GÜLENDAM BAGIROVA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST. YÜKSEK LİSANS TEZİ İSTANBUL-2016

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

FANCONİ ANEMİLİ OLGULARDA İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE TARANMASI VE MUTASYONLARIN SAPTANMASI

GÜLENDAM BAGİROVA

DANIŞMAN
PROF. DR. ZEHRA OYA UYGUNER

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Gülendam BAGİROVA tarafından Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER 'in danışmanlığında hazırlanan ''Fanconi Anemili Olgularda İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Taranması ve Mutasyonların saptanması'' başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 26/08/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak.
Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Doç. Dr. Birsen KARAMAN
İ.Ü. Tıp Fak Tıbbi Genetik A.D.

Prof. Dr Ayhan DEVİREN
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biy. A.D

Prof. Dr. Esra BATTALOĞLU
Boğaziçi Üniversitesi Fen – Edb. Fak.
Moleküler Biyoloji ve Genetik A.D.

Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER
İ.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Genetik A.D.
(Danışman)

BEYAN

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

GÜLENDAM BAGİROVA

İTHAF

Annem'e ve Babam'a...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımı yakından takip eden ve yardımlarını esirgemeyen, sevgili tez danışman hocam sayın *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e,

Her zaman yol gösterici olan, bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam sayın *Prof.Dr. Seher BAŞARAN*'a,

Tezimin başlangıcından bitimine kadar manevi desteğini hissettiren, eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım sevgili hocam sayın *Doç.Dr. Birsen KARAMAN*'a,

Özellikle yeni nesil dizileme çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında yanımda olan, abim olarak gördüğüm sayın *Dr. Güven TOKSOY*'a,

Çalışma grubumuzun oluşturulması ve olgu değerlendirilmesi aşamasında yardımcı olan sayın *Uzm. Dr. Şahin AVCI*'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, üzerimde emeği olan tüm İ.Ü İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı poliklinik ve laboratuvar *çalışanları*'na,

Destek ve önerileri ile her zaman yanımda olan, hayatımda oldukları için mutluluk duyduğum *akraba* ve *arkadaşlarım*'a,

Mutlu olmam adına elinden gelenin fazlasını sabır ve sevgi ile yapan *canım ailem*'e,

sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 52556

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. DNA Tamir Mekanizmaları 3
2.1.1. Tek Sarmal Kırıklarının Tamiri (TSKT) 4
2.1.1.1. Baz Eksizyon Tamiri (BET) 4
2.1.1.2. Yalnış Eşleşme Tamiri (YET) 4
2.1.1.3. Nükleotid Eksizyon Tamiri (NET) 4
2.1.2. Çift Sarmal Kırıklarının Tamiri (ÇSKT) 5
2.1.2.1. Homolog Rekombinasyon (HR) 5
2.1.2.2. Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi (HOUB) 5
2.2. Kemik İliği Yetmezliği İle Giden Genetik Sendromlar 5
2.2.1. Diskeratozis Konjenita (DK) 7
2.2.2. *Shwachman-Diamond* Sendromu (SDS) 8
2.2.3. *Diamond-Blackfan* Anemisi (DBA) 8
2.2.4. Ağır Konjenital Nötropeni (AKN) 9
2.2.5. Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (KAT) 9
2.2.6. Radius Yokluğu İle Giden Trombositopeni (TAR) 9
2.3. Fanconi Anemisi (FA) 10
2.3.1. FA'nın Klinik Bulguları 10
2.4. Fanconi Anemisi/Meme kanseri yolağı (FA/BRCA yolağı) 12

2.4.1. FA/BRCA yolağının esasları 12
2.4.2. FA/BRCA Yolağının Sitokinezdeki Rolü.....15
2.5. FA İle İlişkili Genler.....16
2.5.1. Çekirdek Kompleksini Oluşturan Proteinleri Kodlayan Genler 16
2.5.1.1. FA Komplementasyon Grubu A (MIM#227650) – *FANCA* Geni.....16
2.5.1.2. FA Komplementasyon Grubu G (MIM#614082) – *FANCG* Geni 17
2.5.1.3. FA Kompementasyon Grubu B (MIM#300514) – *FANCB* Geni 17
2.5.1.4. FA Komplementasyon Grubu L (MIM#614083) – *FANCL* Geni 18
2.5.1.5. FA Komplementasyon Grubu C (MIM#227645) – *FANCC* Geni.....19
2.5.1.6. FA Komplementasyon Grubu E (MIM #600901) – *FANCE* Geni 19
2.5.1.7. FA Komplementasyon Grubu F (MIM#603467) – *FANCF* Geni 20
2.5.2. Nüklear Kompleksinin DNA'nın Hedeflerine Bağlaması İçin Gereken Proteinler.....20
2.5.2.1. FA Komplementasyon Grubu M – *FANCM* Geni 20
2.5.3. FANCD2 ve FANCI- monoubikutinleşen birimler 20
2.5.3.1. FA Komplementasyon Grubu D2 (MIM#227646) – *FANCD2* Geni 20
2.5.3.2. FA Komplementasyon Grubu I (MIM#609053) – *FANCI* Geni 21
2.5.4. DNA Tamirinde Görev Alan FA Komplementasyon Grubları.....21
2.5.4.1. FA Komplementasyon Grubu D1 (MIM#605724) – *FANCD1* (*BRCA2*) Geni.....22
2.5.4.2. FA Komplementasyon Grubu J (MIM#609054) – *FANCJ* (*BRIP1*) Geni ..22
2.5.4.3. FA Komplementasyon Grubu N (MIM #610832) - *FANCN* (*PALB2*) Geni23
2.5.4.4. FA Komplementasyon Grubu O (MIM#613390) – *FANCO* (*RAD51C*) Geni 23
2.5.4.5. FA Komplementasyon Grubu P (MIM #613951) – *FANCP* (*SLX4*) Geni ..23
2.5.4.6. FA Komplementasyon Grubu Q (MIM#615272) – *FANCQ* (*ERCC4*) Geni 24
2.5.4.7. X-*Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 2* Geni (*XRCC2*).....24
2.6. FA'da Tanı.....25
2.6.1. Sitogenetik Tanı.....26
2.6.2. FA'da Moleküler Genetik Tanı.....26
2.7. FA'da Genetik Danışma 28

2.8. FA'da Tedavi 29
2.9. Moleküler Yöntemler 31
2.9.1. DNA Dizileme Yöntemleri 31
2.9.1.1. Sanger Dizileme 31
2.9.1.2. Yeni Nesil Dizileme 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 46
3.1. Çalışma grubu 46
3.2. Olguların Değerlendirilmesi 46
3.2.1. Klinik değerlendirmeler 46
3.2.2. Moleküler Analizler 46
3.2.2.1. DNA eldesi 46
3.2.2.2. DNA Kalite Araştırması ve Seyreltme İşlemleri 47
3.2.2.3. Qubit® 3.0 Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü 47
Yeni Nesil Dizileme (YND) 47
3.2.2.4. YND paneli için hedef bölgelerin belirlenmesi ve primer tasarımı 48
3.2.2.5. Hedef bölgelere ait Hot Spot dosyasının oluşturulması 49
3.2.2.6. Kütüphane hazırlanması 49
3.2.2.7. Taslak (*Template*) Hazırlanması 55
3.2.2.8. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi 59
3.2.2.9. Veri Analizi 61
3.2.2.10. YND İle Saptanan Değişimlerin SD İle Doğrulanması 61
4. BULGULAR 65
5. TARTIŞMA 79
KAYNAKLAR 86
HAM VERİLER 93
FORMLAR 94
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 94
ETİK KURUL KARARI 99
PATENT HAKKI İZNİ 102
TELİF HAKKI İZNİ 103
ÖZGEÇMİŞ 104

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: KİYGS'nin klinik ve laboratuar özellikleri – Dokal ve Vulliamy (12)'den değiştirilerek. 6
Tablo 2-2: FA'nın klinik bulguları - (36)'dan. 11
Tablo 2-3: FA fenotipi ile ilişkili genler, mutasyon oranları ve moleküler test stratejisi - (30)'dan. 27
Tablo 2-4: Ion Torrent platformunda kullanılan çipler ve özellikleri - (109)'dan. 36
Tablo 2-5: Ion Torrent sisteminin dizileme alınan ion sinyallerinin ham verilere dönüştürülmesi için kullandığı parametreler - (113)'ten. 38
Tablo 2-6: YND platformlarının maliyet, kapasite ve işlem süresi boyutları ile karşılaştırılması – Quail (103)'ten. 44
Tablo 3-1: RID ile giden sendromlar için oluşturulan YND panelinde yer alan genler. 48
Tablo 3-2: 2X primer havuzu için hazırlanan miks. 50
Tablo 3-3: PZR solusyonları. 50
Tablo 3-4: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı 50
Tablo 3-5: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı 51
Tablo 3-6: Örnek barkod adaptör karışımı 51
Tablo 3-7: Barkod-adaptör ligasyon solusyonu 52
Tablo 3-8: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı 52
Tablo 3-9: Kantitatif PZR için örnek başına hazırlanan karışım 54
Tablo 3-10: Gerçek zamanlı PZR için kullanılan termal döngü programı 54
Tablo 3-11: Taslak hazırlanmasında kullanılan kitler ve içerikleri - (116)'dan. 55
Tablo 3-12: Emülsiyon PZR için hazırlanan amplifikasyon çözeltisi 56
Tablo 3-13: Sekiz Kuyulu Plağın Doldurulması. 58
Tablo 3-14: Dizileme Planı. 59
Tablo 4-1: YND çalışmalarının metrik sonuçları. 66
Tablo 4-2: Olgu grubumuzda sonuçları pozitif saptanan aileler. 74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: KİYGS ile ilişkili yolaklar - Dokal ve Vulliamy (12)'den değiştirilerek. 7
Şekil 2-2: FA/BRCA yolağı – Kee (2)'den. 13
Şekil 2-3: FA/BRCA yolağı modeli – de Winter ve Joenje (42)'den. 14
Şekil 2-4: *FANCA* geninin referans transkript varyantı - (51)'den. 17
Şekil 2-5: *FANCG* geninin referans transkript varyantı - (53)'ten. 17
Şekil 2-6: *FANCB* geninin referans transkript varyantı - (54)'ten. 18
Şekil 2-7: *FANCL* geninin referans transkript varyantı - (56)'dan. 18
Şekil 2-8: *FANCC* geninin referans varyantı - (60)'tan. 19
Şekil 2-9: *FANCE* geninin referens transkript varyantı - (64)'ten. 19
Şekil 2-10: *FANCF* geninin transkript varyantı - (65)'ten. 20
Şekil 2-11: *FANCM* geninin referans transkript varyantı - (67)'den. 20
Şekil 2-12: *FANCD2* geninin referans transkript varyantı - (68)'den. 21
Şekil 2-13: *FANCI* geninin referans transkript varyantı - (70)'ten. 21
Şekil 2-14: *FANCD1* geninin referans transkript varyantı - (71)'den. 22
Şekil 2-15: *BRIP1* geninin referans transkript varyantı - (73)'ten. 22
Şekil 2-16: *PALB2* geninin referans transkript varyantı - (76)'dan. 23
Şekil 2-17: *RAD51C* geninin referans transkript varyantı - (78)'den. 23
Şekil 2-18: *SLX4* geninin referans transkript varyantı - (79)'dan. 24
Şekil 2-19: *ERCC4* geninin referans transkript varyantı - (83)'ten. 24
Şekil 2-20: *XRCC2* geninin referans transkript varyantı - (86)'dan. 25
Şekil 2-21: Ion Torrent ve Miseq platformlarında taslak hazırlama aşamaları – Grada (108)'den. 33
Şekil 2-22: a) *Ion Torrent Ion Chip*'in yapısı. b) Uygun bazın diziye girmesi sonucu H^+ salınımı – Mardis (102)'den. 35
Şekil 2-23: İonogram görüntüsü. 37
Şekil 2-24: Okuma özeti ve uzunluk bilgileri. 39
Şekil 2-25: Haritalama sonuçları. 40
Şekil 2-26: Kapsam ve derinlik analizinin sonuçları. 40
Şekil 2-27: Olguya özgü kapsam ve derinlik bilgileri. 41
Şekil 2-28: Varyant isimlendirme bilgileri. 43
Şekil 3-1: Kütüphane hazırlamanın basamakları - (109)'dan. 53

Şekil 3-2: *Ion OneTouch 2* cihazı. 57
Şekil 3-3: *Ion OneTouch™ ES* cihazı. 59
Şekil 3-4: Ion PGM™ dizileme cihazı. 60
Şekil 4-1: Aile FA-1, fotoğraflar ve aile ağacı. 68
Şekil 4-2: Aile FA-1, moleküler sonuçlar. 69
Şekil 4-3: Aile FA-2, fotoğraflar ve aile ağacı. 70
Şekil 4-4: Aile FA-2, moleküler sonuçlar. 71
Şekil 4-5: Aile FA – 3, fotoğraflar ve aile ağacı. 72
Şekil 4-6: Aile FA – 3, moleküler sonuçlar. 73

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AA : Aplastik Anemi
aCGH : Array Comparative Genomic Hybridization
AKN : Ağır Konjenital Nötropeni
AML : Akut Miyeloid Lösemi
AS : Amniosentez
BAM : Binary Alignment Map
BET : Baz Eksizyon Tamiri
BGG : Büyüme Gelişme Geriliği
cDNA : Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
ÇSK : Çift Sarmal Kırıkları
ÇSKT : Çift Sarmal Kırıklarının Tamiri
DBA : *Diamond-Blackfan* Anemisi
DEB : Diepoksibutan
del/dup : delesyon/duplikasyon
ddNTP : Dideoksinükleotid
dk : dakika
DK : Diskeratozis Konjenita
DKÇ : Doğuştan Kalça Çıkığı
FA : Fanconi Anemisi
FA/BRCA : Fanconi Anemisi/Meme Kanseri
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GH : Gebelik Haftası
GVHD : Graft Versus Host Disease
HGMD : Human Gene Mutation Database (İnsan Mutasyon Veri Bankası)
HKHT : Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
HOUB : Homolog Olmayan Uçların Birleştirmesi
HR : Homolog Rekombinasyon
IGV : Integrative Genomics Viewer
ISP : Ion Sphere Particles
IR : Ion Reporter

KAT : Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni
KİT : Kemik İliği Transplantasyonu
KİYGS : Kemik İliği Yetmezliği ile giden Genetik Sendromlar
MKA/MR : Multipl Konjenital Anomaliler/Mental Retardasyon
MLPA : Multiplex Ligation Probe Amplification
MMC : Mitomisin C
MSD : Miyelodisplastik Sendrom
NET : Nükleotid Eksizyon Tamiri
NKS : Nijmegen Kırık Sendromu
NTM : Nitrojen Mustard
OD : Otozomal Dominant
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
OR : Otozomal Resesif
RID : Radiyal Işın Defektleri
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
SD : Sanger Dizileme
SDS : *Shwachman-Diamond* Sendromu
sn : saniye
TAR : Radius yokluğu ile giden trombositopeni
TED : Tüm Ekzom Dizileme
TGD : Tüm Genom Dizileme
TLS : Translezyon Sentezi
TMAP : Torrent Mapping Alignment Program
TSKT : Tek Sarmal Kırıklarının Tamiri
USG : Ultrasonografi
VCF : Variant Call Format
YET : Yalnış Eşleşme Tamiri
YND : Yeni Nesil Dizileme
XBR : X'e Bağlı Resesif

ÖZET

Bagirova, G. Fanconi anemili olgularda ilişkili genlerin yeni nesil dizileme teknolojisi ile taranması ve mutasyonların saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Programı, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2016.

Fanconi anemisi (FA), multipl konjenital anomaliler, hematolojik bulgular, kemik iliği yetmezliği ile karakterize, malignite riski yüksek ve özgün sitogenetik bulguları olan nadir genetik bir hastalıktır. Moleküler patogenezi, Fanconi anemisi/meme kanseri (FA/BRCA) yolağında, DNA tamir mekanizmasının işlevinde rol alan genlerden herhangi birinde, biallelik mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Günümüzde bu yolakta FA ilişkili 17 gen tanımlanmıştır. Yapılan incelemeler, FA genlerindeki mutasyonların etnik farklılıkların da olduğu heterojen bir dağılımda olduğunu göstermektedir. Klinik heterojenite tanı ve tedavide multidisipliner bir yaklaşımı gerektirmektedir. FA'nın sitogenetik tanısında, hücre kültüründe çapraz bağ yapıcı ajanların varlığında kromozom bulgularının incelenmesi gerekmektedir. Moleküler tanısında ise FA altgruplarını oluşturan, en az 15 genin incelenmesi önerilmektedir. Genel olarak dünyadaki sıklığının yaklaşık 1/350.000 olduğu tahmin edilmektedir. FA'nın geniş klinik spektrumu, çok sayıda gende mutasyonlarının dağınık yerleşimli saptanması ve "*hotspot*" gen bölgelerin olmaması moleküler tanıyı zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, FA klinik tanısı alan 11 olgu, FA ilişkili 17 genin kodlayan ve diğer ilişkili bölgelerini kapsayan, ekibimizce tasarlanmış Yeni Nesil Dizileme (YND) hedef gen paneli ile *Ion Torrent* platformunda incelendi. On bir ailenin üçünde 2 farklı gende (*FANCA, BRIP1*) dört farklı mutasyon saptandı. Bu mutasyonların üçü daha önce tanımlanmış, biri tanımlanmamış (*BRIP1*, NM_032043.2, c.761_764delAGCA) idi. Çalışmamızın mutasyon saptama oranı tüm aileler değerlendirildiğinde %27,27, sadece kromozom kırık testi pozitif gözlenen aileler değerlendirildiğinde ise %75 oldu. Saptanan değişimler ve panelimizin kapsamadığı bölgeler Sanger dizileme yöntemi ile araştırıldı. FA'lı olgularda, ilişkili 17 genin ülkemizdeki mutasyon sıklıklarının belirlenmesi, genetik danışmaya yararlı bilgiler edinilmesi, genotip-fenotip çalışmalarına katkı sağlanması, hastaların klinik takip ve prognozunda hasta yararına bilgiler edinilmesi beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Fanconi Anemisi, Yeni Nesil Dizileme teknolojisi, Ion Torrent Platformu, *FANCA, BRIP1*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 52556

ABSTRACT

Bagirova G. 2016. Screenning Fanconi anemia assosiated genes with next generation sequencing technology in FA patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Istanbul Medical Faculty, Medical Genetics Department, Master Thesis on Genetics, Istanbul, 2016

Fanconi anemia (FA) is a rare syndrome characterized by bone marrow failure, malformations, cancer predisposition and specific cytogenetic findings, mostly associated with bi-allelic mutations in any of the genes involved in DNA repair mechanisms of the Fanconi anemia/breast cancer (FA/BRCA) pathway, where presently 17 genes are identified. The diagnosis and treatment of clinical heterogeneity requires a multidisciplinary approach. For cytogenetic diagnosis of FA, cell cultures must be examined for chromosomal findings with DNA crosslink agents. For molecular diagnosis, at least 15 genes must be examined. General prevalence in the world is roughly 1/350,000. Due to its high clinical heterogeneity, scattered distribution of mutations along the genes, and the absence of hot spots, complicates its genetic diagnosis. In this study, we investigated the probands with the clinical diagnosis of FA by in-house-designed next generation sequencing (NGS) targeted gene panel, for use in Ion Torrent platform. The panel designed covers all the coding sequences of 17 FA associated genes. Four different mutations in two genes (*FANCA, BRIP1*) are detected, in three out of 11 families. One of these mutations was novel (*BRIP1*, NM_032043.2, c.761_764delAGCA). Mutation detection rate, for total number of cases, was 27,27%, furthermore if only cases with positive chromosome breakage test are included, then the rate increased up to 75%. Mutations were confirmed and targeted regions not covered by the panel were screened with Sanger sequencing. Molecular genetic diagnosis of FA will benefit patients and their families through early diagnosis, genetic counseling, precursory treatment and, ideally, prenatal diagnosis.

Key Words: Fanconi Anemia, Next Generation Sequencing technology, Ion Torrent Platform, *FANCA, BRIP1*

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 52556

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fanconi anemisi (FA), ilk kez 1927 yılında İsviçreli Pediatrist Guido Fanconi tarafından mutipl konjenital anomalili üç erkek kardeşte tanımlandı. 1960'lı yıllarda Fanconi'nin tanımladığı klinik bulgular ışığında hastalığın kromozom instabilite sendromu olduğu, kemik iliği yetmezliği ve kansere yatkınlık gösterdiği açıklandı (1).

FA heterojen klinik tablo ile karakterize malignite riski yüksek kromozom instabilite sendromlarından biridir. Klinik bulguları, radius ve başparmak anomalileri, genitoüriner sistem malformasyonları, büyüme gelişme geriliği (BGG), zihinsel yetmezlik, deri bulguları, konjenital kalp anomalileri, dismorfizm (mikrosefali, strabismus, mikroftalmi, kulak anomalileri), işitme kaybı, hematolojik bulgular (anemi, nötropeni, trombositopeni, retikülositopeni, pansitopeni, kanama ve lösemi) ve kemik iliği yetmezliğidir. Olguların ~%70-75'i bu bulgularla klinik tanı alırken ~%25-30'unda herhangi bir fenotip gözlenmemektedir. Somatik mozaisizm, FA'nın tanısına ek zorluklar getirmektedir. Hastalık, Fanconi anemisi/meme kanseri (FA/BRCA) yolağında, DNA tamir mekanizmasının işlevinde rol alan genlerden herhangi birinde, biallelik mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Günümüzde bu yolakta FA ile ilişkisi tanımlanmış 17 gen (*FANCA, FANCC, FANCG, FANCB, FANCD2, FANCM, BRCA2, FANCL, BRIP1, PALB2, FANCE, FANCF, FANCI, RAD51C, SLX4, XRCC2, ERCC4*) bildirilmiştir. FA'lı olguların %90'ında, bu genlerden 8'inde (*FANCA, FANCC, FANCG, FANCB, FANCL, FANCM, FANCE, FANCF*) mutasyon gösterilmektedir (2). Yapılan incelemelerde, olguların %60'ında *FANCA*, %10-15'ine *FANCC*, %10'unda *FANCG* ve %15'inde ise diğer ilişkili genlerde mutasyonlar saptanmakta, bu oranlar etnik farklılıklar göstermekte ancak "*hotspot*" olarak hedef gösterilebilecek gen bölgeleri bulunmamaktadır. Kalıtım şekli bütün ilişkilendirilmiş genlerde otozomal resesif, ancak *FANCB*'de X'e bağlı resesifdir. Tedavi ve semptomatik sorunların giderilmesi için multidisipliner yaklaşım ile kan hücre sayısının arttırılmasına yönelik çeşitli farmakolojik stratejiler izlenmekte, hematopoetik kök hücre transplantasyonu, dismorfizm için düzeltme operasyonları yapılmaktadır. FA tanısının ilk aşamasında, hücre kültüründe diepoksibutan (DEB), mitomisin C (MMC) ve nitrojen mustard (NTM) gibi çapraz bağ yapıcı ajanların varlığında kromozom bulgularının incelenmesi gerekmektedir. Moleküler tanısında ise FA altgruplarını oluşturan, en az 15 genin farklı tekniklerle incelenmesi önerilmektedir.

Türkiye'de, FA diğer hematolojik ve onkolojik bulgularla seyreden sendromlar arasında en sık görüleni olsa da sıklığı konusunda bir bilgi bulunmamakta, ancak akraba evliliğinin yaygın olması, etkilenmiş olgu sayısının da yüksek olacağını düşündürmektedir. Genel olarak dünyadaki sıklığının yaklaşık 1/350.000, taşıyıcı sıklığının 1/300 olduğu tahmin edilmektedir.

FA'nın yüksek klinik ve genetik heterojenliği, kesin tanı için FA'dan sorumlu 17 genin eş zamanlı ve kısa sürede dizilenmesini gerektirmekte ve bu durumda hedef genlerin Yeni Nesil Dizileme (YND) tabanlı teknolojiler ile dizilenmesi en ekonomik ve hassas yaklaşımı sunmaktadır.

Bu çalışmada, ayırıcı tanısında FA düşünülen olgularda; ilişkili 17 genin tüm kodlayan ekzon, ekzon-intron sınırları ile bilinen diğer tüm mutasyon tanımlı bölgelerine özgün olarak tasarlanan YND panel primeri ile *Ion Torrent* platformunda inceleme yapıldı. Bulunan değişimlerin doğrulanması ve panelimizin kapsayamadığı bölgelerin taranması Sanger dizileme yöntemi ile gerçekleştirildi.

Çalışmamızın Türkiye'de FA'lı olgularda, ilişkili tüm genlerin (17 gen) bir arada çalışıldığı ilk araştırma olması nedeniyle, ülkemizde mutasyonların sıklıkları konusunda genetik danışmaya yararlı olacak bilgiler edinilmesi, genotip-fenotip ilişkileri üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlaması, hastaların klinik takip ve prognozu konusunda hasta yararına bilgiler edinilmesi beklenmektedir. Bu bilgiler ışığında yeni tanı ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve bu bilgilerin yeni çalışmalara öncülük etmesi umulmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Fanconi anemisi en sık görülen kalıtsal kemik iliği yetmezliği sendromudur. Bu sendromun klinik bulguları büyük farklılıklar gösterir ve sıklıkla ekstremite anomalileri, cafè au lait lekeleri, kısa boy gibi konjenital anomaliler de gözlenir. Fenotipik çeşitlilik genetik heterojenite ile açıklanmaktadır. Sendromun en önemli bulgusu olan ilerleyici kemik iliği yetmezliği genellikle 20'li yaşlarda başlar ve tanı genellikle pansitopeni bulgusu ile konur. Kemik iliği yetmezliğinin endojenik aldehidle indüklenmiş toksisite ve p53 aktivasyonuna bağlı DNA tamir mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

2.1. DNA Tamir Mekanizmaları

İnsan hücreleri her zaman DNA hasarı yaratabilecek ve genetik instabiliteye yol açabilecek ekzojenik ve endojenik ajanlara maruz kalmaktadır. Baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift sarmal kırıkları, DNA – protein çapraz bağları ve bazını kaybetmiş zincir oluşumları DNA hasarları olarak değerlendirilmektedir. Endojen ajanlara örnek olarak spontan hidroliz, deaminasyon, hücre metabolizması sonucunda oluşan reaktif ürünler, alkillenme gösterilebilir. Tüm hücrelerde günde ~10,000 kez spontan hidroliz olmaktadır. Spontan hidroliz sonucunda DNA'da baz ve deoksiriboz arasında bir köprü oluşur (bazsız bölgeler) ki, bu da DNA hasarlarının en basit örneklerindendir. Ek olarak, deaminasyon sonucunda sitozinin urasile, adeninin hipoksantine ve guaninin ksantine dönüşmesi sık rastlanan DNA hasarlarındandır. Normal hücre metabolizması sonucunda oluşan maddelerden reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri de DNA'da baz modifikasyonları, tek ve çift sarmal kırıkları, DNA – protein çapraz bağları gibi hasarlar oluşturabilirler. Endojen ürünlerin yanısıra, DNA ultraviole ışınları, ionik radyasyon ve kimyasal ürünler gibi ekzojen ajanlara da maruz kalarak baz modifikasyonları ve çift sarmal kırıkları gibi hasarlar görülebilir (3-5). Bu hasarların onarılmasında etkin tamir mekanizmaları şunlardır:

1. Tek sarmal kırıklarının tamiri: (a) baz eksizyon tamiri (BET), (b) yalnış eşleşme tamiri (YET), (c) nükleotid eksizyon tamiri (NET);
2. Çift sarmal kırıklarının tamiri: (a) homolog rekombinasyon (HR) ve (b) homolog olmayan uçların birleştirilmesi (HOUB) (4).

2.1.1. Tek Sarmal Kırıklarının Tamiri (TSKT)

2.1.1.1. Baz Eksizyon Tamiri (BET)

BET mekanizmasında bir çok protein görev alarak baz modifikasyonlarını tamir eder. Örneğin, DNA glikosilazlar bazlarla deoksirobozlar arasında oluşmuş N glikosidik köprü neticesinde ortaya çıkan bazsız bölgelerin tamirinde görevlidir. Bazsız bölgelerin tamirinde görev alan diğer enzim apurinik/apirimidinik endonükleaz 1 (*APE1*)'dir. Bu enzimlerin hasar oluşan bazı kesip çıkartarak oluşturdukları boşluğu, DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimleri doldurur (3).

2.1.1.2. Yalnış Eşleşme Tamiri (YET)

YET, *E.coli*'den insana kadar bütün canlılar arasında yüksek düzeyde korunmuş bir DNA tamir mekanizması olup, DNA polimerazın *proofreading* aktivitesinden kaçarak yanlış yerleştirilen bazların ve tekrarlayan baz bölgelerinde DNA polimeraz hatası olarak ortaya çıkan insersiyon ve delesyon noktalarının tamirinde önemli rol oynar. YET mekanizması üç aşamada çalışır:

1. Tanıma – yanlış yerleştirilen bazın *MutS* proteini tarafından tanınması,
2. Kesip çıkarma – yanlış eşleşen baz/bazların *MutL* proteini tarafından kesip çıkarılması,
3. Sentez – kesip çıkarma sonucu ortaya çıkan boşluğun DNA polimerazın *PCNA* (replikasyon faktör C) ve *RPA* (replikasyon faktör A) proteinleri ile birlikte yeniden sentez yapması ve parçaların DNA ligaz tarafından doldurulması (6).

2.1.1.3. Nükleotid Eksizyon Tamiri (NET)

NET, BET'e benzeyen, ancak daha kompleks bir tamir mekanizması olup pirimidin heterodimerlerini, UV ışınlarına maruz kalma sonucu ortaya çıkan DNA hasarlarını ve DNA sarmal içi çapraz bağlarını tanıma ve tamirinde görevlidir. NET 30'a kadar proteini içeren, DNA hasarını tanıma, kesip çıkarma, DNA'nın yeniden sentezi ve ligasyonu aşamalarından oluşan çok basamaklı bir reaksiyondur (7).

2.1.2. Çift Sarmal Kırıklarının Tamiri (ÇSKT)

Çift sarmal kırıkları (ÇSK) genetik materyal için en zarar verici hasarlar olup tamir edilmediği sürece veya yetersiz tamir edildiğinde delesyonlara, kromozom yeniden düzenlenmelerine yol açar. ÇSKT iki önemli fonksiyonla gerçekleşir: homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (HOUB) (8).

2.1.2.1. Homolog Rekombinasyon (HR)

HR önemli DNA tamir mekanizmalarından biri olup üç faza ayrılır: presinapsis – heterotrimerik *MRN* protein kompleksi (*Mre11-Rad50-Nbs1*) ile ÇSK uçlarının 3' ucundan sarkan uçlar haline dönüştürülmesi; sinapsis - *RAD51* ve paralogları ile homolog bulunması (kardeş kromatid) ve birçok helikaz, rekombinaz, ligaz proteinlerinin yardımı ile DNA sentezinin gerçekleştirilmesi (Holliday ilmiği); postsinapsis – sentezlenen DNA sarmallarının ayrışması, DNA tamirinin tamamlanması (4, 5).

2.1.2.2. Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi (HOUB)

HOUB *Ku70/Ku80* heterodimerinin ÇSK'ını tanıması ile başlar. Ku–DNA kompleksinin oluşması DNA'ya bağlı kinaz proteinin kırık bölgesine bağlanmasına neden olur ve kırıkların modifikasyonu gerçekleşir. Modifikasyona uğrayan uçlarda eksik nükleotidler polimerazların yardımı ile doldurulur ve ligazla birleştirilir (4, 9).

2.2. Kemik İliği Yetmezliği İle Giden Genetik Sendromlar

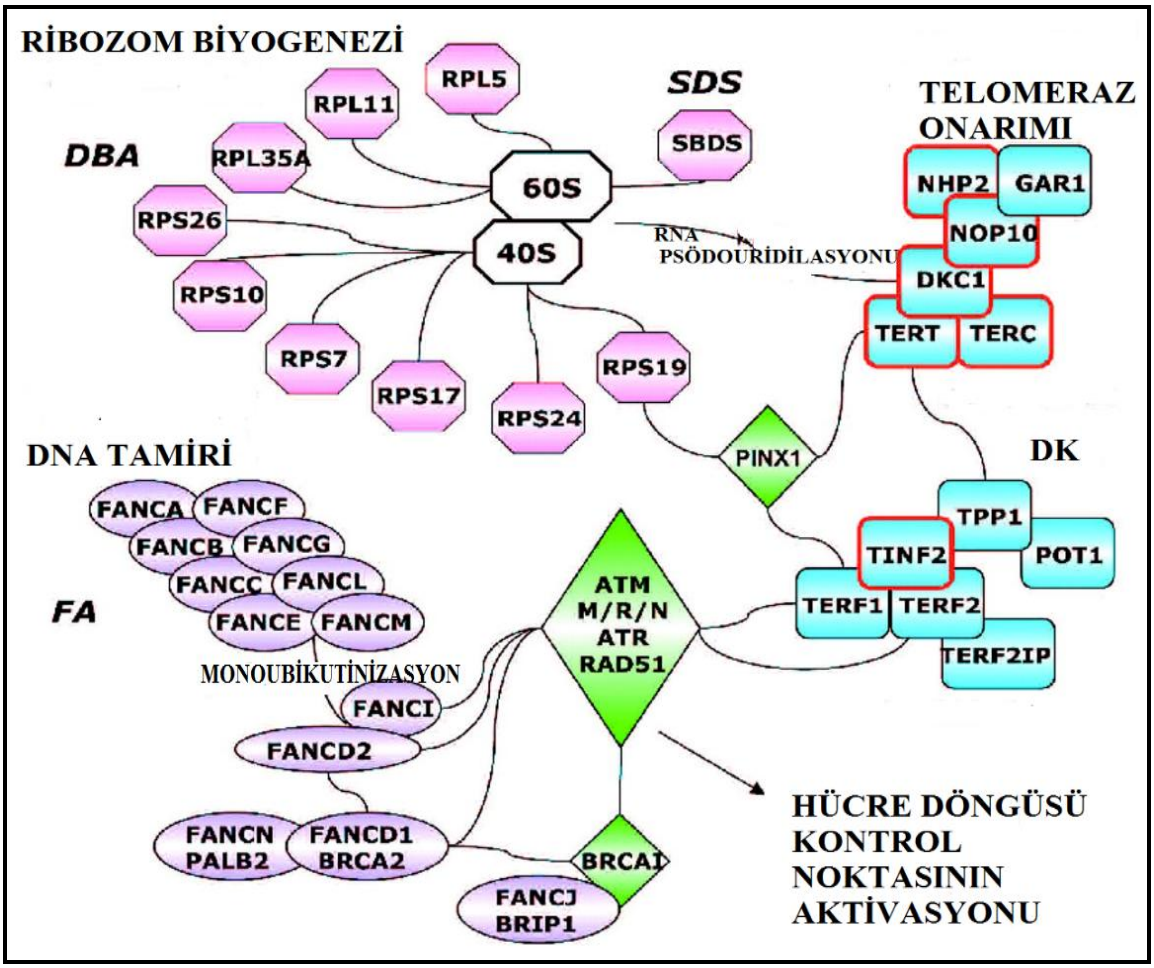
Kemik iliği yetmezliği ile giden genetik sendromlar (KİYGS) genellikle çocukluk evresinde ortaya çıkan heterojen bir hastalık grubudur. En yaygın bilinenleri *Fanconi* anemisi (FA), Diskeratozis konjenita (DK), *Shwachman-Diamond* sendromu (SDS), *Diamond-Blackfan* anemisi (DBA), Ağır konjenital nötropeni (AKN), Konjenital amegakaryositik trombositopeni (KAT), Radius yokluğu ile giden trombositopeni (TAR) sendromudur. KİYGS'ların klinik ve laboratuar özellikleri tablo 2.1'de sunulmaktadır (10-12).

Tablo 2-1: KİYGS'nin klinik ve laboratuar özellikleri – Dokal ve Vulliamy (12)'den değiştirilerek.

	FA	**DK**	**SDS**	**DBA**	**KAT**	**AKN**	**TAR**
Kalıtım şekli	OR, XBR	OD, OR, XBR	OR	OR, OD	OR	OD	OR
Fizik muayene bulguları	+	+	+	+	Nadir	Nadir	+
Kemik iliği yetmezliği	AA (~%90)	AA (~%80)	AA (~%20)	KHA	Meg	Nöt	Tro
Kısa telomerler	+	+	+	+	-	-	?
Kanser	+	+	+	+	+	+	+
Kromozom instabilitesi	+	+	+	?	?	?	?
İlişkili Bilinen genler	13	6	1	9	1	3	-

OR-otozomal resesif, OD- otozomal dominant, XBR-X'e bağlı resesif, AA-aplastik anemi, KHA- kırmızı hücre anemisi, Meg- düşük megakaryosit sayısı, Nöt-düşük nötrofil sayısı, Tro – düşük tombosit sayısı

KİYGS insan fizyolojisinde önemli olan yolaklarla ilişkili proteinlerin işlev bozuklukları sonucu ortaya çıkmaktadır; örneğin, FA, DNA tamirindeki FA/BRCA yolağı; DK, telomeraz onarımı; SDS ve DBA ise ribozom biyogenezi ile ilişkili bozukluklarla ilişkilidir. Şekil 2-1'de bu yolaklar şematize edilmiştir (11).



Şekil 2-1: KİYGS ile ilişkili yolaklar - Dokal ve Vulliamy (12)'den değiştirilerek.

KİYGS ile ilişkili üç yolak; RP – ribozomal protein, FANC – FA komplementasyon grubu, DKC1 – DK 1, diskerin, NOP10 – nükleolar protein 10 homoloğu, NHP2 – non histon ribonükleoprotein 2 homoloğu, GAR1 – glisin ve arjinin zengin ribonükleoprotein 1 homoloğu, TERF1 – telomerik tekrar bağlanma faktörü 1, TERF2 – telomerik tekrar bağlanma faktörü 2, TINF2 TERF1 – ilişkili nüklear faktör 2; TERF2IP - TERF2 ilişkili protein (RAP1); POT1 telomer koruyucusu 1 homoloğu, TPP1 - TIN2 ilişkili protein 1 (ACD, adrenokortikal displazi homoloğu); PINX1 - PIN2 (TERF1) ilişkili protein; ATM - mutasyona uğramış ataksi telejiektazi; M/R/N = MRE11/RAD50/NBS1, mayotik rekombinasyon 11 homolog A/radyasyon rezistansı 50 homoloğu/Nijmegen kırık sendromu 1; ATR – ataksi telenjiektazi ve Rad3 ilişkili (Seckel sendromu); BRCA1 – meme kanseri 1, BRIP1 - BRCA1 ilişkili protein C-uç helikazı 1; PALB2 - BRCA2 partneri ve yerleştiricisi

2.2.1. Diskeratozis Konjenita (DK)

Diskeratozis konjenita (DK), çocukluk çağında tanı alması zor olan, klinik bulguların yaşa bağlı olarak arttığı ve genelde trombositopeni veya pansitopeni ile ortaya çıkan bir KİYGS'dir. Olguların yarısından çoğu 15 yaşın üzerinde tanı almaktadır. Sendromun deri pigmentasyon bozukluğu, displastik tırnaklar ve lökoplaki triadı oluşturan üç kardinal bulgusu vardır ve bunlara somatik bulgular eşlik etmektedir.

DK'da, malignite olarak baş, boyun, özofagus, kolon ve anus karsinomaları gibi solid tümörler sık olarak gözlenmektedir. Günümüzde DK ile ilişkili dört gen tanımlanmıştır: *DCK1* (XBR), *TERC* ve *TERT* (OD), *NOP10* (OR). Bu genler hücre bölünmelerinde kromozom uçlarını kısalmadan koruyan telomer koruma yolağında görev alırlar (12-16).

2.2.2. *Shwachman-Diamond* Sendromu (SDS)

Shwachman-Diamond sendromu (SDS) OR bir hastalık olup, en önemli klinik bulguları büyüme geriliği, malabsorbsiyon ve aşırı yağlı dışkı görülmesidir. Olguların bir çoğunda boy kısalığı ve öğrenme güçlüğü, AA, miyelodisplastik sendrom (MSD) veya lösemi gözlenir. SDS çocukluk çağında, pankreas yetmezliği ve hematolojik bulgularla tanı alır. SDS'li olgularda, kemik iliği hücrelerinde sıklıkla kromozom 7 [monozomi 7, der(7) ve i(7q)] ve 20 [del(20q)] ile ilişkili kromozomal anomaliler gözlenir. Olguların ~%95'inde SDS'nin bilinen *SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond syndrome)* geni ve komşusunda yerleşik olan psödogeni ile oluşan konverziyonlar saptanmaktadır (17).

2.2.3. *Diamond-Blackfan* Anemisi (DBA)

Diamond-Blackfan anemisi (DBA) daha çok yenidoğan döneminde ortaya çıkan bir sendrom olup, ileri yaşlarda nadiren gözlenir. Fiziksel bulguları kısa boy, tenar kaslarının yassılaşması, nadiren trifalangeal başparmak, mikroti ve yarık damaktır. Genelde tanı eritroid hipoplazisi, normal lökosit ve trombosit sayısı ile seyreden makrositik anemi ile konulur. Çoğu olguda, ortalama 23'lü yaşlarda lösemi, MDS veya solid tümörler (daha çok osteojenik karsinomalar) ortaya çıkabilir. Olgularda plevral sıvıda kırmızı hücre adenozin deaminaz yükselişi görüldüğünden adenozin deaminaz (ADA) testi tanı amaçlı kullanılabilir, fakat klasik DBA'lı olguların %10'da bu test normal sonuç vermektedir. Günümüzde, ribozom biyogenezi yolağında rol alan ribozomal proteinleri kodlayan iki gende *(RPS19 ve RPS24)* mutasyon saptama oranı yaklaşık %25 olarak bildirilmiştir (18, 19).

2.2.4. Ağır Konjenital Nötropeni (AKN)

Ağır konjenital nötropeni (AKN) erken başlangıçlı nötropeni (~500/µL), piyogenik enfeksiyonlar ve ilik olgunlaşmasının durdurulması gibi bulgulara sahip hastalık grubudur. *Kostmann* tarafından ilk kez tanımlanan bir ailede hastalığın kalıtım şekli OR olarak gösterilmiş ancak daha sonra OD sporadik formları da tanımlanmıştır. Hastalar genelde yenidoğan döneminde tanı alabilse de ağır nötropeni dışında başka bir klinik bulgusunun olmaması ilk başta diğer nötropeni ile giden hastalıkların dışlanmasını gerektirmektedir. Kesin tanıya ulaşmak için her hafta iki kez kan almak şartıyla altı hafta devam eden kan sayımı testi yapılmalıdır. AKN ile ilişkili bulunan mutasyonların %70-90'ı *ELA2*, %2'si *GTI1* genlerinde saptanmaktadır. Çalışmalar, *HAX1* ve *WAS* genlerinin de *AKN* ile ilişkili olduğunu göstermiş ancak bu genlerdeki mutasyon oranları henüz bilinmemektedir (20, 21).

2.2.5. Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (KAT)

Konjenital amegakaryositik trombositopeni (KAT) de AKN gibi fiziksel bulguları olmayan, sadece trombositopeniye bağlı morluklarla giden bir sendromdur. Genelde tanısı yenidoğan döneminde konulmaktadır. KAT'da solid tümörler gözlenmemekte, AA ortalama 5 yaş, AML ise 17 yaşlarında başlamaktadır. Trombopoetin için reseptor görevini alan *MPL* geninin resesif mutasyonlarının KAT etiyopatogenezinde rol aldığı bildirilmektedir (22, 23).

2.2.6. Radius Yokluğu İle Giden Trombositopeni (TAR)

Radius yokluğu ile giden trombositopeni (TAR) sendromu, klinik tanısı kolay, gerek prenatal gerekse de postnatal erken yenidoğan döneminde fark edilen bir hastalıktır. Radius aplazisi, başparmak hipoplazisi ve trombositopeni TAR sendromunun majör bulguları olup kemik ve kalp anomalileri de görülebilmektedir. TAR sendromu prelösemik sendrom olarak değerlendirilmektedir. Uzun süre genetik etyopatogenezi açıklanamayan TAR sendromunda, yeni yapılan bir çalışmada 30 klinik tanılı olgunun tamamında 1q21.1 bölgesinde 200 kb'lık bir mikrodelesyon varlığı saptanması ilişkili genin bu bölgede yer aldığını düşündürmüştür (24-26).

2.3. Fanconi Anemisi (FA)

FA, ilk kez 1927 yılında Guido Fanconi tarafından, konjenital malformasyonlar ve ilerleyici AA'leri olan üç kardeşte tanımlanmıştır. Prevalansı 1:350.000, taşıyıcı sıklığı 1:300 olan bu hastalığın Türkiye'deki sıklığı tam olarak bilinmemekle birlikte, akraba evlilik oranlarının yüksek olması, OR formlarının yüksek oranda olacağını düşündürmektedir. Bazı populasyonlarda (Aşkenazi'ler, İspanyol çingeneleri ve Güney Afrika zencileri) taşıyıcı sıklığı 1:100 olarak bildirilmektedir (27-30).

2.3.1. FA'nın Klinik Bulguları

FA multipl konjenital anomaliler, hematolojik bulgular ve kansere yatkınlıkla karakterize nadir bir genetik hastalıktır. FA'lı olguların önemli bir kısmında çeşitli konjenital anomaliler görülürken, %25-40'ı fiziksel olarak normal olabilmektedir (31). FA'lı çocukların yarısında konjenital iskelet anomalileri ve sıklıkla başparmak veya önkol anomalileri gözlenmektedir. Genellikle başparmak normal olabiliceği gibi küçük (hipoplastik) ya da duplike, radius hipoplazik ya da aplazik olabilir. Olguların büyük bir kısmında endokrin sistem anomalileri vardır. Olguların yaklaşık yarısında büyüme hormonu yetersizliği ve hipotiroidizm nedeniyle boy kısalığı görülmektedir. Olgularda anormal glükoz veya insulin metobolizması nedeniyle, serum insulin düzeyi yüksek olabilir. Olguların %8'i diabetik, %72'si ise insulin değerleri yüksek olarak bildirilmiştir.

FA'nın kliniğinde hemotolojik bulgular önemlidir ve olguların yaklaşık %75-90'nında hayatın ilk dekadında gözlenen kemik iliği yetmezliği orta ağır formdan ağır forma kadar değişebilmektedir. Buna ek olarak, olguların çoğunda AA, MDS veya akut miyeloid lösemi (AML) gibi bir çok kan hastalıkları da ortaya çıkabilmektedir. Olgularda AML riski genel populasyona göre 800 kat artmıştır ve ortalama başlangıç yaşı 14'tür.

FA çoğunlukla pediatrik yaşlarda görülen bir hastalıktır. On sekiz yaş üzeri olgularda görülen FA için hematolojik kanserler, solid tümörler, baş ve boyun skuamöz hücre kanserleri, jinekolojik kanserler dahil olmak üzere çeşitli kanserler için riskleri artmıştır. Ayrıca, olgularda işitme kaybı, kulak anomalileri, erkeklerde sperm sayısı azlığı, kadınlarda erken menopoz görülebilmektedir.

Kemik iliği nakli olmayan olguların yaklaşık %15'inde normal gebelik görülürken, hematopoetik hücre transplantasyonu sonrasında gebelik oranlarının arttığı bildirilmiştir (32-35).

Klinik bulguları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2-2: FA'nın klinik bulguları - (36)'dan.

Sistem	Bulgular
İskelet sistemi	Radiyal aplazi Başparmak deformitesi Başparmak aplazisi Başparmak hipoplazisi Çift başparmak
Genitouriner sistem	Böbrek malformasyonları Böbrek yokluğu Duplike böbrek Duplike toplayıcı sistem At nalı şeklinde böbrek Renal ektopi Hipergonadotropik hipogonadizm Kriptoorşidizm
Büyüme	Düşük doğum tartısı Boy kısalığı
Sinir sistemi	Mental retardasyon
Deri	Solgunluk Morarma Hiperpigmentasyon Sütlü kahverengi lekeler
Kalp	Konjenital kalp defekti
Baş, göz, kulak, burun, boğaz	Mikrosefali Strabizm Mikrooftalmi Kulak anomalileri Sağırlık

2.4. Fanconi Anemisi/Meme kanseri yolağı (FA/BRCA yolağı)

FA, hem klinik hem de genetik olarak çok heterojen bir hastalıktır, bugüne kadar 15 FA ve 2 FA – ilişkili gen tanımlanmıştır:

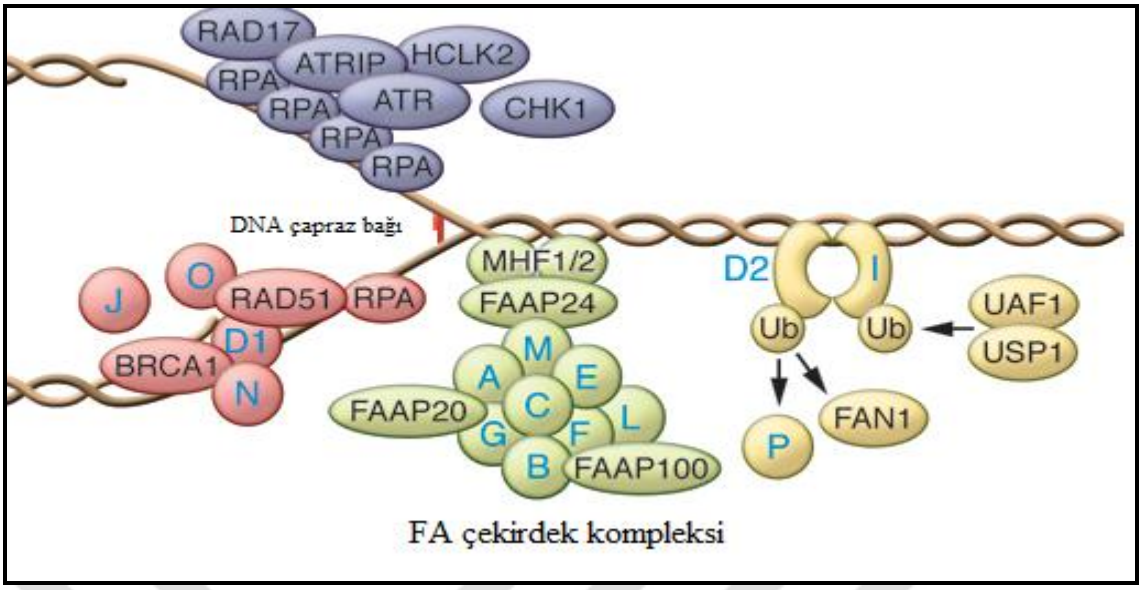
1. FA genleri: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCJ*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN*, *FANCO*, ve *FANCP*
2. FA – ilişkili genler: *ERCC4* ve *XRCC2*

FANCB geni X kromozomunda, diğer tüm bilinen FA genleri otozomlarda lokalizedir. Bu genlerin kodladığı proteinler ortak bir yolakta görev almaktadır. **Fanconi anemisi yolağı** veya **Fanconi anemisi/Meme kanseri yolağı (FA/BRCA yolağı)** olarak isimlendirilen bu yolağın işlevindeki mutasyonların yol açtığı bozulma her hangi bir etmenle/etmenlerle oluşan DNA hasarının onarılmasını engellediğinden FA fenotipinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (29, 37-39).

2.4.1. FA/BRCA yolağının esasları

Hücre siklusunun S fazında DNA, çoklu replikasyon çatallarında DNA polimeraz tarafından kopyalanarak çoğaltılır. Çapraz bağ yapıcı ajanların etkisi ile oluşan DNA hasarları kromatin yapısını bozar ve replikasyon çatalının devam etmesini engeller (39). Yavaşlayan replikasyon çatalı FA/BRCA yolağını aktive eder, DNA hasarını onardıktan sonra replikasyon devam eder.

FA/BRCA yolağı iki esas kompleksten oluşur: çekirdek kompleksi (kompleks 1-nüklear E3 monoubikutin ligaz çekirdek kompleksi) ve kompleks 2-kromatin ilişkili *FANCD2/BRCA2* DNA tamir kompleksi (Şekil 2-2). Çekirdek kompleksi yavaşlayan replikasyon çatalının bulunmasında, *FANCD2* proteinin monoubikutinizasyonu sinyal oluşumunda, kompleks 2 ise DNA tamirinde rol alır. Monoubikutin E3 ligaz kompleksi gibi de isimlendirilen çekirdek kompleksi sekiz FA alt protein grubundan oluşmaktadır (A, B, C, E, F, G, L, M). Bu proteinlerden birinde fonksiyon bozukluğu olduğunda FA/BRCA yolağının ana basamağını oluşturan *FANCD2* ve *FANCI* proteinlerinin monoubikutinizasyonu gerçekleşemez. Mutasyon saptanan olguların yaklaşık %90'ında bu sekiz genden birinde mutasyon gözlenmektedir (29, 37-40).



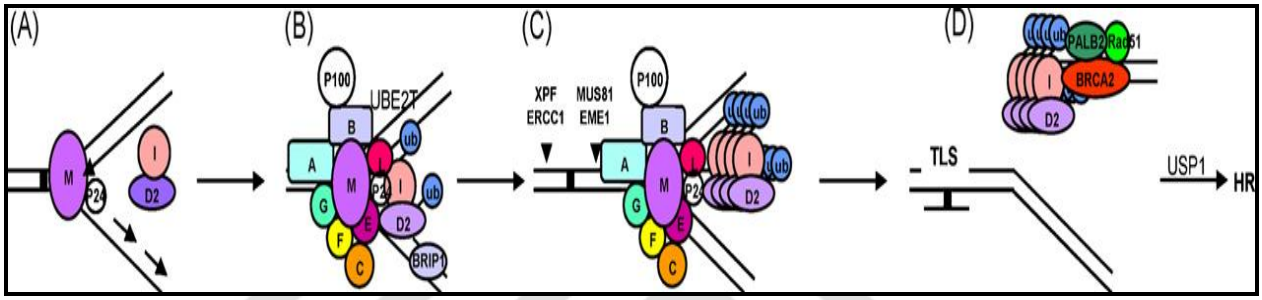
Şekil 2-2: FA/BRCA yolağı – Kee (2)'den.

ATR-aracılığıyla gönderilen sinyal duraksamış replikasyon çatalında FA/BRCA yolağını aktive eder, bu da FA çekirdek kompleksinin aktivasyonuna ve FANCD2/FANCI heterodimerinin monoubikutinizasyonuna neden olur. ATR birçok FA proteinini aktive etmek üzere fosforiller. Monoubikutinleşmiş D2/I çapraz bağlanmış DNA'nın yakınlığında nükleotik yarık açmada rol alan FAN1 nükleaz ve FANCP (birçok nükleazla ilişkilidir) proteinini aktive eder. D2/I TLS polimerazları (şekilde gösterilmemiştir) ve FANCD1 (BRCA2) ve RAD51 gibi HR faktörleri aktive eder. FANCO (RAD51C) HR aşamasında rol alır. USP1/UAF1 kompleksi FA/BRCA yolağını tamamlamak için D2/I heterodimerini deubikutinleştirir. 15 FA proteini mavi renkte, DNA çapraz bağı DNA çift sarmalı arasında kırmızı renkte gösterilmiştir.

Çekirdek kompleksini oluşturan proteinlerin çoğu, skafold (*scaffold* proteinler bir birleri ile kompleks oluşturarak sinyal yolaklarında, sinyal aktarımında ve yolak komponentlerinin gerekli yerlere lokalize olmasında görev alan yapılardır) görevini yapar ve bilinen enzimatik domainleri yoktur. Kompleksin kabul edilen anahtar domaini PHD tip RING finger katalitik domainidir ki, bu da FANCL proteinin C ucunda yerleşiktir (2, 38). PHD domainin diğer E3 ubikutin ligazlarla benzerliği vardır ve yokluğunda hücrelerde karakteristik FA fenotipi gözlenir. Çekirdek kompleksinin primer fonksiyonu normal hücre siklüsünün S fazında FANCD2 ve FANCI proteinlerinin monoubikutinizasyonudur (41). FANCD2/FANCI heterodimeri (ID kompleks) yavaşlayan replikasyon çatalında ortaya çıkan, normal olmayan çeşitli DNA yapılarını tanıyabilir (40). Monoubikutinize FANCD2 proteini yer değiştirerek, FANCD1/BRCA2, BRCA1, RAD51 gibi diğer DNA tamirinde rol alan proteinlerin olduğu kromatin yapısı üzerindeki nüklear odağa yerleşir. Kromatin üzerine yer değiştiren monoubikutinlenmiş FANCD2 (FANCD2-ub), ikinci kompleksin oluşumunu sağlar, UBZ domaine sahip ve nükleaz aktivitesi olan *Fanconi* ilişkili nükleaz 1 (FAN1) proteinin aktifleşmesi için sinyal oluşturur. İkinci kompleks, HR ile DNA tamirinde

görev alan RAD51 proteinini içeren nüklear odağın oluşumunu kolaylaştırır (Şekil 2-3). FA/BRCA yolağının normal işlevinin bozulması durumunda hücrelerde spontan DNA hasarları oluşabilir, bu hücreler çapraz bağ yapıcı ajanlara karşı yüksek hassasiyet gösterir ve bu ajanların etkisi ile kromozomlarda karakteristik kırıklar, multiradiyal figürler oluşur (37-39).

ÇSKT'de HR mekanizması ile DNA tamiri önemlidir. HR yolu ile DNA tamiri FA proteinleri tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin herhangi birinin yokluğu HR aktivasyonunu etkiler (5, 37).



Şekil 2-3: FA/BRCA yolağı modeli – de Winter ve Joenje (42)'den.

(A) DNA hasar oluşumu sonrasında replikasyonun durması ve çapraz bağ hasarının FANCM tarafından tanınması, hasar yerine FANCD2/FANCI yönlendirilmesi

(B) FA çekirdek kompleksinin FANCM ile etkileşimi ve bu kompleksin UBE2T ile birlikte FANCD2/FANCI kompleksinin monoubikutinizasyonunu gerçekleştirmesi

(C) FANCM proteininin DNA boyunca yer değişmesi daha çok tek sarmal DNA oluşturarak monoubikutinleşmiş FANCD2/FANCI kompleksinin artmasına neden olur. Bu da XPF/ERCC1 ve MUS81/EME1 komplekslerinin yerleşmesi için yer açar. MUS81/EME1 3' hasarı keser.

(D) FANCD2/FANCI monoubikutinizasyonu BRCA2 ve RAD51 proteinlerinin hasarı tamir etmesini, translezyon sentezi ile boşlukların doldurulmasını sağlar. FANCD2/FANCI deubikutinizasyonu sonucunda aktifleşen USP1 proteini HR mekanizmasını tetikleyerek hasarın tamirini sağlar.

FA proteinleri, DNA tamirini HR aktivasyonu ile farklı mekanizmaları destekleyerek yapar. FA proteinlerinin, hücre siklüsünün G1 fazında gerçekleşen homolog olmayan uçların birleştirilmesi (HOUB) mekanizmasını aktif olarak baskıladığı ve FA/BRCA yolağının doğru çalışmadığı hücrelerde HOUB faktörlerinin yanlış aktivasyonu, S fazda kromozomal yeniden düzenlenmelere ve aberasyonlara neden olduğu bildirilmektedir (37). Bu sistemin mekanizması şunlardır: (a) FA proteinlerinin *Ku70/80* heterodimeri gibi HOUB faktörlerinin çift sarmal kırık uçlarına ulaşımının kısıtlanması; (b) FANCD2'nin kriptik nükleaz aktivitesi ÇSK'nın HR faktörleri tarafından tanınması (2, 5).

Ek olarak, FA proteinleri sarmallar arası çapraz bağların tamiri için nükleotid eksizyon ve DNA translezyon sentezi (TLS) mekanizmalarını da koordine ederler [Şekil 2-3 (D)]. *Xenopus'ta* yapılan biyokimyasal araştırmalar sonucu FANCD2/FANCI monoubikutinizasyonunun nükleotid eksizyon ve TLS için gerekli olduğunu göstermektedir (38). FA alt tipi olup, yolağın skafold oluşumunda görev alan SLX4 (FANCP) proteini, DNA tamirinin bu aşamalarında önemli olan MUS81-EME1, XPF-ERCC1 ve SLX1 endonükleazlarına bağlanır. FANCP iki UBZ domainine sahip olup, FANCD2 monoubikutinizasyonunun güçlendirilmesi için gereklidir (2, 39).

FA – ilişkili protein 24kDa (FAAP24), FAAP100, FAAP20, FANCM-ilişkili histon katlama proteini 1 (MHF1) ve 2 (MHF2) FA/BRCA yolağında çekirdek kompleksin ayrılmaz parçasıdır (43, 44).

FA ve FA – ilişkili proteinlere ek olarak FA/BRCA yolağı ağı denilen diğer regülatör proteinleri de FA/BRCA yolağında önemli görevler almaktadır. Bunlardan, ubikuitin spesifik peptidaz 1 (USP1), USP1-ilişkili protein (UAF1) FANCD2/FANCI heterodimerinin deubikuitinizasyonunun ve FA/BRCA yolağının tamamlanmasının regulasyonundan sorumludur (45, 46). ATR/ATRIP heterodimeri hücre siklüsünün S fazında meydana gelen tek zincir DNA'nın algılanmasına ve DNA hasarına yanıt olarak FANCD2/FANCI heterodimerinin monoubikutinizasyonunun başlamasına neden olur. ATR sinyalizasyonunda RPA (tek zincir DNA'ya bağlanan protein), RAD17, RAD9 (9-1-1 denetim noktası kompleksi), CHK1 ve HCLK2 gibi proteinler görev alır (47).

2.4.2. FA/BRCA Yolağının Sitokinezdeki Rolü

FA/BRCA yolağının primer fonksiyonu hücre siklüsünün S fazında DNA hasarlarının tamiridir. Özellikle sitokinezde FA proteinlerinin görevi M fazına kadar uzatılabilir. FA'lı hücrelerde stabil olmayan ve tamir olmamış DNA'nın göstergesi olarak frajil kromozom bölgeleri gözlenir. Bu bölgeler *FANCD2* ve *FANCI* proteinleri ile işlenirken, bu proteinlerin yokluğu kromozom instabilitesine ve iki çekirdekli hücrelerin oluşumuna neden olur. İki çekirdekli hücreler FA'da apopitoz ve kemik iliği yetmezliğinin potansiyel nedenlerindendir. Frajil bölgeler ultrafin DNA köprüleri (UFB) denilen mitotik DNA yapıları ile birbirlerine bağlanırlar. Hücre siklüsünün S fazında oluşan replikasyon hataları M fazında UFB yapılarının çoğalmasına neden olur ve dolayısı ile sitokinezde soruna ve iki çekirdekli hücre oluşumuna yol açar. Frajil

bölgelerin ve UFB üzerinde FA proteinlerinin normal fonksiyonu bilinmemektedir. ATR, BRCA1, RAD51 gibi FA/BRCA yolağı ile ilişkili proteinler de frajil bölgelerin stabilitesinin regulasyonundan sorumlu olup, sitokinezde FA – BRCA ağında önemli rollere sahiptir (48-50).

2.5. FA İle İlişkili Genler

FA genleri kodladıkları proteinlerin FA/BRCA yolağının hangi aşamasında yer aldıklarına göre grublandırılmaktadır:

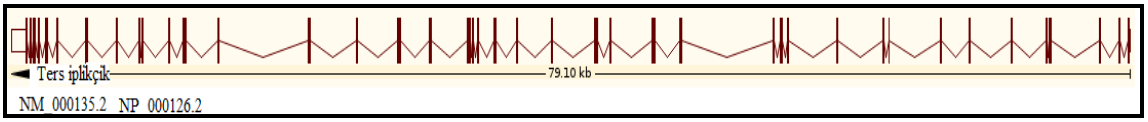
1. Çekirdek kompleksini oluşturan proteinleri kodlayan genler,
2. Çekirdek kompleksinin DNA'nın hedef bölgesine bağlanması için gereken proteinleri kodlayan genler,
3. FANCD2 ve FANCI- monoubikutinleşen birimleri kodlayan genler,
4. DNA tamirinde görev alan FA ve FA ilişkili proteinleri kodlayan genler.

2.5.1. Çekirdek Kompleksini Oluşturan Proteinleri Kodlayan Genler

Çekirdek kompleksi sekiz FA komplementasyon grubu genlerinin (A, B, C, G, F, E, L, M) ve iki FA ilişkili genin (*FAAP24, FAAP100*) kodladığı proteinlerden oluşur. Bu kompleksin fonksiyonu FANCD2 ve FANCI proteinlerini monoubikutinizasyona uğratmak, bununla da DNA tamir proteinlerini aktive etmektir. Ayrıca, FANCM ve FAAP24 proteinleri DNA hasarını veya duraksamış replikasyon çatalını tanımak ve çekirdek kompleksinin hasar bölgesine yönlendirilmesinden sorumludur (5, 29, 38-40).

2.5.1.1. FA Komplementasyon Grubu A (MIM#227650) – *FANCA* Geni

FANCA (MIM*607139) geni 16q24.3 bölgesinde yerleşik, ters iplikçikten transkibe olan 43 ekzonlu, 80 kb uzunluğunda bir gendir. Ensemble veritabanında bu genin 32 transkript varyantı olup, tek fenotiple ilişkilendirilmiştir. En büyük transkriptin (NM_000135.2) uzunluğu 5.451 bç olup translasyonda sentezlediği peptidin (NP_000126.2) uzunluğu ise 1.455 aa'dır.

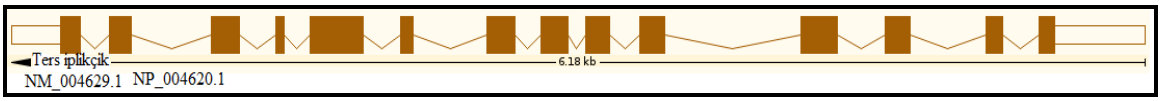


Şekil 2-4: *FANCA* geninin referans transkript varyantı - (51)'den.

FANCA ilk klonlanan FA genlerinden biridir. Olguların yaklaşık %60'ında bu gende mutasyon saptanmaktadır. Kodladığı protein FA/BRCA yolağında nüklear kompleksin bir birimi olarak görev almakta, FANCG proteini ile stabil subkompleks oluşturmaktadır (52). Protein üretimi olmayan homozigot mutasyonlu (*null* mutasyonlar) bireylerde erken başlangıçlı anemi ve yüksek lösemi riski, anormal protein üreten diğer *FANCA* mutasyonlarına göre daha sıktır (33).

2.5.1.2. FA Komplementasyon Grubu G (MIM#614082) – *FANCG* Geni

FANCG (MIM*602956) 9p13.3 bölgesinde yerleşik, 14 ekzonlu, 8 transkript varyantı olan ve ters iplikçikten sentezlenen bir gendir. En büyük transkripti (NM_004629.1) 2631 bç uzunluğundadır ve translasyonda 622 aa uzunluğunda bir polipeptiti (NP_004620.1) kodlamaktadır.



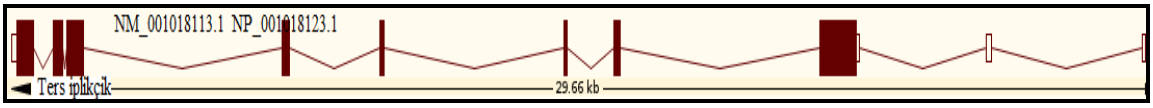
Şekil 2-5: *FANCG* geninin referans transkript varyantı - (53)'ten.

FANCG mutasyonları, FA ilişkili diğer gen mutasyonlarına göre daha ağır sitopeni ve lösemi açısından daha yüksek risk taşıması ile karakterizedir, hiç protein üretmeyen (*null* mutasyonlar) mutasyonlarda fenotip, normal olmayan protein üretenlere kıyasla daha ağırdır.

2.5.1.3. FA Kompementasyon Grubu B (MIM#300514) – *FANCB* Geni

FANCB (MIM*300515) geni Xp22.2 bölgesinde yerleşik, ters iplikçikten transkribe olan 10 ekzonlu, ensemble veritabanında 4 transkript varyantı olan bir gendir ve tek bir fenotiple ilişkilendirilmiştir. En büyük transkriptinin (NM_001018113.1)

uzunluğu 3008 bç, ilk iki ekzonu kodlanmamakta, translasyonda sentezlediği polipeptit (NP_001018123.1) 859 aa'ten oluşmaktadır.

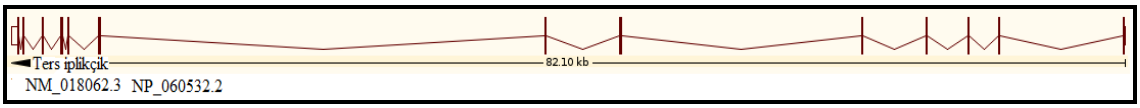


Şekil 2-6: *FANCB* geninin referans transkript varyantı - (54)'ten.

FANCB geni FA/BRCA yolağında çekirdek kompleksinin sekiz biriminden bir proteini kodlamaktadır ve bu protein FANCL ve FAAP100 proteinleri ile birlikte stabil bir subkompleks oluşturmaktadır (55).

2.5.1.4. FA Komplementasyon Grubu L (MIM#614083) – *FANCL* Geni

FANCL (MIM*608111) 2p16.1 bölgesinde yerleşik, 14 ekzonlu, 10 transkript varyantı olan ters iplikçikten sentezlenen bir gendir. En büyük transkripti (NM_001114636.1) 1698 bç uzunluğunda olup translasyonda (NP_001108108.1) 380 aa uzunluğunda bir polipeptid sentezlemektedir. Bu varyant, İnsan Mutasyon Veri Bankasında (HGMD) kullanılan referans transkripten (NM_018062.3), 7. ekzonda 45 baz daha kısa olması ile farklıdır.

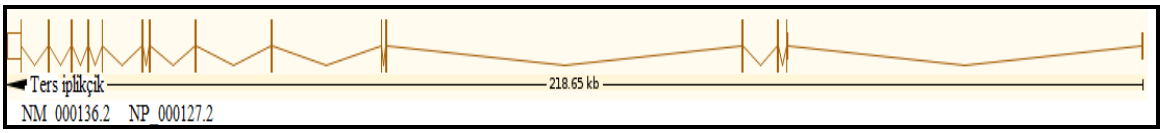


Şekil 2-7: *FANCL* geninin referans transkript varyantı - (56)'dan.

FANCL proteininin E3 ubikuitin ligaz aktivitesine sahip PHD domaini, UBE2T proteinini E2 olarak görevlendirip, FANCD2 ve FANCI proteinlerinin monoubikutinizasyonunu gerçekleştirir (57-59). Nüklear kompleksin diğer birimleri, FANCL proteinin FA/BRCA yolağının ana hattı olan FANCD2–I monoubikutinizasyonunu düzenlemekle görevlidir. *In vitro* koşullarda da FANCL proteini nüklear kompleksin diğer birimleri olmadan FANCD2-I monoubikutinizasyonunu gerçekleştirebilmesi bunun kanıtıdır.

2.5.1.5. FA Komplementasyon Grubu C (MIM#227645) – *FANCC* Geni

FANCC (MIM*613899) geni 9q22.32 bölgesinde yerleşik, ters iplikçikten transkribe olan 15 ekzonlu bir gendir. Birinci ekzonları kodlanmayan 10 transkript varyantı vardır. En büyük transkript varyantı (NM_000136.2) 4585 bç uzunluğunda olup translasyonda, 558 aa'lik bir polipeptiti (NP_000127.2) sentezler.

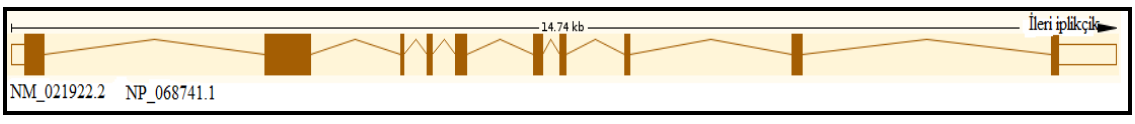


Şekil 2-8: *FANCC* geninin referans varyantı - (60)'tan.

FANCC proteini *FANCE* ve *FANCF* genlerinin kodladığı proteinlerle beraber FA/BRCA yolağının nükleer kompleksinin subkomplekslerinden birini oluşturmaktadır (61, 62). *FANCC* genindeki mutasyonlar tek fenotiple ilişkilendirilmiştir. Bu gendeki c. 456+4A>T (IVS4+4A>T) *founder* etkisi olan Aşkenazi yahudilerinde sık gözlenen bir mutasyondur. *FANCC* genindeki bu kırpılma hatası mutasyonu ve diğer sık görülen iki mutasyon [c.1642C>T (p.Arg548Ter), c.1661T>C (p.Leu554Pro)] erken başlangıçlı konjenital defektlerin ve hematolojik anomalilerin gözlendiği fenotipler için yüksek risk taşırken, p.Asp23IlefsTer23 ve p.Gln23Ter mutasyonları konjenital anomaliler ve kemik iliği yetmezliğinde düşük risk taşımaktadır (33, 63).

2.5.1.6. FA Komplementasyon Grubu E (MIM #600901) – *FANCE* Geni

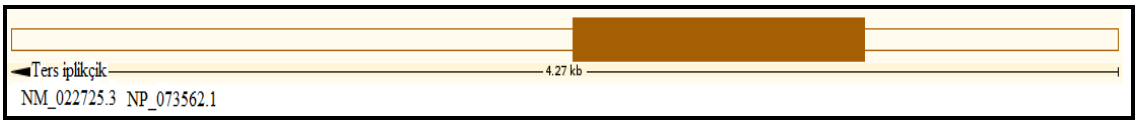
FANCE (MIM*613976) 6p21.31'te yerleşik, 10 ekzonlu, 1 transkript varyantı olan bir gendir. Transkript varyantı (NM_021922.2) 2554 bç uzunluğundadır ve translasyonda 536 aa uzunluğunda bir polipeptit (NP_068741.1) sentezler.



Şekil 2-9: *FANCE* geninin referens transkript varyantı - (64)'ten.

2.5.1.7. FA Komplementasyon Grubu F (MIM#603467) – *FANCF* Geni

FANCF (MIM*613897) 11p14.3 bölgesinde yerleşik, tek ekzonlu, tek transkripti olan bir gendir. Transkript (NM_022725.3) ters iplikçikten sentezlenerek, 4269 bç uzunluğunda olup translasyonda 374 aa uzunluğunda bir polipeptiti (NP_073562.1) sentezler.



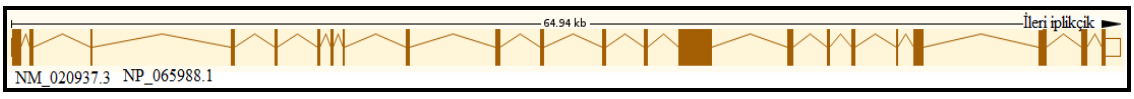
Şekil 2-10: *FANCF* geninin transkript varyantı - (65)'ten.

2.5.2. Nüklear Kompleksinin DNA'nın Hedeflerine Bağlaması İçin Gereken Proteinler

FANCM ve FAAP24 proteinleri çekirdek kompleksinin bir birimi olmakla birlikte, en önemli fonksiyonları DNA hasarını tanıyarak, sahip oldukları nükleaz domainleri ile heterodimer oluşturup FA nüklear kompleksini hasar bölgesine bağlamaktır (66).

2.5.2.1. FA Komplementasyon Grubu M – *FANCM* Geni

FANCM (MIM*609644) 14q21.2 yerleşik, 23 ekzonlu, 10 transkript varyantı olan bir gendir. En büyük transkript varyantı (NM_020937.3) 7111 bç uzunluğunda, translasyonda sentezlediği polipeptiti (NP_065988.1) 2048 aa büyüklüğündedir.

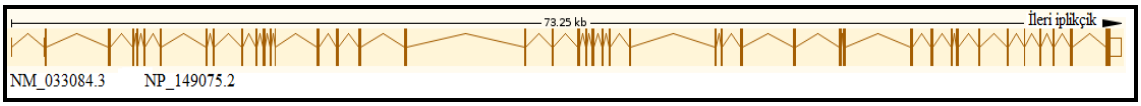


Şekil 2-11: *FANCM* geninin referans transkript varyantı - (67)'den.

2.5.3. FANCD2 ve FANCI- monoubikutinleşen birimler

2.5.3.1. FA Komplementasyon Grubu D2 (MIM#227646) – *FANCD2* Geni

FANCD2 (MIM*613984) 3p25.3'de yerleşik, 43 ekzonlu, 13 transkript varyantı olan bir gendir. En büyük transkript varyantı (NM_033084.3) 5219 bç uzunluğunda, ilk ekzonu kodlanmayan, kodladığı polipeptiti (NP_149075.2) 1471 aa uzunluğundadır.

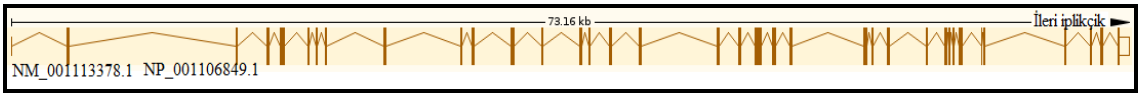


Şekil 2-12: *FANCD2* geninin referans transkript varyantı - (68)'den.

FANCD2 genindeki mutasyonlar FA'lı olguların %5'inden sorumlu tutulmaktadır. FANCD2, FANCI proteini ile beraber posttranslasyonel modifikasyona bağlı olarak kromatinin dışına ve içine haraket edebilecek dinamik bir kompleks oluşturur. FANCD2-I monoubikutinizasyonu FA/BRCA yolağının ana hattını oluşturmaktadır. FANCI proteininin Ataksi Telenjiektazi ve Rad3 ilişkili (ATR) protein tarafından fosforilizasyonu monoubikutinleşmiş FANCD2-I kompleksinin kromatine lokalize olmasını sağlar. FANCD2-I monoubikutinizasyonunun ardından kromatine lokalize olan kompleks DNA tamir proteinlerinin aktifleşmesi ve DNA tamir fonksiyonunun gerçekleşmesini sağlar (38, 69).

2.5.3.2. FA Komplementasyon Grubu I (MIM#609053) – *FANCI* Geni

FANCI (MIM*609053) 15q26.1 bölgesinde yerleşik, 38 ekzonlu, 17 transkript varyantına sahip bir gendir. En büyük transkriptin ilk ekzonu kodlamamakta (NM_001113378.1) 4743 bç uzunluğunda olup, translasyonda 1328 aa uzunluğunda bir polipeptiti (NP_001106849.1) sentezlemektedir.



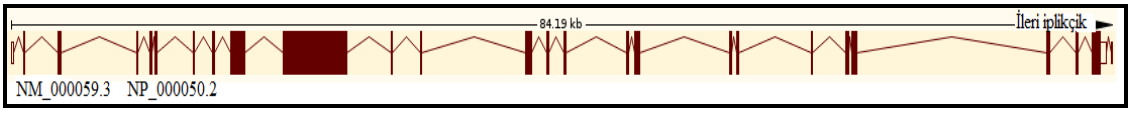
Şekil 2-13: *FANCI* geninin referans transkript varyantı - (70)'ten.

2.5.4. DNA Tamirinde Görev Alan FA Komplementasyon Grubları

FANCD2-I monoubikutinizasyonu FANCD1 (BRCA2), FANCJ (BRIP1), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C) gibi DNA tamir proteinlerinin aktifleşmesini sağlamaktadır (2, 29, 38-40).

2.5.4.1. FA Komplementasyon Grubu D1 (MIM#605724) – *FANCD1* (*BRCA2*) Geni

BRCA2 (MIM*600185) 13q13.1 bölgesinde yerleşik, 28 ekzonlu, 7 transkript varyantı olan bir gendir. Protein kodlayan, transkript varyantının (NM_000059.3) ilk iki ekzonu kodlanmamaktadır. Bu transkript 10984 bç uzunluğunda olup, translasyon ile sentezlenen polipeptit (NP_000050.2) 3418 aa uzunluğundadır.

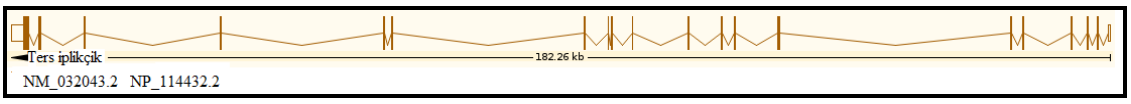


Şekil 2-14: *FANCD1* geninin referans transkript varyantı - (71)'den.

BRCA2 tümör süpressor geni olarak FA dışında meme, over ve diğer kanser türleri ile ilişkilendirilmektedir. FA/BRCA yolağındaki rolü, rekombinasyon mediatörü olarak Rad51 nükleofilametlerin oluşumunu ve DNA hasarının HR mekanizması ile onarılmasını sağlamaktır (72).

2.5.4.2. FA Komplementasyon Grubu J (MIM#609054) – *FANCJ* (*BRIP1*) Geni

BRIP1 (MIM*605882) 17q23.2 bölgesinde yerleşik, 20 ekzonlu, 6 transkript varyantı olan ters iplikçikten transkribe uğrayan bir gendir. En büyük transkipti, ilk ekzonu kodlama yapmayan (NM_032043.2) 6048 bç uzunluğundadır ve translasyonda 1249 aa uzunluğunda bir polipeptiti (NP_114432.2) kodlamaktadır.



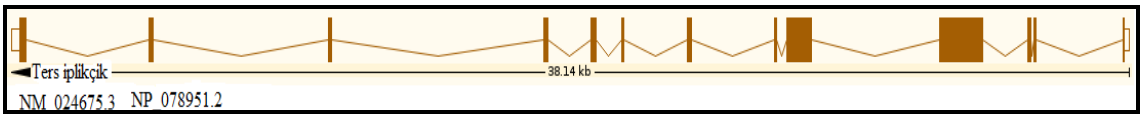
Şekil 2-15: *BRIP1* geninin referans transkript varyantı - (73)'ten.

BRIP1, *BACH1* gibi de bilinen bir gen olup, kodladığı protein RecQ DEAH – box ailesine dahildir. BRIP1 proteini 5'→3' helikaz aktivitesine sahip olup normal olmayan (Holliday ilmiği, duraksamış replikasyon çatalı) DNA yapılarına direkt bağlanma ve bu yapıyı çözme fonksiyonunu yapmaktadır. Bu protein FA ile ilişkisi, FA/BRCA yolağında monoubikutinize-FANCD2'nin BRCA1 ile etkileşimi için gerekli olan bir helikaz geni olmasıdır (74). BRCA1 proteini BRCT domaini ile etkileşerek DNA hasarını onarması için BRCA2 ve RPA proteinlerini DNA'ya yerleştirir. Rad51

nükleofilamentlerin çözülmesine neden olarak HR mekanizmasının sonlanmasında görev aldığı düşünülmektedir. BRIP1 geninin biallelik mutasyonları FA, monoallelik mutasyonları ise meme kanserine yatkınlık ile ilişkilendirilmektedir (75).

2.5.4.3. FA Komplementasyon Grubu N (MIM #610832) - *FANCN* (*PALB2*) Geni

PALB2 (MIM*610355) 16p12.2 bölgesinde yerleşik, 13 ekzonlu, 6 transkript varyantı olan, ters iplikçikten transkribe edilen bir gendir.

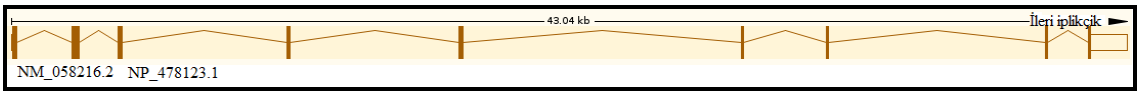


Şekil 2-16: *PALB2* geninin referans transkript varyantı - (76)'dan.

PALB2 proteini BRCA2 proteini ile etkileşerek DNA'da doğru bölgeye bağlanmasını sağlar (77).

2.5.4.4. FA Komplementasyon Grubu O (MIM#613390) – *FANCO* (*RAD51C*) Geni

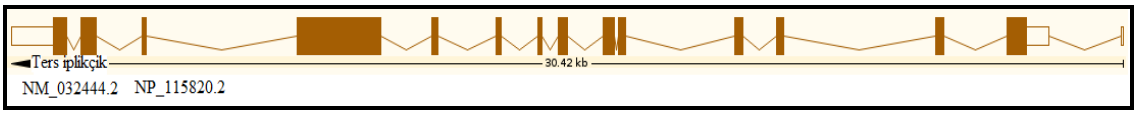
RAD51C (MIM*602774) 17q22 bölgesinde yerleşik, 9 ekzonlu, 18 transkript varyantı olan bir gendir. En büyük transkript varyantı (NM_058216.2) 2591 bç'den oluşup 376 aa uzunluğunda bir polipeptit (NP_478123.1) sentezler.



Şekil 2-17: *RAD51C* geninin referans transkript varyantı - (78)'den.

2.5.4.5. FA Komplementasyon Grubu P (MIM #613951) – *FANCP* (*SLX4*) Geni

SLX4 (MIM*613278) 16p13.3 bölgesinde yerleşik, 15 ekzonlu, 3 transkript varyantı olan ve ters iplikçikten sentezlenen bir gendir. Genin referans transkript varyantının (NM_032444.2) ilk ekzonu kodlanmamakta, uzunluğu 7307 bç olup, translasyonda 1834 aa büyüklüğünde polipeptit (NP_115820.2) sentezlenmektedir.

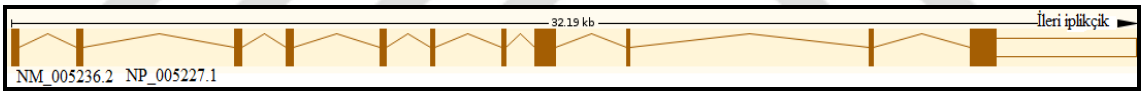


Şekil 2-18: *SLX4* geninin referans transkript varyantı - (79)'dan.

SLX4 geninin kodladığı yapı spesifik endonükleaz birimi ERCC4-ERCC1, MUS81-EME1 ve Slx1 endonükleaz proteinleri ile birlikte multiprotein kompleksi oluşturmakta ve spesifik DNA hasarlarının tamirinde, replikasyon çatalı duraksamalarında hücresel yanıtın verilmesinde fonksiyon göstermektedir. İlaveten, MSH2/MSH3 yanlış eşleşme tamir kompleksi, TERF2 (TRF2)-TERF2IP (RAP1) telomer bağlanma kompleksi, PLK1 protein kinazı ve SLX4IP (C20orf94) gibi bakım ve tamir proteinleri ile ilişkilidir (80-82).

2.5.4.6. FA Komplementasyon Grubu Q (MIM#615272) – *FANCQ* (*ERCC4*) Geni

ERCC4 (MIM*133520) 16p13.12 bölgesinde yerleşik, 11 ekzonlu, 8 transkript varyantı olan bir gendir. En büyük transkript varyantı (NM_005236.2) 6758 bç uzunluğundadır ve translasyonda 916 aa'lik polipeptiti (NP_005227.1) sentezler.

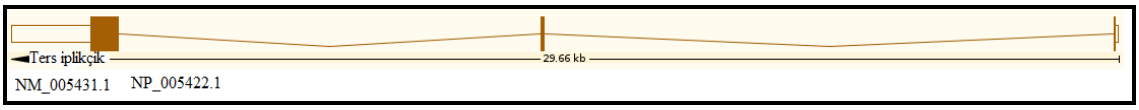


Şekil 2-19: *ERCC4* geninin referans transkript varyantı - (83)'ten.

Kodladığı protein ERCC1 proteini ile birlikte kompleks oluşturarak, NET'de 5' ucunda kesme aşamasında görevlidir. Ayrıca, bu kompleks EME1 proteini ile etkileşime girerek DNA tamirinde endonükleaz aktivitesi göstermektedir (84, 85).

2.5.4.7. X-*Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 2* Geni (*XRCC2*)

XRCC2 (MIM*600375) 7q36.1 bölgesinde yerleşik, 3 ekzonlu, 2 transkript varyantı olan ve ters iplikçikten sentezlenen bir gendir. Kodlanan transkript varyantı (NM_005431.1) 3067 bç uzunluğundadır ve translasyonda 280 aa büyüklüğünde bir protein (NP_005422.1) sentezlemektedir.



Şekil 2-20: *XRCC2* geninin referans transkript varyantı - (86)'dan.

XRCC2 geni *RecA/Rad51* ilişkili protein ailesinin bir proteinini kodlamaktadır. Bu protein ÇSK'nın HR ile tamirinde görevlidir (87).

2.6. FA'da Tanı

FA tanısı klinik ve genetik olarak iki yaklaşımla incelenir;

1. Klinik tanı – fizik muayene ve hematolojik bulgular
2. Genetik tanı – sitogenetik ve moleküler genetik testler

FA, AA ve hematolojik malign tümörlerin en sık genetik nedenlerinden biri olmasına karşın ayırıcı tanısının konulması için benzer fenotiple giden diğer hastalıkları klinik, sitogenetik ve moleküler olarak dışlamak gerekmektedir. Diğer kırık kromozom sendromlarında, örneğin Bloom sendromu ve Ataksi Telenjiektazi'de de yüksek düzeyde spontan kromozom kırıkları oluşmakta ancak DEB testinde artmış kromozom kırıkları FA'lı hücrelerde gösterilebilmektedir.

Nijmegen kırık sendromu (NKS), OR kalıtım gösteren, boy kısalığı, kognitif yeteneğin kaybı ile birlikte progresif mikrosefali, kadınlarda erken over yetmezliği, tekrarlayan sinopulmonar enfeksiyonlar, kanser riskinin artması (özellikle lenfomaların) ile karakterize, MMC ile artmış kromozom kırıkları gösterebilen bir hastalıktır. NKS'nu FA'dan ayıran özellik, olguların neredeyse %100'ünde *NBS1* geninde dizi analizi ile mutasyon saptanmasıdır; ayırıcı tanı moleküler genetik test ile konabilmektedir.

Seckel sendromu büyüme geriliği, entelektüel yetersizlik ile giden mikrosefali, karakteristik 'kuş başı' yüz görünümü ile karakterize, DEB ve ya MMC gibi çapraz bağ yapıcı etkenlerle kromozom kırıklarında artış gösteren bir hastalıktır. Bazı Seckel sendromlu bireylerde pansitopeni ve/veya AML görülebilir. En az üç gendeki mutasyonlar Seckel sendromu'ndan sorumludurlar. Bunlardan en iyi bilineni *ATR* genidir.

Nörofibromatozis Tip 1 (kahve rengli lekeler ve nörofibromlar), TAR sendromu (radius yokluğu ile giden trombositopeni) ve FA ilişkili olmayan VACTERL birlikteliği

(radial ışın defektleri) gibi diğer hastalıklar DEB ve ya MMC testi ile FA'dan ayırt edilebilmektedir (33).

2.6.1. Sitogenetik Tanı

FA'nın sitogenetik tanısı çapraz bağ yapıcı ajanların etkisi ile kromozom kırıklarının ve yeniden düzenlenmelerinin oluşumuna dayalıdır. Bu nedenle klinik olarak FA düşünülen olgularda, kromozom kırık testi bulguları tanı koymada önemli yer tutmaktadır. Bu testte her hasta için üç kan kültürü (0,5ml heparinli kan 4,5 ml %15 fetal dana serumu, %1 antibiotikler, %1 L-glutamine ve %1 fitohemagqlutinin içeren RPMI besiyerinde kültüre edilir) yapıldıktan 24 saat sonra kültürlerden ikisi final konsantrasyonu 0,1 mg/ml olan çapraz bağ yapıcı ajanlarla (DEB, MMC veya NTM) indüklenir, biri ise spontan kromozom kırıklarını test etmek üzere indüklenmez. Kırk altı saat sonra kültürlere final konsantrasyonu 0,1 mg/ml olmak üzere kolşemid eklenir. Kolşemid eklendikten 2 saat sonra kültürler standart sitogenetik metodla çalışılır. Preparatlar Giemsa boyası ile boyanır ve analiz edilir. Toplamda 50 metafaz hücresi kromozomal kırıklar açısından analiz edilir ve skorlanır. Sonuçlar normal hücreler ve FA pozitif hücrelerle kıyaslanır. Olgularda DEB ve MMC testinde kromozomal kırıkların artışı gözlenirken, taşıyıcılarda sonuç normal aralıkda olur. DNA klastojen ajanların olmadığı kültürler spontan kırık hızını değerlendirmek için kullanılabilir. Kan sonucu normal ve ya yetersiz ise, ya da mozaisizm şüphesi varsa sitogenetik tanının deri fibroblastlarında DEB veya MMC tekniği ile tekrarlanması gerekir. Ancak, kromozom kırık testleri yalnış pozitif sonuçlar verebilir.

FA'nın tanısında periferik kan lenfositlerinin hücre siklüs profilinin değerlendirilmesi de yararlıdır. FA'lı hücrelerin çapraz bağ yapıcı ajanlarına maruz kalmadan hem önce, hem de sonra G2/M fazında sayısının dikkat çekici şekilde artması gözlenir (2, 27).

2.6.2. FA'da Moleküler Genetik Tanı

FA'nın sitogenetik tanısı konulduktan sonra, komplementasyon analizi ile mutasyonun hangi gende olduğu belirlenir ve o genin dizilenmesi sağlanır.

Komplementasyon testinde mutant FA cDNA'sını taşıyan referans retrovirus hücre serileri oluşturulur. Her referans hücre serisi farklı gendeki mutasyonu taşır. Araştırılacak materyalin de hücre kültürü yapılır, sonra bu kültür yarı – yarıya olmak üzere referans hücre serileri ile karıştırılır (elektroporasyonla transdüksiyon yapılır). Belli sürelerde yapılan inkübasyon ve çeşitli santrifügasyon aşamalarından sonra çapraz bağ yapıcı ajanlarla indüklenir ve analiz edilir. Analiz sonucunda kromozom kırıklarında artış ve multiradiyal figürler gözlenmişse, referans ve olgu hücrelerinin aynı komplementasyon grubundaki gende mutasyon taşıdığı düşünülür. Bu test komplementasyon grubu belirleninceye kadar mevcut referans hücre serileri ile devam eder.

FA'nın moleküler tanısı, sendrom ile ilişkili toplam 17 gen (15 gen ve FA fenotipi ile ilişkili bulunan *2* gen) nedeniyle çok zordur. Ancak komplementasyon analizi ile grubunun belirlenmesi moleküler tanı için yönlendirici olmaktadır. Tablo 2-3'de FA fenotipi ile ilişkili genler, mutasyon oranları ve moleküler test stratejileri gösterilmiştir. Bazı kapalı toplumlarda *founder* etki nedeniyle hedef mutasyon bölgesinin dizilenmesi ile tanı planlanabilmektedir. Örneğin, Aşkenazi yahudilerinde *FANCC* geninde c.456+4A>T mutasyonu sık olduğundan bu hastalarda, sitogenetik tanı konulduktan sonra öncelikle *FANCC* geninde hedef bölge dizilenmesi önerilmektedir (33).

Tablo 2-3: FA fenotipi ile ilişkili genler, mutasyon oranları ve moleküler test stratejisi - (30)'dan.

Komplementasyon grubu	Gen	Mutasyon oranı	Test	Mutasyon tipleri
FA-A	*FANCA*	%60-70	Dizi analizi Del/dup[1] analizi	Dizi varyantları Ekzon ya da tüm gen delesyonları
FA-B	*FANCB*	~%2	Dizi analizi Del/dup analizi	Dizi varyantları Ekzon ya da tüm gen delesyonları
FA-C	*FANCC*	~%14	Hedef mutasyon analizi Dizi analizi Del/dup analizi	c.456+4A>T, 67delG Dizi varyantları Ekzon ya da tüm gen delesyonları

FA-D1	*BRCA2*	~%3	Dizi analizi	Dizi varyantları
FA-D2	*FANCD2*	~%3		
FA-E	*FANCE*	~%3		
FA-F	*FANCF*	~%2		
FA-G	*FANCG*	~%10		
FA-I	*FANCI*	~%1		
FA-J	*BRIP1*	~%2		
FA-L	*FANCL*	~%0,2		
FA-M	*FANCM*	~%0,2		
FA-N	*PALB2*	~%0,7	Del/dup analizi	Ekzon ya da tüm gen delesyonları
FA-O	*RAD51C*	~%0,2	Dizi analizi	Dizi varyantları
FA-P	*SLX4*	~%0,2		

1: del/dup-delesyon/duplikasyon

2.7. FA'da Genetik Danışma

FANCB, XBR kalıtım gösterirken diğer tüm FA genleri OR kalıtım gösterir. OR FA için taşıyıcı ailelerde hasta çocuk riski %25, fenotipik olarak normal hastalık için taşıyıcı çocuk riski %50 ve sağlıklı genotipe sahip çocuk olasılığı %25 dir. XBR FA için taşıyıcı dişilerin erkek çocukları için hastalık riski %50, kız çocukları için asemptomatik taşıyıcı olma olasılığı da %50'dir. Hem XBR, hem de OR FA için ailedeki hastalık ilişkili mutasyon biliniyorsa ailedeki taşıyıcıların belirlenmesi ve risk taşıyan gebeliklerde prenatal tanı olanaklıdır.

Literatürde, olguların % 15'inde somatik mozaisizm saptandığı bildirilmektedir (88). Özellikle kromozom instabilite sendromlarında "geri dönüş" mutasyonları gözlenmektedir. Bu geri mutasyonlarla, ilk mutasyonla kaybedilen gen aktivitesi ikinci mutasyonla tekrar kazanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda fibroblast kültürlerinden elde edilen DNA örneklerinde FA ilişkili genlerde biallelik mutasyon saptanmasına karşın olguların periferik kan lenfositlerinde tek allel mutasyonlarının gözlenmesi bu tür

mutasyonlarla açıklanmaktadır. Bu geri mutasyonlar kardeş kromatid değişimi esnasında intragenik mitotik rekombinasyon veya replikasyon hatası sonucu oluşmaktadır. Somatik mozaisizmin oluşumunda bir diğer mekanizma olarak üçüncü bir *de novo* düzeltici mutasyonun oluşması ve bunun sonucunda hastalık bulgularının hafiflediği bildirilmektedir (89, 90).

2.8. FA'da Tedavi

FA'lı olguların ~%50'sinde androjen uygulanması kan hücre sayısını arttırmaktadır. Tedaviye en erken cevap, uygulamanın ilk ya da ikinci ayında kırmızı kan hücrelerinin artımı ile başlar ki, bu da kendini retikulositoz ile gösterir. Lökosit ve trombosit cevabı değişkendir. Trombosit cevabı genelde tamamlanmamış olur ve tedaviye başladıktan bir kaç ay sonra yanıt verir. Bu yanıtlar geçici olup, genelde eritrositlerin sayısının artmasına yöneliktir. Zaman geçtikce tedaviye direnç başlar (genelde yıllar sonra). Önerilen standart androjen *oksimetolon* olup, başlangıç dozu 2-5 mg/kg/gündür. Androjen uygulanmasının yan etkileri karaciğer toksisitesi, safra kanallarının tıkanması, karaciğer peliozu ve hepatik tümörlerdir.

Granülosit uyarıcı faktör [Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)] derialtı olarak uygulanması bazı bireylerde nötrofil sayısını arttırır. Bu tedaviye başlamadan önce ve tedavi sürecinde kemik iliği aspirasyonu ve biopsisi yapılmalıdır (91).

FA'da kemik iliği yetmezliğinin primer tedavisi hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT)'dir. Temelinde DNA tamirinin bozukluğu olduğundan olgularda transplantasyon işlemi için yoğun şekilde kemoradyasyon kullanımı yüksek derecede toksik olabilir. Transplantasyon sonrasında kemoradyasyona bağlı fiziksel hasarlar (pulmonar ve renal toksisite, veno-oklüzif hastalık) graft versus host hastalığı (GVHD), immun hasar ve endokrinopatiler gibi çoklu komplikasyonlar oluşabilir. Çoğu ailede doku uyumlu kardeşin olmaması, ailenin donör kardeş amaçlı preimplantasyon genetik tanıya başvurmalarına neden olur. Alternatif donor seçeneği ile yapılan HKHT'de komplikasyon riski artabilir ve başarısız sonuç elde edilebilir. HKHT yüksek kanser riski gibi hematopoetik olmayan komplikasyonlar açısından tedavi edici değildir. Kök hücreler kemik iliğinden, G-CSF ile uyarılmış periferik kandan ve ya kordon kanından alınabilir. İdeal olarak HKHT'yi hematopoetik destek için verilen transfüzyonlardan ve erken başlangıçlı MDS/lösemiden önce yapılır (92).

FA gen tedavisi için en iyi adaylardandır. Mutant genin belirlenmesini takiben, sağlıklı cDNA taşıyan retroviral veya lentiviral verktörlerin üretilmesi ve transdüksiyonu ile gerçekleştirilir. FA'da gen tedavisinin olgularda uygun hematopoetik kök hücrelerin *ex vivo* transdüksiyon için az miktarda olması, erken yaşlarda alınması ve saklanması gibi birçok zorlukları vardır. Bununla beraber gen tedavisi, aktarılan vektör yakınlığındaki proto – onkogenin malign klonların artışına neden olabileceğinden lösemi riski taşımaktadır. Koşullandırma rejiminde yapılacak olan gelişmeler FA'nın gen tedavisindeki verimliliği ve güvenirliliği arttıracağı beklenmektedir (93).

Olguların birçoğunda gözlenen hipotiroidizmin tedavi edilmesi büyümede önemli gelişmeye neden olur. Olguların tahminen %50-70'inde büyüme hormonu eksikliği de olduğundan büyüme hormonu tedavide kullanılır. Ancak, büyüme hormonunun uzun süre kullanımının AML veya diğer kanserler için risk artışına yol açtığı konusu tartışmalıdır (94, 95).

Olgularda sıklıkla AML, baş, boyun ve jinekolojik sistemin skuamoz hücre karsinomu gözlenir. Başarılı transplantasyon sonucunda ortaya çıkan zorluklardan biri FA ilişkili kanserlerin tedavi ve yönetimidir. Kemo ve radyotöropatik rejimin olgulara sitotoksik etkisinden dolayı tedavi FA olmayan bireylerin kanser tedavi stratejisinden farklı olmalıdır. Olgular yılda bir kere kemik iliği aspirasyonu yaptırarak premalign klonal çoğalması açısından değerlendirilmeli ve bütün olgulara HPV aşılama yapılmalıdır (34, 96).

FA komplementasyon grublarına göre oluşabilecek kanser türleri değişebilir. Örn., *FANCD1* mutasyonları Wilms tümörü, nöroblastoma ve medullablastoma gibi beyin tümörleri ile ilişkilidir. *FANCD1, FANCJ, FANCO, FANCN* heterozigot taşıyıcıları ise meme, over ve pankreatik kanserlere yatkınlık göstermektedir (97-99).

FA'nın biyolojisinin anlaşılmış olmasına rağmen tedavisi zordur. Olgularda FA kök hücrelerinin reaktif oksijen türleri (ROS), serum formaldehidi gibi endojen DNA hasarı oluşturan maddelere karşı hassas olmaları tedavi sürecinin zor olmasının nedenlerindendir. Bu hassasiyet erken gelişme evresinde hematopoetik kök hücre kaybına neden olabilir. Bu nedenle, antioksidan kullanımı olgularda hastalık bulgularını kısmi bile olsa azaltabilir. G2/M denetim noktasının kaldırılması FA klinik bulgularının azalmasına neden olabilir, fakat bu uzun sürerse, olgularda zamanla lösemi ve miyelodisplazi oluşabilir. Olgularda öncül hematopoetik kök hücrelerinde p53 ve onun

yakınlığında bulunan p21 proteinlerinin fazla sentezi gözlenir ki, bu da hücre siklüsünün durdurulmasına, HKH'lerin apopitozuna neden olur. Bu nedenle, p53 inhibitörlerinin tedavi amaçlı kullanımı yararlı olabilir, fakat yine de lösemi riskinin artması söz konusudur. İndüklenmiş pluripotent kök hücre transplantasyonu FA açısından yararlı bir tedavi seçeneği olabilir. Olguların kendi hücrelerinin yeniden programlaştırılıp, transplante edilmesi daha az komplikasyon oluşturabilir (100, 101).

2.9. Moleküler Yöntemler

2.9.1. DNA Dizileme Yöntemleri

2.9.1.1. Sanger Dizileme

Frederick Sanger ve ark.'ları 1977 yılında, 3'OH grubu olmayan modifiye nükleotidlerin (dideoksinükleotid-ddNTP) kullanımıyla DNA zincir uzamasının sonlandırılması esasına dayalı bir DNA dizileme yöntemini keşfettiler. 30 yılı aşkın bir süredir Sanger dizileme (SD), en çok kullanılan ve altın standart olan bir DNA dizileme yöntemi oldu ve halen, tanı ve araştırma çalışmalarında sık olarak kullanılmaktadır. Loyd M. Smith ve ark.'larının, her bir DNA bazının farklı florofor ile işaretlenmesi ve poliakrilamid jel elektroforezi sırasında tarayıcı ile bu bazların dizisinin belirlenebilmesiyle, SD otomatize edilmiştir. Floresan boya ile işaretli ddNTP'lerin kullanımıyla birden fazla örneğin aynı anda dizilenmesi mümkün olmuş, ve bu işlemler bilgisayar sistemlerinin yardımı ile entegre edilerek otomatize edilmiş ve böylece eş zamanlı 384 örneğin dizilenmesi sağlanabilmiştir. Bu sistemler her bir yürütmede 600-1000 baz uzunluğundaki DNA dizisini yüksek doğruluk oranlarıyla okuyabilmektedir (102, 103).

2.9.1.2. Yeni Nesil Dizileme

İnsan genom projesinin tamamlanmasından sonra, ikinci ya da yeni nesil dizileme (YND) olarak adlandırılan masif paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. İlk olarak 2005 yılında, 454 platformu *Life Sciences* tarafından piyasaya sürülmüştür. Bir yıl sonra *Solexa* tarafından *Genome Analyser* ve *Agencourt* tarafından SOLİD YND platformları piyasaya sürülmüştür. Daha sonra *Agencourt, Applied Biosystems* tarafından (2006); 454 Life Science, *Roche* tarafından (2007) ve Solexa

Illumina tarafından satın alınmıştır. 2011 yılında ise 3 major YND platformu daha geliştirilmiştir: *Ion Torrent's PGM, Pacific Biosciences' RS* (*Pac Bio*) ve *the Illumina MiSeq* (104).

YND yöntemi, bir örnekten elde edilen DNA'nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak dizilenmesi esasına dayanan yüksek sayıda dizileme yöntemidir. Günümüzde en çok kullanılan YND platformları; *Ion Torrent PGM* ve *Illumina MiSeq*'dir. Bu platformların temel basamakları; taslak (*template*) hazırlama, dizileme, görüntüleme ve elde edilen verilerin analiz edilmesidir (105).

454 platformu, taslak hazırlama aşamasında, boncuklar üzerine bağlanmış tek bir kalıp molekülün emülsiyon PZR ile çoğaltılması yöntemini kullanır. PZR sonrası, üzerinde milyonlarca klonal kopya bulunan boncuklar, her bir kuyuya bir boncuk girecek şekilde tasarlanmış pikolitrelik kuyucuklara yüklenir ve her bir kuyucuktaki fragmanlar paralel olarak pirosekans yöntemiyle dizilenir (106).

Solexa, Illumina platformunda, DNA fragmanlarını yakalamak için solid cam yüzeyler kullanılır ve bu yüzeyde köprü PZR ile her bir DNA fragmanı çoğaltılarak klonal DNA kümeleri elde edilir. Daha sonra floresan işaretli reversibl terminatörler kullanılarak, SD'ye benzer bir yöntemle senteze dayalı dizileme yapılır. *Illumina MiSeq* daha küçük laboratuvarlar için tanısal amaçlı, *HiSeq 2000* platformu ise daha yüksek kapasiteli dizilemeler [tüm ekzom dizileme (TED), tüm genom dizileme (TGD)] için geliştirilmiştir (107).

SOLİD, *Life Technologies* tarafından piyasaya sürülen üçüncü ticari YND platformudur. Bu platformda da emülsiyon PZR ile çoğaltılmış boncuklar üzerindeki klonal DNA fragmanları dizilemede kullanılır. Bu sistemde floresan işaretli di – baz problar kullanılarak ligasyon temelli dizileme yapılır (105).

Helicos, *HeliScope* tarafından geliştirilen ilk ticari tek molekül dizileyicidir. Ancak yüksek maliyeti ve okuma uzunluğunun kısa olması sistemin dezavantajlarıdır. Helicos, dizileme hizmetini sadece merkezi olarak yürütmektedir.

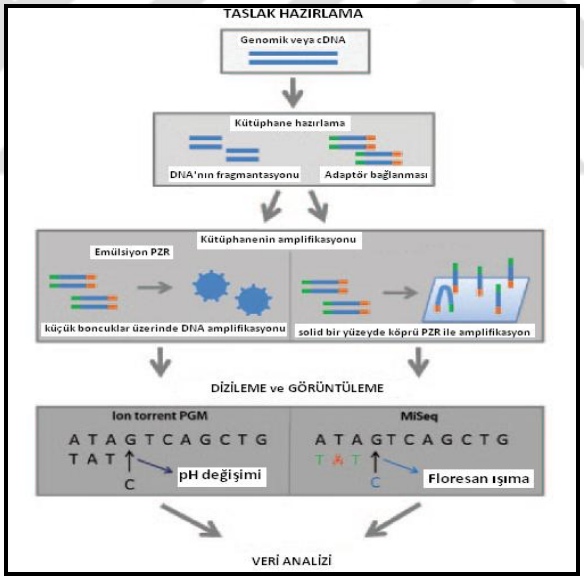
Pac Bio sistemi, tek molekülün gerçek zamanlı dizilenmesine olanak tanıyan bir platform olarak geliştirilmiştir. Bu sistemde; 50 nm genişliğindeki kuyucukların dibine bağlanmış polimerazlar vasıtasıyla kalıp DNA moleküllerinden γ-fosfat floresan ile işaretli nükleotidler kullanılarak yeni zincir sentezlenirken, her bir baz için özgün floresan ışıma algılanır ve böylece DNA dizisi gerçek zamanlı olarak belirlenir (103, 104, 108).

Ion Torrent / *Life Technologies* bu çalışma kapsamında kullanılan platformdur.

Ion Torrent Teknik Özellikleri

Life Technologies tarafından 2010 yılında piyasaya sürülen Ion Torrent, 454 platformuna benzer şekilde senteze dayalı dizileme yapar ve nükleotidlerin uzayan DNA zincirine eklenmesi sonucu açığa çıkan H^+ iyonlarının neden olduğu pH değişimlerini algılayan bir sisteme sahiptir. Dolayısıyla diğer sistemlerden farklı olarak dizileme için floresan işaretli nükleotidlere, kamera ya da lazer sistemlerine ihtiyaç duymaz. Bu da Ion Torrent platformunu daha ekonomik olmasını sağlar.

Ion Torrent platformunda kütüphane ve taslak hazırlama aşamaları; DNA'nın fragmantasyonu, DNA fragmanlarının uçlarının enzimatik olarak modifikasyonu ve adaptörlerin bağlanması, adaptör bağlı kütüphane ürünlerinin emülsiyon PZR ile çoğaltılması aşamalarından oluşur (şekil 2-21).



Şekil 2-21: Ion Torrent ve Miseq platformlarında taslak hazırlama aşamaları – Grada (109)'den.

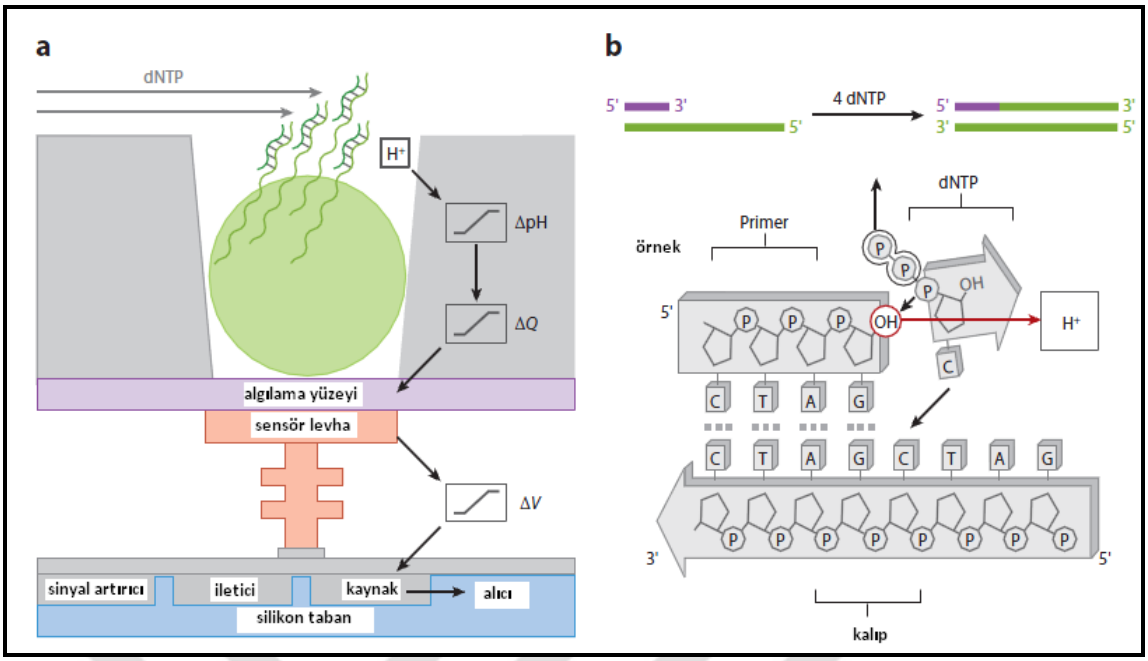
Uçlarına adaptör bağlı DNA fragmanları, üzerlerinde adaptör dizilerin tamamlayıcı bazlarından oluşan dizilerin kovalent olarak bağlı bulunduğu boncuklarla eşleştirilir ve içerisinde PZR için gerekli reaktiflerin ve polimerazın bulunduğu yağ mişelleri oluşturularak her bir DNA fragmanı emülsiyon PZR ile amplifiye edilir. Sonraki aşamada, amplifiye olmuş DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, yağ

parçacıkları, reaktifler ve amplifikasyona katılmamış boncuklardan ayrıştırılır (zenginleştirme aşaması).

Ion Torrent'in genomik DNA'dan dizilenmeye hazır ürünlere kadar olan bütün aşamaları için iki sistemden yararlanılmaktadır; Ion One Touch™ 2 sistemi ve Ion Chef sistemi.

Ion One Touch™ 2 sistemi, 2 cihazdan oluşur: Ion OneTouch™ 2 ve Ion One Touch™ ES. Ion One Touch™ 2 taslak hazırlama, Ion OneTouch™ ES zenginleştirme işlemini otomatize olarak yapar. Sistemin normalize edilip eşit miktarda birleştirilmiş kütüphane ürününe (hedef bölgelerin multipleks PZR ile çoğaltılması, primer uçlarının kısmi kesilmesi, barkod – adaptör bağlanması, purifikasyon ve normalizasyon sonucunda elde edilen ürün) ihtiyacı vardır. Sistem, gerekli malzeme ve solüsyonları yüklendikten sonra taslak hazırlama (emPZR) ve zenginleştirme aşamalarını otomatize olarak yapar. İşlem sonunda zenginleştirilmiş ürünler +4°C'de 3 gün bekletilebilir ya da çipe yüklenerek dizileme yapılabilir.

Ion Chef sistemi tek bir cihazla 8 örneğin bir veya iki primer havuzu için kütüphane ve taslak hazırlığını, çip yüklemesini yapabilen otomatize bir sistemdir. İş akışı çok kolay ve zaman kazandırıcı olup 15 dakika içerisinde, kütüphane hazırlaması için yaklaşık 10-12 ng DNA ve gerekli malzemeleri cihaza yükleyerek dokunmatik ekrandan başlat komutu verilmekte ve ~7 saat sonra hazırlanan kütüphane ile taslak hazırlama aşamasına geçilebilmektedir. Taslak hazırlama, zenginleştirme ve çip yükleme için de aynı şekilde gerekli malzemeler cihaza yüklenmekte ve otomatik olarak yapılmaktadır. İşlem sonunda yüklenmiş çip/çipler alınarak Ion PGM, Ion Proton veya Ion S5/S5XL cihazlarına dizilenmek üzere yüklenmektedir. Zenginleştirme sonrası elde edilen boncuklar, dizi primerleri ve polimeraz eklenmesi sonrasında *Ion Chip* kuyucuklarına yüklenir. Bu kuyucukların her biri uzayan DNA zincirine uygun bazın katılması sonucu açığa çıkan H^+ iyonlarının oluşturduğu pH değişimlerini algılayarak elektrik sinyallerine dönüştürür ve bu sinyaller kaydedilir (Şekil 2-22). Belirli bir sırada her bir baz (A, G, C, T) için tekrarlayan döngülerle bu işlem tekrar edilir ve böylece her bir kuyucukta bulunan DNA dizisi belirlenir (110).



Şekil 2-22: a) *Ion Torrent Ion Chip*'in yapısı. b) Uygun bazın diziye girmesi sonucu H^+ salınımı – Mardis (103)'den.

Ion Torrent'in günümüzde daha çok tanısal amaçlı gen panelleri için tasarlanmış daha düşük kapasiteli *Ion PGM* ve TED veya TGD gibi yüksek kapasiteli dizilemeler için tasarlanmış *Ion Proton* ve *Ion S5/ S5XL* sistemleri mevcuttur. Sistemin Ion Proton I (PI) ve Ion Proton II (PII) olarak isimlendirilen çipleri Ion PGM sisteminin çiplerine nazaran 1000 kere daha fazla veri elde edebilecek hafızaya sahiptir. Bu çipler sayesinde çok az (~5 ng) DNA yoğunlukları ile kütüphane hazırlama yapılabilir, 2-4 saat gibi kısa bir süre içerisinde TGD ve TED gerçekleştirilerek en az 10 GB'a kadar veri elde edilebilir. TED/TGD gibi yüksek kapasiteli çalışmalarda, işlemler otomatize edildiğinden daha hızlı ve az maliyetli olan *ION S5/S5XL* sistemi tercih edilir. Sistemin işleyişi ve avantajlarını kısaca şu şekilde özetlenebilir: reaksiyon maddeleri ile doldurulmuş kartuşlar sayesinde laboratuarda manuel işler 45 dakikaya kadar kısaltılabilir; üç farklı çipte, aynı anda, ayrı yüklemeler yapılabilir; 2,5 – 4 saatlik yürütme zamanı ile birlikte toplamda 24 saatte sonuç alınabilir; kompleks hastalıklar ve yolakların araştırılmasında bile 1 ng DNA veya RNA yeterli olur; *Torrent Suite*^{TM} ve *Ion Reporter*^{TM} (IR) yazılımları ile veri analizi kolaylıkla yapılabilir. Ion Torrent sisteminin zayıf noktası 8 bazdan daha uzun homopolimer bölgelerde baz sayısını doğru saptayamamasıdır (103, 104) Bu sistemlerde kullanılan çip modelleri ve özellikleri Tablo 2-4'de gösterilmiştir.

Tablo 2-4: Ion Torrent platformunda kullanılan çipler ve özellikleri - (110)'dan.

Özellik	**PGM 314[1]**	**PGM 316[1]**	**PGM 318[1]**	**PI[2]**	**ION 520[3]**	**ION 530[3]**	**ION 540[3]**
Sensör sayısı	1.2 milyon	6.1 milyon	11 milyon	165 milyon	~90-100 milyon	~90-100 milyon	~90-100 milyon
Baz sayısı	100 milyon baz	1 milyar baz	2 milyar baz	10 milyar baz	1,5 milyar baz	3-8 milyar baz	12-30 milyar baz
Çalışma süresi	2-4 saat	3-5 saat	4-7 saat	2-4 saat	2,5-4 saat	2,5-4 saat	2,5 saat
Ort. baz okuma uzunluğu	200/400 baz	200/400 baz	200/400 baz	200 baz	200/400 baz	200/400 baz	200/400 baz
Okuma sayısı	0.6 milyon	3 milyon	5.5 milyon	82 milyon	3-5 milyon	15-20 milyon	60-80 milyon

1: Ion PGM sisteminde kullanılan çipler

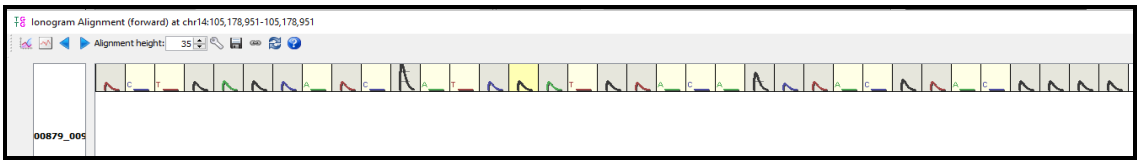
2: Ion Proton sisteminde kullanılan çip

3: Ion S5/S5XL sisteminde kullanılan çipler

Ion Torrent sisteminde sık yerleştirilmiş her birinin altında ion sinyali alıcısı bulunan milyonlarca kuyucuğa sahip çip üzerinde dizileme yapılmaktadır. Sistem dizileme sırasında amplikonlara dNTP bağlandığında her bir kuyucuktan çıkan H^+ ionlarını algılayarak ham verilere dönüşmektedir. Ham veriler baz isimlendirme, haritalama ve varyant isimlendirme basamaklarından oluşan bir iş akışı ile işlenmektedir.

Bu basamaklar;

1. Sinyal işleme: bu aşamada alınan ion sinyalleri voltaja dönüştürülülerek *DAT* dosyasında toplanmaktadır.
2. Baz isimlendirme (*base calling*): dNTP akışı sırasında kuyularda her bir dNTP bağlandığında işaretlenen bazlar *WELLS* dosyasında toplanmaktadır. Baz isimlendirilirken hangi kuyucuktaki amplikonlara, hangi dNTP'nin, kaç tekrarla bağlandığı ionogram grafiği olarak görülebilmektedir (Şekil 2-23) .



Şekil 2-23: İonogram görüntüsü.

Sistemde, ionogram verisi haritalanmamış BAM (*Binary Alignment Map*) dosyası formatına çevrilerek saklanmaktadır.

3. Haritalama: ionogram okuması sonrası haritalanmamış BAM dosyasına dönüştürülen dizi bilgileri her bir amplikon için referans genomla eşleştirilerek haritalanmış BAM dosyasına dönüştürülmektedir. Torrent Server haritalamada özgün olarak yazılmış *Torrent Mapping Alignment Program*-TMAP algoritmasını kullanmaktadır (111). TMAP Ion Torrent verilerini haritalamak için BFAST algoritma yazarları tarafından yapılan, detayları açıklanmamış olan bir algoritmadır. Haritalama sonrası sistem 3 ayrı kalite değerlendirmesi yapmaktadır: haritalama kalitesi 17 (*alignment quality*-AQ17) - %2 ve daha düşük hata payı ile haritalanan baz sayısı, haritalama kalitesi 20 (*alignment quality*-AQ20) - %1 ve daha düşük hata payı ile haritalanan baz sayısı ve mükemmel haritalama (*perfect*) - hata payı olmayan haritalama. Bu kalite değerlendirmeleri sonucunda ortalama kaç bazın hangi kalite değerinde haritalandığı, haritalanan ortalama baz sayısı, en uzun haritalama ve haritalanan bölgenin derinlik bilgileri verilmektedir. Bu basamakta sistem referans genoma haritalanan ve haritalanamayan toplam baz sayısını ve yüzdesini, okumaların ortalama doğruluk yüzdesini vermektedir.

4. Varyant isimlendirme (*variant calling*) - Amplikonlar haritalandıktan sonra referans genomla eşleşmeyen baz/bazlar varyant olarak isimlendirilirler. Bu veriler VCF (*Variant Call Format*) dosyasında toplanır (112, 113).

Tüm bu aşamaları yaparken sistem birçok filtreleme ve kalite değerlendirme parametreleri kullanmaktadır. Bu parametreler Tablo 2-5'de gösterilmiştir.

Tablo 2-5: Ion Torrent sisteminin dizileme alınan ion sinyallerinin ham verilere dönüştürülmesi için kullandığı parametreler - (114)'ten.

Baz isimlendirme parametreleri		barcode-cutoff, barcode-mode, barcode-separation, barcode-postpone, barcode-filter, barcode-filter-minreads, disable-all-filters, keypass-filter, min-read-length, extra-trim-left, trim-adapter-cutoff, trim-adapter-min-match, trim-qual-window-size, trim-qual-cutoff, trim-min-read-len
Haritalama parametreleri	Map4 modülü (güncel)	Context, do-repeat-clip, hit-frac, end-repair, min-seed-length, max-seed-length, max-seed-length-adj-coef, max-iwidth, max-repr, rand-repr, use-min, min-seq-length, max-seq-length
	Geniş çaplı TMAP parametreleri	max-seq-length, fn-reads, reads-format, fn-sam, bam-start-vfo, score-match, pen-mismatch, pen-gap-open, pen-gap-extension, pen-gap-long
Varyant isimlendirme parametreleri		min_allele_freq (SNP, indel, hot spot varyantlar için), min_variant_score (SNP, indel, hot spot varyantlar için), min_coverage (SNP, indel, hot spot varyantlar için), min _ cov _ each _ strand (SNP, indel, hot spot varyantlar için), strand _ bias (SNP, indel, hot spot varyantlar için), data_quality_stringency, filter_unusual_predictions, filter_insertion_predictions, filter_deletion_predictions, hp_max_length downsample_to_coverage, outlier_probability, do_snp_realignment, prediction_precision, heavy_tailed, suppress_recalibration, kmer_len, min_var_count, short_suffix_match, min_indel_size, max_hp_length, min_var_freq, relative_strand_bias, output_mnv, allow_indels, allow_snps, allow_mnps, allow_complex, min_mapping_qv, read_mismatch_limit, read_max_mismatch_fraction, gen_min_alt_allele_freq, gen_min_indel_alt_allele_freq, gen_min_coverage

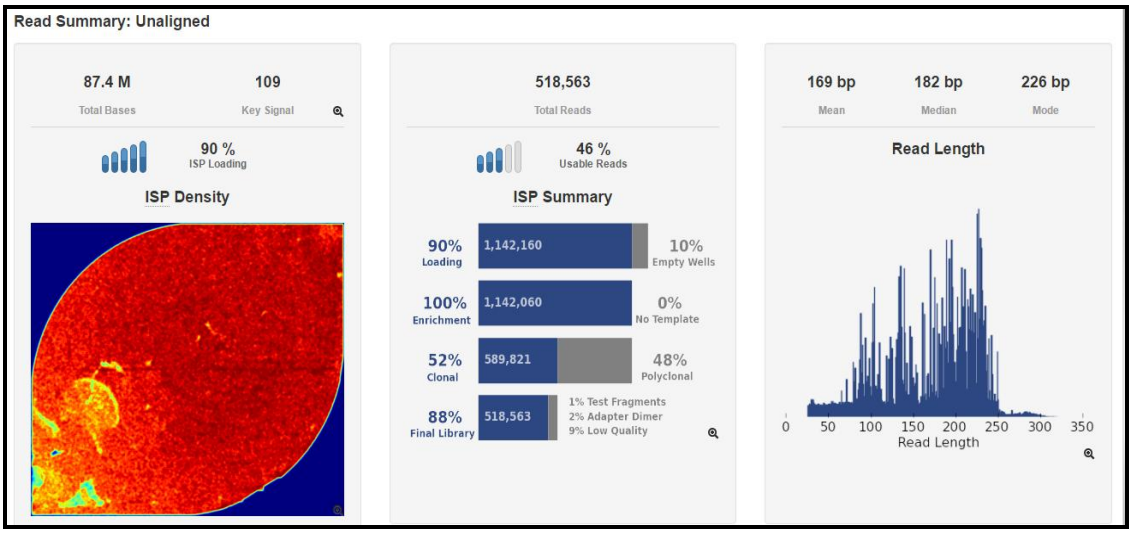
Dizileme sonrasında Torrent Server'in arayüzünden çalışmanın metrik sonuçları görülmektedir. Metrik sonuçlar aşağıdaki bilgileri içermektedir:

1. *Ion Sphere Particles*-ISP'in (üzerinde emPZR'de çoğalmış amplikonlar olan kürecikler) yoğunluğu: yüklenen ISP yüzdesine göre hesaplanan toplam baz sayısı,

anahtar sinyal (ardışık gelen bazların sayısını belirlemede kullanılır) ve çip kuyucuklarına yüklenen ISP yüzdesi bilgileri,

2. ISP özet bilgileri-toplam okuma sayısı, kullanılabilir okuma sayısı, dolu ve boş kuyucukların, zenginleştirme, klonalite, kullanılabilir kütüphane ürünleri, test fragmanları, adaptör dimerleri ve düşük kaliteli ürünlerin yüzde bilgileri,

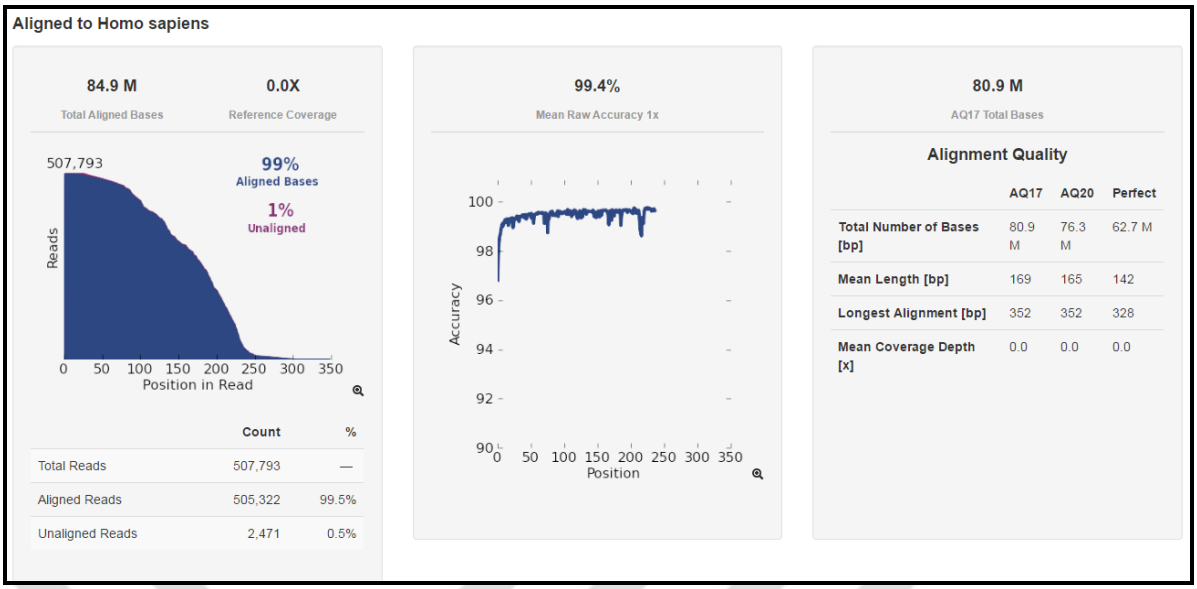
3. Okuma uzunluğu bilgileri; aritmetik ortalama, ortanca ve tepedeğer okuma değerlerinin (bç olarak) grafik görüntüsü (Şekil 2-24).



Şekil 2-24: Okuma özeti ve uzunluk bilgileri.

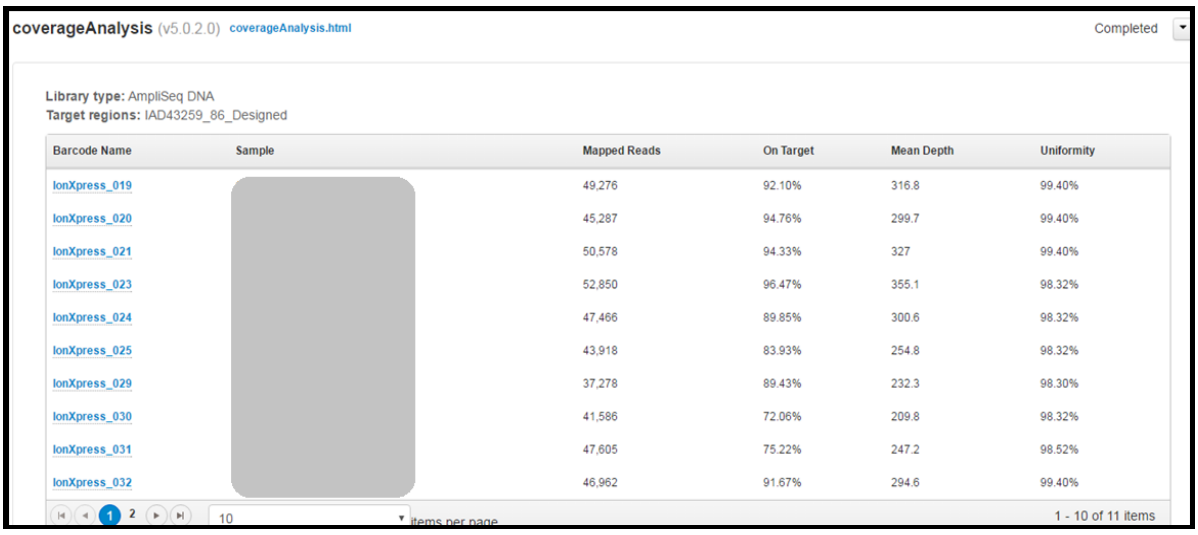
Bu bilgiler çalışmanın kalitesi açısından bilgi sahibi olmamızı sağlar.

Torrent Server'in arayüzünden YND çalışmasının değerlendirmesi için metrik sonuçlardan sonra haritalama, kapsam ve derinlik, varyant isimlendirme sonuçları da görülmekte, analiz için gerekli dosyalar indirilebilmektedir. Haritalamada eşleştirilen ve eşleştirilemeyen baz yüzdeleri, eşleştirilmenin ortalama doğruluğu bilgileri, haritalamanın kalite değerleri görülmektedir (Şekil 2-25).



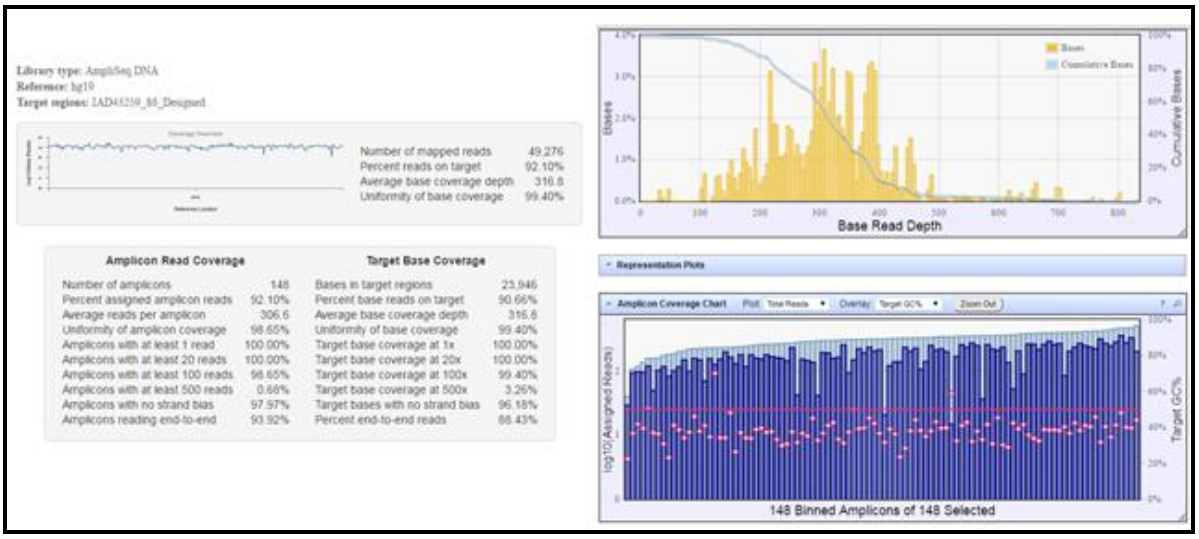
Şekil 2-25: Haritalama sonuçları.

Kapsam (*coverage*) ve derinlik (*coverage deep*)-hedef genomik bölge ile eşleştirilen bölgelerin ne kadar derinlikte (kaç tekrarla) okunduğunu Torrent Server'de *coverageAnalysis* ek programı (*Plugin*) ile incelenir. Bu program her çip için örnek bazında haritalama, kapsam ve derinlik hedef bölgenin yüzde kaçının kapsandığını ve dizi özgünlüğünü bilgilerini sunar (Şekil 2-26).



Şekil 2-26: Kapsam ve derinlik analizinin sonuçları.

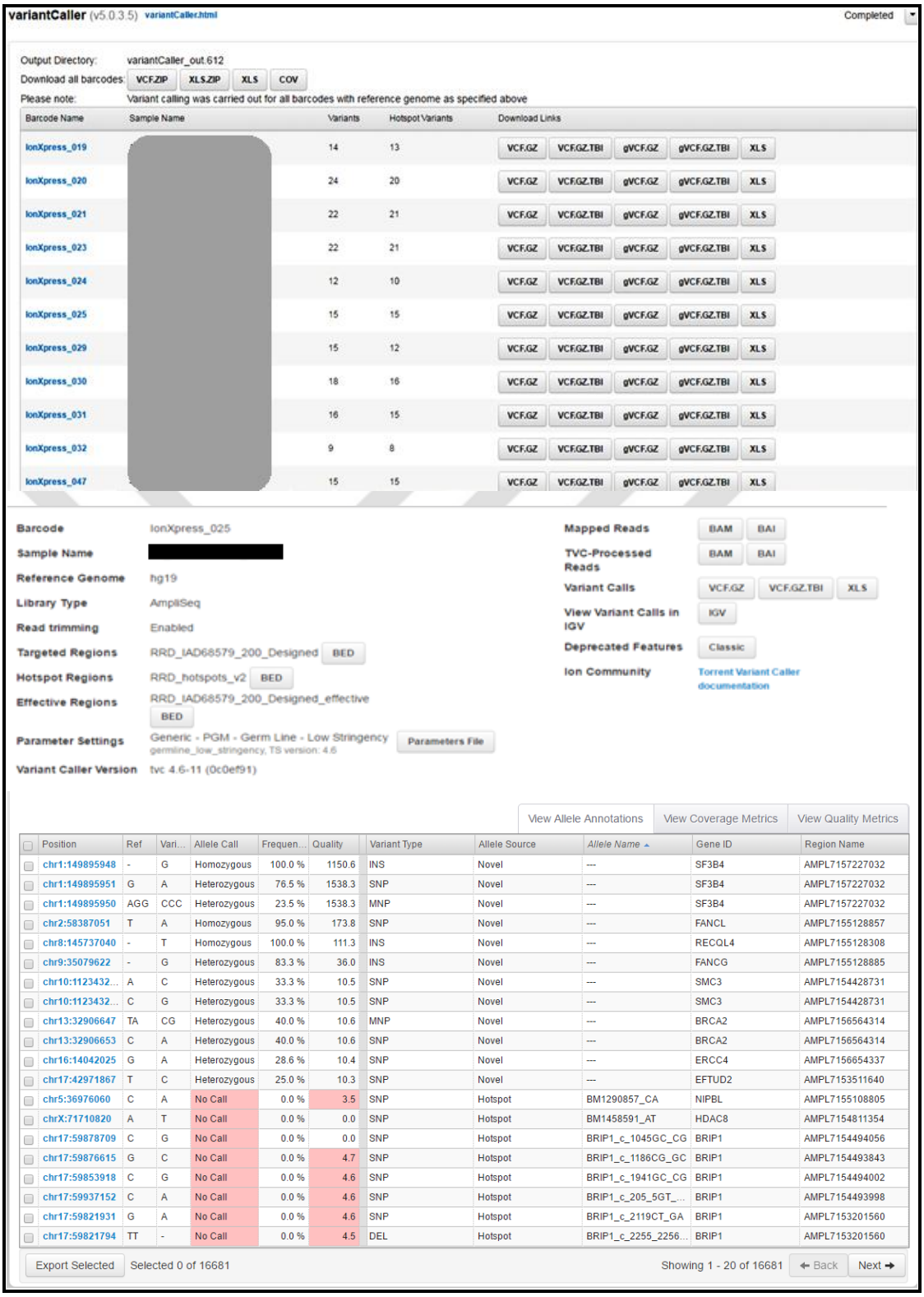
coverageAnalysis programında olgular seçildiğinde her olgu için haritalanan okumaların (baz ve amplikon şeklinde) toplam sayısı, hedef bölge ile örtüşen okumaların toplam sayısı, yüzdesi, özgünlüğü, her iki iplikçikten okuma yüzdesi, ortalama ve maksimum okuma derinlikleri bilgileri görülmektedir. Bu basamakta sistem amplikon ve bazların derinlik bilgilerini hem grafik, hem de *excell* dosyası şeklinde vermektedir. Grafikte her bir amplikon üzerine tıklanarak amplikona özgün detaylı bilgilere ulaşılabilmektedir. Her bir olgunun amplikon ve baz düzeyinde istatistikleri verilmektedir (Şekil 2-27).



Şekil 2-27: Olguya özgü kapsam ve derinlik bilgileri.

Varyant isimlendirme - *Torrent Server* programı *variantcaller* ek programı ile varyant isimlendirmesi yapabilmektedir. Bu program her çip için olgu bazında hedef bölgede yerleşik olan bazların tek (SNP) ve çoklu (MNP) nükleotid değişimi (polimorfizmi), insersiyon ve delesyon olarak varyantları tanımlar. Programın varyant isimlendirme için gerekli filtreleme parametrelerinden geçen ve referans genomla eşleşmeyen bazlar sistemde varyant olarak okunmaktadır (Şekil 2-28). Baz olarak isimlendirilemeyen ve/veya referans genomla eşlememesine rağmen varyant filtreleme parametrelerinden geçmediği için varyant olarak isimlendirilemeyen bazlar *No Call* olarak isimlendirilmektedir. Sisteme varyant değerlendirmesi açısından kontrol etmesi istenen hedef baz lokasyonları *hot spot* dosyası olarak yüklenmiş ise varyant raporlandırmasında bu noktalar hakkında detaylı bilgi verilir. Bu bilgilerde okunan bazın referans, varyant ya da *No Call* olarak durumunun nedenleri raporlandırılır.

Ancak *hot spot* dosyasında bulunmayan lokasyonlarda saptanan *No Call* noktaları, geri plan dosyalarında raporlandırılmaktadır. Bu bölgeler IGV penceresinden incelenerek, hangi parametreden dolayı okunamadı ise o parametrenin durumu manuel olarak değerlendirilebilmektedir. *Hot spot* dosyasında yer alan *No Call*'ların öncelikli olarak IGV'den incelenmesi, eğer gerçek bir değişimden şüphelenilirse ve bu varyant mutasyon olarak tanımlanmış ise SD ile doğrulanması gerekmektedir. *varyantCaller* ek programında her bir örneğin varyant detayı farklı formatlarda sunulmaktadır. Aynı zamanda bu bilgiler IGV programında açılabilecek şekilde bağlantı içermektedir (115, 116).



Şekil 2-28: Varyant isimlendirme bilgileri.

Bu değerlendirmelerden sonra her olgunun dizi verileri IR programına aktarılır ve yeniden varyant isimlendirme ve değerlendirme için analiz ettirilir. Varyantların saptanmasından sonra IR programında diğer veritabanlarından alınmış olan bilgiler de kullanılarak olgularda saptanan her bir varyant için biyoinformatik yorumlama (*variant annotation*) ve raporlama yapılabilir.

Yukarıda anlatılmış olan YND platformları (Illumina MiSeq, Ion Torrent PGM, Pac Bio RS, Illumina HiSeq 2000) maliyet, kapasite ve işlem süreleri açısından Tablo 2-6'da karşılaştırılmıştır.

Tablo 2-6: YND platformlarının maliyet, kapasite ve işlem süresi boyutları ile karşılaştırılması – Quail (104)'ten.

Platform	**Illumina MiSeq**	**Ion Torrent PGM**	**Pac Bio RS**	**Illumina HiSeq 2000**
Cihaz maliyeti	128 bin $	80 bin $	695 bin $	654 bin $
Dizileme kapasitesi	1.5-2 Gb	314 çip: 20-50 Mb 316 çip: 100-200 Mb 318 çip: 1 Gb	100 Mb	600 Gb
Gb başına dizileme maliyeti	502 $	1000 $ (318 çip)	2000 $	41 $
Dizileme süresi	27 saat	2 saat	2 saat	11 gün
Hata oranı (ham veri)	% 0.80	%1.71	% 12.86	% 0.26
Okuma uzunluğu	150 baza kadar	~200 baz	ort. 1500 baz	150 baza kadar
DNA gereksinimi	50-100 ng	10-12 ng	~1 µg	50-100 ng

YND yöntemi birçok alanda kullanılabilmektedir. Hedefe yönelik YND panelleri ile hastalık ilişkili birçok genin aynı anda dizilenmesi, hastalıklarla ilişkili yeni gen/genlerin keşfi amacıyla TED ya da TGD, ekspresyon çalışmaları için RNA dizileme (RNA-Seq) ve mikrobiyoloji alanında hastalığa yol açan genomun ya da viral /

bakteriyal yeni virulans faktörlerin saptanması amacıyla mikroorganizma genomlarının dizilenmesi bu alanlardan bazılarıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubu

Çalışma grubumuzu, 2004-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine, genetik konsültasyon amacıyla çeşitli Pediyatrik ve Tıbbi Genetik kliniklerinden yönlendirilen klinik ya da ayırıcı tanıda FA'nın yer aldığı 11 etkilenmiş olgu oluşturdu.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2014 tarih ve 1937 sayı). Çalışmaya katılan olgu ve ailelerinden onam alındı.

3.2. Olguların Değerlendirilmesi

3.2.1. Klinik değerlendirmeler

Olguların öykü ve fizik muayene bulguları formlarda (Form-1) gösterilen muayene formu esas alınarak kaydedildi. Aile öykülerine göre aile ağaçları hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin fotoğrafları arşivlendi.

3.2.2. Moleküler Analizler

3.2.2.1. DNA eldesi

DNA izolasyonları, steril 2 ml K_3EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon / manyetik boncuk bazlı sistemli kit yöntemi ile (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001* / *Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001* ve *Prepito DNA Cyto Pure Kit, Perkin Elmer*), firma protokollerine uygun olarak yapıldı.

FA nedeniyle kemik iliği transplantasyonu (KİT) yapılmış bir olgunun DNA'sı, deri biyopsi materyalinden firma protokollerine uygun şekilde kit (*Prepito DNA Cyto Pure Kit*) kullanılarak elde edildi.

3.2.2.2. DNA Kalite Araştırması ve Seyreltme İşlemleri

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri ($A_{260/280}$) (1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). $A_{260/280}$ değerleri 1.80'den daha az olan örnekler yüksek protein kontaminasyonu nedeni ile manuel olarak tekrar çöktürülerek saflaştırıldı (Son konsantrasyonu 2mM Ammonuim Asetat [$NH_4C_2H_3O_2$] ve 2,5 hacim %100 etanol [C_2H_5OH] ile çöktürüldükten sonra, pellet 2 defa %80'lik ve bir defa %100'lük etanolde yıkandıktan sonra kurutularak, dH_2O'da çözüldü). $A_{260/280}$ değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase enzimi ile muamele edilerek fazla olan ribonükleik asitler parçalandı. Her olgu için, DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/µl olacak şekilde miliQ (18.2 MΩ) su kullanılarak gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (*Qubit dsDNA HS Assay Kit*) florometrik yöntemle (*Qubit® 3.0 Fluorometer*) tekrar ölçüldü ve final DNA yoğunluklarının YND için istenen aralıkta (1,6 - 2 ng/µl) olması sağlandı.

3.2.2.3. Qubit® 3.0 Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü

Seyreltilmiş DNA örnekleri ölçülmeden önce *Qubit dsDNA HS Assay Kit* ile kalibrasyon ölçümü yapıldı. Bunun için kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanıldı. Standart örnek başına 199 µl *Qubit® dsDNA HS Buffer* ve 1 µl *Qubit® dsDNA HS Reagent* kullanılarak çalışma solusyonu hazırlandı. On mikrolitre standart örnek 190 µl çalışma solusyonu ile karıştırılarak 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra *Qubit® 3.0 Florometre*'de ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü sonrasında, her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solusyonu kullanılarak bir karışım (198 µl çalışma solusyonu + 2 µl seyreltilmiş DNA örneği) hazırlandı. İki dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası ölçüm yapıldı. Örnek DNA yoğunlukları istenen aralığa (1,6-2 ng/µl) gelinceye kadar gerekli seyreltme ya da deriştirme işlemleri sonrasında ölçümler tekrarlandı.

Yeni Nesil Dizileme (YND)

Çalışma grubumuzda yer alan, klinik bulgular ışığında fenotipi açıklayacak değişim elde edilemeyen 11 olguya, radiyal ışın defektleri (RID) ile giden sendromlar

için tasarladığımız YND paneli (Tablo 3.1) ile *Ion Torrent PGM* platformunda YND çalışması yapıldı.

3.2.2.4. YND paneli için hedef bölgelerin belirlenmesi ve primer tasarımı

RID ile giden sendromlar, LMD (*London Medical Database*) ve OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*)'den tarandı. İlişkili geni/genleri bilinen 14 fenotip seçildi. Bu fenotiplerle ilişkilendirilmiş genler, HGMD (*Biobase Professional*) veri tabanından tarandı. Her bir genin HGMD transkripti referans alınarak *Ion AmpliSeq Designer* (http://www.ampliseq.com) ile Tablo 3-1'de gösterilen fenotiplerle ilişkili 43 genin kodlayan bölgelerini, ekzon–intron sınır bölgelerini ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer bölgelerini (derin intron, UTR vs.) içine alan, 765 amplikondan ve iki primer havuzundan oluşan bir YND paneli oluşturuldu.

Tablo 3-1: RID ile giden sendromlar için oluşturulan YND panelinde yer alan genler

Fenotip	**Gen**
Cornelia de Lange sendromu 1 (OMIM #122470)	*NIPBL* (NM_133433.3)
Cornelia de Lange sendromu 2 (OMIM #300590)	*SMC1A* (NM_006306.3)
Cornelia de Lange sendromu 3 (OMIM #610759)	*SMC3* (NM_005445.3)
Cornelia de Lange sendromu 4 (OMIM #614701)	*RAD21* (NM_006265.2)
Cornelia de Lange sendromu 5 (OMIM #300882)	*HDAC8* (NM_001166419.1)
Roberts sendromu (OMIM #268300)	*ESCO2* (NM_001017420.2)
Thrombositopeni-radius yokluğu sendromu (TAR) (OMIM #274000)	*RBM8A* (NM_001031743.2)
Duane-radiyal ışın sendromu (OMIM #607323)	*SALL4* (NM_020436.3)
Akrofasiyal Dizostoz 1, Nager tip (OMIM #154400)	*SF3B4* (NM_005850.4)
Holt-Oram sendromu (OMIM #142900)	*TBX5* (NM_000192.3)
Fanconi anemisi[1] (OMIM #227650)	*FANCA* (NM_000135.2)
	FANCC (NM_000136.2)
	FANCG (NM_004629.1)
	FANCD2 (NM_033084.3)
	FANCB (NM_001018113.1)
	FANCM (NM_020937.2)
	BRCA2 (NM_000059.3)
	FANCL (NM_018062.3)
	BRIP1 (NM_032043.2)
	PALB2 (NM_024675.3)
	FANCE (NM_021922.2)
	FANCF (NM_022725.3)
	FANCI (NM_001113378.1)
	*RAD51*C (NM_058216.2)
	SLX4 (NM_032444.2)
	XRCC2 (NM_005431.1)
	ERCC4 (NM_005236.2)
Mandibulofasiyaldizostoz, Guion-Almeida tip (OMIM #610536)	*EFTUD2* (NM_004247.3)

Baller-Gerold sendromu (OMIM #218600)	*RECQL4* (NM_004260.3)
Rapadilino sendromu (OMIM #266280)	
Rothmund-Thomson sendromu (OMIM #268400)	
Townes-Brocks sendromu (OMIM #107480)	*SALL1* (NM_002968.2)
Diamond-Blackfan anemisi (OMIM #105650)	*RPS19* (NM_001022.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS10 (NM_001014.4)
	RPL11 (NM_000975.3)
	RPL35A (NM_000996.2)
	RPS17 (NM_001021.4)
	RPS24 (NM_033022.3)
	RPL26 (NM_000987.3)
	RPS7 (NM_001011.3)
	GATA1 (NM_002049.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS29 (NM_001032.4)
İskelet Defektleri-genital hipoplazi-MR (OMIM #612447)	*PLZF* (*ZBTB16*) (NM_006006.4)

1: Bu tez çalışmasının kapsadığı fenotip ve genler

3.2.2.5. Hedef bölgelere ait Hot Spot dosyasının oluşturulması

Analiz aşamasında kullanılmak üzere, her bir hedef bölgedeki bilinen bütün varyasyonlara ait gerekli bilgiler, amplikonların hg19/GRCh37 ile uyumlu başlangıç ve bitiş koordinatları girilerek ENSEMBL (http://grch37.ensembl.org/) veri bankasından indirildi. Her bir varyasyonun yer aldığı kromozom, başlangıç ve bitiş koordinatları, ismi, referans ve değişime uğramış allel bilgilerini içeren *excel* dosyası oluşturuldu. Tanımlanmış mutasyonlar, *HGMD Professional 2015.2* sürümünden kontrol edilerek, her bir gen için eksik olan mutasyon bilgileri eklendi. Oluşturulan *excel* dosyası, BED dosyası formatına çevrilerek, *Torrent Server* ve *IR* yazılımlarındaki ilgili analiz akış şemasına eklendi.

3.2.2.6. Kütüphane hazırlanması

Kütüphane hazırlanması, *Ion Ampliseq Library Kit 2.0* (*Life Technologies*) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, *Ion Xpress Barcode Adapters Kit* (*Life Technologies*) ile barkodlandı. Barkodlanan kütüphane ürünleri *Agentcourt AMPure XP reagent* ve % 70'lik etanol kullanılarak firma protokollerine uygun olarak saflaştırıldı. Normalizasyon için miktar tayini, *Ion Library Quantitation Kit* kullanılarak qPCR ile yapıldı.

Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması

Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması için toplam 765 primer çifti içeren (havuz I: 387 primer çifti; havuz II: 378 primer çifti) iki adet primer havuzunun her biri için Tablo 3-2'de gösterilen miktarlarda solüsyon hazırlandı.

Tablo 3-2: 2X primer havuzu için hazırlanan miks.

Malzeme	**Miktar**
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	4 µl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	10 µl

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için iki farklı solüsyon Tablo 3-3'de gösterilen şekilde hazırlanarak bir sonraki basamağa geçildi.

Tablo 3-3: PZR solusyonları.

2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks	14 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	6 µl
Total hacim	20 µl

Hazırlanan PZR reaktiflerinin, Tablo 3-4'de gösterilen program kullanılarak termal döngü cihazında hedef bölgelerin çoğaltılması sağlandı.

Tablo 3-4: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı

Evre	**Basamak**	**Sıcaklık**	**Süre**
Bekleme	Enzim aktivasyonu	99 °C	2 dk
Döngü (x17)	Denatürasyon	99 °C	15 sn
	Bağlanma ve uzama	60 °C	4 dk
Bekleme	-	10 °C	∞

Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi

Bu aşamadan önce, her bir DNA örneğinin iki farklı primer havuzu ile çoğaltılmış olan PZR ürünleri, her birinden 10'ar µl alınarak, toplam hacim 20 µl olacak şekilde birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 2 µl *FuPa Reagent* eklenerek, tablo 3-5'de gösterilen programda termal döngü cihazına kondu.

Tablo 3-5: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	**Süre**
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

Barkod ve Adaptörlerin Bağlanması

Her bir barkod (*Ion Express™ Barcode*), *Ion P1 Adapter* ve nükleazdan arındırılmış su ile karıştırılarak 1:4 oranında seyreltildi (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: Örnek barkod adaptör karışımı

İçerik	**Hacim**
Ion P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress™Barcode X[1]	2 µl
Nükleazdan arındırılmış su	4 µl
Toplam hacim	**8 µl**

1: Seçilmiş barkod

Primer dizilerinin kısmi kesiminden sonra elde edilen ürüne (22 µl), örnek başına, tablo 3-7'de gösterilen miktarlarda *switch solusyonu*, *barkod adaptör karışımı* ve *DNA ligaz* eklenerek, barkod – adaptörlerin ligasyonu için tablo 3-8'deki programda termal döngü cihazına kondu.

Tablo 3-7: Barkod-adaptör ligasyon solusyonu

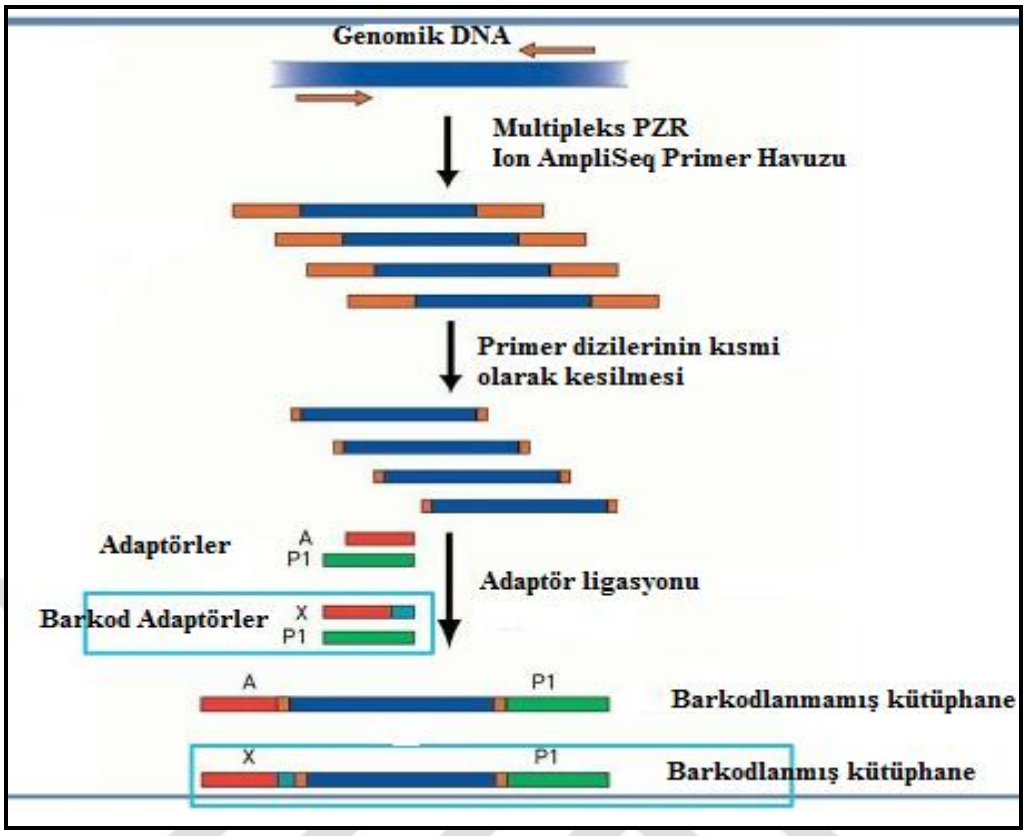
Malzeme	**Hacim**
Switch solusyonu	4 µl
Barkod-Adaptör Karışımı	2 µl
DNA ligaz	2 µl
Toplam Hacim (22 µl ürün ile birlikte)	**30 µl**

Tablo 3-8: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	**Süre**
22 °C	30 dk
72 °C	10 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

Barkod – adaptörlerin ligasyonu sonrasında fazla DNA materyalinin ve enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla çoğaltılmamış kütüphane ürünlerinin saflaştırılması aşamasına geçildi.

Şekil 3-1'de kütüphane hazırlamanın basamakları görsel olarak şematize edilmiştir.



Şekil 3-1: Kütüphane hazırlamanın basamakları - (110)'dan.

Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması

Bu aşamada *Agencourt® AMPure® XP Reagent* ve taze hazırlanmış % 70'lik etanol kullanıldı.

Her bir örneğe 45 µl (toplam örnek hacminin 1.5 katı) *Agencourt® AMPure® XP Reagent* eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Ardından örnekleri içeren plate manyetik bir rafa (DynaMag^{TM}_96 Side Magnet (Cat.no.12331D) alındı ve solüsyon berraklaşıncaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 150 µl taze hazırlanmış % 70'lik etanol eklendi. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Ardından kütüphane ürünlerinin normalizasyonu için kantitasyon aşamasına geçildi. Kütüphane ürünlerinin kantitasyonu kantitatif PZR ile yapıldı.

Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Kantitatif PZR ile Yoğunluk Tayini

Kantitatif PZR için *Ion Ampliseq™ Library Quantitatin Kit* kullanıldı. Bu kitin içeriğinde yer alan malzemeler: *E. Coli DH10B Ion Control Library, 2X TaqMan® MasterMix, 20X Ion TaqMan® Assay.*

Saflaştırma sonrasında manyetik boncuklara bağlı olarak bulunan amplikonların ayrıştırılarak çözünmesi için her bir örneğe 50 µl *low TE* (Tris – EDTA) eklendi. *Low TE* eklenmiş örnekleri içeren plate, manyetik rafa yerleştirildi ve manyetik boncukların kuyucukların kenarlarına tam olarak yapışması için oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. Daha sonra her bir örnek, nükleazdan arındırılmış su kullanılarak 1:100 oranında (495 µl nükleazdan arındırılmış su + 5 µl örnek) seyreltildi. Kantitatif PZR için bu seyreltilmiş örnekler kullanıldı.

Standart örnek olarak kullanılmak üzere *E. Coli DH10B Ion Control Library* (~68.0 pM)'den seri seyreltme işlemleri ile 6.8 pM, 0.68 pM ve 0.068 pM yoğunluklarında örnekler hazırlandı. Kantitatif PZR için her kütüphane örneği ve standart örnek çift tekrarlı olarak çalışıldı. Her örnek için tablo 3-9'da gösterilen miktarlarda *2X TaqMan® MasterMix, 20X IonTaqMan®Assay* kullanılarak karışım hazırlandı. Bu karışıma her kütüphane örneği ve standart örnekten 9'ar µl eklenerek Tablo 3-10'daki gibi hızlı döngü programında gerçek zamanlı PZR yapıldı.

Tablo 3-9: Kantitatif PZR için örnek başına hazırlanan karışım

Malzeme	**Miktar**
2X TaqMan® MasterMix	20 µl
20X Ion TaqMan® Assay	2 µl
Toplam Hacim[1]	22 µl

1: Her bir örnek duplike olarak çalışıldığından, 2x karışım hazırlandı ve 11'er µl dağıtıldı.

Tablo 3-10: Gerçek zamanlı PZR için kullanılan termal döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
UDG İnkubasyonu	50 °C	2 dk
Polimeraz aktivasyonu	95 °C	3 sn
Döngü (40X)	60°C	30 sn

Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen yoğunluk değerlerine göre gerekli seyreltme işlemleri yapılarak, tüm kütüphane ürünleri ~100 pM yoğunluğa eşitlendi. Eşitleme sonrasında her kütüphane örneğinden 10 µl alınarak emülsiyon PZR'de kullanılmak üzere stok kütüphane hazırlandı.

3.2.2.7. Taslak (*Template*) Hazırlanması

Taslak hazırlanmasında kullanılan kitler tablo 3 – 11'de gösterilmiştir. Bu aşamada ~100 pM yoğunluğa normalize edilmiş kütüphane ürünlerine emülsiyon PZR ve zenginleştirme işlemleri uygulandı.

Tablo 3-11: Taslak hazırlanmasında kullanılan kitler ve içerikleri - (117)'dan.

Ion PGM Template OT2 Reactions 400 Kit	Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly
Ion PGM Template OT2 Supplies 400 Kit	Ion OneTouch Reagent tubes, Ion OneTouch Recovery Routers, Ion OneTouch Recovery Tubes, Ion OneTouch Sipper Tubes, Ion OneTouch 2 Amplification Plates, Ion OneTouch ES Supplies, Ion OneTouch 2 Cleaning Adaptors
Ion PGM Template OT2 Reagents 400 Kit	Ion PGM Template OT2 400 Reagent Mix, Ion PGM Template OT2 400 Enzyme Mix, *Ion PGM Template OT2 400* ISP, Ion PGM Template OT2 400 Reagent X
Ion PGM Template OT2 Solutions 400 Kit	Ion PGM Template OT2 400 PCR Reagent B, Ion OneTouch Oil, Ion OneTouch Reaction Oil, Nuclease Free Water, Ion PGM OT2 Recovery Solution, Ion PGM Wash Solution, MyOne Beads Wash Solution, Neutralization Solution, Tween Solution
Ion PGM Enrichment Beads	Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads

Emülsiyon PZR

Bu aşamada, hedef bölgeleri içeren kütüphane ürünlerinin yağ – su emülsiyonları oluşturarak klonal çoğaltılması amaçlanır.

Bir önceki basamakta hazırlanan stok kütüphane ürününden (~100 pM yoğunluktaki ürünler) 2 ve 23 µl arındırılmış su ile 25 µl'ye tamamlandı. Böylece kütüphane ürünleri 8 pM'a seyreltildi. Emülsiyon PZR için Tablo 3-12'de gösterildiği gibi amplifikasyon çözeltisi hazırlandı.

Tablo 3-12: Emülsiyon PZR için hazırlanan amplifikasyon çözeltisi

Malzeme	**Hacim**
Ion PGM Template OT2 400 Reagent Mix	500 µl
Ion PGM Template OT2 400 PCR Reagent B	285 µl
Ion PGM Template OT2 400 Enzyme Mix	50 µl
Ion PGM Template OT2 400 Reagent X	40 µl
Seyreltilmiş kütüphane	25 µl
Toplam hacim	900 µl

Hazırlanan amplifikasyon çözeltisi vorteks ile karıştırıldıktan sonra, üzerine 100 µl *Ion PGM Template OT2 400 ISP* eklenerek toplam hacim 1000 µl'ye tamamlandı. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra tüm karışım reaksiyon filtresine (*Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly*) yüklendi. Üzerine 1,5 kat hacimde (1500 µl) reaksiyon yağı ilave edilerek kullanılan kite uygun programda, *Ion OneTouch 2* cihazında emülsiyon PZR yapıldı (Şekil 3-2).

Şekil 3-2: *Ion OneTouch 2* cihazı.

Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi

Emülsiyon PZR sonrası ~10 dk santrifüj yapılarak amplikon yüklü partiküller (*template positive ISP*) dibe çöktürüldü. Toplam 100 µl ürün kalacak şekilde supernatant kısım atıldı ve zenginleştirme için gerekli çözeltiler hazırlandı.

***Melt-Off* Çözeltisinin Hazırlanması**

Melt-Off çözeltisi için *Tween® Solution* ve 1 M NaOH kullanıldı. Final yoğunluklar; % 0.1 *Tween® 20 deterjan* ve 125 mM NaOH olacak şekilde, 280 µl *Tween®* çözeltisi ve 40 µl 1 M NaOH kullanılarak 320 µl *melt-off* çözeltisi hazırlandı.

Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkanması

DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads karıştırıldı ve 13 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf, manyetik rafa (*DynaMag™ – 2 Magnet*) alındı ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilerek boncukların ependorf duvarına yapışması sağlandı. Oluşan supernatant atıldı. 130 µl *MyOne™ Beads Wash Solution* eklenerek ependorf manyetik raftan alındı ve pipet yardımıyla karıştırıldı. Böylece streptavidin C1 boncukları, stok çözeltiden uzaklaştırılmış oldu.

Sekiz Kuyulu Plağın Doldurulması

Hazırlanan çözeltiler ve emülsiyon PZR ürünü, Tablo 3-13'te gösterilen şekilde 8 kuyulu plağa yüklendi ve zenginleştirme işlemi için *Ion OneTouch™ ES* cihazına (Şekil 3-3) konuldu. Ek olarak, zenginleştirme sonrası oluşacak ürünün aktarılacağı 0.2 ml ependorf tüpüne 10 µl nötralizasyon çözeltisi konularak Şekil 3-3'deki gibi cihaza yerleştirildi.

Tablo 3-13: Sekiz Kuyulu Plağın Doldurulması.

Kuyu Numarası	**Yüklenen malzeme**
Kuyu 1	Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)
Kuyu 2	DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl)
Kuyu 3	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 4	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 5	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)
Kuyu 8	Boş

Şekil 3-3: *Ion OneTouch™ ES* cihazı.

3.2.2.8. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi

Dizileme için *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit* kullanıldı. Firma protokollerine uygun olarak; Ion PGM™ dizileme cihazının (Şekil 3-4) klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkamaları, pH kalibrasyonları yapıldı ve zenginleştirilmiş ürünler çipe (*Ion 318™ Chip v2*) yüklendi. Tablo 3-14'deki gibi dizileme planı oluşturularak dizileme işlemi başlatıldı.

Tablo 3-14: Dizileme Planı.

Ion Reporter	Version: 4.6
Örnek	DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion reporter iş akışı	Oluşturulacak
Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Kütüphane anahtarı	Ion TCAG (TCAG)
Template Kiti	Ion PGM Template OT2 400 Kit
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit

Akış sayısı	850
Çip Tipi	Ion 318™ Chip v2
3' Adaptör:	Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGAGAC)
Barkod	IonXpress
Boncuk yükleme (%)	10
Anahtar Sinyal (1-100)	30
Kullanılabilir dizi (%)	30
Referans Kütüphane	hg19(Homo sapiens)
Hedef Bölgeler	RRD_IAD68579_200_Designed.bed
Hotspot Bölgeler	
Eklentiler	coverageAnalysis, FileExporter, RunTransfer, variantCaller (germline_low_stringency)
Proje	RRD_Panel

Şekil 3-4: Ion PGM™ dizileme cihazı.

3.2.2.9. Veri Analizi

Dizileme sonrasında *Torrent server* yazılımına aktarılan verilere ait BAM dosyaları, analiz için IR yazılımına aktarıldı. Hedef bölgelere ve *hot spot* bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, IR'da analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, filtrelere tabi tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. İlk aşama filtreleme işleminde; çerçeve kaymasına, dur kodonu oluşumuna veya aminoasit değişimine yol açan değişimler listelendi. Fenotip ile uyumlu bulgu elde edilemeyen olgularda ikinci aşama filtreleme ile kodlayan bölgeler, kırpılma bölgeleri ve UTR (*untranslated regions*) bölgelerindeki sıklığı bilinmeyen veya nadir (MAF<0.01) değişimler listelenerek incelendi. Tüm değişimler *Integrative Genomics Viewer (IGV)* yazılımda tek tek bakılarak teyit edildi. Daha önce karakterize edilmemiş değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı, *Mutation Taster* (*http://www.mutationtaster.org/*), *Prediction of functional effects of human nsSNPs* (*http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/*) ve *Scale – invariant feature transform* (*http://sift.jcvi.org/*) veritabanları kullanılarak değerlendirildi.

3.2.2.10. YND İle Saptanan Değişimlerin SD İle Doğrulanması

Primerlerin Tasarlanması

Primerlerin tasarlamasında dikkat edilen hususlar; seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi içermemesine, ileri, geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2 – 5˚C fark), içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18 – 24 nükleotid içermesine ve gen bölgesinde beklenen mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsamasına, dizi analizinde ~30 – 50 bazın iyi okunamayabileceği gözetilerek özen gösterildi. Özgünlük, *UCSC Genome Bioinformatics* (https://genome.ucsc.edu/index.html)' den "*in silico* PZR" interaktif sistemi ile test edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X $(NH4)_2SO_4$] (Thermo Scientific), 25 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific), %0 – 10 DMSO (Biomatik

Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH_20) ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'ı ile birlikte çalışıldı.

PZR; 95°C de 10 dk denatürasyon, ardından 95°C de 30 sn denatürasyon, primerlerin Tm (Temparature of Melting)'e göre değişen 64°C den 52°C ye kadar ve 30 sn lik bağlanma ısılarında ve 70°C de 45 – 90 sn (1 kb/1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 35 – 40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk'lık uzama ile, PZR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

PZR Saflaştırması (Enzimatik Yöntem İle)

Saflaştırma işlemi için Exonuclease – I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında PZR protokolü ile 37 °C de 15dak. , 85°C de 15 dak. ardından 4°C ye getirildi. Saflaştırılan ürünler cihazdan alınarak bir sonraki işlem için +4°C'de karanlıkta saklandı.

Dizi Analizi

PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan amplikonların dizi analizi, Tıbbi Genetik A.D. laboratuvarında bulunan ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi.

DNA Dizi Analizi

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

Dizi PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP'leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR'da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (dizi okuma kalitesi için seçilir) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH_2O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

Dizi Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden temizliği için plak içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 ethanol eklendi. Plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi. 3810 rpm'de (1400-2000xg) 45 dak. santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak kuyucuk ağızları üste gelecek biçimde çevrilerek 1100 rpm'de (168xg) 30 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik ethanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de (1650xg) 15 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve 1170 rpm'de (185xg) 60 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer'ı [(dH_2O ya da HiDi formamid (Highly Deionized formamid)] eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dak. denatüre edildi, 2 dak. buz üzerinde bekletildi ve ABI3500'de yürütüldü.

Elektoforez Cihazına Yükleme

Saflaştırılan örnekler ABI3500 cihazına yüklemek için en yüksek hızda kısa santrifüj yapılıp denatüre edildikten sonra yürütme işlemine geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn. 'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

Elektroforez Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kapiller Elektroforezi sonucunda alınan piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı. Elektroferogramda pik rengi, Adenin yeşil, Guanin siyah, Sitozin mavi ve Timin kırmızı ile gösterildi.

Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v2.7 (ABI) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde UCSC Genome Browser, Ensembl Genome Browser vb. çeşitli *web* sitelerinden yararlanıldı.

SeqScape v2.7 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v2.7 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Elde edilen sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde, 2004-2014 yılları arasında, klinik muayeneleri ve sitogenetik bulguları sonucu tanı ve ayırıcı tanıda FA olduğu düşünülen 10 aileden 10 indeks olgu ile Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniğinden yönlendirilen 1 indeks olgu katıldı. DNA izolasyonları 10 indeks olgudan, 22 sağlıklı ebeveyninden, 1 etkilenmiş amca, 1 sağlıklı dede ve 1 etkilenmiş kardeşten alınan periferik kan örneğinden, kemik iliği nakli almış olan bir indeks olguda ise deri biyopsisi (Aile FA-11) örneğinden gerçekleştirildi. Ailelerden birinde etkilenmiş erkek cinsiyette indekse ek olarak etkilenmiş bir amca (FA-1), bir diğerinde etkilenmiş erkek cinsiyette iki kardeş (FA-3), diğer tüm ailelerde tek etkilenmiş olgu bulunmaktaydı. Etkilenmiş olguların 6'sı dişi (FA-2, 6, 7, 8, 9, 10) 7'si erkek (Aile FA-1, 3, 4, 5, 11) cinste idi. Olguların 5'i birinci derece akraba evliliğinden doğan çocuklardı (FA-1, 3, 4, 7, 11). İndeks olguların 4'ünde (Aile FA-1, 2, 3,11) DEB testi pozitif, 5'inde (Aile FA-4, 5, 6, 7, 9) negatif bulunmuş, diğer iki olguda (Aile FA-8 ve FA-10) kromozom kırık çalışması yapılmamıştı. DEB testi yapılmayan olgularda ve DEB testi yapılıp negatif saptanan olgularda ayırıcı tanıda FA düşünülmekte idi.

YND çalışması kapsamında 11 ailenin indeks olgularında, FA ilişkili 17 genin bütün ekzonlarını ve ekzon/intron sınırlarının introna ait 10bç'i RID için tasarlanan hedefe yönelik YND paneli ile çalışıldıktan sonra yapılan biyoinformatik analizlerde, üç ailede, iki farklı gende (*FANCA, BRIP1*) 4 farklı mutasyon saptandı. 11 ailenin 3'ünde mutasyon saptanması böyle bir grupta moleküler tanı oranının %27,27 olduğunu gösterdi. Saptanan mutasyonların üçü kırpılma bölgesi mutasyonu, biri çerçeve kayması mutasyonu idi. Bu mutasyonların üçü daha önce tanımlanmış, biri daha önce literatürde tanımlanmamış mutasyonlardı.

RID, YND paneli proje kapsamındaki olgular dışında, radiyal ışın defektleri ile giden ve klinik tanısı FA olmayan 23 diğer olgu ile birlikte çalışıldığından yürütülen dört farklı işlemden (ilk, 2. ve 3. çalışmanın her birinde 8, 4.çalışmada 10 olgunun kütüphane ürünleri, emPZR ve zenginleştirme sonrasında 4 ayrı 318v2 çiplerine yüklemesi) elde edilen metrik sonuçlar, kapsam (*coverage*), derinlik (*coverage deep*) ve varyant isimlendirme (*variant calling*) bilgileri Torrent Server'in arayüzündeki

istatistiksel veriler ve sistemin verdiği *excell* dosyasından alınarak Tablo 4-1'de sunulmaktadır.

Tablo 4-1: YND çalışmalarının metrik sonuçları.

Çalışma No	1.	2.	3.	4.
Toplam baz sayısı	1.12 G	1.42 G	813 M	1.32 G
Anahtar sinyal	55	55	67	55
Toplam okuma sayısı	4,428,129	5,522,817	4,251,706	5,636,447
Kullanılabilir okuma (%)	76	76	68	74
Çip kuyucuklarının dolma yüzdesi	53	65	57	68
Zenginleştirme (%)	97	100	98	100
Klonalite (%)	81	82	82	82
Son kütüphane ürünleri (%)	93	91	82	91
Okumaların aritmetik ortalaması (bç)	252	257	191	234
Okumaların ortancası (bç)	281	286	192	249
Okumaların tepedeğeri (bç)	330	330	79	329
Referans genoma haritalanan toplam baz sayısı	1.1 G	1.38 G	796 M	1.29 G
Referans genoma haritalanan toplam okuma sayısı	4,375,012	5,414,531	4,197,063	5,573,118
Okumaların ortalama doğruluğu (%)	99,4	99,4	99,3	99,3
AQ17 kalitesinde olan baz sayısı	1.07 G	1,35 G	756 M	1.26 G
AQ20 kalitesinde olan baz sayısı	1.02 G	1,29 G	709 M	1.19 G
Mükemmel haritalama kalitesinde olan baz sayısı	762 M	957 M	544 M	894 M
Hedef bölge ile örtüşen ortalama okuma (%)	93,1	95	74,6	91
Ortalama haritalanmış okuma	546,9	676,8	524,6	557,3
Ortalama derinlik	603,4	770,3	384,9	559,3
Ortalama okuma özgünlüğü	94,9	95,4	92,7	93,9
Gözlenen ortalama varyant	161,9	158,3	93,9	171,1

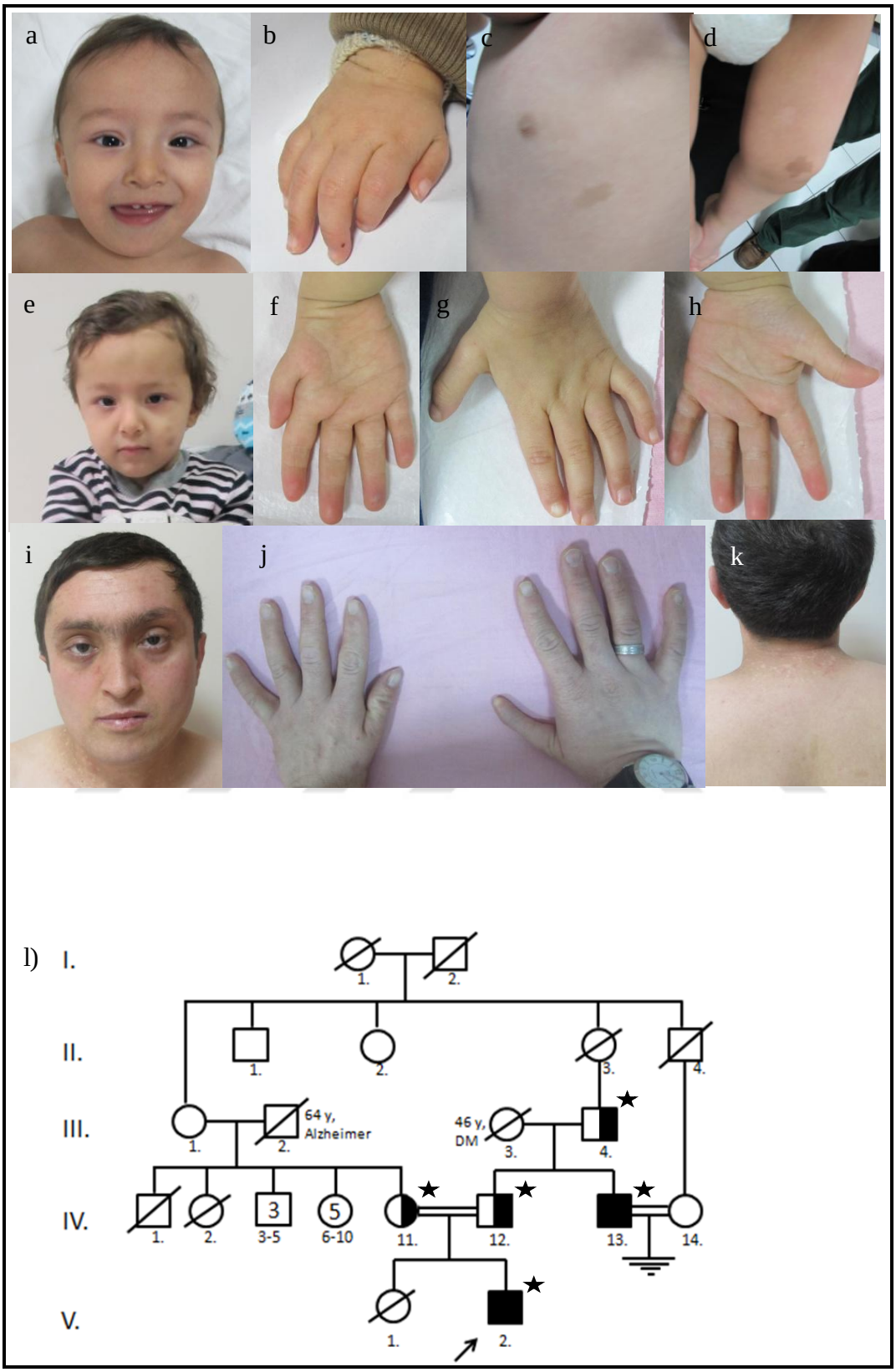
Toplam dört çalışmanın her birinde ortalama 1168 M baz ortalama 579 derinlikle okundu. AQ17 kalitesinde 1109 M baz dizilendi. Bu değerlerle birlikte metrik sonuçların diğer değerleri de her bir olgunun detaylı analizi ve yorumlanması için uyumlu bulundu.

RID YND panel ile yaptığımız dört çalışma sonucunda toplam 765 amplikondan ortalama 500 derinlikle çalışıldığında 6 amplikon (tüm panelin %0,8'i) kaçırıldı. Bu oran paneldeki FA genleri için %1 olup ortalama 500 derinlikle toplam 407 FA genleri amplikonundan ortalama 4'ü kaçırıldı. Baz düzeyinde hesaplandığında; RID panelinin toplam bazları (220.000 bç) için ortalama 415 derinlikle çalışıldığında ortalama 2388 (toplam panelin %1,1'i) baz kaçırıldı. Her olgu için tüm panelin ortalama %0,56'sı kadar *No Call* bazlar gözlendi.

4.1 Aile FA – 1:

$1{,}5^{0}$ kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ikinci gebeliklerinden doğan $1^{9/12}$ yaşındaki erkek çocukları Tıbbi Genetik AD polikliniğinde değerlendirildi ve fizik muayenede; fasiyal dismorfik bulgular, vücutta çok sayıda sütlü kahverengi lekeler, bilateral proksimal yerleşimli el başparmakları ve sağ el başparmağında hipoplazi saptandı. Tüm bu klinik bulgularla ayırıcı tanıda ilk sırada FA düşünüldüğünden tam kan sayımı yapıldı ve trombositopeni (102.000/µl) saptandı. Kromozom kırık çalışmasında da FA ile uyumlu sonuçlar (NTM ile % 3.80 kırık; DEB ile % 3.69 kırık) alındı.

Aile öyküsünde etkilenmiş bir amcanın bulunduğu öğrenildi. Amcanın 30 yaşındaki fizik muayenesinde indeks olguya benzer klinik bulgular saptandı. Olgunun kromozom kırık çalışmasında FA ile uyumlu olarak NTM ile % 3.48, DEB ile % 6.96 kırık tespit edildi (Şekil 4-1) .

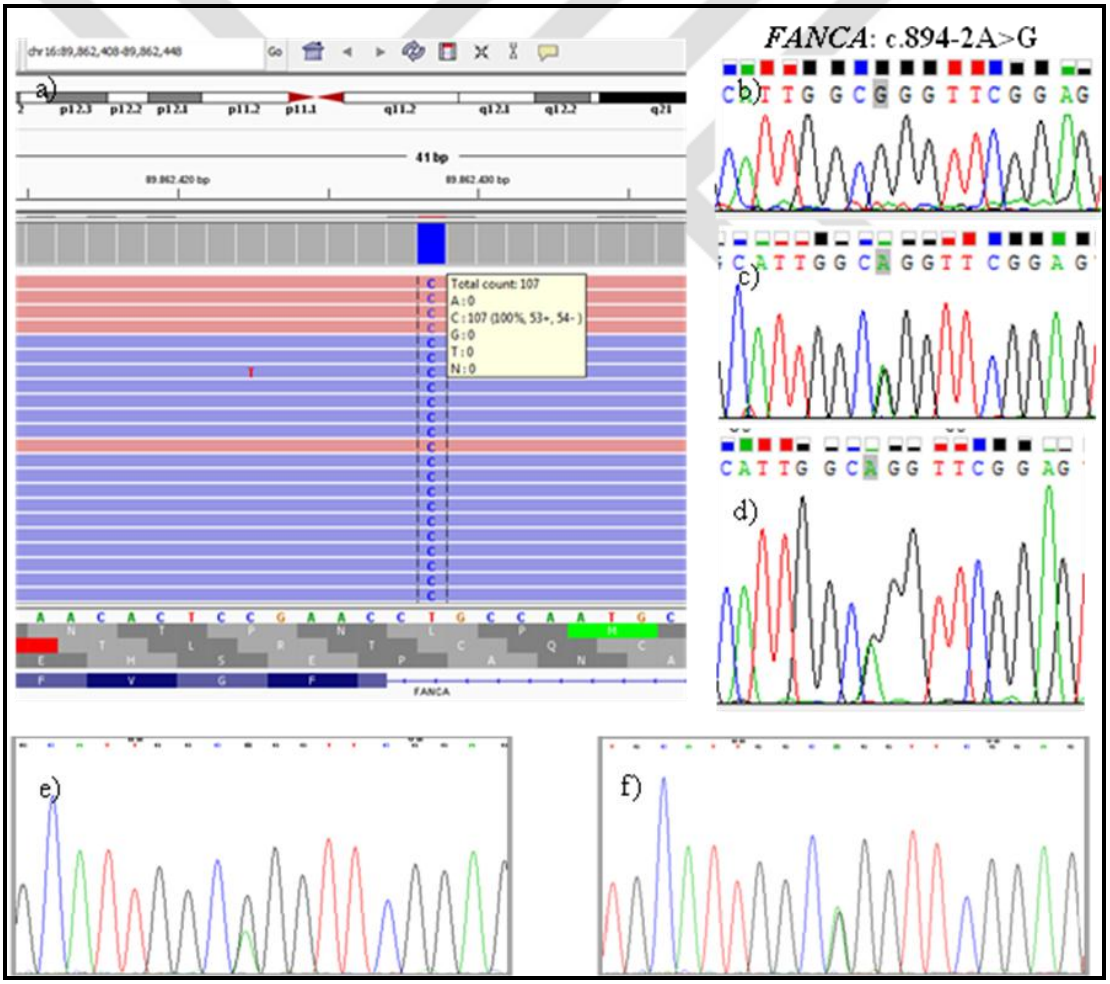


Şekil 4-1: Aile FA-1, fotoğraflar ve aile ağacı.

(a)-(d) olgunun $1^{9/12}$ yaş fotoğrafları, (e)-(h) olgunun $2^{7/12}$ yaş fotoğrafları. (i)-(k) etkilenmiş amca; (l) aile ağacı. ★:moleküler analiz yapılan olgular

4.1.1 Moleküler Analizler

İndeks olguda (Şekil 4.1, V:2) RID YND panel çalışmasında, ortalama 537 derinlikle hedef bölgenin %99,35'i kapsandı, toplam 157 varyant gözlendi. Filtreleme ve varyant değerlendirme sonrasında daha önce ***FANCA*** (NM_000135.2) geninde FA ilişkili olarak tanımlanmış (118, 119) **homozigot c.894-2A>G** (CS050799; [hg19] chr16:89862428T>C) mutasyonu saptandı ve SD ile doğrulandı, anne ve babanın bu mutasyon için heterozigot taşıyıcı olduğu belirlendi (Şekil 4-2). Bu mutasyonun etkilenmiş amcada heterozigot olarak saptanması üzerine mozaisizm olasılığını araştırmak amacıyla ağız mukoza hücrelerinde de mutasyon araştırıldı ancak mozaisizm saptanmadı. Paternal büyükbabanın (III:4) bu mutasyon için heterozigot olduğu gösterildi ancak büyükanne (III:3) yaşamadığından araştırılamadı.



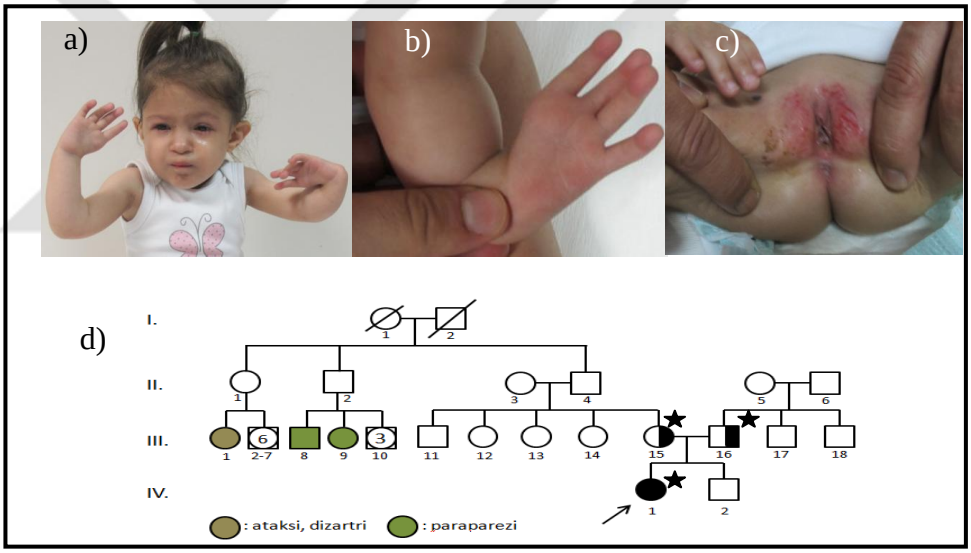
Şekil 4-2: Aile FA-1, moleküler sonuçlar.

(a) olgu V:2'de YND ile saptanan mutasyonun (*FANCA*: c.894-2A>G) IGV görüntüsü, (b) Aynı mutasyonun SD ile doğrulanması, olgu V:2, (c) taşıyıcı babanın (IV:12) elektroferogram görüntüsü, (d) taşıyıcı annenin (IV:11), (e) etkilenmiş amcanın (IV:13) (f) taşıyıcı dedenin (III:4) elektroferogram görüntüsü.

4.2 Aile FA – 2:

Aralarında akraba evliliği bulunmayan anne ve babanın ilk gebeliklerinden doğan dişi olgu $3^{3/12}$ yaşında hidrosefali, anal atrezi ve RID nedeniyle Tıbbi Genetik AD polikliniğinde değerlendirildi.

$3^{3/12}$ yaşındaki fizik muayenesinde, ciltte çok sayıda sütlü kahverengi lekeler, bilateral el başparmak agenezisi, el bileklerinde radiyal deviasyon, hipoplastik ayak tırnakları, ayaklarda parmak pozisyon anomalileri (3. parmaklar, 2. ve 4. parmakların altında yerleşimli), anal atrezi saptandı. Bu bulgularla olguda VACTERL-H sendromu ve FA ayırıcı tanıda yer aldı. Ek olarak ağır büyüme geriliği, mikrosefali, çok sayıda sütlü kahverengi lekelerin olması FA tanısının ilk sıraya alınmasına neden oldu. Tam kan sayımında özellik saptanmadı. Kromozom kırık çalışması FA ile uyumlu (NTM ile % 11.3 kırık, DEB ile % 10 kırık) bulundu (Şekil 4-3).

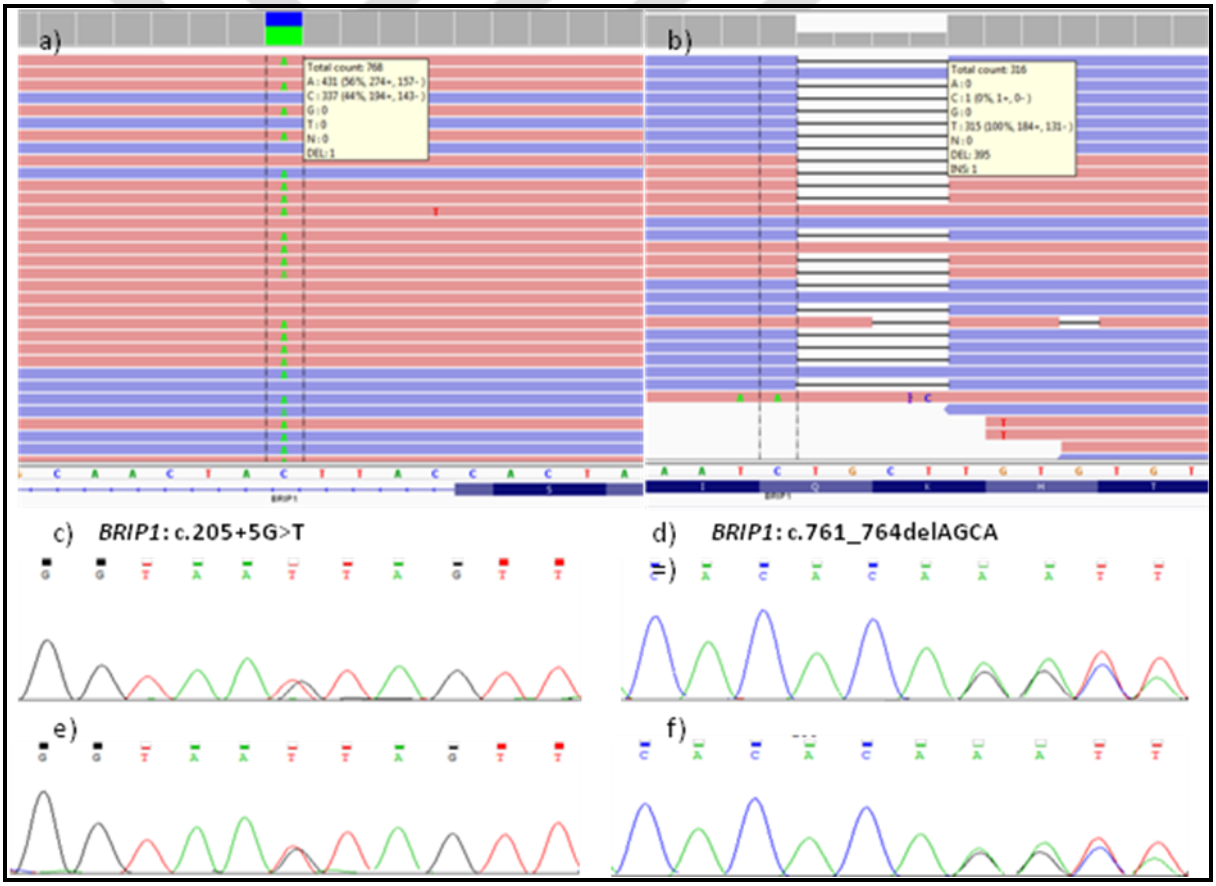


Şekil 4-3: Aile FA-2, fotoğraflar ve aile ağacı.

$3^{3/12}$ yaş, indeks olgu. (a). Olgunun yüz görünümü (b). sol el görünümü (c). anal atrezi (d). aile ağacı. ★ : moleküler analiz yapılan olgular.

4.2.1 Moleküler Analizler

İndeks olguda (şekil 4-3, IV:1), RID YND panel çalışmasında ortalama 960 derinlikle hedef bölgenin %99,35'i kapsandı, 171 varyant gözlendi. Filtreleme ve varyant değerlendirme sonrasında ***BRIP1*** **geninde** (NM_032043.2) **birleşik heterozigot formda [(c.205+5G>T);(c.761_764delAGCA)]** varyantları saptandı. c.205+5G>T (CS053448) varyantı daha önce FA ile ilişkili bir mutasyon olarak tanımlanmış (119, 120) olmasına karşın c.761_764delAGCA daha önce literatürde bildirilmemişti. Çerçeve kaymasına yol açması nedeniyle bu varyant patolojik olarak kabul edildi. Saptanan her iki mutasyon, SD ile doğrulandı. Parental analizde olgunun c.205+5G>T mutasyonunu babadan, c.761_764delAGCA mutasyonunu ise anneden kalıttığı gösterildi (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Aile FA-2, moleküler sonuçlar.

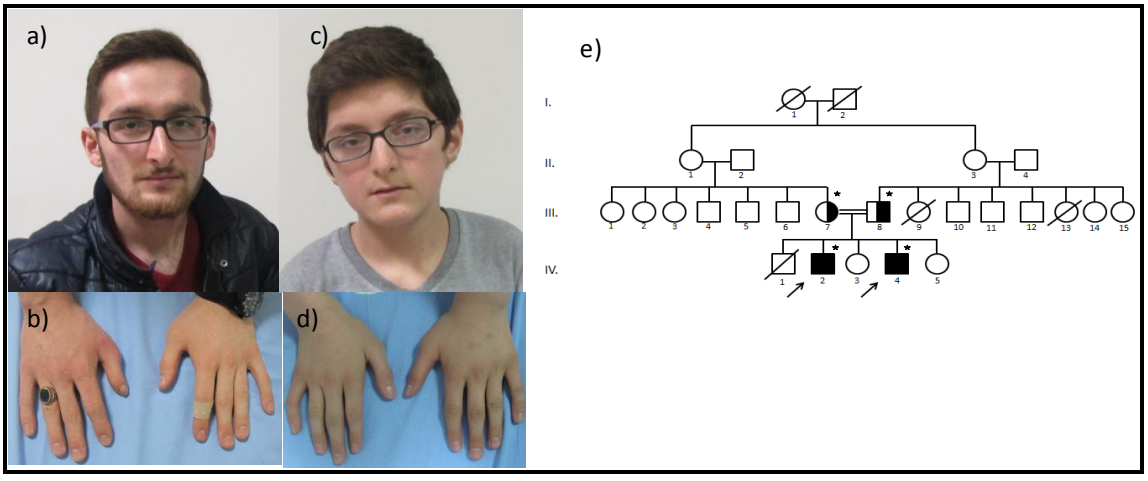
(a) ve (b). indeks olguda (IV:1) YND ile saptanan *BRIP1*: c.205+5G>T heterozigot ve c.761_764delAGCA heterozigot mutasyonlarının IGV görüntüsü, (c). indeks olguda c.205+5G>T heterozigot mutasyonunun SD ile doğrulanması, (d). İndeks olguda c.761_764delAGCA heterozigot mutasyonunun SD ile doğrulanması, (e). babada (III:16), c.205+5G>T heterozigot mutasyonu, elektroferogram görüntüsü, (f). annede c.761_764delAGCA heterozigot mutasyonu, elektroferogram görüntüsü.

4.3 Aile FA – 3:

1° kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ikinci ve dördüncü gebeliklerinden doğan, $10^{3/12}$ yaşında (Şekil 4-5, IV:2) ve $3^{6/12}$ yaşında (Şekil 4-5, IV:4) iki erkek kardeş FA tanısıyla hematoloji kliniğinden izlemdeyken genetik konsultasyon amaçlı Tıbbi Genetik polikliniğine yönlendirildi.

Antenatal izleminde sorun saptanmamış olan olgu FA – 3.1, zamanında, normal spontan doğmuş. Postnatal adaptasyon sorunu olmamış, doğumdan sonra her iki elinde preaksiyel polidaktili saptanmış ve 4 aylıkken opere edilmiş. Üç yaşındayken, tartı alamama ve sık enfeksiyon geçirme şikayetleri olmuş ve bu nedenle olgunun tam kan sayımı yapılmış ve pansitopeni (hgb: 10.7 g/dl, htc: % 31, lökosit: 2800/mm^3, trombosit: 37000/µl) ve kemik iliği aspirasyonunda tüm hücre serilerinde azalma saptanmış. Tıbbi Genetik polikliniğinde de olgunun klinik bulguları ile (preaksiyel polidaktili ve kemik iliği yetmezliği) FA tanısı desteklendi. DEB testi ile FA uyumlu bulundu. On yaşında belirginleşen trombositopeni (23000/µl) nedeniyle streoid (metilprednizolon) tedavisi başlanmıştı.

Ailenin benzer bulgular taşıyan ikinci olgusunda da (olgu FA – 3.2) kromozom kırık çalışmasında FA ile uyumlu (NTM ile % 7.17 kırık, DEB ile % 3.48 kırık) sonuç alındı.

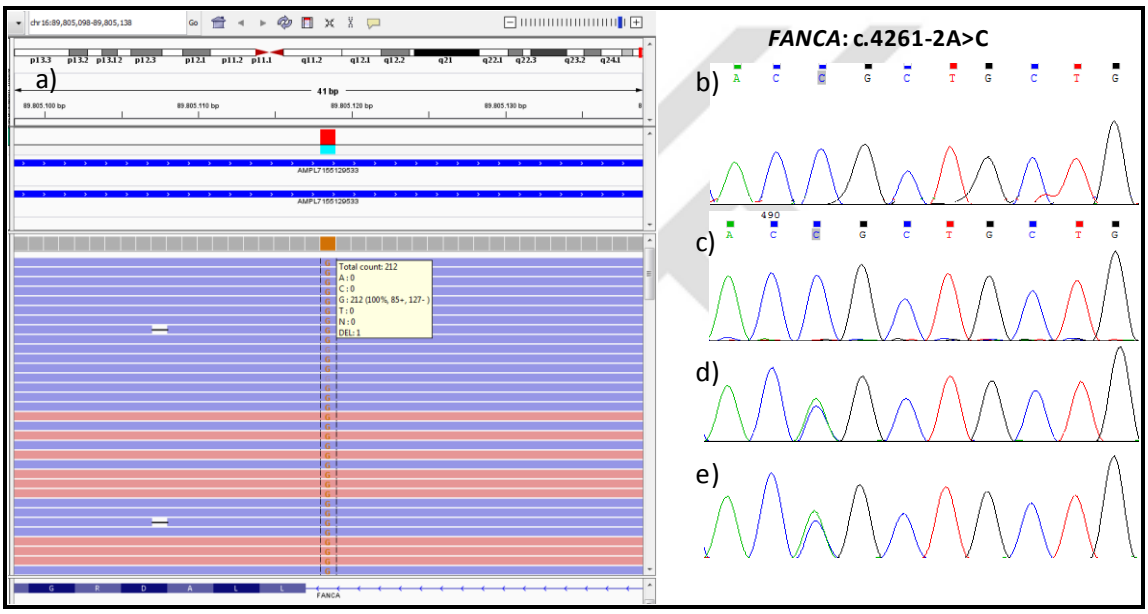


Şekil 4-5: Aile FA – 3, fotoğraflar ve aile ağacı.

(a) Olgu FA – 3.1'in (IV:2) $19^{6/12}$ yaş, olgu FA – 3.2'nin (IV:4) $13^{8/12}$ yaş fotoğrafı. (b). Olgu FA – 3.1, bilateral opere preaksiyel polidaktili. (c).Olgu FA – 3.2,benzer yüz görünümü. (d).Olgu FA – 3.2, sol elde opere preaksiyel polidaktili ve hipoplastik başparmak, (e). aile ağacı.

4.3.1 Moleküler Analizler

İndeks olgu FA – 3.1 (Şekil 4-5, IV:4)'da, RID YND panel çalışmasında ortalama 116 derinlikle hedef bölgenin %96,47'si kapsandı, 124 varyant gözlendi. Filtreleme ve varyant değerlendirme sonrasında ***FANCA* geninde** (NM_000135.2) daha önce tanımlanmış **homozigot c.4261-2A>C** (CS042812 [hg19] chr16:89805118T>G) mutasyonu saptandı (121). SD ile indeks olgu ve etkilenmiş kardeşin (olgu FA – 3.2, şekil 4-6, IV:2) aynı mutasyonu homozigot olarak, anne ve babanın heterozigot olarak taşıdığı gösterildi (şekil 4-6).



Şekil 4-6: Aile FA – 3, moleküler sonuçlar.

(a). olgu FA – 3.2 (IV:4)'de YND ile saptanan *FANCA*: c.4261-2A>C ([hg19] chr16:89805118T>G) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü, (b). Olgu FA – 3.2'de YND ile saptanan mutasyonun SD ile doğrulanması, (c). Aynı mutasyonun, etkilenmiş kardeşte (IV:2) SD ile gösterilmesi, (d) ve (e). sırasıyla anne ve babada, heterozigot formdaki c.4261-2A>C mutasyonunu gösteren elektroferogram görüntüleri.

Tablo 4-2: Olgu grubumuzda sonuçları pozitif saptanan aileler.

Olgu	Doğum yılı	Ailede Akrabalık	Klinik tanı	Sitogenetik bulgular	Moleküler bulgular
FA – 1	2012	1,5° kuzen	Fanconi anemisi	DEB (+): % 3.69 kırık; NTM (+): %3.80 kırık	YND: *FANCA:* c.894-2A>G SD: Doğrulama
FA – 2	2010	yok	Fanconi anemisi, VACTERL-H sendromu	NTM ile % 11.3 kırık, DEB ile % 10 kırık	YND: *BRIP1:* (c.205+5G>T);(c.761_764delAGCA) SD: Doğrulama
FA – 3	2001	1° kuzen	Fanconi anemisi	NTM ile % 7.17 kırık, DEB ile % 3.48 kırık	YND: *FANCA*: c.4261-2A>C SD: Doğrulama

4.4 Aile FA – 4:

1° kuzen evliliği olan çiftin 2. gebeliğinden doğan 2. çocukları 7 aylıkken unilateral (sol) radius aplazisi ve başparmak agenezisi nedeniyle Tıbbi Genetik AD polikliniğimize konsültasyon amaçlı gönderilmişti. Fizik muayenede; sol radius hipoplazisi, sol el başparmak agenezisi, sol el 2. ve 3. parmakta hem proksimal, hem de distal, 4. parmakta distal fleksiyon çizgisi yokluğu, bilateral simian çizgisi, dismorfik bulgular (sağ kulak tragusu hipoplazik, sağ kulak önünde 1 adet ve tragus ile kommisüre inen hat üzerinde 2 adet 0.3x0.3 cm sapsız, deri kabartısı, basık burun kökü ve kemeri, alında kapiller hemanjiom, sütlü kahverengi lekeler), EKO bulguları [midseptal ventrikülоseptal defekt (VSD), geniş koroner sinus, pulmoner venöz (PV) dönüş anomalisi, sol ventrikül geniş] saptandı ve bu bulgularla ayırıcı tanıda; kromozom anomalisi, Goldenhar sendromu, VACTERL assosiyasyonu, FA, Holt-Oram sendromu düşünüldü. Kromozom kırık çalışmasında (DEB) normal sonuç alındı.

Olguda RID YND panel çalışmasında, ortalama 666 derinlikle hedef bölgenin %99,35'si kapsandı, 140 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında

kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.5 Aile FA – 5:

Aralarında akraba evliliği olmayan çiftin ICSI ile oluşan ikiz ikinci gebeliğinden doğan olgumuz, prenatal dönemde (17. GH) İ.Ü, İTF, Kadın Doğum AD tarafından değerlendirilerek patolojik ultrason bulguları (1. fetusta sağ ön kolda tek kemik, sağ elde fleksiyon kontraktürü, 2. fetus normal) nedeniyle Tıbbi Genetik AD poliklinimize yönlendirildi. Aileye verilen genetik danışma sonucunda her iki fetusta amniosentez (AS) yapılmış ve fetal karyotipler normal saptandı. 32 GH'da yapılan USG'de 1. fetusta önceki USG bulgularına ek olarak VSD ve özefageal poş, 2. fetusta ise beyin kıvrımlarının yokluğu gözlendiğinden fetal kranial MR uygulandı. Fetal kranial MR sonucunda 2. fetusun bulguları lizensefali ile uyumlu bulundu. Gebeliğin 35. haftasında doğumun başlaması üzerine 2. fetusa fetosit uygulandı. Canlı doğan ikiz eşi, postnatal dönemde polikliniğimizde detaylı değerlendirildiğinde sağ radius ve başparmak agenezisi, sağ elde fleksiyon kontraktürü, dismorfik bulgular (göreceli makrosefali, belirgin oksiput, üçgen yüz yapısı, yüksek damak, hafif mikrognati), konjenital kalp hastalığı saptandı. Ayırıcı tanıda Holt-Oram sendromu ve FA düşünüldü. Kromozom kırık çalışması ve yurtdışında yapılan *TBX5* geni dizi analizinde normal sonuç alındı.

Olguda RID YND panel çalışması ortalama 129 derinlikle hedef bölgenin %96,08'i kapsandı, 146 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında kapsanmayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.6 Aile FA – 6:

Aralarında akrabalık olmayan çiftin ilk gebeliklerinden doğan olgu sol radius agenezisi nedeniyle konsültasyon amaçlı Tıbbi Genetik AD polikliniğimize yönlendirilmişti. Polikliniğimizdeki değerlendirmede annede gestasyonel diabet olduğu, babada başparmak distal falanks duplikasyonu olduğu, olguda sol radius ve sol

başparmak agenezisi, sağ başparmak hipoplazisi, gingiva hipertrofisi, konjenital kalp anomalisi, serebral atrofi ve trombositopeni saptandı. Bu klinik bulgularla ayırıcı tanıda yer alan sendromlardan biri de FA idi. Kromozom kırık çalışmasında (DEB) normal sonuç alındı.

Olguda RID YND panel çalışması yapıldı, ortalama 496 derinlikle hedef bölgenin %99,22'si kapsandı, 165 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.7 Aile FA – 7:

1° kuzen evliliği olan çiftin ilk gebeliğinden doğan olgu ekstremite anomalileri nedeniyle Tıbbi Genetik AD polikliniğimize konsültasyon amacıyla yönlendirildi. Fizik muayenede dismorfik bulgular (brakisefali, bilateral oryantal epikantus, yukarı çekik palpebral fissürler) ve ekstremite anomalileri (ellerde geri yerleşimli başparmaklar, uca doğru incelen parmaklar, bilateral radiyale dönük ön kollar, ayaklarda parmak pozisyon anomalileri) nedeniyle ayırıcı tanıda FA, Holt – Oram ve TAR sendromu düşünüldü. Kromozom kırık çalışmasında ve yurtdışında yapılan *TBX5* geni dizi analizinde normal sonuç alındı.

Olguda RID YND panel çalışması yapıldı, ortalama 363 derinlikle hedef bölgenin %98,95'i kapsandı, 179 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.8 Aile FA – 8:

Aralarında akrabalık olmayan çiftin 3.gebeliklerinden doğan dişi olgu bilateral radiyal hipoplazi ve başparmak agenezisi nedeniyle Tıbbi Genetik AD polikliniğimize yönlendirilmişti. Fizik muayenede bilateral ön kollar kısa, dirseklerde gamzelenme, ellerde radiyale deviyasyon, bilateral başparmak agenezisi, 2.parmakta silik fleksiyon çizgileri, kamptodaktili, 5.parmakta klinodaktili nedeniyle ayırıcı tanısında FA ve Holt-Oram sendromu düşünüldü. *TBX5* geni dizilendi ve normal sonuç alındı.

Olguda RID YND panel çalışması yapıldı, ortalama 329 derinlikle hedef bölgenin %98,95'i kapsandı, 175 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.9 Aile FA – 9:

Aralarında akrabalık olmayan çiftin ilk çocukları olan olgumuz Fallot tetrolojisi ve bilateral doğuştan kalça çıkığı (DKÇ) nedeniyle Tıbbi Genetik AD polikliniğimize konsültasyon için yönlendirilmişti. Fizik muayenede dismorfik bulgular (düz oksiput, düz kaş kemerleri, dar palpebral fissürler, bilateral epikantus, hafif malar hipoplazi, hipoplastik burun kanatları, dolgun yanaklar, mikrognati, kısa boyun), Fallot tetrolojisi, bilateral DKÇ, psikososyomotor gerilik, BGG, mikrosefali, hipoplastik sol el başparmağı ve uca doğru incelen parmaklar nedeniyle ayırıcı tanıda MKA/MR ve FA düşünüldü. Kromozom kırık çalışmasında ve aCGH analizinde normal sonuç alındı.

Olguda RID YND panel çalışması yapıldı, ortalama 450 derinlikle hedef bölgenin %98,82'si kapsandı, 162 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.10 Aile FA – 10:

Aralarında akrabalık ilişkisi olmayan çiftin 5. gebeliğinden 18 GH'da tahliye ile doğan dişi fetus, patolojik USG bulguları (sağ ön kolda tek tübüler kemik, sağ elde bilekten içe deviyasyon, dört parmak yapısı) nedeniyle perinatoloji konseyinde değerlendirilmiş ve Tıbbi Genetik AD polikliniğimize yönlendirilmişti. Fetusta yapılan fizik muayenede sağ üst ekstremitede el radiyal tarafa deviye, sağ elde dört parmak mevcut, aplastik başparmak, sol elde hipoplastik başparmak nedeniyle ayırıcı tanıda Holt-Oram sendromu ve FA düşünüldü.

Olguda RID YND panel çalışması yapıldı, ortalama 225 derinlikle hedef bölgenin %98,43'ü kapsandı, 155 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında

kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

4.11 Aile FA – 11:

1° kuzen evliliği olan çiftin 2. gebeliklerinden doğan olgu BGG nedeniyle Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik polikliniğinde değerlendirilmiş. Aileden alınan bilgiye göre olgunun $6^{6/12}$ yaşında kusma ve halsizlik nedeniyle değerlendirilmiş ve AA tanısı alarak KİT yapılmış. Fizik muayenede BGG'ye ek olarak mikrosefali, üçgen yüz görünümü, hipoplastik el yapısı, tenar hipotrofisi, hipopigmente lekeler saptanmış. Bu nedenle FA klinik tanıda yer almış. Yapılan kromozom kırık çalışmasında pozitif sonuç alınmış.

KİT yapılmış olduğundan olgudan DNA elde etmek amacıyla deri materyali alınmış.

Olguda RID YND panel çalışması yapıldı, ortalama 291 derinlikle hedef bölgenin %98,56'sı kapsandı, 153 varyant gözlendi. RID YND panel çalışmasında kapsanamayan bölgeler SD ile tarandı. Her iki dizileme çalışmasında da herhangi bir patolojik değişim saptanmadı.

5. TARTIŞMA

FA, klinik olarak inter ve intrafamilyal heterojenlik gösteren nadir bir genetik hastalıktır. Olguların %70-75'inde multipl konjenital anomaliler, çoklu sistem, organ ve hematolojik bulgular, kemik iliği yetmezliği ve kanser riskinde artış gözlenmekte, %25-30'unda ise her hangi bir fiziksel anomali ortaya çıkmamaktadır. Şimdiye kadar ilişkisi bilinen ve lokus heterojenliği gösteren genlerdeki *germ* line mutasyonlara ek olarak, somatik mozaisizmle ortaya çıkan formlarının da varlığı, bu geniş spektrumda seyreden hastalığın tanısını güçleştirmektedir.

Günümüze kadar yapılan çeşitli moleküler genetik çalışmalarda, 16'sı otozom ve biri X kromozomunda lokalize toplam 17 büyük gendeki yaklaşık 712 farklı mutasyonla ilişkili olduğunun gösterilmiş olması FA'nın yüksek genetik heterojenitesinin altını çizmektedir. Bu genlerin herhangi birinde belli bir "*hot spot*" mutasyon bölgesi de bulunmamaktadır. Kapalı toplumlarda, genetik kayma ve atasal haplotipler sonucu bazı mutasyonların sıklık oranları coğrafik ve etnik farklılıklar göstermektedir.

FA'nın moleküler genetik tanısında, SD yöntemi ile her bir genin dizilenmesi yüksek maliyeti ve teknik işlemlerin uzun sürmesi nedenleriyle tercih edilmemektedir. Her bir genin tek tek dizilenmesi yerine, aday genin komplementasyon testi ile seçilerek genomik düzeyde dizilenmesi uzun yıllardan beri tercih edilen daha pratik bir yaklaşım olarak uygulanmaktadır. Komplementasyon testinde hastanın hücre kültürü birçok ayrı kapta hazırlanarak, her birinde FA ilişkili genin cDNA'sı ifade edilmekte, DEB/MMC fenotipini düzelten kaptaki cDNA, genomik düzeyde incelenmesi gereken aday gen olarak seçilmektedir. Her bir gene özgün mutasyon taşıyan kontrol referans hücre serilerinin sürekli kullanıma hazır bir koşulda bulundurulması gerekliliği, bu testin pratik bir tanı testi olarak kullanılmasını zorlaştırmakta, bu nedenle test dünyada sayılı merkezlerde yapılabilmektedir. Yüksek kapasiteli DNA dizileme teknolojilerinin uygulamaya girmesi ile bu yaklaşım terk edilmeye başlanmıştır.

YND teknolojisi, aynı bir sürede birçok genin bir arada dizilenmesine olanak sağladığından, yüksek genetik heterojenite gösteren hastalıklarda ve büyük genlerin incelenmesi gerektiği durumlarda moleküler genetik tanıyı kolaylaştıran ve maliyeti düşüren bir yaklaşım sunmaktadır.

YND teknolojisi ile yapılan incelemeler, SD teknolojisinin aksine düşük mozaiklikleri de tanıma olanağı sunarken, kütüphanenin hazırlanması ve biyoinformatik analizlere bağlı olarak translokasyonları, büyük inversiyonları, delesyonları, duplikasyonları, konversiyonları ve tekrar dizi artışları gibi mutasyonları saptama özelliği değişmektedir.

FA'ya neden olan mutasyonların büyük çoğunluğu küçük mutasyonlar (yanlış anlamlı, anlamsız, küçük del/dup, kırpılma hatası) olup DNA dizi analizi ile saptanabilmektedir. *FANCA, FANCB, FANCC* ve *PALB2*'de ise ek olarak hastalık ilişkisi olan büyük delesyon ve duplikasyonlar da gösterilmiştir. Delesyon tipi mutasyonların homozigotluğu, PZR ürünü ya da amplikon elde edilemeyeceğinden, indirekt olarak tanınabilse ya da tahmin edilebilse de, bu tip mutasyonların ve birleşik heterozigotluklarının incelenmesi gerektiğinde gerçek zamanlı PZR, *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA), *microarray,* FISH gibi farklı yöntemlere başvurmak gerekmektedir (30).

Bu tez çalışmasındaki amacımız, FA ilişkili 17 ve diğer RID ile ilişkili 26 genin kodlayan bölgelerini ve literatürde mutasyon tanımlanmış tüm diğer bölgelerini kapsayacak biçimde YND tabanlı bir RID panelinin tasarlanması, ıslak laboratuvar analiz koşullarının optimize edilmesi, elde edilen ham verilerden sadece FA ile ilişkili genlerin biyoinformatik analizlerinin gerçekleştirilmesi, panelin FA'nın moleküler genetik tanısındaki etkinliğinin araştırılması ve yöntemin limitlerinin ortaya çıkarılmasıdır.

Panel tasarımı için ilk aşamada 17 FA geninin HGMD'de kullanılan transkriptlerinde kodlama yapan bölgeleri ve ekzon-intron sınırından içeri giren 10 bç'lik intronik bölgeleri *ampliseq designer*'a (https://www.ampliseq.com) tanıtıldı. Toplam 63.035 bç'lik bir genomik dizinin, her biri 125-375 bç aralığında toplam 407 amplikonda kapsanan ve iki ayrı havuza ayrılmış primer çiftleri elde edildi. Bu tasarım ile beklenen FA ilişkili hedef bölgelerinin % 99,33'ü kapsanmaktaydı. Dizi motifindeki zorluklar nedeniyle *ampliseq designer*'ın primer konuşlandıramadığı yaklaşık 425 bç'lik bölgenin ise manuel yöntemlerle tasarlanan primerlerin kullanıldığı SD yöntemi ile dizilenmesi planlandı. Sonuçlarımızın, Türkiye'deki FA olgularında, mutasyon sıklıklarının belirlenerek moleküler tanı stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olması, mutasyon saptanan olgu ve ailelerine özgün genetik danışma verilmesi, taşıyıcıların belirlenmesi, prenatal ve preimplantasyon tanı için zemin oluşturması hedeflendi.

FA ilişkili 17 genin tarandığı, 11 indeks olgunun çalışıldığı serimizde üç olguda mutasyon saptanması ile oluşan oranımız % 27,27 idi oysa FA'da 8 gende mutasyon oranı literatürde %90 olarak bildirilmektedir (2). Bu farkın en önemli nedeni FA için gold standart olan DEB testinin serimizdeki olguların tümünde yapılmamış olması veya DEB negatif olguların da ayırıcı tanı amacıyla bu seride yer almasıdır. DEB testi bulguları ile sonuçlar değerlendirildiğinde, DEB pozitif olgularda mutasyon oranı %75'e (3/4) yükselmektedir ki bu oran literatür ile uyumludur. DEB testi yapılmayan veya negatif saptanan olgularda RID paneli ile klinik olarak anlamlı olabilecek herhangi bir varyant saptanmaması klinik tanıyı tartışmalı hale getirmektedir. Ancak, DEB testinin duyarlılığının laboratuvar koşullarına, materyalin türüne ve olgularda olası mozaiklik durumuna göre değişkenlik gösterebileceği bildirildiğinden testin tekrarlanması, bir başka dokuda uygulanması düşünülebilir (27). DEB testi negatif olan olgularımızda herhangi bir mutasyon saptanmaması, DEB testinden çok klinik tanının yeniden değerlendirilmesinin, klinik bulguların güçlü olduğu olgularda önce MLPA tekniği uygulanması normal sonuçlanan olgularda hastalık ilişkili yeni genlerin araştırılması için TED gibi daha detaylı analizlerin yapılması akılcı bir algoritma olacaktır diye düşünmekteyiz.

Literatürde, FA'da saptanan mutasyonların %60'ının *FANCA*, %10-15'inin *FANCC*, %10'unun *FANCG* ve %15'inin ise diğer ilişkili genlerde saptandığı, bu oranların etnik farklılıklar gösterebildiği ancak "*hotspot*" olarak hedef gösterilebilecek gen bölgeleri bulunmadığını bildirilmektedir. Küçük olgu grubumuzda da 3 mutasyonun ikisinin *FANCA* geninde saptanması literatür ile uyumludur.

FANCA geninde bir ailede (FA-1) c.894-2A>G, bir diğerinde (FA-3) c.4261-2A>C mutasyonları saptandı. Her iki mutasyon da *FANCA* geninde kırpılma hatasına yol açması beklenen ve daha önce FA'lı olgularda bildirilmiş olan mutasyonlardı (118, 119, 121).

Bugüne kadar *FANCA* geninde 62 adet kırpılma hatasına yol açan mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan olgularımızdan birinde saptanan c.894-2A>G, *Levran* ve ark.'nın (2005) çalışmasında gösterilmiştir (118). Daha sonra *Xiong* ve ark.'ları (2015) kırpılma bölgesi değişimlerinin patolojik olup olmadığını değerlendirdikleri *in silico* analizlerde, bu mutasyonun intron 10'da (*intervening sequence* 10, IVS10) *acceptor* kırpılma bölgesinin kaybına yol açması beklendiğini belirtilerek hastalık ilişkisini desteklemiştir (119). Ancak, bu mutasyonun *in vivo* transkriptte yol açtığı anormal yapı

cDNA dizilemesi ile henüz kanıtlanmamıştır. Bizim çalışmamızda *FANCA* genindeki bu değişimin indeks olguda homozigot, sağlıklı anne ve babasında heterozigot saptanması hastalığın kalıtım modeli ile uyumluydu. Aynı aileden kesin klinik tanılı amcada (FA-1, IV:13) bu mutasyon araştırıldığında periferik kandan elde edilen DNA örneğinde mutasyon heterozigot olarak saptandı. Amcada KİT'in yapılıp yapılmadığı bilinmediğinden, ilk aşamada bu durumun olası bir kimerizm ile ilişkili olabileceği düşünülmüştü ancak daha sonra olguda KİT yapılmadığı öğrenildi ve sonuç çok düşük bir olasılıkla somatik bir rekombinasyona bağlı olarak, bir başka dokuda bu mutasyonun heterozigosite kaybına uğrayıp uğramadığını araştırmak için yanak mukozasından elde edilen DNA örneğinde inceleme tekrarlandı ve bu dokuda da mutasyon heterozigot olarak gözlendi. Amcanın annesi hayatta değildi, babasının (olgumuzun paternal dedesi ve maternal büyük amcası) bu mutasyon için heterozigot olduğu belirlendi. Bu aşamada, amcanın iki farklı *FANCA* geni mutasyonu için birleşik heterozigot olması beklendiğinden, tüm gen dizi analizi yapılması önerildi. 43 ekzonlu bir gen olan *FANCA*'da SD yöntemi ile inceleme çok yüksek bir maliyet gerektireceğinden RID panel çalışılmasına alınması planlandı. Bu incelemede *FANCA*'da herhangi bir ikinci mutasyon ya da diğer FA ilişkili genlerde hastalığın kalıtım modeli ile uyumlu mutasyonlar saptanmaz ise del/dup mutasyonlarının araştırılması için MLPA analizi, test normal sonuçlanırsa, TED yapılması planlandı. Yapılan araştırmalar normal çıkarsa, bu durum literatürde *FANCA* geninde birleşik heterozigot mutasyonun geri mutasyon mekanizması ile oluşan somatik mozaisizm olasılığı ile açıklanabilir (122).

FANCA geninde saptanan diğer bir mutasyon homozigot c.4261-2A>C idi. Genin 42. intronunda *acceptor* kırpılma bölgesinde gözlenen bu mutasyon daha önce literatürde tanımlanmıştır. FA'da yapılan moleküler çalışmalar, *FANCA* genindeki kırpılma mutasyonları arasında *donor* bölgedeki (intronun 5' ucu) mutasyonların *acceptor* bölgedeki (intronun 3' ucu) mutasyonlara kıyasla daha sık gözlendiğini göstermektedir (121, 123). Çalışmamızda ise saptanan her iki mutasyon da, daha nadir görülen *acceptor* bölge mutasyonu olarak dikkat çekmektedir. Saptanan her iki mutasyonunda dünyada daha ender gözlenen mutasyonlar olması Türkiye'deki mutasyonların diğer toplumlardan farklı olabileceğine işaret etmektedir.

Genel olarak, *FANCA* geninde anormal protein sentezine yol açan tipte mutasyon taşıyan olguların, protein sentezini engelleyen (*null*) tipte mutasyon taşıyanlara göre çok daha hafif etkilendikleri; *null* mutasyonlu olgularda, aneminin daha

erken yaşta başladığı ve malignite riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (124). Bir ailemizde saptanan *FANCA* c.4261-2A>C mutasyonunun, kırpılma hatasına yol açarak anormal protein ürününün oluşmasına neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda, daha hafif bir fenotipin gözlenmesi literatürdeki bu bilgilerle uyumludur. Ancak, *FANCA* geninde aynı mutasyonu taşıdığı bildirilen bir Arap ailesinin etkilenmiş üç olgusunda hipoplastik el başparmak bulgusu, ikisinde ek olarak böbrek anomalisi (unilateral renal agenezi/pelvik ektopik böbrek), diğer ikisinde ise mikrosefali, zihinsel yetmezlik ve işitme kaybı bildirilmiştir. Ayrıca bu olgularda ortalama $8^{6/12}$ yaşında kemik iliği yetmezliği başladığı ve iki olguda ise sırasıyla 26 ve 30 yaşlarında yassı hücreli deri kanseri geliştiği bildirilmiştir (121). Aynı mutasyonu taşıyan serimizdeki iki etkilenmiş (indeks $13^{8/12}$; etkilenmiş kardeş $19^{6/12}$ yaş) kardeşteki (FA – 3, IV:2 ve IV:4) klinik bulgular ise Arap ailesine göre çok daha hafifti (sadece başparmak anomalileri). Olguların son klinik değerlendirmesinde de belirgin bir transfüzyon ihtiyaçlarının olmadığı, kemik iliği naklini gerektirecek düzeyde kemik iliği yetmezliği bulunmadığı ve herhangi bir malignitenin gelişmediği gözlendi. Ancak genetik danışmada aileler, malignite açısından takip gerektiği konusunda uyarıldı. Aynı mutasyonu taşıyan bu iki aile arasındaki fenotipik farklar, modifiye edici genlerin varlığını düşündürmektedir.

Serimizde iki farklı varyant (c.205+5G>T ve c.761_764delAGCA) saptanan diğer gen *BRIP1* idi. Birleşik heterozigot saptanan bu olgunun ailesinde SD ile c.205+5G>T'nin babadan, c.761_764delAGCA'nin anneden kalıtıldığı gösterildi.

BRIP1 geninde saptanan c.205+5G>T'nin FA ile ilişkisi, daha önce *Levitus ve* ark.'ları (2004) tarafından bildirilmiş ve bu mutasyonun, kırpılma hatasına yol açarak, BRIP1'in helikaz motif I (proteinin DEXD domaini) bölgesini kodlayan 3. ekzonunun delesyonuna yol açtığı, cDNA düzeyinde gösterilmiştir (120). Literatürde *BRIP1* geninde FA ilişkisi tanımlanmış 15 farklı mutasyon bulunmasına karşın olgumuzdaki c.761_764delAGCA değişimi daha önce literatürde bildirilmemiştir. Tanımlanan bu mutasyonlardan sadece biri delesyon tipi mutasyon olup (c.2255_2256delAA) çerçeve kaymasına yol açmaktadır. Polipeptid zincirinde 751. amino asiti ve devamını değiştirerek proteinin HELIC domainini etkilemesi beklenmektedir. Çalışmamızda saptanan delesyonun ise protein düzeyinde 254. amino asit olan lizinin yerine arjinin gelmesine (p.K254Rfs*19) ve sonraki 19. kodonun "dur" şifresi alarak protein

trunkasyonuna yol açması beklenmektedir. Çerçeve kayması proteinin DEXD domainini kodlayan bölgede oluşmaktadır.

BRIP1 mutasyonu taşıyan FA'lı olguların ağır klinik bulgular gösterdiği, ortalama 4-5 yaşlarında kemik iliği yetmezliği geliştiği bildirilmiştir (125). *BRIP1* geninde birleşik heterozigot mutasyon saptanan olgumuzdaki (FA-2, IV:1) ağır büyüme geriliği, mikrosefali, dismorfik bulgular, ciltte çok sayıda sütlü kahverengi lekeler, bilateral el başparmaklarında agenezi, el bileklerinde radiyal deviasyon, hipoplastik ayak tırnakları, ayaklarda parmak pozisyon anomalileri (3. parmaklar, 2 ve 4. parmakların altında yerleşimli), anal atrezi gibi ağır fiziksel anomaliler literatür ile uyumluydu.

Olgu grubumuzdaki DEB testi pozitif, AA nedeniyle KİT yapılan FA-11 olgumuzda, deri biyopsisinden elde edilen DNA örneğinde yapılan RID panel test çalışmasında FA ilişkili herhangi bir mutasyon heterozigot veya homozigot formda saptanmamış olması YND tabanlı analizlerde yanlış negatiflik olabileceğini düşündürmektedir. Ion PGM platformunun duyarlılığı %98-99 olup özellikle uzun homopolimer dizi bölgelerinde yanlış okuma yapabileceği bilinmektedir (104). Olguda panelin kapsamadığı bölgeler ile yetersiz derinlik nedeni ile düşük kalitede okunan diziler, SD yöntemi ile incelendi ve mutasyonlar açısından dışlandı. Bu olguda taranan genlerde dışlanamayan mutasyon tipleri büyük delesyon ve duplikasyonlardır. Bu nedenle MLPA analizi ile olası del/dup mutasyonlarının incelenmesi önerilebilir. Deri örneğinde heterozigot bir mutasyon saptanması durumunda diğer allelde geri mutasyon olasılığı zayıf da olsa düşünülebilir, ancak olgumuz erkek olduğundan X'e bağlı *FANCB* geni için somatik mozaisizm olasılığının dışlanamadığını düşünmekteyiz. MLPA analizi normal sonuçlanırsa FA-11 olgusunun klinik bulguları tekrar değerlendirilerek DEB pozitifliği nedeniyle diğer kromozom kırık sendromları açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma 2014'de planlanarak panelde yer alacak genler belirlenmişti. Ancak 2015'te FA ile ilişkili bir gen (*UBE2T* geni) tanımlandı (126). FA klinik tanılı DEB pozitif mutasyon saptanmayan olgularımızda bu genin de SD ile araştırılması gerekmektedir. Yeni bir panel oluşturduğumuzda panele bu genin de ilave edilmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz.

Olgu sayısı küçük olmasına rağmen çalışma grubumuzda DEB testi pozitif olgularda %75 mutasyon oranının saptanması ve bu mutasyonların 2/3'ünün *FANCA*

geninde olması literatür ile uyumlu sonuçlardır. Bu kadar küçük bir grupta bile *BRIP1* geninde mutasyon saptanması ve akraba evliliği olmayan ailede iki farklı mutasyonun bulunması literatürden farklı olarak Türk populasyonunda farklı gen ve mutasyon sıklıklarının olabileceğine işaret etmektedir. Bu durumda klinik ön tanılı olguların YND teknolojisi ile panel olarak çalışılmasının daha doğru olacağını da göstermektedir.

Bu çalışma sonuçları; 1) DEB testinin moleküler analizler öncesinde önemli bir tanı testi olduğunu, 2) tasarladığımız RID panelindeki 17 FA geninin, klinik tanılı olgularda, mutasyonların saptanmasında tek bir çalışma ile hızlı analizine olanak sağladığını, 3) YND analizlerinin normal saptanması sonrasında MLPA analizlerinin gerekli olduğunu bu nedenle akış şemasında yer alması gerektiğini göstermektedir. Daha büyük seri çalışmalarıyla Türkiye populasyonunda FA gen mutasyon frekans bilgilerine ulaşılması daha akılcı ve ekonomik tanı akış şemalarının oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lobitz, S. ve Velleuer, E. (2006). Guido Fanconi (1892–1979): a jack of all trades. *Nature Reviews Cancer*, ***6,*** 893-898.
2. Kee, Y. ve D'Andrea, A. D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *The Journal of clinical investigation*, ***122,*** 3799.
3. Lindahl, T., Karran, P. ve Wood, R. D. (1997). DNA excision repair pathways. *Current opinion in genetics & development*, ***7,*** 158-169.
4. Dexheimer, T. S. (2013). DNA repair pathways and mechanisms. *DNA repair of cancer stem cells: Springer*, p. 19-32
5. Li, X. ve Heyer, W-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research*, ***18***, 99-113.
6. Li, G-M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*, ***18***, 85-98.
7. Costa, R. M., Chiganças. V., da Silva Galhardo, R. ve ark. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, ***85***, 1083-1099.
8. McKinnon, P. J. (2009). DNA repair deficiency and neurological disease. *Nature Reviews Neuroscience*, ***10***, 100-112.
9. Walker, J. R., Corpina, R. A. ve Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, ***412***, 607-614.
10. Alter, B. P., Giri, N., Savage, S. A. ve ark. (2015). Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *haematologica*, ***100***, 49-54.
11. Dokal, I. (2006). Fanconi's anaemia and related bone marrow failure syndromes. *British medical bulletin*, ***77***, 37-53.
12. Dokal, I. ve Vulliamy, T. (2010). Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica*, ***95***, 1236-1240.
13. Alter, B. P. (2007). Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *ASH Education Program Book. 2007*, 29-39.
14. Sakaguchi, H., Nakanishi, K. ve Kojima, S. (2013). Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *International journal of hematology*, ***97***, 20-29.
15. Khincha, PP., Savage, SA., editors. (2013). Genomic characterization of the inherited bone marrow failure syndromes. *Seminars in hematology: Elsevier*.
16. Wilson, D. B., Link, D. C., Mason, P. J. ve ark. (2014). Inherited bone marrow failure syndromes in adolescents and young adults. *Annals of medicine*, ***46***, 353-363.
17. Dror, Y. ve Freedman, M. H. (2002). Shwachman–diamond syndrome. *British journal of haematology*, ***118***, 701-713.
18. Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B. ve ark. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature genetics*, ***21***, 169-175.
19. Vlachos, A., Ball, S., Dahl, N. ve ark. (2008). Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *British journal of haematology*, ***142***, 859-876.
20. Welte, K. ve Zeidler, C. (2009). Severe congenital neutropenia. *Hematology/oncology clinics of North America*, ***23***, 307-320.

21. Dale, D. C., Person, R. E., Bolyard, A. A. ve ark. (2000). Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood*, ***96***, 2317-2322.
22. Ihara, K., Ishii, E., Eguchi, M. ve ark. (1999). Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***96***, 3132-3136.
23. Germeshausen, M., Ballmaier, M. ve Welte, K. (2006). MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Human mutation*, ***27***, 296-296.
24. Klopocki, E., Schulze, H., Strauß, G. ve ark. (2007). Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia–absent radius syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, ***80***, 232-240.
25. Fadoo, Z. ve Naqvi, S. M. A. (2002). Acute myeloid leukemia in a patient with thrombocytopenia with absent radii syndrome. *Journal of pediatric hematology/oncology*, ***24***, 134-135.
26. Albers, C. A., Newbury-Ecob, R., Ouwehand, W. H. ve ark. (2013). New insights into the genetic basis of TAR (thrombocytopenia-absent radii) syndrome. *Current opinion in genetics & development*, ***23***, 316-323.
27. Castella, M., Pujol, R., Callén, E. ve ark. (2011). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *Journal of medical genetics*, ***48***, 242-250.
28. Moreira, C., Brito, L. ve Lemos, J. (2008). Flow cytometry for diepoxybutane test analysis. *Genetics and Molecular Research*, ***7***, 1353-1359.
29. Levitus, M., Joenje, H. ve de Winter, J. P. (2006). The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Analytical Cellular Pathology*, ***28***, 3-29.
30. Pagon, R., Adam, M., Ardinger, H. ve ark. Fanconi Anemia--*GeneReviews (®).*
31. D'Andrea, A. D. (2010). Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *New England Journal of Medicine*, ***362***, 1909-1919.
32. Niedernhofer, L. J., Lalai, A. S. ve Hoeijmakers, J. H. (2005). Fanconi anemia (cross) linked to DNA repair. *Cell*, ***123,*** 1191-1198.
33. Alter, B. P. ve Kupfer, G. 2013. Fanconi anemia.
34. Taniguchi, T. ve D'Andrea, A. D. (2006). Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood*, ***107***, 4223-4233.
35. Shimamura, A. (1999). Treatment of hematologic abnormalities in Fanconi anemia. *Fanconi Anemia*, 49.
36. http://www.omim.org/clinicalSynopsis/227650?search=fanconi%20anaemia&highlight=anemia%20anaemia%20fanconi.
37. Kee, Y. ve D'Andrea, A. D. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & development*, ***24***, 1680-1694.
38. Kennedy, R. D. ve D'Andrea, A. D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & development*, ***19***, 2925-2940.
39. Moldovan, G-L. ve D'Andrea, A. D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annual review of genetics*, ***43***, 223.
40. Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S. ve ark. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular cell*, ***7***, 249-262.

41. Hodson, C. ve Walden, H. (2012). Towards a molecular understanding of the fanconi anemia core complex. *Anemia 2012*.
42. de Winter, J. P. ve Joenje, H. (2009). The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, ***668***, 11-19.
43. Ling, C., Ishiai, M., Ali, A. M. ve ark. (2007). FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *The EMBO journal*, ***26***, 2104-2114.
44. Ciccia, A., Ling, C., Coulthard, R. ve ark. (2007). Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Molecular cell*, ***25***, 331-343.
45. Nijman, S. M., Huang, T. T., Dirac, A. M. ve ark. (2005). The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell*, ***17***, 331-339.
46. Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P. ve ark. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*, ***129***, 289-301.
47. Friedel, A. M., Pike, B. L. ve Gasser, S. M. (2009). ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Current opinion in cell biology*, ***21***, 237-244.
48. Porfirio, B., Smeets, D., Beckers, L. ve ark. (1991). Fragile sites and chromosome instability: the distribution of breaks induced by cis-diamine-clichloro-platinum (II) in Fanconi anemia lymphocyte cultures. *Human genetics*, ***86***, 256-260.
49. Fundia, A., Gorla, N. ve Larripa, I. (1994). Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi's anemia patients are located at fragile sites and acute myeloid leukemia breakpoints. *Hereditas*, ***120***, 47-50.
50. Vinciguerra, P., Godinho, S. A., Parmar, K.ve ark. (2010). Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway–deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *The Journal of clinical investigation*, ***120***, 3834-3842.
51. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000187741;r=16:89737549-89816657;t=ENST00000389301.
52. Garcia-Higuera, I., Kuang, Y., Denham, J. ve ark. (2000). The Fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood*, ***96***, 3224-3230.
53. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000221829;r=9:35073835-35080016;t=ENST00000378643.
54. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000181544;r=X:14843407-14873069;t=ENST00000398334.
55. Medhurst, A. L., Laghmani, E. H., Steltenpool, J. ve ark. (2006). Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. *Blood*, ***108***, 2072-2080.
56. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000115392;r=2:58159243-58241372;t=ENST00000233741.
57. Gurtan, A. M., Stuckert, P. ve D'Andrea, A. D. (2006). The WD40 repeats of FANCL are required for Fanconi anemia core complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, ***281***, 10896-10905.

58. Machida, Y. J., Machida, Y., Chen, Y. ve ark. (2006). UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Molecular cell*, ***23***, 589-596.
59. Meetei, A. R., De Winter, J. P., Medhurst, A. L. ve ark. (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics*, ***35***, 165-170.
60. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000158169;r=9:95099054-95317709;t=ENST00000289081.
61. Gordon, S. M. ve Buchwald, M. (2003). Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2-and 3-hybrid systems. *Blood*, ***102***, 136-141.
62. Taniguchi, T. ve D'Andrea, A. D. (2002). The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC. *Blood*, ***100***, 2457-2462.
63. Verlander, P., Kaporis, A., Liu, Q. ve ark. (1995). Carrier frequency of the IVS4+ 4 A--> T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood*, ***86***, 4034-4038.
64. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000112039;r=6:35452361-35467103;t=ENST00000229769.
65. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000183161;r=11:22622519-22626787;t=ENST00000327470.
66. Kim, J. M., Kee, Y., Gurtan, A. ve ark. (2008). Cell cycle–dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood*, ***111***, 5215-5222.
67. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000187790;r=14:45135940-45200890;t=ENST00000267430.
68. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000144554;r=3:10026414-10101930;t=ENST00000287647.
69. Joo, W., Xu, G., Persky, N. S. ve ark. (2011). Structure of the FANCI-FANCD2 complex: insights into the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Science*, ***333***, 312-316.
70. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000140525;r=15:89243949-89317261;t=ENST00000310775.
71. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32315474-32400266;t=ENST00000544455.
72. Hussain, S., Wilson, J. B., Medhurst, A. L. ve ark. (2004). Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Human molecular genetics*, ***13***, 1241-1248.
73. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000136492;r=17:61681266-61863521;t=ENST00000259008.
74. Litman, R., Peng, M., Jin, Z. ve ark. (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCJ. *Cancer cell*, ***8***, 255-265.

75. http://omim.org/.
76. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000083093;r=16:23603160-23641310;t=ENST00000261584.
77. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K. ve ark. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell*, ***22***, 719-729.
78. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000108384;r=17:58692573-58735611;t=ENST00000337432.
79. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000188827;r=16:3581181-3611598;t=ENST00000294008.
80. Kim, Y., Lach, F. P., Desetty, R. ve ark. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature genetics*, ***43***, 142-146.
81. Stoepker, C., Hain, K., Schuster, B. ve ark. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature genetics*, ***43***, 138-141.
82. Crossan, G. P., van der Weyden, L., Rosado, I. V. ve ark. (2011). Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nature genetics*, ***43***, 147-152.
83. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000175595;r=16:13920157-13952345;t=ENST00000311895.
84. Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C.ve ark. (2013). Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *The American Journal of Human Genetics*, ***92***, 800-806.
85. Osorio, A., Bogliolo, M., Fernández, V. ve ark. (2013). Evaluation of rare variants in the new fanconi anemia gene ERCC4 (FANCQ) as familial breast/ovarian cancer susceptibility alleles. *Human mutation*, ***34***, 1615-1618.
86. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000196584;r=7:152644779-152676165;t=ENST00000359321.
87. Shamseldin, H. E., Elfaki, M. ve Alkuraya, F. S. (2012). Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *Journal of medical genetics*, jmedgenet-2011-100585.
88. Soulier, J., Leblanc, T., Larghero, J. ve ark. (2005). Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood*, ***105***, 1329-1336.
89. Gross, M., Hanenberg, H., Lobitz, S. ve ark. (2003). Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenetic and genome research*, ***98***, 126-135.
90. Ellis, N., Ciocci, S. ve German, J. (2001). Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells. *Human genetics*, ***108***, 167-173.
91. Velazquez, I. ve Alter, B. P. (2004). Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *American journal of hematology*, ***77***, 257-267.
92. MacMillan, M. L. ve Wagner, J. E. (2010). Haematopoeitic cell transplantation for Fanconi anaemia–when and how? *British journal of haematology*, ***149***, 14-21.

93. Becker, P. S., Taylor, J. A., Trobridge, G. D. ve ark. (2010). Preclinical correction of human Fanconi anemia complementation group A bone marrow cells using a safety-modified lentiviral vector. *Gene therapy*, ***17***, 1244-1252.
94. Eyal, O., Blum, S., Mueller, R. ve ark. (2008). Improved growth velocity during thyroid hormone therapy in children with Fanconi anemia and borderline thyroid function. *Pediatric blood & cancer*, ***51***, 652-656.
95. Dupuis-Girod, S., Gluckman, E., Souberbielle, J-C. ve ark. (2001). Growth hormone deficiency caused by pituitary stalk interruption in Fanconi's anemia. *The Journal of pediatrics*, ***138***, 129-133.
96. Alter, B. P., Greene, M. H., Velazquez, I.ve ark. (2003). Cancer in Fanconi anemia. *Blood*, ***101***, 2072-2072.
97. Myers, K., Davies, S. M., Harris, R. E. ve ark. (2012). The clinical phenotype of children with Fanconi anemia caused by biallelic FANCD1/BRCA2 mutations. *Pediatric blood & cancer*, ***58***, 462-465.
98. Frappart, P. O., Lee, Y., Lamont, J. ve ark. (2007). BRCA2 is required for neurogenesis and suppression of medulloblastoma. *The EMBO journal*, ***26***, 2732-2742.
99. Hirsch, B., Shimamura, A., Moreau, L. ve ark. (2004). Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. *Blood*, ***103***, 2554-2559.
100. Ceccaldi, R., Briot, D., Larghero, J. ve ark. (2011). Spontaneous abrogation of the G 2 DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *The Journal of clinical investigation*, ***121***, 184-194.
101. Raya, Á., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G. ve ark. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, ***460***, 53-59.
102. Sanger, F., Nicklen, S. ve Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***74***, 5463-5467.
103. Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry*, ***6***, 287-303.
104. Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P. ve ark. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, ***13***, 341.
105. Liu, L., Li, Y., Li, S. ve ark. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International 2012*.
106. http://my454.com/products/technology.asp.
107. Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, ***24***, 133-141.
108. Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*, ***11***, 759-769.
109. Grada, A. ve Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, ***133***, e11.
110. https://ioncommunity.thermofisher.com/.
111. TMAP Frequently Asked Questions.
https://ioncommunity.thermofisher.com/servlet/JiveServlet/downloadBody/9355-102-3-25292/TMAP%20FAQ.pdf
112. https://ioncommunity.thermofisher.com/docs/DOC-3266.

113. https://ioncommunity.thermofisher.com/docs/DOC-3271.
114. https://ioncommunity.thermofisher.com/docs/DOC-3268.
115. Torrent Suite ™ Analysis Report Guide for use with Torrent Suite™ Software v5.0.
https://ioncommunity.thermofisher.com/servlet/JiveServlet/downloadBody/9701-102-2-25852/Torrent%20Suite%20Software%20v5.0%20Analysis%20Report%20Guide.pdf
116. Ion Torrent by life technologies (2013, Kasım). TECHNICAL NOTES. Torrent Suite™ Software 4.0.2.
117. Ion PGM™ Template OT2 400 Kit.
file:///C:/Documents%20and%20Settings/USER/Desktop/MAN0007218_RevA_UG_15Sept2014.pdf
118. Levran, O., Diotti, R., Pujara, K. ve ark. (2005). Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Human mutation*, ***25***, 142-149.
119. Xiong, H. Y., Alipanahi, B., Lee, L. J. ve ark. (2015). The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, ***347***, 1254806.
120. Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B. C. ve ark. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature genetics*, ***37***, 934-935.
121. Tamary, H., Dgany, O., Toledano, H. ve ark. (2004). Molecular characterization of three novel Fanconi anemia mutations in Israeli Arabs. *European journal of haematology*, ***72***, 330-335.
122. Gregory, J. J., Wagner, J. E., Verlander, P. C. ve ark. (2001). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***98***, 2532-2537.
123. Krawczak, M., Reiss, J. ve Cooper, D. N. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human genetics*, ***90***, 41-54.
124. Faivre, L., Guardiola, P., Lewis, C. ve ark. (2000). Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *Blood*, ***96***, 4064-4070.
125. Levran, O., Attwooll, C., Henry, R. T. ve ark. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics*, ***37***, 931-933.
126. Hira, A., Yoshida, K., Sato, K. ve ark. (2015). Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *The American Journal of Human Genetics*, ***96***, 1001-1007.

HAM VERİLER

FORMLAR

Form-1: Muayene formu

T.C.

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Muayene Formu

Tarih:

Olgu No:

Ad-Soyad: Protokol No:

D.T/ yaşı: DNA No:

Cinsiyet:

Adres bilgileri:

Tel:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Antenatal/Natal/Postnatal:

Öykü:

Psikososyal motor gelişme:

Aile ağacı

Fizik muayene:

Baş çevresi: Tartı: Boy:

Sistemik muayene:

Görüntüleme:

Ek tetkikler:

Pozitif bulgular:

TANI:

Moleküler analizler:

Form-2: Bilgilendirilmiş Onam Formu

T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER İNCELEMER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Proje Adı

"FANCONİ ANEMİLİ OLGULARDA İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE TARANMASI VE MUTASYONLARIN SAPTANMASI"

Tarih:

Bu incelemede, klinik ve radyolojik incelemeler sonucunda Fanconi anemisi olduğu saptanan seçilmiş olgularda, fenotipe neden olan moleküler patolojinin araştırılması amaçlanmaktadır. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine gönderilen olgularda araştırma amaçlı moleküler incelemelerinin yapılmasına izin vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Aşağıdaki **Moleküler İncelemeler için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı: İnceleme, Fanconi anemisi saptanan olgularda altta yatan nedenin ileri düzeyde aydınlatılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

İleri moleküler analizlerin yapılması için hastaların tanı amacı ile önceden alınmış olan mevcut doku örnekleri kullanılacaktır. Seçilecek uygun olgularda ileri moleküler yöntemler kullanılarak detaylı tanıya gidilmeye çalışılacaktır. Eldeki örneklerin yetersiz olması ya da kullanılamaması durumunda hastadan yeniden doku (kan, vb) örnekleri almamız gerekebilir. Bu durumda hasta ve aile bilgilendirilecek ve izni alınacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Bu incelemeler için sizden alınan kanlardan elde edilecek örneklerinizin saklanması konusunda lütfen aşağıdaki seçeneklerden birini seçiniz:

a. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanmasına izin veriyorum.

b. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum.

Doku örneğiniz saklandığı takdirde size sorulmadan, izniniz alınmadan hiçbir şekilde başka bir çalışma için kullanılmayacaktır.

2. Olası riskler ve faydalar:

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişmesi durumu.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Olası yararlar: Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan kromozom anomalisini daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan,

---

(Doktor Adı)

hastaya, ---

(Aile Adı)

(Tanık Kişi)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih:

Doktorun imzası:

Kontak kurulabilecek kişiler:

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direk hat:
Dahili hat: (0 212) 414 20 00 – 32347

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: .....

İzin: Yukarıda tanımlanan ileri düzey incelemenin uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailemdeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

	Adı Soyadı	Doğum tarih	İmza	(Ebeveyn)
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				

ETİK KURUL KARARI

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

Sayı : 1937 Tarih : 25.12.2014

Konu : Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER

Sayın Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 03/12/2014 gün ve 363 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yüksek lisans öğrencisi Gülendam BAGİROVA'nın yürüteceği 2014/1880 dosya numaralı "Fankoni Anemili Olgularda Ilişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi Ile Taranması Ve Mutasyonların Saptanması" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/12/2014 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

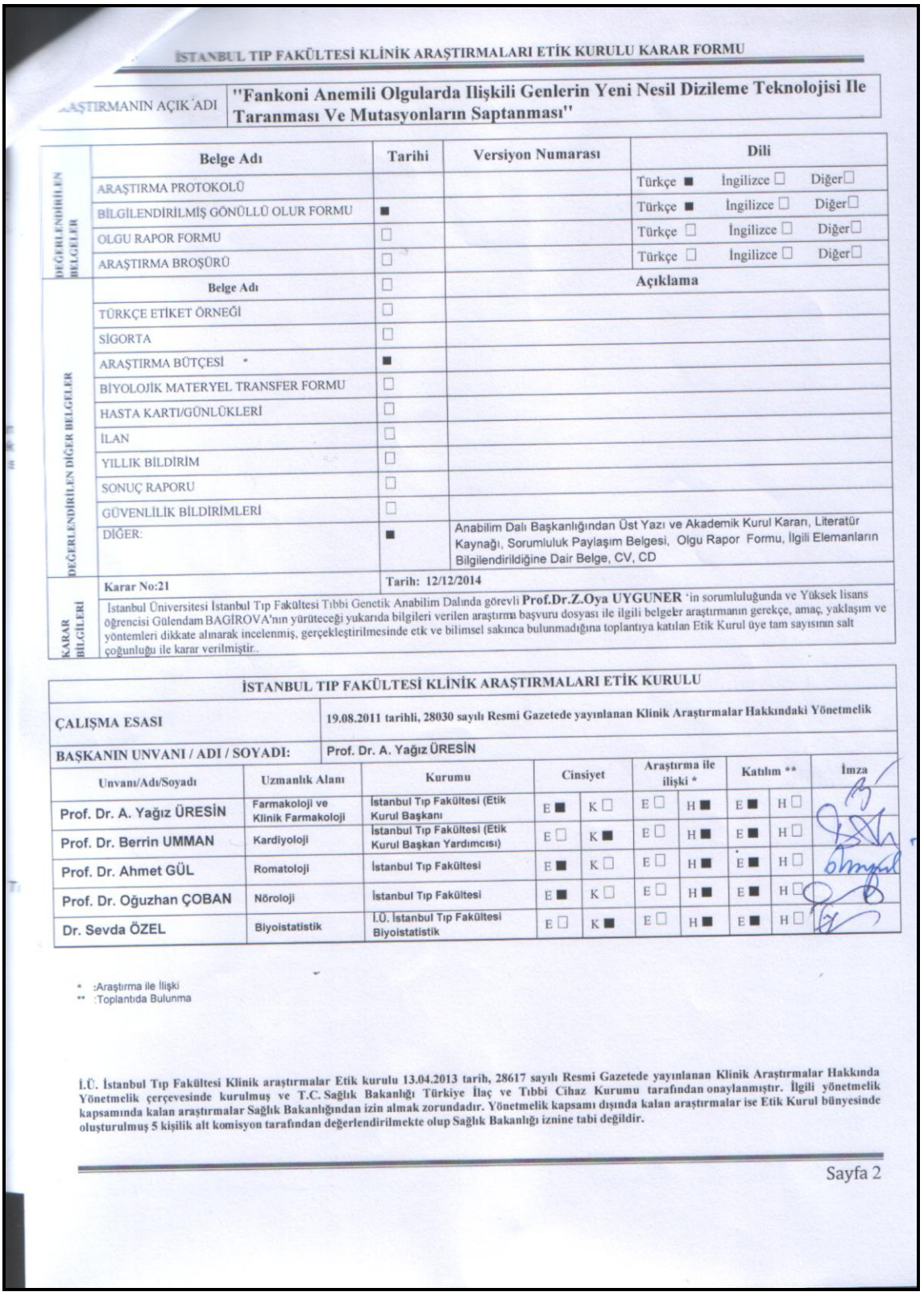
Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ		
	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ					
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Fankoni Anemili Olgularda Ilişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi Ile Taranması Ve Mutasyonların Saptanması"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**Tıbbi Genetik**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**			
	DESTEKLEYİCİ	**İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Fankoni Anemili Olgularda Ilişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi Ile Taranması Ve Mutasyonların Saptanması"

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ *	■	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:21	Tarih: 12/12/2014
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görevli **Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER** 'in sorumluluğunda ve Yüksek lisans öğrencisi Gülendam BAGİROVA'nın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etk ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir..	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

Sayfa 2

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

Özel İlgi Alanları (Hobileri):