



Editör

Prof. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN

Yardımcı Editör

Dr. Zafer YÜKSEL

YENİ NESİL DİZİLEME VE KLİNİKTEKİ UYGULAMALARI



GÜNEŞ TIP
KİTABEVLERİ

54

Yeni Nesil Dizileme ve Klinikteki Uygulamaları

Editör

Prof. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN

Yardımcı Editör

Dr. Zafer YÜKSEL



GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

Yeni Nesil Dizileme ve Klinikteki Uygulamaları

Copyright © 2024

Bu Kitabın her türlü yayın hakkı **Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.**'ne aittir. Yazılı olarak izin alınmadan ve kaynak gösterilmeden kısmen veya tamamen kopya edilemez; fotokopi, teksir, baskı ve diğer yollarla çoğaltılamaz.

ISBN: 978-975-277-???-?

Genel Yayın Yönetmeni: Murat Yılmaz

Genel Yayın Yönetmeni Yardımcısı: Polat Yılmaz

Yayın Danışmanı ve Tıbbi Koordinatör: Dr. Ufuk Akçıl

Yayına Hazırlama: Güneş Dizgi-Grafik Tasarım Birimi

Baskı: Ayrıntı Basım Yayın ve Matbaacılık Hiz. San. Tic. A.Ş.

Saray Mahallesi 126. Cadde No: 20 Kahramankazan / Ankara

Telefon: 0312 802 00 53-54

Sertifika No: 49599

UYARI

Medikal bilgiler sürekli değişmekte ve yenilenmektedir. Standart güvenlik uygulamaları dikkate alınmalı, yeni araştırmalar ve klinik tecrübeler ışığında tedavilerde ve ilaç uygulamalarındaki değişikliklerin gerekli olabileceği bilinmelidir. Okuyuculara ilaçlar hakkında üretici firma tarafından sağlanan ilaca ait en son ürün bilgilerini, dozaj ve uygulama şekillerini ve kontrendikasyonları kontrol etmeleri tavsiye edilir. Her hasta için en iyi tedavi şeklini ve en doğru ilaçları ve dozlarını belirlemek uygulamayı yapan hekimin sorumluluğundadır. Yayıncı ve editörler bu yayından dolayı meydana gelebilecek hastaya ve ekipmanlara ait herhangi bir zarar veya hasardan sorumlu değildir.

GENEL DAĞITIM

GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

ANKARA

M. Rauf İnönü Sokak No: 3
06410 Sıhhiye / Ankara
Tel: (0312) 431 14 85 • 435 11 91-92
Faks: (0312) 435 84 23

İSTANBUL

Gazeteciler Sitesi Sağlam Fikir Sokak
No: 7 / 2 Esentepe / İstanbul
Tel: (0212) 356 87 43

KADIKÖY

Rasimpasha Mah. İskele Sokak
No: 4 / A Kadıköy / İstanbul
Tel: (0216) 546 03 47

www.guneskitabevi.com
info@guneskitabevi.com



Tıp Fakültesi Dönem 1 öğrencisi iken, gelecekte önemli bir uzmanlık alanı olacağını düşündüğüm ve bu alandaki araştırmalarda ve keşiflerde yer alma isteğimden dolayı Tıbbi Genetik uzmanı olmaya karar verdim. O günden bugüne kadar ki süreçte öğrenme isteğimin hep artarak devam etmesi, işimi en iyi şekilde yapma motivasyonum oldu.

Eğitim hayatım boyunca, üzerinde emeği olan tüm öğretmenlerimi sevgi, saygı, şükran ve minnetle anıyorum. Ayrıca bilim insanı olma yolumda, mesleğimin değerini ve özellikle de ülkemizdeki önem ve ihtiyacını anlamamda, ilham ve eğitim aldığım değerli üniversite hocalarıma, bilimsel katkılarından, kıymetli yaşam deneyim ve bilgilerini çömertçe paylaşımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Bilime ve bilim insanına verdiği değer ile yolumuzu aydınlatarak, bugünlere gelmemizi sağlayan Mustafa Kemal Atatürk'ün Samsun İstiklâl Ticaret Okulu'nda öğretmenlerle yaptığı konuşmasından en iyi bilinen sözlerinden birini hatırlatmak isterim. “Dünyada her şey için, medeniyet için, hayat için, muvaffakiyet için en hakiki mürşit ilimdir, fendir.” Bu farkındalıkla, Cumhuriyetimizin 100. Yılında bu eseri ortaya çıkartmak en büyük gururumdur.

Bu eser vesilesi ile, olmazsa olmaz kıymetli destekleri ve özverileri için hayatı paylaştığım, sevgili eşim Leyla, kızım Lara Bilgen ve oğlum Erkehan'a teşekkür ederim. Sonsuz destekleri ve sevgileri ile her zaman yanımda olan, benim için yaptıkları her şey için bu eseri ithaf ederek minnetimi ifade etmek istediğim sevgili anne ve babama, her konuda fikrini almaktan memnuniyet duyduğum sevgili kardeşim Berna'ya ve desteği ile yanımda olan kardeşim Tolga'ya, ve ikinci ailem olan eşimin anne ve merhum babasına teşekkür ederim.

Bu eserin ortaya konmasında, öncelikle yardımcı editor arkadaşım Dr. Zafer Yüksel olmak üzere emeği geçen tüm saygıdeğer bilim insanlarımıza, yayımlanması için desteklerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Dilek Akdaş'a ve Güneş Tıp Kitabevlerinin kıymetli çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Bu eserin, içeriğindeki bilgilerden faydalanmak isteyen herkese şifa ve ilham olması dileği ile...

Cumhuriyetimizin nice yüzyıllarına.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. Ahmet Okay Çağlayan

İzmir

ÖNSÖZ

Değerli okuyucular,

Aşağıda okuyacağınız önsözün yapay zekâ aracılığı ile hazırlandığını size söyleseydik, bize inanır mıydınız? Biraz duraksanız da çoğunuzun evet dediğini duyar gibiyiz. İşte tam da böyle baş döndürücü gelişmelerin yaşandığı ve yaşanmaya devam ettiği bir döneme tanıklık ediyoruz. Bizler de bu dönemin küçük bir kesitini mümkün olduğunca basit bir şekilde sunmak ve yeni nesil dizileme teknolojilerinin temelini, günlük hasta yönetimindeki güncel uygulamalarını bu kitapta bir bütün halinde aktarmak istedik.

Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojileri, son yıllarda hızla gelişen ve geniş kullanım alanları bulunan oldukça popüler yöntemlerdir. YND teknolojilerinin, bu teknolojiye paralel olarak gelişen özellikle bilgi işlem teknolojileri gibi diğer araç ve yöntemler ile de entegre edilmesi ile toplumların bütününe dahil edebilecek kadar çok büyük ölçekli uygulamaların önünü açmıştır. Böylelikle DNA dizilimi başta olmak üzere birçok biyolojik bilgiyi elde etmemizi sağlamış, hücresel yapı taşları ve metabolizmanın ve dolayısı ile de insan organizmasının dinamik bir şekilde nasıl çalıştığını daha iyi anlamamıza büyük katkılar vermiştir. Bu bilgiler ile sağlık ve iyilik halinin geliştirilmesine yönelik tanı, tedavi, izlem, bakım ve risk belirleme gibi YND'nin klinikteki uygulamaları ortaya çıkmıştır.

“Yeni Nesil Dizileme ve Klinikteki Uygulamaları” kitabı, tıbbi genetik bilim alanı, moleküler ve hücre biyolojisi ve biyoinformatik yöntemleri temel almak üzere birçok açıdan yeni nesil dizileme teknolojilerinin uygulamalarını olabildiğince kısa ama bir o kadar da detaylı bir şekilde ele almıştır. Her bölüm, YND uygulamalarının farklı yönlerini ele almış ve okuyucularımıza kolay, anlaşılır bir dil kullanarak faydalı ve pratik bilgiler sunmayı amaçlamıştır. Hedeflerimiz, çeşitli YND uygulamalarının farklı disiplinler tarafından daha kolay anlaşılması, kullanım alanlarının bir bütünlük ve bağlantısallık içerisinde ele alınarak, bu uygulamaların en doğru şekilde kullanılmasına bir nebze de olsa katkı sağlamaktır.

Umarız insan sağlığı alanında çalışan ve farklı disiplinlerden bir araya gelen profesyoneller için YND ve uygulamaları için güncel, derli ve toplu bir Türkçe kaynağı literatüre katma hayalimizi gerçekleştirebilmişizdir.

İyi okumalar dileriz,

Prof. Dr. Ahmet Okay Çağlayan
Dr. Zafer Yüksel

YAZARLAR

Ferda ABBASOĞLU

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Enes AK

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Öğr. Gör. Dr. Hilal AKALIN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dahili Tıp Bilimleri
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU

Hacettepe Üniversitesi; Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Özgenur AKDAŞ

PHITECH Biyoinformatik, Gebze, Kocaeli

Dr. Öğr. Üyesi Dilek ULUDAĞ ALKAYA

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Çocuk Genetik Bilim Dalı

Prof. Dr. Kazım Yalçın ARGİ

Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Gülben AVŞAR

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Büşra AYDIN

Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi
Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Doç. Dr. Ayça AYKUT

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Volkan BALTACI

Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Mikrogen Genetik Hastalıklar Değerlendirme
Merkezi Direktörü

Dr. Öğr. Üyesi Tanyeri BARAK

Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı, CT, ABD

Prof. Dr. Seher BAŞARAN

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Evrim KÖMÜRCÜ BAYRAK

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Elçin BORA

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Dr. İçten BOZKURT, İntörn

Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi

Uzm. Dr. Ayça Yıldız BULUT

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Caner ÇAĞLAR

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri
ve Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi
Anabilim Dalı

Batuhan ÇAKIR

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Prof. Dr. Tunahan ÇAKIR

PHITECH Biyoinformatik, Gebze, Kocaeli /
Gebze Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik
Bölümü, Kocaeli, Türkiye

Dr. Öğr. Üyesi Onur ÇAKIRGÖZ

Bartın Üniversitesi Mühendislik
Mimarlık ve Tasarım Fakültesi
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Dr. Ayşegül ÇALIŞKAN

İstinye Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Tufan ÇANKAYA

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Pervin Rukiye DİNÇER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Duygu DUMAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi,
Odyoloji Bölümü, Odyoloji Anabilim Dalı
Ankara, Türkiye

Emre Taylan DUMAN

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Dr. Saliha DURMUŞ

PHITECH Biyoinformatik, Gebze, Kocaeli

Dr. Ali DURSUN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Çocuk Metabolizma Bilim Dalı

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dahili Tıp Bilimleri Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı

Öğr. Gör. Dr. Sadiye EKİNCİ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Prof. Dr. M. Derya ERÇAL

Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Dr. Merve ESKİCİ

Massive Bioinformatics

Doç. Dr. Basri GÜLBAKAN

Hacettepe Üniversitesi
Çocuk Sağlığı Enstitüsü
Pediatrik Temel Bilimler Anabilim Dalı
Metabolizma Bilim Dalı

Ünzile GÜVEN GÜLHAN

PHITECH Biyoinformatik, Gebze, Kocaeli

Batur GÜLTEKİN

Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin
Cerrahisi Anabilim Dalı, New Haven, CT,
ABD

Prof. Dr. Fikret GÜRGEN

Boğaziçi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Dr. Utku GÜRS

Massive Bioinformatics

Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Prof. Dr. Emin Kansu

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve
Kanser Enstitüsü Emekli Öğretim Üyesi
TÜBA Şeref Üyesi

Hamza Umut KARAKURT

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Dr. Nurdan KELEŞOĞLU

Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Ass. Dr. Deniz KILIÇ

Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı

Nehir KIZILİSOLEY

Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KOCABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

Doç. Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü,
Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir,
Türkiye

Emel KÖKREK

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Dr. Yağmur KÜÇÜMEN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

Öğr. Gör., Ph.D. Adayı Ecem KURAL MANGIT

Hacettepe Üniversitesi
Deney Hayvanları Araştırma ve
Uygulama Merkezi
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Dr. İbrahim Halil MİRALOĞLU

Massive Bioinformatics

Dr. Öğr. Üyesi Emrah NİKEREL, PhD

Yeditepe Üniversitesi; Mühendislik Fakültesi
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Onur Emre ONAT, PhD

Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Arş. Gör. Dr. Fırat ÖZÇELİK

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dahili Tıp Bilimleri
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇELİK

Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye

Doç. Dr. Taha Reşid ÖZDEMİR

Tıbbi Genetik Uzmanı
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
İzmir Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi

Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL

Hacettepe Üniversitesi
Çocuk Sağlığı Enstitüsü & Tıp Fakültesi
Metabolizma Bilim Dalı

Doç. Dr. Arzucan ÖZGÜR

Boğaziçi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Pınar PİR

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU

İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü
Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Fatih Erdoğan SEVİLGİN

Boğaziçi Üniversitesi
Veri Bilimi ve Yapay Zeka Enstitüsü
Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı
Farmakogenetik ve Bireyselleştirilmiş Tedavi
Derneği Başkanı

Dr. Öğr. Üyesi

A. Gülhan ERCAN-ŞENÇİÇEK, PhD

Yale Üniversitesi; Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi
Nörogenetik Programı

Nuriye Özlem ÖZCAN ŞİMŞEK

(Doktora Öğrencisi)

Boğaziçi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Bilgisayar Mühendisliği

Ezgi TANIL, MSc

Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

Prof. Dr. Mustafa TEKİN

İnsan Genetiği Bölümü, Miami Üniversitesi
Miller Tıp Okulu, FL, ABD

Çiğdem Hazal TİMUÇİN

Tıbbi Biyoinformatik Bölümü
Göttingen Tıp Üniversitesi, Almanya

Doç. Dr. Gamze TUNA

Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Fulya YAYLACIOĞLU TUNCAY

Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ajlan TÜKÜN

Düzen Laboratuvarlar Grubu
Genetik Tanı Merkezleri Koordinatörü

Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Çocuk Genetik Bilim Dalı

Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER, PhD

İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ayşe Evrim Bayrak, PhD

İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Uzm. Dr. Ceren Yılmaz UZMAN

S.B.Ü Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve
Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Çocuk Genetik Hastalıkları Bölümü

Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Genetik AD, İzmir

Dr. Arş. Gör. Çağrı Zeybek ÜNSAL

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıp Tarihi ve Etik Ana Bilim Dalı

Kanat YALÇIN

Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin
Cerrahisi Anabilim Dalı, CT, ABD

Cemal YILDIZ

Gebze Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Dr. Zafer YÜKSEL

Bioscientia Healthcare GmbH, Ingelheim,
Almanya

İÇİNDEKİLER

1. Yeni Nesil Dizilemeye Giriş ve Klinik Kullanım Alanları

1. BÖLÜM: Yeni Nesil Dizileme Uygulamalarına Giriş3
Dr. Duygu DUMAN, Dr. Mustafa TEKİN
2. BÖLÜM: Nadir Hastalıklarda Yeni Nesil Dizilemenin Klinik Kullanım Alanları..... 13
Dr. Hilal AKALIN, Dr. Fırat ÖZÇELİK, Dr. Munis DÜNDAR
3. BÖLÜM: Farmakogenetik ve Farmakogenomik Uygulamalarda
Yeni Nesil Dizileme Yöntemlerinin Kullanımları 23
Dr. Belgin SÜSLEYİCİ
4. BÖLÜM: Kompleks Hastalıklar 51
Dr. Caner ÇAĞLAR

2. Fenotipleme

5. BÖLÜM: Klinik Fenotipleme 75
Dr. Dilek ULUDAĞ ALKAYA, Dr. Beyhan TÜYSÜZ
6. BÖLÜM: Elektronik Fenotip Kayıt Sistemleri (Derin Fenotipleme) 85
Dr. Onur ÇAKIRGÖZ

3. Genotipleme

3.1. Islak Tezgah

7. BÖLÜM: Biyolojik Örnek Toplanması ve Hazırlanması 101
Dr. R. Köksal ÖZGÜL
8. BÖLÜM: Sager Dizileme 119
Dr. Evrim KÖMÜRCÜ BAYRAK
9. BÖLÜM: İkinci Nesil Dizileme Metotları ve Platformları 143
Dr. Ayça AYKUT
10. BÖLÜM: Üçüncü Nesil Dizileme Metotları ve Platformları 153
Dr. İbrahim Halil MİRALOĞLU

3.2. Kuru Tezgah

11. BÖLÜM: Yeni Nesil Dizilemede Primer Analiz.....	163
Nehir KIZILİLSOLEY, Ezgi TANIL, Dr. Emrah NİKEREL	
12. BÖLÜM: Sekonder Analiz.....	175
Özgenur AKDAŞ, Ünzile GÜVEN GÜLHAN, Dr. Tunahan ÇAKIR	
13. BÖLÜM: Tersiyer Analiz.....	193
Dr. Zafer YÜKSEL	
14. BÖLÜM: Patojenite Skorum Yöntemleri ve Uygulamaları.....	209
Nuriye Özlem ÖZCAN ŞİMŞEK, Arzucan ÖZGÜR, Fikret GÜRGEN	
15. BÖLÜM: Yapay Zeka ve Uygulamaları	215
Dr. Ferda ABBASOĞLU, Dr. Çiğdem Hazal TİMUÇİN, Dr. Fatih Erdoğan SEVİLGİN	
16. BÖLÜM: Büyük Veri Ekosistemi.....	239
Dr. Nurdan KELEŞOĞLU, Dr. Ayşegül ÇALIŞKAN, Dr. Büşra Aydın, Dr. Kazım Yalçın ARGAN	

3.3. Yeni Nesil Dizileme Verilerinin Yorumlanması ve Raporlanması

17. BÖLÜM: Yeni Nesil Dizileme Verilerinin Yorumlanması.....	263
Dr. Mehmet KOCABEY, Dr. Ayfer ÜLGENALP, Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN	
18. BÖLÜM: Nomenklatür ve Varyant Sınıflandırması (Germline)	277
Dr. Taha Reşid ÖZDEMİR	
19. BÖLÜM: Nomenklatür ve Varyant Sınıflandırması (Somatik)	287
Dr. Zafer YÜKSEL	
20. BÖLÜM: Rapor Bölümleri ve Formatı / Raporlama Sonrası Hususlar.....	305
Dr. Zehra Oya UYGUNER	

4. Genomikten Omik Veriye

21. BÖLÜM: Transkriptom.....	323
Çiğdem Hazal TİMUÇİN, Özgenur AKDAŞ, Dr. Tunahan ÇAKIR	
22. BÖLÜM: Proteomiks ve Tıptaki Uygulamaları	337
Dr. Gül Hüray İŞLEKEL, Dr. Gamze TUNA	

- 23. BÖLÜM: Epigenetik Mekanizmalar ve Sağlık Üzerinde Etkileri 361**
 Gülben AVŞAR, Emre Taylan DUMAN, Emel KÖKREK, Enes AK, Dr. Pınar PİR
- 24. BÖLÜM: Genomik Sonrası Dönemde Yeni Nesil Omik Teknolojileri: Metabolomik 377**
 Dr. Basri GÜLBAKAN, Dr. Ali DURSUN
- 25. BÖLÜM: Genomikten Omik Veriye Metagenomik 403**
 Ünzile GÜVEN GÜLHAN, Dr. Saliha DURMUŞ, Dr. Tunahan ÇAKIR

5. Varyantların Fonksiyonel Analizi

- 26. BÖLÜM: Yeni Nesil Dizileme Analizi Sonrasında Saptanan Varyantların Fonksiyonel Analizinde Zebra Balığı Modellerinin Kullanımı 419**
 Dr. Fulya YAYLACIOĞLU TUNCAY, Ecem KURAL MANGIT, Dr. Pervin Rukiye DİNÇER
- 27. BÖLÜM: Genetiği Değiştirilmiş Fare Modellerinin İnsan Hastalıkların Araştırılmasında Kullanımı 459**
 Batur GÜLTEKİN, Kanat YALÇIN, Dr. Tanyeri BARAK
- 28. BÖLÜM: Organoidler 463**
 Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL
- 29. BÖLÜM: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin (İPKH) Tıp ve Araştırma Alanlarında Kullanılması 473**
 Dr. İçten BOZKURT, Dr. Deniz KILIÇ, Dr. A. Gülhan ERCAN-ŞENÇİÇEK

6. Özel Yeni Nesil Dizileme Uygulamaları

- 30. BÖLÜM: Dünyada ve Türkiyede Genom Projeleri 497**
 Dr. Onur Emre ONAT, Dr. Hasan Tayfun ÖZÇELİK
- 31. BÖLÜM: Tek Hücreli Omik Veriler ve Sağlık Bilimlerinde Kullanımları 517**
 Cemal YILDIZ, Batuhan ÇAKIR, Hamza Umut KARAKURT, Dr. Pınar PİR
- 32. BÖLÜM: Klinik Pratikte “Anne Kanında Serbest Fetal Dna Dizileme” 539**
 Dr. Seher BAŞARAN
- 33. BÖLÜM: Solid Kanserlerde Yeni Nesil Dizileme 547**
 Dr. Sadiye EKİNCİ, Dr. Ajlan TÜKÜN
- 34. BÖLÜM: Hematolojik Kanserlerde Yeni Nesil Dizileme 569**
 Dr. Müge SAYITOĞLU, Dr. Emin KANSU

35. BÖLÜM: Herediter Kanser ve Ngs Uygulamaları	603
Dr. Ayça Yıldız BULUT, Dr. Elçin BORA	
36. BÖLÜM: Preimplantasyon Tanıdaki Yeni Nesil Dizileme Uygulamaları	621
Dr. Volkan BALTACI	
37. BÖLÜM: Doğum Öncesi Tanıda Yeni Nesil Dizileme Uygulamaları	655
Dr. Tufan ÇANKAYA	
38. BÖLÜM: Yenidoğan Taramaları ve Yeni Nesil Dizileme	665
Dr. Ceren Yılmaz UZMAN, Dr. M. Derya ERÇAL	
39. BÖLÜM: Nadir Hastalıklara Multi-Omik Yaklaşım	675
Dr. Yağmur KÜÇÜMEN, Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN	
40. BÖLÜM: Yeni Nesil Dizileme ve Etik, Hukuki ve Sosyal Sorunlar	685
Dr. Çağrı Zeybek ÜNSAL, Dr. Ayşe Nurten AKARSU	

Tablo 2. PGx için Kullanılan Mevcut Genotipleme Yöntemlerinin Performans ve Uygulanabilirlikleri

		TNV Paneli		Kısa Okuma dizileme			Uzun Okuma dizileme	
		PGx Paneli	Tüm Genom Paneli	PGx Paneli	TED	TGD	PGx Paneli	TGD
Geri Dönüş Süresi (Islak tezgah*)		++	+	+	+	+/-	-	--
Haplotip Fazlama	Hesaplama	-	+/-	+	+/-	+	++	++
	Doğrudan	-	-	-	-	-	++	++
İmpütasyon PGx varyasyonunun kapsamı		-	+/-	+/-	+/-	MD	MD	MD
Nadir varyantların tespiti **		+	+	++	+/	++	++	++
Önceden tanımlanmış gen/varyant panelinin dışındaki varyantların tespiti		--	--	-/+	-/+	++	++	++
Yapısal ve karmaşık varyantların tespiti		--	--	+	+/-	+	++	++
Geri dönüş süresi verisinin işlenmesi*		++	++	+	+	+/-	-	--
	Yatırım	++	+	-	-	-	-	-
Maliyet***	Örnek başına işletme maliyeti	+/-	++	+/-	+/-	-	+/-	-

PGx: farmakogenomik, TED: tam ekzom dizileme, TGD: tüm genom dizileme, TNV: tek nükleotid varyasyonu. MD: Mevcut değil (Tam gen/genom kapsamı nedeniyle geçerli olmadığından bu bölgede imputasyona gerek yoktur). Bu tablo mevcut sorun için en iyi teknolojiyi seçmeye yardımcı olacak bir kılavuz niteliğindedir (Lee ve ark, 2020).

++ en iyi, + iyi, - kötü, -- en kötü skorlamayı ifade etmektedir. * Kısa bir geri dönüş süresi + ile gösterilmiştir. ** TNV panelleri için, varyantların panelde mevcut oldukları varsayılmıştır. *** Daha düşük maliyetler + ile belirtilmiştir.

YND'NİN TEMEL BİLİMLERDE VE KLİNİK UYGULAMALARDA KULLANIMI

Tüm genom ve tüm ekzom dizileme teknikleriyle DNA'da meydana gelen varyasyonların bulunmasını sağlayan yeni nesil dizileme teknikleri, birçok farklı hastalığın mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında, teşhis ve tedavi yöntemlerinin belirlenebilmesi için yapısal varyasyonların (Alkan 2011), epigenetik değişikliklerin (Meaburn 2012), hedef bölge dizilerinin, tek hücre seviyesinde meydana gelen DNA dizisindeki değişikliklerin, mRNA ve diğer RNA çeşitlerinin dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır (Zhao 2015). Bu sayede, hastalık mekanizmaların çok daha derinlemesine anlaşılması sağlanmakta ve daha doğru teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin de önü açılmaktadır. Bu gelişmeler ışığında, özellikle kanser başta olmak üzere (Kosvira 2019), nörodejeneratif hastalıklar (Shademan 2021) ve çeşitli patojenlerin tanımlanmasında (Deneke 2017) da YND'nin kullanımı gün geçtikçe artmakta ve yaygınlaşmaktadır.

YND'nin Kanserde Kullanımı

DNA dizisinde meydana gelen varyasyonlar, kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu değişimler DNA'nın tek bir noktasında meydana gelebileceği gibi, birkaç nükleotidin değişime uğraması veya daha büyük yapısal değişikliklerin oluşmasıyla insersiyon, delesyon ve füzyonların meydana gelmesi sonucunda da ortaya çıkabilir (Loeb 2003). Bu bulgulara takiben yapılacak olan araştırmalar ise farklı varyantlara sahip kanser hastalarının hangi tedavi yöntemine en iyi cevabı verdiğinin anlaşılmasını sağlayarak, hastanın en doğru tedaviyi alması için gerekli olan bilginin üretilmesini sağlar (**Tablo 1**). Bu iki adımlı süreç sonucunda elde edilen bilgiler YND tabanlı gen panelleri aracılığıyla (**Tablo 2**) lösemi, prostat (Beltran 2013), mesane (Wang 2020), akciğer (Papadimitrakopoulou 2020) ve yumurtalık (Zelli 2020) kanseri gibi farklı kanser türlerinin teşhis ve tedavi sürecinde kullanılır ve hastanın iyileşmesini sağlayacak olan yol haritasının belirlenmesinde önemli bir katkıda bulunur.

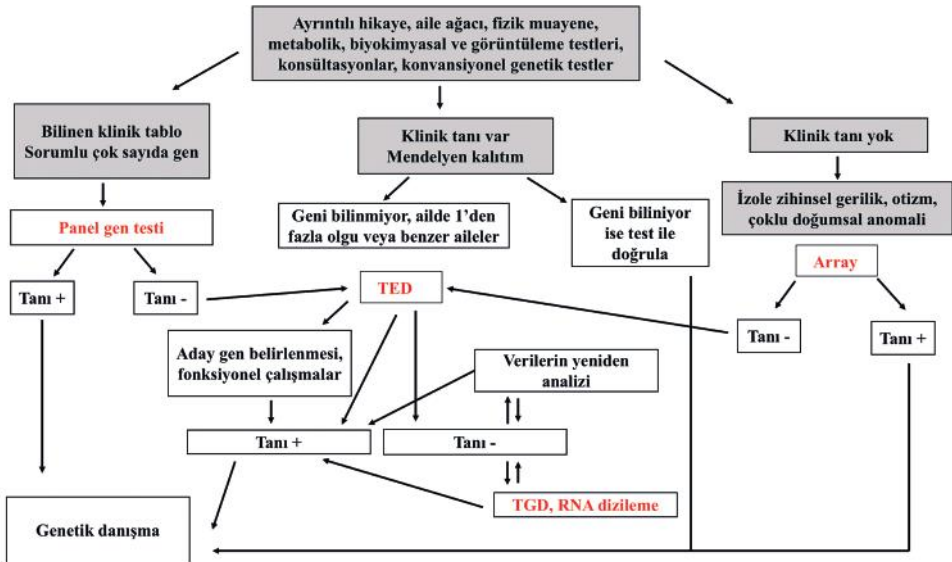
Tablo 1. Genomik Değişimler Temel Alınarak FDA Tarafından Kanser Tedavisinde Kullanımı Onaylanan Terapi Örnekleri

Kanser Türü	Hedef Gen/ Özellik	Genomik Değişim Türü	FDA Tarafından Onaylanan Terapi
Küçük hücreli olmayan Akciğer kanseri	EGFR	Ekzon 19 delesyonu veya L858R varyantı	Osimertinib
Küçük hücreli Akciğer kanseri	TMB	varyantlar	Pembrolizumab
Metastatik Kolorektal Kanser	BRAF	V600E varyantı	Encorafenib, Cetuxsimab
Metastatik Kastrasyona Dirençli Prostat Kanser	HRR	Delesyon ve varyantlar	Olaparib
Metastatik Kastrasyona Dirençli Prostat Kanser	BRCA2, BRCA1	varyantlar	Rucaparib
Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser	MET exon 14	varyantlar	Kapmatinib
Meme Kanser	HER2	varyantlar	Neratinib, Tukatnib

Genetik Test Seçim Algoritması

Klinik bulgular moleküler testi planlamada önemli ipuçları sağlar. Genetik hastalıkların bir kısmında tipik yüz görünümü ve hastalığı düşündürecek ayırt edici bulgular vardır. Örneğin ağır boy kısalığı olan bir olguda intrauterin başlangıçlı boy kısalığı, üçgen yüz görünümü, göreceli makrosefali varlığı Silver-Russel sendromunu düşündürürken; yüzde güneşte artan eritematöz döküntü, sık enfeksiyon varlığı Bloom sendromunu düşündürmektedir. Noonan sendromu ise boy kısalığına yüz bulguları (yele boyun, aşağı eğimli palpebral fissur, epikantus, hipertelorizm, düşük kulak), kalp anomali ve cilt bulgularının eşlik etmesi ile ayırt edilmektedir. Düşünülen ön tanıya göre yapılacak testler de çeşitlilik göstermektedir. Silver-Russel sendromu düşünülen hastada metilasyon analizleri seçilecek test iken, Bloom sendromunda hastalığa neden olan BLM genine yönelik tek gen analizi planlanması doğru olacaktır. Noonan sendromunda ise genetik heterojenite nedeni ile moleküler tanı için hastalığa yol açan en sık genden başlayarak ilişkili genler tek tek analiz edilebileceği gibi, hepsine bir arada tek seferde bakabilen gen panel analizi de planlanabilir. Muayene bulgularının yanı sıra ek laboratuvar tetkikleri de klinik tanı konulmasında önemli rol oynar. Örneğin hipotoni ile başvuran bir bebekte artmış çok uzun zincirli yağ asiti düzeyi peroksizomal hastalık düşündürürken, katarakt ve proteinüri saptanması Lowe sendromu açısından yönlendirici olur.

Genetik hastalık düşülen olgularda test algoritması **Şekil 1**'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Yeni nesil dizileme test algoritması

Mikroarray Analizleri

Gelişim geriliği/zihinsel yetersizlik genetik olarak oldukça heterojen bir hastalık grubudur. Gelişim geriliği/zihinsel yetersizliğe neden olan 700'den fazla gen bildirilmiştir (Stojanovic ve ark, 2020). Alta yatan neden tek gen varyantları, nükleotid tekrar sayısı değişimleri, yapısal varyasyonlar veya kopya sayısı değişiklikleri olabilir. Bu olgularda klinik yönlendirme bilinen bir hastalık düşündürmüyorsa ilk yapılacak test konvansiyonel sitogenetik analizlerden sonra mikroarray

Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılacak Doku Örneklerinin Saklanması

-80°C'da 12 ay boyunca dondurulmuş insan dokularından (göğüs, kolon, karaciğer, akciğer, yumurtalık, endometriyum ve serviks) izole edilen DNA ve RNA'nın stabilitesini elektroforez, ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ve Northern blot dahil olmak üzere çeşitli yöntemler ile analiz edilerek, dokuların %80'inde DNA'nın iyi kalitede olduğu buna karşın RNA'nın bu dokuların sadece %60'ında iyi kalitede olduğu bulunmuştur. Bu saklama koşullarında dokudaki DNA'nın, RNA'dan daha kararlı olduğu gösterilmiştir (Jewell ve ark., 2002).

Biyolojik Örnekleri Bölümlere Ayırma ve Saklama

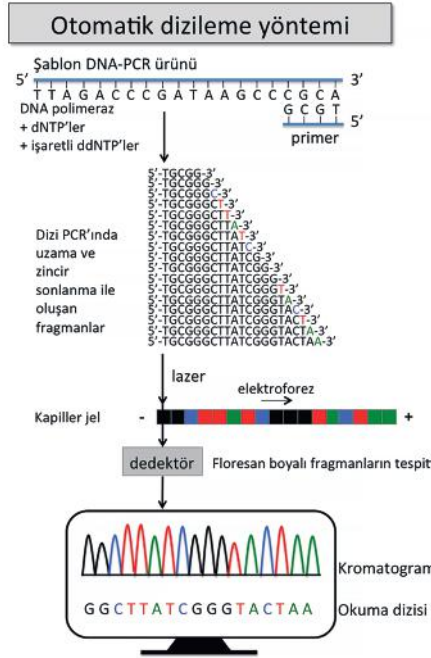
Örnekleri daha küçük temsili miktarlara (alikitlara) bölmek, onları rutin analizler için yararlı hacimlerde korumak için gereklidir. Alikotlama protokolü, amaçlanan analizler için gerekli örnek miktarı ve ayrıca öngörülemeyen ilerideki kullanımlar için uygun şekilde planlanmalıdır. Steroid hormonlar gibi birçok analit stabil olmasına rağmen, diğer farklı analizler biyolojik örneğin bir veya daha fazla çözülme-dondurma döngüsünden etkilenebilir.

İstenilen laboratuvar analizlerine bağlı olarak, biyolojik örnekler ve bunların alikitları çeşitli koşullar altında saklanabilir. DNA, RNA, plazma, serum gibi en yaygın biyolojik örnekler, mekanik dondurucularda, -80°C'da, güvenli bir şekilde saklanabilir. Lenfosit veya diğer hücre örneklerinin saklanması, uzun süreli hücre canlılığı gerekli olduğundan, -150°C veya daha düşük sıcaklıktaki sıvı nitrojenin buhar fazında saklanmalıdır. Biyolojik örnek ve analit stabilitesi açısından genellikle gerekli olmasa da, sıvı nitrojen tankının sıvı fazında -196°C'da depolama en uygun seçeneklerdendir.

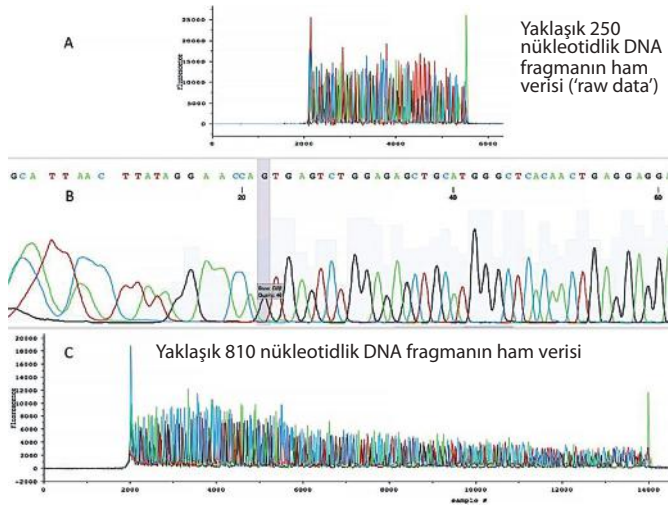
Dondurucu sistemlerin bulunmayabileceği durumlarda, daha düşük maliyetli bir seçenek, filtre kartlarından tükürük veya kan lekelerinin toplanması ve oda sıcaklığında saklanmasıdır. Aşağıda bazı genel depolama koşulları verilmiştir (Tablo 2) (Campbell ve ark., 2008; Vaught ve Henderson, 2011).

Tablo 2. Biyolojik örnek saklama koşulları

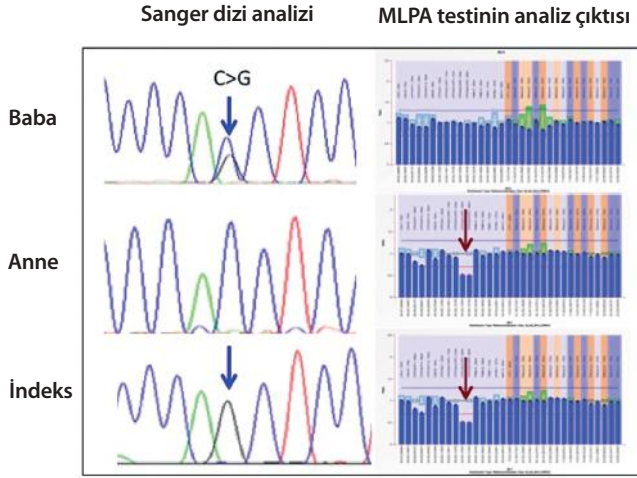
Sıcaklık (°C)	Koruma yöntemi	Tavsiye edilen
+18 ila +20	Oda sıcaklığı	Slaytlar, doku blokları
0 ila +4	Buzdolabı	Taze biyolojik örneklerin işlenmesi
-0,5 ila -27	Derin Dondurucu	Kısa süreli DNA stabilitesi
-27 ila -40	Derin Dondurucu	DNA stabilitesi
-40 ila -80	Derin Dondurucu	DNA / RNA stabilitesi
-80 ila -130	Derin Dondurucu	İdrar, kan ve kan fraksiyonları (plazma, serum vb.) için önerilir.
-130 ila -150	Sıvı nitrojen buharı	Hücre canlılığının korunması ve dokuların saklanması için önerilir.
-196	Sıvı nitrojen sıvı fazı	Canlı hücrelerin saklanması



Şekil 3. Otomatik boya-sonlandırıcı (dye-terminator) dizileme yöntemi şematik olarak gösterilmektedir



Şekil 4. Otomatik dizileyicide floresan boyalarla işaretlenen fragmanların kapiller elektroforezinden elde edilen kromatografik verilerin elektroferogram görüntüsü ve ham verileri. A. Yaklaşık 250 nükleotidlik DNA fragmanının dizileme sonucu elde edilen ham verisi ve okuma boyunca elde edilen floresan yoğunlukları gösterilmektedir. B. A'daki dizi okumasının ilk 60 nükleotidlik elektroferogramında dört rengin her biri farklı bir bazı temsil etmektedir. Yaklaşık 20 nükleotidden sonra tepe (pik) noktaları artarak baz ataması yapılmış ve her baz için kalite skoru >40 olarak dizilenmiştir. C. Daha uzun DNA fragmanının okuma esnasındaki floresan yoğunluk durumunu belirten ham veri gösterilmektedir.



Şekil 7. Sanger dizi analizinde elde edilen elektroferogramlarda gösterilen tek nükleotid varyantının (mavi ok) annede ve babada incelenmesi bu varyantın bulunduğu bölgeyi de içine alan sekiz ekzonu (ekzon 1-8) kapsayan bir delesyonun (kırmızı ok) MLPA testi ile gösterilmesi. Otozomal resesif kalıtlımlı bu hastalıkta her iki test birlikte değerlendirildiğinde, baba SNV taşıyıcısı, anne delesyon taşıyıcısı, indeks ise bileşik heterozigottur.

Örnek 3. Sanger dizileme analizinde yanlış negatif sonuç alma riski oluşturan bir başka durum, doku mozaikliğidir. Bununla ilgili bir örnek olarak, YND gen-paneli yaklaşımı ile Fankoni anemisi için yapılan bir incelemede indekste, *FANCA*(NM_000135.4):c.3754G>T p.(Glu1252*) varyantı (Sanger teyidi yapılmış ve indeksin bu alleli babasından aldığı gösterilmiştir) ile bileşik heterozigotluk oluşturabilecek ikinci bir varyant olarak da *FANCA*(NM_000135.4):c.2557C>T p.(Arg853*) değişimi, yüksek okuma derinliği ve çift yönlü okumalarda ancak %10'luk T-allel frekansı ile saptanmıştır. Bu varyant için Sanger dizileme ile anne, baba ve indeks periferik beyaz kan hücrelerinin genomik DNA örneklerinde doğrulama çalışması yapılmıştır. Bu varyant için Sanger dizi analizinde annede heterozigot olarak gösterilen C>T değişimi (Şekil 8, kırmızı ok), indeksin beyaz kan hücrelerinde (*) net olarak gösterilememiş, ancak deri biyopsisi materyalinin dizi analizinde, heterozigot olarak gösterilmiştir. Bu örnekte verilen varyantın detaylı değerlendirmesi ve klinik önemi ilgili yayında anlatılmıştır (Toksoy ve ark., 2020). Teknik olarak Sanger dizileme analizlerinde, doku mozaikliği riski bulunduğu farklı doku kaynaklarının çalışılması önem taşır, aksi takdirde burada verilen örnekte sadece indeksin kan örneğindeki sonuç dikkate alınsaydı, bu varyantı taşımadığına dair bir raporlama riski vardı. Diğer yandan, YND ile düşük allel frekansı okuması ile tespit edilen varyantların hastalık endikasyonu, kalıtım paterni ve mozaiklik ihtimali göz önünde bulundurularak, aile segregasyonu ile Sanger dizi ile doğrulamasının yapılması tavsiye edilmektedir.

törlerin, uygulanan dizileme platformuyla uyumlu olması ve multipleks dizilemenin gerçekleştirildiği yerde tanımlanabilmesi için bilinen oligomer dizilerine sahip uzunlukları tanımlamıştır. Örnek başına ayrı adaptör dizileri kullanan multiplex dizilimi, çok sayıda kütüphanenin tek bir çalışmada eş zamanlı olarak havuza alınmasını ve dizilenmesini sağlar. Adaptörlerin bağlı olduğu bu DNA parçaları havuzu, bir dizileme kütüphanesi olarak bilinir.

Uzunluk seçimi daha sonra, dizileme platformunda ve seçilen protokolde optimum performans için çok kısa veya çok uzun olan parçaları çıkarmak için jel elektroforezi veya manyetik boncuklar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Kütüphane zenginleştirme/amplifikasyon daha sonra PCR kullanılarak gerçekleştirilir. Emülsiyon PCR'sini içeren tekniklerde, her bir parça, dizileme kümelerinin temelini oluşturmaya devam edecek olan tek bir emülsiyon boncuğuna bağlanır. Amplifikasyonu genellikle istenmeyen parçaları çıkarmak ve sıralama verimliliğini artırmak için bir "temizleme" adımı (örneğin manyetik boncuklar kullanarak) takip eder.

Son kütüphaneler, DNA kalitesini ve miktarını doğrulamak için qPCR kullanarak QC kontrollerinden geçebilir. Bu aynı zamanda dizileme için doğru numune konsantrasyonunun hazırlanmasına da izin verecektir.

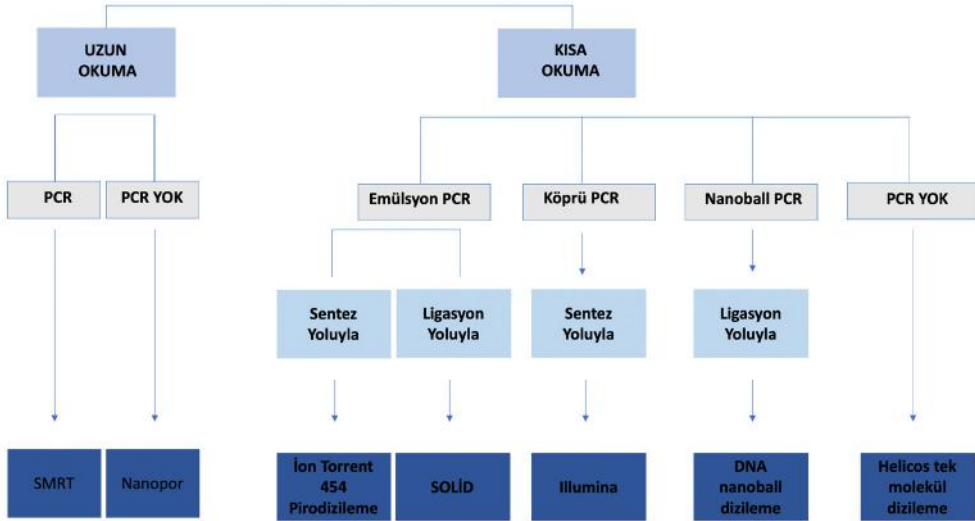
3. Dizileme

Seçilen platforma ve kimyaya bağlı olarak, kütüphane fragmanlarının klonal amplifikasyonu, dizileme yüklemesinden (emülsiyon PCR) önce veya dizileyicinin kendisinde (köprü PCR) gerçekleşebilir. Ardından diziler algılanır ve seçilen platforma göre raporlanır.

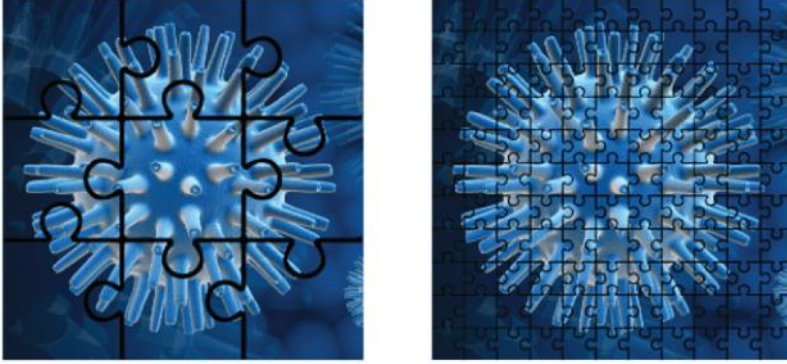
4. Data Analizi

Oluşturulan veri dosyaları, kullanılan iş akışına bağlı olarak analiz edilir. Analiz yöntemleri büyük ölçüde çalışmanın amacına bağlıdır.

Yeni nesil dizileme metotlarının biyokimyasal temelleri ve kullandıkları platformlar detaylı olarak **Şekil 1** de verilmiştir.



Şekil 1. Farklı platform ve ilkelere sahip çeşitli NGS teknolojilerine genel bakış (Satam ve ark 2022)



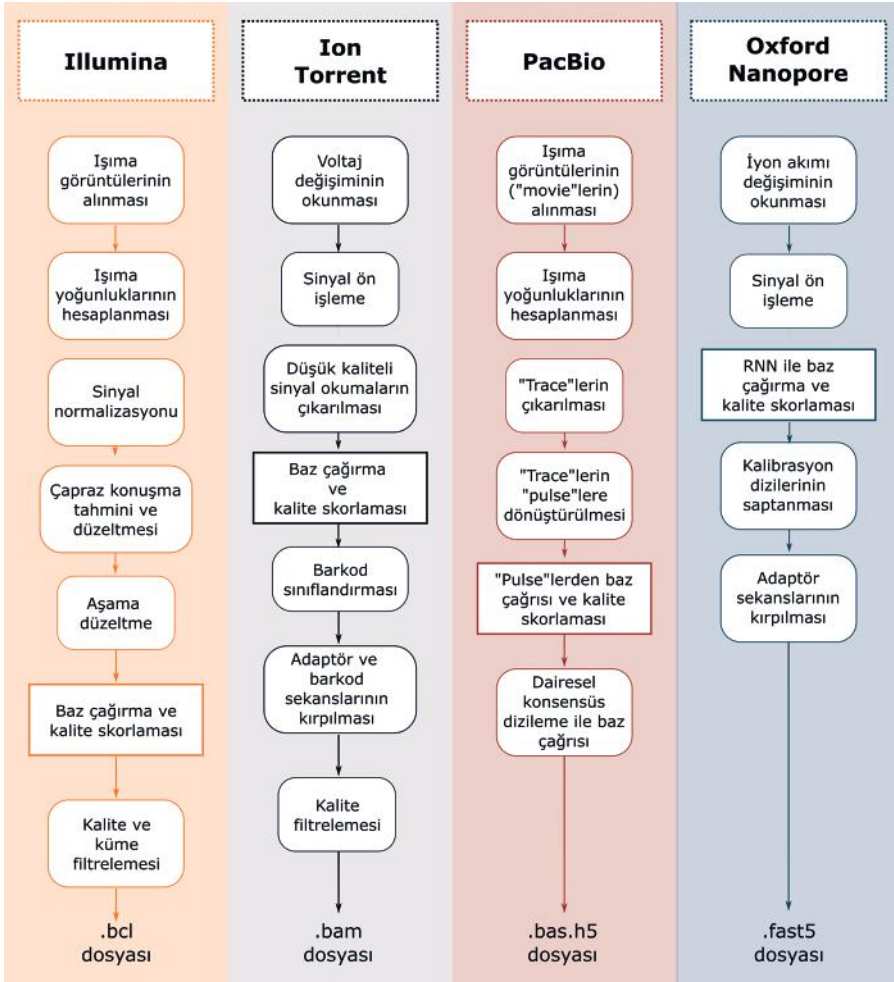
Şekil 7. Kısa Okuma ve Uzun Okumanın Sembolik Karşılaştırması. (<https://nanoporetech.com/>)

de novo birleştirme, referans genomun kullanılmadığı, yalnızca dizilenmiş okumanın kullanıldığı, genomu sıfırdan birleştirme işlemidir. Mikroorganizmalarda yaygın olarak kullanılan bu yaklaşım, son zamanlarda ökaryotik genom üzerine yapılan analizlerde de yaygınlaşmıştır. Bu tür bir birleştirmede tek başına kısa okuma verilerinin kullanılması tam bir genomu üretebilir ancak bu genom parçalar halindedir ve taslak genom olarak adlandırılır. Ancak bazen yüksek kaliteli, bitmiş bir genome ihtiyaç olabilir. Bu durumda yüksek kaliteli bir birleştirme elde etmek için uzun okumalar ve kısa okumalar birlikte kullanılabilir.

Uzun okuma ve kısa okuma teknolojilerinin bir araya gelmesiyle ‘hibrit analiz’ seçeneği karşımıza çıkar. Nanopore uzun okumaları 40.000 baz çiftini kapsayabilir ve parçaların nasıl düzenlenmesi gerektiğini ortaya koyabilir. Uzun okumaların genom yapısı hakkında sağladığı bilgi ve kısa okumaların baz düzeyinde sağladığı yüksek doğruluk bir arada kullanılarak veriler birleştirilir. Unicycler gibi hibrit *de novo* birleştirme için amaca yönelik yeni araçların geliştirilmesi, üretilebilecek sonuçların kalitesini iyileştirir. Bu araçlar büyük önem taşımakta ve zamanla gelişmeye devam etmektedir. (Hybrid Genome Assembly - Nanopore and Illumina - Bioinformatics Documentation, n.d.)

Bazı çalışmalarda uzun okuma ve kısa okuma metodolojileri birbiriyle ve hibrit analizle karşılaştırmıştır. Uzun okuma yapan metodolojilerin genellikle daha eksiksiz diziler ve daha uzun örtüşen DNA segmentleri sağladığı, kısa okuma yapan metodolojilerin daha hassas sonuç verdiği, hibrit analizlerin ise tüm yöntemler arasında en eksiksiz ve doğru sonucu verdiği ortaya çıkmıştır (Chen ve ark., 2020).

Kısaca yeni nesil dizileme ve üçüncü nesil dizilemenin birlikte kullanımı, yani hibrit dizileme, kısa okumanın boşluklar bırakarak okuması ve uzun okumanın nispeten yüksek hata oranlarına sahip olması gibi eksikliklerini gidererek, özellikle *de novo* genom birleştirmede oldukça kullanışlı hale gelmektedir.



Şekil 2. Illumina®, Ion Torrent™, PacBio® ve Oxford Nanopore® Platformlarında Kullanılan Primer Analiz İş Akışı Basamakları.

Sinyal İşleme

Primer analizde ilk adım, sinyal işlemedir. Burada, bir dizileme platformundan diğerine “okuma” teknolojisi değişeceğinden, işlenecek sinyalin doğası (resimden renk, elektrotlardan pH vb.) değişecektir.

Popüler dizileme platformlarından biri olan Illumina®, sentez yoluyla dizileme konseptini floresan etiketli tersinir sonlandırıcı teknolojisi ile kullanır. Dizileme, bir DNA polimeraz tarafından polimerizasyon reaksiyonunu duraklatmak için tersinir bir sonlandırıcıya bağlanmış ve floresanla işaretlenmiş nükleotitlerin (3'-O-azidometild NTP'lerin) optik okumasına dayanır. Bu okuma, floresan nükleotitlerin her dizileme döngüsü sırasında nükleik asit zincirine dahil edildiğinde elde edilen floresan sinyalinin şarj-kuplajlı cihaz (CCD) kamerası ile taranarak görüntülenmesi ile gerçekleşir. Floresan işaretli sonlandırıcının tersinir olması özelliği ile, bir sonraki

Hizalama aşamasının sonunda referans genom haritalanmış diziler dizi hizalama haritası (*Sequence Alignment Map*, *SAM*) uzantılı, metin tabanlı bir dosyada depolanmaktadır. *SAM* formatındaki dosya, dosya içeriği ile ilgili genel bilgileri içeren başlık kısmı ve her bir dizinin referans genom ile nasıl hizalandığına ilişkin bilgileri içeren hizalama kısmından oluşmaktadır. Başlıklar, *SAM* dosyası içinde "@" ile başlamaktadır. Bu başlıklar, HD, SQ, PG ve RG şeklinde alt başlıklara ayrılmıştır. Burada, HD - hizalamanın sıra düzenini, SQ - referans dizinin ismi ve uzunluğu bilgisini, PG - hizalama için kullanılmış araç ve versiyon bilgisini ve RG - okuma grubu bilgisini içeren başlıklardır. Okuma grubu (RG) alt başlığı, okuma numarası (read ID), örnek ismi, kütüphane bilgisi, kullanılan platform birimi (Illumina® vd.), okuma üretilirken hangi teknolojinin kullanıldığı gibi bilgilerin yer aldığı uzun bir alt başlıktır. *SAM* dosyasında yer alan okuma grubu bilgisi, genotip tespitinde kullanılmaktadır. Ayrıca hizalama kalitesini arttırmak amacıyla hizalama işleminden sonra uygulanan baz kalite skoru yeniden kalibrasyonu aşamasında da okuma grubu bilgisinden faydalanılmaktadır (Detaylı bilgi için "Baz Kalite Skoru Yeniden Kalibrasyonu" isimli bölüme bakınız). Bu nedenle hizalama aşamasında okuma grubu bilgisinin girilmesi gereklidir.

SAM dosyasının hizalama kısmındaki her bir satır ise hizalanan okumayı temsil etmektedir ve on bir zorunlu alan bilgisini içermelidir.

Tablo 1. *SAM* dosyasının hizalama kısmındaki zorunlu 11 alan

Alan İsmi	Tanım
QNAME	Okuma sorgu ismi (read ID).
FLAG	Referans diziye hizalamanın nasıl gerçekleştiğinin sayısal ifadesidir (bitwise).
RNAME	Referans dizi ismi. Genel olarak kromozom ismi ile ifade edilir.
POS	Referans dizi üzerinde okumanın hizalandığı ilk bazın pozisyonu.
MAPQ	Hizalama kalitesi. Genomda bir hizalamanın ne kadar benzersiz olduğunu göstermek için kullanılmaktadır.
CIGAR	CIGAR (<i>Compact Idiosyncratic Gapped Alignment Report</i>) bölgesindeki M: eşleşmeyen bazı (<i>mismatch</i>), I: Birkaç bazın eklenmesi (<i>insertion</i>), D: Birkaç bazın silinmesi (<i>deletion</i>).
RNEXT/ MRNM	Çift/eşli uç (<i>paired end</i>) dizilemeler için sonraki okumanın hizalandığı referans dizi ismi. RNAME'in sonraki dizi için karşılığı olarak düşünülebilir. <i>SAM</i> dosyasındaki "=" RNAME ile aynı isimde olduğu anlamına gelmektedir.
PNEXT/ MPOS	Sonraki okumanın referans dizi üzerinde hizalandığı pozisyon. POS'un ikinci okuma için karşılığı olarak düşünülebilir. "0" pozisyon ile ilgili bilginin olmadığı anlamına gelmektedir.
TLEN	Template Length → Ölçülen DNA fragmanının (<i>template</i>) uzunluğu.
SEQ	Okuma dizisi.
QUAL	ASCII Phred ölçekli kalite skoru.

Analizdeki performansı artırmak ve bellek kullanımını düşürmek amacıyla *SAM* dosyası öncelikle sıkıştırılmış ikili gösterim (*binary*) formatına çevrilir. Bu format *BAM* (*Binary Alignment Map*) uzantılı bir dosya şeklinde kaydedilir. Sonraki analizler de *SAM* dosyası üzerinden değil, *BAM* dosyası üzerinden gerçekleştirilir.

gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Dipnotlandırma amacı ile kullanılan kaynakların düzenli olarak takip edilip güncellenmesi, eğer bir güncelleme varsa mümkün olan en kısa sürede değişikliklerin uygulanmasına da azami ölçüde özen gösterilmesi gerekmektedir.

Kullanıcıların tersiyer analiz noktasında tercihlerini belirlerken dikkat etmeleri gereken bir başka nokta da kişisel ve kurumsal kullanım amaçları ve politikaları doğrultusunda mutlaka üretilen büyük ölçekli verinin uzun dönem kullanımı, saklanması ve paylaşılması gibi konular hakkında bir yol haritasına sahip olmalarıdır. Böylelikle dipnotlandırmalarda kullanılan bilgiler birikerek kurum içi, ulusal ve uluslararası belli bir bilgi birikimi yaratacak ve bu bilgi birikimini tekrardan dipnotlandırma döngüsüne kolaylıkla kazandırmak mümkün olabilecektir.

2025 yılı itibarıyla dünya genelinde 2 milyara yakın insanın genomunun dizilenmesi beklenmektedir (Stephens ve ark., 2015). Geçmişte üretilen verinin gelecekte üretilen veri ile bir köprü kurabilmesi, geçişken olarak kullanılabilmesi ve kümeleşen genomik verinin biyolojimizi daha net anlamamıza yardımcı olmasına olanak tanıyıcı bilgi işlem alt yapıları kurmak gerekmektedir. Ayrıca ardışık işlemler dizisi sürekli testlere tabi tutularak standardın ve optimizasyonun yakalanmasına yönelik karşılaştırma çalışmaları ve buna göre dipnotlandırmalar arasında önem sırasının çıkarılması uygun olacaktır (Wang ve ark., 2020).

Son olarak tersiyer analiz özelinde klinik biyoinformatik alanında bizleri bekleyen zorlukları ve fırsatları Tablo 2’de özetleyerek, baş döndürücü bir hızla devam eden hassas tıp alanındaki gelişmelerin bizleri nereye götüreceğini heyecan ile bekliyor olacağız.

Tablo 2. Klinik biyoinformatikte bizleri bekleyen zorluklar ve fırsatlar

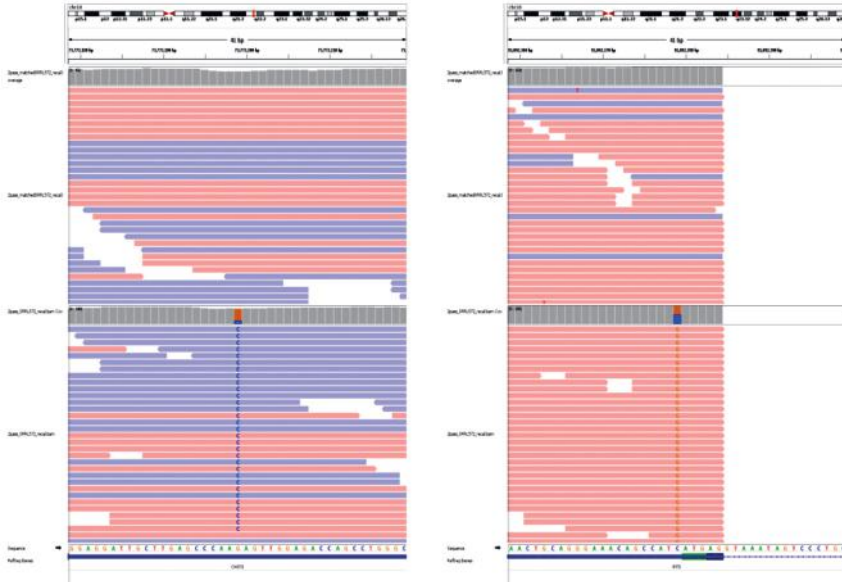
Zorluklar	Fırsatlar
Kanıtların takip edilememesi	Veri tabanlarındaki kanıt zinciri sunumunun iyileştirilmesi
Data standardı ve uyumu	Standart belirleyici organizasyonların [Global Alliance for Genomics and Health (GA4GH) gibi] rehberlerini takip etmek ve uygulamak
Kötü tanımlanmış veri girdileri	Fenotipik datanın takibi ve güncellenmesi
Veri büyüklüğü	Uzun dönem sürdürülebilir veri merkezleri oluşturmak
Artan veri çeşitliliği	Omik veri entegrasyonu ve biyobankalama ön hazırlıkları
Veri güvenliği ve veri paylaşımı	Paylaşım imkanı tanıyan ancak gizlilik ilkelerini asla elden bırakmayan teknolojik ve politik düzenlemeler
Verinin dağıtılma maliyeti ve etkinliği	Genotip ve fenotip verisine ulaşım için ortak kabul gören veri ve etik uygulamaların evrimleşmesi (API, REST arayüzleri)
Veri işleminin hesaplamasal maliyeti	Donanım geliştirilmesi ve daha etkin kullanım biçimleri (optimizasyon, paralelleme vb)
Standart ontolojik söz dağarcığı kullanımı	Kullanım teşviki, ontolojilerin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi

Örnek Uygulama

Bu bölümde YND verisi üzerinde yapay zekâ yöntemlerinin uygulamasına dair bir uygulamadan detaylı olarak bahsedilecektir. Tersiyer analiz kısmında da bahsedilen varyant iyileştirme konusu üzerine derin öğrenme modeli geliştirilen uygulama 2019 yılında lisansüstü tez çalışması olarak basılmıştır (Timuçin, 2020).

Bir hastanın normal örneğinde bulunmayan ancak tümör örneğinde bulunan varyantlara somatik varyantlar denmektedir. Somatik varyantların doğru tespiti kanser teşhisinde ve doğru tedavi imkanlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Dizileme hataları, hizalama hataları, tümör-normal kontaminasyonu ve tümör heterojenliği somatik varyant bulmayı zorlaştıran faktörler arasındadır. Somatik varyantların tespiti için literatürde geliştirilmiş çok sayıda araç bulunmaktadır, bunlar arasında en yaygın kullanılanlar Mutect2 (Benjamin ve ark, 2019) ve VarScan (Koboldt ve ark, 2012) araçlarıdır. Bu araçların sonuç olarak verdiği varyant listeleri karşılaştırıldığında elde edilen varyantlar arasındaki uyumun düşük olduğu gözlemlenmiştir (Krøigård, Thomassen, Lænkholm, Kruse ve Larsen, 2016). Farklı araçlardan elde edilen sonuçlar arasındaki uyumsuzluk araçların arka planda uyguladığı farklı algoritmalarından kaynaklandığı gibi somatik varyantların tespitinin zorluğunun etkisiyle çok sayıda yanlış pozitif varyant tespit edilmesinden kaynaklanmaktadır.

Araçlar tarafından tespit edilen yanlış pozitif varyantları ortadan kaldırmak ve doğru tanıda bulunmak amacıyla, IGV (*Integrative Genomics Viewer*) (Thorvaldsdóttir, Robinson ve Mesirov, 2013) gibi genom görselleştirme araçları kullanarak her bir varyantın klinisyenler tarafından görsel olarak incelenmesi gerekebilmektedir. 2018 yılında yapılan bir çalışma (Barnell ve ark, 2019) somatik varyantlar incelenirken dikkate alınması gereken kurallar listelenmiştir. **Şekil 7**'de literatür çalışması göz önüne alınarak doğru ve güvenilirliği azalmış olarak etiketlenen görseller bulunmaktadır. Soldaki örnekte doğru bir somatik varyant örneğinden beklendiği üzere varyant normal örnekte gözlenmemekte ancak kanser örneğinde gözlenmektedir, sağdaki örnekte ise varyantın bulunduğu bütün okumaların sadece kırmızı yani tek yönlü okumalardan gelmesi ve okuma sonunda yer alması varyantın güvenilirliğini azaltmaktadır.



Şekil 7. Üstte normal altta tümör dokularına ait hizalamaların IGV görselleri

Tablo 1. Kriterlerin kombinasyonu yoluyla varyant sınıflandırılması

Patojenik	1. Bir adet çok güçlü kriter ile, a. ≥ 1 güçlü kriter veya b. ≥ 2 orta güçlü kriter veya c. ≥ 1 orta ve ≥ 1 destekleyici kriter veya d. ≥ 2 destekleyici kriter varlığı 2. ≥ 2 güçlü kriter varlığı 3. Bir güçlü kriter ile, a. ≥ 3 orta güçlü kriter veya b. İki orta güçlü ve ≥ 2 destekleyici kriter veya c. Bir orta güçlü ve ≥ 4 destekleyici kriter varlığı
Muhtemel Patojenik	1. Bir adet çok güçlü kriter ve 1 orta güçlü kriter varlığı 2. Bir güçlü kriter ve 1-2 orta güçlü kriter varlığı 3. Bir güçlü kriter ve ≥ 2 destekleyici kriter varlığı 4. ≥ 3 orta güçlü kriter varlığı 5. 2 orta güçlü ve 2 destekleyici kriter varlığı 6. 1 orta güçlü ve 4 destekleyici kriter varlığı
Klinik Önemi Belirsiz	1. Varyantın diğer sınıflara sokulamaması 2. Birbirine zıt bilgi veren benign ve patojenik kriter varlığı
Muhtemel Benign	1. Bir adet güçlü benign kriter ve 1 destekleyici benign kriter varlığı 2. ≥ 2 destekleyici benign kriter varlığı
Benign	1. Popülasyon allel frekansı %5 üzerindeki varyantlar (BA1) 2. ≥ 2 güçlü benign kriter varlığı

Buradaki skorlama sistemi mutlak bir aritmetik kanıta dayanmamaktadır. Tavtigian ve ark. (2018) ACMG kriterleri üzerinde Bayes matematiksel modellemesi yaparak her kriter için kantitatif bir ağırlık puanı ortaya koymayı hedeflemişlerdir. ACMG kriterleri belirlerken kalitatif bir yaklaşım planlamış olsa da bu sınıflandırmanın tutarlı bir Bayes modellemesine bazı eksiklikler dışında uyabileceği gösterilmiştir. Her kriterin bağımsız olarak uygulanabilmesi, her biri için tek tek patojenisite oranı hesaplanabilmesini (odds of pathogenicity >1 ise patojenik, <1 ise benign) sağlamaktadır. Bu çalışmaya göre patojenik yönündeki çok güçlü kriterler için patojenisite oranı 350, güçlü kriterler için 18.7, orta güçlü kriterler için 4.3, destekleyici kriterler için ise 2.08 olarak hesaplanmıştır. Benign yönündeki güçlü kriterlerde oran 0.053, destekleyici kriterler için 0.48 olarak hesaplanmıştır. Sadece BA1 kriteri mutlak benign sonuç verdiği için skoru bulunmamaktadır. Matematiksel modellemede 0.1 ön risk (prior probability) varsayımında tüm patojenisite oranlarının çarpımı ile kombine skor hesaplanması ve beşli sınıflandırma hedeflenmiştir [Son risk (posterior probability): $P > 0.99$, $LP > 0.90$, $VUS > 0.10$, $LB > 0.001$, $B < 0.001$]. Fakat özellikle VUS sınıflandırma kombinasyonundaki “birbirine zıt kriter varlığının” ne şekilde olacağı ayrıntılı anlatılmadığı için zorluklar ortaya çıkmıştır. Örneğin iki güçlü patojenik kriter ve bir destekleyici benign kriter alan varyant nasıl yorumlanmalıdır? Bu noktada ACMG, tıbbi genetik profesyonellerinin veriyi tümüyle yorumlaması gerektiğini belirtmekte ve uzman görüşüne saygı duymaktadır. Matematiksel modellemede ise bazı kombinasyonlar P/LP bazıları VUS sınıflandırması almıştır ki gerçek dünyada da varyantların bu şekilde yorumlanacağı tahmin edilmiştir. ACMG varyant sınıflandırmasının gelecekte tümüyle kantitatif bir temel üzerinde yeniden dizayn edilmesinin rasyonel olduğu düşünülmektedir.

Tablo 1. Somatik Varyant Tespitinde Sıklıkla Kullanılan Araçlar

Varyant çağırıcı	Kullanım Alanı	Web Adresi
MuTect2 ¹	SNV, indel	gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/5358911630107-Mutect2
SAMtools ²	SNV, indel	htslib.org
FreeBayes ³	SNV, indel, MNV ve bileşik insersiyon ve substitüsyon olayları	github.com/ekg/freebayes
Strelka2 ⁴	SNV, indel	github.com/Illumina/strelka
VarScan2 ⁵	SNV, indel	dkoboldt.github.io/varscan/somatic-calling.html
VarDict ⁶	SNV, indel	github.com/AstraZeneca-NGS/VarDict
Scalpel ⁷	Indel	scalpel.sourceforge.net
Pindel ⁸	Büyük delesyonlar, orta boyut insersiyonlar, inversiyonlar, tandem duplikasyonlar ve diğer SV	gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel
SomaticSniper ⁹	Tümör ve normal arasında farklı tek nükleotid pozisyonlar	gmt.genome.wustl.edu/packages/somatic-sniper
Lancet ¹⁰	SNV, indel	github.com/nygenome/lancet
SvABA ¹¹	Indel (1-50 bç), orta boyut SV (50-300 bç), büyük SV (>300 bç)	github.com/walaj/svaba
Manta ¹²	SV	github.com/Illumina/manta
Lumpy ¹³	SV	github.com/arq5x/lumpy-sv
BIC-Seq2 ¹⁴	CNV	compbio.med.harvard.edu/BIC-seq
FACETS ¹⁵	CNV	sites.google.com/site/mskfacets
EXCAVATOR2 ¹⁶	CNV	sourceforge.net/projects/excavator-2tool
MuSE ¹⁷	SNV, indel	github.com/wwylab/MuSE
FusionCatcher ¹⁸	Füzyon genleri, translokasyonlar ve kimeralar (RNA-seq)	github.com/ndaniel/fusioncatcher
STAR-Fusion ¹⁹	Füzyon genleri	github.com/STAR-Fusion/STAR-Fusion/wiki
TopHat-Fusion ²⁰	Füzyon genleri	ccb.jhu.edu/software/tophat/fusion_index.shtml
ShatterSeek ²¹	Kromotripsis	github.com/parklab/ShatterSeek

SNV: Tek nükleotid değişiklikleri, indel: insersiyonlar ve delesyonlar, MNV: mononükleik varyasyonlar, SV: yapısal varyantlar.

¹(Cibulskis ve ark., 2013), ²(H. Li ve ark., 2009), ³(Garrison & Marth, 2012), ⁴(Saunders ve ark., 2012), ⁵(Koboldt ve ark., 2013), ⁶(Lai ve ark., 2015), ⁷(Fang ve ark., 2016), ⁸(Ye ve ark., 2009), ⁹(Larson ve ark., 2012), ¹⁰(Narzisi ve ark., 2018), ¹¹(Wala ve ark., 2018), ¹²(Chen ve ark., 2016), ¹³(Layer ve ark., 2014), ¹⁴(Xi ve ark., 2016), ¹⁵(Shen & Seshan, 2016), ¹⁶(D'Aurizio ve ark., 2016), ¹⁷(Y. Fan ve ark., 2016), ¹⁸(Nicorici ve ark., 2014), ¹⁹(Haas ve ark., 2017), ²⁰(Kim & Salzberg, 2011), ²¹(Cortés-Ciriano ve ark., 2020) (Web adreslerine son erişim tarihi: 21.05.2022).

Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezinin Adı, tel ve iletişim bilgileri, e posta adresi, web adresi

Protokol No.:

Materyal geliş tarihi:

Adı Soyadı / Doğum Tarihi / DNA No

İndeks:

Rapor Tarihi:

Anne:

Baba:

Endikasyon: Fanconi anemisi
İncelenen Materyal: DNA (periferik kan)

İnceleme Yöntemi : Ion Torrent PGM'de, **Radial Işın Defektleri** (RID) ile ilişkili **43** genin kodlayan ekzon bölgeleri ile ekzonların 10 bç intron sınır bölgelerini içeren 210,91 kb'lik alanda toplam 785 amplicon ile % 99,43 kapsamda dizilendi. **BRCA2** (FANCD1, 13q12.3, NM_000059.3); **BRIP1** (FANCI, 17q22-q24, NM_032043.2); **EFTUD2** (17q21.31, NM_004247.3); **ERCC4** (FANCC, 16p13.3-p13.11, NM_005236.2); **ESCO2** (8p21.1, NM_001017420.2); **FANCA** (16q24.3, NM_000135.2); **FANCB** (Xp22.2, NM_001018113.1); **FANCC** (9q22.3, NM_000136.2); **FANCD2** (3p26, NM_033084.3); **FANCE** (6p22-p21, NM_021922.2); **FANCF** (11p15, NM_022725.3); **FANCG** (XRC9, 9p13, NM_004629.1); **FANCI** (15q26.1, NM_00113378.1); **FANCL** (PHF9, 2p16.1, NM_018062.2); **FANCM** (14q21.3, NM_020937.2); **GATA1** (Xp11.23, NM_002049.3); **HDAC8** (Xq13, NM_018486.2); **NIPBL** (5p13.2, NM_133433.3); **PALB2** (FANCF, 16p12.2, NM_024675.3); **PLZF** (ZBTB16, 11q23.1, NM_006006.4); **RAD21** (8q24, NM_006265.2); **RAIOS1C** (FANCO, 17q22-q23, NM_058216.2); **RECQL4** (8q24.3, NM_004260.3); **RBM8A** (1q21.1, NM_005105.4); **RPL15** (3p24.2, NM_002948.3); **RPL35A** (3q29-qter, NM_000996.2); **RPL11** (1p36.1-p35, NM_000975.3); **RPL15** (3p24.2, NM_002948.3); **RPS7** (2p25, NM_001011.3); **RPS10** (6p21.31, NM_001014.4); **RPS17** (15q, NM_001021.4); **RPS19** (19q13.2, NM_001022.3); **RPS24** (10q22-q23, NM_033022.3); **RPL26** (17p13, NM_000987.3); **RPS29** (14q, NM_001032.4); **SALL1** (16q12.1, NM_002968.2); **SALL4** (20q13.13-q13.2, NM_020436.3); **SF3B4** (1q21.2, NM_005850.4); **SLX4** (FANCP, 16p13.3, NM_032444.2); **SMC1A** (Xp11.22-p11.21, NM_006306.3); **SMC3** (10q25, NM_005445.3); **TBX5** (12q24.1, NM_000192.3); **XRCC2** (FANCU, 7q36.1, NM_005431.1).

İndeks 'de gen panel testi, anne Hanım ve baba 'Bey' de hedef bölgede Sanger dizi analizi

Fanconi anemisi ile ilişkili kliniklerin analizinde, gen panelinde ilişkili varyant saptanmayan ya da heterozigot saptanan olgularda kapsanmayan gen bölgeleri (FANCA-exon 1 ve 39, FANCD1 (BRCA2)-exon 15, FANCD2-exon 20, FANCE-exon 1, FANCP-exon 12, FANCI (BRIP1)-exon 13) Sanger dizi yöntemi ile incelendi. **MLPA testi:** FANCA (P031-B2 lot B2-0116 / P032-B2 lot B2-0116) ile FANCA ekzon 1-43 (NM_000135.2) ve FANCA ekzon 1-44 (NM_000135.2); FANCD2 - PALB2 (FANCM) (P057-B2 lot B1-0211) bölgelerinde delesyon/duplikasyon analizi

Gönderen Doktor:

Sonuçlar:

İndeks'de yapılan gen panelinde **BRCA2** (FANCD1) geninde ekzon 27'de heterozigot c.9739C>T (p.Gln3247Ter, p.Q3247*, rs886040849) saptandı. İndeks'de **BRCA2** için yapılan MLPA analizinde büyük delesyon/duplikasyon saptanmadı (Dış Merkez Raporu; Adı ve Tarihi)li Bu testte uygulanan MLPA analizinde **PALB2** (FANCM) geninde ekzon 5-6'da heterozigot delesyon saptandı.

Anne: **BRCA2** (FANCD1) geninde c.9739C>T değişimini taşımadığı belirlendi. MLPA analizinde **PALB2** (FANCM) geninde ekzon5-6'da delesyon saptanmadı.Baba: **BRCA2** (FANCD1) geninde c.9739C>T değişimini taşımadığı belirlendi. MLPA analizinde **PALB2** (FANCM) geninde ekzon 5-6'da heterozigot delesyon saptandı.

Yorum:

Bu testin sonuçları, indeks'de **BRCA2** (FANCD1) geninde gösterilen anlamsız değişimin gonadal mozaikizm dışlanamamakla birlikte de novo oluştuğunu ve **PALB2** (FANCM) genindeki büyük delesyonun ise babadan kalıtıldığını göstermektedir. Fanconi anemisinde digenik kalıtmıla ilişkili genotipler literatürde daha önce gösterilmemiştir.

Fanconi anemisi ile ilişkili genler, klasik bilinen üç DNA tamir mekanizması komponentlerini kodlamaktadır. Bu mekanizmalar homolog rekombinasyon, nükleotid ekzision onarımı ve mutajenik translezon sentezidir. **BRCA2** ve **PALB2** proteinleri homolog rekombinasyonda görevlidir. **PALB2** proteininin WD40 domaini **BRCA2** ile bağlanarak işlev görmektedir. **PALB2** genindeki delesyon bu domainin kaybına neden olmaktadır^{1,2,3}. Bu bilgiler **BRCA2** ve **PALB2** genindeki mutasyonların digenik kalıtmıla ilişkisini desteklese de fonksiyon analizi yapılmadan kesin sonuca varılamaz.

Genetik danışma önerilir.

Saygılarımızla,

Moleküler Test Sorumlusu

Klinik Genetik Sorumlusu

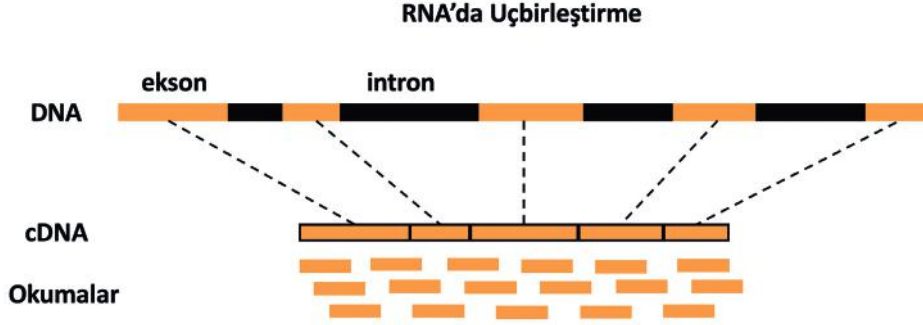
¹George-Lucian Moldovan-2009 How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome.²Rohit Prakash-2015. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins.³Ronald S. Cheung-2017. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers

Not: DNA analiz raporları değerlendirilirken, polimorfizm, nadir genetik varyantlar, saptanamayan mozaikler ve rekombinasyon gibi DNA yapısına özgün durumların ve öngörülemeyen teknik sorunların yanlış pozitifliğe/yanlış negatifliğe, yanlış, yetersiz ve doğru olmayan yorumlara neden olabileceği ya da bazı durumlarda sonuç verilemeyeceği göz önünde tutulmalıdır. Sanger DNA dizi analizi, gende incelenmeyen bölgelerdeki (düzenleyici, kodlamayan transkript, derin intronik gibi) patojenik dizi değişimlerini ya da büyük gen delesyon/duplikasyon ve inversiyonları gösteremez. PZR + RE yöntemi, fragman analizi, MLPA, gerçek zamanlı PZR testleri hedefe yönelik analizler olup hedef dışında olan başka varyantları gösteremez. Yeni Nesil Dizileme (YND) temelli tüm testlerin (gen paneli, tüm ekzon gibi) kapsam ve derinlik limitleri vardır ve ilgili genin bazı dizilerinin incelenememesi ya da kapsanmama olasılığı mevcuttur. YND verilerinin bioinformatik analizi, sadece tıbbi öykü, klinik ve laboratuvar bulguları ile ilişkisi bilinen genler ve varyantları için yapılır. YND testi tekrar dizi bölgelerini, bu bölgelerdeki artış ve eksilmeleri, dinamik mutasyonları ve delesyon/duplikasyonları doğru saptayamaz. Bazı özgün bioinformatik analizlerde kopya sayı değişimleri için ek analizler yapılabilir.

Adres:

E-Posta adresi:

gerçekleşememesine neden olmaktadır. RNA-Seq (mRNA) verisi kullanılarak bu bölgelerdeki varyantlar tespit edilebilmektedir. Literatüre göre ise hastalığa neden olan tüm tek nükleotit varyantlarının %62'sinin kırılmayı etkilediği tahmin edilmektedir. (Marco-Puche ve ark., 2019).



Şekil 2. RNA verisinin uçbirleştirme özelliği

Füzyon Genlerinin Tespiti

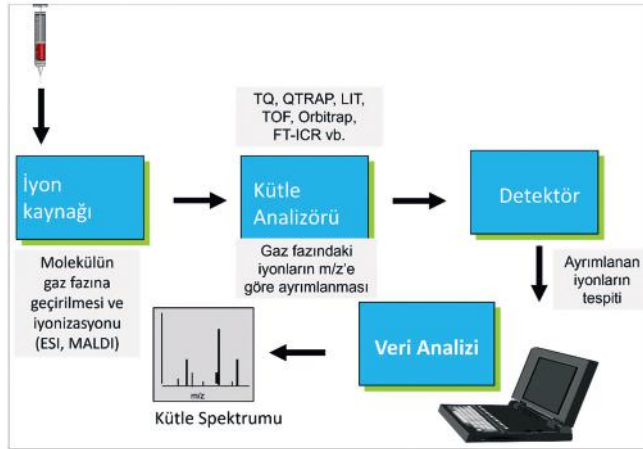
Füzyon transkriptleri, delesyon, duplikasyon, inversiyon gibi kromozomal yeniden düzenlemeler nedeniyle oluşmaktadır. Transkriptom dizilemesi ile bu transkriptlerin yakalanması iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. İlk yöntemde, kısa okumalar genoma hizalanarak uyumsuz hizalanmış okumalar tespit edilir. Diğer yöntemde ise öncelikle kısa okumalar birleştirilerek daha uzun bir transkript haline getirilir daha sonra genoma hizalanarak füzyon tespiti sağlanır. Onkogenik gen füzyonları, kanserde sık karşılaşılan bir faktördür ve patojenik olarak tanınmaktadır. Bazı durumlarda, tekrarlayan gen füzyonları, spesifik tümör alt tipleri ile ilişkilidir ve teşhis amacıyla kullanılabilir. Örneğin kronik miyeloid lösemi hastalarının yaklaşık %95'inde BCR-ABL1, prostat kanserlerinin yaklaşık %50'sinde TMPRSS2-ERG füzyon genleri tespit edilmiştir (Haas ve ark., 2019).

Allele Özgün Ekspresyon (allele-specific expression; ASE)

Allele özgün ekspresyon, alellerden birinin diğerine göre daha az eksprese olduğu ya da hiç eksprese olmadığı durumu ifade etmektedir (Kukurba ve ark., 2014). Ebeveynlerden aktarılan genlerden birinin ifade bulmadığı diğerinin ise aktif olması durumu olarak tanımlanan genomik damgalama (imprinting), X kromozomu inaktivasyonu gibi epigenetik mekanizmalar ya da düzenleyici dizilerdeki cis etkili varyantlar sonucunda allele özgü ekspresyon görülmektedir. Allele özgü ekspresyon analizi ise allelik ekspresyonlar arasındaki dengesizliği tespit edildiği işlemidir. Analiz temizlenmiş okumaların referans genoma ya da referans transkriptte hizalanmasından sonra sayım işlemi ile devam etmektedir. Alleller arasındaki ekspresyon dengesizliği, bireyler arasında fenotipik çeşitliliğe ve hastalık patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır (Fan ve ark., 2020).

Proteomiks alanında doğruluk, hassasiyet ve çözünürlük açısından her biri kendine özgü güçlü ve zayıf yönler içeren dört temel kütle analizörü mevcuttur. Bunlar üçlü quadupol (triple quadupole-TQ), uçuş süresi (time of flight-TOF), iyon tuzağı (ion trap) ve fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans (FT-ICR) analizörleridir. Hem tek başına hem de farklı veri türleri oluşturmak için kombinasyon halinde kullanılabilirler. Üçlü quadupol sistemi kullanılarak gerçekleştirilen sıralı kütle spektrometresi (MS/MS) çalışmalarında, ilk quadupol spesifik kütle/yük (m/z) değerlerine sahip prekürsör iyonların (ana iyonlar) filtrelenmesi için, ikinci quadupol bir çarpışma hücresi (collision cell) olarak ve üçüncüsü ise ürün iyonlarının analizlerini yapmak için kullanılır. Elektrosprey iyonizasyon kaynakları ile birleştirilmiş quadupol iyon tuzakları (iyon trap) ve doğrusal iyon tuzakları, peptit ve protein analizi için geniş kullanımda olan başka bir kütle spektrometre türüdür. Kütle çözünürlükleri ve doğrulukları nispeten düşüktür, ancak özellikle hızlı ve son derece hassas fragman iyon taraması sağlarlar. TOF analizörleri çoğunlukla intakt peptit iyonlarının analizi için MALDI iyonizasyon tekniği ile birlikte kullanılır (MALDI-TOF-MS). Ayrıca quadupol-TOF (Q-TOF), quadupol-Orbitrap MS ve quadupol-doğrusal iyon tuzağı-Orbitrap tribrid MS cihazları ile yüksek çözünürlüklü ve yüksek kütle doğruluğu ile ölçümler gerçekleştirilebilmektedir. FT-ICR ise oldukça kompleks bir analizör olup rezolüsyon, kütle doğruluğu ve duyarlılık açısından hassastır. Ancak oldukça pahalı ve teknik açıdan kullanımı nispeten zor olması nedeniyle diğer enstrümanlara kıyasla kullanımı sınırlıdır.

Moleküllere spesifik ürün iyonlarının elde edilmesi amacıyla geliştirilen fragmantasyon teknikleri arasında en çok kullanılanı çarpışma kaynaklı ayrışma (*Collision-induced dissociation-CID*) tekniğidir. Bunun haricinde elektron transferi ayrışması (*Electron transfer dissociation-ETD*), yüksek enerjili çarpışma ayrışması (*high-energy collisional dissociation-HCD*) teknikleri ve bu tekniklerin birlikte kullanıldığı platformlar mevcuttur (Al-Amrani ve ark., 2021; Paolo ve ark., 2022).



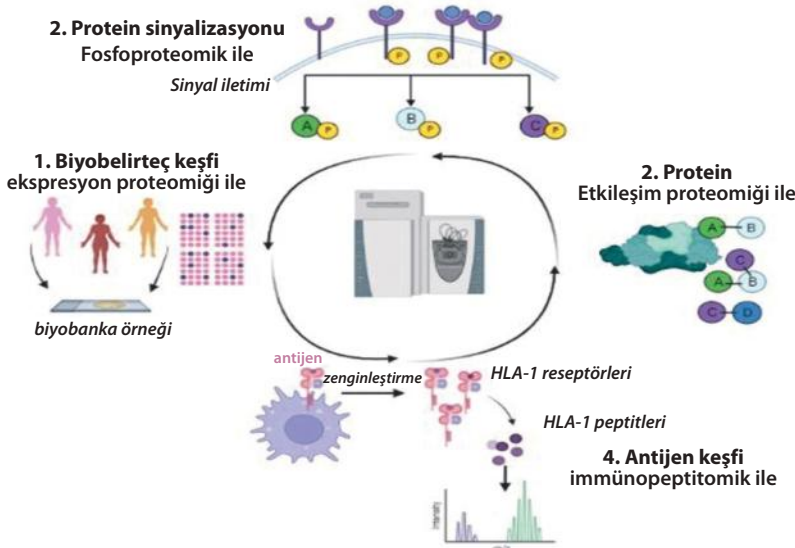
Şekil 2. Kütle spektrometre ana bileşenleri

gibi istatistiksel testler uygulanarak iki farklı koşul arasındaki protein miktar değişiklikleri tespit edilir (Paolo ve ark., 2022).

PROTEOMİKSİN TIPTA KULLANIM ALANLARI

Genom nispeten statik iken, proteom son derece dinamikdir. Bunun nedeni, ekleme varyantları, glikozilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon gibi transasyon sonrası değişiklikler ve bazı proteinler için fonksiyonlarını veya aktivitelerini değiştiren somatik rekombinasyon gibi modifikasyonlardır. Transkripsiyonel ve transasyonel kontrol nedeniyle her gen kopyalanmaz ve her RNA protein düzeyine aktarılamaz. Ayrıca, kararlı proteinler genellikle üretildikleri transkriptlerden daha uzun ömürlüdür. Bu nedenle proteom 100.000 den fazla transkript ve potansiyel olarak milyonlarca protein varyantı (proteoform), alternatif kırılma (*alternative splicing*), tek amino asit polimorfizmleri (SAP'ler) ve kapsamlı posttransasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) ile genomdan bin kat daha fazla hücrel bilgi içerdiğinden, hücre, doku veya organizma düzeyindeki değişikliklerin ortaya konması, dolayısıyla da sağlık ve hastalık ilişkili potansiyel biyobelirteçlerin ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından zengin bir kaynak oluşturmaktadır (Al-Amrani ve ark., 2021).

Genler ve hastalıklar arası ilişkilerde kritik bir role sahip olan proteinlerin büyük ölçekli analizlerini kapsayan proteomiks, tıpta başlıca biyobelirteç ve ilaç keşfi ile ilgili araştırma ve uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu teknik ile serum, idrar, gaita, beyin omurilik sıvısı gibi biyolojik sıvılarda proteinlerin çoklu analizleri ile biyobelirteçler tanımlanabilir ve izlenebilir. Diğer yandan, proteomiksin biyomedikal alandaki uygulamaları sadece biyobelirteç ve ilaç keşfi ile sınırlı kalmayıp, özellikle etkileşim proteomik ve fosfoproteomik yaklaşımlar hastalık yolları ile ilişkili protein etkileşimlerinin kapsamlı haritalarını, protein sinyal yollarını, bu yollarındaki protein fonksiyonlarını ortaya çıkartarak ilaç ve antijen geliştirme konusunda etkin yöntemlerdir (Al-Amrani ve ark., 2021, Doll ve ark., 2019) (Şekil 4).



Şekil 4. Klinik alanlarda proteomiks uygulamaları (Doll ve ark., 2019), (BioRender.com uygulaması ile oluşturulmuştur).

Mide Kanseri	2DE-MS, WB	CFI prekürsör	Liu ve ark., 2007
İdrar			
ADPKD	CE-MS	PKD1, PKD2	Kistler ve ark., 2009, 2013
Mesane Kanseri	Shot gun Proteomik, ELISA	Midkin, HA-1	
FSGS	nLC-MS/MS	77 varsayılan biyobelirteç, (CD59, CD44, IBP7, Robo4, DPEP1)	Shimwell ve ark., 2014
Tükürük			
Tip 2 Diyabet	2D-LC-MS/MS, WB	G3P, SAA, PLUNC, TREE	Border ve ark., 2012
OSCC	SDS-PAGE, LC-MS/MS	Resistin (RETN)	Wu ve ark., 2015
Mide Kanseri	Tandem kütle etiketi (TMT)	CSTB, TPI1, DMBT1	Xiao ve ark., 2016
Ağız Kanseri	Av Tüfeği Proteomik	M2BP, MRP14, CD59, Profilin, Katalaz	Hu ve ark., 2008
GCF			
Diş Eti Hastalıkları	LC-MS/MS	Moesin	Tsuchida ve ark., 2014
CFS			
AD	Nano-LC-MRM/MS, ELISA	24 peptit	Choi ve ark., 2013
Multipl Skleroz	2DE-MS	CRTAC1B, tetranektin	Hammack ve ark., 2004
Doku			
Meme Kanseri	iTRAQ, SRM/MRM, LCMS/MS, WB, IHC	GP2, MFAP4	Muraoka ve ark., 2012
Kolon Kanseri	Etiketsiz LC-MS/MS, WB, IHC	RAI3	Zougman ve ark., 2013
BCC	2DE-MS-MALDI	C3b, aldolaz C, FGG, Prx-cis, Protrombin, VDAC ve LRG	Zali ve ark., 2010
Hücre Kültürü			
REH Hücre Hattı	2DE-MALDI-TOF/TOFMS	VDAC1, SNX3, PFDN6	Dehghan-Nayeri ve ark., 2016

AD (Alzheimer hastalığı), PD (parkinson hastalığı), ADPKD (otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı), OSCC (oral skuamöz hücre karsinom), CSTB (sistatin B), TPI1 (triozfosfat izomeras), DMBT1 (kötü huylu beyin tümörlerinde silinir 1 protein), FSGS (Odak Segmental Glomerüloskleroz), BCC (Bazal Hücreli Karsinom), VDAC1 (voltaj bağımlı anyon kanalı 1), SNX3 (Nexin 3 sıralama), PFDN6 (prefoldin alt birimi 6), GCF (Dişeti Sıvısı)



Şekil 4. Metabolomik analizler için özütleme yöntemleri

Metabolomik Analizlerde Kullanılan Analitik Yöntemler

Daha önce de bahsedildiği üzere genom, transkriptom ve proteom, nükleotidlerin veya aminoasitlerin uç uca eklenmesi ile oluşur ve yapı taşları bellidir. Dolayısıyla genom ve proteom analizleri genellikle tek bir analitik platform ile gerçekleştirilebilir. Örneğin genomik ve transkriptomik analizler yeterli okuma derinliğine sahip bir dizileme cihazı ile proteomik analizler yüksek çözünürlüklü (>50.000) bir nano-LC-MS/MS ile gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, metabolom gerek belli yapı taşlarından oluşmadığı gerekse metabolomu oluşturan moleküllerin kimyasal yapısı birbirinden son derece farklı olduğu için örneğin tek bir analitik yöntem veya tek bir cihazla metabolomik analizi mümkün değildir. Bunun yanında metabolitlerin kısmi derişimlerinde büyük farklılıklar ($6 \log$) bulunması metabolit analizini hem nitel hemde nicel olarak daha karmaşık hale getirir. Metabolom analizi için genellikle farklı analiz modlarında çalıştırılan birden fazla cihaz gereklidir ve bu nedenle metabolomik analizler diğer omiklere göre çok daha karmaşıktır. Ayrıca metabolomik analizlerin nitel ya da nicel olmasına göre kullanılan yöntem ve cihazlar farklılık gösterir. Teorik olarak UV spektroskopisi ve Raman spektroskopisi gibi spektral analiz yöntemleri metabolit analizlerinde kullanılabilir olsa da bu yöntemlerin ayırıcılığı, tanımlama gücü ve nicel ölçüm kapasiteleri sınırlıdır. Metabolomikte günümüzde en yaygın olarak kullanılan platformlar, farklı ayırma teknikleriyle eşlenik olarak kullanılan NMR spektroskopisi ve kütle spektrometresidir (MS). Her iki yönteminde hem avantajları hem de dezavantajları vardır, ancak her ikisi de uygun şartlarda yüksek kalite ve geniş metabolom okuma derinliği sağlar. Çalışma ilkeleri ve tam olarak anlaşılması için gerekli fizik bilgisi oldukça ileri olmasına karşın çok basit bir şekilde anlatılacak olursa belli atom çekirdekleri küçük birer mıknatıs gibi davranma özelliğine sahiptir ve bu çekirdekler yüksek bir manyetik alan içerisine konulduğunda biri yukarı ve diğeri

Tablo 4. Kronik Hastalıklarda Hedefsiz Metabolomik İle Keşfedilen Belirteç Adayları

Hastalık/durum	Önerilen biyobelirteçler
Anormal savda	Glikosenodeoksikolik asit ve bilirubin
Akut koroner yetmezlik	Sitrik asit, 4-hidroksiprolin, aspartik asit, fruktoz, laktat, üre, glikoz ve valin
Akut böbrek hasarı	Dimetilarginin, piroglutamat, lizoPC , açılarnitin, fenilalanin, kreatinin, homosistein, metionin, arginin, triptofan
İleri karaciğer fibrozu	kolin, glikoz, glutamin, sistein, histidin, sitrat, asetoasetat
Alzheimer hastalığı	Lizofosfokolin, triptofan, fitosfingosin, dihidrosfingosin, heksadekosfinganin Desmosterol Araşidonik asit, N, N-dimetilglisin, timin, glutamin, glutamik asit ve sitidin Alanin ve taurin Sfinganin-1-fosfat, ornitin, fenilatik asit, inozin, 3-dehidrokarnitin, hipoksantin
Astım	Adenozin, alanin, karnitin, format, fumarat, glikoz, histidin, taurin, treonin, süksinat Metiyonin, glutamin, histidin
Ateroskleroz	Palmitat, stearat ve 1-monolinoleolgliserol
Otizm	Metilguanidin, indoksil sülfat, glukuronik asit, desaminotirozin, guanidiosüksinat asit Dekanoilkarnitin, pregnanetriol, ürik asit, 9,10 epoksioktadekanoik asit, dokosahekzanoik asit, dokosapentanoik asit
Mesane kanseri	Süksinat, piruvat, oksoglutarat, karnitin ve açılarnitinler, fosfoenolpiruvat
Meme kanseri	Palmitik asit, stearik asit, linoleik asit, FFA
Kardiyovasküler hastalıklar	Orta ve uzun zincirli açılarnitinler, alanin
Kronik kalp yetmezliği	Laktat, kreatin, glikoz, glikoprotein, lipid türleri ve amino asitler
Kronik Hepatit B	Lizofosfatidilkolin ve glikochenodeoksikolik asit
Kronik böbrek hastalığı	İdrar nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin
Kronik yaygın kas-iskelet ağrısı	Epiandrosteron sülfat, dehidroizoandrosteron sülfat, androsteron sülfat, 3-(4-hidroksifenil) asetat, nonadekanoat
Kolorektal kanser ileri evre	Yağ asitleri, organik asitler, şekerler, steroid, yağ asidi esteri ve pirimidin nükleosit..
Kolorektal kanser	Hidroksillenmiş, çoklu doymamış çok uzun zincirli yağ asitleri Serbest yağ asitleri ve esterleşmiş yağ asitleri Panel dahil: oktadekanoik asit, laktik asit, treonik asit, 3-hidroksi butanoik asit, serin, sistein
Koroner arter hastalığı	Dikarboksilaçılarnitinler, orta zincirli açılarnitinler, yağ asitleri
Koroner arter hastalığı	Doymuş yağ asitleri, trans yağ asidi, n3 ve n6 çoklu doymamış yağ asitleri
Koroner arter hastalığı *	LizoPC (18:1), LizoPC (18:2), MG (18:2), SM (28:1)
Diyabet	3-indoksil sülfat, gliserofosfolipidler, serbest yağ asitleri ve safra asitleri

(devamı)

Tablo 3. Metagenom analizlerinde kullanılan analiz ve görselleştirme yöntemleri

Metot	Çıktı	Görselleştirme tekniği	Referans
Alfa çeşitliliği	Örnek içi çeşitlilik	Kutu grafiği, Nadirlik eğrisi, Venn diyagramı	Edwards ve ark., 2015 Beckers ve ark., 2017 Ren ve ark., 2019
Beta çeşitliliği	Örnekler arası çeşitlilik	PCoA grafikleri, Dendrogram (hiyerarşik kümeleme)	Zhang ve ark., 2018 Chen ve ark., 2019
Taksonomik sınıflandırma	Türlerin göreceli miktarları	Yığılmış çubuk grafiği, akış ve Sankey diyagramı	Jin ve ark., 2017 Smits ve ark., 2017
Korelasyon analizi	Türler ve meta veri arasındaki korelasyon bilgisi	Dağılım grafiği, korelasyon matrisi, ısı haritası	Metcalf ve ark., 2016 Zhang ve ark., 2018 Subramanian ve ark., 2014
Ağ analizleri	Türlerin korelasyonlarının gözlenmesi	Renklendirilmiş ağ grafikleri	Jiao ve ark., 2016 Wang ve ark., 2018
Makine öğrenmesi	Sayısal meta veri tahmini için sınıflandırma grupları veya regresyon analizi	Isı haritası, Bar çizelgesi	Wilck ve ark., 2017 Zhang ve ark., 2019 Subramanian ve ark., 2014
Ağaç haritası	Filogenetik ağaç veya taksonomik hiyerarşi	Filogenetik ağaç, kladogram, dairesel ağaç haritası	Levy ve ark., 2018 Segata ve ark., 2011 Carrión ve ark., 2019
Farklılıkların karşılaştırılması	Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren biyobelirteçler	Volkan grafiği, Manhattan grafiği, Çubuk grafiği	Shi ve ark., 2019 Zgadaj ve ark., 2016 Parks ve ark., 2014

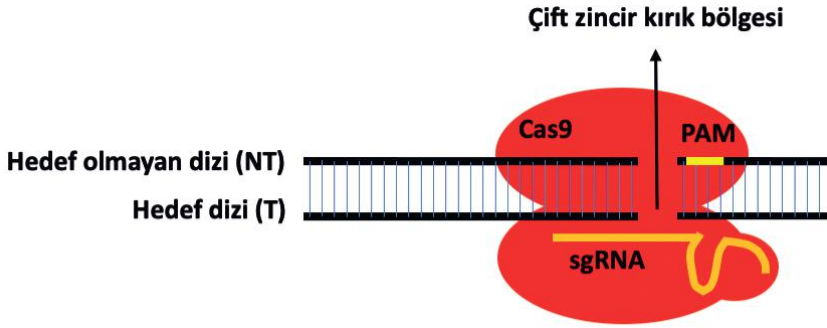
KAYNAKLAR

- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473:174–180.
- Beckers B, Op De Beeck M, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome*. 2017; 5:25.
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol*. 2019; 37: 852–857.
- Bork P, Costea PI, Sunagawa S, Dore J, Ehrlich SD, Levenez F, Pelletier E, Alberti A, Bertrand L, Guarner F, Manichanh C, Santiago A, Zhao L, Shen J, Zhang C, Versalovic J, Luna RA, Petrosino J, Yang H, Li S, Wang J, Allen-Vercoe E, Gloor G, Singh B and IHMS Consortium. IHMS_SOP 13 V1: Assessment

Tablo 2. Cas9 Ortologları ve Varyantları

Cas9 ortolog ve varyantları	PAM dizisi	Hedef uzunluğu	Zebra balığında kullanım	Kaynakça
Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9)	NGG	19-20	Evet	Jinek ve ark., 2012
SpCas9 VQR varyant	NGAN, NGNG	19-20	Evet	Kleinstiver ve ark., 2015
SpCas9 EQR varyant	NGAG	19-20	Evet	Kleinstiver ve ark., 2015
SpCas9 VRER varyant	NGCG	20	Evet	Kleinstiver ve ark., 2015
SpCas9 D1135E varyant	NAG	20	Hayır	Kleinstiver ve ark., 2015
SpCas9 QQR1 varyant	NAAG	20	Hayır	Anders ve ark., 2016
SpCas9 TLIKDIV varyant	NG, NNG, CAA, GAT, GAA	20	Hayır	Hu ve ark., 2018
SpCas9 NG varyant	NGA, NGT, NG	20	Hayır	Nishimasu ve ark., 2018
Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9)	NNGRRT	20-24	Hayır	Ran ve ark., 2015
SaCas9 KKH varyant	NNNRRT	21	Evet	Kleinstiver ve ark., 2015
Streptococcus thermophilus 1 Cas9 (St1Cas9)	NNAGAAW (W=A/T)	20	Hayır	Muller ve ark., 2016
Streptococcus thermophilus 3 Cas9 (St3Cas9)	NGGNG	20	Hayır	Glemzaite ve ark., 2015
Neisseria meningitidis Cas9 (NmCas9)	NNNNGMTT (M=A/C)	23-24	Hayır	Hou ve ark., 2013
Francisella novicida Cas9	NGG	22	Hayır	Hirano ve ark., 2016
Acidaminococcus Cas12a (AsCas12a/Cpf1)	TTTV (V=A/C)	23-24	Evet	Zetsche ve ark., 2015
Lachnospiraceae Cas12a (Lb Cas12a/Cpf1)	TTTV (V=A/C)	23-24	Evet	Zetsche ve ark., 2015
Francisella Cas12a (FnCas12a/Cpf1)	TTN	23-24	Evet	Zetsche ve ark., 2015
Moraxella Cas12a (MbCas12a/Cpf1)	TTN	23-24	Hayır	Gao ve ark., 2017

oryantasyonunda ve sol homoloji kolu daha uzun olan asimetric ssODN olduğu gösterilmiştir (Boel ve ark., 2018). Ancak NT oryantasyonunda ve simetrik olan ssODN de aynı çalışmada etkili bulunmuştur. Moreno-Mateos ve ark. (2017) ise zebra balığında SpCas9 kullandıkları grupta T ya da NT oryantasyonunun *knock-in* etkinliğini değiştirmediği ancak Cpf1 kullanıldığında T oryantasyonuna sahip ssODN ile etkinliğin arttığını bildirmiştir. Yani kullanılan nükleaz tipi ve genomik lokus burada belirleyici olabilmektedir. şu ana kadar yapılan çalışmalarda ssODN oryantasyonu, uzunluğu ve özelliği konusunda tutarlı sonuçlar mevcut değildir ve kullanılan deney sistemine göre de etkinlikler farklılıklar göstermektedir. Ancak genel eğilim nokta mutasyonu gibi kısa değişiklikler için uzun olmayan ssODN kullanmak yönündedir. Kalıp DNA tasarımı da bir değer önemli nokta kalıp DNA 'da yapılacak değişikliklerdir. Bu değişiklikler hem HDR etkinliği açısından hem *knock-in* gerçekteşmiş embriyoların tespiti açısından önemlidir. Kalıp DNA hedef nokta mutasyonu içermenin dışında sgRNA'nın tamir edilmiş bölgeye tekrar bağlanmasını engelleyecek nükleotit değişikliklerini mümkünse PAM dizisinde ya da PAM dizisine yakın çekirdek bölgede içermelidir (Auer ve Del Bene, 2014; Armstrong ve ark., 2016). Ayrıca bu değişiklikler sessiz değişiklikler olmalı ve amino asit dizisinde değişiklik yaratmamalıdır. Mümkünse bu değişiklikler enzim kesim bölgesi oluşturmamalı ya da farklı tespit seçeneklerine imkan verecek şekilde olmalıdır.

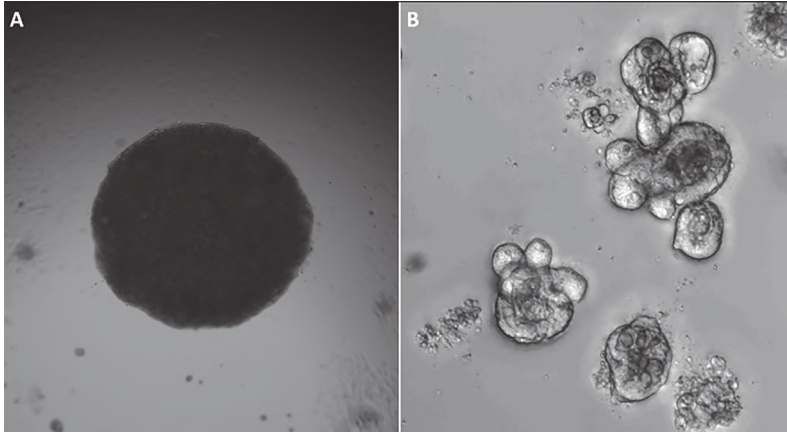


şekil 3. HDR-aracılı genom düzenlemede hedef ve hedef olmayan DNA dizisi (Richardson ve ark, 2016)

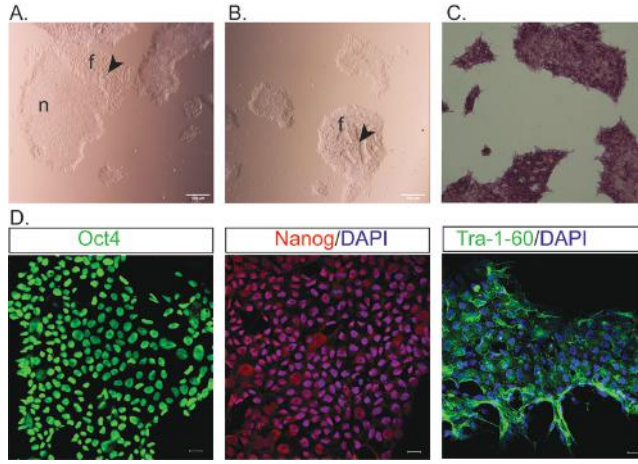
Zebra balıklarında genom düzenleme aracı ve kalıp DNA kullanılarak gerçekteştirilen ilk kısa insersiyon çalışmasında TALEN aracı eşliğinde 20 nükleotit sol ve 18 nükleotit sağ homoloji koluna sahip ssODN ile iki farklı lokusta insersiyonun hatasız gerçekteştiiği gösterilmiştir (Bedell ve ark., 2012). Bu çalışmada farklı homoloji kolu uzunlukları denenmiş ve homoloji kollarının uzunluğunun artmasının HDR etkinliğini azalttiiğı ifade edilmiştir. CRISPR/Cas9 ve kalıp DNA kullanarak yapılan kısa insersiyon çalışmalarından ilki ise Chang ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Chang ve ark., 2013). Bedell ve ark. (2012), TALEN ile yaptığı çalışmanın benzerini CRISPR/Cas9 kullanarak gerçekteştirmişlerdir. Her iki çalışmada da bildirilen olumsuzluk kısa insersiyonun hatasız gerçekteşme oranının düşük olmasıdır. Hedeflenen değişimin 3' ve 5' uçlarında beklenmedik insersiyon ve/veya delesyonlar sıklıkla izlenmektedir. Bu durumun kullanılan genom düzenleme aracından bağımsız olarak gerçekteştiiği belirtilmiştir (Chang ve ark., 2013). Sonraki bir çalışmada HDR-aracılı bu tamir mekanizmasının hata oranının %50'lere ulaştiiğını sistematik bir şekilde ortaya konmuştur (Boel ve ark., 2018). Bu hatalar arasında indel

Tablo 2. Sferoid ile Organoid Yapılarının Karşılaştırması (Gunti ve ark, 2021; Sakalem ve ark, 2021)

Özellikler	Sferoid	Organoid
Hücre kaynağı	Hücre hatları, çoklu hücre karışımları, primer hücreler, tümör doku ve hücreleri	Embriyonik/yetişkin kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler, tümör hücreleri
Kültür koşulları	Ekstraselüler matris bileşenleri ve büyüme faktörleri yokluğunda kültür edilebilir Uzun süre kültür edilmeye elverişli değil	Ekstraselüler matris bileşenleri ve büyüme faktör gereksinimi Uzun süre kültür edilebilir
3-boyutlu organizasyon	Hücre-hücre agregasyonu ile kendi kendine toplanma, bazı modellerde kendi kendine organizasyon	Hücrelerin farklılaşması ile kendi kendine toplanma ve organizasyon
Polarite	Polarite gösterebilir/göstermeyebilir	Polarite gösterir
Organ fizyolojisi	Çoğalan heterojen hücre katmanları, hareketsiz ve nekrotik hücreler, geçici 3-boyutlu organizasyon	Organ yapısını ve işlevini yansıtan farklı hücre soyları
Maliyet	Daha uygun	Pahalı/özellikli malzeme ihtiyacı
Genetik manipülasyon	Yapılabilir	Yapılabilir
Tekrarlanabilirlik	Yüksek	Ortalama
Biyobankalama	Mevcut değil	Yapılabilir

**Şekil 1.** Sferoid (A) ve organoid (B) yapılarının mikroskopik görüntüleri

Organoidler, embriyonik kök hücrelerden, iPSC ve yetişkin kök hücrelerden kültürlenebilir. Bu hücre kaynaklarından gelen organoidler, gelişimsel süreçler yoluyla yapılar oluşturur ve bu oluşum için bir bazal lamina kaynağı olarak ekstraselüler matrise ihtiyaç duyar. Embriyonik kök hücrelerden elde edilen organoidler önce çoğaltılır ve ardından çok basamaklı bir protokolün izlenmesi ile farklılaştırılır ve sonunda tamamen farklılaşmış hücreleri barındıran bir yapıya ulaşır. Doku tipine bağlı olarak farklılaşmayı takiben karmaşık yapının oluşumu farklı



Şekil 2. İPKH'lerinin morfolojik ve pluripotent özelliklerinin karakterizasyonu. A-B. Tipik İPKH kolonisi "n" ve etrafında farklılaşmamış düzensiz ve değişken görünümlü kendiliğinden farklılaşmış hücreler ("f" ve siyah ok). C. Alkalın fosfataz boyaması yapılmış İPKH kolonisi. D. İmmünohistokimya boyaması yoluyla pluripotensi belirteçleri olan OCT4, NANOG ve TRA-1-60 İPKH'lerinin pluripotent özelliğini onaylamıştır.

Genom Düzenleme Metotları

Genom düzenleme, bir hücrede sekans spesifik, genomik sekans manipülasyonları yapabilmeye denmektedir. DNA'da bir modifikasyon yapabilmek için DNA'yı keserek tek zincir ya da çift zincir kırığı oluşturulur. Yeni sekans, önceden dizayn edilmiş bir kalıba göre kesilen DNA sekansının tamiri esnasında, hücre tarafından eklenmektedir. Bu şekilde istenilen genlerin veya genomik bölgelerin eklenmesi ve çıkarılması mümkün olur. Temel olarak 4 teknik genom düzenleme için kullanılmaktadır. Bunlar, Çinko Parmak Nükleaz (Zinc Finger Nuclease; ZFN), Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz (Transcription Activator-Like Effector Nucleases; TALEN), Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri sistemi (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-Associated Nuclease-9; CRISPR/Cas9), ve Primer düzenlemedir. Genom düzenleme metotlarının İPKH hücrelerinin istediğimiz hücre tipine farklılaşma potansiyeli ile kombine edilmesi sonucu hastalıkların genetik ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında ve buna bağlı olarak yeni terapötik yaklaşımların denenmesi için önemli bir adım olmuştur.

Günümüzde uygulanabilirliğinin kolay ve etkili olması nedeni ile CRISPR/Cas9 sistemi aktif olarak pek çok laboratuvar ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. CRISPR, bakteriyofajlara karşı prokaryotik bir bağışıklık sistemi olup, 2 parçadan oluşmaktadır. Bunlar öncü RNA (Guide RNA/gRNA) ve DNA kesimini yapan Cas9 enzimidir. gRNA'nın DNA'da genom düzenleme yapılacak bölgeye bağlanıp Cas9 enziminin DNA dizisinde kesim yapmasını sağlar. Cas9, CRISPR'daki en önemli proteindir, bir DNA makası görevi yapar ve tamir mekanizmalarını aktive eder. DNA üzerinde oluşturulan kırık daha sonra homolog olmayan uç yerleştirme (NHEJ) ve homolog yönlendirme tamiri (HDR) mekanizmaları ile istenen genin susturulması veya istenen mutasyonun oluşturulmasını sağlar. CRISPR/Cas9 sisteminin İPKH'lerde kullanılması ile hücresel mekanizmaları, kalıtsal hastalıkların patofizyolojisini, genetik ve moleküler mekanizmaları

miaları ve kurumları geleceğe yönelik planlamalar yapmaya başladılar ve raporlar yayınladılar. Bunlar arasında ABD’de The National Academies, National Research Council tarafından hazırlanan “Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and New Taxonomy of Disease” özel bir önem taşımaktadır (National Research Council Committee, 2011). Bu raporda özetle, genom projeleri ile birlikte hayat bulan –omics (genomics, proteomics, metabolomics gibi) teknolojilerinin insan sağlığına yönlendirilmesi ve “precision medicine” olarak adlandırılan yeni bir girişimin başlatılmasının gerekçesi sunulmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Temel biyolojik süreçlerle ilgili “bilgi ağı’nın” geliştirilerek “bilgi ortak alanlarının” kurulması ve yeni bir hastalık sınıflaması üzerinden kesin tanı, hedefe yönelik tedavi ve gelişmiş sağlık çıktıların alınması sistemi. “Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and New Taxonomy of Disease” belgesinden uyarlanmıştır.

21. yüzyılın ikinci dekatında tüm tıp alanının moleküler biyoloji ve genetik tabanlı yeni bir tanımlaması, tanı, önlem ve tedaviye yönelik yapılandırılması gerekçelendirilmiştir. Bu kapsamda 2010 yılında Washington, Yale, Baylor ve Johns Hopkins’in bir araya gelmesi ile Amerika Birleşik Devletleri’nde üç adet “Mendel Genom Merkezi” kurulmuştur (<http://www.mendelian.org/about-mendelian-conditions>). Bu merkezlerde yürütülen genom dizilemeleri ile 2011-2014 döneminde yaklaşık 500 adet Mendel hastalığının genleri bulunmuştur. Aynı dönemde, tüm dünyada bulunan tek gen hastalığı genlerinin sayısı ise yaklaşık 1000 adet olarak gerçekleşmiştir. Eş zamanlı olarak Avrupa Birliği’nin organizasyonu ile Ulusal ve Uluslararası kurumların bir araya geldikleri yapı olarak IRDIRC kurulmuştur. Araştırma destek kurumları dahil olmak üzere devlet ve özel sektör kuruluşları bir araya gelerek hastalık genlerinin bulunmasını hedefleyen genom projelerinin desteklenmesi çalışmalarını başlatmışlardır. Bu araştırmalar kapsamında Mendel kalıtımı gösteren hastalıkların genomik nedenleri konusunda çok değerli bilgiler elde edilmiştir. 1986 yılında Duchenne Kas Distrofisi hastalığının geninin bulunmasından (Hoffman, 2020) sonra başlayan ve günümüzde belki de altın dönemini yaşayan genom çağında geleneksel ve yeni nesil dizileme ile bulunan hastalıklarla ilişkili tek genlerin sayısı binler ile ifade edilmeye başlanmıştır. 2010 yılında yeni nesil dizilemenin Moore yasalarının öngörüsünü aşan bir hızla ucuzlaması ve gen araştırmalarında bu teknolojinin yaygınlaşması ile geleneksel yöntemlerin kullanımı hızla azalmaya başlamıştır. Bu süreçte özetle, insan veritabanındaki Mendel kalıtımına göre karakterize edilen 20.396 protein kodlayan genin %23,4’ünün mutasyonu bir fenotiple ilişkilendirilmiştir. Bu genlerin %24’ü (1,012 gen) birden fazla fenotipe neden olmaktadır (genetik heterojenite) ve toplamda 6.035 fenotiple ilişkilendirilmiş. OMIM fenotiplerinin %35’inin moleküler temelleri

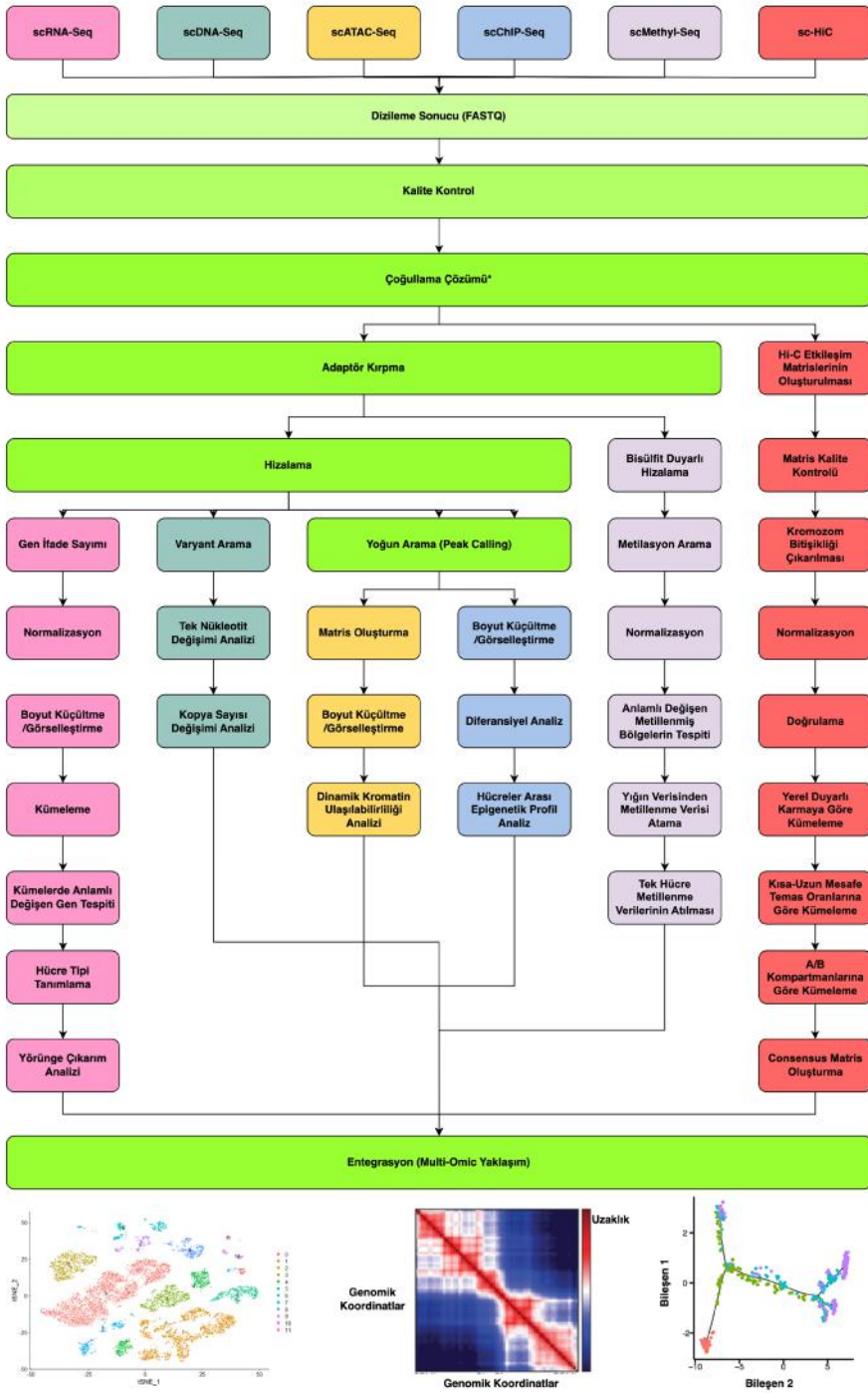
Pulmoner alveolar miktolitiazis	265100	<i>SLC34A2</i>	Corut vd., 2006
Ayrık el/ayak malformasyonu 6	225300	<i>WNT10B</i>	Ugur ve Tolun, 2008
Oksipital kortikal gelişim bozukluğu	614115	<i>LAMC3</i>	Barak vd., 2011
Gecikmiş uyku fazı bozukluğu	614163	<i>CRY1</i>	Patke vd., 2017
Dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite	NA	<i>CRY1</i>	Onat vd., 2020
Parkinson hastalığı	610297	<i>HTRA2</i>	Unal vd., 2014
Lizensefali 4	614019	<i>NDE1</i>	Bakircioglu vd., 2011
Lizensefali 5	615191	<i>LAMB1</i>	Caglayan vd., 2013
Lizensefali 6, mikrosefali ile	616212	<i>KATNB1</i>	Caglayan vd., 2014
Entelektüel yetersizlik, OR	NA	<i>METAP1</i>	Caglayan vd., 2021
Cohen benzeri sendrom	NA	<i>BICD2</i>	Caglayan vd., 2022

Türkiye Genom Projesi Yol Haritası

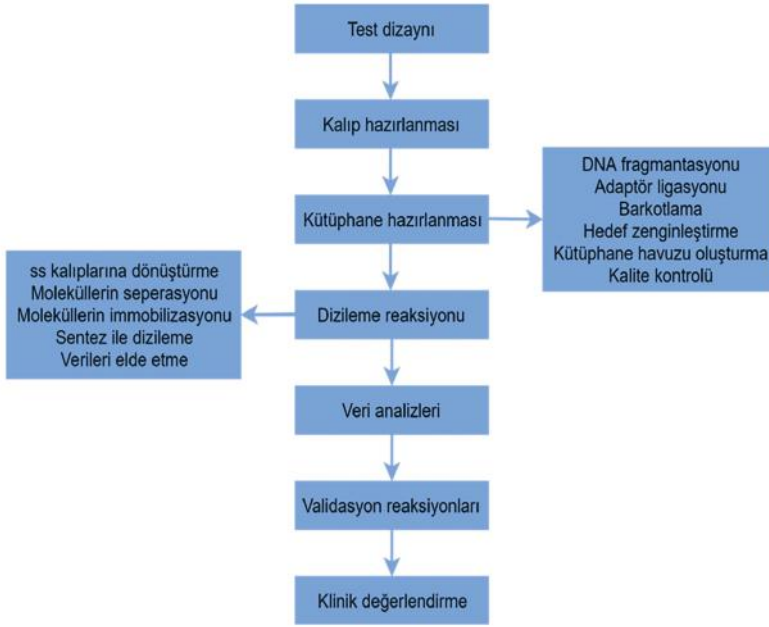
Ülkemiz bir genom projesini hayata geçirirken dünyaya önderlik yapacak bir konumdadır. Bir Akdeniz Genom Projesi kapsamında ele alınacak yaklaşımla geniş bir coğrafyaya bilimsel önderlik yapabiliriz. Bunun için kapsamlı bir planlama hemen başlatılmalıdır. Türkiye Genom Projesi kohortunun oluşturulması, ekonomik fizibilitesi yüksek dizileme kapasitesinin geliştirilmesi, klinik işbirliği merkezlerinin seçimi, Türkiye’de genom dizileme ve analizini içeren gelecekte yapılabilecek projeler için gerekli eğitime ve tecrübeye sahip genç araştırmacıların yetiştirilmesi ve bu projeler için gerekli altyapıların sağlanması için merkezlerin kurulması öncelikli olarak ele alınması gereken konulardır. Türkiye Genom Projesi için dünyadaki örneklerinden yola çıkarak önerdiğimiz yol haritası şu şekildedir:

1. Türkiye Genom Projesi Devlet himayesinde olmalıdır. Sağlık Bakanlığı TÜSEB’in yürütücülüğünde başlatılıp ilgili Üniversiteler ve kurumların katılımı sağlanabilir. Örneğin, New York Genome Center 12 kurumun işbirliği ile kurulmuştur: 1. Albert Einstein College of Medicine, 2. Cold Spring Harbor Laboratory, 3. Columbia University, 4. Mount Sinai School of Medicine, 5. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 6. New York-Presbyterian, 7. NYU School of Medicine, 8. Stony Brook University, 9. North Shore LIJ, 10. The Jackson Laboratory, 11. The Rockefeller University, 12. Weill Cornell Medicine (<http://www.nygenome.org>).
2. Türkiye Genom Projesi sağlık alanında gerçekleşecek büyük gelişmelerin odağını oluşturacaktır. Yalnız sağlık değil tarımdan hayvancılığa, ilaç endüstrisinden arkeolojiye uzanan geniş bir yelpazede önemli bir tetikleyici etkisi olması, bir biyoekonominin doğmasında lokomotif rol üstlenmesi beklenmelidir. Ancak tüm bu alanlarda en üst düzeyde başarının gerçekleşmesi için bu projenin Devletimiz düzeyindeki odak noktası “etki değeri yüksek temel bilimsel buluşların önceliklendirilmesi” olmalıdır. Bilimsel buluşların en üst düzeyde gerçekleştiği toplumlar aynı zamanda küresel düzeyde en yüksek rekabet gücüne ulaşmakta, katma değeri yüksek teknolojik çıktılarla refahın yükselmesi sağlanmaktadır.

Türkiye Genom Projesi temel başarı ölçütü bilimsel mükemmeliyettir. Bilimsel iletişimin en üst düzeyde yer alan platformlarında yapılacak yayınlar marifetiyle insanlığın bilgi birikimine sunulacak katkılar teknolojik uygulamaların, yaratıcılık kültürünün, ürüne yönelik açılımların rekabetçi bir ortamda doğal olarak ortaya çıkmasının temelinde yer almaktadır.



Şekil 2. Tek Hücre Dizileme Tekniklerinin Genelleştirilmiş Veri Analizi Adımları



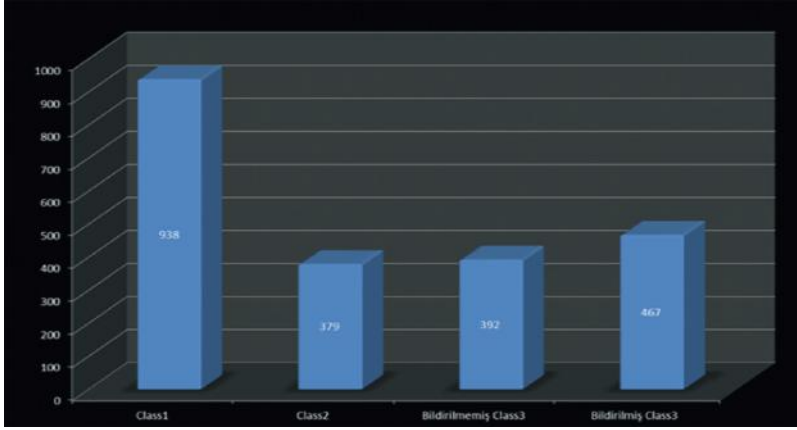
Şekil 3. YND genel akış özeti (Ilyas,2017)

Kütüphane hazırlanması, her platformda farklılık gösteren nükleik asit kalıplarının/şablonlarının dizileme için hazırlanmasını ifade eder ve kısa okuma teknolojilerinde (İkinci nesil dizileme metodlarında) 3 ana aşamadan oluşur: 1) teknoloji spesifik şablon uzunluklarında DNA fragmentasyonu 2) fragmanların katı yüzeylere (mikroçipler, mikro boncuklar veya nanokuyucuk gibi) bağlanmasını kolaylaştırmak için adaptörlerin ligasyonu 3) dizileyicinin her bir kalıbı/şablonu saptaması için kalıpların/şablonların çoğaltılarak yeterli kopyasının elde edilmesi (Knierim,2011; Kim,2011; Garcia-Garcia,2016). Adaptörler DNA fragmanlarının yüzeye ve tanıma bölgelerine bağlanıp dizilemeyi başlatması için moleküler barkodları (hasta örneklerinden havuz yapılmasını sağlar), universal PZR primerlerini ve hibridizasyon dizilerini içerebilir.

Kalıp hazırlama, bir nükleik asit kütüphanesini [genomik DNA (gDNA) veya cDNA] oluşturmayı ve çoğaltmayı içerir. Başlangıçtaki nükleik asit; genomik DNA, standart veya long-race PZR ampliconları veya cDNA olabilir (Voelkerding,2010). Dizileme kütüphaneleri, DNA örneğinin ~ 500 bç veya daha küçük parçalar halinde rastgele kesilmesi ve universal adaptör dizilerinin (bilinen bir dizinin sentetik oligonükleotitleri) DNA parçalarının uçlarına bağlanmasıyla oluşturulur. Bu aşamada DNA fragmanlarına uygun linker/bağlayıcılar ve barkodlar eklenir. Eşsiz nükleotid etiketleri (6-8 nt) olan DNA barkodları, dizileme reaksiyonu için numunelerin tek bir akış hücrelerinde bir araya toplanmasına izin verir (Kamps,2017). Kütüphane oluşturulduktan sonra, dizileme işlemine hazır olması için adaptör bağlı fragmanlar klonal olarak çoğaltılır (Shendure,2008). Platforma bağlı olarak, amplifikasyon yöntemi değişiklik gösterebilir.

Kalıp hazırlama sonrasında farklı dizileme teknoloji platformları ile dijital olarak diziler elde edilir. Dizileme tamamlandıktan sonra, ham dizi verileri birkaç biyoinformatik analiz seviyesin-

%39.4) VUS (class3) niteliğinde değişim olduğu, bunların da yaklaşık yarısının (392 tanesi, % 45.6) rapor edilmemiş VUS oldukları gözlenmiştir (Şekil 6) (Unsal,2017).



Şekil 6. 557 adet tanısı konulmamış hastaya ait WES analiz sonucunda tespit edilen varyasyonlara ait dağılım

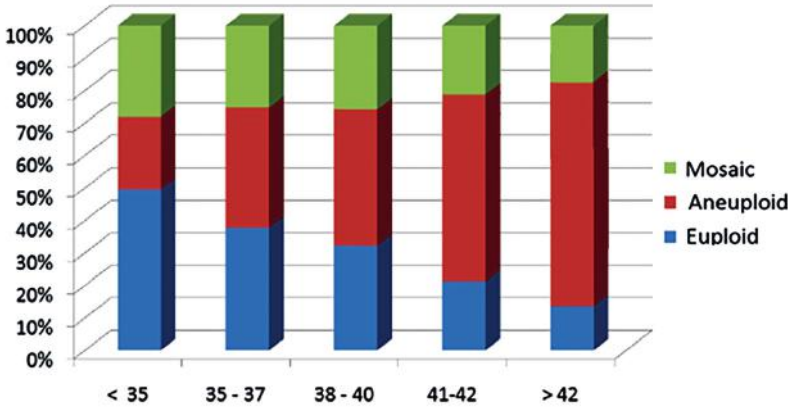
Tüm bu veriler göz önüne alındığında Türkiye’ye spesifik genişletilmiş bir tarama paneli için standart kriterlere ilave olarak aşağıdaki bazı kriterler de dikkate alınmalıdır:

- Türkiye’ye spesifik hastalık ve genler dokümanite edilerek panele entegre edilmeli
- Bu genlere ait varyasyonların klasifikasyon ve sıklıkları dokümanite edilmeli
- Bu varyantlar tarama kitlerine ve kullanılan analiz programlarına entegre edilmeli
- Bu varyantların “hedef bölge kapsamı” içinde yer aldıklarından emin olunması gerekmektedir

Tarama testlerini takiben genetik hastalık riski taşıyan çiftler için bu riski bertaraf edebilmelelerinin en etkin yolu: prenatal ve preimplantasyon genetik tanı yapılmasıdır. Ancak Class 3 nitelikte olan varyasyonlar bakımından gerek prenatal tanı uygulamalarında ve gerekse PGT-M uygulamalarında bazı zorluklar ve özellikler bulunmaktadır. Patojenik ve muhtemel patojenik olan varyasyonlar için prenatal veya preimplantasyon tanı yapılması herhangi bir risk oluşturmazken, VUS niteliğinde olan varyasyonlar için önemli riskler söz konusudur. Özellikle, aile anamnezinde anormal bebek veya fenotip öyküsünün bulunduğu durumlarda söz konusu fenotipten sorumlu olarak bir VUS tespit edilmiş ise bu riskler karşımıza çıkar. Böyle bir durumda en önemli risk: tespit edilmiş olan VUS fenotipten sorumlu gerçek varyasyon değilse yani halen arkada fenotipe yol açan bilmediğimiz bir varyasyon varsa, biz yanlış varyasyon için prenatal veya preimplantasyon tanı yapıyoruz anlamına gelir ki bu durum son derece tehlikeli sonuçlar doğurabilir. Bu durum için önerilen sadece kuvvetli VUS veya klinikle uyumlu VUS niteliğindeki varyasyonlar için prenatal tanı veya PGT-M uygulanmasıdır. VUS’ların tamamına prenatal veya PGT-M uygulanmaz demek doğru bir yaklaşım olmayacaktır, bunun iki önemli sebebi vardır;

1. Class-3 varyantlar fenotipe neden olabilir
2. Patojen (Class-1) varyasyon mevcutken bile Class-3 varyasyon fenotip üzerine etki ediyor olabilir ve bu nedenle ihmal edilemez.

Erken embriyonik dönemde bu kadar yüksek oranda gösterilmiş olan kromozomal mozaiklikler tabiidir ki göz ardı edilemez ve bu nedenle yakından monitörize edilmesi gerekir. Zira mozaik yapıda sitogenetik anormallikler klinik sonuçlara yol açabilmektedir. Diğer yandan mozaikizim maternal yaş ile korelasyon göstermez, yani tüm yaş grubu kadınların ortak problemidir. Mozaiklikler “postzigotik” düzensizliklerdir ve mitotik bölünmenin ürünüdürler. Bu nedenle hızlı bölünen embriyolarda daha sık rastlanmaktadır, yani daha hızlı ve daha kaliteli embriyolarda mozaiklik ihtimali yavaş gelişen embriyolara göre daha yüksek olarak gösterilmiştir (Munne,2017; Munne,2020) (**Şekil 10**). Ayrıca çalışmalar göstermiştir ki; bazı mozaik embriyoların transfer edilmesi sonrasında sağlıklı bebek doğumu gerçekleşmektedir. Bu sebeple, bazı bilimsel meslek örgütleri bu konuda kılavuzlar yayınlayarak PGT-A, uygulamasını takiben eğer hiç normal embriyo yoksa, risk getirmeyecek nitelikteki bazı mozaik anöploid embriyoların transfer için kullanılabileceğini deklare etmişlerdir ve bu konuda kılavuzlar yayınlamışlardır (Cram,2019).



Şekil 10. Mozaikizim maternal yaş ile korelasyon göstermez ve tüm yaş grubu kadınlara ait embriyolarda benzer sıklık oranına sahiptir.

Bu kılavuzlardan en çok kabul görenler arasında PGDIS 2016 deklarasyonu, COGEN 2016 kılavuzu ve yine PGDIS 2019 deklarasyonu sayılabilir. Tüm bu kılavuzlar bazı minör farklılıklar içermekle birlikte benzer kriterler yayınlamışlardır. Buna göre büyük kromozomlara ait mozaiklikler, küçük kromozomal mozaikliklerden daha az risk getirmektedir. Yine total delesyon ve duplikasyonlar küçük ve segmental delesyonlara göre daha az risk taşırlar. Cinsiyet kromozomlarına ait mozaiklikler (özellikle mozaik Turner S) ile 21. kromozom gibi küçük kromozomların mozaikliklerine sahip embriyoların transfer edilmesi daha yüksek risk taşıdığı için tercih edilmezler. Yine 14 ve 15. kromozomlara ait mozaiklikler uniparental dizomi ve epigenetik riskler nedeniyle transfer edilmezler. Bu meslek kuruluşlarının kılavuzlarının yanı sıra Francisca Romana tarafından yapılmış olan kromozomlara göre mozaikliğin risk skorlaması oldukça dikkat çekicidir (Grati,2019). Bu çalışmada; abortus riski, viabilite potansiyeli, uniparental dizomi riski gibi kriterler bakımından her bir kromozom için ayrı ayrı kompozit risk skoru hesaplanmıştır ve bu riskler bir tabloda bir araya getirilerek sunulmuştur. Bu tablo klinik kullanımda klinisyen için oldukça pratik bir başvuru kaynağı niteliğindedir (**Tablo 8**).

3. ACMG nin varyant kriterlerinden bağımsız olarak otozomal resesif ve X e bağlı resesif hastalıklar için (sadece dişi fetüsler için) taşıyıcı olması durumunda rapor edilmemesi önerilir iken anne-babanın taşıyıcılık durumlarının bildirilmesini öneriliyor. Tabi bu durumda sadece patolojik (P) veya Muhtemel Patojenik (LP) varyantların rapor edilmesinin uygun olacağı belirtiliyor.

Tablo 1. Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji'nin şans eseri bulunan varyantlar ile ilgili raporlanması/dikkat edilmesi önerilen genler ve ilişkili hastalıklar

Hastalık Adı	OMIM	Gen Adı	Kalıtım Modeli	Raporlanacak
Kanser Fenotipine Neden Olan Genler				
Ailesel medüller tiroid kanseri	155240	<i>RET^b</i>	AD	Tüm P ve LP
Ailesel adonömatöz polipozis	175100	<i>APC</i>	AD	Tüm P ve LP
Ailesel Meme/over kanseri	604370 612555 114480	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>PALB2</i>	AD	Tüm P ve LP
Ailesel paraganlioma-feokromasitoma sendromu	168000 601650 605373 115310 171300 171300	<i>SDHD</i> <i>SDHAF2</i> <i>SDHC</i> <i>SDHB</i> <i>MAX</i> <i>TMEM127</i>	AD	Tüm P ve LP
Juvenile polypozis sendromu	174900 175050	<i>BMPR1A</i> <i>SMAD4^c</i>	AD	Tüm P ve LP
Li-Fraumeni sendromu	151623	<i>TP53</i>	AD	Tüm P ve LP
Lynch sendromu	609310 120435 614350 614337	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i>	AD	Tüm P ve LP
Multiple endokrin neoplasia tip 1	131100	<i>MEN1</i>	AD	Tüm P ve LP
<i>MUTYH</i> -ilişkili polipozis	608456	<i>MUTYH</i>	AR	P ve LP (2 varyant)
Neurofibromatozis tip 2	101000	<i>NF2</i>	AD	Tüm P ve LP
Peutz-Jeghers sendromu	175200	<i>STK11</i>	AD	Tüm P ve LP
<i>PTEN</i> hamartoma tumor syndrome	158350	<i>PTEN</i>	AD	Tüm P ve LP
Retinoblastom	180200	<i>RB1</i>	AD	Tüm P ve LP
Tuberosklerozis kompleks	191100 613254	<i>TSC1</i> <i>TSC2</i>	AD	Tüm P ve LP
von Hippel-Lindau sendromu	193300	<i>VHL</i>	AD	Tüm P ve LP
<i>WT1</i> -ilişkili Wilms tümörü	194070	<i>WT1</i>	AD	Tüm P ve LP

(devamı)

YENİ NESİL DİZİLEME VE KLİNİKTEKİ UYGULAMALARI

ARADIĞINIZ TÜM TIP KİTAPLARI BU ADRESTE



www.guneskitabevi.com

GENEL DAĞITIM

GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

ANKARA

M. Rauf İnan Sokak No: 3
06410 Sıhhiye / Ankara
Tel: (0312) 431 14 85 • 435 11 91-92
Faks: (0312) 435 84 23

İSTANBUL

Gazeteciler Sitesi Sağlam Fikir Sokak
No: 7 / 2 Esentepe / İstanbul
Tel: (0212) 356 87 43

KADIKÖY

Rasimpasha Mah. İskele Sokak
No: 4 / A Kadıköy / İstanbul
Tel&Faks: (0216) 546 03 47



Türkiye'nin her yerinden...
0505 734 13 13

