

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

**KARAKTERİZE EDİLEMİYEN KALITSAL KEMİK İLİĞİ**  
**YETMEZLİKLERİNDE GENETİK NEDENLERİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Hasibe Nesligül GÖNEN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2022**

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

**KARAKTERİZE EDİLEMİYEN KALITSAL KEMİK İLİĞİ  
YETMEZLİKLERİNDE GENETİK NEDENLERİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Hasibe Nesligül GÖNEN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU**

**ANKARA  
2022**

## TEŞEKKÜR

Tez dönemim ve tüm asistanlık sürecim boyunca bilimsel tecrübeleri ile bana yol gösteren, samimi katkılarından her zaman faydalandığım kıymetli hocam, tez danışmanım ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten Akarsu'ya,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi birikimini benden esirgemeyen ve desteğini her zaman hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Alikashifoğlu'na,

Tez çalışmam süresince hasta muayeneleri ve tetkiklerin tamamlanmasında her zaman bana yardımcı olan ve tüm imkanlarını sunan sayın Prof. Dr. Pelin Özlem Şimşek Kiper ve Prof. Dr. Şule Ünal'a,

Tez çalışmamda ve asistanlık eğitimimde bilgi birikimini her zaman benimle paylaşan ve değerli katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Dr. Arda Çetinkaya'ya,

Asistanlık eğitimimde kıymetli katkılarını sunan Doç. Dr. Ekim Taşkiran'a,

Laboratuvar çalışmalarında değerli katkıları olan Bio. Serkan Kabaçam, Bio. Deniz Ceylan ve gerek dostlukları gerek profesyonel yardımları ile bana ailenin bir parçası gibi hissettiren çok sevgili genetik ailesine,

Tez çalışma sürecimin birçok alanına şahitlik eden ve her zaman desteklerini hissettiğim Öğr. Gör. Dr. Naz Güleray, Öğr. Gör. Dr. Damla Durmaz ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmasının yapılması için maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a

Ayrıca tüm hayatım boyunca beni destekleyen, hayatta duruşlarımı her zaman örnek alacağım ve bana öncelikle arkadaş olan başta annem olmak üzere tüm aileme,

Hayatımın birçok alanına tanıklık eden, tüm süreçlerde benim yanımda olan ve hayatı paylaşmanın güzelliğini bana gösteren eşime teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Gönen, NH. Karakterize Edilemeyen Kalıtsal Kemik İliği Yetmezliklerinde Genetik Nedenlerin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022.** Kalıtsal Kemik İliği Yetmezliği Sendromları hematopoez sürecinde tek bir hücre serisinde azlık şeklinde ortaya çıkabildiği gibi ikili ya da üçlü seride yetmezlik şeklinde de ortaya çıkabilen heterojen bir hastalık grubudur. Klasik örneklerini Fanconi Anemisi, Diskeratozis Konjenita, Shwachman Diamond Sendromu gibi hastalıklar oluştururken, bilinen kemik iliği yetmezlikleri ile uyumlu olmayıp, bir ya da daha fazla hücre hattındaki kemik iliği yetmezliğine diğer sistemik bulguların eşlik ettiği heterojen hastalık grubu “Karakterize Edilemeyen Kemik İliği Yetmezlikleri” olarak tanımlanmaktadır. Bu tez çalışmasında, Türkiye genelinden karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği ön tanısı ile gönderilen 17 indeks vaka öncelikle genom boyu kopya sayısı değişiklikleri açısından değerlendirilmiş ardından tüm ekzom dizileme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 7 hastada daha önce kemik iliği yetmezliği ile ilişkilendirilen telomer boy sürdürülmesinde, amino asit metabolizmasında, ribozom maturasyonunda, vitamin metabolizmasında ve diğer hücresel süreçlerde görevli genlerde nedensel varyantlar saptanırken 1 hastada klinik önemi bilinmeyen kopya sayısı değişikliği gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, kemik iliği yetmezliği, gelişme geriliği ve dismorfik bulgulara sahip bir birey ile etkilenmiş kardeşinin de yer aldığı çekirdek ailesinde homozigotluk haritalaması yapılarak p53 ilişkili apoptoz yolaklarında görevli ve şu ana kadar kalıtsal kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmemiş olan güçlü bir aday gene ulaşılmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışması ile karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri başlığı altında genetik ve fenotipik açıdan oldukça heterojen bir grup hasta ile karşı karşıya kalındığı, harman fenotipler ve *germline* mutasyona eklenen somatik değişikliklerin yüksek fenotip çeşitliliği gösteren bu grupta ayırıcı tanıyı zorlaştırdığı ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Karakterize Edilemeyen Kemik İliği Yetmezlikleri, sitopeni, tüm ekzom dizileme, p53.

**Destekleyen Kuruluş:** TÜBİTAK, Proje No: 319S062.

## ABSTRACT

**Gonen, NH. Investigation of Genetic Causes in Uncharacterized Inherited Bone Marrow Failures. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Medical Specialty Thesis, Ankara, 2022.** Inherited Bone Marrow Failure Syndromes (IBMFSs) are a heterogeneous group of disorders that result from deficiency of in a single or more hemapoetic cell lineages. Fanconi Anemia, Dyskeratosis Congenita, Shwachman Diamond Syndrome are the classic examples, however there are a group of conditions termed as Uncharacterized Bone Marrow Failure Syndrome, which refer to a heterogeneous disease group of disorders, which cannot be classified as one of the common IBMFSs where one or more cell lineages are affected and may be accompanied by other systemic findings. In this thesis, 17 individuals with “uncharacterized bone marrow failure syndromes” sent from various regions of Turkey were first evaluated for genome-wide copy number variations, followed by whole exome sequencing (WES). A copy number variation of unknown significance was detected in 1 individual. WES analysis revealed the causative variants for 7 individuals. Disease-related variants were in genes involved in telomere maintenance, amino acid metabolism, ribosome maturation, vitamin metabolism and other cellular processes, which were previously associated with IBMFSs. In addition, one affected individual with bone marrow failure, who also had developmental delay, and dysmorphic features had a variant in a strong candidate gene. This gene was also pointed out by homozygosity mapping involving the other affected sibling and nuclear family; has not been previously associated with any IBMFSs; and is critical in p53-related apoptotic pathways. In conclusion, with this study it has been demonstrated that the uncharacterized bone marrow failure syndromes are genetically and phenotypically a very heterogeneous group of disorders. The blended phenotypes and somatic mutations in a germline mutation background have been shown to complicate differential diagnosis in this group with high phenotype diversity.

**Keywords:** Uncharacterized Inherited Bone Marrow Failures, cytopenia, whole exome sequencing, p53

**Supported by:** TÜBİTAK, Project number: 319S062.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER.....	x
TABLOLAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Hematopoez .....	2
2.1.1. Embriyonik Hematopoez .....	2
2.1.2. Erişkin Hematopoez.....	4
2.2. Kemik İliği Yetmezlikleri .....	6
2.3. Tek Serinin Etkilendiği Kemik İliği Yetmezlikleri.....	8
2.3.1. Eritroid Seriyi Etkileyen Kemik İliği Yetmezlikleri.....	8
2.3.2. Granülositer Seriyi Etkileyen Kemik İliği Yetmezlikleri .....	13
2.3.3. Megakaryositer Seriyi Etkileyen Kemik İliği Yetmezlikleri .....	15
2.4. Çoklu Serinin Etkilendiği Kemik İliği Yetmezlikleri .....	20
2.4.1. Çoklu Serinin Etkilendiği Kalıtsal Sitopeniler .....	21
2.5. Kemik İliği Yetmezliklerinde Somatik Mutasyonlar .....	24
2.5.1. 5q Delesyon Sendromu .....	25
2.5.2. Aplastik Anemi .....	25
2.5.3. Somatik Olay ile Fenotipi Düzeltme/Hafifletme ( <i>Somatic Rescue/</i> <i>Somatik Kurtarma</i> ) .....	26
2.6. Karakterize Edilemeyen Kalıtsal Kemik İliği Yetmezlikleri .....	27
3. BİREYLER VE YÖNTEMLER .....	32
3.1. Klinik Verilerin Toplanması .....	32
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Gereçler, Kimyasal Maddeler ve Cihazlar ..	32
3.2.1. DNA Eldesi ve Ölçümü .....	32
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	33

3.2.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizilenmesi .....	33
3.2.4. Affymetrix CytoScan™ Optima Array .....	33
3.2.5. Genom boyu homozigotluk analizi .....	33
3.2.6. Yeni Nesil Dizileme .....	33
3.2.7. RNA Dizilenmesi .....	33
3.2.8. Tüm Genom Amplifikasyonu .....	34
3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler .....	34
3.3.1. DNA Eldesi .....	34
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	35
3.3.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizilenmesi .....	36
3.3.4. Affymetrix CytoScan Optima Array Analizi .....	37
3.3.5. Genom boyu homozigotluk analizi .....	41
3.3.6. Yeni Nesil Dizileme .....	41
3.3.7. RNA Dizilemesi .....	44
3.3.8. Tüm Genom Amplifikasyonu .....	46
4. BULGULAR .....	47
4.1. Klinik Bulgular .....	47
4.2. Laboratuvar Bulguları .....	48
4.2.1. Genom boyu mikrodizin analizi ve kopya sayısı değişiklikleri .....	48
4.2.2. TRBMFS-0137_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi .....	52
4.2.3. TRBMFS-0266_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi .....	62
4.2.4. TRBMFS-0134_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi .....	66
4.2.5. TRBMFS-0232_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi .....	73
4.2.6. TRBMFS-0248_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi .....	80
4.2.7. TRBMFS-0252_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi .....	88

4.2.8. TRBMFS-0108_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	96
4.2.9. TRBMFS-0098_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	105
4.2.10. TRBMFS-0152_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	113
4.2.11. TRBMFS-0238_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	116
4.2.12. TRBMFS-0042_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	119
4.2.13. TRBMFS-0133_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	122
4.2.14. TRBMFS-0210_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	123
4.2.15. TRBMFS-0242_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	125
4.2.16. TRBMFS-0256_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	126
4.2.17. TRBMFS-0265_04 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	129
4.2.18. TRBMFS-0077_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi.....	130
5. TARTIŞMA .....	131
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	152
7. KAYNAKLAR .....	153
8. EKLER	
EK 1. WES analizi sırasında IGV değerlendirilmesi ile elenen varyantlara ait örnek görüntüler	
EK 2. Yarık Damak/Dudak Fenotipi ile İlişkilendirilmiş Gen Listesi	
EK 3. Kalıtsal Kemik İliği Yetmezlikleri ile İlişkilendirilmiş Gen Listesi	



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AGM	Aorta-Gonad Mezanefron
ALL	Akut Lenfositik Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
bp	<i>Base pair</i> (baz çifti)
CHIP	<i>Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential</i>
CLP	<i>Common Lenfoid Progenitor</i> (Ortak Lenfoid Progenitör)
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i> (Ortak Myeloid Progenitör)
CP	<i>Cerebral Palsy</i> (Serebral Palsi)
DBA	Diamond-Blackfan Anemisi
DC	Diskeratozis Konjenita
DEB	<i>Diepoxybutane</i> (Diepoksibütan)
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EEG	Elektensefalografi
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Epidermal Büyüme Faktörü)
EKO	Ekokardiyografi
ES	Eritrosit süspansiyonu
FA	Fanconi Anemisi
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fibroblast Büyüme Faktörü)
fL	Femtolitre
GİS	Gastrointestinal sistem

GMP	Granülosit-Makrofaj Progenitör
GRCh	<i>Genome Reference Consortium Human</i>
Hb	Hemoglobin
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> (Hematopoetik Kök Hücre)
ITP	İmmün Trombositopenik Purpura
IQ	<i>Intelligence quotient</i> (Zeka Katsayısı)
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
KML	Kronik Myeloid Lösemi
MAF	Minör allel frekansı
MCV	<i>Mean Corpuscular Volume</i> (Ortalama Korpusküler Hacim)
MDS	Myelodisplastik Sendrom
MEP	Megakaryosit-Eritroid Progenitör
ml	Mililitre
MMC	<i>Mitomycin c</i> (Mitomisin C)
MPV	<i>Mean Platelet Volume</i> (Ortalama Platelet Hacmi)
NA	<i>Not accessible</i> (Erişilebilir olmayan)
ng	Nanogram
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Yeni Nesil Dizileme)
OD	Otozomal Dominant
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	Otozomal Resesif
PFO	<i>Patent Foramen Ovale</i>
RBC	<i>Red blood cell</i> (Kırmızı Kan Hücresi)
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Ters Transkripsiyon)

RNA	Ribonükleik asit
RP	Ribozomal Protein
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> (Squamous Hücreli Karsinom)
SDS	Shwachman-Diamond Sendromu
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
s	Saniye
SNİK	Sensörinöral işitme kaybı
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i> (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
TP53	Tümör protein p53
TS	Trombosit süspansiyonu
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TY	Triküspit yetmezliği
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Translasyona uğramayan bölge)
V	Volt
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i> (Tüm Ekzom Dizileme)
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ m	Micron

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 2.1.</b> Hematopoez ve regülasyonu.....	6
<b>Şekil 4.1.</b> TRBMFS-0137_03 numaralı bireyin yaş uyumlu kontroller kullanılarak yapılmış telomer boy ölçümüne ait grafik, klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	61
<b>Şekil 4.2.</b> TRBMFS-0266_03 numaralı bireyin aile ağacı ve klinik bulgular ile uyumlu olabilecek <i>MYH9</i> genindeki değişikliğin sekans elektroferogram görüntüsü .....	65
<b>Şekil 4.3.</b> TRBMFS-0134_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	72
<b>Şekil 4.4.</b> TRBMFS-0232_03 numaralı bireyin klinik bulguları ile uyumlu olabilecek <i>VPS13B</i> genindeki değişikliğin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	79
<b>Şekil 4.5.</b> TRBMFS-0248_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	87
<b>Şekil 4.6.</b> TRBMFS-0252_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	95
<b>Şekil 4.7.</b> <i>PAPSS2</i> geni cDNA sekans elektroferogram görünümü ve <i>splice</i> 'ın şematik gösterimi.....	96
<b>Şekil 4.8.</b> TRBMFS-0108_03 numaralı birey ve etkilenmiş kardeşin genom boyu homozigot bölgelerinin gösterimi.....	103
<b>Şekil 4.9.</b> TRBMFS-0108_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	104
<b>Şekil 4.10.</b> TRBMFS-0108_03 numaralı bireydeki <i>SMARCE1</i> genindeki varyant için sanger verisinden hesaplanan mozaiklik oranının gösterimi.....	104

<b>Şekil 4.11.</b> TRBMFS-0098_03 numaralı bireydeki yarık damak/dudak etyolojisini açıklamaya yönelik yapılan WES analizi filtreleme basamaklarından elde edilen varyant sayıları.....	109
<b>Şekil 4.12.</b> TRBMFS-0098_03 numaralı bireyin klinik bulguları ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.....	112
<b>Şekil 5.1.</b> MDM2/p53 mekanizması .....	144
<b>Şekil 5.2.</b> <i>MDM2</i> gen-domain ve bildirilen mutasyonların görünümü .....	146
<b>Şekil 5.3.</b> <i>MDM2</i> geninde mutasyon saptanan aminoaside ait evrimsel korunmuşluk görünümü.....	147
<b>Şekil 5.4.</b> <i>Protein Data Bank</i> (3V3B) kullanılarak resmedilmiş MDM2/p53 interaksiyonunun kristalografik görünümü .....	148
<b>Şekil 5.5.</b> TRBMFS-0042_03 numaralı bireyde saptanan delesyon bölgesi .....	150

## TABLOLAR

<b>Tablo 2.1.</b> Eritrositer seri yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri .....	13
<b>Tablo 2.2.</b> Granülositer seri yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri .....	15
<b>Tablo 2.3.</b> Megakaryositer seri yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri .....	20
<b>Tablo 2.4.</b> Çoklu serinin yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri .....	24
<b>Tablo 2.5.</b> Karakterize Edilemeyen Kemik İliği Yetmezliği Genleri ve Patofizyolojisi .....	30
<b>Tablo 3.1.</b> PCR Karışımı ve Reaksiyon Koşulları.....	36
<b>Tablo 3.2.</b> Sekans Reaksiyonu Karışımı ve Sekans Reaksiyonu PCR Koşulları .....	36
<b>Tablo 3.3.</b> Farklı yöntemlerle WES analizi gerçekleştirilen hasta grupları .....	42
<b>Tablo 3.4.</b> RT PCR reaksiyonu için hazırlanan miks içeriği ve reaksiyon koşulları.	45
<b>Tablo 4.1.</b> Hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleri.....	49
<b>Tablo 4.2.</b> TRBMFS-0137_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan soumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	54
<b>Tablo 4.3.</b> TRBMFS-0137_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	55
<b>Tablo 4.4.</b> TRBMFS-0137_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	56
<b>Tablo 4.5.</b> TERT ilişkili klinik ile TRBMFS-0137_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması .....	58
<b>Tablo 4.6.</b> MYH9 ilişkili klinik ile TRBMFS-0137_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması .....	59

<b>Tablo 4.7.</b> TRBMFS-0266_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	63
<b>Tablo 4.8.</b> TRBMFS-0266_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	65
<b>Tablo 4.9.</b> TRBMFS-0134_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	67
<b>Tablo 4.10.</b> TRBMFS-0134_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	68
<b>Tablo 4.11.</b> TRBMFS-0134_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. ....	69
<b>Tablo 4.12.</b> TRBMFS-0232_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	75
<b>Tablo 4.13.</b> TRBMFS-0232_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	76
<b>Tablo 4.14.</b> TRBMFS-0232_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	77
<b>Tablo 4.15.</b> Cohen Sendromu ile TRBMFS-0232_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması .....	79
<b>Tablo 4.16.</b> TRBMFS-0248_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	82

<b>Tablo 4.17.</b> TRBMFS-0248_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturmaya beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	83
<b>Tablo 4.18.</b> TRBMFS-0248_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	83
<b>Tablo 4.19.</b> Lizinürik protein intoleransı ile TRBMFS-0248_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması.....	85
<b>Tablo 4.20.</b> Kistik Fibrozis ile TRBMFS-0248_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması .....	86
<b>Tablo 4.21.</b> TRBMFS-0252_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	89
<b>Tablo 4.22.</b> TRBMFS-0252_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	90
<b>Tablo 4.23.</b> Transkobalamin II eksikliği ile TRBMFS-0252_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması.....	92
<b>Tablo 4.24.</b> PIEZO1 ilişkili hastalıklar ve TRBMFS-252_3 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması.....	93
<b>Tablo 4.25.</b> PAPSS2 ilişkili brakiolmia 4 ile TRBMFS-0252_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması.....	94
<b>Tablo 4.26.</b> TRBMFS-0108_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	98
<b>Tablo 4.27.</b> TRBMFS-108_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	99
<b>Tablo 4.28.</b> Coffin Siris 5 ile TRBMFS-0108_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması .....	102



<b>Tablo 4.29.</b> TRBMFS-0098_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	107
<b>Tablo 4.30.</b> TRBMFS-0098_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. ....	108
<b>Tablo 4.31.</b> TRBMFS-0098_03 numaralı bireyin yarı damak/dudak etyolojisini aydınlatmak için yapılan analiz sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday varyantın özelliklerinin değerlendirilmesi.....	109
<b>Tablo 4.32.</b> Prolidaz eksikliği ile TRBMFS-0098_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması .....	111
<b>Tablo 4.33.</b> TRBMFS-0152_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	114
<b>Tablo 4.34.</b> TRBMFS-0152_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	115
<b>Tablo 4.35.</b> TRBMFS-0152_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	115
<b>Tablo 4.36.</b> TRBMFS-0238_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	117
<b>Tablo 4.37.</b> TRBMFS-0238_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/ <i>splice-nonsense-indel</i> varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	118
<b>Tablo 4.38.</b> TRBMFS-0042_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	120

<b>Tablo 4.39.</b> TRBMFS-0042_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturmaya beklenen varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	122
<b>Tablo 4.40.</b> TRBMFS-0133_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	123
<b>Tablo 4.41.</b> TRBMFS-0210_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	124
<b>Tablo 4.42.</b> TRBMFS-0242_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	125
<b>Tablo 4.43.</b> TRBMFS-0256_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	127
<b>Tablo 4.44.</b> TRBMFS-0265_04 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	129
<b>Tablo 4.45.</b> TRBMFS-0077_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi .....	130

## 1. GİRİŞ

Kalıtısal Kemik İliği Yetmezliği Sendromları (KKİYS) tek bir hücre serisinde (eritroid, miyeloid veya megakaryositik seri) azlık şeklinde ortaya çıkabildiği gibi ikili ya da üçlü seride yetmezlik (pansitopeni) şeklinde de ortaya çıkabilen bir hastalık grubudur. Çoklu seri tutulumlarının klasik örneklerini Fanconi Anemisi, Diskeratozis Konjenita, Schwachman Diamond Sendromu, Pearson Sendromu gibi sendromlar oluştururken klinik açıdan bu sendromlarla uyumluluk göstermeyen, bir ya da çoklu seri tutulumları ile seyirli, farklı organ anomalilerinin de tabloya eklendiği grup ise “Karakterize Edilemeyen Kalıtısal Kemik İliği Yetmezlikleri” başlığı altında toplanmaktadır.

Yeni nesil dizileme teknolojisinin getirdiği avantajlar sayesinde *SRP72* (OMIM 602122), *ERCC6L2* (OMIM 615667), *DNAJC21* (OMIM 617048), *MYSM1* (OMIM 612176), *TP53* (OMIM 191170) ve *MDM4* (OMIM 602704) gibi genlerin bu grupla ilişkilendirilebilmesi mümkün olmuştur. Karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği sendromları klinik ve genetik açıdan heterojen bir tablodur ve pek çoğunun genetik nedeni bilinmemekle birlikte otozomal resesif etyoloji şu ana kadar saptanan genlerde önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemizin resesif hastalıklar açısından sık bir coğrafyaya sahip olması bu hastalık grubunda yeni genlerin tanımlanması açısından bir avantajdır.

Bu nedenle bu tez kapsamında özellikle akraba evliliği olan ya da ailede birden fazla etkilenmiş birey bulunan aileler üzerinden bu ağır sitopeni tablosuna yol açan genetik nedenlerin saptanması hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında Çocuk Hematoloji Kliniğinden karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği ön tanısı ile yönlendirilen hasta ve aileleri izlenmiştir. Hastalara öncelikle genom boyu kopya sayısı değişikliklerinin saptanabilmesi için mikrodizin analizi uygulanmış, ardından tüm ekzom dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle hastalarda fenotipe katkı sağlayabilecek hem kopya sayısı değişikliklerinin hem de genlerin kodlayan bölgelerindeki genetik varyasyonların bulunup genetik etyolojinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hematopoez

Hematopoez olarak adlandırılan kan hücrelerinin yapımı embriyonik dönemde başlayıp; hayat boyu devam eden ve yaşamın devamlılığı için mutlak olan bir süreçtir. Bu süreçte öncelikle kendi kendini yenileme ve differansiyasyon yeteneği olan hematopoetik kök hücrelerden immatür progenitör hücreler oluşmaktadır. Ardından bu progenitör hücrelerde meydana gelen bir seri differansiyasyon ve proliferasyon aşamasından sonra vücutta belirli görevlere sahip matür eritrositler, myeloid hücreler, lenfositler ve trombositler meydana gelmektedir (1). Eritrositler dokulara oksijen sağlanması ve karbondioksit taşınması; birçok farklı hücre tipine sahip myeloid ve lenfoid hücreler mikroorganizmalar ve dışardan gelen etkenlere karşı vücudun savunması; trombositler ise kanın pıhtılaşması ve yara iyileşmesi için özelleşmiştir. Bu hücrelerin yapım aşamasındaki hiyerarşi hem embriyonik hem de doğum sonrası dönemde transkripsiyon faktörleri, hormonlar ve moleküler mekanizmalar ile kontrol edilmektedir. Bu yolağın herhangi bir yerinde meydana gelen aksaklıklarda etkilenen hücre grubuna bağlı olarak tek bir hücre serisinden çoklu hücre serisinin yetmezliği ile sonuçlanan geniş bir yelpazede klinik tablolar ortaya çıkabilir. Bu nedenle hematopoezin hiyerarşisi ve bunu kontrol eden faktörlerin açıklanması sitopenilerle seyreden hastalıkların patofizyolojisinin açıklanması açısından çok önemlidir.

#### 2.1.1. Embriyonik Hematopoez

Embriyonik dönemde *yolk sac*'da bulunan mezoderm hücreleri gelişimin yaklaşık 2. haftası civarında kümeleşmeye başlar (2). Bu kümeleşen mezoderm hücreleri ileride hem vasküler yapıların hem de ekstraembriyonik hematopoezin kökenini oluşturacaktır. Gelişimin devam etmesi ile merkezde yer alan hücreler kaybolup damar lümeni oluşurken, periferde yer alan hücreler damarların endotellerini oluşturacak şekilde farklılaşır ve bunu takip edebileceğimiz endotele özgü belirteçleri kazanırlar. Bazı mezoderm hücreleri yeni oluşan vasküler endotelyuma bağlı kalır ve buralarda kan adaları meydana gelir. Bu adalarda aynı mezoderm kümelerinden köken almış hem endotel hücrelerine hem de hematopoetik hücrelere dönüşme potansiyeline

sahip olan hemanjioblastlar oluşur. Hemanjioblastların diğer hücrelerden ayırt edilmesinde Flk-1 önemli bir hücre yüzey reseptörü iken, bu hücrelerin gelişimi için TAL1, GATA2, LMO2, FLI1, ETSRP önemli transkripsiyon faktörleridir (3). Hemanjioblastlar hem endotel hücrelerine hem de hematopoetik kök hücreye farklılaşma özelliği olan hücrelerdir. Bu hücrelerin hangi yolağa doğru farklılaşacağını yüzey belirteçleri ve transkripsiyon faktörleri belirler.

Embriyonik dönemin yaklaşık 3. haftasında hematopoetik hücreye farklılaşmaya karar vermiş hücrelerle ilk hematopoez başlar. Burada meydana gelen hematopoezin ilk dalgası olan primitif dalgadır ve eritromyeloid potansiyele sahip progenitör hücrelerden daha çok eritrositler oluşmakla birlikte görevleri henüz tam belirlenememiş makrofajlar ve megakaryositlerde üretilmektedir. Bu dalgada esas amaç hızla büyüyen embriyo dokularının ihtiyaç duyduğu oksijeni sağlayacak kırmızı kan hücrelerinin elde edilmesidir (4). Burada üretilen eritrositler çekirdekli olup; fetal hemoglobin olan hemoglobin epsilon ( $\epsilon$ ) ve hemoglobin zeta ( $\zeta$ ) bu aşamada sentezlenmektedir. Bu dalgayı kontrol eden transkripsiyon faktörleri GATA1 ve Pu.1'dir. GATA1 eritroid farklılaşmasında önemli iken, Pu.1 makrofaj ve granülosit farklılaşmasında önemlidir ve bu iki transkripsiyon faktörü birbirine zıt çalışmaktadır. Bu dalganın ilerleyen dönemlerinde plasenta ve allantois de kan üretimine katılır. Embriyonun gelişimi ile hızlı bir şekilde primitif hematopoezin yerini definitif hematopoez alır. Definitif hematopoez, erişkin hematopoez olarak da bilinir ve hematopoezin ikinci dalgasıdır. Bu dalgada öncelikle kan adalarında Eritroid-Myeloid Progenitör hücreler oluşur. Bu dalganın ilerleyen evrelerinde aortik endotel ve vitellin arterin önündeki Aorta-Gonad Mezonefronlarında (AGM) ve plasantada hemojenik endotelyumdan bütün kan hücrelerine dönüşme ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahip Hematopoetik Kök Hücre [Hematopoietic Stem Cell, (HSC)] ler meydana gelir. Bu HSC'lerin oluşması farklı epigenetik mekanizmalar, GATA3, RUNX1, c-myb, Notch sinyalleri gibi farklı transkripsiyon faktörleri ve VEGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, FGF gibi çeşitli büyüme faktörleri ile kontrol edilmektedir (4). HSC'ler gelişim süresince çok hızlı yer değiştirirler. İlk kez AGM'de oluşan HSC'ler, gelişimin 4,5-5. haftası civarında esas çoğalma yerleri olan karaciğere göç ederler. Kısa bir süre sonra dalağa geçerler ve yaklaşık 11. hafta civarında hayat

boyu hematopoezin esas yeri olacak kemik iliğine ve az miktarda da lenfoid dokunun gelişiminde önemli olan timusa göç ederler (2).

HSC'lerin kendi kendini yenileme ve buna bağlı yayılma kapasitesi için bulunduğu ortam çok önemlidir (3). Burada yoğun bir HSC popülasyonuna sahip kemik iliği çevresinin etkisinden bahsetmek kaçınılmaz olacaktır. Kemik iliğinde endosteal osteoblastik ve perivasküler endotelial olmak üzere 2 farklı niş bulunmaktadır. Bu iki niş birbirlerine çok yakın konumlanmalarına rağmen farklı isimlerle tanımlansa da, bunların HSC'lerin devamlılığı için farklı özelliklerinin olup olmadığı ya da sinerjistik çalışıp çalışmadığı hala bilinmemektedir (3). Aynı zamanda kemik iliği hücre çeşitliliği açısından çok zengindir ve bu hücrelerden HSC'lerin devamlılığı için gerekli olan Notch, Wnt, Sonic Hedgehog sinyalleri ve birçok farklı sitokin salgılanmaktadır. Burada önemli olan HSC'lerin herhangi bir nişe yakınlığından ziyade muhtemelen kendileri için belirlenmiş doğru yerde olmalarıdır ki bu sağlandığı takdirde kendi kendini yenileme ya da differansiyasyon süreçlerinin sürdürülebilir olacağı speküle edilmektedir.

Embriyonik hematopoezde görevli birçok farklı moleküler mekanizma yalnızca bu dönemde etkili olmayıp; hematopoez devam ettiği sürece erişkin hayatta da yolağın belli noktalarındaki kontrol mekanizması olarak görevlerine devam etmektedir.

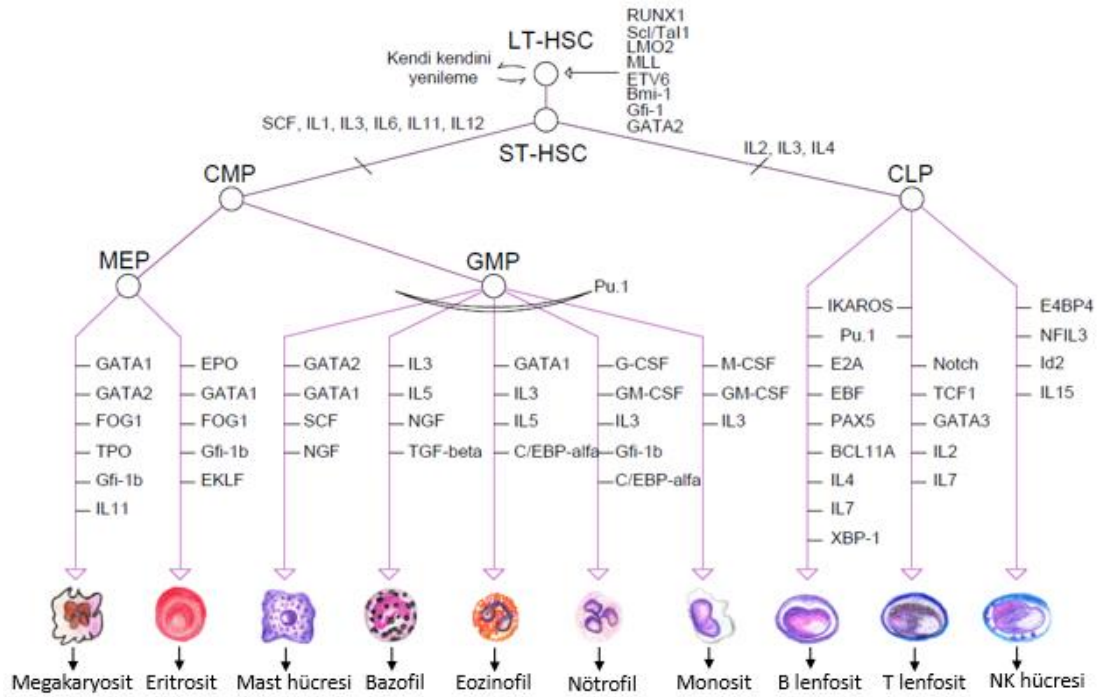
### **2.1.2. Erişkin Hematopoez**

Embriyonik dönemde oluşmuş ve kemik iliğine yerleşmiş olan HSC'lerden yaşam boyunca matür kan hücrelerinin yapımı devam etmektedir. HSC havuzunun dolayısı ile hematopoezin devamlılığı için bu hücrelerin proliferasyon, differansiyasyon, apoptoz ve kendi kendini yenileme yetenekleri arasındaki denge çok önemlidir (1). Hematopoezde, farklılaşmaya karar vermiş HSC'lerden matür kan hücreleri oluşana kadar aşılması gereken yolaklar çok sıkı kontrol altındadır. Bu yolağın doğru bir şekilde ilerlemesi için doğru zamanda doğru hücre tipinde doğru kontrol mekanizmaları devreye girmek zorundadır. Aksi takdirde hematolojik hastalıkların meydana gelmesi sürecin kaçınılmaz bir sonucudur. Bütün bu süreçlerin doğru bir şekilde işlediğini varsaydığımızda sayılarını korumak için kendi kendini yenileme kararı veren HSC'lerde bu süreç hem kemik iliğinin kendi çevresi hem de

birçok intrinsik mekanizma ile kontrol edilmektedir. Özellikle Notch, Wnt sinyallerinin ve transkripsiyon faktörlerinin HSC havuzunun korunmasında önemli moleküler mekanizmalar olduğu bilinmektedir.

Diğer bir yandan matür kan hücresi oluşturma yolunda farklılaşmaya karar vermiş HSC'lerde ise yine birçok karmaşık kontrol mekanizmaları devreye girmektedir (1). Bu kontrolü sağlayan mekanizmalar, her bir hücre basamağında aktifleşen farklı transkripsiyon faktörleri başta olmak üzere, kromatin modifikasyonu, microRNA lar ve diğer regülatör RNA'lardır. HSC'lerde birçok seri için spesifik olan transkripsiyon faktörleri aynı anda eksprese olabilir. Ancak bunların rastgele olarak ekspresyonlarının değişmesi ve birbirleri ile olan interaksyonu sayesinde yalnızca bir yolağa özgü olan transkripsiyon faktörü dominant olarak kalır ve farklılaşma tek bir hücre serisi çevresinde devam eder. Örneğin; HSC'lerde ve progenitör hücrelerde *GATA1* ekspresyonunun artması hücre kaderini eritroid seriye doğru yönlendirirken, *Pu.1* myeloid seri gelişimi için, *Notch* sinyalleri T hücrelerinin gelişimi için gerekli transkripsiyon faktörleridir. Hücrede dominant olan transkripsiyon faktörüne göre farklılaşma yolağı belirlenir (3). Farklılaşma sırasında öncelikle pluripotent HSC'lerden multipotent HSC'ler meydana gelir. Bu multipotent progenitör HSC'lerden Common (Ortak) Myeloid Progenitor (CMP) ve Common (Ortak) Lenfoid Progenitor (CLP) hücreler oluşur. CLP hücrelerinden B/T lenfositleri ve *Natural Killer* hücreler üretilmektedir. CMP'den ise öncelikle eritrosit ve platelet öncülü olan Megakaryosit-Eritroid Progenitör (MEP) ve vücudun savunmasında önemli olan granülosit ve makrofajların öncülü olan Granülosit-Makrofaj Progenitör (GMP) hücre üretilmektedir. Bu progenitör hücrelerden bir dizi proliferasyon ve differansiyasyon basamağının ardından nihayetinde matür eritrositler, granülositler, makrofajlar ve trombositler meydana gelmektedir.

Bu yolakların tamamı yine birçok transkripsiyon faktörü, sitokin ve büyüme faktörleri ile kontrol edilmektedir. Hematopoez ve onun kontrol mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Şekil 2.1). Hematopoezde etkili olan transkripsiyon faktörleri çoğunlukla hematolojik hastalıklara yol açan kromozomal translokasyonlarda ya da hematolojik kanserlerde görülen somatik mutasyonlarda etkilenen faktörlerdir. Bu komplike yolağın herhangi bir yerinde meydana gelen bir aksaklık hiyerarşinin doğru bir şekilde ilerlemesini engellemekte ve matür kan hücrelerinin oluşumunda problemler yaratıp; kemik iliği yetmezliği fenotipinin oluşmasına sebep olmaktadır.



**Şekil 2.1.** Hematopoez ve regülasyonu. Kısaltmalar; LT-HSC: Uzun ömürlü hematopoetik kök hücre, ST-HSC: Kısa ömürlü hematopoetik kök hücre, CMP: Ortak myeloid progenitör, CLP: Ortak lenfoid progenitör, MEP: Megakaryosit/eritroid progenitör, GMP: Granülosit/makrofaj progenitör. (Orkin ve ark., 2008 ve Rieger ve ark., 2012 çalışmalarındaki bilgilere dayanarak bu tez çalışması kapsamında Nesligül Gönen ve Nebile Dayılar tarafından görselleştirilmiştir).

## 2.2. Kemik İliği Yetmezlikleri

Kemik iliği yetmezlikleri, kemik iliğinde bir ya da daha fazla hematopoietik hücre hattının etkilenmesi ile ortaya çıkan ineffektif hematopoezin ve bunu takiben periferik kanda etkilenen hücre hattına bağlı olarak çeşitli sitopenilerin görüldüğü nadir ve oldukça heterojen bir hastalık grubudur. Etyolojide kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrenin azalması, kemik iliğini hasarlandıran ailesel ve klonal kanserler, kan hücrelerinin gelişimi sırasında matürasyonda sorun oluşturan metabolik hastalıklar sayılabilir. Bunlara ek olarak, **Ribozomopati** ve **Telomeropati** başlığı altında toplanan iki büyük hastalık grubu kemik iliği yetmezliklerinin patolojisinde önemli yer tutmaktadır (5).

**Ribozomlar**, hücrenin protein sentezinden sorumlu olan primer organelleridir. Bu organellerin yapısal ve biyogenezinde rol alan genlerde saptanan mutasyonlara



bağlı olarak oluşan ve büyük bir klinik çeşitlilik yarattığı bilinen hastalık grubu ribozomopatilerdir. Kemik iliği yetmezliği, dismorfik bulgular, işitme kaybı, nörogelişimsel gerilik, anormal deri döküntüleri görülebilecek fenotipik özelliklerdendir. Bütün hücrelerde ribozomların bulunmasına rağmen, ribozomal bozukluklar doku spesifik özellik gösterebilmekte ve kemik iliği yetmezliği görülen durumlarda kanser yatkınlığı meydana gelebilmektedir (6, 7).

**Telomerler**, kromozomların ucunda bulunan, kromozomların uç uca birleşmesini, replikasyondan dolayı oluşan kromozomal kısalmanın işlevsel genetik bölgeleri etkilemesini önleyen ve bu sebeplerle genomik stabiliteyi sağlayan ve hücresel yaşlanmayı engelleyen “TTAGGG” nükleotidlerinin oluşturduğu tekrar dizileridir. Telomer biyogenezindeki bozukluk olarak da bilinen telomeropatiler oldukça nadir bir hastalık grubudur. Hastalığın genetik etyolojisini direkt telomer boy sürdürülebilirliğinde rol alan genlerdeki değişiklikler ya da bu yolda direkt görevli olmasa da değişikliklerinde telomer boyunun kısalması ile sonuçlanan farklı yolda görevli genlerdeki genetik değişiklikler oluşturabilir. Hastaların klinik bulguları arasında kemik iliği yetmezliğine ek olarak çoklu organ yetmezlikleri, anormal deri döküntüleri ve minör dismorfik bulgular görülebilmektedir (8, 9).

Kemik iliği yetmezliği ile karakterize hastalıkların bazıları için spesifik fenotipler tanımlanmış olsa da, hastalar genellikle birbiri ile örtüşen bulgulara sahiptir ve bu durum sınıflandırmayı zorlaştırmaktadır (10). Hastalarda kalıtılan bir varyasyon sonucu kemik iliği yetmezliği tablosu oluşuyor olsa da; kemik iliği gibi hızlı bölünen dokuların kaderi olan somatik mutasyonlar da klinik bulgulardan sorumlu olabilir. Zor olsa da, bu varyasyonların **konjenital ya da somatik** ayrımının yapılması özellikle kanser yatkınlığı, transplantasyon tedavileri, aile bireylerinin taramaları ve verilecek genetik danışmanlık açısından çok önemlidir.

Kalıtılabilir kemik iliği yetmezlikleri, aileden kalıtılan ya da *de novo* olarak ortaya çıkan germline bir mutasyona bağlı olarak oluşan kemik iliği yetmezlikleridir. Bu gruptaki hastalıklar genellikle çocukluk çağında bulgu verir ve kemik iliği yetmezliğine ek olarak bazı dismorfik bulgular ve diğer organ sistemlerinin de etkilendiği kompleks bir klinik durum ile karşımıza çıkabilmektedir. Hastalarda aynı zamanda hematolojik ve non-hematolojik kanserlere karşı yatkınlık gelişmektedir.

Tanıda dismorfik bulgulara yönelik fiziksel muayene, kemik iliği incelemesi ve moleküler genetik analiz oldukça önemlidir. Hastaların tedavisinde sitopenilere yönelik replasmanlar kullanılsa da tek küratif tedavi seçeneği hematopoetik kök hücre naklidir.

Kazanılmış kemik iliği yetmezliği ise germline bir mutasyon olmaksızın, somatik mutasyonlarla ya da ilaçlar, kemoterapi, radyasyon ve enfeksiyonlar sonucu kemik iliğinin hasarlanması ile ortaya çıkan klinik tablodur. Herhangi bir germline mutasyon olmaksızın sonradan gelişen klonal olay çevresinde özellikle MDS/AML'ye yatkınlık gelişebilmektedir. Hastaların klinik bulguları çok ağır olmadıkça replasman tedavileri ve immünoterapi tercih edilmektedir. Ancak prognozun kötü seyrettiği durumlarda hematopoetik kök hücre nakli seçeneği de küratif amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Hem kalıtılan hem de kazanılmış kemik iliği yetmezlikleri tek ya da birden fazla hücre hattının etkilenmesi ile ortaya çıkabilir.

### **2.3. Tek Serinin Etkilendiği Kemik İliği Yetmezlikleri**

#### **2.3.1. Eritroid Seriyi Etkileyen Kemik İliği Yetmezlikleri**

Eritrositler, dokuların oksijen ihtiyacını karşılayan ana kan hücre elemanlarıdır. Yalnızca eritroid serinin etkilendiği kemik iliği yetmezlikleri, kemik iliğinde eritroid prekürsörlerin azaldığı, kanda çoğunlukla normositik olmakla birlikte makrositik özellikte de olabilen anemiye retikülositopeninin eşlik ettiği bir hipoeritropoez kliniği ile karakterizedir. Eritroid seri yetmezlikleri kalıtsal ve kazanılmış eritroid seri yetmezlikleri olarak 2 başlık altında incelenmektedir. Kazanılmış eritroid seri yetmezlikleri altta yatan herhangi bir organik sebep olmaksızın çoğunlukla antikor aracılı otoimmün bir bozukluğa bağlı eritroid progenitor hücrelerinin hasarlanması ile meydana geldiğinde primer, altta yatan organik bir sebep bulunması durumunda ise sekonder kazanılmış eritroid seri yetmezlikleri olarak sınıflanmaktadır. Primer kazanılmış eritroid seri yetmezliklerinin arasında çocukluk çağı geçici eritroblastopenisini (*Transient erythroblastopenia of childhood*) de kapsayan primer otoimmün eritroid seri yetmezlikleri ve primer myeloblastik eritroid seri yetmezlikleri sayılırken, sekonder sebepler arasında 5q

delesyonu, lösemiler, lenfomalar, solid tümörler, timoma, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, ilaçlar, kollajen doku hastalıkları, gebelik ve ciddi böbrek yetmezliği sayılmaktadır (11). İneffektif eritropoezle birlikte retikülositopeninin eşlik ettiği, mikrositik/normositik/makrositik özellikte farklı anemilerle seyredabilen konjenital diseritropoetik anemiler (CDA), hipoeritropoezle karakterize olan kalıtsal eritroid seri yetmezliklerinden farklı hematolojik ve klinik özelliklere sahip olabilmektedir. Aneminin görülme yaşının daha ileri olması, farklı özellikte çeşitli anemilerin görülebilmesi, organomegalinin eşlik edebilmesi ve kemik iliğinde inefektif eritropoeze sekonder eritroid hiperplazi görülebilmesi nedenleri ile son yıllarda yapılan çalışmalarda CDA kalıtsal hipoeritropoez ile karakterize eritroid seri yetmezlikleri içine dahil edilmemiştir (11, 12). Bu nedenle kalıtsal eritroid seri yetmezlikleri hipoeritropoezle karakterize ve diseritropoezle karakterize olmak üzere 2 başlık altında incelenmiş ve aşağıda ayrıntılandırılmıştır (Tablo 2.1).

### **Kalıtsal Hipoeritropoezle Karakterize Eritroid Seri Yetmezlikleri**

#### **i. Diamond-Blackfan Anemisi (OMIM 105650)**

Diamond-Blackfan Anemisi (DBA), ribozomun 40S ve 60S alt ünitesinin yapısına katılan ribozomal proteinleri kodlayan ribozomal protein (RP) genlerindeki ve ribozom biyogenezini etkileyen genlerdeki (*TSR2*, *HEATR3*) mutasyonlara bağlı olarak rRNA maturasyon defekti ile sonuçlanan bir ribozomopatidir (13, 14). Ribozomal proteinler ribozom yapısına direkt katılan proteinlerdir ve bu proteinleri kodlayan genlerde tek bir alelin sağlam olması oluşan hücrel stresini kompanse edememektedir. Bu nedenle bu genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar otozomal dominant kalıtım özelliklerine sahiptir. Ancak doğrudan ribozom yapısına katılmayan ribozom biyogenez faktör genlerindeki mutasyonların hastalık fenotipi oluşturmaları için her iki alelde de mutasyon beklenmesi daha olasıdır (15). Bu nedenle bir DBA hastasında otozomal resesif kalıtım paternine sahip bir aile ağacı görülüyorsa öncelikle otozomal resesif hastalık sebebi olabilecek ribozom biyogenez faktörleri ile ilgili genlerdeki mutasyonlara dikkat etmek gerekmektedir. Ribozom biyogenezini etkilememelerine rağmen *ADA2*, *EPO* ve *GATA1* genlerindeki değişikliklerde de DBA benzeri bir fenotip ortaya çıkabilmektedir. Bu karmaşık moleküler yapı ve genetik heterojenite hastalığın sınıflamasını da karmaşık hale

getirmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda konjenital eritroblastopeni ile birlikte yukarıda sayılan herhangi bir gende değişikliğin olması DBA sendromu tanımı için yeterli olmaktadır. Ancak DBA sendromu olarak sınıflanan hastalar sahip oldukları gen mutasyonuna ve klinik bulgularına göre klasik DBA, DBA-benzeri hastalık ve *GATA1* ilişkili klinik olarak 3 başlık altında incelenmektedir (14). Klasik DBA, RP genleri ya da ribozom biyogenezinde önemli olan genlerdeki değişikliklere bağlı olarak rRNA maturasyon defekti ile karakterize olup, hastalarda genellikle hayatın ilk 1 yılında başlayan makrositer anemi, el baş parmak anomalileri, kraniyofasiyal anomaliler ve ürogenital anomaliler ile seyretmektedir. DBA-benzeri klinik ise *EPO* ya da *ADA2* genlerindeki biallelik değişikliklerle ortaya çıkan, rRNA maturasyon defektinin olmadığı, klinikte MCV sayısı normal ve anemiye eşlik edebilecek diğer sistemik malformasyonların görülmediği bir tablodur. Hem eritroid serinin hem de megakaryositer serinin gelişiminde önemli bir transkripsiyon faktörü olan *GATA1* değişikliklerinde ise normal rRNA maturasyonu olmasına rağmen, klasik DBA fenotipi gösteren hastalar olması sebebi ile klasik DBA fenotipine yol açan genlerin arasında sayılıp sayılamayacağı tartışması hala devam etmektedir.

Somatik mutasyonlarla meydana gelen ve DBA-benzeri kliniğe sebep olan 5q delesyon sendromuna ise kemik iliği yetmezliklerinde somatik mutasyonlar başlığı altında yer verilecektir.

## **Konjenital Diseritropoezle Karakterize Eritroid Seri Yetmezlikleri**

### **i. Konjenital Diseritropoetik Anemi**

Konjenital Diseritropoetik Anemiler, ineffektif eritropoezin, kemik iliğinde multinükleer eritroblastların olduğu; konjenital dönemde başlayan heterojen bir kalıtsal anemidir (16). Başlıca 3 tipi (CDA I/II/III) tanımlanmış olsa da transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olan ve CDA varyantları olarak bilinen formları da sayılınca toplam 5 tipi bulunmaktadır.

### **ii. CDA Tip I (OMIM 224120)**

Doğumdan geç erişkinlik dönemine kadar tanı alabilen fakat genellikle erken çocukluk ve ergenlikte kendini gösteren retikülositopeninin eşlik ettiği ciddi ya da ılımlı makrositik anemi ile karakterizedir. Bilirubin yüksekliği, safra taşı oluşumuna yatkınlık, splenomegali, transfüzyondan bağımsız demir birikimi hastalarda

görülebilir bulgulardır. Ayrıca, aneminin yanında boy kısalığı, göğüs deformasyonu, ekstremitelerde anomalileri gibi çeşitli konjenital anomaliler de tanımlanmıştır. Kemik iliğinde eritrosit maturasyonunun geç basamaklarında iki ya da daha fazla çekirdekli hücreler görülür. Bu çekirdekler birbirlerine kromatin köprüleri ile bağlanmaktadır ve çoğunlukla farklı differansiyasyon basamaklarına aittirler. Çekirdekler arası kromatin köprüleri CDA tip I in tipik özelliğidir fakat bütün hastalarda görülmeyebilir. Elektron mikroskobu altında çekirdeklerin heterokromatin görünümü daha yoğundur ve daha geniş porlara/vakuollere sahiptir. Bu yapı tipik “*Swiss Cheese*” görünümüne yol açar. Hücre siklusunda görevli proteinleri sentezleyen *CDAN1* ve *CDIN1* genlerindeki mutasyonlar otozomal resesif (OR) kalıtım paternine uygun olarak bu fenotipin ortaya çıkmasından sorumludur.

### iii. CDA Tip II (OMIM 224100)

Çoğunlukla normositik değişken derecede aneminin eşlik ettiği, CDA tip I'e göre daha geç tanı alabilen en yaygın CDA formudur. İlerleyen splenomegali, sarılık, safra taşı oluşumu, ineffektif eritropoeze bağlı demir birikimi hastaların çoğunda yaygın olan bulgulardır. Kemik iliğinde genellikle aynı maturasyon basamaklarına ait 2 çekirdekli eritroblastlar görülmektedir. Elektron mikroskobu ile bu eritroblastlar çift membranlı olarak görülür ve sahip oldukları glikolizasyon kusuru patognomoniktir. Genetik etyolojide hücre içi veziküller iletimde görevli bir proteini kodlayan *SEC23B* genindeki biallelik mutasyonlar bu fenotipten sorumludur.

### iv. CDA Tip III (OMIM 105600)

Üç major CDA tipi içinde en nadir görülen tiptir. Hastalar asemptomik ya da ılımlı anemi, normal ya da hafif yüksek MCV, normal ya da hafif düşük retikülosit sayısına sahip olabilirler (16). Kemik iliği incelemesinde dev çok çekirdekli eritroblastlar karakteristiktir. Elektron mikroskopik incelemede heterokromatin arası yarık, otofajik vakuoller ve eritroblast sitoplazmasında myelin figürleri görülebilir. Hastalarda görme problemleri, monoklonal gammopati ve diğer tiplerden farklı olarak multiple myelom gelişme riski bulunabilmektedir. Mitozun geç evrelerinde görevli proteini kodlayan *KIF23* genindeki otozomal dominant (OD) kalıtım paterni ile karakterize heterozigot mutasyonlar klinik bulgulardan sorumludur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada sadece 1 hastada sitokinezde görevli *RACGAP1* genindeki

bileşik heterozigot mutasyonda CDA Tip III'e benzeyen fenotip görülmüş ve bu fenotip CDA Tip IIIb olarak sınıflandırılmıştır (17).

#### v. Transkripsiyon Faktörleri ile İlişkili CDA

Bu grup CDA Tip 4 (OMIM 613673) ve Diseritropoetik aneminin eşlik ettiği veya etmediği X-linked trombositopeni (*X-linked thrombocytopenia with or without dyserythropoietic anemia*) (OMIM 300367) fenotiplerini içermektedir (16).

**CDA tip 4:** Laboratuvar bulguları arasında ciddi hemolitik anemiye eşlik eden normal ya da hafif yüksek retikülosit sayısı ve yüksek HbF seviyesi sayılabilmektedir. Kemik iliği incelemesi hipersellüler,  $\geq 2$  nükleuslu eritroblastlarla karakterizedir. Elektron mikroskopunda atipik sitoplazmik inklüzyonlu, çekirdek membranlarında invajinasyon olan ve belirgin heterokromatin yapı kazanmış eritroblastlar görülebilmektedir. Terminal eritroid differansiyasyonunda ve fetal hemoglobin sentezinden erişkine geçişte önemli bir role sahip transkripsiyon faktörü *KLF1*'in heterozigot mutasyonları bu klinikten sorumludur.

**Diseritropoetik aneminin eşlik ettiği veya etmediği X-linked trombositopeni:** Hipogranüle makrotrombositopeni ile karakterize, kanamaya yatkınlığın ve ılımlı/ciddi aneminin görüldüğü CDA tipidir. Kemik iliğinde dismegakaryopoezis ve diseritropoezis görülmektedir. Hem eritroid serinin hem de megakaryositer serinin gelişiminde görevli bir transkripsiyon faktörü olan *GATA1* genindeki X'e bağlı resesif (XLR) kalıtım paternine uygun olarak meydana gelen mutasyonlar bu klinikten sorumludur.

#### vi. CDA Varyantları

Bu gruptaki hastalar çeşitli genlerdeki mutasyonlara bağlı CDA benzeri bulgulara sahip izole ya da sendromik vakalardır. Hepsinde kemik iliği yetmezlikleri bulunmamakla birlikte diseritropoezle gittiği için CDA başlığı altında sınıflanmaktadır. Burada sorumlu olan genler *ALAS2*, *LPIN2*, *CAD*, *COX4I2*, *MVK* genleridir.

**Tablo 2.1.** Eritrositer seri yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri. CDA varyantları grubu tipik CDA bulguları ile seyretmediği için tabloya eklenmemiştir.

		Hastalık	Kalıtım	Patofizyoloji	Genler
Eritroid Seri Yetmezlikleri	Hipoeritropoez	DBA	OD X'e bağlı resesif OR	RP'lerde ya da ribozom biyogenez faktörlerinde meydana gelen problemlere bağlı hematopoez etkilenmesi	<i>RPS19, RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5, RPL11, RPL15, RPS7, RPS10, RPS26, RPS29, RPS28, RPS15, RPS27, RPS27A, RPL9, RPL18, RPL26, RPL27, RPL31, TSR2, HEATR3, EPO, GATA1</i>
	Diseritropoez	CDA Tip I	OR	Hücre siklus problemlerine bağlı mitozda sorunlar ve hücre yapı değişiklikleri	<i>CDANI, CDIN1</i>
		CDA Tip II	OR	Hücre içi veziküler iletim kusuru	<i>SEC23B</i>
		CDA Tip III	OD	Hücre bölünmesinde oluşan sorunlara bağlı hücre yapı etkilenmesi	<i>KIF23, RACGAP1</i>
		Transkripsiyon faktörleri ile ilişkili CDA → CDA Tip 4 → X-linked thrombocytopenia with or without dyserythropoietic anemia	OD X'e bağlı resesif	Transkripsiyon faktöründeki değişiklikler	<i>KLF1</i>  <i>GATA1</i>

### 2.3.2. Granülositer Seriyi Etkileyen Kemik İliği Yetmezlikleri

Nötrofiller, granülositer seri içinde %60-70 oran ile baskın olan hücre grubudur. Vücutta bakteriyel ve fungal etkenlere karşı savunma görevi bulunmaktadır. Nötrofillerin yapım-yıkım süreci hızlı olup yarı ömürleri 4 saattir. Vücut savunması için çok önemli olan bu dinamik dengenin bozulması ile ortaya çıkan nütropeni tablosu sekonder (kazanılan) ya da primer (kalıtılan) sebeplerle meydana gelebilmektedir (18). Nütropenin sekonder sebepleri arasında neonatal alloimmün nütropeni, otoimmün nütropeni, bazı ilaçlar, enfeksiyonlar, özellikle B12 ve folik asit eksikliğine yol açan beslenme bozuklukları ve Kİ'de infiltrasyon oluşturan nedenler (lösemi, lenfoma, solid tümörler, granümatöz enfeksiyonlar, lizozomal depo hastalıkları,

osteopetrozis) sayılabilmektedir. Kalıtılan nötropeni sebepleri ise aşağıda ayrıntılandırılmış ve Tablo 2.2’de özetlenmiştir (Tablo 2.2).

### **Kalıtılan (primer) Nötropeniler**

#### **i. Ciddi Konjenital Nötropeni (OMIM 202700)**

Erken çocukluk döneminde başlayan ve nötrofil sayısının  $<0.5 \times 10^9/L$  olmasına bağlı olarak bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara yatkınlık ile karakterizedir (13, 19). Genetik etyolojisi heterojendir (Tablo 2.2).

#### **ii. İmmün Bozukluklara Eşlik Eden Konjenital Nötropeniler**

Nötropeni, farklı kalıtım kalıbı özellikleri ile seyirli, retiküler disgeneziste (OMIM 267500), hiperimmünglobulin-M sendromunda (OMIM 308230), X-linked agammaglobulinemide (OMIM 300755), *cartilage hair displazi*’de (OMIM 250250), IRAK4 eksikliği’nde (OMIM 607676), Schimke immuno-osseous displazide (OMIM 242900), *Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis* (WHIM) sendromunda (OMIM 193670) ve *common variable immunodeficiency* (OMIM 240500) ve IgA bozukluğunda klinik tabloya eşlik eden bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır (Tablo 2.2) (13, 19).

#### **iii. Veziküler Transport Bozukluklarına Eşlik Eden Konjenital Nötropeniler**

Chediak-Higashi sendromu (OMIM 214500), Hermansk-Pudlak sendromu (tip2) (OMIM 608233), Griscelli sendromu (tip2) (OMIM 607624), Cohen sendromu (OMIM 216550), p14 eksikliği (OMIM 610798) otozomal resesif kalıtılan, hücrede veziküler transport defektine bağlı olarak ortaya çıkan ve klinik bulgulara nötropeninin de eşlik ettiği sendromlardır. Aynı zamanda Chediak-Higashi sendromunda kanama diatezinde bozukluklar, Hermansk-Pudlak sendromunda platelet defektleri de görülebilmektedir (13, 19).

#### **iv. Metabolik Bozukluklara Eşlik Eden Konjenital Nötropeniler**

X-linked resesif kalıtım paternine sahip değişikliklerle meydana gelen Barth sendromunda (OMIM 302060) ve otozomal resesif kalıtılan Glikojen Depo Hastalığı Tip 1B (OMIM 232220) de nötropeni diğer klinik bulgulara eşlik edebilmektedir (13, 19).



**Tablo 2.2.** Granülositer seri yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri

	Hastalık	Kalıtım	Patafizyoloji	Genler	
Granülositer Seri Yetmezlikleri	Ciddi Konjenital Nötropeni	OD X'e bağlı resesif OR	Granülopoez problemleri Metabolik yolaktaki problemler Hücre içi iletişim ve hücre iskelet problemleri	<i>ELANE, GF11, HAX1, G6PC3, VPS45, JAGN1, CSF3R, SRP54, WAS</i>	
	İmmün Bozukluklara Eşlik Eden Nötropeniler	Retiküler disgenezis	OR	Enerji metabolizması problemleri	<i>AK2</i>
		Hiperimmünglobulin-M Sendromu	X'e bağlı resesif	Otoimmünite?	<i>CD40L</i>
		X'e bağlı agammaglobulinemi	X'e bağlı resesif	Myeloid hücre hattında problemler	<i>BTK</i>
		Cartilage hair displazi	OR	Endoribonükleaz metabolizma bozukluğu	<i>RMRP</i>
		IRAK4 deficiency	OR	Nötrofil fonksiyon defekti	<i>IRAK4</i>
		Schimke immuno-osseous displazi	OR	DNA replikasyon problemlerine bağlı myeloid seride bozulma	<i>SMARCAL1</i>
		WHIM	OD	Myeloid hücre hattında problemler	<i>CXCR4</i>
		Common variable immunodeficiency IgA deficiency	OD, OR ?	Otoimmünite	<i>TNFRSF13B</i>
	Veziküler Transport Bozukluklarına Eşlik Eden Nötropeniler	Chediak-Higashi sendromu	OR	Veziküler transport defektleri	<i>LYST</i>
		Hermansk-Pudlak sendromu (tip2)	OR		<i>AP3B1</i>
		Griscelli sendromu (tip2)	OR		<i>RAB27A</i>
		Cohen sendromu	OR		<i>VPS13B</i>
		p14 eksikliği	OR		<i>LAMTOR2</i>
Metabolik Bozukluklara Eşlik Eden Nötropeniler	Barth sendromu	X'e bağlı resesif	Kardiyolipin metabolizma bozukluğu	<i>TAZ</i>	
	Glikojen Depo Hastalığı Tip1B	OR	Glikoz metabolizma bozukluğu	<i>G6PT1</i>	

### 2.3.3. Megakaryositer Seriyi Etkileyen Kemik İliği Yetmezlikleri

Trombositler, damar duvarındaki herhangi bir yaralanma esnasında kanın pıhtılaşmasını sağlayan kan elemanlarıdır. Eksikliklerinde ya da yara yerinde tam bir agregat oluşturamamaları durumunda şiddetin değişken olduğu kanama bozuklukları görülebilmektedir. Trombositopeniler, psödotrombositopeni, konjenital ve kazanılmış trombositopeniler olarak 3 başlık altında incelenmektedir (20). Psödotrombositopeni, EDTA'lı tüpte trombositlerin kümeler oluşturmaya bağlı olarak yalancı bir trombosit

eksikliği olduğu durumdur ve klinik olarak yanıtıcı olabilmektedir. Kazanılmış trombositopeniler, immün aracılı ya da immün aracılı olmayan trombositlerin hasarlandığı durumlarla, çeşitli virüslerle, kanserlerle, dalak boyutunun artmasına bağlı yıkımın indüklenmesi ile meydana gelebilmektedir. Konjenital trombositopeniler ise, asemptomatik durumdan erken yaşta kanama yatkınlığı oluşturacak kadar geniş yelpazede kliniğe sahip, çoğunlukla genetik etyolojisi tanımlanmamış heterojen bir kemik iliği yetmezliği grubudur. Bu grup hastalar tam kan sayımında değerlendirilen MPV (Mean Platelet Volume) değerinin referans aralığı (7,2-11,7 fL) (21) göz önüne alınarak büyük platelet boyutuna sahip trombositopeniler (makrotrombositopeniler), normal platelet boyutuna sahip trombositopeniler ve küçük platelet boyutuna sahip trombositopeniler (mikrotrombositopeniler) olmak üzere 3 sınıfa ayrılır (Tablo 2.3).

### **Büyük Platelet Boyutu ile Karakterize Trombositopeniler**

#### **i. MYH-9 İlişkili Hastalıklar (OMIM 155100)**

Trombositopeni, dev plateletler ve granülositlerde Döhle cisimciği benzeri inklüzyon cisimleri ile karakterize triadı olan hücre iskeletinde görevli *kas dışı miyozin ağır zincir IIA* proteinini kodlayan *MYH9* genindeki heterozigot mutasyonların sebep olduğu oldukça nadir bir hastalık grubudur (13, 20). *MYH9* ilişkili hastalıklar arasında birbiri ile örtüşen bulguları olan May–Hegglin, Fechtner, Sebastian, and Epstein sendromları bulunmaktadır. Bunlar farklı isimlere sahip olsa da birbirinden farklı sendromlar olarak düşünülmemelidir ve hepsindeki ortak genetik neden *MYH9* genindeki heterozigot mutasyonlardır. Neredeyse etkilenmiş tüm hastalarda hafif ya da ılımlı bir trombositopeni, normal granüler yapıya sahip dev trombositler (trombosit çapı  $>7 \mu\text{m}$ ), nötrofil inklüzyon cisimleri ve çok nadir kanama bozuklukları görülmektedir.

#### **ii. Bernard-Soulier Sendromu (BSS) (OMIM 231200)**

Platelet membranlarındaki Von-Willebrand faktör reseptör kompleksi olan glikoprotein (GP) Ib'nin bozukluğu olarak da bilinen BSS, özellikle trombositlerin yüzeyinde bulunan/kanama esnasında adezyonda görevli Von-Willebrand reseptör kompleksi (GPIb/IX/V) alt üyelerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı, trombosit adezyonunun bozulduğu ve bunun sonucunda bebeklik döneminde başlayan

ciddi kanamalarla karakterize dev trombositlerin görüldüğü nadir bir hastalıktır (13, 20). GPIb/IX/V reseptör kompleksi 4 farklı gen tarafından kodlanan 4 alt üniteye (GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX, GPV) sahiptir. GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX ve GPV alt üniteleri sırasıyla *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9* ve *GP5* genleri tarafından kodlanmaktadır. *GP5* geni kompleksteki GPV alt ünitesini kodlasa da bu gendeki mutasyonlar BSS fenotipi ile ilişkilendirilmemiştir.

Tip 2B Von-Willebrand hastalığı (VWD 2B), GPIb/IX/V kompleksine bağlanan Von-Willebrand faktöründeki (*VWF*) fonksiyon kazanımı mutasyonları sonucu ortaya çıkan, kanama bozukluğu, dev trombositler ve trombositopeni ile karakterizedir.

Di-George sendromunda da 22q11.2 bölgesinde bulunan *GP1BB* geninin haployetmezliğine bağlı kanamaya yatkınlık olmaksızın makrotrombositler görülebilmektedir.

### **iii. Gray Platelet Sendromu (GPS) (OMIM 139090)**

Büyük trombositlerin olduğu ılımlı bir trombositopeni ve trombositlerdeki  $\alpha$  granüllerin kaybına bağlı periferik yayma incelemesinde gri trombositlerle karakterize *NBEAL2* genindeki biallelik mutasyonlar sonucu görülen nadir bir hastalıktır (13).

### **iv. Transkripsiyon Faktörleri ile İlişkili Makrotrombositopeniler**

*GATA1* (XLR) ve *FLII* (OD/OR), megakaryosit gelişiminde önemli transkripsiyon faktörleridir ve mutasyonlarında hastalarda büyük trombositlerle karakterize trombositopeni görülebilmektedir (13).

### **Normal Platelet Boyutu ile Karakterize Trombositopeniler**

#### **i. Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (CAMT) (OMIM 604498)**

CAMT, trombositlerin ve multipotent hematopoetik progenitör hücrelerin büyüme faktörü olan trombopoietin reseptörünü kodlayan *MPL* genindeki biallelik mutasyonlar ile meydana gelen bir kalıtsal kemik iliği yetmezliğidir (13). Klinikte doğumla birlikte başlayan ciddi trombositopeni ve bu durumun sebep olduğu kanama bulguları görülmektedir. Hastalığın ciddiyeti mutasyon tipine göre değişebilmektedir. Bu nedenle mutasyonun hasar verici olma potansiyeline göre 2 tipe ayrılmaktadır. Tip 1, *nonsense/frameshift* gibi proteini ağır hasarlandıran mutasyonlarda daha düşük

platelet sayısı, daha ciddi kanama bozuklukları ve ortalama 20'li yaşlarda pansitopeniye progresyon gösteren klinik özelliklere sahiptir. Tip 2 ise *missense* mutasyonlarla meydana gelen bir hastalık olup, doğumda başlayan hafif platelet düşüklüğü çocukluk döneminde spontan düzelme eğilimindedir ve hastalar yaklaşık 40'lı yaşlarda pansitopeni geliştirirler (22). Her iki tipte de trombositopeni şiddeti oldukça değişken olabilmektedir. Kandaki trombositlerin boyutları ve granülasyon paterni normaldir. Ancak kemik iliği incelemelerinde megakaryositler hiç görülmeyebilir ya da sayıları belirgin düşük olarak değerlendirilebilir.

**ii. Radius Yokluğuna Eşlik Eden Trombositopeni Sendromu (TAR)  
(OMIM 274000)**

TAR, doğumda değişken derecelerde var olan ve yaşla düzelme eğilimindeki trombositopeniye eşlik eden bilateral radius aplazisi ile karakterize, periferik yaymada normal boyutta trombositlerin olduğu bir kalıtsal trombositopeni sebebidir. İskelet bulgularının yanında renal anomaliler, kardiyak anomaliler, dismorfik bulgular, inek sütü intoleransı bu fenotipe eşlik edebilen diğer bulgulardandır (23, 24).

**iii. Amegakaryositik Trombositopeniye Eşlik Eden Radioulnar Sinostozis  
(RUSAT) (OMIM 605432)**

RUSAT, ilerleyen dönemde pansitopeniye ilerleyebilen amegakaryositik trombositopeniye eşlik eden proksimal radius ve ulna sinostozu ile karakterizedir (25).

**iv. Myeloid Seri Kanseri İlişkili Ailesel Platelet Bozukluğu (OMIM  
601399)**

Plateletlerdeki hem sayısal hem de yapısal anomalilerle karakterize, myeloid kanserler ile ilişkili ailesel platelet bozukluğu (OMIM 601399), *RUNX1* genindeki heterozigot mutasyonlarla meydana gelen bir sendromdur (13). *RUNX1* hematopoetik hücre proliferasyonunda, hücre iskeletinin ve genomun stabilitesinde önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve bu regülasyonun bozulduğu durumlarda kanserlere eğilim riski artmaktadır.

## **Küçük Platelet Boyutu ile Karakterize Trombositopeniler**

### **i. Wiscott-Aldrich Sendromu (WAS) (OMIM 301000)**

WAS genindeki mutasyonlarla ortaya çıkan küçük plateletlerin, immün bozukluğun ve ekzemanın kliniğe eşlik ettiği nadir bir trombositopeni sebebidir (13). WAS genindeki mutasyonlarda diğer klinik bulgular olmaksızın sadece mikrotrombositopeni ya da trombosit bozukluğu olmaksızın ciddi konjenital nötropeni de görülebilmektedir. Bu pleitropik etki, genin hematopoetik hücre gelişimi, hücre sinyal mekanizması, lenfosit apoptozu, aktin polimerizasyonu gibi farklı hücresel yollarda görev almasından kaynaklanmaktadır.

### **ii. Trombositopeni (Tip III) (OMIM 273900)**

*FYBI* genindeki biallelik mutasyonlarla ortaya çıkan ve mikrotrombositopeniye bağlı bebeklik döneminde kanama bulguları ile karakterize pansitopeniye progrese olabilen trombositopeni sebebidir (13).

Ayrıca bahsedilen genlerin dışında *ANKRD26* (OD), *CYCS* (OD), *IFZF5* (OD), *ETV6* (OD), *SRC* (OD), diğer ailesel trombositopeni genlerindedir (13).

**Tablo 2.3.** Megakaryositer seri yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri

	Hastalık	Kalıtım	Patafizyoloji	Genler	
Megakaryositer Seri Yetmezlikleri	Büyük Platelet Boyutu ile Karakterize Trombositopeniler	MYH9 ilişkili Hastalık	OD	Megakaryosit differansiyasyon ve maturasyon defekti	<i>MYH9</i>
		Bernard-Soulier Sedromu	OD OR	Trombosit adezyon bozukluğuna bağlı trombositlerin yıkımı	<i>GP1BA, GP1BB, GP9</i>
		Tip 2B Von-Willebrand hastalığı	OD OR	Trombosit agregasyon problemlerine bağlı agregate olan trombositlerin uzaklaştırılması	<i>VWF</i>
		Gray Platelet Sendromu	OR	Trombositlerin dalakta yıkımı ve üretim defekti	<i>NBEAL2</i>
		Transkripsiyon faktörleri ile ilişkili trombositopeni	OD, OR X'e bağlı resesif	Transkripsiyon problemleri	<i>GATA1, FLII</i>
	Normal Platelet Boyutu ile Karakterize Trombositopeniler	Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni	OR	Trombopoetin reseptörü problemleri	<i>MPL</i>
		TAR	OR	mRNA maturasyon problemleri	<i>RBM8A</i>
		RUSAT	OD	Hematopoez problemleri	<i>HOXA11 MECOM</i>
		Myeloid seri kanserler ile ilişkili trombositopeni	OD	Transkripsiyon problemleri	<i>RUNX1</i>
	Küçük Platelet Boyutu ile Karakterize Trombositopeniler	Wiscott-Aldrich Sendromu	X'e bağlı resesif	Platelet yüzey proteinlerinin sentez problemleri	<i>WAS</i>
		Trombositopeni Tip III	OR	Megakaryosit maturasyon problemleri	<i>FYB1</i>

#### 2.4. Çoklu Serinin Etkilendiği Kemik İliği Yetmezlikleri

Farklı hücre yollarını etkileyen genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak kemik iliğinde birden fazla hücre serisinin etkilenmesi ile ortaya çıkan kemik iliği yetmezlikleridir. Kalıtsal ve kazanılmış olarak meydana gelebilmektedir. Kazanılmış sebeplerin en tipik örneği aplastik anemidir ve kemik iliği yetmezliklerinde somatik

mutasyonlar başlığı altında ayrıntılandırılmaktadır. Kalıtsal sebepler ise aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmış ve Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

### 2.4.1. Çoklu Serinin Etkilendiği Kalıtsal Sitopeniler

#### i. Fanconi Anemisi (FA, OMIM 227650)

FA, en sık rastlanan ve her üç seriyi de etkileyen bir kalıtsal kemik iliği yetmezliğidir. Hastalarda hayatın ilk onyılında sadece trombositopeni görülebilese de ilerleyen yaşlarda eritrositer ve granülositer seri de etkilenir ve pansitopeni meydana gelir (10). Eşlik eden konjenital anomaliler, kemik iliği yetmezlik fenotipinin şiddeti ve yatkınlık oluşturduğu kanser tipleri açısından oldukça heterojendir. Boy kısalığı, *cafe-au-lait* lekeleri, radyal aplazi, el baş parmak anomalileri, mikrosefali, mikroftalmi görülebilecek fiziksel anomaliler olmasına rağmen bazı hastalar bunlardan hiçbirine sahip olmayabilir. Genetik etyolojisinden DNA hasarının onarılmasında görevli FA genleri sorumludur (Tablo 2.4). Bu genlerdeki mutasyonlarda radyasyon ve diğer ajanların indüklediği çift zincirli DNA kırıklarının tamir edilemediği gözlenmektedir. Bu bulgudan yola çıkılarak FA'nın laboratuvar tanısı için diepoksibütan (DEB) ve mitomisin C (MMC) gibi çift zincirli DNA kırıklarını indükleyen ajanlarla periferik kan lenfosit kültürü kurulur ve bu hastalarda normal popülasyona göre kromozomal kırık oranlarının daha yüksek olduğu gözlenir (10, 26).

#### ii. Telomer Biyoloji Bozuklukları

Telomer biyoloji bozuklukları, telomer boy sürdürülebilmesinde görevli olan genlerde meydana gelen değişikliklerin genel adıdır (10, 27). Telomeropati olarak adlandırılan bu grubun en bilinen örneğini Diskeratozis Konjenita (DC) (OMIM 613989) oluşturmaktadır. DC'nin klasik triadını retiküler deri döküntüleri, mukozal lökoplaki ve tırnak distrofileri oluştursa da bütün hastalarda bu bulgular bulunmayabilir. Genetik etyolojisini telomer biyogenezinde görevli olan genler oluşturmaktadır (Tablo 2.4). Etyolojiden sorumlu genlerdeki mutasyonlara sekonder kısalan telomerler kromozomal stabilitenin bozulmasına bağlı olarak kanser yatkınlığına, hücresel yaşlanmaya ve apoptoza neden olmaktadır. Genetik mutasyona bağlı hastalarda kısalan telomer boyları ve azalmış telomeraz aktivitesi tanıya destek olmaktadır. Hastalarda çoğunlukla tek serinin etkilendiği anemi ya da

trombositopeniyi tüm serilerin etkilendiği pansitopeni takip etmektedir. Diğer telomer biyoloji bozukluklarından olan Hoyeraal-Hreidarsson (HH) Sendromu (OMIM 305000), Revesz Sendromu (OMIM 268130), Coats Plus sendromu (OMIM 612199) çoğunlukla otozomal resesif kalıtım paternine sahip olan ve DC'ye göre daha ağır fenotipi olan hastalıklardır. Bu sendromlarda telomer boyunun yaşa göre <1 persentil olması ile çok ciddi bir telomer boy kısalığından söz edilmektedir. HH Sendromunda, erken başlayan kemik iliği yetmezliği, intra-uterin gelişme geriliği (IUGR), büyüme-gelişme geriliği, mikrosefali, mental gerilik, serebellar hipoplazi, ataksi, immün bozukluklar; Revesz Sendromunda IUGR, gelişme geriliği, bilateral eksudatif retinopati, intrakraniyal kalsifikasyonlar, ciddi kemik iliği yetmezliği, ince-seyrek saçlar, Coats Plus Sendromunda retinal vaskülopati, serebral kalsifikasyonlar ve lökodistrofi DC'nin tipik triadına eşlik eden bulgulardır.

### iii. Shwachman-Diamond Sendromu (SDS, OMIM 260400)

SDS, klasik triadını kemik iliği yetmezliği, ekzokrin pankreas yetmezliği ve kemik yapı değişikliklerinin oluşturduğu *SBDS* genindeki homozigot mutasyonlardan kaynaklanan oldukça nadir bir sendromdur (10). Ayrıca hastalarda dental displazi, hepatik anormallikler, düşük IQ seviyesi, özellikle lenfositlerin etkilendiği immün bozukluk ve buna bağlı gelişen enfeksiyonlar da görülebilmektedir. Çocukluk çağında genellikle nötropeni ve yağlı dışkılama ile bulgu vermesinin yanında yaklaşık %20 hastada ciddi aplastik anemi de görülebilmektedir. Yaklaşık %90 hastada biallelik *SBDS* gen mutasyonları klinik bulgulardan sorumlu iken, heterozigot ya da somatik mutasyonlar da tanımlanmıştır. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda *SBDS* proteini ile birlikte çalışan *EFL1* proteinini kodlayan *EFL1* geninde biallelik mutasyonlar da SDS ile ilişkilendirilmiştir (28). SDS hastalarında telomer boylarının da kısa olması hastalığın hem ribozomopatilerle hem de telomeropatilerle çakışan özelliklerinin olduğunu göstermektedir. Hastalarda *SBDS* gen mutasyonlarının yanında klonal değişiklikler de gözlenebilmektedir. En sık görülenlere örnek i(7q), del(20q), monozomi 7 ve *TP53* gen mutasyonlarıdır.



#### **iv. Pearson Sendromu (OMIM 557000)**

Pearson Sendromu, mitokondriyal DNA'daki büyük delesyonlar sonucu oluşan bir mitokondriyopatidir. Delesyon boyutu hastalar arasında değişkenlik gösterse de en sık rastlanan delesyon mitokondriyal DNA'daki 13 bazlık tekrar dizisine bağlı meydana gelen ~4.9 kbp'lik delesyondur (29). Mitokondriyal DNA tarafından kodlanan oksidasyon sisteminin etkilenmesine bağlı çoklu sistem tutulumu ile karakterizedir (30). Hastalarda kemik iliğinde eritroid, myeloid ve megakaryositer serinin etkilenmesine bağlı ciddi pansitopeninin yanında ekzokrin pankreas yetmezlikleri, karaciğer, böbrek ve endokrin bozukluklar görülebilmektedir.

#### **v. Dubowitz Sendromu (OMIM 223370)**

Dubowitz Sendromu, patofizyolojisi ve genetik nedeni belli olmayan bir hastalıktır. Farklı çalışmalarda otozomal resesif kalıtım kalıbı önerilmiştir (13). Klinik bulgular değerlendirildiğinde pansitopeniye IUGR, büyüme geriliği, mikrosefali, egzama, mental gerilik, hiperaktivite ve dikkat dağımlıklığının eşlik ettiği görülmektedir.

#### **vi. Nijmegen Breakage Sendromu (OMIM 251260)**

Nijmegen Breakage Sendromu, iyonize radyasyonla kromozomal kırıkların indüklendiği bir kromozomal instabilite sendromudur (13). Etyolojiden *NBN* genindeki biallelik mutasyonlar sorumludur ve fenotip olarak FA'ya benzemektedir. Hastalarda nadir de olsa trombositopeni ve aneminin eşlik ettiği kemik iliği yetmezlikleri görülebilmektedir.

#### **vii. Seckel Sendromu (OMIM 210600)**

Seckel Sendromu, tipik baş görünümü, dismorfik bulgular, artmış kromozomal instabilitenin olduğu ve birçok sistemin etkilendiği otozomal resesif nadir bir primordiyal dwarfizm sendromudur (13). Hastalarda klinik bulgulara pansitopeni eşlik edebilmektedir. Genetik etyolojisi oldukça heterojendir (Tablo 2.4). Sorumlu tutulan genler dışında etyolojide daha fazla genin rol aldığı düşünölmektedir.

**Tablo 2.4.** Çoklu serinin yetmezliği ile karakterize kemik iliği yetmezliği sebepleri

Hastalık	Kalıtım	Patofizyoloji	Genler
Fanconi Anemisi	OD OR X'e bağlı resesif	Çift zincirli DNA kırıklarında tamir bozuklukları	<i>FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1(BRCA2), FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG(XRCC9), FANCI, FANCI(BRIP1), FANCL(PHF9), FANCM, FANCN(PALB2), FANCO(RAD51C), FANCP(SLX4), FANCT(UBE2T), FANCO(ERCC4), FANCR(RAD51), MAD2L2, XRCC2</i>
Telomer Biyoloji Bozuklukları	OD OR X'e bağlı resesif	Telomer biyogenez ve boy sürdürülebilirliğindeki bozukluklar	<i>TERT, TERC, DKC1*, NOP10, NHP2, PARN, RTEL1, TIN2, WRAP53</i>
Shwachman-Diamond Sendromu	OR OR OD	Ribozom biyogenez Bozukluğu Sekretuar proteinlerin sinyal iletim bozukluğu	<i>SBDS EFL1 SRP54</i>
Pearson Sendromu	-	Mitokondri işlevlerinde bozukluk	Mitokondriyal DNA'da delesyonlar
Dubowitz Sendromu	OR?	?	?
Nijmegen Breakage Sendromu	OR	Çift zincirli DNA kırıklarında tamir bozuklukları	<i>NBN</i>
Seckel Sendromu	OR	DNA tamiri, hücre bölünmesi ve apoptoz bozuklukları	<i>ATR, RBBP5, CEP152, CEP63, TRAP1, NSMC2</i>

\* En sık karşılaşılan DC formu

## 2.5. Kemik İliği Yetmezliklerinde Somatik Mutasyonlar

Şimdiye kadar anlatılan hastalıklarda daha çok germline meydana gelen mutasyonlar üzerinde durulsa da aslında kemik iliği yetmezliklerinin çok büyük bir kısmını post-zigotik dönemde ya da yaşlanma ile meydana gelen somatik mutasyonlar oluşturmaktadır (10, 31). Bu somatik olaylar zemininde çeşitli hematolojik kanserlerin görülme ihtimali artmaktadır ve bu da devamında mortaliteyi getirmektedir. Kemik iliği yetmezliği düşünülen bir olguda eğer hayatın ilk yıllarında bu yetmezlik meydana geliyor ve diğer organların da etkilendiği bir klinik durum ile karşılaşıyorsa daha çok altta yatan germline bir mutasyon olabileceğini düşünmek gerekiyorken, ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan ve başka bir sistemik bulgu olmaksızın sadece kemik iliği yetmezliğinin görüldüğü durumlarda altta yatan somatik mutasyona bağlı olarak bu klinik durumun oluşabileceği göz ardı edilmemelidir. Aşağıda hematolojik kanserler dışında somatik mutasyonlarla kemik iliği yetmezliğine sebep olan hastalık grupları ayrıntılandırılmıştır.

### 2.5.1. 5q Delesyon Sendromu

5q delesyonu, erişkin yaştaki MDS'lerde en sık rastlanan kromozomal anomalidir ve genellikle hastalarda AML dönüşümünün düşük olduğu iyi seyreden bir prognoz ile karakterizedir (32, 33).

5q delesyon sendromu, 5. kromozomun uzun kolunda yerleşik ribosomal protein gen 14 (*RPS14*)'ün somatik delesyonları ile meydana gelen ve DBA'yı taklit eden bulgulara sahip kazanılmış bir eritroid seri yetmezliğidir (34). Kemik iliğinde eritroid seride hipo/aplazi ile karakterize refraktör makrositik bir anemi görülmektedir. DBA'dan farklı olarak genellikle 50 yaş civarı kadınlarda hakim olan bu delesyon varlığında hastaların steroid tedavisine yanıtı kötü olup, talidomid analogu bir immünmodülatör olan lenalidomid tedavide oldukça etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır (35, 36). 5q delesyon sendromu çocukluk çağında oldukça nadir rastlanan bir durumdur ve bu yaş grubunda şimdiye kadar literatürde yaklaşık 10 vaka bildirilmiştir. 5q delesyon sendromunun bir MDS alt tipi olması nedeni ile AML transformasyon riski ve doğru tedavi seçeneği açısından sadece eritroid serinin etkilendiği fakat kalıtsal bir kemik iliği yetmezliği olan DBA ile ayırıcı tanısının mutlaka yapılması gerekmektedir.

### 2.5.2. Aplastik Anemi

Kazanılmış çoklu seriyi etkileyen kemik iliği yetmezliklerinin tipik örneklerinden biri olan aplastik aneminin patofizyolojisinde genellikle kemik iliğindeki progenitörlere karşı oluşan immün yanıt rol oynamaktadır ve kemoterapi/radyoterapi, bazı ilaçlar, viral enfeksiyonlar, kollajen doku hastalıkları ve hatta gebelik bile etyolojiden sorumlu tutulmaktadır (13, 37). Genellikle 60 yaş üzerinde ve genç erişkinlerde görülen bu hastalık %70 oranında idiyopatik olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastaların kliniğinde hiposellüler kemik iliğinin eşlik ettiği pansitopeni görülmektedir ve yalnızca hastaların %50 sine genetik tanı konabilmektedir. Aplastik aneminin genetik etyolojisinden *PIGA*, *BCOR/BCORLI*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TP53* ve *RUNX1* genlerindeki somatik mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır.

Son yıllarda yeni nesil dizileme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılması ile somatik mutasyonların saptanma oranları oldukça artmıştır. Fakat saptanan somatik mutasyonun patojenitesinin değerlendirilmesi ve bu hastaların izlemi oldukça karmaşık bir hal almaktadır. Saptanan somatik mutasyon sağlıklı bireylerde sadece hücre yaşlanmasına sekonder meydana gelen bir mutasyon olarak sınıflanabileceği gibi, MDS kriterlerini karşılamayan hastalarda sadece klonal mutasyona sahip olup *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential* (CHIP) olarak da sınıflanabilir (37, 38). CHIP tanımı için sitopeni eşlik etsin ya da etmesin hematolojik kanserlerde sık mutasyona uğrayan genlerde somatik mutasyonun var olması ve 2016 WHO'nun yayınladığı (39) MDS kriterlerini karşılamaması yeterli olmaktadır. Genellikle >65 yaşta düşünülen CHIP tanısında hastalarda sitopeni kliniği değişken olabilmektedir. Sitopeninin eşlik ettiği hastalarda çoğunlukla bu durumun sebebi olarak ileri yaşlarda görülebilen hematolojik kanserler dışı nedenler düşünülmektedir. CHIP olarak değerlendirilen bir mutasyon zemininden MDS ya da diğer hematolojik kanserlere dönüşme ihtimali her yıl yaklaşık %0.5-%1 arasında değişmektedir ve aslında bu hastaların çoğu >65 yaş olması ve diğer başka kronik hastalıklara sahip olmaları nedeni ile mortalite genellikle hematolojik olmayan hastalıklardan kaynaklanmaktadır (38).

### **2.5.3. Somatik Olay ile Fenotipi Düzeltme/Hafifletme (*Somatic Rescue/ Somatik Kurtarma*)**

Germline mutasyona bağlı olarak meydana gelen bir hastalığın zamanla klinik seyrinde iyileşme görülebilmektedir. Klinik bulgulardaki düzelmeye germline mutasyonun etkisini azaltacak somatik bir mutasyonun sebep olduğu bilinmektedir ve bu mekanizma literatürde “somatik kurtarma (*somatic rescue*)” mekanizması olarak adlandırılmaktadır (40). Örneğin; 7. kromozomun uzun kolunda yerleşik olan *SBDS* genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları ile meydana gelen SDS'de somatik olarak i(7q) anomalisine oldukça sık rastlanmaktadır ve bunun azalmış *SBDS* gen ürün miktarını nötralize etmek için oluşan bir hücresel savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu “doğrudan somatik kurtarma” olarak tanımlanmaktadır. Doğrudan somatik kurtarmanın bir başka örneği de 7. kromozomun uzun kolunda yerleşik olan *SAMD9* ve *SAMD9L* genlerinin germline fonksiyon kazanımı mutasyonları ile meydana gelen Miyelodisplazi, Enfeksiyon, Büyüme geriliği,

Adrenal hipoplazi, Genital değişiklikler, Enteropati (MIRAGE) ve Ataksi-Pansitopeni Sendromlarında 7. kromozomda bu genleri içeren genomik bölgenin somatik kayıplarının sık görülmesidir (40). Öte yandan somatik kurtarma dolaylı olarak da olabilmektedir. Buna örnek olarak, ribozomopatilerdeki artmış p53 aktivitesine bağlı olarak artan eritropoetik hücre apoptozunun *TP53*'deki somatik fonksiyon kaybı mutasyonlarla dengelenmesi verilebilir (41).

Bu nedenle klinikte kalıtsal bir hastalıktan şüphelenilen fakat hasta bulgularının öngörülen sendromla bire bir eşleşmediği durumlarda somatik kurtarma mekanizması göz ardı edilmemelidir.

## 2.6. Karakterize Edilemeyen Kalıtsal Kemik İliği Yetmezlikleri

Yukarıda da anlatıldığı gibi kemik iliği yetmezlikleri hem genetik hem de fenotip özellikleri açısından oldukça heterojen bir hastalık grubudur. Şimdiye kadar kemik iliği yetmezliğine sebep olduğu bilinen yaklaşık >70 gen tanımlanmış olmasına rağmen kemik iliği yetmezliği sebebi ile izlenen hastaların yaklaşık %50'sinde tanımlanan genlerde herhangi bir genetik değişikliğe rastlanamamaktadır. Kemik iliğinde bir ya da daha fazla hücre serisinin etkilenmesine bağlı sitopenilere eşlik eden multisistemik tutulumun olduğu fakat bilinen kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri sendromlarından herhangi birine dahil edilemeyen ve genetik etyolojisi henüz aydınlatılmamış bu büyük hasta grubu karakterize edilemeyen/sınıflandırılmayan kemik iliği yetmezlikleri başlığı altında incelenmektedir (5, 42, 43). Bu grup hastalık bilinen bir kalıtsal kemik iliği yetmezliği sendromunun atipik şekli olabileceği gibi bilinen sendromların dışında tamamen farklı bir gendeki değişikliğe bağlı olarak da meydana gelebilmektedir. Hastalar bilinen kalıtsal kemik iliği yetmezliği sendromlarına sahip bireyler ile karşılaştırıldığında hem hematolojik hem hematolojik olmayan bulguların daha ileri yaşlarda ortaya çıktığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (43). Bu grup hastalarda kemik iliğinde tek serinin etkilenimi ile çeşitli izole sitopeniler görülebilse de en sık karşılaşılan hematolojik bulgu çoklu serinin etkilenimi ile karakterize pansitopenidir (43, 44). Kemik iliği incelemesinde ise en sık rastlanan bulgu hiposellüleritedir. En sık büyüme-gelişme geriliği olmak üzere boy kısalığı, dismorfik bulgular, nörolojik anomaliler hastalarda görülebilen hematolojik olmayan bulgulardandır.

Son yıllarda gelişen yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri ile bu hastalarda genetik etyolojiyi aydınlayabilecek yeni genler tanımlanmıştır. Bu genlerin fonksiyonları ve neden oldukları klinik bulgular aşağıda detaylandırılmış ve Tablo 2.5’te özetlenmiştir.

*SRP72* (OMIM 602122), hücre membranında görevli olan ya da hücre dışına atılacak proteinlerin sentezinin durdurulması ve bu proteinlerin endoplazmik retikuluma iletilmesini sağlayan ribonükleoprotein kompleksi içinde yer alan bir proteini kodlamaktadır. Bu gendeki fonksiyon kaybı ile sonuçlanan germline heterozigot mutasyonlar pansitopeni, myelodisplazi, sağırılık ile karakterize kemik iliği yetmezliği sendromu 1 (OMIM 614675) fenotipinden sorumludur (45).

*ERCC6L2* (OMIM 615667), kromatin yapının yeniden düzenlenmesi ve DNA tamir mekanizmasında görevli bir helikazdır. Bu genin fonksiyon kaybıyla sonuçlanan germline biallelik mutasyonlarında reaktif oksijen radikallerinin hücrede artması ve DNA tamir mekanizmasının bozulmasına bağlı olarak gelişme geriliği, öğrenme güçlüğü, mikrosefali ve kemik iliği yetmezliği bulguları ile karakterize kemik iliği yetmezliği sendromu 2 (OMIM 615715) görülmektedir (46).

*DNAJC21* (OMIM 617048), hem pre-rRNA biyogenezinde hem de 60S ribozomal alt birimin maturasyonunda önemlidir. Bu gendeki fonksiyon kaybıyla sonuçlanan germline biallelik mutasyonlarda ribozom biyogenezindeki bozukluğa bağlı olarak kemik iliği yetmezliğine ek büyüme geriliği, boy kısalığı, mikrosefali, anormal deri pigmentasyonu, iskelet anomalileri, pankreas yetmezliği ve retinal distrofiye bağlı görme problemlerinin eşlik edebildiği kemik iliği yetmezliği sendromu 3 (OMIM 617052) meydana gelmektedir. Bu hastalar kemik iliği yetmezliğinin yanında pankreas yetmezliği ve iskelet bulguları görülmesi nedeni ile klinikte SDS ile karışabilmektedir (47, 48).

*MYSM1* (OMIM 612176), histon 2A’nın ubiquitinlenmesini engelleyen ve epigenetik mekanizma ile transkripsiyonu düzenleyen bir deubiquitinazdır. Bu gendeki germline fonksiyon kaybı ile sonuçlanan biallelik mutasyonlarda kemik iliği yetmezliği kliniğine ek olarak dismorfik bulgular, immün yetmezlik, myelodisplazi, gelişme geriliği, katarakt, iskelet anomalileri ile karakterize kemik iliği yetmezliği sendromu 4 (OMIM 618116) ile karşılaşılmaktadır (49).

*TP53* (OMIM 191170), birçok kanser tipinde mutasyona uğrayan bir tümör baskılayıcı genidir. Germline mutasyonlarında bir kanser yatkınlık sendromu olan Li-Fraumeni sendromuna sebep olduğu bilinmektedir. Heterozigot fonksiyon kazanımı mutasyonları DBA ve DC'yi taklit edebilen steroid tedavisine cevap vermeyen anemi, gelişme geriliği, mikrosefali, retiküler deri döküntüleri, diş anomalileri ve hipogammaglobulinemi ile karakterize bir kemik iliği yetmezliği tablosu olan kemik iliği yetmezliği sendromu 5 (OMIM 618165)'e neden olmaktadır (50).

*MDM4* (OMIM 602704), hücrede *TP53*'ün negatif regülatörü olarak fonksiyon görmektedir. Bu gendeki germline heterozigot mutasyonlarda kemik iliği yetmezliğine eşlik eden telomer boy kısalığı, erken yaşta SCC ve hematolojik kanserler ile karakterize DC benzeri bir klinik durum olan kemik iliği yetmezliği sendromu 6 (OMIM 618849) meydana gelmektedir (51).

*ADH5* (OMIM 103710) ve *ALDH2* (OMIM 100650), alkol metabolizmasında görevli sırasıyla alkol dehidrojenaz ve asetaldehit dehidrojenaz enzimlerini kodlayan genlerdir. Doğu Asya populasyonları için *ALDH2* genindeki c.1510G>A (p.Glu504Lys) değişikliği alkol alımından sonra yüzde, boyunda ve göğüste kızarıklıklarla karakterize alkol intoleransından sorumlu bir polimorfizmdir. Bu polimorfizmin var olduğu durumda eşlik eden *ADH5* genindeki fonksiyon kaybıyla sonuçlanan germline homozigot ya da bileşik heterozigot mutasyonların varlığı sonucunda endojen formaldehit bileşiklerinin DNA hasarı oluşturduğu ve bunun sonucunda digenik kalıtım paterni ile uyumlu olarak aplastik anemi, zihinsel yetersizlik, boy kısalığı ve mikrosefali ile karakterize bir kemik iliği yetmezliği sendromu olan AMED Sendromunun (OMIM 619151) meydana geldiği gösterilmiştir (52).

*SAMD9*, endozom füzyonunda ve büyüme faktörü sinyal iletiminde görevli bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin aşırı ifade olduğu durumlarda hücre proliferasyonu negatif yönde etkilenmektedir. Bu gendeki germline heterozigot fonksiyon kazanımı mutasyonları kemik iliği yetmezliğinin görüldüğü MIRAGE sendromuna sebep olmaktadır (53). *SAMD9* paraloğu olan *SAMD9L* genindeki yine germline heterozigot fonksiyon kazanımı mutasyonlarda ise Ataksi-Pansitopeni sendromu görülmektedir (54). Her iki gende 7. kromozomun uzun kolunda lokalizedir

ve bu genlerdeki fonksiyon kazanımı mutasyonlarında bu kazanımın dengelenmesi için somatik kurtarma mekanizması ile 7. kromozomun monozomisi ya da 7q delesyonu görülebilmektedir. Bu mekanizma ile genlere ait artmış fonksiyon dengelenirken, -7/7q delesyonu olan hücreler nedeni ile MDS yatkınlığı oluşmaktadır (40).

*GATA2*, hematopoez için önemli olan bir çinko parmak (*zinc finger*) transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. *GATA2* heterozigot fonksiyon kaybına yol açan germline mutasyonları ile çeşitli immün bozukluklarla birlikte, lenfödem, pulmoner alveolar proteinozis, konjenital sağırılık ve ilerleyen dönemlerde MDS/AML dönüşümü ile anemi ve trombositopeninin de tabloya eşlik edebileceği bir kemik iliği yetmezliği fenotipi oluşmaktadır. MDS/AML dönüşümü için *GATA2* mutasyonuna eşlik eden somatik değişiklikler meydana gelmektedir. *GATA2* germline mutasyonlarına eşlik eden somatik değişikliklerle MDS/AML yatkınlığı oluşabileceği gibi, germline mutasyon olmaksızın *GATA2*'deki somatik değişikliklerle de AML dönüşümü meydana gelebilmektedir (55).

**Tablo 2.5.** Karakterize Edilemeyen Kemik İliği Yetmezliği Genleri ve Patofizyolojisi

Kalıtım	Patofizyoloji	Gen	İlişkili olduğu fenotip
OD	Protein sentez problemlerine bağlı etkilenim	<i>SRP72</i>	Kemik iliği yetmezliği sendromu 1
OR	DNA tamir mekanizmasındaki problemlere bağlı hücrenin etkilenimi	<i>ERCC6L2</i>	Kemik iliği yetmezliği sendromu 2
OR	Ribozom biyogenez bozukluğuna bağlı hematopoezin bozulması	<i>DNAJC21</i>	Kemik iliği yetmezliği sendromu 3
OR	Epigenetik problemlere bağlı transkripsiyonda meydana gelen aksamlar	<i>MYSM1</i>	Kemik iliği yetmezliği sendromu 4
OD	Apoptozu arttırarak hücre ölümünün artması	<i>TP53</i>	Kemik iliği yetmezliği sendromu 5
OD	<i>TP53</i> negatif regülatörü olması sebebi ile p53'ü arttırıp apoptoz yolağını aktifleştirmesi	<i>MDM4</i>	Kemik iliği yetmezliği sendromu 6
OR Digenik	Alkol dehidrajenaz ve Asetaldehit dehidrajenaz enzim problemlerine bağlı DNA üzerine toksik maddelerin birikmesi	<i>ADH5</i> <i>ALDH2</i>	AMED Sendromu
OD	Endozom füzyonu ve Büyüme faktör sinyal iletim bozukluğu nedeni ile hücre proliferasyonunun bozulması	<i>SAMD9</i> <i>SAMD9L</i>	MIRAGE Sendromu Ataksi-pansitopeni Sendromu
OD Somatik	Transkripsiyon faktörü olması sebebi ile hematopoez regülasyonunun bozulması	<i>GATA2</i>	Emberger Sendromu MDS/AML yatkınlığı



Gelişen teknolojiler ile birlikte birçok yeni kalıtsal kemik iliği yetmezliği genleri tanımlanmış olsa da hala vakaların yaklaşık %50 sinin genetik etyolojisi aydınlatılamamıştır.

Hastalarda kemik iliği yetmezliğine çeşitli klinik bulgular eşlik etse de kemik iliği yetmezliği kanser yatkınlığı oluşturması sebebi ile mortalitenin en önemli sebebidir. Bu nedenle hastaların izlemi, tedavisi, gelişecek komplikasyonlara karşı alınabilecek önlemler, aile üyelerinin taranması ve aile planlaması için genetik etyolojinin belirlenmesi çok kritiktir.

Bu amaçla, kemik iliğinde 2 ya da daha fazla hücre serisinde yetmezliğe sahip olup klinik ve laboratuvar bulguları değerlendirildiğinde bilinen bir kemik iliği yetmezliği grubuna dahil edilemeyen hastaların analiz edilmesi planlanmıştır. Bu grubun altında akraba evliliği olan ya da ailede birden fazla etkilenmiş bireyi bulunan ailelere öncelik verilmiş ve bu kapsama giren 17 indeks birey ve aileleri genetik etyolojinin aydınlatılması ve kemik iliği yetmezliği oluşturan yeni genlerin tanımlanması amacı ile bu tez çalışmasına dahil edilmiştir.

### 3. BİREYLER VE YÖNTEMLER

Çalışma, *Horizon 2020 European Joint Programme on Rare Disease (EJPRD)* projesi çerçevesinde TÜBİTAK tarafından fonlanan “Konjenital Kemik İliği Yetmezliği Sendromlarında Genetik Etyolojinin Araştırılması ve Translasyon Tayini (*RiboEurope*)” (Proje No: 319S062) projesi kapsamında tamamlanmış, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Toplantı tarihi 28.05.2019, Karar No: 2019/14-35, Revizyon tarihi 23.06.2020) (EK 1).

#### 3.1. Klinik Verilerin Toplanması

Karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği ön tanısı ile gönderilen ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde takipli hastaların verileri hastane bilgi yönetim sisteminden, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde takipli olmayan hastaların ise ilgili bölüm doktorlarınca elde ettiğimiz epikrizlerden taranarak elde edilmiştir. Moleküler analizler sonrasında pozitif sonuç saptadığımız hastalar ise daha sonra çağrılmış ve kliniğe gelen hastalar tekrar muayene edilmiştir.

Klinik bilgi olarak, hastaların demografik bilgileri yanında, saptanan moleküler etyolojiye bağlı görülmesi beklenen bulgular (cilt bulguları, büyüme ve gelişme geriliği, anormal biyokimyasal testler ve radyografiler) değerlendirilmiş ve hastaların pedigrî analizleri tamamlanmıştır.

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Gereçler, Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

##### 3.2.1. DNA Eldesi ve Ölçümü

- Qiagen Puregene® Blood Core Kit A
- Su banyosu (Memmer †)
- IKA® HS 260 Control çalkalayıcı
- Nanodrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific)

### 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- PCR Malzemeleri (dH<sub>2</sub>O, Promega 2X Master miks, F ve R primer, DNA, Betain)
- Veriti<sup>®</sup> 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA)
- UVP BioSpectrum 500 Jel Görüntüleme Cihazı
- Pürifikasyon kiti (GeneAll<sup>®</sup> Expin<sup>TM</sup>, PCR SV, 50p)

### 3.2.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizilenmesi

- Big Dye Terminator v3.1 Cycle Seq Kit
- Pürifikasyon kiti (Zymo Research DNA Sequencing Clean-up Kit<sup>TM</sup>)
- ABI Prism 3500 Genetik Analizör

### 3.2.4. Affymetrix CytoScan<sup>TM</sup> Optima Array

- Affymetrix CytoScan<sup>TM</sup> Optima Array Kit (Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 termal cycler
- MagnaRack<sup>TM</sup> - mıknatıslı platform (Invitrogen<sup>TM</sup>)
- GeneChip<sup>TM</sup> Hibridizasyon firmı (Applied Biosystems<sup>TM</sup>)
- GeneChip<sup>TM</sup> Fluidics istasyonu (Applied Biosystems<sup>TM</sup>)
- GeneChip<sup>TM</sup> Scanner 3000 7G (Applied Biosystems<sup>TM</sup>)

### 3.2.5. Genom boyu homozigotluk analizi

- Affymetrix CytoScan<sup>TM</sup> Optima Array Kit (Thermo Fisher Scientific)

### 3.2.6. Yeni Nesil Dizileme

- Illumina Platformu

### 3.2.7. RNA Dizilenmesi

- QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit
- İpsogen<sup>®</sup> RT Kit

### 3.2.8. Tüm Genom Amplifikasyonu

- Qiagen REPLI-g Mini Kit

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Bu tez çalışmasında başlıca Sanger yöntemi ile DNA dizilenmesi, mikrodizin analizi, tüm ekzom dizileme, biyoinformatik analizler, genom boyu SNP genotipleme, RNA dizilenmesi ve genom boyu amplifikasyon yöntemleri kullanılmıştır. Kullanılan yöntemler aşağıda aşamalı olarak ayrıntılandırılmıştır.

#### 3.3.1. DNA Eldesi

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Qiagene Puregene DNA izolasyon kiti kullanılarak periferik venöz kandan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için izlenen talimatlar şu şekildedir: İlk olarak 1,5 ml'lik Ependorf tüpüne 900 µl RBC tampon çözelti, üzerine ise 300 µl periferik kan eklenmiş ve 1 kez pipetaj yapıldıktan sonra oda ısısında 3 dk beklenmiştir. Üç dk'nin sonunda birkaç kez Ependorf tüpü ters-düz edilerek karıştırma yapılmıştır. Ardından 45 s süre ile 16000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından alttaki pellet korunarak üstteki supernatan çekilip, atılmıştır. Dipte bulunan pellet elle çırpılarak-vorteksle kaldırılmış ve üzerine 300 µl *cell lysis* tampon çözelti eklenmiştir. 30-40 s vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 1,5 µl RNAz eklenmiştir. Yaklaşık 15 kez alt-üst yapıp karıştırılmasının ardından 15 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde Ependorf tüpü buz dolu kaba alınmış ve 1-2 dk bekletilmiştir. Ardından oda ısısında ortalama 1-2 dk bekletilmiş ve bu sürenin sonunda 100 µl *protein precipitation* çözeltisi eklenmiştir. Karışım proteinlerin parçalanması için şeffaf bir görünüm alınca kadar yüksek hızda 1 dk vortekslenmiştir. Bir dk 16000 x g'de santrifüj edilmiş ve supernatan uzaklaştırıldıktan sonra pellet, 300 µl izopropanol konulmuş temiz bir Ependorf tüpüne aktarılmıştır. Yaklaşık 50 kez alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 1 dk 16000 x g'de santrifüj edilmiştir. Ardından pellet korunarak supernatan uzaklaştırılmış ve izopropanolün olabildiğince uzaklaştırılması amacı ile Ependorf tüpünün içi peçete ile iyice kurulanmıştır. Yaklaşık 2 dk kadar oda ısısında bekletilmesinin ardından pelletin üzerine 100 µl DNA *hydration* eklenmiş ve 65 °C 5 dk su banyosunda bekletilmiştir. Son basamak olarak 1 gece düşük derecede

çalkalayıcıda bırakılmış ve ertesi gün Ependorf tüpü etiketlenerek DNA izolasyonu tamamlanmıştır. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları *nanodrop* ile ölçülmüş ve 50 ng/µl olacak şekilde ara stok DNA'lar hazırlanmış ve reaksiyonlarda bu şekilde kullanılmıştır.

### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Onyediyedi hasta için yapılan WES analizinde bulunan varyantların validasyon ve aile boyu segregasyonu için kullanılan spesifik primerler *PerlPrimer* ve *Primer Blast* programları kullanılarak tasarlanmıştır. Liyofilize halde üretici firma tarafından sentezlenen primerler distile su ile ana stok primerler 100 mikromolar, ara stok primerler 10 mikromolar olacak şekilde dilüe edilmiştir. PCR için karışımlar 0.2 ml Ependorf tüplerinin içinde Tablo 3.1'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır (Tablo 3.1). Karışımlar hazırlandıktan sonra Ependorf tüpleri önce vortekslenmiş ardından tüpün içindeki karışım santrifüj ile çöktürülmüş ve Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Foster City, CA) cihazı kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ardından PCR ürünleri 50 bp'lik *ladder* ile birlikte %2'lik agaroz jelde 130 voltta 30 dk yürütülmüştür. Elde edilen ürünler GeneAll® Expin™, PCR SV, 50p pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Pürifikasyon sırasında ilk basamak olarak PCR ürünlerine 100 µl *binding* tampon çözelti eklenmiş ve karışım pipetaj yapılarak pürifikasyon için üretilen membrana sahip minikolonlara aktarılmıştır. Kolonlar 1600 x g'de 1 dk santrifüj edilmiş ve böylece PCR ürünlerinin membrana tutunması sağlanmıştır. Ardından 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 1600 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde membran taşıyan minikolonlar 1.5 ml'lik temiz ependorflara alınmıştır ve 30 µl *elution* tampon çözelti eklenerek oda ısısında 1 dk beklenmesinin ardından 1600 x g'de 1dk santrifüj edilmiş ve saflaştırılmış PCR ürünleri elde edilmiştir.

**Tablo 3.1.** PCR Karışımı ve Reaksiyon Koşulları

<i>PCR Karışım İçeriği</i>		<i>PCR Reaksiyon Koşulları</i>	
Promega 2X Master Mix	10 µl	Denatürasyon	95 °C – 5 dk
Forward Primer	1 µl		95 °C – 30 s
Reverse Primer	1 µl	Primere özgü bağlanma sıcaklığı ( <i>Annealing</i> )	50-65 °C – 30 s
DNA	1 µl	Uzama ( <i>Extension</i> )	72 °C – 30 s
dH <sub>2</sub> O	7 µl	Son uzama dönemi	72 °C – 7 dk
Total Volüm	20 µl		4 °C - ∞

Not: PCR karışımına betain (2 µl) eklendiği durumlarda dH<sub>2</sub>O 5 µl olarak eklenmiştir.

### 3.3.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizilenmesi

Pürifiye edilen PCR ürünleri ABI (Applied Biosystems) Big Dye Terminator 3.1 Kiti ve uygun primer (F veya R) ile Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Foster City, CA) cihazı kullanılarak DNA dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı ve koşulları Tablo 3.2’de özetlenmiştir (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** Sekans Reaksiyonu Karışımı ve Sekans Reaksiyonu PCR Koşulları

<i>Sekans Reaksiyon Karışımı İçeriği</i>		<i>Sekans Reaksiyon PCR Koşulları</i>	
5X Sekans Tampon Çözeltisi	2 µl	Denatürasyon	96 °C – 1 dk
F/R Primer	1 µl		96 °C – 10 s
Big Day Terminatör Karışımı	1 µl	Bağlanma ( <i>Annealing</i> )	50 °C – 5 s
Saflaştırılmış PCR Ürünü	1 µl	Uzama ( <i>Extension</i> )	60 °C – 4 dk
dH <sub>2</sub> O	5 µl		4 °C - ∞
Total Volüm	10 µl		

PCR reaksiyonunun ardından ürünler Zymo Research ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ kullanılarak saflaştırılmıştır. Pürifikasyon basamakları PCR pürifikasyon basamaklarına benzer olup, protokole uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından kapiller elektroforez cihazı (ABI 3500 Genetic

Analyzer) ile dizileme yapılmıştır. Dizi analiz sonuçları FinchTV programı kullanılarak değerlendirilmiş, tez kapsamında varyant pozisyonları GRCh37/hg19 referans genomuna göre sunulmuştur. Saptanan varyantların patojenitesi *in-silico* olarak Varsome ve PolyPhen-2 programları ile değerlendirilmiştir. Bu programlardan Varsome birçok *in-silico* tahmin programının ön görülerini hesaplayıp kaçının patojen kaçının *benign* olduğu sonucunu sayısal olarak verirken, PolyPhen-2 programı bölgedeki değişen aminoasidin protein yapı ve fonksiyonu üzerine olan etkisini tahmin ederek varyantı “*benign, possibly damaging* ya da *probably damaging*” olarak sınıflamaktadır. Varsome programı varyantın patojenitesini değerlendirirken DANN, Mutation Taster, Mutation assessor, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, DEOGEN2, EIGEN, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, PROVEAN, MVP, MutPred, REVEL, PrimateAI, MetaSVM ve MetaLR gibi *in-silico* programların tahminlerini kullanmaktadır.

### 3.3.4. Affymetrix CytoScan Optima Array Analizi

Genom boyu kopya sayısı değişikliklerini (CNV) belirlemek için 18.018 adet kopya sayısı ve 148.450 adet SNP probu içeren Affymetrix CytoScan Optima Array Kiti üretici firmanın protokolleri doğrultusunda kullanılmıştır. Uygulanan aşamalar aşağıda detaylandırılmıştır.

#### DNA Hazırlanması ve Kesimi

Konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde hazırlanmış olan DNA örneğinden 5µl alınarak buz üzerinde temiz bir ependorfa aktarılmıştır. Bir örnek için; 11,55 µl nükleazlardan arındırılmış su, 2 µl Nsp I tampon çözelti, 0,2 µl 100X BSA ve 1 µl Nsp I içeren kesim solüsyonları karışımı toplamda 14,75 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. GeneAmp® PCR System 9700 termal cycler cihazında 37 °C’de 2 saat, 65 °C’de 20 dk, 4 °C’de 5 dk kaldıktan sonra kesim tamamlanmıştır.

#### Ligasyon

Kesim işleminden sonra ligasyona başlanmış ve 2,5 µl DNA ligaz tampon çözelti, 0,75 µl adaptör Nsp I adaptör ve 2 µl DNA ligaz olacak şekilde 5,25 µl hacimdeki hazırlanan ligasyon karışımı kesilmiş DNA örneğinin üzerine eklenmiştir.

PCR cihazında 16 °C'de 3 saat, 70 °C'de 20 dk, 4 °C'de 5 dk kaldıktan sonra ligasyon tamamlanmıştır.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Kesilmiş ve ligasyonu tamamlanmış DNA örnekleri nükleazdan arındırılmış su ile %25 oranında (25 µl ligasyonu yapılmış DNA ve 75 µl nükleazdan arındırılmış su) seyreltilmiştir. 10 µl ligasyon ürününün üzerine 50,3 µl nükleazdan arındırılmış su, 10 µl CytoScan Taq tampon çözelti, 20 µl 5M Betain, 3,5 µl dNTP, 4,2 µl PCR primer ve 2 µl CytoScan Taq DNA polimerazdan oluşan PCR karışımı eklenerek toplam volüm 100 µl'ye tamamlanmış ve her DNA örneği için bu şekilde 2 örnek hazırlanmıştır.

GeneAmp® PCR System 9700 termal cycler cihazında 95 °C'de 1 dk denatürasyon, sonrasında 30 döngü 95 °C'de 30 s, 60 °C'de 45 s ve 68 °C'de 60 s ve son olarak 68 °C'de 7 dk uzama ve 4 °C'de 5 dk bekleme (gece boyu bekleyebilir) basamaklarından oluşan PCR reaksiyonu başlatılmıştır. PCR reaksiyonunun ardından elde edilen üründen 3 µl'lik kısım 17 µl dilue yükleme tampon çözelti ile %2'lik agaroz jelde 120 V'de bir saat boyunca yürütülmüştür. Ürünlerin jelde yaklaşık 150-2200 baz çiftleri arasında olması deneyin sorunsuz ilerlediğini göstermektedir.

### **PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Ölçülmesi**

Temiz bir 2 ml'lik ependorfda aynı örnek için hazırlanan 2 farklı PCR reaksiyon ürünleri total volüm 197 µl olacak şekilde birleştirilmiştir. Üzerine 360 µl *Purification Beads* eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra 1600 x g'de 3 dk santrifüj yapılmıştır. Ardından ependorf mıknatıs platforma (Magnarack) alınarak peletin manyetik alan aracılığı ependorfun bir taraftaki yan duvarına çökmesi beklenmiş ve üzerindeki supernatant kısım pelete dokunmadan uzaklaştırılmıştır. Ardından peletin üzerine 800 µl *Purification Yıkama Tampon Çözeltisi* eklenerek 2 dk vortekslenmiş ve sonrasında 1600 x g'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Bu basamaktan sonra ependorf tekrar mıknatıs platforma alınmıştır. Tekrar manyetik alan kullanılarak pelletin bir yan duvara birikmesi sağlanmış ve üstte kalan supernatant kısım pelete zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Pelet 1600 x g'de 30 s yeniden santrifüj yapılmış ve bu santrifüj sonrası hala üstte görünen supernatant kısım varsa 20 µl'lik pipet ucu ile pelete değmeden uzaklaştırılmıştır. Ardından ependorf yeniden mıknatıs platforma alınmış



ve kalan supernatan kısmın uçması amacı ile kapağı açık bir şekilde 7 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu basamaktan sonra peletin üzerine 27 µl *Elution* tampon çözelti eklenerek *bead*'lerin homojen hale gelmesi için 10 dk vortekslenip, 1600 x g'de üç dk santrifüj yapılmıştır. Yeniden mıknatıs platforma alınan Ependorf tüpünde *bead*'lerin manyetik alan aracılığı ile Ependorf tüpünün bir yan duvarında birikmesi sağlanmıştır. Ardından elute edilen örnekten 25 µl yeni bir 96'lık plate'e aktarılmıştır. Kalan 2 µl örnek ile spektrofotometre aracılığıyla kantitasyon yapılmış ve DNA veriminin yeterliliği hakkında karar verilmiştir.

### **Fragmantasyon**

Ölçülen PCR ürünleri 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. 215 µl nükleazdan arındırılmış su, 275 µl fragmantasyon tampon çözelti ve 10 µl fragmantasyon reaktifi ile fragmantasyon master miksi hazırlanmıştır. Ardından 23 µl'lik örneğe 5 µl fragmantasyon master miksi eklenmiştir. PCR cihazında 37 °C'de 35 dk, 95 °C'de 15 dk, 4 °C'de 5 dk boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Fragmantasyon jel üzerinde elde edilen ürünlerin yürütülmesi ile kontrol edilmiştir. Ürünlerin 25-125 bp arasında bantlar birbirinden ayrılmayacak şekilde bir yığılım (*smear*) göstermesi beklenir.

### **İşaretleme (*Labelling*)**

Yedi µl TdT tampon çözelti, 1 µl DNA işaretleme reaktifi, 1,8 µl TdT enzimi ile toplam volüm 9,8 µl olacak şekilde işaretleme master miksi hazırlanmıştır. Ardından toplam volüm 35,8 µl olacak şekilde 26 µl fragmente DNA ürünü ile 9,8 µl işaretleme master miksi birleştirilmiştir. PCR cihazında 37 °C'de 4 saat, 95 °C'de 15 dk, 4 °C'de beş dk boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

### **Hibridizasyon**

Hibridizasyona başlamadan 1 saat önce hibridizasyon fırını 50 °C olacak şekilde açılmış ve dönüş hızı 60 rpm'e ayarlanmıştır. Ardından Command Console'dan AGCC (Affymetrix® GeneChip® Command Console®) portalına bağlanılmıştır. Örnekler sekmesinden "Batch Registration" seçilmiş ve örnek adları sisteme girilmiştir. Ardından array çipi (array) temiz bir zemine yükleme yüzü yukarıda olacak şekilde koyulmuştur. Çipin sağ üst bölgesindeki deliğe 200 µl'lik

pipet ucu takılmış ve bir çip için 2 adet yapıştırma kağıdı hazırlanmıştır. 82,5 µl Hyb tampon çözelti part 1, 7,5 µl Hyb tampon çözelti part 2, 3,5 µl Hyb tampon çözelti part 3, 0,5 µl Hyb tampon çözelti part 4 ve 1 µl oligo kontrol reaktifi (ayıraç) ile hibridizasyon master miksi hazırlanmış ve örnek üzerine eklenmiştir. İyice karışana kadar vortekslelendikten sonra önceden ısıtılmış PCR cihazında 95 °C’de 10 dk, 49 °C’de 3 dk olmak üzere “CytoScan Optima Hyb” programında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Ardından 100 µl ürün alınarak çipe sol alttaki delikten yüklenmiş ve yüklemenin ardından delikler yapışkan kağıtlar ile kapatılmıştır. Sonrasında çipler hibridizasyon fırınında 50 °C’de 60 rpm hızında 16-18 saat bırakılmıştır.

### **Yıkama, Boyama, Tarama**

Yıkama için öncelikle Fluidics istasyonu açılmış ve Affymetrix Command Console uygulamasından “Affymetrix Launcher” başlatılmıştır. Affymetrix Launcher’den “AGCC Fluidics Control” uygulaması açılmıştır. “AGCC Fluidics Control” panelinden “PRIME\_450” komut dosyasından spesifik *fluidics* istasyonu ve modülü seçilmiştir. Yıkama A ve B tampon çözeltileri uygun rezervuarlara yerleştirilmiştir. *Fluidics* komutunu başlatmak için “Run” komutu seçilmiştir. 500 µl boyama tampon çözelti 1 pozisyon 1’e, 500 µl boyama tampon çözelti 2 pozisyon 2’ye ve 800 µl array holding tampon çözelti pozisyon 3’e yerleştirilmiştir. Sonrasında hibridizasyon fırınından çipler çıkarılıp hemen *Fluidics* istasyonuna alınmıştır. Yıkama ve boyama işlemi tamamlandıktan sonra çipler hava kabarcığı açısından kontrol edilmiş ve hava kabarcığı yoksa tarama işlemi için “Scanner” a alınmıştır. Çipler AGCC yazılımı tarafından kontrol edilen “GeneChip Scanner 3000 7G” tarayıcısına yerleştirilmiştir. Sonuçlar “.dat” formatında otomatik olarak dosyalanmıştır. .dat formatındaki dosyalar AGCC Viewer ile “.CEL” formatına çevrilmiştir. Tarama bittikten sonra “Analysis Workflow” programı kullanılarak ham veri olan “.CEL” uzantılı dosyadan “.CYCHP” dosyası oluşturulmuştur.

### **Sonuçların Değerlendirilmesi**

Affymetrix CytoScan Optima array oligonükleotid çipleri kullanılarak her bir birey için yukarıdaki basamaklar uygulanmış ve “.CYCHP” formatındaki dosyalar Chromosome Analysis Suite 4.2 (ChAS 4.2) yazılımıyla analiz edilmiştir. Elde edilen

veriler GRCh38/hg38 referans genomuna göre hizalanmıştır. Kalite skorları olarak  $MAPD \leq 0,29$  ve  $SNPQC \geq 8,5$  değerleri referans alınmıştır ve filtreleme sınırı 1 kbp ve 1 marker olarak seçilmiştir. Analiz UCSC Genome Browser kullanılarak yapılmış, patojenite değerlendirmesi Clinvar, DECIPHER, DGV ve kurumsal veri tabanımız kullanılarak yapılmıştır.

### 3.3.5. Genom boyu homozigotluk analizi

Genom boyu homozigotluk analizi için Affymetrix CytoScan Optima array oligonükleotid çipleri ile genom boyu tek nükleotid polimorfizmleri değerlendirilmiştir. SNP problemlerinden elde edilen genotip verisi ChAS 4.2 yazılımı kullanılarak .CYCHP formatındaki dosyalardan alınmış ve *MS excel* formatına dönüştürülerek incelenmiştir. Ardından her bir SNP için homozigot olanlar mavi, heterozigot olanlar sarı, genotip verisi elde edilemeyenler (*no call*) gri, indeksten farklı homozigot genotip verisine sahip olanlar beyaz, genotipleme hatası olarak düşünülenler ise kırmızı olarak işaretlenmiştir. Genom boyu SNP'ler gözle taranmış ve  $\geq 4$  Mbp olan homozigot bölgeler "homozigot blok" olarak değerlendirilmiştir.

### 3.3.6. Yeni Nesil Dizileme

Onaltı hasta için yapılan WES çalışmaları hizmet alımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar için 2 farklı şirket ve dizileme protokolü kullanılmış, hastalar grup 1 ve 2 olarak belirtilmiştir.

Grup 1 hastalar için *Berry Genomics* (Pekin, Çin) firmasından hizmet alımı yapılmış, DNA kütüphanesi için *xGen® All Exome Kit* (ABD) kullanılmıştır.

Grup 2 hastalar için *Yearth Biotechnology* (Changsha, Hunan, Çin) firmasından hizmet alımı yapılmış, DNA kütüphanesi için *TargetCap® Core Exome Panel v3.0* (Çin) kitleri kullanılmıştır.

Her iki yöntemde de elde edilen kütüphaneler Illumina NovaSeq6000 cihazında 150 bp uzunluğundaki çiftler halinde dizilenmiştir.

Bir hasta ise grup 3 olarak sınıflandırılmış ve bu hastanın WES çalışması TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, İleri Genom ve Biyoenformatik Araştırmaları Merkezi'nde (IGBAM) (Kocaeli, Türkiye) tamamlanmıştır. Bu WES

işleminde DNA kütüphanesi Illumina *TruSeq Exome Enrichment Kit* kullanılarak hazırlanmış, kütüphane Illumina HiSeq2000 cihazında 100 bp uzunluğundaki çiftler halinde dizilenmiştir.

Biyoinformatik analiz işlemlerinde, grup 1 hastaların WES verileri için *Berry Genomics* tarafından yapılan hizalama, varyant çağırma ve anotasyon iş akışı kullanılmıştır. Grup 2 ve grup 3 hastalar için ise *bwa mem* algoritması kullanılarak çift uçlu dizilenmiş okumaların hizalanması tarafımızdan gerçekleştirilmiş, GATK (*Genome Analysis ToolKit*) *HaplotypeCaller* ile varyant çağırılması tamamlanmıştır. Son olarak, *AnnoVar* kullanılarak anotasyon işlemleri tamamlanmıştır.

Her 3 grup için de hg19 referans genomu olarak kullanılmış, tüm işlemler hg19'a göre yapılmıştır. Anote edilen varyant tablolarından filtreleme ve varyant önceliklendirmesi işlemleri ise *MS excel* tabloları üzerinden filtreleme işlemleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalar Tablo 3.3'te özetlenmiştir (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3.** Farklı yöntemlerle WES analizi gerçekleştirilen hasta grupları

<i>Grup 1</i>	<i>Grup 2</i>	<i>Grup 3</i>
TRBMFS-0098_03	TRBMFS-0133_03	TRBMFS-0042_03
TRBMFS-0108_03	TRBMFS-0210_03	
TRBMFS-0134_03	TRBMFS-0242_03	
TRBMFS-0137_03	TRBMFS-0256_03	
TRBMFS-0152_03	TRBMFS-0265_04	
TRBMFS-0232_03	TRBMFS-0266_03	
TRBMFS-0238_03	TRBMFS-0077_03	
TRBMFS-0248_03		
TRBMFS-0252_03		

### **i. Homozigot Varyantlara Ait Filtreleme Basamakları**

Homozigot varyantlara yönelik filtreleme toplam 8 basamakta yapılarak sırası ile aşağıdaki basamaklardaki varyantlar dikkate alınmış, en son basamakta hala filtrelenmemiş olan varyantlar hastalığı açıklamaya aday olarak değerlendirilmiştir:

- 1) Okuma sayısı  $\geq 5$  olan varyantlar
- 2) Homozigot varyantlar
- 3) ExAC, gnomAD tüm ekzom ve gnomAD tüm genom veri tabanlarına göre minor allel frekans (MAF) değeri  $< 0.01$  olan varyantlar
- 4) gnomAD veri tabanında homozigot olarak görülmeyen varyantlar
- 5) Protein kodlayan veya *splice* bölgelerinde yer alan varyantlar
- 6) Aminoasit dizisini değiştiren (*non-synonymous*) veya *splice* bölgelerinde yer alan varyantlar
- 7) dbSNP154 veri tabanında MAF değeri  $< 0.01$  olan veya kurumsal veri tabanında daha önce homozigot olarak görülmeyen varyantlar
- 8) IGV'de gözle incelemede gerçek olduğu değerlendirilen varyantlar (kısa ardışık tekrar bölgelerinde tekrar dizisinin artış ve azalışlarını içeren varyantlar, okumaların genom içerisinde haritalanmalarındaki hatalar ve analizler sonucunda belirlenen genotip ile IGV'deki genotipin uyumsuz olduğu varyantlar elenmiştir) (EK 2)

Bu filtreleme basamaklarına ek olarak çok sayıda varyant bilgisine sahip Grup 2 ve 3 içinde yer alan hastalarda analiz başlangıcında intergenik varyantlar elenmiştir. Yine bu gruptaki hastalarda dördüncü ve beşinci basamaklar yer değiştirilerek analizlere devam edilmiştir.

TRBMFS-0098\_03 numaralı hastada ise kendisinde ve ailesinde yarık damak/dudak bulgusu olması üzerine genetik etyolojiyi açıklayabilecek *Prevention Genetics*'in *Cleft Lip/Cleft Palate* panelinden alınan 163 geni içeren (EK 3) panel filtresi ile de analiz yapılmıştır.

## ii. Heterozigot Varyantlara Ait Filtreleme Basamakları

Heterozigot varyantlara yönelik filtreleme toplam 9 basamakta yapılarak sırası ile aşağıdaki basamaklardaki varyantlar dikkate alınmış, en son basamakta hala filtrelenmemiş olan varyantlar hastalığı açıklamaya aday olarak değerlendirilmiştir:

- 1) Okuma sayısı  $\geq 5$  olan varyantlar
- 2) Heterozigot varyantlar
- 3) ExAC, gnomAD tüm ekzom ve gnomAD tüm genom veri tabanlarına göre MAF değeri  $< 0.005$  olan varyantlar (56)

- 4) Protein kodlayan veya *splice* bölgelerinde yer alan varyantlar
- 5) Aminoasit dizisini değiştiren (*non-synonymous*) veya *splice* bölgelerinde yer alan varyantlar
- 6) Kemik iliği yetmezliği fenotipi oluşturan genlerde (EK 4) yer alan varyantlar veya *splice* bölgesi/*nonsense*/delesyon/duplikasyon varyantları
- 7) gnomAD veri tabanında homozigot veya heterozigot olarak görülmeyen varyantlar
- 8) IGV’de gözle incelemede gerçek olduğu değerlendirilen varyantlar
- 9) dbSNP154 veri tabanında MAF değeri <0.005 olan veya kurumsal veri tabanında daha önce homozigot/heterozigot olarak görülmeyen varyantlar

Ayrıca beşinci basamağın sonunda elde edilen varyantlar bileşik heterozigotluk açısından göz ile değerlendirilmiştir.

### 3.3.7. RNA Dizilemesi

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA izolasyonu aşağıda ayrıntılandırıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için QIAamp® RNA Blood Mini Kit üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Hücre parçalanmasından sonra açığa çıkan RNaz’ların inhibe edilmesi için 1 ml RLT tampon çözeltisine 10 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol eklenmiştir.

Eritrositleri parçalamak amacı ile 15 ml’lik falkon tüpün içinde 1 ml periferik kan üzerine 5 ml EL tampon çözeltisi eklenmiştir. Çözelti, transparan görünüm elde edilene kadar 10-15 dk buz içinde inkübe edilmiş ve bu sürede birkaç kez vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 4 °C’de 400 x g’de 10 dk santrifüj edilen çözeltide üstte kalan supernatan uzaklaştırılmış bu işlem dipte kalan pellet üzerine 2 ml EL tampon çözeltisi eklenerek pellet içerisindeki kırmızı renk ortadan kalkana kadar 3-4 kez tekrarlanmıştır. Pellet üzerine RLT tampon çözeltisinden 600 µl eklenmiş ve pellet tamamen çözünene kadar vortekslenip, pipetaj yapılmış ve karışımın tamamı QIAshredder *spin* kolona (mor renkli) aktarılarak maksimum hızda 2 dk santrifüj edilip *spin* kolon uzaklaştırılmıştır. Homojenize olmuş lizatın üzerine 600 µl

%70 etanol eklenerek pipetaj ile karıştırılmıştır. Bu aşamada lizatın içinde presipitasyon meydana gelmesi normaldir. Oluşan lizatın tamamı kolon çevresine bulaştırmadan ve maksimum 700 µl hacimlerde olacak şekilde beyaz renkli QIAamp *spin* kolona aktarılarak 8500 x g'de 30 s santrifüj edilmiştir. Bu işlem, kolondan geçen sıvı atılarak lizat bitene kadar tekrar edilmiştir. İçerisinde RNA molekülleri tutunmuş olarak bulunan QIAamp *spin* kolon ayrı bir toplama tüpüne yerleştirilmiş sırasıyla 700 µl RW1 tampon çözeltisi eklenerek 8500 x g'de 30 s, 500 µl RPE tampon çözelti eklenerek 8500 x g'de 30 s ve tekrar 500 µl RPE tampon çözelti eklenerek 16000 x g'de 4 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Her yıkama işlemi sonrasında toplama tüpü boşaltılmıştır. RNA'nın eldesinden önce etanolü uzaklaştırmak amacı ile *spin* kolon yeni bir toplama tüpü içerisinde ve üzerine birşey eklenmeden 16000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Son aşamada *spin* kolon 1.5 ml'lik Ependorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 µl RNaz'lerden arındırılmış su eklenerek 8500 x g'de 1 dk santrifüj edilerek RNA eldesi tamamlanmıştır.

### **Reverse Transcription (RT) PCR Reaksiyonu**

RT PCR reaksiyonu için İpsogen® RT Kit (33), V1 kullanılmıştır. Tablo 3.4'te gösterilen oranlarda master miksin buz üzerinde hazırlanmasının ardından PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4). Reaksiyona eklenecek olan RNA'nın çift zincir oluşturmuş olma ihtimaline karşı ana stoktan 100 ng/µl olacak kadar Ependorf tüpüne aktarılan RNA çözeltisi 65 °C'de 5 dk inkübe edilerek hızla buz üzerinde şoklanmıştır. Şoklanmış olan bu çözelti yine buz üzerinde master miks ile karıştırılarak vorteks yapılmaksızın kısa süreli santrifüj ile çöktürülmüş ve Tablo 3.4'te belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu başlatılmıştır (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** RT PCR reaksiyonu için hazırlanan miks içeriği ve reaksiyon koşulları

<b>RT PCR Karışım İçeriği</b>		<b>RT PCR Reaksiyon Koşulları</b>	
5X RT tampon çözelti	5 µl	Reverse transkripsiyon 1	25 °C – 10 dk
dNTP (10 Mm each)	2 µl	Reverse transkripsiyon 2	50 °C – 60 s
Random nonamer (100 µM)	5,25 µl	İnaktivasyon	85 °C – 5 dk
RNAaz inhibitör	0,5 µl	Soğutma	4 °C – 5 dk
DTT	1,25 µl		
RNA (en son eklenir)	10 µl		4 °C - ∞
Total volüm	25 µl		

### 3.3.8. Tüm Genom Amplifikasyonu

Çalışmada 2 hasta örneğinde (TRBMFS-0042\_03/TRBMFS-0134\_03) DNA miktarının devam çalışmaları için yeterli olmaması nedeni ile az miktarda olan DNA'dan Qiagen REPLI-g Mini Kit kullanılarak tüm genom amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bunun için öncelikle 2,5 µl TE tampon çözeltisinde 10 ng DNA olacak şekilde DNA solüsyonu elde edilmiştir. Reaksiyonda kullanılacak olan tampon çözeltiler [D1 (*denaturation buffer*) ve N1 (*neutralization buffer*)] üretici firmanın önerileri doğrultusunda nükleazlardan arındırılmış su kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla kit içerisinde bulunan DLB ve *stop* çözeltileri kullanılmıştır.

Genom amplifikasyonu için 0.2 ml'lik Ependorf tüplerine akartılan DNA'nın üzerine 2,5 µl D1 tampon çözeltisi eklenmiş, vorteksle karıştırılarak santrifüjde çöktürülmüştür. Üç dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 5 µl N1 tampon çözeltisi eklenerek vorteksle karıştırma ve santrifüjle çöktürme aşamaları tekrarlanmış, oda ısısında beklemeye bırakılmıştır.

PCR amplifikasyonu için kit içinde mevcut olan REPLI-g Mini DNA polimeraz, REPLI-g Mini Reaksiyon tampon çözeltisi ve nükleazlardan arındırılmış su oda ısısındaki DNA ile toplamda 50 µl'lik hacim elde edilecek şekilde karıştırılmış, polimeraz eklenmesi aşaması buz üzerinde tamamlanmıştır. 16 saat 30 °C'de inkübasyondan sonra DNA polimerazın inaktivasyonu için 3 dk 65 °C'de ve kapak sıcaklığı maksimum 70 °C olacak şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu basamaktan sonra elde edilen amplifiye olmuş genomik DNA'dan 38 µl TE tampon çözelti içine 2 µl alınarak ara stok DNA çözeltileri elde edilmiştir. Genomik amplifikasyon uygulanmış olan bu ara stoklar çalışmada WES analizlerinde gözlenen varyantların validasyonu için Sanger dizileme aşamasında kullanılmıştır. Sanger dizileme için gerekli olan PCR reaksiyonu için ara stoklardan 3 µl eklenmesi yeterli olmaktadır.



## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına Karakterize Edilemeyen Kemik İliği Yetmezlikleri ön tanısı ile gönderilen 17 aile incelenmiştir. Çalışma grubu Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Ünitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Şule ÜNAL tarafından değerlendirilerek, anabilim dalımıza genetik nedenin bulunması açısından yönlendirilen hastalardan oluşmaktadır.

### 4.1. Klinik Bulgular

Tez kapsamında değerlendirilen 17 indeks vakanın 10'unun kız, 7'sinin erkek olduğu, 4 bireyde bulgular konjenital olarak başlarken diğer bireylerde semptomların ortalama 1 yaş 9 ay (n=13)'da başladığı saptanmıştır. Hastaların 13 (%76.4) tanesinde ebeveynler arasında akrabalık bulunduğu, 1 ailede de ebeveynlerin aynı köyden olduğu gözlenmiştir.

Aile öyküleri incelendiğinde 4 ailede indeks vaka haricinde diğer bazı aile bireylerinde de kemik iliği yetmezliği görüldüğü, 1 ailede ise indeks vakada da var olan yarı damak/dudak bulgusunun aile bireylerinde de bulunduğu saptanmıştır

Hastalarda en sık saptanan hematolojik bulgunun %58,8 (n=10) oranı ile pansitopeni olduğu, pansitopeni bulgusunu %17,6 (n=3) oranı ile nötropeninin takip ettiği görülmüştür. Hastaların 10'unda DEB testi negatif olup, 16 hastanın ihtiyaç duydukça kan ürünleri için replasman tedavileri almakta olduğu saptanmıştır.

Ondört hastada kemik iliği yetmezliği dışında multisistemik tutulumun var olduğu, bu bulguların oldukça çeşitlilik gösterdiği (gelişme geriliği, büyüme geriliği, zihinsel yetersizlik, hepatosplenomegali, ataksi ve hipotoni) gözlenmiştir. Kemik iliği yetmezliği dışında en sık gözlenen bulgu gelişme geriliğidir (%29,4, n=5). Bunu %17,6 (n=3) oranı ile hepatosplenomegali izlemektedir. Çalışılan 17 vakanın klinik ve laboratuvar bulgularının ayrıntılı incelemelerine bölüm 4.2'de yer verilmiştir.

## 4.2. Laboratuvar Bulguları

### 4.2.1. Genom boyu mikrodizin analizi ve kopya sayısı değişiklikleri

Mikrodizin analizi tamamlanan 17 indeks vakanın 11'inde farklı boyutlarda delesyon ve duplikasyonlar saptanmış olmakla birlikte bunlardan sadece 1 tanesinde (TRBMFS-0042\_03) saptanan değişikliğin *de-novo* olarak ortaya çıktığı görülmüştür (Tablo 4.1). Buna ek olarak klinik önemi belirlenemeyen kopya sayısı değişikliği 3 hastada (TRBMFS-0238\_03/TRBMFS-0134\_03/TRBMFS-0265\_04) daha saptanmış ancak ebeveynlerde de aynı değişiklik belirlendiği için bu değişiklikler elenmiştir.

**Tablo 4.1.** Hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleri. Delesyonlar kırmızı renk, duplikasyonlar mavi renk ile gösterilmiştir. Klinik önemi bilinmeyen ve *de novo* olarak ortaya çıkan CNV değişikliğine sahip birey koyu renk ile işaretlenmiş ve ilgili değişiklik bilgilerini içeren satır açık gri zemin ile gösterilmiştir.

	Chr	Bant	Boyut (kbp)	OMIM genleri	DGV	Decipher/ Clinvar	Kurumsal veri tabanı	Aile çalışması
TRBMFS-0042_03	chr2:186,214,523-186,523,507	q32.1	309	ZC3H15	1 tane parsiyel	Biraz daha küçük etkisi bilinmeyen (unknown) CNV denilmiş	-	Ebeveynlerde saptanmadı
	chr14:21,981,849-22,468,664	q11.2	487	OMIM geni yok	1 tane DGV+	1 tane benign	7 tane bölgeden daha büyük, 3 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	Ebeveynlerde saptanmadı
TRBMFS-0232_03	chr12:33,712,261-34,606,648	p11.1	894	ALG10	5 tane DGV+	Daha büyük bildirilen 1 VUS 1 tane likely benign birey mevcut	<i>In-house yok</i>	-
TRBMFS-0152_03	chrX:155,717,273-155,733,777	q28	16	SPRY3	Bölgeden daha büyük çoklu DGV+	Unknown CNV	35 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-
	chrY:23,698,626-25,593,016	q11.2	1894	TTY3B, TTY3, CDY1B, CDY1	DGV yok	Unknown CNV	3 tane bölgeden daha büyük, 1 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-
TRBMFS-0238_03	chr4:184,468,921-185,139,106	q35.1	670	IRF2, CASP3, PRIMPOL, CENPU, ACSL1, HELT	DGV yok	1 tane yakın kapsayan dup var etkisi bilinmeyen (unknown) denilmiş	-	Anneden kalıtıldığı saptandı
	chr8:4,108,402-4,301,206	p23.2	193	CSMD1	Bölgeden daha küçük 1 tane DGV+	3 tane daha büyük del olan hasta var Etkisi bilinmeyen (unknown) denilmiş	-	Anneden kalıtıldığı saptandı
	chr14:21,981,849-22,468,664	q11.2	487	OMIM geni yok	4 tane DGV+	Bölgeden daha büyük 2 tane benign	7 tane bölgeden daha büyük, 3 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	

**Tablo 4.1. (Devamı) Hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleri.**

TRBMFS-0108_03	chr14:22,107,301-22,509,533	q11.2	402	OMIM geni yok	3 tane DGV+	Bölgeden daha büyük 1 tane benign	7 tane bölgeden daha büyük, 3 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-
	chrX:155,691,858-155,691,858	q28	0.001	<i>SPRY3</i>	Bölgeden daha büyük çoklu DGV+	Unknown CNV	<i>In-house</i> +	-
TRBMFS-0248_03	chr14:22,045,252-22,484,618	q11.2	439	OMIM geni yok	3 tane DGV+	Bölgeden daha büyük 1 tane benign	7 tane bölgeden daha büyük, 3 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-
	Xq28 or Yq12(155717274_155733777 or 56903794_56920297)	q28	16	<i>SPRY3</i>	Bölgeden daha büyük çoklu DGV+	3 tane daha büyük del olan hasta var Etkisi bilinmeyen (unknown) denilmiş	35 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-
TRBMFS-0256_03	chrX:155,666,435-155,691,858	q28	25	<i>SPRY3</i>	Bölgeden daha büyük çoklu DGV+	Unknown CNV	45 tane tam bölgeyi kaplayan CNV	-
TRBMFS-0134_03	chr4:104,042,452-104,240,630	q24	198	OMIM geni yok	2 tane DGV+	Unknown CNV	-	Babadan kalıtıldığı saptandı
	chr14:21,924,323-22,535,762	q11.2	611	OMIM geni yok	3 tane DGV+	Bölgeden daha büyük 1 bireyde benign	7 tane bölgeden daha büyük, 3 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-
	chr16:76,645,961-78,133,761	q23.1	1,488	<i>MON1B, ADAMTS18, NUDT7, CLEC3A, WWOX</i>	DGV yok	Unknown CNV	-	Babadan kalıtıldığı saptandı
TRBMFS-0210_03	chr10:46400326-46780831	q11.22	380	<i>NPY4R, GPRIN2, SYT15</i>	2 tane DGV+	Bölgeden daha büyük 6 bireyde benign	5 tane bölgeden daha büyük, 1 tane bölgeye yakın CNV	-
	chrX:141259312-141553745	q27.2	294	OMIM geni yok	2 tane DGV+	Bölgeden daha büyük 1 bireyde likely benign	1 tane bölgeden daha büyük, 1 tane tam bölgeyi kapsayan CNV	-

**Tablo 4.1. (Devamı)** Hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleri.

TRBMFS-0265_04	chr12:67992232-68435452	q15	443	<i>IFNG, IL26, IL22, MDM1</i>	DGV yok	Unknown CNV	-	Anneden kalıtıldığı saptandı
	chrX:155666435-155691858	q28	25	<i>SPRY3</i>	Bölgeden daha büyük çoklu DGV+	Unknown CNV	45 tane tam bölgeyi kaplayan CNV	
TRBMFS-0266_03	chrX:155666435-155691858	q28	25	<i>SPRY3</i>	Bölgeden daha büyük çoklu DGV+	Unknown CNV	45 tane tam bölgeyi kaplayan CNV	-

Bu aşamadan sonra tüm ekzom dizi analizine geçilmiştir. Aşağıda 17 hastaya ait Illumina alt yapısı kullanılarak elde edilen WES verilerinin ayrıntılı filtrelemesi ve hastaların klinik bulguları ışığında hastalık ile ilişkili olabilecek varyantların anlamlandırılma süreçleri ayrıntılandırılmıştır.

#### **4.2.2. TRBMFS-0137\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi**

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve 34. gestasyonel haftada 1300 gr düşük doğum ağırlığı ile doğan kız hasta ilk kez 2 yaşında iken yanlılıkla haloperidol etken maddeli ilaç içmesinin ardından hareket bozukluğu oluşması nedeni ile hastaneye başvurmuştur. Yapılan tetkiklerinde Hb: 8.3gr/dL, Trombosit: 62.000/mm<sup>3</sup> saptanması üzerine bisitopeni nedeni ile araştırılmaya başlanmıştır. Tetkiklerde vitamin B12 eksikliği saptanmış ve replasman tedavisi verilmiştir. Hastanın düzenli takipleri sırasında bisitopenisinin dirençli olması nedeni ile kemik iliği aspirasyon biyopsisi yapılmış, yağlanma artışı olan hiposellüler kemik iliği saptanmış ve kemik iliğinden yapılan sitogenetik analiz sonucu 46,XX olarak bulunmuştur. Fanconi anemisine yönelik yapılan DEB testinde kromozomal kırık artışı saptanmamıştır. Hastanın ataksik yürüyüşünün olması nedeni ile yapılan kraniyal MR'da serebellar hipoplazi saptanmıştır. Ataksik CP (serebral palsi) ön tanısı ile takip edilen hasta 1 yıl Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon uygulaması almış olup bu tedaviden de fayda görmüştür. Hastanın epileptik nöbet öyküsü bulunmamaktadır. Yaşıtlarına göre gelişim basamaklarını kazanmakta gecikmiş olan hasta, 6 aylık iken baş kontrolü, 2 yaşında konuşma, 2 yaş 6 aylık iken yürüme becerilerini kazanmış ancak dengeli bir şekilde yürüme ve düzgün kelime telaffuzu ile konuşma becerisi 5 yaşında kazanılabilmektedir. İlk dişi 1 yaşında çıkmıştır. 3 yaşında başlayan ve konuşmasını, beslenmesini etkileyen ağız yaraları olması sebebi ile bu lezyonlardan biyopsi alınmıştır ve biyopsi sonucu pyojenik granülom olarak sonuçlanmıştır.

Sekiz yaş sekiz aylık iken yaptığımız fizik muayenede mikrosefalik görünüm, seyrek-ince yapılı saçlar, dar alın, sinofrizis, bozuk diş yapısı, boyunda retüküler deri döküntüleri ve atrofik kas yapısına sahip ekstremiteler saptanmıştır. Ayrıca hastanın hafif ataksik

yürüyüşünün olduğu görülmüştür. Tırnaklarda ise herhangi bir displazi ve anomaliye rastlanmamıştır.

Hasta 8 yaşına kadar üçer kez Eritrosit ve Trombosit Süspansiyon (ES/TS) replasmanı almıştır. İlk kez 8 yaşında donör olan dededen Kemik İliği Transplantasyonu (KİT) yapılmış olup, yeterli kimerizm sağlanmadığı için 2 ay sonra aynı donörden bir kez daha KİT yapılmıştır. İki kez KİT sonrasında da bisitopeni şikayeti devam etmiş ve yaklaşık her hafta olacak şekilde replasman tedavilerine devam edilmiştir. Hasta 9 yaşında iken donör olan kardeşten 3. kez KİT yapılmıştır. Son yapılan KİT ardından 1 yıl geçen hastanın tetkiklerinde Hb: 12.5gr/dL, ANS: 7300/ $\mu$ L Trombosit: 260.000/ $\text{mm}^3$  olarak saptanmıştır.

### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 12 (Tablo 4.2), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği oluşturması beklenen 2 (Tablo 4.3) ve olası zararlı mutasyon (*nonsense/splice/indel*) olan 8 varyant elde edilmiştir (Tablo 4.4). Birleşik heterozigotluk filtrelemesinde ise hastalıktan sorumlu olmaya aday olacak şekilde aynı gende 2 heterozigot varyant saptanmamıştır.

**Tablo 4.2.** TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan soumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant kırmızı ile gösterilmiştir. *In-silico* değerlendirme kolonunda P; patojen ve B; benin varyantları ifade etmektedir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon Bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>TERT</i>	5	1,282,613	c.1700C>T p.Thr567Met	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>6P14B</b>	-	Dyskeratosis congenita (OD/OR)	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	Valide edildi.	Diskerozis konjenita
<i>MYH9</i>	22	36,708,267	c.1555G>A p.Ala519Thr	Polyphen: Benign Varsome: <b>11P9B</b>	-	Makrotrombositopeni İşitme kaybı Nefrit (OD)	<i>Nonmuscle myosin IIA</i>	Valide edildi.	Nadir bir polimorfizm
<i>FAM71A</i>	1	212,799,045	c.827_828del p.Lys276ArgfsTer 142	Polyphen: Benign Varsome: - Mutation taster: Disease causing	-	-	<i>Family With Sequence Similarity 71 Member A</i>	Valide edildi.	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>RGS2</i>	1	192,778,269	c.68G>A p.Gly23Asp	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P18B</b>	1-VUS	-	<i>Regulator of G-protein signaling 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>SYDE2</i>	1	85,666,687	c.1-8T>G	Polyphen: - Mutation taster: Disease causing	-	-	<i>Rho GTPase-activating protein</i> Proapoptoziste görevli p53 hedefi	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>GLIPR1L2</i>	12	75,785,047	c.151G>A p.Val51Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P19B</b>	-	-	<i>Glpr1-like protein 2</i> Proapoptoziste görevli p53 hedefi	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>SLFN13</i>	17	33,767,787	c.2521G>A p.Ala841Thr	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>4P17B</b>	-	-	<i>Schfalen family, member 13</i> T hücre gelişimi ve aktivasyonu	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>LAMC2</i>	1	183,190,055	c.599C>A p.Ala200Glu	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P19B</b>	-	Herlitz ve Herlitz olmayan tip epidermolizis büllöza (OR)	<i>Laminin, Gamma 2</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>METTL7B</i>	12	56,077,603	c.505G>A p.Val169Met	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>2P17B</b>	-	-	<i>Methyltransferase-like protein 7B</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>LOXHD1</i>	18	44,109,147	c.4523G>A p.Arg1508Lys	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>1P17B</b>	-	İşitme kaybı(OR)	<i>Lipoxygenase homology domain containing 1</i> İntrauterin dönemde kulak gelişimi	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>ANTXR1</i>	2	69,409,751	c.1312C>T p.Arg438Cys	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>10P10B</b>	-	- ?Hemangioma, capillary infantile, susceptibility (OD) - GAPO (OR)	<i>Anthrax toxin receptor1</i> Aktin ilişkili hücre adezyonu Tümör spesifik endotel belirteci	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>GAPVD1</i>	9	128,070,072	c.1354A>G p.Ser452Gly	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>10P10B</b>	-	-	<i>GTPase-activating protein and VPS9 domains1</i> Ras aracılı endositoz	-	Fonksiyon uygun bulunmadı



**Tablo 4.3.** TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sonuç
<i>ATRX</i>	X	76,939,594	c.1154C>G p.Ser385Cys	Polyphen: Benign Varsome: <b>8P</b> 11B	-	Alpha-thalassemia myelodysplasia syndrome, somatic Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (XLD) Mental retardation-hypotonic facies syndrome, X-linked (XLR)	<i>Atrx chromatin remodeler</i> Helikaz	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>FANCA</i>	16	89,851,362	c.1361_1370del	Varsome: - Mutation Taster: Disease causing	-	Fanconi anemia, complementation group A (OR)	<i>Fanca gene</i> DNA tamir mekanizması	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi

**Tablo 4.4.** TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyde saptanan heterozigot *splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>JUND</i>	19	18,391, 754	c.541G>T p.Glu181Ter	Polyphen: - Varsome: <b>4P1U3B</b>	-	-	<i>Oncogene jun-d</i>	Valide edildi	Çalışma devam ediyor
<i>RYR1</i>	19	38,964, 023	c.3772C>T p.Arg1258Ter	Polyphen: - Varsome: <b>6P1U1B</b>	-	Central core disease (OD/OR) King-Denborough syndrome (OD) Minicore myopathy with external ophthalmoplegia (OR) Neuromuscular disease, congenital, with uniform type 1 fiber (OD/OR) (Malignant hyperthermia susceptibility 1) (OD)	<i>Ryanodine receptor 1</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>SMTNLI</i>	11	57,313, 819	c.1188+1dup p.His397Alafs Ter27	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Smoothelin-like 1</i> İskelet kasının kasılma, rahatlama ve egzersize uyumu	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi
<i>HEPHLI</i>	11	93,836, 078	c.2576-2_2576delAGG p.Gly859Glufs Ter3	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	?Abnormal hair, joint laxity, and developmental delay (OR)	<i>Hephaestin-like protein 1</i> Dokularda demir transportu	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>FANCA</i>	16	89,851, 362	c.1361_1370del p.Ala454Glyfs Ter69	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	Fanconi anemia, complementation group A (OR)	<i>Fanca gene</i> DNA tamir mekanizması	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>DHX40</i>	17	57,684, 482	c.2290_2291del p.Lys764Alafs*9	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Deah-box helicase 40</i> ATP bağımlı RNA helikaz	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi
<i>DMGDH</i>	5	78,365, 398	c.31_45dup p.Gly11_Arg15dup	Polyphen: - Mutation Taster: Polymorphism	-	Dimethylglycine dehydrogenase deficiency (OR)	<i>Dimethylglycine dehydrogenase</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>TSTA3</i>	8	144,695, 097	c.945_949del p.Asn315Lysfs Ter12	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Gdp-l-fucose synthase</i> tissue-specific transplantation antigen 3	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp, elendi

Hastada saptanan bu aday varyantlardan *TERT*, *MYH9* ve *FAM71A* genlerindeki homozigot değişikliklerin klinik bulgulardan sorumlu olabileceği düşünölmüştür. GnomAD veri tabanında bu genlerde saptanan varyantlara ait daha önce bildirilmiş homozigot ya da heterozigot bir birey verisi bulunmamaktadır. Her üç varyantın da Sanger dizileme yöntemi ile validasyon ve segregasyon çalışması yapılmıştır.

*TERT* genindeki homozigot, bileşik heterozigot ve heterozigot değişikliklerin bir telomer biyogenez bozukluğu olan DC (OMIM 613989) ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda homozigot *TERT* geni 3. ekzonundaki c.1700C>T (p.Thr567Met) değişikliğini taşıyan bireyin bulgularının da *TERT* ilişkili fenotipler ile uyumlu olduğu görölmüştür (Tablo 4.5). Bu bulgu üzerine *RepeatDx* şirketinde yapılan telomer boy çalışmalarında hastanın farklı kan hücrelerindeki telomer boylarının yaşlıları ile kıyaslandığında <1 persentil olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.A). Segregasyon çalışması da, bir sağlık problemi olmayan anne ve babanın bu değişikliği heterozigot olarak taşıdığını göstermiştir (Şekil 4.1.B). Bu bulgularla *TERT* geninde saptanan varyantın bu hastada görölen fenotipi açıkladığı düşünölmüştür.

*MYH9* genindeki heterozigot değişiklikler makrotrombositopeni, işitme kaybı ve nefrit (OMIM 155100) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Klinik bulgular ile ailede gözlenen bulguların karşılaştırılması sonucunda, patojenik *MYH9* varyantlarında görölen fenotipin aile bireylerinde görölen tablo ile uyumlu olmadığı görölmüştür (Tablo 4.6). Buna ek olarak aile boyu segregasyon çalışmasında da diğer bir sağlıklı kardeşin aynı değişikliği homozigot olarak bulundurduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.C). Makrotrombositopeniye yönelik yapılan trombosit büyüklüğü ölçümlerinde hiçbir kardeşte dev trombosit (>7 µm) görölmemiştir. Bu bulgular nedeni ile ailedeki *MYH9* varyantının fenotiple ilişkili olmadığı düşünölmüştür.

Hastadaki aday varyantlar arasında bulunan ve çerçeve kayması değişikliğine yol açan *FAM71A* genindeki varyantın c.827\_828del (p.Lys276ArgfsTer142) validasyon ve segregasyon çalışmasında hastalıkla uyumlu segregasyon gösterdiği görölmüştür (Şekil 4.1.D). *FAM71A*'nın fonksiyonu hakkında bilgi bulunmamaktadır. Ancak hastada var olan *TERT* varyantının hastanın tüm klinik bulgularını açıklamış

olduğu göz önüne alınarak *FAM71A* genindeki varyantın hastalık fenotipi ile ilişkisi olmayan bir varyant olduğu düşünülmüştür.

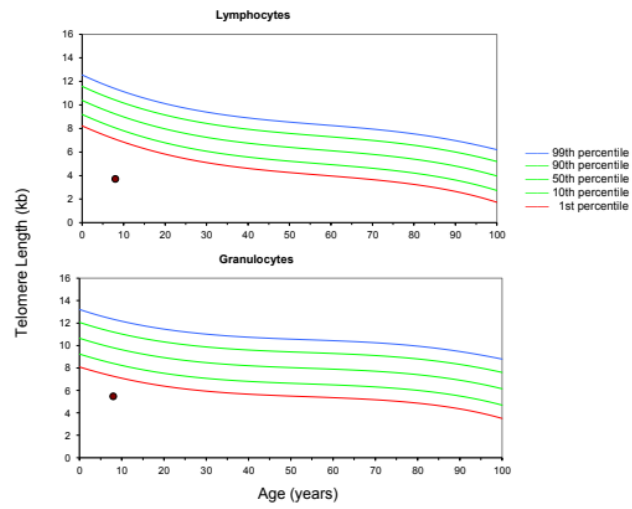
**Tablo 4.5.** TERT ilişkili klinik bulgular ile TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması. OD: otozomal dominant; OR: otozomal resesif kalıtım kalıpları ile uyumlu bulguları tanımlamaktadır

	TERT ilişkili DC (OD)	TERT ilişkili DC (OR)	TRBMFS-0137_03
Tanı yaşı (yıl)	~15	~11	<b>9y</b>
IUGR	+	+	+
Mikrosefali	+	+	+
Büyüme geriliği	-	+	+
Anormal diş yapısı/diş kaybı	-	+	+
<b>Kalp bulguları</b>			
Kardiyak fibrosis	+	+	-
Kardiyomyopati	+	+	-
<b>Kemik bulguları</b>			
Osteoporoz	+	+	+
<b>Mukokutanöz bulgular</b>			
Anormal deri pigmentasyonu	Nadir	+	+
Tırnak distrofisi	Nadir	+	-
Lökoplaki	Nadir	+	-
Erken yaşta saçta beyazlama	+	+	-
<b>Hematolojik bulgular</b>			
Kemik iliği yetmezliği	+	+	+
Myelodisplazi	+	+	-
Pansitopeni	+	+	+
İmmün yetmezlik	+	+	-
<b>Nörolojik bulgular</b>			
Öğrenme güçlüğü	-	+	+
Gelişim geriliği	-	+	+
Serebellar hipoplazi	-	+	+
<b>Diğer bulgular</b>			
Kanser yatkınlığı	+	+	NA
Akciğer fibrozisi	+	+	NA
Karaciğer fibrozisi	+	+	-
<b>Laboratuvar bulguları</b>			
Kısa telomerler	+	+	+
Azalmış telomeraz aktivitesi	+	+	NA

**Tablo 4.6.** MYH9 ilişkili klinik ile TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

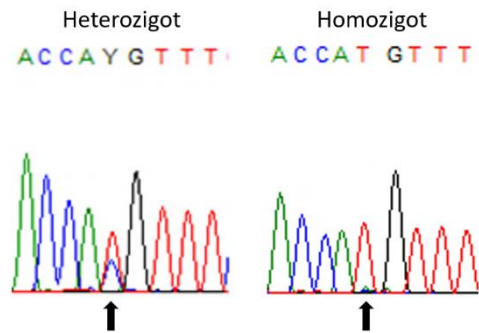
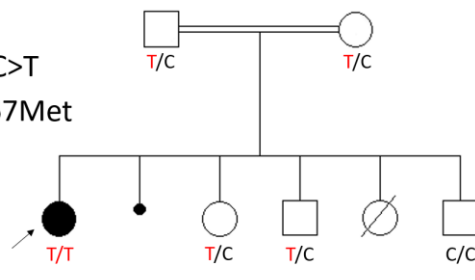
	MYH9 ilişkili Klinik	TRBMFS-0137_03	TRBMFS-0137_02 (Anne)	TRBMFS-0137_01 (Baba)	TRBMFS-0137_06 (Kardeş)
<b>Kalıtım</b>	OD				
<b>Kulak bulgusu</b>					
Görülme yaşı (yıl)	~30	-	-	-	-
Klinik	Bilateral SNİK	-	-	-	-
Seyir	İlerleyici	-	-	-	-
<b>Göz bulgusu</b>					
Görülme yaşı (yıl)	~30	-	-	-	-
Klinik	Katarakt	-	-	-	-
Seyir	?	-	-	-	-
<b>Üriner bulgu</b>					
Görülme yaşı (yıl)	~30	-	-	-	-
Klinik	Proteinürik nefropati	-	-	-	-
Seyir	İlerleyici	-	-	-	-
<b>Hematolojik bulgular</b>					
Görülme zamanı	Cerrahi operasyon ya da doğumdan sonra				
Trombositopeni	+	+	1 kez	-	-
Büyük trombositler	+	+	NA	NA	+
Uzamış kanama zamanı	+	NA	NA	NA	NA
Nötrofilik inklüzyon cisimleri	+	-	NA	NA	-

A.



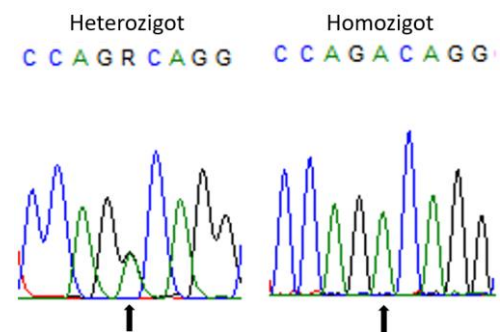
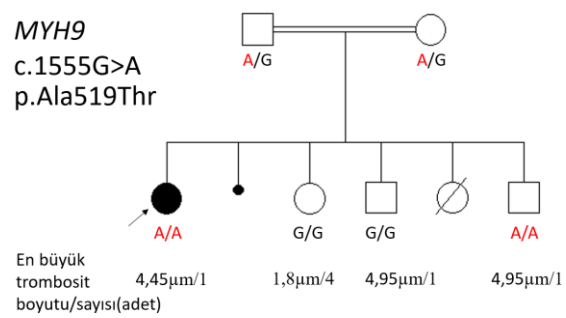
B.

*TERT*  
c.1700C>T  
p.Thr567Met

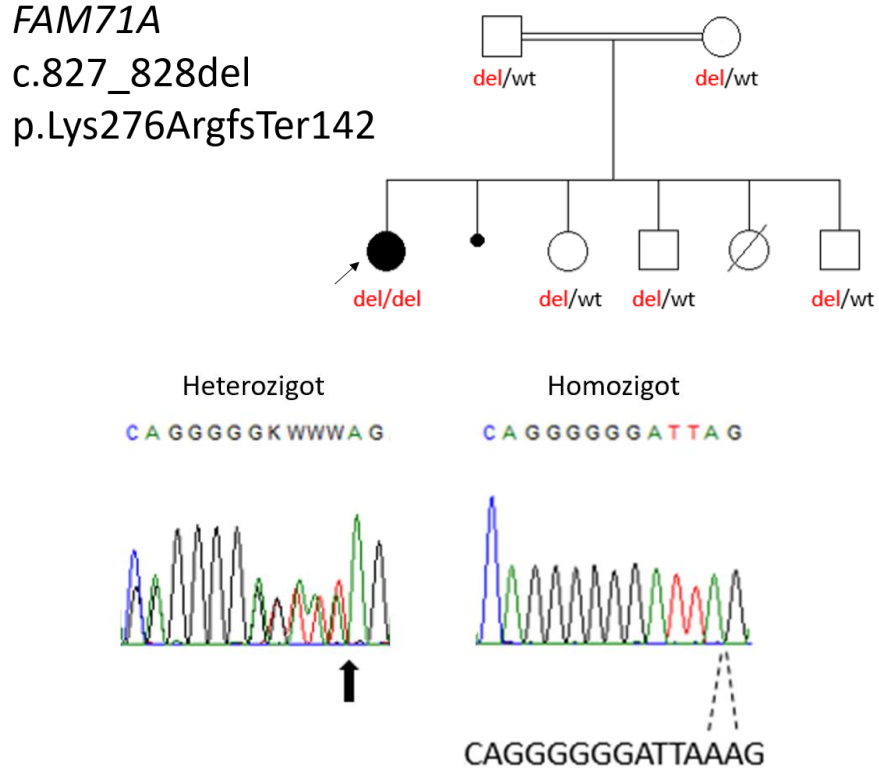


C.

*MYH9*  
c.1555G>A  
p.Ala519Thr



D.



**Şekil 4.1.** TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyin yaş uyumlu kontroller kullanılarak yapılmış telomer boy ölçümüne ait grafik, klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri. A. Bireyin yapılan telomer boy ölçümlerinin yaş ile uyumlu kontrollerin telomer boyları ile karşılaştırıldığı grafikte, x eksenini yaşı (yıl), y eksenini lenfositlerin (üstte), granüositlerin (altta) telomer boyunu (kbp) temsil etmektedir. Grafikler üzerindeki siyah nokta ise indekse ait telomer boy uzunluğunu göstermekte olup, grafikler incelendiğinde indeksin hem lenfoid hem de granüositler seri elemanlarına ait telomer boyunun aynı yaştaki bireylere kıyasla <1 persentil olduğu görülmektedir. B. *TERT* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve sekans elektroferogram görünümü, C. *MYH9* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve sekans elektroferogram görünümü, D. *FAM71A* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve *reverse* yönden yapılan sekans elektroferogram görünümü.

### **4.2.3. TRBMFS-0266\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi**

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve ilk kez 2 yaş 6 aylık iken vücutta oluşan ekimozlar nedeni ile hastaneye başvuran erkek hastanın yapılan tetkiklerinde Hb: 12.2gr/dL, ANS: 6500/ $\mu$ L Trombosit: 77.000/ $\text{mm}^3$  saptanması üzerine hastaya TS tedavisi verilmiştir. DEB testinde kromozomal kırık artışı saptanmayan hastanın trombositopeni etyolojisini belirlemeye yönelik yapılan periferik yaymasında dev trombositler ve kemik iliği incelemesinde ise megakaryosit artışı olmayan hafif hiposellüler kemik iliği saptanmıştır. Yapılan üriner ultrason incelemesinde ise bilateral böbrek parankim ekojenitesinde diffüz artış bulunmuştur.

### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 15 (Tablo 4.7), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği oluşturması beklenen 1 (Tablo 4.8) güçlü aday varyant belirlenmiş, birleşik heterozigotluk filtrelemesinde herhangi bir aday varyant saptanmamıştır. Bu bulgulara ek olarak, heterozigotluk filtrelemesinde olası zararlı mutasyon olan toplamda 205 varyant gözlenmiş olmakla birlikte saptanan güçlü varyantın mevcut fenotipi açıkladığı düşünülmüştür.



**Tablo 4.7.** TRBMFS-0266\_03 numaralı bireyin hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>TALDO1</i>	11	760,181	c.389A>G p.Lys130Arg	Polyphen: Benign Varsome: <b>11P11B</b>	-	Transaldolase deficiency (OR)	<i>Transaldolase 1</i>	Valide edildi	Aile bireylerine ait örnek olmaması sebebi ile segregasyon analizi yapılmadı
<i>WDR25</i>	14	100,863,579	c.55G>T p.Glu19Ter	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>WD repeat-containing protein 25</i> Çeşitli hücre sel süreçler	-	Kanonik ve kanda eksprese olmayan transkriptte saptanan değişiklik elendi
<i>KIAA2026</i>	9	5,923,078	c.2918G>T p.Cys973Phe	Polyphen: Benign Varsome: <b>6P15B</b>	-	-	-	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>OR52N1</i>	11	5,809,925	c.122T>G p.Ile41Ser	Polyphen: Benign Varsome: <b>8P15B</b>	-	-	<i>Olfactory receptor, family 52, subfamily N, member 1</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>FLT1</i>	13	29,041,719	c.100C>A p.Leu34Met	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>10P13B</b>	-	-	<i>Fms-related tyrosine kinase 1</i> Hücre proliferasyon ve differansiyasyonu	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>ELMO3</i>	16	67,235,451	c.824G>A p.Gly275Asp	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>10P11B</b>	-	-	<i>Engulfment and cell motility gene 3</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>KDM4C</i>	9	6,793,068	c.80G>A p.Arg27Gln	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P21B</b>	-	-	<i>Lysine demethylase 4c</i> Histon modifikasyonu	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>IRF7</i>	11	613,102	c.1292G>A p.Arg431Gln	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P18B</b>	1-VUS	?Immuno deficiency 39 (OR)	<i>Interferon regulatory factor 7</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı

**Tablo 4.7. (Devamı)** TRBMFS-0266\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

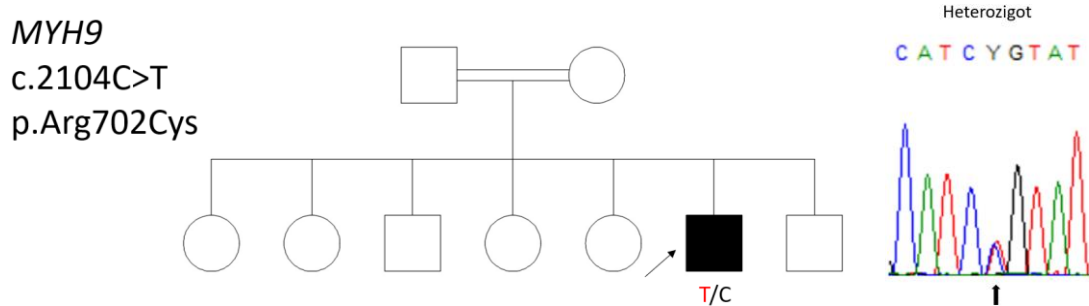
<i>TRPM5</i>	11	2,432,983	c.2489C>T p.Ala830Val	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P22B</b>	-	-	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily m, member 5</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>DNHD1</i>	11	6,578,075	c.7550G>A p.Arg2517His	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>11P11B</b>	-	Spermatogenic failure 65 (OR)	<i>Dynein heavy chain domain 1</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>CTR9</i>	11	10,800,555	c.3425G>C p.Gly1142Ala	Poyphen: Benign Varsome: <b>5P18B</b>	1-VUS	-	<i>Ctr9 homolog, paf1/rna polymerase ii complex component</i> Transkripsiyon regülatörü	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>ATXNIL</i>	16	71,885,443	c.1800G>C p.Gln600His	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P19B</b>	-	-	<i>Ataxin 1-like</i> Notch sinyal baskılanması	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>GSDMA</i>	17	38,128,870	c.751+1_751+4del	Polyphen:-	-	-	<i>Gasdermin 1</i>	-	Dizinin değerlendirilmesin de <i>splice site</i> '1 değiştirmedığı görüldü
<i>HSD17B1</i>	17	40,706,455	c.572C>T p.Thr191Ile	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>12P5B</b>	-	-	<i>17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>PCDH11Y</i>	Y	5,369,219	c.3251A>G p.Tyr1084Cys	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>6P5B</b>	-	-	<i>Protocadherin 11, y-linked</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi

**Tablo 4.8.** TRBMFS-0266\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>MYH9</i>	22	36,702,031	c.2104C>T p.Arg702 Cys	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>22P1B</b>	8-Patojenik	Deafness, autosomal dominant 17 (OD) Macrothrom bocytopenia and granulocyte inclusions with or without nephritis or sensorineura l hearing loss (OD)	<i>Myosin, heavy chain 9, nonmuscle</i>	Valide edildi	<i>MYH-9 ilişkili fenotip</i>

Hastada saptanan aday varyantlar değerlendirildiğinde *MYH9* genindeki heterozigot c.2104C>T (p.Arg702Cys) varyantının hastanın fenotipinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Şekil 4.2). GnomAD veri tabanında bu varyanta sahip daha önce bildirilmiş homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır. *MYH9* genindeki heterozigot değişiklikler makrotrombositopeni, işitme kaybı ve nefrit (OMIM 155100) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

Hasta ve aile bireylerine ulaşılamaması sebebi ile ayrıntılı muayenesi yapılamayan hastanın hastane bilgi yönetim sistemi üzerinden elde edilen verileri değerlendirildiğinde periferik yaymada belirgin makrotrombositopenisinin bulunması ve olası bir renal hasar ile ilişkili olabilecek bilateral artmış böbrek parankim ekojenitesinin olması MYH-9 ilişkili klinik ile uyumlu bulguları olarak saptanmıştır.



**Şekil 4.2.** TRBMFS-0266\_03 numaralı bireyin aile ağacı ve klinik bulgular ile uyumlu olabilecek *MYH9* genindeki değişikliğin sekans elektroferogram görüntüsü

#### 4.2.4. TRBMFS-0134\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve oligohidramniyoz nedeni ile 33. gestasyonel haftada 1300 gr düşük doğum ağırlığı ile doğan kız hastanın doğumdan sonra solunum sıkıntısı olması sebebi ile 3 gün yoğun bakımda izlenmiştir. Bu dönemde kandaki oksijen saturasyonu düşük seyreden hastaya ES tedavisi başlanmıştır. Doğum sonrası dönemde 3 kez şiddetli ishal ve sepsis nedeni ile hastanede yatarak izlenen hastanın bu dönemde yapılan tetkiklerinde en düşük değerler Hb: 7.7gr/dL, ANS: 100/ $\mu$ L Trombosit: 11.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanmış ve replasman tedavileri başlanmıştır. Hastane bilgi yönetim sistem kayıtlarından hastanın işitme testinde sol kulakta işitme problemi olduğu, gözde bilateral skar olup, bunun Toxoplazma Gondii enfeksiyonu ile uyumlu olduğu, batin USG ve kemik iliği incelemelerinin normal olarak saptandığı bilgisi edinilmiştir. *SBDS* gen dizi analizinde ise patojenik varyant saptanmayan hasta, takipleri sırasında dış merkezde hayatını kaybetmiştir.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 10 (Tablo 4.9), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği oluşturması beklenen 2 (Tablo 4.10) ve olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 4 varyant elde edilmiş (Tablo 4.11) olup, birleşik heterozigotluk filtrelemesinde aday varyant saptanmamıştır.

**Tablo 4.9.** TRBMFS-0134\_03 numaralı bireyin hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>EFL1</i>	15	82,422,793	c.3284G>A p.Arg1095Gln	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>12P4B</b>	1-VUS 1-Patojenik	Shwachman-Diamond sendromu 2 (OR)	<i>Elongation factor-like GTPase 1</i> Pre-60S'den eIF6'nın uzaklaştırılması	Valide edildi	Shwachman-Diamond Sendromu 2
<i>TNFSF11</i>	13	43,148,522	c.83G>A p.Gly28Asp	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P1U12B</b>	3-VUS	Osteopetrozis (OR)	<i>TNF ligand superfamily member 11</i> Osteoklast fonksiyonunda regülatör	Valide edildi	Klinik önemi bilinmeyen varyant
<i>DIDO1</i>	20	61,525,450	c.2669C>G p.Ser890Cys	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>5P15B</b>	-	-	<i>Death-inducer obliterator 1</i> Caspas3/9 üzerinden apoptozis	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>MTMR6</i>	13	25,839,959	c.589G>A p.Glu197Lys	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P15B</b>	-	-	<i>Myotubulerin related protein 6</i> Vesicular trafficking	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>KCNRG</i>	13	50,594,584	c.813G>T p.Lys271Asn	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P16B</b>	-	-	<i>Potassium channel regulator</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>DHRS12</i>	13	52,371,979	c.256C>T p.Arg86Trp	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>6P13B</b>	-	-	<i>Short chain dehydrogenase reductase family member 12</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>CRAMP1</i>	16	1,703,106	c.986A>G p.Asn329Ser	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P16B</b>	-	-	<i>Cramped chromatin regulator homolog 1</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>CRAMP1</i>	16	1,664,719	c.79T>G p.Ser27Ala	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P19B</b>	-	-	<i>Cramped chromatin regulator homolog 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>DSCAM</i>	21	41,450,700	c.4625C>G p.Thr1542Ser	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>12P9B</b>	-	-	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i> Down sendromu visseral anomalileri	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>PRAG1</i>	8	8,185,715	c.2577C>A p.His859Gln	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P16B</b>	-	-	<i>Peak 1 related kinase activating pseudokinase 1</i> Hücre kontraksiyonu NOTCH komponenti	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi

**Tablo 4.10.** TRBMFS-0134\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>TP53</i>	17	7,578,403	c.527G>T p.Cys176 Phe	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>18P2B</b>	16-Likely pathogenic 15-Somatik 1-Germline	Bone marrow failure syndrome 5 (OD) Breast cancer, somatic Hepatocellular carcinoma, somatic Li-Fraumeni syndrome (OD) Nasopharyngeal carcinoma, somatic Pancreatic cancer, somatic (Adrenocortical carcinoma, pediatric) (OD) (Basal cell carcinoma 7) (OD) (Choroid plexus papilloma) (OD) (Colorectal cancer) (OD, SMu) (Glioma susceptibility 1) (OD, SMu) (Osteosarcoma) (SMu)	<i>Tumor protein p53</i>	Valide edildi	Somatik olduğu gösterildi
<i>ITK</i>	5	156,649,949	c.572C>T p.Ala191 Val	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P15B</b>	2-VUS	Lymphoproliferative syndrome 1(OR)	<i>IL2-inducible t-cell kinase</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi

**Tablo 4.11.** TRBMFS-0134\_03 numaralı bireyde saptanan heterozigot *splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>GHI</i>	17	61,995,244	c.332C>A p.Ser111 Ter	Polyphen: - Varsome: <b>7P1B</b>	-	Growth hormone deficiency, isolated, type IA(OR) Growth hormone deficiency, isolated, type IB Growth hormone deficiency, isolated, type II(OD) Kowarski syndrome(OR)	<i>Growth hormone 1</i>	-	Hastalık mekanizması uygun bulunmadı (Dominant negatif etki)
<i>TPO</i>	2	1,497,750	c.1946_1969del p.Thr649_L eu656del	Polyphen: - Mutation taster: Disease causing Varsome: -	-	Thyroid dyshormonogenesis 2A(OR)	<i>Thyroid peroxidase</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>ZNF343</i>	20	2,474,200	c.141dup p.Cys48Leu sTer100	Polyphen: Benign Mutation taster: Disease causing Polyphen: -	-	-	<i>Zinc finger protein 343</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>CTCF</i>	20	56,083,813	c.1514_1522 dup p.Thr507_Hi s508 ins LeuArg Thr	Polyphen: - Mutation taster: Polymorphism Varsome: -	-	-	<i>Ccctc-binding factor-like protein</i> Epigenetik düzenleme	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi

Hastada saptanan aday varyantlar değerlendirildiğinde, *EFLI* ve *TNFSF11* genindeki değişikliklerin hastanın fenotipinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

*EFLI* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak büyüme-gelişme geriliği, pankreas yetmezliği, metafizyal displazi ve kemik iliği yetmezliğinin eşlik ettiği Shwachman-Diamond sendromu 2 (OMIM 617941) fenotipinden sorumludur. Hastada *EFLI* geninde homozigot olarak saptanan c.3284G>A (p.Arg1095Gln) değişikliği için gnomAD veri tabanında homozigot birey bilgisi bulunmazken, 7 bireyin heterozigot olarak bildirildiği saptanmıştır. Hastanın klinik takiplerinin olmaması ve bu dönemde hayatını kaybetmesi sebebi ile ayrıntılı muayene edilememiş ve ayrıntılı klinik bulgulara ulaşılamamış olsa da, kemik iliği yetmezliği, pankreas yetmezliğini düşündürecek kronik ishalinin olması ve gelişme geriliği Shwachman-Diamond sendromu 2 ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan segregasyon analizinde ise her iki ebeveynin aynı varyantı heterozigot olarak taşıdığı saptanmıştır (Şekil 4.3.A).

Ayrıca hastada klinik bulgular ile ilişkili olabilecek *TNFSF11* geninde c.83G>A (p.Gly28Asp) değişikliği homozigot olarak bulunmuştur. *TNFSF11* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım paternine uygun olarak pansitopeniye osteoskleroz ve çoklu kemik kırıkları gibi çeşitli kemik bulgularının ve kemik sklerozunun eşlik ettiği Osteopetrozis, Otozomal Resesif 2 (OMIM 259710) fenotipinden sorumludur. Hastada *TNFSF11* geninde homozigot olarak saptanan varyant için gnomAD veri tabanında homozigot olan birey bilgisi bulunmuyorken, 101 bireyin heterozigot olarak bildirildiği saptanmıştır. Hastanın işitme testinde sol kulakta işitme problemi saptanması ve pansitopeni bulguları osteopetrozis ile uyumlu olsa da klinik tanıyı destekleyecek olan kemik sklerozu, optik atrofi ve hepatosplenomegali (HSM) bulgularına yönelik ayrıntılı incelemeleri yapılamamıştır.

Bu varyantın valide edilmesi için bölgeye özgü tasarlanan primer çiftinde annenin de aynı varyantı homozigot olarak bulundurduğu saptanmıştır. Annede varyant alelde *drop-out* olabileceği göz önüne alınarak bölgeye özgü farklı primer tasarımı yapılmış ve ikinci kez tasarlanan primer ile yapılan dizi analizinde ise annenin de babada olduğu gibi saptanan varyant açısından heterozigot olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.B). *TNFSF11* genindeki varyant hastalık ile uyumlu segregasyon gösterse



de hastanın osteopetrozis kliniğini destekleyecek kemik graflerinin olmaması sebebi ile bu varyant klinik önemi bilinmeyen varyant sınıfında değerlendirilmiştir.

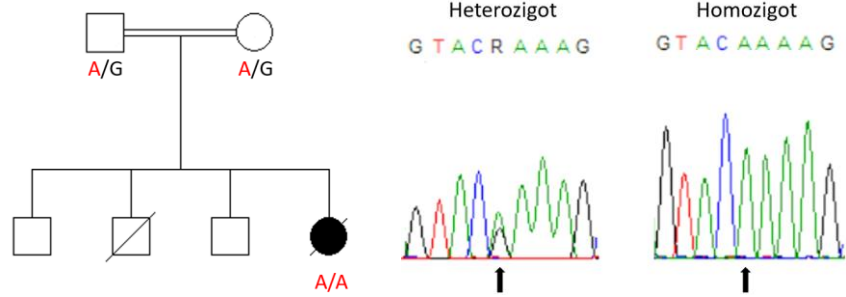
Ayrıca hastada *TP53* geninde heterozigot c.527G>T (p.Cys176Phe) varyantı saptanmıştır. Saptanan bu varyant gnomAD veri tabanında 1 kişide heterozigot olarak bildirilmiştir. Ancak gnomAD veri tabanı üzerinden bu bireye ait IGV görünümü değerlendirildiğinde 142 okumanın 41'inde varyant allelin saptanmış olduğu görülmüş ve gnomAD veri tabanına eklenen bu varyantın somatik bir varyant olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde tez kapsamında çalışılan hastanın da IGV değerlendirmesinde bu bölgenin toplamda 121 kez okunduğu ve 24 okumada varyant allelin saptandığı görülmüştür. Bölgenin okuma sayısına göre varyant allelin okuma sayısının çok düşük olması bizim hastamızda da bu varyantın somatik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, yapılan validasyon ve segregasyon çalışması ile, indeks vakanın örneğinden elde edilen sekans elektroferogram görünümünde varyant allelin *wild* tip allelin altında çok küçük bir pik şeklinde görünmesi ve anne-babada bu değişikliğin saptanmaması bu kanıyı desteklemiştir (Şekil 4.3.C).

*TP53* geni germline heterozigot değişiklikleri bir kanser yatkınlık sendromu olan Li-Fraumeni Sendromu (OMIM 151623) ve kemik iliği yetmezliği tip 5 (OMIM 618165) fenotipi ile ilişkilendirilirken, somatik değişiklikleri ise çeşitli kanser fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuç olarak hasta hem kemik iliği yetmezliğine sebep olabilecek Shwachman-Diamond sendromu 2 fenotipinden sorumlu germline bir varyantı hem de kanserlerde çok önemli bir yeri olan *TP53* genindeki somatik bir varyantı bulundurmaktadır.

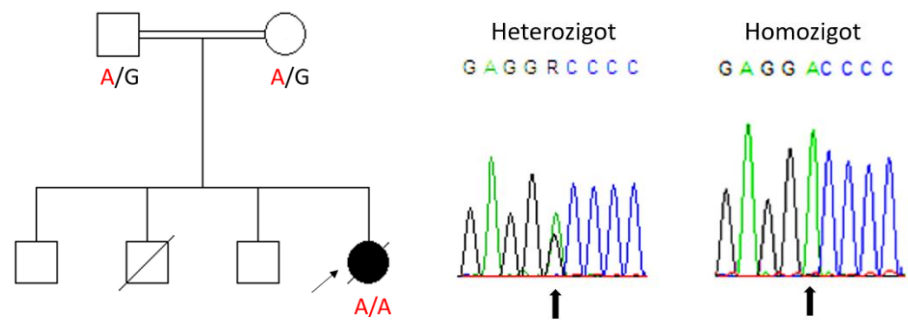
A.

*EFL1*  
c.3284G>A  
p.Arg1095Gln



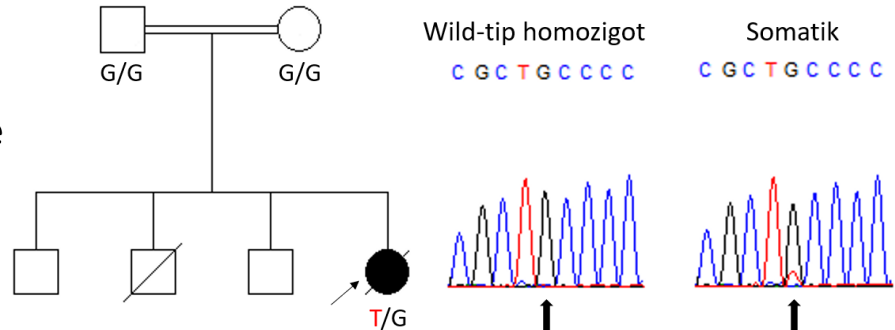
B.

*TNFSF11*  
c.83G>A  
p.Gly28Asp



C.

*TP53*  
c.527G>T  
p.Cys176Phe



**Şekil 4.3.** TRBMFS-0134\_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri. A. *EFL1* genindeki varyantın aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü, B. *TNFSF11* genindeki varyantın aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü, C. *TP53* genindeki varyantın aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü.

#### 4.2.5. TRBMFS-0232\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve 36. gebelik haftasında IUGR ve fetal distres nedeni ile 1905 gram düşük doğum ağırlıklı doğan erkek hasta, doğumdan sonra beslenme sıkıntısı ve sebebi belirlenemeyen ateş nedenleri ile 29 gün hastanede yatışı yapılarak izlenmiştir. Ardından devam eden takiplerinde de sık enfeksiyon öyküsü olmuş ve bu nedenle birçok kez hastane yatışı gerekmiştir. Geçirdiği sık orta kulak enfeksiyonları nedeni ile her iki kulağa da ventilasyon tüpü takılmıştır. Ayrıca fizik muayenede gözlenen hipotoni ve mikrosefali bulgularına yönelik olarak yapılan kraniyal MR'da lateral ventriküllerde bilateral genişleme saptanmıştır. Göz muayenesinde bilateral miyopi, EKO'da aort kapak anomalisi, PFO (*Patent Foramen Ovale*) ve TY (Triküspit Yetmezliği) belirlenmiştir.

Hasta gelişim becerilerini yaşlarına kıyasla daha ileri yaşlarda kazanmıştır. Buna yönelik yapılan değerlendirmede hastanın 8 aylık iken baş tutma, 2 yaş 6 aylık iken destekli oturma becerilerini kazandığı bilgisi edinilmiştir. Hasta 8 aylık iken özel eğitime başlamıştır. Epileptik nöbet öyküsü bulunmayan hastanın EEG'sinde epileptik aktivite izlenmemiştir. Yutma disfonksiyonu da bulunan hasta mama ile beslenmektedir.

Sitopeni bulgusu ilk kez 2 yaşında inmemiş testis nedeni ile planlanan operasyon öncesinde yapılan tetkiklerde görülmüştür ve nötropeni olarak değerlendirilmiştir. Aralıklı olarak hafif anemi bulgusu da görülen hastanın kemik iliği aspirasyon biyopsisinde normosellüler olan kemik iliğinde, M/E oranının arttığı, myeloid seride sola kaymanın mevcut olduğu ancak matürasyon segmentinin nötrofile kadar tam olduğu ve displazinin belirgin olmadığı belirlenmiştir. Farklı merkezler tarafından yapılan *HAX1/G6PC3/ELANE/SBDS* genlerine ait dizi analizlerinde ve mitokondriyal delesyon panelinde fenotip ile ilişkili bir mutasyon gözlenmemiştir. DEB testinde de kromozomal kırık artışı bulunmamaktadır. Anabilim dalımız tarafından değerlendirilen *ADA2* gen dizi analizinde de hastalık ile ilişkili varyant saptanmamıştır. Sırası ile periferik kan örneğinden ve kemik iliği örneğinden yapılan karyotip analizleri 46,XY ve 46,XY[10]/45,XY,-20[1] olarak belirlenmiştir. Şimdiye kadar sadece girişimsel işlemler öncesinde G-CSF tedavisi almış olup, nötropeniye yönelik devamlı tedavi kullanmamaktadır.

Dört yaşında iken yaptığımız fizik muayenede boy 90 cm (<3p), kilo 12 kg (<3p), baş çevresi 46 cm (<3p) olarak saptanmıştır. Fizik muayenede dar ve düz alın, bifrontal darlık, düz oksipital bölge, gür ve kıvrık kirpikler, aşağı eğilimli palpebral aralıklar, basık burun köprüsü, bulböz burun ucu, malar hipoplazi, silik nasolabial oluklar ve retraktil sağ testis saptanmıştır. Uyaranlara cevap vermeyen ve göz teması kurmayan hastanın desteksiz oturma, yürüme ve konuşma becerilerini kazanamadığı gözlenmiştir.

### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 3 (Tablo 4.12), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği oluşturması beklenen 2 (Tablo 4.13) ve olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 8 varyant elde edilmiş (Tablo 4.14) olup, birleşik heterozigotluk filtrelemesinde aday varyant saptanmamıştır.

**Tablo 4.12.** TRBMFS-0232\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>VPS13B</i>	8	100,026,078	c.62T>G p.Leu21Ter	Polyphen: Unknown Varsome: <b>8P1B</b>	-	Cohen Sendromu (OR)	<i>Vacuolar Protein Sorting 13 Homolog B</i> Endosomal/ lisosomal trafficking	Valide edildi	Cohen sendromu
<i>FLG</i>	1	152,277,448	c.9914G>A p.Arg3305His	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P17B</b>	-	Dermatitis, atopic, susceptibility to, 2 Ichthyosis vulgaris(OD/ OR)	<i>Filaggrin</i> Keratinosit farklılaşması	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>HSD17B3</i>	9	99,064,254	c.133C>T p.Arg45Trp	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>7P14B</b>	1-Likely benign 1-VUS	Pseudohermaphroditism, male, with gynecomastia (OR)	<i>17-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase III</i> Hipofiz adenomlarında östrojenik aktivite	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı

**Tablo 4.13.** TRBMFS-0232\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>RHAG</i>	6	49,580,118	c.937T>C p.Phe313Leu	Polyphen: Benign Varsome: <b>9P13B</b>	-	Anemia, hemolytic, Rh-null, regulator type (OD) Overhydrated hereditary stomatocytosis (OD)	<i>Rhesus blood group-associated glycoprotein</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi
<i>FIBP</i>	11	65,653,889	c.412-3_415dup p.Asp139AlafsTer3	Polyphen: Probably damaging	-	Thauvin-Robinet-Faivre syndrome (OR)	<i>Fibroblast growth factor, acidic, intracellular binding protein</i>	Valide edildi	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi

**Tablo 4.14.** TRBMFS-0232\_03 numaralı bireyde saptanan heterozigot *splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>GAS6</i>	13	114,566,845	c.49C>T p.Gln17Ter	Polyphen: Varsome: <b>3P4B</b>	-	-	<i>Growth arrest-specific 6</i>	Valide edildi	Okuma sayısının düşük olduğu bölgede bölgenin dizilemesi ile mutasyon saptanmadı
<i>VWA3B</i>	2	98,920,212	c.3468T>A p.Tyr1156Ter	Polyphen: Varsome: <b>4P1U3B</b>	-	?Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 22 (OR)	<i>Von willebrand factor a domain-containing protein 3b</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>FBLN1</i>	22	45,898,868	c.3G>A p.Met1?	Polyphen:- Varsome: <b>11P8B</b>	-	Synpolydactyly, 3/3'4, associated with metacarpal and metatarsal synostoses (OD)	<i>Fibulin 1</i> Kondrosit proliferasyonu		Çalışma devam ediyor
<i>FIBP</i>	11	65,653,889	c.412-3_415dup p.Asp139AlafsTer3	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	Thauvin-Robinet-Faivre syndrome (OR)	<i>Fibroblast growth factor, acidic, intracellular binding protein</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>LOXHD1</i>	18	44,057,759	c.6312del p.Ala2106GlnfsTer9	Polyphen: Possibly damaging Mutation Taster: Disease causing	-	Deafness, autosomal recessive 77 (OR)	<i>Lipoxygenase homology domain-containing 1</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>CCDC13</i>	3	42,772,035	c.1641_1642insC p.Glu548ArgfsTer14	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Coiled-coil domain-containing protein 13</i> Genom stabilitesi ve silia formasyonu	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi
<i>PAK1IP1</i>	6	10,695,230	c.16_22dup p.Tyr8TrpfsTer30	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>p21-activated kinase- and phospholipase c-interacting protein 1</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi
<i>VNN1</i>	6	133,004,368	c.1453del p.Ala485HisfsTer14	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Vanin 1</i> [High density lipoprotein cholesterol level QTL 8]	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi

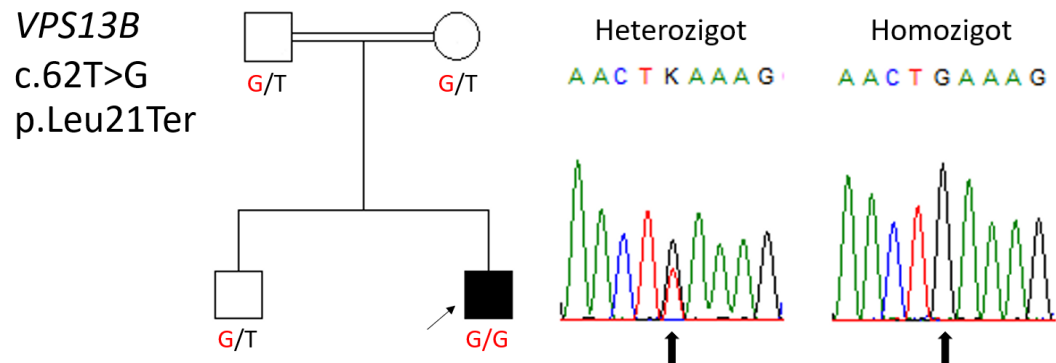
Hastada saptanan aday varyantlar değerlendirildiğinde *VPS13B* genindeki homozigot c.62T>G (p.Leu21Ter) değişikliğinin hastanın fenotipinden sorumlu olabileceği saptanmıştır. Saptanan bu değişikliğe ait gnomAD veri tabanında homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır. *VPS13B* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım paternine uygun olarak n6tropeniye mikrosefali ve global gelişme geriliğinin eşlik ettiği Cohen Sendromundan (OMIM 216550) sorumludur. Hastanın klinik bulguları da Cohen Sendromu ile uyumlu olarak bulunmuştur (Tablo 4.15). Saptanan değişiklik için yapılan segregasyon analizinde anne ve babanın aynı değişikliği heterozigot olarak taşıdıkları saptanmıştır (şekil 4.4).



**Tablo 4.15.** Cohen Sendromu ile TRBMFS-0232\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	Cohen Sendromu	TRBMFS-0232_03
<b>Dismorfik Bulgular</b>		
Mikrosefali	+	+
Kısa filtrum	+	+
Maksiller hipoplazi	+	+
Açık ağız görünümü	+	+
Aşağı eğilimli palpebral fissür	+	+
Koryoretinal distrofi	+	NA
Optik atrofi	+	NA
Miyop	+	+
<b>Kardiyak Bulgular</b>		
MVP	+	-
<b>İskelet Bulguları</b>		
Skolyoz	+	-
Artmış eklem laksitesi	+	+
Dar/kısa el-ayak parmakları	+	+
<b>Nörolojik bulgular</b>		
Motor basamaklarda gerilik	+	+
Zihinsel yetersizlik	+	+
Hipotoni	+	+
Epileptik nöbet	+	-
Büyük CC <sup>1</sup>	+	-
Serebral hipoplazi	+	-
<b>Endokrinolojik Bulgular</b>		
Gecikmiş puberte	+	-
Büyüme hormon eksikliği	+	NA
<b>Hematolojik Bulgular</b>		
Lökopeni	+	+
Nötropeni	+	+

<sup>1</sup> Corpus Callosum

**Şekil 4.4.** TRBMFS-0232\_03 numaralı bireyin klinik bulguları ile uyumlu olabilecek *VPS13B* genindeki değişikliğin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri

#### 4.2.6. TRBMFS-0248\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve 39. gebelik haftasında 2750 gram doğan erkek hastanın doğumdan sonra yenidoğan sepsisi ve mekonyum ileusu ön tanıları nedenleri ile 17 gün hastanede izlemi yapılmıştır. Topuk kanından değerlendirilen İmmün Reaktif Tripsinojen (IRT) değerinin 2 kez yüksek saptanması (İlk değeri: 99.7 mmol/L, İkinci değeri: 92.3 mmol/L) ve kilo alamama sebepleri ile Kistik Fibrozis (KF) ön tanısı almıştır. 1 yaş 6 aylık iken yapılan tetkiklerinde hipokloremik hipokalemik metabolik alkaloz, Hb: 6.7gr/dL, Trombosit: 79.000/mm<sup>3</sup>, LDH: 1500U/L ve vitamin B12: 150pg/ml saptanmıştır. Direkt Coombs ve haptoglobulin ise normal olarak değerlendirilmiştir. Yapılan kemik iliği aspirasyonunda normosellüler, megakaryositlerin azaldığı, her alanda tek tek megakaryositlerin, megaloblastik değişikliklerin ve yer-yer vakuolizasyonun görüldüğü kemik iliği saptanmıştır. 1 yaş 6 aylık olduğu döneme kadar beslenme bozukluğu, halsizlik, dirençli kusma nedenleri ile 3 kez hastane yatışı olan hastanın yatışları sırasında elektrolit bozukluğu ve bisitopeni saptanmıştır. Gaita yağ analizi ++ olan hastanın, abdominal USG sonucunda karaciğer sağ lob komşuluğunda mezotelyal kist ve splenomegali saptanmış, fekal elastaz ve *CFTR* geni sık görülen mutasyon taramasına yönelik (Delta F508, 1677delTA, Asn1303Lys, Gly542Ter, Phe1052Val, Trp1282Ter, 3849+10C>T, 2789+5G>A) analizleri ise normal olarak değerlendirilmiştir.

Bir yaş sekiz aylık iken yaptığımız fizik muayenede kilo 9,8 kg (3-10p), boy 79 cm (3p), baş çevresi 47 cm (10-25p) olarak bulduğumuz hasta için 1 yaşından sonra ek gıda desteği başlandığı, beslenme kısıtlamasının olmadığı, yalnızca ara-ara beslenmeyi reddetmesi sebebi ile beslenmenin mama ile desteklendiği öğrenilmiştir. Hasta 1 yaşında yürüme ve 1 yaş 2 aylık iken konuşma becerilerini kazanmıştır. Hastanın takvim yaşı 1 yaş 8 ay iken değerlendirilen kemik yaşının 3 ay ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Doğumdan sonra erken yenidoğan sepsisi ve mekonyum ileusu ön tanıları ve şimdiye kadar 2 kez aldığı ES tedavileri için toplam 5 kez hastane yatışı olan hastanın operasyon öyküsü bulunmamaktadır. Pedigri analizinde ailede kiştik fibrozis ya da başka bir kronik hastalığı olan birey bulunmamaktadır. Hastanın fizik muayenesinde sınırdaki büyüme geriliğinin dışında minor dismorfik yüz bulguları (hafif

frontal bossing, sinofrizis ve öne yerleşimli kulaklar) izlenmiştir. Yapılan kombine kan/idrar aminoasit taramasında katyonik aminoasitlerden lizin ve arjininin idrar atılımlarının yüksek olduğu, amonyak değerinin normal olduğu saptanmıştır. Ayrıca hasta 1 yaş 6 ay olduğu dönemden itibaren 6 ay aralıklarla yapılan ter testinde klor ölçümü sırasıyla 86-80-63 mmol/L olarak belirlenmiştir.

### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 7 (Tablo 4.16), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği oluşturması beklenen 2 (Tablo 4.17) ve olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 4 varyant elde edilmiş (Tablo 4.18) olup, birleşik heterozigotluk filtrelemesinde aday varyant saptanmamıştır.

**Tablo 4.16.** TRBMFS-0248\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>SLC7A7</i>	14	23,243,231	c.1335_1340del p.Gly446_Ile447del	Polyphen: - Mutation taster: Polymorphism	-	Lysinuric protein intolerance(OR)	<i>Solute Carrier Family 7 (Cationic Amino Acid Transporter, y+ System), Member 7</i>	Valide edildi	Lizinerik protein intoleransı
<i>CFTR</i>	7	117,307,030	c.4312delC p.Arg1438GlyfsTer10	Polyphen: Unknown Mutation taster: Disease causing	-	Cystic fibrosis(OR) Congenital bilateral absence of vas deferens(OR) Pancreatitis, hereditary(OD)	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>	Valide edildi	Kistik fibrosis
<i>RILP</i>	17	15,52,238	c.530G>A p.Arg177Lys	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P18B</b>	-	-	<i>Rab-Interacting Lysosomal Protein Rab7 aracılı lizozom morfolojisi</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>DMBT1</i>	10	124,361,305	c.3344-8C>T	Polyphen: -	-	-	<i>Deleted In Malignant Brain Tumors 1</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ZMYND15</i>	17	4,649,197	c.2141C>G p.Pro714Arg	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P19B</b>	-	?Spermatogenic failure 14(OR)	<i>Zinc Mynd-Containing Protein 15</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>TAF4</i>	20	60,639,932	c.935C>G p.Ala312Gly	Polyphen: Benign Varsome: <b>1PIU18B</b>	-	-	<i>RNA Polymerase II, TATA BOX-BINDING Protein-Associated Factor</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>SSX3</i>	X	48,209,451	c.437C>T p.Thr146Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P14B</b>	-	-	<i>Synovial Sarcoma, X Breakpoint 3</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı

**Tablo 4.17.** TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>GFII</i>	1	92,946,412	c.532G>C p.Gly178Arg	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P19B</b>	-	?Neutropenia, nonimmune chronic idiopathic, of adults (OD) Neutropenia, severe congenital 2, autosomal dominant (OD)	<i>Growth factor-independent 1</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>FANCD2</i>	3	10,114,603	c.2543T>C p.Leu848Ser	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>2P20B</b>	-	Fanconi anemia, complementation group D2 (OR)	<i>Fancd2 gene</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi

**Tablo 4.18.** TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyde saptanan heterozigot *splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>GDPD4</i>	11	76,956,549	c.865-2A>C	Polyphen: - Varsome: <b>4P2B</b>	-	-	<i>Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 4</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>DGKG</i>	3	185,983,035	c.1269+1G>A	Polyphen: - Varsome: <b>6P0B</b>	-	-	<i>Diacylglycerol kinase, gamma</i> Hücre içi 2. haberci yolağı	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>CCDC149</i>	4	24,810,133	c.1468G>T p.Glu490Ter	Polyphen: - Varsome: <b>3P1U5B</b>	-	-	<i>Coiled-coil domain containing 149</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>FAM227B</i>	15	49,860,478	c.710dup p.Met237IlefsTer17	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Family with sequence similarity 227 member B</i>	-	PLI o/e oranı:1.07 görülüp elendi

Hastada saptanan tüm aday varyantlar incelendiğinde hastanın klinik bulgularını açıklayabilecek iki farklı gende değişiklik saptanmıştır. Bunlar *CFTR* geni 27. ekzondaki c.4312delC (p.Arg1438GlyfsTer10) ve *SLC7A7* geni 10. ekzondaki c.1335\_1340del (p.Gly446\_Ile447del) değişiklikleri olup her iki değişiklik için de gnomAD veri tabanında homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır.

*SLC7A7* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak Lizinürik Protein İntoleransı (OMIM 222700) fenotipine neden olmaktadır. *SLC7A7* geninde saptanan çerçeve kaymasına neden olmayan delesyon *in-silico* (Mutation Taster) değerlendirmede polimorfizm olarak ön görülmesine rağmen, hastanın klinik bulguları lizinürik protein intoleransı açısından değerlendirildiğinde fenotipin hastalık ile uyumlu olduğu saptanmıştır (Tablo 4.19).

*CFTR* geni otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak Kistik Fibrozis (OMIM 219700) fenotipine neden olmaktadır. Hastada *CFTR* geninde bulunan ve çerçeve kaymasına neden olan c.4312delC (p.Arg1438GlyfsTer10) değişikliği *in-silico* (Mutation Taster) değerlendirmede hastalık sebebi olarak tanımlanmıştır. Fenotiple uyumluluk değerlendirildiğinde bu değişikliğin hastada konjenital dönemden itibaren görülen elektrolit bozukluğunu açıkladığı düşünülmüştür (Tablo 4.20). Bu çalışmada tanımlanan mutasyon 1989 yılında Kistik Fibrozis Genetik Konsorsiyumu tarafından başlatılan ve sistematik olarak *CFTR* geninde tanımlanmış mutasyonları toplayan “Cystic Fibrosis Mutation Database” ve Clinvar veri tabanlarında bildirilmemiş yeni bir mutasyondur.

Her iki gendeki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan klinik bulgulara sahip ve bu nedenle harman fenotip olarak değerlendirilen hastanın anne ve babasının da her iki değişikliği heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).

**Tablo 4.19.** Lizinürik protein intoleransı ile TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	<i>Lizinürik Protein İntoleransı</i>	TRBMFS-0248_03
<b><i>Büyüme Bulguları</i></b>		
Büyüme geriliği	+	+
Ciddi boy kısalığı	+	<b>Sınırdadır</b>
Zayıf ekstremiteler	+	+
<b><i>Gastrointestinal Sistem Bulguları<sup>1</sup></i></b>		
Beslenmeyi reddetme	+	+
Periyodik kusma/ışhal	+	-
Hepatosplenomegali	+	+
Pankreatit	+	-
Hiperamonyemi	+	-
<b><i>Akciğer Bulguları</i></b>		
İnterstitiyel değişiklikler	+	-
Alveolar proteinozis	+	-
Pulmoner hemoraji	+	-
Solunum yetmezliği	+	-
<b><i>Üriner Sistem Bulguları</i></b>		
Katyonik aminoasitlerin emilim bozukluğu	+	+
Mikroskopik proteinüri/hematüri	+	-
Kronik böbrek hastalıkları	+	-
Hipertansiyon	+	-
Glomerülonefrit	Nadir	-
Fanconi Sendromu	Nadir	-
<b><i>İskelet Sistem ve Kas Bulguları</i></b>		
Osteopeni/Osteoporoz	+	NA
Kemik yaşında gecikme	+	+
Sık kemik kırıkları	+	-
Hipotoni	+	-
Kaslarda zayıflık/atrofi	+	-
<b><i>Hematolojik Sistem Bulguları</i></b>		
Anemi	+	+
Lökopeni	+	+
Trombositopeni	+	+
Kemik iliğinde hemofagositoz	+	NA
HLH <sup>2</sup> /MAS <sup>3</sup>	+	-
<b><i>Nörolojik Sistem Bulguları</i></b>		
Zengin protein beslenme sonrası koma	+	NA
Gelişim geriliği	+	-
Davranış bozuklukları	+	-

<sup>1</sup>Anne sütünün kesilmesi ile başlayan semptomlar<sup>2</sup>Hemofagositik lenfositik lenfositosis<sup>3</sup>Makrofaj aktivasyon sendromu

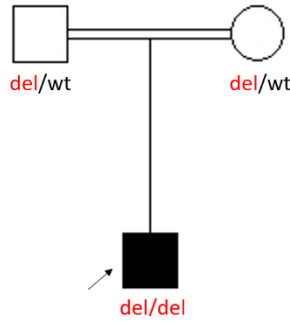
**Tablo 4.20.** Kistik Fibrozis ile TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	<i>Kistik Fibrozis</i>	<b>TRBMFS-0248_03</b>
<b><i>Büyüme bulguları</i></b>		
Büyüme geriliği	+	+
<b><i>Gastrointestinal Sistem Bulguları</i></b>		
Pankreatik yetmezlik	+	-
Biliyer Siroz	+	-
YD de mekonyum ileusu	+	+
İntestinal obstruksiyon	+	+
Rektal prolapsus	+	-
İleumda adenokarsinom	+	-
<b><i>Akciğer Bulguları</i></b>		
Kronik bronkopulmoner infeksiyon	+	-
Bronşiektazi	+	-
Astım	+	-
Pseudomonas kolonizasyonu	+	-
<b><i>Genital Sistem Bulguları</i></b>		
İnfertilite	+	NA
<b><i>Laboratuvar Bulguları</i></b>		
YD de IRF de artış	+	+
Ter sodyum ve klor seviyelerinde yükseklik	+	+
Hiponatremik dehidratasyon	<b>Nadir</b>	+
Hiperkalsüri	+	+



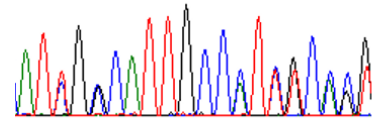
A.

*SLC7A7*  
c.1335\_1340del  
p.Gly446\_Ile447del



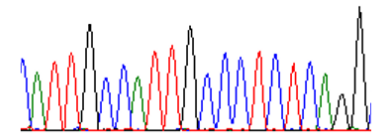
Heterozigot

A T Y G S C A T T G C C M T Y K C M S K



Homozigot

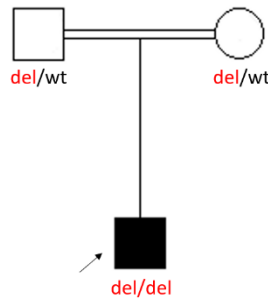
A T T G C C A T T G C C C T C T C A G G I



A T C G G C A T T G C C A T T G C C C T C T C A G G

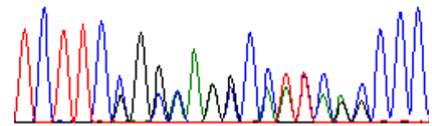
B.

*CFTR*  
c.4312delC  
p.Arg1438GlyfsTer10



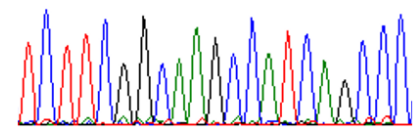
Heterozigot

T C T T C S G S M A R S C M W Y M R S C C C



Homozigot

T C T T C G G C A A G C C A T C A G C C C



T C T T C C G G C A A G C C A T C A G C C C

**Şekil 4.5.** TRBMFS-0248\_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri. A. *SLC7A7* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü, B. *CFTR* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü.

#### 4.2.7. TRBMFS-0252\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Aralarında akraba evliliği olan ve ilk çocuklarını aplastik anemi, Pearson Sendromu ön tanıları ile 3 yaş 6 aylık iken kaybeden ebeveynlerden 40. gebelik haftasında 3550 gram doğan kız hasta, ilk kez 3 aylık iken solukluk şikayeti üzerine yapılan testlerinde Hb: 3.6 gr/dL, Trombosit: 20.000/mm<sup>3</sup>, ANS: 400/μL ve vitamin B12: 163pg/ml olarak saptanmış ve hastaya ES, aferez kan ürünü, B12 replasman tedavileri verilmiştir. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsi incelemesinde eritroid seride azalma ve dismorfik değişiklikler, megakaryositlerde azalma ve her üç seride kesintisiz maturasyon saptanmıştır. Kemik iliği örneğinden yapılan karyotip analiz sonucu 46,XX olarak bulunmuştur. Hasta şimdiye kadar 4 kez ES, 1 kez aferez kan ürünü desteği almıştır. Ayrıca pansitopeninin vitamin B12 tedavisinin kesilmesi ile yeniden oluştuğu gözlemlendiğinden vitamin B12 tedavisi sürekli hale getirilmiştir.

Bir yaş 3 aylık iken yaptığımız fizik muayenede kilo 8,8 kg (10p), boy 80 cm (90p), baş çevresi 45 cm (25-50p), kulaç mesafesi: 77 cm ve vücut üst/alt segment oranı:1.1 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, frontal bossing, iki taraflı epikantus, basık burun kökü, bulböz burun ucu, aşağı eğilimli palpebral aralıklar, iki taraflı proksimal çıkışlı el baş parmakları gibi minör dismorfik bulgular saptanmıştır. Hastanın epileptik nöbet öyküsünün olmadığı ve gelişim basamaklarını da yaşlıları ile uyumlu zamanlarda kazandığı gözlenmiştir. Takvim yaşı 1 yaş 3 aylık iken değerlendirilen kemik yaşının 3-6 aylık ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Hastanın tetkik edilen ekstremite grafileri de normal olarak değerlendirilmiştir.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 5 (Tablo 4.21), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen heterozigot varyanta rastlanmamışken olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 6 varyant saptanmıştır (Tablo 4.22). Birleşik heterozigotluk filtrelemesinde ise aday varyant gözlenmemiştir.

**Tablo 4.21.** TRBMFS-0252\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>TCN2</i>	22	31,008,990	c.388C>T p.Gln130Ter	Polyphen: - Varsome: <b>6P1U2B</b>	-	Transcobalamin II deficiency(OR)	<i>Transcobalamin II Vitamin B12 taşıyıcısı</i>	Valide edildi	Transkobalamin 2 bozukluğu
<i>PIEZO1</i>	16	88,789,709	c.4363G>A p.Ala1455Thr	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P15B</b>	1-Likely benign	Dehydrated hereditary stomatocytosis with or without pseudohyperkalemia and/or perinatal edema(OD) Lymphatic malformation 6(OR)	<i>Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1</i>	Valide edildi	Nadir bir polimorfizm
<i>PAPSS2</i>	10	89,475,483	c.754-6T>C	Polyphen: - Mutation taster: Disease causing	-	Brachyolmia 4 with mild epiphyseal and metaphyseal changes(OR)	<i>3-Prime-phosphoadenosine 5-prime-phosphosulfate synthase 2</i>	Valide edildi	RNA çalışması sonucu <i>splice</i> 'in değişmediği gösterildi
<i>INPP5J</i>	22	31,529,993	c.1508C>T p.Ala503Val	Polyphen: Benign Varsome: <b>7P11B</b>	-	Leber congenital amaurosis 3 Retinitis pigmentosa, juvenile(OR)	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase, A</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>SPATA7</i>	14	88,897,520	c.1033A>G p.Met345Val	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P19B</b>	4-VUS	-	<i>Spermatogenesis-associated protein 7</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı

**Tablo 4.22.** TRBMFS-0252\_03 numaralı bireyde saptanan heterozigot *splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>TMOD4</i>	1	151,144,240	c.488-1G>T	Polyphen: - Varsome: <b>6P0B</b>	-	-	<i>Tropomodulin 4</i> Aktin filamanlarının uzaması ve depolarizasyonu engelleme	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>OR6S1</i>	14	21,109,849	c.2T>C p.Met1?	Polyphen: - Varsome: <b>7P14B</b>	-	-	<i>Olfactory Receptor Family 6 Subfamily S Member 1</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>PRORP</i>	14	35,592,734	c.283C>T p.Gln95Ter	Polyphen: - Varsome: <b>4P4B</b>	-	Combined oxidative phosphorylation deficiency 54 (OR)	<i>Protein only mase p catalytic subunit</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>SGPPI</i>	14	64,165,377	c.685-1G>T	Polyphen: - Varsome: <b>6P0B</b>	-	-	<i>Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>CHCHD4</i>	3	14,154,594	c.222C>A p.Cys74Ter	Polyphen: - Varsome: <b>7P1U1B</b>	-	-	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 4</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>PCED1B</i>	12	47,630,012	c.1167_1169del p.Tyr389_Gln390delins*	Polyphen: - Varsome: <b>7P1B</b>	-	-	PC-Esterase Domain Containing 1B Hücre yüzeyinde görevli hidrolaz	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi

Hastada tüm aday varyantlar incelendiğinde *TCN2* geni 3. ekzondaki c.388C>T (p.Gln130Ter) homozigot değişikliğin fenotipi açıklayabileceği düşünülmüştür.

*TCN2* geninde saptadığımız varyanta ait gnomAD veri tabanında homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır. *TCN2* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak Transkobalamin II bozukluğundan (OMIM 275350) sorumludur. Saptadığımız bu değişikliğin hastanın sitopeni bulgusunu açıkladığı düşünülmüştür (Tablo 4.23). Her iki ebeveynin *TCN2* genindeki değişikliği heterozigot olarak taşıdıkları saptanmıştır (Şekil 4.6.A).

Buna ek olarak, *PIEZO1* geninin anemi ile ilişkisi ve *PAPSS2* geninde görülen değişikliğin protein yapısını etkileyebilecek *splice* varyant olması nedenleri ile her iki gendeki varyantlar olası aday değişiklikler olarak incelenmiştir. *PIEZO1* genindeki değişikliklerde otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtım kalıpları ile uyumlu fenotipler tanımlanmıştır. Otozomal dominant kalıtım kalıbı ile uyumlu olarak perinatal ödem ve/veya yalancı hiperkaleminin eşlik ettiği ya da etmediği kalıtsal dehidrate stomatozis (OMIM 194380) tanımlanırken, otozomal resesif kalıtım kalıbı ile uyumlu olarak lenfatik malformasyon 6 (OMIM 616843) kliniği ortaya çıkmaktadır. Hastada saptanan varyanta ait gnomAD veri tabanında homozigot birey bilgisi bulunmuyorken, 313 bireyin bu değişikliği heterozigot olarak bulundurduğu gözlenmiştir. Yapılan segregasyon çalışmasında baba değişikliği heterozigot olarak taşıyorken, annenin ve sağlıklı kardeşin de değişikliği homozigot olarak bulundukları (Şekil 4.6.B) ancak ayrıntılı değerlendirmede her iki bireyde de ilişkilendirilmiş hastalıklarla ilgili klinik bulgu olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.24). Bu nedenle *PIEZO1* genindeki değişikliğin aile içinde var olan bir polimorfizm olduğu düşünülmüştür.

İkinci olarak *PAPSS2* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım kalıbı ile hafif metafizyal ve epifizyal değişikliklerin klinik bulgulara eşlik ettiği Brakiolmia 4 (OMIM 612847) fenotipinden sorumludur. GnomAD veri tabanında hastada saptanan *PAPSS2* genindeki değişikliğe ait homozigot bir birey bilgisi bulunmuyorken, 66 bireyin bu değişikliği heterozigot olarak bulundurduğu saptanmıştır. *In-silico* (Mutation Taster) değerlendirmede değişikliğin hastalık sebebi

olarak ön görülmesine rağmen, bireyin ayrıntılı ekstremite muayenesi ve radyolojik incelemesi yapılmış ve fenotip Brakiolmia ile uyumlu bulunmamıştır (Tablo 4.25). *PAPSS2* genindeki varyanta yönelik yapılan segregasyon çalışmasında anne ve babanın değişikliği heterozigot olarak taşıdıkları saptanmıştır (Şekil 4.6.C). Ayrıca hastanın cDNA'sından ilgili bölgenin dizilemesi yapıldığında varyantın *splice*'ı etkilemediği kanıtlanmıştır (Şekil 4.7).

**Tablo 4.23.** Transkobalamin II eksikliği ile TRBMFS-0252\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	Transkobalamin II eksikliği	TRBMFS-0252_03
Büyüme geriliği	+	-
<b><i>Gastrointestinal Sistem Bulguları</i></b>		
Ağız yaraları	+	-
Kusma	+	-
İshal	+	+
<b><i>Nörolojik Bulgular</i></b>		
Kaslarda zayıflık	+	-
Letarji/irritabilite	+	-
Zihinsel yetersizlik <sup>1</sup>	+	-
Ataksi <sup>1</sup>	+	-
<b><i>Hematolojik Bulgular</i></b>		
Pansitopeni	+	+
Makrositik anemi	+	+
Megaloblastik kemik iliği	+	NA

<sup>1</sup> Tedavi edilmediğinde görülen bulgular

**Tablo 4.24.** PIEZO1 ilişkili hastalıklar ve TRBMFS-252\_3 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	PIEZO1(OR) Konjenital Lenfatik Displazi	PIEZO1(OD) Hereditör stomositozis	TRBMFS- 0252_03	TRBMFS- 0252_02 (Homozigot)	TRBMFS- 0252_01 (Heterozigot)
<b><i>Lenfatik Sistem Bulguları</i></b>					
İntrauterin ödem	+	+	-	-	-
Nonimmün hidrops fetalis	+	-	-	-	-
Tüm vücutta ödem	+	-	-	-	-
Perikardiyal/Plevral effüzyon	+	-	-	-	-
Şilotoraks	+	-	-	-	-
Pulmoner/İntestinal lenfanjektazi	+	-	-	-	-
<b><i>Dismorfik Yüz Bulguları</i></b>					
Mikrosefali	+	-	-	-	-
Flat yüz	+	-	-	-	-
Küçük ağız	+	-	-	-	-
Yüksek damak	+	-	-	-	-
Dişeti hipertrofisi	+	-	-	-	-
<b><i>Hematolojik Bulgular</i></b>					
Anemi	-	+	+	+	-
Retikülositozis	-	+	-	NA	NA
Artmış MCHC	-	+	-	-	-
Artmış MCV	-	+	-	-	-
Demir birikimi	-	+	NA	NA	NA
Artmış serum bilirubin	-	+	-	NA	NA
Periferik yaymada stomasit	-	+	-	NA	NA
Psödohiperkalemi	-	+	-	NA	NA
<b><i>Diğer Sistem Bulguları</i></b>					
Büyüme geriliği	+	-	-	-	-
Epilepsi	+	-	-	-	-
Zeka yetersizliği	+	-	-	-	-
Hepatosplenomegali	-	+	-	-	-

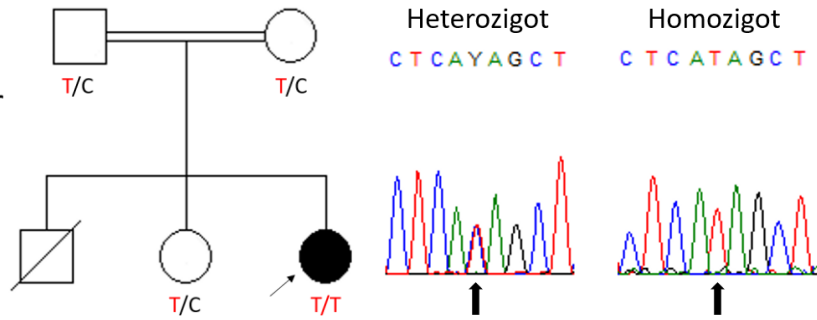
**Tablo 4.25.** PAPSS2 ilişkili brakiolmia 4 ile TRBMFS-0252\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	<b>Brachyolmia 4</b>	<b>TRBMFS-0252_03</b>
<i>İskelet Sistem Bulguları</i>		
Boy kısalığı	+	-
Platispondili	+	-
Skolyoz	+	-
Kısa-eğimli alt ekstremitte kemikleri	+	-
Genişlemiş diz eklemi	+	-
Alt ekstremitte eklemlerinde metafizyal değişiklikler		-
Osteoartropati	+	-
Brakidaktili	+	-
<i>Dermatolojik Bulgular</i>		
Akne	+	-
Hirsutizm	+	-
<i>Endokrinolojik Bulgular</i>		
Hiperandrojenizm	+	-
Sekonder amenore	+	-



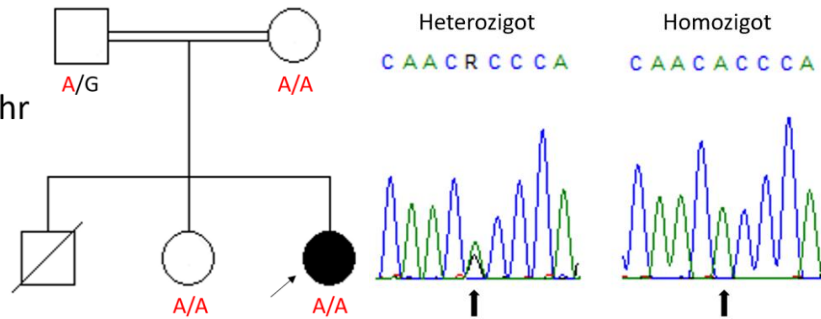
A.

*TCN2*  
c.388C>T  
p.Gln130Ter



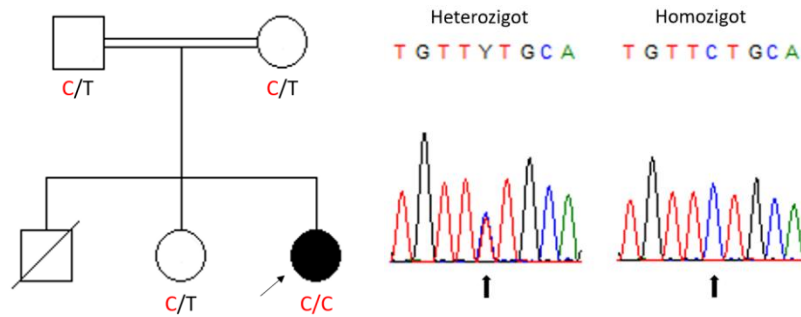
B.

*PIEZO1*  
c.4363G>A  
p.Ala1455Thr

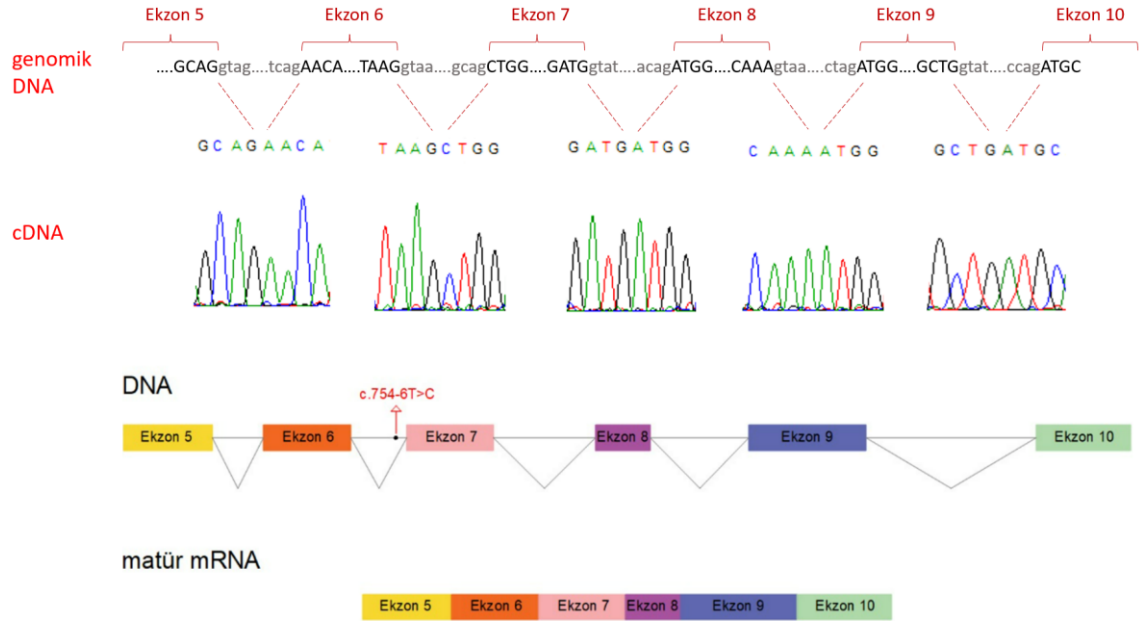


C.

*PAPSS2*  
c.754-6 T>C  
Splice region



**Şekil 4.6.** TRBMFS-0252\_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri. A. *TCN2* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü, B. *PIEZO1* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü, C. *PAPSS2* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyon ve sekans elektroferogram görünümü.



**Şekil 4.7.** PAPSS2 geni cDNA sekans elektroferogram görünümü ve *splice*'ın şematik gösterimi

#### 4.2.8. TRBMFS-0108\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri aynı köyden olan ve 38. gebelik haftasında 2300 gram doğan erkek hastanın, ilk kez 7 aylık iken solukluk şikayeti üzerine yapılan tetkiklerinde Hb: 4.9 gr/dL, Trombosit: 225.000/mm<sup>3</sup>, ANS: 1700/μL ve vitamin B12: 125 pg/ml olarak saptanmıştır. Bu dönemde yapılan fizik muayenesinde mikrosefali, bilateral tenar atrofi, sol elde proksimal çıkışlı baş parmak ve hepatomegali saptanmış ve hasta anemiye eşlik eden diğer bulguları ile de izlenmeye başlanmıştır. Hastanın takipleri sırasında anemi bulgusuna ek olarak trombositopeni bulgusunun da gelişmesi ile steroid tedavisi başlanmıştır. Steroid kullanımı sırasında sitopeni bulgusu devam ettiği için hastaya ES/TS replasmanı da verilmiştir. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde megakaryositlerde ileri derecede azalma, E/M oranında artış ve eritroid seride displastik değişiklikler saptanmıştır. Takipleri sırasında sitopeni tablosu daha da ağırlaşan ve kan ürünleri replasman ihtiyacı sürekli hale gelen hastaya 13 yaşında donör olan abisinden KİT yapılmıştır. KİT'in ardından hastanın sitopeni bulgusu düzelmiş olup, kan ürünleri replasmanı ve steroid tedavisine ihtiyacı kalmamıştır. Takipleri sırasında gelişme geriliği fark edilen hastanın yapılan tetkiklerinde orta derecede zihinsel yetersizlik ve kranial MR'ında diffüz serebral atrofi gözlenmiştir.

Hastanın aile öyküsü ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde 4 aylık iken kardeşinde de ateş sebebi ile hastane başvurusu olduğu ve bu sırada yapılan tetkiklerinde Hb: 7.2 gr/dL, Trombosit: 264.000/mm<sup>3</sup> olarak saptandığı öğrenilmiştir. İzlemleri sırasında ise anemi spontan olarak gerilemiş ancak trombositopeni bulgusu gelişmiş olup, bu sebeple izlenmeye başlanmıştır. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde displastik/megaloblastik değişiklikler göstermeyen normosellüler kemik iliği gözlenmiştir.

Hastanın 15 yaş 7 aylık iken yaptığımız fizik muayenesinde kilo 28 kg (<3p), boy 142,5 cm (<3p), baş çevresi 49 cm (<3p) kulaç mesafesi: 141,5 cm ve vücut üst/alt segment oranı: 0.9 olarak saptanmıştır. Bun ek olarak, üçgen yüz, düşük ön saç çizgisi, dar alın, öne yerleşimli kulaklar, sinofrizis, hipotelorizm, derin yerleşimli gözler, malar hipoplazi, ince üst dudak, bilateral jinekomasti, bilateral el ve dirsek ekleminde ekstansiyon kısıtlılığı, bilateral el baş parmaklarının proksimal çıkışlı olduğu gözlenmiştir. Epileptik nöbet öyküsü olmayan hastanın gelişim basamaklarını yaşlarına göre daha ileri yaşlarda kazandığı belirlenmiştir.

Hastanın kardeşinin 2 yaş 4 aylık iken yaptığımız fizik muayenesinde kilo 12 kg (10-25p), boy 91 cm (25-50p), baş çevresi 45 cm (<3p) olarak saptanmış olup bifrontal darlık, belirgin glabella, alında hipertrikozis, uzun filtrum, öne yerleşimli kulaklar, belirgin retromikrognati ve alt ekstremitelerde ekimozlar belirlenmiştir. Yine yapılan muayene sırasında konuşma becerisinin olmadığı ve çevreye/kendisine zarar verme eğiliminde olduğu fark edilmiştir.

### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 3 (Tablo 4.26), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen heterozigot varyanta rastlanmamışken olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 7 varyant saptanmıştır (Tablo 4.27). Birleşik heterozigotluk filtrelemesinde ise aday varyant gözlenmemiştir.

**Tablo 4.26.** TRBMFS-0108\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi. Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>MDM2</i>	12	69,210,710	c.293C>G p.Ser98Cys	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>15P6B</b>	-	?Lessel-Kubisch syndrome(OR) (Accelerated tumor formation, susceptibility to)(OD)	<i>Mdm2 protooncogene</i> p53 ü hedefleyen E3 ubiquitin ligaz	Valide edildi	<i>p53</i> metabolizmasında bozulma
<i>SPTBN5</i>	15	42,180,196	c.589G>A p.Val197Met	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>13P7B</b>	-	-	<i>Spectrin, beta, nonerythrocytic, 5</i> Hücre iskeleti	Valide edildi	Ailede sağlıklı kardeşte homozigot görülmesi sebebi ile elendi
<i>ZNF469</i>	16	88,502,259	c.8381C>T p.Thr2794Met	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P16B</b>	1-VUS 1-Likely benign	Brittle cornea syndrome 1(OR)	<i>Zinc finger protein 469</i>	-	Fenotip uygun bulunmadı, homozigosite haritasında sağlıklı kardeşte de homozigot olan bölge

**Tablo 4.27.** TRBMFS-108\_03 numaralı bireyde saptanan heterozigot *splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi. Kırmızı ile yazılan klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>SMARCE1</i>	17	38,786,960	c.1027+2_1027+6del	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	(Meningioma, familial, susceptibility to)(OD) Coffin-Siris syndrome 5(OD)	<i>Swi/snf-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1</i>	Valide edildi	Farklı doku çalışması planlandı
<i>SIGLEC15</i>	18	43,419,059	c.874+2_874+33del	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15</i> Osteoklast differansiyasyonu	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>SLC39A4</i>	8	145,639,814	c.981T>A p.Tyr327Ter	Polyphen: - Varsome: 3P5BIU	-	Acrodermatitis enteropathica(OR)	<i>Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>AMPD2</i>	1	110,168,363	c.464delA Gln155Argfs*32	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	?Spastic paraplegia 63(OR) Pontocerebellar hypoplasia, type 9(OR)	<i>Adenosine monophosphate deaminase 2</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>OR10K2</i>	1	158,390,285	c.370_372del p.Ile124del	Polyphen:- Mutation Taster: Disease causing	-	-	Olfactory receptor 10K2	Valide edildi	Annede heterozigot olarak saptanıp, elendi
<i>FGF2</i>	4	123,748,249	c.333_338del p.Arg112_Gly113del	Polyphen:- Mutation Taster:-	-	-	<i>Fibroblast growth factor 2</i> Nöron ve üst ekstremitte gelişimi	Valide edildi	Okuma sayısının düşük olduğu bölgede dizileme ile varyant saptanmadı
<i>FAT2</i>	5	150,947,635	c.854_858del p.Glu285Glyfs*9	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	Spinocerebellar ataxia 45(OD)	<i>Fat atypical cadherin 2</i>	Valide edildi	Babada heterozigot olması ve saptanan değişiklikten önce GnomAD da ileri yaşta heterozigot birey olması sebebi ile elendi

Hastada saptanan homozigot varyantlar değerlendirildiğinde, *MDM2* genindeki 4. ekzonda yer alan c.293C>G (p.Ser98Cys) değişikliğinin hastanın fenotipinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür. GnomAD veri tabanında saptanan değişikliğe ait homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır. Günümüzde *MDM2* genindeki değişiklikler yalnızca bir hastada otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak erken saç beyazlaması, boy kısalığı, hipogonadizm ve ciddi arteryal hipertansiyonun klinik bulgulara eşlik ettiği Lessel-Kubisch Sendromu (OMIM 618681) ile ilişkilendirilmiştir. Hasta ve etkilenmiş kardeş klinik bulguları ile yeniden değerlendirildiğinde Lessel-Kubisch Sendromu ile uyumlu bulunmamıştır. Ebeveynlerin aynı köyden olması sebebi ile uzak ortak atadan kalıtılan hastalık ilişkili bir varyant olabileceği göz önüne alınarak aile boyu yapılan mikrodizin analizi ile aile bireylerinin genom boyu homozigot bölgeleri belirlenmiş ve ortak homozigot bölgeler Şekil 4.8’de gösterilmiştir (Şekil 4.8). Aile boyu yapılan homozigotluk haritası incelendiğinde hasta ile etkilenmiş kardeş arasında 12q14.3q21.1 ve Xp22.3p22.2 bölgelerinin ortak homozigot bölgeler olduğu gözlenmiştir. X kromozomu üzerindeki ortak homozigot bölgede yer alan değişiklikler incelenmiş ve hastalık sebebi olabilecek varyant saptanmamıştır. 12. kromozom üzerindeki ortak homozigot alanda yer alan *MDM2* genindeki c.293C>G (p.Ser98Cys) değişikliğinin ise her iki kardeşte görülen fenotipin sebebi olabileceği düşünülmüştür. Mevcut değişiklik yapılan segregasyon analizinde anne ve babada heterozigot olarak saptanmıştır (Şekil 4.9.A).

Ayrıca hastada saptanan heterozigot varyantların değerlendirme sonucunda ise, *SMARCE1* genindeki değişikliğin hastanın klinik bulgularına katkı sağlamış olabileceği düşünülmüştür. Otozomal dominant kalıtım kalıbına uygun olarak *SMARCE1* genindeki değişiklikler boy kısalığı, mikrosefali, gelişme geriliği ve çeşitli dismorfik bulguların (kaba yüz, el parmak anomalileri vb.) eşlik ettiği Coffin Siris Tip 5 Sendromundan (OMIM 616938) sorumludur. Hastada *SMARCE1* geninde heterozigot olarak saptanan ve *splice site*’ı değiştiren c.1027+2\_1027+6del değişikliği için gnomAD veri tabanında homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır. Hasta bulguları ile yeniden değerlendirildiğinde Coffin Siris Tip 5 sendromu ile uyumlu fenotipe sahip olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.28). Bu nedenle mevcut değişikliğin somatik olabileceği

düşünölmüş ve sanger dizileme verisinden mozaiklik hesaplanmıştır. Değişikliğin %50 oranda mozaik olduğu yani heterozigot durumda olduğu saptanması sebebi ile geç postzigotik olaylar ekarte edilmiştir (Şekil 4.10). Kan dokusuna sınırlı bir değişiklik olması ihtimaline karşı farklı bir dokudan çalışma planlanmıştır.

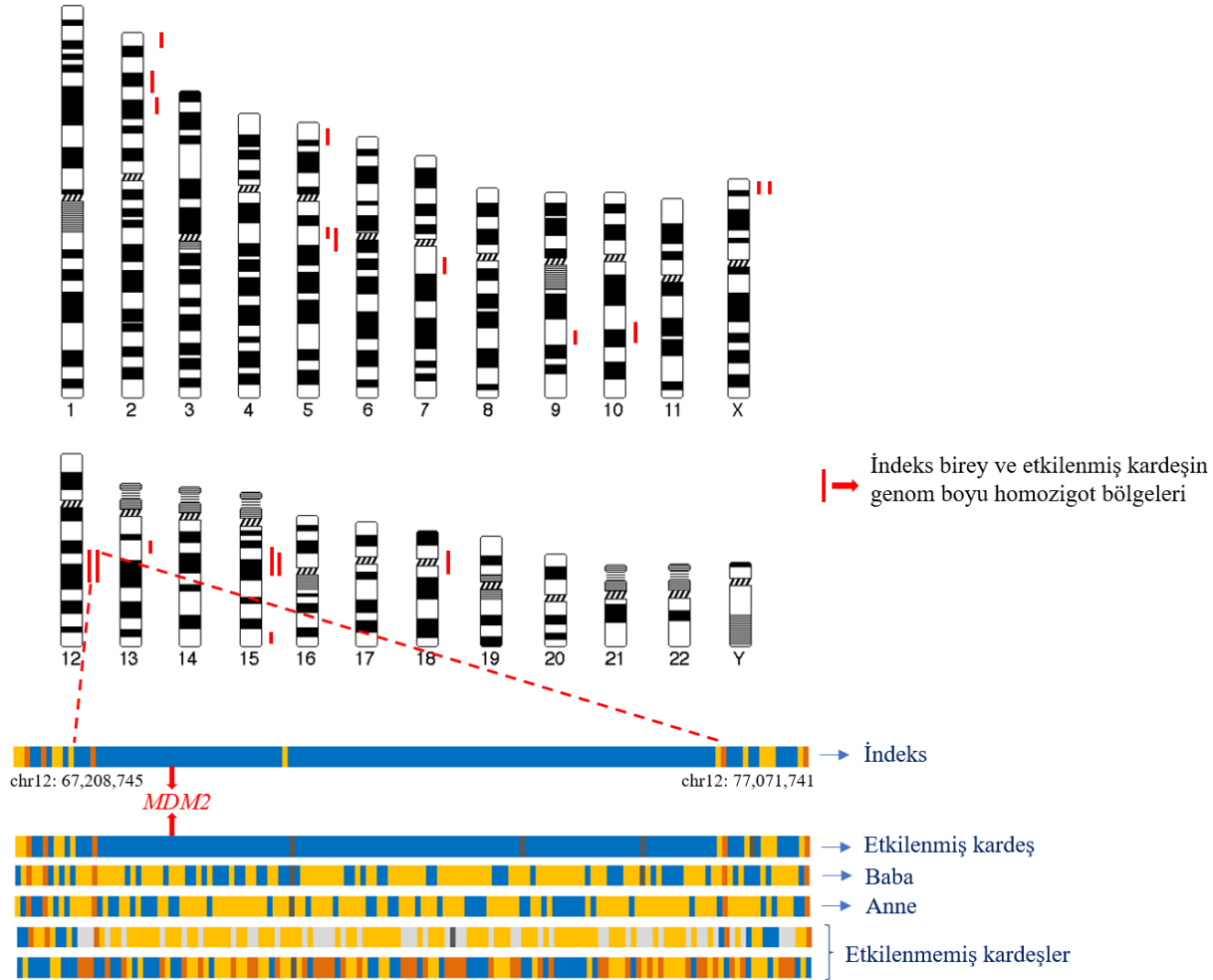
*SMARCE1* geninde saptanan değişikliğe yönelik yapılan segregasyon analizinde ise anne ve babanın değişikliği homozigot ya da heterozigot olarak bulundurmadıkları belirlenmiştir (Şekil 4.9.B).

**Tablo 4.28.** Coffin Siris 5 ile TRBMFS-0108\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	Coffin Siris Sendromu 5	TRBMFS-0108_03
IUGR	+	-
Emme/beslenme bozukluğu	+	-
Büyüme geriliği	+	+
<b><i>Dismorfik bulgular</i></b>		
Kaba yüz görünümü	+	-
Kalın kaşlar	+	+
Uzun kirpikler	+	-
Pitozis	+	-
Yarı damak	+	-
<b><i>İskelet sistem bulguları</i></b>		
El ve ayak parmak ve tırnaklarında hipoplazi/aplazi (özellikle beşinci parmaklarda)	+	-
Skolyoz	+	-
<b><i>Kardiyovasküler sistem bulgular</i></b>		
Dekstrokardi	+	-
ASD	+	-
Kapak darlıkları*	+	-
<b><i>Gastrointestinal sistem bulguları</i></b>		
Pilor stenozu	+	-
<b><i>Nörolojik bulgular</i></b>		
Hipotoni	+	-
Epileptik nöbet	+	-
Serebellar hipoplazi	+	-
CC anomalileri	+	-
Gelişme geriliği	+	+
Zihinsel yetersizlik	+	+
Davranış problemleri	+	-
<b><i>Diğer bulgular</i></b>		
İşitme kaybı	+	-
Görme problemleri	+	-
Sık enfeksiyon öyküsü	+	-

\*Aort, triküspit, mitral kapaklarda

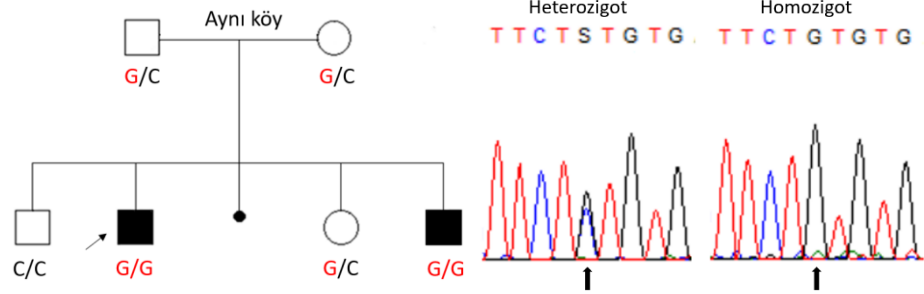




**Şekil 4.8.** TRBMFS-0108\_03 numaralı birey ve etkilenmiş kardeşin genom boyu homozigot bölgelerinin gösterimi. 5, 12, 15 ve X kromozomlarında her iki etkilenmiş kardeşin ortak homozigot segmentlere sahip olduğu görülmektedir. Etkilenmemiş aile bireyleri de analize katıldığı zaman 5q13.1-q13.2 ve 15q15.1-q21.1 bölgeleri etkilenmemiş aile bireylerinin de aynı bölgeye homozigotluk göstermeleri esas alınarak elenmiştir.

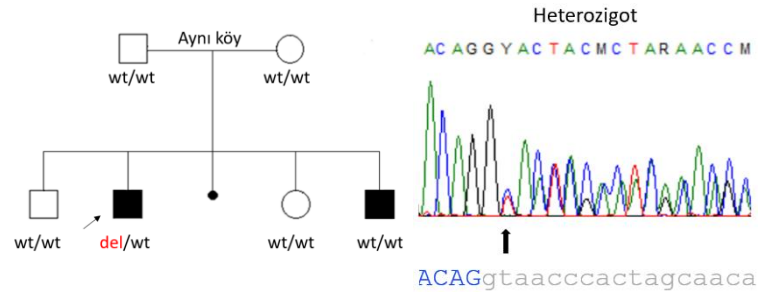
A.

*MDM2*  
c.293C>G  
p.Ser98Cys

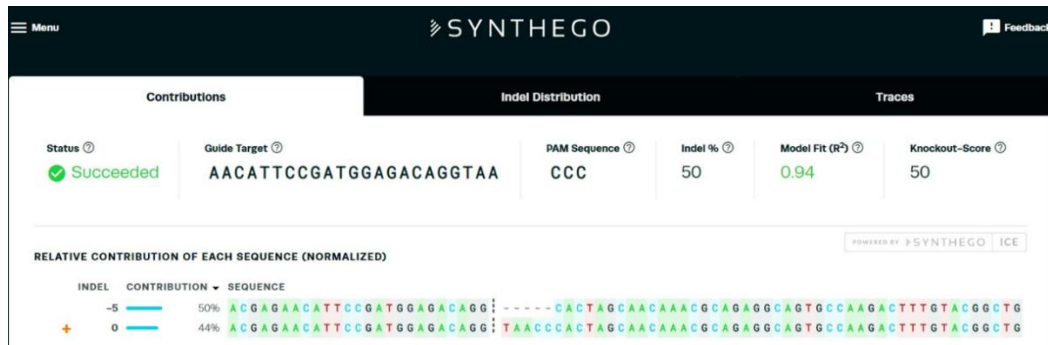


B.

*SMARCE1*  
c.1027+2\_1027+6delTAACC



**Şekil 4.9.** TRBMFS-0108\_03 numaralı bireydeki klinik bulgular ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri. A. *MDM2* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve sekans elektroferogram görünümü, B. *SMARCE1* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve sekans elektroferogram görünümü.



**Şekil 4.10.** TRBMFS-0108\_03 numaralı bireydeki *SMARCE1* genindeki varyant için sanger verisinden hesaplanan mozaiklik oranının gösterimi. Hesaplama için Sanger verisinden *CRISPR* etkinliğini değerlendirmeye yönelik kullanılan ve *online* erişimi olan *Inference of CRISPR Edits (ICE)* programı kullanılmıştır (57). İndel yüzdesi olarak görülen %50 oranı indeksteki referans olmayan dizinin oranını göstermektedir. Analiz sonucunda varyantın neredeyse tam bir heterozigot orana sahip olduğu anlaşılmaktadır.

#### 4.2.9. TRBMFS-0098\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve 38. gebelik haftasında 2900 gram doğan kız hastanın 3 yaş 6 aylık iken diş eti kanamaları nedeni ile yapılan tetkiklerinde Hb: 9,8 gr/dL, Trombosit: 70.000/mm<sup>3</sup>, ANS: 1300/μL olarak saptanmıştır. Yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde megakaryositlerde artış gösteren normosellüler kemik iliği, myeloid seride sola kayma, eritroid seride hafif şiddette megaloblastik/displastik değişiklikler saptanmıştır. Trombositopeni nedeni ile hastaya aralıklı olarak TS desteği verilmiştir. Ayrıca intrauterin dönemde yarık damak/dudak bulgusu fark edilmiş ve doğumdan sonra 3 kez yarık damak/dudak düzeltme operasyonu geçirmiştir. Yaklaşık 6 yaşında ise öncelikle üst ekstremitelerde sivilce tarzında başlayan yaralar nedeni ile çoklu antibiyotik tedavisi kullanmıştır. On bir yaşına kadar hem üst hem de alt ekstremitelerde skar bırakarak iyileşen, geniş yayımlı yaralar meydana gelmiş, bu dönemde sellülit ya da myozit ön tanıları ile birçok kez hastane yatışı olmuştur. Yapılan metabolik taramasında iminodipeptid atılımında artış saptanmıştır. On yaş altı aylık olduğu dönemden itibaren saçlarında oluşan egzama nedeni ile de takipleri devam etmektedir. Hem diş tedavisi hem de yarık damak/dudak nedeni ile operasyon planı devam eden hasta ihtiyaç duydukça TS desteği ve aylık IVIG tedavisi almaktadır.

Hastanın 12 yaşında iken yaptığımız fizik muayenesinde kilo 40,5 kg (25-50p), boy 132 cm (<3p), baş çevresi 52 cm (10-25p) ve kulaç mesafesi: 128,5 cm olarak saptanmıştır. Buna ek olarak, dar alın, frontal bossing, belirgin glabella, yukarı eğilimli palpebral aralıklar, sinofrızis, basık burun kökü, malar hipoplazi, bilateral brakidaktili, bilateral el 5. parmaklarda klinodaktili, bilateral el parmaklarında clubbing ve parmaklarda fetal pad, üst ve alt ekstremitelerde en küçüğü 5x5 cm olan yaygın yara skarları saptanmıştır. Epileptik nöbet öyküsü olmayan hastanın gelişim basamaklarını yaşlıları ile uyumlu zamanlarda kazandığı belirlenmiştir.

Hastanın kardeşinin 3 yaş 1 aylık iken yaptığımız fizik muayenesinde kilo 19,5 kg (>97p), boy 96 cm (50-75p), baş çevresi 48 cm (10-25p) olarak saptanmıştır. Ayrıca muayenede frontal bossing, belirgin glabella, hafif yukarı eğilimli palpebral aralıklar, bilateral el parmaklarında fetal pad ve clubbing yine bilateral

el 5. parmaklarda klinodaktili belirlenmiştir. Konuşma becerisini 1 yaş 6 aylık iken kazanmış olan bireyin muayene esnasında cümle kuramadığı gözlenmiştir. Diğer gelişim basamaklarını ise yaşlıları ile uyumlu zamanlarda kazandığı saptanmıştır.

### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 12 (Tablo 4.29), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen heterozigot varyanta rastlanmamışken olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 4 varyant saptanmıştır (Tablo 4.30). Birleşik heterozigotluk filtrelemesinde ise aday varyant gözlenmemiştir.

**Tablo 4.29.** TRBMFS-0098\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi.  
Klinik durumu açıkladığı düşünülen varyant bilgileri kırmızı ile gösterilmiştir.

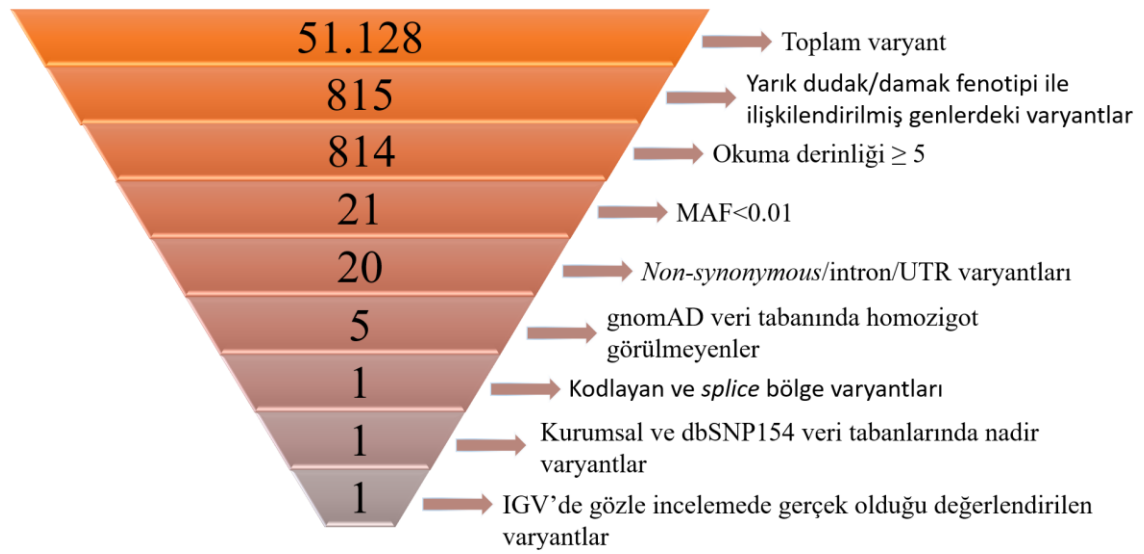
Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>PEPD</i>	19	33,954,937	c.580delG p.Val194PhefsTer16	Polyphen: Possibly damaging Mutation Taster: Disease causing	-	Prolidase deficiency(OR)	<i>Peptidase D İminodipeptidlerin katabolizması görevli</i>	Valide edildi	Prolidaz eksikliği
<i>TERF2</i>	16	69,400,738	c.1312C>G p.Gln438Glu	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P15B</b>	-	-	<i>Telomeric repeat binding factor 2 Shelterin kompleks üyesi</i>	Valide edildi	Ailede sağlıklı kardeşte de saptanıp elendi
<i>RPAP1</i>	15	41,819,663	c.1567_1569del p.Glu523del	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>RNA polimerase II associated protein 2</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>DPH2</i>	1	44,437,179	c.605G>A p.Arg202His	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P19B</b>	-	-	<i>Diphthamide biosynthesis protein 2</i> Translasyon uzama faktör 2 metabolizması	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>SELENON</i>	1	26,135,249	c.716G>A p.Arg239His	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P19B</b>	2-VUS	Muscular dystrophy, rigid spine, 1(OR) Myopathy, congenital, with fiber-type disproportion(OR/OD)	<i>Selenoprotein N</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>CSAD</i>	12	53,553,953	c.1198G>A p.Gly400Ser	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>18P3B</b>	-	-	<i>Cysteine sulfinic acid decarboxylase</i> Taurin biyosentezi	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>C12orf10</i>	12	53,700,099	c.760T>C p.Phe254Leu	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P17B</b>	-	-	<i>MYG1 exonuclease</i> Vitiligo susceptibility	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>GANC</i>	15	42,643,586	c.2591T>C p.Leu864Ser	Polyphen: Benign Varsome: <b>14P7B</b>	-	-	<i>Glucosidase, alpha, neutral C</i> Glikojen metabolizması	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ITGA11</i>	15	68,599,968	c.3241A>G p.Asn1081Asp	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P20B</b>	-	-	<i>Integrin, alpha-11</i> Hücre-hücre ve ekstrasellüler matriks etkileşimi	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>KRTAP16-1</i>	17	39,464,631	c.875C>T p.Pro292Leu	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P15B</b>	-	-	<i>Keratin-associated protein 16-1</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>KRT32</i>	17	39,623,102	c.468+8C>A	Polyphen: - Mutation Taster: Polymorphism	-	-	<i>Keratin 32, Type 1</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>RSPH10B</i>	7	6,006,669	c.79G>T p.Asp27Tyr	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>3P18B</b>	-	-	<i>Radial spoke head 10 homolog B</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi

**Tablo 4.30.** TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/*splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi.

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>TCERGIL</i>	10	133,109,862	c.32_37del p.Arg11_Arg12del	Polyphen: - Mutation Taster: Polymorphism	-	-	<i>Transcription elongation regulator 1-like protein</i>	Valide edildi	Çalışma devam ediyor
<i>PYY</i>	17	42,030,764	c.85_87dup p.Tyr29dup	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Peptide YY</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>ZNF730</i>	19	23,328,922	c.1077_1079dup p.Lys359_Ile360insMet	Polyphen: - Mutation Taster: Polymorphism	-	-	<i>Zinc finger protein 730</i> Transkripsiyon regülasyonu	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>OTOF</i>	2	26,687,812	c.4885del p.His1629ThrfsTer8	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	Auditory neuropathy, autosomal recessive, 1(OR) Deafness, autosomal recessive 9(OR)	<i>Otoferlin</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi

## Yarık Damak/Dudak Fenotipi Oluşturabilecek Gen Listesi Kullanılarak Yapılan WES Analiz Değerlendirmesi

Ayrıca hastanın WES verisi yarık damak/dudak etyolojisini aydınlatmak amacı ile hastalık sebebi olabilecek 163 geni içeren panel kullanılarak da analiz edilmiştir (Şekil 4.11). Yarık damak/dudak fenotipi ile ilişkilendirilmiş ve filtrelemede kullanılan 163 gene ait liste EK-3’de sunulmuştur. Filtreleme sonucunda elde edilen varyant ise Tablo 4.31’de listelenmiş, aile boyu segregasyon görünümü Şekil 4.12.B’de gösterilmiştir (Tablo 4.31 ve Şekil 4.12.B).



**Şekil 4.11.** TRBMFS-0098\_03 numaralı bireydeki yarık damak/dudak etyolojisini açıklamaya yönelik yapılan WES analizi filtreleme basamaklarından elde edilen varyant sayıları

**Tablo 4.31.** TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyin yarık damak/dudak etyolojisini aydınlatmak için yapılan analiz sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday varyantın özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
CHD7	8	61,769,341	c.7502C>A p.Ser2501Tyr	Polyphen: Possibly damaging Varsome: 21P2B	-	CHARGE syndrome (OD) Hypogonadotropi c hypogonadism 5 with or without anosmia (OD)	Chromodomain Helicase Dna- Binding Protein 7 Transkripsiyon regülatörü	Valide edildi	Sağlıklı aile bireylerinde saptanıp elendi

Hastada saptanan tüm aday varyantlar değerlendirildiğinde, *PEPD* genindeki homozigot değişikliğin hastanın fenotipinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür. *PEPD* genindeki değişiklikler otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak

pansitopeni, gelişme geriliği, HSM, akciğer hastalıkları, genellikle hayatın ilk onyılında başlayan ülseröz/eritematöz deri lezyonlarına eşlik eden iminodipeptidlerde artmış atılım ile karakterize Prolidaz Eksikliğinden (OMIM 170100) sorumludur. Hastada *PEPD* geninde homozigot olarak saptanan ve proteininin erken sonlanmasına sebep olan 8. ekzondaki c.580 delG (p.Val194PhefsTer16) değişikliği için gnomAD veri tabanında homozigot ya da heterozigot bir birey bilgisi bulunmamaktadır. Hasta klinik bulguları ile değerlendirildiğinde Prolidaz Eksikliği ile uyumlu olduğu bulunmuştur (Tablo 4.32).

Saptanan varyant için yapılan segregasyon analizinde anne ve babanın aynı varyantı heterozigot olarak taşıdıkları saptanmıştır (Şekil 4.12.A). Yapılan aile taramasında hastanın kardeşinin iki farklı zamanda elde edilen DNA örneklerinin her ikisinde de de değişikliğin homozigot olarak bulunduğu görülmüştür. Bunun üzerine kardeşin detaylı fizik muayenesi tamamlanmış ve 3 yaşında iken yaptığımız bu muayenede fenotip olarak hastaya benzediği ancak cilt bulgularının olmadığı saptanmıştır.

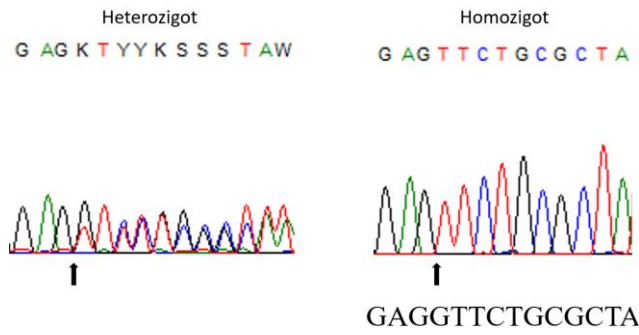
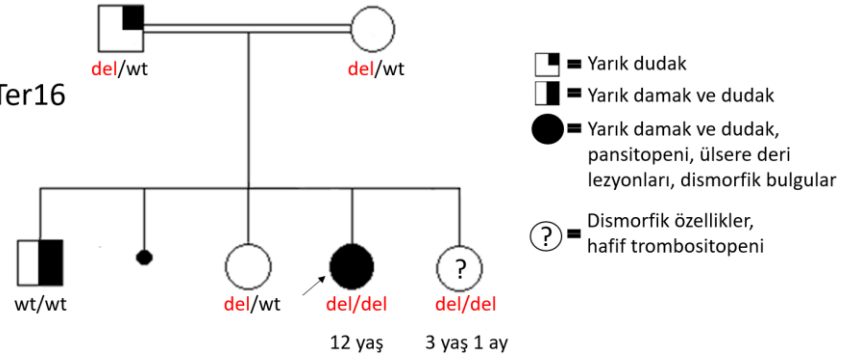


**Tablo 4.32.** Prolidaz eksikliği ile TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyin bulgularının karşılaştırılması

	<i>Prolidaz Eksikliği</i>	<i>TRBMFS-0098_03</i>	<i>TRBMFS-0098_05 (Kardes)</i>
<b><i>Büyüme bulguları</i></b>			
Büyüme geriliği	+	+	-
Boy kısalığı	+	+	-
Mikrosefali	+	-	-
Dismorfik yüz bulguları	+	+	<b>Hafif</b>
<b><i>Gastrointestinal Sistem Bulguları</i></b>			
Hepatosplenomegali	+	+	NA
<b><i>Akciğer Bulguları</i></b>			
Tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları	+	-	-
<b><i>Dermatolojik bulgular</i></b>			
Kronik ülsere lezyonlar	+	+	-
Egzema	+	+	-
Dermatit	+	-	-
Talenjektazi	+	-	-
Rash benzeri döküntüler	+	-	-
<b><i>İskelet Sistem ve Kas Bulguları</i></b>			
Osteopeni	+	-	NA
Genu valgum	+	-	-
<b><i>Üriner sistem bulguları</i></b>			
Artmış imidodipeptid atılımı	+	+	NA
<b><i>Hematolojik Sistem Bulguları</i></b>			
Anemi	+	+	-
Trombositopeni	+	+	Hafif
<b><i>Nörolojik Sistem Bulguları</i></b>			
Gelişme geriliği	+	+	+
Zihinsel yetersizlik	+	+	NA
Beyaz cevherde lezyonlar	+	-	NA
Kortikal/serebellar atrofi	+	-	NA
<b><i>Otoimmün olaylar</i></b>			
SLE/SLE benzeri bulgular	+	-	-
IgE yüksekliği	+	+	NA

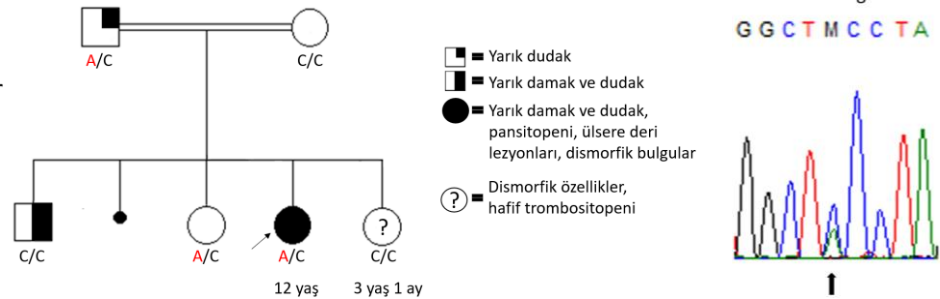
A.

*PEPD*  
c.580delG  
p.Val194PhefsTer16



B.

*CHD7*  
c.7502C>A  
p.Ser2501Tyr



**Şekil 4.12.** TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyin klinik bulguları ile uyumlu olabilecek değişikliklerin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri. A. *PEPD* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve sekans elektroferogram görünümü, B. *CHD7* genindeki değişikliğin aile boyu segregasyonu ve sekans elektroferogram görünümü.

#### **4.2.10. TRBMFS-0152\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi**

Ebeveynleri arasında akrabalık olan ve ilk kez 3 yaş 6 aylık iken vücutta oluşan ekimozları nedeni ile hastane başvurusu bulunan erkek hastanın, tetkiklerinde pansitopeni saptanmış olup, kemik iliği yetmezliği etyolojisini belirlemek amacı ile yapılan kemik iliği aspirasyon incelemesinde hafif hiposellüler, eritroid seride artış, megakaryosit seride azalma olan kemik iliği saptanmıştır. Hasta burun kanamaları ve gastrointestinal sistem kanaması olduğu dönemde TS almış olup, immünglobulin düşüklüğü nedeni ile de IVIG tedavisi başlanmıştır.

#### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 9 (Tablo 4.33), heterozigot varyant filtrelemesi sonucunda ise kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen 1 (Tablo 4.34), olası zararlı mutasyon sınıfında yer alan 4 aday (Tablo 4.35) varyant gözlenmiş olup birleşik heterozigotluk filtrelemesinde aday varyant saptanmamıştır.

Aday varyantların değerlendirilmesinde hastalıktan sorumlu olduğu düşünülen bir varyant belirlenmemiştir. Bireyin kopya sayısı değerlendirilmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.33.** TRBMFS-0152\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>DHX34</i>	19	47,884,200	c.3110C>T p.Thr1037Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P18B</b>	-	-	<i>DExH-BOX Helicase 34</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>IL13RA2</i>	X	114,248,429	c.424G>T p.Asp142Tyr	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>15P3B</b>	-	-	<i>Interleukin 13 Receptor, Alpha-2</i> IL13 etkilerini baskılama	-	Fonksiyon uygun bulunmadı (Astım ve allerjide sitokin yanıtında görevli)
<i>TMEM54</i>	1	33,361,173	c.442G>A p.Asp148Asn	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>11P9B</b>	-	-	<i>Transmembran protein 54</i> Kanser hücrelerinde hücre siklusu	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>EPHX4</i>	1	92,515,916	c.647A>T p.Tyr216Phe	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>9P12B</b>	-	-	<i>Epoxide Hydrolase 4</i> Araşidonik asit metabolizması	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>CAMSAP1</i>	9	138,710,284	c.4138A>G p.Ser1380Gly	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P18B</b>	-	-	<i>Calmodulin-Regulated Spectrin-Associated Protein 1</i> Mikrotübül stabilizasyonu	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>TASIR2</i>	1	19,181,279	c.685C>T p.Arg229Trp	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>5P14B</b>	-	-	<i>Taste Receptor Type 1, Member 2</i> Tat reseptörü	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>TIGD2</i>	4	90,034,294	c.169A>T p.Asn57Tyr	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>3P1U16B</b>	-	-	<i>Tigger Transposable Element Derived Gene 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>TIGD5</i>	8	144,680,135	c.62G>T p.Gly21Val	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>1P18B</b>	-	-	<i>Tigger Transposable Element Derived Gene 5</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>AMOT</i>	X	112,034,001	c.709A>G p.Asn237Asp	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P16B</b>	-	-	<i>Angiomotin</i> Endotel hücrelerinin göçü ve vasküler patern	-	Fonksiyon uygun bulunmadı

**Tablo 4.34.** TRBMFS-0152\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
WDR1	4	10,079,414	c.1532A>G p.Lys511Arg	Polyphen: Benign Varsome: 7P13B	-	Periodic fever, immunodeficiency, and thrombocytopenia syndrome(OR)	Wd repeat-containing protein 1 Aktin depolimerizasyonu	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp, elendi

**Tablo 4.35.** TRBMFS-0152\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/*splice-nonsense-indel* varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
DIAPH3	13	60,545,284	c.1661T>A p.Leu554Ter	Polyphen: - Varsome: 6P2B	-	Auditory neuropathy, autosomal dominant, 1 (OD)	Diaphanous-related formin 3 Aktin flamanlarının uzaması, mikrotübül stabilizasyonu	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp, elendi
PSMA8	18	23,772,282	c.679-1G>T	Polyphen: - Varsome: 6P1B	-	-	Proteasome subunit, alpha-type, 8 Spermiyogenezde sinaptonemal komplekste görevli	Valide edildi	Okuma sayısının düşük olduğu bölgede dizileme ile varyant saptanmadı
ADGRD1	12	131,605,404	c.2122_2124del p.Leu708del	Polyphen: - Mutation Taster: Polymorphism	-	-	Adhesion g protein-coupled receptor dl	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi
DLEC1	3	38,163,262	c.5010del p.Met1671Cysfs Ter2	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	-	Deleted in lung and esophageal cancer 1	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp, elendi

#### 4.2.11. TRBMFS-0238\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akrabalık bulunmayan ve ilk kez 2 yaş 6 aylık iken ateşli olduğu dönemde değerlendirilen tetkiklerinde en düşük değerleri Hb: 10.4 gr/dL, ANS: 0/ $\mu$ L, Trombosit: 295.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanan kız hastanın bisitopeni etyolojisini araştırmak amacı ile yapılan kemik iliği aspirasyon biyosisinde megakaryositlerde artış, megaloblastik değişiklikler ve displazi izlenmiştir. Nötropeni etyolojisi araştırılmasına yönelik yapılan *SBDS*, *CSF3R*, *HAX-1*, *ELA2*, *G6PC3*, *ADA2* gen dizi analizlerinde fenotip ile ilişkili patojenik varyant saptanmamış ve hasta G-CSF tedavisi ile izlenmeye başlanmıştır.

Hasta 8 yaşında iken yapılan değerlendirmede gelişim basamaklarını yaşıtları ile benzer zamanlarda kazandığı ve eşlik eden bir klinik bulgusunun olmadığı saptanmıştır.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

WES analizinde homozigot varyantlara yönelik yapılan filtreleme basamakları sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday varyant elde edilmemiştir. Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtreleme basamakları sonucunda kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturması beklenen 2 (Tablo 4.36), olası zararlı mutasyon sınıfında olan 7 aday varyant (Tablo 4.37) belirlenmiş olmasına rağmen bu varyantların hiçbirisi mevcut klinik tablo ile ilişkilendirilememiştir. Bireyin kopya sayısı değerlendirmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.36.** TRBMFS-0238\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>FANCM</i>	14	45,645,531	c.3574G>A p.Asp1192Asn	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P23B</b>	-	?Premature ovarian failure 15 (OR) Spermatogenic failure 28 (OR)	<i>Fanconi anemia-associated polypeptide fancd</i> monoubiquitinizasyonu	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>GATA1</i>	X	48,652,266	c.937G>C p.Gly313Arg	Polyphen: Benign Varsome: <b>9P1U10B</b>	-	Anemia, X-linked, with/without neutropenia and/or platelet abnormalities(XLR) Leukemia, megakaryoblastic, with or without Down syndrome, somatic Thrombocytopenia with beta-thalassemia, X-linked(XLR) Thrombocytopenia, X-linked, with or without dyserythropoietic anemia(XLR)	<i>Erythroid transcription factor 1</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi

**Tablo 4.37.** TRBMFS-0238\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday heterozigot/*splice-nonsense-indel* varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>DICER1</i>	14	95,570,189	c.3544C>T p.Gln1182Ter	Polyphen: - Varsome: <b>5P4B</b>	-	GLOW syndrome, somatic mosaic Goiter, multinodular 1, with or without Sertoli-Leydig cell tumors (OD) Pleuropulmonary blastoma (OD) Rhabdomyosarcoma, embryonal, 2	<i>Ribonuclease III</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>CCDC142</i>	2	74,702,854	c.1483-1G>T	Polyphen: - Varsome: <b>6P0B</b>	-	-	Coiled-coil domain containing 142	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>STEAP1B</i>	7	22,533,082	c.458G>A p.Trp153Ter	Polyphen: - Varsome: <b>4P2U3B</b>	-	-	<i>STEAP family member 1</i> Prostat kanserinde overekspresye	<i>Steap1</i> geni ile yüksek homoloji nedeni ile valide edilemedi	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>TMEM88B</i>	1	1,363,023	c.348del p.Pro117Arg fsTer13	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Transmembrane protein 88B</i>	Valide edildi	Babada heterozigot saptanıp elendi
<i>OTOG</i>	11	17,632,692	c.5883del p.Glu1962Argfs Ter17	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	Deafness, autosomal recessive 18B (OR)	<i>Otogelin</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>XIRP2</i>	2	168,108,448	c.10548del p.Phe3516Leufs Ter2	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Xin actin-binding repeat-containing protein 2</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi
<i>TXLNB</i>	6	139,564,155	c.1547_1563del p.Thr516Arg fsTer14	Polyphen: Benign Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Taxilin, beta</i>	Valide edildi	Annede heterozigot saptanıp elendi



#### 4.2.12. TRBMFS-0042\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve ilk kez 4 aylık iken hareketlerinde azalma ve beslenmesinde bozulma olan kız hastanın bu dönemde yapılan tetkiklerinde Hb: 11 gr/dL, Trombosit: 48.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanmıştır. Bisitopeni etyolojisini belirlemeye yönelik yapılan kemik iliği aspirasyonunda malignite ile uyumlu bulunmayan selüler ve ağır displazili kemik iliği saptanmıştır. DEB testinde ise kromozomal kırık artışı saptanmamıştır. Ayrıca dismorfik bulgular (kaba yüz görünümü, kaba saç yapısı, gingival hipertrofi, yaygın diş çürükleri, üst ve alt ekstremitelerde fleksiyon postürü ve tonus artışı), global gelişim geriliği, hipotoni, HSM bulguları da olan hastanın takipleri sırasında pansitopeni gelişmiş ve kemik iliği yetmezliği etyolojisi araştırıldığı sırada hayatını kaybetmiştir.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtreleme sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 23 (Tablo 4.38), heterozigot varyant filtreleme sonucunda ise kemik iliği yetmezliği bulgusu oluşturmaya beklenen 2 aday varyant tespit edilmiştir (Tablo 4.39), Filtreleme basamakları sonucunda olası zararlı mutasyon sınıfında bulunan 150 varyant tespit edilmiş olup olup, bu varyantların IGV programı kullanılarak göz ile değerlendirilmesi devam etmektedir. Birleşik heterozigotluk filtrelemesinde ise kritik aday saptanmamıştır.

Hastada saptanan aday varyantlar değerlendirildiğinde, hasta fenotipi ile uyumlu varyant saptanmamıştır. Hastanın genom boyu kopya sayısı değişiklikleri değerlendirildiğinde 2q32.1 bölgesinde saptanan 309 kbp'lik direkt olarak hastalık ile ilişkilendirilemeyen klinik önemi bilinmeyen delesyon *de-novo* olarak saptanmıştır. Delesyon bölgesinde 1 tane OMIM geninin (*ZC3H15*) olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 4.38.** TRBMFS-0042\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>CLEC3B</i>	3	45,077,337	c.530C>A p.Ser177Ter	Polyphen: - Varsome: <b>4P1U5B</b>	-	-	<i>Tetranectin</i> Osteogenezis mineralizasyon fazında etkili plazminojen bağlayıcı protein	Valide edildi	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>GPN3</i>	12	110,897,661	c.164G>A p.Arg55Gln	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>14P6B</b>	-	-	GPN-Loop GTPase 3 RNA Pol. II'nin düzgün lokalizasyonu	Valide edildi	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>DGKG</i>	3	185,906,044	c.2042G>A p.Arg681Gln	Polyphen: Benign Varsome: <b>7P13B</b>	-	-	<i>Diacylglycerol kinase, gamma</i>	Valide edildi	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>AXL</i>	19	41,762,444	c.2124C>G p.Ile708Met	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>11P9B</b>	-	-	<i>AXL Receptor tyrosine kinase</i>	Valide edildi	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ZNF180</i>	19	44,981,209	c. 1489C>T p.Gln497Ter	Polyphen: - Varsome: <b>6P1U3B</b>	-	-	<i>Zinc finger protein 180</i> Melanomada kötü prognoz	Valide edildi	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>SEMA3F</i>	3	50,223,433	c.1699G>A p.Ala567Thr	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>13P7B</b>	-	-	<i>Semaphorin 3F</i> Nöron migrasyonu	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ZSCAN30</i>	18	32,834,237	c.662C>T p.Ser221Phe	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P18B</b>	-	-	<i>Zinc finger and SCAN domain containing 30</i> Transkripsiyon regülasyonu	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>YEATS2</i>	3	183,503,986	c.2810A>G p.Gln937Arg	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P17B</b>	-	?Epilepsy, myoclonic, familial adult, 4 (OD)	<i>Yeats domain-containing protein 2</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>PRICKLE2</i>	3	64,145,695	c.317G>A p.Ser106Asn	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P18B</b>	-	-	<i>Prickle, planar cell polarity protein 2</i> Nöronal yapı-fonksiyonu	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>RP1L1</i>	8	10,467,988	c.3620C>G p.Ser1207Cys	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>6P2U11B</b>	-	Occult macular dystrophy (OD) Retinitis pigmentosa 88 (OR)	<i>RP1-Like protein 1</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>SLC18A1</i>	8	20,036,746	c.374G>T p.Cys125Phe	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>7P1U14B</b>	-	-	<i>Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı

**Tablo 4.38 (Devamı)** TRBMFS-0042\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

<i>MUC16</i>	19	9,071,065	c.16381G>A p.Asp5461Asn	Polyphen: - Varsome: <b>1P19B</b>	-	-	<i>Mucin 16</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>AGRN</i>	1	987,189	c.5645C>T p.Thr1882Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>6P14B</b>	2-VUS	Myasthenic syndrome, congenital, 8, with pre- and postsynaptic defects (OR)	<i>Agrin</i> Nöral regülatör	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>PLCH2</i>	1	2,430,250	c.2417G>A p.Arg806His	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>14P6B</b>	-	-	<i>Phospholipase c, eta-2</i> İkincil haberci mekanizması	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>KIF9</i>	3	47,307,226	c.910T>A p.Ser304Thr	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>19P3B</b>	-	-	<i>Kinesin family member 9</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>PCDHGC4</i>	5	140,866,626	c.1886G>A p.Arg629Gln	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>14P6B</b>	-	-	<i>Protocadherin-gamma, subfamily c, member 4</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ZNF618</i>	9	116,811,870	c.2288C>T p.Thr763Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P20B</b>	-	-	<i>Zinc finger protein 618</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>ZNF770</i>	15	35,274,005	c.1631A>G p.Asn544Ser	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P1U20B</b>	-	-	<i>Zinc finger protein 770</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>KIAA1328</i>	18	34,646,914	c.638G>C p.Ser213Thr	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>5P16B</b>	-	-	<i>Hinderin</i> Anafazda kardeş kromatidlerin erken ayrılmasını düzenleme	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>FBXO15</i>	18	71,790,624	c.1117C>T p.Arg373Cys	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>6P16B</b>	-	-	<i>F-box only protein 15</i> Protein-ubiquitin ligaz	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>CNDP2</i>	18	72,173,253	c.367+7G>A	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Carnosine dipeptidase 2</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>EXOC3L2</i>	19	45,731,499	c.116G>A p.Arg39His	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P20B</b>	-	-	<i>Exocyst complex component 3-like 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>TBX1</i>	22	19,751,670	c.513-8C>T	Polyphen: - Mutation Taster: Polymorphism	-	Conotruncal anomaly face syndrome DiGeorge syndrome (OD) Tetralogy of Fallot (OD) Velocardiofacial syndrome (OD)	<i>T-box transcription factor 1</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı

**Tablo 4.39.** TRBMFS-0042\_03 numaralı bireyin kemik iliği yetmezliği bulgusu ile ilişkilendirilen heterozigot varyantlarının özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>FANCM</i>	14	45,645,252	c.3295C>A p.Arg1099Ser	Polyphen-Benign <b>0P23B</b>	-	?Premature ovarian failure 15 (OR) Spermatogenic failure 28 (OR)	<i>Fanconi anemia-associated polypeptide</i> FANCD monoubiquitinasyonu	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi
<i>CEP152</i>	15	49,030,787	c.4792A>T p.Thr1598Ser	Polyphen-Benign <b>1P21B</b>	-	Microcephaly 9, primary, autosomal recessive (OR) Seckel syndrome 5 (OR)	<i>Centrosomal protein, 152</i>	-	Kalıtım kalıbı uyumsuzluğu nedeni ile elendi

#### 4.2.13. TRBMFS-0133\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akrabalık olan ve ilk kez 11 aylık iken sık enfeksiyon nedeni ile değerlendirilen kız hastanın tetkiklerinde Hb: 13.1 gr/dL, ANS: 600/ $\mu$ L, Trombosit: 291.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanması üzerine nötrojeni etyolojisi araştırılmaya başlanmıştır. Bu amaçla yapılan kemik iliği aspirasyonunda malignite ile uyumlu olmayan sellüler, promiyelosit-myelositlerde artış ve myeloid seride duraklama saptanmıştır.

Hasta 9 yaşında iken yapılan değerlendirmede gelişim basamaklarını yaşlıları ile benzer zamanlarda kazandığı ve sık üst solunum yolu enfeksiyonu geçirdiği saptanmıştır. Hastanın siklik nötrojeni bulgusunun yanında eşlik eden başka bir sistemik bulgusunun olmadığı belirlenmiştir.

#### WES Analizinde Homozigot Varyant Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 2 (Tablo 4.40) varyant tespit edilmiş, ancak mevcut klinik ile ilişkisi kurulamamıştır. Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtrelemede kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmiş genlerde ve birleşik heterozigotluk filtrelemesinde kritik aday belirlenmemiştir. Filtreleme basamakları sonucunda olası zararlı mutasyonlara yönelik toplam 182 varyant saptanmış olup IGV programı

kullanılarak göz ile analiz devam etmektedir. Bireyin kopya sayısı değerlendirmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.40.** TRBMFS-0133\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>C7ORF57</i>	7	48,086,169	c.463G>A p.Val155 Ile	Polypen-Benign <b>0P</b> 20B	-	-	<i>Chromosome 7 open reading frame 57</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>DIS3L</i>	15	66,586,050	c.116C>G p.Pro39 Arg	Polypen-Benign <b>1P</b> 20B	-	-	<i>Dis3-like exosome 3-prime-5-prime exoribonuclease RNA işlenmesi</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi

#### 4.2.14. TRBMFS-0210\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve ilk kez 4 aylık iken sık enfeksiyon geçirmesi sebebi ile değerlendirilen kız hastanın tetkiklerinde Hb: 9.4 gr/dL, ANS: 600/ $\mu$ L, Trombosit: 256.000/ $\text{mm}^3$  saptanmış olup bisitopeni etyolojisine yönelik yapılan kemik iliği aspirasyon biyopsisinde MDS'den şüphelenilse de MDS paneli (FISH ile trizomi 8, 7q delesyonu/monozomi 7, 5q delesyonu açısından değerlendirme) normal olarak sonuçlanmıştır. DEB testinde de kromozomal kırık artışı saptanmayan hasta G-CSF tedavisi ile izlenmeye devam etmektedir.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 9 (Tablo 4.41) varyant tespit edilmiş, ancak hastalık ile ilişkisi kurulamamıştır. Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtrelemede kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmiş genlerde ve birleşik heterozigotluk filtrelemesinde kritik aday belirlenmemiştir. Olası zararlı mutasyonlara yönelik filtrelemede ise toplam 206 varyant saptanmış olup IGV programı kullanılarak göz ile analiz devam etmektedir. Bireyin kopya sayısı değerlendirmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.41.** TRBMFS-0210\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>ARMC6</i>	19	19,168,246	c.1315C>T p.Arg439Ter	Polyphen: - Varsome: <b>8P0B</b>	-	-	<i>Armadillo Repeat Containing 6</i>	Valide edildi	Aile bireylerinin örneklerine ulaşılamadığı için segregasyon çalışması yapılamadı
<i>FCHO1</i>	19	17,897,438	c.2482G>T p.Gly828Cys	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>13P1U9B</b>	-	Immunodeficiency 76 (OR)	<i>Fch domain only protein 1</i> Endositoz	Valide edildi	Aile bireylerinin örneklerine ulaşılamadığı için segregasyon çalışması yapılamadı
<i>STPG1</i>	1	24,696,200	c.701G>A p.Ser234Asn	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P22B</b>	-	-	<i>Sperm-tail pg-rich repeat-containing protein 1</i> Mismatch tamir	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>KIF26A</i>	14	104,642,936	c.3811C>T p.Pro1271Ser	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P21B</b>	-	-	<i>Kinesin family member 26a</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>EPHA8</i>	1	22,903,043	c.493A>G p.Lys165Glu	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>14P8B</b>	-	-	<i>Ephrin receptor epha8</i> Aksonal büyüme	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>LACTBL1</i>	1	23,279,604	c.1672G>A p.Asp558Asn	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>5P5B</b>	-	-	<i>Lactamase beta like 1</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ZNF839</i>	14	102,786,386	c.284C>T p.Pro95Leu	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>5P15B</b>	-	-	<i>Zinc finger 839</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi
<i>COL5A3</i>	19	10,104,478	c.1592G>A p.Arg531His	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>17P6B</b>	-	-	<i>Collagen, type v, alpha-3</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>ZNF66</i>	19	20,988,761	c.355A>G p.Ser119Gly	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>0P12B</b>	-	-	<i>Zinc finger 66</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi

#### 4.2.15. TRBMFS-0242\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olmayan kız hasta kronik konstipasyon nedeni ile araştırıldığı sırada yapılan tetkiklerinde Hb: 8.8 gr/dL, ANS: 700/ $\mu$ L, Trombosit: 118.000/mm<sup>3</sup> saptanması üzerine kemik iliği yetmezliği etyolojisi araştırılmaya başlanmıştır. Hastanın devamlı görülen anemi bulgusuna ek olarak nötrofil ve trombosit değerlerinin değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Yapılan kemik iliği incelemesinde megaloblastik değişikliklere sahip, malignite bulgusu olmayan sellüler kemik iliği bulunmuştur. Hasta anemi bulgusuna yönelik ihtiyaç duyması halinde ES tedavisi ile takip edilmeye devam etmektedir.

Hasta 3 yaş 6 aylık iken yapılan değerlendirmede gelişim basamaklarını yaşlıları ile eş zamanlı kazandığı ve sık enfeksiyon geçirmesi dışında herhangi bir bulgusunun olmadığı saptanmıştır.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 2 varyant tespit edilmiş, ancak hastalık ile ilişkisi kurulamamıştır (Tablo 4.42). Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtrelemede kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmiş genlerde ve birleşik heterozigotluk filtrelemesinde kritik aday belirlenememiştir. Olası zararlı mutasyonlara yönelik filtrelemede ise toplam 215 varyant saptanmış olup IGV programı kullanılarak göz ile analiz devam etmektedir. Bireyin kopya sayısı değerlendirmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.42.** TRBMFS-0242\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>HYAL4</i>	7	123,516,806	c.1045-2A>T	Polyphen: - Varsome: <b>5P1B</b>	-	-	<i>Hyalurono glucosamini dase 4</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>EFCAB14</i>	1	47,150,259	c.1090A>G p.Asn364Asp	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P23B</b>	-	-	<i>Ef-hand calcium-binding domain-containing protein 14</i>	-	In-silico değerlendirme ile elendi

#### **4.2.16. TRBMFS-0256\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi**

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve doğumda değerlendirilen tetkiklerinde Hb: 12.7 gr/dL, ANS: 3700/ $\mu$ L, Trombosit: 29.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanan erkek hastanın trombositopeni etyolojisini aydınlatmaya yönelik yapılan kemik iliği aspirasyon incelemesinde megakaryosit görülmüş olup ek bir bulgu saptanmamıştır. Erken saç beyazlaması dışında kemik iliği yetmezliğine eşlik eden sistemik bulgusu olmayan hastada dış merkezde klinik ekzom sekanslama yapılmış ve fenotip ile ilişkili patojenik bir varyant saptanmamıştır. Hasta steroid ve gerek duydukça TS ile izlenmeye devam etmektedir.

Hasta 4 yaşında iken yapılan değerlendirmede kilo 13 kg (<3p), boy 90 cm (<3p) olup, steroid tedavisine bağlı adrenal yetmezlik ve bilateral katarakt nedeni ile takibe başlanıldığı öğrenilmiştir. Gelişim basamaklarını yaşlıları ile benzer zamanlarda kazanmış olan hastada minör dismorfik yüz bulguları (dar alın, düşük ön saç çizgisi, kalın kaşlar, basık burun kökü, aşağı eğilimli palpebral aralıklar) dışında ek bir bulgu saptanmamıştır.

#### **WES Analiz Değerlendirmesi**

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 21 varyant tespit edilmiş olmasına karşın bu varyantların hiçbiri mevcut klinik ile ilişkilendirilememiştir (Tablo 4.43). Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtrelemede kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmiş genlerde ve birleşik heterozigotluk filtrelemesinde kritik aday belirlenememiştir. Olası zararlı mutasyonlara yönelik filtrelemede ise toplam 202 varyant saptanmış olup IGV programı kullanılarak göz ile analiz devam etmektedir. Bireyin kopya sayısı değerlendirilmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.



**Tablo 4.43.** TRBMFS-0256\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	<i>In-silico</i> (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>ZNF75D</i>	X	134,428,054	c.13G>T p.Glu5Ter	Polyphen: - Varsome: <b>3P1B</b>	-	-	<i>Zinc finger protein 75D</i>	Valide edildi	PLI o/e oranı: 0.96 olması ve gende LoF'a yol açacak varyantın homozigot görülmesi sebebi ile elendi
<i>CD163</i>	12	7,640,564	c.1540G>A p.Val514Ile	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>11P11B</b>	-	-	<i>Hemoglobin scavenger receptor Haptoglobulin-hemoglobin kompleksi ile hemoglobin yıkılması</i>	Valide edildi	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>CORO6</i>	17	27,943,817	c.907_913del p.Val303Thrf5Ter2	Polyphen: Probably damaging Mutation Taster: Disease causing	-	-	<i>Coronin 6 Aktin bağlayıcı protein</i>	Valide edildi	Babada homozigot saptanıp elendi
<i>AASDH</i>	4	57,219,729	c.1417G>A p.Ala473Thr	Polyphen: Benign Varsome: <b>8P14B</b>	-	-	<i>Aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>CDCA3</i>	12	6,958,806	c.467G>C p.Arg156Thr	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P21B</b>	-	-	<i>Cell division cycle-associated protein 3</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>NHSL2</i>	X	71,359,290	c.1892G>A p.Ser631Asn	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P16B</b>	-	-	<i>NHS-like protein 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>HCN2</i>	19	616,278	c.2474C>T p.Pro825Leu	Polyphen: Benign Varsome: <b>8P14B</b>	-	Febrile seizures, familial, 2 (OD) Generalized epilepsy with febrile seizures plus, type 11 (OD) (Epilepsy, idiopathic generalized, susceptibility to, 17) (OD)	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>STX6</i>	1	180,971,756	c.286C>T p.Arg96Trp	Polyphen: Possibly damaging Varsome: <b>20P2B</b>	-	-	<i>Syntaxin 6 Hücre içi iletişim</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>SNAP47</i>	1	227,954,668	c.1132C>G p.Leu378Val	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P19B</b>	-	-	<i>Synaptosome-associated protein 47</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>FAT1</i>	4	187,527,259	c.10315G>A p.Val3439Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P22B</b>	-	-	<i>Fat atypical cadherin 1</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>CEMIP2</i>	9	74,305,069	c.3790G>C p.Val1264Leu	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P21B</b>	-	-	<i>Transmembrane protein 2</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirmede elendi

**Tablo 4.43 (Devamı).** TRBMFS-0256\_03 numaralı bireyin ekzom analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

<i>KIAA1958</i>	9	115,408,089	c.1331C>T p.Thr444Ile	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P</b> 22B	-	-	<i>Kiaa1958 gene</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>FDXACB1</i>	11	111,745,821	c.1700T>C p.Ile567Thr	Polyphen: Benign Varsome: <b>7P</b> 15B	-	-	<i>Ferredoxin-fold anticodon binding domain containing 1 rRNA islenmesi</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>BIN2</i>	12	51,696,879	c.209C>G p.Ala70Gly	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>13P</b> 8B	-	-	<i>Bridging integrator 2 Adaptör protein</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı
<i>HELB</i>	12	66,703,975	c.1267G>A p.Asp423Asn	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P</b> 18B	-	-	<i>Helicase, DNA, B</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>SLC35E3</i>	12	69,141,738	c.431A>G p.Asn144Ser	Polyphen: Benign Varsome: <b>2P</b> 18B	-	-	<i>Solute carrier family 35 member E3</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>LRRIQ1</i>	12	85,449,854	c.1283A>G p.Asp428Gly	Polyphen: Benign Varsome: <b>0P</b> 22B	-	-	<i>Leucine-rich repeats and IQ motif containing 1</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>RFLNA</i>	12	124,798,904	c.241C>G p.Leu81Val	Polyphen: Benign Varsome: <b>3P</b> 18B	-	-	<i>Family with sequence similarity 101, member A</i>	-	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>TMEM132D</i>	12	130,184,731	c.592C>T p.Leu198Phe	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P</b> 19B	-	-	<i>Transmembrane protein 132D</i>	--	<i>In-silico</i> değerlendirme ile elendi
<i>SLC28A1</i>	15	85,432,079	c.173C>T p.Pro58Leu	Polyphen: Benign Varsome: <b>1P</b> 21B	-	[Uridine-cytidineuria] (OR)	<i>Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>SSH2</i>	17	28,029,992	c.277C>T p.Arg93Trp	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>13P</b> 9B			<i>Slingshot protein phosphatase 2 Aktin dinamıkları</i>	-	Fonksiyon uygun bulunmadı

#### 4.2.17. TRBMFS-0265\_04 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olmayan erkek hastanın doğum sonrası değerlendirilen tetkiklerinde Hb: 11.6 gr/dL, ANS: 100/ $\mu$ L, Trombosit: 323.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanmış olup konjenital nötropeni nedeni ile araştırılmaya başlanmıştır. Hastanın etyoloji aydınlatılmasına yönelik yapılan kemik iliği incelemesinde anormal bulgu saptanmamıştır. Hastanın ablasında da konjenital nötropeni saptanmış olup, bu nedenle takipleri devam etmektedir.

Hasta 2 yaş 6 aylık iken yapılan değerlendirmede gelişim basamaklarını yaşlıları ile benzer zamanlarda kazandığı buna ek olarak allerjik astım ön tanısı ile steroid tedavisine başlandığı öğrenilmiştir. Hastanın ve ablasının sık enfeksiyon geçirme haricinde ek bir şikayetin ve bulgusunun olmadığı saptanmıştır.

#### WES Analiz Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 2 varyant tespit edilmiş olmasına karşın bu varyantlar mevcut klinik ile ilişkilendirilememiştir (Tablo 4.44). Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtrelemede kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmiş genlerde ve birleşik heterozigotluk filtrelemesinde kritik aday belirlenememiştir. Olası zararlı mutasyonlara yönelik filtrelemede ise toplam 216 varyant saptanmış olup IGV programı kullanılarak göz ile analiz devam etmektedir. Bireyin kopya sayısı değerlendirilmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.44.** TRBMFS-0265\_04 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
<i>PHEX</i>	X	22,239,868	c.1899+8 C>T	Polyphen: - Mutation Taster: Disease causing	-	Hypophosphatemic rickets, X-linked dominant (XLD)	<i>Phosphate-regulating endopeptidase homolog, X-linked</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı
<i>IRS4</i>	X	107,977,569	c.2006A>G p.Glu669 Gly	Polyphen: Benign Varsome: <b>4P16B</b>	-	Hypothyroidism congenital, nongoitrous, 9 (XLR)	<i>Insulin receptor substrate 4</i>	-	Klinik bulgular uyumlu bulunmadı

#### 4.2.18. TRBMFS-0077\_03 numaralı Bireyin Klinik Bulguları ve WES Analiz Değerlendirmesi

Ebeveynleri arasında akraba evliliği olan ve 5 yaşında iken değerlendirilen tetkiklerinde Hb: 8.3 gr/dL, ANS: 1700/ $\mu$ L, Trombosit: 11.000/mm<sup>3</sup> olarak saptanan kız hastanın kemik iliği yetmezliği etyolojisini aydınlatmaya yönelik dış merkez tarafından >43 kemik iliği yetmezliği ilişkili geni kapsayan panel analizi yapılmış ve fenotip ile ilişkili patojenik varyant saptanmamıştır. Kemik iliği yetmezliğine yönelik replasman tedavileri devamlı hale gelen hasta 8 yaşında KİT olmuştur.

Hasta 9 yaşında iken yapılan değerlendirmede kemik iliği yetmezliği bulgusunun KİT ardından düzeldiği, gelişim basamaklarını yaşlıları ile benzer zamanlarda kazandığı ve eşlik eden herhangi bir sistemik bulgusunun olmadığı saptanmıştır.

#### WES Analizinde Homozigot Varyant Değerlendirmesi

Homozigot varyant filtrelemesi sonucunda hastalıktan sorumlu olmaya aday 1 varyant tespit edilmiş, ancak mevcut klinik ile ilişkilendirilememiştir (Tablo 4.45). Heterozigot varyantlara yönelik yapılan filtrelemede kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkilendirilmiş genlerde ve birleşik heterozigotluk filtrelemesinde kritik aday belirlenmemiştir. Olası zararlı mutasyonlara yönelik filtrelemede ise toplam 194 varyant saptanmış olup IGV programı kullanılarak göz ile analiz devam etmektedir. Bireyin kopya sayısı değerlendirilmesi de normal olarak saptandığı için bu indeks vaka henüz çözülmemiş kemik iliği yetmezlikleri sınıflamasında kalmıştır.

**Tablo 4.45.** TRBMFS-0077\_03 numaralı bireydeki hastalıktan sorumlu olmaya aday homozigot varyantların özelliklerinin değerlendirilmesi

Gen	Chr	Lokasyon (bp)	Varyant bilgisi	In-silico (varsome-polyphen)	Clinvar	Hastalık Bilgisi	Gen-Fonksiyon bilgisi	Sanger validasyon	Sonuç
ADH6	4	100,130,004	c.649G>A p.Ala217Thr	Polyphen: Probably damaging Varsome: <b>13P9B</b>	-	-	Alcohol Dehydrogenase 6	-	Fonksiyon uyumlu bulunmadı

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında klinik ve genetik olarak oldukça heterojen bir grup olan karakterize edilemeyen kalıtsal kemik iliği yetmezliklerinin genetik etyolojisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çalışılan kohortun %47'sinde (n=8) her biri farklı genlerde (*EFL1*, *TERT*, *MYH9*, *TCN2*, *VPS13B*, *PEPD*, *SLC7A7* ve *MDM2*) hastalıktan sorumlu olan genetik değişiklikler saptanmış, 1 bireyde ise 2q32.1 bölgesinde *ZC3H15* genini içeren, klinik önemi bilinmeyen, *de-novo* delesyon belirlenmiştir. Literatürde daha geniş hasta kohortu ile çalışılan bir yayında da hastalık etyolojisinin belirlenme oranı bizim çalışmamıza benzer şekilde %48 olarak bulunmuştur (44). Yapılan ileri genetik analizlere rağmen hastaların yaklaşık yarısında genetik nedenin saptanamaması genomda kodlamayan bölgelerin analizlerinin de bu hasta grubu için önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Ülkemizde akraba evliliklerinin sık oluşu genetik etyolojisi büyük oranda çözülmemiş olan bu grupta otozomal resesif kalıtım kalıbı ile uyumlu hastalık genlerinin bulunmasını kolaylaştırmaktadır. Tez çalışması kapsamında genetik etyolojisi belirlenen 8 hasta değerlendirildiğinde 1 indeks birey haricinde diğer tüm bireylerde kemik iliği yetmezliğine neden olabilecek genlerde homozigot mutasyonlar saptanmıştır. Birleşik heterozgotluk ise hiç gözlenmemiştir. Buna karşın, literatürde 179 indeks bireyin katılımı ile yapılan çalışmada genetik etyolojisi belirlenen 86 bireyden 16 tanesinde kemik iliği yetmezliğine neden olabilecek genlerde birleşik heterozgotluk belirlenmiş olup sadece 12 bireyde homozigot mutasyonlar bulunmuştur (44). Bu da çalışma kohortumuzdaki yüksek akraba evliliği oranı ile uyumlu olarak hastalıktan sorumlu homozigot varyantların saptanması olasılığının bizim toplumumuzda anlamlı ölçüde yüksek olduğunu desteklemektedir (Odds oranı: 68,25; %95 C.I : 4.87-382.74; p=0.0007). Sunulan tez çalışmasında homozigot *MDM2* gen mutasyonunun karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri ile ilk kez ilişkilendirildiği de göz önüne alındığında toplumumuzda yeni nesil dizileme verisinde öncelikli olarak homozigot varyantlara odaklanılmasının klinik açıdan karmaşık özelliklere sahip bu hastalık spektrumuna yol açan yeni genlerin bulunmasında da ne denli güçlü bir strateji olduğu ortaya çıkmaktadır.

Klinik özellikler açısından genetik etyolojisi belirlenen kohort değerlendirildiğinde yine literatür ile uyumlu olarak en sık hematolojik bulgunun pansitopeni olduğu, hematolojik bulguların ilk meydana gelme zamanının ise klasik kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri ile kıyaslandığında daha geç (ortalama 1 yaş 9 ay) olduğu görülmüştür (43, 44). Aynı zamanda bu grup hastalarda diğer sistemik bulguların eşlik etme olasılığı da klasik kalıtsal kemik iliği yetmezliklerinden daha fazla olup, en sık eşlik eden sistemik bulgu gelişme geriliğidir. Etiyoloji belirlediğimiz hastaların %50 (n=4)'sinde pansitopeniye gelişim geriliğinin eşlik ettiği görülmüştür. Buna ek olarak, ileri genetik analizlere rağmen genetik etyolojisi belirlenemeyen hasta grubunda ise sadece 1 (%11) hastada pansitopeni ve gelişme geriliği birlikteliği görülmüş olup, bu bireyde de klinik önemi bilinmeyen kopya sayısı değişikliği saptanmıştır. Bu nedenle her üç seriyi de etkileyen bir kemik iliği yetmezliği varlığında klinik bulgulara gelişim geriliği de eşlik ediyorsa etyolojide bilinen kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri yanında karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri de akla gelmelidir.

Çalışmamızda gözlemlediğimiz önemli bir bulgu ise hematoloji kliniklerinde özellikle beklenmeyen bulgularla karşılaşıldığında karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği ön tanısının klasik kemik iliği yetmezliklerini de içerecek şekilde geniş tutulmasıdır. Buna ek olarak, kemik iliği yetmezliklerinin eşlik ettiği sendromlar, nadir görülen hematolojik hastalıklar, harman fenotipler de ayırıcı tanıda zorluk oluşturarak bu kapsama alınabilmektedir. Bu bulguyu destekleyecek şekilde, literatürde 179 birey'lik karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri grubu ile yapılan çalışmada da genetik etyolojisi belirlenen 86 hastanın 41 tanesinde klasik kemik iliği yetmezliklerinden olan DC, DBA ve SDS ile ilişkili genlerde, 21 tanesinde ise hematopoez ile ilişkili bilinen genlerde değişiklikler saptanmıştır (44). Ayrıntılı fizik incelemede ise klasik kalıtsal kemik iliği yetmezliğine sahip hastaların atipik bulgulara sahip olması, Fanconi Anemisi dışında kemik iliği yetmezlikleri için dışlama testinin olmaması ve muayene esnasında bu sendromlardan şüphelenilmemesi sebepleri ile klinikte ayırıcı tanının zorlaştığı ve klasik kemik iliği yetmezliklerinin de karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği grubu içinde incelenemediği gösterilmiştir (44). Çalışma grubumuzda saptanan *TERT* ilişkili Hoyereal Hreidarrson Sendromu (OMIM 305000) ve *EFL1* ilişkili Shwachman Diamond Sendromu

Tip 2 (OMIM 617941) ayırıcı tanıda zorluk yaşanması nedeni ile bu grup altında incelemeye alınan klasik kemik iliği yetmezlikleri örneklerindedir.

*TERT* geni telomerlerin yapısı ve uzunluğunun kontrolünde görevli telomeraz kompleksinin katalitik alt ünitesini oluşturan *Telomerase Reverse Transcriptase* proteinini kodlamaktadır (27). *TERT* geni heterozigot mutasyonları klasik triadı retiküler deri döküntüleri, mukozal lökoplaki ve tırnak distrofileri olan DC fenotipini oluşturur. *TERT* geni biallelik mutasyonları ile ortaya çıkan Hoyereal Hreidarrson Sendromu ise günümüze kadar sadece 7 ailede bildirilmiştir (58-62). DC'nin tipik bulgularının yanında <1 persentil telomer boyu, erken yaşta başlayan kemik iliği yetmezliği, serebellar hipoplazi, ataksi gibi ek bulguların eklenmesi ile DC'ye göre daha ağır bir klinikle seyirlidir. TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyde saptanan ve korunmuş bir bölgede bulunan mutasyon daha önce akraba evliliği yapmış ebeveynleri olan iki kardeşte de homozigot olarak bildirilmiştir (59). Bireyin değerlendirilmesinde saptanan IUGR, erken yaşta başlayan kemik iliği yetmezliği, serebellar hipoplazi, ataksi, telomer boyunun <1 persentil oluşu Hoyereal Hreidarrson Sendromu ile uyumlu olmasına karşın oldukça nadir görülen bir durum olması nedeniyle karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri spektrumu kapsamında incelenmesine yol açmıştır.

Benzer bir durum *EFL1* ilişkili SDS (OMIM 617941) fenotipinde karşımıza çıkmıştır. *EFL1* geni "*Elongation Factor Like GTPaz 1*" proteinini kodlamaktadır. Bu protein SBDS proteini ile birlikte pre-60S ribozomun birleşme arayüzünden *Eukaryotic Translation Initiation Factor 6* (eIF6)'nın uzaklaştırılmasında ve böylelikle ribozomun 60S ve 40S altünitelerinin birleşerek translasyon başlangıç kompleksini oluşturması aşamasında rol almaktadır (63). Hastada bulunan mutasyon daha önce yapılan bir çalışmada ebeveyn akrabalığı bulunan 2 aileden toplam 4 bireyde saptanmış ve Shwachman-Diamond Sendromu 2 fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (28). Bu bireylerin klinik bulguları değerlendirildiğinde büyüme gelişme geriliği, pankreatik yetmezlik, metafizyal displazi ve tüm hücre serilerinin etkilendiği kemik iliği yetmezliği gözlenmiştir. TRBMFS-0134\_03 numaralı bireyde saptanan kemik iliği yetmezliği, gelişme geriliği ve pankreatik yetmezlik düşündürülecek tekrarlayan ishalinin olması daha önce mutasyon saptanan vakalarla ortak klinik bulgularıdır. Ancak SDS fenotipinden farklı olarak hastada konjenital

işitme kaybı görülmesi ve %90 oranında SDS etyolojisinden sorumlu olan SBDS geninde mutasyon bulunmaması nedenleri ile ilk aşamada SDS olarak değerlendirilmemiş, böylelikle hasta klasik kemik iliği yetmezliğine sahip olmakla birlikte karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri altında çalışılmaya başlanmıştır.

WES incelemeleri ise durumun beklenenden daha karmaşık olduğunu ve bu bireyin *EFL1* gen mutasyonuna ek olarak *TP53* geninde somatik bir değişiklik taşıdığını ortaya çıkarmıştır. *TP53* geni apoptozis, transkripsiyon regülasyonu, hücre bölünmesinde kontrol noktası olması gibi hücrede çok önemli görevlere sahip bir tümör baskılayıcı genidir. Ribozomopatilerde hücre içinde meydana gelen ribozomal stres sebebi ile p53'ün artması ve artan p53'ün sebep olacağı hücrel apoptozisi azaltmak amacı ile *TP53* geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarının görülmesi bilinen bir somatik kurtarma mekanizmasıdır (41). Bunun önemli bir örneği de biallelik *SBDS* mutasyonlarına sahip hastalarda yüksek oranda somatik *TP53* fonksiyon kaybı mutasyonlarının görülmesidir (64). Somatik mutasyon taşıyan bu grup hastada kemik iliği yetmezliklerinin daha ileri yaşlarda ortaya çıkması ve fenotipin SDS'ye göre daha ılımlı olması nedenleri ile bu durum SDS için bilinen bir somatik kurtarma mekanizması olarak kabul edilmiştir (64, 65).

Bu tez çalışmasında ise ilk kez SDS'nin bir diğer sebebi olan *EFL1* germline mutasyonuna eşlik eden *TP53* somatik mutasyonu tanımlanmaktadır. Ancak fenotip somatik kurtarma mekanizması açıklaması ile uyumlu olmayacak şekilde ölümle seyredecek oranda daha ağır olarak karşımıza çıkmıştır. Bunun bir nedeni *TP53* geninde meydana gelen somatik fonksiyon kaybı mutasyonunun kanser yatkınlığı meydana getirmiş olabileceğidir. Keza tez kapsamında çalışılan hastada saptanan *TP53* mutasyonu daha önce birçok farklı doku kanserlerinde sık görülen mutasyon olarak bildirilmiştir (66). Ayrıca saptanan mutasyon daha önce AML olan bir hastada germline olarak da gözlenmiştir (67). Buna ek olarak, SDS hastalarında SBDS germline mutasyonuna eşlik eden somatik *TP53* mutasyonu miyeloid kanserlerle ilişkilendirilmiştir (65). Ancak, bunlarda *TP53* geni her iki allelinde somatik olayların meydana geldiği raporlanmış olup *TP53* somatik mutasyon zemininde kanser meydana gelmesi için *TP53*'ün her iki allelinin de hasarlanması gerektiği iddia edilmiştir (65).



Çalışmamızda ise *EFLI* mutasyonuna eşlik eden somatik değişiklik heterozigot olup ikinci allelde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Hastanın klinik takipsizliği ve bu takipsizlik döneminde hayatını kaybetmesi sebebi ile hem son dönem bulguları hem de bu dönemde yapılan kemik iliği incelemesi olmadığından hastanın bulgularının olası bir myeloid kanser transformasyonu ile uyumlu olup olmadığı belirlenememiştir. Buna ek olarak, hastada saptanan ve kemik iliği yetmezliği yanısıra işitme kaybı ile seyirli osteopetrozis hastalığına sebep olan *TNFSF11* gen mutasyonunun da harman fenotip olarak klinik çeşitliliğe katkı yapmış olması olasıdır.

Bir hasta özelinde karşılaştığımız fenotip ve laboratuvar değerlendirmelerini karmaşık hale getiren bu durum özellikle kemik iliği gibi hızlı bölünen dokuların hastalıkları ile ilgilenildiğinde daha detaylı inceleme gerekliliği ve özellikle hastaların takibinde somatik mutasyonların saptanmasının önemini vurgulanmaktadır. Yeni nesil dizileme teknikleri ile somatik mutasyonlar değerlendirilirken elde edilen okumalarda varyant allelin okuma sayısının bölgenin toplam okuma sayısına bölünmesi ile bulunan varyant allel frekans (VAF) değeri kritiktir (68). VAF değerinin ~%50 olduğu durumlarda varyantın heterozigot olduğu düşünülmeli gerekirken, <%50 olduğu durumlarda somatik olayların varlığı akla gelmelidir. Bu hastada da p53 varyantı için VAF değeri %19 olarak hesaplanmış ve <%50 olması sebebi ile dikkat çekmiştir. Son yıllarda özellikle düşük düzey mozaikliğin de belirlenmesi amacıyla tümör dokusundan daha çok panel testleri ile yeni nesil dizileme yöntemi kullanılsa da WES analizi de VAF değerlerinin belirlenmesi amaçlı olarak kullanılabilir. Burada en büyük dezavantaj panel testlerine göre WES analizinde okuma sayılarının daha düşük olması ve buna bağlı olarak VAF değeri düşük somatik varyantın gözden kaçma ihtimalinin artmasıdır. Bu nedenle WES analizinde heterozigot olarak saptanan varyantların VAF değerlerinin dikkatli bir şekilde incelenmesi somatik varyantların aydınlatılması açısından oldukça önemli hale gelmektedir. Şüphelenilen somatik olayı doğrulamanın bir başka yöntemi ise farklı bir doku örneğinden saptanan mutasyonun çalışılmasıdır. Ancak bu tez çalışmasında hasta kaybedilmiş olduğu için ikinci bir doku alınarak doğrulama çalışması yapmak mümkün olmamıştır.

Buna ek olarak, bu hastada saptandığı şekilde *TNFSF11* geninde bir alelin çoğaltılamaması (*allele drop-out*) genetik analizlerde karşılaşılan ve analizi zorlaştıran

durumlardan birisi olarak daima akılda tutulmalıdır. Genellikle çoğaltılan bölgeye yönelik tasarlanan primer bağlanma bölgesinde farklı bir polimorfik değişikliğin bulunması ile bir alelin çoğaltılamaması olarak tanımlanan “*allele drop out*” hastalık nedeni olan genetik değişikliklerin hatalı olarak ekarte edilmesine neden olmaktadır (69, 70). Özellikle klinik bilgiler ışığında sanger dizileme ile şüphelenilen varyantın hastalıkla birlikte segregasyonunun doğrulanamaması halinde mutlaka ikinci bir primer dizisi ile aynı bölgenin çalışılması ve alellerden birinin *drop-out* olmuş olma olasılığının ekarte edilmesi gerekmektedir.

Çalışmamız, bir bireyde birden fazla hastalığın birarada bulunması olarak tanımlanan harman fenotiplerin de hasta tanı ve takibinde zorluk yaratabileceğini göstermiştir. Harman fenotipler özellikle WES analizlerinin yaygın kullanıma girmesinden sonra giderek artan örneklerle karşımıza çıkan ve klinik tanıyı zorlaştıran bir durumdur. Daha önce Türkiye’den katılan aileler ile yapılan bir çalışmada, nörogelişimsel geriliğe sahip bireylerin olduğu 234 aile incelenmiş ve genetik etyolojisi belirlenen 176 hastanın 51’inde (%28.9) birden fazla gendeki değişikliğin fenotipe etki ettiği “harman fenotip” saptanmıştır (71). Tespit edilebilmeleri pedigrî analizleri yanısıra multisistemik muayene ve WES analizi sonucunda elde edilen hastalıktan sorumlu gen değişikliklerinin işaret ettiği fenotiplerin dikkatli bir şekilde incelenmesi ile mümkün olabilmektedir. Bu nedenle, pedigrî analizleri ve hastalıklara multisistemik yaklaşımı ön plana alan Tıbbi Genetik alanı uzmanlarınca hastaların değerlendirilmesi etkin hasta takibi ve genetik danışmanlık açısından vazgeçilmez öneme sahiptir.

Çalışma grubumuzda TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyde saptanan *SLC7A7* ilişkili lizinürik protein intoleransı (OMIM 222700) ve *CFTR* ilişkili kistik fibrozis (OMIM 219700) hastalığı birlikteliği yanısıra TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyde saptanan *PEPD* ilişkili prolidaz eksikliği (OMIM 170100) ve kompleks etyolojili yarık damak/dudak fenotipinin aynı birey ve ailede kalıtılıyor oluşu harman fenotip örnekleridir.

*SLC7A7* geni katyonik aminoasitlerin, ince barsak ve böbrek tübül hücrelerinde bulunan epitel hücrelerinin bazolateral membranlarında transportundan sorumlu proteinin hafif zinciri olan  $\gamma(+)$  *L-Type aminoasit transporter 1* ( $\gamma+LAT1$ )’i

kodlamaktadır. Bu protein ağır zinciri ile birlikte dimer oluşturup, katyonik aminoasitlerin emilimini gerçekleştirmektedir (72). Proteinde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları sonucunda katyonik aminoasitlerin emiliminin azalması ile karakterize oldukça farklı klinik bulgulara sahip bir metabolik hastalık olan Lizinürik Protein İntoleransı (OMIM 222700) meydana gelmektedir. Bu hastalıkta çok farklı organ tutulumlarının olmasının yanında kemik iliğinin de etkilenmesi ile sitopeni ortaya çıkmaktadır. Çok büyük vaka serileri olmasa da 11 hastanın katılımı ile yapılan bir çalışmada %57.1 oranında klinik bulgulara sitopeninin de eşlik ettiği görülmüştür (73). TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyde saptanan 11 ekzonluk *SLC7A7* geninin 10. ekzonunda yer alan homozigot 6 bazlık çerçeve kaymasına neden olmayan delesyon daha önce hastalık ile ilişkilendirilmemiş yeni bir mutasyondur. Bireyde buna ek olarak *CFTR* geninde de çerçeve kaymasına neden olan ve yine ilk kez bu tez çalışmasında bildirilen homozigot ikinci bir mutasyon daha bulunmaktadır. *CFTR* geni *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* proteinini kodlamaktadır. Bu protein epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde anyon iletiminden sorumlu transmembran bir kanal proteindir ve *ATP binding cassette* (ABC) ailesinin bir üyesidir (74). ABC proteinleri 2 transmembran (TMD), 2 nükleotid bağlayıcı domain (NBD) olmak üzere toplam 4 domainden oluşmaktadır. *CFTR* proteininde bu 4 domainin yanında bir de Regülatör domain bulunmaktadır. Bu regülatör domain NBD'lere ATP bağlanmasını sağlamak için protein kinaz A tarafından fosfatlanır ve ardından NBD domainlerine bağlanan ATP'nin hidrolizi ile kanal porlarının açılması gerçekleşir. Bu proteinde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları ile kistik fibrozis kliniği meydana gelmektedir ve gende tanımlanmış mutasyonlar 6 sınıf olarak incelenmektedir; sınıf I: Proteinin neredeyse hiç yapılamadığı *nonsense*, çerçeve kaymasına neden olan mutasyonlar, sınıf II: Protein maturasyonunu ve iletimini hasarlandıran mutasyonlar, sınıf III: Kanal kapı regülasyonunun bozulduğu mutasyonlar, sınıf IV: Açık kanal porlarından anyon geçişini hasarlandıran mutasyonlar, sınıf V: Alternatif *splice*'a sebep olan mutasyonlar, sınıf VI: Stabil olmayan protein oluşturan mutasyonlar (75). TRBMFS-0248\_03 numaralı bireyde saptanan 27 ekzonluk *CFTR* geninin 27. ekzonunda bulunan tek nükleotid delesyonu çerçeve kaymasına sebep olan bir mutasyondur. Saptanan mutasyon, son ekzonda olması sebebi ile *nonsense mediated mRNA decay* mekanizmasıyla proteinin tamamı

hücrede yıkılmasa da güdük kalıp, stabil olmayan bir protein oluşması ve bu yapı bozukluğuna bağlı proteinin fonksiyon görememesi muhtemel olup, sınıf VI mutasyonlar içerisinde olacağı düşünülmüştür (76). Literatürde de daha önce güdük protein oluşmasına bağlı proteinin fonksiyon kaybedip kistik fibrozis kliniğinin meydana geldiği ve ağır bir fenotiple seyrettiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (77-79).

Bireyin 1 yaş 6 aylık iken yapılan muayenesi sırasında her iki hastalığı da ağır bulguları olmaksızın taşıdığı gözlenmiştir. Özellikle her iki hastalıkta da görülmesi ve ileri yaşlarda oluşması beklenen büyüme geriliği ve akciğer bulguları henüz gözlenmemiş olup bu bulgular açısından dikkatli takip gereklidir. Akciğer bulgularının oluşmasında iki hastalıkta da artan proinflatuar sitokin salınımları sorumlu iken (80, 81), büyüme geriliği bulgusu lizinürik protein intoleransında proteinden zengin beslenmeyi reddetmeye, kistik fibroziste ise oluşan mukus tıkaçları ile gastrointestinal sistemde pankreas, safra kesesi dahil birçok salgı kanalının tıkanması sonucunda besin emiliminin tam olamamasına bağlanmaktadır (82). Bu nedenlerle bu iki hastalık birleştiğinde artan proinflatuar sitokinlere bağlı akciğer bulgularının, farklı mekanizmalarla da olsa büyüme geriliğininin daha da ağır olmasına sebep olması beklenebilir. Bu bağlamda bu hasta için bu bulgular daha ileri yaşlarda sadece lizinürik protein intoleransına sahip bireylerden ya da sadece kistik fibrozise sahip bireylerden daha da ağır bulgular olarak karşımıza çıkabilmesi muhtemel bulgulardandır. Bu nedenle uzun dönem izlemde hastayı tek bir klinik disiplinin izlemesi yeterli olmayıp genetik polikliniklerince her iki açıdan dikkatli bir şekilde takip edilmesi gerekmektedir.

Çalışma grubumuzdaki ikinci harman fenotip örneği TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyde tespit ettiğimiz *PEPD* geninde homozigot değişikliğe bağlı Prolidaz Eksikliği (OMIM 170100) ile yarı damak/dudak malformasyonu birlikteliğidir. *PEPD* geni C-terminal bölümünde prolin ve hidroksiprolin rezidülerine sahip iminodipeptitlerin katabolizmasında görevli bir metalloenzim olan prolidaz enzimini sentezlemektedir. Prolidaz aracılığı ile protein yıkımı sonucu açığa çıkan prolin yeniden metabolizmaya katılabilmekte ve prolinin protein döngüsü devam etmektedir. Bu enzim özellikle >%25 iminodipeptid içeren kollajenin metabolizmasında oldukça önemli bir yere sahiptir (83). Bu proteindeki

fonksiyon kaybı durumlarında henüz patofizyolojisi tam aydınlatılmayan özellikle alt ekstremitelerde kronik ülsere lezyonlar, gelişim geriliği, zihinsel yetersizlik, SLE benzeri bulgular ile seyredabilen anemi ve trombositopeninin tabloya eşlik ettiği prolidaz eksikliği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada prolidaz eksikliği olan hastalardan alınan fibroblastların kültüre edilmesi ile elde edilen hücrelerde prolinin azalıp, hücre içinde iminodipeptidlerin birikmesine bağlı hücre yapısının değiştiği (normalden daha şiş, kromatin yoğunluğu kaybolmuş, sitoplazmik vakuolizasyon ve inklüzyon cisimcikleri olan, hücre zarları kesintili olan hücreler), mitokondrilerin beklenenden az sayıda, daha az yoğun matriksli ve beklenenden daha şiş bir yapıda olduğu saptanmıştır (84). Ayrıca hücre ölüm oranında da artış saptanmıştır. Hücrede prolidaz enziminin fonksiyon kaybına bağlı prolin havuzunun azaldığı durumlarda bu havuzu arttırmak amaçlı bir yan yol olan prolin hidroksilaz enziminin aktivasyonu sonucu hücredeki prolin miktarı artarken yanında radyoaktif oksijen radikallerinin de arttığı ve hücrenin bu yolla apoptoza sürüklendiği hipotezi ise varlığını sürdürmektedir (85). Doku spesifitesi oldukça düşük olan *PEPD* genindeki fonksiyon kaybıyla hücrelerin hem yapı hem de hayatta kalma durumlarının etkilenmesine bağlı birçok dokunun aynı anda etkilenmesi muhtemeldir. Klinik bulgular oldukça değişken seyredilebilmekle birlikte aile içinde bile fenotip farklılığı görülebilmektedir (86). Genellikle 2 yaşından önce ülsere lezyonlar, gelişim geriliği gibi bulgular başlasa da çok ileri yaşta bulgu veren hastalar da literatürde bildirilmiştir.

TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyde ve kardeşinde saptanan homozigot çerçeve kaymasına neden olan mutasyon daha önce bildirilmemiş bir mutasyon olup 15 ekzonluk *PEPD* geninin 8. ekzonunda bulunmaktadır. Proteinde erken sonlanmaya sebep olarak fonksiyon kaybı oluşturması açısından kritik bir öneme sahiptir. Klinik bulguların değerlendirmesinde hastanın ülsere lezyonları, bisitopenisi, gelişim geriliği ve zihinsel yetersizliği prolidaz eksikliği fenotipi ile uyumlu iken henüz 3 yaşında olan kardeşte konuşma gecikmesi ve dismorfik bulguları sebebi ile hastamıza benzemesi dışında ek bir bulgunun olmadığı görülmüştür. Kardeşte dismorfik bulgu ve hafif trombositopeni dışında eşlik eden bir bulgunun olmaması aile içinde var olan fenotipik çeşitliliğin bir kanıtını oluşturmaktadır. Homozigot mutasyona sahip hasta kardeş olası semptomlar açısından dikkatli bir şekilde takip

edilmelidir. Ayrıca bu hasta ile indeks vakalarda saptanan mutasyon açısından aile bireylerinin taranmasının önemi vurgulanmaktadır.

Prolidaz eksikliği yarık damak/dudak eşliği açısından incelendiğinde literatürde şimdiye kadar bildirilen 75 tane prolidaz eksikliğine sahip bireyin hiçbirinde yarık damak/dudak bulgusu tanımlanmadığı görülmüştür (86). *PEPD* geninde homozigot mutasyonun saptanmadığı aile bireylerinde de yarık damak/dudak bulgusunun olması sebebi ile bu durumun prolidaz eksikliği yanında ikinci bir fenotip olduğu düşünülmüştür. Pedigri analizi de yarık damak/dudak malformasyonunun ailede prolidaz eksikliğinden bağımsız olarak otozomal dominant kalıtım kalıbı ile uyumlu olarak kalıtıldığını desteklemiştir. Yarık damak/dudak toplumda sık rastlanan multifaktöryel bir hastalık olup genetik nedenlerin yanında çevresel etkenler ve epigenetik değişikliklerin de hastalık sebebi olduğu bilinmektedir (87, 88). Bunun yanında vakaların ~%30'unda yarık damak/dudak fenotipi çevresel etkenlerden bağımsız olarak farklı genlerdeki mutasyonlar ile de meydana gelmekte ve çeşitli sendromlara eşlik etmektedir (89). Bu nedenle şu ana kadar yarık damak/dudak malformasyonu ile ilişkilendirilmiş ve çoğunluğu transkripsiyon faktörlerinden oluşan 163 gene ait değişiklikler TRBMFS-0098\_03 numaralı bireyin WES analizinde araştırılmasına rağmen bu malformasyona yol açabilecek kritik bir varyant gözlenmemiştir.

Bunlara ek olarak genetik neden iyi tanımlanmış bazı sendromların ve hematolojik hastalıkların da karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri kapsamında tıbbi genetik polikliniklerine inceleme için gönderilebildiği görülmektedir. Çalışma kohortumuzda saptanan dismorfik yüz bulguları, gelişme geriliği, bilateral miyopi ve nötropeni birlikteliği ile seyirli ve *VPS13B* geninde mutasyonlarla ortaya çıkan Cohen sendromu (OMIM 216550); *TCN2* ilişkili Transkobalamin II eksikliği (OMIM 275350) ve *MYH9* ilişkili Makrotrombositopeni (OMIM 155100) bunlara örnektir. Bu grup içinde özellikle *MYH9* ilişkili varyantların değerlendirilmesi genetik tanıda klinik ve laboratuvar verilerinin birarada değerlendirilmesinin önemini bir kez daha kanıtlamıştır.

Çalışma kohortumuzda 2 indeks vakada (TRBMFS-0266\_03 ve TRBMFS-0137\_03) *MYH9* geninde nadir *missense* varyantlar saptanmış, bunlardan

birisi hastalık etkeni olarak değerlendirilirken diğerinin ailede rastlanan nadir bir polimorfizm olduğu düşünülmüştür.

Miyozin gen ailesinin kodladığı miyozin proteinleri aktine bağlanıp, ATP'nin hidrolizi ile mekanik enerji üreten ve hücrenin temel iskelet proteinlerinden olan motor protein ailesidir. 30'dan farklı üyesi olan miyozin ailesinde sınıf II miyozinler hem kas içindeki hem de diğer dokulardaki miyozini kapsamaktadır. Bu sınıf miyozinlerin hücre iskeletine destek olmanın yanında hücre migrasyonu, adezyonu, hücre şeklinin korunması ve sinyal iletimi gibi görevleri de bulunmaktadır. Memelilerde kas dışı sınıf II miyozinlerin 3 izoformu vardır (IIA, IIB, IIC). Bu izoformlardan miyozin IIA'nın ağır zinciri *MYH9* tarafından kodlanmaktadır (90). Bu izoformunun sentezinde meydana gelen bozukluklarda, makrotrombositopeni ve nötrofilik inklüzyon cisimciklerine ileri yaşlarda eşlik edebilen sensörinöral işitme kaybı (SNİK), renal bozukluk, katarakt ve karaciğer enzim yükseklikleri gibi bulguların olduğu, oldukça heterojen bir kliniğe sahip ve otozomal dominant kalıtım özellikleri gösteren *MYH-9* ilişkili hastalıklar meydana gelmektedir. Çalışmamızda TRBMFS-0266\_03 numaralı bireyde saptadığımız heretozigot *MYH9 missense* değişikliği literatürde hastalıkla ilişkili olarak birden çok kez bildirilmiştir (91-93). Buna ek olarak genotipten fenotipe giden değerlendirmede, hastada periferik yaymada saptanan makrotrombositler, trombositopeni ve renal USG'de bilateral artmış renal parankim ekojenitesi bulgularının tamamı da *MYH-9* ilişkili fenotipi düşündürmektedir. Bu bulgularla ilgili değişiklik hastalıktan sorumlu olarak kabul edilmiştir.

*MYH9* geninde homozigot değişikliklere ait bir fenotip henüz bilinmemektedir. Buna karşın trombositopeni ve anemi birlikteliği gösteren TRBMFS-0137\_03 numaralı bireyde ise nadir bir *MYH9 missense* değişikliği homozigot olarak saptanmıştır. Ancak, fenotip, laboratuvar ve pedigrî bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde ilgili varyantın hastalıktan sorumlu olmadığı ve aslında nadir bir polimorfizm olduğu düşünülmüştür. Bireyde saptanan homozigot *TERT* mutasyonunun klinik bulguları tam olarak açıklıyor olması yanısıra ailede *MYH9* değişikliğini homozigot ve heterozigot olarak taşıyan bireylerde makrotrombositopeniyi destekleyecek şekilde dev trombosit boyutu ( $>7 \mu\text{m}$ ) ile uyumlu olabilecek anlamlı sayıda trombosit bulunmaması, periferik yaymada

nötrofilik inklüzyon cisimciklerinin gözlenmemesi nedenleri ile *MYH9* varyantı hastalıktan sorumlu varyant olarak değerlendirilmemiştir. Buna ek olarak, *TERT* ve *MYH9* varyantlarını homozigot olarak taşıyan indeks bireye daha sonra *TERT* varyantını taşımadığı halde *MYH9* varyantını homozigot olarak bulunduran sağlıklı kardeşten KİT yapıldığında trombositopeni bulgusunun tamamen düzeldiği görülmüştür. Bu durum *MYH9* ve *TERT* duble homozigot varyantına sahip bireyde ilgili *MYH9* varyantının trombositopeni bulgusunu ortaya çıkarma/ağırlaştırma yönünde modifiye edici etkisini de dışlamaktadır.

Sunulan tez çalışmasında saptanan en önemli başarı ise 1 ailede (TRBMFS-0108) kemik iliği yetmezliklerinde önemli olan p53 yolağında kritik bir role sahip *MDM2* genindeki mutasyonun karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezliği fenotipi ile ilişkisinin ilk kez gösterilmiş olmasıdır.

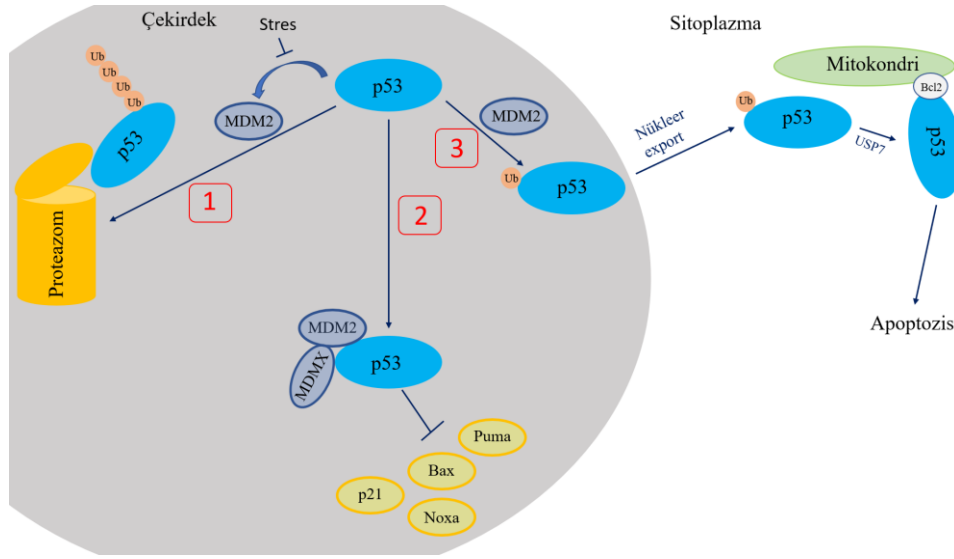
MDM gen ailesi her ikisi de p53 metabolizmasında rol alan iki üyeden (*MDM2* ve *MDM4*) oluşmaktadır (94). Bunlardan *MDM2* geni, *E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2* proteinini kodlayan ve ubiquitinizasyonda görevli bir gendir. Ubiquitinizasyon, proteinlerin ubiquitin proteini tarafından işaretlenip, bu işaretleme sayesinde birçok hücre yolakta etkili olan bir posttranslasyonel modifikasyon mekanizmasıdır (95). Temel olarak proteinlerin bir kez (mono) ubiquitinlenmesi ile hücre içinde proteinlerin taşınımı (*trafficking*) sağlanırken, birçok kez (poli) ubiquitinizasyon ile protein yıkımından sorumlu proteazomlar tarafından tanınması sağlanmaktadır. *MDM2* proteini ise E3 ligaz aktivitesi aracılığı ile p53'ün ubiquitinizasyonunu sağlayan ve bu yolla p53 stabilitesini sağladığı belirlenen ilk proteindir (96, 97). *TP53* geni tarafından kodlanan p53 proteini hücre stres durumunda apoptozun aktifleşmesi, hücre yaşlanmanın tetiklenmesi, büyüme gibi görevlere sahip bir tümör baskılayıcı proteindir. p53'ün hücrede arttığı durumlarda apoptoz ve hücre yaşlanmanın tetiklenmesi ile hematopoezin etkilendiği ve kemik iliği yetmezliği kliniği meydana geldiği fonksiyonel deneylerle gösterilmiştir (97). Bu nedenle hematopoezin düzgün bir şekilde ilerlemesi için hücre içinde p53 miktarının stabil durumda olması oldukça kritiktir.

*MDM2* N-terminalinden p53'ün C-terminaline bağlanarak protein-protein ilişkisi kurar ve bu yolla p53 metabolizmasında doğrudan etkili olur (98, 99). Bu



etkileşimde temel olarak MDM2'deki N-terminal bölge etkili olsa da proteinin diğer kısımlarının da yardımcı olduğu bilinmektedir. Şekil 5.1'de detaylandırıldığı şekilde MDM2 proteini p53 mekanizmasını 3 yoldan etkilemektedir (99) ve hangi yolağı seçeceğine karar verdiren mekanizma hücrel stresdir (Şekil 5.1). Hücrenin stres altında olmadığı durumda çekirdekte bulunan p53, MDM2'nin transkripsiyonunu indüklemektedir (100). Artan MDM2 proteini, p53'ü ubiquitinleyip proteazomlarda yıkılmasına neden olmaktadır. Bu negatif *feed-back* mekanizma ile p53'ün artıp, hücrede strese bağılı yolların aktifleşmesi engellenmektedir. Ancak hipoksi, DNA hasarı gibi hücrede strese sebep olacak bir durum karşısında bu negatif regülasyon ortadan kalkıp, p53 birikmeye başlamaktadır. Daha düşük seviyelerde kalan MDM2, p53'ün monoubiquitinizasyonunu meydana getirip, p53'ün nükleustan sitozole göçüne sebep olmaktadır. Sitozole çıkan p53 ise apoptoz yollarını aktifleştirecek şekilde görevine devam etmektedir.

MDM2, direkt p53'e bağlanıp etki oluşturmasının yanında indirekt bir mekanizma ile ribozomopatilerde artan ribozomal strese bağılı p53'ün artması ve apoptoz yolağının aktifleşmesinde de görev almaktadır (101). Ribozom biyogenezinin bozulduğu durumlarda çekirdekte ribozom oluşturmak için görevli ribozomal proteinlerin dengesi bozulup stres ortamı meydana gelmektedir. rRNA oluşturmak için yapıya katılamayan serbest ribozomal proteinler MDM2'ye bağlanıp, bu yolla MDM2'nin p53'ü ubiquitinlemesi engellenmektedir. Böylece artan p53 ribozomapati patofizyolojisinde önemli olan hücrel apoptozu tetiklemektedir. Görüldüğü gibi hematopoezin sorunsuz bir şekilde ilerlemesi için MDM2, RP/MDM2/p53 arasında var olan dengenin korunmasında kritik rol üstlenen bir protein olarak görev yapmaktadır.



**Şekil 5.1.** MDM2/p53 mekanizması. Ub: Ubiquitin proteini. Kutu içindeki numaralar p53-MDM2 arasındaki yolları göstermektedir. (1) p53'ün poliubiquitinizasyonu: Bu yol ile p53 birçok kez ubiquitinlenir ve proteazomlar tarafından tanınır, yıkılır, (2) p53 üzerindeki asetilasyon bölgesinin ubiquitinlenmesi: p53'ün asetillenmesi ile onun aşağı yolağında görev alan ve apoptoz, hücre duraklamaya sebep olacak genlerin (p21, BAX, Noxa, PUMA) transkripsiyonunun tetiklenmesi MDM2'nin p53'ün asetilasyon bölgesini ubiquitinlenmesi sonucunda engellenir (99). MDM2'nin asetil transferaz özellikli olan proteinleri (p300/CBP, PCAF, ve Tip60) ubiquitinleyip onların proteazomal yıkımlarını indüklemesi de p53'ün asetillenmesini etkileyerek benzer etki yaratır, (3) p53'ün monoubiquitinizasyonu: bir kez ubiquitinlenme p53'ün çekirdekte sitozole göç etmesini ve apoptoz yollarını aktive etmesini sağlar. Aktifleşme için p53'ün ubiquitinden ayrılmasını sağlayan molekül ise mitokondriyal HAUSP (USP7)'dir. HAUSP hücre stresine göre MDM2 ya da p53'ü deubiquitinler (102). (Lee ve ark., 2010 çalışmasındaki bilgilere dayanarak bu tez çalışması kapsamında Nesligül Gönen tarafından görselleştirilmiştir).

*MDM2* varyantları ile hastalıklar arasındaki ilişki tam kurulamamıştır. *MDM2*, OMIM veri tabanında Werner sendromu benzeri bir hastalıkla (Lessel-Kubish sendromu; OMIM 618681) ilişkilendirilmiş olmakla birlikte 1 hastada gösterilen bu ilişkinin henüz doğrulanmamış olduğu belirtilmektedir. Bu tek hastada *MDM2*'de terminasyon kodonunda değişiklik meydana gelmesine bağlı 5 aminoasitin daha protein yapısına eklendiği bulunmuştur (103). Yapılan deneysel çalışmalarda hücrede *MDM2* ekspresyonunun arttığı bulunsa da *MDM2* aracılığı ile sürdürülen p53'ün proteazomal yıkımının hasarlandığı, buna bağlı olarak p53 seviyesinin de arttığı gösterilmiştir. p53'ün hücrede artmasının hücre yaşlanma sürecini başlattığı ve

buna bağılı olarak hastada meydana gelen progeria fenotipinden *MDM2*'deki bu varyantın sorumlu olduğu iddia edilmiştir.

Yine başka bir çalışma otizm, zihinsel yetersizlik ve bilişsel geriliği olan 189 birey ve aile üyelerinin katılımı ile yapılmış olup, 1 indeks vakada *MDM2*'de biri *missense* biri *nonsense* olmak üzere 2 değişiklik saptanmıştır. Ancak, yayın içeriği araştırıldığında her iki değişikliğinde sağlıklı babadan kalıtıldığı saptanmış ve direkt otizm ile nedensel ilişki kurulamamıştır (104).

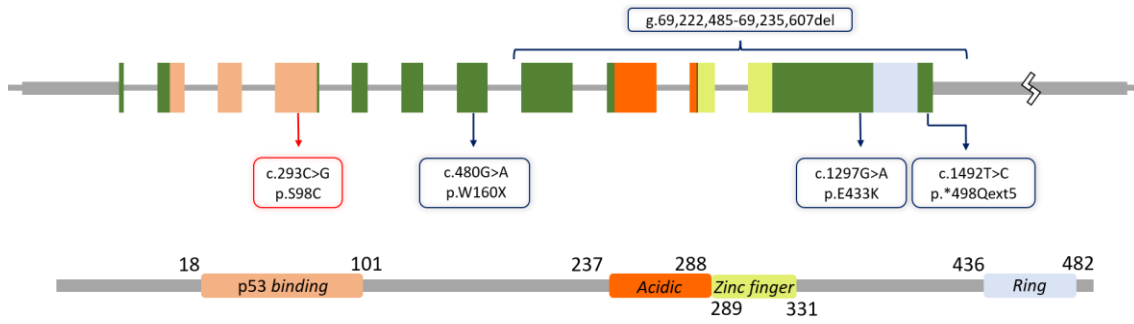
Çalışmamız açısından önemli olacak yayın ise 179 tane kemik iliği yetmezliği hastasının germline varyantlarının saptanması için hasta fibroblast örnekleri ile yapılan çalışmadır (44). Bu çalışmada 1 hastada *MDM2* geninin son 4 ekzonunu içine alan heterozigot büyük bir gen içi delesyon saptanmış olmakla birlikte klinik özellikler hakkında bilgi verilmemiş, ileri çalışmalar yapılmamış ve ilgili varyant klinik önemi belirlenemeyen varyant kategorisinde sınıflanmıştır (44).

*MDM2* şu ana kadar doğrudan kemik iliği yetmezlikleri ile ilişkilendirilmemiş olsa da tümör yatkınlığı ile ilişkilendirildiği yayınlar bulunmaktadır. Bu bağlamda, *MDM2*'de yerleşik bir polimorfik değişiklik olan SNP309T>G (rs2279744), *MDM2*'nin promoter bölgesinde bulunmaktadır ve *MDM2*'nin transkripsiyon faktörü olan Sp1'in bağlanımını arttırıp, *MDM2* transkripsiyonunu pozitif yönde regüle etmektedir. Bu SNP'in varlığında bir de hüresel stres eklenirse p53'ün ve onun aşağı yolağında görevli genlerin hücrede azalmasına bağılı hücrenin apoptoza ilerleyememesi, DNA hasarına cevap verememesi meydana gelmekte ve bunun sonucunda hücre onkogen özellik kazanmaktadır (105). Bu durumda daha erken yaşlarda kanserlerin görüldüğü, primer tümörlere ikincil çok daha fazla sayıda tümörün olduğu gözlenmiştir. Bu SNP'ten dolayı *MDM2*'nin tümör yatkınlığı (OMIM 614401) oluşturduğu kabul edilmektedir.

Buna ek olarak, MDM ailesinin diğer üyesi olan MDM4 ise otozomal dominant kemik iliği yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir (Kemik İliği Yetmezliği Sendromu 6; OMIM 618849). p53 metabolizmasında, MDM4, *MDM2*'nin *ring* domainine bağlanıp p53'ün ubiquitinizasyonu için MDM2 ile birlikte sinerjistik olarak çalışmaktadır (106). OMIM'de karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri altında sınıflanan Kemik İliği Yetmezliği Sendromu 6 hastalığında DC fenotipi gösteren bir ailenin 4 etkilenmiş bireyinde *MDM4*'te heterozigot *missense* bir varyant tanımlanmıştır. Yapılan fare deneylerinde ise bu varyanta sahip farelerde hücrede p53 seviyelerinin

arttığı saptanmış ve hastada kemik iliği yetmezliği oluşturan fenotipten bu varyant sorumlu tutulmuştur (51).

MDM2 proteini toplamda 4 domainden oluşmaktadır (Şekil 5.2). Bunlar; p53'e bağlanmayı sağlayan p53 *binding* domain, hücrel stres durumlarında bazı proteinlerin (ARF, ribozomal proteinler) bağlandığı ve bu yolla MDM2 inaktivasyonunun meydana geldiği *acidic* ve *zinc finger* domainleri, MDM4 (MDMX) ile heterodimer oluşturmasını ve bunun sonucunda ubiquitinizasyonda sinerjistik etki göstermelerini sağlayan *ring* domainidir. Aşağıda *MDM2* gen-domain görünümü ve günümüze kadar gende bildirilen varyasyonlar şematize edilmiştir (Şekil 5.2).



**Şekil 5.2.** *MDM2* gen-domain ve bildirilen mutasyonların görünümü. *MDM2* gen yapısı şeklin üst tarafında yer almaktadır. Şeklin alt kısmında yer alan protein domainlerinin eşleştiği ekzonlar aynı renk skalası ile gösterilmiştir. Tez kapsamında saptanan mutasyon kırmızı çerçeve ile işaretlenmiştir. g.69,222,485-69,235,607del varyantı kemik iliği yetmezliği kohortunda saptanan varyant. p.\*498Qext5 ise Werner Sendromu benzeri fenotip ile ilişkilendirilmiş varyantı göstermektedir. Otizim ile nedensellik ilişkisi kurulamadığı halde *MDM2*'de bildirilen nadir varyant olmaları sebebi ile heterozigot p.W160X ve p.E433K varyantları da şekle eklenmiştir.

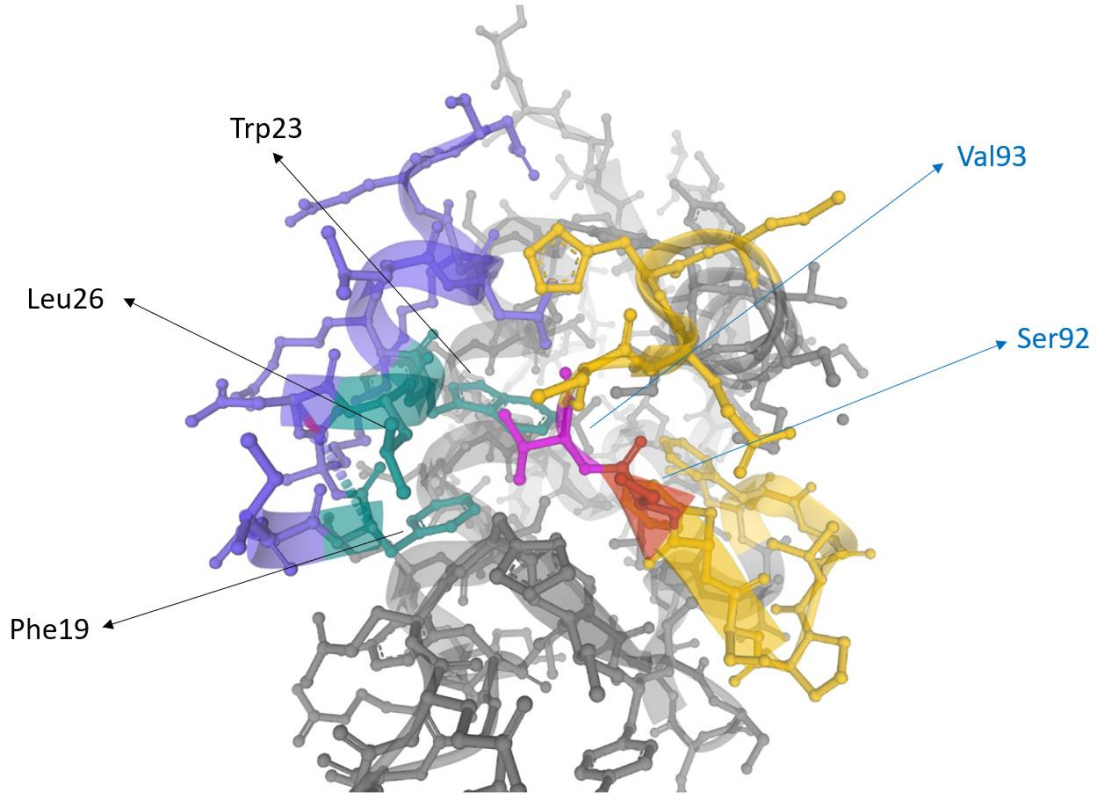
Bu tez kapsamında oldukça korunmuş bir bölgede saptanan homozigot değişiklik *MDM2*'nin p53 *binding* domainine denk gelmektedir ve daha önce bu domaine rast gelen bir mutasyon bildirilmemiştir (Şekil 5.3). RP/*MDM2*/p53 arasındaki denge düşünüldüğünde, *MDM2*'nin p53'e bağlanmasının inhibe olması ile p53 miktarının artması ve hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde ciddi etkilenmeler olması muhtemeldir. *MDM2*'nin santral *acidic* ve *zinc finger* domainlerine bağlanan bazı RP'lerin (RPL5 ve RPL11) p53 ubiquitinlenmesini engelleyerek p53 artışına sebep olup, çeşitli sistemik bulgulara kemik iliği yetmezliğinin de eşlik ettiği ribozomapati fenotipini oluşturması bilinen bir mekanizmadır (107). Ancak günümüze kadar yapılan

çalışmalarda MDM2-p53 bağlanımını başka bir faktör olmadan inhibe edebilecek *MDM2* mutasyonu ve bunun kemik iliği yetmezliği ile ilişkisi henüz bildirilmemiştir.

conservation protein level for non-synonymous changes	species	match	gene	aa alignment
	Human			98 LLGDLFGVPSF <b>S</b> VKEHRKIYTMIV
	mutated	not conserved		98 LLGDLFGVPSFCVKEHRKIYTMIV
	Ptroglydotes	all identical	<a href="#">ENSPTRG00000005203</a>	98 LLGDLFGVPSF <b>S</b> VKEHRKIYTMIV
	Mmulatta	all identical	<a href="#">ENSMUG00000014193</a>	92 LLGDLFGVPSF <b>S</b> VKEHRKIYTMIV
	Fcatus	no homologue		
	Mmusculus	all identical	<a href="#">ENSMUSG00000020184</a>	92 LLGDVFGVPSF <b>S</b> VKEHRKIYAMI
	Ggallus	all identical	<a href="#">ENSGALG00000009942</a>	91 LLGDLFGVTSF <b>S</b> VKEHRRIYSMI
	Trubripes	all identical	<a href="#">ENSTRUG00000008338</a>	97 ELGRVLGVDSF <b>S</b> VKEPRVLFAMI
	Drerio	all identical	<a href="#">ENSDARG00000033443</a>	85 PLGAVLGVKSF <b>S</b> VKEPRALFALI
	Dmelanogaster	no homologue		
	Celegans	no homologue		
	Xtropicalis	all identical	<a href="#">ENSXETG00000001434</a>	103 PLGELFGVQEF <b>S</b> VKEPRRLYAMI

**Şekil 5.3.** *MDM2* geninde mutasyon saptanan aminoaside ait evrimsel korunmuşluk görünümü. Sarı ile işaretli bölge türler arası korunmuşluğun yüksek olduğu bölge. Kırmızı ile işaretli aminoasit tez kapsamında mutasyon saptanan serin aminoasidi (Mutasyon saptanan aminoasidin türler arasında korunmuşluğuna ait görünüm Mutation Taster veri tabanından alınmıştır).

Değişikliğin saptandığı serin aminoasidi MDM2/p53 bağlanımı sırasında meydana gelen hidrofobik cepteki oldukça korunmuş aminoasitlerle interaksiyon halinde olduğu gösterilmiştir (108). MDM2/p53 interaksiyonunun gösterilmesi amacı ile *Protein Data Bank*'te MDM2/p53 bağlanımının en güncel (3V3B) (109)protein kristalografik görünümü değerlendirilmiştir (Şekil 5.4). MDM2/p53 bağlanımında p53 üzerinde Trp23, Leu26 ve Phe19 ile MDM2 üzerindeki Val93 aminoasitleri etkileşime girip hidrofobik bir cep oluşturmaktadır. Mutasyonun saptandığı MDM2 üzerindeki Ser92 (WES analizinin gerçekleştirildiği NM\_002392.5 numaralı transkriptte 98. pozisyonda yer alan serin aminoasidi) direkt olarak bu hidrofobik yapıya katılmasa da bu yapının içinde yer alan Val93'e doğrudan bağlanmaktadır. Ayrıca bu serin aminoasidi hidrofobik cebi stabilize eden MDM2 üzerindeki  $\beta$ -pileli yapının içinde yer almaktadır. Bu nedenle serin aminoasidinin sisteine dönüşmesi ile  $\beta$ -pileli yapının bozulup hidrofobik cebin destabilize olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda MDM2/p53 bağlanımının bozulmuş olması ile p53'ün proteazomal yıkımının azalması ve hücrede artan p53'ün apoptoz yolağını tetikleyip hematopoezi etkiliyor olması muhtemeldir. Buna ek olarak, hücrede artan p53'ün bu ailede etkilenmiş iki kardeşinde de görülen zihinsel yetersizlik ve dismorfik bulgulara katkı sağlıyor olması da olasıdır. Tüm bu bilgiler ışığında *MDM2*'nin kemik iliği yetmezliği fenotipinden sorumlu yeni bir gen olduğu düşünülmüştür.

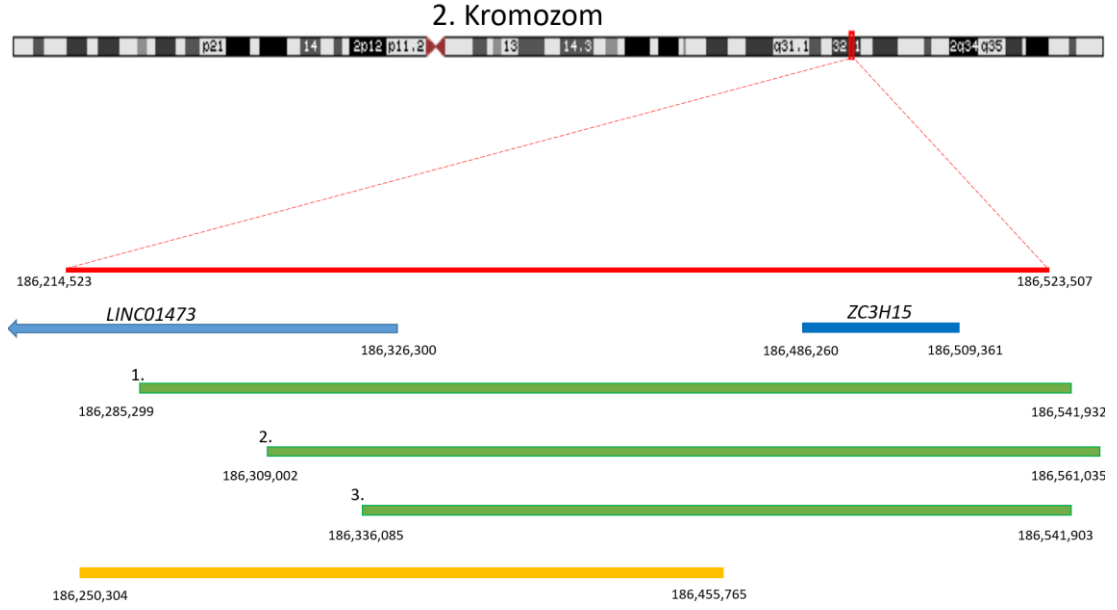


**Şekil 5.4.** *Protein Data Bank* (3V3B) kullanılarak resmedilmiş MDM2/p53 interaksiyonunun kristalografik görünümü. Mor ve su yeşili ile işaretli alanlar interaksiyona katılan p53 proteinine ait bölgeleri göstermektedir. Su yeşili ile gösterilen aminoasitler MDM2/p53 interaksiyonunda temel olarak görev alan ve hidrofobik cebe katılan 3 hidrofobik aminoasiti (Trp23, Leu26, Phe19) temsil etmektedir. Sarı, kırmızı ve mor ile gösterilen bölgeler MDM2 proteinine ait kritik bölgeleri ifade etmektedir. Kalın sarı interaksiyonu stabilize eden  $\beta$ -pileli yapıyı, ince sarılar ile gösterilen alanlar ise mutasyonun çevresindeki evrimsel korunmuşluğu yüksek olan bölgeyi göstermektedir. Mor: MDM2/p53 interaksiyonundaki hidrofobik cebe katılan korunmuş Val93 amino asidini; Kırmızı: mutasyonun saptandığı Ser92 amino asidini işaret etmektedir. Mutasyonun saptandığı Ser92 aminoasidinin MDM2/p53 bağlanımındaki hidrofobik cebe katılmadığı, ancak bu hidrofobik cebe katılan MDM2 üzerindeki Val93 ile direkt bağlantı halinde olduğu görülmektedir. Ayrıca Ser92 aminoasidi bu hidrofobik yapının stabilizesinden sorumlu  $\beta$ -pileli yapının (kalın sarı) ucunda yer almaktadır. Bu yapı sayesinde MDM2/p53 bağlanımının stabilizasyonu sağlanmaktadır.

Bu ailede rastlanan ikinci bir önemli özellik ise MDM2'deki aynı mutasyonu homozigot olarak taşıyan iki kardeş arasındaki fenotip farklılığıdır. İndeks vakada çok erken yaşlarda başlamış ve dirençli seyretmiş olan ağır kemik iliği yetmezliğinin homozigot mutasyona sahip olan kardeşte indeks vakada olduğu kadar ağır olmadığı görülmüştür. Bu nedenle harman fenotipler açısından indeks vakada MDM2'ye ek olarak başka bir varyantın var olabileceği araştırılmıştır. İndeks vakada olup

etkilenmiş kardeşte olmayan, daha önce bildirilmemiş ve splice site'ın değişmesine sebep olan SMARCE1 genindeki heterozigot delesyonun indeks vakadaki kemik iliği yetmezlik bulgusunu ağırlaştırmış olabileceği düşünülmüştür. SMARCE1 geni kromatin modifikasyonunda önemli SWI/SNF kompleksi içinde yer alan SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1 proteinini kodlamaktadır (110). SMARCE1 genindeki heterozigot mutasyonlar Coffin Siris Sendromu Tip 5 (OMIM 616938) ile ilişkilendirilmiştir. Coffin Siris Sendromu Tip 5 ile indeks vakanın fenotipi karşılaştırıldığında ise uyumlu bulunmamış ve bu nedenle bu mutasyonun kemik iliğine özgü bir mutasyon olup olmadığının belirlenmesi amacı ile farklı bir dokudan çalışma planlanmıştır.

Tez çalışmasına eklenen 17 hastanın yarısında ise herhangi bir genetik etken saptanamamış ve bu hastalar henüz çözülememiş vakalar sınıfında kalmıştır. Bunlardan 1 tanesi klinik önemi belirlenemeyen kopya sayısı açısından ilginçtir. TRBMFS-0042\_03 numaralı bireyde 2q32.1 bölgesinde saptanan 309 kbp'lik klinik önemi bilinmeyen delesyonun *de-novo* olduğu belirlenmiştir. Delesyon bölgesi incelendiğinde bölgede 1 tane OMIM geninin (*ZC3H15*) olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.5). Saptanan delesyon bölgesi açısından veri tabanları incelendiğinde Decipher veri tabanında *ZC3H15* genini içeren ancak saptanan delesyon bölgesini parsiyel kapsayan delesyonlara sahip 3 bireyin var olduğu gözlenmiştir. Her üç bireyin sahip olduğu delesyon da veri tabanında klinik önemi bilinmeyen kopya sayısı değişikliği olarak değerlendirilmiştir. Şekil 5.5'te gösterilen 1 ve 3 numaralı bireylerdeki delesyonun anneden kalıtıldığı saptanırken, 2 numaralı bireydekinin ebeveynlerden kalıtılıp kalıtılmadığı hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Decipher veri tabanından bireylere ait klinik bulgular incelendiğinde hiçbirinde kemik iliği yetmezliği fenotipi saptanmazken, 1 numaralı bireyde global gelişme geriliği, trigonosefali, 2 numaralı bireyde otizm, yarık ön mitral kapak, duodenal darlık, hipospadias, renal hipoplazi, 3 numaralı bireyde ise global gelişme geriliği gibi çeşitli bulguların olduğu gözlenmiştir. Tez kapsamında değerlendirdiğimiz hasta ve Decipher'da bildirilen hastalar karşılaştırıldığında gelişme geriliği haricinde ortak bulguya rastlanmamıştır. DGV veri tabanında ise, *ZC3H15* genini kapsayan delesyon gözlenmemiştir.



**Şekil 5.5.** TRBMFS-0042\_03 numaralı bireyde saptanan delesyon bölgesi. Mavi renk ile gösterilenler bölgede bulunan genleri ifade etmektedir. Bölgedeki tek OMIM geni *ZC3H15*'tir. Yeşil ile ifade edilen bölge Decipher veri tabanında *ZC3H15* genini kapsayan ve saptanan delesyon bölgesini parsiyel kapsayan delesyona sahip bireylerdeki CNV sınırlarını göstermektedir. Her üç delesyon da veri tabanında klinik önemi bilinmeyen kopya sayısı değişikliği olarak değerlendirilmiştir. Sarı ile ifade edilen bölge DGV veri tabanında yer alan ve tez kapsamında saptanan delesyon sınırını parsiyel kapsayan delesyona sahip bireydeki CNV sınırlarını göstermektedir. Bu değişiklik veri tabanında yalnızca 1 kişide bildirilmiştir (Şekilde gösterilen tüm pozisyon bilgileri GRCh38/hg38 referans genomuna göre ifade edilmiştir).

*ZC3H15* geni, *zinc finger CCCH domain-containing protein 15* proteinini kodlamakta olup, günümüzde herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmemiştir. Hücre hattında *ZC3H15* geninin *knockdown* edilmesi ile hücre siklusunu durduran, hücre adezyonunu sağlayan ve NF- $\kappa$ B yolağını düzenleyen proteinlerin ifadeleri azalırken, immün cevap, MAPK yolağı ve transkripsiyonda görevli bazı proteinlerin ifadelerinin arttığı saptanmıştır (111). Bunun yanında *ZC3H15*'in translasyonda, mikrotübül regülasyonunda ve hücre büyümesinde görevli bir GTPaz olan *DRG1*'in ubiquitinizasyonunu engelleyerek, hücresel yıkımını önlediği bilinmektedir (112). *ZC3H15* geninin çeşitli hücresel süreçlerde dolaylı olarak etkili olduğunun kanıtları olsa da kemik iliği yetmezliği dahil herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmesi için daha fazla kanıt ihtiyacı olduğu aşıkardır.



Hastanın tüm bulguları belirlenen delesyon ile açıklanamadığı, *ZC3H15* genine ait değişiklikler daha önce herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmediği ve saptanan delesyon bölgesi sağlıklı populasyona ait veri tabanında bildirilmediği için tez kapsamında belirlenen delesyon klinik önemi bilinmeyen kopya sayısı değişikliği sınıfında değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında bilinen en kompleks ve genetik heterojenitesi yüksek hastalık grubu olan karakterize edilemeyen kemik iliği yetmezlikleri grubu detaylı olarak çalışılmıştır. Tüm kohortun yarıya yakınında nedensel etyoloji saptanmış ancak klinik bulguların geniş bir çeşitlilik göstermiş olduğu belirlenmiştir. Konjenital kemik iliği yetmezliğine yol açacak çok güçlü bir aday gen (*MDM2*) ilk kez bu tez kapsamında kemik iliği yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir. Buna ek olarak genomik kopya sayısı değişiklikleri, *TP53* gibi kritik genlerdeki somatik değişiklikler, atipik ya da harman fenotiplerin klinik tanıyı zorlaştıracağı, bu nedenle klinik ve genetik grupların iş birliği içinde bu hasta ve ailelerin takibinde yer alması gerektiği bir kez daha ve çok güçlü bir şekilde ortaya konmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışma Türkiye’de Karakterize Edilemeyen Kalıtsal Kemik İliği Yetmezliklerine yönelik ilk ve kapsamlı çalışma özelliği taşımaktadır.
- Araştırma sonucunda diğer toplumlarda olduğu gibi bizim toplumumuzda da oldukça heterojen klinik ve genetik özellikte bir hastalık grubu ile karşı karşıya kalındığı kanıtlanmıştır.
- Klinik bulguların tüm yönleri ile ve dikkatli bir şekilde incelenmesinin klinik tanı açısından oldukça kritik olduğu sonucuna varılmıştır.
- Klinik heterojenite nedeni ile geniş ölçekli genetik testlerin gerekliliğinin önemi gösterilmiştir.
- Çalışma sonucunda klinik izlemi değiştirebilmesi açısından doğru tanının çok önemli olduğu bu hasta grubu için yüksek bir tanı oranı yakalanmıştır.
- Etyolojinin aydınlatılmasına yönelik yeni aday genlerin saptanması hedefine ulaşılmıştır.
- Çalışma sonucunda 1 ailede güçlü bir aday gen saptanmıştır.
- Saptanan bu aday gen ile gene özgü yeni bir fenotip tanımlanmıştır.
- 2 ailede iki farklı gendeki değişikliklere bağlı klinikleri ayrı ayrı taşıyan “harman fenotip” saptanmıştır.
- Toplumumuz için harman fenotiplerin saptanması ve izlenmesinin önemi vurgulanmıştır.
- Son olarak genetik etyolojisi belirlenemeyen hastalar için ileri analizler devam etmekte olup, bu analizlerde kodlamayan bölge varyantlarının değerlendirilmesi, RNAseq çalışması ve yeni filtreleme stratejileri ile reanalizler önerilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(12).
2. Tavian M, Péault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. Int J Dev Biol. 2005;49(2-3):243-50.
3. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell. 2008;132(4):631-44.
4. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. Development. 2013;140(12):2463-7.
5. European Hematology Association. Inherited bone marrow failure syndromes 2014, June [Available from: <https://library.ehaweb.org/eha/2014/19th/55581/inderjeet.dokal.inherited.bone.marrow.failure.syndromes.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D2%2Aspeaker%3D93692>.
6. Farley-Barnes KI, Ogawa LM, Baserga SJ. Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. Trends Genet. 2019;35(10):754-67.
7. Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, De Keersmaecker K. Hallmarks of ribosomopathies. Nucleic Acids Res. 2020;48(3):1013-28.
8. Armando RG, Mengual Gomez DL, Maggio J, Sanmartin MC, Gomez DE. Telomeropathies: Etiology, diagnosis, treatment and follow-up. Ethical and legal considerations. Clin Genet. 2019;96(1):3-16.
9. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. Blood. 2014;124(18):2775-83.
10. Sieff CA. Introduction to Acquired and Inherited Bone Marrow Failure. Hematol Oncol Clin North Am. 2018;32(4):569-80.
11. Means RT, Jr. Pure red cell aplasia. Blood. 2016;128(21):2504-9.
12. Alfaraj M, Al Saeed H. Pure red cell aplasia, a disease of a great diversity. Journal of Applied Hematology. 2020;11(1):1-6.
13. Diagnostic Pediatric Hematopathology. Cambridge: Cambridge University Press; 2011.

14. Da Costa L, Leblanc T, Mohandas N. Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2020;136(11):1262-73.
15. O'Donohue MF, Da Costa L, Lezzerini M, Unal S, Joret C, Bartels M, et al. HEATR3 variants impair nuclear import of uL18 (RPL5) and drive Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2022;139(21):3111-26.
16. Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Congenital dyserythropoietic anemias. *Blood*. 2020;136(11):1274-83.
17. Wontakal SN, Britto M, Zhang H, Han Y, Gao C, Tannenbaum S, et al. RACGAP1 variants in a sporadic case of CDA III implicate the dysfunction of centralspindlin as the basis of the disease. *Blood*. 2022;139(9):1413-8.
18. Bohn G, Welte K, Klein C. Severe congenital neutropenia: new genes explain an old disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(6):644-50.
19. Boxer LA, Newburger PE. A molecular classification of congenital neutropenia syndromes. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(5):609-14.
20. Veneri D, Franchini M, Randon F, Nichele I, Pizzolo G, Ambrosetti A. Thrombocytopenias: a clinical point of view. *Blood Transfus*. 2009;7(2):75-85.
21. Demirin H, Ozhan H, Ucgun T, Celer A, Bulur S, Cil H, et al. Normal range of mean platelet volume in healthy subjects: Insight from a large epidemiologic study. *Thromb Res*. 2011;128(4):358-60.
22. Narla A. When to worry about inherited bone marrow failure and myeloid malignancy predisposition syndromes in the setting of a hypocellular marrow. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021;2021(1):153-6.
23. Albers CA, Newbury-Ecob R, Ouwehand WH, Ghevaert C. New insights into the genetic basis of TAR (thrombocytopenia-absent radii) syndrome. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23(3):316-23.
24. BouSSION S, Escande F, Jourdain AS, Smol T, Brunelle P, Duhamel C, et al. TAR syndrome: Clinical and molecular characterization of a cohort of 26 patients and description of novel noncoding variants of RBM8A. *Hum Mutat*. 2020;41(7):1220-5.
25. Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kaneko T, Hashii Y, Irie M, et al. Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar

- Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2015;97(6):848-54.
26. Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia.* 2012;2012:238731.
  27. Kam MLW, Nguyen TTT, Ngeow JYY. Telomere biology disorders. *NPJ Genom Med.* 2021;6(1):36.
  28. Stepensky P, Chacón-Flores M, Kim KH, Abuzaitoun O, Bautista-Santos A, Simanovsky N, et al. Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in aShwachman-Diamond like syndrome. *J Med Genet.* 2017;54(8):558-66.
  29. Rötig A, Bourgeron T, Chretien D, Rustin P, Munnich A. Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Hum Mol Genet.* 1995;4(8):1327-30.
  30. Farruggia P, Di Marco F, Dufour C. Pearson syndrome. *Expert Rev Hematol.* 2018;11(3):239-46.
  31. Groarke EM, Young NS, Calvo KR. Distinguishing constitutional from acquired bone marrow failure in the hematology clinic. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2021;34(2):101275.
  32. Olney HJ, Le Beau MM. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14(3):479-95.
  33. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, et al. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia.* 2005;19(8):1424-31.
  34. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 2008;451(7176):335-9.
  35. Giagounidis AA, Germing U, Wainscoat JS, Boulwood J, Aul C. The 5q- syndrome. *Hematology.* 2004;9(4):271-7.
  36. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med.* 2006;355(14):1456-65.

37. Kallen ME, Dulau-Florea A, Wang W, Calvo KR. Acquired and germline predisposition to bone marrow failure: Diagnostic features and clinical implications. *Semin Hematol*. 2019;56(1):69-82.
38. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16.
39. Hong M, He G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Int Med*. 2017;5(3):139-43.
40. Revy P, Kannengiesser C, Fischer A. Somatic genetic rescue in Mendelian haematopoietic diseases. *Nat Rev Genet*. 2019;20(10):582-98.
41. McGowan KA, Li JZ, Park CY, Beaudry V, Tabor HK, Sabnis AJ, et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet*. 2008;40(8):963-70.
42. Khincha PP, Savage SA. Genomic characterization of the inherited bone marrow failure syndromes. *Semin Hematol*. 2013;50(4):333-47.
43. Teo JT, Klaassen R, Fernandez CV, Yanofsky R, Wu J, Champagne J, et al. Clinical and genetic analysis of unclassifiable inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatrics*. 2008;122(1):e139-48.
44. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2018;131(7):717-32.
45. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, Velangi M, Ho A, Hossain U, et al. Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *Am J Hum Genet*. 2012;90(5):888-92.
46. Tummala H, Kirwan M, Walne AJ, Hossain U, Jackson N, Pondarre C, et al. ERCC6L2 mutations link a distinct bone-marrow-failure syndrome to DNA repair and mitochondrial function. *Am J Hum Genet*. 2014;94(2):246-56.
47. Tummala H, Walne AJ, Williams M, Bockett N, Collopy L, Cardoso S, et al. DNAJC21 Mutations Link a Cancer-Prone Bone Marrow Failure Syndrome to Corruption in 60S Ribosome Subunit Maturation. *Am J Hum Genet*. 2016;99(1):115-24.

48. D'Amours G, Lopes F, Gauthier J, Saillour V, Nassif C, Wynn R, et al. Refining the phenotype associated with biallelic DNAJC21 mutations. *Clin Genet*. 2018;94(2):252-8.
49. Bahrami E, Witzel M, Racek T, Puchałka J, Hollizeck S, Greif-Kohistani N, et al. Myb-like, SWIRM, and MPN domains 1 (MYSM1) deficiency: Genotoxic stress-associated bone marrow failure and developmental aberrations. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):1112-9.
50. Toki T, Yoshida K, Wang R, Nakamura S, Maekawa T, Goi K, et al. De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2018;103(3):440-7.
51. Toufektchan E, Lejour V, Durand R, Giri N, Draskovic I, Bardot B, et al. Germline mutation of MDM4, a major p53 regulator, in a familial syndrome of defective telomere maintenance. *Sci Adv*. 2020;6(15):eaay3511.
52. Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, Muramatsu H, Okuno Y, Higasa K, et al. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Sci Adv*. 2020;6(51).
53. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet*. 2016;48(7):792-7.
54. Chen DH, Below JE, Shimamura A, Keel SB, Matsushita M, Wolff J, et al. Ataxia-Pancytopenia Syndrome Is Caused by Missense Mutations in SAMD9L. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1146-58.
55. McReynolds LJ, Calvo KR, Holland SM. Germline GATA2 Mutation and Bone Marrow Failure. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(4):713-28.
56. Dorschner MO, Amendola LM, Turner EH, Robertson PD, Shirts BH, Gallego CJ, et al. Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants' exomes. *Am J Hum Genet*. 2013;93(4):631-40.
57. Conant D, Hsiao T, Rossi N, Oki J, Maures T, Waite K, et al. Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *Crispr j*. 2022;5(1):123-30.
58. Çepni E, Satkın NB, Moheb LA, Rocha ME, Kayserili H. Biallelic TERT variant leads to Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with additional dyskeratosis congenita findings. *Am J Med Genet A*. 2022;188(4):1226-32.

59. Gramatges MM, Qi X, Sasa GS, Chen JJ, Bertuch AA. A homozygous telomerase T-motif variant resulting in markedly reduced repeat addition processivity in siblings with Hoyeraal Hreidarsson syndrome. *Blood*. 2013;121(18):3586-93.
60. Stockklausner C, Raffel S, Klermund J, Bandapalli OR, Beier F, Brümmendorf TH, et al. A novel autosomal recessive TERT T1129P mutation in a dyskeratosis congenita family leads to cellular senescence and loss of CD34+ hematopoietic stem cells not reversible by mTOR-inhibition. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(11):911-27.
61. Marrone A, Walne A, Tamary H, Masunari Y, Kirwan M, Beswick R, et al. Telomerase reverse-transcriptase homozygous mutations in autosomal recessive dyskeratosis congenita and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Blood*. 2007;110(13):4198-205.
62. Du HY, Pumbo E, Manley P, Field JJ, Bayliss SJ, Wilson DB, et al. Complex inheritance pattern of dyskeratosis congenita in two families with 2 different mutations in the telomerase reverse transcriptase gene. *Blood*. 2008;111(3):1128-30.
63. Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, Drynan LF, Goyenechea B, Menne TF, et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev*. 2011;25(9):917-29.
64. Xia J, Miller CA, Baty J, Ramesh A, Jotte MRM, Fulton RS, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in congenital neutropenia. *Blood*. 2018;131(4):408-16.
65. Kennedy AL, Myers KC, Bowman J, Gibson CJ, Camarda ND, Furutani E, et al. Distinct genetic pathways define pre-malignant versus compensatory clonal hematopoiesis in Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Commun*. 2021;12(1):1334.
66. de Andrade KC, Lee EE, Tookmanian EM, Kesserwan CA, Manfredi JJ, Hatton JN, et al. The TP53 Database: transition from the International Agency for Research on Cancer to the US National Cancer Institute. *Cell Death & Differentiation*. 2022;29(5):1071-3.



67. De Rienzo A, Archer MA, Yeap BY, Dao N, Sciaranghella D, Sideris AC, et al. Gender-Specific Molecular and Clinical Features Underlie Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* 2016;76(2):319-28.
68. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):3-11.
69. Heinrich M, Müller M, Rand S, Brinkmann B, Hohoff C. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *Int J Legal Med.* 2004;118(6):361-3.
70. Zajícková K, Krepelová A, Zofková I. A single nucleotide polymorphism under the reverse primer binding site may lead to BsmI mis-genotyping in the vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res.* 2003;18(10):1754-7.
71. Mitani T, Isikay S, Gezdirici A, Gulec EY, Punetha J, Fatih JM, et al. High prevalence of multilocus pathogenic variation in neurodevelopmental disorders in the Turkish population. *Am J Hum Genet.* 2021;108(10):1981-2005.
72. Sebastio G, Sperandeo MP, Andria G. Lysinuric protein intolerance: reviewing concepts on a multisystem disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011;157c(1):54-62.
73. Font-Llitjós M, Rodríguez-Santiago B, Espino M, Sillué R, Mañas S, Gómez L, et al. Novel SLC7A7 large rearrangements in lysinuric protein intolerance patients involving the same AluY repeat. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(1):71-9.
74. Moran O. The gating of the CFTR channel. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(1):85-92.
75. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2016;388(10059):2519-31.
76. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(6):198-9.
77. Jambhekar SK, Carroll JL, Keiles S. Report of two patients with associated conditions in addition to cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2010;9(4):269-71.
78. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014;13(4):403-9.

79. Yeh JT, Yu YC, Hwang TC. Structural mechanisms for defective CFTR gating caused by the Q1412X mutation, a severe Class VI pathogenic mutation in cystic fibrosis. *J Physiol.* 2019;597(2):543-60.
80. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2004;3(4):223-31.
81. Rotoli BM, Barilli A, Visigalli R, Ingoglia F, Milioli M, Di Lascia M, et al. Downregulation of SLC7A7 Triggers an Inflammatory Phenotype in Human Macrophages and Airway Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2018;9:508.
82. Ratchford TL, Teckman JH, Patel DR. Gastrointestinal pathophysiology and nutrition in cystic fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;12(9):853-62.
83. Lupi A, Tenni R, Rossi A, Cetta G, Forlino A. Human prolidase and prolidase deficiency: an overview on the characterization of the enzyme involved in proline recycling and on the effects of its mutations. *Amino Acids.* 2008;35(4):739-52.
84. Forlino A, Lupi A, Vaghi P, Icaro Cornaglia A, Calligaro A, Campari E, et al. Mutation analysis of five new patients affected by prolidase deficiency: the lack of enzyme activity causes necrosis-like cell death in cultured fibroblasts. *Hum Genet.* 2002;111(4-5):314-22.
85. Zareba I, Palka J. Prolidase-proline dehydrogenase/proline oxidase-collagen biosynthesis axis as a potential interface of apoptosis/autophagy. *Biofactors.* 2016;42(4):341-8.
86. Spodenkiewicz M, Spodenkiewicz M, Cleary M, Massier M, Fitsialos G, Cottin V, et al. Clinical Genetics of Prolidase Deficiency: An Updated Review. *Biology (Basel).* 2020;9(5).
87. Setó-Salvia N, Stanier P. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: association with other common anomalies. *Eur J Med Genet.* 2014;57(8):381-93.
88. Young JI, Slifer S, Hecht JT, Blanton SH. DNA Methylation Variation Is Identified in Monozygotic Twins Discordant for Non-syndromic Cleft Lip and Palate. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:656865.
89. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):167-78.

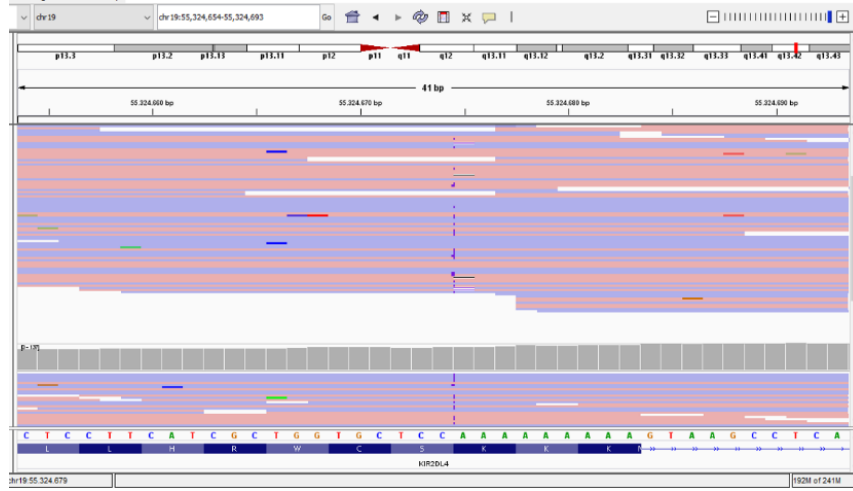
90. Pecci A, Ma X, Savoia A, Adelstein RS. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene*. 2018;664:152-67.
91. Pecci A, Klersy C, Gresele P, Lee KJ, De Rocco D, Bozzi V, et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*. 2014;35(2):236-47.
92. Verver EJ, Topsakal V, Kunst HP, Huygen PL, Heller PG, Pujol-Moix N, et al. Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA Mutation Predicts Severity and Progression of Sensorineural Hearing Loss in Patients With MYH9-Related Disease. *Ear Hear*. 2016;37(1):112-20.
93. Hashimoto J, Hamasaki Y, Takahashi Y, Kubota M, Yanagisawa T, Itabashi Y, et al. Management of patients with severe Epstein syndrome: Review of four patients who received living-donor renal transplantation. *Nephrology (Carlton)*. 2019;24(4):450-5.
94. Moretti F. MDM Genes. In: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 2194-7.
95. Kaiser P, Huang L. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol*. 2005;6(10):233.
96. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997;387(6630):299-303.
97. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9.
98. James A, Wang Y, Raje H, Rosby R, DiMario P. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus*. 2014;5(5):402-26.
99. Lee JT, Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ*. 2010;17(1):86-92.
100. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009;458(7242):1127-30.
101. Golomb L, Volarevic S, Oren M. p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2571-9.
102. Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W. The p53--Mdm2--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene*. 2007;26(51):7262-6.

103. Lessel D, Wu D, Trujillo C, Ramezani T, Lessel I, Alwasayah MK, et al. Dysfunction of the MDM2/p53 axis is linked to premature aging. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(10):3598-608.
104. O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*. 2012;485(7397):246-50.
105. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004;119(5):591-602.
106. Francoz S, Froment P, Bogaerts S, De Clercq S, Maetens M, Doumont G, et al. Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3232-7.
107. Kamio T, Gu BW, Olson TS, Zhang Y, Mason PJ, Bessler M. Mice with a Mutation in the Mdm2 Gene That Interferes with MDM2/Ribosomal Protein Binding Develop a Defect in Erythropoiesis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152263.
108. Murray JK, Gellman SH. Targeting protein-protein interactions: lessons from p53/MDM2. *Biopolymers*. 2007;88(5):657-86.
109. Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, Svobodová R, Berka K, Bazgier V, et al. Mol\* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W431-w7.
110. Agaimy A, Foulkes WD. Hereditary SWI/SNF complex deficiency syndromes. *Semin Diagn Pathol*. 2018;35(3):193-8.
111. Capalbo G, Mueller-Kuller T, Koschmieder S, Klein HU, Ottmann OG, Hoelzer D, et al. Characterization of ZC3H15 as a potential TRAF-2-interacting protein implicated in the NFκB pathway and overexpressed in AML. *Int J Oncol*. 2013;43(1):246-54.
112. Westrip CAE, Zhuang Q, Hall C, Eaton CD, Coleman ML. Developmentally regulated GTPases: structure, function and roles in disease. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(23):7219-35.

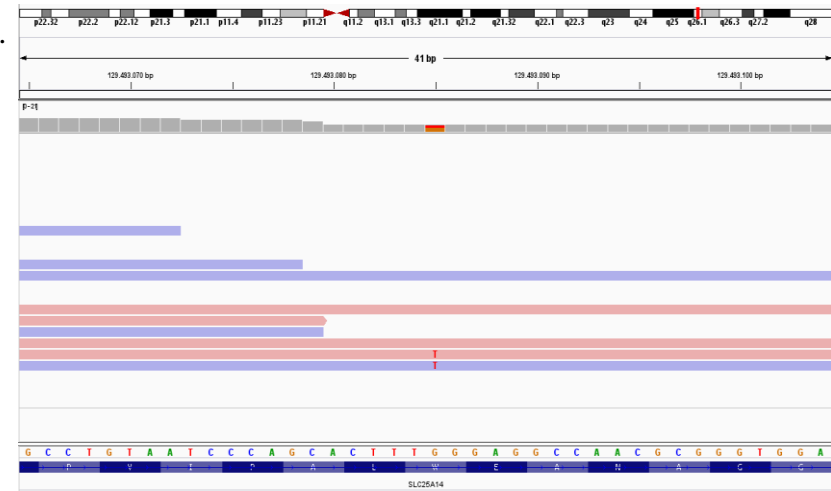
## 8. EKLER

### EK 1. WES analizi sırasında IGV değerlendirmesi ile elenen varyantlara ait örnek görüntüler

A.



B.



C.

Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly

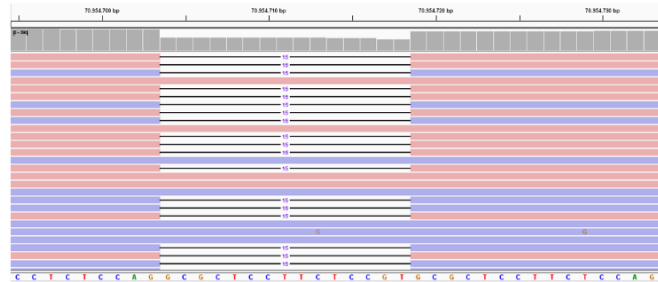
Sequence ID: [NC\\_000001.11](#) Length: 248956422 Number of Matches: 1

Range 1: 146794412 to 146794561 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
278 bits(150)	9e-73	150/150(100%)	0/150(0%)	Plus/Minus

Features: [449697 bp at 5' side: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4H](#)  
[165583 bp at 3' side: neuroblastoma breakpoint family member 12](#)

```
Query 1 tccccctccagtcgctccgctctccaggctcgcagcttccaggcgtcccgtcc 60
Sbjct 146794561 TCCCCCTCCAGTCGCTCCGCTCTCCAGGGCTCGAGCTTCCAGGCGTCCCCTCC 146794502
Query 61 gcccttccctccagggctcctctccaggcgtcctccgggtccTTGCGGCCCC 120
Sbjct 146794501 GCCTTCTCCTCTCCAGGCGCTCTCTCCCGGTCTTGC GGCC 146794442
Query 121 CTGCGCCACCCGAGGGGACCTGGCGCTGG 150
Sbjct 146794441 CTGCGCCACCCGAGGGGACCTGGCGCTGG 146794412
```



16. Kromozomda yer alan gendeki hizalama hatası

Ek 1. WES analizi sırasında IGV değerlendirmesi ile elenen varyantlara ait örnek görüntüler. A. Kısa ardışık tekrar bölgelerinde tekrar dizisinin artışına örnek teşkil eden varyant. B. Analizler sonucunda belirlenen genotip ile IGV'deki genotipin uyumsuz olduğuna örnek teşkil eden varyant. C. Genom içerisinde haritalama hatasına örnek teşkil eden varyant.

## EK 2. Yarık Damak/Dudak Fenotipi ile İlişkilendirilmiş Gen Listesi

<i>ABCA12</i>	<i>CLPTM1</i>	<i>EYA1</i>	<i>ISM1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SIX3</i>	<i>UGT1A9</i>
<i>ABCA4</i>	<i>CLPTM1L</i>	<i>FAM20C</i>	<i>JAG2</i>	<i>PGM1</i>	<i>SKI</i>	<i>VAX1</i>
<i>ACACB</i>	<i>COG5</i>	<i>FBLN1</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PHF8</i>	<i>SMAD2</i>	<i>WDR11</i>
<i>ACBD5</i>	<i>COL11A1</i>	<i>FGD1</i>	<i>KLF4</i>	<i>PHYH</i>	<i>SMAD3</i>	<i>WDR35</i>
<i>ACSS2</i>	<i>COL11A2</i>	<i>FGF10</i>	<i>KMT2D</i>	<i>PIBF1</i>	<i>SMC1A</i>	<i>WNT5A</i>
<i>ACTC1</i>	<i>COL2A1</i>	<i>FGF8</i>	<i>LHX8</i>	<i>PIGA</i>	<i>SNAP29</i>	<i>WNT7A</i>
<i>ADH7</i>	<i>COL9A1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>LRP8</i>	<i>PLEKHA5</i>	<i>SNTG1</i>	<i>YWHAE</i>
<i>AHDC1</i>	<i>COL9A2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>MAFB</i>	<i>PLEKHA7</i>	<i>SOX9</i>	<i>ZBTB24</i>
<i>ALX1</i>	<i>COL9A3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>MASP1</i>	<i>POLR1C</i>	<i>SP8</i>	
<i>AMELX</i>	<i>COLEC11</i>	<i>FLNA</i>	<i>MEIS2</i>	<i>POLR1D</i>	<i>SPECC1L</i>	
<i>ANOS1</i>	<i>CRISPLD2</i>	<i>FOXE1</i>	<i>MIB1</i>	<i>PORCN</i>	<i>SPRY2</i>	
<i>ARHGAP29</i>	<i>CRYZ</i>	<i>FOXF2</i>	<i>MN1</i>	<i>PPP1R21</i>	<i>SPRY4</i>	
<i>ARID5B</i>	<i>CTNND1</i>	<i>FRAS1</i>	<i>MSX1</i>	<i>PREPL</i>	<i>SUMO1</i>	
<i>BMP2</i>	<i>DAB1</i>	<i>FREM2</i>	<i>MSX2</i>	<i>PRICKLE1</i>	<i>TBX1</i>	
<i>BMP4</i>	<i>DEAF1</i>	<i>FZD6</i>	<i>MYH3</i>	<i>PTCH1</i>	<i>TBX10</i>	
<i>CADPS</i>	<i>DENND4B</i>	<i>GJA1</i>	<i>NBAS</i>	<i>PTHLH</i>	<i>TBX22</i>	
<i>CBFB</i>	<i>DHCR7</i>	<i>GLI2</i>	<i>NECTIN1</i>	<i>PTPRS</i>	<i>TCOF1</i>	
<i>CDH1</i>	<i>DHODH</i>	<i>GLI3</i>	<i>NECTIN2</i>	<i>RIMS3</i>	<i>TFAP2A</i>	
<i>CDH19</i>	<i>DLG1</i>	<i>GPC6</i>	<i>NEDD4L</i>	<i>RIPK4</i>	<i>TGDS</i>	
<i>CDKN1C</i>	<i>DLX4</i>	<i>GREM1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>RPGRIP1L</i>	<i>TGFB1</i>	
<i>CDON</i>	<i>DUSP22</i>	<i>GRHL3</i>	<i>NTN1</i>	<i>RYK</i>	<i>TGFB3</i>	
<i>CFAP57</i>	<i>DVL3</i>	<i>HYAL2</i>	<i>NUDT6</i>	<i>RYR1</i>	<i>TGFBR2</i>	
<i>CFDP1</i>	<i>EFTUD2</i>	<i>IFT88</i>	<i>PAX3</i>	<i>SATB2</i>	<i>TGIF1</i>	
<i>CHD7</i>	<i>ESCO2</i>	<i>IGF1R</i>	<i>PAX7</i>	<i>SEMA3E</i>	<i>TP63</i>	
<i>CHN2</i>	<i>ESRP2</i>	<i>INPPL1</i>	<i>PAX9</i>	<i>SF3B4</i>	<i>TXNRD2</i>	
<i>CHRNA7</i>	<i>EVC2</i>	<i>IRF6</i>	<i>PDGFC</i>	<i>SHH</i>	<i>UFD1</i>	

Prevention Genetics firmasının “Cleft Lip/Cleft Palate” panelinden alınmıştır.

### EK 3. Kalıtsal Kemik İliği Yetmezlikleri ile İlişkilendirilmiş Gen Listesi

ABCB7	CD177	EPO	GPI	LAMTOR2	NRAS	RPL21	SLC19A3	TPK1
ACD	CD36	ERCC4	GP9	LDB1	NSMCE3	RPL26	SLC25A19	TP53
ACKR1	CD40LG	ERCC6L2	GRWD1	LIG4	PALB2	RPL27	SLC25A38	TRNT1
ACTN1	CEBPA	ETO2	GSS	LMBRD1	PARN	RPL31	SLC4A1	TSR2
ADAMTS13	CENPJ	SR	HAX1	LMO2	PAX5	RPL35	SLC35A1	UBE2T
ADA2/CECR1	CEP152	FANCA	HBA1	LPIN2	PC	RPL35A	SLC37A4	UNC13D
ADH5	CLCN7	FANCB	HBA2	LYST	PCCA	RPL5	SLC7A7	USB1
AK2	CLPB	FANCC	HBB	MAD2L2	PCCB	RPL9	SLX4	VPS13B
ALAS2	COX4I2	FANCD2	HFE	MAGT1	PDHA1	RP1L1	SMARCD2	VPS45
ALDH2	CSF2RA	FANCE	HOXA11	MAP2K1	PDHX	RPS10	SOS1	ZFPM1
AMN	CSF3R	FANCF	HPS1	MAP2K2	PGM3	RPS15	SPTA1	WAS
ANKRD26	CTC1	FANCG	HPS3	MDM4	PKLR	RPS15A	SPTB	WDR1
ANK1	CTSC	FANCI	HPS4	MKLI/MRTFA	POT1	RPS17	SRP54	WIPF1
AP3B1	CUBN	FANCL	HPS5	MPL	PRF1	RPS19	SRP72	WRAP53
ATM	CYB5R3	FANCM	HPS6	MRE11	PTPN11	RPS24	STIM1	XIAP
ATR	CYCS	FAS	HSPA9	MSN	PUS1	RPS26	STK4	XRCC2
ATRX	CXCR2	FASLG	HSPA14	MTR	RAB27A	RPS27	STN1	YARS2
BLM	CXCR4	FCGR3B	HTRA2	MTRR	RAC2	RPS27A	STX11	
BLOC1S3	C15ORF41	FIBP	HYOU1	MVK	RAD51	RPS28	STXBP2	
BLOC1S6	DDX41	FLI1	IFNG	MYD88	RAD51C	RPS29	TAL1	
BRAF	DHFR	G6PC3	IFNGR2	MYB	RBBP8	RPS7	TAZ	
BRCA1	DIAPH1	G6PD	IKZF1	MYH9	RBM8A	RTEL1	TCIRG1	
BRCA2	DKC1	GATA1	IL2RG	MYO5A	RFWD3	RUNX1	TCN2	
BRIPI	DNAJC19	GATA2	IRAK4	MYSM1	RHAG	SAMD9	TERC	
CAD	DNAJC21	GFII	ITGA2B	NAF1	RIT1	SAMD9L	TERF2IP	
CASP10	DNASE2	GFIIIB	ITGB3	NBN	RMRP	SBDS	TERT	
CBL	DTNBP1	GINS1	ITK	NF1	RNF168	SEC23B	TFRC	
CBLIF	EFL1	GLRX5	JAGN1	NHEJ1	RNU6-1	SEC61A1	THPO	
CDAN1	EIF2AK3	GNE	KCNN4	NHP2	RPL11	SETD1B	TINF2	
CDIN1	ELANE	GP1BA	KLF1	NOL11	RPL15	SH2D1A	TNFSF5	
CDKN2A	EPB42	GP1BB	KRAS	NOP10	RPL18	SLC19A2	TNFSF11	

Gen Listesi *Cincinnati Children's* Hastanesi, *Chicago* Üniversitesi Genetik Servis Laboratuvarı, *Prevention Genetics* ve *Invitae* firmaları tarafından oluşturulan “Kalıtsal Kemik İliği Yetmezliği Panel”leri kullanılarak meydana getirilmiştir.