

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AİLESEL HİPERKOLESTEROLEMİNİN
GENETİK NEDENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem KINDİŞ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2022

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AİLESEL HİPERKOLESTEROLEMİNİN
GENETİK NEDENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem KINDİŞ

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞİFOĞLU**

**ANKARA
2022**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Alikaşifoğlu'na,

Klinik bilgisi ve yönlendirmeleri ile tez sürecime önemli katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Lale Tokgözoğlu'na,

Tez sürecinde klinik düzeyde katkıları bulunan Çocuk Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı ve Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'na,

Asistanlık sürecimde bilgi ve deneyimleri ile eğitimime büyük katkılar sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Nurten Akarsu'ya,

Yer aldığım bilimsel projelerde ve asistanlık eğitimimde önemli katkıları bulunan değerli hocam Doç. Dr. Z. Ekim Taşkiran'a,

Asistanlık eğitimimde büyük katkıları bulunan ve tez sürecimde RNA çalışmalarını yürütmemde bana yol gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Arda Çetinkaya'ya,

Asistanlığa başladığım günlerden itibaren birlikte çalıştığım, eğitimime ve gelişimime katkıları bulunan, tez sürecinde RNA izolasyonunu yapmamda bana yol gösteren değerli Öğr. Gör. Dr. Naz Güleray Lafcı'ya,

Laboratuvar çalışmalarımnda değerli katkılarını esirgemeyen Uzm. Bio. Serkan Kabaçama'a,

Biyoinformatik analizlere değerli katkıları bulunan Biyoinformatik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Melisa Acun'a,

Tez sürecimde desteklerini güçlü bir şekilde hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma ve tüm genetik ailesine,

Son olarak, bugünlere gelmemde yaptıkları fedakarlıklar ile büyük payı olan, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiren sevgili Anne ve Babama

Teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kındış, E. Ailesel Hiperkolesteroleminin Genetik Nedenlerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. Ailesel hiperkolesterolemi plazma kolesterol düzeylerinde yükseklik ve erken dönemde kardiyovasküler hastalık gelişimi ile karakterize genetik bir hastalıktır. Bu çalışma, ailesel hiperkolesteroleminin genetik nedenlerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek, klinik ve genetik ilişkisini incelemek amacı ile planlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda, *Simon Broome* Kriteri'ne göre ailesel hiperkolesterolemi tanısı alan 52 hasta çalışmaya alınmıştır. İlk aşamada, *LDLR* geni tüm hastalarda Sanger yöntemi ile dizilenmiştir. Hastalık ilişkili mutasyon saptanmayanlara, sırası ile önce *APOB* geni 26. ve 29. ekzonları ve *PCSK9* genine yönelik DNA dizi analizi yapılmıştır. Üç genin dizilenmesi sonucunda, toplamda 28 hastada *LDLR* geninde patojenik mutasyon saptanmıştır. Bunlardan iki tanesi daha önce bildirilmemiştir. Kalan 24 hastada öncelikle *LDLR* kopya sayısı değişikliklerine yönelik MLPA yapılmış ve bir hastada *LDLR*'de homozigot ekzon 11-12 duplikasyonu saptanmıştır. Bu aşamada mutasyon saptanmayan hastalarda NGS paneli ile etiyolojide yer alan genler araştırılmış ve NGS paneli ile bir hastada, *LDLRAP1* geninde ve iki hastada *APOE* geninde hastalık ile ilişkili mutasyon saptanmıştır. Bir hastada ise *LDLR* geninde saptanan sinonim mutasyonun, RNA çalışması ile *splice* değişikliğine neden olduğu tespit edilmiştir ve bu mutasyon patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Toplamda 33 hastada monogenik bir neden saptanırken, 1 hastada *LDLR* geninde önemi bilinmeyen değişiklik saptanmıştır. 18 hastada ise monogenik neden saptanmamıştır.

Monogenik etiyolojiye yönelik olarak bu çalışmalar dışında, hastalığın poligenik etiyolojisine yönelik değerlendirilmeler yapılmıştır. Bu amaçla, daha önce literatürde bildirilen, 12 SNP bölgesi genotiplenmiştir. İlk basamakta mutasyon saptanan 28 hasta Sanger yöntemi ile genotipleme yapılırken, kalan 24 hastada monogenik nedenleri belirlemek için yapılan NGS paneli kullanılmıştır. Bu SNP'ler kullanılarak, mutasyon saptanan/saptanmayan hasta grupları ve bir kontrol örnekleminde 12 ve 6 SNP (genotiplenen 12 SNP içinden seçilen SNP'ler) içeren 2 farklı poligenik risk skoru hesaplanmıştır. Hesaplanan skorların ortalamaları gruplar

arasında karşılaştırılmıştır. Bu şekilde, Türk popülasyonunda ilk defa, poligenik etiyojinin hastalıktaki rolü değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, Türk popülasyonunda diğer popülasyonlara benzer şekilde mutasyon negatif hastaların skor ortalamaları kontrollere ve mutasyon pozitiflere göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca monogenik hastalığın ortaya çıkışında poligenik faktörlerin etkili olabileceği de gösterilmiştir. Bulunan genetik değişikliklerin klinik ve biyokimyasal parametreler ile ilişkileri de araştırılmıştır. Son olarak, hastalarda bulunan sonuçlar doğrultusunda genetik danışma verilmiş, hastalar tedavi ve takipleri için ilgili kliniklere yönlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ailesel hiperkolesterolemi, *LDLR*, Poligenik risk skoru

Destekleyen Kuruluşlar: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (THD-2021-19124).

ABSTRACT

Kindiş, E. Investigation of Genetic Causes of Familial Hypercholesterolemia, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics Specialization Thesis, Ankara, 2022. Familial hypercholesterolemia is a genetic disease characterized by high plasma cholesterol levels and early cardiovascular disease development. Main objectives of the study were to evaluate the genetic causes of familial hypercholesterolemia and to detect the relationship between genetic causes and the clinical findings. For these purposes, 52 patients diagnosed with familial hypercholesterolemia according to the Simon Broome Criteria were included. At the beginning, the *LDLR* gene of all patients was sequenced by Sanger method. After that, Sanger sequencing was performed respectively, for exons 26 and 29 of *APOB* gene and *PCSK9* gene in the patients who did not have a causal *LDLR* mutations. As a result of Sanger sequencing, pathogenic *LDLR* mutations of which two of them had not been described before were detected in 28 patients. In the remaining 24 patients, MLPA was performed to detect *LDLR* copy number changes and a homozygous duplication of exon 11-12 of *LDLR* gene was found in a patient. In the patients without molecular diagnosis, a NGS panel was performed to comprehensively evaluate the genes related to the disease. Disease-related mutations were detected in the *LDLRAP1* in a patient and *APOE* in two patients. A synonymous mutation found in *LDLR* gene was identified to cause splice site changes by RNA study and classified as pathogenic. While a monogenic cause was detected in 33 patients, 1 patient had a variant of unknown significance in the *LDLR*. There was no monogenic cause detected in 18 patients.

In addition to effort for detection of monogenic causes of the disease, studies were also conducted to assess polygenic etiology. For this purpose, previously reported 12 SNP were genotyped. To genotype 28 patients that found to have a mutation in *LDLR* gene at beginning of the study, Sanger sequencing was performed. For the remaining patients, the NGS panel were used. After genotyping, Two polygenic risk scores (PRS) were calculated in the mutation positive/mutation negative patient groups and the control group by using 12 SNP and 6 SNP (a subset of 12 SNP). The means of the calculated PRS were compared between the groups. By this way, the role of polygenic effects on the disease was evaluated for the first time in the Turkish

population. As a result, similar to the different population studies, mutation negative patients were found to have higher mean PRS than control group and mutation positive patients in Turkish population. Besides, probable effects of the polygenic determinants to occurrence of the monogenic disease were identified. The effects of the genetic etiology on the clinical and biochemical parameters were also investigated. Finally, according to molecular findings, genetic counselling were provided and the patients were directed to the related clinics for treatment and management of the disease.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, *LDLR*, Polygenic risk score

Supporting Organizations: This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (THD-2021-19124).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER.....	xv
TABLolar.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Lipoproteinler ve Lipoprotein Metabolizması.....	4
2.2. APOB İçeren Lipoproteinler.....	5
2.2.1. Şilomikron Metabolizması.....	6
2.2.2. VLDL ve LDL Metabolizması.....	8
2.3 HDL Metabolizması.....	10
2.4. Lipoprotein ve Lipidlerin Plazma Düzeylerinin Ölçümü ve Klinik Önemleri.....	11
2.4.1. Ateroskleroz Gelişimi.....	12
2.5. Dislipidemiler ve Sınıflandırılmaları.....	14
2.6. Birincil (Ailesel) Dislipidemiler.....	15
2.6.1. Yüksek Kolesterol ve Trigliserid Birlikteliği ile Seyreden Birincil Dislipidemiler... ..	16
2.6.2. Trigliserid Yüksekliği ile Seyreden Birincil Dislipidemiler.....	17
2.6.3. HDL-K Düşüklüğü ile Seyreden Birincil Dislipidemiler.....	19
2.6.4. Yüksek LDL-K Düzeyleri ile Seyreden Birincil Dislipidemiler.....	20
2.7. Ailesel Hiperkolesterolemi Hakkında Genel Bilgiler.....	21
2.7.1. Ailesel Hiperkolesterolemide Bulgular, Tanı ve Tedavi.....	22
2.8. Monogenik Ailesel Hiperkolesterolemiler.....	28
2.8.1. LDLR Proteininin Görevi, Hücre İçi Döngüsü ve Düzenlenmesi.....	28
2.8.2. <i>LDLR</i> Geni ve Mutasyonlarının Etkileri.....	29
2.8.3. <i>APOB</i> Geni, Proteini ve Mutasyonları.....	31
2.8.4. <i>PCSK9</i> Geni, Proteini ve Mutasyonları.....	32
2.8.5. Diğer Monogenik Nedenler.....	33
2.8.6. <i>LDLRAP1</i> ve Resesif Hiperkolesterolemi.....	34

2.9. Poligenik Ailesel Hiperkolesterolemi	34
2.9.1. Poligenik Risk Skorları, Hesaplanmaları ve Kullanımları	34
2.9.2 Ailesel Hiperkolesterolemide Poligenik Risk Skorları	37
3. BİREYLER VE YÖNTEM	40
3.1. Hastaların Seçilmesi ve Değerlendirilmesi	40
3.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	42
3.3. <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> ve <i>PCSK9</i> Genlerine Yönelik DNA Dizi Analizi	42
3.3.1. Primerlerin Tasarlanması	43
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
3.3.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	44
3.3.4. PCR Ürün Pürifikasyonu	45
3.3.5. Sanger Dizileme ile Hedef Genlerin Dizilenmesi	45
3.3.6. DNA Dizileme Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu	46
3.3.7. DNA Dizi Analizinin Yapılması	46
3.4. <i>LDLR</i> Geni Kopya Sayısı Değişikliği Analizi	46
3.4.1. Multipleks Ligaz Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)	46
3.4.2. DNA Denatürasyonu ve Prob Hibridizasyonu	47
3.4.3. Prob Ligasyonu	47
3.4.4. PCR Reaksiyonu	48
3.4.5. Kopya Sayısı Değişikliklerinin Değerlendirilmesi	48
3.6. Yeni Nesil Dizileme	50
3.6.1. DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü	52
3.6.2. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması	52
3.6.3. Ürünlerin Barkodlanması ve Çoğaltılması	53
3.6.4. Kütüphanelerin Havuzlanması, Pürifikasyonu ve Dilüsyonu	53
3.6.5. Cihaza Yükleme ve Sekanslama	54
3.6.6. Varyantların Çağırılması ve Anote Edilmesi	55
3.6.7. Varyantların Analizi	56
3.7. Poligenik Risk Skorlarının Hesaplanması	57
3.8. <i>LDLR</i> cDNA Sanger Dizileme	60
3.8.1. RNA İzolasyonu	60
3.8.2. RNA Repürifikasyonu	61
3.8.3. cDNA Sentezi	62

3.8.4. cDNA ile PCR Yapılması	62
3.8.5. Jelden Ürün İzolasyonu ve Ürünlerin Çoğaltılması	63
3.9. İstatistiksel Analizler	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. Klinik Bulgular ve Laboratuvar Bulguları	65
4.2. Mutasyon Bulgusu ile Klinik ve Laboratuvar Bulgularının İlişkisi	69
4.3. <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> ve <i>PCSK9</i> Genlerinin Sanger Dizi Analizi Sonuçları	70
4.4. <i>LDLR</i> Geni MLPA Analizi Sonuçları	75
4.5. NGS Paneli Sonuçları ve Saptanan Nadir Değişiklikler	76
4.6. <i>LDLR</i> cDNA PCR ve Dizileme Sonuçları	77
4.7. Hasta ve Kontrol Gruplarından Hesaplanan Poligenik Risk Skorları	81
4.7.1. Poligenik Risk Skorlarının İstatistiksel Analizi.....	87
4.7.2. Poligenik Risk Skorlarının Farklı Poüplasyonlar Arasında Karşılaştırılması	88
5. TARTIŞMA.....	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
7. KAYNAKLAR	107
8. EKLER.....	114
EK-1. IGV değerlendirmesinde elenen değişiklik örnekleri	114
EK-2. Akrabalarında mutasyon saptanan hastalar ve iki kuşak pedigri ve elektroferogram görüntüleri.....	115
EK-3. Aile bireylerinin mutasyon bilgisi bulunmayan hastaların elektroferogram görüntüleri.....	119
EK-4. 1 numaralı hastanın PRS için kullanılan 12 SNP elektroferogramları	120
EK-5. 2 numaralı hastanın Amplicon Suite programından elde edilen 12 SNP bilgisini içeren tablo örneği	121

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece Santigrat
µl	Mikrolitre
ABCA1	ATP Binding Cassette, Subfamily A, Member 1
ABCG5	ATP Binding Cassette, Subfamily G, Member 5
ABCG8	ATP Binding Cassette, Subfamily G, Member 8
ANGPTL3	Angiopoietin-like 3
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
APOA-I	Apolipoprotein A-I
APOA-II	Apolipoprotein A-II
APOA-IV	Apolipoprotein A-IV
APOA-V	Apolipoprotein A-V
APOB	Apolipoprotein B
APOB-48	Apolipoprotein B-48
APOB-100	Apolipoprotein B-100
APOC-II	Apolipoprotein C-II
APOC-III	Apolipoprotein C-III
APOE	Apolipoprotein E
cDNA	Complementary/Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CELSR2	Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 2
CETP	Cholesteryl-Ester Transfer Protein
COPII	Coat Protein Complex II
CYP7A1	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1
dl	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
F	Forward
FL	Fosfolipid
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol-Anchored High Density Lipoprotein Binding Protein 1
HDL	High Density Lipoprotein/Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HDL-K	HDL Kolesterolü
HFE	Homeostatic Iron Regulator
IDL	Intermediate Density Lipoprotein/Ara Yoğunluklu Lipoprotein

IDOL	Inducible Degradable of Low Density Lipoprotein Receptor
KAH	Koroner Arter Hastalığı
KE	Kolesterol Ester
KVH	Kardiyovasküler Hastalık
LCAT	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein/Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDL-K	LDL Kolesterolü
LDLR	LDL Reseptörü
LDLRAP1	Low Density Lipoprotein Receptor Adapter Protein 1
LIPA	Lipase A, Lysosomal Acid Type
LMF1	Lipase Maturation Factor 1
LPL	Lipoprotein Lipase
LXR	Liver X Receptor
MAF	Minör Alel Frekansı
mg	Miligram
MI	Myocardial Infarctus/Miyokart enfarktüsü
ml	Mililitre
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
MYLIP	Myosin Regulatory Light Chain Interacting Protein
NGS	Next Generation Sequencing/Yeni Nesil Dizileme
NYNRIN	NYN Domain And Retroviral Integrase Containing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9
PLTP	Phospholipid Transfer Protein
PRS	Poligenik Risk Skoru
R	Reverse
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Revolutions per Minute
rs	RefSNP
SAR1B	Secretion Associated Ras Related GTPase 1B
SLC22A1	Solute Carrier Family 22 Member 1

SNP	Single Nucleotide Polymorphism/Tek Nükleotid Polimorfizmi
SR-B1	Scavenger Receptor Class B Type 1
SREBP2	Sterol regulatory element-binding protein 2
ST3GAL4	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 4
STAP1	Signal-transducing Adaptor Protein 1
ŞL	Şilomikron
TG	Trigliserid
TK	Total Kolesterol
V	Volt
VLDL	Very Low Density Lipoprotein/Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
W	Watt

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Lipoproteinlerin genel yapısı	5
Şekil 2.2. Şilomikronun metabolizması.....	8
Şekil 2.3. VLDL ve LDL metabolizması	9
Şekil 2.4. HDL metabolizması	11
Şekil 2.5. Aterom plağı yapısı	13
Şekil 2.6. LDLR hücre döngüsü ve düzenlenmesi	29
Şekil 2.7. LDLR geni ve protein bölgeleri	31
Şekil 2.8. APOB proteini bölgeleri.....	32
Şekil 2.9. PCSK9 Bölgeleri	33
Şekil 2.10. PRS'nin üretiminden hesaplanma aşamasına kadar kısa özeti.....	36
Şekil 3.1. Simon Broome Kriteri'nin Türkçeleştirilmiş formu	41
Şekil 3.2. MLPA testinin aşamaları.....	47
Şekil 3.3. NGS sonucu değerlendirme şeması.....	57
Şekil 4.1. <i>LDLR</i> ekzonlarının temsili görünümü ve mutasyonların yerleri.....	72
Şekil 4.2. c.372delG mutasyonu taşıyan üç hasta.....	73
Şekil 4.3. c.2477_2493del mutasyonu taşıyan iki hasta	74
Şekil 4.4. Ekzon 17'de yer alan delesyon (c.2477_2493del) ve erken <i>stop</i> kodonu	75
Şekil 4.5. Ailenin Pedigrisi ve MLPA sonucu.....	76
Şekil 4.6. NGS sonucu hastalık ilişkili saptanan mutasyonların IGV görüntüleri	77
Şekil 4.7. 50 numaralı hastanın elektroferogram ve pedigrisi	78
Şekil 4.8. Hasta ve kontrol örneğinden cDNA PCR sonucu jel görüntüsü ve saptanan <i>LDLR</i> transkriptlerinin band görüntüleri.....	79
Şekil 4.9. İlk jel pürifikasyonu sonucu Sanger dizi analizinde kanonik ve anormal transkripti içeren elektroferogram ve DNA dizisi.....	80
Şekil 4.10. Hasta ve kontrol örneğinden alel spesifik PCR jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.11. Hastanın alel spesifik ürününden Sanger ve anormal transkriptlerin yeni <i>splice</i> bölgeleri.....	81

Şekil 5.1.	<i>UCSC Genom Browser</i> veri tabanından elde edilen <i>LDLR</i> transcriptleri ve tekrar dizileri	97
Şekil 5.2.	Ailesel hiperkolesterolemide genetik yaklaşım algoritması.....	105

Not: Şekiller Erdem Kındış tarafından çizilmiştir.

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Lipoprotein Metabolizmasında Önemli Yer Tutan Apolipoproteinler	5
Tablo 2.2. Plazmada ölçülen lipidlerin sınır değerleri	14
Tablo 2.3. Frederickson Sınıflaması tiplerine göre hiperlipidemilerin özellikleri	15
Tablo 2.4. Sık görülen ikincil dislipidemi nedenleri	15
Tablo 2.5. Birincil dislipidemiler ve genetik nedenleri	16
Tablo 2.6. Simon Broome, DLCN ve US MedPed Kriterleri	25
Tablo 2.6. (Devamı) Simon Broome, DLCN ve US MedPed Kriterleri	26
Tablo 2.7. Ailesel Hiperkolesteroleminin Ayırıcı Tanısında Yer Alan Durumlar	27
Tablo 2.8. <i>LDLR</i> Mutasyonlarının Fonksiyonel Sınıfları.....	31
Tablo 3.1. Primer çiftleri ve PCR reaksiyonundaki primer bağlanma sıcaklıkları.....	43
Tablo 3.2. PCR koşulları	44
Tablo 3.3. CNV değerlendirmesi için sınır <i>Final Ratio (FR)</i> değerleri	49
Tablo 3.4. Prob kodları ve pozisyonları	49
Tablo 3.5. <i>Devyser FH v2</i> Kit içeriğinde yer alan malzemeler	51
Tablo 3.6. NGS panelinin kapsadığı genler	51
Tablo 3.7. NGS panelinin kapsadığı ve 12’li skor için kullanılacak SNP’ler	52
Tablo 3.8. Ailesel hiperkolesterolemi için geliştirilen 12 ve 6 SNP PRS’de kullanılan polimorfizmler ve etki büyüklükleri	59
Tablo 3.9. 12 SNP bölgesine yönelik Primerler ve sıcaklıkları	60
Tablo 3.10. 12 SNP bölgesi için <i>Thermal Cycler</i> koşulları.....	60
Tablo 3.11. cDNA PCR şartları ve primerler	62
Tablo 4.1. Hastaların tanımlayıcı istatistiksel verileri (Gruplandırılmış).....	66
Tablo 4.2. Hastaların tanımlayıcı istatistiksel verileri (Sayısal).....	66
Tablo 4.3. Hastaların biyokimyasal, klinik bulguları ve aile öyküleri	67

Tablo 4.4. Sayısal değişkenlerin mutasyon ile ilişkisi	70
Tablo 4.5. <i>LDLR</i> geninde dizi analizinde saptanan klinik ilişkili olabilecek değişiklikler ...	71
Tablo 4.6. Kontrol örnekleminin genotipleri ve 12 ve 6 SNP PRS sonuçları	83
<p>Microsoft Excel’de formüller yardımı ile hesaplanmıştır. Formüller tablo X’teki etki büyüklüklerine ve anlatılan hesaplama metoduna göre yazılmıştır. 0,1,2 rakamları risk alellerinin bireylerdeki bulunma durumunu ifade etmektedir;0: Risk aleli bireyde yok, 1: Risk aleli bireyde heterozigot, 2: Risk aleli bireyde homozigot durumda. Sarı işaretli SNP’ler aynı zamanda 6 SNP skorunda kullanılan SNP’lerdir</p>	
Tablo 4.7. Mutasyon negatif hastalarda genotipler, 12 ve 6 SNP skorlar	84
Tablo 4.8. Mutasyon pozitif hastalarda genotipler,12 ve 6 SNP skorları.....	85
Tablo 4.9. Türk popülasyon örnekleminde poligenik risk skorları ve gruplar arası karşılaştırma sonuçları.....	87
Tablo 4.10. Diğer popülasyonların mutasyon durumuna göre PRS ortalamaları ve karşılaştırılması.....	88
Tablo 4.10. Mutasyon negatif hasta gruplarının 6 SNP skor ortalamalarının birbirleri ile karşılaştırılması.....	89
Tablo 4.12. Mutasyon pozitif hasta gruplarının 6 SNP skor ortalamalarının birbirleri ile karşılaştırılması.....	89
Tablo 4.13. Mutasyon negatif hasta gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması	90
Tablo 4.15. Kontrol gruplarının skor ortalamaları, standart sapma değerleri ve istatistiksel olarak karşılaştırılmaları	90
Tablo 5.1. Farklı Türk ailesel hiperkolesterlemi çalışmalarında ortak olarak saptanan <i>LDLR</i> değişiklikleri	96
Tablo 5.2. NGS ve RNA analizi yapılmadığı durumda PRS ve gruplar arası değerlendirme	102

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar dünya genelinde ve Türkiye’de mortalitenin en yaygın sebebidir ve tüm ölümlerin yarıya yakınından sorumludur (1). Kardiyovasküler hastalığa neden olan temel patofizyolojik mekanizma ateroskleroz gelişimidir (2). Ateroskleroz gelişiminin merkezinde lipid metabolizmasının elemanları olan lipoproteinler ve içeriğindeki trigliserid, kolesterol gibi bileşenler yer almaktadır. Damar duvarında aterojenik lipoproteinlerin birikimi ve buna ikincil olarak aktive olan makrofajların sürece katılması ile ateroskleroz başlar.

Kanda lipid düzeylerinin ateroskleroz oluşumunu hızlandıracak şekilde değişmesi durumu ise dislipidemi olarak tanımlanır (3). Dislipidemiler; ilaç kullanımı, çeşitli hastalıklar, diyet gibi ikincil faktörlerden kaynaklanabilir. Bununla birlikte, birincil: Genetik nedenlerle de ortaya çıkabilirler. Genetik nedenli dislipidemiler, lipoprotein metabolizmasında yer alan proteinlerin işlevlerinin bozulmasına neden olan genetik değişikliklerden kaynaklanır (4, 5). Bu grupta yer alan hastalıkların çoğu monogenik nedenli iken, bir kısmının poligenik nedenli olduğu ya da poligenik etkilerin hastalık şiddetinin belirlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (4). Klinik olarak ksantoma, arkus kornealis benzeri muayene bulguları, genç yaşta ailede ve hastada kardiyovasküler hastalık öyküsü genetik dislipidemilerin çoğunda ortak olarak görülür. Bununla birlikte, laboratuvar bulguları, kalıtım tipleri, genetik nedenleri, ek klinik bulguların varlığı bu hastalıkların farklı gruplara ayrılmasında etkilidir.

Genetik dislipidemiler içinde sıklıkla karşılaşılan hastalıklardan birisi ailesel hiperkolesterolemidir. Ailesel hiperkolesteroleminin görülme sıklığı ortalama 1/250 civarındadır (6). Hastalarda yüksek LDL kolesterol ve total kolesterol değerleri bulunması tipiktir. Muayenede, ksantoma, ksantalezma gibi lipid birikimine bağlı cilt bulguları görülebilir. Tedavi edilmeyen hastalarda erken yaşta kardiyovasküler hastalıklar özellikle koroner kalp hastalığı riski artmıştır. Ailesel hiperkolesterolemide tanı için kullanılan farklı kriterler mevcuttur. Bu kriterler, kişinin ve aile bireylerinin kolesterol düzeyleri, koroner hastalık öyküleri ve muayene bulguları gibi parametreler kullanılarak oluşturulmuştur. Sıklıkla kullanılan kriterlerden olan *Simon Broome ve*

Dutch Lipid Network Criteria; LDLR, APOB ve PCSK9 genlerinde patojenik mutasyon varlığını tanı için bir parametre olarak kullanmaktadır (7).

Ailesel hiperkolesterolemi (OMIM 143890) sıklıkla *LDLR* geni heterozigot mutasyonlarından kaynaklıdır. Daha az oranda *APOB* ve *PCSK9* heterozigot mutasyonları hastalığa neden olmaktadır (6). Bunlar dışında *APOE* geninin bazı mutasyonlarının ailesel hiperkolesterolemiye neden olduğu ortaya çıkmıştır (8). *STAP1* geninin hastalık ile ilişkili olduğu düşünülmüş, fakat son dönemde yapılan çalışmalar sonucunda ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili olmadığı görülmüştür (9). Bunun dışında *LDLRAP1* geni ailesel hiperkolesteroleminin resesif formuna neden olmaktadır. *LIPA, CYP7A1, ABCG5/8* gen mutasyonları da ailesel hiperkolesterolemiye benzer kliniğe neden olabilmektedir (4). Hastalığın daha ağır bir formu olan homozigot ailesel hiperkolesterolemi ise, daha nadir görülür ve *LDLR, APOB* ve *PCSK9* genlerinin homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlarından kaynaklanır. Genetik etiyojinin çeşitliliğine rağmen ailesel hiperkolesterolemi tanısı konulan hastaların yaklaşık %40-60'ında mutasyon saptanmamaktadır (10). Yeni monogenik nedenlerin keşfine yönelik araştırmalar devam etmekle birlikte, bu grubun çoğunluğunda hastalığın poligenik nedenli olduğu görüşü mevcuttur (10-12). Yapılan çalışmalarda oluşturulan poligenik risk skorları ile bu görüş desteklenmiştir ve mutasyon saptanmayan hastalarda poligenik risk skorları toplum ortalamasına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (10, 13). Sonuç olarak, bu hastalarda monogenik nedenlerin yanı sıra poligenik etkilerin de hastalık ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Bu iki hasta grubunda kardiyovasküler hastalık riski ve ailesel geçiş açısından farklılıkların mevcut olduğu da çalışmalarda bildirilmiştir. Bu nedenlerle hastalığın genetik nedenlerini belirlemek hem aile taraması açısından hem de kardiyovasküler hastalık riskinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

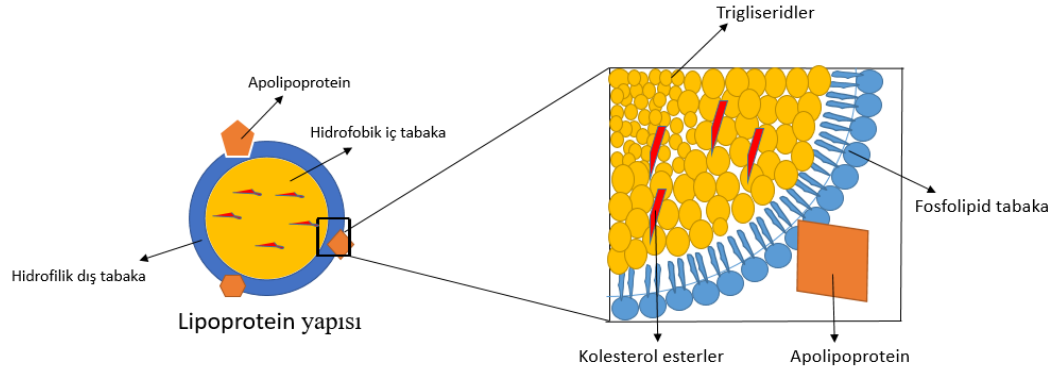
Bu tez çalışması kapsamında hastalığın monogenik nedenlerinin ve poligenik etkilerin klinik ile birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, Simon Broome kriterlerine göre ailesel hiperkolesterolemi ile uyumlu olan 52 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalarda ayrıntılı klinik değerlendirme ile ailesel hiperkolesteroleminin genetik nedenlerine yönelik kapsamlı bir araştırma planlanmıştır. Hasta grubunda hastalığın monogenik nedenlerine yönelik olarak *LDLR, APOB* ve *PCSK9* genlerine yönelik Sanger yöntemi ile DNA dizilemesi

yapılmış ve mutasyonlar değerlendirilmiştir. Mutasyon saptanmayan hastalarda, *LDLR* geni kopya sayısı değişiklikleri multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu ile değerlendirilmiş ve ardından daha nadir monogenik etiyojolojiye yönelik ileri nesil dizileme paneli yapılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak, daha önce farklı çalışmalarda kullanılmış olan 12 ve 6 tek nükleotid polimorfizmi ile oluşturulmuş poligenik risk skorları ile poligenik etkiler ilk defa Türk hasta kohortunda değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, monogenik, poligenik nedenler ve bunların klinik ile ilişkisi tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipoproteinler ve Lipoprotein Metabolizması

Lipoproteinler, hidrofobik yağ moleküllerinin hücre dışında sıvı bir ortamda taşınmasına ve dokulara ulaştırılmasına imkan sağlayan araçlardır (4). Şekil 2.1.'de lipoprotein yapısı gösterilmiştir. Besinlerden elde edilen yağların dokulara, kolesterolün dokulardan karaciğere ve trigliseridlerin (TG) karaciğerden diğer organ ve dokulara taşınmasında rol alırlar. Lipoproteinler yapısal olarak TG ve serbest kolesterol ya da kolesterol esterden (KE) meydana gelen hidrofobik çekirdek ile birlikte dışarıda çekirdeği saran hidrofilik fosfolipid (FL) tabakadan meydana gelirler. Ayrıca, yapılarında apolipoprotein adı verilen, lipoproteinlerin hücre içinde oluşumu, bir araya getirilmesi, reseptörler ile etkileşimi ve enzimlerin aktive edilmesi gibi görevleri olan proteinler yer alırlar, apolipoproteinler ve işlevleri Tablo 2.1.'de özetlenmiştir. Lipoproteinler yoğunluklarına göre, şilomikron (ŞL), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) olarak beşe ayrılırlar (4). Ayrıca, lipid elektroforezi ile de ŞL, VLDL, LDL ve HDL elektriksel negatif yük farkları nedeni ile ayrı bantlar olarak görülürler (14). HDL bandı alfa, LDL bandı beta ve VLDL bandı ise pre-beta olarak adlandırılır. Bantlara göre adlandırma, lipoproteinlerle ilgili hastalıkların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Lipoproteinlerin genel yapısı.

Tablo 2.1. Lipoprotein Metabolizmasında Önemli Yer Tutan Apolipoproteinler

Apolipoprotein	Yer Aldığı Lipoprotein	Görevi
APOA-I	HDL	HDL biyosentezi LCAT aktivasyonu
APOA-II	HDL	HDL yapısal proteini
APOA-IV	HDL, ŞL, plazmada serbest	Bazı lipoproteinlerin sentezi ve maturasyonunda, LCAT için kofaktör olabilir
APOA-V	VLDL, ŞL	Lipoprotein lipaz aracılı TG sentezini artırır
APOB-48	ŞL	ŞL oluşumu ve işlevi için ana yapısal protein
APOB-100	VLDL, IDL, LDL	VLDL, IDL, LDL için yapısal protein, LDLR ile bağlanır
APOC-II	ŞL, VLDL	Lipoprotein lipazın kofaktörü
APOC-III	ŞL, VLDL, HDL	TG içeriği yüksek lipoproteinlerin lipolizini azaltır.
APOE	VLDL, ŞL kalıtları, IDL, HDL	Kalıtların dolaşımdan temizlenmesi, LDLR bağlanma bölgesi içerir

LCAT: *Lecithin-cholesterol acyltransferase*, LDLR: LDL-Reseptörü

2.2. APOB İçeren Lipoproteinler

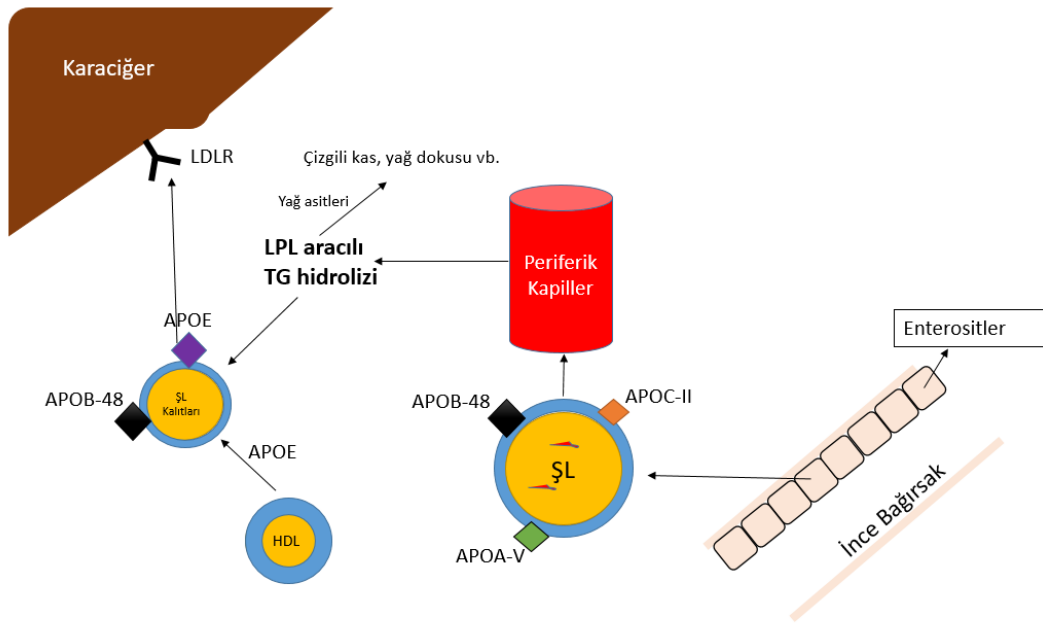
İçeriğinde Apolipoprotein B (APOB) proteinini barındıran lipoproteinler; ŞL, VLDL, IDL ve LDL'dir (15). APOB proteini vücutta sentezlenen en büyük proteinlerden biridir ve farklı lipoproteinler üzerinde farklı transkript ürünleri bulunmasından dolayı farklı şekillerde adlandırılır. Karaciğerde sentezlenen tipi VLDL, LDL ve IDL'de bulunur ve APOB-100'dür. Enterositlerde sentezlenen tipi ise

APOB-48'dir ve ŞL'de bulunur. Aralarındaki farklılık enterositlerde sentezlenen APOB-48'in, karaciğerde sentezlenen APOB-100 proteininin yüzde 48'i uzunluğunda olmasından kaynaklanır. Bu durum, aynı mRNA transkriptinin ince barsak enterositlerinde ve karaciğerdeki hepatositlerde farklı şekilde düzenlenmesinin sonucudur ve iki noktada önemi vardır: İlk olarak, daha kısa olan APOB-48'in enterositlerde hacimce diğer lipoproteinlerden daha büyük bir molekül olan ŞL sentezlenmesine olanak verdiği düşünülmektedir. İkinci olarak; APOB-48, LDL reseptörü (LDLR) için APOB-100'de bulunan bağlanma bölgesini içermez ve bu nedenle ŞL kalıtları karaciğerde metabolize edilirken farklı yollara bağlı kalmaktadırlar (4).

2.2.1. Şilomikron Metabolizması

İnce bağırsakta bulunan enterositler, şilomikronların sentezlendiği hücrelerdir. Öğün sonrası alınan ve barsak lümeninde bulunan yağ asitleri ve kolesterol enterositler tarafından emilir. Hücre içine alınan yağ asitleri farklı enzimatik süreçler sonrası esterifiye edilir ve üç yağ asidi molekülü bir tane gliserol molekülünden oluşan TG'lere dönüştürülür, kolesterol de bir yağ asidi molekülü ile esterifiye edilerek KE meydana getirilir. Şilomikron sentezi endoplazmik retikulumda gerçekleştirilir. Besinsel yağ asitlerinden sentezlenmiş olan TG'ler mikrozomal transfer protein (MTP) aracılığı ile endoplazmik retikulumda APOB48 proteini ile birleştirilir (15, 16). Eş zamanlı olarak şilomikronun hidrofilik dış tabakasını meydana getiren FL şilomikronun oluşuma katılır ve sonuçta öncü şilomikron elde edilmiş olur. Bu aşamanın ardından öncü şilomikronlar golgi cisimciğine yönlendirilir, bunun için SAR1B ve COPII proteinleri gereklidir (17). Ayrıca, yine APOA-IV proteininin de endoplazmik retikulumda başlayan ve golgide devam eden maturasyon sürecinde şilomikrona TG yüklenmesinde katkısı olduğu düşünülmektedir (15). Golgi cisimciğine ulaşan öncü şilomikronlar burada lipidasyonu tamamlayarak olgun hale gelir. Son halini alan şilomikron çok yüksek oranda TG içerirken, oldukça düşük oranda da KE içeriğine sahiptir. Şilomikronlar, enterositlerin bazolateral membranından lenf dolaşımına salınır ve duktus torasikus vasıtası ile sistemik dolaşıma karışır. Bu şekilde karaciğere uğramadan periferik dokularda lipolize uğrarlar ve periferik dokular besinsel yağ asitlerinden faydalanırlar (4). Sistemik

dolaşıma geçen şilomikronların lipolizinden sorumlu olan ana protein lipoprotein lipazdır (LPL). Bu protein özellikle kalp kası, periferik kas ve yağ dokusu gibi lipidleri enerji kaynağı olarak kullanan ya da depo eden hücrelerde fazladır. LPL hücre içinde sentezlendikten sonra dokuda yer alan kılcal damarların yüzeyine gönderilir ve damar endoteline GPIHBP1 (*glycosylphosphatidylinositol-anchored protein*) isimli çıpa işlevi gören bir protein vasıtası ile tutunur (18). Şilomikronlar damar lümenine girdikten sonra LPL'ye bağlanır ve lipoliz başlar, bu aşamada şilomikronların üzerinde bulunan apoprotein C-II (APOC-II) proteini de LPL için kofaktör görevi görerek lipolizin hızlandırılmasına yardımcı olur. Bu proteinler şilomikron metabolizması ile doğrudan ilişkili olduğu için, bunları kodlayan *LPL*, *APOC-II* ve *GPIHBP1* genlerinde görülen fonksiyon kaybı mutasyonları şilomikron metabolizmasının bozulması ile karakterize ailesel hiperşilomikronemi tablosuna neden olur. Bunlar dışında; APOA-V, APOC-III, ANGPTL3 ve ANGPTL4 gibi proteinler de LPL aktivitesinin düzenlenmesinde yer almakta ve ŞL metabolizmasını dolaylı yoldan etkilemektedirler. Bu proteinleri kodlayan genlerde saptanan mutasyonların plazma lipid (özellikle TG) seviyelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (19-21). Şilomikronların damar lümeninde lipolizi sonucunda içerdikleri trigliserid miktarı azalır. Lipoliz sonucu arta kalan parçacıklar ŞL kalıtlarıdır. Bu parçacıklar aterojenik etkiye sahiptir ve dolaşımdan kaldırılmaları gereklidir. Bu işlem karaciğerde gerçekleşir ve bunun için ŞL kalıtları üzerinde bulunan APOE apolipoproteini gereklidir (4). APOE, aslında dolaşımda HDL'ler üzerinde taşınmaktadır, dolayısıyla yeni sentezlenmiş olan şilomikronlar üzerinde yoktur. Lipoliz sırasında şilomikronlar ile etkileşen HDL parçacıkları sayesinde APOE, ŞL kalıtlarının yapısına katılır. Böylece ŞL kalıtları karaciğere geldiklerinde taşıdıkları APOE aracılığı ile LDLR, lipoprotein ilişkili reseptör-1 ve *Syndecan-4* gibi reseptörlere tutunarak hepatositlere alınır ve içeriğinde kalan TG ve KE'ler bu hücrelerde metabolize edilir. Şilomikronlar beslenme sonrası elde edilen lipidlerin gerekli dokulara ulaştırılması ve kullanılmasına yarar ve plazmada beslenme sonrası görülürler. Yaklaşık 12 saatlik açlığın ardından plazmada şilomikrona rastlanması normal durumlarda çok olası değildir (4). Şilomikron metabolizması Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



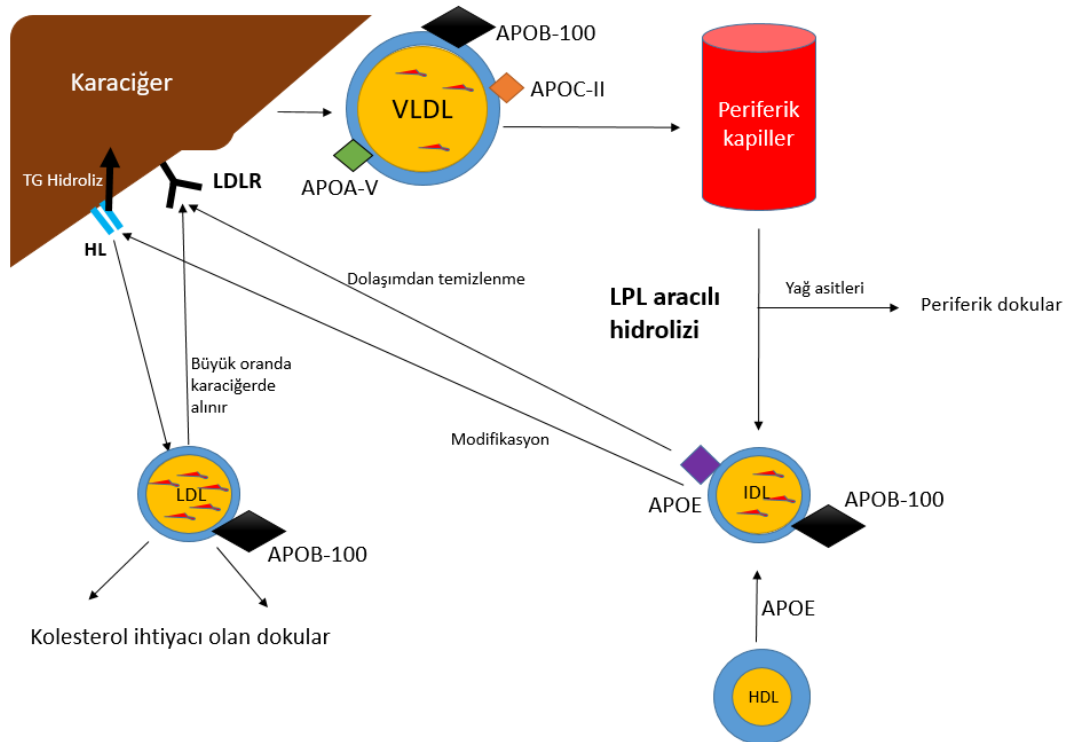
Şekil 2.2. Şilomikronun metabolizması.

2.2.2. VLDL ve LDL Metabolizması

Bir diğer APOB içeren lipoprotein olan VLDL, hem açlıkta hem de toklukta karaciğerde sentezlenir (4). Açlık sırasında, vücutta özellikle enerji kaynağı olarak yağ asidi kullanan dokuların ihtiyaçları karaciğerde sentezlenen VLDL sayesinde karşılanır, bunun dışında, tokluk durumunda da fazladan alınan karbonhidrat da karaciğerde yine TG'lere dönüştürülür ve bu sırada VLDL sentezi de artar. Hepatositte VLDL sentezi ana olarak iki proteine bağlıdır (15). Bunlardan birisi APOB (karaciğerde APOB-100 formunda sentezlenmektedir.), diğeri ise MTP'dir. VLDL sentezi, APOB translasyonu ile birlikte başlar, APOB translasyonu sitozolde başladıktan sonra endoplazmik retikulumda (ER) devam eder ve bu sırada TG zengin lipid çekirdek protein üzerinde yüklenmeye başlanır. Yükleme işlemi ana sorumlu ŞL sentezinde olduğu gibi MTP'dir. VLDL oluşumunun ilk aşaması bu şekilde tamamlanır. Daha sonra oluşan TG fakir VLDL üzerine TG ilavesi MTP öncülüğünde devam eder APOC-III, APOA-IV, APOA-V ve APOE gibi farklı apolipoproteinlerin de bu süreçte katkısı olduğu görüşü mevcuttur. Sonuçta VLDL karaciğerden dolaşıma salınır ve periferik dolaşımında, ŞL hidrolizine benzer şekilde LPL yardımı ile hidrolize edilir. VLDL hidrolizi sonucu oluşan parçacık IDL'dir. IDL, ŞL kalıtlarına benzer şekilde HDL ile etkileşim sayesinde yapısında bulunmayan bir apolipoprotein olan

APOE'yi yapısına katar. APOE, ŞL kalıtlarının karaciğerde temizlenmesine yardımcı olduğu gibi IDL'nin de karaciğerde LDLR aracılı temizlenmesine yardımcı olur. IDL'nin bir kısmı hepatositlere alınarak dolaşımdan temizlenirken, bir kısmı da karaciğerde LPL benzeri bir enzim olan hepatik lipaz (HL) ile daha ileri düzeyde TG hidrolizine uğrar. IDL üzerinde bulunan APOB-100 harici diğer proteinler de farklı lipoproteinlere aktarılır. Bunun sonucunda KE'den zengin ve APOB-100 taşıyan bir diğer lipoprotein olan LDL meydana gelir (4).

LDL, VLDL metabolizmasının bir yan ürünü olarak ortaya çıkar ve APOB-100 ile birlikte yüksek KE içeriğine sahiptir, plazmada kolesterol taşıyan ana lipoproteindir ve tüm plazma kolesterolünün yarısından fazlası LDL tarafından taşınır (4). LDL, özellikle kolesterol ihtiyacı bulunan adrenokortikal bez, over, testis gibi dokularda ve asıl olarak da karaciğerde, hücre yüzeyinde bulunan LDL-reseptörü (LDLR) ile kendisi üzerinde bulunan APOB-100'ün bağlanması sonucunda endositoz ile hücre içine alınarak metabolize edilir (4, 22). Şekil 2.3.'te VLDL ve LDL metabolizması özetlenmiştir.

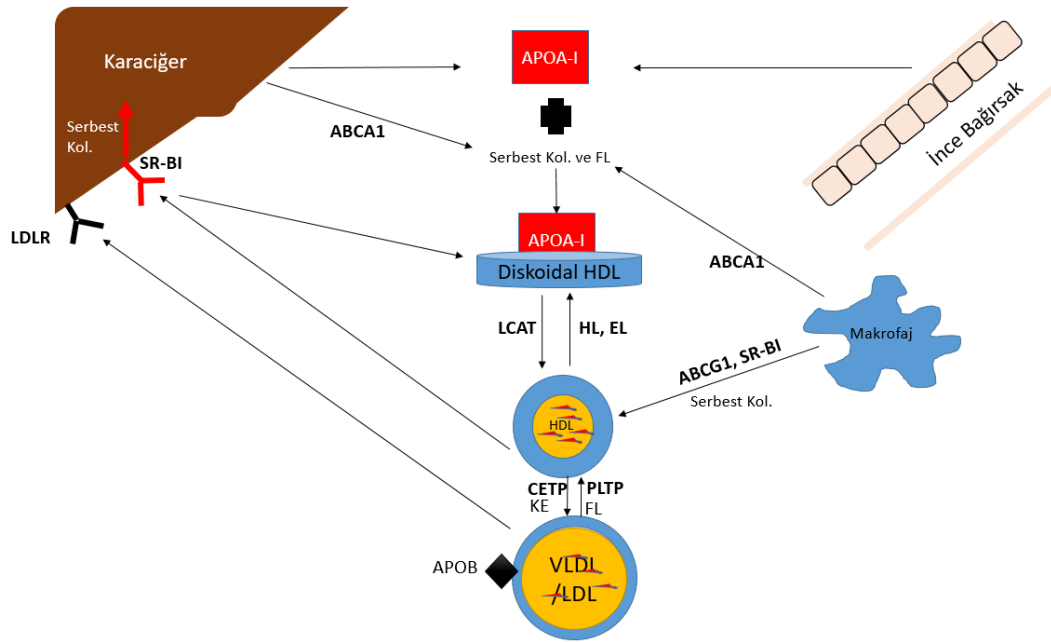


Şekil 2.3. VLDL ve LDL metabolizması.

2.3 HDL Metabolizması

APOB içermeyen bir lipoprotein olan HDL lipid ve kolesterol döngüsünde önemli bir elemandır. HDL'nin asıl görevi vücuttaki dokularda kullanılmayan kolesterolün karaciğere taşınmasıdır (4, 23). Çünkü, kolesterol periferik dokularca yıkılamaz ve karaciğerden safra asitlerine dönüştürülerek uzaklaştırılması gerekir, bu işlem tersine kolesterol taşınımı (*Reverse cholesterol transportation*) olarak adlandırılır. Bu görevi dışında, HDL transfer edilebilen farklı apolipoproteinler için (APOC-I, II, III ve APOE vb.) taşıyıcı ve depo görevi görür. Bu proteinler diğer lipoproteinlere transfer edilerek onların işlevlerinin düzenlenmesine katkı sağlar (4, 23). HDL'de bulunan ana yapısal apolipoprotein APOA-I'dir. Bununla beraber, bir kısım HDL molekülü APOA-I ile birlikte APOA-II de içermektedir (23). APOA-I karaciğerde hepatositlerden, daha az miktarda ince barsakta enterositlerden sentezlenir ve dolaşıma salınır. Periferik dokularda, karaciğerde ve makrofajlarda APOA-I'in üzerine FL ve serbest kolesterol yüklenir, bu işlem hücrelerin yüzeyinde gerçekleşir. FL kaynağı hücre zarıdır ve APOA-I'e FL akışı ABCA1 (*ATP Binding Cassette, Subfamily, Member 1*) isimli bir yüzey proteini sayesinde sağlanır. ABCA1 aktivitesi APOA-I ile bağlanma sonrası artar ve hücre zarında iç tabakadan dış tabakaya FL ile eş zamanlı olarak serbest kolesterol taşınır ve APOA-I'e aktarılır (23). Oluşan parçacık diskoidal HDL ya da kolesterol ve lipidden fakir HDL'dir. HDL periferik dokulardan kolesterol aldıkça büyür. Bu süreçte plazmada bulunan ve APOA-I yardımı ile aktive olan LCAT (*lecithin-cholesterol acyltransferase*) enzimi HDL'de bulunan serbest kolesterolün FL kaynaklı yağ asitleri ile esterifiye olmasını sağlar (24). Bunun sonucunda oluşan KE hidrofobik bir moleküldür ve HDL'nin çekirdeğini yani plazmaya bakamayan iç kısmını oluşturur. Bu sayede HDL daha fazla serbest kolesterol toplar ve diskoidal formdan yuvarlak forma geçer. HDL plazmada farklı lipoproteinler, proteinler ve enzimler sayesinde yapısal değişime uğrar. CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*) ve PLTP (*Phospholipid Transfer Protein*) adlı transfer proteinler aracılığıyla HDL, VLDL ve LDL arasında, karşılıklı FL, TG ve KE alışverişi gerçekleşir (4). Ayrıca, HDL karaciğerde hücre yüzeyinde hepatik lipaz ve periferik dokularda aynı aileden endotelial lipaz ile ilişkiye girerek içeriğindeki TG, KE ve FL'nin hidrolizi ile lipidden fakir formuna dönebilir. Sonuç olarak, bu modifikasyonlar sayesinde lipidden fakir HDL ya da lipidden yoksun hale gelmiş

APOA-I periferik dokulardan kolesterol toplayabilir veya APOA-I böbreklerde yıkıma uğrayabilir. HDL içeriğindeki kolesterol; LDL, VLDL gibi lipoproteinlere aktarılır ve bu lipoproteinlerin karaciğere alınması ve metabolize olması sonucu kolesterol periferden karaciğere taşınmış olur. Bir ikinci yol ise doğrudan HDL'nin karaciğerde SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B, Type 1*) reseptörlerine bağlanarak içeriğindeki kolesterolü hepatositlere aktarmasıdır (23). Bunun sonucunda da serbest kalan APOA-I böbrekte metabolize olur ya da periferik dokularda tekrar HDL'ye dönüşür. HDL metabolizması Şekil 2.4.'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4. HDL metabolizması. Kol.: Kolesterol

2.4. Lipoprotein ve Lipidlerin Plazma Düzeylerinin Ölçümü ve Klinik Önemleri

Kan total kolesterol, TG ve FL düzeyleri farklı biyokimyasal yöntemler kullanılarak direkt olarak ölçülebilir (14). Lipoproteinlerin ise direkt ölçümü kütle konsantrasyonları (Her bir lipoproteinin çözelti içinde litre başına düşen kütlesi) yardımı ile yapılabilir. Fakat rutinde bu yöntem yerine, farklı lipoprotein sınıflarının (VLDL, LDL, HDL) içeriğindeki kolesterol miktarı, farklı bireyler arasında benzerlik gösterdiği için örnek olarak; LDL'nin göstergesi olarak LDL kolesterolü (LDL-K) ölçülmektedir. Kolesterol içeriği ölçümü hem daha kolaydır hem de lipoproteinin kandaki düzeyini doğrudan yansıtmaktadır, Tablo 2.2.'de plazma lipid değerlerinin

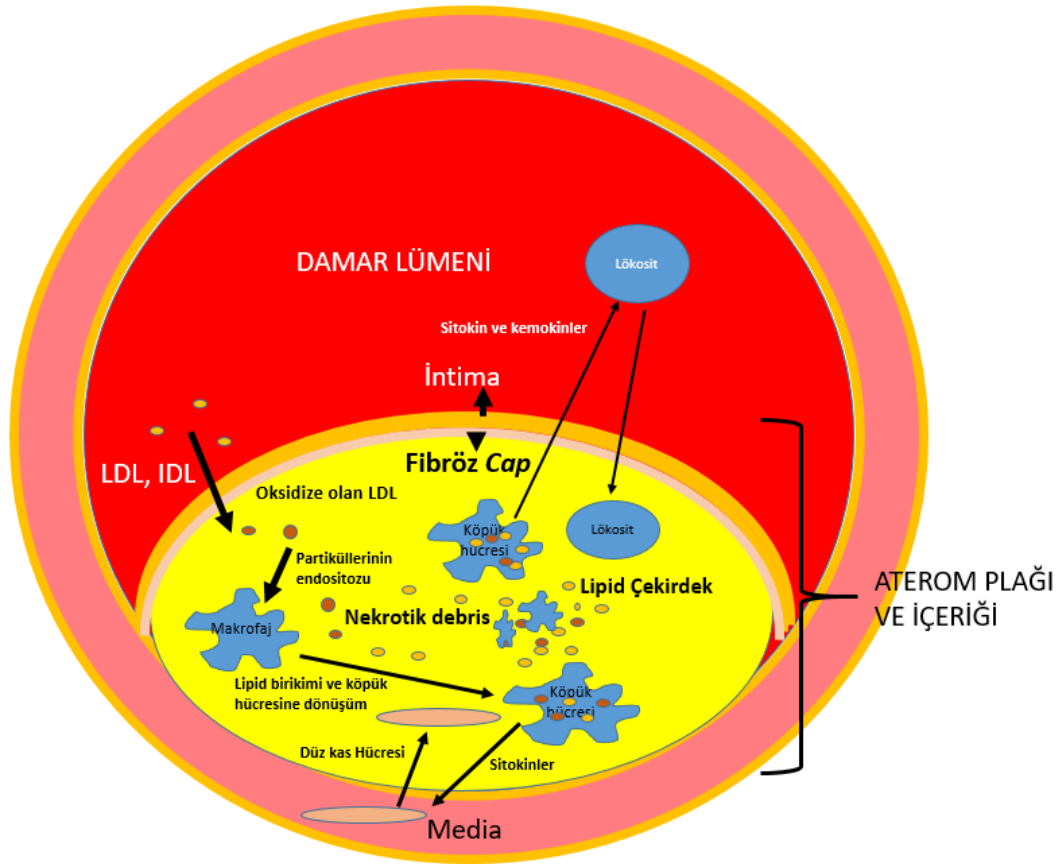
normal aralıkları gösterilmiştir. Bu ölçümlerin klinik olarak özellikle kardiyovasküler hastalık riski açısından önemi büyüktür. Araştırmalar kan total kolesterol (TK) ve daha az oranda TG konsantrasyonlarının kardiyovasküler hastalık (KVH) ile ilişkisini göstermektedir (4). Çalışmalarda total kolesterol düzeyleri ile KVH geçirme riski arasında doğru orantılı ilişki saptanmıştır ve yine uzun dönem takiplerde, koroner arter hastalığı geçiren bireylerde total kolesterol düzeyleri yüksek olanların ölüm riskinin arttığı tespit edilmiştir (25, 26). Ayrıca, LDL kolesterolü (LDL-K), HDL kolesterolü (HDL-K) ve VLDL (VLDL-K) kolesterol düzeylerinin belirlenebilmesi sayesinde hem bunların KVH üzerine etkileri hem de bunları etkileyen faktörlerle ilgili çalışmalar yapılmıştır(4). Araştırmalar sonucunda HDL-K ve KVH riski arasında ters orantılı bir ilişki olduğu, yani yüksek HDL-K düzeylerinin daha düşük KVH geliştirme ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Yüksek LDL-K düzeyinin ise TK ile benzer şekilde KVH gelişme riskini artırdığı gösterilmiştir. TG doğrudan KVH'nin nedeni olan aterosklerozun gelişmesinde rol oynamasa da, aterosklerozun gelişiminde rol oynayan lipoprotein kalıtlarının (IDL ve ŞL kalıtları) içeriğinin önemli bir parçası olduğu için, KVH riskinin belirlenmesinde önemli bir biyobelirteçtir (27).

Bireylerde lipoproteinler ve lipid düzeylerinin kardiyovasküler hastalık riskini artıracak şekilde normal değerler dışına çıkarak lipid dengesinin bozulması durumu, daha net bir şekilde tanımlanacak olursa: Artmış TK, artmış LDL-K, artmış TG, azalmış HDL-K düzeyleri ya da bunların farklı kombinasyonları dislipidemi olarak adlandırılmaktadır (3). Dislipidemiler kişilerde ateroskleroz gelişimini artırmaktadır.

2.4.1. Ateroskleroz Gelişimi

Ateroskleroz oluşum sürecinde, ilk olarak dolaşımda bulunan LDL, IDL, ŞL kalıtları, VLDL gibi lipoprotein arterlerin intima tabakasında birikir ve lipoproteinlerin içeriğindeki kolesterolün oksidasyonu sonucu bölgeye makrofajlar gelir (2). Makrofajlar lipoproteinleri hücre içine alıp değişime olurlar ve kolesterol esterden zengin köpük hücrelerini meydana getirirler. Zamanla köpük hücrelerinin hücre içi lipid metabolizması bozulur ve bu durum hücrelerin fonksiyonlarını sınırlayarak lezyon içinde kalıcı hale gelmelerine ve kronik inflamasyona neden olur. Bu sürece vasküler düz kas hücreleri, diğer immün hücreler de dahil olarak kompleks bir yapı olan aterom plağını meydana getirir. Sonuç olarak oluşan aterom plağı damar

lümeninde daralmaya, eğer plak rüptüre olursa tromboza ve ani tıkanmalara neden olabilir ve bu da beslediği organda hasara neden olur. Şekil 2.5.'te aterom plağı yapısı özetlenmiştir. Lipoprotein metabolizmasındaki bozulmalar ve sonucunda gelişen dislipidemi, ateroskleroz gelişimini hızlandırarak kardiyovasküler hastalık riskini artırır. Dislipidemiler, KVH riskini artırdıkları için sınıflandırılmaları ve altta yatan nedenlerin aydınlatılması önem taşımaktadır. Çünkü, her dislipidemi tipinin KVH riskini artırmadaki etkisi aynı değildir ve tedavi yaklaşımlarında da farklılıklar görülebilmektedir (14).



Şekil 2.5. Aterom plağı yapısı. Şekilde aterom plağının içeriği genel olarak özetlenmiştir. Ateroskleroz gelişiminde en önemli iki elemanlar: İntimada biriken aterojenik lipid partikülleri ve bunlara ikincil olarak köpük hücrelerine dönüşen makrofaqlardır.

Tablo 2.2. Plazmada ölçülen lipidlerin sınır değerleri

LDL-Kolesterol	Trigliserid	Total Kolesterol	HDL-Kolesterol
130 mg/dl üzeri yüksek	150 mg/dl üzeri yüksek	200 mg/dl üzeri yüksek	40 mg/dl altı düşük

Tabloda verilen değerler biyokimyasal ölçümlerde erişkinler için kabul edilen sınır değerlerdir. Popülasyonlar arasında, farklı hastalık gruplarında ve çocuklarda kabul edilen değerler farklılık gösterebilir. Ayrıca, bu değerler lipid yüksekliklerinde tedavi sonrası hedef değerleri ile aynı olmayabilir.

2.5. Dislipidemiler ve Sınıflandırılmaları

Dislipidemileri birden farklı şekilde sınıflandırmak mümkündür, fakat günümüzde ideal bir sınıflama sistemi bulunmamaktadır (14). İlk olarak Frederickson sınıflaması kullanılmıştır (28). Bu sınıflama sisteminde etiyolojiler belirtilmez, sadece lipid profili ve lipid elektroforez sonuçlarına göre sınıflandırma yapılır. Frederickson Sınıflaması dislipidemilerde belli bir düzeye kadar etiyolojinin ve kardiyovasküler risk tahminine olanak sağlar (14). Fakat, bu sınıflamada HDL-K düşüklüğü bir parametre olarak kullanılmamıştır ve sadece hiperlipidemiler (hiperkolesterolemi ve/veya hipertriglieseridemi) ile karşımıza çıkan durumların değerlendirilmesine imkan vermektedir. Bu sınıflama günümüzde artan genetik ve lipoprotein metabolizması bilgisi ile değerlendirildiğinde eksik kalmaktadır. Fakat yine de bu sınıflamada tanımlanmış olan adlandırma biçimleri, dislipidemilerin tanımlanmasında hala kullanılmaktadır. Tablo 2.3.'te Frederickson Sınıflamasına göre tiplendirilmiş hiperlipidemilerin bazı özellikleri verilmiştir. Bir diğer sınıflama biçimi de etiyolojiye göre sınıflama sistemidir (14, 29). Buna göre dislipidemiler, primer (ailesel) dislipidemiler ve sekonder dislipidemiler olarak ayrılır. Birincil ya da ailesel dislipidemiler; genetik nedenlere bağlı, genelde çocukluktan itibaren ortaya çıkar ve daha ağır klinik bulgularla seyredir. İkincil ya da edinilmiş dislipidemiler, çeşitli hastalıklar, ilaçlar gibi farklı nedenlere bağlı ortaya çıkar. İkincil dislipidemilerin sık görülen nedenleri Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Frederickson Sınıflaması tiplerine göre hiperlipidemilerin özellikleri

Tipi	Kolesterol	Trigliserid	KVH riski	Ek özellik
Tip I	Normal	++++	Normal	Karın ağrısı, pankreatit riski artmış, ŞL metabolizması ilişkili
Tip IIA	+++	Normal/+	+++	LDL metabolizması ilişkili, elektroforezde beta bandında artış
Tip IIB	++	++	+++	LDL ve VLDL metabolizması ile ilişkili, aile bireylerinde yüksek olan lipid tipi değişebilir.
Tip III	++	+++	+++	Elektroforezde geniş pre-beta bandı, IDL metabolizması ile ilişkili
Tip IV	Normal/+	++	+	VLDL metabolizması ilişkili
Tip V	+	++++	Normal/+	ŞL ve VLDL metabolizması ilişkili

Tablo, Frederickson Sınıflaması modifiye edilerek verilmiştir. Sınıflamaya göre tiplendirilen hiperlipidemilerin bazı klinik ve patofizyolojik özellikleri ilave edilmiştir.

Tablo 2.4. Sık görülen ikincil dislipidemi nedenleri

İzole TK ve LDL-K Yüksekliği	İzole TG Yüksekliği	LDL-K, TK ve TG Yüksekliği	İzole HDL-K Düşüklüğü
Hipotiroidi	Kronik Böbrek Yetmezliği	Nefrotik Sendrom	Obezite
Kolestatik Karaciğer Hastalığı	Diabetes Melitus	Diabetes Melitus	Karbonhidrat zengin diyet
Obezite	Obezite	Obezite	Beta blokerler
Steroidler	Steroidler	Yüksek doz steroid kullanımı	İsotretinoin
Kolesterolden zengin diyet	Retinoidler	Siklosporin	Fiziksel inaktivite
	Siklosporin	HIV tedavisi	
	Beta blokerler		
	Antipsikotik (Olanzapin)		
	Sigara		
	Oral Kontraseptif		
	Hamilelik		
	Fiziksel İnaktivite		
	Karbonhidrat zengin diyet		

2.6. Birincil (Ailesel) Dislipidemiler

Bu grupta yer alan dislipidemiler genel olarak çocukluk çağından başlayarak klinik ve/veya laboratuvar bulguları ile karşımıza çıkarlar. Genel olarak koroner arter hastalığı/kardiyovasküler hastalık riski artmakla birlikte, hepsinde aynı düzeyde risk artışı olmaz (4). Bu grupta yer alan hastalıklar Tablo 2.5.'te de görüldüğü gibi çeşitli genetik nedenlerden kaynaklanır. Özellikle laboratuvar bulguları, öykü ve muayenede saptanan ayırt edici özellikler, bu hastalıklara doğru tanı konulmasında yönlendirici olur. Benzer laboratuvar ve klinik bulgulara sahip olanlarda ise genetik testler tanıya yardımcıdır.

Tablo 2.5. Birincil dislipidemiler ve genetik nedenleri

Dislipidemi	Genetik Neden	Kalıtım Şekli
Yüksek Kolesterol ve TG		
Ailesel Kombine Hiperlipidemi	Poligenik	Kompleks (poligenik)
Disbetalipoproteinemi	APOE E2 haplotipi	Kompleks (fenotipte çevresel faktörler etkili)
Hepatik Lipaz Eksikliği	<i>HL</i>	Otozomal resesif
CYP7A1 mutasyonları	<i>CYP7A1</i>	Otozomal resesif
İzole Yüksek LDL-K, TK		
Ailesel Hiperkolesterolemi	<i>LDLR, APOB, PCSK9, APOE, STAP1?, Poligenik</i>	Otozomal semi-dominant, Kompleks (poligenik)
Sitosterolemi	<i>ABCG5, ABCG8</i>	Otozomal resesif
Resesif Hiperkolesterolemi	<i>LDLRAP1</i>	Otozomal resesif
LIPA Eksikliği	<i>LIPA</i>	Otozomal resesif
İzole Yüksek TG		
Ailesel Hiperşilomikronemi	<i>LPL, APOC-II, APOA-V, LMF1, GPIIIBP1</i>	Otozomal resesif
Ailesel Hipertrigliseridemi	Poligenik	Kompleks, Otozomal dominant?
APOC-III Fonksiyon Kazanımı	<i>APOC-III</i>	Otozomal dominant
İzole Düşük HDL-K		
APOA-I Eksikliği	<i>APOA-I</i>	Otozomal Semi-dominant
ABCA1 Eksikliği	<i>ABCA1</i>	Otozomal Semi-dominant
LCAT Eksikliği	<i>LCAT</i>	Otozomal resesif
Balık Gözü Hastalığı	<i>LCAT</i>	Otozomal resesif

2.6.1. Yüksek Kolesterol ve Trigliserid Birlikteliği ile Seyreden Birincil Dislipidemiler

Yüksek trigliserid düzeyleri ile birlikte yüksek TK ve yüksek LDL-K düzeyleri karakterize olurlar (14). Ailesel kombine hiperlipidemi (Frederickson Tip2B) ve disbetalipoproteinemi (Frederickson Tip3) bu gruba dahildir (4, 14). Ayrıca, ailesel olmasa da metabolik sendroma bağlı ortaya çıkan dislipidemilerde de benzer bir lipid profili tablosu mevcuttur. Ailesel kombine hiperlipidemi önceleri monogenik bir hastalık olarak düşünülürken, son dönemde poligenik bir hastalık olduğu ve birden fazla gen ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (30). Sıklığı popülasyonlar arası değişkenlik gösterse de 1/100 civarındadır. Ailesel kombine hiperlipidemide bireylerde yüksek kolesterol ve trigliserid yüksekliği birlikte görülebildiği gibi izole kolesterol yüksekliği veya izole trigliserid yüksekliği de gözlenebilir (14). Karaciğerde artmış VLDL üretimi sonucunda plazmada TG ve LDL düzeyleri artar, bunun yanında APOB düzeyleri de artmıştır (4). Bu hastalarda erken dönemde kardiyovasküler hastalık riski artar.

Disbetalipoproteinemi, yaklaşık 1/5000-10.000 bireyde görülmektedir. Hastalarda ksantomalar ve erken dönem kardiyovasküler hastalık görülmektedir (4). Disbetalipoproteinemide, lipid elektroforezinde patognomonik bir bulgu olan

normalden daha geniş bir beta bandı görülür. Bu duruma neden olan mekanizma ise plazmada VLDL ve ŞL kalıtlarının artışı olup, APOE proteinin E2 izoformu sorumlu tutulmaktadır. *APOE* geni E2, E3 ve E4 olarak üç izoforma sahiptir. İzofomlar gende yer alan iki adet polimorfizmin farklı kombinasyonları ile oluşturdukları haplotiplere göre belirlenmektedir. E3 izoformu en yaygın izoform iken E2 izoformu da yaklaşık 1/100 insanda homozigot olarak görülmektedir. E2 izoformunun LDLR proteinine afinitesi çok daha düşük olduğu için VLDL ve ŞL kalıtları karaciğerde temizlenmesi bu izoformu taşıyan bireylerde daha yavaş olur. Fakat hastalığın frekansının homozigot E2 taşıyan bireylerin sıklığından çok daha az olması fenotipin ortaya çıkmasında bazı ikincil faktörlerin de rol oynaması gerektiğini düşündürmektedir. Disbetalipoproteinemiye benzer şekilde lipid elektroforezinde geniş beta bandı görülebilen bir başka hastalık da, *HL* (Hepatik lipaz) geninde saptanan mutasyonlara bağlı ve resesif kalıtılan hepatik lipaz eksikliğidir (31). Bu bireylerde tüm lipoprotein çeşitlerinde TG içeriği artmıştır. *HL*'nin birincil substratı olan IDL ve onun LDL'ye dönüşümü bozulur. Karaciğerde HDL'de bulunan TG ve FL'nin sindirimi azaldığı için HDL partikülleri daha büyüktür. Hastalarda genel olarak TG ve TK düzeyleri artmış, HDL düzeyi ise hafif artmış ya da normaldir. Erken dönem kardiyovasküler hastalık riski de bu hastalar da yine artmıştır. Bunlar dışında, birkaç hastada *CYP7A1* genindeki homozigot mutasyonlar sonucu bu genin ürünü olan ve kolesterolün karaciğerde safra asitlerine dönüşümünde rol oynayan bir enzim olan kolesterol 7-alfa hidroksilazın aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir (32). Bu bireylerde TK, LDL-K ve TG yüksekliği ile karakterize ve statin tedavisine dirençli dislipidemi tablosu görülmüş ve bu durumun karaciğer hücrelerinde biriken ve safra asitlerine dönüşümü yavaşlayan kolesterol nedeni ile LDLR aktivitesinin azalması sonucu oluştuğu düşünülmüştür.

2.6.2. Trigliserid Yüksekliği ile Seyreden Birincil Dislipidemiler

İzole trigliserid yüksekliği ile giden durumlar VLDL ve şilomikron metabolizmasındaki bozukluklardan kaynaklanan; ailesel şilomikronemi, ailesel hipertrigliseridemi gibi hastalıklarda karşımıza çıkmaktadır (4, 14). Ailesel hipertrigliseridemi (Frederickson, Tip-IV) hastalarında VLDL sayısı görece daha stabil kalmakla birlikte partiküller içindeki TG düzeyleri artmıştır ve bu da VLDL partiküllerinin hacimce daha büyük olmasına neden olarak LPL tarafından

sindirilmelerini zorlaştırmaktadır (33). TG düzeylerinin orta düzeylerde arttığı görülür (200-700 mg). Kalıtım paterninin otozomal dominant olabileceği düşünülmekle birlikte bugüne kadar monogenik bir nedeni bulunamamıştır. Bu nedenle poligenik nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (33, 34). Sıklıkla Tip 2 diyabet, metabolik sendrom ile birlikte görülür (14). Artmış karbonhidrat ve alkol tüketimi, metabolik sendrom, Tip 2 diyabet gibi durumlarla birlikte daha şiddetli trigliserid yüksekliği (>1000 mg) görülebilir ve akut pankreatit riski artmıştır (33). KVH riskinin ise artıp artmadığı tartışmalıdır.

Ailesel hiperşilomikronemiler, hipertrigliseridemiye neden olan bir diğer gruptur. Bunların poligenik olduğu düşünülen formları olduğu gibi (Frederickson, tip-V) daha nadir olarak monogenik formlarla da karşımıza çıkar (34). Monogenik hiperşilomikronemiler sıklıkla *LPL* geni homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlarına bağlı olarak karşımıza çıkar (14). Hastalarda LPL proteinin fonksiyon kaybına bağlı olarak ŞL partiküllerinin sindirimi bozulmakta ve hiperşilomikronemi ortaya çıkmaktadır (Frederickson, tip I). Özellikle yemek sonrası plazma TG düzeyleri 10.000 mg/dl düzeylerine kadar çıkabilmektedir. KVH riski ise artmamaktadır. Bununla birlikte, ksantomalar ile birlikte karın ağrıları, akut pankreatit gibi bulgular görülebilir (5). *LPL* dışında daha az sıklıkta *APOC-II*, *APOA-V*, *LMF1* ve *GPIHBP1* genlerinin bialelik fonksiyon kaybı mutasyonları hiperşilomikronemi ile ilişkili olarak bildirilmiştir. *APOC-II*, LPL'nin kofaktörü olarak görev yapmaktadır. *APOA-V* ŞL ve VLDL parçacıklarının LPL ile etkileşiminde görev almaktadır. *LMF1* LPL'nin doğru katlanmasında ve *GPIHBP1* de sentezlenen LPL'nin kapiller endotele ulaşması ve tutunmasında görev alır. Dolayısı ile klinikleri de benzerlikler göstermektedir. İlave olarak, *GBPIHBP1* ve LPL eksiklikleri daha erken yaşlarda bu kliniğe neden olurken, *APOC-II* ve *APOA-V* eksikliklerinde klinik bulgular daha ileri yaşlarda görülebilmektedir (4). Son olarak *APOC-III* geninde saptanan bir missens mutasyonun (Gln38Lys) fonksiyon kazanımı yaparak hipertrigliseridemiye neden olduğu saptanmıştır (35). *APOC-III* proteini LPL'nin lipoproteinler üzerindeki sindirim fonksiyonunu azaltmakta, yine reseptör aracılı olarak kalıtların hücre içine alımını bozmaktadır. Bunlardan kaynaklı olarak fonksiyon kaybı mutasyonlarının da KVH'ya karşı koruyucu olduğu öne sürülmektedir.

2.6.3. HDL-K Düşüklüğü ile Seyreden Birincil Dislipidemiler

HDL-K düşüklüğü tersine kolesterol transportunu etkilediği için KVH gelişiminde bir risk faktörüdür. Daha çok poligenik formda görülmekle birlikte APOA-I mutasyonları, Tangier Hastalığı, LCAT eksikliği gibi monogenik nedenli olarak da karşımıza çıkar (5). APOA-I bilindiği gibi HDL oluşumunda görevli ve HDL içeriğinde yer alan ana apolipoproteindir ve *APOA-I* geninde yer alan heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları HDL-K düşüklüğüne neden olmaktadır (4, 14). Homozigot ya da bileşik heterozigot mutasyonlar daha ağır seviyede seyretmekte ve bu bireylerde ksantomalar görülmektedir. Heterozigot mutasyonlarda ise daha hafif düzeyde HDL-K düşüklüğü görülmektedir ve iki grup için de erken dönemde KVH riski artmıştır. Bununla birlikte, bir istisna olarak ‘APOA-I milano’ varyantı olarak da bilinen ‘Arg173Cys’ değişikliği düşük HDL-K düzeylerine neden olmalarına rağmen KVH riskini artırmamaktadır (36). ABCA1 hücre içinden APOA-I üzerine KE taşınmasında ve diskoidal HDL oluşumunda görevli proteindir ve *ABCA1* geninin bialelik fonksiyon kaybı mutasyonları Tangier hastalığına neden olmaktadır (4). Bu hastalıkta özellikle makrofajlarda biriken KE onların köpük hücrelere transforme olmasına neden olur. Beta karotenden zengin KE taşıyan köpük hücreleri nedeni ile turuncu tonsiller görülebilir. Ayrıca hastalarda splenomegali, hafif hepatomegali, periferik nöropati görülebilir. KVH riski APOA-I kadar artmasa da bazı erişkinlerde erken dönemde KAH görülür. LCAT enziminin eksikliğinde ise iki farklı hastalık görülmektedir. Eğer enzimin hem alfa hem beta aktivitesi kaybolmuşsa ailesel LCAT eksikliği, sadece alfa aktivitesi kaybolmuş fakat beta aktivitesi belirli bir düzeyde korunuyorsa balık gözü hastalığı (*Fish-eye disease*) ortaya çıkar (37). LCAT karaciğerden sentezlenen ve lipoproteinlerde kolesterolün esterifikasyonundan sorumlu enzimdir. Asıl olarak HDL ile ilişkilidir (alfa aktivite), daha az miktarda LDL ve VLDL ile ilişkili aktivitesi vardır (beta aktivite). İki hastalık formu da *LCAT* geni bialelik fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanır. Klinik farkın varyantların neden olduğu fonksiyon kaybı derecesine göre ortaya çıktığı düşünülmektedir. İki hastalıkta da esterifiye olmamış kolesterolün birikimine bağlı korneal opasifikasyonlar görülmesi tipiktir. Ailesel LCAT eksikliğinde kronik böbrek hastalığı ve buna bağlı komplikasyonlarla ölüm görülürken, balık gözü hastalığında böbrek tutulumu olmaz. Böbrek tutulumunun esterifiye olmayan kolesterolden zengin anormal bir lipoprotein

olan ‘Lipoprotein-X’ birikiminden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Erken dönem KVH riski ise bu hastalarda artmamaktadır. Bunun tam fonksiyon kaybına bağlı olarak LDL-K miktarının azalmasına bağlı olabileceği öne sürülmüştür (5). Balık gözü hastalığında ise böbrek fonksiyonları korunmuştur bununla birlikte, erken dönem KVH bu hastalarda görülmektedir.

2.6.4. Yüksek LDL-K Düzeyleri ile Seyreden Birincil Dislipidemiler

Yüksek LDL-K ve buna bağlı olarak genelde yüksek plazma TK düzeyleri ile karakterize olan gruptur (14). LDL’nin lipid elektroforezinde oluşturduğu beta bandına ithafen hiperbetalipoproteinemiler olarak da adlandırılmaktadır (5, 14). Frederickson sınıflamasına göre ise ‘Tip2A’ hiperlipidemilerdir. Bu grubu temsil eden hastalık ailesel hiperkolesterolemidir. Ailesel hiperkolesteroleminin monogenik formu sıklıkla *LDLR* geninin heterozigot mutasyonları sonucu meydana gelir. Bunun dışında, *APOB* geni ve *PCSK9* genleri de bu hastalığın daha nadir monogenik nedenleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, *APOE* geninin bazı mutasyonlarının da hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir (6). Ailesel hiperkolesteroleminin farklı dislipidemilerde olduğu gibi poligenik bir formu da mevcuttur ve mutasyon saptanamayan bireylerin bir kısmında, poligenik ve çevresel etkiler nedeni ile hastalığın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ailesel hiperkolesterolemiye neden olan monogenik nedenlerin homozigot formu daha nadir olarak görülür ve daha ağır klinik sonuçlara neden olur. Bunun dışında, otozomal resesif hiperkolesterolemi olarak da adlandırılan ve ailesel hiperkolesterolemi ile aynı klinik ve laboratuvar bulguları ile seyreden bir diğer durum daha mevcuttur ve *LDLRAP1* geninin bialelik mutasyonlarından kaynaklanır (14). Ailesel hiperkolesterolemi ve resesif hiperkolesterolemi hastalarında erken yaşta artmış KVH riskinin yanı sıra vücudun çeşitli yerlerinde biriken kolesterol kaynaklı ksantoma, ksantalezma, ve arkus kornealis gibi bulgular görülebilir.

Sitosterolemi de LDL-K ve TK yüksekliği ile giden ve ailesel hiperkolesterolemi ile benzer bulguların görüldüğü bir diğer hastalıktır. *ABCG5* veya *ABCG8* genlerinin bialelik fonksiyon kaybı mutasyonları sonucu ortaya çıkar. Bu genlerin ürünleri olan *ABCG5* ve *ABCG8* proteinleri birlikte bir kanal kompleksini meydana getirir. Bu kanal kompleksi düzgün çalıştığında, enterositlerde emilmiş olan bitki kaynaklı steroller olan fitosterollerin bağırsak lümenine tekrar pompalanarak

vücuttan atılmasını sağlar. Bunun dışında, karaciğerde de safra salgısı bu kanal kompleksi aracılığı ile gerçekleşir. Sonuçta hem artan bitki kaynaklı sterollerin emilimi hem de karaciğerde kolesterolün birikimi LDLR aktivitesini ikincil olarak bozar (4). Bir diğer nadir görülen hastalık da lizozomal asit lipaz eksikliğine bağlı ortaya çıkan kolesterol ester depo hastalığıdır. Bu durum lizozomal asit lipazı kodlayan *LIPA* geninin bialelik fonksiyon kaybı mutasyonları sonucu ortaya çıkar (38). Bu enzim karaciğerde kolesterol esterlerin lizozomda sindirilmesinde görev alır ve fonksiyon kaybı sonucu hücre için kolesterol ester sindirilemediği için serbest kolesterol miktarı azalır ve karaciğerde kolesterol sentezi artar. Bununla birlikte, LDLR aktivitesi artsa da net etki TK ve LDL-K yüksekliğidir. Ayrıca, plazma trigliseridlerinde bir miktar artış görülebilir ve lipid profili ailesel kombine hiperlipidemideye benzer seyredebilir. Hastalarda hepatomegali tipik bulgudur. Lipid düzeylerinin yanı sıra karaciğer enzimlerinde AST ve ALT yüksekliği de görülür ve KVH riski artmıştır. Bu enzimin aktivitesinin tam kaybolduğu mutasyonlar infantil dönem de ölüm ile sonuçlanan Wolman hastalığına neden olurken çok az da olsa enzim aktivitesinin korunduğu durumlarda kolesterol ester depo hastalığı görülür.

2.7. Ailesel Hiperkolesterolemi Hakkında Genel Bilgiler

Ailesel hiperkolesterolemi, dünya genelinde yaklaşık olarak 1/250-500 sıklığında görülen genetik bir hastalıktır (39). Ailesel hiperkolesterolemi en sık karşılaşılan dislipidemilerden biridir ve KVH ilişkili olması nedeni ile yüksek oranda morbidite ve mortaliteye sebep olur. Hastalığın tanısında kullanılan farklı tanı kriterleri mevcuttur. Bunlardan en sık kabul edilen ve dünya genelinde kullanılanlar: *Simon Broome Register*, *Dutch Lipid Network Criteria* ve *US MEDPED* kriterleridir. Ailesel hiperkolesterolemi, geçmiş yıllarda monogenik bir hastalık olarak tanımlanırken, son dönemlerde yapılan çalışmalarda hastaların bir kısmında poligenik etkenlerin rol oynayabileceği belirtilmiştir (10). Hastaların % 40-60'ında monogenik bir neden saptanabilirken geri kalanında bilinen genlerde mutasyon saptanamamaktadır. Mutasyon saptanan hastalarda en sık *LDLR* geni heterozigot mutasyonları (% 85-90) saptanırken, bu mutasyonların büyük çoğunluğu (%90-95) tek nükleotid değişiklikleridir. Geri kalan kısım ise gen içi kopya sayısı değişikliklerinden kaynaklanır (39). İkinci en sık neden *APOB* heterozigot mutasyonlarıdır (%5). Bu gende özellikle 'Arg3527Gln'

mutasyonu sıklıkla görülmektedir. Hastalarda fenotip *LDLR* mutasyonu saptananlara göre bir miktar daha hafif seyretmektedir (6). Mutasyon saptanabilen hastaların yaklaşık %1-3'lük kısmında ise etken *PCSK9* heterozigot mutasyonlarıdır. Bu gende saptanan mutasyonlar diğer ikisinin aksine fonksiyon kazanımı sonucunda hastalığa neden olur. Klasik olarak ailesel hiperkolesterolemi tanımı bu üç genin heterozigot mutasyonları için kullanılmaktadır. Literatürde, Heterozigot Ailesel Hiperkolesterolemi (*Heterozygote Familial Hypercholesterolemia*) bu üç gen mutasyonuna bağlı ortaya çıkan fenotip için kullanılır ve 'HeFH' olarak da kısaltılır. Yine bu üç genin homozigot mutasyonları da biçimde aynı hastalığın daha ağır fenotipi ile ilişkilidir ve Homozigot Ailesel Hiperkolesterolemi (*Homozygous Familial Hypercholesterolemia*) olarak adlandırılır ve 'HoFH' olarak kısaltılmaktadır. Fakat, son dönemde ailesel hiperkolesteroleminin moleküler temelini, klasik olarak literatürde tanımlanandan daha geniş ve kompleks olduğu ortaya çıkmıştır (6). 'HeFH' dışında, nadir olarak birkaç ailede *APOE* heterozigot mutasyonları fenotiple ilişkili olarak bildirilmiştir. Ayrıca, resesif *LDLRAP1* geni mutasyonları da ailesel hiperkolesteroleminin resesif formuna neden olmaktadır ve hastalarda nadir nedenlerden birisi de bu genin mutasyonlarıdır. *LIPA* ve *ABCG5/8* resesif mutasyonları da ailesel hiperkolesterolemi ile benzer fenotipler ile ilişkilendirilmiştir ve ayırıcı tanıda yer almaktadırlar. Bunun dışında mutasyon saptanamayan bireylerde yeni monogenik gen arayışları devam etmekle birlikte, bu grupta büyük oranda poligenik etkenlerin belirleyici olduğu görüşü ön plana çıkmıştır (11). Poligenik formun hem aile içinde kalıtım oranı açısından, hem de KVH riski bakımından monogenik forma göre farklılık göstermesi nedeni ile bu iki formun ayrılması genetik danışma, hastalığın yönetimi ve aile bireylerine genetik test gerekliliğinin belirlenmesi açısından önemlidir (10).

2.7.1. Ailesel Hiperkolesterolemide Bulgular, Tanı ve Tedavi

Ailesel hiperkolesterolemi, yüksek kolesterol düzeylerine ikincil olarak, erken dönem KVH riskinin artması sonucunda, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bir hastalıktır (7). Genelde, erişkinlerde LDL-K > 190 mg/dl, çocuklarda ise LDL-K düzeyleri >160 mg/dl üzerinde olan bireylerde, özellikle ailede ya da bireyde koroner arter hastalığı öyküsü var ise ailesel hiperkolesterolemiden şüphelenilmelidir (7).

KVH grubu içinde özellikle koroner arter hastalığı riski artmıştır. Koroner arter hastalığı asemptomatik seyredildiği gibi klinikte sıklıkla karşımıza akut koroner sendrom formunda (miyokard enfarktüsü veya unstabil anjina) çıkmaktadır (40). Akut koroner sendrom, koroner damarlarda bulunan aterom plaklarında yapısal bozulma ve buna ikincil olarak gelişen trombüs sonucunda damarın tamamen ya da parsiyel olarak tıkanması sonucu meydana gelir (41). Hastalarda, göğüs sol tarafında sol kola ve çeneye doğru yayılan lokalize edilemeyen ağrı, nefes darlığı, bulantı-kusma gibi bulgular, elektrokardiogramda ST segment elevasyonu veya depresyonu, T dalgasında inversiyon gibi iskemiye bağlı bulgular ve kanda kardiyak enzim düzeylerinde yükselme görülebilir. Akut koroner sendrom gelişmeyen fakat iskemiden şüphelenilen durumlarda egzersiz stres testi, ilaçla stres testi, radyonüklid miyokardiyal perfüzyon görüntülemesi gibi yaklaşımlarla hastalara KAH teşhisi konulabilmekte ve bu hastaların tanı ve revaskülarizasyon için yönlendirilmesine olanak sağlamaktadır (42). Anatomik olarak vasküler stenozun gösterilmesinde ve değerlendirilmesinde koroner BT anjiyografi önemli yer tutan noninvaziv bir yöntemdir. Bu yöntemin dezavantajı stenozun fizyolojik öneminin saptanamamasıdır (43). Koroner arter hastalığında tanı için altın standart, invaziv bir yöntem olan koroner anjiyografidir (44).

Ailesel hiperkolesterolemide kolesterol düşürücü tedavi almayan hastalarda, erkekler için 50 yaşından önce, kadınlar için ise 60 yaşından önce KAH'a bağlı kardiyak olay (Miyokard enfarktüsü) geçirme riski %30-50 arasındadır (39). LDL-K düzeyleri >190 mg/dl olan ve heterozigot ailesel hiperkolesterolemi (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9* mutasyonlarına bağlı) saptanması durumunda sağlıklı gruba göre koroner arter hastalığı riskinin 22 kat arttığı, mutasyon saptanmayan bireylerde ise 6 kat arttığı bildirilmiştir (7). 50 yaş altında miyokardiyal enfarkt (MI) geçiren erkeklerde ve 60 yaş altı MI geçiren kadınlarda yapılan moleküler çalışmalarda %2 kadarında *LDLR* mutasyonu saptanmıştır. Bununla birlikte, 45 yaş altında MI geçiren erkeklerin % 20 kadarının ailesel hiperkolesterolemi olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (45). Ailesel hiperkolesterolemide iskemik inme riskinin artıp artmadığı konusu ise tartışmalıdır. Literatürde normal popülasyona göre riskin artmadığına yönelik yayınlar mevcuttur (46, 47). Perifer arter hastalığı riskinde ise artış olduğu bildirilmiştir (48).

Ailesel hiperkolesterolemi hastalarında, KAH dışında kolesterol yüksekliği ile ilişkili fizik muayene bulgularına rastlanabilir. Homozigot ailesel

hiperkolesterolemide daha yüksek oranda görülmekle birlikte hastaların bir kısmında ksantomalar görülür. Ksantomalar, özellikle elin ekstansör yüzeyi, bilekler, dirsekler, dizin tendon yapılarında ve aşil tendonunda karşımıza çıkan ve histolojik olarak lipid yüklü makrofajların (köpük hücreleri) birikimi ile meydana gelen yuvarlak, düzgün sınırlı, ağrısız ve yavaş büyüyen, sarı-turuncu renkli kitlelerdir (49). Ksantalezma ise göz çevresinde görülen ksantoma benzeri yapılara verilen addır. Fakat tendon ksantomalarının aksine bu bulgu, normolipidemik bireylerde de görülebilir. Tarihsel olarak ailesel hiperkolesterolemi hastalarında %30-50 oranında ksantoma saptandığı bildirilse de artan kolesterol düşürücü tedaviler sonucunda prevalansın düştüğü bildirilmiştir (50). Ksantomalar, tedavi olmayan ve yaşı ileri hastalarda daha sık görülür ve tendon ksantoma yaygınlığı ile koroner ateroskleroz yaygınlığı arasında korelasyon mevcuttur (7). Korneal arkus, korneada görülen halkasal şekilli gri-beyaz renkte lipid depozitlerdir yaşlı bireylerde sıklıkla bulunur. Bu nedenle, özellikle 35 yaş altında görüldüyse veya 50 yaş altında tam halka formasyonu ortaya çıktıysa, ailesel hiperkolesterolemiden şüphe edilmesi gereklidir (51).

Ailesel hiperkolesterolemi tanısı için kullanılan birden fazla kriter mevcuttur ve bu konuda bir konsensus yoktur (7). Genel anlamda tüm kriterler; LDL-K ya da TK yüksekliği ile birlikte aile öyküsü, KAH, ksantoma ve korneal arkus gibi muayene bulguları ve üç genden en az birinde (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*) mutasyon varlığı gibi parametrelerin kombinasyonları ile oluşturulmuştur. Tanıda kullanılan kriterler Tablo 2.6.'da ayrıntılı şekilde gösterilmiştir. Bunlar arasında en çok parametreyi kullanan *Dutch Lipid Network Criteria* (DLCN) kriteridir. *Simon Broome* Kriteri patojenik mutasyon varlığını tek başına tanı için yeterli gören tek kriterdir. DLCN kriterinde ise, patojenik mutasyon varlığında kesin tanı için ek bir bulgu da gereklidir. Bir çalışmada, ailesel hiperkolesterolemi şüphesi olan çocuklarda mutasyon taraması yapılmış ve daha sonra DLCN, *Simon Broome* ve US MedPed kriterleri ile hastalara ne derece doğru tanı konulabildiği araştırılmıştır. Sonuç olarak hiçbirinin optimal tanısal kriter olmadığı görülmüş, aralarında en sensitif ve spesifik olanın *Simon Broome* Kriterleri olduğu saptanmıştır (52). Tanı kriterlerinin optimal olmamasına paralel olarak, ailesel hiperkolesterolemili bireylerin bir çoğuna tanı konulamamaktadır. Buna bağlı olarak, hastalığın komplikasyonları nedeni ile morbidite ve mortalite görülmektedir (7). Özellikle mutasyon pozitif hastalarda, genel popülasyona ve mutasyon negatif

hastalara göre artmış KVH riski nedeni ile genetik tanı, hastaların takibi ve tedavisi açısından önemlidir. NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*) rehberine ve *Simon Broome* Kriteri'ne göre muhtemel ya da kesin ailesel hiperkolesterolemi olan bireylerde veya DLCN kriterine göre >5 puan alan bireylerde ailesel hiperkolesterolemi genetik tanısına yönelik testlerin yapılması önerilmektedir(53).

Tablo 2.6. Simon Broome, DLCN ve US MedPed Kriterleri

Simon Broome Kriteri	
<p>1). <16 yaş→ LDL seviyesi: >155mg/dl ya da total kolesterol : >260mg/dl</p> <p>>16 yaş→ LDL seviyesi: >190mg/dl ya da total kolesterol : >290mg/dl</p> <p>(Tedavi öncesi değerler ya da tedavi süresince en yüksek değer)</p>	<p>Minimum 1+2 veya Tek başına 3. kriteri karşılıyor ise;</p> <p>Kesin Ailesel Hiperkolesterolemi</p>
2). Tendon ksantomaları (Hastada ya da 1. ya da 2.derece akrabada)	
3). Patojenik <i>LDLR</i> ya da <i>APOB</i> ya da <i>PCSK9</i> mutasyonu	
4). Ailede MI öyküsü (1.derece akraba <60 yaş, ya da 2.derece akraba <50 yaş)	<p>Minimum 1+4 veya 1+5. kriterleri karşılıyor ise;</p> <p>Muhtemel Ailesel Hiperkolesterolemi</p>
5). Ailede 1. ya da 2. derece akrabada total kolesterol yüksekliği öyküsü:	
<16 yaş→ total kolesterol: >260mg/dl	
>16 yaş→ total kolesterol: >290mg/dl	
DLCN Kriteri	
Değerlendirilen Parametre	Puan
Aile Öyküsü	
Birinci derece akrabada prematür KVH (Erkek<55 yaş, kadın<60 yaş) YA DA , birinci derece akrabada LDL-K düzeyi >95 persentil	1
Birinci derece akrabada tendon ksantoması ve/veya arkus kornealis YA DA , LDL-K Düzeyinin <18 yaş çocuklarda 95.persentilin üzerinde olması	2
Kişisel Öykü	
Hastanın kendisinde prematür koroner arter hastalığı (Erkek<55 yaş, kadın<60 yaş)	2
Hastanın kendisinde prematür serebral ya da periferik vasküler hastalık (Erkek<55 yaş, kadın<60 yaş)	1

Tablo 2.6. (Devamı) Simon Broome, DLCN ve US MedPed Kriterleri

Klinik Muayene				
Tendon ksantoması				6
45 yaştan önce arkus kornealis saptanması				4
LDL-K Düzeyi				
LDL-K > 330 mg/dl				8
LDL-K, 250-329 mg/dl				5
LDL-K, 190-249 mg/dl				3
LDL-K, 155-189 mg/dl				1
<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> veya <i>PCSK9</i> patojenik mutasyon varlığı				8
Toplam puan : >8 ise, KESİN / 6-8 ise MUHTEMEL / 3-5 ise OLASI / <3 ise OLASI DEĞİL				
US MedPed Kriteri				
Yaş	Birinci derece akrabada AH	İkinci derece akrabada AH	Üçüncü derece akrabada AH	Genel Popülasyon
<20	TK sınır- 220 mg/dl	TK sınır- 230 mg/dl	TK sınır- 240 mg/dl	TK sınır- 270 mg/dl
20-29	TK sınır- 240 mg/dl	TK sınır- 250 mg/dl	TK sınır- 260 mg/dl	TK sınır- 290 mg/dl
30-39	TK sınır- 270 mg/dl	TK sınır- 280 mg/dl	TK sınır- 290 mg/dl	TK sınır- 340 mg/dl
≥40	TK sınır- 290 mg/dl	TK sınır- 300 mg/dl	TK sınır- 310 mg/dl	TK sınır- 360 mg/dl
Eğer ailede Ailesel Hiperkolesterolemi (AH) tanısı varsa, TK sınır değerleri yukarıdaki gibidir. Hasta, yaşına ve aile öyküsüne göre bu miktarın üzerinde değerlere sahipse tanı alır. Eğer ailede AH yoksa genel popülasyon sınır düzeyini geçen değerleri varsa tanı alır.				

Klinik olarak ailesel hiperkolesterolemi tanısı alan hastaların bir kısmı da aslında benzer bulgulara sahip başka hastalıklar ile karşımıza çıkabilmektedir (39). Ailesel hiperkolesterolemi ayırıcı tanısına giren hastalıklar ve özellikleri Tablo 2.7.'de ayrıntılı şekilde verilmiştir. Genel olarak bu hastalıklar laboratuvar bulguları ya da klinik bulgular ile ailesel hiperkolesterolemi ile benzer olmakla birlikte, ayırıcı özellikleri de mevcuttur.

Tablo 2.7. Ailesel Hiperkolesteroleminin Ayırıcı Tanısında Yer Alan Durumlar

Tanı	Ayırt Edici Özellik
İkincil Hiperkolesterolemiler (Hastalık, İlaç vb.)	Duruma spesifik hikaye özellikleri
Ailesel Kombine Hiperlipidemi	Ailede farklı karışık hiperlipidemi öyküsü, izole TG yükseliği, izole LDL-K ya da ikisinin birlikte olduğu bireyler, TG yüksekliği daha baskın olabilir
Disbetalipoproteinemi	TG yüksekliği baskın, elektroforezde geniş pre-beta bandı
Sitosterolemi	Kalıtım şekli resesiftir ve hastalarda bitki kaynaklı sterolden fakir diyetle kolesterol düzeyleri düşer
Yüksek Lipoprotein(a) (Lpa)	Lpa yüksekliği MI ile ilişkilidir. Kolesterol miktarı ailesel hiperkolesterolemi düzeyinde olmayabilir.

Ailesel hiperkolesterolemi tedavi edilebilir bir hastalıktır ve tedavide asıl amaç kolesterol düzeylerinin düşürülmesidir. Rehberlere göre mutasyon pozitif (HeFH ya da HoFH) hastalarda tedavi hedefleri: Semptomatik koroner arter hastalığı olan ya da Tip 2 Diyabet olan bireylerde LDL-K<70 mg/dl, semptomu bulunmayan erişkinlerde LDL-K<100 mg/dl ve çocuklarda LDL-K<135 mg/dl olarak belirtilmektedir (54, 55).

Bu amaçlar doğrultusunda, birçok farklı tedavi seçeneği mevcuttur ve halen geliştirilmeye devam etmektedir. Günümüzde geleneksel tedavilerin yanında, monoklonal antikolar, *anti-sense* oligonükleotid tedaviler ve potansiyel gen terapileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (56, 57). Hastalarda ilk basamakta, hayat tarzı ve beslenme değişiklikleri ile birlikte, farmakolojik olarak statinler ilk basamakta kullanılmaktadır. Statinler Hücre içinde kolesterol sentezini engelleyerek, *LDLR* ekspresyonunun artmasına neden olurlar. Hastalara tolere edilebilen maksimum statin tedavisi başlanması önerilmektedir (55). Buna rağmen birçok hastada hedeflenen değerlere ulaşamaz. Statin yan etkileri gelişen kişilerde veya statin tedavisi ile hedeflenen LDL-K düşüşü olmayan bireylerde, Ezetimib ilk basamakta kullanılan tedavidir (56). Ezetimibin etki mekanizması, bağırsakta NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1*) inhibisyonu yaparak kolesterolün emilimini azaltmaktır. Bu etkisi ile *LDLR* ekspresyonunu artırır. Statin+ezetimib kombinasyonunun izole statin tedavisine göre LDL-K düzeyini anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir. Bu tedavilere rağmen LDL-K hedeflerine ulaşamayan hastalarda PCSK9 inhibitörleri (monoklonal antikolar) kullanılabilir. Bu ajanların ana etki mekanizması *LDLR* yıkımının azaltılmasıdır. Özellikle kliniğin daha şiddetli seyrettiği homozigot ailesel

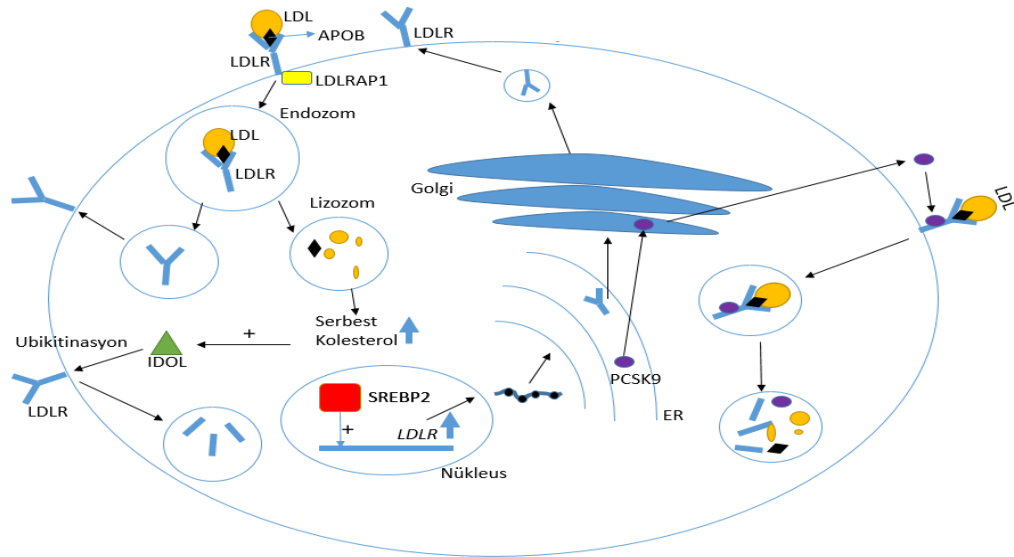
hiperkolesterolemi (HoFH) tedavisinde hedeflere ulaşmada etkili olabilir. Fakat *null* mutasyon taşıyan HoFH hastalarında etkili değildirler. Bunlar dışında, bir diğer tedavi yöntemi de APOB içeren lipoproteinlerin üretimini azaltmaktır. APOB mRNA ile bağlanarak yıkımını sağlayan, antisens oligonükleotid Mipomersen ve MTP inhibitörü Lomitapid, LDLR bağımsız bir mekanizma ile etki gösterdikleri için özellikle diğer tedavilere yanıtı az HoFH grubunda kullanılabilen alternatif tedavilerdir. Özellikle, LDLR *null* mutasyona sahip HoFH grubunda medikal tedavilere yanıtın az olması nedeni ile yeni tedavi arayışları devam etmektedir. Vektör aracılı gen tedavilerinin bu tip hastalarda bir alternatif olabileceği düşünülmektedir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir (58). Medikal tedavinin yeterli olmadığı bireylerde ise lipid aferezi diğer tedavilerle kombine olarak uygulanmaktadır (56).

2.8. Monogenik Ailesel Hiperkolesterolemiler

2.8.1. LDLR Proteininin Görevi, Hücre İçi Döngüsü ve Düzenlenmesi

LDLR proteini hepatositler başta olmak üzere birçok farklı hücre yüzeyinde bulunur. Fonksiyonel olarak APOB ve APOE için ligand görevi gören bu reseptör, LDL parçacıklarının da hücre içine alınması için gereklidir (4). Hücrenin LDLR miktarı temel olarak hücre içindeki kolesterol seviyeleri ile düzenlenir. Hücre içinde kolesterol seviyeleri düştüğünde SREBP2 (*sterol regulatory element-binding protein-2*) ER'den Golgi cisimciğine gönderilir ve burada proteolitik işlemler sonucunda işlevsel hale gelir. Daha sonra çekirdeğe giderek *LDLR* ve bunun yanında kolesterol biyosentezinde görevli bazı genlerin transkripsiyonunu artırır. LDLR reseptörleri sentezlendikten sonra ER lümenine aktarılırlar ve ardından Golgi cisimciğinde N ve O glikolizasyona uğrayarak olgun hale gelip, hücre yüzeyine gönderilirler. LDL parçacıkları APOB aracılığı ile LDLR'ye bağlanır ve LDL-LDLR kompleksi hücre içine endositoz yardımı ile alınır. Hücre içine alınan LDL-LDLR içeren endozomlarda pH düştükçe LDLR ligand-reseptör kompleksinden ayrılır ve hücre yüzeyine tekrar dönerek kullanıma hazır hale gelir. LDLR yüzden fazla kez geri dönüşüme uğrayarak kullanılabilir (6). Endozom içinde kalan LDL parçacıkları ise lizozomal enzimler yardımı ile parçalanır ve ortaya çıkan serbest kolesterol miktarının artması ile birlikte LDLR'nin yıkımı da artar. Yıkımın artması iki biçimde meydana gelir. Bunlardan ilki LXR (*Liver X Receptor*) aracılı yoldur. LXR bir nükleer sterol bağımlı bir

transkripsiyon faktörüdür (59). Hücre içinde artan serbest kolesterole ikincil olarak bazı proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesini sağlar. LXR aracılığı ile ABCA1 ve ABCG1 proteinlerinin ekspresyonunu artırarak hücre dışına kolesterol pompalanmasını ve tersine kolesterol taşınması teşvik edilir. LDLR üzerine asıl etkisini ise IDOL aracılı sağlar. Bu protein sayesinde, LDLR ubikitinasyona uğrar ve yıkıma gider. Bir diğer yol ise PCSK9 aracılı yoldur (60). PCSK9 hücre yüzeyinde LDLR ile kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre içine alınır ve endozomlar meydana gelir. Fakat PCSK9 ile kompleks halinde olan LDLR geri dönüşüme uğrayamaz ve lizozomlarda yıkılır. Bunun nedeni tam net bilinmese de PCSK9'un LDLR ile bağlanması sonucunda LDLR'de meydana gelen yapısal değişikliklerin, LDLR'nin kompleksi terk edip hücre yüzeyine geri dönmesini engellediği yönünde görüşler mevcuttur. LDLR hücre içi döngüsü ve düzenlenmesi Şekil 2.6.'da özetlenmiştir.



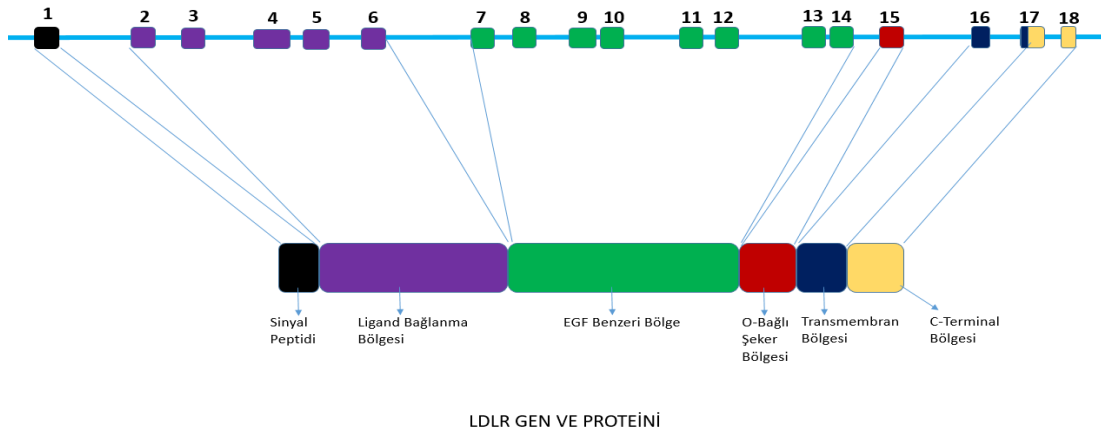
Şekil 2.6. LDLR hücre döngüsü ve düzenlenmesi.

2.8.2. LDLR Geni ve Mutasyonlarının Etkileri

LDLR geni 19. kromozomun kısa kolunda yer alır, yaklaşık 45 kilobaz uzunluğunda ve sinyal peptidi ve 5 adet fonksiyonel protein bölgesi (domain) kodlayan, 18 ekzonu içeren bir gendir (4). Şekil 2.7.'de bölgeler ve genin yapısı özetlenmiştir. Bu bölgeler: Sinyal peptidi, Ligand bağlanma bölgesi, EGF-benzeri bölge, O-bağlı şeker bölgesi, Transmembran bölgesi ve Sitoplazmik bölgedir. Sinyal peptidi ilk ekzon tarafından kodlanmaktadır. Bu bölge proteinin translasyon sırasında

ER lümenine yönlendirilmesinde rol oynar ve sentezlenen protein ER lümenine aktarıldıktan sonra bu bölge kesilir. *LDLR* mutasyonlarının yaklaşık %5'i sinyal peptid bölgesini kodlayan 1. ekzonu etkiler. Ligand bağlanma bölgesi ise 2-6. ekzonlar tarafından kodlanır. Bu bölge, sisteinden zengin 40 aminoasitlik 7 adet sıralı tekrardan meydana gelmektedir. APOB ve APOE proteinlerinin bağlanması için gereklidir. Ailesel hiperkolesterolemiye neden olan *LDLR* mutasyonlarının yaklaşık %40'ı bu bölgeyi kodlayan ekzonlarda saptanmaktadır. Ekzon 7-14 ise EGF-benzeri bölgeyi kodlamaktadır. Bu bölge EGF (*Epidermal Growth Factor*) geni ile dizi bakımından %33 benzerlik gösterdiği için bu şekilde adlandırılmaktadır. İleride de bahsedileceği üzere PCSK9 proteini bu bölgeye bağlanarak LDLR geri dönüşümünü azaltacak şekilde işlev görür. Bu bölge delesyona uğradığında LDL, LDLR'ye bağlanamazken, APOE aracılı olarak kalıtlar (IDL, ŞL kalıtları) reseptöre bağlanabilir, fakat endozom içinde LDL-LDLR kompleksinin birbirinden ayrılması ve bu şekilde LDLR'nin geri dönüşüme uğraması ise gerçekleşmez (61). Ailesel hiperkolesterlemi ilişkili mutasyonların yaklaşık %50'den fazlası bu bölgeden kaynaklanır (62). Ekzon 15 tarafından kodlanan bölge ise serin ve treonin aminoasitleri bakımından zengin ve karbonhidrat zincirleri için bağlanma noktaları içeren bölgedir. Bu bölge türler arası korunmamış bir bölge olmasa da bazı çalışmalar sonucunda karbonhidrat zincirlerinin LDLR stabilizasyonu için gerekli olduğu saptanmıştır (63). Ekzon 16 ve ekzon 17'nin 5' bölgesi 22 aminoasitlik bir bölge olan transmembran bölgesini kodlar ve bu bölge reseptörün hücre zarına tutunması için elzemdir (4). Ekzon 17'nin 3' bölgesi ve ekzon 18'in 5' bölgesi ise sitoplazmik bölgeyi kodlar. Bu bölge LDLR'nin hücre yüzeyine yönlendirilmesini ve klatriin kaplı çukurcularda lokalize olmasını sağlayan sinyal sekanslarını içerir (64). Ayrıca, *LDLR* 5' bölgesinde de ailesel hiperkolesterlemi ilişkili mutasyonlar bildirilmiştir, bu bölge *LDLR* transkripsiyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesidir (65).

LDLR mutasyonları, proteinin fonksiyonunu etkileme durumuna göre sınıflandırılmıştır. Bu mutasyonlar 5 sınıfta toplanmıştır (66). Sınıflamalar Tablo 2.8.'de detaylandırılmıştır.



Şekil 2.7. LDLR geni ve protein bölgeleri. Üstte *LDLR* geni ekzonları numaralandırılmış ve kodladıkları bölgelere göre renklendirilmiştir. Altta protein bölgeleri temsili olarak gösterilmiştir.

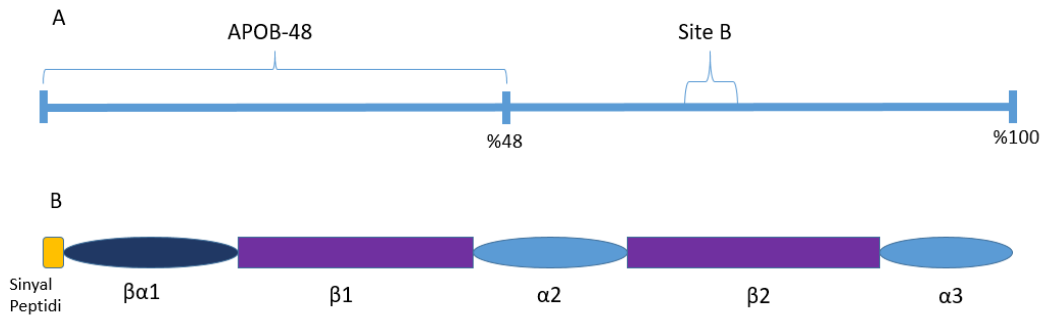
Tablo 2.8. *LDLR* Mutasyonlarının Fonksiyonel Sınıfları

Sınıf-1 Mutasyonlar	Protein yok
Sınıf-2 Mutasyonlar	Protein var, 3 boyutlu yapı bozuk hücre içinde yıkılır, yüzeye çıkamaz
Sınıf-3 Mutasyonlar	Protein hücre yüzeyine çıkar, ligand ile bağlanmasında sorun var
Sınıf-4 Mutasyonlar	Protein, ligand ile bağlanır, hücre içine alımda sorun var
Sınıf-5 Mutasyonlar	Protein-ligand kompleksi hücreye alınır, proteinin geri dönüşümünde sorun var

2.8.3. *APOB* Geni, Proteini ve Mutasyonları

APOB geni 2. kromozomun kısa kolunda bulunan, 43 kilobazlık bir uzunlukta ve 29 ekzonu bulunan bir genidir (67). *APOB* proteini daha önce de bahsedildiği gibi karaciğer ve bağırsakta iki farklı formda sentezlenir (*APOB*-100 ve *APOB*-48). *APOB*'nin tam uzunluktaki formu 27 amino asitlik sinyal peptidi hariç, 4536 amino asitten oluşmaktadır. *APOB*; LDL, VLDL ve VLDL kalıtlarında bulunmaktadır ve bu partiküllerin hücre içine alınarak metabolize edilmesi için LDLR'nin ligandı olarak görev yapan proteindir. *APOB*'nin özellikle C-terminal ucu LDLR ile bağlantı kurması için önemlidir. Özellikle 'Site B' 3359-3369. aminoasitler bu bağlanma için çok önemlidir ve türler arasında oldukça korunmuştur. Bu bölge, *APOE* proteininin LDLR bağlanma bölgesi ile benzerlik gösterir. Amino terminaline yakın olan *βal* bölgesi *APOB*'nin sentezi ve lipoprotein oluşumu için gerekli bir protein olan MTP'nin bağlanma bölgesidir. *APOB* geninde özellikle proteinde erken terminasyona neden olan mutasyonlar *APOB* içeren lipoprotein sentezini bozarak ailesel hipobetalipoproteinemiye neden olmaktadır. Karboksi terminale yakın ve ligand

bağlanma bölgesini etkileyen mutasyonlar ise ailesel hiperkolesterolemiye neden olurlar. Özellikle bazı avrupa toplumlarında *APOB* ilişkili hiperkolesterolemi daha sık görülmektedir (4). Hastalıkla ilişkili en sık saptanan mutasyon ‘Arg3527Gln’ değişikliğidir. Bunun dışında yine ‘Arg3527Trp’ ve ‘Arg3558Cys’ mutasyonlarının da hastalıkla ilişkili olduğu ve LDL’nin LDLR’ye bağlanmasını bozduğu saptanmıştır. Fakat, fonksiyonel çalışmalarda ‘Arg3558Cys’ mutasyonunun LDLR’ye bağlanmayı normalin yaklaşık %70’ine kadar düşürdüğü ve tek başına hastalık yapamayacağı düşünülmektedir (68). Ailesel hiperkolesterolemi ilişkili *APOB* mutasyonları genel olarak ligand bağlanma bölgesi içinde saptandığı için, öncelik olarak 26. ekzonun bir kısmına ve 29. ekzona yönelik testler yapılmaktadır (69). Son dönemde ise bu bölgelerin dışında da ilişkili olabilecek mutasyonlar saptanmıştır. Örnek olarak, 3. ekzonda saptanan ve etkilenmiş aile bireylerinde de saptanan ‘Arg50Gln’ değişikliğinin ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (69). Fakat, *APOB* fonksiyonunu nasıl etkilediği ve hangi mekanizma ile hastalığa neden olabileceği aydınlatılmamıştır. *APOB* proteini bölgeleri Şekil 2.8.’de özetlenmiştir.

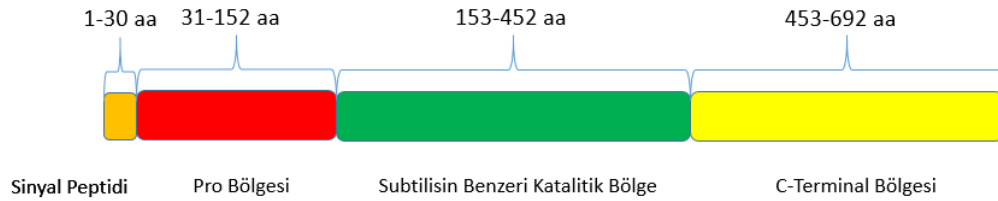


Şekil 2.8. APOB proteini bölgeleri. A: APOB proteininin iki formu APOB-48 ve APOB-100. APOB-48, LDLR bağlanma bölgesi olan *Site B*'yi içermemektedir. B: APOB proteininin fonksiyonel bölgeleri.

2.8.4. PCSK9 Geni, Proteini ve Mutasyonları

PCSK9 geni 1. kromozomun kısa kolunda yer alan ve 12 ekzon içeren bir gendir. *PCSK9* proteini, LDLR'nin EGF-benzeri bölgesine bağlanarak onun endozomdan ayrılmasına ve yıkımına neden olmaktadır (4). *PCSK9*'un hücre içinde miktarca artmasına ya da fonksiyon kazanmasına neden olan mutasyonlar ailesel hiperkolesterolemiye neden olmaktadır. EGF-benzeri bölge ile etkileşen *PCSK9* bölgesi Subtilisin-benzeri katalitik bölgedir ve ‘Asp374Tyr’ gibi bazı

mutasyonlar bu bölgeyi etkileyerek doğrudan PCSK9'un EGF-benzeri bölgeye bağlanmasını artırır ve hastalığa neden olur (70). Subtilisin-benzeri katalitik bölgede yer alan 'Arg218Ser' ve 'Phe216Leu' mutasyonlarının ise PCSK9'un LDLR'ye bağlanması ile doğrudan ilişkili olmasa da, LDLR'ye daha az bağlanan bir forma dönüşmesini engellediği ve aktif PCSK9 sayısını artırarak hastalığa neden oldukları ileri sürülmüştür (71). Ailesel hiperkolesterolemi ilişkili *PCSK9* mutasyonların büyük kısmı ise (%60) Pro ve C terminal bölgelerinde görülür (70). Pro bölgesi N-terminale yakın olan bölgedir ve bu bölgede yer alan 31-53 pozisyonlarında bulunan amino asitlerin silinmesinin PCSK9'un LDLR'ye bağlanmasını on kat ve LDLR yıkımını dört kat artırdığı gözlemlenmiştir. C-terminal bölgesinin LDLR ligand bağlanma bölgesi ile ilişkili olduğu ve düşük Ph'ta LDLR ve PCSK9'un kompleksinin ayrılmadan kalması ve lizozomal yıkım için gerekli olduğu görülmüştür. Bu bölgenin silinmesi durumunda LDLR-PCSK9 kompleksinin lizozomal yıkımının bozulduğu bildirilmiştir. Şekil 2.9.'da PCSK9 proteininin işlevsel bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 2.9. PCSK9 Bölgeleri. Proteinin bölgeleri amino asit pozisyonları ile birlikte verilmiştir, aa: Amino asit.

2.8.5. Diğer Monogenik Nedenler

APOE proteini de APOB'ye benzer şekilde lipoproteinlerin hücre içine alınarak metabolize edilmesinde önemli bir yere sahiptir. APOE çoğu lipoprotein sınıflarında bulunur ve daha önce ailesel disbetalipoproteinemi ile ilişkilendirilmiştir (4). Son dönemde iki farklı grup ailesel hiperkolesterolemi fenotipine sahip iki ailede *APOE* geninde 'c.500_502delTCC/p.Leu167del' mutasyonunu tanımlanmıştır (8).

Ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili olduğu düşünülen bir diğer gen de *STAP1* genidir. Bu genin mutasyonlarının ilk defa 2014 yılında ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili olabileceği ve hastaların fenotiplerinin klasik ailesel hiperkolesterolemilere göre daha hafif olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, *STAP1* proteininin biyolojik

fonksiyonu ile hiperkolesterolemi ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır (72). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda ise hiperkolesterolemili bireyler ile normal kolesterol düzeylerine sahip bireyler arasında, nadir *STAP1* varyantları açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (73). Ayrıca, yine 2020 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre ailesel hiperkolesterolemili hastalarda *STAP1* değişikliği taşıyan bireyler taşımayanlara göre daha düşük kolesterol düzeylerine sahip olarak bulunmuş ve *STAP1*'in LDL-K düzeylerini modifiye edici etkisi olmadığı ve ailesel hiperkolesterolemi genleri arasında sayılmaması gerektiği belirtilmiştir (9).

2.8.6. *LDLRAP1* ve Resesif Hiperkolesterolemi

Ailesel hiperkolesteroleminin resesif formu *LDLRAP1* gen mutasyonları ile ortaya çıkmaktadır. Bu gen 1. kromozomun kısa kolunda yer alan 9 ekzonlu ve 308 amino asitlik *LDLRAP1* proteinini kodlayan genidir (74). *LDLRAP1* (*Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1*) LDLR'nin hücre içinde kalan kısmı ile bağlantılıdır ve LDL-LDLR kompleksinin hücre içine alınması için gereklidir. Bu genin homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonları ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkilendirilmiştir. Heterozigot durumda ise, bireylerde kolesterol yüksekliğine neden olmamaktadır. Hastaların klinik bulguları, heterozigot (HeFH) hastalara göre şiddetli seyrederken, homozigot (HoFH) hastalarına göre daha hafiftir (4).

2.9. Poligenik Ailesel Hiperkolesterolemi

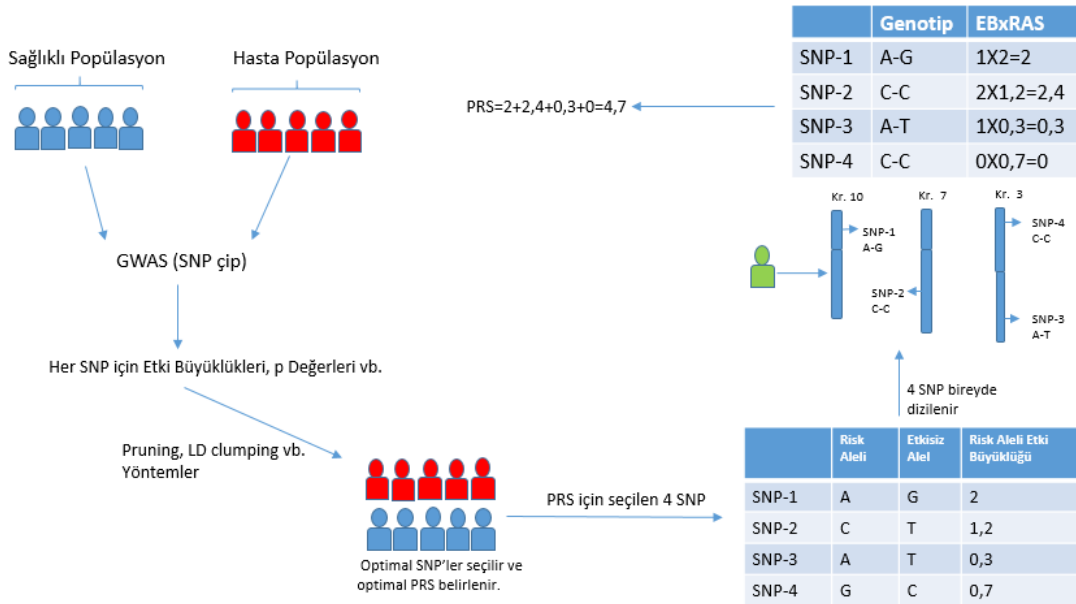
2.9.1. Poligenik Risk Skorları, Hesaplanmaları ve Kullanımları

Kompleks hastalıklar birçok farklı genetik ve çevresel etkinin etkileşimi ile ortaya çıkar (75). Kompleks hastalıkların ortaya çıkışında, etkili genetik mekanizmalardan birinin yaygın varyant yaygın hastalık hipotezi olduğu düşünülmektedir. Buna göre küçük etkili ve yaygın genetik varyantlar bir araya gelerek kümülatif etki ile fenotipin ortaya çıkmasına katkı yapmaktadır (76). Bu varyantların belirlenmesine yönelik olarak genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılmıştır. GWAS'lar sonucu elde edilen varyant bilgisinin, bireylerde hastalık risk tahminine yönelik kullanılması, poligenik risk skorlarının (PRS) geliştirilmesi ile mümkün olmuştur (77). PRS, bir bireyin sahip olduğu hastalık ya da

bir özellik için (kilo, boy, vb.) genetik yatkınlığının sayısal değer olarak hesaplanmasıdır. PRS hesaplanırken, GWAS verisinde saptanan risk alelinin etki büyüklüğü (*effect size*) gereklidir. Etki büyüklüğü, GWAS için ilgili hastalık ile risk aleli arasındaki ilişkinin gücünü gösteren sayısal değerdir. GWAS özet istatistiklerinde *Beta* ya da *odds ratio* etki büyüklüğünü temsil eder (78). Üretilen PRS'ler rastgele seçilmiş ve tercihen GWAS yapılan popülasyonu temsil eden bir örneklem grubunda değerlendirilir ve ilgili hastalığa yönelik prediktif netliği ve değeri saptanmış olur. PRS üretiminde ilk aşama GWAS verisinden SNP'lerin seçilmesidir. Bu seçim, PRS'de kullanılacak SNP setini belirler. Daha sonra PRS'nin uygulanacağı tüm bireylerde bu SNP seti genotiplenecektir. SNP setinin seçimi PRS'lerin etkinliklerini de belirleyecek ana faktör olduğu için önemlidir. Bu noktada PRS'nin etkinliğini ve prediktif değerini düşürebilecek bazı sorunlar ile karşılaşmaktadır. (78). Bu sorunlardan birisi: GWAS'ların sınırlı örneklem büyüklüğüne bağlı olarak tüm popülasyonu temsil etmemesi ve bu nedenle saptanan etki büyüklüklerinin optimal olmamasıdır. Bir diğeri ise: GWAS'ta *Linkage Disequilibrium*'un (LD) hesaba katılmaması nedeni ile SNP'lerin bağımsız etkileri doğru hesaplanmamasıdır. Bu nedenle, optimal SNP setinin seçimi yapılırken yukarıda sıralanan sorunların mümkün olduğunca kaçınılmaya çalışılmaktadır. Optimal seçim için farklı metotlar kullanılmaktadır (78). Klasik yöntemde sadece GWAS'ta genom boyu istatistiksel anlamlı p değerine ulaşan SNP seti PRS için kullanılır. Bu şekilde LD sorunundan mümkün olduğunca kurtulunur ve genom boyu istatistiksel önem sınırını geçemeyen SNP'lerin etki büyüklükleri (*Beta* veya *Odds*) hesaba katılmaz. Bunun dışında, *p-thresholding*, *LD clumping* + *p-thresholding* gibi metotlar kullanılmaktadır. *P-thresholding*, PRS için seçilecek optimal SNP setini belirlerken, GWAS verisinde farklı p değerlerini sınır olarak kullanarak, o değerinin altında kalan SNP'lerin seçilmesidir. Örnek olarak, GWAS'ta önce $p < 0,01$ değerine sahip bir SNP seti ile PRS oluşturulur. Daha sonra p sınır değeri $< 0,05$ çekilerek ikinci bir PRS oluşturulur. Bunlardan hangisinin daha etkili olduğu örneklem grubunda karşılaştırılır ve aralarından daha yüksek etkinliğe sahip PRS seçilir. *LD clumping* ise, genotipleme yapıldıktan sonra LD pencereleri oluşturularak, bu pencereler içinde en düşük p değerine sahip SNP'lerin skorda kullanılmak üzere seçilmesidir. LD bilgisinin de işin içine katılmasını sağlayan yöntemdir. Ayrıca, GWAS'ta saptanan etki büyüklüklerinin

LD'yi de hesaba katarak düzenlenmesini sağlayan LDpred, Lassosum gibi algoritmalarla da PRS'lerin prediktif değerleri artmaktadır (79, 80). PRS için kullanılacak SNP seti seçildikten sonra, ilk olarak bir örneklemede tüm bireylerde bu PRS hesaplanır. Hesaplama sonrasında, ilgili hastalık veya özellik için varyansın ne kadarını açıkladığı gibi sorular bu örneklem grubunda hesaplanır. Bu şekilde PRS'ler hasta kohortları için kullanılabilir hale gelmiş olur.

Kişisel düzeyde PRS hesaplanırken, ilk olarak PRS'de kullanılacak SNP seti genotiplenir. Daha sonra ortaya çıkan genotiplerde GWAS'ta saptanan risk aleli var ise o risk alelinin etki büyüklüğü kadar skora ekleme yapılır. Örnek olarak: ilgili pozisyonda risk aleli heterozigot durumda ise 1 X etki büyüklüğü skora eklenirken, risk aleli homozigot durumdaysa 2 X etki büyüklüğü skora eklenir. Bu işlem PRS'de kullanılan her SNP için yapılır ve çıkan sonuçlar toplanarak PRS elde edilir. Sonuçta birey, risk aleli genotipine göre bir skor elde etmiş olur. Şekil 2.10.'da genel olarak PRS hesaplaması özetlenmiştir.



Şekil 2.10. PRS'nin üretiminden hesaplanma aşamasına kadar kısa özeti. Kr.: Kromozom, GWAS: Genom boyu ilişkilendirme çalışması, PRS: Poligenik risk skoru, SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*, EB: Etki büyüklüğü, RAS: Risk alel sayısı.

PRS'ler kanserler, KVH, diyabet gibi birçok yaygın hastalık için üretilmiş ve üretilmeye devam edilmektedir. Rutinde tanıda kullanılmamakla birlikte, potansiyel olarak farklı kullanım alanları mevcuttur (81). PRS'ler ya da PRS'ler ile bilinen risk

faktörlerinin (biyobelirteçler, yaş, cinsiyet vb.) birleştirilmesi ile oluşturulabilecek entegre risk modellerinin (*integrated risk model*); hastalık risk tahminleri, hastalığın tanısının konulması ya da alt sınıflandırmalarının yapılması, hastalığın prognoz ve tedaviye yanıtının tahmini gibi alanlarda kullanılabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar klasik risk faktörleri ile PRS'ler kombine edildiğinde risk tahminlerinin geliştiğini göstermektedir (77). Bunlar dışında, özellikle toplum taramaları yapılan hastalıklarda kullanılabilir: Örnek olarak kolorektal kanserlerde tarama programlarında bireyler PRS yüksekliğine göre öncelik sırasına konulabilir. BRCA1 mutasyonu olan hastalarda yüksek PRS'si olan bireylerde daha erken yaşlarda taramalar başlatılabilir. Bu potansiyellerin yanında, günümüzde PRS'lerin dezavantajlı tarafları da mevcuttur. Günümüzde, kullanılan PRS'lerin bireysel düzeyde prediktif değerleri kısıtlıdır (77). Bunlardan bir tanesi PRS'lerin heritabilitenin sadece kısıtlı bir düzeyi hakkında bilgi vermesidir. Ayrıca, PRS'in prediktif değeri, bir hastalığa yönelik GWAS'ın yapıldığı ve PRS'in oluşturulduğu popülasyonlar benzer ise artarken, diğer popülasyonlarda aynı PRS'in prediktif değeri oldukça düşebilir (78). Hastalığın heritabilitesi de PRS etkinliği açısından önemlidir. Düşük heritabiliteye sahip hastalıklarda etkinlik daha sınırlıdır.

Sonuç olarak, PRS'ler gelecekte, doğrudan tanı amaçlı kullanılmaktan çok, toplum bazlı olarak halk sağlığı sisteminin bir parçası olarak kullanılabilir. Bireylerin genotipleri oluşturularak PRS veri tabanları kurulabilir ve birden fazla hastalıkta risk profilinin çıkarılması ve hastalıklarda tarama, tedavi planlanması gibi konularda yardımcı olması beklenebilir (77).

2.9.2 Ailesel Hiperkolesterolemide Poligenik Risk Skorları

Ailesel hiperkolesterolemi tanısı alan hastaların yaklaşık ortalama %40-60'ında bilinen genlerde patojenik mutasyon saptanmamaktadır (10). Bu grupta yeni gen arayışları devam etmekle birlikte, hastaların çoğunluğunda küçük etkili ve yaygın varyantların birikerek kümülatif etki ile fenotipe yol açtığı düşünülmektedir (6, 10, 11, 13, 82). Bu durumu kanıtlar nitelikte, kolesterol düzeylerini etkileyen SNP setleri seçilerek yapılan farklı PRS'lerde mutasyon saptanamayan grupta skor düzeyleri kontrol örneklemelerine göre yüksek bulunmaktadır. Bir çalışmada, mutasyon negatif

hastaların %80'inden fazlasının, poligenik nedenlere bağlı olarak ailesel hiperkolesterolemi fenotipine sahip olabileceği belirtilmiştir (12).

Ailesel hiperkolesterolemide poligenik etiyolojinin rolünün gösterilmesi için, ilk olarak 12 adet SNP içeren bir PRS oluşturulmuştur (10). 12 SNP, GWAS'ta p değeri 5×10^{-8} altında olan genom boyu öneme sahip SNP'ler arasından seçilmiştir. Bu çalışmada kontrol örneklemini olarak *UK Whitehall II Study* grubundan bireyler kullanılmıştır. Buna karşılık hasta grubu olarak İngiltere ve Belçika'dan ailesel hiperkolesterolemi hastaları toplanmıştır. Yapılan analizlerde bu skorun, kontrol grubu içindeki bireylerde LDL-K konsantrasyonundaki değişimin %11'ini açıkladığı görülmüştür. Ayrıca, mutasyon negatif hasta grubunun skor ortalamasının, mutasyon pozitiflere ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular sonucunda araştırmacılar, mutasyon negatif ailesel hiperkolesterolemi grubunda hastalığın özellikle, skoru 0.73 değerinin üzerindeki bireyler için poligenik kaynaklı olduğunu düşünmüşlerdir. Bu değer altındaki bireyler için ise altta yatan monogenik bir neden olabileceğinden bahsedilmiştir. Bu çalışmada ayrıca mutasyon pozitif bireylerin PRS ortalaması da kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre, monogenik hastalığın ortaya çıkmasında ve değişken ekspresyonda, poligenik etiyolojide rol oynayan SNP'lerin etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Mutasyon pozitif ailelerde, aynı mutasyonu taşıyan aile bireyleri arasında ekspresyon farklılıkları görülmesinin, poligenik etkilerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Bu çalışma sonrasında, çalışmanın devamı niteliğinde daha çeşitli popülasyonlardan hasta gruplarını içeren bir araştırma daha yapılmıştır (13). Yeni çalışmada; İtalya, Hollanda, Kanada, Yunanistan, İsrail, Polonya'den farklı yaş gruplarında ailesel hiperkolesterolemi hastaları seçilmiştir. Bu çalışmada amaç, ilk çalışmayı farklı popülasyonlarda tekrarlamak ve kullanılan PRS'nin etkinliğini artırmak olarak belirtilmiştir. Bu amaçla, ilk aşama seçilen SNP sayısı artırılmış ve 33 SNP seçilerek skor yenilendiğinde, 12 SNP skoruna göre mutasyon negatif ve kontrol arasındaki ayırıcılık gücünün artmadığı görülmüştür. Daha sonra orijinal 12 SNP içinden 6 SNP seçilerek üretilen yeni skorun da 12 SNP skoru ile benzer etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada da yapılan istatistiksel analiz sonucunda mutasyon negatif hastaların %88'inde hastalığın poligenik etiyolojiye bağlı olduğu hesaplanmıştır. Bahsi geçen PRS'ler dışında, ailesel

hiperkolesterolemi için farklı skorlar üretilmiş ve farklı etkinlikler gösterdikleri bildirilmiştir (83, 84).

Bu aşamada, genel anlamda skorların gelecek dönemlerde tanıda bir araç olarak kullanılabileceği üzerine bir konsensus yoktur. Bununla birlikte, mutasyon negatif hastaların bir bölümünde PRS düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek saptanması, hastalıkta poligenik etiyolojiyi genel olarak desteklemektedir (83). Hasta grubunda, monogenik ve poligenik etiyolojiye sahip hastaların tespiti ve gruplandırılması önemlidir. İlk olarak: Poligenik etiyoloji düşünülen hastalarda, aile bireylerinde kalıtım daha düşüktür ve aile taramasına gerek yoktur. İkinci olarak: Poligenik etiyolojiye sahip hastalar, monogenik etiyolojiye sahip olan hastalara göre KVH geliştirme açısından daha düşük riske sahiptir. Son olarak: Monogenik ailesel hiperkolesterolemide, daha farklı tedavi hedefleri bulunmakta ve bu hastalara, daha yoğun lipid düşürücü tedavilerin verilmesi önerilmektedir. (10, 13, 83).

3. BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçilmesi ve Değerlendirilmesi

Çalışmanın başlangıcında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 06/10/2020 tarihli GO 20/784 kayıt numaralı karar ile onay alınmıştır. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: THD-2021-19124). Etik onay belgesi EK-1'de sunulmuştur. Çalışmada yer alan ailesel hiperkolesterolemi şüphesi bulunan ve 18 yaşından büyük bireyler Hacettepe Üniversitesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı ve Çocuk Metabolizma Bilim Dalı tarafından yönlendirilmiştir. Hastaların klinik değerlendirilmesi *Simon Broome* Kriterleri çerçevesinde yapıldı. Buna göre biyokimyasal değerlendirme için hastanın; TK, LDL-K, TG, HDL-K, VLDL-K değerleri ile birinci veya ikinci derece akrabalarının TK değerleri medikal kayıtlardan elde edilmiştir. *Simon Broome* Kriteri'nde belirlenen sınır değerlerin üzerindeki değerler yüksek olarak kabul edilmiştir. Hasta kolesterol düşürücü tedavi alıyorsa tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerleri ayrı şekilde kaydedilmiştir. Klinik değerlendirme için, hastanın, birinci ve ikinci derece akrabalarının KAH öyküsü ve hastalığın ilk saptandığı yaş sorgulanmış ve kaydedilmiştir. Buna ek olarak, başka bir hastalık öyküsü var ise kaydedilmiştir. Muayenede ksantoma/ksantalezma bulguları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, *Simon Broome* Kriterleri'ne göre muhtemel veya kesin ailesel hiperkolesterolemi tanısı alan 52 birey aydınlatılmış onamları alındıktan sonra çalışmaya alınmıştır. Şekil 3.1.'de *Simon Broome* Kriterleri'nin Türkçeleştirilmiş şekli olan ve hastaları seçerken kullanılan form verilmiştir. Hasta seçilirken, MI geçirmiş akrabası olması kriteri genişletilerek, koroner arter hastalığı öyküsü olan akrabalar da bu kategoride kabul edilmiştir. Ayrıca, ksantoma bulgusu ile birlikte ksantalezması olan hastalar da aynı kategoride değerlendirilmiştir. Tüm hastalarda pedigrî çizimi ve analizi yapılmıştır.

Simon Broome Registry Ailesel Hiperkolesterolemi Tanı Kriteri (Türkçe)		
<u>Kesin Ailesel Hiperkolesterolemi</u>	<u>Evet</u>	<u>Havır</u>
1) <16 yaş → LDL seviyesi: >155mg/dl ya da total kolesterol : >260mg/dl >16 yaş → LDL seviyesi: >190mg/dl ya da total kolesterol : >290mg/dl (Tedavi öncesi değerler ya da tedavi süresince en yüksek değerler)		
2) Tendon ksantomaları(Hastada ya da 1. ya da 2.derece akrabada)		
3) Patojenik <i>LDLR</i> ya da <i>APOB</i> ya da <i>PCSK9</i> mutasyonu		
Asgari olarak 1 ve 2 birlikte ya da 3 tek başına sağlanıyor ise kesin ailesel hiperkolesterolemi kabul edilir.		
<u>Muhtemel Ailesel Hiperkolesterolemi</u>	<u>Evet</u>	<u>Havır</u>
1) <16 yaş → LDL seviyesi: >155mg/dl ya da total kolesterol : >260mg/dl >16 yaş → LDL seviyesi: >190mg/dl ya da total kolesterol : >290mg/dl (Tedavi öncesi değerler ya da tedavi süresince en yüksek değerler)		
2) Ailede MI öyküsü(1.derece akraba <60 yaş, ya da 2.derece akraba <50 yaş)		
3) Ailede 1. ya da 2. derece akrabada total kolesterol yüksekliği öyküsü: <16 yaş → total kolesterol: >260mg/dl >16 yaş → total kolesterol: >290mg/dl		
Asgari olarak 1 ile birlikte 2 ya da 3'ten herhangi biri birlikte sağlanıyor ise muhtemel ailesel hiperkolesterolemi olarak kabul edilir.		

Şekil 3.1. Simon Broome Kriteri'nin Türkçeleştirilmiş formu.

Hasta kohortunda monogenik ve poligenik nedenlerin belirlenmesine yönelik olarak; ilk aşamada tüm hastalara *LDLR* genine yönelik, mutasyon saptanmayan hastalara sırası ile *APOB* ve *PCSK9* genlerine yönelik Sanger dizileme yapılması planlanmıştır. Bu testlerde mutasyon saptanmayan hastalarda ise sırası ile *LDLR* kopya sayısı değişikliklerinin saptanması için multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) ve son olarak, mutasyon saptanmayan hastalarda yeni nesil dizileme (NGS) panelinin yapılması planlanmıştır. Ayrıca, poligenik risk skorlarının hesaplanması amacı ile Sanger dizi analizinde mutasyon saptanan bireylerde, poligenik faktörlerin monogenik hastalığa olası etkisini belirlemek amacı ile 12 SNP bölgesine yönelik Sanger dizileme yapılması, mutasyon saptanmayan bireylerde ise bu bölgelerin verilerinin NGS panelinden elde edilmesi planlanmıştır. Bu testlerin yapılması amacı ile tüm hastalarda periferik kandan EDTA'lı tüpe 10 ml kan alınarak DNA izolasyonuna geçilmiştir.

3.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

EDTA'lı tüplere periferik kan alındıktan sonra amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle, 50 ml'lik *Falcon* tüplere boşaltılan 10 ml'lik kan örneği 40 ml steril distile su karıştırılarak kuvvetlice çalkalandı ve ardından karışım 588 g'de 20 dakika santifrüj edilmiştir. Bu işlemin ardında süpernatant uzaklaştırılmış ve kalan çökelti üzerinde aynı işlem tekrarlanarak 694 g'de 20 dakika santifrüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra her bir tüpteki çökelti üzerine 3 ml nükleer lizis tampon (10 mM Tris, 400 mM NaCl, 200 µM, pH 8,2), 150 µl 10 mg/ml proteinaz K ve 200 µl %10'luk sodyum dodesil sülfat solüsyonu eklenmiştir. Tüpler karıştırılmış ve bir gece boyunca 37 °C sıcaklıkta etüvde bekletilmiştir. Etüvden alınan her bir tüpe 3 ml 148 g/100 ml amonyum asetat eklenerek çalkalanmış, sonra 3076 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. *Supernatant* pastör pipeti ile dipteki çökeltiye dokunmadan başka bir temiz tüpe alınarak üzerine etil alkol eklenmiştir.

Tüpler hafifçe çalkalandıktan sonra görünür hale gelen DNA pipet ucu yardımıyla toplanarak 400 µl Tris-EDTA tamponu içeren tüpler içerisine yerleştirilmiştir.

DNA konsantrasyonu ölçümü *Nanodrop ND-1000 UV-VIS* spektrofotometre cihazında ND-1000 *software* versiyon 3.8.1. yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'nın konsantrasyonu ile birlikte, saflığı ve kalitesi için A260/A280 oranı ve 260/230 oranı değerlendirilmiş ve DNA'ların yeterli konsantrasyonlar ve kalitede olduğu değerlendirildikten sonra moleküler testlere geçilmiştir.

3.3. *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9* Genlerine Yönelik DNA Dizi Analizi

Hasta grubunda ilk aşamada etken olduğu bilinen üç gene yönelik Sanger yöntemi ile dizi analizi yapılması planlandı. Bütün hastalarda *LDLR* geninin tüm ekzonları dizilenmiş, *LDLR* mutasyonu saptanmayan hastalarda ise *APOB* ve *PCSK9* genlerine yönelik dizileme yapılmıştır. *APOB* geninin 26. Ekzonunun bir kısmına ve 29. Ekzonuna yönelik dizileme yapılmıştır. Bunun nedeni, genin büyük olması ve bilinen mutasyonların bu iki bölgede yoğunlaşmış olmasıdır. Literatürde de ilk olarak değerlendirilen bölgelerin bu iki bölge olduğu bilgisi mevcuttur (69). *PCSK9* geninin ise tüm ekzonları dizilenmiştir.

3.3.1. Primerlerin Tasarlanması

LDLR, *APOB* ve *PCSK9* genleri için *Ensembl Genome Browser* veri tabanında sırası ile ENST00000558518.6, ENST00000233242.5 ve ENST00000302118.5 numaralı transkriptlere göre primer tasarımı yapılmıştır. Primer tasarlarken *Perl Primer* programı ile tasarıma başlanmıştır. Bu program ile sıcaklık değerleri ve birbiri ile dimer oluşturmayacak primer çiftleri seçilmiş ve *UCSC Genome Browser In Silico PCR* yardımı ile primer çiftinin doğru bölgeyi çoğaltma durumu, sıcaklık değerleri ve ampikonun uzunluğu gibi parametreler değerlendirilmiştir. Son olarak *Primer Blast* programı yardımı ile primer çiftinin diğer bölgelerden oluşturabileceği olası ampikonlar değerlendirilmiştir. Primer çiftleri ve PCR için kullanılan sıcaklık değerleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Primer çiftleri ve PCR reaksiyonundaki primer bağlanma sıcaklıkları

LDLR	Forward Primer- Reverse Primer	PCR T_m °C
<i>EKZON1</i>	CAGTGAGGTGAAGACATTTG-AGGGATGGAGTGATTATTTG	54
<i>EKZON2</i>	CAGGAAATAGACACAGGAAAC-ATACATCAAAATCCACTGGC	54
<i>EKZON3</i>	AAAGTGGGATTGACATTCTCTTC CTTTGTAAATGCCTCTGGTCA	62
<i>EKZON4</i>	AGAGGGCAGTGGTTCAGAGT-CACCTAAATCACTGCATGTCC	58
<i>EKZON5</i>	TTCAGCCTCTCAAGCAGTTGG-CACAGCTGGTGCAGAGCTGAC	64
<i>EKZON6</i>	TGAGTGCCAAGCAAAGTGGAGTTCCAAAACCTAC	58
<i>EKZON7-8</i>	GAGGTGGAGGTTGTAATGAG-GCAAAGTTCAGAGGATGAAAC	58
<i>EKZON9-10</i>	GGATGGGGAGGCACCTCTGG-AGCTCCTCCTGCTCCCTCC	64
<i>EKZON11-12</i>	TCCAGCAGGACTATTCCC-TCTGCGTTCATCTTGGCTTG	61
<i>EKZON13-14</i>	TGGAGAGAGGGTGGCCTGTG-CAGGAGGGGGCAGTTGGAG	64
<i>EKZON15</i>	TCATTAGGCGCACACCTATGAG-AAGGTCAGCAAGGGAGTGAGG	61
<i>EKZON16</i>	GAGATGTGCCAGGCCTTTC-GGCTGTTCCCTGTCCAGGAG	62
<i>EKZON17</i>	GGCTGGAGTACAGTGGCTAAC-ACACCACCAAGGCCATTGTC	62
<i>EKZON18</i>	TGACTGAATCCGGTACTCAC-GAAATGGAGGTGTCATCCTG	54
APOB		
<i>EKZON26</i>	ACCAGTCAGATATTGTTGCTCATC-AAGGTCAGGGAAATCATGGAAG	61
<i>EKZON29</i>	CAAGCATCTGATTGACTCAC-TTTTCTGTGCTATGTGAAAG	53
PCSK9		
<i>EKZON1</i>	CTTCAGCTCCTGCACAGTCC-CGACCTGCACTCCACTTCC	61
<i>EKZON2</i>	AATTTGTAAGTAGGGGTGAG-GCTCAATACATACTTGCTGTC	51
<i>EKZON3</i>	TTTGATCAGGTAAGGCCAG-AAGTGGAAACCACCAGCAG	56
<i>EKZON4-5</i>	AACTATAAGGTTGACTTTATGC-TTCTTGGTTAGGAGACATTAG	51
<i>EKZON6</i>	CCAAACATCAGGCCACAAAG-CAGGAACGTGCCACAAGAAG	61
<i>EKZON7</i>	GGACCCAAAACAGGTGTATAGCAG-ACAGACCCTGACTGCCAAAAG	61
<i>EKZON8-9</i>	ACCTCACTGAGTAAGGACTG-TAAGCTTACAGAAGAGCTGG	51
<i>EKZON10</i>	TGATGAGGGTGGCTTGAAGTTGAT-TCATGGATCACACTTGTGAGGA	61
<i>EKZON11</i>	TCTTGCCTCAGACCTTAAAG-CACAACTGACACAGAAAAG	51
<i>EKZON12</i>	CAGAAGGATGTCCGAGGGAG-CCCAGAGTGAGTGAGTCCAG	59

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), üç gen için de malzemeler aynı oranda kullanılarak yapılmıştır. PCR öncesi, primer ana stoklarından 10µl alınarak 90µl dH₂O ile karıştırılmış ve ara stoklar elde edilmiştir. Yine DNA'lar da 50 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edilerek ara stok elde edilmiş PCR reaksiyonunda bu ara stoklar kullanılmıştır. PCR reaksiyonu her üç gen için; 10µl *Promega 2x Master mix*, 8µl dH₂O, 1 µl DNA ve 1'er µl ilgili primer çifti eklenerek toplamda 21µl reaksiyonda gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için *Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler* cihazı kullanılmıştır. Her üç gen için de Tablo 3.2.'de PCR için optimal *thermal cycler* koşulları verilmiştir.

Tablo 3.2. PCR koşulları

LDLR-Sıcaklık °C	LDLR-Süre	Döngü Sayısı
95	1 dakika	1
95	30 saniye	35
54-64	30 saniye	35
72	45 saniye	35
72	7 dakika	1
APOB-Sıcaklık °C	APOB-Süre	Döngü Sayısı
95	1 dakika	1
95	30 saniye	35
53-61	30 saniye	35
72	1.20 dakika	1
72	7 dakika	1
PCSK9-Sıcaklık °C	PCSK9-Süre	Döngü Sayısı
95	1 dakika	1
95	30 saniye	35
51-61	30 saniye	35
72	45 saniye	1
72	7 dakika	1

3.3.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PCR reaksiyonu sonrası ürün oluşumunun gözlenmesi, oluşan ürünlerin istenen uzunlukta olup olmadığının anlaşılması ve spesifik olmayan bantların saptanması için jel elektroforezi yapılmıştır. Bu işlem için öncelikle agaroz jel dökülmüştür. Agaroz jel için, 200 ml 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) *buffer* ile 4 gram agaroz ile karıştırılarak %2'lik bir karışım oluşturuldu ve bu karışım mikrodalga fırında 2 dakika boyunca 600 W'ta ısıtılmıştır. Agaroz tamamen çözündükten sonra

bu çözelti içine 12 µl etidyum bromür eklendi ve hafifçe çalkalayarak karıştırıldıktan sonra jel dökülmüştür. Jel hazır hale geldikten sonra, ilk kuyucuğa 5 µl 1500 baz çiftlik *ladder* ve diğer kuyucukların her birine 3 µl ürün ile 3 µl Orange G karıştırılarak yüklenmiş ve elektroforezde 130 V'da 30 dakika boyunca yürütülmüştür. Güç kaynağı olarak BIO-RAD PowerPac™ HC High-Current cihazı kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında bant görüntülemesi Biospectrum sistemi ve Vision WorksLS programı yardımı ile yapılmıştır.

3.3.4. PCR Ürün Pürifikasyonu

Elektroforezde istenen uzunlukta bant saptanan olan ürünler için pürifikasyon aşamasına geçilmiştir. Pürifikasyon için Geneall Expin PCR SV kitleri kullanılmıştır. İlk aşamada, 100 µl PB solüsyonu ile PCR ürünü pipetaj yapılarak karıştırılmış ve karışım minikolonlara yüklenmiştir. Minikolonlar 13000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra minikolonlar üzerine 500 µl NW solüsyonu eklenmiş ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra santrifüj işlemi yine tekrarlanmıştır. Minikolonlar temiz 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış ve santrifüj sonrası kolon altındaki tüplerde biriken sıvı atık olduğu için atılmıştır. Minikolonlara 30 µl EB solüsyonu eklenmiş ve 13000 rpm'de 45 saniye boyunca santrifüj yapılmıştır. Bu şekilde temiz ürünler elde edilmiş ve Sanger dizilemede kullanılmak üzere hazır hale gelmiştir.

3.3.5. Sanger Dizileme ile Hedef Genlerin Dizilenmesi

Pürifiye edilen PCR ürünleri "BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing" Kit kullanılarak dizilenmiştir. Bu işlem için, 4 µl dH₂O, kit içeriğinde bulunan 2 µl 5X sekans buffer ve 1 µl *Big Dye Terminator*, 1 µl PCR ürünü, 1 µl *forward* ya da *reverse* primer karıştırılarak *thermal cycler* cihazına yüklenmiştir. Dizileme reaksiyonu için, 96°C'de 1 dakika, sonra 25 döngü boyunca sırasıyla 96°C'da 10 saniye, 50°C'de 5 saniye, 60°C'de 4 dakika devam ettikten sonra sona eren standart bir protokol kullanılmıştır. Sanger dizileme sonrası ürünlerin pürifikasyonuna geçilmiştir.

3.3.6. DNA Dizileme Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu

Ürünlerin pürifikasyonu için “ZR DNA Sequencing Clean-up Kit” kullanılmıştır. Ürünler 100 µl sekans bağlama solüsyonu ile karıştırılarak minikolonlara eklenmiş, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra minikolonlara 200 µl yıkama solüsyonu eklenerek 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Son olarak minikolonlar 1,5 ml’lik ependorf tüplere aktarılmış ve minikolonlara 25 µl dH₂O eklenerek 13000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek pürifiye ürünler kapiller elektroforez cihazında yürütülecek hale getirilmiştir. Pürifiye ürünler, 96 well plate aracılığı ile *ABI Prism 3500 Genetic Analyzer* cihazına yüklenmiş ve kapiller elektroforez gerçekleştirilmiştir.

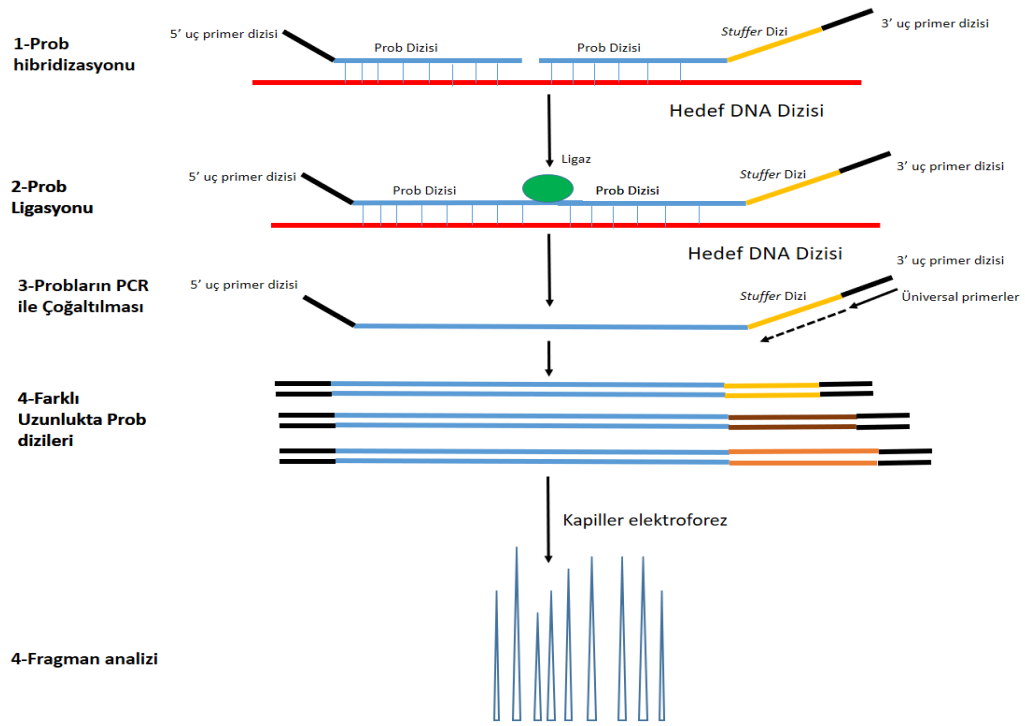
3.3.7. DNA Dizi Analizinin Yapılması

Kapiller elektroforez sonrası elde edilen elektroferogram görüntüleri *Finch TV* programı kullanılarak görüntülenmiş ve analizlerde, *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>), *MutationTaster* (www.mutationtaster.org), *EXAC* (exac.broadinstitute.org), ve *gnomAD* (gnomad.broadinstitute.org) gibi veri tabanlarından yararlanılmış ve bulunan değişikliklerin patojenitesi *ACMG 2015* kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Bu amaçla *Varsome* (Varsome.com) ve *Franklin* (Franklin.genoox.com) gibi programlardan da faydalanılmıştır.

3.4. LDLR Geni Kopya Sayısı Değişikliği Analizi

3.4.1. Multipleks Ligaz Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)

LDLR genine yönelik olarak kopya sayısı değişikliklerini (CNV) saptamak amacıyla MLPA yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin çalışma mekanizması Şekil 3.2.’de gösterilmiştir. MLPA için *MRC Holland* firmasının *LDLR* genine yönelik üretmiş olduğu *SALSA® MLPA® Probemix P062-D2 LDLR* kiti kullanıldı. Bu yöntem, Sanger yöntemi ile *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9* genlerinde patojenik değişiklik saptanmayan 24 hasta için uygulandı. 24 hasta için, 3 adet LDL-K yüksekliği olmadığı bilinen birey de kontrol örneği olarak kullanıldı ayrıca bir tane de DNA içermeyen negatif kontrol örneği hazırlandı.



Şekil 3.2. MLPA testinin aşamaları. *Stuffer* dizileri fragmanların uzunluğunu belirler. Her prob için primer dizisi aynıdır. Kapiller elektroforez sonrası ortaya çıkan her pik (fragmanlar) bir probu temsil eder. Piklerin altında kalan alan hesaplanarak kontrol örneği ve hasta örneği arasında fark olup olmadığı tespit edilir ve kopya sayısı değişikliği bu prensibe göre belirlenir.

3.4.2. DNA Denatürasyonu ve Prob Hibridizasyonu

İlk aşamada her bir reaksiyon için 0,2 ml'lik PCR tüplerine 100 ng, 5 µl DNA eklenmiştir. Daha sonra, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 *Thermal Cycler* cihazında 98°C'de 5 dakika boyunca DNA denatüre edildikten sonra 25°C'ye düşürülmüştür. Bu aşamada, her bir reaksiyon için 1,5 µl MLPA *buffer* ve 1,5 µl *Probemix* (28 örnek için 28x3 µl=84 µl) karıştırılarak önceden hazırlanmış olan hibridizasyon master miksi, denatüre DNA'ların bulunduğu tüplere aktarılmış ve tüpler hibridizasyonun gerçekleşmesi için 95°C'de 1 dakika ve ardından 60°C'de 16 saat koşulları ile *Thermal Cycler* cihazına yüklenmiştir.

3.4.3. Prob Ligasyonu

Bu aşamada öncelikle Ligaz 65 master miksi hazırlanmıştır. Bu mikste her bir reaksiyon için 25 µl dH₂O 3 µl Ligaz A, 3 µl Ligaz B, 1 µl Ligaz-65 enzimi

karıştırılmıştır (28 reaksiyon için 28 x 32 µl). Bu karışım, PCR tüpleri üzerinde 54°C'ye getirildikten sonra tüpler *Thermal Cycler* cihazı üzerindeyken hafifçe pipetaj yapılarak tüplere eklenmiş ve *Thermal Cycler* 54°C'de 15 dakika, 98°C'de 5 dakika ve ardından 20°C'de duracak şekilde ayarlanarak ligasyon reaksiyona devam edilmiştir.

3.4.4. PCR Reaksiyonu

Ligasyon sonrası problemlerin amplifikasyonu için PCR reaksiyonu ile devam edilmiştir. Bu aşamada her bir reaksiyon için PCR master miks hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon için 7,5 µl dH₂O, 2 µl SALSA PCR primer miks ve 0,5 µl SALSA polimeraz eklenerek PCR master miks elde edilmiştir (28 reaksiyon için 28x10 µl). Daha sonra *Thermal Cycler* cihazında bulunan PCR tüplerine oda sıcaklığında PCR master miksleri eklenmiştir. PCR reaksiyonu için *Thermal Cycler*; 35 döngü boyunca 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 60 saniye ve 35 döngü sonunda 72°C'de 20 dakika devam ettikten sonra ve son olarak 15°C'de duracak şekilde programlanmış ve reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Kapiller elektroforezde yürütülmeden önce; 0,7 µl PCR ürünü, 0,3 µl ROX-500 *size standart* ve 9 µl deionize formamid karıştırılmış ve ardından *plate ABI 3130 Genetic Analyzer* cihazına yerleştirilerek, ürünler yürütülmüştür.

3.4.5. Kopya Sayısı Değişikliklerinin Değerlendirilmesi

MLPA analizi, hasta örnekleri ve kontrol örnekleri arasında, problemleri temsil eden her fragmanın (pikin) altında kalan alanın kıyaslanması prensibine dayanmaktadır ve CNV'ler bu şekilde anlaşılmaktadır. MLPA sonuçlarının değerlendirilmesinde ilk aşamada *GeneMapper* programı yardımı ile fragman analizi gerçekleştirilmiştir. Fragmanlar, deney kaynaklı oluşabilecek artefaktlar CNV durumunu etkileyebileceği için manuel olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra, *Coffalyser. Net* programı yardımıyla örneklerin kalite kontrolü yapıldıktan sonra, kontrol örnekleri ve hasta örnekleri karşılaştırılarak CNV'lerin saptanmasına çalışılmıştır. *MRC Holland* Firması tarafından önerilen sınır *final ratio* değerlerine göre CNV'ler yorumlanmıştır. Bu değerler Tablo 3.3.'te verilmiştir. Hastalarda *LDLR*

problarına yönelik değerlendirme yapılmıştır. MLPA’da kullanılan kitin prob içeriği de Tablo 3.4.’te verilmiştir.

Tablo 3.3. CNV değerlendirmesi için sınır *Final Ratio (FR)* değerleri

CNV	<i>Final ratio (FR)</i>
Normal	$0.80 < FR < 1.20$
Homozigot delesyon	$FR = 0$
Heterozigot delesyon	$0.40 < FR < 0.65$
Heterozigot duplikasyon	$1.30 < FR < 1.65$
Heterozigot triplikasyon/homozigot duplikasyon	$1.75 < FR < 2.15$
Belirsiz CNV	Diğer değerler

Tablo 3.4. Prob kodları ve pozisyonları

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob	Kromozomal Pozisyon (hg18) ^a	
		Referans	LDLR
64-105	Kontrol fragmanları		
136	Referans prob 09824-L10234	10q	
142 -	SMARCA4 prob 02488-L13996		<i>Upstream</i>
148	LDLR prob 02309-L01800		Ekzon 1
154	Referans prob 14813-L16521	1p	
160	LDLR prob 02310-L01801		Ekzon 2
166	LDLR prob 19517-L26011		Ekzon 18
184 Ж ± +	LDLR prob 19518-SP0828-L26012		Ekzon 3
193 +	LDLR prob 02313-L01804		Ekzon 12
202	Referans prob 01116-L00620	8q	
212	LDLR prob 02314-L01805		Ekzon 4
218 +	LDLR prob 19333-L12635		Ekzon 14
229	Referans prob 04360-L03780	7p	
238 +	LDLR prob 19519-L26013		Ekzon 5
247 +	LDLR prob 19520-L26014		Ekzon 15
256	Referans prob 06007-L05432	2q	
265	LDLR prob 19521-L26015		Ekzon 7

Tablo 3.4. (Devamı) Prob kodları ve pozisyonları

283	Referans prob 14477-L16197	4q	
290 Δ	LDLR prob 19523-L26017		Ekzon 6
310	Reference prob 15380-L17211	3p	
319 Ж Δ	LDLR prob 19522-SP0893-L28967		Ekzon 17
328 +	LDLR prob 19526-L26020		Ekzon 11
335 Ж	LDLR prob 19524-SP0864-L26573		Ekzon 16
352 Ж	LDLR prob 19525-SP0892-L26886		Ekzon 8
364	LDLR prob 02324-L26888		Ekzon 9
372	Reference prob 15433-L17263	5p	
390	LDLR prob 19640-L26021		Ekzon 10
400 Ж +	LDLR prob 19528-SP0829-L26022		Ekzon 13
415	Referans prob 18255-L22981	12q	
427 +	LDLR prob 10781-L11396		Ekzon 15
445	Referans prob 16634-L19164	17q	
460	Referans prob 16287-L25505	20q	
472 Ж +	LDLR prob 06281-SP0876-L26683		Ekzon 1
490	Referans prob 12461-L21828	22q	

± SNP rs559091708, prob sinyalini etkiler. Delesyon durumunda, bu prob tarafından hedeflenen bölgenin dizilenmesi önerilir. Δ Daha değişken. Bu prob belirli deneysel varyasyonlara duyarlı olabilir. Anormal sonuçlara dikkatle yaklaşılmalıdır. Ж Bu prob üç parçadan oluşur ve iki ligasyon bölgesine sahiptir. Bu probun düşük sinyali, numune DNA'sının depurinasyonundan kaynaklanabilir, örn. yetersiz tamponlama kapasitesi veya uzun bir denatürasyon süresi nedeniyle. Bu, referans numunelerde meydana geldiğinde, test numunelerinde artan bir sinyal gibi görünebilir. – Flank bölgeye denk gelen prob. Bir delesyon ya da duplikasyonun genişliğini belirlemeye yardımcı olmak için dahil edilmiştir. Sadece flank veya referans problemlerde kopya sayısı değişikliklerinin saptanmasının, test edilen koşullarla ilgili olması olası değildir. + Ligasyon bölgesi ekzonik dizinin dışında yer alır. Bir probun hedef dizisinde bulunan tek nükleotid değişiklikleri, prob hibridizasyonunu ve/veya prob ligasyonunu etkileyebilir. Lütfen dikkat: Bilinen tüm tek nükleotid değişiklikleri yukarıdaki tablolarda belirtilmemiştir. Tek probda saptanan değişiklikler başka bir yöntemle onaylanmalıdır. (mrcholland.com) sitesinden alınarak türkçeleştirilmiştir.

3.6. Yeni Nesil Dizileme

Sanger dizileme sonucu mutasyon saptanamayan 24 bireyde ailesel hiperkolesterolemiye yönelik nadir genetik nedenleri araştırmak amacıyla yeni nesil dizileme (NGS) paneli kullanılması planlanmıştır. Bu amaçla *Devyser FH v2* 24 hastalık NGS kiti seçilmiştir. Bu kitin içeriğindeki malzemelere Tablo 3.5.'de genler kapsadığı genomik bölgeler Tablo 3.6. ve 3.7.'de verilmiştir. Kitin seçilme nedenleri hastalıkla ilişkili olduğu bilinen 6 adet geni içermesinin yanı sıra çalışmada

kullanacağımız PRS için gerekli 12 SNP'yi de kapsıyor olmasıdır. Bu şekilde, mutasyon negatif hastalarda hem monogenik nedenler daha kapsamlı değerlendirilmiş hem de 12 SNP'li poligenik risk skoru hesaplanmıştır.

Tablo 3.5. *Devyser FH v2* Kit içeriğinde yer alan malzemeler

İçerik	Katalog No.	Sayı/kit	Kapak Rengi
FH mix	4-A293	1	Mavi
Start, 24 test	4-A280	1	Mor
Dilution buffer	4-A245	3	Beyaz
Indexmix2, 24 test	4-A279	1	Kırmızı
Indexstrip A2	-	1	-
Index buffer	4-A258	3	Yeşil
Sealer S	-	1	-
Clean	4-A255	1	Turuncu
Wash	4-A256	1	Sarı
Dilution buffer	4-A245	1	Beyaz

Tablo için *Devyser FH v2 Handbook* kataloğundan faydalanılmıştır.

Tablo 3.6. NGS panelinin kapsadığı genler

Genler	Ekzonlar	Promoter Bölgeler	Ekzon/intron sınırlarında Minimum Sekanslanan Baz Sayısı
<i>LDLR (LRG_274t1)</i>	1-18	c.1'den 236 baz uzakta	-10/+10
<i>APOB</i>	2-29	Hayır	-10/+10
<i>PCSK9 (LRG_275t1)</i>	1-12	c.1'den 439 baz uzakta	-10/+10
<i>LDLRAP1 (LRG_276t1)</i>	1-9	Hayır	-10/+10
<i>APOE</i>	2-3, 4*	Hayır	-10/+10
<i>STAP1</i>	1-9	Hayır	-10/+10

* APOE ekzon 4'te c.387-529 arası sekanslanmaktadır. Tablo için *Devyser FH v2 Handbook* kataloğundan faydalanılmıştır.

Tablo 3.7. NGS panelinin kapsadığı ve 12’li skor için kullanılacak SNP’ler

SNP	cDNA pozisyonu	Gen lokasyonu
rs629301	c.1635T>G	CELSR2
rs1564348	c.1599-688T>C	SLC22A1
rs1800562	c.845G>A	HFE
rs2479409	c.-861A>G	PCSK9
rs3757354	c.-2147C>T	MYLIP
rs4299376	c.166-718T>G	ABCG8
rs6511720	c.67+2015G>T	LDLR
rs8017377	c.2932G>A	NYNRIN
rs11220462	c.-61+18215G>A	ST3GAL4
rs1367117	c.293C>T	APOB
rs429358	c.388T>C	APOE
rs7412	c.526C>T	APOE

Tablo için *Devyser FH v2 Handbook* kataloğundan faydalanılmıştır.

3.6.1. DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü

DNA konsantrasyonlarının ölçümü için ilk olarak *Nanodrop ND-1000 UV-VIS* spektrofotometre kullanılmıştır. DNA konsantrasyonu 50 ng/μl olacak şekilde dilüe edildikten sonra, daha net ölçümler yapılması için *Qubit™ 4 Fluorometer* cihazı kullanılmıştır. Her hasta için 199 μl *Qubit Buffer* ve 1 μl *Qubit Reagent* karışımı hazırlanmıştır. Önce standartların ölçümü için (S1 ve S2) 10 μl S1 ve 10 μl S2 ayrı tüplere konularak üzerlerine 190 μl karışımdan eklenmiş ve ölçüm yapılmıştır. Daha sonra, her bir hasta için 198 μl karışım ile 2 μl hasta DNA’sı karıştırılmış ve ölçüm yapılmıştır. DNA konsantrasyonları belirlendikten sonra, her hasta için DNA konsantrasyonu dilüsyon solüsyonu kullanılarak 2 ng/ μl olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.6.2. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması

İlk aşamada, *Start, 24 Test* solüsyonu ve *FH Mix* solüsyonu eritilmiş ve vortekslenmiştir. 150 μl *Start, 24 Test* solüsyonu alınarak *FH Mix* solüsyonu tüpüne aktarılmış, bu şekilde aktif *FH Mix* elde edilmiştir. Daha sonra, PCR tüplerine her hasta için 10 μl aktif *FH Mix* ve daha önceden 2 ng/μl olacak şekilde dilüe edilmiş 5 μl DNA eklenmiştir. Sonuç hacim 15 μl olacak şekilde PCR reaksiyonu başlatılmıştır.

PCR reaksiyon koşulları; 95°C’de 15 dakika, 22 döngü boyunca sırasıyla 97°C’de 1 dakika, 62°C’de 1 dakika ve 72°C’de 1 dakika, döngü bitiminde de 72°C’de 15 dakika devam edip bitecek şekilde ayarlanmıştır.

3.6.3. Ürünlerin Barkodlanması ve Çoğaltılması

Bu aşamada, *Index strip* dikkatlice açılmış ve *Index mix 2*, 24 test solüsyonundan 20’şer µl pipetaj yapılarak *strip* içeriğindeki 24 kuyucuğa dağıtılmıştır. Daha sonra, her hasta için, 198 µl *Index Buffer* ile 2 µl PCR ürünü karıştırılmış ve bu karışımdan, 5’er µl alınıp, kuyucuklarda bulunan *Index mix 2*, 24 test solüsyonu ile homojen hale gelene kadar pipetajla karıştırılarak eklenmiştir. Son hacim, *Index strip* içindeki her kuyucukta 25 µl oldu. *Index strip seal* ile hava almayacak şekilde kapatılarak vortekslenmiş ve kısa süre santrifüj edilmiştir. PCR reaksiyon koşulları; 95°C’de 15 dakika, 2 döngü boyunca sırasıyla 97°C’de 30 saniye, 55°C’de 1 dakika ve 72°C’de 1 dakika, döngü bitiminde 22 döngü boyunca sırasıyla 97°C’de 30 saniye, 68°C’de 1 dakika ve 72°C’de 1 dakika ve döngü bitiminde 72°C’de 15 dakika devam edip bitecek şekilde ayarlanmıştır.

3.6.4. Kütüphanelerin Havuzlanması, Pürifikasyonu ve Dilüsyonu

PCR sonrası elde edilen her 8 kütüphane için 1 adet 1,5 ml’lik tüp hazırlanmıştır. 8 kütüphaneden 5’er µl alınarak toplamda 40 µl olacak şekilde 1,5 ml’lik tüpe eklenmiştir. 24 hasta için toplamda 3 adet tüp hazırlanmıştır. Bu işlem havuzlama (*pooling*) olarak adlandırılır. Bu şekilde kütüphaneler havuzlanmıştır. Daha sonra *Clean* solüsyonundan 3 tüpe de 40’ar µl aktarılmıştır. Tüpler vortekslenmiş ve *spin down* yapıldıktan sonra manyetik raka yerleştirilmiştir. Üç dakika beklendikten pellete dokunulmadan üstteki süpernatant pipetle çekilerek atılmıştır. Daha sonra 1500 µl etanol eklenerek hazır hale getirilmiş yıkama solüsyonundan, manyetik raktaki 3 adet tüpe 150’şer µl eklenmiş ve tüpler raktan çıkarılmadan hafifçe ileri geri yapılarak karıştırılmıştır. Manyetik *beadler* toplandıktan sonra üstteki süpernatant pellete dokunulmadan pipetle çekilerek atılmıştır. Tüpler ağız açık şekilde 5 dakika etanolün tamamen kuruması için bekletilmiştir. Daha sonra tüpler manyetik raktan alınarak 3 tüpe de 40’ar µl dilüsyon solüsyonu eklenmiştir. Tüpler vorteks ve *spin down* yapıldıktan sonra manyetik raka tekrar dizilmiştir. Bu

sefer tüplerdeki süpernatant alınarak temiz tüplere aktarılmıştır. Bu işlem sonrası pürifiye ve dilüe edilmiş her 3 tüpteki kütüphanenin konsantrasyon ölçümü *Qubit™ 4 Fluorometer* cihazı ile yapılmıştır. Bunun için yine 199 µl *Qubit Buffer* ve 1 µl *Qubit Reagent* karıştırılmıştır. Bu karışımla, önce standartlar (S1 ve S2) daha önce anlatıldığı oranda karıştırılarak ölçülmüştür. Standartların ölçümünden sonra aynı karışımdan (*Qubit Buffer* ve 1 µl *Qubit Reagent*) 3 adet temiz 0,5 ml'lik tüpe 190'ar µl aktarılmış ve üzerine 3 farklı tüpte bulunan dilüe edilmiş ürünlerden 10'ar µl aktarılmıştır. Toplamda 3 tüp için 200 µl'lik karışım elde edilmiştir. Son olarak konsantrasyonlar *Qubit* cihazı ile ölçülmüştür.

3.6.5. Cihaza Yükleme ve Sekanslama

Cihaza yükleme aşamasından önce *Qubit* ile ölçümü yapılmış dilüe edilmiş ve havuzlanmış kütüphaneler tekrar dilüe edilmiştir. Bu aşamada pürifiye ve dilüe edilmiş 3 adet havuzlanmış kütüphane bulunmaktadır. Bu kütüphaneler, her birinin konsantrasyonu 0,44 ng/µl olacak şekilde dilüsyon solüsyonu kullanılarak dilüe edilmiştir. Daha sonra dilüe edilen kütüphanelerden 15'er µl alınarak tek bir PCR tüpünde birleştirilmiştir.

Bu aşamadan sonra farklı kitlerden farklı hasta gruplarından gelen, kütüphaneler cihaza birlikte yüklenebilir. Bizim grubumuz için de bu durum söz konusu olmuştur. 24 hastalık pürifiye ve dilüe edilmiş kütüphanemizle birlikte, yine Devyser firmasının kitlerinin kullanıldığı iki ayrı 24 kişilik hasta grubuna ait kütüphaneler mevcuttu ve cihaza 72 hasta örneğinin birlikte yüklenmesi gerekmiştir. Bu nedenle de tüm hasta kütüphanelerinin tek bir havuzda toplanması için son bir havuzlama işlemi yapılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, calculator.devyser.com sitesinden hangi kütüphaneden, ne kadar hacim alınarak havuzlama yapılması gerektiği hesaplanmış ve bu miktarlara göre son kütüphane havuzu oluşturulmuştur. Sonra bu havuzdan 20 µl'lik hacim 20 µl dilüsyon solüsyonu ile karıştırılmıştır. Cihaza yüklemeye önce, kütüphane havuzundan 5 µl ile 5 µl 0,1 M NaOH karıştırılmıştır. Bu işlem denatürasyon amaçlı yapılmıştır. Beş dakika sonra bu karışıma 5 µl Tris-HCL eklenerek denatürasyon işlemi sona erdirilmiştir. Elde edilen 15 µl karışım 985 µl HT1 solüsyonu ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 180 µl alınarak üzerine 320 µl HT1 solüsyonu eklendi toplam 500 µl karışım elde edilmiştir. Bu

karışıma 5 µl Phix kontrol eklenmiş ve elde edilen karışım cihaza yüklenecek hale gelmiştir. Tüm hacim alınarak kartuja yüklenmiş ve kartuj cihaza yüklenmiştir. Platform olarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yer alan Illumina firmasının Miniseq Platformu kullanılmıştır. Kütüphaneler çift yönlü (*paired-end, 2x151 bp*) şekilde sekanslanmıştır.

3.6.6. Varyantların Çağırılması ve Anote Edilmesi

Veriler, *Genome Analysis Toolkit best practices pipeline* şemasına göre işlenerek varyant tabloları oluşturulmuştur (85). FastQC (versiyon: v0.11.9) ile ham verinin (fastq), kütüphane hazırlama aşaması veya sekanslama sırasında oluşmuş olması muhtemel hataları açısından verinin kalitesine dair rapor elde edilmiştir (86). Fastq dosyaları (R1 ve R2) GRCh37'ye (genom versiyon: human G1Kv37) göre BWA (Burrows-Wheeler Aligner) versiyon 0.7.17-r1188 ile hizalanmıştır (87). Samtools (versiyon: 1.9) hizalanan okumalar .bam formatına dönüştürülmüş ve kromozomal pozisyonlara göre sıralanıp indekslenmiştir (88). Picard Tools'un (versiyon: 2.25.5) MarkDuplicates işlemi ile amplifikasyon bazlı kütüphane hazırlama işlemi nedeni ile, duplike okumaların varyant çağırma aşamasında atılmaması için işaretlenmesi işlemi yapılmıştır. Sonrasında okuma grupları yeniden adlandırılmıştır. Örneğin platform: Illumina ve her birey için verilen DNA numarası. <https://broadinstitute.github.io/picard/> GATK BaseRecalibrator ile referans genom ve bilinen bir varyant veri tabanından yararlanılarak, sekanslamadan kaynaklanabilecek yanlış okumalar giderilmeye çalışılmıştır. Bu aşamada baz başına okumaların kalitesi yeniden skorlanmış ve güvenilir veritabanı olarak 1000 Genom Projesi Faz 3 ve 4 (SNP ve indeller birlikte yer almaktadır) kullanılmıştır. GATK HaplotypeCaller ile varyant çağırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada verimiz spesifik genler açısından hedeflenmiş ekzom verisi olduğu için sekanslamanın yapıldığı firma tarafından oluşturulmuş .bed dosyası varyantların çağrılacağı sahaların belirlenmesi için kullanılmıştır. Bed dosyası içinde sekanslamanın hedeflendiği bölgeleri içeren kromozom, pozisyon başlangıç ve bitiş ve hedeflenen genler yer almaktadır. Ayrıca bu aşamada doğru okuma sayılarını elde edebilmek için daha önce işaretlediğimiz duplike okumalar filtrelenmemiştir. Genotip bilgisi içermeyen ham vcf (.gvcf) dosyası .vcf dosyasına dönüştürülmüştür. GATK'nın "*best practices*" uygulamaları içinde yer

alan VQSR (Variant Quality Recalibration) aşaması gen panelleri veya küçük veriler için uygulanmadığından, bu aşamada hiç varyant filtrelemesi yapılmamıştır. VQSR dışında önerilen filtreleme yöntemleri uygulanmıştır. Burada amaç okuma kalitesi, okuma derinliği, hizalanma kalitesi, okumaların pozisyonu gibi çeşitli istatistiklerden geçemeyen ve dolayısıyla gerçek olduğuna güvenilmeyen varyantların analizden elenmesini sağlamaktır. Bu aşama için “bcftools (versiyon: 1.13)” ile GATK’nın SNP ve Indeller için önerdiği filtrelemeler uygulanmıştır. Buna göre SNP için; $MQ < 40.0$, $QD < 2.0$, $MQRankSum < -12.5$, $ReadPosRankSum < -8.0$, Indel için; $QD < 2.0$, $ReadPosRankSum < -20.0$ olarak uygulanmıştır. Son filtreleme basamağı olarak “vcftools (versiyon: 0.1.13)” ile okuma derinliği (DP) < 5 olan varyantlar vcf dosyasından filtrelenmiş ve sadece tüm filtrelemelerden geçebilen varyantlar anotasyon için kaydedilmiştir. Annovar (versiyon: 20200608) kullanılarak vcf anotasyonu gerçekleştirilmiştir. Splice region +/- 8 alındı ve ExAC, GnomAD (ekzom ve genom), 1000G vb istenen veri tabanları eklenmiştir (89).

3.6.7. Varyantların Analizi

Analizde, okuma derinliği 10’un altında olan varyantlar ve varyant alel frekansı (VAF) %20’nin altında kalan varyantlar değerlendirilmeye alınmamıştır. Bunun dışında kalan varyantlar değerlendirilirken ilk önce minimum alel frekansı (MAF) 0,002’nin altında olan varyantlar filtrelenmiştir. Bu MAF değeri, hastalığın toplumda görülme sıklığı (ortalama 1/250) göz önünde bulundurulduğunda, Hardy-Weinberg dengesinde hastalığa neden olabilecek bir varyantın, toplumda maksimum görülme sıklığıdır. Hesaplama, “ $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ” eşitliği kullanılarak “q” değeri 0.002 olarak bulunmuştur. Filtrelemede gnomAD, 1000 Genom, ESP ve ExAC popülasyon veri tabanları kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra kalan varyantlar *Integrative Genomics Viewer (IGV)* programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Homopolimer veya tekrar bölgelerine denk gelen veya IGV görüntülemesinde saptanmayan varyantlar değerlendirmeye alınmamıştır. Değerlendirmeye alınmayan varyantlardan bazılarının örnek IGV görüntüleri EK-2’de verilmiştir. Varyantların değerlendirilmesinde; Clinvar, LOVD (*Leiden Open Variation Database*) veri tabanları ile Mutation Taster, Polyphen, SIFT *in silico* algoritmalarından ve literatürden faydalanılmıştır. Varyantların patojenik sınıflamasının yapılması için ise ACMG (*American College*

of *Medical Genetics*) 2015 kriterlerinden faydalanılmıştır. Varsome.com ve Franklin.genoox.com web siteleri ACMG 2015 sınıflandırılmasına yardımcı olması amacı ile kullanılmıştır. Şekil 3.3.'te filtreleme basamakları özetlenmiştir.



Şekil 3.3. NGS sonucu değerlendirme şeması

3.7. Poligenik Risk Skorlarının Hesaplanması

Çalışmada poligenik risk skorlarının mutasyon negatif hastalarda mutasyon pozitif hastalara göre ve kontrol grubuna göre yüksek olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Bunun için farklı popülasyon gruplarında daha önce denenmiş olan 12 ve 6 SNP kullanarak hesaplanan PRS kullanılması planlanmıştır (10, 13). Bu PRS'ler ile ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 3.8'de verilmiştir. Bu amaçla öncelikle, Türk popülasyonunda bu skorların kullanılabilirliğini test etmek amacı ile Türkiye Genom Projesi yayınında bahsi geçen ulaşabildiğimiz 16 sağlıklı bireyin genom verisi indirilmiştir (90). Bu veri üzerinden PRS'de kullanılan 12 SNP bölgesi gözden geçirilerek her bir birey için bu bölgelerin genotipleri çıkarılmıştır. Okuma derinliği 5'in altında kalan bölge varsa genotiplemeye dahil edilmemiştir. Bu nedenle, SRR839600 kayıt numaralı birey gerekli tüm SNP bölgelerinde 5 okuma derinliği şartını sağlayamadığı için skorlaması yapılmamıştır. Kalan 15 birey için 12 ve 6 SNP kullanan PRS hesaplanmıştır. Çıkarılan bireyin yerine ise kurumumuzda genom verisi bulunan ve 2678 kayıt numarası ile kaydedilmiş olan bir bireyin 12 ve 6 SNP skoru hesaplanmıştır. Bu bireylerin hiçbirinin kolesterol düzeyi bilinmemektedir.

Bunun yanı sıra, 52 hastanın tamamında poligenik risk skoru hesaplanmıştır. Bunlardan 28'inde Sanger dizileme ile mutasyon saptanan hastalar olduğu için 12 SNP bölgesine de Sanger yöntemi ile bakılmıştır. Bu yöntemin tüm basamakları ve kullanılan malzemeler anlatıldığı şekli ile yapılmış olup, Tablo 3.9. ve 3.10.'da sırası ile 12 SNP için hazırlanmış primer dizileri ve sıcaklık değerleri ile *Thermal Cycler* PCR koşulları verilmiştir. 24 hastada ise NGS yapıldığı ve 12 SNP bölgesi de NGS tarafından kapsandığı için genotip verileri NGS sonucundan elde edilmiştir. NGS sonucundan 12 SNP bölgesi ve ilgili genotipler *Amplicon Suite* programı yardımıyla filtrelenerek doğrudan Excel tablosuna dönüştürülmüştür. Daha sonra tüm hastalarda 12 ve 6 SNP kullanılarak elde edile PRS hesaplanmıştır.

Tablo 3.8. Ailesel hiperkolesterolemi için geliştirilen 12 ve 6 SNP PRS’de kullanılan polimorfizmler ve etki büyüklükleri

dbSNP ID	Gen	Etkisiz Alel	Risk Aleli	Etki Büyüklüğü
rs2479409	<i>PCSK9</i>	A	G	0.052
rs629301	<i>CELSR2</i>	G	T	0.15
rs1367117	<i>APOB</i>	G	A	0.10
rs4299376	<i>ABCG8</i>	T	G	0.071
rs1564348	<i>SLC22A1</i>	C	T	0.014
rs1800562	<i>HFE</i>	A	G	0.057
rs3757354	<i>MYLIP</i>	T	C	0.037
rs11220462	<i>ST3GAL4</i>	G	A	0.050
rs8017377	<i>NYNRIN</i>	G	A	0.029
rs6511720	<i>LDLR</i>	T	G	0.18
APOE Haplotipi (rs429358 ve rs7412) Kombinasyonuna Göre Eklenicek Etki Büyüklükleri				
rs429458 polimorfizmi genotipi	rs7412 polimorfizmi genotipi	Her iki aleldeki haplotip (rs429458+rs7412)		Etki Büyüklüğü
T-T	C-C	E3-E3		0
T-T	T-T	E2-E2		-0.9
C-C	C-C	E4-E4		0.2
T-T	T-C	E2-E3		-0.4
T-C	T-C	E2-E4		0.2
T-C	C-C	E3-E4		0.1

Tablodaki ilk 10 SNP’ye göre hesaplanan skora, kişide buluna APOE haplotipine göre, ilgili haplotipin etki büyüklüğü eklenerek yapılarak 12 SNP risk skoru elde edilmektedir. Mavi ile boyalı kutucuklarda yer alan SNP ve yine APOE haplotipleri 6 SNP risk skoru için kullanılmaktadır. (İlk 10 SNP için skor hesaplanırken her SNP için risk aleli x etki büyüklüğü kadar skora eklenir. Örnek:rs2479409 bireyde a-g genotipinde ise skora 0.052 eklenirken, g-g ise 0.104 eklenir, a-a ise 0 eklenir. APOE haplotipine karşılık gelen etki büyüklükleri de son olarak eklenir.).

Tablo 3.9. 12 SNP bölgesine yönelik Primerler ve sıcaklıkları

TNP Bölgesi	Forward Primer- Reverse Primer	Sıcaklık °C
rs2479407	ACTGGATGCTTGTCCAGTTGAT-CTTTATGCACCCTGCACACTG	60
rs629301	AGCAATTCCTGCAAAGGGTTA-TTCCAGAGACCAGACCTTCCT	60
rs1367117	GTTGATAAGGCATGTGGTGTG-GATCCACGATGGATACGGAATA	60
rs4299376	GATTCAAGGATCCATATCCCA-TCATGTGCAATAGTGGTACAGAA	58
rs1564348	TTTCATTGTCTGTCTTCTCTGCT-AGGTTGATCATGTTCTGGCTA	58
rs1800562	AGAGTCCAATCTTAGGACACAAA-AGATCCTCATCTCACTGCCATA	57
rs3757354	ATGTGAGAGTGCACCTGTTCC GGAAGCGCAGCAAAGATAATAA	60
rs11220462	GCTATCCGATGAACAGATCCATT-TTTGTCCAGCTCTTACTCAGCTTC	61
rs8017377	CAGCCTCAGGACACTTTGGAAT-GGCACTCCACCCTGAACACT	62
rs6511720	ATGAAATACGGATGATTGTTCTTT-CTTTGTAAAGGAAATGGACAAGA	57
rs429358- rs 7412	CCTACAAATCGGAACCTGGAGGAA-TGCTCCTCACCTCGTCCA	*60

*: Bölgede GC içeriği yüksek olduğu için her PCR reaksiyonuna 2 µl daha az dH₂O eklenerek onun yerine 2 µl Betain eklenmiştir.

Tablo 3.10. 12 SNP bölgesi için *Thermal Cycler* koşulları

Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
95	1 dakika	1
95	30 saniye	35
57-62	30 saniye	35
72	45 saniye	35
72	7 dakika	1

3.8. LDLR cDNA Sanger Dizileme

3.8.1. RNA İzolasyonu

Hasta grubu içinden 50 numaralı bireyde, *LDLR* geninde c.2319A>G (p.Thr713=) sinonim mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon 14. ekzonun son bazından bir önceki bazda saptanması nedeni ile *splice* bölgesinde bulunmaktadır. Bu mutasyon gnomAD veri tabanında bildirilmemiştir ve *in silico* algoritmalar *splice* bölgesini değiştirebileceği yönünde tahminlerde bulunmuştur. *APOB* ve *PCSK9* dizi analizlerinde, MLPA ve NGS analiz sonuçlarında etken olarak başka bir neden saptamamıştır. Bu nedenle, öncelikle hastanın anne ve babasında bu mutasyona yönelik değerlendirme yapılmış ve hiperkolesterolemi nedeni ile etkilenmiş annede

aynı mutasyon saptanırken, babada saptanmamıştır. Bu nedenle, *splice* bölgesinin etkilenmesini göstermek amacı ile hastadan RNA çalışması planlanmıştır.

Bu işlem için öncelikle hastadan mor kapaklı tüpte 10 ml kan alınmıştır. Kan bekletilmeden RNA izolasyonuna başlanmıştır. İzolasyonda QiaAmp RNA Blood Mini Kit kullanılmıştır. İlk aşamada 1 ml kan 15 ml'lik *Falcon* tüpe aktarılmış ve üzerine 5 ml EL solüsyonu eklenmiştir. 15 dakika bekledikten sonra karışım vortekslenmiş ve 10 dakika boyunca 400 g'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüştür. Kalan çökeltinin üzerine 2 ml EL solüsyonu eklenmiş ve vortekslenerek çökelti ile homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Karışım, 10 dakika buzda bekletilmiş ve ardından 400 g'de 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş ve çökelti gözlemlenmiştir. Çökeltiye dokunmadan tüpte kalan sıvı damlacıklar kurutulmuştur. Bu aşamanın ardından, 600 µl RLT solüsyonu ve 6 µl 6-Merkapto etanol karışımı hazırlanmış ve bu karışım çökelti ile homojen hale gelen kadar pipetaj ile karıştırılmıştır. Bu karışım mor kapaklı mini kolonlara aktarılmış ve 16000g'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Kolon atıldıktan sonra altta koleksiyon tüpündeki karışıma %70'lik 600 µl etanol eklenmiştir. Toplam 1200 µl'lik karışımın 600 µl'si alınarak beyaz mini kolonlara eklenmiş ve 10000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı dökülmüş ve kalan 600 µl karışım da aynı kolona eklenerek santrifüj tekrarlanmıştır. Bunun ardından koleksiyon tüpleri atılarak, mini kolon yeni koleksiyon tüpleri üzerine yerleştirilmiş ve kolona 700 µl RW1 solüsyonu mini kolona eklenmiştir. 30 saniye 10000g'de santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü yenilenmiş, mini kolona 500 µl RPE solüsyonu eklenmiştir. 10000'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü yenilenmiş, 500 µl RPE eklenmiş ve bu sefer 16000 g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü yenilenerek boş mini kolon 16000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Son olarak mini kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 40 µl RNA'ase free H₂O eklenerek 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.8.2. RNA Repürifikasyonu

Elde edilen RNA'nın kalitesini artırmak amacı ile repürifikasyon protokolü uygulanmıştır. 40 µl olan RNA çözeltilisine 440 µl distile H₂O eklendi üzerin 3 molar

(PH:5,5) sodyum asetat eklenmiştir. Son olarak 500 µl izopropranol eklenmiş ve bu karışım 4 °C’de 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüştür. Çökeltinin üzerine 500 µl etanol eklenerek homojen şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra 16000 g’de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra tüpler 10-15 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Son olarak üzerine 20 µl distile H₂O eklenerek repürifiye RNA elde edilmiştir.

3.8.3. cDNA Sentezi

RNA’dan cDNA sentezlemek amacıyla Ipsogen RT kit kullanılmıştır. İlk aşamada 10 µl RNA 65°C’de 5 dakika boyunca denatüre edilmiştir. Daha sonra 5 µl 3X RT buffer, 2 µl dNTP, 5,25 µl *Random Primer*, 0,5 µl *RNA’ase inhibitor*, 1 µl reverse transkriptaz, 1,25 µl DTT ve 10 µl denatüre RNA ile toplamda 25 µl’lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. *Thermal Cycler* cihazında 25°C’de 10 dakika, 50°C’de 60 dakika, 85°C’de 5 dakika ve 4°C’de duracak şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Sonuçta cDNA sentezi tamamlanmıştır.

3.8.4. cDNA ile PCR Yapılması

cDNA sentezlendikten sonra cDNA’ya yönelik iki adet primer ile bir adet kontrol ile birlikte hastaya ait örnekte PCR yapılmıştır. Daha sonra elde edilen ürünler yürütülerek, görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme sonrası kontrol ve hastanın ürünleri arasında bazı farklılıklar saptanması üzerine jelden izolasyon yapılmasına karar verilmiştir. PCR şartları ve primerler Tablo 3.11.’de verilmiştir.

Tablo 3.11. cDNA PCR şartları ve primerler

Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
95	1 dakika	1
95	30 saniye	40
60	30 saniye	40
72	1 dakika	40
72	7 dakika	1
F Primer	GCATCACCTAGATCTCCTCAG	
R Primer	TACTGGGCTTCTTCTCATTTCCT	

3.8.5. Jelden Ürün İzolasyonu ve Ürünlerin Çoğaltılması

Kontrol ve hastadan jelden izolasyon amacı ile aynı şartlarda tekrar PCR yapılmıştır. Her iki örnekten de dörder adet PCR reaksiyonu konulmuştur. PCR sonrası bu ürünler kendi aralarında (hasta ve kontrol kendi içinde) birleştirilmiş ve sonuç olarak, hasta ve kontrolden 80'er µl ürün elde edilmiştir. Daha sonra vakum konsantratör kullanılarak ürünler 40 µl olacak şekilde konsantre edilmiştir. Bu ürün 300 ml %3'lük agaroz jelde 50 baz çiftlik *ladder* ile yüklenmiş ve 3 saat boyunca 140 V'de yürütülmüştür. Yapılan görüntüleme sonrası hastada kontrolde bulunmayan 3 adet farklı band görülmüştür. Hasta ve kontrolde tüm bandlar UV ışık altında bistüri ile kesilmiş ve elde edilen jel parçaları 1,5 µl tüplere konulmuştur.

İzolasyon basamağında Geneall PCR pürifikasyon kiti kullanılmıştır. Jelden izolasyonun ilk basamağında, 1,5 ml'lik tüp içinde bulunan jel parçalarının ağılıklarının üç katı volümde GB solüsyonu tüpe eklenmiştir. Daha sonrasında tüpler sıcak su banyosunda 50 °C'de yarım saat kadar bekletilmiştir. Jel parçalarının tamamen çözündüğü gözlemlendikten sonra, tüpler içindeki sıvı mini kolonlara aktarılmış ve 16000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra koleksiyon tüplerindeki sıvı dökülerek mini kolonlara 700 µl NW solüsyonu eklenmiş ve yine 16000g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı döküldükten sonra 1 dakika 16000g'de boş santrifüj gerçekleştirilmiştir. Sonrasında koleksiyon tüpleri atılarak mini kolonlar 1,5 µl'lik tüplere yerleştirilmiş, üzerlerine 30 µl EB solüsyonu eklenmiş ve 1 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Jelden ürünler elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen ürünlere Tablo 3.12.'deki koşullara göre tekrar PCR yapılmıştır. Elde edilen ürünler pürifiye edilmiş ve Sanger yöntemi ile sekanslanmıştır.

Elde edilen sekans görüntülerinde kanonik transkript ile birlikte hastada, kontrolde olmayan başka bir transkriptin birliktelik gösterdiği anlaşılmıştır. Anormal transkriptte, intronik bölgeden 81 bazlık bir kısmının ekzon 14'e katıldığı anlaşılmıştır. Bunun üzerine, hem değişiklik saptanan alelin normal transkript üretip üretmediğini anlamak hem de anormal transkriptlerin daha izole bir şekilde çoğaltılarak, yeni *splice* noktalarının daha net bir şekilde gösterilmesi amacı ile alel spesifik PCR yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla 3' ucu hastada saptanan A>G değişikliğini içerecek şekilde 5'-ATGAGGAGCTGCCTCACG-3' *forward* primer

dizisi tasarlanmıştır ve bu primer ile *reverse* 5'-TACTGGGCTTCTTCTCATTTCCT-3' dizisi kullanılarak Tablo 3.12.'deki koşullarda hem hastada hem kontrolde PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise elde edilen ürünler Sanger yöntemi ile dizilenmiştir.

3.9. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) for Windows sürüm 20.0 kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenler için tanımlayıcı istatistikler, sayı ve yüzdeler olarak, sayısal değişkenler için ise ortalama \pm standart sapma değerleri olarak sunulmuştur. Sayısal verilerin analizinde normal dağılıma uygunluk "Shapiro-Wilk" testi ile incelenmiş olup, normal dağılım özelliği gösteren sayısal değişkenlerin analizinde parametrik yöntemler, normal dağılım özelliği göstermeyen sayısal değişkenlerin analizinde ise parametrik olmayan yöntemler kullanılmıştır. Normal dağılım özelliği gösteren sayısal veriler için bağımsız iki grup arasındaki ortalama farkı "Independent Samples t" testi ile, normal dağılım özelliği göstermeyen sayısal veriler için bağımsız iki grup arasındaki medyan farkı "Mann-Whitney U" testi ile incelenmiştir. Kategorik değişkenlerin kendi aralarındaki analizleri "Chi-Square" koşulu sağlandığı durumlarda "Chi Square" test istatistiği, sağlanmadığı durumlarda ise "Fisher's Exact Test" istatistiği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler %95 güven düzeyinde incelenerek p değeri 0,05'ten küçük ise testler anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular ve Laboratuvar Bulguları

Hastalar *Simon Broome* Kriterleri'ne göre değerlendirilirken gerekli laboratuvar parametreleri, klinik öykü ve bulguları ayrıntılı şekilde kaydedilmiştir. Tablo 4.3.'te bu bilgiler her hasta için ayrıntılı şekilde verilmiştir. Bu bilgiler, tanımlayıcı istatistiklerin yanı sıra genetik etioloji ile klinik ve biyokimyasal parametrelerin ilişkisini değerlendirmek amacı ile kullanılmıştır.

Hasta grubu toplamda 52 bireyden oluşmaktadır. 52 bireyin 30 tanesi (% 57.7) *Simon Broome* Kriter'ine göre kesin ailesel hiperkolesterolemi, 22 tanesi (% 42.3) ise muhtemel ailesel hiperkolesterolemi tanımına uymaktadır. Hastaların 29 tanesi (%55.8) kadın, 23 tanesi (%44.2) erkekti. KAH öyküsü 10 (%19.2) hastada mevcutken, 42 (%80.8) hastada yoktu. Ek hastalıklara bakıldığında, hipertansiyon öyküsü 6 hastada (%11.5) varken, 46 hastada (%88.5) yoktu. Diyabet öyküsü ise 3 hastada (%5.8) varken, 49 hastada (%94.2) yoktu. Muayenede, 8 hastada (%15.4) ksantoma/ksantalezma saptanırken, 44 hastada (%84.6) saptanmadı. Aile bireylerinde KAH öyküsüne bakıldığında ise, 1. derece akrabasında KAH öyküsü olan 27 (%51.9) hasta, olmayan 25 (%48.1) hasta mevcuttu. 2. derece akrabalara bakıldığında ise 23 (%44.2) hastanın 2. derece akrabasında KAH öyküsü varken, 29 (%55.8) hastanın böyle bir öyküsü yoktu. Aile bireylerinde (1. ve 2. derece akrabalarında) TK yüksekliği öyküsü bulunan 39 hasta (%75), bulunmayan 13 hasta (%25) mevcuttu. Son olarak hastaların 34 tanesinde (%65.4) mutasyon saptanırken bunlardan 33 tanesi muhtemel patojenik/patojenik (MP/P), 1 tanesi (18 numaralı hasta) önemi bilinmeyen değişiklik (ÖBD) olarak değerlendirildi.

Hasta grubunun klinik ve laboratuvar bulgularına yönelik tanımlayıcı istatistikler ve gruplandırılmış veriler için Tablo 4.1.'de, sayısal sayısal veriler için ise Tablo 4.2.'te özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların tanımlayıcı istatistiksel verileri (Gruplandırılmış)

	Sayı	Yüzde (%)		Sayı	Yüzde (%)
Simon Broome			Akrabada TK Yüksekliği		
Kesin	32	61.5	Var	39	75
Muhtemel	20	38.5	Yok	13	25
Cinsiyet			Hastada KAH Öyküsü		
Kadın	29	55.8	Var	10	19.2
Erkek	23	44.2	Yok	42	80.8
Birinci Derece Akrabada KAH Öyküsü			İkinci Derece Akrabada KAH Öyküsü		
Var	27	48.1	Var	23	44.2
Yok	25	51.9	Yok	29	55.8
Hipertansiyon			Diabetes Mellitus		
Var	6	11.5	Var	3	5.8
Yok	46	88.5	Yok	49	94.2
Ksantoma/Ksantalezma			Mutasyon Varlığı (MP/P)		
Var	8	15.4	Var	33	65.4
Yok	44	84.6	Yok	18	34.6
Kolesterol Düşürücü Tedavi					
Kullanıyor	23	44.2			
Kullanmıyor	29	55.8			

MP/P: Muhtemel Patojenik/Patojenik, KAH: Koroner arter hastalığı

Tablo 4.2. Hastaların tanımlayıcı istatistiksel verileri (Sayısal)

	Sayı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
Yaş	52	18	59	38.1	11.787
LDL-K (Tedavi Öncesi)	49	193mg/dl	723mg/dl	276.2mg/dl	97.495
LDL-K (Tedavi Sonrası)	22	62mg/dl	440mg/dl	169.1mg/dl	81.884
TG (Tedavi Öncesi)	46	57mg/dl	477mg/dl	174.4mg/dl	91.056
TG (Tedavi Sonrası)	22	34mg/dl	315mg/dl	124mg/dl	75.395
TK (Tedavi Öncesi)	48	252mg/dl	799mg/dl	368.8mg/dl	109.252
TK (Tedavi Sonrası)	21	106mg/dl	564mg/dl	246.4mg/dl	100.426
HDL-K	51	27mg/dl	101mg/dl	58.3mg/dl	16.786
Akrabada Yüksek TK	34	276mg/dl	630mg/dl	340.9mg/dl	80.842
M. Het. LDL-K	18	201mg/dl	723mg/dl	284.64mg/dl	121.558
D. Het. LDL-K	7	238mg/dl	386mg/dl	293.71mg/dl	49.888

Tabloda ilgili özelliği bilinen birey sayısıdır. Akarabada yüksek TK: Simon Broome Kriteri'ne göre hastanın TK >290 mg/dl'ye sahip olan 1. veya 2. dereceli akrabaları ve onların TK değerlerini ifade eder. Diğer biyokimyasal değerler ise hastaya ait değerlerdir. Bazı hastaların hem tedavili hem tedavisiz değerleri öğrenilebilmiştir. Bazı hastalar için ise bu durum geçerli değildir. Bu nedenle sayılar arasında farklılıklar mevcuttur. M.: *Missens*, Het.:Heterozigot, D.:Diğer, Son iki satırda heterozigot *LDLR* mutasyonu taşıyan bireyler ve LDL-K düzeyleri mutasyon tiplerine göre (*missens* ve diğer) ayrılmıştır.

Tablo 4.3. Hastaların biyokimyasal, klinik bulguları ve aile öyküleri

Hasta Numarası	Cinsiyet	Yaş	SIMON Broome Kriteri	Tedavili LDL-K	Tedavisiz LDL-K	Tedavisiz TG	Tedavili TG	Tedavisiz TK	Tedavili TK	HDL-K	VLDL-K	1 veya 2. Derecede TK yüksekliği (>290)	Akrabamn TK seviyesi	KAH Öyküsü	1. derece akrabada KAH	2.derece akrabada KAH	1.derece akrabamn KAH yaşı	2. derece akrabamn KAH yaşı	Hipertansiyon	DM	İlaç	Gen	Ksantoma veya Ksantalezma
1	K	22	kesin	119	292	?	61	?	172	46	12	var	321	yok	yok	Var		31	yok	yok	rosuvastatin 40mg	LDLR	yok
2	E	32	muhtemel	255	?	?	124	?	343	51,7	29	var	305	var	yok	Var		53	yok	yok	rosuvastatin 20mg		yok
3	K	26	muhtemel	140	253	98	114	374	227	65	23	?	?	yok	var	Var	49		yok	yok	rosuvastatin		yok
4	K	46	muhtemel	?	229	168	?	337	?	58	34	var	310	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor		yok
5	E	46	muhtemel	145	249	244	72	317	216	51	14	var	335	var	var	Yok	44		yok	yok	atorvastatin 20mg	APOE	yok
6	K	35	kesin	?	251	128	?	317	?	43	17	var	379	yok	var	Yok	58		yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
7	K	28	muhtemel	?	215	109	?	328	?	90	22	var	293	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor		yok
8	K	18	kesin	283	458	96	55	505	378	55	11	var	383	yok	yok	Var		?	yok	yok	rosuvastatin 20mg	LDLR	var
9	K	37	kesin	?	265	?	?	310	?	?	?	var	308	yok	var	Yok	?		yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
10	E	18	kesin	215	?	?	85	293	215	62	17	var	388	yok	yok	Var			yok	yok	kolestiramin	LDLR	yok
11	E	31	kesin	222,4	?	?	254	?	334	51,2	50,8	var	331	yok	var	Var	45		yok	yok	atorvastatin 80mg- Ezetimib 10mg	LDLR	yok
12	K	34	kesin	?	227	85	?	326	?	81	17	var	298	yok	var	Var	60		yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
13	K	33	kesin	153	249	57	56	?	218	50	11	?	?	yok	var	Var	45		yok	yok	atorvastatin 10mg	LDLR	yok
14	E	27	kesin	166	326	477	315	540	232	71	95,3	?	?	yok	yok	Yok			yok	yok	rosuvastatin 40 mg. aferez	LDLR	var
15	E	40	kesin	?	312	328	?	405	?	27	?	var	323	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
16	E	39	kesin	?	282	229	?	393	?	50	46	var	281	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
17	E	51	kesin	?	203	153	?	276	?	40	24	var	254	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
18	K	41	muhtemel	?	215	162	?	306	?	54	32	var	311	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
19	K	21	kesin	121	433	103	52	543	144	88	20	var	329	yok	yok	Var		52	yok	yok	rosuvastatin 40 mg. aferez	LDLR	var
20	E	23	kesin	?	263	149	?	372	?	63	30	var	508	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
21	K	30	kesin	?	386	310	?	586	?	96	62	var	302	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
22	K	18	muhtemel	?	193	59	?	282	?	66	10	var	367	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
23	E	36	kesin	?	294	190	?	393	?	61	?	var	266	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	var
24	K	46	muhtemel	?	195	168	?	292	?	75	34	?	?	yok	var	Yok	45		yok	yok	kullanmıyor		yok
25	K	57	kesin	440	723	239	80	799	564	74	16	var	630	var	var	Yok	37		var	yok	rosuvastatin 40 mg	LDLR	yok
26	K	24	kesin	?	296	139	?	394	?	69	?	?	?	yok	yok	Var		45	yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
27	K	49	kesin	?	230	?	?	293	?	54	?	var	282	yok	yok	Yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok

Tablo 4.3. (Devam) Hastaların biyokimyasal, klinik bulguları ve aile öyküleri

28	E	40	kesin	?	213	183	?	298	?	45	37	var	276	yok	var	Var	38	50	yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
29	E	26	kesin	245	529	181	103	647	295	101	36	?	?	yok	yok	yok			yok	yok	rosuvastatin 40mg, aferez	LDLRAP1	var
30	K	55	muhtemel	142	250	100	99	334	216	70	?	?	?	yok	var	yok	40		yok	yok	?		yok
31	K	56	kesin	129	204	179	177	283	187	35	35	?	?	var	var	var	61	40	var	yok	atorvastatin 40mg		var
32	K	47	muhtemel	?	211	110	?	304	?	68	22	?	?	yok	var	yok	42		yok	yok	kullanmıyor		yok
33	K	44	kesin	?	217	147	?	310	?	54	29	var	262	yok	yok	yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
34	K	50	muhtemel	?	254	204	?	352	?	66	41	var	305	yok	var	yok		75	yok	yok	kullanmıyor		yok
35	E	42	kesin	?	238	196	?	323	?	39	39	var	560	yok	var	var	54		yok	yok	kullanmıyor	LDLR	var
36	K	51	muhtemel	?	210	99	?	278	?	63	20	?	?	yok	var	var	46	55	var	var	kullanmıyor		yok
37	K	56	muhtemel	168	314	113	103	421	258	69	21	var	393	yok	var	yok	57		var	var	atorvastatin 40mg		yok
38	E	31	muhtemel	?	214	104	?	303	?	65	21	var	320	yok	yok	yok			yok	yok	kullanmıyor		yok
39	E	44	muhtemel	?	230	135	?	322	?	62	27	var	362	yok	yok	var		57	yok	yok	kullanmıyor		yok
40	E	46	muhtemel	109	217	206	158	320	181	52	41	?	?	var	var	var	52	?	yok	yok	atorvastatin 80mg		yok
41	K	59	kesin	?	201	200	?	294	?	85	?	var	333	yok	var	var	47	?	yok	yok	rosuvastatin 10mg	LDLR	yok
42	E	36	kesin	?	353	215	?	426	?	35	43	?	?	yok	var	var	25	60	yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
43	K	31	kesin	110	383	119	34	531	144	51	23	?	?	var	var	yok	40		yok	yok	Atorvastatin 80mg/Ezetimib 10mg	LDLR	var
44	E	36	muhtemel	138	214	136	238	311	211	58	27	?	?	yok	var	var	52	?	yok	yok	rosuvastatin 10mg		yok
45	E	53	muhtemel	109	224	422	234	342	234	62	?	?	?	var	var	var	43	42	var	var	rosuvastatin 20mg		yok
46	E	43	kesin	?	293	399	?	441	?	62	80	var	284	yok	yok	yok			yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok
47	E	44	muhtemel	?	207	203	?	274	?	34	?	?	?	var	var	var	43	42	yok	yok	rosuvastatin 20mg		yok
48	E	47	kesin	140	274	168	121	353	?	29	?	var	288	var	var	yok	42	42	yok	yok	rosuvastatin 80mg	LDLR	yok
49	E	39	kesin	62	203	124	120	252	106	28	30	?	?	var	var	yok	41		var	yok	atorvastatin 80mg/Ezetimib 10mg	LDLR	yok
50	K	20	kesin	110	315	95	74	315	175	48	15	var	362	yok	yok	yok			yok	yok	atorvastatin 20mg	LDLR	yok
51	K	58	muhtemel	?	211	208	?	298	?	54	42	?	?	yok	var	var	47	?	yok	yok	kullanmıyor		yok
52	K	23	kesin	?	315	86	?	390	?	58	?	var	320	yok	yok	var		?	yok	yok	kullanmıyor	LDLR	yok

4.2. Mutasyon Bulgusu ile Klinik ve Laboratuvar Bulgularının İlişkisi

Hasta grubunda MP/P mutasyon saptanan bireyler ile mutasyon saptanmayan bireylerin klinik ve laboratuvar parametreleri açısından farklılıklarını saptamak ve genetik bulguların, klinik ve laboratuvar bulguları ile ilişkisi değerlendirmek amacı ile istatistiksel analizler yapılmıştır.

Mutasyon saptanan ve saptanmayan bireyler arasında, cinsiyet açısından anlamlı bir fark yoktu. Erkeklerin % 69,6'sında mutasyon var iken, kadınların % 60,6'sında mutasyon vardı. Hastada KAH öyküsü ile mutasyon ilişkisi değerlendirildiğinde, KAH öyküsü bulunanların % 50'sinde mutasyon varken % 50'sinde yoktu. KAH öyküsü bulunmayanların ise % 68.3'ünde mutasyon varken, % 31,7'sinde mutasyon saptanmamıştır. Bu değerlere göre KAH öyküsü ile mutasyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Hastalarda ksantoma/ksantalezma bulunması ile mutasyon varlığı ilişkisi değerlendirildiğinde, ksantoma/ksantalezma saptanan hastaların % 87,5'inde, ksantoma/ksantalezması olmayanların % 60,5'inde mutasyon saptanmıştır. Bu iki parametre arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Fakat, homozigot *LDLR* mutasyonu olan bireyler ile heterozigot mutasyona sahip bireyler bu bulgu açısından karşılaştırıldığında, aradaki fark homozigot mutasyon taşıyanlar lehine anlamlı bulunmuştur ($p=0.0001$). Birinci derece akrabasında, KAH öyküsü ile hastalarda mutasyon saptanma durumu arasında ilişki incelendiğinde, birinci derece akrabalarında KAH bulunmayan hastaların % 79,2'sinde mutasyon mevcutken, birinci derece akrabasında KAH öyküsü olanların % 51,9'unda mutasyon saptanmıştır. Buna göre mutasyon pozitifliği ile birinci derece akrabada KAH öyküsü bulunmaması arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,042$). İkinci derece akrabada KAH öyküsü ile hastada mutasyon saptanması arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır. Akrabalarında TK yüksekliği öyküsü bulunan hastaların %78,9'unda mutasyon saptanır iken, %21,1'inde mutasyon saptanmamıştır. Akrabalarında TK yüksekliği bulunan hastalar ile bu hastalarda mutasyon saptanması arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p=0.001$).

Kategorik değişkenlerin, mutasyon ile ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi dışında, sayısal değişkenlerin (yaş, TK, LDL-K, TG) de mutasyon ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Buna göre, mutasyon saptananların yaş ortalaması, mutasyon

saptanmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0.003$). Tedavisiz LDL-K değerleri mutasyon saptanan bireylerde, saptanmayanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.002$). Kolesterol düşürücü tedavi alan bireylerde TG değerleri mutasyon saptananlarda, saptanmayanlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0.026$). Sayısal değişkenlerin mutasyon ile ilişkisinin değerlendirilmesi Tablo 4.4.'te özetlenmiştir. Bunlar dışında, yanlış anlamlı mutasyonların, diğer mutasyon çeşitlerine göre (*splice*, anlamsız, çerçeve kayması) LDL-K düzeyini etkileme durumu değerlendirilmiştir. Buna göre, LDL-K düzeyi, yanlış anlamlı heterozigot *LDLR* mutasyonu taşıyanlar ile diğer tiplerde (*siplice*, anlamsız, çerçeve kayması) heterozigot *LDLR* mutasyonu taşıyanlar arasında karşılaştırılmış ve fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0.24$).

Tablo 4.4. Sayısal değişkenlerin mutasyon ile ilişkisi

Değişkenler	Ortalama (SS)		p Değeri
	Mutasyon yok	Mutasyon var	
Yaş	44.72 (10.12)	34.52 (11.35)	0.003
LDL-K (Tedavi Sonrası)	148.75 (46.98)	180.81 (96.13)	0.432
LDL-K (Tedavi Öncesi)	226.95 (28.35)	305.35 (111.27)	0.002
TG (Tedavi Öncesi)	162.47 (79.08)	182.11 (99.78)	0.623
TG (Tedavi Sonrası)	155.88 (56.19)	105.86 (80.64)	0.026
TK (Tedavi Öncesi)	321.94 (37.30)	397.47 (127.69)	0.058
TK (Tedavi Sonrası)	232.13 (51.20)	245.63 (123.31)	0.638
HDL-K	61.00 (13.12)	57.28 (18.82)	0.182
Akrabada Yüksek TK	326.86 (36.61)	344.27 (97.94)	0.982

SS: Standart sapma, p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

4.3. *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9* Genlerinin Sanger Dizi Analizi Sonuçları

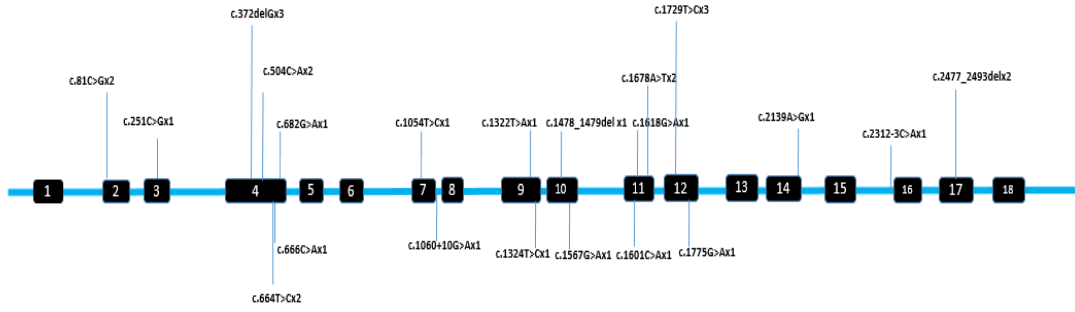
Muhtemel veya kesin ailesel hiperkolesterolemi saptanan hastalarda ilk aşamada *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9* genlerine yönelik yapılan dizi analizi sonucunda, toplamda 30 hastada *LDLR* geninde patojenik/muhtemel patojenik veya önemi bilinmeyen değişiklik (VUS) olarak sınıflandırılan, 21 farklı değişiklik saptanmıştır. Diğer iki gende ise hastalık ilişkili bir değişiklik saptanmamıştır. 28 hastada saptanan değişiklikler patojenik/muhtemel patojenik değişiklik olarak sınıflandırılmıştır. Bu hastaların 20 tanesinde 14 farklı yanlış anlamlı (missens) mutasyon saptanırken, 8 bireyde 2 tanesi tek nükleotid değişikliği ve 3 tane çerçeve kayması mutasyonu olmak üzere 5 farklı anlamsız (nonsens)/*splice* bölgesi değişikliği saptanmıştır. VUS değişikliğe sahip 2 kişide ise bir tane intronik ve bir tane *splice* bölgesinde yer alan eş

anlamli (sinonim) değişiklik saptanmıştır. 30 hastanın 3 tanesinde saptanan mutasyonlar homozigotken, 27 tanesinde heterozigot olduğu görülmüştür. Hastaların mutasyon bilgileri ve mutasyonlar Tablo 4.5'te toplu şekilde gösterilmiştir. Ayrıca, saptanan tüm mutasyonlar ve gen üzerindeki konumları şekil 4.1.'de temsili olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.5. *LDLR* geninde dizi analizinde saptanan klinik ilişekli olabilecek değişiklikler

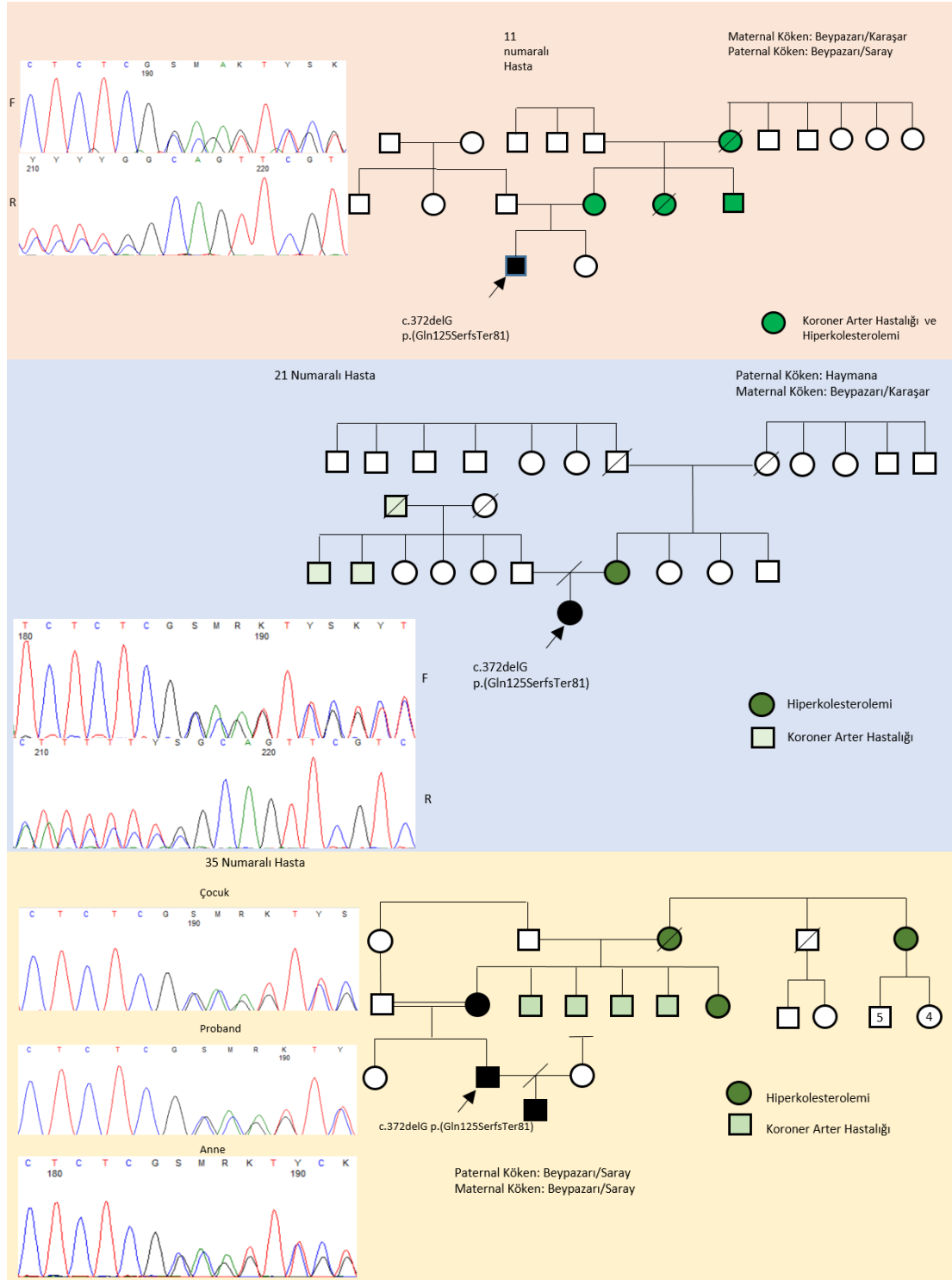
Hasta No	Patojenite	Zigosite	Tipi	Gen	Pozisyon	LDLR Mutasyonu	Protein
1	LP/P	Het.	M	LDLR	E-9	c.1322T>A	p.Ile441Asn
6	LP/P	Het.	M	LDLR	E-4	c.504C>A	p.Asp168Glu
8	LP/P	Hom.	M	LDLR	E-11	c.1601C>A	p.Thr534Asn
9	LP/P	Het.	M	LDLR	E-12	c.1729T>C	p.Trp577Arg
10	LP/P	Het.	M	LDLR	E-11	c.1678A>T	p.Ile560Phe
11	LP/P	Het.	N	LDLR	E-4	c.372delG	p.Gln125SerfsTer81
12	LP/P	Het.	M	LDLR	E-9	c.1324T>C	p.Tyr442His
13	LP/P	Het.	N	LDLR	E-4	c.666C>A	p.Cys222Ter
14	LP/P	Hom.	SB	LDLR	İ-15	c.2312-3C>A	
15	LP/P	Het.	N	LDLR	E-17	c.2477_2493del	
16	LP/P	Het.	N	LDLR	E-10	c.1478_1479del	p.Ser493CysfsTer42
17	LP/P	Het.	M	LDLR	E-12	c.1775G>A	p.Gly592Glu
18	VUS	Het.	İN/SB?	LDLR	İ-7	c.1060+10G>A	
20	LP/P	Het.	M	LDLR	E-11	c.1678A>T	p.Ile560Phe
21	LP/P	Het.	N	LDLR	E-4	c.372delG	p.Gln125SerfsTer81
23	LP/P	Het.	M	LDLR	E-12	c.1729T>C	p.Trp577Arg
25	LP/P	Het.	M	LDLR	E-4	c.664T>C	p.Cys222Arg
26	LP/P	Het.	M	LDLR	E-7	c.1054T>C	p.Cys352Arg
27	LP/P	Het.	M	LDLR	E-10	c.1567G>A	p.Val523Met
28	LP/P	Het.	M	LDLR	E-11	c.1618G>A	p.Ala540Thr
33	LP/P	Het.	M	LDLR	E-3	c.251C>G	p.Pro84Arg
35	LP/P	Het.	N	LDLR	E-4	c.372delG	p.Gln125SerfsTer81
41	LP/P	Het.	M	LDLR	E-2	c.81C>G	p.Cys27Trp
42	LP/P	Het.	M	LDLR	E-4	c.504C>A	p.Asp168Glu
43	LP/P	Hom.	M	LDLR	E-4	c.682G>A	p.Glu228Lys
46	LP/P	Het.	M	LDLR	E-12	c.1729T>C	p.Trp577Arg
48	LP/P	Het.	N	LDLR	E-17	c.2477_2493del	
49	LP/P	Het.	M	LDLR	E-2	c.81C>G	p.Cys27Trp
50	VUS	Het.	SN/SB	LDLR	E-14	c.2139A>G	p.Thr713=
52	LP/P	Het.	M	LDLR	E-4	c.664T>C	p.Cys222Arg

Tabloda Benign/Muhtemel Benign değişikliklere yer verilmemiştir. LP/P:Patojenik/Muhtemel Patojenik, VUS: nemi bilinmeyen değişiklik, Het.: Heterozigot, Hom.: Homozigot, M:Missens, N:Nonsens, SB:Splice Bölgesi, İN:İntronik, SN:Sinonim, E:Ekzon, İ:İntron

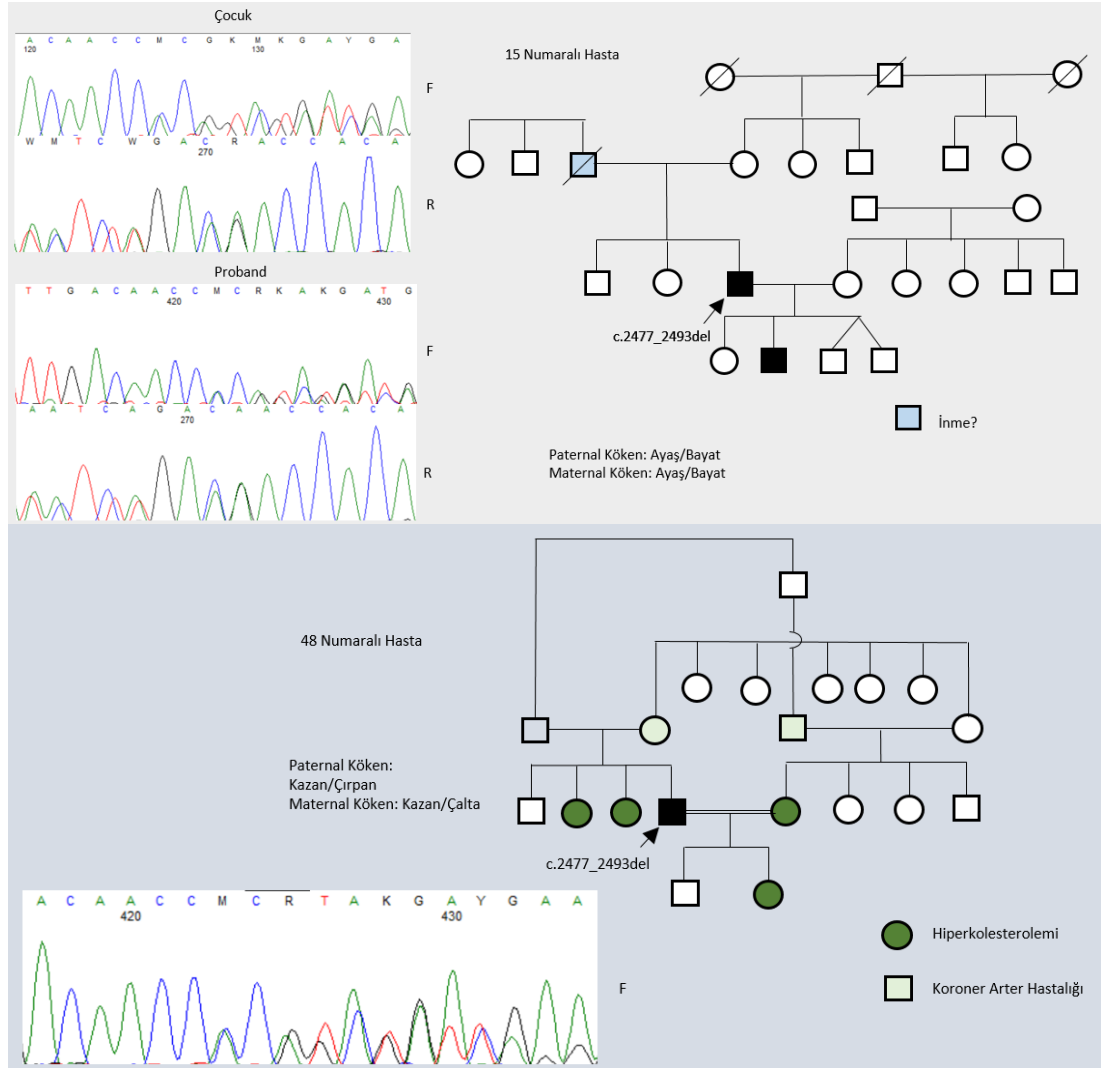


Şekil 4.1. LDLR ekzonlarının temsili görünümü ve mutasyonların yerleri.

Saptanan mutasyonlardan 2 tanesi daha önce literatürde bildirilmemiştir. Bu iki mutasyon toplamda 5 hastamızda görülmüştür. Aynı mutasyonu taşıyan hastalar arasında yapılan pedigri analizine göre 2. derece veya daha yakın akarabalık olmadığı düşünülmüştür. Bu hastaların mutasyonlarının elektroferogram görüntüleri ve pedigrileri Şekil 4.2. ve 4.3.'de görülmektedir. Ayrıca, yeni saptanan mutasyonlardan olan 17 bazlık c.2477_2493del mutasyonunun çerçeve kaymasına neden olarak erken dur (*stop*) kodonu oluşturduğu görülmüş ve bu da şekil 4.4.'de özetlenmiştir.



Şekil 4.2. LDLR: c.372delG mutasyonu taşıyan üç hasta.



Şekil 4.3. *LDLR*: c.2477_2493del mutasyonu taşıyan iki hasta.



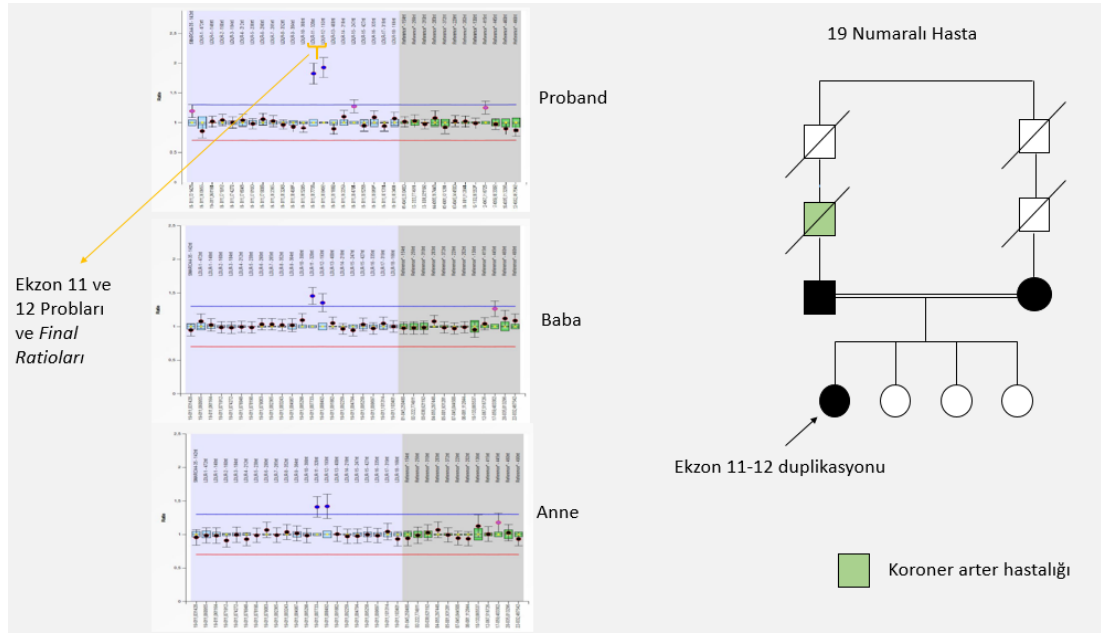
Şekil 4.4. Ekzon 17’de yer alan delesyon (c.2477_2493del) ve erken *stop* kodonu. Delesyonun iki ucunda yer alan mikrohomojoloji gösteren diziler **açık mavi** ve **yeşil** ile işaretlenmiştir. Delesyon bu iki diziden biri ile birlikte **kırmızı** ile işaretlenmiş diziyi de içeren 17 bazdan oluşmakta ve çerçeve kaymasına neden olmaktadır. Delesyon sonucunda oluşan yeni kodonlar (farklı renklerle işaretli) ve son olarak erken dur kodonu şekilde görülmektedir.

Bu beş hasta dışında *LDLR* geninde mutasyon saptanan diğer hastaların iki kuşak pedigrisi ve elektroferogramları EK-3’de verilmiştir. Mutasyon saptanan fakat, aile bireylerinin mutasyon verisi olmayan bireylerin ise elektroferogram görüntüleri EK-4’te verilmiştir.

4.4. *LDLR* Geni MLPA Analizi Sonuçları

Hasta grubunda 3 gene yönelik Sanger dizileme sonucunda hastalık ilişkili mutasyon saptanamayan ya da önemi bilinmeyen mutasyon saptanan 24 hastaya *LDLR* geni kopya sayısı değişikliklerini değerlendirmek amacıyla MLPA yapılmıştır. Bu analiz sonucunda bir hastada ekzon 11 ve 12 problemlerini içeren bir kopya sayısı artışı saptanmıştır. Bu artış, *Final Ratio* değerlerinin ekzon 11 için 1,82, ekzon 12 için ise 1,92 olması nedeni ile homozigot duplikasyon veya triplikasyon olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra, hastanın anne ve babasında akarabalık öyküsü olması ve yüksek kolesterol değerleri olması nedeni ile anne ve babadan da *LDLR* MLPA yapılmıştır. Sonuç olarak, hem anne hem de baba da 11 ve 12. ekzonlarda duplikasyon tespit edilmiştir. Annenin *Final ratio* değerleri ekzon 11 ve 12 için sırası ile 1,41 ve

1,42 iken, babanın aynı bölgeler için değerlerinin, sırasıyla 1,45 ve 1,35 olarak saptanması nedeni ile duplikasyon heterozigot olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda bu iki ekzonun toplam nükleotid sayısının 259 baz olduğu ve üçün katı olmaması nedeni ile çerçeve kaymasına neden olduğu anlaşılmıştır. Hastanın, anne ve babasının fragman analizleri ve pedigrileri şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



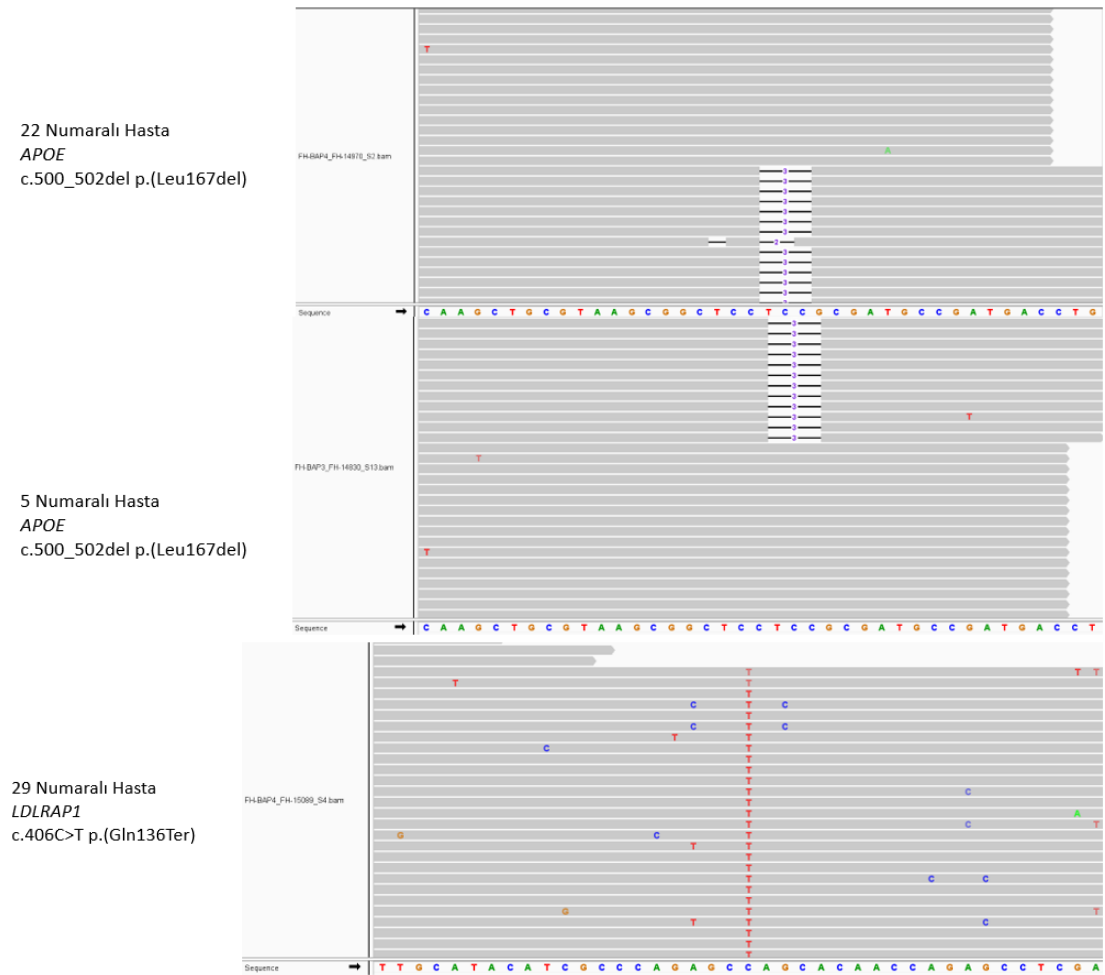
Şekil 4.5. Ailenin Pedigrisi ve MLPA sonucu.

4.5. NGS Paneli Sonuçları ve Saptanan Nadir Değişiklikler

NGS paneli iki farklı amaç için kullanılmıştır. Bunlardan birincisi ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkilendirilmiş diğer genlerin mutasyon çıkmayan hastalarda değerlendirilmesidir. İkincisi ise 12 SNP'nin bu hastalarda değerlendirilerek PRS hesaplanması ve diğeri hastalık ilişkili olabilecek nadir değişikliklere yönelik değerlendirme yapmaktır. Panelde içeriğinde, *APOE*, *LDLRAP1* ve *STAP1* genlerinin yanı sıra, *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9* genleri de mevcuttu. Bu genler Sanger dizileme ile değerlendirilmiş olmasına rağmen *LDLR* ve *PCSK9*'un *promoter* bölgeleri Sanger ile değerlendirilmemişti. *APOB*'nin ise sadece 26. ekzonun bir kısmı ve 29. Ekzonlarında yer alan *hotspot* bölgelere yönelik dizileme yapılmıştı. Bu nedenle ilk basamakta Sanger ve MLPA sonucunda mutasyon saptanamayan 23 hasta ile MLPA'da kopya sayısı değişikliği saptanan bir hasta panele alınmıştır. MLPA sonucu pozitif olan

hastanın penele dahil edilmesinin nedeni panelin 8 hasta ve katları çalışılacak şekilde dizayn edilmiş olması ve bu nedenle 23 hastaya ek olarak bir kişiye daha ihtiyaç duyulmasıydı, ayrıca bu şekilde hastanın 12 SNP skoru da hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, 24 hastanın değerlendirilmesinde 2 hastada *APOE* geninde daha önce hastalık ile ilişkilendirilmiş c.500_502del p.(Leu167del) mutasyonu saptanmıştır. Bir hastada ise *LDLRAP1* geninde durma kodonuna yol açan homozigot c.406C>T p.(Gln136Ter) değişikliği saptanmıştır. Saptanan mutasyonların IGV görüntüleri Şekil 4.6.'da yer almaktadır. Bunlar dışında, diğer bireylerde hastalık ilişkili bir mutasyon saptanmamıştır.

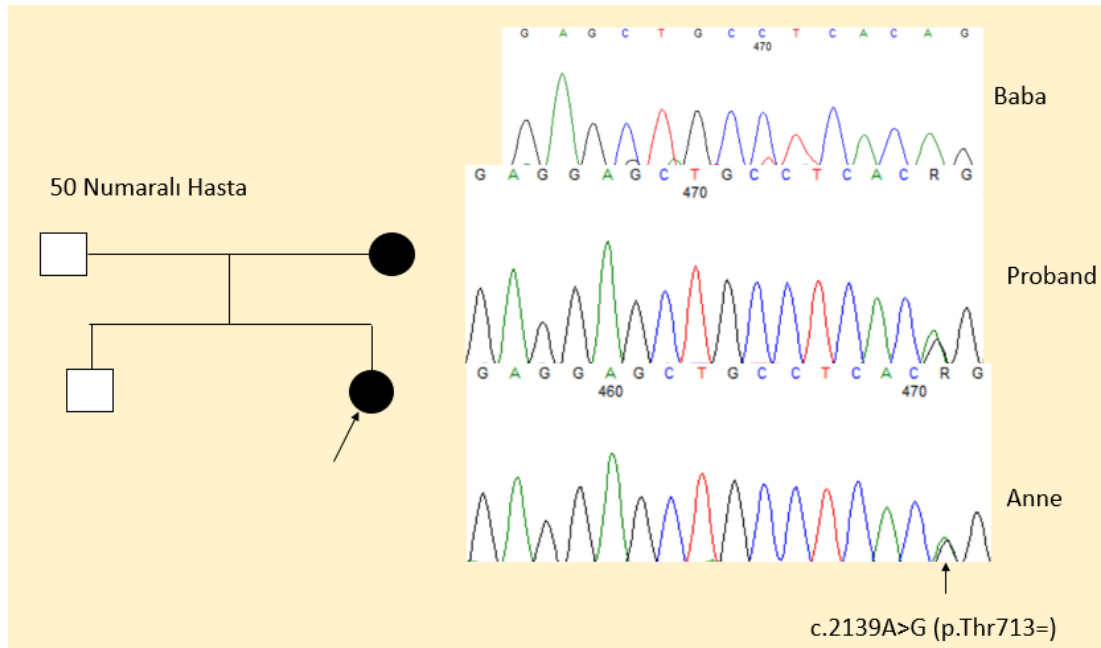


Şekil 4.6. NGS sonucu hastalık ilişkili saptanan mutasyonların IGV görüntüleri.

4.6. LDLR cDNA PCR ve Dizileme Sonuçları

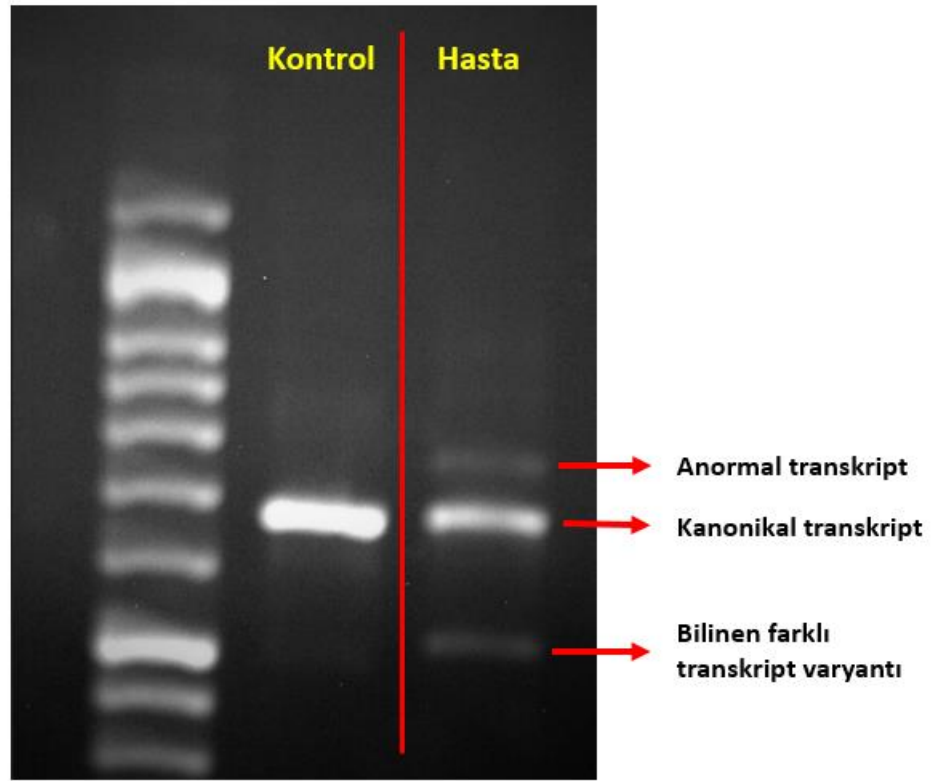
Hasta grubu içinden 50 numaralı bireyde, *LDLR* geninde c.2319A>G (p.Thr713=) sinonim mutasyonu saptandı. Mutasyon 14. ekzonun son bazından bir

önceki bazda saptanması nedeni ile *splice* bölgesinde bulunuyordu. Bu mutasyon gnomAD veri tabanında bildirilmemişti ve *in silico* algoritmalar *splice* bölgesini değiştirebileceği yönünde tahminlerde bulunmuştu. *APOB* ve *PCSK9* dizi analizlerinde, MLPA ve NGS analiz sonuçlarında etken olarak başka bir neden saptanmadı. Bu nedenle, öncelikle hastanın anne ve babasında bu mutasyona yönelik segregasyon analizi yapıldı ve hiperkolesterolemi nedeni ile etkilenmiş annesinde aynı mutasyon saptanırken babada saptanmadı. Mutasyonun elektroferogram görüntüleri pedigrisi ile birlikte Şekil 4.7.'te verilmiştir.



Şekil 4.7. 50 numaralı hastanın elektroferogram ve pedigrisi.

Bu sonuç doğrultusunda değişikliğin *splice* bölgesini değiştirme durumunu anlamak amacı ile, hastadan RNA izolasyonu yapılmış ve RNA, cDNA'ya dönüştürülmüştür. Oluşturulan cDNA üzerinden ekzon 16 ve ekzon 11-12 sınırından tasarlanan primerler ile bir kontrol ile birlikte hastaya PCR yapılmıştır. Normal PCR sonucunda, 663 baz kanonik transkript ve 510 baz uzunluğunda iki farklı uzunlukta transkript ürünlerinin oluşması beklenmekteydi. PCR sonucunda hastada beklenen transkriptler dışında, beklenmeyen uzunlukta bandlar saptandı (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Hasta ve kontrol örneğinden cDNA PCR sonucu jel görüntüsü ve saptanan *LDLR* transkriptlerinin band görüntüleri.

Bunun üzerine saptanan bandlar jelden izole edildi, tekrar PCR ile çoğaltıldı ve Sanger yöntemi ile dizilendi. Fakat, izolasyon sırasında kanonik transkriptten tam olarak ayrıştırılamadığı için elektroferogramda iki farklı transkriptin pikleri birlikte kirli bir görüntü oluşturuyordu. Bununla birlikte, ayrıntılı olarak incelendiğinde anormal transkriptin intron 14'ten 81 bazlık intron retansiyonuna yol açtığı ve bu bölgenin içinde dur kodonu olduğu saptandı (Şekil 4.9.). Bunun üzerine, anormal transkripti daha iyi göstermek için ekzon 14'ten mutant alele yönelik yapılan F primer ile yapılan PCR sonucunda kontrolde band saptanmadı. Hastada ise kanonik transkriptin uzunluğuna denk gelen band görülmedi. Bununla birlikte, ilk PCR sonucu saptanan anormal band ile daha silik ve uzun bir band görüldü (Şekil 4.10.). Bu ürün sekanslandığında İntrondan 81 bazlık kısım içeren anormal transkript ve değişen *splice* bölgesi net bir şekilde gözlemlendi ve ayrıca, elektroferogramda pikleri küçük olmakla birlikte daha farklı anormal transkriptler olabileceği anlaşıldı. Bunlardan bir tanesinde intron 14'ten 217 bazın ekzon 14'e eklenmiş olabileceği görüldü (Şekil 4.11.).

EKZON-14

GAGTGAACCTGGTGTGAGAGGACCACCCTGAGCAATGGCGGCTGCCAGTATCTGTGCCTCCCTGCCCCGAGAT
CAACCCCACTCGCCAAGTTTACCTGCGCTGCCGGACGGCATGCTGCTGGCCAGGGACATGAGGAGCTGC
CTCACAG

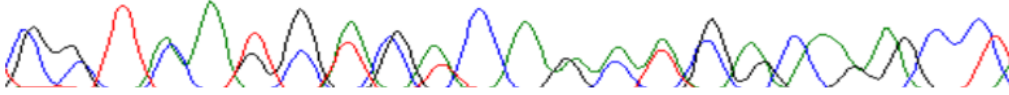
İNTRON-14 (Bir kısmı)

gtgtggcacacgccttgttctgctgctgtctcctcaactgccccctcctgagccctctctgctcatctgcaaatgggtacctcaaggtcgttgt
aaggactcatgagtcgggataaccatactttctggatggacacatcagcacccgggcttgacatttaccagttcccctttgatgcctggttcctc
ttcccggccccctgaagaggtgatctgatttctgacaggagccctgagggaggaaatggccccttggactttcttttcttattttttctt
gagatttctgtcaccagcctggaatgcagtggtgcatcttgctcactgctacctcccactgggttcaagcaattctcctgcctcagcctccc
aagtagctgggattacaagcatgcgccaccatgcctggtaagttttagtatttttagtacagacagggtttctccatggtggcc

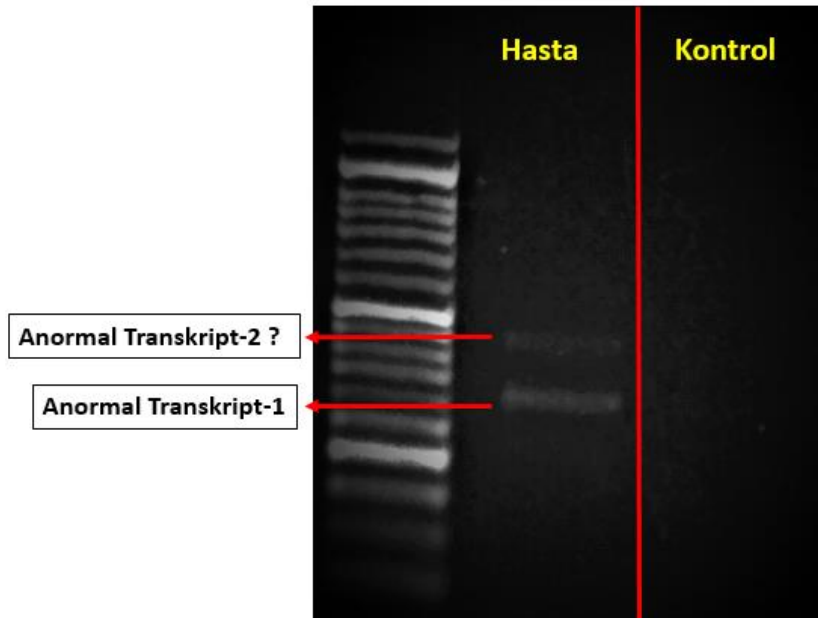
EKZON-15

AGGCTGAGGGTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCACAGC**CGTAAGGA**
CACAGCACACAACCACCCGACCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGGGGCCACCCCTGGGCTCACCACGGT
GGAGATAGTGACAATGTCTACCAAG

G S T M A T G A G W C A R M W G A C A A C C
510 520



Şekil 4.9. İlk jel pürifikasyonu sonucu Sanger dizi analizinde kanonik ve anormal transkripti içeren elektroferogram ve DNA dizisi. Şekilde, **mavi** ve **sarı** ile işaretli diziler elektroferogramda bir arada görülmektedir. Mavi işaretli dizi anormal transkripti gösterirken, sarı dizi kanonik transkripti göstermektedir. Görüldüğü gibi kanonik transkript ekzon14'ten 15'e normal şekilde *splice* gerçekleşmiştir. Anormal olanda ise intronik dizi görülmektedir. Elektroferogram *forward* yönündedir.



Şekil 4.10. Hasta ve kontrol örneğinden allel spesifik PCR jel görüntüsü.

EKZON-14

GAGTGAACTGGTGTGAGAGGACCACCCTGAGCAATGGCGGCTGCCAGTATCTGTGCCTCCCTGCCCCGAGAT
CAACCCCACTCGCCCAAGTTTACCTGCGCCTGCCCGACGGCATGCTGCTGGCCAGGGACATGAGGAGCTGC
CTCACAG

İNTRON-14 (Bir kısmı)

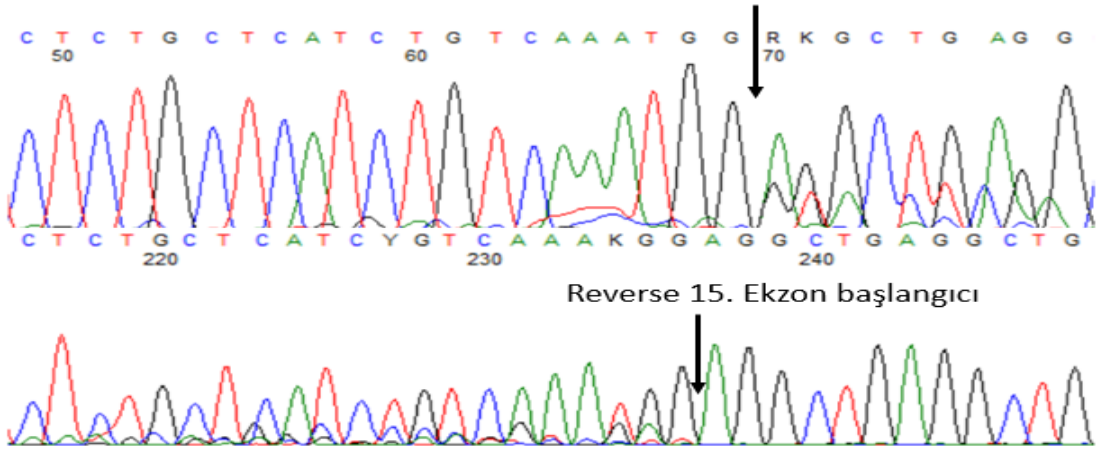
gtgtggcacaagccttgtttctgctcctgtgtcctccaactgccccctcgaagcctctctgtctcatctgtcaaatgggtacccaaggtcgttgt
aaggactcatgagtcgggataaccatactttcttgatggacacatcagcaccgggcttgacatttaccagttcccctttgatcctggtttcctc
ttccggccccctgaagaggtgatctgattctgacaggacccctgaggaggaaatggtccccttgttgactttttcttttttttttttt
gagatttctgtcaccagcctggaatgcaagtggtccatcttggctcactgctacctctccaactgggttcaagcaattctctgctcagcctcc
aagtagctgggattacaagcatgcccaccatgctggctaagttttgatttttagtacagacagggtttccatgggtggcc

EKZON-15

AGGCTGAGGCTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGCTCCACAGCCGTAAGGA
CACAGCACACAACCACCCGACCTGTTCCCGACACCTCCCGGCTGCCTGGGGCCACCCCTGGGCTCACCACGGT
GGAGATAGTGACAATGTCTACCAAG

14. İtronun 81. bazından

15. Ekzona geçiş noktası



Şekil 4.11. Hastanın alel spesifik ürününden Sanger ve anormal transkriptlerin yeni *splice* bölgeleri. Şekilde alel spesifik Sanger sonucunda üstte F, altta R yönünden elektroferogramlar görülmektedir. Üstteki elektroferogramda, dizide yeşil ile işaretlenmiş kısım okunmaktadır. Alttan gelen pikler ise görüldüğü gibi 81 baz sonunda yani, ilk anormal transkriptin ekzon 15'e *splice*'i sonrası görülmektedir. Yüksek pikler, intron 14'ten 81 bazın ekzona eklendiği transkripte aittir. R'de alttan gelen küçük pikler incelendiğinde diğer transkriptlerden birinin muhtemel *splice* bölgesinin pembe ile işaretli dizi olabileceği düşünülmüştür. Fakat muhtemelen bunun dışında farklı transkript ürünleri de mevcuttur. Kırmızı ile işaretli kısım ise yeni transkriptler içindeki dur kodonudur.

4.7. Hasta ve Kontrol Gruplarından Hesaplanan Poligenik Risk Skorları

Hasta ve kontrol grubunda, daha önce başka çalışmalarda da kullanılan, 12 SNP ve 6 SNP içeren PRS anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 3.8.). *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9* dizi analizi sonucunda ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili mutasyon saptanan 28 bireyin PRS hesaplaması Sanger yöntemi ile 12 SNP'ye yönelik dizileme yapılması ile hesaplanırken, kalan 24 birey NGS panele alınmış ve bu panelin 12 SNP'yi kapsamaması sayesinde, bu bireylerin PRS'leri de hesaplanabilmiştir. EK-5 ve 6'da sırası ile iki yöntemle 12 SNP genotipi saptanmış olan iki farklı hastaya ait

örnekler verilmiştir. Bu grupların PRS'leri hem birbirleri ile hem de Tablo 4.6.'da kontrol grubu olarak kullanılan Türk örnekleme ile karşılaştırılmıştır. Tablo 4.7. ve 4.8.'de sırası ile Mutasyon negatif ve mutasyon pozitif hastaların genotipleri ve skorlama sonuçları yer almaktadır.

Hasta grubu ve kontrol örnekleminde hesaplanmış olan PRS'ler kendi aralarında karşılaştırıldıktan sonra, PRS'lerin üretildiği yayınlardaki diğer popülasyonların skor ortalamaları ile de karşılaştırılmıştır. Bu sayede ilk aşamada Türk mutasyon negatif, pozitif ve kontrol gruplarında PRS ortalamaları arasında farklar olup olmadığı değerlendirilmiştir. İkinci aşamada ise diğer popülasyonlarda saptanan skor ortalamaları ile Türk popülasyonunda saptanan ortalamalarının birbiri ile uyumu değerlendirilmiştir. Bahsi geçen yayınlarda da skor ortalamaları; mutasyon pozitif, negatif hasta grupları ile kontrol olmak üzere üç ana grupta hesaplanmıştır.

Tablo 4.6. Kontrol örnekleminin genotipleri ve 12 ve 6 SNP PRS sonuçları

Hasta No	rs24794 09	rs6293 01	rs13671 17	rs42993 76	rs15643 48	rs18005 62	rs37573 54	rs112204 62	rs80173 77	rs65117 20	rs429358 Genotipi	rs7412 Genotipi	10 SNP	4 SNP	APOE Genotipi	12 SNP Skoru	6 SNP Skoru
SRR8397 04	1	0	1	1	2	2	2	0	0	2	TT	CC	0.799	0.531	0	0.799	0.531
SRR8397 05	1	1	0	0	2	2	2	1	1	2	TT	CC	0.857	0.51	0	0.857	0.51
SRR8401 04	2	2	0	2	2	2	2	1	1	2	TT	CC	1.201	0.802	0	1.201	0.802
SRR8469 81	1	2	0	1	1	2	2	0	2	1	TT	CC	0.863	0.551	0	0.863	0.551
SRR8469 82	0	2	0	0	2	2	1	0	1	2	TC	CC	0.868	0.66	0.1	0.968	0.76
SRR8469 83	1	2	0	0	2	2	2	0	0	2	TT	CC	0.928	0.66	0	0.928	0.66
SRR8474 90	1	1	0	1	2	2	2	0	2	2	TT	CC	0.907	0.581	0	0.907	0.581
SRR8474 91	1	1	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	TC	0.878	0.581	-0.4	0.478	0.181
SRR8480 69	1	2	1	0	2	2	1	0	1	1	TT	CC	0.84	0.58	0	0.84	0.58
SRR8489 30	2	1	0	0	2	2	1	0	0	2	TT	CC	0.793	0.51	0	0.793	0.51
SRR8494 97	1	0	0	1	2	2	1	0	2	2	TT	CC	0.72	0.431	0	0.72	0.431
SRR8494 96	1	2	1	0	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.057	0.76	0	1.057	0.76
SRR8494 95	1	1	2	2	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.149	0.852	0	1.149	0.852
SRR8494 94	0	2	0	0	2	2	1	1	0	2	TT	CC	0.889	0.66	0	0.889	0.66
SRR8494 93	1	2	0	0	2	2	1	1	1	2	TT	CC	0.97	0.66	0	0.97	0.66
2678	0	2	0	2	2	2	2	1	1	1	TC	CC	0.917	0.622	0.1	1.017	0.722

Microsoft Excel'de formüller yardımı ile hesaplanmıştır. Formüller tablo X'teki etki büyüklüklerine ve anlatılan hesaplama metoduna göre yazılmıştır. 0,1,2 rakamları risk alellerinin bireylerdeki bulunma durumunu ifade etmektedir;0: Risk aleli bireyde yok, 1: Risk aleli bireyde heterozigot, 2: Risk aleli bireyde homozigot durumda. Sarı işaretli SNP'ler aynı zamanda 6 SNP skorunda kullanılan SNP'lerdir

Tablo 4.7. Mutasyon negatif hastalarda genotipler, 12 ve 6 SNP skorlar

Hasta No	rs2479409	rs629301	rs1367117	rs4299376	rs1564348	rs1800562	rs3757354	rs1120462	rs8017377	rs6511720	rs429358	rs7412	10 SNP	4 SNP	APOE Haplotipi	12 SNP Skoru	6 SNP Skoru
40	0	2	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.976	0.731	0	0.976	0.731
3	1	1	1	1	1	2	2	0	1	2	TC	CC	0.964	0.681	0.1	1.064	0.781
2	0	2	0	0	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.905	0.66	0	0.905	0.66
4	0	1	0	2	2	2	2	1	2	2	TC	CC	0.976	0.652	0.1	1.076	0.752
7	1	2	0	2	1	2	1	1	1	2	TT	CC	1.098	0.802	0	1.098	0.802
24	0	2	0	2	2	2	2	1	0	2	TT	CC	1.068	0.802	0	1.068	0.802
31	1	2	0	1	2	2	1	0	1	2	TC	CC	0.991	0.731	0.1	1.091	0.831
32	1	2	1	1	2	2	2	0	2	2	TC	CC	1.157	0.831	0.1	1.257	0.931
34	1	2	0	1	1	2	2	0	0	2	TT	CC	0.985	0.731	0	0.985	0.731
36	1	2	1	0	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.057	0.76	0	1.057	0.76
37	1	2	2	2	1	2	2	0	1	1	TT	CC	1.105	0.822	0	1.105	0.822
39	0	2	1	0	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.005	0.76	0	1.005	0.76
38	0	1	0	2	2	2	2	0	2	2	TC	CC	0.926	0.652	0.1	1.026	0.752
44	0	2	0	1	2	2	1	0	0	1	TT	CC	0.73	0.551	0	0.73	0.551
45	1	2	0	1	1	2	1	1	2	2	TT	CC	1.056	0.731	0	1.056	0.731
51	1	2	1	0	1	2	2	0	1	2	TC	CC	1.043	0.76	0.1	1.143	0.86
47	1	2	0	1	2	2	2	0	0	2	TT	CC	0.999	0.731	0	0.999	0.731
30	1	2	1	2	1	2	1	1	0	2	TC	CC	1.169	0.902	0.1	1.269	1.002

Tablo 4.8. Mutasyon pozitif hastalarda genotipler,12 ve 6 SNP skorları

Hasta No	rs2479409	rs629301	rs1367117	rs4299376	rs1564348	rs1800562	rs3757354	rs11220462	rs8017377	rs6511720	rs429358	rs7412	10 SNP	4 SNP	APOE haplotip	12 SNP Skoru	6 SNP Skoru
6	0	2	1	0	0	2	0	1	0	2	TT	CC	0.924	0.76	0	0.924	0.76
1	1	1	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.878	0.581	0	0.878	0.581
8	1	2	0	0	2	2	2	0	0	2	TT	CC	0.928	0.66	0	0.928	0.66
11	0	2	0	0	0	2	2	0	1	2	TT	CC	0.877	0.66	0	0.877	0.66
9	2	2	0	1	2	2	2	0	0	2	TC	CC	1.051	0.731	0.1	1.151	0.831
10	1	2	0	1	0	2	2	0	1	2	TT	CC	1	0.731	0	1	0.731
12	1	1	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.878	0.581	0	0.878	0.581
13	0	2	1	2	2	2	2	0	1	1	TT	CC	0.967	0.722	0	0.967	0.722
16	0	1	0	1	1	2	2	0	2	2	TT	CC	0.841	0.581	0	0.841	0.581
15	1	2	0	0	0	2	2	0	1	2	TT	CC	0.929	0.66	0	0.929	0.66
21	0	2	0	1	1	2	2	1	0	2	TT	CC	0.983	0.731	0	0.983	0.731
14	1	2	0	1	2	2	1	0	2	2	TT	CC	1.02	0.731	0	1.02	0.731
20	0	2	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.976	0.731	0	0.976	0.731
17	0	2	0	0	2	2	2	0	1	2	TC	TC	0.905	0.66	0.2	1.105	0.86
26	1	2	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.028	0.731	0	1.028	0.731
25	1	2	0	0	2	2	1	1	2	2	TC	CC	0.999	0.66	0.1	1.099	0.76
27	1	2	0	1	2	1	2	0	2	2	TT	CC	1	0.731	0	1	0.731
23	1	1	0	1	1	2	2	0	2	2	TT	CC	0.893	0.581	0	0.893	0.581
28	0	1	2	0	1	2	2	0	0	2	TT	CC	0.912	0.71	0	0.912	0.71
33	1	2	2	1	1	2	1	0	1	2	TT	CC	1.177	0.931	0	1.177	0.931
19	1	2	2	0	1	2	1	0	1	2	TT	TC	1.106	0.86	-0.4	0.706	0.46
29	0	2	0	1	2	2	2	0	0	0	TT	CC	0.587	0.371	0	0.587	0.371
41	0	2	1	2	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.147	0.902	0	1.147	0.902

Tablo 4.7. (Devamı) Mutasyon pozitif hastalarda genotipler,12 ve 6 SNP skorları

43	1	2	2	2	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.299	1.002	0	1.299	1.002
42	1	2	0	0	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.957	0.66	0	0.957	0.66
35	0	2	2	1	2	2	2	0	2	2	TT	CC	1.205	0.931	0	1.205	0.931
52	1	2	1	0	1	2	2	0	1	2	TT	CC	1.043	0.76	0	1.043	0.76
49	0	1	0	0	2	2	1	0	1	2	TT	CC	0.718	0.51	0	0.718	0.51
48	1	2	0	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.028	0.731	0	1.028	0.731
46	1	1	1	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	0.978	0.681	0	0.978	0.681
5	2	2	0	1	2	2	0	2	2	2	TT	CC	1.135	0.731	0	1.135	0.731
18	2	2	2	0	1	2	2	0	1	2	TT	CC	1.195	0.86	0	1.195	0.86
22	1	2	1	1	2	2	2	0	1	2	TT	CC	1.128	0.831	0	1.128	0.831
50	0	2	0	1	2	1	2	1	0	1	TT	CC	0.76	0.551	0	0.76	0.551

Sarı ile işaretli SNP'ler hem 6 hem 12 SNP PRS'de kullanılan SNP'lerdir.

4.7.1. Poligenik Risk Skorlarının İstatistiksel Analizi

Türk popülasyon örneklemini, MP/P mutasyon saptanan mutasyon pozitif hastalar ve mutasyon negatif hastaların 12 ve 6 SNP kullanılarak elde edilen skorlarının ortalama değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre, 12 SNP skoru için, Türk popülasyon örnekleminin ortalaması: 0.902 (SS: 0.171), mutasyon pozitif grubun ortalaması: 0.977 (SS: 0.153) ve mutasyon negatif grubun ortalaması: 1.051 (SS:0.120) olarak saptanmıştır. 6 SNP skoru için ise, Türk popülasyon örnekleminin ortalaması: 0.609 (SS: 0.165), mutasyon pozitif grubun ortalaması: 0.709 (SS: 0.138) ve mutasyon negatif grubun ortalaması: 0.777 (SS: 0.098) olarak bulunmuştur. Poligenik risk skor ortalamalarının kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, 12 SNP skoru için, mutasyon negatif grup ile kontrol (Türk popülasyon örneklemini) arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.006$). Mutasyon negatif grup ile mutasyon pozitif grup ve mutasyon pozitif grup ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. 6 SNP skoru için yapılan karşılaştırmalar sonucunda ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Poligenik risk skorlarına ait ortalama değerleri ve gruplar arasında yapılan karşılaştırmaların sonuçları Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Türk popülasyon örnekleminde poligenik risk skorları ve gruplar arası karşılaştırma sonuçları

Grup Adı	Ortalama ve Standart Sapma	
	12 SNP Skoru	6 SNP Skoru
Mutasyon Negatif	1.051 (0.120)	0.777 (0.098)
Mutasyon Pozitif	0.977 (0.153)	0.709 (0.138)
Kontrol	0.900 (0.176)	0.609 (0.169)
Karşılaştırmalar	p Değeri	
	12 SNP Skoru	6 SNP Skoru
Negatif-Pozitif	0.087	0.029
Negatif-Kontrol	0.006	0.002
Pozitif-Kontrol	0.128	0.044

p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.7.2. Poligenik Risk Skorlarının Farklı Popülasyonlar Arasında Karşılaştırılması

Türk hasta ve örneklem grubunun poligenik risk skorlama ortalamaları, kendi aralarında karşılaştırıldıktan sonra, bu skorun kullanıldığı diğer popülasyonların ortalamaları ile Türk hasta ve örneklem grubunun skorları karşılaştırılmıştır. Bu sayede, popülasyonlar arasında hasta grupları ve kontrol grubunun skor ortalamaları açısından anlamlı fark olup olmadığı değerlendirilmiştir. Karşılaştırmalarda $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Diğer popülasyonların 6 SNP ve 12 SNP skor ortalama ve standart sapmaları literatürden elde edilmiştir (10, 13). Tablo 4.10.'da diğer popülasyonların mutasyon pozitif ve negatif hastalarında 6 ve 12 SNP skorlarının ortalamaları ve bunların istatistiksel karşılaştırmaları gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Diğer popülasyonların mutasyon durumuna göre PRS ortalamaları ve karşılaştırılması

Ülkeler	Mutasyon Durumu	Ortalama±Standart Sapma	p
		Skor 6'lı	
Hollanda	Negatif	0.710±0.200	0.057
	Pozitif	0.648±0.252	
Yunanistan Çocuk	Negatif	0.731±0.141	0.014
	Pozitif	0.661±0.171	
Kanada	Negatif	0.681±0.264	0.422
	Pozitif	0.635±0.233	
İtalya	Negatif	0.680±0.192	0.638
	Pozitif	0.666±0.191	
Polonya	Negatif	0.671±0.238	0.656
	Pozitif	0.635±0.187	
İsrail	Negatif	0.682±0.142	0.454
	Pozitif	0.653±0.144	

Ülkeler	Mutasyon Durumu	Ortalama±Standart Sapma	p
		Skor 12'li	
İngiltere	Negatif	1.000±0.210	0.002
	Pozitif	0.950±0.200	
Belçika	Negatif	0.990±0.190	<0.001
	Pozitif	0.920±0.200	

Buna göre İngiltere ve Belçika örnekleminde mutasyon pozitif ve negatif hastalar arasında, 12 SNP skoru ortalamaları anlamlı derecede farklı iken, 6 SNP skoru açısından sadece Yunanistan çocuk örnekleminde mutasyon pozitif ve negatif

hastalar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Daha sonra, Türk popülasyonu verileri diğer popülasyon verileri ile her alt grup kendi arasında olacak şekilde karşılaştırılmıştır.

Bu şekilde popülasyonlar arasında kontrol grubu, mutasyon negatif ve mutasyon pozitif hasta gruplarının kendi içlerinde farklılık gösterip göstermediği incelenmiştir. 6 SNP skoru karşılaştırma sonuçları mutasyon negatif hasta grubu için Tablo 4.11.'de ve mutasyon pozitif hasta grubu için Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.10. Mutasyon negatif hasta gruplarının 6 SNP skor ortalamalarının birbirleri ile karşılaştırılması

Karşılaştırmalar	p	Karşılaştırmalar	p
Türkiye-Hollanda	0.100	Yunanistan Çocuk-Hollanda Çocuk	0.149
Türkiye-Yunanistan Çocuk	0.097	Yunanistan Çocuk-İtalya	0.122
Türkiye-Kanada	0.088	Yunanistan Çocuk-Polonya	0.213
Türkiye-Hollanda Çocuk	0.765	Yunanistan Çocuk-İsrail	0.088
Türkiye-İtalya	0.025	Kanada-Hollanda Çocuk	0.132
Türkiye-Polonya	0.060	Kanada-İtalya	0.675
Türkiye-İsrail	0.003	Kanada-Polonya	0.621
Hollanda-Yunanistan Çocuk	0.439	Kanada-İsrail	0.688
Hollanda-Kanada	0.677	Hollanda Çocuk-İtalya	0.025
Hollanda-Hollanda Çocuk	0.061	Hollanda Çocuk-Polonya	0.101
Hollanda-İtalya	0.268	Hollanda Çocuk-İsrail	0.015
Hollanda-Polonya	0.459	İtalya-Polonya	0.913
Hollanda-İsrail	0.268	İtalya-İsrail	0.891
Yunanistan Çocuk-Kanada	0.410	Polonya-İsrail	0.743

Tablo 4.12. Mutasyon pozitif hasta gruplarının 6 SNP skor ortalamalarının birbirleri ile karşılaştırılması

Karşılaştırmalar	p	Karşılaştırmalar	p
Türkiye-Hollanda	0.136	Yunanistan Çocuk-Kanada	0.426
Türkiye-Yunanistan Çocuk	0.192	Yunanistan Çocuk-İtalya	0.945
Türkiye-Kanada	0.069	Yunanistan Çocuk-Polonya	0.388
Türkiye-İtalya	0.182	Yunanistan Çocuk-İsrail	0.640
Türkiye-Polonya	0.107	Kanada-İtalya	0.340
Türkiye-İsrail	0.091	Kanada-Polonya	0.856
Hollanda-Yunanistan Çocuk	0.527	Kanada-İsrail	0.823
Hollanda-Kanada	0.853	İtalya-Polonya	0.372
Hollanda-İtalya	0.415	İtalya-İsrail	0.577
Hollanda-Polonya	0.980	Polonya-İsrail	0.522
Hollanda-İsrail	0.736		

Bu sonuçlara göre mutasyon negatif hasta grubunda Türkiye-İsrail ve Türkiye-İtalya arasında skor ortalamaları açısından anlamlı bir fark vardır. Hollanda çocuk

hasta grubu ile de bu aynı iki popülasyon arasında anlamlı farklar mevcuttur.

Mutasyon pozitif hastalara baktığımızda ise hiçbir grup arasında anlamlı bir istatistiksel fark bulunmamıştır.

Aynı kıyaslama 12 SNP skoru açısından, İngiltere ve Belçika popülasyonlarının verisi elde edilebildiği için bu iki popülasyon yapılmıştır. Bu karşılaştırmalar mutasyon negatif hasta grubu ve mutasyon pozitif hasta grubu için sırası ile Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.'te verilmiştir.

Tablo 4.13. Mutasyon negatif hasta gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması

Karşılaştırmalar	P
Türkiye-İngiltere	0.313
Türkiye-Belçika	0.055
İngiltere-Belçika	0.499

Tablo 4.14. Mutasyon pozitif hasta gruplarının ortalamalarının karşılaştırılması

Karşılaştırmalar	P
Türkiye-İngiltere	0.348
Türkiye-Belçika	0.056
İngiltere-Belçika	0.070

Bu sonuçlara göre popülasyonlar arasında 12 SNP skoru açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak kullanılan Türk popülasyon örnekleme ve bahsi geçen çalışmalarda kullanılmış olan kontrol grubunun (WHII) hem 12 hem 6 SNP skor ortalamaları ve standart sapmaları ile istatistiksel karşılaştırma sonuçları da Tablo 4.15.'te yer almaktadır.

Tablo 4.15. Kontrol gruplarının skor ortalamaları, standart sapma değerleri ve istatistiksel olarak karşılaştırılmaları

Örneklem	6 SNP ortalama ve SS	Karşılaştırma (p)
Türk örnekleme	0.609 (0.165)	0.682
WHII örnekleme	0.632 (0.22)	
Örneklem	12 SNP ortalama ve SS	Karşılaştırma (p)
Türk örnekleme	0.902 (0.171)	0.969
WHII örnekleme	0.900 (0.23)	

WHII: *Whitehall II* çalışmasındaki bireyler kontrol grubu kontrol olarak kullanılmıştır.

Sonuç olarak kontrol grupları arasında da her iki skor açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ailesel hiperkolesteroleminin genetik nedenlerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek, klinik ve genetik ilişkisini incelemek amacı ile panlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda, *Simon Broome* Kriteri'ne göre değerlendirilerek ailesel hiperkolesterolemi tanısı alan toplam 52 hasta çalışmaya alınmıştır. Bu hastalarda bilinen monogenik etiyojinin dışında poligenik etkiler de değerlendirilmiştir. Monogenik etiyojinin değerlendirilmesi amacı ile tüm hastalara *LDLR* dizi analizi yapılmış, hastalığa neden olan bir mutasyon saptanmayan hastalara ise, sırası ile önce *APOB* ve *PCSK9* dizi analizi yapılmıştır. Bu aşama sonunda, 28 hastada patojenik mutasyon saptanmıştır. Kalan 24 hastada öncelikle *LDLR* kopya sayısı değişikliklerine yönelik MLPA yapılmış ve ardından NGS ile diğer nadir genler ve bilinen genlerin Sanger ile değerlendirilmemiş bölgelerine bakılmıştır. Sonuçta 1 hastada *LDLR*'de homozigot kopya sayısı değişikliği, 1 hastada *LDLRAP1* geninde erken *stop* kodonuna neden olan bir mutasyon ve 2 hastada *APOE* geninde *inframe* delesyon saptanmıştır. Bir hastada *LDLR* geninde saptanan mutasyonun, RNA çalışması ile *splice* değişikliğine neden olduğu tespit edilmiştir ve bu mutasyon da patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Toplamda 33 hasta monogenik bir neden saptanırken 18 hastada monogenik neden saptanmamış, 1 hastada *LDLR* geninde önemi bilinmeyen değişiklik saptanmıştır. Poligenik etkilerin değerlendirilmesi için, ilk aşamada patojenik mutasyon saptanan 28 hastadan Sanger yöntemi ile, mutasyon saptanmayan 24 hastadan ise NGS ile PRS hesaplaması için gerekli 12 SNP bölgesi genotiplenmiş ve poligenik risk skorları her bir hasta için hesaplanmıştır. Bu şekilde ilk defa ailesel hiperkolesterolemide kullanılmış olan PRS Türk hasta grubunda hesaplanmış ve poligenik etkiler değerlendirilmiştir. Ayrıca, bulunan genetik değişikliklerin kliniğe ve biyokimyasal parametrelerle ilişkileri de araştırılmıştır.

Hasta grubu içinde patojenik mutasyon 33 (%63,4) kişide mevcuttu. Sadece klasik olarak bilinen ve tanı kriterlerinde yer alan 3 gendeki (*LDLR*, *APOB* ve *PCSK9*) mutasyonlar dikkate alındığında ise 30 (%57,6) hastada mutasyon saptanmıştır. Literatürde, mutasyon saptanma oranları arasında farklılıklar görülmekle birlikte,

oranlar %40-80 arasında geniş bir aralıkta değişmektedir (10, 39). Hasta grubunda mutasyon saptanma oranı literatür ile uyumludur.

Hastalarda tanı yaşı ve mutasyon saptanma durumu ilişkisi değerlendirildiğinde, mutasyon saptanan hastaların yaş ortalamalarının, mutasyon saptanmayan hastalara göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p=0.003$). Literatürde benzer şekilde tanı yaşı ve mutasyon saptanma ilişkisinden bahsedilmiştir (91). Buna göre 40 yaş altında ailesel hiperkolesterolemi tanısı alan bireylerde, 40 yaş üstünde tanı alan bireylere göre mutasyon saptanma oranı yaklaşık iki kat yüksektir. Bu durumun, genetik test yapılacak olan hastaların öncelik sıralamasında önemli olabileceği düşünülmüştür. Özellikle tanı kriterlerinin optimal olmadığı ve birden fazla tanı kriterinin bulunduğu göz önüne alınırsa, yaş parametresi tanı kriterlerinin özgül olmasını sağlamakta kullanılabilir.

Ailesel hiperkolesterolemide, hastada mutasyon saptanması hem tedavi hedefleri, hem hastanın takibi açısından önem taşımaktadır (6, 10). Çünkü yapılan çalışmalarda, ortalama LDL-K düzeylerinin hem tedavi öncesi hem tedavi sonrası dönemde mutasyon pozitif bireylerde daha yüksek seyrettiği bildirilmiştir (92). LDL-K düzeylerinin mutasyon pozitiflerde anlamlı derece yüksek olmasının yanı sıra, mutasyon tipi ve mutasyon saptanan genin de, LDL-K düzeyleri ve tedavi etkinliğine etkisi vardır (92, 93). Hasta grubunda literatür ile benzer şekilde, kolesterol düşürücü tedavi almayan hastalarda kolesterol düzeyleri, mutasyon pozitif grupta, negatif gruba göre anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır ($p=0.002$). Mutasyon tipinin LDL-K düzeyine etkisini değerlendirmek amacı ile heterozigot *LDLR* mutasyonu taşıyan bireyler kendi aralarında yanlış anlamlı ve diğer tiplerde (*splice*, anlamsız, çerçeve kayması) mutasyon taşıyanlar olarak iki gruba ayrılmıştır. İki grup arasında LDL-K düzeyleri açısından ise anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu durum literatür ile uyumlu değildir (92). Fakat, aynı mutasyonu taşıyan bireyler arasında bile, LDL-K düzeylerinin farklılık gösterebileceği ve bunun diğer genetik ve çevresel faktörler ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (94). Bu faktörlerin etkisi sonucunda, iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmıyor olabilir. İstatistiksel olarak anlamsız olsa da *splice*/anlamsız/çerçeve kayması mutasyonu taşıyan bireylerin tedavisiz LDL-K düzeyleri ortalama olarak missens mutasyon taşıyanlara göre yüksektir. Bu nedenle,

örneklemedeki birey sayısının düşük olması da istatistiksel anlamsızlığa katkıda bulunmuş olabilir.

LDL-K dışında yer alan diğer biyokimyasal parametrelerin (TK, TG, HDL-K), mutasyon ile ilişkisine bakıldığında, tedavi altında TG değerleri haricinde, mutasyon pozitif ile negatifler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat genel olarak bakıldığında tedavisiz TK ve tedavili TK değerleri mutasyon pozitiflerde ortalama olarak daha yüksek bulunmuştur. Literatürde TK seviyelerinin de, LDL-K'ya benzer şekilde mutasyon pozitif hastalarda daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir (95). LDL parçacıkları plazma kolesterolünün % 50'den fazlasını taşıdığı için LDL-K düzeyleri ile TK'nın doğrudan ilişkili olması normaldir (4). Tedavisiz TG değerleri de mutasyon pozitif hasta grubunda negatif gruba göre yüksektir. Ailesel hiperkolesterolemisi olan hastalarda TG yüksekliği genel olarak beklenen bir durum değildir. Bununla birlikte, açlık TG düzeylerinin, hem LDLR'de işlev kaybı neden ile IDL gibi TG içeriği zengin lipoproteinlerin hücre içine alımının bozulması, hem de VLDL sentezinin artması ile bir miktar arttığı gözlenmiştir (96). Hasta kohortuna baktığımızda TG ortalaması (174.4 mg/dl) sınırdan yüksek (*borderline high*) bulunmuştur (150-199 mg/dl) (97). Mutasyon pozitif hasta grubunda düzeyler daha yüksek iken mutasyon negatif hastalarda daha düşük düzeyler gözlenmiştir. Bununla birlikte, tedavi altındaki değerlerde mutasyon pozitif hastaların mutasyon negatiflere göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur (p=0.026). Bu durum mutasyon pozitif hastaların daha yüksek LDL-K düzeylerine sahip olmaları nedeniyle daha yüksek doz statin tedavisi almalarından kaynaklı olabilir. Ailesel hiperkolesterolemide, ana tedavi seçeneklerinden olan statinlerin, TG düzeyini yüksek dozlarda kullanıldığında, daha etkili şekilde azaltabildiği literatürde bildirilmiştir (98).

Hastalarda KAH öyküsü ve ksantoma/ksantalezma bulgusu ile mutasyon saptanma durumunun ilişkisi değerlendirildiğinde, mutasyon pozitif ve negatif grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kardiyovasküler hastalık riskinin mutasyon pozitif bireylerde daha yüksek olduğu bilinmektedir (7). Hasta grubunda ise, iki hasta grubu KAH öyküsü açısından karşılaştırıldığında, mutasyon negatif hastalarda oransal olarak KAH öyküsü daha yüksektir. Bu durum mutasyon pozitif hastalarda yaş ortalamasının düşüklüğü ile ilişkili olabilir. Bu sayede daha erken tedavi ile KAH gelişiminin önüne geçilmiş olabilir. Buna karşın, mutasyon negatif hastalarda, ileri

tanı yaşı hastalığın ilk olarak KAH gelişimi sonrasında saptanması ile ilişkili olabilir. Ksantoma/ksantalezma bulgusu açısından mutasyon pozitif ve negatif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, mutasyon pozitifler içinde homozigotlar ile heterozigotlar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.0001$). Ksantoma/ksantalezma bulgusu daha uzun süreli ve daha yüksek miktarda kolesterol maruziyeti ile ilişkilidir ve homozigot bireylerde daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (7). Bu durum, iki grup arasındaki farklılığı açıklamaktadır.

Hastaların aile öyküleri ve mutasyon ilişkisi, aile bireylerinde TK yüksekliği ve KAH öyküsü kullanılarak değerlendirilmiştir. Aile bireylerinde (1. ve 2. derece akrabalarda) TK yüksekliği ($>290\text{mg/dl}$) olan hastalarda, mutasyon saptanma oranı, olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). Bu durumun nedeni mutasyon pozitif hastalarda hastalık etkeni olan mutasyonun mendelyan kalıtımı nedeni ile aile bireylerinde de fenotipin görülme ihtimalinin daha yüksek olması olabilir. Literatürde, mutasyon pozitif hastaların bile etkilenmiş akraba oranının hesaplanandan daha düşük olduğu (%30) ve poligenik etiyolojiye bağlı hastalığın, aile bireylerinde görülme ihtimalinin ise daha az olduğu bildirilmiştir (10, 99). Hastalarda, mutasyon ile aile bireylerinde KAH öyküsü bulunması ilişkisi incelendiğinde ise, mutasyon negatif hastaların 1. derece akrabalarında KAH saptanma oranı, mutasyon pozitiflere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (0.042). Bu durum, kullanılan tanı kriteri ile ilişkili olabilir. *Simon Broome* Kriterleri'ne göre kişide LDL-K yüksekliği ile birlikte, akrabada TK yüksekliği ya da akrabada KAH öyküsü olması durumunda, kişi ailesel hiperkolesterolemi tanısı alır. Mutasyon pozitif bireylerde kalıtımın aile içinde daha yüksek oranda olduğu düşünülürse, bu grupta daha çok sayıda TK yüksekliği olan akraba bulunması ve hastaların daha yüksek oranda bu parametre ile tanı alması normaldir. Mutasyon negatif grupta ise tanı konulması için aile bireylerinde TK yüksekliğinden çok, KAH öyküsü olanların seçilmiş olması muhtemeldir. Çünkü daha önce de bahsedildiği gibi aile içi kalıtım daha düşük beklenmektedir. KAH kompleks kalıtım gösteren yaygın bir hastalıktır ve kolesterol dışında birçok yolak ile çevresel faktör gelişimine katkı sunar (100). Bu nedenle, aile bireylerinde KAH öyküsü olan, fakat TK yüksekliği ($>290\text{mg/dl}$) olmayan hastalar daha taraflı seçiliyor olabilir. Böyle bir durum var ise, özellikle

özgüllüğü artırmak için, tanı kriterinde bulunan ilgili parametrelerin (aile bireylerinde KAH veya TK yüksekliği öyküsü) modifiye edilmesi düşünülmelidir.

Hasta grubunda genetik etiyoloji ayrıntılı olarak incelenmiş ve mutasyon pozitif-negatif ayrımı bu inceleme sonucunda gerçekleştirilmiştir. Mutasyon pozitif grup incelendiğinde genetik heterojenite ve farklı kalıtım modelleri ile karşımıza kompleks bir grup çıkmaktadır. Hasta grubunda dikkat çekici özelliklerden bir tanesi, 4 adet homozigot ailesel hiperkolesterolemi (*LDLR* mutasyonu ilişkili) ve 1 adet resesif hiperkolesterolemi (*LDLRAP1*) saptanmasıdır. Homozigot ailesel hiperkolesterolemisi olan bireylerin, tüm hasta grubuna oranı 1/13'tür. Bu oran tüm hasta grubu literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında yüksektir. Literatürde homozigot ailesel hiperkolesteroleminin heterozigot forma göre oldukça düşük sıklıkta (yaklaşık-1/300.000) görüldüğü bilinmektedir (6). Ülkemizde akraba evliliğinin yüksekliği göz önüne alındığında homozigot hastalığın yüksek oranda saptanması bununla ilişkili olabilir (101). Bunu destekleyecek biçimde homozigot *LDLR* mutasyonu saptanan hastaların tümünde, ebeveynler arasında akrabalık mevcuttur.

Bunun dışında, genel olarak bakıldığında toplamda 34 hastada 3 farklı gende (*LDLR*, *LDLRAP1*, *APOE*) 24 adet farklı mutasyon saptanmıştır. 23 farklı mutasyon hastalık ile ilişkili (patojenik/muhtemel patojenik) olarak sınıflandırılmıştır. Hasta kohortunda, 3 kişide görülen *LDLR* c.1729T>C (p.Trp577Arg) değişikliği, daha önce Türk ailesel hiperkolesterolemi kohortunda *LDLR* mutasyon spektrumunun konu edildiği bir çalışmada 55 mutasyon pozitif hastanın 9 tanesinde saptanmıştır (102). Benzer şekilde iki farklı Türk çalışmasında kohortumuzla aynı mutasyonları taşıyan bireyler mevcuttur. Tablo 5.1.'de iki farklı Türk kohortunda ve aynı zamanda kohortumuzda saptanan *LDLR* mutasyonları gösterilmiştir. Saptanan bazı mutasyonlar dünyada da sık görülen ve çalışmalarda bildirilen mutasyonlardır. Örnek olarak: c.682G>A (p.Glu228Lys), c.1618G>A (p.Ala540Thr) değişikliklerinin Latin Amerika'da en sık görülen değişikliklerden oldukları bildirilmiştir (103). Kohortumuzda saptanan c.1775G>A (p.Gly592Glu) değişikliği ise Çekya'da en sık görülen değişikliklerden birisi olarak bulunmuştur (104). Bunlarla birlikte Tablo 5.1.'de görüldüğü üzere, farklı Türk popülasyon çalışmalarında benzer değişiklikler öne çıkmıştır. Özellikle, c.1729T>C mutasyonu Türk popülasyonunda ailesel hiperkolesteroleminin en sık etkeni olmaya aday gözükmektedir.

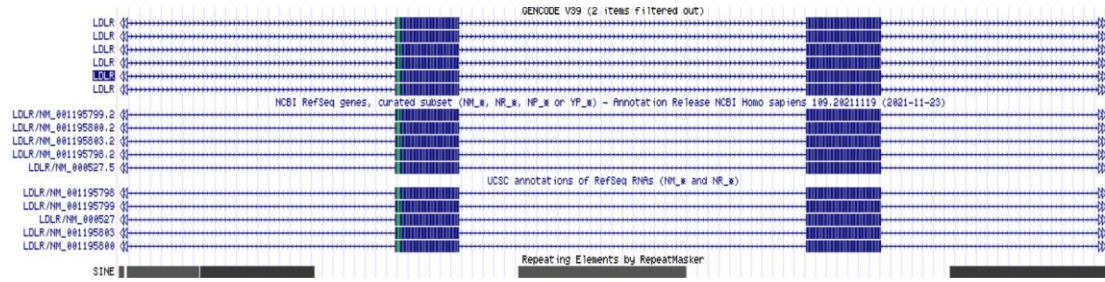
Tablo 5.1. Farklı Türk ailesel hiperkolesterlemi çalışmalarında ortak olarak saptanan *LDLR* değişiklikleri

Mutasyon	Saptanan kişi sayısı (Kaynak: (102))	Saptanan kişi sayısı (Kaynak:(105))	Saptanan kişi sayısı (Bu çalışma)
c.1322T>A (p.Ile441Asn)	Var (sayı verilmemiş)	0	1
c.1601C>A (p.Thr534Asn)	Var (sayı verilmemiş)	0	1
c.1729T>C (p.Trp577Arg)	9	7	3
c.1678A>T (p.Ile560Phe)	Var (sayı verilmemiş)	2	2
c.1324T>C (p.Tyr442His)	Var (sayı verilmemiş)	0	1
c.1478_1479del p.(Ser493CysfsTer42)	6	1	1
c.664T>C p.(Cys222Arg)	Var (sayı verilmemiş)	1	2
c.1567G>A p.(Val523Met)	Var (sayı verilmemiş)	0	1
c.1618G>A p.(Ala540Thr)	Var (sayı verilmemiş)	2	1
c.81C>G p.(Cys27Trp)	0	1	2
c.682G>A p.(Glu228Lys)	0	1	1

Bilinen mutasyonlar dışında, daha önce literatürde bildirilmemiş olan, iki adet *LDLR* mutasyonu birden fazla kişide saptanmıştır. Bunlardan ilki c.372delG p.(Gln125SerfsTer81) mutasyonudur. Bu mutasyonu taşıyan bireylerin ortak kökenleri Ankara/Beypazarı bölgesi olarak görünmektedir. Hastaların pedigrileri incelendiğinde iki hastanın aynı köyden, bir hastanın ise yakın köyden olduğu bilgisi mevcuttur, fakat yakın dereceli bir akrabalık durumu pedigrilere göre anlaşılabilir (Bkz. Şekil 4.2.). Bu hastaların ortak ataya sahip olması muhtemeldir. İkinci mutasyon ise c.2477_2493del mutasyonudur. Bu mutasyona sahip iki bireyin kökenleri de yine Ankara'nın farklı ilçelerine dayanmaktadır ve pedigrinin incelemesinde akrabalık bilgisine ulaşılamamıştır. Bu 17 bazlık ekzonik delesyonun iki ucunda, aynı 3 bazlık dizinin (5'-acc-3') yer alması nedeni ile (Bkz. Şekil 4.4.) oluşum mekanizmasının DNA çift zincir kırık tamir mekanizmalarından, mikrohomoloji aracılı uç birleştirme (*microhomology mediated end joining*) olabileceği düşünülmüştür. Bu mutasyon sonrası 17. Ekzon içinde erken *stop* kodonu oluşmaktadır. Bu şekilde *LDLR* proteinin hücre içinde kalan C-terminal bölgesinin büyük oranda kodlanmadığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, *LDLR* mutasyon spektrumuna giren 2 adet yeni P/MP mutasyon tanımlanmıştır.

LDLR nokta mutasyonu saptanan hastalar dışında bir hastada MLPA ile ekzon 11 ve 12'yi içeren bir homozigot duplikasyon saptanmıştır. Bugüne kadar, çok farklı *LDLR* gen içi kopya sayısı değişiklikleri, ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkilendirilmiştir (106). Ekzon 11-12 duplikasyonu ise ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili *LDLR* kopya sayısı değişikliklerinin incelendiği büyük bir ailesel hiperkolesterolemi kohortunda bildirilmiştir (107). Bu duplikasyonun, ekzon 11 ve

12'nin içerdiği toplam baz sayısının (259 baz) üçün katı olmaması nedeni ile çerçeve kaymasına neden olduğu düşünülmüştür. Bu duruma iki ekzon etrafındaki *Alu* dizilerinin yol açmış olması olasıdır. Şekil 5.1.'de *UCSC Genom Browser* veri tabanından elde edilen görüntüde *LDLR* geni ekzon 11-12 ve etrafında yer alan *Alu* dizileri görülmektedir.



Şekil 5.1. *UCSC Genom Browser* veri tabanından elde edilen *LDLR* transkriptleri ve tekrar dizileri. Şekilde *RefsSeq* ve *Gencode* transkriptlerinin 11 ve 12. ekzonları (Kalın koyu mavi kısımlar) ve altta siyah-gri kutucuklar şeklinde *RepeatMasker* veri tabanına göre iki ekzonun etrafındaki intronik bölgede yer alan tekrar elementleri (*Alu*) görülmektedir.

Hastalardan bir tanesinde ve kolesterol yükseliği saptanan iki aile bireyinde *LDLR* geninde heterozigot c.1060+10G>A mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyon gnomAD veri tabanında çok az sayıda kişide bildirilmiştir. Bu özellikleri ile patojenik olmaya aday olsa da intronik bir varyant olması ve fonksiyonel olarak *splice* aktivitesini etkileme durumunun bilinmemesi, aynı noktada polimorfik G>C değişikliğinin olması ve literatürde yeterli bilgi olmaması nedeni ile önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirilmiştir. Türkiye'den bildirilen bir yayında homozigot ailesel hiperkolesterolemi oldukları bildirilen monozigotik ikizlerde 1060+10G>A mutasyonunun homozigot olarak bulunduğu bildirilmiş ve bu değişikliğin hastalık ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (108). Fakat yayın incelendiğinde, hastalarda tedavi öncesi LDL-K düzeylerinin heterozigot hastalık düzeyinde olduğu belirtilmiş ve ayrıca babalarında da benzer düzeylerde LDL-K yüksekliği olduğu görülmüştür. Ayrıca, iki hastada da heterozigot olarak taşınan bir missens mutasyon (c.542C>T) olduğu görülmüştür. Bu durum c.1060+10G>A değişikliğinin patojenik olma ihtimalini düşürmektedir. Kohortumuzdaki hasta yayında bildirilen, c.542C>T mutasyonu açısından tekrar değerlendirilmiş ve bu mutasyon hastada saptanmamıştır. Bu örnekten de yola çıkarak, bu mutasyonun kendi başına hastalık yapmaktan öte, hastalığa yol açabilecek başka nadir bir varyant ile birliktelik gösterebileceği ya da diğer

varyantların etkisini modifiye edici özellikleri olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, bu değişiklik önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirilmiş ve bu hasta; mutasyon fenotip ilişkisi, PRS'lerin hasta grupları arasında karşılaştırılması gibi istatistiksel analizlere dahil edilmemiştir.

Dizi analizi sonrası ilk aşamada önemi bilinmeyen değişiklik olarak sınıflandırılan bir diğer *LDLR* mutasyonu; eş anlamlı c.2139A>G değişikliğiydi. 14.ekzonun sondan ikinci bazında yer alması nedeniyle *splice* bölgesinde yer alan ve veri tabanlarında saptanmayan bu mutasyon, daha önce bir Türk hastada homozigot olarak bildirilmiştir (102). Yayında hastanın kolesterol değerleri homozigot ailesel hiperkolesterolemi ile uyumlu olarak bulunmuş ve akrabaları arasında etkilenen bireylerde aynı değişiklik saptanmıştır. Varyantın *splice* değişikliğine etkisi fonksiyonel olarak gösterilemediği ve olası diğer genetik etkenler ekarte edilemediği için varyantın önemi bilinmeyen değişiklik olarak sınıflandırıldığı bildirilmiştir. Kohortumuzda bu varyantı taşıyan 50 numaralı hastada yapılan RNA çalışmalarında birden fazla anormal transkript tespit edilmiş ve bunlardan bir tanesi net şekilde Sanger dizi analizinde gösterilebilmiştir (Bkz. Şekil 4.11.). Bir diğer transkriptinde olası *splice* bölgesinin yine 14. intron içinde yer aldığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak iki transkript de içinde erken *stop* kodonu içerdiği için aralarında fonksiyon kaybı açısından bir fark olmadığı düşünülebilir. Hastada ilk PCR sonrası jel görüntüsünde kanonik transkriptin, anormal transkriptlere göre çok daha koyu olarak görülmesi anormal transkriptlerin erken dönemde yıkılıyor olabileceğinin göstergesidir. Mutant alele göre tasarlanan primer ile alel spesifik PCR yapıldığında sadece anormal transkriptlerin çoğalması ve kontrol örneğinde herhangi bir band görülememesi de mutant alelin normal transkript varyantı üretemediğini bize göstermektedir (Bkz. Şekil 4.10.). Sonuç olarak bu değişiklik, erken *stop* kodonuna sahip ve potansiyel olarak anlamsız mutasyon aracılı RNA yıkımına (*nonsense mediated RNA decay*) gidebilecek transkriptler üretmekte ve normal transkript ürünü oluşturamamaktadır ve bu nedenle hastalığa neden olacak düzeyde fonksiyon kaybına neden olacağı düşünülmüştür. Bu mutasyonun patojenitesinin saptanmasının bir diğer önemi, mutasyon negatif olarak düşünülen hastaların bir kısmında, yanlış negatifliğin olabileceğini göstermesidir. Bu tip sinonim mutasyonlar yanlış şekilde sınıflandırmaya açıktır ve mutasyon negatif olarak sınıflandırılan hastalarda, muhtemel benign, benign veya VUS olarak

değerlendirilen buna benzer varyantlar bulunuyor olabilir. Bu nedenle saptanan mutasyonun değerlendirilmesi ve sınıflandırılması yapılırken dikkatli olunmalı ve bu kişiler yanlışlıkla mutasyon negatif olarak düşünülmemelidir. Çünkü mutasyon durumu daha önce de bahsedildiği üzere kişinin tedavi ve takibini doğrudan etkilemektedir.

Literatürde, *LDLR* dışında en sık iki monogenik etken olarak *APOB* ve *PCSK9* gen mutasyonları öne çıkmıştır (6). Kohortumuzda bu iki gende hastalık ile ilişkili mutasyon saptanmamıştır. Bununla birlikte, ailesel hiperkolesterolemi fenotipi ilişkili olarak, 3 kişide 2 farklı gende iki mutasyon saptanmıştır. Bunlardan biri *APOE* geninde 2 kişide saptanan, ailesel hiperkolesterolemi fenotipi ile ilişkili c.500_502del (p.Leu167del) mutasyonudur. Bu mutasyon son dönemde tanımlanmış ve daha sonra yapılan fonksiyonel çalışmalarda mutasyonun, *LDLR*'nin ekspresyonunun azalmasına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır (8, 109). Literatüre göre *APOB* mutasyonları mutasyon pozitif hastaların ortalama %5-10'unu oluştururken, *PCSK9* mutasyonları yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır (6). *APOE* ise daha az miktarda görülmektedir. Bu bilgilere ve hasta grubunun verisine göre, mutasyon pozitif hastaların genetik etkenler ve bunların görülme sıklığı bakımından, Türk popülasyonu ve diğer popülasyonlar arasında belirgin bazı farklılıklar olabileceği görülmektedir. Bununla birlikte, bu hipotezin değerlendirilmesi ancak daha büyük hasta grupları ve kapsamlı bir araştırma ile mümkün olabilir. İkincisi ise, *LDLRAP1* geninde bir hastada saptanan homozigot c.406C>T (p.Gln136Ter) mutasyonudur. Bu mutasyon daha önce hastalık ile ilişkili olarak Türk ve Lübnan'lı ailelerde bildirilmiştir (110). Ülkemizde akraba evliliğinin sıklığı göz önüne alındığında, resesif formun görülme ihtimalinin artacağı düşünülebilir. *LDLRAP1* mutasyonları, özellikle batı toplumlarından farklı olarak daha sık hastalık etkeni olabilir. Bu durumun mutasyon saptanmayan hasta grubunda özellikle göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Literatürde bildirildiği üzere ailesel hiperkolesterolemide mutasyon bulunamayan bireylerde, poligenik etiyojinin üzerinde durulmuştur (11, 12). Çalışmamız kapsamında da analizler sonrası nedensel mutasyon saptanamayan mutasyon negatif bir hasta grubu mevcuttu. Literatüre dayanarak, poligenik etkilerin popülasyonumuzdaki rolünü değerlendirmek amacı hem mutasyon saptanamayan hastalara hem de onlarla karşılaştırılmak üzere mutasyon pozitif ve Türk popülasyon

örnekleminde PRS hesaplanmıştır. Farklı popülasyonlarda denenmiş olan PRS'ler, ilk defa Türk ailesel hiperkolesterolemi kohortunda değerlendirilmiştir. Çalışmamızda da görüldüğü gibi monogenik etiyolojiler açısından diğer ülkelere özellikle batı ülkelerine kıyasla farklılıklar görülmektedir. Bu nedenle batı ülkelerinde oluşturulmuş PRS'lerin Türk toplumundaki kullanılabilirliği önemli bir soru işaretidir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda 12 SNP ve 6 SNP skor ortalaması kontrol örnekleminde en düşük seviyede bulunmuştur (12-(0.902, SS:0.171); 6-(0.609, SS:0.165)). Mutasyon pozitif hasta grubunun skor ortalaması kontrol grubuna göre yüksek, mutasyon negatiflere göre düşüktür (12-(0.977 SS:0.153); 6-(0.709, SS:0.138)) Mutasyon negatif hasta grubunun ise PRS ortalaması diğer iki gruba göre yüksek bulunmuştur (12-(1.051, SS:0.120); 6-(0.777, SS:0.098)). Bu durum literatürdeki diğer popülasyon verileri ile karşılaştırıldığında genel anlamda uyumlu görünmektedir (10, 13). Ayrıca, farklı popülasyonların mutasyon negatif, pozitif ve kontrol gruplarının skor ortalamaları da kendi içlerinde karşılaştırıldığında genel olarak anlamlı farklar bulunmadığı görülmüştür. Türk popülasyonunda küçük bir örneklem grubu olmasına rağmen diğer popülasyonlar ile benzer bir örüntünün kaşımıza çıkması, farklı açılardan önem taşımaktadır. Bunlardan ilki, bu PRS'lerde kullanılan SNP'lerin genel anlamda bizim popülasyonumuz için de avrupa popülasyonlarına benzer frekans ve etki büyüklüklerine sahip olduğunun gösterilmiş olmasıdır. Çünkü literatürde bildirildiği üzere, bir popülasyon ya da etnik grup içinde kolesterol düzeyine etki eden varyantlar ya da gen bölgeleri, diğer popülasyonda etkisiz olabilmektedir (111). Sonuç olarak, iki PRS açısından ön bir veri elde edilmiştir. Bu veri literatür ile genel anlamda uyumlu olduğundan, bu skorların Türk popülasyonunda hastalığın eksik kalıtılabilirliğinin ne kadarını açıklayabildiği gibi daha büyük örneklemlemler ile araştırılması gereken sorulara yönelik ileri çalışmalar yapılabilir. İkinci olarak, bu skorlarda kullanılan SNP'lerin elde edildiği GWAS meta- analiz çalışmasından, farklı SNP alt grupları seçilerek yeni skorlar, farklı yöntemler kullanılarak oluşturulabilir (112). Bu şekilde, kolesterol düzeyleri ile ilgili olarak Türk toplumuna özgü bir GWAS çalışması yapılması gerekli olmadan yeni PRS çalışmaları yapılabilir. Son olarak ise, monogenik etiyolojide farklılıklar görülmekle birlikte, Türk popülasyonunda da PRS'lerin diğer popülasyonlarla benzer olması, poligenik etkinin monogenik etiyolojiden bağımsız olarak hastalığın oluşmasına katkı yapabileceğini göstermektedir.

Hasta gruplarının iki PRS açısından farklılıkları incelendiğinde, mutasyon pozitif hasta grubunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bir skora sahip olduğu görülmektedir (10, 13). Bizim çalışmamız açısından bakıldığında 6 SNP skorunun ortalama değeri mutasyon pozitif hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. 12 SNP skoru da yüksek bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlar, literatürde monogenik hastalığın ekspresyonuna poligenik etkilerin olduğu şeklinde yorumlanmıştır (10). Bu durumunun doğruluğu kanıtı değildir. Bununla birlikte, aynı mutasyonu taşıyan bireylerde bile kolesterol düzeyleri arasında büyük farklar olabileceği göz önüne alındığında doğru bir önerme olabilir (93). Normal şartlarda monogenik hastalık için, etken mutasyonun tek başına fenotipi ortaya çıkarması beklenmektedir. Bu durumda mutasyon pozitif hastalarda poligenik etkiler çok önemli olmayacağı için, kontrol grubu ile mutasyon pozitif hasta grubunun ortalama olarak benzer skorlara sahip olması gerekmektedir. Durumun bu şekilde olmaması, monogenik hastalığın da aslında sadece monogenik olmadığı ve tam ekspresyon için poligenik etiyolojinin de rolü olabileceğini düşündürmektedir. Buna göre özellikle daha düşük etkili mutasyonlar taşıyan hastalar için (yanlış anlamlı vb.), hastada LDL-K düzeylerinin ailesel hiperkolesterolemi düzeyine gelebilmesi ve fenotipi tam olarak ortaya çıkarabilmesi için mutasyon tek başına yeterli olmayabilir. Bu tip bir durumda LDL-K düzeyleri 190mg/dl sınır değerlerinin altında kalabilir ve bu nedenle aslında mutasyon pozitif bir birey tanı kriterlerini karşılamadığı için takip ve tedaviye alınamayabilir. Bu da bize toplumda beklenenden daha fazla sayıda mutasyon pozitif ailesel hiperkolesterolemi olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu varsayımların tamamı şu anda hipotetik düzeydedir ve bunlara yönelik ileri çalışmalar yapılması gereklidir.

Mutasyon negatif hasta grubunun skor ortalaması, bazı popülasyonlarda istatistiksel anlamlı, diğerlerinde istatistiksel anlamsız olsa da mutasyon pozitif hastalara göre yüksek bulunmuştur. Türk popülasyonunda da benzer bir fark ortaya çıkmıştır. 6 SNP skorunda gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcut iken, 12 SNP skorunda anlamlı fark bulunmamıştır. Bu iki grup arasındaki fark, poligenik hastalığın ortaya çıkması için monogenik forma göre daha yüksek düzeyde, küçük etkili SNP'nin kişide birikmesi gerektiğini gösteriyor olabilir. Bazı popülasyonlarda

iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum, örneklemelerin küçüklüğü ile ilişkili olabileceği gibi yanlışlıkla poligenik olarak değerlendirilmiş ve PRS düzeyi düşük olan hastalardan kaynaklanabilir. Literatürde yapılan PRS çalışmalarında sadece *LDLR*, *APOB* ve *PCSK9*'a yönelik değerlendirme yapılmış ve bu üç gende ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili mutasyonlar, mutasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (10, 13). Çalışmamızda da ilk aşamada bu üç gen değerlendirildiğinde 29 hastada etken monogenik neden olarak saptanırken, 21 hastada etken bir değişiklik bulunamamıştı. Diğer genetik nedenler değerlendirilmese, 2 adet *APOE*, bir adet *LDLRAP1* mutasyonu saptanan toplam 3 hasta negatif grupta yer alacaktı. Ayrıca, *LDLR* sinonim mutasyonu saptanan bir hastada RNA analizi yapılmıyaydı, bu mutasyon önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirilecek ve hasta değerlendirmeye alınmayacaktı. Bu durumda poligenik skorlarında nasıl değişiklikler olacağı Tablo 5.2.'de verilmiştir.

Tablo 5.2. NGS ve RNA analizi yapılmadığı durumda PRS ve gruplar arası değerlendirme

12 TNP Skoru	Ortalama ve Stnadart Sapma	Gruplar arası p değeri
Mutasyon Pozitif (29 kişi)	0.987 (0.134)	0.24
Mutasyon Negatif (21 kişi)	1.036 (0.153)	
6 TNP Skoru	Ortalama ve Standart Sapma	Gruplar arası p değeri
Mutasyon Pozitif (29 kişi)	0.721 (0.126)	0.076
Mutasyon Negatif (21 kişi)	0.758 (0.128)	

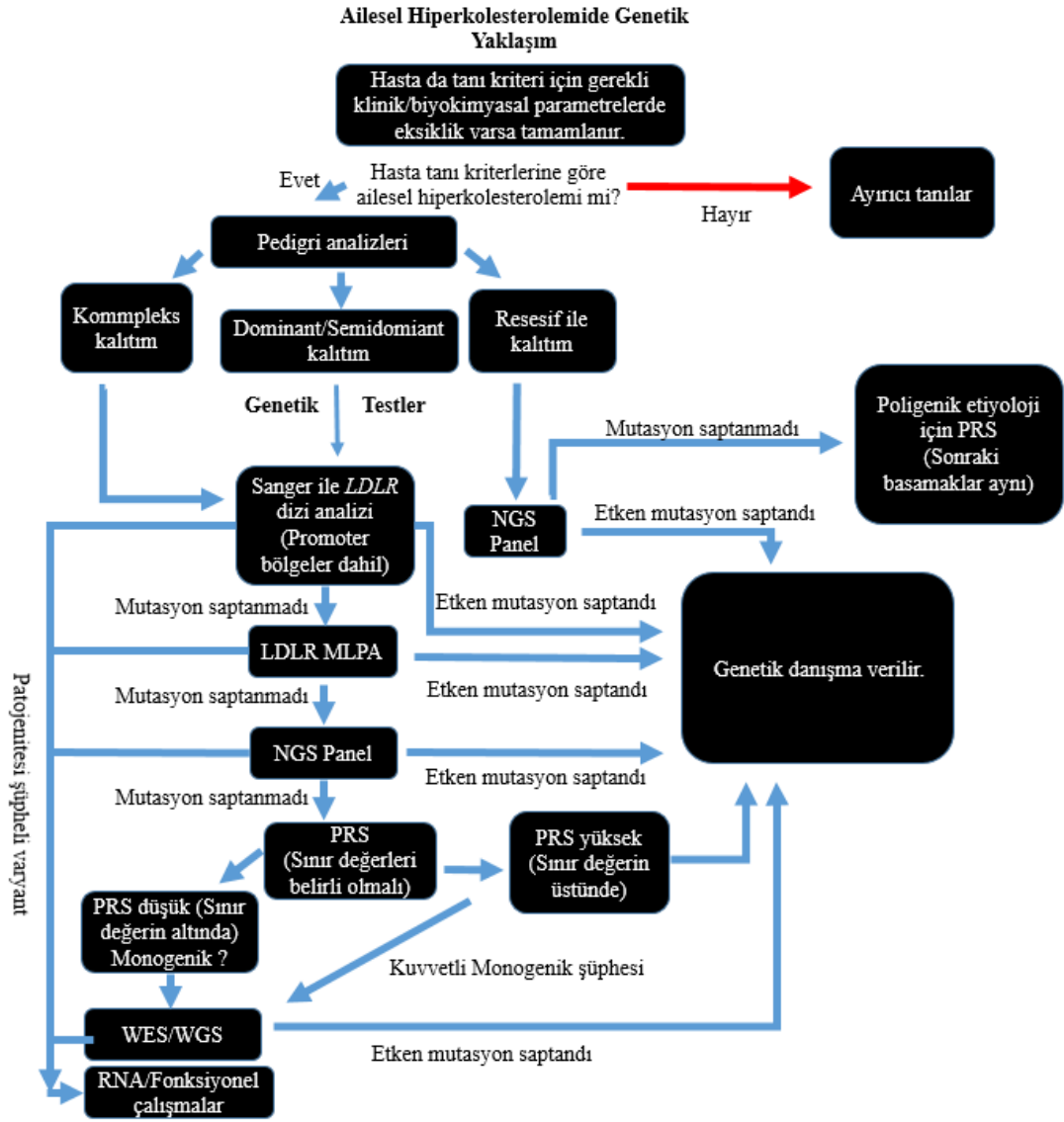
Tabloda da görüldüğü üzere p değerleri daha yüksek ve iki grubun ortalamaları birbirine daha yakın olacaktı. Buna göre, PRS'lerin daha etkin olarak kullanılabilmesi için monogenik nedenlerin iyi analiz edilmesi gereklidir. Bu şekilde PRS'lerin iki grup arasında ayırıcılığı artırılabilir. Ayrıca, PRS düzeyleri için sınır değerleri belirlenerek, sınır değerlerin altında kalan bireylerde monogenik etiyoloji aranmasına devam edilmesi gerekebilir. Bu tip sınır değerleri literatürde belirlenmiştir (10, 13). Fakat, Türk popülasyonu için bu değerler geçerli olmayabilir. Bu değerlerin hesaplanabilmesi için öncelikle, Türk popülasyonunu temsil eden kontrol örneklemının LDL-K değerlerini bilinmesi ve örneklemin daha büyük olması gerekmektedir. Literatürde kontrol grubu (popülasyon örneklemi) verileri ile *bayes* istatistiği kullanılarak bu tip sınır değerleri belirlenmiş ve poligenik hastalık olasılığı belirtilmiştir (13).

12 ve 6 SNP PRS'lerinin mutasyon negatif ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında çalışma yapılan popülasyonların çoğunda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (10, 13). Bu durum çalışmamızda da benzer şekilde bulunmuştur. Bu da PRS'lerin poligenik hastalığı belirli düzeyde tüm popülasyonlarda benzer şekilde ayırt edebildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda 6 SNP skor ortalaması için tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olarak bulunmuştur. 12 SNP skoru için ise mutasyon negatif ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark bulunurken, diğer gruplar arasındaki fark anlamlı değildir. Bu durumun, iki skorun etkinliği açısından anlam ifade edip etmediği ise net değildir. Bunun için bahsedildiği üzere, bir kontrol örnekleminde bu iki skorun LDL-K düzeyindeki varyansın ne kadar açıkladıkları ve bunlar arasında istatistiksel fark bulunup bulunmadığının araştırılması gerekmektedir. Literatürde ise iki skor arasında etkinlik bakımından fark olmadığından bahsedilmiştir (13).

Bireysel düzeyde değerlendirildiğinde PRS'lerin poligenik hastalığı belirleme ve tanı koyma noktasında eksiklikleri mevcuttur. Alman hasta grubunda 6 SNP skoru kullanılarak yapılan bir çalışmada benzer şekilde mutasyon negatif, pozitif ve kontrol grubu arasında skor ortalamaları istatistiksel anlamlı derecede farklı bulunmuştur (113). Bununla birlikte, skorun LDL-K varyansının sadece %3'ünü açıkladığı ve hiperkolesterolemi hastalarını sınıflamak için güvenilir bir araç olmadığından bahsedilmiştir. Farklı bir çalışmada ise PRS'lerin ailesel hiperkolesterolemiye tanı koymada yetersiz olduğu ve bireysel düzeyde tanısal bir araç olamayacağından bahsedilmiştir (94). Bu açılardan bakıldığında, 6 ve 12 SNP skorunun bireysel tanıda kullanılmasının çok anlamlı olmayacağı ve görülmektedir. Fakat, bu skorların kullanılabilirliği mutasyon negatif hastaların doğru şekilde belirlenmesi ile bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi artırılabilir. Bununla birlikte, skorların etkinliği, skor üretilirken kullanılan yöntemden kaynaklı olarak düşük olabilir. Son dönemlerde geliştirilen algoritmalar ve *linkage* bilgisinin hesaba katılması ile daha etkin PRS'lerin üretilbileceği bildirilmiştir (78). Farklı yöntemler ile üretilen yeni skorların ailesel hiperkolesterolemi için geliştirilmesi, poligenik/monogenik hastalık ayırımının daha doğru yapılmasında ve bu şekilde hastalığın takip ve tedavi hedeflerine ulaşılmasında yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, ailesel hiperkolesterolemi genetik açıdan bakıldığında yüksek oranda heterojen bir etiyolojiye sahip, monogenik ve poligenik nedenlerin hastalığın ortaya çıkmasına ortak şekilde katkı sağladığı bir hastalıktır. Fakat, mutasyon pozitif ve negatif hasta gruplarının; KAH riskleri, takipleri ve tedavi hedefleri ve seçenekleri açısından farklılıkları olduğu için, klinik bakımdan bu hastaları iki farklı grup olarak değerlendirmek gereklidir. Ayrıca, mutasyon pozitif grup içinde de tedavi seçenekleri mutasyon tipine göre farklılık gösterebilmekte ve son dönemde geliştirilen antisens oligonükleotidler, PCSK9 inhibitörleri gibi tedaviler klasik tedavilere alternatif oluşturmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, hastalığın genetik nedenlerinin ve gelişim mekanizmasının doğru şekilde belirlenmesi klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada da hem monogenik nedenlere, hem de poligenik nedenlere yönelik kapsamlı bir araştırma yürütülmüş ve bu amaçla Sanger dizileme, MLPA, NGS ve RNA çalışması gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu şekilde, hastalarda geniş ölçekte monogenik nedenler aydınlatılmış, 2 yeni mutasyon tanımlanmış, 1 gen içi homozigot duplikasyon saptanmış, önemi bilinmeyen değişikliğin aslında patojenik olduğu görülmüştür. Bulunan değişiklikler doğrultusunda hastalara genetik danışma verilmiş takip ve tedavi açısından gerekli yönlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca, Bu çalışma ile ilk defa Türk popülasyonunda ailesel hiperkolesterolemi hastalarında, PRS'ler denenmiş ve ortalama skor düzeyleri diğer popülasyonlar ile benzer şekilde bulunmuştur. Bununla birlikte, çalışmanın; hasta kohortunun küçük olması, kontrol grubunun küçüklüğü ve kontrol grubunda kolesterol değerlerinin bilinmemesi, mutasyon negatif hastalarda ayırıcı tanıya giren bazı monogenik dislipidemi genlerinin değerlendirilememesi gibi eksik yanları mevcuttur. Bu nedenle PRS'lerin LDL-K düzeylerindeki varyansı ne derece açıkladığı gibi etkinliğin değerlendirilmesinde ve eksik kalıtılabilirliği açıklamada kullanılan parametreler hesaplanamamıştır. Bu sonuçlara ek olarak, çalışmanın sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda ailesel hiperkolesterolemiye genetik açıdan yaklaşım ile ilgili bir algoritma önerilmiş ve Şekil 5.2.'de sunulmuştur.



Şekil 5.2. Ailesel hiperkolesterolemide genetik yaklaşım algoritması.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. *LDLR* geninde iki yeni mutasyon saptanmış ve bir sinonim mutasyonun *splice* bölgesini değiştirdiği bulunarak literatüre katkıda bulunulmuştur.
2. Mutasyon pozitif ve negatif hasta grupları arasında, klinik ve biyokimyasal parametreler açısından farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle genetik testler yardımı ile hastaların gruplara ayrılması doğru takip ve tedavi hedeflerinin gerçekleşmesine katkı sağlayacaktır.
3. Mutasyon pozitif ve negatif hasta grubunun doğru şekilde ayırımında sadece klasik genetik nedenlerin (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*) taraması yetersizdir. Bu nedenle farklı teknikler kullanarak ileri genetik tetkikler yapılması gereklidir. Bu şekilde tanısal verim ve duyarlılık artırılabilir.
4. Bu çalışmada, ilk defa Türk ailesel hiperkolesterolemi grubunda poligenik faktörlerin rolü değerlendirilmiştir. Mutasyon negatif PRS diğer gruplara göre yüksek bulunmuş ve bu grup hastada ana nedensel etken olabileceği düşünülmüştür.
5. Mutasyon saptanan ve monogenik hastalığa sahip olan bireylerde hastalığın ortaya çıkışında poligenik faktörlerin etkisi olabileceği görülmüştür.
6. Mutasyon pozitif ve negatif hasta ayırımının doğru yapılmasının, poligenik risk skorlarının kullanılabilirliğine de etki edebileceği görülmüştür.
7. Kullanılan 12 ve 6 SNP içeren poligenik risk skorları; toplumumuzda, Avrupa toplumları ile genel anlamda benzer ortalamalara sahiptir. Bu sonuçlar, ileri çalışmalar için temel niteliğindedir. Popülasyonumuzda daha büyük kohortlarda, bu skorların kullanılabilirliği ve etkinlikleri değerlendirilebilir.
8. Hastalara moleküler tanı doğrultusunda genetik danışma verilmesi, tedavi ve izlem açısından gerekli yönlendirmelerin yapılmasına olanak sağlamakta ve bu şekilde hastalığın olası sonuçlarından kaynaklı morbidite ve mortalitenin önüne geçilmesine katkı sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Kayikcioğlu M, Oto A. Control and Management of Cardiovascular Disease in Turkey. 2020;141(1):7-9.
2. Huff MW, Daugherty A, Lu H. Chapter 18 - Atherosclerosis. In: Ridgway ND, McLeod RS, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*. Boston: Elsevier; 2016. p. 519-48.
3. Schwinghammer TL, DiPiro JT, Ellingrod VL, DiPiro CV. Dyslipidemia. *Pharmacotherapy Handbook*, 11e. New York, NY: McGraw Hill; 2021.
4. Garg A. *Dyslipidemias: pathophysiology, evaluation and management*: Springer; 2015.
5. Hegele RA, Borén J, Ginsberg HN, Arca M, Averna M, Binder CJ, et al. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2020;8(1):50-67.
6. Berberich AJ, Hegele RA. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(1):9-20.
7. McGowan MP, Dehkordi SHH, Moriarty PM, Duell PB. Diagnosis and Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. 2019;8(24):e013225.
8. Marduel M, Ouguerram K, Serre V, Bonnefont-Rousselot D, Marques-Pinheiro A, Erik Berge K, et al. Description of a Large Family with Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Associated with the APOE p.Leu167del Mutation. 2013;34(1):83-7.
9. Lamiquiz-Moneo I, Restrepo-Córdoba MA, Mateo-Gallego R, Bea AM, Del Pino Alberiche-Ruano M, García-Pavía P, et al. Predicted pathogenic mutations in STAP1 are not associated with clinically defined familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2020;292:143-51.
10. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9874):1293-301.
11. Futema M, Plagnol V, Li K, Whittall RA, Neil HA, Seed M, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *Journal of medical genetics*. 2014;51(8):537-44.
12. Futema M, Bourbon M, Williams M, Humphries SE. Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2018;277:457-63.
13. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem*. 2015;61(1):231-8.
14. Chen X, Zhou L, Hussain MMJHscd, Elsevier mblmteSL. *Lipids and dyslipoproteinemia*. 2017:221-43.
15. McLeod RS, Yao Z. Assembly and Secretion of Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*: Elsevier; 2016. p. 459-88.
16. Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutrition & metabolism*. 2012;9:14.
17. Fryer LG, Jones B, Duncan EJ, Hutchison CE, Ozkan T, Williams PA, et al. The endoplasmic reticulum coat protein II transport machinery coordinates cellular lipid

secretion and cholesterol biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(7):4244-61.

18. Beigneux AP, Weinstein MM, Davies BS, Gin P, Bensadoun A, Fong LG, et al. GPIHBP1 and lipolysis: an update. *Current opinion in lipidology*. 2009;20(3):211-6.

19. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(7):919-33.

20. Sharma V, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on the metabolic fate of triacylglycerol. *Current opinion in lipidology*. 2013;24(2):153-9.

21. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *Journal of lipid research*. 2011;52(2):189-206.

22. Lin J. Low-Density Lipoprotein: Biochemical and Metabolic Characteristics and Its Pathogenic Mechanism. *Apolipoproteins, Triglycerides and Cholesterol: IntechOpen*; 2020.

23. Francis GA. Chapter 15 - High-Density Lipoproteins: Metabolism and Protective Roles Against Atherosclerosis. In: Ridgway ND, McLeod RS, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*. Boston: Elsevier; 2016. p. 437-57.

24. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2009;16(2):163-71.

25. Lloyd-Jones DM, Wilson PW, Larson MG, Leip E, Beiser A, D'Agostino RB, et al. Lifetime risk of coronary heart disease by cholesterol levels at selected ages. *Archives of internal medicine*. 2003;163(16):1966-72.

26. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Jama*. 1986;256(20):2823-8.

27. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(20):2292-333.

28. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *The New England journal of medicine*. 1967;276(2):94-103 contd.

29. Dixon DL, Riche DM. Dyslipidemia. In: DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin TD, Ellingrod V, editors. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.

30. Taghizadeh E, Farahani N, Mardani R, Taheri F, Taghizadeh H, Gheibihayat SM. Genetics of Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL) Disorder: An Update. *Biochemical Genetics*. 2022;60(2):453-81.

31. Connelly PW, Hegele RA. Hepatic lipase deficiency. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 1998;35(6):547-72.

32. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(1):109-17.

33. Cruz-Bautista I, Huerta-Chagoya A, Moreno-Macías H, Rodríguez-Guillén R, Ordóñez-Sánchez ML, Segura-Kato Y, et al. Familial hypertriglyceridemia: an entity with distinguishable features from other causes of hypertriglyceridemia. *Lipids in Health and Disease*. 2021;20(1):14.

34. Laufs U, Parhofer KG, Ginsberg HN, Hegele RA. Clinical review on triglycerides. *European Heart Journal*. 2019;41(1):99-109c.

35. Sundaram M, Curtis KR, Amir Alipour M, LeBlond ND, Margison KD, Yaworski RA, et al. The apolipoprotein C-III (Gln38Lys) variant associated with human hypertriglyceridemia is a gain-of-function mutation. *Journal of lipid research*. 2017;58(11):2188-96.
36. Alexander ET, Tanaka M, Kono M, Saito H, Rader DJ, Phillips MC. Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I. *Journal of lipid research*. 2009;50(7):1409-19.
37. Vitali C, Bajaj A, Nguyen C, Schnall J, Chen J, Stylianou K, et al. A systematic review of the natural history and biomarkers of primary lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Journal of lipid research*. 2022;63(3):100169.
38. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, et al. Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):21-30.
39. Youngblom E, Pariani M, Knowles JW. Familial Hypercholesterolemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

40. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of translational medicine*. 2016;4(13):256.
41. Makki N, Brennan TM, Girotra S. Acute Coronary Syndrome. 2015;30(4):186-200.
42. Gopal S, Murphy C. Nuclear Medicine Stress Test. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

43. Sirajuddin A, Mirmomen SM, Kligerman SJ, Groves DW, Burke AP, Kureshi F, et al. Ischemic Heart Disease: Noninvasive Imaging Techniques and Findings. 2021;41(4):990-1021.
44. Ramjattan NA, Lala V, Kousa O, Makaryus AN. Coronary CT Angiography. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

45. Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ. Familial Hypercholesterolemias: Prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*. 2011;5(3, Supplement):S9-S17.
46. Hovland A, Mundal LJ, Igland J, Veierød MB, Holven KB, Bogsrud MP, et al. Risk of Ischemic Stroke and Total Cerebrovascular Disease in Familial Hypercholesterolemia. 2019;50(1):172-4.
47. Beheshti S, Madsen CM, Varbo A, Benn M, Nordestgaard BG. Relationship of Familial Hypercholesterolemia and High Low-Density Lipoprotein Cholesterol to Ischemic Stroke: Copenhagen General Population Study. *Circulation*. 2018;138(6):578-89.
48. Akioyamen LE, Tu JV, Genest J, Ko DT, Coutin AJS, Shan SD, et al. Risk of Ischemic Stroke and Peripheral Arterial Disease in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: A Meta-Analysis. *Angiology*. 2019;70(8):726-36.
49. Guillou L, Folpe AL. Chapter 3 - Fibroblastic and Fibrohistiocytic Tumors. In: Folpe AL, Inwards CY, editors. *Bone and Soft Tissue Pathology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2010. p. 43-96.
50. Perez de Isla L, Alonso R, Watts GF, Mata N, Saltijeral Cerezo A, Muñoz O, et al. Attainment of LDL-Cholesterol Treatment Goals in Patients With Familial Hypercholesterolemia: 5-Year SAFEHEART Registry Follow-Up. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67(11):1278-85.

51. Fernández A, Sorokin A, Thompson PD. Corneal arcus as coronary artery disease risk factor. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):235-40.
52. Boccatonda A, Rossi I, D'Ardes D, Cocomello N, Perla FM, Bucciarelli B, et al. Comparison between different diagnostic scores for the diagnosis of familial hypercholesterolemia: assessment of their diagnostic accuracy in comparison with genetic testing. *European Heart Journal*. 2020;41(Supplement_2).
53. NICE Evidence Reviews Collection. Familial hypercholesterolaemia: identification and management: Evidence reviews for case-finding, diagnosis and statin monotherapy. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE)

Copyright © NICE 2017.; 2017.

54. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016;253:281-344.
55. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3478-90a.
56. Raal FJ, Hovingh GK, Catapano AL. Familial hypercholesterolemia treatments: Guidelines and new therapies. *Atherosclerosis*. 2018;277:483-92.
57. Lui DTW, Lee ACH, Tan KCB. Management of Familial Hypercholesterolemia: Current Status and Future Perspectives. *Journal of the Endocrine Society*. 2021;5(1):bvaa122.
58. Hajighasemi S, Mahdavi Gorabi A, Bianconi V, Pirro M, Banach M, Ahmadi Tafti H, et al. A review of gene- and cell-based therapies for familial hypercholesterolemia. *Pharmacological research*. 2019;143:119-32.
59. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science (New York, NY)*. 2009;325(5936):100-4.
60. Peterson AS, Fong LG, Young SG. PCSK9 function and physiology. *Journal of lipid research*. 2008;49(6):1152-6.
61. Brown MS, Herz J, Goldstein JL. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature*. 1997;388(6643):629-30.
62. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Larrea-Sebal A, Alonso-Estrada R, et al. Mutation type classification and pathogenicity assignment of sixteen missense variants located in the EGF-precursor homology domain of the LDLR. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1727.
63. Kingsley DM, Sege RD, Kozarsky KF, Krieger M. DNA-mediated transfer of a human gene required for low-density lipoprotein receptor expression and for multiple Golgi processing pathways. *Molecular and cellular biology*. 1986;6(7):2734-7.
64. Yokode M, Pathak RK, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. Cytoplasmic sequence required for basolateral targeting of LDL receptor in livers of transgenic mice. *The Journal of cell biology*. 1992;117(1):39-46.
65. Khamis A, Palmén J, Lench N, Taylor A, Badmus E, Leigh S, et al. Functional analysis of four LDLR 5'UTR and promoter variants in patients with familial hypercholesterolaemia. *European journal of human genetics : EJHG*. 2015;23(6):790-5.
66. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human mutation*. 1992;1(6):445-66.

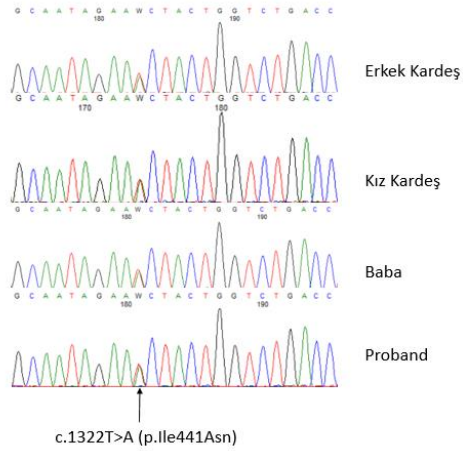
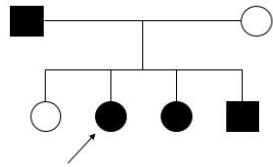
67. Whitfield AJ, Barrett PHR, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid Disorders and Mutations in the APOB Gene. *Clinical Chemistry*. 2004;50(10):1725-32.
68. Rabès JP, Varret M, Devillers M, Aegerter P, Villéger L, Krempf M, et al. R3531C mutation in the apolipoprotein B gene is not sufficient to cause hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(10):E76-82.
69. Elbitar S, Susan-Resiga D, Ghaleb Y, El Khoury P, Peloso G, Stitzel N, et al. New Sequencing technologies help revealing unexpected mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1943.
70. Guo Q, Feng X, Zhou Y. PCSK9 Variants in Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Synopsis. 2020;11.
71. Poirier S, Mayer G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug design, development and therapy*. 2013;7:1135-48.
72. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JC, Zelcer N, Kastelein JJ, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circulation research*. 2014;115(6):552-5.
73. Danyel M, Ott CE, Grenkowitz T, Salewsky B, Hicks AA, Fuchsberger C, et al. Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia. *Sci Rep*. 2019;9(1):11995.
74. Shaik NA, Al-Qahtani F, Nasser K, Jamil K, Alrayes NM, Elango R, et al. Molecular insights into the coding region mutations of low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1 (LDLRAP1) linked to familial hypercholesterolemia. 2020;22(6):e3176.
75. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(4):241-51.
76. Hemminki K, Försti A, Bermejo JL. The 'common disease-common variant' hypothesis and familial risks. *PloS one*. 2008;3(6):e2504.
77. Wray NR, Lin T, Austin J, McGrath JJ, Hickie IB, Murray GK, et al. From Basic Science to Clinical Application of Polygenic Risk Scores: A Primer. *JAMA psychiatry*. 2021;78(1):101-9.
78. Choi SW, Mak TS-H, O'Reilly PF. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. *Nature Protocols*. 2020;15(9):2759-72.
79. Vilhjálmsson BJ, Yang J, Finucane HK, Gusev A, Lindström S, Ripke S, et al. Modeling Linkage Disequilibrium Increases Accuracy of Polygenic Risk Scores. *American journal of human genetics*. 2015;97(4):576-92.
80. Mak TSH, Porsch RM, Choi SW, Zhou X, Sham PC. Polygenic scores via penalized regression on summary statistics. *Genetic epidemiology*. 2017;41(6):469-80.
81. Wand H, Lambert SA, Tamburro C, Iacocca MA, O'Sullivan JW, Sillari C, et al. Improving reporting standards for polygenic scores in risk prediction studies. *Nature*. 2021;591(7849):211-9.
82. Trinder M, Li X, DeCastro ML, Cermakova L, Sadananda S, Jackson LM, et al. Risk of Premature Atherosclerotic Disease in Patients With Monogenic Versus Polygenic Familial Hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;74(4):512-22.
83. Iacocca MA, Hegele RA. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert review of molecular diagnostics*. 2017;17(7):641-51.
84. Hooper AJ, Burnett JR, Bell DA, Watts GF. The Present and the Future of Genetic Testing in Familial Hypercholesterolemia: Opportunities and Caveats. *Current atherosclerosis reports*. 2018;20(6):31.
85. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics*. 2013;43(1110):11.0.1-.0.33.

86. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom; 2010.
87. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2010;26(5):589-95.
88. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2009;25(16):2078-9.
89. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research*. 2010;38(16):e164.
90. Alkan C, Kavak P, Somel M, Gokcumen O, Ugurlu S, Saygi C, et al. Whole genome sequencing of Turkish genomes reveals functional private alleles and impact of genetic interactions with Europe, Asia and Africa. *BMC Genomics*. 2014;15(1):963.
91. Mickiewicz A, Chmara M, Futema M, Fijalkowski M, Chlebus K, Galaska R, et al. Efficacy of clinical diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia genetic testing in Poland. *Atherosclerosis*. 2016;249:52-8.
92. Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS, Maplebeck S, Cooper JA, Soutar AK, et al. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *Journal of medical genetics*. 2006;43(12):943-9.
93. Hopkins PN, Lane SR. Genotype-guided diagnosis in familial hypercholesterolemia: clinical management and concerns. *Current opinion in lipidology*. 2017;28(2).
94. Sjouke B, Tanck MWT, Fouchier SW, Defesche JC, Hutten BA, Wiegman A, et al. Children with hypercholesterolemia of unknown cause: Value of genetic risk scores. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016;10(4):851-9.
95. Semenova AE, Sergienko IV, García-Giustiniani D, Monserrat L, Popova AB, Nozadze DN, et al. Verification of Underlying Genetic Cause in a Cohort of Russian Patients with Familial Hypercholesterolemia Using Targeted Next Generation Sequencing. *Journal of cardiovascular development and disease*. 2020;7(2).
96. Kolovou GD, Kostakou PM, Anagnostopoulou KK. Familial hypercholesterolemia and triglyceride metabolism. *International Journal of Cardiology*. 2011;147(3):349-58.
97. Zaman SB, Karim MA, Hossain N, Al Kibria GM, Islam SMS. Plasma triglycerides as a risk factor for chronic kidney disease in type 2 diabetes mellitus: Evidence from northeastern Thailand. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018;138:238-45.
98. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of Statins in Hypertriglyceridemia. *The American Journal of Cardiology*. 1998;81(4, Supplement 1):66B-9B.
99. Hadfield SG, Horara S, Starr BJ, Yazdgerdi S, Marks D, Bhatnagar D, et al. Family tracing to identify patients with familial hypercholesterolaemia: the second audit of the Department of Health Familial Hypercholesterolaemia Cascade Testing Project. *Annals of clinical biochemistry*. 2009;46(Pt 1):24-32.
100. Musunuru K, Kathiresan S. Genetics of Common, Complex Coronary Artery Disease. *Cell*. 2019;177(1):132-45.
101. Kaplan S, Pinar G, Kaplan B, Aslantekin F, Karabulut E, Ayar B, et al. THE PREVALENCE OF CONSANGUINEOUS MARRIAGES AND AFFECTING FACTORS IN TURKEY: A NATIONAL SURVEY. *Journal of Biosocial Science*. 2016;48(5):616-30.
102. Turkyilmaz A, Kurnaz E, Alavanda C, Yarali O, Kartal Baykan E, Yavuz D, et al. The Spectrum of Low-Density Lipoprotein Receptor Mutations in a Large Turkish Cohort of Patients with Familial Hypercholesterolemia. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2021;19(6):340-6.
103. Mehta R, Zubirán R, Martagón AJ, Vazquez-Cárdenas A, Segura-Kato Y, Tusié-Luna MT, et al. The panorama of familial hypercholesterolemia in Latin America: a systematic review[S]. *Journal of lipid research*. 2016;57(12):2115-29.

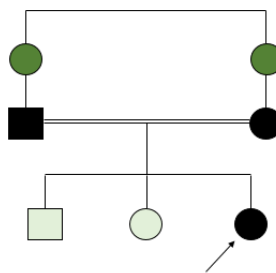
104. Dedoussis GV, Schmidt H, Genschel J. LDL-receptor mutations in Europe. Human mutation. 2004;24(6):443-59.
105. Kose E, Kose M, Ozturk SI, Ozcan E, Onay H, Ozkan B. Cascade screening and treatment of children with familial hypercholesterolemia in Turkey. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM. 2020;33(10):1251-6.
106. Taylor A, Martin B, Wang D, Patel K, Humphries S, Norbury G. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis to screen for deletions and duplications of the LDLR gene in patients with familial hypercholesterolaemia. 2009;76(1):69-75.
107. Iacocca MA, Wang J, Dron JS, Robinson JF, McIntyre AD, Cao H, et al. Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in familial hypercholesterolemia. Journal of lipid research. 2017;58(11):2202-9.
108. Kayıkçıoğlu M, Uzun HG, Tetik Vardarlı A, Tokgözoğlu L. Monozygotic twins with familial hypercholesterolemia and high lipoprotein(a) levels leading to identical cardiovascular outcomes: Case report and review of the literature. Turk Kardiyoloji Dernegi arsivi : Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir. 2020;48(5):531-8.
109. Cenarro A, Etxebarria A, de Castro-Orós I, Stef M, Bea AM, Palacios L, et al. The p.Leu167del Mutation in APOE Gene Causes Autosomal Dominant Hypercholesterolemia by Down-regulation of LDL Receptor Expression in Hepatocytes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2016;101(5):2113-21.
110. Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia: a mild phenotype of familial hypercholesterolemia: insight from the kinetic study using stable isotope and animal studies. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2015;22(1):1-9.
111. Vrablik M, Tichý L, Freiburger T, Blaha V, Satny M, Hubacek JA. Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. 2020;11.
112. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature. 2010;466(7307):707-13.
113. Rieck L, Bardey F, Grenkowitz T, Bertram L, Helmuth J, Mischung C, et al. Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia. Clinical genetics. 2020;98(5):457-67.

EK-2. Akrabalarında mutasyon saptanan hastalar ve iki kuşak pedigri ve elektroferogram görüntüleri

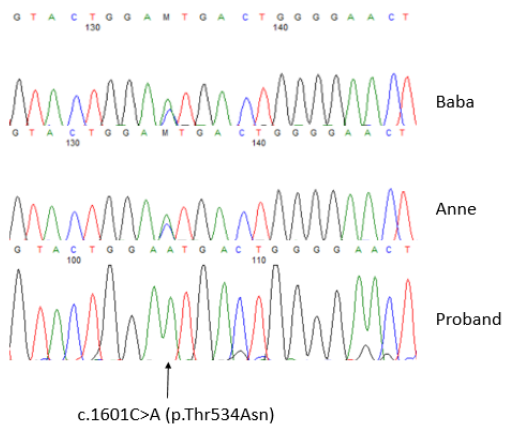
1 Numaralı Hasta



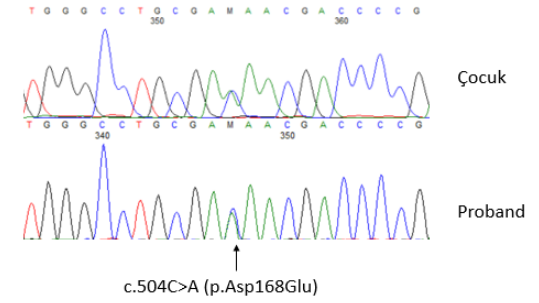
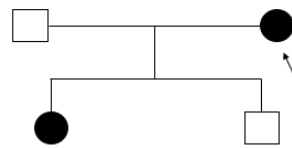
8 Numaralı Hasta



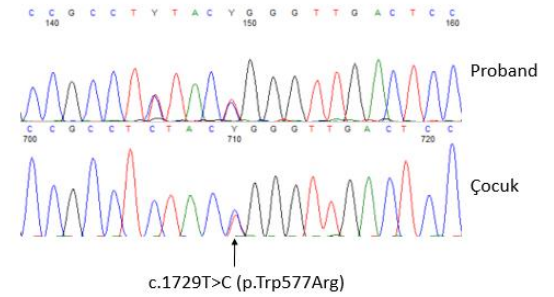
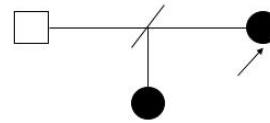
- Koroner arter hastalığı
- Hiperkolesterolemi



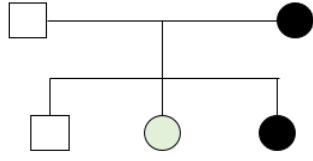
6 Numaralı Hasta



9 Numaralı Hasta



12 Numaralı Hasta

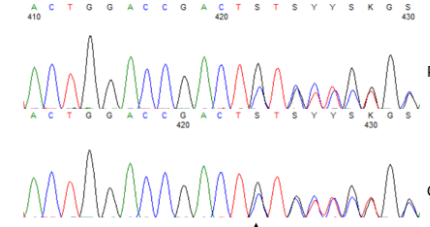
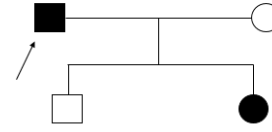


● Hiperkolesterolemi



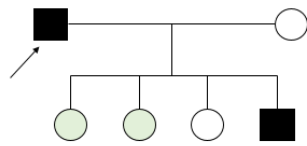
c.1324T>C (p.Tyr442His)

16 Numaralı Hasta

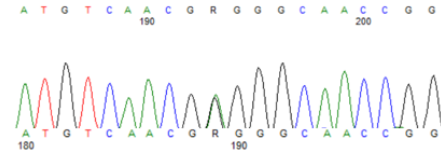


c.1478_1479del (p.Ser493CysfsTer42)

17 Numaralı Hasta

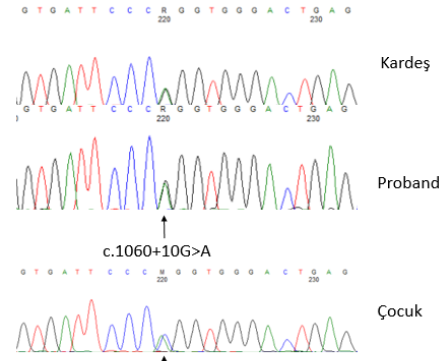
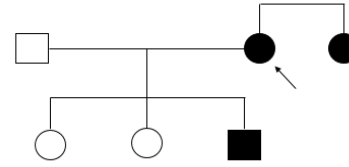


● Hiperkolesterolemi



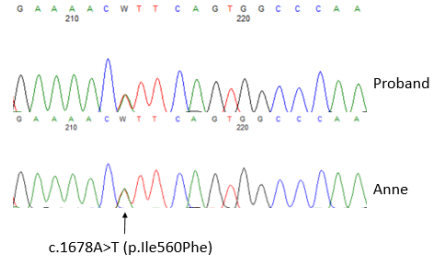
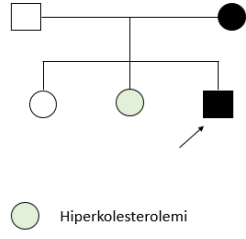
c.1775G>A (p.Gly592Glu)

18 Numaralı Hasta

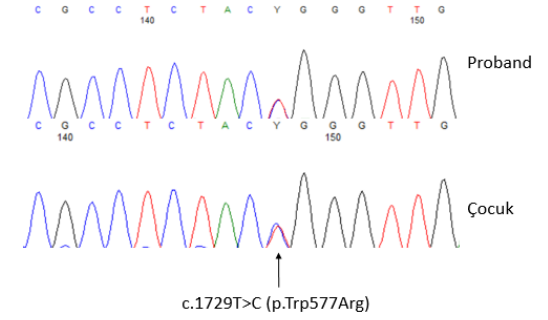
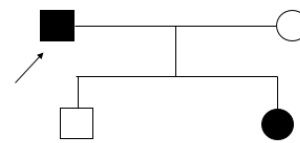


c.1060+10C>A

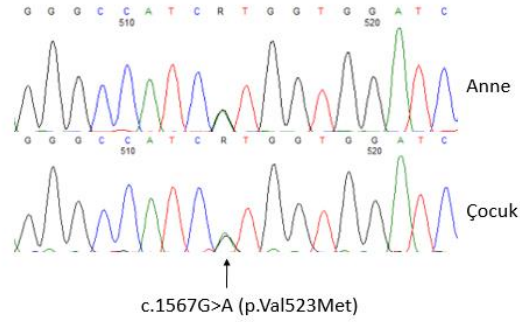
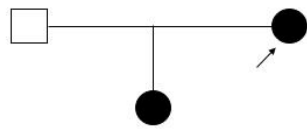
20 Numaralı Hasta



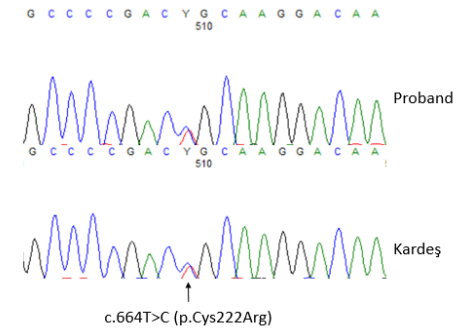
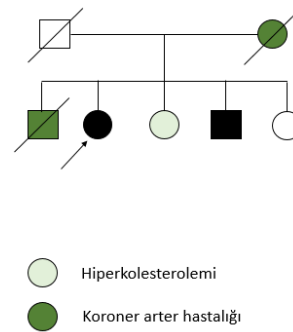
23 Numaralı Hasta

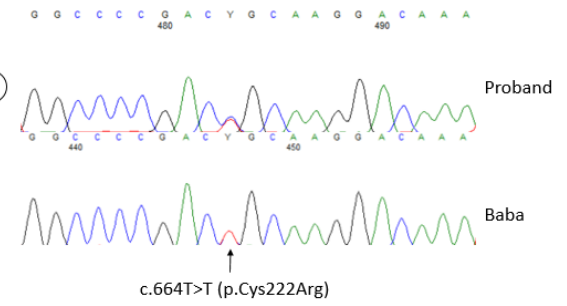
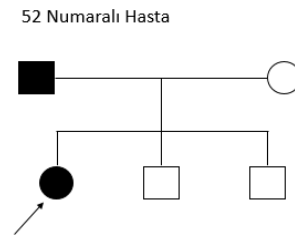
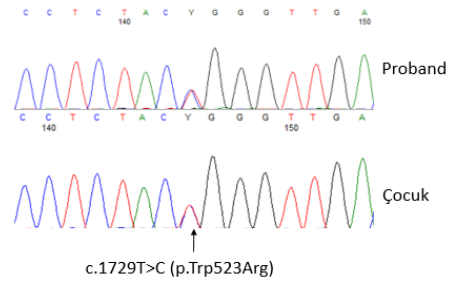
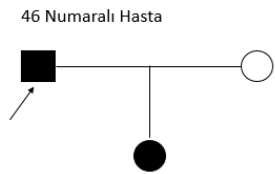
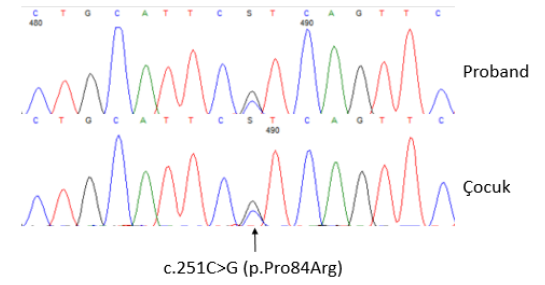
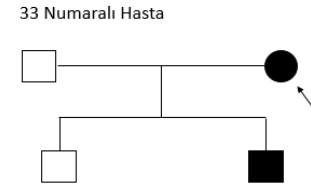
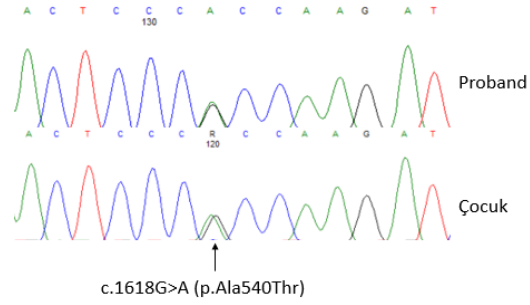


27 Numaralı Hasta

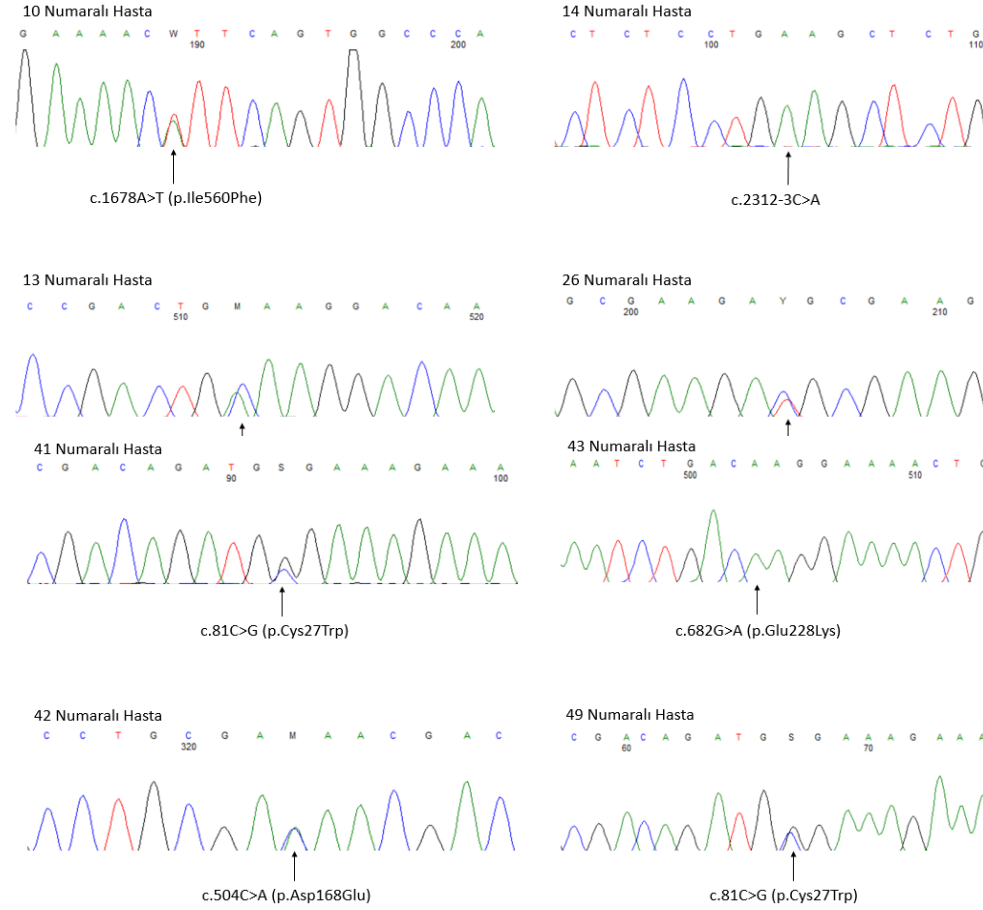


25 Numaralı Hasta

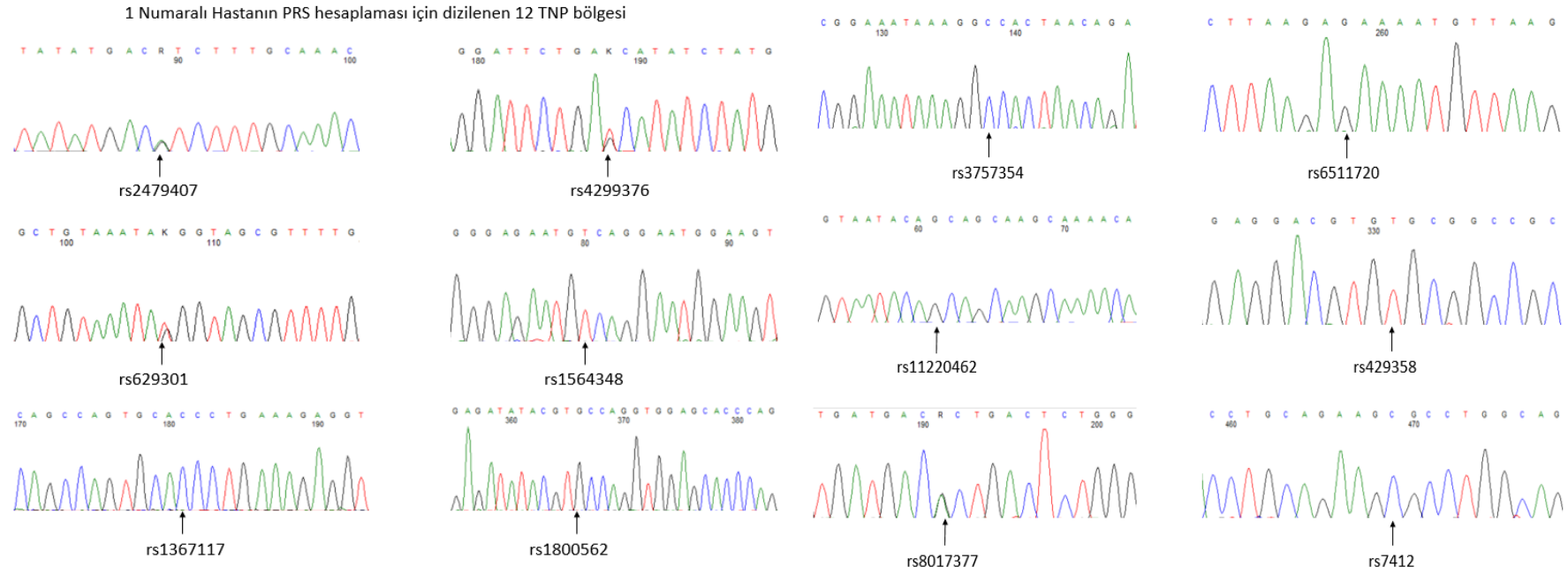




EK-3. Aile bireylerinin mutasyon bilgisi bulunmayan hastaların elektroferogram görüntüleri



EK-4. 1 numaralı hastanın PRS için kullanılan 12 SNP elektroferogramları



EK-5. 2 numaralı hastanın Amplicon Suite programından elde edilen 12 SNP bilgisini içeren tablo örneği

Polygenic markers and risk alleles associated with FH						
Marker	Gene location	Common allele	Minor allele	Risk allele/genotype	Called genotype	
rs629301	CELSR2	T	G	T	T/T	
rs1564348	SLC22A1	T	C	T	T/T	
rs1800562	HFE	G	A	G	G/G	
rs2479409	PCSK9	A	G	G	A/A	
rs3757354	MYLIP	C	T	C	C/C	
rs4299376	ABCG8	T	G	G	T/T	
rs6511720	LDLR	G	T	G	G/G	
rs8017377	NYNRIN	G	A	A	G/A	
rs11220462	ST3GAL4	G	A	A	G/G	
rs1367117	APOB	C	T	T	G/G	
rs429358	APOE	T	C	e4 > e3 > e2	T/T	ε3/ε3
rs7412	APOE	C	T	e4 > e3 > e2	C/C	ε3/ε3