

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI

ARRAY-CGH İLE TESPİT EDİLEN KOPYA SAYISI
DEĞİŞİKLİKLERİNİN DOĞRULANMASINDA KANTİTATİF
PCR YÖNTEMİNİN KULLANILMASI

Dr. Aysel ÜNAL
UZMANLIK TEZİ

ANKARA
MAYIS 2017

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI

ARRAY-CGH İLE TESPİT EDİLEN KOPYA SAYISI
DEĞİŞİKLİKLERİNİN DOĞRULANMASINDA KANTİTATİF
PCR YÖNTEMİNİN KULLANILMASI

Dr. Aysel ÜNAL
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr E. Ferda PERÇİN

ANKARA
MAYIS 2017

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

18/05/2017

Adı ve Soyadı	Aysel Ünal
Baba Adı	Mehmet
Doğum Yeri/Tarihi	Antalya/02.03.1988
Diploma Tarihi/Diploma No	19.07.2012/2012-09-0193
Mezun Olduğu Fakülte	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 4
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "Array-CGH İle Tespit Edilen Kopya Sayısı
Değişikliklerinin Doğrulanmasında Kantitatif PCR (qPCR) Yönteminin
Kullanılması "

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:

BAŞKAN

Prof.Dr.E.Ferda Perçin

ÜYE
Prof.Dr.Mehmet Ali Engün

ÜYE
Prof.Dr.Nurten Akarsu

TEŞEKKÜR

Yanında eğitim almaktan ve tez öğrencisi olmaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum, akademik kimliğinin yanında kişiliği ve etik yaklaşımları açısından bizlere örnek olan, iyi ve kötü günlerimizde bizi yalnız bırakmayan değerli hocam Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e çok teşekkür ederim. Eğitimimize büyük önem veren, anlayışı ve çok yönlülüğü ile enerjimizin yüksek kalmasını sağlayan kıymetli hocam Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoguz'a, uzmanlık eğitimim boyunca en güncel bilgilere ulaşmamı sağlayan, çalışkanlığı, pratikliği ve dürüstlüğü, gerektiğinde dostluğu ile yanımda olan Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e, her fırsatta bizlere bilgi ve tecrübelerini aktaran Doç. Dr. Esra Tuğ'a samimiyetinden dolayı teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince bilgilerine sıklıkla başvurduğum kıdemlilerime, özellikle güler yüzü ve pozitif enerjisi sayesinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, hayatım boyunca çalışkanlığı ve yardımseverliği ile örnek alacağım Uzm. Dr. Gülsüm Kayhan'a çok teşekkür ederim. Her biriyle çalışmaktan keyif aldığım arkadaşlarım Dr. Hanife Saat, dostlarım Dr. Pelin Özyavuz Çubuk ve Dr. Selvihan Sağdıç'a, Dr. Serdar Mermer, Dr. Abdullah Sezer ile Dr. Sezen Güntekin Ergün, Dr. Derya Karaer, Bio. Işıl Küçün Kiraz, Uzm. Bio. Ebru Aytekin, Uzm. Bio. Halide Gül Akyar, Esra Küçük, Uzm. Bio. Neslihan Ağırbaşı ve sekreterlerimiz Mehtap Yılmaz ile Ayşe Erdoğan'a teşekkür ederim.

Bana her zaman güven veren, hayattaki en büyük servetim olan aileme, huzur kaynağım Sıdika ablama, yol göstericim Hüsnü abime çok teşekkür ederim.

Değerli eşim Abdullah Ünal'a hep yanımda olduğu için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR	V
TABLolar DİZİNİ.....	VII
RESİMLER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 GENETİK VARYASYONLAR VE CNV TANIMI	1
1.2 CNV GELİŞİM MEKANİZMALARI	5
1.2.1 Non-alelik Homolog Rekombinasyon (NAHR).....	5
1.2.2 Homolog Olmayan Birleştirme (HOB).....	6
1.2.3 Replikasyon Temelli Mekanizmalar.....	7
1.3 CNV'LERİN HASTALIKLARA YOL AÇMA MEKANİZMALARI.....	10
1.4 CNV'LERİN KLİNİKLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ	13
1.5 CNV SAPTAMA YÖNTEMLERİ	16
1.5.1 GENOM BOYU CNV SAPTAMA YÖNTEMLERİ.....	16
1.5.1.1 ARRAY TABANLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON (ARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION, ARRAY-CGH)...	19
1.5.1.2 SNP (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM, Tek Nükleotid Polimorfizm) ARRAY	21
1.5.1.3 YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMLERİ	26
1.5.2 HEDEFE YÖNELİK CNV SAPTAMA YÖNTEMLERİ	27
1.5.2.1 Floresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	27
1.5.2.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	28
1.5.2.3 Southern Blot	29
1.5.2.4 Kantitatif Real-time PCR (qPCR)	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1 YÖNTEM	40
2.1.1 Array CGH 8x60K ISCA Protokolü	40

2.1.2. Array CGH Verilerinin Analizi ve Aday CNV'lerin Belirlenmesi	45
2.1.3 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	48
3. BULGULAR.....	51
4. TARTIŞMA.....	77
5. SONUÇ.....	91
KAYNAKLAR	93
ÖZET	99
SUMMARY.....	103
6. ÖZGEÇMİŞ	105
7. EKLER.....	107

KISALTMALAR

aCGH	array CGH
ACMG	American Collage of Medical Genetics and Genomics
°C	Santigrad derece
cm	santimetre
CNV	Copy Number Variation
CT	Cycle of Treshold
DECIPHER	Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using Ensebl Resources
DGV	Database of Genomic Variants
DKT	Düşük kopyalı tekrar
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EKO	Ekokardiyografi
EY	Entelektüel yetersizlik
FISH	Florescence In Situ Hybridization
FoSTeS	Fork Stalling and Template Switching
gr	gram
Hg	Human Genome
HOB	Homolog Olmayan Birleştirme
ISCA	International Standard for Cytogenomic Array
kb	kilobaz
kg	kilogram
log	logaritmik değer
LOH	Loss of Heterozygosity
Mb	megabaz
ml	mililitre
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMBIR	Microhomology Mediated Break Induced Replication
MR	Manyetik Rezonans
mRNA	messanger RNA
NAHR	Non-allelik Homoloh Rekombinasyon
ng	nanogram
NGS	Next-generation Sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction

rpm	rotations per minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
UPD	Uniparental Disomy



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: CNV'lerin Genotip Spektrumu ve İlişkili Fenotipler	12
Tablo 2: CNV'lerin patojenite değerlendirmesi.....	14
Tablo 3: İnternet üzerinden erişime açık CNV ve İlişkili Fenotip Kaynakları	15
Tablo 4: Postnatal Yapısal CNV'lerin ACMG'ye Göre Klinik Gruplaması.....	16
Tablo 5: Array CGH ile SNP Array Platformlarının Karşılaştırması.....	25
Tablo 6: qPCR Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları.....	36
Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen CNV'lerin genomik yerleşimleri, büyüklüğü, sınıflaması ve ilgili bölgede bulunan prob sayısı	47
Tablo 9: 1. Hastaya ait detaylı array-CGH raporu.....	52
Tablo 10: 1. Hastaya ve annesine ait qPCR çalışması CT değerleri.....	53
Tablo 11: 2. ve 3. Hastaların tespit edilen marker kromozomuna ait aCGH sonuçları	54
Tablo 12: 2, 3 ve 4. Hastalarda tespit edilen ortak CNV'ye ait detaylı aCGH sonuçları	55
Tablo 13: 2. ve 3. hastalara ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri	57
Tablo 14: 4. Hastaya ait qPCR çalışması CT değerleri.....	57
Tablo 15: 5. Hastaya ait aCGH raporu	59
Tablo 16: 5. Hastaya ait qPCR çalışması CT değerleri.....	60
Tablo 17: 6. Hastaya ait aCGH raporu	61
Tablo 18: 6. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri	63
Tablo 19: 7. Hastaya ait array-CGH raporu	64
Tablo 20: 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri (2p24.3-23,3 için)	66
Tablo 21: 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri (2p22.1 için)	67
Tablo 22: 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri (6p24.2-24.1)	67
Tablo 23: 8. Hastaya ait array-CGH raporu	69
Tablo 24: 8. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri	70
Tablo 25: 9. Hastaya ait array-CGH raporu	71
Tablo 26: 9. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri	72
Tablo 27: 10. Hastaya ait array-CGH raporu	74
Tablo 28: 10. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri	74
Tablo 29: Hastalara ve ebeveynlerine ait qPCR çalışma sonuçlarının özeti	76
Tablo 30: Yanlış pozitif olduğu saptanan iki aCGH sonucunun kalite verileri.	82

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: 1. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı	52
Resim 2 : Sırasıyla 2, 3 ve 4. Hastalara ait moleküler karyotip ideogramları	56
Resim 3: 5. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı	59
Resim 4: 6. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı	62
Resim 5: 7. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramları	65
Resim 6: 9. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Uzunluklarına Göre Genetik Varyasyonlar.....	2
Şekil 2: Farklı CNV Formları.....	3
Şekil 3: Non-allelik Homolog Rekombinasyon (NAHR).	6
Şekil 4: Homolog olmayan birleştirme (HOB)	7
Şekil 5: FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) Mekanizması.....	8
Şekil 6: MMBIR (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication).....	9
Şekil 7: Array CGH Uygulama Basamakları	20
Şekil 8: Array CGH’te Saptanan CNV Örnekleri	21
Şekil 9: SNP Array ile Genotipleme	23
Şekil 10: SNP Array ile CNV Analizi.....	24
Şekil 11: qPCR Basamakları.	31
Şekil 12: qPCR analizinde Taqman probu ile SYBR Green’in karşılaştırması	32
Şekil 13: Amplifikasyon Eğrileri ve Standart Eğri Eldesi	34
Şekil 14: qPCR’da Elde Edilen Erime Eğrisinin Değerlendirilmesi	35
Şekil 16: Array-CGH için klinik uygulamada önerilen algoritma	48

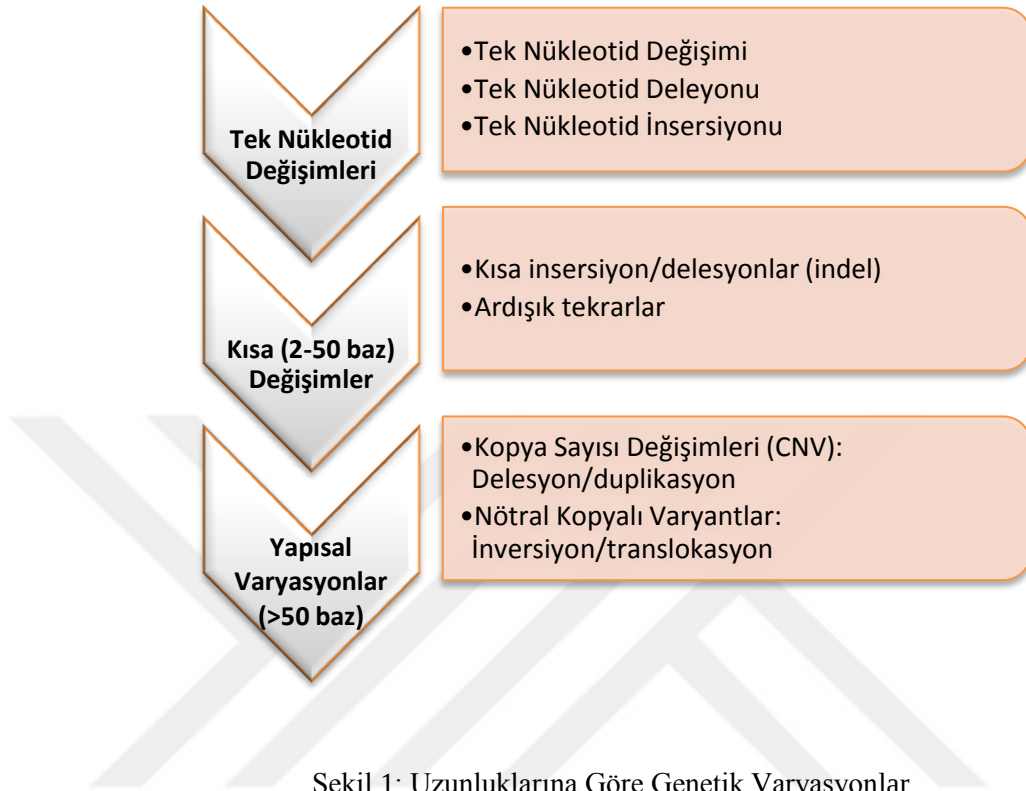
1. GENEL BİLGİLER

İnsan genomu, bireyler arasında varyasyonlar göstermektedir. Bu varyasyonlar, kişilerin birbirinden farklı özelliklere sahip olmasını sağladığı gibi, hastalıklara da neden olabilmektedir. Bireyler arası farklı fenotipten sorumlu olan genetik farklılıklar, teknolojinin gelişmesiyle birlikte, nükleotid düzeyine kadar tespit edilebilir hale gelmiştir.

1.1 GENETİK VARYASYONLAR VE CNV TANIMI

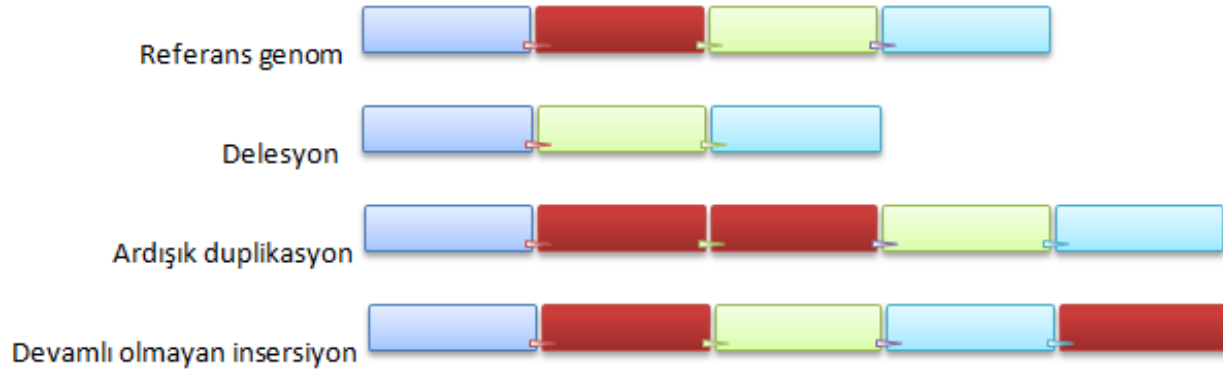
Bireyler arası genetik varyasyonlar farklı tiplerde olup, uzunluklarına göre üç grupta incelenmektedir (Şekil 1):

- 1) Tek nükleotid değişimleri (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)
 - 2) Kısa (2-50 baz) insersiyon, delesyonlar ve ardışık tekrarlar
 - 3) DNA segmentlerinin 50 bazdan büyük değişimleri (insersiyon, delesyon, inversiyon, translokasyon gibi dengeli veya dengesiz olaylar): Yapısal varyantlar [1].
- Kopya sayısı değişimleri (Copy Number Variation, CNV), dengesiz yapısal varyantların önemli bir alt grubudur.



Şekil 1: Uzunluklarına Göre Genetik Varyasyonlar

CNV'nin klasik tanımlaması; referans genomla karşılaştırıldığında genlerde veya genomik segmentlerde bulunan dozaj farklılığıdır (kopya sayısında artma veya azalma). Bireyler arası genomda kopya sayısı farklılıkları her zaman hastalık nedeni olmadığı için bu kantitatif değişiklik tanımı, patojenite hakkında bilgi vermez. CNV'ler daha önceleri 1 kilobazdan (kb) daha büyük kopya sayısı değişimleri olarak tanımlanırken, teknolojinin gelişmesi ve böylece çözünürlüğün artması sayesinde 50 bazdan büyük değişimler olarak isimlendirilmektedir [2]. Şekil 2'de farklı CNV formları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2: Farklı CNV Formları: Kırmızı renkle gösterilen genomik segmentin delesyon ve duplikasyonu

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla, herhangi iki bireyin genomik bilgisinin %99.9 oranında aynı olduğu gösterilmiş ve uzun yıllar genetik ve fenotipik varyasyona çoğunlukla SNP'lerin neden olduğu düşünülmüştür. Ancak, genetik varyasyonlar alanında, özellikle yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle günümüzde, CNV'lerin genomik heterojenitede önemli rol oynadığı bilinmektedir [3]. Otozomal genomun %4.8-9.5'inin CNVlerden oluşması, sağlıklı popülasyon genomunun önemli bir oranının, kopya sayısı açısından değişken olabilme potansiyelini göstermektedir [2,4].

CNV'ler, mayotik veya somatik bölünmeler sonucu oluşabilmektedir. Buna en iyi örnek, monozigotik ikizlerde [5] ve bir bireyin farklı organlarında [6] kopya sayılarının değişken olmasıdır.

Sağlıklı insanlarda genom boyu CNV araştırmaları ilk olarak Lee ve Wigler [7-8] tarafından yapılmış olup, bu ilk çalışmalar, günümüzde yaygın olarak kullanılan

genomik varyantlar veritabanı (Database of Genomic Variants, DGV)'nin kurulmasını sağlamıştır. Takip eden araştırmalarla, insan genomunun CNV haritası oluşturulmaya [2] ve sağlıklı bireylerdeki küçük (<100 kb) ve büyük CNV'ler raporlanmaya başlamıştır. Fakat çoğu CNV'nin fenotipik etkileri henüz net olarak bilinmediğinden yakın gelecekte, tüm yapısal varyasyonları keşfetmek ve hastalıklar üzerindeki etkisini anlayabilmek için bunların genotiplendirmesinin temel çalışma alanı olabileceği düşünülmektedir [1].

DNA'da farklı kopya sayılarının bulunması, mRNA ve protein düzeylerinde dramatik değişiklikler yaparak birçok hücresel süreci değiştirip çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir [9]. Bir ya da daha fazla dozaj-sensitif genin bulunduğu genomik segmentleri etkileyen kopya sayısı değişimlerinin, otizm, immün yetmezlik, kanser, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklar gibi birçok hastalığa neden olabildiği gösterilmiştir. Ancak CNV'lerin sağlıklı bireylerde de yaygın olarak bulunması, bunların her zaman hastalıktan sorumlu olmadığını da göstermiştir [10-12].

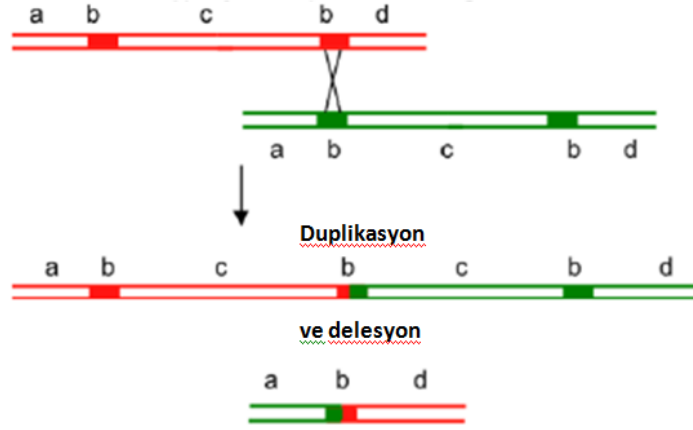
Sonuç olarak yapısal varyasyonların hastalıklarla ilişkisinin ortaya konması için, bunların keşfi ve genotiplendirilmesi esastır [1], ancak bu varyasyonların kompleks olması ve eşlik eden başka parametreler olması nedeniyle değerlendirilmeleri pek kolay olmamaktadır. İdeal olarak, 1) kopya sayılarının, 2) içeriğinin ve 3) yapısının net olarak tespit edilmesi gereklidir fakat pratik olarak, yapısal varyasyonların tekrarlayan DNA bölgelerinde bulunmaya eğilimli olması bu üç özelliğin tespit edilmesini zorlaştırmaktadır [1].

1.2 CNV GELİŞİM MEKANİZMALARI

Haploid insan genomunun yaklaşık %5'i, iki veya daha fazla kopya halinde bulunur [13]. 1kb den büyük olan ve %90'ın üzerinde dizi benzerliği gösteren DNA segmentlerine düşük kopyalı tekrarlar (DKT) (Low Copy Repeats) veya segmental duplikasyon denir. Büyüklüğü 10 kb'nin üzerinde olup %97'nin üzerinde dizi benzerliği gösteren DKT'ler, genomik instabiliteye ve CNV oluşumuna yol açabilirler. [14,15]

1.2.1 Non-alelik Homolog Rekombinasyon (NAHR)

Genomik bozukluklara neden olduğu gösterilen ilk mekanizma NAHR olmuştur [16]. Birinci mayoz bölünmede homolog kromozomların düzgün segregasyonunu sağlayan mayotik rekombinasyon, homologlar üzerindeki allelik diziler arasında gerçekleşir (Şekil 3). Fakat bu rekombinasyon, yüksek oranda dizi benzerliği gösteren (DKT), allelik olmayan DNA segmentleri arasında da olabilmektedir [17]. Sonuçta non-allelik homolog rekombinasyon ve eşit olmayan crossing-over gerçekleşir.



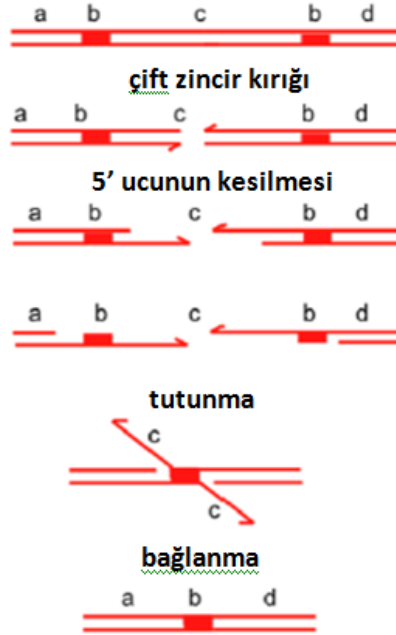
Şekil 3: Non-allelık Homolog Rekombinasyon (NAHR): Krossing-over (X olarak gösterilmiştir), allelik olmayan fakat homoloji gösteren b segmentleri arasında olmakta; sonuçta duplike ve delete ürünler oluşmaktadır [18 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır].

NAHR ayrıca mitoz bölünme sırasında da gerçekleşebilir. Böylece, somatik hücrelerde genomik yeniden düzenlenimleri olan mozaik bir populasyon oluşur. Bir çok kanser, bu somatik NAHR mekanizması ile ortaya çıkmaktadır [16].

1.2.2 Homolog Olmayan Birleştirme (HOB)

HOB (Nonhomolog End Joining, NHEJ), ökaryotik hücrelerin çift zincir kırıklarını tamir etmede kullandıkları iki önemli mekanizmadan biridir [16]. Bu tamir yolu iki DNA ucunu, homoloji aramaksızın birleştirir (homolog olmayan birleştirme) [19]. NAHR'un aksine burada, rekombinasyon oluşması için DKT'lere ihtiyaç yoktur. Tamir bölgesinde, birleştirme öncesi düzenleme çalışmalarının ürünleri olarak, sıklıkla "moleküler skar" olarak adlandırılan fazla nükleotidler bulunur. Bu birleştirme sonucunda kırık noktasına yakın bölgelerin kopyalanmasına bağlı dizi

insersiyonları olabileceği gibi, farklı boyutlarda delesyonlar da olabilmektedir (Şekil 4).

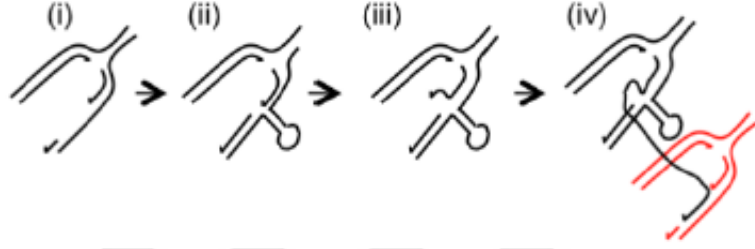


Şekil 4: Homolog olmayan birleştirme (HOB): Çift zincir kırığı tamir edilirken segmental kayıplar oluşabilmektedir [18].

1.2.3 Replikasyon Temelli Mekanizmalar

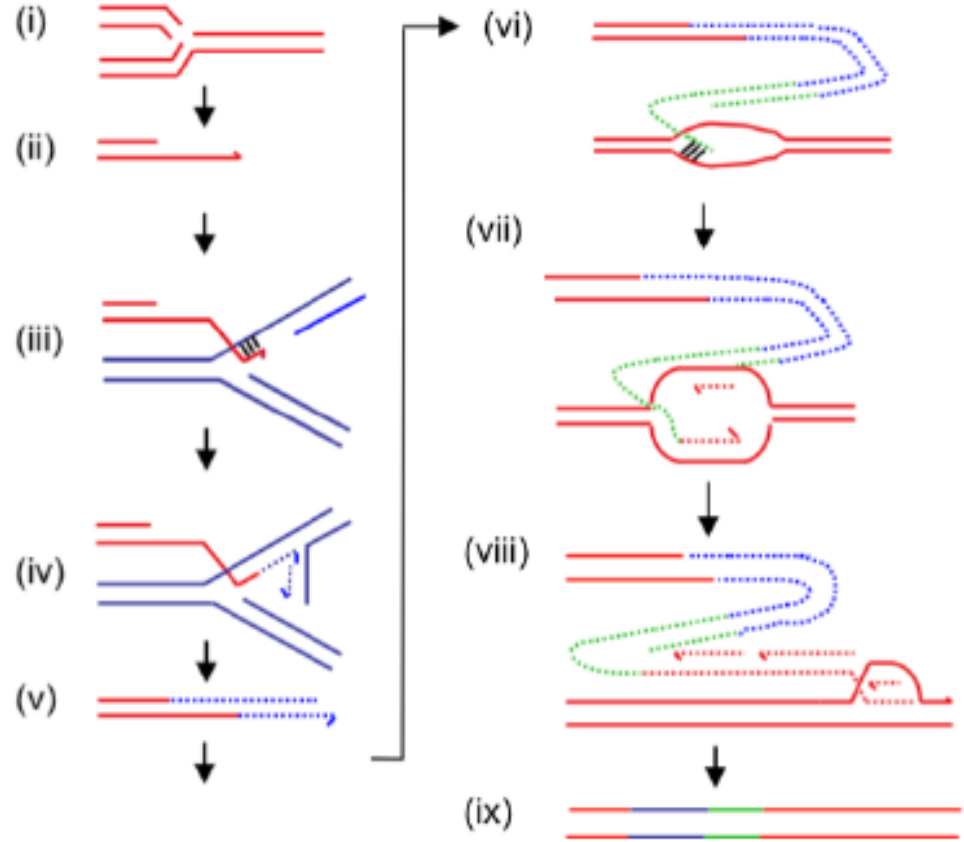
DNA replikasyon hatalarına bağlı bir mekanizma olan çatalın durması ve kalıp DNA değişimi (FoSTeS: fork stalling and template switching) modeli, stress altındaki E. Coli gen amplifikasyonundan modifiye edilen bir modeldir [20]. Bu modelde DNA replikasyon çatalı durur, devamsız (lagging) dizi orjinal kalıptan ayrılır ve fiziksel olarak yakın bulunan başka bir replikasyon çatalına bağlanır. Yeni çatalın lokalizasyonuna göre (upstream/downstream) sırasıyla delesyon veya

duplikasyon oluşur. Durma ve kalıp atlama döngüsü arttıkça, kompleks yeniden düzenlenimler ortaya çıkar (Şekil 5).



Şekil 5: FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) Mekanizması: Devamsız dizi (lagging strand), yakında bulunan başka bir replikasyon bölgesine giderek replikasyonu buradan devam ettirir [18].

FoSTeS mekanizmasının kalıp atlama özelliğinin geliştirildiği model; Mikrohomoloji temelli, kırıkların yol açtığı replikasyon (MIMBIR: Microhomology-Mediated Break-Induced Replication) modelidir. Replikasyon sırasında çatal, mikrohomoloji gösteren başka bir alana atlayarak replikasyonu o bölgeden tekrar başlatır. Yeni çatalın lokalizasyonuna göre (upstream/downstream) sırasıyla delesyon veya duplikasyon oluşur (Şekil 6).



Şekil 6: MMBIR (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication): Replikasyon çatalının ardışık olarak mikrohomojoloji gösteren DNA bölgelerine atlamasıyla oluşur [18].

1.3 CNV'LERİN HASTALIKLARA YOL AÇMA MEKANİZMALARI

SNP'ler ve CNV'ler, fenotipik farklılıkların temelini oluştururlar. Bu farklılıklar, adaptif olumlu sonuçlardan, intrauterin letal durumlara kadar geniş bir spektrumda olabilmektedir.

CNV'ler, birkaç yolla hastalık fenotipinin ortaya çıkmasına yol açarlar. Bunların başında kantitatif etki (dozaj) ve önemli bir genin bölünmesi (disruption) gelir (Tablo 1).

Kantitatif Etki (dozaj): En olası senaryo, delesyon veya duplikasyonların, dozaj-sensitif genlerin genomik kopya sayılarını değiştirmesidir. Kopya sayısı artışları, örneğin duplikasyonlar, duplike genlerde ürün artışına yol açarak dengesizliklere neden olmaktadır. Bu CNV intragenik bir kopya artışı ise, ürünün yapısını, dolayısıyla fonksiyonunu bozmaktadır.

CNV'ler, özellikle üst düzey replikasyon bölgeleriyle ilişkiliyse (eşit olmayan krossig-over'a bağlı olarak), bunların dozaj etkileri zamanla artış gösterebilmektedir. Bu durumda kopya sayısı ve hastalık ilişkisini kurmak zorlaşır ve bu ilişki belli bir eşik değere bağlı olur [21].

Genlerin bölünmesi: CNV'lerin oluşumu sırasında genlerin bütünlüğü her zaman korunmamaktadır. Bir gen içerisindeki kırık noktası gen ürününün fonksiyonunu bozabilmektedir. [21]

Regülatör bölgelerin etkilenmesi: Promotör veya diğer regülatuar bölgelerin kesintiye uğraması da gen ürününün miktarını ve/veya fonksiyonunu etkileyebilir [21]. Bilinen CNV'lerin yarısından fazlasında patojenite, dozaj etkisinden öte, genin veya regülatuar bölgelerin kesintiye uğramasına bağlıdır [22].

Heterozigozite kaybı: Bir CNV'nin gen içeriğinin yanında, fenotipik sonuçları açısından genel genomik durumu da oldukça önem arz eder. Örneğin dozaj-insensitif bir geni delete eden bir CNV'nin, tamamıyla resesif özellik göstermesi beklenir ancak, diğer alel fonksiyonel bir mutasyona sahipse yine fenotipin etkilenmesi beklenir [21]. İzole bir CNV'nin belli bir fenotipe yol açmamış olması, başka bir genomik durum nedeniyle gelişebilecek patojenite potansiyelini dışlatmaz. Bu duruma tersinden bakılacak olursa; CNV'lerin, (çift vuruş hipotezine göre) otozomal resesif hastalıkların ortaya çıkma ihtimalini artırdığı bilgisine ulaşılır [23].

Ardışık gen delesyonları: İntragenik olan veya tek bir geni içeren CNV'ler, fonksiyonel olarak nokta mutasyonları gibi davranıp, dominant ya da resesif mendeliyen kalıtım paterni sergileyebilirler. Daha geniş CNV'ler birden fazla gen içerirler ve ardışık gen sendromlarına (continuous gene syndrome) neden olurlar [24].

Tablo 1: CNV'lerin Genotip Spektrumu ve İlişkili Fenotipler*

CNV Genotipi			İlişkili Fenotip
Resesif Bölünme veya Delesyon			Duchenne/Becker Muskuler Distrofisi (<i>DMD</i>)
Dominant Delesyon	Bölünme	veya	Nörofibromatozis (<i>NF1</i>) Tuberoz Skleroz (<i>TSC1-TSC2</i>) Sotos Sendromu (<i>NSD1</i>) CHARGE Sendromu (<i>CHD7</i>)
Dozaj Etkisi			Erken Başlangıçlı Alzheimer (<i>APP</i>) 22q Otizmi (<i>SHANK3</i>)
Multiallelik Etkiler			Crohn Hastalığı Yatkınlığı (<i>DEFB4</i>) Sistemik Otoimmünite Yatkınlığı (<i>FCGR3B</i>) Parkinson Hastalığı (<i>SNCA</i>) HIV/AIDS , Kawasaki Hastalığı, Romatoid Artrit Yatkınlığı (<i>CCL3L1</i>)
Ardışık Sendromları	Gen	Delesyon	Velo-kardio-fasial Sendrom/ DiGeorge Sendromu (22q11.2 delesyonu) Williams-Beuren Sendromu (7q11.23 delesyonu) 1p36 Mikrodelesyon Sendromu
Heterojen			Otizm Bipolar Bozukluk Şizofreni Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyon Fallot Tetralojisi
Değiştirici (Modifier) Etki			TAR (Trombositopeni ve Radius Yokluğu) Sendromu (1q21.1) Spinal Muskuler Atrofi (<i>SMN1-SMN2</i>)
Epigenetik Etkiler			Russel-Silver Sendromu (11p15 duplikasyonu)
Somatik Mozaizm			Rubinstein Taybi (<i>CREBBP, EP300</i>) Tuberoz Skleroz (<i>TSC1-TSC2</i>) Aniridi (11p13)
Somatik İnstabilite			Li-Fraumeni Sendromu Tuberoz Skleroz Nörofibromatozis

*21 numaralı kaynaktan alınmıştır

1.4 CNV'LERİN KLİNİKLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Güncel araştırmalara göre, şimdiye kadar 267 farklı genomik bölge, iyi tanımlanmış mikrolelesyon/mikroduplikasyon sendromlarıyla ilişkilendirilmiştir [25]. Tıbbın diğer bir çok alanında olduğu gibi, CNV'lerin patojenite değerlendirmesi de kombine analizler, tecrübe ve uzmanlık gerektirmektedir.

Bir CNV tanımlandığında ilgili genomik bölgenin, klinik değerlendirme açısından bazı özellikleri dikkate alınmalıdır [26]:

- 1) Mevcut CNV, normal varyasyon veri tabanlarında bulunuyorsa benign variant olarak değerlendirilir. Bulunmuyorsa, potansiyel patojenite açısından incelenmelidir.
- 2) CNV, bilinen bir sendroma neden olan bir bölgeyi içeriyorsa kliniğin bu sendromla sonuçlanması beklenir.
- 3) CNV, delesyon veya duplikasyonunun bilinen bir sendroma yol açtığı bir geni içeriyorsa ve gen tümüyle etkilenmiş ise kliniğin bu sendromla sonuçlanması beklenir.
- 4) CNV bilinen bir bölge veya geni kapsamıyorsa, değişimin boyutu ve gen içeriği incelenmelidir. Gen içeriği açısından zengin ve büyük CNV'nin patojenik olma ihtimali yüksektir.
- 5) Sağlıklı ebeveynlerde bulunmayan (de novo) CNV'nin patojenik olma ihtimali yüksektir.
- 6) CNV ebeveynlerden birinde bulunuyorsa, aktaran ebeveyn de proband gibi etkilenmiş olabilir veya değişken ekspresiviteye bağlı olarak

daha hafif etkilenmiş olabilir. CNV sağlıklı popülasyonda sık bulunuyorsa benign varyant olabilir.

Tablo 2: CNV'lerin patojenite değerlendirmesi*

	Kriter	(Olasılıkla) Patojenik	(Olasılıkla) Benign
1.	a. Delesyon	✓	
	b. Duplikasyon		✓
2.	a. Dozaj-sensitif gen içermeyen Duplikasyon		✓
	b. Amplifikasyon (1 kopyadan daha fazla artış)	✓	
3.	Bilinen regülatuar bölge içermeyen CNV		✓
4.	a. Sağlıklı ebeveynden aynen aktarılan CNV**		✓
	b. Sağlıklı ebeveynden büyüyerek/değişerek aktarılan CNV	✓	
	c. Etkilenmiş ebeveynden aynen aktarılan CNV	✓	
5.	a. Sağlıklı akrabalarda bulunan CNV'nin aynısı		✓
	b. Etkilenmiş bir akrabada bulunan CNV'nin aynısı	✓	
6.	Veri tabanlarına göre sağlıklı bireylerde bulunan CNV		✓
7.	Veri tabanlarında hastalıkla ilişkilendirilen CNV	✓	
8.	İyi tanımlanmış bir sendroma neden olan Bölgeyi kapsayan CNV	✓	
9.	Morbid OMIM genlerini bulunduran CNV	✓	
10.	a. Genden zengin CNV	✓	
	b. Gen içeriği düşük CNV		✓

*Tek bir CNV

**Sağlıklı ebeveynden aktarılan delesyon, diğer ebeveynden ilgili gene ait bir nokta mutasyonuna eşlik ediyorsa, resesif hastalık ortaya çıkmış olabilir.

Her zaman kesin sonuca ulaşıramamakla birlikte, incelenmesi gereken temel parametreler Tablo 2’de olası patojenite ihtimaliyle birlikte özetlenmiştir [27]. Genotip-fenotip ilişkisinin ve patojenitenin ortaya konması için ek fonsiyon çalışmaları yapılmalıdır [21]. CNV’lerin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan veritabanları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: İnternet üzerinden erişime açık CNV ve ilişkili Fenotip Kaynakları [26]

Veritabanı	Web Adresi	Olgu CNV Bilgisi	Kontrol CNV Bilgisi	Fenotip Bilgisi
GENOM TARAYICILARI				
DbVar4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/	X	X	X
Ensembl	http://www.ensembl.org	X	X	X
UCSC	https://genome.ucsc.edu/	X	X	X
OLGU VE KONTROL VERİTABANLARI				
ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	X		X
DECIPHER	https://decipher.sanger.ac.uk/	X		X
DGV	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home		X	
ECARUCA	http://ecaruca.net	X		X
FENOTİPİK BİLGİ KATALOGLARI				
GeneReviews	http://www.genetests.org/resources/genereviews			X
MedGen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen			X
OMIM	http://www.omim.org/			X
Orphanet	http://www.orpha.net/			X

Yapılan araştırmalar sonucunda CNV’lerin, klinik önemini belirten gruplandırmaya göre raporlanması gerekir. Tablo 4’de ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) tarafından belirlenen, klinik önemi belirten beş kategori, örnekleriyle birlikte verilmiştir.

Tablo 4: Postnatal Yapısal CNV'lerin ACMG**ye Göre Klinik Gruplaması

Kategori	Tanımlama	Örnek
Benign	Birçok yayında ve sağlıklı bireylerin çalışıldığı veri tabanlarında benign olarak raporlanan CNV'ler veya polimorfizmler (sağlıklı popülasyonun >%1inde bulunan)	2q37.3 telomer polimorfizmi (~200 kb büyüklüğünde, bir çok çalışmada benign olarak raporlanmış)
Olası Benign	Benign olma ihtimalini artıran kanıtlar bulunan CNV	Sağlıklı genom çalışmalarında belirtilmemiş fakat gen içermeyen, 500 kb büyüklüğünde delesyon
Klinik Önemi Bilinmeyen	Raporlama döneminde fenotipik etkisi bilinmeyen fakat laboratuvarın, raporlama kriterlerine uyan, ileride benign yada patojenik olarak gruplaması beklenen CNV	Henüz önemi bilinmeyen 5 gen içeren, fakat kalıtımı bilinmeyen 500 kb büyüklüğünde delesyon
Olası Patojenik	Patojenik olma ihtimalini artıran kanıtlar bulunan CNV	Literatürde benzer kırık noktaları ve fenotipi bulunduran tek bir yayının bulunduğu 5 geni içeren 500 kb büyüklüğünde delesyon
Patojenik	Birçok yayına ve veri tabanlarına göre kararlı bir şekilde fenotipe yansıyan CNV	22q11.2 delesyon sendromu (DiGeorge/velokardiyofasial sendrom)

*American Collage of Medical Genetics and Genomics

1.5 CNV SAPTAMA YÖNTEMLERİ

1.5.1 GENOM BOYU CNV SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Array CGH ve SNP array, genel isimlendirme olarak mikroarray, klinikte entelektüel yetersizlik, gelişme geriliği, otizm spektrum bozuklukları ve çoklu konjenital anomalili hastalarda sıklıkla kullanılan bir test haline gelmiştir. Son yıllarda elde edilen gelişmelerle birlikte, array teknolojilerinin konvansiyonel karyotiplemeden daha fazla tanı değeri olduğu gösterilmiştir. Uluslararası Sitogenomik Array (International Standard for Cytogenomic Array, ISCA) Konsorsiyumu kromozomal mikroarrayi, entelektüel yetersizlik, gelişme geriliği ve çoklu konjenital anomalisi olan hastalarda ilk seçenek tanı testi olarak önermektedir [28]. Başvuran ailenin birden fazla çocuğunda anomali olması ve/veya tekrarlayan düşüklerinin olması durumunda karyotip analizi ilk seçenek olabilir [27].

Mikroarray analizleri teknik açıdan bazı kısıtlılıklara sahiptir;

- Dengeli translokasyon ve inversiyonlar gibi genetik materyal miktarının değişmediği olaylar tespit edilemez. Hemofili A hastalarının %50 sinde bulunan *F8C* geninin inversiyonunda olduğu gibi, inversiyonlar hastalıklarla direkt ilişkili olabilmektedir. Dengeli bir translokasyonun kırık noktalarının kodlayan bir bölgeyi böldüğü durumlarda, hastalık fenotipi ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle diğer hastalık mekanizmalarının atlanmaması amacıyla karyotip analizi gibi ek tetkiklerin de yapılması önem arz etmektedir [29].

- Mikroarray yönteminde duplike olmuş kopyaların yeni lokalizasyonu hakkında bilgi edinilmez ve kırık noktaları, tek baz çifti düzeyinde tespit edilemez.

- Array teknolojilerinin en önemli kısıtlılığı muhtemelen tekrardan zengin ve duplike bölgelerden yapılan hibridizasyondur. Mikroarray yönteminin verdiği kopya sayısı farklılıkları, problemlerin dizaynında kullanılan referans diziye bağlıdır. Her iki array platformu da referans genomun her lokasyonda diploid olduğunu kabul eder, ancak bu durum genomda duplike olarak bulunan diziler açısından kabul edilebilir değildir. Referans dizinin 4 kopyalı olup hastanın 5 kopyaya sahip olması gibi kompleks paternler, referansın diploid kabul edildiği durum için beklenen bir sonuç olmaz ve testin sensitivite sınırları aşıldığından sinyaller ayırt edilemez. CNV'lerin, segmental duplikasyonlarla doğru orantılı olması ve birçok kırık noktasının duplike segmentlerde yer alması nedeniyle bu durum, kopya sayısı tespiti için

oldukça zorlayıcı bir faktördür. Sonuç olarak bu bölgelerin ve sınırlarının ek yöntemlerle incelenmesi önerilmektedir [1].

Testin yukarıda bahsedilen kısıtlılıkları nedeniyle genetik laboratuvarları mikroarray testlerinin yanında konvansiyonel sitogenetik analiz ve çeşitli moleküler incelemeleri (dizi analizi gibi) de yapabiliyor olmalı, aileler de sonuçlar ve bu kısıtlılıklar hakkında bilgilendirilmelidir [30]. Ülkemizde birçok merkezde konvansiyonel sitogenetik alanında yetişmiş yeterince eleman olduğundan ve kromozom analizinin maliyeti mikroarray testinden daha ucuz olduğundan genetik başvuruda ilk test karyotip analizi olmaya devam etmektedir.

Array CGH ve SNP array'e ek olarak son yıllarda artmış çözünürlük olanağı sunan farklı ticari platformlar da ortaya çıkmaktadır ancak tespit edilen CNV'lerin raporlanmasında standardizasyona gidilememiş olması, referans örneklerinin standardize olmaması, genom kapsamı (coverage) ve çözünürlükteki farklılıklar, bu çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırmasını zorlaştırmaktadır [31].

Platformların ucuz olması ve günümüze kadar yapılmış birçok hasta ve sağlıklı populasyon çalışmalarının olması ve sayesinde, mikroarray yöntemleri maliyet-etkinlik açısından belirgin avantaj sağlamaktadır [1].

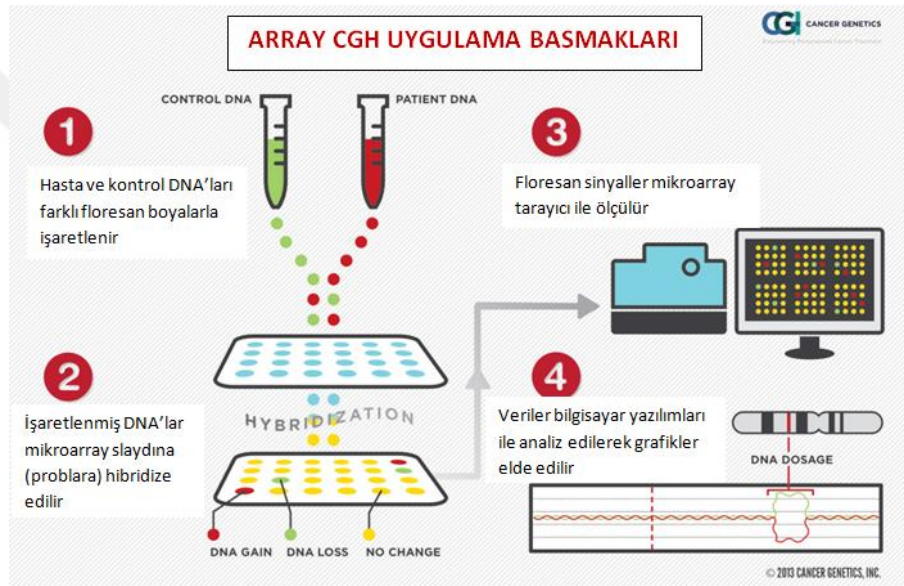
Kromozomal mikroarray yöntemleriyle tespit edilen delesyon/duplikasyon bölgesinde yer alan genlere yönelik yapılacak fonksiyon çalışmalarıyla birlikte bu genlerin hastalığa yol açma mekanizmaları daha iyi anlaşılacaktır [30].

1.5.1.1 ARRAY TABANLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON (ARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION, ARRAY-CGH)

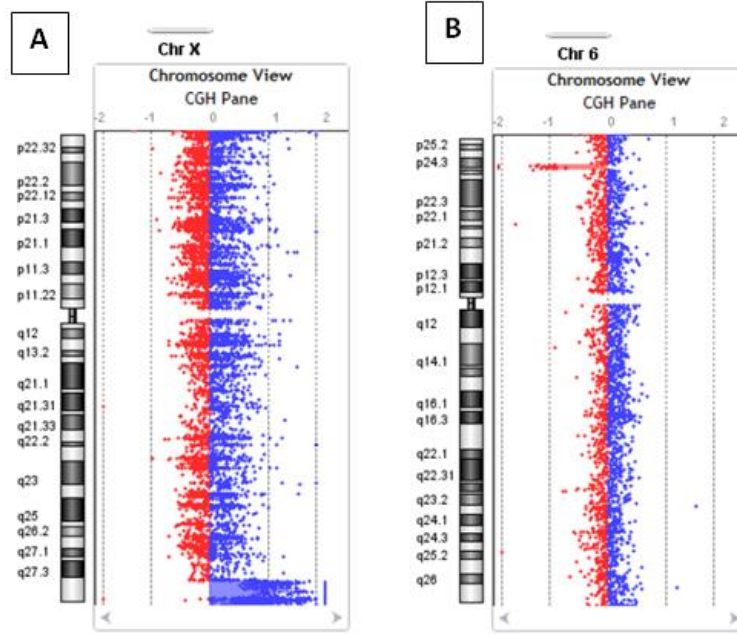
Günümüzde CNV saptamada kullanılan standart metod, Array-CGH'dir [32]. Bu yöntemde kısa oligonükleotidlerden (25-60 baz) veya genomik fragmanlardan (1Mb) oluşan problar kullanılır. Bir hastadaki kopya sayısı değişimlerinin tespit edilebilmesi için, hastanın genomik DNA'sı ve sağlıklı referans genom iki farklı florofofor ile işaretlenir. Örneklerin cam slayt üzerine sabitlenmiş belirli diziler (prob) üzerine eş zamanlı hibridize edilmesiyle her prob için elde edilen kontrol/hasta floresan oranı, ortalama kopya sayısı oranlarını verir. Hasta DNA'sından elde edilen sinyal kuvvetindeki artış veya azalma, kopya sayısında sırasıyla artma veya azalmayı gösterir [33] (Şekil 7, Şekil 8). Kullanılan problar tüm (tüm genomu kapsayabileceği gibi, sadece hedeflenmiş bölgelerden de dizayn edilebilir (isteğe göre uyarlanmış, custom array)).

Zamanla kullanılan prob sayılarının artmasıyla array CGH'te çözünürlük artmış ve günümüzde hedef bölge için yüksek prob sayısı içeren CGH platformları

(custom-array) da uygulanabilir olmuştur. Klinik kullanıma adaptasyonu, yüksek çözünürlüğü ve genom boyu tarama yapması sayesinde Array CGH, CNV'lerin tespitinde altın standart yöntem halini almış ve genotip-fenotip korelasyonlarıyla birlikte birçok yeni mikrolelesyon/mikroduplikasyon sendromunun tanımlanmasını kolaylaştırmıştır [34].



Şekil 7: Array CGH Uygulama Basamakları



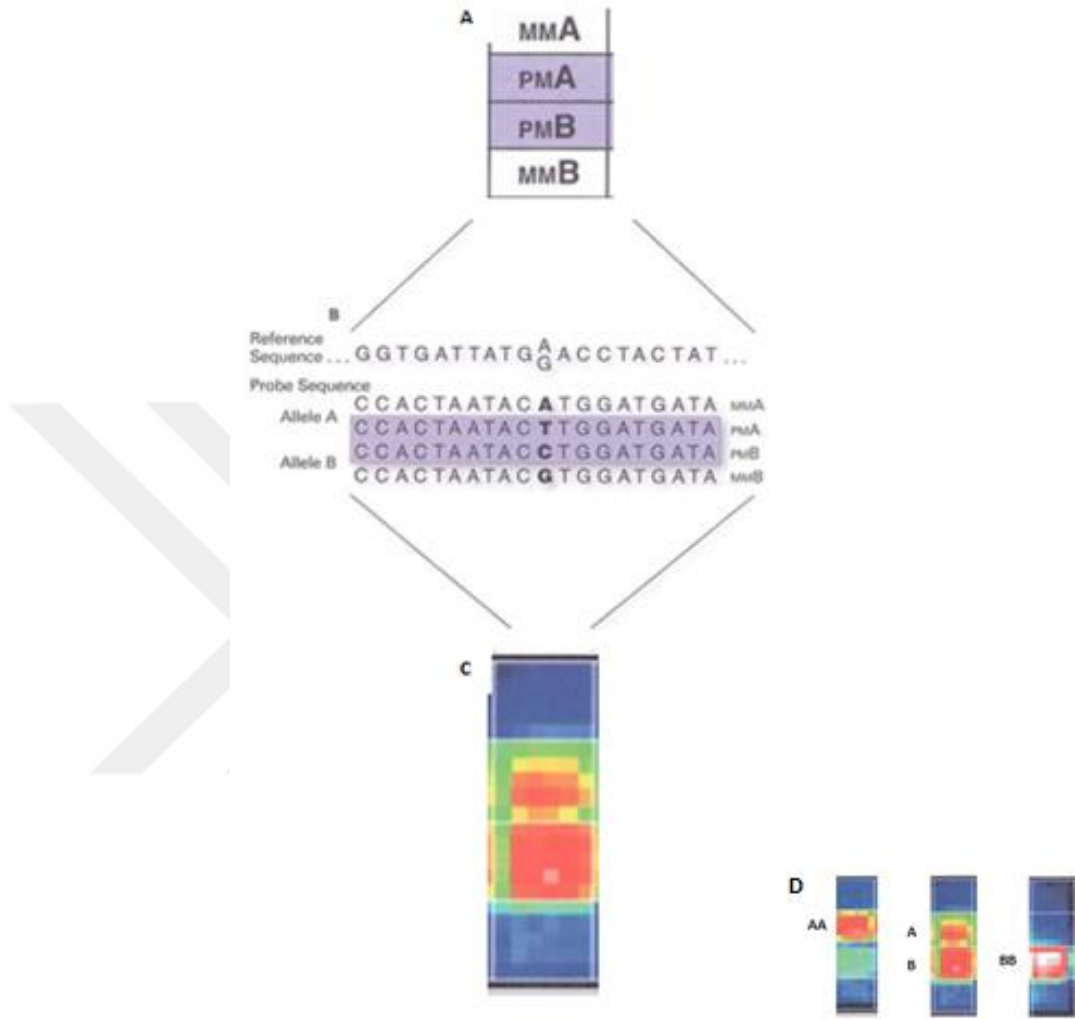
Şekil 8: Array CGH’te Saptanan CNV Örnekleri (A) X kromozomu uzun kol terminal bölgesinde 7,5 Mb’lık duplikasyon. (B) 6. kromozomun kısa kolunda 1,5 Mb’lık delesyon. (Bölümümüzde değerlendirilen hastalara ait sonuçlardır)

1.5.1.2 SNP (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM, Tek Nükleotid Polimorfizm) ARRAY

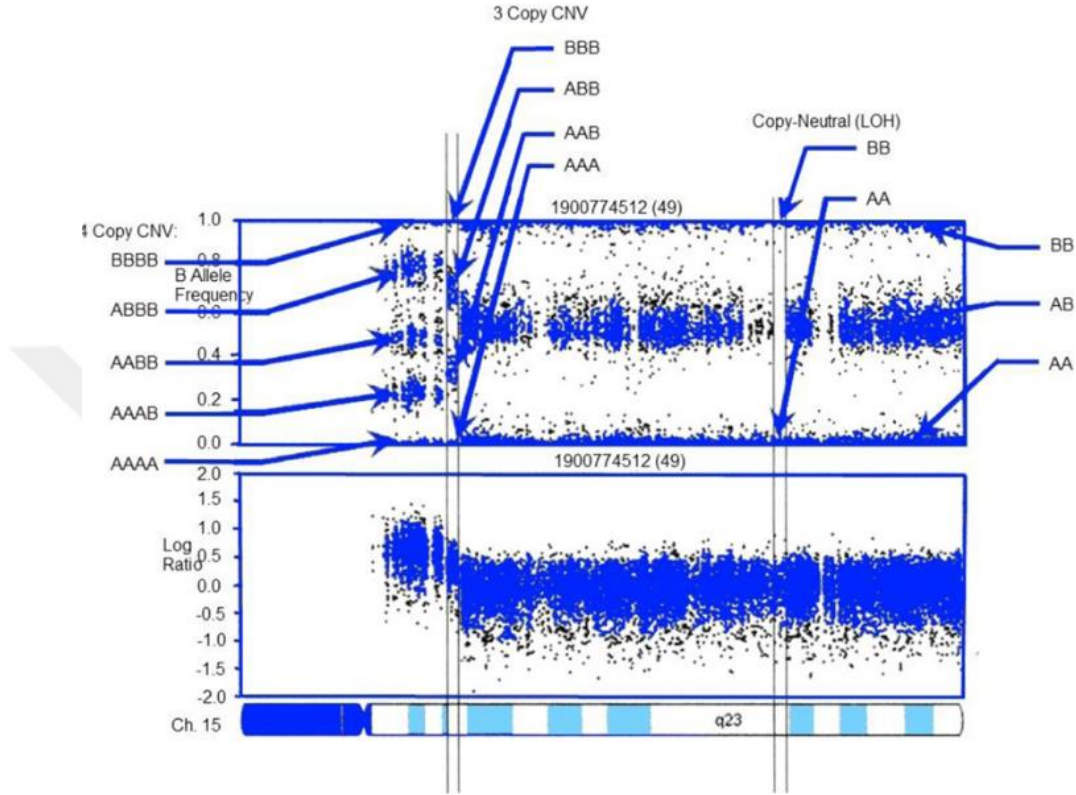
SNP array başlangıçta genomda bulunan yüzbinlerce SNP’in genotiplenmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bunun için bilinen iki allelin (A ve B) her biriyle eşleşen oligonükleotid prob lar kullanılır. Daha sonra A ve B prob larının hibridizasyon oranlarına dayanarak genotip belirlenir. SNP prob undan alınan bir allele ait veri, CNV yorumu için kullanılabilir [35]. Delesyon ve duplikasyonlar, ölçülen toplam sinyal düzeyini değiştirirler, ek olarak birçok SNP bölgesini kapsayan büyük CNV’lerde normal dizomik bölgelerden farklı sinyal paterni elde edilir [CH].

Böylece başlangıçta hedeflenmemiş olsa da zamanla SNP arraylerin CNV'leri de saptayabildiği ortaya çıkmıştır [36]. Şekil 9 ve Şekil 10'da SNP array uygulaması ve sonuçların değerlendirilmesi anlatılmaktadır.

CGH teknolojisinden birkaç farkı olmakla birlikte, SNP array platformları da hibridizasyon temeline dayanır. Bu teknoloji, SNP ve CNV'leri saptayabilecek problemlerden oluşur. Uzun oligonükleotidli array yöntemiyle karşılaştırılınca burada genellikle, tek nükleotid değişimleri açısından hassas fakat CNV saptamada daha az hassas olan 20-30 bazlık kısa oligonükleotidler kullanılır. Böylece SNP array hem bir allelin kaybını hem de heterozigozite kaybını (Loss of Heterozygosity, LOH) araştırır. Bu platformda ayrıca uniparental dizomi ve paternite de tespit edilebilmektedir [33]. Tablo 5'de iki yöntemin karşılaştırması verilmektedir.



Şekil 9: SNP Array ile Genotipleme. (A) SNP'lerin araştırılmasında kullanılacak prob bloklarının dizaynı. Hedef SNP'deki her bir allel (A ve B) için 4 ayrı komplementer prob dizayn edilir (A,G,T,C). Tam uyumlu (Perfect Match, PM) olması beklenen problemler SNP hedefine hibridize olurken tek baz uyumsuzluğu (Mismatch, MM) gösteren problemler hibridize olmaz ve bu kuyulardan sinyal alınmaz. (B) Referans dizi ve tasarlanan problemler için bir örnek. (C) AB genotipli bireye ait elde edilen hibridizasyon sinyal görüntüsü (D) AA, AB ve BB genotiplere ait hibridizasyon sinyalleri (Affymetrix GeneChip HuSNP broşüründen alınmıştır)



Şekil 10: SNP Array ile CNV Analizi: B Allele Frequency, BAF (B Allel Oranı): Bir tek allelden alınan sinyalin toplam allel sinyaline oranıdır. (BAF 0 ise genotip A/A veya A/-; 0,5 ise A/B; 1 ise B/B veya B/- olarak değerlendirilir). Log R Ratio, LRR: Test örneği ve referansdan alınan sinyal oranlarının log2 değeri. LRR'deki yükselme kopya sayısında artışı, düşüş ise delesyonları gösterir. Şekilde, incelenen 15. kromozomun q koluna ait LRR ve BAF değerleri verilmiştir. Normal kromozom bölgelerinde AA, AB, BB genotipleri olmak üzere üç farklı BAF paterni görülürken LRR'nin 0 olması beklenir. Nötral kopyalı LOH bölgelerinde LRR normaldir fakat AB genotip kümesi bulunmaz. CNV bölgesindeki kopya sayısı artışları BAF paterninde piklerin sayısında artış ile birlikte artmış LRR ile tanınır. Sonuçların yorumlanmasında LRR ve BAF grafikleri birlikte değerlendirilmelidir [37].

Tablo 5: Array CGH ile SNP Array Platformlarının Karşılaştırması

Array CGH	SNP Array
Problar sadece CNV analizi için tasarlanmış uzun, oligonükleotidlerdir (50-70 baz). Bazı platformlar, UPD* tespiti için SNP-tabanlı prob ekleyebilmektedir.	SNP'lere özel allel-spesifik kısa oligonükleotid problar (20 baz) kullanılmaktadır. Kopya sayılarının incelenmesi için ek analiz yapılmalıdır. Bazı platformlar, CNV analizi için uzun oligonükleotid problar eklemektedir.
Hasta ve sağlıklı kotrolden elde edilen genomik DNA'lar farklı floroforlarla işeretlenerek aynı dizi üzerine hibridize edilir. Elde edilen sinyal kuvvetindeki farklılıklar, kopya sayıları arasındaki farkı gösterir.	Yalnızca hasta örneği mikroarray slaydına hibridize edilir. Kopya sayıları, hastadan elde edilen sinyal kuvvetinin daha önce toplanmış ve CNV analizi yapılmış kontroller ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilir.
Problar, çok yüksek çözünürlüğü sağlayacak şekilde döşenebilir. Prob içeriği ve kapasitesi belirlenirken daha esnek olunabilmektedir. Tek ekzona kadar çözünürlük elde edilebilmektedir.	Probların yerleşimi, SNP'lerin lokalizasyonuna bağlıdır. Bu durum çözünürlüğü sınırlar.
Yalnızca CNV analizi için kullanılabilir. Düşük mozaik CNV'ler de tespit edilebilmektedir. Spesifik SNP probları eklenmediği sürece UPD/ paternite tayini yapılamamaktadır.	CNV'lere ek olarak, allellerin tespiti sayesinde UPDler ve paternite tespit edilebilmektedir. Düşük mozaik CNV'ler de tespit edilebilmektedir.

*Uniparental Dizomi

1.5.1.3 YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMLERİ

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemlerinin ortaya çıkması yapısal varyasyonların tespitinde devrimsel bir gelişme olmuştur [1].

Yaygın görülen CNV'ler, SNP'ler ile çevrelenmiş olduğundan, SNP array yönteminde indirekt olarak gözlemlenirler. Ancak yapılan dizileme tabanlı araştırmalarda nadir CNV'lerin SNP array yöntemine oranla daha iyi saptandığı görülmektedir. Nadir allellerin fenotipi olumsuz etkileme ihtimalinin fazla olması ve penetransın yüksek olması, SNP array'in önemli patojenik CNV'lerin tespitindeki kısıtlıdır [38]. CNV'lerin tespitinde daha üstün olan NGS, özellikle referans genomda bulunmayan novel insersiyonları da saptayarak bu soruna etkin bir çözüm olmuştur.

Gelişen teknolojiye rağmen hibridizasyon temelli CNV saptama yöntemlerinin çözünürlüğü sınırlıdır ve küçük (Agilent 8x60 ISCA için <100 kb) CNV'ler ile kırık bölgeleri saptanamamaktadır. Son yıllarda artan genom dizileme kapasitesi sayesinde NGS, tek bir seferde milyarlarca kısa okuma ile küçük (<50 bp) CNV'lerin ve kırık noktalarının kapsamlı bir şekilde saptanmasını sağlamıştır.

Zorlu bilgisayar ve biyoinformatik değerlendirmelerin de klinik kullanıma uygun hale getirilmesi durumunda NGS'nin yakın gelecekte CNV tespiti ve genotipleme platformu olarak mikrodizileme yöntemlerinin yerini alması beklenmektedir [1].

Yukarıda bahsedilen genom boyu metodların delesyon ve duplikasyonları saptama hassasiyetleri farklıdır. Örneğin SNP-array ve NGS analizlerinde, array-CGH'e oranla birçok duplikasyon atlanabilmektedir.

1.5.2 HEDEFE YÖNELİK CNV SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Genom boyu metodların aksine, hedefe yönelik yöntemler tek bir kromozomun veya bir genetik sendromla ilişkili bölgenin araştırılması amacıyla kullanılır. Birçok genetik hastalıkta klinik tanıya ulaştırabilecek, dolayısıyla genomda spesifik bir bölgeyi işaret edecek bulgu olmadığından genom boyu tarama yapan array teknolojileri önem kazanmıştır. Mikroarray yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte mikrolelesyon ve mikroduplikasyonların tespiti için kullanılan birçok hedefe yönelik test önemini yitirmiştir ancak tespit edilen anormal bulguların doğrulanmasında bu yöntemler halen kullanılmaya devam etmektedir.

1.5.2.1 Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

FISH, floresanla işaretlenmiş lokus-spesifik problemlerin genomdaki komplementer dizisine bağlandığı, spesifik mikrolelesyon sendromlarının saptandığı moleküler-sitogenetik bir yöntemdir. Teknik olarak sinyal alınıp alınmaması temeline dayandığından, submikroskopik duplikasyonlar FISH yöntemi ile genellikle saptanamaz.

Günümüzde kullanılan birçok ticari FISH probu olup klinik fenotipin belirli bir hastalığı işaret ettiği durumlarda ilk yöntem olarak kullanılabilir. Ancak problemler herhangi bir sendrom için en sık delesyonu görülen bölgeyi kapsadığından, daha küçük ve atipik delesyonlar atlanabilmektedir. Ek olarak, bir çok mikrolelesyon sendromunda klinik olarak farkedilebilir bulgular olmasına rağmen delesyon/duplikasyonun boyutuna bağlı olarak bireyler arasında bulguların varlığı ve şiddeti açısından ciddi varyasyonlar olup klinik tanıya ulaşmak mümkün olmayabilmektedir.

Özellikle prenatal dönemde ve postnatal olgularda klinik bulguların spesifik bir kromozomal sendromu düşündürdüğü olgularda 13, 18, 21, X ve Y kromozomları için aneuploidilerin test edilmesi amacıyla FISH ve konvansiyonel sitogenetik analiz ilk seçenek olarak kullanılmaya devam etmektedir [26].

1.5.2.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

MLPA tekniği, problemlerin ilgili genomik bölgeye hibridizasyonu temeline dayandığından güvenilir bir yöntemdir ancak bu teknik FISH gibi, her probun bir bölgeye ait olduğu ticari kitler ile çalışılır. Bu nedenle nadir CNV'lerin neden olduğu hastalıklarda qPCR gibi daha manuel yöntemlere başvurulmalıdır. MLPA yönteminde farklı ekzon veya genler aynı anda analiz edilebilmektedir. Ancak MLPA yönteminde; optimizasyon basamaklarının çok fazla olması ve maliyetin daha uygun

olması için çok sayıda örneğin eş zamanlı çalışılmasının gerekmesi gibi durumlar dezavantaj yaratmaktadır [1].

1.5.2.3 Southern Blot

Southern blot, elektroforezle ayrılmış DNA fragmanlarının filtre özelliği olan bir membrandan geçirilmesini takiben bu fragmanların prob hibridizasyonu ile tespit edilmesi esasına dayanır. Yüksek kaliteli southern blot teknik olarak manuel ve zahmetlidir, zaman alıcıdır ve sadece büyük CNV'leri tespit edebilmektedir.

1.5.2.4 Kantitatif Real-time PCR (qPCR)

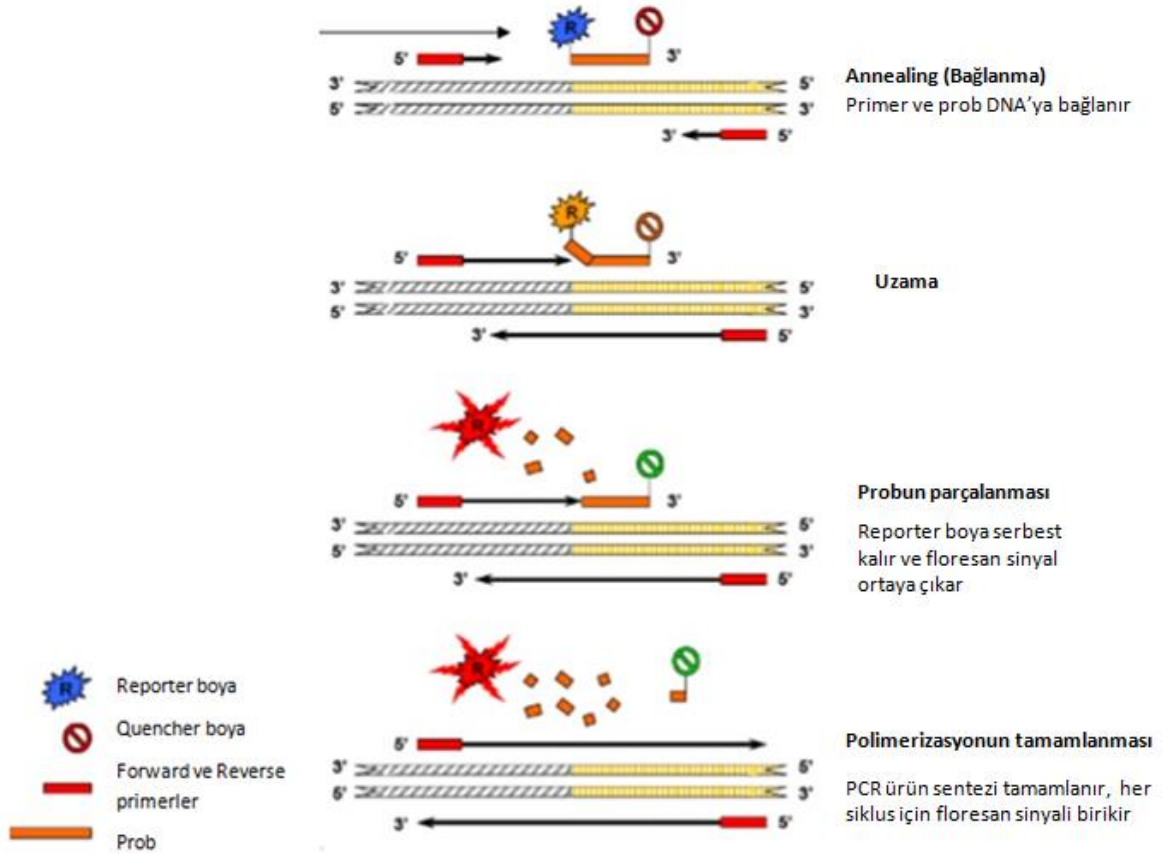
qPCR, floresan veya interşalasyon boyaları kullanılarak gen ekspresyonunun veya gen delesyon ve duplikasyonlarının ölçüldüğü gerçek zamanlı PCR'dır ve kopya sayısı bilinen referans bir bölge ile kopya sayısı bilinmeyen test lokusunun amplifikasyonu temeline dayanır (Şekil 11). Bu yöntem floresan boyalar veya interşalasyon boyaları ile yapılabilir. Her iki yöntemde de PCR'ın her siklusunda floresans ikiye katlanır ve spesifik bir floresans eşiğine ulaşılan siklus sayısı saptanarak başlangıçta kullanılan kalıbın miktarı belirlenebilir. Şekil 12'de qPCR çalışmasında TaqMan probu ile SYBR Green'in çalışma prensipleri verilmiştir.

qPCR veri analizi için sıklıkla kullanılan metodlar:

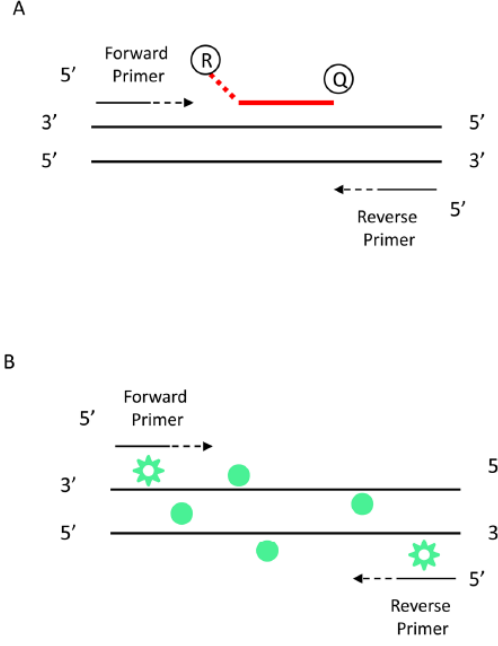
- Hedef transkript PCR sinyalinin iki grup arasındaki göreceli ölçümü (eşik siklus sayısı, cycle treshold, CT).
- PCR sinyalinin bir standart eğriye oranlanmasıyla elde edilen net miktar belirlemesidir.

CT Hesaplanması: PCR devam ettikçe açığa çıkan floresan sinyal miktarı artar. Cihaz tarafından saptanabilecek eşik floresan değerine ulaşıldığı andaki siklus sayısı, eşik siklus sayısını verir (CT). Bu değer, cihaz tarafından otomatik olarak tespit edilip kaydedilir (Şekil 12).

CT değerinin yüksek olması, reaksiyon tüpü içerisindeki toplam DNA miktarının daha az olması demektir (eşik floresans değerine ulaşılması için daha fazla siklusla amplifikasyon olmalıdır).



Şekil 11: qPCR Basamakları. Oligonükleotid probun 5' ucunda reporter floresan boya ile 3' ucunda engelleyici (quencher) boya bulunur. Prob, DNA üzerindeki hedef diziye bağlanır, primerden başlayan sentez devam ederek probun olduğu diziye ulaşıldığında Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile prob parçalanarak reporter boya, quencher bölgeden ayrılarak serbest kalır böylece reporter boyanın verdiği sinyal ortaya çıkar. Her PCR siklusunda üretilen ampikon miktarı arttıkça elde edilen floresans miktarı artar.



Şekil 12: qPCR analizinde Taqman probu ile SYBR Green'in karşılaştırması: (A) Her PCR siklusunda üretilen amplicon miktarı arttıkça elde edilen floresans artar. (B) SYBR Green boyası, PCR ürününü reaksiyon boyunca oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanarak ölçer. Elde edilen PCR ürünü arttıkça floresan miktarında artış görülür [39].

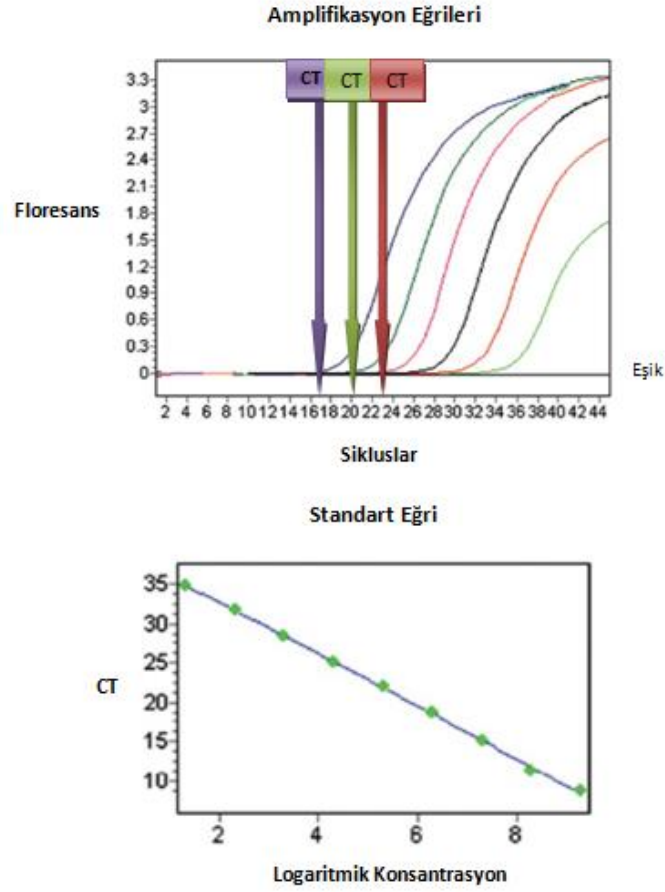
Göreceli ölçüm için, belirli bir konsantrasyondaki hasta DNA'sı ve konsantrasyonları bilinen kontrol DNA'ları ile qPCR düzeneği aşağıda örnek verildiği gibi kurulur:

1	Hasta 20 ng/ μ l
2	Kontrol 10 ng/ μ l
3	Kontrol 20 ng/ μ l
4	Kontrol 40 ng/ μ l

Sonuçta konsantrasyonu bilinen örneklerden elde edilen CT değerleri aracılığıyla toplam DNA miktarı tahmini yapılabilir, böylece hastanın ilgili bölgesinde delesyon/duplikasyon tespiti yapılabilir. Yukarıdaki test düzeneği örneğinden yola çıkılarak, hastanın ilgili bölgedeki kopya sayısının normal olduğu düşünülürse CT değerinin 3. kuyudaki örnekle aynı olması beklenmektedir. Ancak delesyon varlığında toplam DNA miktarı yarıya inmiş olacağından CT 2. kuyudaki örnek ile aynı olacaktır. Duplikasyon varlığında ise sonuç 4. kuyudan elde edilen değere benzeyecektir. Böylece elde edilen CT değerleri ile ilk delesyon/duplikasyon tahmini yapılabilir.

Housekeeping genler, temel hücresel fonksiyoların devamı için gerekli olan hayati genlerdir ve bunların genomdaki kopya sayıları daima stabildir. Araştırılan gen/bölgenin hasta ve kontrol DNA'sı ile yapılan real-time PCR reaksiyonu yanında, housekeeping bir gen (örn *G6PDH*) için de aynı düzenek kurularak test tekrarlanır. Burada amaç, örnekler arasında olabilecek pipetaj hataları ve reaksiyon/cihaz hatalarının önüne geçmektir. Sonuçta çıkan CT değerleri her tüpün içerisindeki DNA konsantrasyonları (burada aynı zamanda toplam DNA miktarı) ile uyumlu olacaktır. Başlangıç materyali ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı sinyal verecektir (CT erken olur).

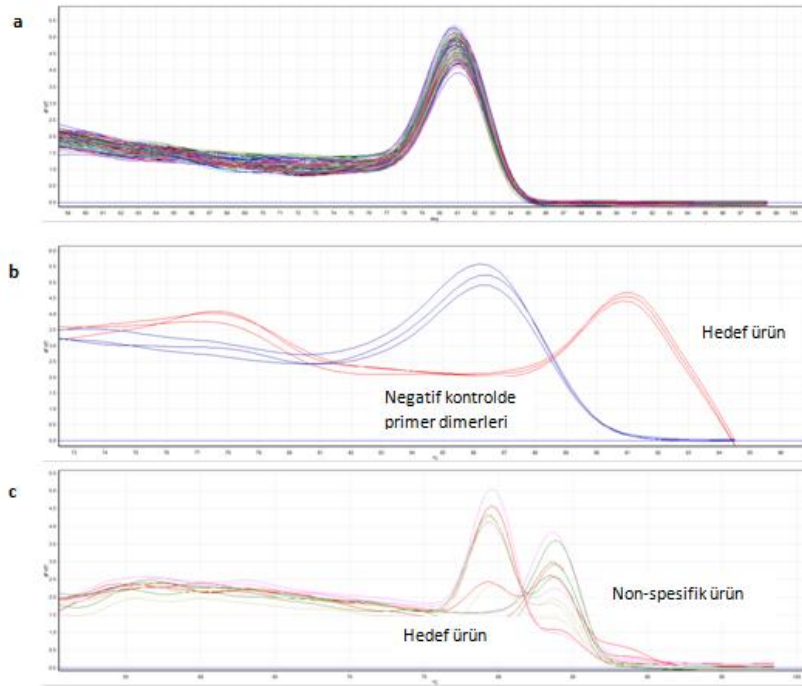
Standart Eğri: Elde edilen CT değerlerinin yanında muhakkak standart eğri değerlendirilmelidir. Standart eğri, testimizin sonuçlarının dinamik (lineer) göstergesidir (Şekil 13). Ayrıca testin etkisinin hesaplanmasını sağlar.



Şekil 13: Amplifikasyon Eğrileri ve Standart Eğri Eldesi

Yukarıdaki grafikte her tüpten elde edilen floresan sinyal düzeyi farklı bir renkle gösterilmiştir. CT, her tüp için eşik amplikon miktarına ulaşıldığı andaki siklus sayısıdır. Reaksiyona başlanan kalıp DNA miktarı arttıkça, eşik değeri daha erken aşılır (CT erken olur). Standart eğri grafiği, konsantrasyonu bilinen tüplerin CT değerlerine dayanılarak oluşturulur ve logaritmik konsantrasyon değerleri kaydedilir. Konsantrasyonu bilinmeyen örneğin, CT değerine denk gelen konsantrasyon saptanmış olur.

Erime Eğrisi (Melting Curve): SYBR Green ile yapılan çalışmalarda tek bir spesifik ürünün elde edildiğinin kontrolü içindir. Yukarıda bahsedildiği üzere, SYBR Green floresan boyası, ortamdaki çift zincirli DNA miktarını gösterir. qPCR’da uygun PCR protokolünden hemen sonra sıcaklığın 95°C’ye çıkarıldığı, erime eğrisinin elde edileceği ikinci kısım vardır. Burada sıcaklığın artmasıyla denatüre olan DNA’nın çift zincir yapısının açılması nedeniyle SYBR ile ölçülen değer hızla düşer. Erime eğrisi ile ayrıca, primer dimerleri ve spesifik olmayan ürünler saptanabilmektedir (Şekil 14).



Şekil 14: qPCR’da Elde Edilen Erime Eğrisinin Değerlendirilmesi (a) İdeal bir erime eğrisi. Verilen pik, uygun bağlama sıcaklığında ölçülen DNA miktarına ait floresan sinyaldir. Reaksiyonun 95°C’ye ısıtılması ile ölçülen DNA miktarının aniden düşüşü görülmektedir. (b) Negatif kontrol tüpünde tespit edilen pik, burada kalıp DNA olmadığından, primer dimerlerinin varlığını gösterir. (c) Spesifik ürünümüz dışında alınan bir pik, hedef bölgemiz dışında başka bir genomik bölgenin de amplifiye olduğunu gösterir.

Sonuçta elde edilen CT değerleri ve standart eğri kullanılarak birkaç farklı hesaplama ile göreceli ölçüm yapıp, kopya sayıları belirlenebilmektedir.

Tablo 6’da qPCR’in CNV analizinde kullanımının avantaj ve dezavantajları verilmektedir.

Tablo 6: qPCR Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
•Yöntem, PCR'ın basit bir modifikasyonu ile genomik delesyon ve duplikasyonları saptar •Birçok örnek eş zamanlı çalışılabilir •Post-PCR işlemler yoktur, işgücü ve fiyat düşüktür •Araştırılacak gen tespit edildikten sonra test kısa sürede yapılır	•Göreceli analiz metodunu kullanmak için hedef gen veya bölge, kontrolde iki kopya olmalıdır. •Sonuçların tamsayı olmaması (örn 1,3 kopya) durumunda değerlendirme zorlaşır •Her bir gen/bölge için üçer set kurulmalıdır, testin tekrarlanması gerekebilir •Primer dizaynı zahmetli olabilir •Sonuçlar mozaik durumlardan etkilenir •DNA konsantrasyonlarının optimizasyonu teknik olarak zordur

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma retrospektif bir çalışma olup, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’na entelektüel yetersizlik ve/veya çoklu konjenital anomali nedeniyle başvuran, klinik değerlendirme sonucunda Array-CGH uygulanan

ve sonuçların doğrulanması için qPCR yöntemi uygulanmış olan 10 hastanın 10 CNV bölgesi değerlendirilmiştir (Hastalara uygulanmış olan çalışma basamakları Şekil 15'te gösterilmiştir). Elde edilen doğrulanma sonuçlarıyla hastaların genotip-fenotip korelasyonu yapılması amaçlanmıştır. Bu retrospektif çalışma için etik kurul onayı, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunu'nun 22/06/2016 tarihli toplantısından 1177 karar numarası ile izin alınarak gerçekleştirilmiştir.

Polikliniğimize entelektüel yetersizlik (EY) ve/veya gelişme geriliği nedeniyle başvuran hastalardan spesifik bir sendromla ilişkilendirilmemiş olan hastalara Array-CGH uygulanmıştır. Array-CGH sonucuna göre klinik önemi bilinmeyen/olası patojenik olarak değerlendirilen CNV'lerde bulunan, hastanın fenotipiyle ilişkili olabilecek genlere yönelik qPCR uygulanmıştır. Tablo 7'de qPCR uygulanan 10 hastaya ait demografik özellikler, muayene bulguları ve tetkik sonuçları özetlenmiştir. Hastalardan ikisi (2. ve 3. hastalar) monozigotik ikiz olup, aCGH ve qPCR sonuçlarında iç kontrol olması amacıyla her iki kardeş birden değerlendirmeye alınmıştır. Tespit Edilen CNV'lerin kalıtım durumlarının belirlenmesi için, hastaların qPCR çalışması ebeveynleri ile birlikte yapılmıştır.



Şekil 15: Değerlendirmeye alınan hastalara uygulanmış olan çalışma basamaklarının özeti

Tablo 7: Hastaların klinik bilgileri ve tetkik sonuçları

Hastalar	1. Hasta	2. Hasta	3. Hasta	4. Hasta	5. Hasta	6. Hasta	7. Hasta	8. Hasta	9. Hasta	10. Hasta
Yaş	9 yaş	20 aylık, monozigotik ikiz eşi	20 aylık, monozigotik ikiz eşi	3 aylık	19 aylık	2 yaş	5 günlük	5yaş 4 ay	3,5 yaş	7 yaş
Cinsiyet	E	E	E	K	K	K	E	K	K	K
Aile öyküsü	Uzak akraba	3. derece akraba	3. derece akraba	5. derece akraba	Aynı köylü, anne BÇ:3p	Özellik yok	Özellik yok	3. derece akraba	Özellik yok	3. derece akraba
Prenatal	Özellik yok	Gestasyonel DM, diyetle regüle	Gestasyonel DM, diyetle regüle	Özellik yok	Özellik yok	IUGR	Polihidramniyoz	Özellik yok	Düşük tehdidi	Özellik yok
Natal	Term, C/S	36 hf, C/S	36 hf, C/S	Term, NSVY	Term, C/S	Term, C/S	Term, C/S	33 hf, SGA	Term, NSVY, zor doğum	Term, NSVY
Postnatal öykü	EY, otizm benzeri bulgular, konjenital katarakt, dirençli glokom	Hipotoni, primer pulmoner hipertansiyon, gelişme geriliği, yutma güçlüğü, sık akciğer enfeksiyonu	Hipotoni, gelişme geriliği, sık akciğer enfeksiyonu, inmemiş testis	Atipik yüz, pulmoner hipertansiyon, VSD	EY, gelişme geriliği, hipotoni, mikrosefali	EY, gelişme geriliği, epilepsi, Hipotoni	Dismorfik yüz, duodenal atrezi,	Büyüme-gelişme geriliği, tekrarlayan kusma	Hipotoni, epilepsi, konuşma gecikmesi, agresivite	Imperfore anüs, yüksek kas ve karaciğer enzimleri
Dismorfik özellikler	Horizontal kaşlar, küçük ağız,uplift kulak lobülleri	Seyrek saç ve kirpikler, yüksek kaşlar, belirgin ciltaltı venleri	Seyrek saç ve kirpikler	Mikrosefali, medialde seyrek kaşlar, geniş palpebral aralıklar	Mikrosefali, yay şeklinde kaşlar, uzun kirpikler, sol elde tek transvers çizgi ve 5. parmakta klinodaktili	Mikrosefali Strabismus, arkaya düşük kulaklar	Dar alın, uzun kirpikler, strabismus, kısa palpebral aralıklar, yüksek burun köprüsü, uzun ve silik filtrum, retrognati	Mikrosefali, geniş burun köprüsü, columella below ala nasi, ince dudaklar, belirgin kulaklar	Makrosefali, ifadesiz yüz, derin yerleşimli gözler, orta yüz hipoplazisi	Hirsutizm, kalın kaşlar, antevverte nares
Ek testler	Kranial MR N İşitme N Frajil-X tekrar sayısı N Williams FISH N	İnce korpus kallozum Metabolik testler N	EKO: PFO	Atrofik serebellum, ince korpus kallozum	Epilepsi, hidrocefali, ince korpus kallozum	Stereotipik hareketler	VSD, sol böbrek agenezisi, hipospadyas	Kranial MR normal	Raşitizm	Kas biyopsisi: myopatik/hafif distrofik değişiklik, EKO: küçük sekundum ASD
Kromozom analizi	46,XY	46,XY, +der(22)t(X;22)(q28;q11.2)mat	46,XY, +der(22)t(X;22)(q28;q11.2)mat	46,XX	46,XX	46,XX	46,XY,del2p23	46,XX	46,XX	46,XX
Array-CGH	dup10q23.31	dup22q11.1 dupXq28 dup13q34	dup22q11.1 dupXq28 dup13q34	dup13q34	dupXq12	del5q33.1	del2p24.3-23.3 del2p22.1 del6p24.2-24.1	del14q11.2 del11q13.4	dupXp11.4	dup17p13.3

E: erkek, K: kız, DM: diyabetes mellitus, C/S: sezaryen, NSVY: normal spontan vajinal yolla doğum, SGA: Small for Gestational Age, EY: entelektüel yetersizlik, VSD: ventriküler septal defekt, BC: baş çevresi, N: normal, PFO: patent foramen ovale, ASD: atrial septal defekt, dup: duplikasyon, del: delesyon

2.1 YÖNTEM

Hastalara uygulanmış olan Array CGH 8X60K ISCA yöntemi ve hasta-anne-baba üçlülerine uygulanmış olan qPCR yöntemi ile ilgili protokoller aşağıda verilmiştir.

2.1.1 Array CGH 8x60K ISCA Protokolü

Hastalara, üretici firmanın önerdiği protokole

(http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4410---90010_CGH_Enzymatic_7.4.pdf) uygun olarak 8x60K Array CGH

(Agilent®, Santa Clara, USA) uygulanmıştır. İşlem basamakları aşağıda sıralanmıştır:

1. DNA Eldesi
2. Restriksiyon Enzim Kesimi
3. Ligasyon
4. PCR
5. PCR Pürifikasyon
6. PCR Ürünlerinin Ölçümü
7. Fragmantasyon
8. İşaretleme
9. Hibridizasyon
10. Yıkama/Boyama/Tarama

1. DNA Eldesi

DNA aşağıda anlatılan “yüksek konsantrasyonlu tuzla çöktürme yöntemi” ile elde edilmiştir.

1. gün

1- 2,5 ml kan 15 ml’lik steril tüpe alınıp, üzerine 15 ml’ye tamamlayacak şekilde önceden hazırlanmış otoklavlanmış soğuk bidistile su konulur.

2- Aşağı yukarı çalkalayarak 2-3 dk. hızlı olarak karıştırılır.

3- 2200 rpm’de 10 dk santrifüj edilir.

4- Süpernatant atılıp pelletin üzerine tekrar soğuk su ilave edilip santrifüj yapılır.

5- Arkasından yıkama işlemi 3 kez daha tekrarlanıp, son boşaltmada (içindeki pelletin sabit kalıp düşmeyecek şekilde olduğu zaman) tüpler bir kağıt havlunun üzerine ters çevrilip, süzülmesi sağlanır.

6- Süzüldükten sonra tekrar çevrilerek üzerine 37,5µl Proteinaz K (20 mg/ml), 750 µl lysis buffer, 50 µl SDS konup çalkalanır.

7- Bir gece 37 °C de bekletilir.

2. gün

8- 500 µl Amonyum asetat eklenip, 20 kez aşağı yukarı hızla karıştırılarak 10 dk. oda ısısında bekletilir.

9- 3500 rpm de 15 dk santrifüj edilip, üzerindeki süpernatant başka 15 ml’lik tüpe aktarılır.

10- Tüpün içindekinin iki katı kadar absolü etanol konulup, hafif karıştırılarak içindeki DNA belirginleştirilir.

11- Önceden içerisine 250 µl TE konan mikrosantrifüj tüplerine pipet ucuyla alınan DNA konulup, 1 gün oda sıcaklığında bekletilir ve çözünmesi sağlanır. Çözündükten sonra derin dondurucuya (-20°C) kaldırılır.

2. Restriksiyon Enzim Kesimi

Çalışmada 250 ng (50ng/ul) genomik DNA kullanılır. Buz üzerinde uygun miktarlarda tampon kullanılan arraye uygun enzim, BSA ile kesim karışımı hazırlanır. DNA ile karıştırılarak uygun inkübasyon programında koşullara göre 2-16 saat arası kesim reaksiyonu yapılır. Kesim sonrası örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edilir ve örnekler -20°C’de saklanır.

3. Ligasyon

Buz üzerinde uygun miktarlarda tampon, ligaz enzimi, ve kesim enzimine uygun adaptör ile ligasyon karışımı hazırlanır. DNA ile karıştırılarak uygun inkübasyon programında yaklaşık 3 saat ligasyon reaksiyonu yapılır. Örnekler -20°C’de saklanır.

4. PCR

Ligasyon sonrası ürünler dilüe edilerek PCR aşamasına hazırlanır. PCR için gerekli olan malzemeler (enzim, primer, dNTP gibi) buzda karışım olarak hazırlanır

ve DNA eklenir. Kullanılacak PCR cihazına göre uygun program yazılır ve PCR reaksiyonu yapılır. PCR sonrası örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edilir.

5. PCR Pürifikasyon

Pürifikasyon için PCR reaksiyonuna uygun miktarda “magnetics bead” solüsyonu eklenir. Karışım magnetik stand de bekletilip tüpün alt kısmında toplanan DNA uygun mikropipetle alınır. İşlem sonu elde edilen ürünler spektrofotometrik analizle ölçülür. Örnekler -20°C’de saklanır.

6. PCR Ürünlerinin Ölçümü

Uygun cihaz kullanılarak pürifiye edilmiş PCR ürünlerinin konsantrasyonu ölçülür. Fragmentasyona hazırlık için ürünlere uygun tampon eklenip, vorteks ve spin yapılır.

7. Fragmentasyon

Pürifiye edilmiş PCR ürünü ve uygun tampon ile fragmentasyon karışımı hazırlanır. Fragmentation Reagent uygun miktarda dilüe edildikten sonra, buzda hazırlanan karışıma eklenir. Termal Cycler’da uygun programla yaklaşık 45 dk fragmentasyon reaksiyonu yapılır. Fragmentasyon sonrası ürünler agaroz jelde yürütülüp kontrol edilir.

8. İşaretleme

Buzda enzim, tampon gibi malzemelerle işaretleme karışımı hazırlanıp fragmente olmuş DNA karışıma eklenir. Termal Cyclers’da uygun programda yaklaşık 4 saat işaretleme reaksiyonu gerçekleşir. Örnekler -20°C’de saklanır.

9. Hibridizasyon

Hibridizasyon aşaması için gerekli solüsyonlar ve tamponlar önceden gereken miktarda hazırlanır. Bu solüsyonlardan uygun miktarlarda kullanılarak bir karışım hazırlanır. Karışıma işaretlenmiş DNA örneği eklenip, gereken sıcaklıklarda inkübasyon yapıldıktan sonra, karışımdan uygun miktar mikropipet ile arraylere enjekte edilir. Arrayler Hibridizasyon Fırınına yerleştirilir ve 49°C, 60 rpm rotasyonla 16-18 saat hibridizasyon gerçekleştirilir.

10. Yıkama/Boyama/Tarama

Yıkama aşaması öncesi gerekli solüsyon ve tamponlar hazırlanır. Yıkama öncesi örneklerle ilgili bilgiler sistem bilgisayarına işlenir. Yıkama-Boyama ve Tarama aşamaları bilgisayar tarafından kontrol edildiği için bu aşama önemlidir. 16-18 saat Hibridizasyon sonrası array içinde olan sıvı mikropipet ile geri çekilip, yerine uygun miktarda tampon enjekte edilir. Solüsyonlar, boyalar ve array yıkama istasyonuna yerleştirilir. Arraye uygun yıkama protokolü bilgisayar programından seçilip, protokol başlatılır. Yıkama işlemi bittikten sonra yine program yardımıyla tarama işlemi gerçekleştirilir.

2.1.2. Array CGH Verilerinin Analizi ve Aday CNV'lerin

Belirlenmesi

aCGH çalışmasında elde edilen veriler değerlendirilirken;

- En az 3 prob ile temsil edilen
- Gen içeren
- Minimum mutlak ortalama logaritmik değeri 0.25'in üzerinde

olan CNV'ler dikkate alınmaktadır.

1) Yanlış pozitif sonuçların ayıklanması: Array CGH yönteminde yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu değişikliklerin ayıklanabilmesi için; belirli alana düşen prob sayısı, prob yerleşimleri ve dağılımları değerlendirilir. Ayrıca aynı platformda yapılan analizlerde farklı hasta gruplarında sıklıkla karşılaşılan değişiklikler yanlış pozitif olarak değerlendirilmektedir.

2) Sağlıklı toplumda sık görülen CNV'lerin ayıklanması: Benign ya da olası benign olarak adlandırılan değişikliklerin değerlendirilmesinde yerel ve uluslararası veritabanlarından yararlanılmaktadır. Bu veritabanlarının başında Database of Genomic Variants (DGV) gelmektedir.

3) Geri kalan değişikliklerin fenotiple ilişkisinin araştırılması: Elde edilen CNV'ler içerisinde hastanın kliniği ile ilişkili olabileceklerin değerlendirilmesi için çeşitli veritabanları kullanılmaktadır;

- DGV
- UCSC Genome Bioinformatics
- Decipher (Database of Chromosome Imbalance and Phenotype

in Humans Using Ensemble Resources)

- Pubmed
- OMIM (Online Mendelian Inheritance In Man)
- Uniprot
- Genecards
- MGI (Mouse Genome Informatics)

Bu kriterlere göre değerlendirmeye alınan değişiklikler aşığıdaki şekilde sınıflandırılır:

- a. Hastalığın nedeni olanlar (**patojenik**)
- b. Hastalığa neden olduğu düşünölenler (**olası patojenik**)
- c. Hakkında yeterince çalışma bulunmayanlar (**linik önemi bilinmeyen**)
- d. Uluslararası veritabanlarında sağlıklı popölasyonda sıklıkla bildirilenler (**olası benign**)

Yukarıdaki kriterlere göre patojenik/olası patojenik ya da klinik önemi bilinmeyen 10 değişikliğin (delesyon/duplikasyon) konfirmasyonu için qPCR analizi yapılmıştır. Tablo 8’de çalışmaya dahil edilen 10 CNV ve özellikleri belirtilmiştir.

Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen CNV'lerin genomik yerleşimleri, büyüklüğü, sınıflaması ve ilgili bölgede bulunan prob sayısı

Hasta no	Genomik Konum (Grch37/hg19)	Boyut	Delesyon/ Duplikasyon	Yorum
1	10q23.31(92095432-92548183)	452 kb	Duplikasyon	Olası Patojenik
2	13q34(114943814-115011507)	67 kb	Duplikasyon	Klinik Önemi Bilinmeyen
3	13q34(114957933-115011507)	53 kb	Duplikasyon	Klinik Önemi Bilinmeyen
4	13q34(115004778-115047826)	43 kb	Duplikasyon	Klinik Önemi Bilinmeyen
5	Xq12(67131889-67568066)	436 kb	Duplikasyon	Olası Patojenik
6	5q33.1(151243145-151547865)	304 kb	Delesyon	Olası Patojenik
7	2p24.3-p23.3(13664684-24173207)	10 Mb	Delesyon	Patojenik
7	2p22.1(38725171-40206339)	1,4 Mb	Delesyon	Patojenik
7	6p24.2-p24.1(11149035-12805272)	1,6 Mb	Delesyon	Patojenik
8	14q11.2(21892210-22897089)	1 Mb	Delesyon	Olası Patojenik
9	Xp11.4(39953078-40496404)	543 kb	Duplikasyon	Olası Patojenik
10	17p13.3(810138-1022950)	212 kb	Duplikasyon	Olası Patojenik

Mavi renk amplifikasyonu, kırmızı renk delesyonu temsil etmektedir.

kb: kilobaz, Mb: megabaz

ISCA, Array-CGH'in postnatal klinik uygulaması için Şekil 16'daki algoritmayı önermektedir:



Şekil 15: Array-CGH için klinik uygulamada önerilen algoritma [40]

2.1.3 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

1. Aday genlerin ve qPCR uygulanacak bölgelerin belirlenmesi: Array CGH sonuçlarına göre elde edilen aday CNV'lerde bulunan, hastaların kliniğinden sorumlu olabilecek genler tespit edilip Ensembl [kaynak] veritabanı kullanılarak bu genlerin polimorfizm içermeyen bölgeleri tespit edilir.

2. qPCR için primer dizaynı: İlgili gen içerisinden mümkün olduğunca polimorfizm içermeyen (özellikle intronik bölgeler) 19-25 bazlık bölgeler aday primer çifti olarak belirlenir. IDT web sitesi [kaynak] yardımıyla primer çiftlerinin hairpin yapısı, self-dimer veya heterodimer oluşturup oluşturmadığı kontrol edilir. Kendi üzerine katlanma ve dimer

oluşturma ihtimali dūřuk olan primer çiftleri seşilir. NCBI-Blast program [kaynak] yardımıyla hedeflenen PCR ürün uzunluğu uygun (120-300 baz) olan, primer çifti çalışma sıcaklıklarının 1 dereceden fazla olmadığı, genomda başka bölgelerin çoğalmasının beklenmediği primer çiftleri tercih edilir.

3. Primerlerin optimizasyonu: Primerler ana stok için 100 mikromolar, çalışılacak stok için 10 mikromolar olacak şekilde sulandırılır. Deneme reaksiyonları her bir primer için hasta ve kontrol DNA'ları kullanarak konvansiyonel PCR ile yapılır. Doğru PCR ürünü elde edilip edilmediği, primer dimeri oluşumu veya non-spesifik ürün varlığı kontrol edilir. Farklı sıcaklıkta, farklı Mg^{+2} konsantrasyonlarıyla reaksiyonlar optimize edilir.

4. qPCR yapılması: qPCR reaksiyonları BIO-RAD CFX96 Touch Real-time PCR cihazında çalışılmıştır. Real-time cihazı, eşik florsansa ulaşılan siklus sayılarını (Cycle of Treshold, CT) saptayarak kaydeder. Daha sonra bu CT'ler kullanarak başlangıçta reaksiyon tüplerine konulan kalıp DNA'ların miktarı belirlenebilmektedir.

Reaksiyonlar, hedef bölge ve kontrol bölge (housekeeping gen olarak Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH)'a yönelik primerler kullanılmıştır) için üçer set olarak çalışılmıştır. Çalışma taslağı aşağıdaki gibidir

Hedef Bölge Reaksiyonları			Kontrol Bölge (G6PDH) Reaksiyonları		
<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta	Hasta	Hasta	Hasta	Hasta	Hasta
Anne	Anne	Anne	Anne	Anne	Anne
Baba	Baba	Baba	Baba	Baba	Baba
Kontrol DNA 10 ng/μl	Kontrol DNA 10 ng/μl	Kontrol DNA 10 ng/μl	Kontrol DNA 10 ng/μl	Kontrol DNA 10 ng/μl	Kontrol DNA 10 ng/μl
Kontrol DNA 20 ng/μl	Kontrol DNA 20 ng/μl	Kontrol DNA 20 ng/μl	Kontrol DNA 20 ng/μl	Kontrol DNA 20 ng/μl	Kontrol DNA 20 ng/μl
Kontrol DNA 40 ng/μl	Kontrol DNA 40 ng/μl	Kontrol DNA 40 ng/μl	Kontrol DNA 40 ng/μl	Kontrol DNA 40 ng/μl	Kontrol DNA 40 ng/μl

Reaksiyon İçeriği:

- 18 μl EvaGreen® mastermix
- 1 μl Primer F
- 1 μl Primer R
- 5 μl DNA (duplikasyon/delesyon olmasına bağlı
sırasıyla 10ng/ml veya 20 ng/ml lik)

qPCR programı:

1. 94°C 5 dk
 2. 94°C 30 sn
 3. T_m°C 30 sn
 4. 94°C 30 sn
 5. T_m°C 30 sn
- (40 döngü)
- (erime eğrisi için, burada veri toplama)

Sonuçların değerlendirilmesi: Sonuçların değerlendirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda, qPCR analizleri için tasarlanmış olan excel programı kullanılmıştır. Çalışmaların doğruluğunu görmek için erime eğrileri incelenmiş ve non-spesifik PCR ürünü veya primer dimeri olmadığından emin olunmuştur. Çalışılan her kuyu için cihaz tarafından CT değerleri kaydedilmektedir. Reaksiyonların sonunda 3'er set halinde çalışılan DNA'ların CT ortalaması hesaplanmıştır. Hedef bölge ve internal kontrol (G6PDH) CT'leri oranlanarak standart eğri elde edilmiş ve kuyulara eşit konsantrasyonlarda konulan DNA'ların reaksiyona başlama miktarları hesaplanmıştır.

Çalışmamızda, qPCR ile doğruluğu teyit edilen CNV'ler, daha önce yukarıda sıralanmış olan veritabanlarında sağlıklı populasyonda bulunma sıklığı, tanımlanmış olan hastalarla klinik benzerlikler ve kalıtım paternleri açısından araştırılarak genotip-fenotip korelasyonu yapılmıştır. Elde edilen verilerin bilimsel platformlarda paylaşılmasıyla literatüre katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

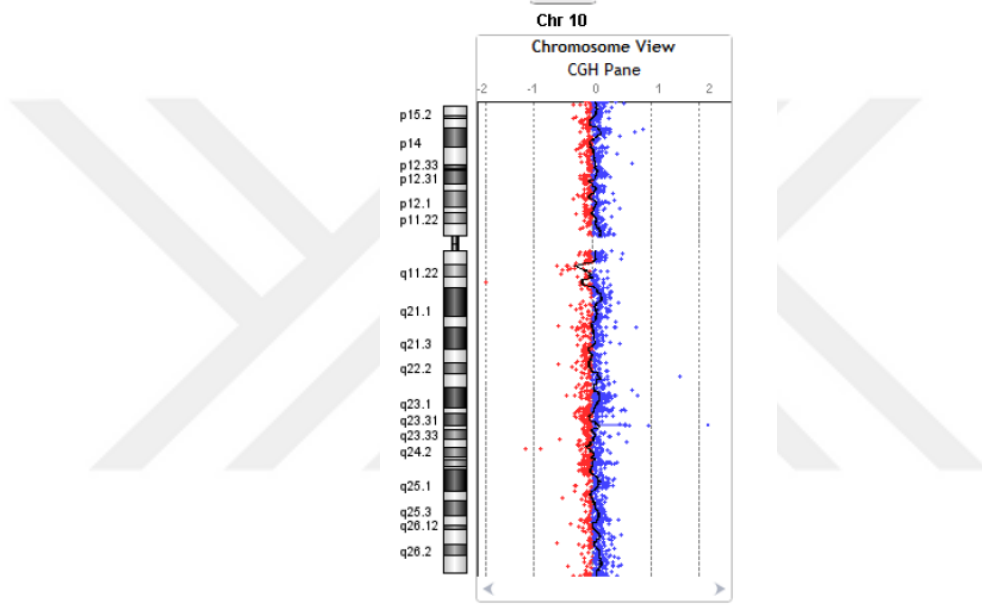
3. BULGULAR

1. HASTA

Entelektüel yetersizlik, otistik davranış paterni, konjenital katarakt ve katarakt operasyonu sonrası gelişen tedaviye dirençli glokom ile başvuran 1. Hastaya ait detaylı array-CGH sonucu ve moleküler karyotip ideogramı sırasıyla Tablo 9 ve Resim 1'de gösterilmiştir.

Tablo 8: 1. Hastaya ait detaylı array-CGH raporu

Kromozom	Kayıp/Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Değerlendirme	Gen(ler)
10q23.31	kazanç	92095432-92548183	452,752 kb	7	Olası patojenik	<i>HTR7</i>

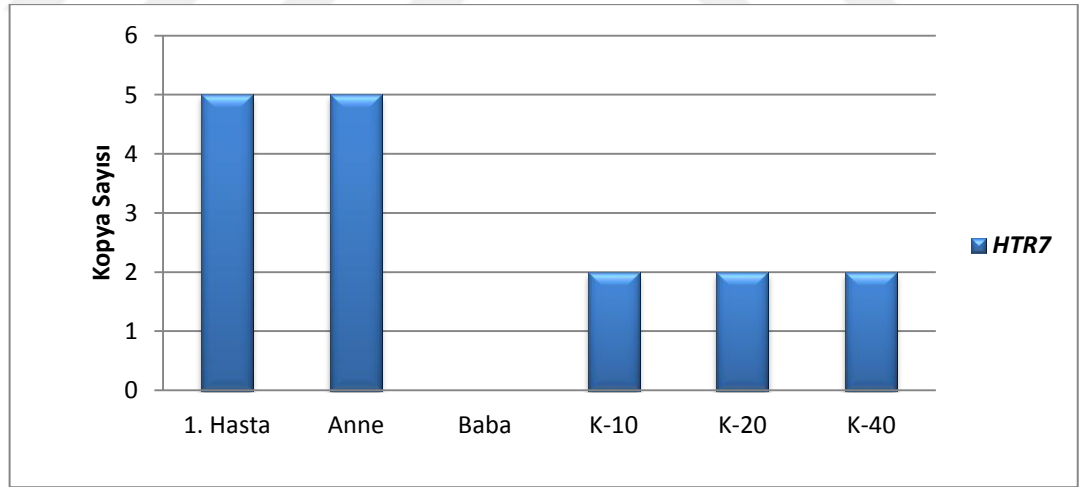


Resim 1: 1. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı

Hastada moleküler karyotipleme sonucunda 10q23.31 bölgesinde 452 kb büyüklüğünde duplikasyon tespit edilmiş, qPCR çalışması sonucunda bu duplikasyon hastada doğrulanmış ve söz konusu duplikasyon annede de tespit edilmiştir. Babaya (sosyal nedenlerle) qPCR uygulanamamıştır. Hastaya ve annesine ait CT değerleri Tablo 10’da, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 1’de verilmiştir.

Tablo 9: 1. Hastaya ve annesine ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>HTR7</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 10 ng/μl	20,05	20,27	20,15	26,26	26,22	26,30
Anne 10 ng/μl	20,04	20,65	20,24	25,34	25,43	25,35
Kontrol DNA 10 ng/μl	20,54	19,55	20,20	23,34	24,17	23,50
Kontrol DNA 20 ng/μl	19,39	18,09	19,40	22,65	22,39	22,55
Kontrol DNA 40 ng/μl	18,02	19,83	18,10	21,29	21,29	21,54



Grafik 1: qPCR sonucunda 1. Hastaya ve annesine ait elde edilen kopya sayıları (babaya qPCR uygulanamamıştır). K-10: 10 ng/μl'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/μl'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/μl'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

2., 3. VE 4. HASTALAR

Monozigotik ikiz olan 2. ve 3. Hastaların bölümümüzde yapılan sitogenetik analizinde ekstra marker kromozom tespit edilmiş ve bu marker kromozomun, annede var olan t(X;22)(q28;q11.2) dengeli resiprokal translokasyonunun 3:1 segregasyon ürünü olduğu (tersiyer trizomi) gösterilmiştir. Detaylı moleküler analiz amacıyla yapılan aCGH analizinin sonuçları Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 10: 2. ve 3. Hastaların tespit edilen marker kromozomuna ait aCGH sonuçları

	Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalisasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Değerlendirme	Gen(ler)
2. hasta	22q11.1	kazanç	17397498- 17703156	305,659 kb	36	patojenik	<i>GAB4, CECR7, IL17RA, CECR6, CECR5, CECR1</i>
	Xq28	kazanç	147585891- 155226944	7,641 Mb	693	patojenik	<i>AFF2, IDS, LINC00893, CXorf40A, MAGEA9B, HSFX2, TMEM185A, MAGEA11, MGEA8, CXorf40B, LINC00894, MAMLD1, MTM1, CD99L2, HMGB3, MIR4330, GPR50, PASD1, PRRG3, FATE1, CNGA2, MAGEA4...</i>
3. hasta	22q11.1	kazanç	17397498- 17703156	305,659 kb	36	patojenik	<i>GAB4, CECR7, IL17RA, CECR6, CECR5, CECR1</i>
	Xq28	kazanç	147585891- 155228958	7,643 Mb	694	patojenik	<i>AFF2, IDS, LINC00893, CXorf40A, MAGEA9B, HSFX2, TMEM185A, MAGEA11, MGEA8, CXorf40B, LINC00894, MAMLD1, MTM1, CD99L2, HMGB3, MIR4330, GPR50, PASD1, PRRG3, FATE1, CNGA2...</i>

Marker kromozom saptanan monozygotik ikizlerin aCGH analizinde 22q11.2 bölgesinde 305 kb'lık duplikasyon ile Xq28 bölgesinde 7,6 Mb'lık duplikasyon olduğu gösterilmiştir. Veri tabanlarında yapılan araştırmalar doğrultusunda, söz konusu marker kromozom hastaların mevcut kliniği ile ilişkili bulunmuştur.

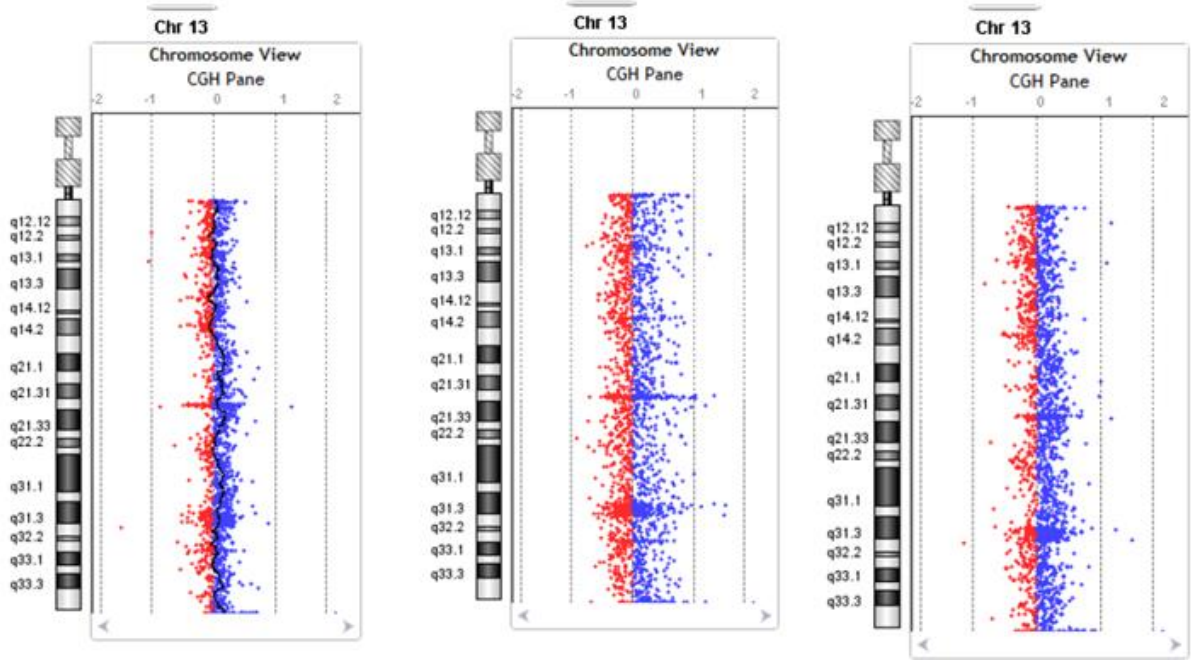
Marker kromozomu açıklayan duplikasyonlar dışında 2. ve 3. hastalarda, 4. Hastayla ortak olarak 13q34 bölgesinde duplikasyon tespit edilmiştir.

4. Hasta, mikrosefali, hipotoni, pulmoner hipertansiyon, serebellar vermis agenezisi ve ince korpus kallozum nedeniyle bölümümüze danışılmıştır. 2. ve 4. Hastalarda ortak klinik bulgu olarak pulmoner hipertansiyon bulunması ve aCGH sonucunda 2., 3. (monozygotik ikiz) ve 4. hastalarda ve aynı bölgede duplikasyon saptanmış olması nedeniyle, bu CNV üç hastada birlikte değerlendirilmiştir.

Hastalara ait aCGH sonuçları ve moleküler karyotip ideogramları sırasıyla Tablo 12 ve Resim 2'de gösterilmiştir.

Tablo 11: 2, 3 ve 4. Hastalarda tespit edilen ortak CNV'ye ait detaylı aCGH sonuçları

	Kromozom	Kayıp/Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Değerlendirme	Gen(ler)
2. hasta	13q34	kazanç	114943814-115011507	67,694 kb	14	Klinik önemi bilinmeyen varyasyon	<i>CDC16</i>
3. hasta	13q34	kazanç	114957933-115011507	53,575 kb	13	Klinik önemi bilinmeyen varyasyon	<i>CDC16</i>
4. hasta	13q34	kazanç	115004778-115047826	43,049 kb	12	Klinik önemi bilinmeyen varyasyon	<i>CDC16</i> , <i>UPF3A</i>



Resim 2 : Sırasıyla 2, 3 ve 4. Hastalara ait moleküler karyotip ideogramları

2. ve 3. Hastalarda tespit edilmiş olan marker kromozomun, hastaların kliniğini açıklamakta yeterli olduğu düşünülmüşse de, ortak klinik bulgu olarak hipotoni, gelişme geriliği ve pulmoner hipertansiyonu olan 4. Hastada da aynı CNV'nin tespit edilmiş olması, bu değişimin detaylı incelemesini gerektirmiştir.

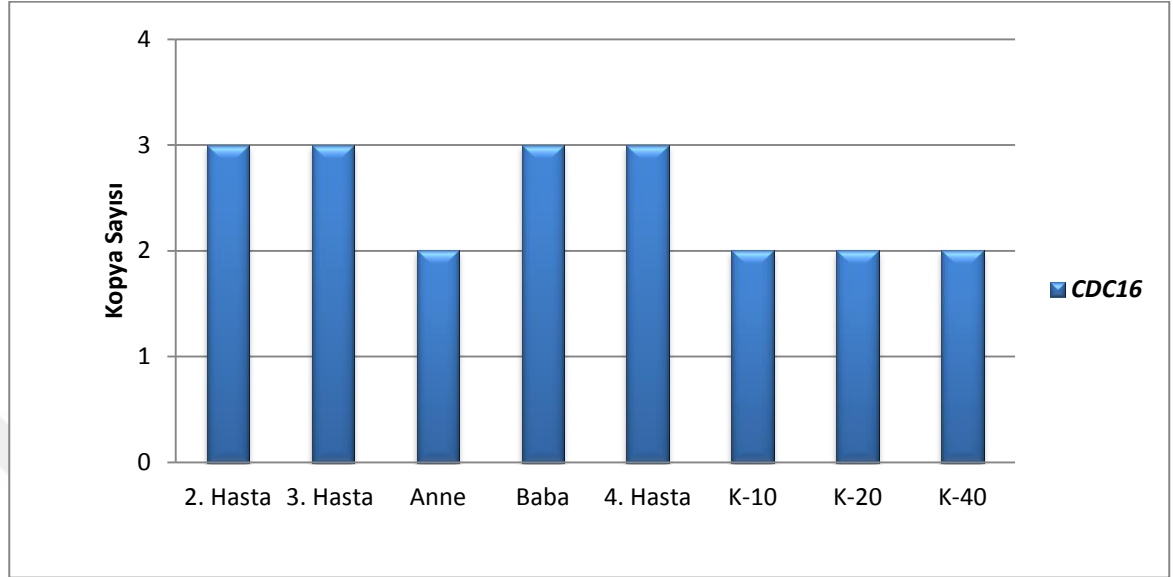
Üç olguda ve ikiz olguların ebeveynlerinde qPCR ile *CDC16* geninin duplikasyonu çalışılmış, her üç hastada *CDC16* geninin duplikasyonu doğrulanmıştır, bu bölgenin duplikasyonu, ikiz olguların babasında da tespit edilmiştir. Hastalara ve ikiz olguların ebeveynlerine ait CT değerleri Tablo 13 ve 14'de, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 2'de verilmiştir.

Tablo 12: 2. ve 3. hastalara ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>CDC16</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
2. Hasta 10 ng/μl	25,15	25,53	25,40	25,51	25,17	25,59
3. Hasta 10 ng/μl	25,04	25,15	25,44	26,64	26,6	26,78
Anne 10 ng/μl	24,48	24,32	24,35	24,37	24,32	24,53
Baba 10 ng/μl	23,63	23,71	23,32	26,04	26,02	26,10
Kontrol DNA 10 ng/μl	25,31	25,40	25,52	25,09	25,55	25,62
Kontrol DNA 20 ng/μl	24,61	24,43	24,91	24,35	24,39	24,42
Kontrol DNA 40 ng/μl	23,58	23,98	23,70	23,64	23,55	23,54

Tablo 13: 4. Hastaya ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>CDC16</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
4. hasta 10 ng/μl	24,27	24,09	24,09	24,78	24,82	24,55
Kontrol DNA 10 ng/μl	25,23	25,57	25,25	25,09	25,15	25,05
Kontrol DNA 20 ng/μl	24,29	24,38	24,47	24,35	24,39	24,40
Kontrol DNA 40 ng/μl	23,27	23,69	23,35	23,64	23,52	23,40



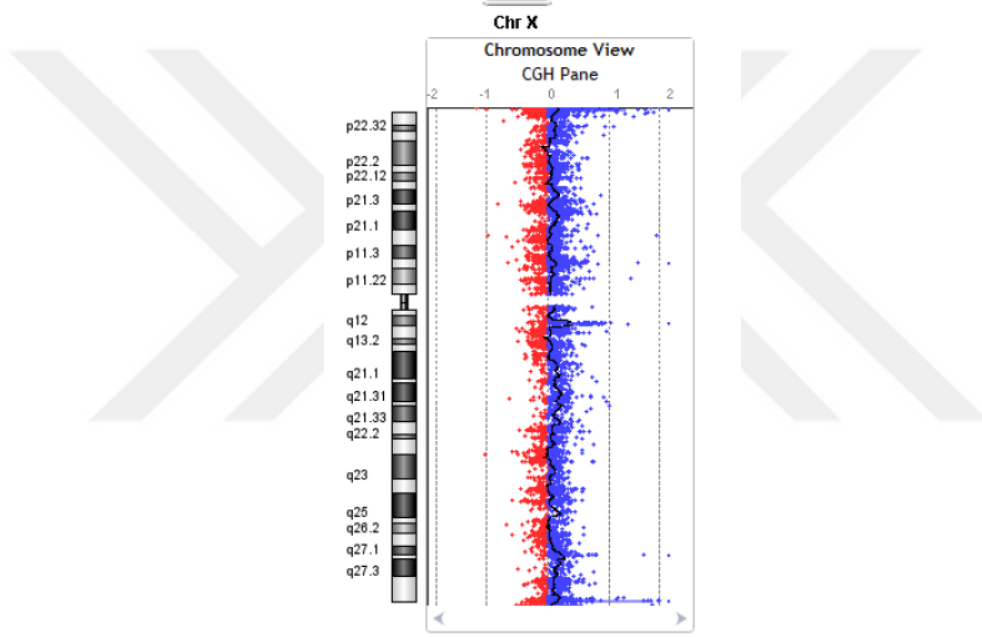
Grafik 2: qPCR sonucunda 2-3. hastalara, ebeveynlerine ve 4. Hastaya ait elde edilen kopya sayıları. K-10: 10 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/ μ l'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

5. HASTA

Entelektüel yetersizlik, mikrosefali, gelişme geriliği nedeni ile başvuran, dismorfik muayenesinde yay şeklinde kaşlar ve uzun kirpikler gözlenen, kranial MR'ında hidrosefali ile ince korpus kallozum bulunan, 5. Hastaya ait detaylı array-CGH sonucu Tablo 15'de, X kromozomunda bulunan CNV'ye ait moleküler karyotip ideogramı Resim 3'de gösterilmiştir.

Tablo 14: 5. Hastaya ait aCGH raporu

Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Değerlendirme	Gen(ler)
19p12	kazanç	20830072-21068757	238,686 kb	5	Klinik önemi bilinmeyen varyasyon	<i>ZNF626</i>
Xq12	kazanç	67131889-67568066	436,178 kb	62	Olası patojenik varyasyon	<i>OPHN1</i>



Resim 3: 5. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı

Array-CGH sonucunun doğrulanması ve tespit edilen CNV'nin kalıtım durumunun belirlenmesi için qPCR çalışması yapılmış ve sonuçta hastanın kendisinde ve annesinde bu bölgenin duplike olduğu gösterilmiştir. Hastanın babasına ait sonuçlar, DNA kalitesine bağlı olabilecek nedenlerle güvenilir bulunmamış ve (anne-babanın aynı köylü olması nedeniyle aynı CNV'yi bulundurma ihtimallerinden

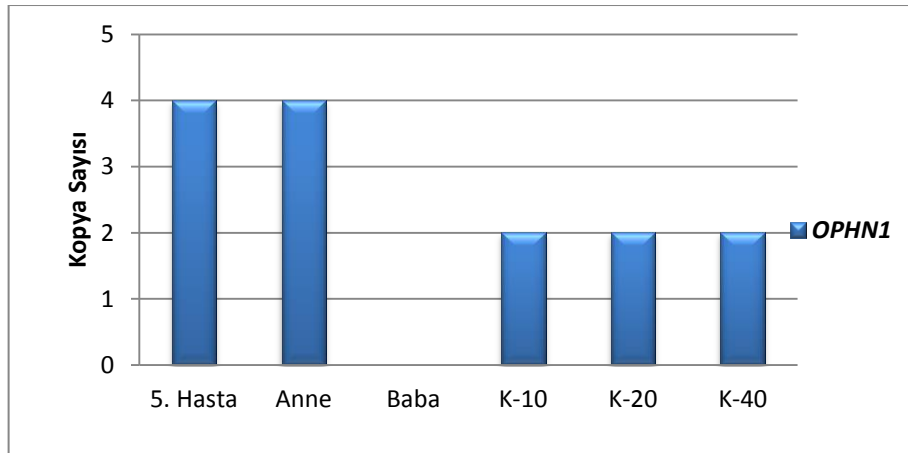
dolayı) qPCR çalışmasının babada tekrarlanması önerilmiştir. Hastaya, annesine ve kontrollere ait CT değerleri Tablo 16’da, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 3’de verilmiştir.

Tablo 15: 5. Hastaya ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>OPHN1</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 10 ng/μl	24,84	24,4	24,62	26,73	26,69	26,93
Anne 10 ng/μl	24,32	24,55	24,37	26,45	26,64	26,52
Baba 10 ng/μl	25,7	25,75	25,78	28,07*	27,80*	28,09*
Kontrol DNA 10 ng/μl	24,65	24,72	24,84	25,68	25,68	25,68
Kontrol DNA 20 ng/μl	23,04	23,02	23,01	24,97	24,63	24,85
Kontrol DNA 40 ng/μl	22,13	22,32	22,40	23,35	23,42	23,30

*CT değerinin 27 ve üzeri olması, qPCR tekniği için sonucun güvenilir olmadığını

göstermektedir (DNA konsantrasyonu çok düşüktür veya kalite bozulmuştur).



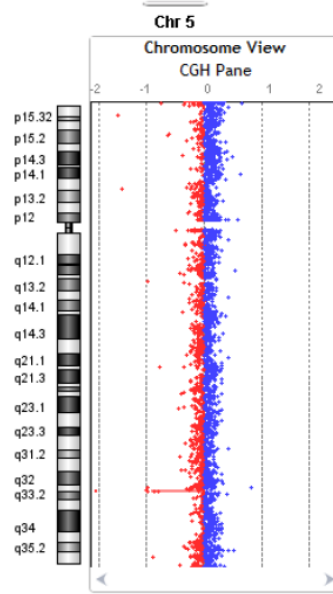
Grafik 3: qPCR sonucunda 5. Hastaya ve ebeveynlerine ait elde edilen kopya sayıları (babaya ait sonuçlar güvenilir bulunmamıştır). K-10: 10 ng/μl'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/μl'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/μl'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

6. HASTA

Gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik, epilepsi ve stereotipik hareketler nedeniyle başvuran, dismorfik muayenesinde mikrosefali ve arkaya düşük kulakları olan 2 yaşındaki kız hastaya ait detaylı array-CGH sonucu ve moleküler karyotip ideogramları sırasıyla Tablo 17 ve Resim 4'de gösterilmiştir.

Tablo 16: 6. Hastaya ait aCGH raporu

Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Değerlendirme	Gen(ler)
5q33.1	kayıp	151243145-151547865	304,721 kb	4	Olası patojenik varyasyon	<i>GLRA1</i>



Resim 4: 6. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı

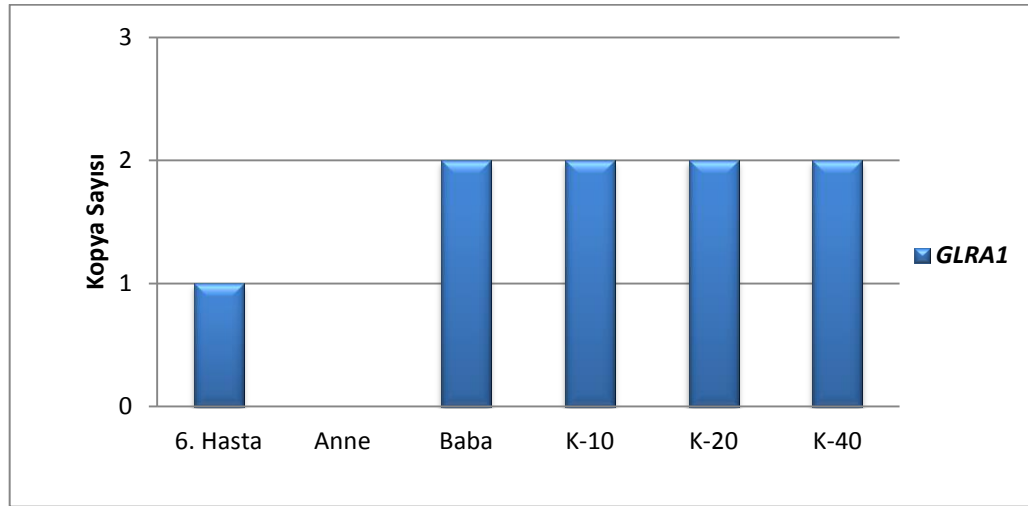
aCGH sonucunun doğrulanması amacıyla qPCR çalışması yapılmış ve sonuçta bulunan delesyon hastada doğrulanmış, baba ilgili bölgenin kopya sayısı açısından normal bulunmuş, annede ise DNA kalitesindeki problemler nedeniyle güvenilir bir sonuca ulaşılamamıştır. Hastaya, anne-babasına ve kontrollere ait CT değerleri Tablo 18’de, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 4’de verilmiştir.

Hastada ayrıca ön tanı olarak düşünülen Rett Sendromu açısından sorumlu genlerin dizi analizi yapılmış ve *MECP2* geninde patojenik c.611C>G (p.S204*) mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak hasta Rett Sendromu tanısı almış ve ek olarak 5q33.1 bölgesinde delesyon taşıdığı doğrulanmıştır.

Tablo 17: 6. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>GLRA1</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
Hasta 20 ng/μl	25,38	26,05	25,45	24,34	24,60	24,46
Anne 20 ng/μl	32,28*	28,65*	29,43*	23,12	23,66	24,03
Baba 20 ng/μl	25,45	25,52	25,40	25,45	25,55	25,59
Kontrol DNA 10 ng/μl	25,47	25,60	25,42	25,49	25,54	25,30
Kontrol DNA 20 ng/μl	24,63	24,52	24,38	24,38	24,83	24,58
Kontrol DNA 40 ng/μl	22,92	23,15	23,02	23,78	23,56	23,60

*CT değerinin 27 ve üzeri olması, qPCR tekniği için sonucun güvenilir olmadığını göstermektedir (DNA konsantrasyonu çok düşüktür veya kalite bozulmuştur).



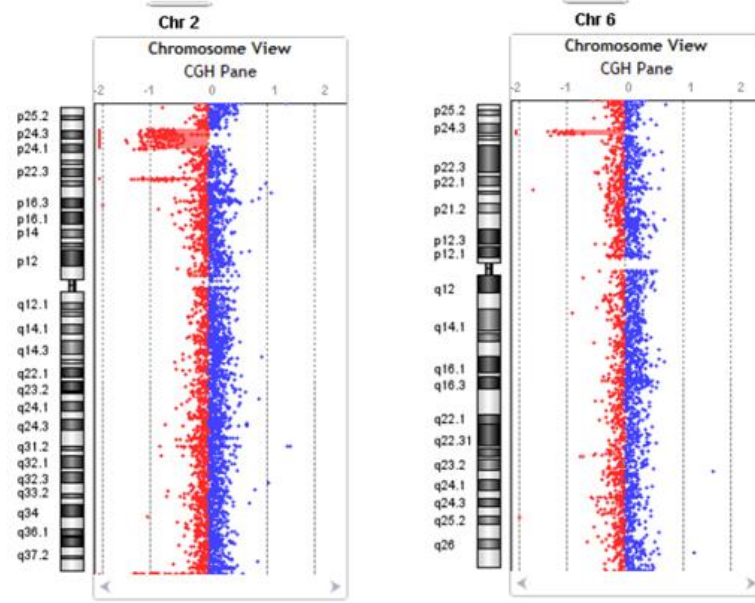
Grafik 4: qPCR sonucunda 6. Hastaya ve ebeveynlerine ait elde edilen kopya sayıları (anneye ait sonuçlar güvenilir bulunmamıştır). K-10: 10 ng/μl'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/μl'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/μl'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

7. HASTA

Dismorfik yüz, duodenal atrezi, VSD, sol böbrek agenezisi ve hipospadyas nedeniyle danışılan, dismorfik muayenesinde dar alın, kısa palpebral aralıklar, uzun kirpikler, strabismus, yüksek burun köprüsü, uzun-silik filtrum ve retrognatisi olan 5 günlük erkek hastanın yapılan konvansiyonel sitogenetik analizinde 2p23 bölgesinde delesyon tespit edilmiş olup, hastanın detaylı array-CGH sonucu ve moleküler karyotip ideogramları sırasıyla Tablo 19 ve Resim 5’de gösterilmiştir.

Tablo 18: 7. Hastaya ait array-CGH raporu

Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalisasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Gen(ler)
2p24.3- p23.3	kayıp	13664684-24173207	10,528 Mb	182	<i>NBAS, DDX1, MYCNOS, MYCN, VSNL1, SMC6, GEN1, MSGN1, KCNS3, OSR1, MATN3, SDC1, PUM2, HS1BP3, GDF7, APOB, FAM84A, FAM49A, RAD51AP2, RDH14, NT5C1B-RDH14, NT5C1B, FLJ12334, TTC32, WDR35, LAPTM4A, RHOB, C2orf43, KLHL29, ATAD2B, UBXN2A</i>
2p22.1	kayıp	38725171-40206339	1,481 Mb	45	<i>SOS1, THUMPD2, HNRPLL, GALM, SRSF7, GEMIN6, DHX57, MORN2, ARHGEF33, LOC375196, CDKL4, MAP4K3, LOC728730, TMEM178</i>
6p24.2- 24.1	kayıp	11149035-12805272	1,656 Mb	23	<i>NEDD9, HIVEP1, EDN1, TMEM170B, C6orf105, PHACTR1</i>



Resim 5: 7. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramları

Klinik değerlendirmenin ve verilecek genetik danışmanın netleştirilmesi amacıyla tespit edilen CNV'lerin doğrulanması ve kalıtım durumlarının belirlenmesi için qPCR çalışması yapılmıştır.

Yapılan qPCR çalışmaları sonucunda

1) 2p24.3-2p23.3 kromozomal bölgesindeki delesyon (*MYCN* geni çalışılmıştır) hastada doğrulanmış, anne ve babada bu bölgenin kopya sayısı normal olarak değerlendirilmiştir.

2) 2p22.1 bölgesindeki delesyon (*SOS1* geni çalışılmıştır) hastada doğrulanmış, anne ve babada bu bölgenin kopya sayısı normal olarak değerlendirilmiştir.

3) 6p24.2-24.1 bölgesindeki delesyon hastada doğrulanmış, anne ve babada bu bölgenin kopya sayısı normal olarak değerlendirilmiştir.

Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışmaları CT değerleri Tablo 20, 21 ve 22’de; sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 5’de verilmiştir.

Tablo 19: 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri (2p24.3-23,3 için)

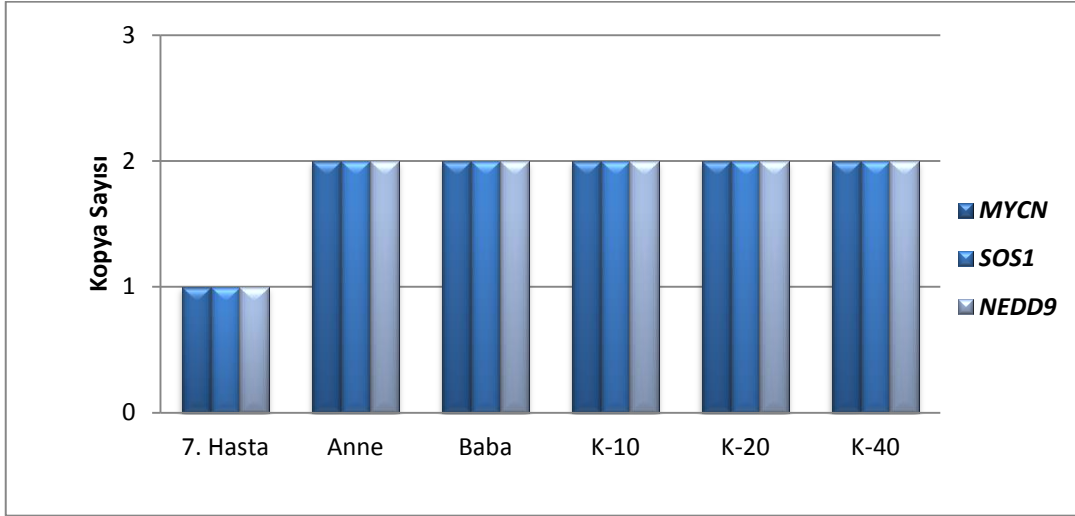
DNA	Hedef Bölge (<i>MYCN</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 20 ng/μl	26,73	26,20	25,84	24,99	26,29	24,80
Anne 20 ng/μl	26,67	25,39	26,59	25,64	26,29	25,73
Baba 20 ng/μl	26,13	26,48	26,89	26,66	25,40	25,60
Kontrol DNA 10 ng/μl	26,85	26,65	26,84	26,01	26,15	26,02
Kontrol DNA 20 ng/μl	25,69	25,53	25,37	25,29	25,30	25,35
Kontrol DNA 40 ng/μl	24,76	23,51	24,65	23,99	24,10	23,99

Tablo 20: 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri (2p22.1 için)

DNA	Hedef Bölge (<i>SOS1</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 20 ng/μl	26,96	26,82	26,52	24,99	24,80	24,91
Anne 20 ng/μl	26,79	26,85	26,70	25,64	25,73	25,51
Baba 20 ng/μl	26,13	26,25	26,54	25,40	25,45	25,30
Kontrol DNA 10ng/μl	26,75	26,58	26,38	25,35	26,15	26,02
Kontrol DNA 20ng/μl	25,56	25,63	25,35	24,02	24,55	25,29
Kontrol DNA 40ng/μl	24,62	24,43	24,25	23,38	23,99	24,10

Tablo 21: 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri (6p24.2-24.1)

DNA	Hedef Bölge (<i>NEDD9</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 20 ng/μl	25,48	26,03	25,67	25,02	25,16	24,87
Anne 20 ng/μl	24,81	25,15	25,74	25,13	26,02	26,19
Baba 20 ng/μl	25,68	26,36	25,53	26,04	26,15	26,02
Kontrol DNA 10 ng/μl	24,01	23,90	24,72	25,16	25,09	24,81
Kontrol DNA 20 ng/μl	23,28	23,16	23,35	24,19	24,29	24,52
Kontrol DNA 40 ng/μl	22,51	22,75	23,16	23,14	23,04	22,63



Grafik 5: qPCR sonucunda 7. Hastaya ve ebeveynlerine ait elde edilen kopya sayıları. K-10: 10 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/ μ l'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

8. HASTA

Büyüme-gelişme geriliği, dismorfik görünüm ve sıklık kusmaları nedeniyle danışılan 5 yaşındaki kız hastanın fizik muayenesinde kısa boy, mikrosefali, yüksek kaşlar, burun kanatlarından aşağıda kalan kolumella, ince dudaklar ve belirgin kulak kepçeleri gözlenmiş olup hastanın detaylı array-CGH sonucu Tablo 23'de gösterilmiştir.

Tablo 22: 8. Hastaya ait array-CGH raporu

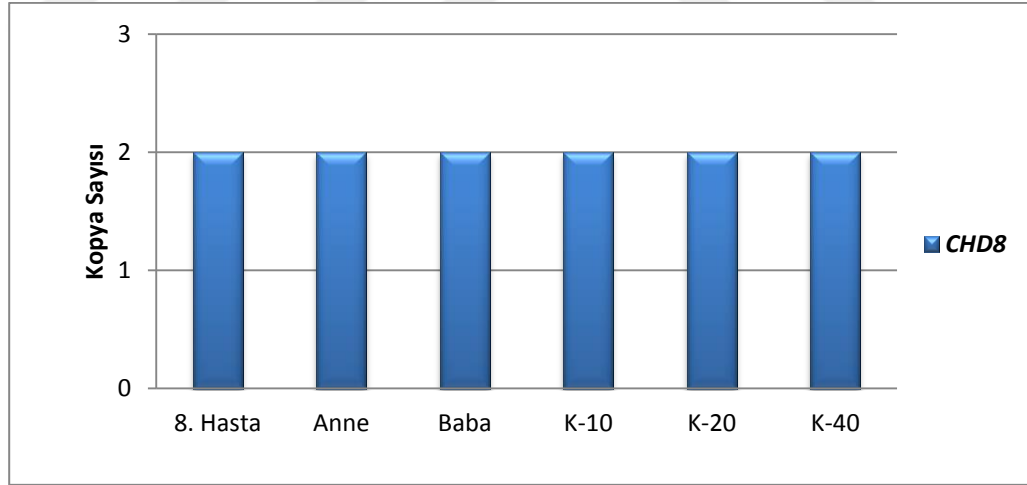
Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Gen(ler)
11q13.4	kayıp	74943765-75129727	185,9 63 kb	<i>ARRB1, RPS3, LOC441617, MIR326, SNORD15A, SNORD15B</i>
14q11.2	kayıp	21892210-22897089	1,004 Mb	<i>CHD8, RAB2B, METTL3, SALL2, TOX4, OR10G3, OR10G2, OR4E2</i>

Hastada 11q13.4 ve 14q11.2 bölgelerinde iki ayrı delesyon tespit edilmiştir. 11q13.4 bölgesinde saptanan delesyon, DECIPHER veri tabanında el ve ayak anomalileri olan bir hastada tanımlanmış olup bu CNV, 8. Hastanın kliniği ile ilişkilendirilmemiştir.

14q11.2 bölgesinde tespit edilen CNV'nin doğrulanması ve kalıtım durumunun belirlenmesi amacıyla qPCR çalışması yapılmıştır. Sonuçta bu bölgenin kopya sayısı hasta, anne ve babasında normal bulunmuştur. Hastaya ve ebeveynlerine ait CT değerleri Tablo 24'te, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 6'da verilmiştir.

Tablo 23: 8. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>CHD8</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
Hasta 20 ng/μl	25,45	25,46	25,05	26,60	26,82	26,55
Anne 20 ng/μl	23,76	23,53	23,93	24,33	24,42	25,15
Baba 20 ng/μl	23,54	23,49	23,77	25,60	25,89	26,24
Kontrol DNA 10 ng/μl	24,71	24,18	24,50	26,05	26,28	26,41
Kontrol DNA 20 ng/μl	24,22	24,05	24,05	26,15	26,35	26,22
Kontrol DNA 40 ng/μl	23,01	23,32	22,51	25,01	25,40	25,83



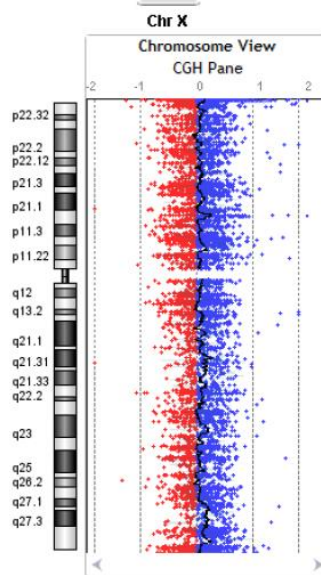
Grafik 6: qPCR sonucunda 8. Hastaya ve ebeveynlerine ait elde edilen kopya sayıları. K-10: 10 ng/μl’lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/μl’lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/μl’lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2’den fazla olması amplifikasyonu; 2’den az olması delesyonları göstermektedir.

9. HASTA

Gelişme geriliği, konuşma gecikmesi, epilepsi ve agresivite nedeniyle danışılan 3,5 yaşında kız hastanın dismorfik muayenesinde makrosefali, ifadesiz yüz, derin yerleşimli gözler ve orta yüz hipoplazisi gözlenmiş olup hastanın detaylı array-CGH sonucu ve moleküler karyotip ideogramları sırasıyla Tablo 25 ve Resim 6’da gösterilmiştir.

Tablo 24: 9. Hastaya ait array-CGH raporu

Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Gen(ler)	Değerlendirme
Xp11.4	kazanç	39953078-40496404	543,327 kb	<i>BCOR, ATP6AP2, LOC347411, CXorf38</i>	Olası patojenik varyasyon

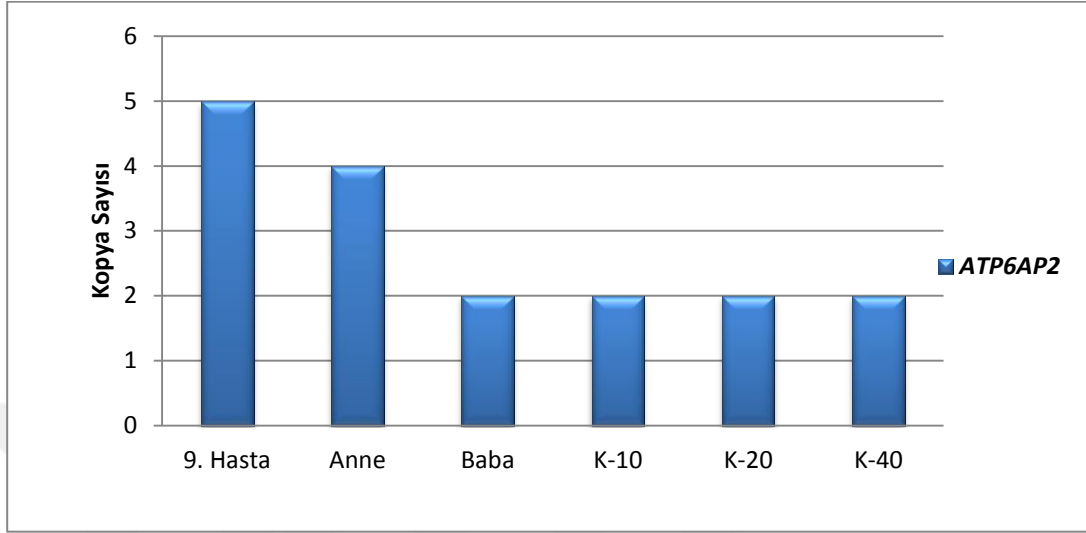


Resim 6: 9. Hastaya ait moleküler karyotip ideogramı

Xp11.4 bölgesinde tespit edilen amplifikasyonun doğrulanması ve kalıtım durumunun belirlenmesi amacıyla qPCR çalışması yapılmıştır. Sonuçta hastada saptanan duplikasyon doğrulanmış, hafif entelektüel yetersizlik bulguları olan annede de bu bölge duplike olarak değerlendirilmiştir. Babada bu bölgenin kopya sayısı normal olarak değerlendirilmiştir. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR CT değerleri Tablo 26’da, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 7’de verilmiştir.

Tablo 25: 9. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>ATP6AP2</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 10 ng/μl	25,5	25,6	25,52	25,16	25,37	25,92
Anne 10 ng/μl	25,3	25,39	25,54	24,31	25,69	25,35
Baba 10 ng/μl	26,12	26,85	26,25	26,69	25,3	26,35
Kontrol DNA 10ng/μl	25,14	25,66	25,57	23,91	25,18	25,61
Kontrol DNA 20ng/μl	24,41	24,86	24,92	23,24	24,12	24,75
Kontrol DNA 40ng/μl	23,84	23,94	23,88	22,28	23,35	23,52



Grafik 7: qPCR sonucunda 9. Hastaya ve ebeveynlerine ait elde edilen kopya sayıları. K-10: 10 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/ μ l'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

10. HASTA

Motor gelişme geriliği, ASD, imperfore anüs, yaygın kas güçsüzlüğü ve artmış kas enzimleri nedeniyle danışılan, dismorfik muayenesinde hirsutizm, kalın kaşlar ve anteverte nares gözlenen 7 yaşında kız hastanın detaylı array-CGH sonucu Tablo 17'de gösterilmiştir.

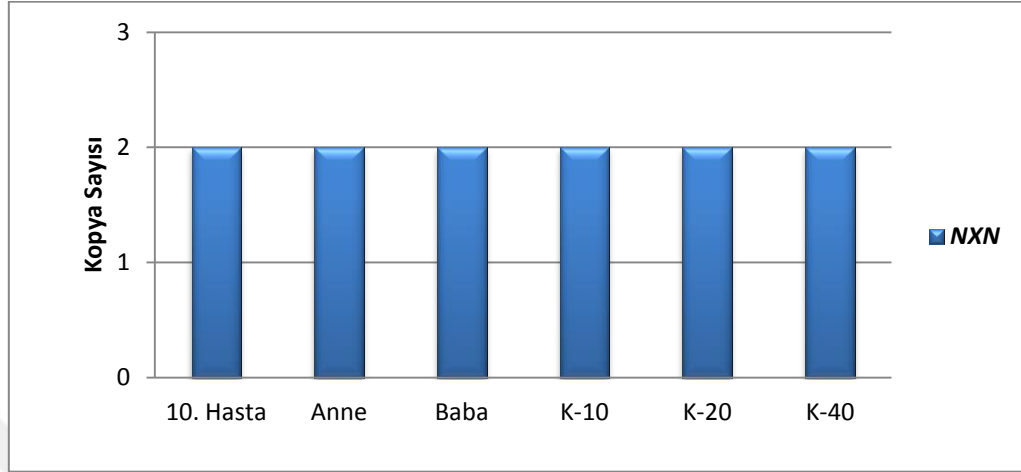
Tablo 26: 10. Hastaya ait array-CGH raporu

Kromozom	Kayıp/ Kazanç	Genomik lokalizasyon (GRCh37/hg19)	Boyut	Gen(ler)	Değerlendirme
17p13.3	kazanç	810138-1022950	212,813 kb	<i>NXN, ABR, TIMM22</i>	Klinik önemi bilinmeyen varyasyon

17p13.3 bölgesinde tespit edilen amplifikasyonun doğrulanması ve kalıtım durumunun belirlenmesi amacıyla qPCR çalışması yapılmıştır. *NXN* geninin ilk ekzonunun çalışıldığı qPCR’da hastanın ve ebeveynlerinin ilgili kromozomal bölgede kopya sayısı normal bulunmuştur. Hastaya ve ebeveynlerine ait CT değerleri Tablo 28’de, sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen kopya sayıları Grafik 8’de verilmiştir.

Tablo 27: 10. Hastaya ve ebeveynlerine ait qPCR çalışması CT değerleri

DNA	Hedef Bölge (<i>NXN</i>) Reaksiyonları			Kontrol Bölge (<i>G6PDH</i>) Reaksiyonları		
	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>	<u>1. Tekrar</u>	<u>2. Tekrar</u>	<u>3. Tekrar</u>
Hasta 10 ng/μl	24,36	25,27	24,35	24	23,11	24,02
Anne 10 ng/μl	25,63	25,51	26,45	25,01	23,93	26,39
Baba 10 ng/μl	25,61	26,55	26,45	24,6	24,91	23,80
Kontrol DNA 10ng/μl	23,26	22,38	23,65	23,11	22,36	22,73
Kontrol DNA 20ng/μl	22,19	22,07	22,76	22,29	22,73	24,01
Kontrol DNA 40ng/μl	21,09	21,35	21,09	21,34	21,24	21,58



Grafik 8: qPCR sonucunda 10. Hastaya ve ebeveynlerine ait elde edilen kopya sayıları. K-10: 10 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-20: 20 ng/ μ l'lik kontrol DNA, K-40: 40 ng/ μ l'lik kontrol DNA reaksiyonlarına ait sonuçları temsil etmektedir. Kopya sayısının 2'den fazla olması amplifikasyonu; 2'den az olması delesyonları göstermektedir.

Hastalara ve ebeveynlerine ait, 5 delesyon ve 5 duplikasyondan oluşan CNV'lere uygulanmış olan qPCR çalışmalarının sonuçları Tablo 29'da özetlenmiştir.

Tablo 28: Hastalara ve ebeveynlerine ait qPCR çalışma sonuçlarının özeti

Hasta No	Array-CGH	Boyut	Değerlendirme	qPCR Sonucu		
				Hasta	Anne	Baba
1	chr10: 92095432-92548183	452 kb	Olası patojenik	duplikasyon	duplikasyon	uygulanamadı
2	chr13: 114943814-115011507	67 kb	Klinik önemi bilinmeyen	duplikasyon	normal	duplikasyon
3	chr13: 114957933-115011507	53kb	Klinik önemi bilinmeyen	duplikasyon	normal	duplikasyon
4	chr13: 115004778-115047826	43 kb	Klinik önemi bilinmeyen	duplikasyon	uygulanamadı	uygulanamadı
5	chrX: 67131889-67568066	436 kb	Olası patojenik	duplikasyon	duplikasyon	güvenilir değil*
6	chr5: 151243145-151547865	304 kb	Olası patojenik	delesyon	güvenilir değil*	normal
7	chr2: 13664684-24173207	10Mb	Patojenik	delesyon	normal	normal
7	chr2: 38725171-40206339	1481 kb	Olası patojenik	delesyon	normal	normal
7	chr6: 11149035-12805272	1656 kb	Olası patojenik	delesyon	normal	normal
8	chr14: 21892210-22897089	1004 kb	Olası patojenik	normal	normal	normal
9	chrX: 39953078-40496404	543 kb	Olası patojenik	duplikasyon	duplikasyon	normal
10	chr17: 810138-1022950	212 kb	Klinik önemi bilinmeyen	normal	normal	normal

*5 nolu hastanın babasına; 6 nolu hastanın annesine ait sonuçlar, DNA kalitesinde olası probleme bağlı olarak veya DNA konsantrasyonlarının teknik nedenlerle optimize edilememiş olması nedeniyle güvenilir bulunmamıştır.

(Array CGH sonuçlarında mavi renk duplikasyonu, kırmızı renk delesyonu göstermektedir).

4. TARTIŞMA

Array-CGH, genom boyu kopya sayıları hakkında bilgi veren, oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Uluslararası Sitogenomik Array (International Standard for Cytogenomic Array, ISCA) Konsorsiyumu kromozomal mikroarrayi, entelektüel yetersizlik, gelişme geriliği ve çoklu konjenital anomalisi olan hastalarda ilk seçenek tanı testi olarak önermektedir. Ancak mikroarray, teknik nedenlerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle, zaman zaman yanlış tanıya da yönlendirebilmektedir. Saptanan değişikliklerin doğru yorumlanması için fenotipik etkisi olduğu düşünülen değişikliklerin güvenilir bir başka yöntem ile doğrulanması ve kalıtım çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

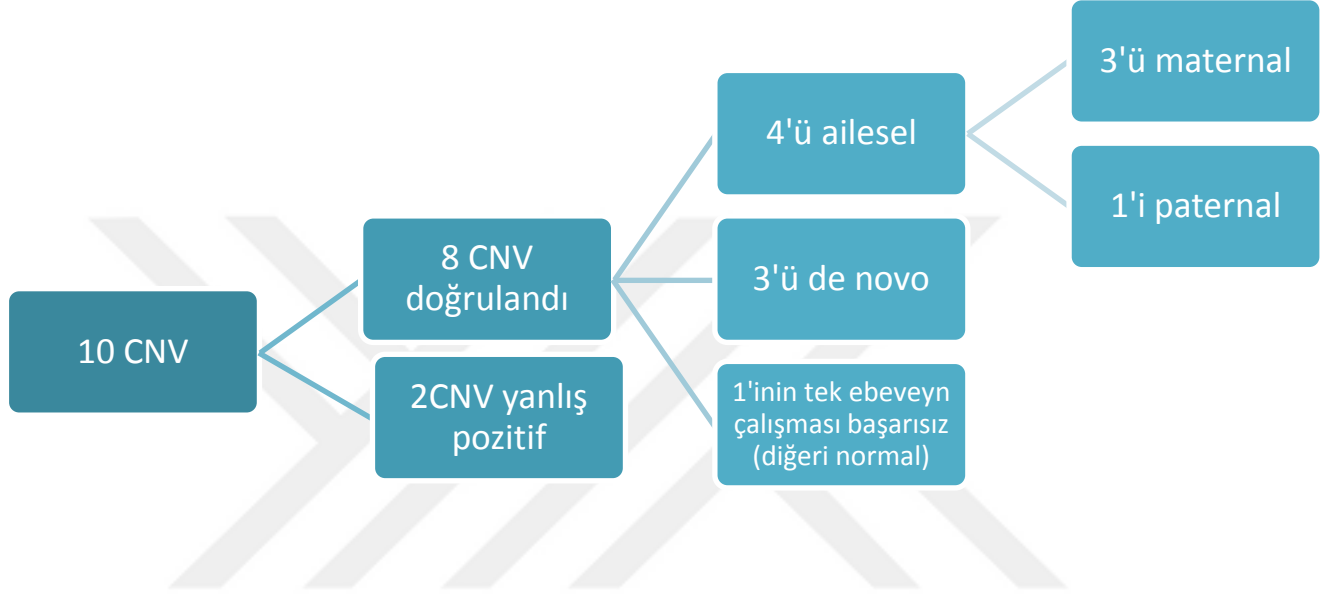
Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri olan qPCR, FISH tekniği ile karşılaştırıldığında hücre kültürü gerektirmemesi, çok küçük değişiklikleri saptayabilmesi, uygulamanın basit olması, duplikasyonları saptayabilmesi, MLPA yöntemine göre ucuz olması ve yeni kit geliştirilmesini gerektirmemesi gibi avantajları sayesinde son yıllarda aCGH sonuçlarını doğrulamada sıklıkla tercih edilen yöntem olmaya başlamıştır. Ancak çalışmanın optimizasyonu her zaman mümkün olmamakta ve DNA konsantrasyonlarının sabitlenmesinde teknik olarak zorluk yaşanabilmektedir.

Tez kapsamında entelektüel yetersizlik ve/veya çoklu konjenital anomali nedeniyle başvuran, klinik değerlendirme sonucunda Array-CGH uygulanan ve

sonuçların doğrulanması için qPCR yöntemi uygulanmış olan 10 hastanın 10 CNV bölgesi değerlendirilmiştir (Tablo 29).

qPCR çalışmasında toplam iki ebeveynde uygunsuz CT değerleri elde edilmiş ve tekrarlanan çalışmalarda bu durum düzelmediğinden, problemin DNA konsantrasyonunun optimize edilememesi ve/veya olası DNA kalitesizliği olduğuna karar verilmiş ve qPCR sonucu güvenilir bulunmamıştır. Teknik bir sorun olan DNA konsantrasyonlarının optimizasyon zorluğu, qPCR'ın sık karşılaşılan kısıtlılıklarından biridir. Kalan 30 çalışmada (30/32) (hasta-anne-baba toplam çalışmaları) güvenilir CT değerlerine ulaşılmıştır.

Sonuçta array CGH ile saptanmış olan 10 CNV'nin 8'i qPCR ile doğrulanmıştır. Bunlardan 4'ü ailesel, 3'ü de novo olup 1'inin tek ebeveyninden güvenilir sonuç elde edilmemiştir (Şekil 16, Tablo 29).



Şekil 16: qPCR Çalışma Sonuçlarının Özeti

Probandda tespit edilen CNV'nin etkilenmemiş (olduğu belirtilen) ebeveynde de saptanması durumunda, CNV'lerin olası yanlış sınıflandırılmasına engel olunması amacıyla, öncelikle söz konusu ebeveyn detaylı öykü ve muayene ile hafif olabilecek bulgular açısından değerlendirilmelidir. Tamamen sağlıklı ebeveynden aktarıldığı gösterilen CNV olasılıkla benign bir değişiklik olarak değerlendirilir ancak aşağıdaki durumlar buna istisna niteliğindedir;

- Penetrans yokluğu: CNV patojeniktir fakat taşıyıcı ebeveynde penetran değildir.

- Değişken ekspresivite: Ebeveyndeki bulgular subklinik olup daha sonra ortaya çıkabilir.

- Mikroarray ile tespit edilemeyen ikinci bir mutasyon olması: Proband resesif kalıtılan bir hastalığa sahip olabilir (örneğin etkilenmemiş ebeveynden delesyon, diğer ebeveynden nokta mutasyonu aktarılmış olabilir). Alternatif olarak, probandda ek olarak bir veya daha fazla modifiye edici durum söz konusu olabilir.

- Ebeveynde bulunan CNV mozaik durumda olup bu nedenle subklinik görünüyor olabilir.

- Probandda bulunan CNV, ebeveynde tespit edilen ile aynı boyutta olmayabilir. CNV'lerin, sonraki kuşağa aktarılırken nadiren modifiye olabildiği (delesyonun boyutunun artabildiği) bilinmektedir.

- X kromozomunda bulunan CNV'ler: Erkek probandda saptanan CNV'nin etkilenmemiş annede tespit edilmesi durumunda anne, bulgu vermemiş taşıyıcı olarak düşünülmelidir. X kromozomu inaktivasyon çalışmaları bilgi verici olabilir ancak X'e bağlı kalıtılan her hastalıkta, taşıyıcı kadınlarda X inaktivasyonundan kaçış görülmemektedir. Bu nedenle anne tarafındaki erkek bireylerin incelenmesi daha bilgi verici olacaktır [42].

Yukarıda sıralanan nedenlerden dolayı, de novo ve yüksek penetranslı CNV'lerin hastalıklarla ilişkisi daha kuvvetli olmakla birlikte, sağlıklı ebeveynden aktarılan kopya sayısı değişiklikleri de hastalık nedeni olabilmektedir. Hastalık

nedeni olduğu bilinen bir çok CNV'nin (22q11.2 delesyonu, 1q21.1 delesyonu gibi) değişken penetrans ve ekspresivite gösterdiği bilinmektedir ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır [43].

Düşük penetranslı değişikliklerin patojenitesinin netleştirlmesi için daha fazla hasta çalışması ve CNV sıklığının belirlenmesi için büyük ölçekli vaka-kontrol çalışmaları gerekmektedir. Bu nedenle elde edilen genotip-fenotip değerlendirme sonuçlarının ortak platformlarda paylaşılmaması oldukça önemlidir.

Kopya sayısı değişikliklerinin fenotipe etkisindeki faktörlerin araştırlığı bir çalışmada ebeveynlerden kalıtılan bir CNV'nin, ikinci bir CNV ile birlikte olmaya yatkın olduğu sonucuna ulaşılmış ve tespit edilen 2. değişimin sıklıkla anneden kalıtıldığı görülmüştür [44]. Bu tez çalışmasında da doğrulanmış olan 8 CNV'den 4'ünün ailesel olduğu ve bunların 3'ünün anneden aktarıldığı görülmüştür. Ailesel olan bu 4 CNV'den ikisinde (ikiz olgular ve 5. Hasta) eşlik eden ikinci bir kopya sayısı değişimi bulunmaktadır (5. Hastadaki değişimin doğrulanması gerekmektedir).

Son yıllarda qPCR'ın aCGH sonuçlarını teyit etmedeki güvenilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla farklı genişliklerde çalışmalar yapılmış ve qPCR'ın saptanan değişiklikleri doğrulamada ve ebeveyn çalışmalarında oldukça güvenilir bir yöntem (spesifite %100 ve buna yakın) olduğu görülmüştür [45]. Bu tez çalışması ile elde edilen veriler laboratuvarımızda uygulanmakta olan qPCR'ın aCGH sonuçlarının doğrulanmasında etkin ve güvenilir olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir.

8. ve 10. Hastalarda aCGH ile saptanmış olan iki bölgedeki kopya sayısı değişikliği qPCR çalışmasında gösterilmemiştir (normal olarak değerlendirilmiştir). aCGH ve qPCR çalışmalarının güvenilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla ilgili 2 hastanın aCGH sonuçları tekrar değerlendirmeye alınmış ve 8. Hastada array kalitesinin tüm genomda düşük (derivative of log ratio SD=0,38 (<0,2 olması idealdir)); 10. Hastada bölgeye özgü prob ortalama logaritmik değerinin düşük (bölgeye özgü mean log ratio=0,25 (1'e yakın olması idealdir)) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 30). Bu veriler doğrultusunda, hastalara ait aCGH sonuçlarının yanlış pozitif olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 29: Yanlış pozitif olduğu saptanan iki aCGH sonucunun kalite verileri. Saptanan CNV, boyutu, bölgedeki prob sayısı, tüm genom veri kalitesi (derivative of log ratio SD), bölgede yer alan problemlerin sıfır çizgisine uzaklıklarının ortalaması (bölge mean log ratio).

Hasta No	CNV	Boyut	Prob Sayısı	Tüm genom DerivativeOfLogRatio	Bölge MeanLogRatio
8	del 14q11.2	1004 kb	21	0,38	0,62
10	dup 17p13.3	212 kb	26	0,16	0,25

Array CGH analizinde yanlış pozitif sonuçların nedenlerini sıralayacak olursak;

1) Tüm genom için array veri kalitesinin düşük olması (genomda problemlerin dağınık yerleşimli oluşu [yüksek “derivative of log ratio SD” değeri], floresan ölçümü etkileyecek düzeyde kirliliğin fazla oluşu)

- 2) İlgili bölgedeki prob sayısının az olması
- 3) Probların birbirine uzaklığının fazla olması
- 4) Değişiklik saptanan bölgedeki problemlerin sıfır çizgisinden uzaklıklarının ortalamasıdır (bölgeye özgü mean log ratio) [Agilent CytoGenomics Reference Guide].

Mikroarray çalışmalarında en önemli konulardan biri, veri kalitesidir. Bu nedenle detaylı analizlere başlamadan önce, çalışılan verilerin teknik bir sorun içerip içermediği değerlendirilmelidir [45].

Analiz sonucunda elde edilen veriler tek tek her bir hasta için değerlendirildiğinde:

1. Hastanın Array CGH ile 10q23 bölgesinde saptanmış olan 452 kb'lik duplikasyon qPCR ile doğrulanmış ve bu duplikasyon annede de gösterilmiştir (Tablo 29). Sağlıklı toplum veri tabanı olan DGV'ye göre polimorfik olmayan duplikasyon bölgesinde; 5-hidroksi triptamin (serotonin) reseptör 7'yi kodlayan *HTR7* geni bulunmaktadır. *HTR7* geni otistik ve nöropsikiyatrik hastalıklar için aday bölge olarak kabul edilmektedir [46]. Ayrıca selektif serotonin geri alım inhibitörlerinin göz içi basıncı üzerine etkilerinin araştırıldığı farklı hayvan çalışmalarında *HTR7* geninin retina, lens, iris ve siliyer cisimcikte eksprese olduğu ve 5-HT7 agonistlerinin intraoküler basıncı artırdığı gösterilmiştir [47,48]. Hastada var olan otizm benzeri bulgular, konjenital katarakt ve tedaviye dirençli glokom bulguları göz önünde

bulundurulduğunda bu duplikasyonun hastanın kliniği ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Hastanın anne tarafında birden fazla akrabada tedaviye dirençli glokom olması ve annede de duplikasyonun tespit edilmiş olması, ilgili CNV'nin klinikten sorumlu olabileceği fikrini desteklemekte ve anne için penetrans yokluğunu düşündürmektedir. Ancak bu ilişkinin netleştirilmesi amacıyla glokomlu diğer aile bireylerinin incelenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte bu duplikasyonun otizm ya da katarakt ve glokoma yatkınlık oluşturabileceği ve kliniğin açığa çıkmasında farklı genetik ve çevresel faktörlerin rol oynayabileceği unutulmamalıdır.

2. ve 3. hastalar monozigotik ikiz olmasına rağmen, test sonuçlarının birbirini teyit etmesi amacıyla her ikisi birden tez çalışmasına kabul edilmiştir. Bu hastaların sitogenetik analizinde marker kromozom tespit edilmiş ve bu marker kromozomun, hastaların kliniğini açıklamakta yeterli olduğu düşünülmüşse de, ortak klinik bulgu olarak hipotoni, gelişme geriliği ve pulmoner hipertansiyonu olan 4. Hastada da aynı CNV'nin tespit edilmiş olması, bu değişimin detaylı incelemesini gerektirmiştir.

2. 3. ve 4. hastaların 13q34 kromozomal bölgesinde tespit edilen duplikasyon her üç hastada doğrulanmış ve ikiz hastaların babasında da gösterilmiştir (Grafik 2, Tablo 29). Saptanan bu duplikasyon, ClinVar veri tabanında “olası benign” olarak bildirilmiş olmakla birlikte, literatürde aynı bölgede duplikasyonu olup otizm ve/veya entelektüel yetersizlik bulgularına sahip hastaların olması [49-52] ve subtelomerik bölgede yer alması nedeniyle, “klinik önemi bilinmeyen varyasyon” olarak değerlendirilmiştir. Mevcut duplikasyonun ikiz hastaların iletişim problemi olan

babalarında da tespit edilmiş olması, hastaların kliniğine bu CNV'nin katkısı olabileceğini düşündürmüştür.

Söz konusu duplikasyon bölgesinde *CDC16* geni ve 4. Hastada ayrıca *UPF3A* geni bulunmaktadır. Her üç hastada ortak olarak duplike görünen *CDC16* geni, hücre döngüsünde görevli anafaza yönlendirici kompleksin (Anaphase-promoting complex, APC) bir subünitini (APC6) kodlar ve mitoz bölünme için esansiyeldir. APC kompleksinin her bir protein komponenti ökaryotlarda yüksek oranda korunmuştur.

İkiz olguların birinde (2. Hasta) ve 4. Hastada primer pulmoner hipertansiyon kliniği mevcuttur. Bu durumun monozigotik ikiz hastalardan yalnızca birinde bulunması, sorumlu olan genetik nedenin değişken ekspresivitesine bağlı olabileceğini ya da henüz diğer kardeşte ortaya çıkmamış olabileceğini düşündürmüştür. Veri tabanlarında benzer bölgenin duplikasyonuna veya *CDC16* geninin mutasyonuna sahip hastalar içerisinde özellikle pulmoner hipertansiyon kliniği araştırılmış fakat bildirilen olgu bulunamamış olmasına rağmen, iki ayrı pulmoner hipertansiyonlu hastada tespit edilen ve qPCR ile amplifikasyonu doğrulanan *CDC16* geninin pulmoner hipertansiyonla ilişkili olma olasılığı dışlanamamıştır.

5. Hastada Xq12 bölgesinde saptanan 436 kb'lık, qPCR ile doğrulanan duplikasyon bölgesinde *OPHN1* geninin son 23 ekzonu bulunmaktadır. *OPHN1* geninin mutasyonlarında "Mental retardation, X-linked, with cerebellar hypoplasia

and distinctive facial appearance” sendromu görülmektedir (OMIM #300486). Literatürde bu genin duplikasyonu ile ilgili net bir klinik veri bulunmamakla birlikte, daha büyük duplikasyonu olan, mikrosefali, dismorfik yüz görünümü, ileri derecede mental retardasyon ve konuşma bozukluğunun eşlik ettiği hastada klinikten sorumlu olabilecek genin *OPHN1* olabileceği üzerinde durulmuştur [53]. ClinVar veritabanında ise bu varyasyon için iki farklı referans bulunmaktadır ve sırasıyla “patojenik” (RCV000135880.3 review status: 0/4; onaylama kriterleri sağlanmamıştır) ve “klinik önemi bilinmeyen” (RCV000054200.4 review status: 1/4; onaylama kriterleri sağlanmıştır) varyasyon olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler ışığında, hastamızda bulunan varyasyon “olası patojenik” olarak değerlendirilmiş ve hastanın kliniği ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

qPCR çalışmasında sağlıklı olan annede de duplikasyon gösterilmiştir. *OPHN1* geninin mutasyonlarında ortaya çıkan X’e bağlı mental retardasyonda taşıyıcı kız hastaların fenotiplerinin değişken düzeylerde etkilenmiş olabileceği bilinmektedir [54,55]. Hastanın babasına ait qPCR sonuçları ise güvenilir bulunmamıştır. Sonuçların güvenilir olmama nedenlerinden yukarıda bahsedilmiştir. Anne-babanın aynı köylü olması, bu nedenle aynı CNV’yi bulundurma ihtimalleri olması nedeniyle qPCR çalışmasının babada tekrarlanması önerilmiştir. Aynı değişikliğin babada da bulunması durumunda, klinik değerlendirmeye birlikte söz konusu CNV’nin patojenitesi hakkında daha net yorum yapılabilecektir. Ayrıca hastada aCGH ile tespit edilmiş ve klinik önemi bilinmeyen 19p12 bölgesindeki

duplikasyonun da kliniğe katkısının değerlendirilmesi amacıyla hedefe yönelik bir tanı yöntemiyle doğrulanması gerekmektedir.

MECP2 geninde patojenik mutasyon nedeniyle Rett Sendromu tanısı alan 6. hastada, ayrıca aCGH’te 5q33 bölgesinde 304 kb’lik delesyon saptanmış ve *GLRA1* geninin ilk üç ekzonunu içeren bu delesyon qPCR ile doğrulanmıştır (Tablo 29). Bu genin homozigot, heterozigot veya compound heterozigot mutasyonları Hiperekpleksi Hastalığına (OMIM #149400) neden olmaktadır. Hiperekpleksi, ani işitsel ve dokunsal uyarılara aşırı irkilme-sıçrama yanıtının verildiği erken başlangıçlı nörolojik bozukluktur. Yenidoğan döneminde uzamış rijidite periyotları olabilmekte ve apne/aspirasyon nedeniyle ani ölümler olabilmektedir. Bebeklik döneminden sonra semptomlar genellikle kaybolur. Literatürde, hiperekpleksi hastalığı olan iki olguda, genin ilk 7 ekzonunu içeren homozigot delesyon tanımlanmıştır [56-57]. Rett Sendromuyla uyumlu gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik, epilepsi ve stereotipik hareketleri olan hastanın ayrıca takılarak düşmelerinin olması nedeniyle yukarıdaki literatür bilgileri doğrultusunda, tespit edilen CNV’nin kliniğe katkıda bulunduğu düşünülmüştür.

Duodenal atrezi, VSD, sol böbrek agenezisi ve hipospadyas, kısa palpebral aralıklar, strabismus, yüksek burun köprüsü, uzun ve silik filtrumu olan 7. Hastada aCGH’te üç ayrı bölgede delesyon saptanmış ve qPCR’ çalışmasında her üç CNV doğrulanmıştır. Hastanın 2p24.3-2p23.3 kromozom bölgesinde saptanmış olan delesyon, ‘Feingold Sendromu’na yol açtığı bilinen *MYCN* geninin kaybına yol

açmıştır. Feingold Sendromu (OMIM 164280); mikrosefali, ekstremité malformasyonları, özafageal ve duodenal atrezi, entelektüel yetersizlik ile bazı hastalarda kardiyak ve renal malformasyonlar ile işitme kaybının eşlik ettiği otozomal dominant bir hastalıktır. Klinik bulguları ve analiz sonuçları ile değeriendirildiğinde hasta, Feingold Sendromu ile uyumlu bulunmuştur. Hastada 2p22.1 bölgesinde saptanan ikinci delesyon, DECIPHER veri tabanında gelişme geriliği, mikrosefali, entelektüel yetersizlik ve/veya otizmi olan hastalarda (249901, 271724, 291561, 275492, 274729) tanımlanmıştır. Delesyonun kapsadığı *SOS1* geninin heterozigot mutasyonları Tip 1 Gingival Fibromatozis (OMIM 135300) ve Tip 4 Noonan Sendromuna (OMIM 610733) yol açmaktadır. Hastanın kliniğinde VSD olması nedeniyle delesyonu doğrulanın bölgesinin fenotipe katkıda bulunmuş olabileceği düşünölmüştür. 6p24.2-24.1 bölgesinde saptanan 3. delesyon DGV veri tabanına göre polimorfik olmayıp, DECIPHER veri tabanında hipotoni, anormal filtrum, konuşma gecikmesi olan hastalarda (265752, 273546, 308445) tanımlanmıştır. Ayrıca delesyon bölgesinde bulunan *NEDD9* geninin böbrekte yüksek miktarda eksprese olması [58] ve hastada böbrek agenezesi olması nedeniyle bu CNV de olası patojenik olarak değeriendirilmiş ve hastanın kliniğine katkıda bulunmuş olabileceği düşünölmüştür. Söz konusu delesyonların qPCR ile de novo olduğu gösterilmiştir (Tablo 29) ancak bu durum gonadal mozaizizmleri ekarte ettirmemektedir.

8. Hastada, aCGH'te 14q11.2 kromozomal bölgesinde fenotipi açıklayabilecek delesyon tespit edilmiştir. 14q11.2 bölgesi, yeni tanımlanan bir

rekürren mikrolelesyon bölgesi olup, olgularda klinik olarak entelektüel yetersizlik, gelişme geriliği, geniş burun köprüsü ve dış kulak anomalileri görülmektedir. 14q11.2 mikrolelesyon sendromunda fenotipik bulgulara sebep olan en önemli gen olarak *CHD8* geni gösterilmektedir [41]. Hastanın fenotipinde 14q11.2 mikrolelesyon sendromuyla uyumlu bulgular olmasına rağmen bu bölgenin kopya sayısı qPCR çalışmasında normal bulunmuştur (Tablo 29). aGCH verilerine geri döndüğünde tüm genom prob dağılım kalitesinin uygunsuz ve incelemenin yeterli kalitede olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 30). Hastada öncelikle, klinikten sorumlu olabilecek CNV'ler açısından array analizinin tekrarlanması planlanmıştır.

9. Hastada Xp11.4 bölgesinde saptanan 543 kb'lik duplikasyon qPCR ile doğrulanmış ve hafif entelektüel yetersizlik bulguları olan annede de tespit edilmiştir (Tablo 29). Xp11.4 duplikasyon bölgesinde bulunan *ATP6AP2* geninin mutasyonlarında erkek hastalarda “Mental retardation, X-linked, syndromic, Hadera type” (#300423) bildirilmiştir. Bu sendroma sahip hastaların taşıyıcı anneleri asemptomatik bulunmuştur [59-60] ve etkilenmiş kız hasta bildirilmemiştir. Henüz genin tamamını içeren duplikasyonların kliniği ile ilgili kesin bir veri olmamakla birlikte, DECIPHER'da konuşma gecikmesi, entelektüel yetersizlik ve epilepsi (ID: 322952) ile dismorfik yüz ve entelektüel yetersizliği (ID: 315068) bulunan iki hastadaki amplifikasyon bölgeleri, hastamızda saptanan Xp11.4 bant bölgesindeki amplifikasyon içinde yer almaktadır. Ayrıca DGV veri tabanında bu bölgenin duplikasyonu yapılan iki ayrı çalışmada non-polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Bu

veriler, hastamızda var olan gelişme geriliği ve epilepsi bulgularının, bu bölge ile ilişkili olabileceğini, *ATP6AP2* geninin mutasyonlarında olduğu gibi duplikasyonlarında da X'e bağlı resesif olarak kalıtılan Hadera Tipi Mental Retardasyon Sendromunun ortaya çıkabileceğini ve kız hastalarda da değişken düzeylerde bulgu verebileceğini düşündürmüştür.

10. Hastada moleküler karyotipleme sonucunda 17p13.3 bölgesinde 212 kb'lık duplikasyon saptanmış olup ilgili bölgede *ABR*, *TIMM22* genlerinin tamamı ile *NXN* geninin ilk ekzonu ve ilk intronu yer almaktadır. Hastanın kliniğinde yaygın kas güçsüzlüğü olması, tespit edilen CNV'de *NXN* geninin kesintiye uğraması ve literatürde bu şekilde iki hastanın (DECIPHER 254240, 290914) bildirilmiş olması nedeniyle bu delesyonun klinikle ilişkili olabileceği düşünülmüş fakat qPCR çalışmasında bu bölgenin kopya sayısı normal bulunmuştur (Tablo 29). aCGH verilerine geri dönüldüğünde ilgili bölgeye özel prob ortalama logaritmik değerinin oldukça düşük olduğu ve tespit edilmiş olan CNV'nin yanlış pozitif olduğu görülmüştür (Tablo 30). Hastanın tanısı için, ebeveynlerin kuzen olması nedeniyle resesif kalıtılan hastalıklar göz önünde bulundurularak klinik değerlendirme ışığında ek incelemeler yapılması planlanmıştır.

5. SONUÇ

1. Array CGH analizinde saptanan klinik önemi bilinmeyen, olası patojen ve patojen değişikliklerin bir başka yöntemle doğrulanmasının doğru bir yaklaşım olduğu ve bu amaçla qPCR'ın güvenle kullanılabilecek bir yöntem olduğu bir kez daha gösterilmiştir.

2. Doğrulama çalışmalarının ebeveynlerle birlikte yapılmasının, CNV'lerin patojenite değerlendirmesine katkıda bulunarak doğru genetik danışma verilmesini sağladığı görülmüştür.

3. Bu tez çalışmasında ayrıca doğrulanmış olan spesifik mikrodelsiyon/ mikroduplikasyonların veritabanlarında incelemesi yapılarak

- *HTR7* geninin göz içi basıncı artışına yatkınlık oluşturabileceği
- *CDC16* geninin pulmoner hipertansiyonla ilişkili olabileceği
- *OPHN1* geninin mutasyonlarında olduğu gibi duplikasyonlarında da “Mental retardation, X-linked, with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance” (OMIM #300486) sendromu ortaya çıkabileceği
- *ATP6AP2* geninin mutasyonlarında olduğu gibi duplikasyonlarında da X'e bağlı resesif olarak kalıtılan “Mental retardation, X-linked, syndromic, Hedera type” (OMIM #300423) sendromunun ortaya çıkabileceği ve kız hastalarda da değişken düzeylerde bulgu verebileceği gözlenmiştir. Bu genlerin ilgili

fenotiplerle ilişkisinin ortaya konması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* 2011; 12(5):363-76.
2. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat. Rev Genet* 2015;16(3):172-83.
3. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 2010; 464(7289):704-12.
4. Sudmant PH, Mallick S, Nelson BJ, Hormozdiari F, Krumm N, Huddleston J, et al. Global diversity, population stratification, and selection of human copy-number variation. *Science* 2015;349(6253).
5. Bruder CE, Piotrowski A, Gijsbers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Stahl T, et al. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):763-71.
6. Piotrowski A, Bruder CE, Andersson R, Diaz de Stahl T, Menzel U, Sandgren J, et al. Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat.* 2008;29(9):1118-24.
7. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):949-51.
8. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004;305(5683):525-8.
9. Curtis C, Shah S, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning M, et al. Pattern discovery and cancer gene identification in integrated cancer genomic data. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Mar 12;110(11):4245-50.
10. Mishra S, Whetstine JR. Different Facets of Copy Number Changes: Permanent, Transient, and Adaptive. *Mol Cell Biol.* 2016 Jan 11;36(7):1050-63.

11. Arit MF, Mulle JG, Schaibley VM, Ragland RL, Durkin SG, Warren ST, et al. Replication stress induces genome-wide copy number changes in human cells that resemble polymorphic and pathogenic variants. *Am J Hum Genet.* 2009 Mar;84(3):339-50.
12. Human Genome Structural Variation Working Group. Eichler EE, Nickerson DA, Altshuler D, Bowcock AM, Brooks LD, Carter NP, et al. Completing the map of human genetic variation. *Nature.* 2007 May 10;447(7141):161-5.
13. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res.* 2001 Jun;11(6):1005-17.
14. Van Binsbergen E. Origins and breakpoint analyses of copy number variations: up close and personal. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):271-6.
15. Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010;61:437-55.
16. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 2008 Nov 3;1(1):4.
17. Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):182-95.
18. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet.* 2009 Aug;10(8):551-64.
19. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4;283(1):1-5.
20. Slack A, Thornton PC, Magner DB, Rosenberg SM, Hastings PJ. On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 2006 Apr;2(4):e48.
21. Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med.* 2010 Mar 9;12:e8.

22. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*. 2007 Feb 9;315(5813):848-53.
23. Rivera-Brugués N, Albrecht B, Wiczorek D, Schmidt H, Keller T, Göhring I, et al. Cohen syndrome diagnosis using whole genome arrays. *J Med Genet*. 2011 Feb;48(2):136-40.
24. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*. 1998 Oct;14(10):417-22.
25. Naseer MI, Faheem M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Al-Quaiti MM, Jan MM, et al. Genome wide analysis of novel copy number variations duplications/deletions of different epileptic patients in Saudi Arabia. *BMC Genomics*. 2015;16 Suppl 1:S10.
26. Martin CL, Kirkpatrick BE, Ledbetter DH. Copy number variants, aneuploidies, and human disease. *Clin Perinatol*. 2015 Jun;42(2):227-42.
27. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):749-64.
28. Chong WW, Lo IF, Lam ST, Wang CC, Luk HM, Leung TY, et al. Performance of chromosomal microarray for patients with intellectual disabilities/developmental delay, autism, and multiple congenital anomalies in a Chinese cohort. *Mol Cytogenet*. 2014 May 23;7:34.
29. Coughlin CR 2nd, Scharer GH, Shaikh TH. Clinical impact of copy number variation analysis using high-resolution microarray technologies: advantages, limitations and concerns. *Genome Med*. 2012 Oct 30;4(10):80.
30. Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, Kim HJ, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Mol Cytogenet*. 2011 May 9;4:12.

31. Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, et al. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol.* 2011 May 8;29(6):512-20.
32. Sykulski M, Gambin T, Bartnik M, Derwińska K, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Stankiewicz P, et al. Multiple samples aCGH analysis for rare CNVs detection. *J Clin Bioinforma.* 2013 Jun 11;3(1):12.
33. Choy KW, Setlur SR, Lee C, Lau TK. The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. *BJOG.* 2010 Mar;117(4):391-8.
34. Sharma P, Gupta N, Chowdhury MR, Sapra S, Ghosh M, Gulati S, et al. Application of chromosomal microarrays in the evaluation of intellectual disability/global developmental delay patients - A study from a tertiary care genetic centre in India. *Gene.* 2016 Sep 15;590(1):109-19.
35. Oldridge DA1, Banerjee S, Setlur SR, Sboner A, Demichelis F. Optimizing copy number variation analysis using genome-wide short sequence oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jun;38(10):3275-86.
36. Beaudet AL. The utility of chromosomal microarray analysis in developmental and behavioral pediatrics. *Child Dev.* 2013 Jan-Feb;84(1):121-32.
37. Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, et al. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data.
38. Connolly JJ, Glessner JT, Almoguera B, Crosslin DR, Jarvik GP, Sleiman PM, et al. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Front Genet.* 2014 Mar 18;5:51.
39. Ma L, Chung WK. Quantitative analysis of copy number variants based on real-time LightCycler PCR. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014 Jan 21;80:Unit 7.21.
40. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Jan;1151:157-66.

41. Drabova J, Seemanova E, Hancarova M, Pourova R, Horacek M, Jancuskova T, et al. Long term follow-up in a patient with a de novo microdeletion of 14q11.2 involving CHD8. *Am J Med Genet A*. 2015 Apr;167A(4):837-41.
42. Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011 Jul;13(7):680-5.
43. Morrow EM. Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Nov;49(11):1091-104.
44. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med*. 2012 Oct 4;367(14):1321-31.
45. Wang R, Carter J, Lench N. Evaluation of real-time quantitative PCR as a standard cytogenetic diagnostic tool for confirmation of microarray (aCGH) results and determination of inheritance. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013 Nov;17(11):821-5.
46. Helsmoortel C, Swagemakers SM, Vandeweyer G, Stubbs AP, Palli I, Mortier G, et al. Whole genome sequencing of a dizygotic twin suggests a role for the serotonin receptor HTR7 in autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2016 Dec;171(8):1049-1056.
47. Costagliola C, Parmeggiani F, Semeraro F, Sebastiani A. Selective serotonin reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr Neuropharmacol*. 2008 Dec;6(4):293-310.
48. Platania CB1, Leggio GM, Drago F, Salomone S, Bucolo C. Regulation of intraocular pressure in mice: structural analysis of dopaminergic and serotonergic systems in response to cabergoline. *Biochem Pharmacol*. 2013 Nov 1;86(9):1347-56.
49. <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/286248#overview>

50. <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/288681#overview>
51. <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/289289#phenotype/person/40431>
52. Di Bella MA, Calì F, Seidita G, Mirisola M, Ragusa A, Ragalmuto A, et al. Screening of subtelomeric rearrangements in autistic disorder: identification of a partial trisomy of 13q34 in a patient bearing a 13q;21p translocation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Sep 5;141B(6):584-90.
53. Bedeschi MF, Novelli A, Bernardini L, Parazzini C, Bianchi V, Torres B, et al. Association of syndromic mental retardation with an Xq12q13.1 duplication encompassing the oligophrenin 1 gene. *Am J Med Genet A.* 2008 Jul 1;146A(13):1718-24.
54. Bienvenu T, Der-Sarkissian H, Billuart P, Tissot M, Des Portes V, Brûls T, et al. Mapping of the X-breakpoint involved in a balanced X;12 translocation in a female with mild mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 1997 Mar-Apr;5(2):105-9.
55. Chabrol B, Girard N, N'Guyen K, Gérard A, Carlier M, Villard L, et al. Delineation of the clinical phenotype associated with OPHN1 mutations based on the clinical and neuropsychological evaluation of three families. *Am J Med Genet A.* 2005 Nov 1;138(4):314-7.
56. Sirén A, Legros B, Chahine L, Misson JP, Pandolfo M. Hyperekplexia in Kurdish families: a possible GLRA1 founder mutation. *Neurology.* 2006 Jul 11;67(1):137-9.
57. Gilbert SL, Ozdag F, Ulas UH, Dobyns WB, Lahn BT. Hereditary hyperekplexia caused by novel mutations of GLRA1 in Turkish families. *Mol Diagn.* 2004;8(3):151-5.
58. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14511#expression>
59. Hedera P, Alvarado D, Beydoun A, Fink JK. Novel mental retardation-epilepsy syndrome linked to Xp21.1-p11.4. *Ann Neurol.* 2002 Jan;51(1):45-50.

60. Gupta HV, Vengoechea J, Sahaya K, Virmani T. A splice site mutation in *ATP6AP2* causes X-linked intellectual disability, epilepsy, and parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Dec;21(12):1473-5.



ÖZET

İnsan genomunda yaklaşık 3,2 milyar nükleotid bulunmaktadır. Bireylerin genomları arasında, farklı büyüklüklerde değişiklikler olabilmektedir. Bu değişiklikler, insanların birbirinden farklı özelliklere sahip olmasını sağladığı gibi, hastalıklara da neden olduğu bilinmektedir. Tek nükleotid değişikliklerine tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism-SNP), kısa (2-50 baz) delesyon ve insersiyonlara indel, kromozom bölümlerinin 50 bazdan büyük değişikliklerine ise kopya sayısı değişimi (Copy Number Variation, CNV) adı verilmektedir. CNV'lerin hastalıklardaki önemi anlaşıldıkça bunları saptamaya yönelik yöntemler de gelişmeye başlamıştır. CNV araştırmalarında, genom boyu veya hedefe yönelik yöntemler kullanılmaktadır.

Array tabanlı komperatif genomik hibridizasyon (Array CGH) ve tek nükleotid polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) array, genel isimlendirme olarak kromozomal mikroarray, entelektüel yetersizlik, gelişme geriliği ve çoklu konjenital anomalisi olan hastalarda ilk seçenek tanı testi olarak önerilmektedir. Günümüzde CNV saptamada kullanılan standart metod, array-CGH'dir ancak teknik nedenlerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle, yanlış tanıya yönlendirebilmektedir. Bu nedenle, fenotipik etkisi olduğu düşünülen değişikliklerin güvenilir bir yöntem ile doğrulanması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında hedefe yönelik bir CNV saptama yöntemi olan kantitatif real-time PCR (qPCR)'ın doğrulama çalışmalarında güvenilirliğinin gösterilmesi; ayrıca, doğrulanan spesifik mikrodelsiyon/mikroduplikasyon sendromlarının genotip/fenotip korelasyonu yapılarak literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Bu araştırma retrospektif bir çalışma olup, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na entelektüel yetersizlik ve/veya çoklu konjenital anomali nedeniyle başvuran, klinik değerlendirme sonucunda Array-CGH uygulanan ve sonuçların doğrulanması için qPCR yöntemi uygulanmış olan 10 hastanın 10 CNV bölgesi değerlendirilmiştir. qPCR çalışmasında 10 CNV'den 2'sinin yanlış pozitif olduğu saptanmış, 8'i başarı ile doğrulanmıştır. Doğrulan 8 CNV'den 4'ünün ailesel (3'ü anneden 1'i babadan), 4'ünün de novo olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar; array CGH'te saptanan ve hastanın kliniği ile ilişkili olabilecek değişikliklerin mutlaka ikinci bir yöntemle doğrulanması gerektiğini ve literatürdeki güvenilirlik çalışmalarıyla birlikte, qPCR'ın bu amaçla güvenle kullanılacak bir yöntem olduğunu göstermiştir. Doğrulama çalışmalarının ebeveynlerle birlikte yapılması, CNV'lerin patojenite değerlendirmesine katkıda bulunmuş ve doğru genetik danışma verilmesini sağlamıştır. Bu tez çalışmasında ayrıca doğrulanan mikrodelsiyon/mikroduplikasyonlarda bulunan *HTR7*, *CDC16*, *OPHN1*, *GLRA1*, *ATP6AP2* genleri ile hastaların kliniği arasında genotip/fenotip korelasyonu yapılmış ve literatüre katkı sağlanacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: CNV, array CGH, qPCR, *HTR7*, *CDC16*, *OPHN1*,
GLRA1, *ATP6AP2*



SUMMARY

The human genome contains approximately 3,2 billion nucleotides. There are different size of variations between individuals which are the basis for phenotypic variations or may be the cause for diseases. Single nucleotide changes from the reference genome are called single nucleotide polymorphism (SNP), short (2-50 bases) deletions and insertions are named indels and chromosome changes greater than 50 bases are called copy number variation (CNV). As the importance of CNVs are recognized in diseases, methods for detecting them have increased to develop. Genome-wide or targeted methods are used in CNV studies.

Array-based Comperative Genomic Hybridization (Array-CGH) and Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP Array), chromosomal microarray as the general name, is suggested as the first choice diagnostic test in patients with intellectual disability, developmental delay and multiple congenital abnormalities. The standard method used in CNV detection today is array-CGH but it may lead to false positive results due to technical reasons. Therefore copy number changes that are thought to heve phenotypic effects need to be confirmed by a reliable method.

In this study, it is aimed to demonstrate the reliability of a targeted CNV detection method, quantitative real-time PCR (qPCR) in validation studies and also to contribute to the literature by correlating the genotype / phenotype of specific microdeletion / microduplication syndromes confirmed.

This study was a retrospective study evaluating 10 CNV regions of 10 patients who applied to Gazi University Medical Genetics Department due to intellectual disability and / or multiple congenital anomalies. After clinical evaluation, Array-CGH and then qPCR methods were applied to confirm the results. In the qPCR trial, 2 out of 10 CNVs were found to be false positive and 8 were successfully verified. Of the 8 confirmed CNVs, 4 were familial (3 maternal and 1 paternal) and 4 were novo.

These results have shown that phenotypically important copy number changes detected in the array CGH should be confirmed with a second method and together with reliability studies in the literature, qPCR is a safe method for this purpose. Verification studies in conjunction with parents has contributed to the pathogenicity assessment of CNVs and provided a more accurate genetic counseling. It is also thought that this study will contribute to the literature with genotype/ phenotype correlation of *HTR7*, *CDC16*, *OPHN1*, *GLRA1*, *ATP6AP2* genes the confirmed microdeletions / microduplications.

Keywords: CNV, array CGH, qPCR, *HTR7*, *CDC16*, *OPHN1*, *GLRA1*, *ATP6AP2*

6. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Aysel Ünal

Doğum Yeri ve Tarihi: Antalya, 02.03.1988

e-mail : atekmenuray@yahoo.com

Eğitimi

2013-2017: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD Araş. Gör. Dr.

2006-2012: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

2002-2006: Antalya 75. Yıl Cumhuriyet Lisesi

1994-2002: Antalya Kültür İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Avrupa İnsan Genomu Topluluğu

(European Society of Human Genetics, ESHG)

Bilimsel Toplantılarda Yapılan Sözlü Sunumlar

- 1) Tekmenuray A., Yirmibeş Karaoğuz M., Perçin E.F. Multipl Kromozomal Yeniden Düzenlenim Saptanan Fetüsün Tanısında aCGH Kullanımı. 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.

2) Ünal A., Perçin E.F. MACS Sendromlu 5. Olgu. Gevher Nesibe Tıbbi Genetik Günleri, 11-13 Şubat 2016, Kayseri

Bilimsel Toplantılarda Yapılan Poster Sunumları

1) Unal A., Bahsi T., Bakir A., Perçin E.F. The 3rd W522X Mutation In EIF2AK3 Gene From Turkey: A New Patient With Wolcott-Rallison Syndrome. European Human Genetics Conference-ESHG 2016 May 20-24, Barcelona, Spain

7. EKLER

Ek 1: qPCR Çalışmasında Tasarlanan ve Kullanılan Primer Çiftleri

	BÖLGE	FORWARD	REVERSE	ÜRÜN UZUNLUĞU
1	10q23.31	GATTGACAACAAGGCAGGTGAT	AGCCCAGGTGAATGTAAGTGC	219
2	13q34	TACATCCTTGGGAAGACAGAGAAA	ACCACTGCACTAGGCTAAAATATG	210
3	Xq12	GATGTGGAGAGGTTTGTCTTCTA	AAGCAAACAAAATTCCAAGAAGC	200
4	5q33.1	TGGGGAAGAGGGGTGCTGTATTC	AAAGTCCTCAGCCGAGTGAAAGCC	257
5	2p24.3	AGAGGACGTTGTCGTGGGTTT	ACAAATCCTTCCCCTCCCCAAATT	135
6	2p22.1	AGTTTTTCAGCGGAGGTCAAAGC	AACCAGGAGAATGAGGAGTGAATAC	218
7	6p24.2	ACTCATTCAGGCTCCTACTTCCTG	CACTAAAACCAGCACCTCCAGGTC	161
8	14q11.2	CCCTCAGCAACCACTTATTCTTGA	CCCAAACCCAACAATCCCTCT	143
9	Xp11.4	CTGGCTGCCACGATGTTTTT	CCATCTCAACTTTTGCATCCG	125
10	17p13.3	CTTTGCATTGTCTGGCCGTCCA	AAACCCAAACTCAACTCGGCAGCA	236

Ek 2: Klinik Araştırmalar Etik Kurul Formu ve Onay



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabıplığı
Klinik Araştırma Etik Kurulu

Sayı : 2012-KAEK-15/1177
Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Etik Kurul Kararı

22.06.2016

**KEÇİÖREN EğİTİM VE ARAşTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAşTIRMA
ETİK KURULU**

"Array-Tabanlı Komperatif Genomik Hibridizasyon (Array-CGH) İle Tespit Edilen Kopya Sayısı Değişikliklerinin (Copy Number Variation-CNV) Doğrulanmasında Kantitatif PCR Yönteminin Kullanılması" adlı klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekteştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ve kurumumuz kararının başvuru sahibi tarafından sağlık bakanlığına arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.


Op.Dr. Ömer Faruk TANER
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Pınarbaşı Mahallesi Sanatoryum Cad.
Arıahan Sokak No:25 Keçiören / ANKARA

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Array-Tabanlı Komperatif Genomik Hibridizasyon (Array-CGH) ile Tespit Edilen Kopya Sayısı Değişikliklerinin (Copy Number Variation-CNV) Doğrulanmasında Kantitatif PCR Yönteminin Kullanılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2012-KAEK-15
	AÇIK ADRESİ	Pınarbaşı Mah. Sanatoryum Cad. Ardahan Sok. No.25 06380 Keçiören / Ankara
	TELEFON	0312 356 90 00-1117
	FAKS	
	E-POSTA	etikkurulkeah@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. E. Ferda Perçin	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı	
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI		
	DESTEKLEYİCİ		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐
		FAZ 2	☐
		FAZ 3	☐
		FAZ 4	☐
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐
		in vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐
		İlaç dışı klinik araştırma	☒ Akademik Araştırma
	Diğer ise belirtiniz Uzmanlık Tezi		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐
		ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Op.Dr.Ömer Faruk TANER
İmza:

ASLI GİBİDİR

Zelma ÖZMECİ
Başkan Yardımcısı
Klinik Araştırma Etik Kurulu Sek.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Array-Tabanlı Komperatif Genomik Hibridizasyon (Array-CGH) İle Tespit Edilen Kopya Sayısı Değişikliklerinin (Copy Number Variation-CNV) Doğrulanmasında Kantitatif PCR Yönteminin Kullanılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	S.GORTA					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU					
	ILAN					
	YILLIK BİLDİRİM					
	SONUÇ RAPORU					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ					
	DİĞER:					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:1177	Tarih: 22.06.2016				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmaların/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANTIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Op.Dr.Ömer Faruk TANER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Op.Dr.Ömer Faruk TANER Bşk.	Plastik Ve Rekonstrüktif Cerrahi	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Şamil HIZLI Bşk. Yrd.	Çocuk Gastroenteroloji	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr. Handan GÜLEÇ Blg.Görevli üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr Ahmet ERGÜN	Fizyoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN	Tıbbi Genetik	Gazi Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

Etik Kurul Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı: Op.Dr.Ömer Faruk TANER

İmza:

ASLI
Zaferan

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Array-Tabanlı Komperatif Genomik Hibridizasyon (Array-CGH) ile Tespit Edilen Kopya Sayısı Değişikliklerinin (Copy Number Variation-CNV) Doğrulanmasında Kantitatif PCR Yönteminin Kullanılması							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		-							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlgili		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Mustafa N. İLHAN	Halk Sağlığı, İş Ve Meslek Hst.	Gazi Ünv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Nermin ÇAPAN	Göğüs Hastalıkları	Atatürk Göğüs Hst. Ve Göğüs Cer. E.A.H.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Op. Dr. Selim Şakir Erkinen GÜLHAN	Göğüs Cerrahisi	Atatürk Göğüs Hst. Ve Göğüs Cer.E.A.H.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Yr.Doç. Dr. Işıl ÖZAKÇA	Farmakoloji (PhD)	Ankara Ünv.Ecz.Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Selma UYSAL RAMADAN	Radyodiagnostik	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Mustafa ALTAY	Endokrinoloji ve Metabolizma Hst.	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Uzm. Dr. Osman KORUCU	Nöroloji	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Av. Abdullah Emin TEKİN	Avukat	Serbest	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Necmettin TEKİN	Din Görevlisi	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİ

Zelha ÖZELGE
Kurumun Etik Kurul Başkanı / Üyesi
Etik Kurul Başkanı / Üyesi

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Op.Dr. Ömer Faruk TANER
İmza: