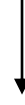


← Adınızı soyadınızı giriniz

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



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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İNSAN GENOMUNDAKİ KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN SNP ARRAY
YÖNTEMİ KULLANILARAK İNCELENMESİ VE TESPİT EDİLEN DEĞİŞİKLİKLERİN
VALİDASYONU**

FATMA YEŞİM KESİM

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL AYLİN UĞUR İŞERİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

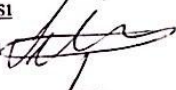

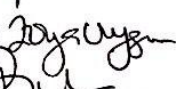


İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Yüksek Lisans Programında Fatma Yeşim KESİM tarafından hazırlanan İnsan Genomundaki Kopya Sayısı Değişikliklerinin SNP Array Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi ve Tespit Edilen Değişikliklerin Validasyonu başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

07 / 07 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Doç. Dr. Sibel A. UĞUR İŞERİ	I.Ü. Deneysel Tıp Arş. Enst. Genetik Anabilim Dalı 
2.Prof. Dr. Uğur ÖZBEK	I.Ü. Deneysel Tıp Arş. Enst. Genetik Anabilim Dalı 
3.Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ	I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D. 
4.Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER	I.Ü. İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 
5.Doç. Dr. Burçak VURAL	I.Ü. Deneysel Tıp Arş. Enst. Genetik Anabilim Dalı 

BEYAN

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

Fatma Yeşim Kesim



İTHAF

Anneme ve babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde eğitimime en çok katkıda bulunan, üstün deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman anlayışlı ve destek olan tavrı ile yanımda olan çok değer verdiğim ve çalışmaktan mutluluk duyduğum danışmanım Sayın Doç. Dr. Sibel Aylin Uğur İşeri'ye;

Çalışma koşul ve imkanlarını sağlayan enstitü müdürümüz ve hocamız Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek' e;

Tezimin klinik incelemelerinde bana yol gösteren ve yardım eden Sayın Prof. Dr. Beyhan Tüysüz' e;

İlk geldiğim günden beri öğrenme sürecime her aşamada en çok katkıda bulunan insanlardan biri olan, esprili kişiliği, yardımseverliği ile her zaman yanımda olan ve kendisiyle çalışmaktan hiç sıkılmadığım Uzm.Tbb. Bio. Emrah Yücesan' a;

Her sıkıştığım anda işini bırakıp yardımına koşan, çözüme yönelik tavrı ve gülyeryüzlülüğü ile bana destek olan Uzm. Bio. Özkan Özdemir' e;

Enstitüye geldiğimde ekipten tanıştığım ilk insan, neşeli ve esprili tavrı ile çalışma ortamına renk katan ve yüksek lisans sürecinde bana yardımcı olan Uzm. Mol. Bio. Feyza Nur Tuncer' e;

Tez yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve sorularımı cevapsız bırakmayan Uzm. Tbb. Bio. Yücel Erbilgin' e;

Tez süreci boyunca her daim destekçim olan Elçin Şehitoğlu' na,

DETAE Genetik Anabilim Dalı' nda bana destek olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

En çok da bana tüm sevgisini veren her zaman yanımda olan ve bana inanan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 43975 ve ÖNAP Projesi No: 11021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kopya Sayısı Değişiklikleri (Copy Number Variations, CNVs).....	2
2.1.1. Array Sistemleri	3
2.1.2. Tüm Genom SNP-Array Verisi ile CNV Analizi	4
2.2. İzokromozom 18p	5
2.3. Multipl Konjenital Anomaliler ve Mental Retardasyon ve CNV İlişkisi	5
2.4. Tespit Edilen CNV Bölgeleri için Validasyon Çalışması.....	6
2.4.1. Floresans In- Situ Hibridizasyon.....	7
2.4.2. MLPA (Çoklu Prob Ligasyon Bağımlı Amplifikasyon).....	7
2.4.3. Uzun PZR (Uzun Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	7
2.4.4. Gerçek Zamanlı-qPZR (Gerçek Zamanlı Kantitatif- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	7
2.4.5. Gerçek Zamanlı-qPZR ile Validasyon Çalışması	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1. GEREÇ	9
3.1.1. Çalışmaya Katılan Bireyler	9
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	11
3.1.3. Kullanılan Kitler	11
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	12

3.1.5. Kullanılan Elektronik Veritabanları.....	13
3.1.6. Kullanılan Analiz Programları.....	14
3.2. YÖNTEM.....	14
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	14
3.2.2. DNA Kalite Kontrol Aşamaları.....	17
3.2.3. Tüm Genom SNP-Array Uygulaması.....	17
3.2.4. SNP-Array Verisinde Biyoinformatik Analizler.....	19
3.2.5. Trizomi 21 Ebeveyn Etkisi Tespiti Analizi.....	21
3.2.5.1. Ebeveyn Etkisi Tespiti Analizi.....	21
3.2.6. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı-qPZR).....	22
3.2.6.1. Gerçek Zamanlı-qPZR Primerleri ve Optimizasyon Koşulları.....	22
3.2.6.2. Primerler için Optimizasyon Çalışması.....	22
3.2.6.3. PZR Verim Hesaplanması.....	23
3.2.6.4. Gerçek Zamanlı-qPZR' de Rölatif Kantifikasyon Analizi.....	24
3.2.7. Gerçek Zamanlı-qPZR ile X kromozomu Kopya Sayısının Tespiti.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Tüm Genom SNP- Array Uygulaması Sonuçları.....	26
4.2. CNV Analiz Sonuçları.....	26
4.2.1. H1 (E12-34) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları.....	27
4.2.1.1 H1 Kodlu Bireyde Trizomi 21 İçin Ebeveyn Etkisinin Tespiti.....	29
4.2.2 H2 (05-204) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları.....	30
4.2.3. H3 (11-672) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları.....	35
4.2.4. H4 (12-600) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları.....	41
4.2.5. H5 (12-639) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları.....	47
4.2.6. H6 (12-623) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları.....	54
4.2.7. H7 (13-334) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları.....	55
4.2.8. H8 (13-440) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları.....	56
4.2.9. H9 (13-445) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları.....	57
4.2.10. H10 (13-457) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları.....	58
4.3 Validasyon Sonuçları.....	59
4.3.1. Gradient-PZR ile Yapılan Optimizasyon Çalışması Sonuçları.....	60
4.3.1.1. <i>RBMXL</i> ve <i>KIF1C</i> Genleri Optimizasyon Çalışması Sonuçları.....	60

4.3.1.2. H2 Kodlu Bireyde Validasyon için Seçilen <i>CLDN1</i> Geni Optimizasyon Çalışması Sonuçları.....	61
4.3.1.3. H4 Kodlu Bireyde Validasyon için Seçilen <i>FBLN7</i> Geni Optimizasyon Çalışması Sonuçları.....	62
4.3.1.4. H4 Kodlu Bireyde Validasyon için Seçilen <i>TRPM2</i> Geni Optimizasyon Çalışması Sonuçları.....	62
4.3.2. Gerçek Zamanlı-qPZR Sonuçları.....	63
4.3.2.1.PZR Verimi Çalışması Sonuçları	63
4.3.2.2. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile X kromozomu CNV Tespiti Sonuçları	65
4.3.2.3. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile H2 Kodlu Bireyde Seçilen <i>CLDN1</i> Geni Validasyon Çalışması Sonuçları	66
4.3.2.4. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile H4 Kodlu Bireyde <i>TRPM2</i> İnsersiyon Validasyonu.....	67
4.3.2.5. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile H4 Kodlu Bireyde <i>FBLN7</i> Delesyonu Validasyonu.....	70
4.3.3. Erime Eğrisi Analizleri	71
5. TARTIŞMA	73
KAYNAKLAR	80
FORMLAR	86
ETİK KURUL KARARI	88
ÖZGEÇMİŞ	90

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: MKA/MR ile İlişkisi Tespit Edilmiş CNV Bölgelerinin Bir Kısmı	6
Tablo 3-1: Çalışmaya Dahil Edilen Bireyler ve Bilgileri	10
Tablo 3-2: Manuel DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve İçerikleri	11
Tablo 3-3 Çalışmada Kullanılan Ticari Kitler ve Kullanım Amaçları	11
Tablo 3-4: Kullanılan Cihazların Listesi ve Bilgileri	12
Tablo 3-5: Kullanılan Veritabanlarının Listesi	13
Tablo 3-6: Kullanılan Analiz Programlarının Listesi	14
Tablo 3-7: GenomeStudio Programına Tanıtılan Örnek Dosya Görüntüsü	19
Tablo 3-8: cnvPartition Eklentisi ile Yapılan Bir Raporlama Örneği	21
Tablo 3-9 Çalışmada Kullanılan Primerler ve Özellikleri	22
Tablo 4-1: Tüm Genom SNP-Array Uygulaması Kalite Kontrol Sonuçları	26
Tablo 4-2: H1 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu	29
Tablo 4-3: H1 Bireyinde 11 SNP' ye Ait BAF Değerleri ve Belirlenen Genotipler	29
Tablo 4-4: Anne baba trizomili birey ve iki kardeşinde hesaplanan genotipler	30
Tablo 4-5: H2 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu	32
Tablo 4-6: H2 Bireyinde 3.Kromozomda Bulunan Delesyon Bölgesi İçerisindeki Genler	32
Tablo 4-7: H2 Kodlu Bireyde 12.Kromozomdaki Delesyon Bölgesindeki Genler	34
Tablo 4-8: H3 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu	36
Tablo 4-9: H3 Kodlu Bireyde 9.Kromozomda Bulunan Delesyon Bölgesindeki Genler	37
Tablo 4-10: H4 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu	43
Tablo 4-11: H4 Bireyinde 2. Kromozomdaki Delesyon Bölgesindeki Genler	43
Tablo 4-12: H4 Kodlu Bireyde 21.Kromozomdaki İnsersiyon Bölgesindeki Genler	46
Tablo 4-13: H5 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu	48
Tablo 4-14: H5 Kodlu Bireyde 2.Kromozomdaki İnsersiyon Bölgesindeki Genler	49
Tablo 4-15: H6 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu	55
Tablo 4-16: H Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu	56
Tablo 4-17: H8 Kodlu Bireyin CNV Analiz Raporu	57
Tablo 4-18: H9 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu	58

Tablo 4-19:H9 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu	59
Tablo 4-20: Validasyon için Seçilen Bireyler ve Genler	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Gerçek zamanlı-qPZR ile Kantifikasyon Yöntemlerine Ait Akış Şeması	8
Şekil 3-1 Manuel DNA İzolasyonu İş Akış Şeması	15
Şekil 3-2: Roche maksı kit (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche) İş Akışı	16
Şekil 3-3: DNA Kalitesine Örnek Jel Görüntüsü.....	17
Şekil 3-4: Illumina Human CytoSNP 12-BeadChip Kitine Ait İş Akış Şeması.....	18
Şekil 3-5: 3q28 Bölgesinde Kayıp Olan Bir Hastaya Ait Veri Görüntüsü	20
Şekil 3-6: Bir Optimizasyon Çalışması Sonucu Jel Görüntüsü	23
Şekil 4-1: H1 Bireyine Ait Trizomi 21 Veri Görüntüsü	27
Şekil 4-2: H1 (E12-34) ‘ in Annesine Ait 21.Kromozom Veri Görüntüsü.....	28
Şekil 4-3: H1 (E12-34) ‘ in Babasına Ait 21. Kromozom Veri Görüntüsü.....	28
Şekil 4-4: H2 Kodlu Bireyde 3.Kromozomda Bulunan Delesyona Ait GenomeStudio Görüntüsü.....	31
Şekil 4-5:H2 Kodlu Bireyde 12.Kromozomda Bulunan Delesyona Ait GenomeStudio Görüntüsü.....	31
Şekil 4-6: H3 Kodlu Bireyde 9.Kromozomdaki Delesyona ait GenomeStudio Veri Görüntüsü.....	36
Şekil 4-7: H4 Bireyinde Tespit Edilen 2. Kromozomdaki Delesyona Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü	42
Şekil 4-8: H4 Bireyinde Tespit Edilen 21. Kromozomdaki İnsersiyona Ait GenomeStudio Görüntüsü.....	42
Şekil 4-9: H5 Kodlu Bireyde Tespit Edilen 2.Kromozomdaki Delesyona Ait GenomeStudio Görüntüsü.....	47
Şekil 4-10: H5 Kodlu Bireyde Tespit Edilen 3.Kromozomdaki İnsersiyona Ait GenomeStudio Görüntüsü.....	48
Şekil 4-11: H6 Kodlu Bireyde 21.Kromozomda Tespit Edilen Parsiyel Trizomi Verisi	54
Şekil 4-12: H7 Kodlu Bireyde 18. Kromozoma Ait Veri Görüntüsü	55
Şekil 4-13: H8 Kodlu Birey 18. Kromozoma Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü	56
Şekil 4-14: H9 Kodlu Birey 18. Kromozoma Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü.....	57
Şekil 4-15: H10 Kodlu Birey 18. Kromozoma Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü.....	58

Şekil 4-16: <i>RBMXL</i> ve <i>KIF1C</i> Geni için Yapılan Optimizasyon Sonuçları.....	61
Şekil 4-17: <i>CLDN1</i> Geni için Yapılan Optimizasyon Deneş Sonucu	61
Şekil 4-18: <i>FBLN7</i> Geni için Yapılan Optimizasyon Deneş Sonucu.....	62
Şekil 4-19: <i>TRPM2</i> Geni için Yapılan Optimizasyon Deneş Sonucu	62
Şekil 4-20: <i>KIF1C</i> Geni için PZR Verim Çalışması Sonucu.....	63
Şekil 4-21: <i>CLDN1</i> Geni için PZR Verim Çalışması Sonucu	64
Şekil 4-22: <i>RBMXL</i> Geni için PZR Verim Çalışması Sonucu	64
Şekil 4-23: X Kromozomu CNV Tespiti Sonuçları.....	65
Şekil 4-24: <i>CLDN1</i> Geni için Validasyon Sonuçları	66
Şekil 4-25: <i>CLDN1</i> Geni Validasyon Sonuçlarının Gruplandırılarak İncelenmesi.....	67
Şekil 4-26: <i>TRPM2</i> Geni için Validasyon Sonuçları	67
Şekil 4-27: <i>TRPM2</i> Geni Validasyon Sonuçlarının Gruplandırılarak İncelenmesi.....	68
Şekil 4-28: <i>TRPM2</i> Geni Kopya Sayısı Değişimi 2. Analizi.....	69
Şekil 4-29: <i>TRPM2</i> Geni Validasyonu 2. Analizi.....	69
Şekil 4-30: <i>FBLN7</i> Geni için Validasyon Sonuçları.....	70
Şekil 4-31: <i>FBLN7</i> Geni Validasyon Sonuçlarının Gruplandırılarak İncelenmesi.....	71
Şekil 4-32: H2 Kodlu Bireye Ait Erime Eğrisi Grafiği	71
Şekil 4-33: H4 Kodlu Bireye Ait Erime Eğrisi Grafiği	72

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH: Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

BAF: B Allel Frekansı

CB: Chromosome Browser

CNV: Kopya Sayısı Değişikliği

DNA: Deoksiribonükleik asit

FISH: Floresans In Situ Hibridizasyon

KHLÇ: Kırmızı Hücre Lizis Çözeltisi

LOH: Loss of Heterozygosity (Heterozigote Kaybı)

LRR: Log R Değeri

Mb: Megabaz

MKA: Multipl Konjental Anomaliler

MLPA: Multipleks ligasyon esaslı prob amplifikasyonu

MR: Mental Retardasyon

NLÇ: Nükleus Lizis Çözeltisi

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SNP-Array: Tek Nükleotid Polimorfizm Array

qPZR: Kantitatif- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Kesim, F.Y. (2014). İnsan Genomundaki Kopya Sayısı Değişikliklerinin SNP-Array Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi ve Tespit Edilen Değişikliklerin Validasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kopya sayısı değişiklikleri (CNVs), insan genomunda referans genoma kıyasla DNA segmentlerinde kayıp ve kazançlarla ifade edilen boyutu 1 kilobazdan büyük genomik yeniden düzenlenmelerdir. Bu çalışmada tüm genom yüksek çözünürlüklü SNP-Array teknolojisi kullanılarak Down Sendromlu 2 ve mental retardasyon ve multipl doğumsal (MKA/MR) anomalilere sahip 8 vakada CNV bölgeleri tespit edilmiştir. Tespit edilen CNV bölgelerinin gerektiğinde Gerçek Zamanlı-qPZR ile rölatif kantifikasyon yaklaşımı kullanılarak validasyonu yapılmıştır. qPZR yaklaşımının optimizasyonu erkek ve kadınlardan oluşan bir sette X kromozomu kopya sayıları karşılaştırılarak yapılmıştır. Down Sendromlu olan ilk vakanın SNP-Array verisi Trizomi 21' in kaynaklandığı ebeveyni belirlemek amacıyla aile bireyleriyle birlikte değerlendirilmiştir. Trizomilerde ebeveyn etkisini belirlemeye yönelik genotip tabanlı yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Ek olarak, Down Sendromlu olan ikinci vakada Down Sendromu kritik bölgeyi içermeyen parsiyel trizomi tespit edilmiştir. Nefrokalsinozisi olan bir vakanın CNV bölgesinde Hiperoksilüri Tip 1' de ifadesi olan *AGTX* geninin bulunması dikkate değerdir. Kalan 4 MKA/MR vakasının hepsinde 18p bölgesinin izokromozom 18p ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve SNP-Array verisi tetrazominin mayotik zamanlamasının tespiti için kullanılmıştır. Bu çalışma çeşitli konjenital hastalıklarda CNV bölgelerinin patolojik rolünün tespitine yönelik bir model sunmaktadır. SNP-Arraylerin çok yönlülüğü ile ebeveyn etkisi, tetrazomilerde mayotik zamanlamayı da içeren CNV mekanizmalarına cevap sağlamak amacıyla bu çalışmada sinyal yoğunlukları ve genotip verileri kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler : SNP Array, Kopya Sayısı Değişikliği, Multipl Konjenital Anomalier/ Mental Retardasyon, Gerçek Zamanlı- qPZR, Biyoinformatik Analiz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 43975 ve ÖNAP Projesi No: 11021

ABSTRACT

Kesim, F.Y. (2014). Copy Number Variation Detection In The Human Genome With Using SNP Array Method and Validation of Detected Variations.

İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department/ Genetics Programme. İstanbul.2014

Copy number variations (CNVs) are chromosomal aberrations that are characterized by extra or missing copies of DNA segments. In this study, high resolution SNP-Array technology has been used to detect CNVs in 2 cases with Down Syndrome and 8 cases ID/MCA. Detected CNV regions have been validated with Real Time qPCR (quantitative Polimerase Chain Reaction) using relative quantification approach whenever required. The optimization of qPCR approach was done in a set of males and females, where X-chromosome copy numbers were compared. SNP-Array data of the first case with DS was interpreted along with her parents in order to detect the parent where her trisomy has originated. We present an effective genotype based novel approach for detecting parent of origin effect in trisomies. In addition, in the second case with DS we have detected partial trisomy 21 without the DS critical region. It is remarkable to note that *AGTX* gene implicated in Hyperoxsaluria Type 1 lies within the CNV region of one of the cases with nephrocalcinosis. The remaining 4 MCA/ID cases were all shown to have 18p associated with isochromosome 18p, where SNP Array data was used to detect meiotic timing of the tetrasomy. This study serves as a model for detecting CNV regions in various congenital disorders in order to understand pathologic role of CNVs. Versatility of SNP-arrays which permits interpretation of both signal intensity and genotyping data have also been used extensively in this study in order to provide answers to CNV mechanisms including parent of origin effect in trisomies and meiotic timing in tetrasomies.

Key Words: : SNP Array, Copy Number Variations, Multiple Congenital Anomalies/ Intellectual Disability, Real Time- qPCR, Bioinformatic Analysis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 43975 and ONAP Project No: 11021

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan genomundaki kopya sayısı değişiklikleri (Copy Number Variation; CNV) DNA segmentlerinde kayıp ve kazançlarla ifade edilen genomik yeniden düzenlenmelerdir. CNV' ler tandem bir duplikasyon gibi yapısal olarak basit bir şekilde ortaya çıkabilecekleri gibi büyük kompleks kayıp ve kazançlar olarak da genomda gözlenebilirler (1), (2). CNV' ler hastalıklarla ilişkili olabildikleri gibi toplumda sık görülen ancak patolojik olmayan varyantlar olarak da genomda yer alırlar (3). Uzun süre CNV' lerin insan genomundaki varyasyonların çok küçük bir oranını temsil ettiği düşünüldüğünden önemi anlaşılamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla CNV' lerin birçok kompleks hastalıkla ve hastalıklara yatkınlıkla olan ilişkisinin saptanmasıyla birlikte bu konuda yapılan çalışmalar artmıştır (4), (5).

CNV' ler birçok hastalık ve fenotiple ilişkilendirildiği gibi etiyolojik heterojeniteye sahip multipl konjenital anomalilerde (MKA) ve mental retardasyonda (MR) da rolü olabileceği gösterilmiştir (6-8).

Günümüzde CNV' leri de içeren birçok kromozomal aberasyon yüksek çözünürlüğe sahip tüm genom teknolojileri ile tespit edilebilmektedir. Bu teknolojilerden biri de Tek Nükleotit Polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) Array yöntemidir. CNV tespiti duyarlı bir yöntem olan SNP-Array ile etkin ve doğru bir şekilde yapılabilmektedir. SNP-Array hem yüksek çözünürlüğe sahip oluşu hem de birçok parametreyi birlikte incelemeyi sağlamasından dolayı avantajlı bir yöntemdir (9).

Çalışmada 2 Down Sendromlu ve 8 MKA/MR' li bireyin CNV açısından değerlendirilmesi ve tespit edilen CNV bölgelerinin Gerçek Zamanlı-qPZR ile validasyonunun yapılması planlanmıştır.

CNV bölgelerinin tespit edilmesi hangi değişimlerin hastalığa ve hastalığa yatkınlığa sebep olduğunun belirlenmesi ve bireyler arasındaki genetik çeşitliliğin aydınlatılması açısından önemlidir. Ayrıca çalışmada SNP-Array yönteminin çok yönlü özelliğinden faydalanılarak trizomilerin parental kaynağını tespit etmeye yönelik alternatif bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kopya Sayısı Değişiklikleri (Copy Number Variations, CNVs)

İnsan genomu 3.2 milyar baz çifti uzunluğunda yaklaşık 24.000 protein kodlayan gen, 2.9 milyon düzenleyici bölge içeren kompleks bir yapıdır (10), (11). İnsan genomundaki CNV' ler DNA segmentlerinde kayıp ve kazançlarla ifade edilen genomik yeniden düzenlenmelerdir (1,2). Uzunca bir süre CNV' lerin insan genomundaki varyasyonların çok küçük bir kısmını temsil ettiği düşünüldüğünden önemi anlaşılammıştır (12-14). CNV' ler hastalıklarla ilişkili olabildikleri gibi toplumda sık görülen ancak patolojik olmayan varyantlar olarak da genomda yer alabilirler (1), (15-18). Bugüne kadar Multipl Konjenital Anomaliler (19-21), Mental Retardasyon (22-25), Epilepsi (26-29), Otizm (30-33), Nöroblastoma (34-37), AIDS (Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu) (5, 38) gibi bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

Günümüzde CNV' leri de içeren birçok kromozomal aberasyon yüksek çözünürlüğe sahip tüm genom teknolojilerinden Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (Array Comparative Genomic Hybridization; aCGH) ve Tek Nükleotit Polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) array yöntemleri ile tespit edilebilmektedir (39-41).

SNP Array' leri avantajlı kılan özellik kullanıcıya 2 basamaklı analiz imkanı sağlamasıdır. İlk basamakta DNA' nın taşıdığı SNP alleli ile uyumlu prob dizisine bağlanması ve tek baz uzama prensibine dayalı uygulamasıyla allel dağılımının tespiti yapılır. Analize ekstra bir boyut veren diğer bir parametre de B Allel Frekansısıdır (BAF). Her bir SNP' ye ait 2 allel baz yapısı ne olursa olsun A ve/veya B allel frekansını cinsinden ifade edilir. Böylece heterozigot olan (AB) ve olmayan (Loss of Heterozygosity, LOH; AA veya BB) bölgeleri belirlenebilir. İkinci basamakta ise, hasta bireylerin hedef sinyal yoğunlukları referans sinyal yoğunlukları ile karşılaştırılarak her bir SNP ile ilişkili bir de CNV değeri elde edilir. CNV değeri için kullanılan sinyal yoğunluğu Log R kesiri (Log R Ratio; LRR) ile ifade edilir ve bu değer toplam sinyal yoğunluğunun normalize bir ölçütüdür. CNV normalizasyonu aCGH' teki gibi 2 farklı örneğin array öncesi karıştırılıp, analiz edilmesi ile değil, çalışılan tek bir örneğin belirli sayıda farklı örnek ile bilgisayar ortamında karşılaştırılması ile yapılır. Elde edilen CNV

değeri sayesinde LOH bölgelerinin gerçek homozigotluğu mu yoksa bir delesyon kaynaklı allel kaybı mı olduğu anlaşılabilir. BAF ve CNV değerlerini bir arada kullanmak, düşük seviyede mozaiklik hakkında da bilgi verebilir (8). Sonuç olarak SNP-Array ile genomdaki kopya sayısı değişiklikleri hem BAF hem de LRR birlikte değerlendirilerek incelenmektedir. Array çalışmalarında unutulmaması gereken önemli bir nokta da hastalıkla ilişkili bir CNV tespit edilemediği durumlarda hastalığın kaynağının tek noktada oluşan mutasyonlar, küçük indeller, instabil tekrarlar veya CNV analizi için kullanılan eşik değerinden daha küçük boyutta CNV' ler de olabileceğidir.

2.1.1. Array Sistemleri

Kromozomal aberasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri çok çeşitli klinik fenotiplerden sorumlu olabilmektedir. Bunların tespiti klasik karyotipleme ile yapılabilmekte ancak rezolüsyonu 5-10 Mb ile sınırlı olmaktadır. Moleküler karyotipleme olarak da bilinen tüm genom array sistemlerinin geliştirilmesi ile kromozomal aberasyonlar daha yüksek çözünürlükte tespit edilebilmektedir. Mikroarrayler ile CNV tespiti ilk olarak array temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem CGH- Array ve Mikroarray olarak da adlandırılmaktadır. aCGH ile genomdaki kopya sayısı değişiklikleri incelenebilmektedir. aCGH yönteminin temeli hasta ve referans DNA örneğinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Farklı floresans boya ile boyanmış hasta ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresans renk farklılıkları ile kromozomlardaki kayıp ve kazanç olan bölgeler tespit edilebilmektedir. Rölatif floresans yoğunlukları hesaplanarak bireylerin genomlarındaki kromozomal bölgeler sarı ile ifade edilir ancak kayıp olan bölgeler yeşil kazanç olan bölgeler ise kırmızı renkte görülmektedir. Diğer bir array yöntemi ise ailesel ve bireysel olgularda bağlantı ve ilişkilendirme çalışmaları için kullanılan SNP- Array' dir. Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri hem genotipleme çalışmaları hem de kopya sayısı değişikliklerinin analiz edilmesini sağlamasıdır. SNP arraylerin çok yönlü özelliği sayesinde hasta bireylerin hedef sinyal yoğunlukları referans sinyal yoğunlukları ile karşılaştırılarak her SNP bölgesi için allel dağılımının yanı sıra bir de CNV değeri elde edilir. Böylece aCGH'de olduğu gibi genomda kayıp ve kazanç olan bölgeler tespit edilebilir. Yeni nesil SNP arraylerde genom boyunca yayılmış SNP'lerin yanısıra çeşitli

hastalıklarla ilişkilendirilmiş CNV bölgelerine özel problemler yer alır. Bu problemler yardımıyla CNV tespiti daha da gelişmiştir. SNP arraylerde genotip bilgisi CNV harici kromozomal varyasyonların da açığa çıkarılması için kullanılabilir. SNP arraylerde CNV olmaksızın kaydedilen LOH (Loss of Heterozygosity, Heterozigote Kaybı) durumu homozigot bölgeleri ve üniparental disomiye işaret edebilir. Artmış homozigotluk hastalığın kaynağı olarak çekinik geçiş gösteren bir gen bölgesini işaret edebilir. Üniparental isodisomi durumunda ise SNP arrayler ile tek bireyde tespit edilebilirken, üniparental heterodisominin tespiti için ebeveynlerin de örneğine ihtiyaç vardır. SNP- Array yöntemi genotip bilgisi, sinyal yoğunluğu ve heterozigote kaybı bölgelerinin belirlenebilmesini sağlamasıyla diğer yöntemlere göre çok daha avantajlıdır. Ancak array sistemleri genel olarak dengeli translokasyonları tespit edememektedir.

2.1.2. Tüm Genom SNP-Array Verisi ile CNV Analizi

Yüksek çözünürlükteki array teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte CNV tespiti daha kolay hale gelmiştir. Bunun için dizayn edilen tüm genom SNP çipleri bulunmaktadır. Bu çipler ile 300 bin SNP belirteciden 5 milyon SNP belirteciye kadar genotipleme yapılabilmektedir. Gün geçtikçe daha çok SNP belirteci içeren daha duyarlı çipler geliştirilmektedir. 300 bin belirteç içeren çipteki prob aralığı ortalama 10 kb olarak hesaplanır ve genoma yayılmış 220.000 adet belirteci içerir. Bu belirteçler arasında 200.000 polimorfik tagSNP ile sadece CNV değeri veren bilinen sitogenetik anomalilere özgü 250 adet ve hastalıkla ilişkili genleri hedefleyen 400 adet prob sayılabilir. Bu çip 12 örneğin birden çalışılabilmesine olanak sağlamaktadır. SNP-Array genotipleme verisi analizi iki parametre kullanılarak yapılır. Bunlardan ilki allelik bileşimi temsil eden BAF' tır. BAF değeri her belirteç için hesaplanan, o belirteç için çipten okunan B alleli sayısının toplam yapılan okumaya oranıdır. Yani BB genotipine sahip bir belirteç için BAF değeri 1, AB genotipi için BAF değeri 0,5, AA genotipi için ise 0 olacaktır. Diğer analiz parametresi ise toplam sinyal yoğunluğu ile ilişkili olan LRR' dir. Sıfır civarında bir LRR değeri normaldir ve sıfırdan sapması CNV olabileceğini gösterir.

2.2. İzokromozom 18p

İzokromozom, kromozomun bir kolunun kaybı ve onun yerine diğer kolun duplikasyonu ile oluşmaktadır (42). İzokromozom sendromlarının arasında en sık görüleni 18p izokromozom sendromudur (43). Klinik olarak spesifik olmayan bulgular ile karakterizedir. Bu bulgular arasında düşük doğum ağırlığı, mikrosefali, şaşılık, kas anormallikleri ve ek olarak beslenme güçlüğü ve büyüme gerilikleri görülebilmektedir (44,45). Canlı doğumda 1/140.000-180.000 sıklıkla görülen ve her iki cinsiyeti de eşit oranda etkileyen nadir kromozomal bir hastalıktır (46). Tetrazomilerde değişik oranlarda mozaiklik de bulunmaktadır (47).

İzokromozom 18p karyotip analizi ve FISH (Floresan İn Situ Hibridizasyon) yöntemi kullanılarak tespit edilebilmektedir. Ancak yüksek çözünürlükteki SNP-Array yöntemi mozaiklik açısından da fikir verdiği için daha duyarlı ve avantajlıdır.

2.3. Multipl Konjenital Anomaliler ve Mental Retardasyon ve CNV İlişkisi

Mental retardasyon (MR), toplumun %1-3' ünü etkileyen ve bireyin hayatı boyunca süren bir durumdur (47). Literatürde mental retardasyon olarak da geçmekte ancak zihinsel yetmezlik olarak da kullanılmaktadır. Zihinsel yetmezlik, günlük aktivite ve pratik becerileri içeren, zihinsel fonksiyonların ve uyum davranışlarında kısıtlılıklar ile karakterize olan ve 18 yaş öncesi başlayan bir durumdur. Öğrenme ve iletişim güçlüğü ile kendini gösterir. MR tek başına görülebildiği gibi multipl konjenital anomaliler (MKA) ile birlikte de görülebilir. MR' nin birçok sebebi olabilir ancak genetik nedenler bunların arasında büyük bir yer kaplamaktadır. Başta kromozomal anomaliler olmak üzere tek gen hastalıkları ve mitokondriyal hastalıklar da dahil olmak üzere birçok genetik hastalık grubu MR ile ilişkilendirilmiştir (49). MR tespitinde klasik karyotip analizi önemli bir yer tutmaktadır ancak yapılan çalışmalarda sitogenetik analizi normal olarak değerlendirilse de MR' si olan olguların %10' unda yüksek çözünürlüklü array yöntemleri kullanılarak anomali tespit edildiği bildirilmiştir (39). MKA/MR bulguları ya da yalnızca biri olan bireylerde yapılan SNP-Array çalışmalarında şimdiye kadar birçok CNV bölgesi tespit edilmiştir. Aşağıdaki Tablo 2-

1' de şimdiye kadar MKA/MR bulguları olan bireylerde tespit edilmiş CNV bölgelerinin bir kısmı gösterilmiştir.

Tablo 2-1: MKA/MR ile İlişkisi Tespit Edilmiş CNV Bölgelerinin Bir Kısmı

Yazar	Pozisyon	Orijin	Fenotip
(Männik et al., 2011) (6)	2p25.1	Maternal	Ağır MR, dismorfik bulgular, epilepsi
(Männik et al., 2011) (6)	7q11.23	Paternal	Ağır MR, dismorfik bulgular, konuşma bozukluğu
(Mullen et al., 2013) (50)	1p34.3	Maternal değil	Orta MR
(Männik et al., 2011) (6)	16p11.2	De novo (mat)	Hafif MR, konuşma geriliği
(Männik et al., 2011) (6)	22q31.13	Maternal	Ağır MR, epilepsi, makrosefali
(Mullen et al., 2013) (50)	9q22.1	Paternal	Orta MR
(Isrie et al., 2012) (51)	Xp22.31	Bilinmiyor.	Ağır MR, konuşma yok, dismorfik bulgular

2.4. Tespit Edilen CNV Bölgeleri için Validasyon Çalışması

SNP-Array verisinde tespit edilen CNV bölgelerinin validasyonu çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Kullanılacak yöntem CNV bölgesinin yapısı, boyutu gibi özellikleri göz önünde bulundurularak seçilir. Alternatif validasyon yöntemleri FISH, MLPA (Çoklu Prob Ligasyon Bağımlı Amplifikasyon), Uzun PZR (Uzun Polimeraz Zincir Reaksiyonu), Gerçek Zamanlı-qPZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) vb. tekniklerdir.

2.4.1. Floresans In- Situ Hibridizasyon

Kromozomların belli bölgelerine özgün DNA/RNA dizilerinin enzimatik yolla floresans ışına veren maddelerle işaretlenerek hedef DNA/Bölge ile hibrit oluşturması ve bu hibrit sinyallerin uygun filtreler aracılığı ile mikroskopta görüntülenmesi esasına dayanır. İşlem sırasıyla; preparatların hazırlanması, ön yıkama, prob ve hedef DNA' nın denaturasyonu, hibridizasyon, hibridizasyon sonrası yıkamalar, immunolojik görüntüleme, mikroskop aşaması ve yorumlama şeklindedir.

2.4.2. MLPA (Çoklu Prob Ligasyon Bağımlı Amplifikasyon)

DNA veya RNA dizilerindeki küçük kopya sayısı değişimlerinin multiplex taranmasını sağlar. FISH' e göre multiplex olması ve 50-70 nükleotidlerin incelenebilmesi avantajdır. Bir MLPA probu iki oligonükleotid prob içerir. Eğer örnek DNA içinde hedef dizi varsa iki prob bu DNA' ya bağlanır. Hibridize olmuş prob ligasyon ile birleştirilir. Ligasyonu tamamlanan prob multiplex PZR ile amplifiye edilir. Hedef nükleik asit yerine eklenen MLPA probu amplifiye olur. Her bir prob için özgün uzunlukta ampikon elde edilir. Örnekte DNA içindeki her bir hedef dizinin elde edilen ampikonlarının miktarları karşılaştırılır, veri analizi yapılır.

2.4.3. Uzun PZR (Uzun Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

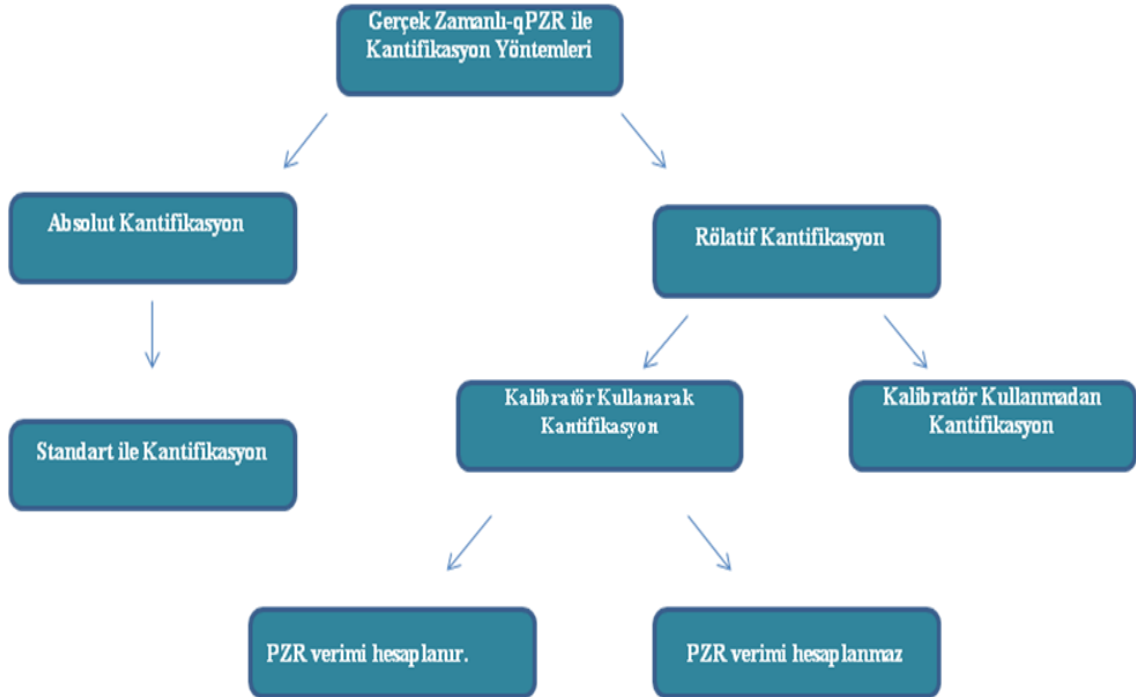
PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) , genomik DNA' daki özgül bölgelerin amplifikasyonunu sağlayan basit ama başarılı bir *in vitro* DNA sentez yöntemidir. PZR; DNA molekülünün milyonlarca kopyasını kısa zamanda yapabilen bir tekniktir. PZR prensibi denaturasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır. Denaturasyon aşamasında çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta tek zincirli haline gelmesi gerçekleşir. Ardından primerler uygun sıcaklıkta hedef bölgelere bağlanır ve uzama gerçekleşir. Uzun PZR ile sadece delesyon bölgeleri incelenebilir. 40 kb'a kadar olan bölgelerin tespiti yapılabilmektedir. Uzun PZR sonrası elde edilen ürün dizilenecek delesyonun kırık noktaları tam olarak tespit edilebilir.

2.4.4. Gerçek Zamanlı-qPZR (Gerçek Zamanlı Kantitatif- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Gerçek zamanlı PZR ile her döngü sonucu elde edilen ürün miktarı floresans boyalarla gerçek zamanlı olarak ölçülebilmekte ve kantitatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu kantitatif sonuçların analizi rölatif ve mutlak kantifikasyon analiz yaklaşımlarından uygun olan seçilerek analiz edilebilmektedir.

2.4.5. Gerçek Zamanlı-qPZR ile Validasyon Çalışması

Gerçek Zamanlı-qPZR ile yapılan validasyon sonrası elde edilen kantitatif sonuçların analizi için iki farklı metod bulunmaktadır. Bunlardan ilki absolut kantifikasyon yöntemidir ve bu yöntemde mutlaka konsantrasyonu bilinen bir standarda ihtiyaç vardır. Rölatif kantifikasyon metodunda ise standarda gerek olmadan hedef ve referans örneklerin karşılaştırılması yapılabilir (52). Şekil 2-1' de süreci açıklayan bir akış şeması verilmiştir.



Şekil 2-1: Gerçek zamanlı-qPZR ile Kantifikasyon Yöntemlerine Ait Akış Şeması

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmaya Katılan Bireyler

Çalışma kapsamında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Genetik Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Beyhan Tüysüz tarafından klinik değerlendirmesi yapılmış 9 olgu ile Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Nöroloji Bölümü'nde Doç. Dr. Mustafa Çalık tarafından değerlendirilen 1 olgu (Tablo 3-1) çalışmaya dahil edilmiştir. Harran Tıp Fakültesinde klinik değerlendirmeleri yapılan olgunun anne, baba ve iki kardeşi de analizlerin daha anlaşılır olması amacıyla değerlendirmeye alınmıştır. Ayrıca çalışmaya sağlıklı kontrol bankasından 3 erkek ve 3 kadın birey eklenmiştir. Bu bireylerin yaş, cinsiyet, hastalık öyküsü, sendrom tipleri, kullandığı ilaçlar, yapılan tetkiklerden elde edilen bulguları klinik değerlendirme formlarına kaydedilmiştir.

Çalışmaya katılan tüm bireylerden T.C. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 02.04.2014 tarihli 593 sayılı izni kapsamında yazılı bilgilendirilmiş onam formları alınmıştır. Her bir bireyden 5-10 ml periferik kan EDTA'lı tüpe alınıp +4°C buzdolabında saklanmış ve DNA eldesi manuel yöntem veya kit kullanılarak yapılmıştır. DNA materyali anonim olarak numaralandırılarak -20°C dondurucularda saklanmıştır. Örnek sahiplerine ait bilgiler ve analiz sonuçları ise bilgisayar ortamında şifre korumalı dosyalarda saklanmıştır.

Tablo 3-1: Çalışmaya Dahil Edilen Bireyler ve Bilgileri

ÖRNEK ADI	DOĞUM TARİHİ	CİNSİYET	BULGULAR
H1 (E12-34)	2010	K	Trizomi 21
H2 (05-204)	05.12.2005	E	(2. kuzen, 5. derece akrabalık), hafif motor gerilik ve atipik yüz (hipertelorizm, mikrognati, antimongoloid aks, solda dışa şaşılık), değişik dermatoglifler
H3 (11-672)	04.06.2005	K	Anne/baba 1.derece akraba, mental ve motor gerilik, atipik yüz (şaşılık, hipertelorizm, düz ve belirgin alın, eksik ve yanlış yerleşimli disklore dişler, pektus excavatus, boyun kısa, el parmakları ve 5.parmakta kamptodaktili, el ve ayakta değişik dermatogliflik görünüm, iskelet grafiplerinde alt servikal ve üst dorsal vertebralarda çok sayıda segmentasyon anomalisi ve çatal kosta görünümü
H4 (12-600)	05.10.2004	K	Akraba evliliği yok. Boy kısalığı, kemik yaşı geri, mavi sklera, hipertelorizm, bilateral hidronefroz, pektus excavatus, dirsek ve eller hiper mobil, cubitus valgus, sekundum atrial septal defekt (ASD) Turner düşünülmüş, Karyotip normal, İç genital organlar, Normal, IQ:85
H5 (12-639)	24.08.2011	E	Postnatal gerilik, yarı damak, üçgen yüz, klinodaktili, karyotip analizi t(2;3), nefrokalsinosis, OR Hiperoksalüri, MR, gelişim geriliği, hipospadias, inmemiş testis
H6 (12-623)	28.06.2012	K	Parsiyel Trizomi 21; hafif mongoloid aks, epikantus, hipertelorizm, IQ:93, Normal Boy, motor gelişim normal
H7 (13-334)	2013	K	At nalı böbrek; Sol gözde şaşılık, hipotelorizm, telekantus, malforme küçük kulak, uzun yüz
H8(13-440)	2009	K	Bilateral şaşılık, hipotelorizm, telekantus, palpebral fissür, malforme küçük kulak, uzun yüz, kısa omuz
H9(13-445)	2009	E	Anal Stenozis, sekundum ASD, sağ gözde şaşılık, sağ kulakta işitme kaybı, hipertelorizm, telekantus, malforme küçük kulak, uzun yüz
H10 (13-457)	2004	K	Sağ kulakta işitme kaybı, hipotelorizm, telekantus, malforme küçük kulak, uzun yüz, kısa omuz, hiperaktivite, dikkat eksikliği

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

Manuel DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler Tablo 3-2’ de verilmiştir.

Tablo 3-2: Manuel DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve İçerikleri

Çözelti Adı	İçerik ve Saklama Koşulu
1X Kırmızı Hücre Lizis Çözeltisi (KHLÇ), pH=7.1-7.4	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.5 M EDTA (pH=8), (dH ₂ O ile 1lt’ ye tamamlanır, otoklavlanır ve +4 °C’ de saklanır.)
Nükleus Lizis Çözeltisi (NLÇ), pH=8.2	10 ml Tris HCl, NaCl, 0.5 M EDTA (pH=8) (dH ₂ O ile 1lt’ ye tamamlanır, otoklavlanır ve +4 °C’ de saklanır)
NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ (Amonyum Asetat)	9.5 M (dH ₂ O ile 100 ml’ ye tamamlanır ve filtre ile sterilize edilir)
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	%10’ luk SDS (100 ml H ₂ O ile tamamlanır, oda sıcaklığında saklanır.)
EDTA (EtilenDiamin Tetraasetik Asit), pH=8	0.5M EDTA (Otoklavlanır, oda sıcaklığında saklanır.)

3.1.3. Kullanılan Kitler

Çalışmada kullanılan ticari kitlerin listesi kullanım amacı ve firma isimleri Tablo 3-3 ‘ te verilmiştir.

Tablo 3-3 Çalışmada Kullanılan Ticari Kitler ve Kullanım Amaçları

Kit Adı	Kullanım Amacı	Firma
Roche DNA Isolation Kit for Mammalian Blood	DNA İzolasyonu	Roche Diagnostics, Turkey
Zymo Research Genomic DNA Clean&Concentrator	Genomik DNA Purifikasyonu	Zymo Research Corporation,USA
Light Cycler 480 SYBR Green I Master	Validasyon	Roche Diagnostics, Turkey
Illumina Human CytoSNP 12v2.1 BeadChip Kit 300K	SNP- Array	Illumina, San Diego, CA.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi Tablo 3-4' te verilmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan Cihazların Listesi ve Bilgileri

Kullanım	Firma Adı
Jel Görüntüleme Sistemi	UVP Imaging System
Steril Kabin	Thermo Scientific, HERA (51022515)
NanoDrop Spektrofotometre	Thermo Scientific (ND- 1000)
Bilgisayarlar	HP (WM434EA II AB8)
	Acer Incorporated (IV1670G)
	SANYO LABCOOL +4°C
Derin Dondurucular	Uğur Soğutma Makinaları Sanayi Tic. A.Ş. (UFR 370 GD)
Inkübator	Hibrigene Techne
Santrifüjler	Eppendorf Centrifuge, (5415C)
	Labofuge
Gerçek Zamanlı- qPZR	Light Cycler 480 II, Roche
Vorteks	Yellowline (TTS2)
Otoklav	Sümer A.Ş.
Jel Dökümantasyon Sistemi	GelDoc-It
Thermomixer	ThermoScientific

3.1.5. Kullanılan Elektronik Veritabanları

Kullanılan elektronik veritabanlarının listesi Tablo 3-5' te verilmiştir.

Tablo 3-5: Kullanılan Veritabanlarının Listesi

Veritabanı	Açıklama
UCSC (University of California Santa Cruz) http://genome.ucsc.edu GRCh337/hg19	Referans sekans ve genomla ilgili bilgiler içeren, kullanıcıya çalışma alanı sağlayan bir veritabanıdır.
ENSEMBL Release 75 http://www.ensembl.org	Ökaryotik türler için genom veritabanıdır.
NCBI (National Center for Biotechnology) Annotation Release 105 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	NCBI, referans sekans ve genom bilgilerini sağlayan bir veritabanıdır.
OligoCalculator http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html	Dizayn edilen primerlerin özelliklerini tespit etmeyi sağlayan bir veritabanıdır.
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim	Kalıtsal hastalıklar ve fenotipleri ile ilgili bilgi sağlayan bir veritabanıdır.
SDSC Biology Workbench Biology Workbench 3.2 http://workbench.sdsc.edu/	Birçok programı bir araya getiren primer, prob dizaynı gibi opsiyon içerikleri olan bir veritabanıdır.
Decipher (https://decipher.sanger.ac.uk)	Genomik varyantlarla ilgili bilgi sağlayan bir veritabanıdır.

3.1.6. Kullanılan Analiz Programları

Çalışma kapsamında kullanılan analiz programlarının listesi Tablo 3-6' da verilmiştir.

Tablo 3-6: Kullanılan Analiz Programlarının Listesi

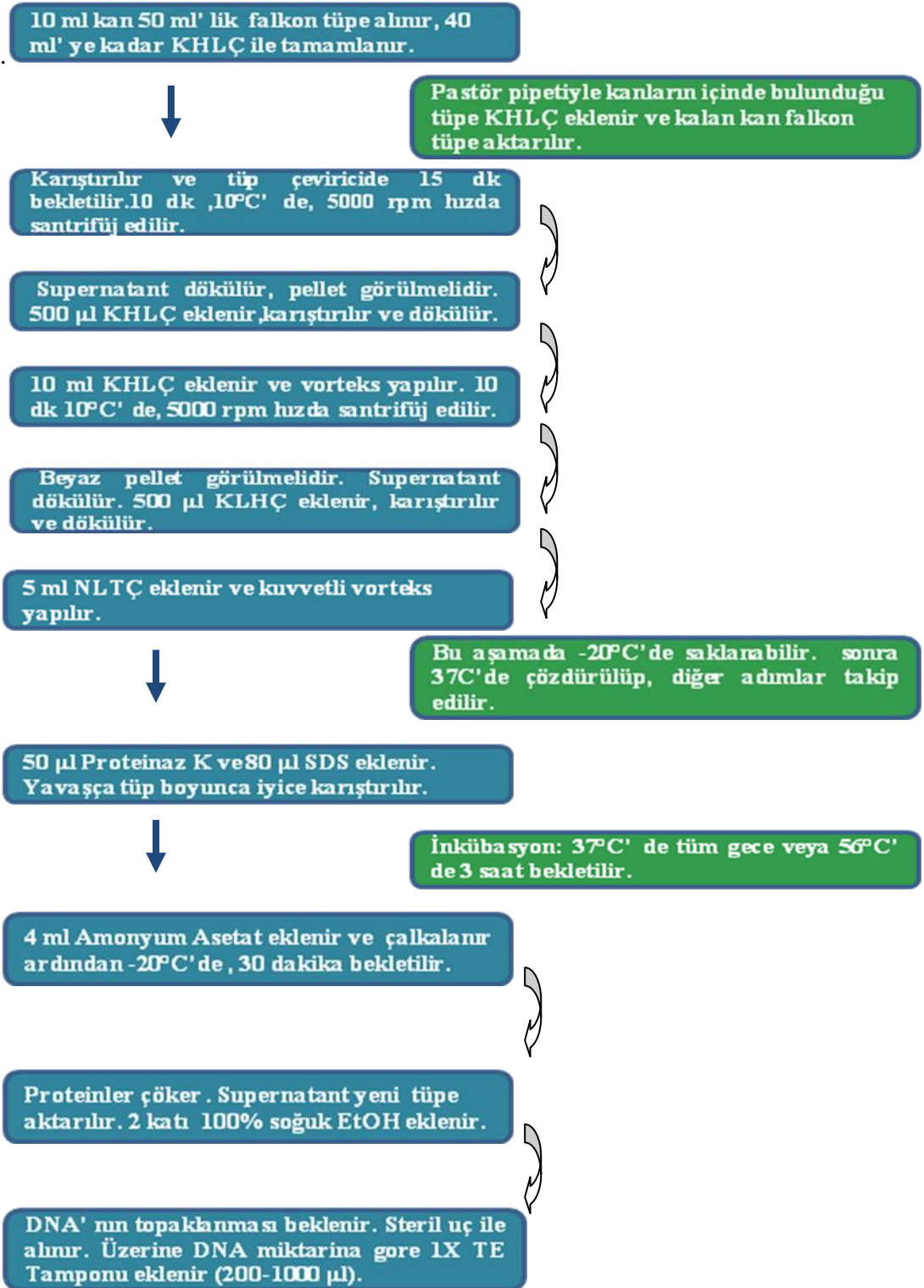
Program Adı	Açıklama
GenomeStudio	SNP- Array verisinin incelenmesini sağlayan Illumina' ya ait bir yazılımdır.
cnvPartition	CNV analizlerini rapor halinde alabilmeyi sağlayan bir programdır.
Homozygosity Detector	Genomdaki homozigot bölgelerin tespit edilmesini sağlayan bir ek yazılımdır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA İzolasyonu

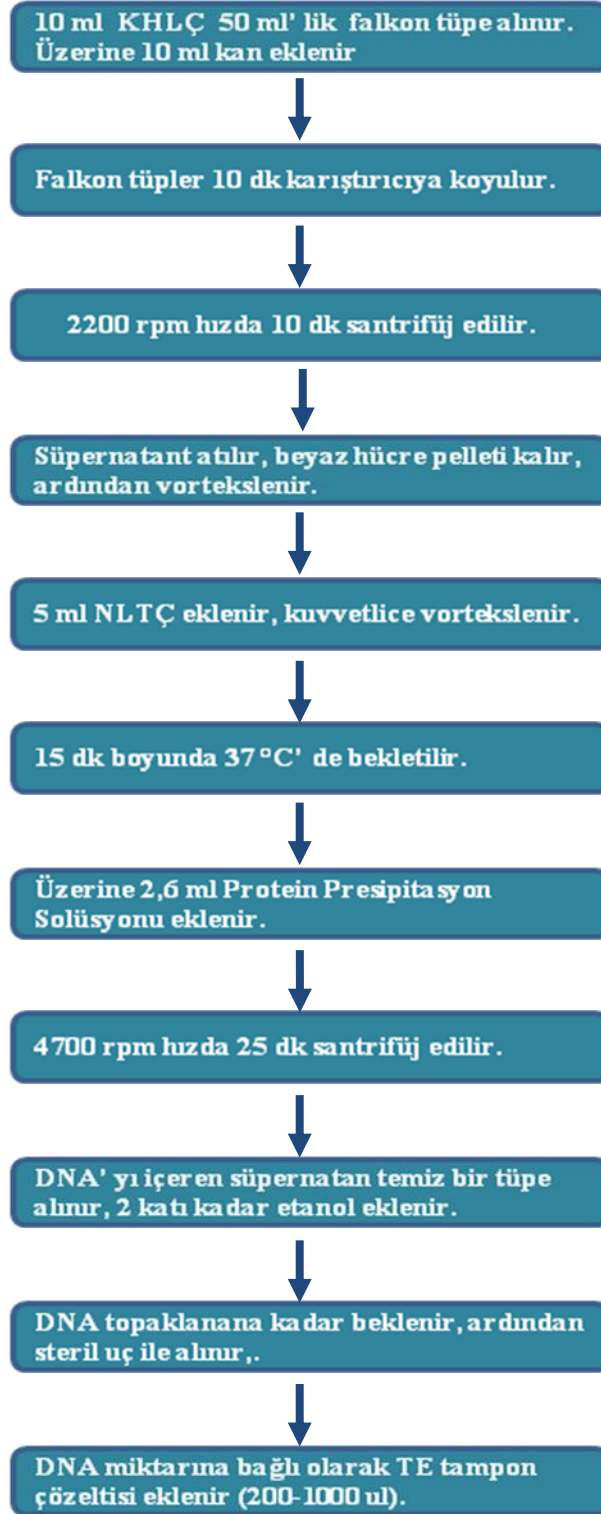
DNA izolasyonu için birçok farklı yöntem ve ticari kitler bulunmaktadır. DNA izolasyonu için kanın alındıktan sonra bekleme süresi ve miktarı göz önüne alınarak manuel, maksit kit (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche) veya mini kit (Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit, Life Technologies) yöntemlerinden biri tercih edilmiştir. Genel olarak 2 ml' nin altında hacmi bulunan kanlar minikit yöntemiyle izole edilmiştir. Bu 3 yönleme ait uygulama süreçleri sırasıyla Şekil 3-1 ve 3-2' de bulunabilir.

Manuel DNA izolasyonuna başlamadan önce yapılması gereken hibridizasyon fırını 37°C' ye veya 56°C' ye ayarlanır. Etanol (EtOH) -20°C' ye , SDS çözeltisi ise 37°C' ye alınır. Proteinaz K inkübasyonun hemen öncesinde -20°C' den çıkarılır.



Şekil 3-1 Manuel DNA İzolasyonu İş Akış Şeması

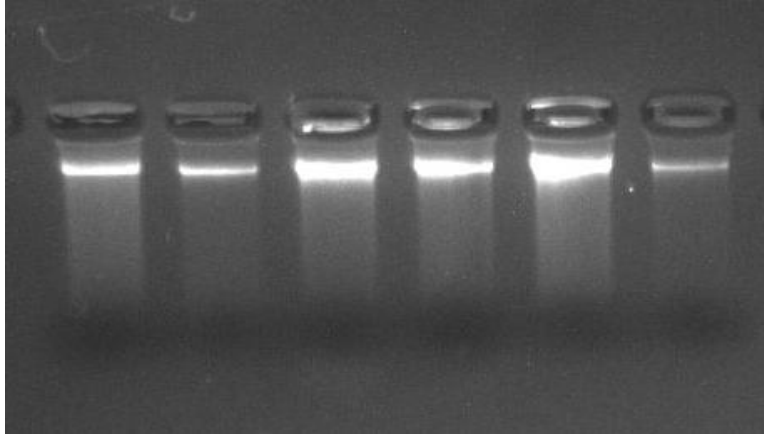
Roche maksit kit (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche) için iş akış şeması aşağıda Şekil 3-2 ' de verilmiştir.



Şekil 3-2: Roche maksit kit (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche) İş Akışı

3.2.2. DNA Kalite Kontrol Aşamaları

Kandan izole edilen DNA'ların kalite ve kantite tayini hem spektrofotometre ve hem de agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır. Spektrofotometre ölçümlerinde 260 nm' de bir peak ve 260 nm/280 nm absorbans kesirinin 1,8-2,0 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemiyle ise DNA'nın degradasyon durumu kontrol edilmiştir. Aşağıda Şekil 3-3' te agaroz jel elektroforezi sonrası kaliteli DNA'ların görüntüsüne örnek olarak bir jel görüntüsü verilmiştir.

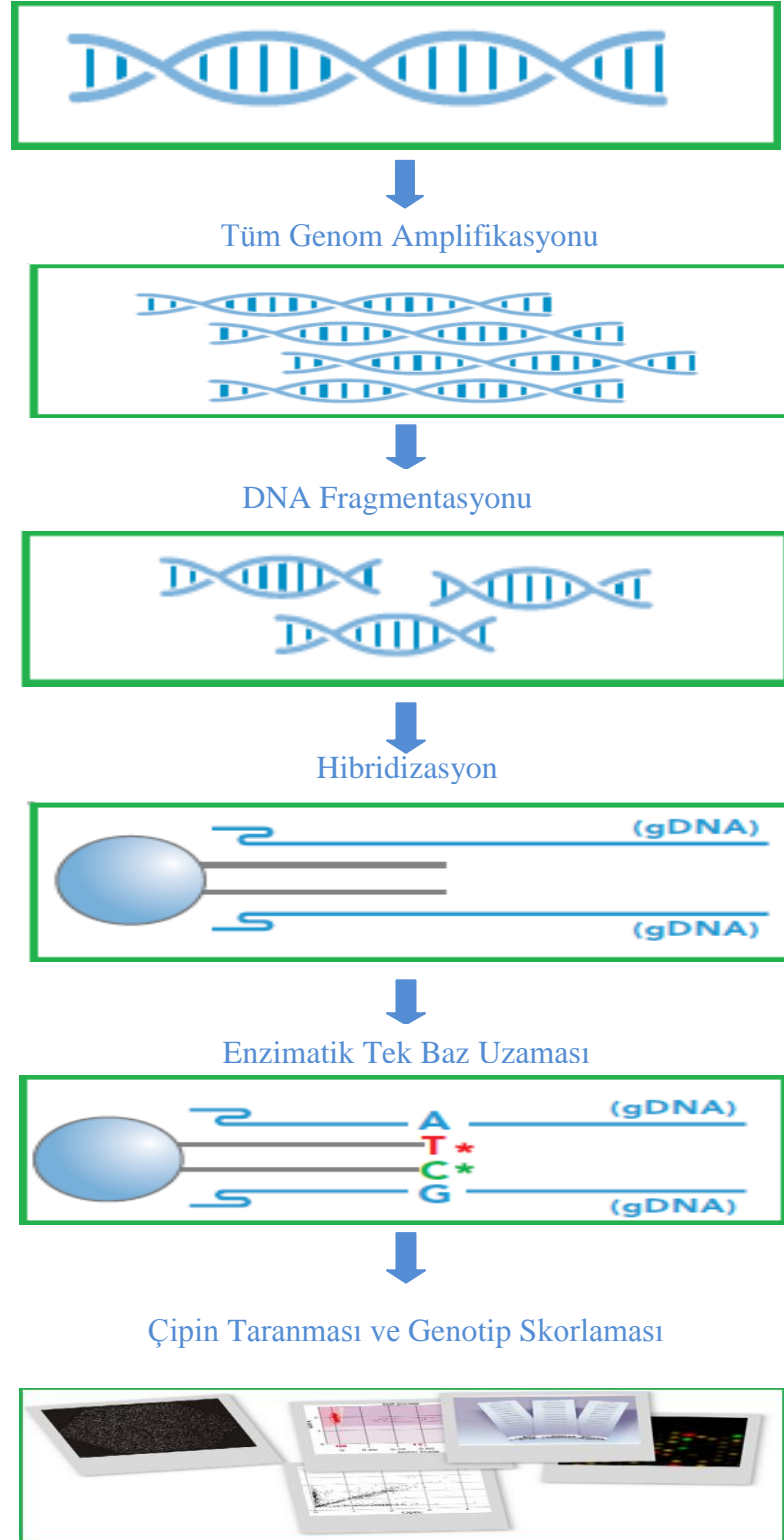


Şekil 3-3: DNA Kalitesine Örnek Jel Görüntüsü

3.2.3. Tüm Genom SNP-Array Uygulaması

Kalite kontrol aşamasından geçen DNA örnekleri distile su ile 50 ng/µl oranında sulandırılmış ve toplam 200 ng olacak tüm genom SNP-Array uygulaması için hazırlanmıştır. Çalışma kapsamındaki tüm genom genotiplendirme uygulaması, Illumina HumanCytoSNP-12 BeadChip çip kiti kullanılarak yapılmıştır. Kitin protokolüne göre hazırlanan örnekler ilk olarak tüm genom amplifikasyonuna tabi tutulmaktadır. Ardından fragmentasyon, hibridizasyon ve enzimatik tek baz uzaması gerçekleştirilir. Son olarak da yıkama ve çipin taranması işlemleri gerçekleştirilir. Bu kite ait akış şeması Şekil 3-4' te bulunabilir Bu kit ile 200.000 adet genomla yayılmış tagSNP, sitogenetik laboratuvarlarında taranan bölgelere özel (telomer altı bölgeler, perisentromik bölgeler, cinsiyet kromozomları vb.) 250 adet, 400' ü de hastalıkla ilişkili genleri hedefleyen toplam 220.000 belirteç taranabilmiştir. Veri eldesi %98' in altında olan ve/veya sinyal değerleri açısından görsel olarak dalgalanma gösteren örnekler yeniden hazırlanarak, farklı çiplerde çalışılmıştır.

Uygulamanın ardından IScan cihazı ile taranan çip bilgisi GenomeStudio v2011.1 yazılımı ile elektronik veriye dönüştürülmüş, görsel ve sayısal olarak analiz edilmiştir.



Şekil 3-4: Illumina Human CytoSNP 12-BeadChip Kitine Ait İş Akış Şeması

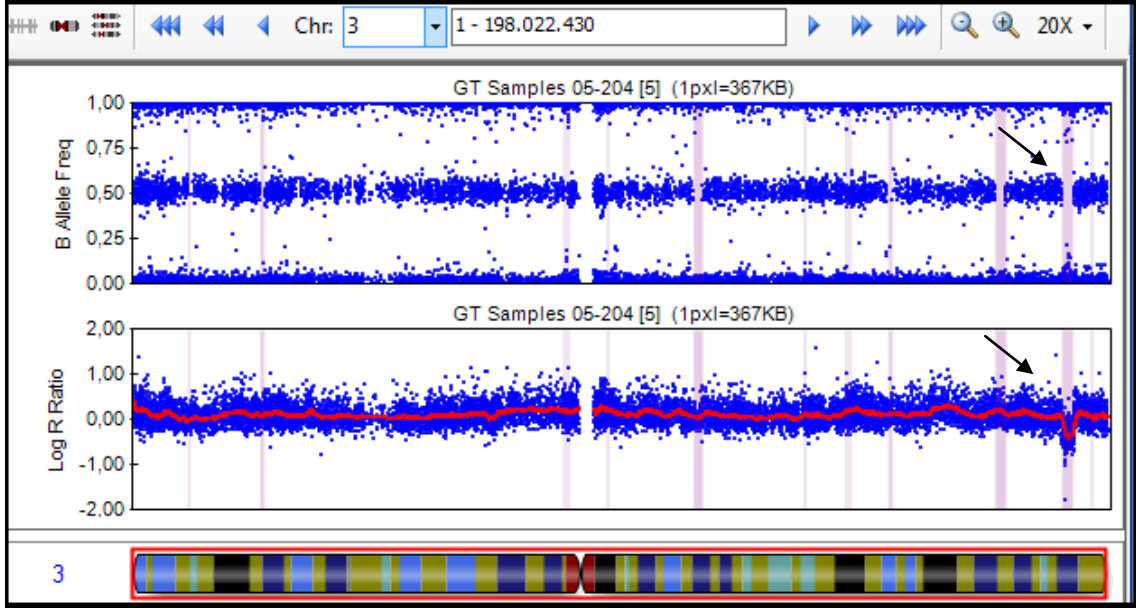
3.2.4. SNP-Array Verisinde Biyoinformatik Analizler

IScan taraması sonucunda elde edilen ham veri (*.idat dosyaları) örnek isimlerini, çip kodlarını ve çip pozisyonlarını gösteren örnek dosyaları (sample sheets) hazırlanarak GenomeStudio-Genotipleme Modülüne tanıtılmıştır. Bir örnek dosya Tablo 3-7’de gösterilmektedir.

Tablo 3-7: GenomeStudio Programına Tanıtılan Örnek Dosya Görüntüsü

[Header]							
Investigator Name	GENETIK						
Project Name	HumanCytoSNP-12v2-1_H						
Experiment Name	ReGentrain						
Date	23.11.2012						
[Manifests]							
Sample_ID	SentrixBarcode_A	SentrixPosition_A	Gender	Sample_Name	Replicate	Parent1	Parent2
11-672	7165713066	R04C01	Female				
12-600	7019311014	R01C02	Female				
12-623	7019311014	R02C02	Female				
12-639	7019311014	R03C02	Male				
05-204	9259616021	R01C01	Male				
E12_34	6298127108	R06C02	Female				
13-440	9259616021	R05C01	Female				
13-445	9259616021	R05C02	Male				

Illumina’ ya ait bir yazılım olan GenomeStudio çipler tarandıktan sonra elde edilen ham verinin hem görsel hem de sayısal olarak analiz edilmesini sağlamaktadır. Genotip verisinin analiz edilmesi iki parametre yardımı ile yapılmaktadır. Bunlardan ilki allelik bileşimi ifade eden BAF değeridir. SNP’ ler BAF hesaplanarak karakterize edilir. BAF, A ve B olarak adlandırılan 2 allelli SNP’ ler için B allelinden gelen rölatif sinyal miktarının toplam sinyal miktarına katkısını gösterir. SNP’ ler 2 alleli oldukları için 0.5 değeri heterozigotluğu, 0 veya 1 değeri ise sırasıyla A veya B aleli için LOH bölgelerini gösterir. İkinci parametre ise toplam sinyal yoğunluğu LRR değeridir. LRR’ nin normal değeri sıfır civarındadır. Bu değer azalması veya artması sırası ile genomda kayıp ve kazanç olan bölgeleri işaret eder. Şekil.3-5’ te kromozomunda kayıp olan bir hastanın veri görüntüsü örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 3-5: 3q28 Bölgesinde Kayıp Olan Bir Hastaya Ait Veri Görüntüsü

Şekil 3-5’ te gösterilen veri görüntüsünde BAF ve LRR parametrelerinin delesyonu gösterdiği bölgeler ok ile işaretlenmiştir.

CNV analizi yapılırken BAF ve LRR değeri birlikte değerlendirilir. Eğer sinyal yoğunluğunda bir düşüş gözlemlenirse bunun BAF değerinde de gözlemlenmesi gerekmektedir. Elde edilen veri hem görsel olarak hem de programın bir eklentisi olan cnvPartition ile sayısal olarak yapılmaktadır. GenomeStudio programında tüm kromozomlar tek tek görsel olarak analiz edilir. Tespit edilen değişiklikler hem BAF hem de LRR parametresi değerlendirilerek doğrulanır. Ardından programın bir eklentisi olan cnvPartition ile sayısal olarak raporlaması yapılır. GenomeStudio programı içerisinde bir başka eklenti olan Homozygosity Detector ile bireylerin genomlarındaki homozigot bölgeler belirlenebilmektedir. Bu eklenti çalıştırıldığında bireylerin genomlarındaki homozigot bölgeler pembe ile işaretlenerek görünür hale gelmektedir. Bu sayede hem homozigot olan bölgeler hem de bireylerin ebeveynlerinin akrabalık durumları hakkında fikir edinilebilir. Şekil 3-5’ te bunun bir örneği görülebilir. Tablo 3-8’ de cnvPartition eklentisi ile yapılan bir raporlama örneği verilmiştir. Bu rapor içerisinde bireylere ait tespit edilen CNV bölgelerinin bulunduğu kromozom, pozisyon, CNV değerleri ve değişimlerin megabaz cinsinden büyüklükleri yer almaktadır. Tespit edilen değişiklikler için hem görsel hem de raporlama ile analiz yapılması daha doğru sonuca ulaşılmasını sağlamaktadır.

Tablo 3-8: cnvPartition Eklentisi ile Yapılan Bir Raporlama Örneği

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum
H2	1	148.000.829	149.728.859	1,73	3	CB' de elendi.
H2	2	110.882.699	110.982.530	0,10	3	CB' de teyit edildi.
H2	3	188.612.356	190.995.351	2,38	1	CB' de teyit edildi.
H2	7	61.074.194	61.804.394	0,73	4	CB' de elendi.
H2	9	40.215.520	42.374.011	2,16	3	CB' de elendi.
H2	12	77.969.441	82.013.098	4,04	1	CB' de teyit edildi.
H2	13	35.440.882	36.072.729	0,63	3	CB ' de teyitedildi.
H2	14	106.350.394	107.023.065	0,67	3	CB' de elendi.
H2	16	32.001.824	33.909.759	1,91	3	CB' de elendi.
H2	22	18.889.490	19.008.108	0,12	1	CB' de teyit edildi.
H2	X	15.354.310	15.867.450	0,51	2	CB' de teyit edildi.
H2	X	16.419.490	16.851.556	0,43	2	CB' de teyit edildi.

*CB: Chromosome Browser

3.2.5. Trizomi 21 Ebeveyn Etkisi Tespiti Analizi

3.2.5.1. Ebeveyn Etkisi Tespiti Analizi

Ebeveyn etkisinin tespiti için öncelikle iki ebeveynin ve Trizomi 21' li olgunun genotipleri 21 kromozom açısından listelenmiş, daha sonra Excel programı üzerinden harf ve renk koduna göre seçilerek sadece anne ve babanın farklı alleller için homozigot olduğu SNP genotipleri bırakılmıştır. Bu analiz ile 21. kromozom boyunca yer alan 4326 adet SNP' den sadece 11 tanesi kullanılmıştır. GenomeStudio Genotipleme Modülüne ait genotip listesi sadece 2 allelli durumu hesaplayabildiğinden bu 11 SNP' ye ait 3 allel E12-34 numaralı bireyde frekans değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Yani, herhangi bir SNP' ye ait genotip BAF değeri 0 ise AAA, 0,33 ise AAB, 0,66 ise ABB ve 1 ise BBB olarak hesaplanmıştır. Filtreleme ve frekansa göre allel dağılımı hesaplama yöntemiyle E12-34' te hangi allelin hangi ebeveyninden geldiği tespit edilebilmektedir. Analizin daha kolay anlaşılabilmesi için 21. kromozomları CNV açısından normal 2 kardeş de analize dahil edilmiştir.

3.2.6. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı-qPZR)

3.2.6.1. Gerçek Zamanlı-qPZR Primerleri ve Optimizasyon Koşulları

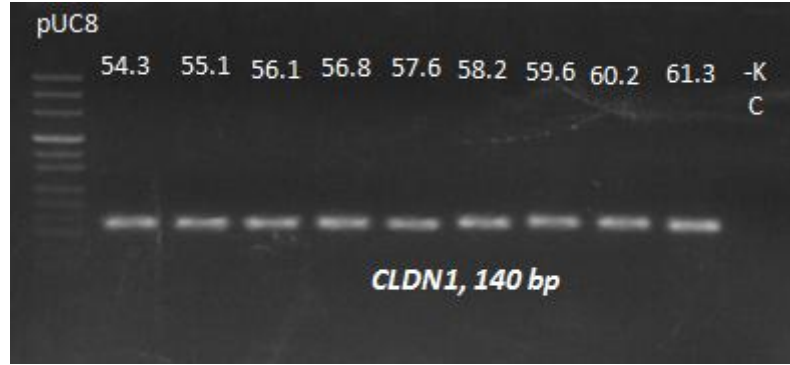
Gerçek Zamanlı-qPZR için kullanılan primer çiftleri; GC içeriği, primer pozisyonları içerisine SNP denk gelmemesi, bağlanma sıcaklıkları, uzunlukları gibi kriterlere uygun olacak şekilde SDSC Workbench arayüzünde Primer3 programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Primerlerin çoğalttığı bölgeler UCSC veritabanında In silico- PCR kullanılarak kontrol edilmiştir. Bölge içerisine denk gelen SNP' ler UCSC Genome Viewer modülü kullanılarak kontrol edilmiştir. Dizayn edilen primerlerin 200 baz çifti uzunluğunu geçmemesine özen gösterilmiştir. Primerler Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul, Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir. Liyofilize olarak alınan bu primerlerin her biri stok konsantrasyonu 100 ul olacak şekilde distile su ile sulandırılmışlar ve -20C'de saklanmışlardır. Gerçek Zamanlı-qPZR için 10 ul' lik ara stoklar da yapılarak üreticinin belirttiği koşullarda saklanmıştır.. Kullanılan primerlerin listesi ve özellikleri Tablo 3-9' da görülebilir.

Tablo 3-9 Çalışmada Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Ekzon	Gen Adı	Primer Sekansı (5' → 3')	Uzunluk (bc)	GC İçeriği	Tm (°C)
17	KIF1C	CACTGTAGGCGAGGAGGAAG GCTTCACCTCCTGCAGAATC	131	66	58,5
2	CLDN1	TCTCTCTTCCATAACAACAGTGACA GATGCCAACCACCATCAAG	140	41	59,3
2	FBLN7	TTTGTTTTAGACCTAGAACTCACATC TGCATCTGTACTGGTTGACTCC	131	39	58,5
11	TRPM2	CCAGGGTCTTTGAGATCAGG CAAACCTCAGGCTTGTGGAGA	132	52	59
3	RBMXL	CTATGAGGAGAACCGAGGC GTACTCATAGCGGCCTTCTC	139	61	57

3.2.6.2. Primerler için Optimizasyon Çalışması

Valide edilecek CNV bölgelerinin içinden seçilen genlere özgü primerler ile öncelikle konvansiyonel PZR cihazında (Techne 512) optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyonun amacı, primerler için en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesidir. Bu amaçla çift zincirli DNA' ya bağlanarak floresans ışımaya veren bir boya olan SYBR Green kullanılarak gradient PZR yapılmıştır. Şekil 3-6' da bir optimizasyon çalışması sonucu örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 3-6: Bir Optimizasyon Çalışması Sonucu Jel Görüntüsü

Şekil 3-6 ' da *CLDN1* geni primerleri optimizasyonu için 9 farklı sıcaklık denenerek yapılan Gradient-PZR jel görüntüsü gösterilmiştir. Şekilde primerler denenen tüm sıcaklıklarda çalışmıştır.

SNP-Array ile tespit edilen CNV' lerin validasyonu LC480 cihazında (Light Cycler ® 480 Real-Time PCR System, Roche Applied Science, Istanbul-Turkey) Gerçek Zamanlı-qPZR ile yapılmış ve analiz için rölatif kantifikasyon yöntemi kullanılmıştır. (52)

3.2.6.3. PZR Verim Hesaplanması

PZR verimi reaksiyon kinetiğinin bir ifadesidir. PZR verimi standart eğrinin eğim değerine eşittir. Standart eğri eşik değerleri ve kullanılan DNA konsantrasyonlarının logaritması alınarak çizilmiştir. -3,1 ve -3,6 eğim değerleri verimin %90- 110 arasına olduğunu ifade eder ve bunlar kabul edilir değerlerdir. PZR veriminin 2 olması % 100 verimde amplifikasyon gerçekleştiğinin ifadesidir.

Primerler için optimum sıcaklığın bulunmasının ardından Gerçek Zamanlı - qPZR ile PZR verimi hesaplanması için plak dizaynı yapılmıştır ve bu dizaynda seçilen sağlıklı kontrol örneklerinin DNA' ları farklı konsantrasyonlarda seri dilüsyonlar halinde hazırlanarak kullanılmıştır ve herbir örnek daima üçlü çalışılmıştır. Validasyonu yapılması planlanan her gen için PZR verim hesaplaması yapılmıştır ancak çalışmada verim değerleri birbirine çok yakın olan sonuçlar için direk olarak $\Delta\Delta C_t$ hesaplaması yapılması tercih edilmiştir.

3.2.6.4. Gerçek Zamanlı -qPZR' de Rölatif Kantifikasyon Analizi

Gerçek Zamanlı -qPZR' de rölatif kantifikasyon yapmak amacıyla hem validasyonu yapılacak bireyde seçilen gen hem de referans gen için hasta örneği ve sağlıklı kontrolleri içerecek şekilde bir plak dizaynı yapılarak çalışılmıştır. Çalışmada validasyonu yapılan her bir bölgeden seçilen hedef gene referans olarak 17. kromozomda bulunan *KIFIC* geni seçilmiştir. Bu genin seçilme sebebi bu gene dizayn edilen primerin baz boyunun çalışmadaki diğer primerler ile uyum sağlaması ve deneylerde optimum sinyal değerleri vermiş olmasıdır. Her örnek önceki deneylerde olduğu gibi üçlü çalışılmıştır. Bu deneylerden elde edilen Ct (Eşik değer) değerleri kullanılarak $\Delta\Delta C_t$ hesaplamaları yapılmıştır. Referans genin Ct değerinden hedef genin Ct değeri çıkartılarak (Ct referans - Ct hedef gen) delta Ct değeri bulundu. Son işlem olarak delta delta Ct hesaplamak için 2 üzeri delta Ct değeri ($2^{\Delta\Delta C_t}$) alındı. Rölatif kantifikasyon analizleri delta delta Ct değerlerine göre hesaplandı. Çıkan $\Delta\Delta C_t$ sonuçları ile ortalama hesabı ile karşılaştırmaları yapılmış ve grafikler bu hesaplamalara bağlı olarak oluşturulmuştur. Tablo 3-10' da $\Delta\Delta C_t$ hesaplamalarına bir örnek verilmiştir. Rölatif kantifikasyon analizindeki yaklaşımlardan biri olan kalibratör kullanarak artış ve azalışlar belirlenmiştir. Örneklerden Ct değeri ortalamaya yakın olan normalizasyonu sağlayabilmek için kalibratör olarak seçilmiştir. Kalibratör değeri normalizasyon yapabilmek amacıyla 1' e eşitlenmiştir.

Çalışmamızda hasta örnekleri ve kontrol örnekleri validasyonu yapılan gen için öncelikle kendi aralarında daha sonra hasta ve kontrol örnekleri ayrıca hasta örnekleri kendi içlerinde gruplandırılarak ortalamaları alınmış ve grafikleri bu şekilde oluşturulmuştur. Her bireyin tek tek hesaplandığı rölatif kantifikasyon için ortalama değer kullanılmıştır. Hasta ve kontrol örneklerinin gruplandırılarak yapılan analiz için ise ortanca hesaplamaları kullanılmıştır.

“

Tablo 3-10: Rölatif Kantifikasyonda $\Delta\Delta C_t$ Hesaplamalarına Örnek Analiz

	Referans Gen C_t	Hedef Gen C_t	Ort. Referans	Ort. Hedef	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	STD $\Delta\Delta C_t$
	1	2	3	4	5	7	8
A	23,3	22,6					
B	23,02	22,8	$(A1+B1+C1)/3$	$(A2+B2+C2)/3$	$B4-B3$	$B5-B5$	$\sqrt{(STD \text{ hedef})^2+(STD \text{ ref})^2}$
C	23,4	22,8					

3.2.7. Gerçek Zamanlı-qPZR ile X kromozomu Kopya Sayısının Tespiti

Erkek ve kadın bireylerdeki X kromozomu kopya sayısı farklılığı göz önüne alınarak Gerçek Zamanlı qPZR ile kopya sayısı değişikliklerinin tespit edilebilirliğini kontrol etmek amacıyla yapılmıştır. qPZR ile kopya sayısı değişikliklerini tespit edilebildiğinin gösterilmesi bu yöntemin validasyon aşaması için kullanılabilirliğini göstermiştir. Bunun için öncelikle X kromozomu üzerinden *RBMXL* geni seçilmiştir. Bu gene özgü primerler ile sağlıklı 3 kadın ve 3 erkek seçilerek deney dizaynı yapılmıştır. Deneyde her örnek üçlü çalışılmıştır. Sonuçlar rölatif kantifikasyon yöntemi $\Delta\Delta C_t$ hesaplamaları ile analiz edilerek erkekler ve kadınlar arasındaki X kromozom sayısının kantifikasyonu yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Tüm Genom SNP- Array Uygulaması Sonuçları

Çalışmaya katılan bireylere ait örneklerin Illumina Human CytoSNP 12v2.1 BeadChip Kiti ile çalışılmasının ardından örneklere ait kalite kontrol değerleri incelenmiştir. Kalite kontrol değeri çip üzerinde bulunan problemlerin bağlanma yüzdesini ifade etmektedir. Aşağıda Tablo 4.1’ de çalışmadaki örneklere ait çip kodu, pozisyon ve kalite kontrol sonuçları verilmiştir.

Tablo 4-1: Tüm Genom SNP-Array Uygulaması Kalite Kontrol Sonuçları

Örnek Adı	Çip Kodu	Çip Pozisyonu	Okuma Oranı
H1 (E12-34)	6298127108	R06C02	0,9882295
H2 (05-204)	9259616021	R01C01	0,9941936
H3 (11-672)	7165713066	R04C01	0,9927102
H4 (12-600)	7019311014	R01C02	0,9923985
H5 (12-639)	7019311014	R03C02	0,9898875
H6 (12-623)	7019311014	R02C02	0,9920183
H7 (13-334)	9259616057	R02C01	0,9828410
H8 (13-440)	9259616057	R04C01	0,9883152
H9 (13-445)	9259616057	R06C01	0,9405721
H10 (13-457)	9259616057	R05C01	0,9763323

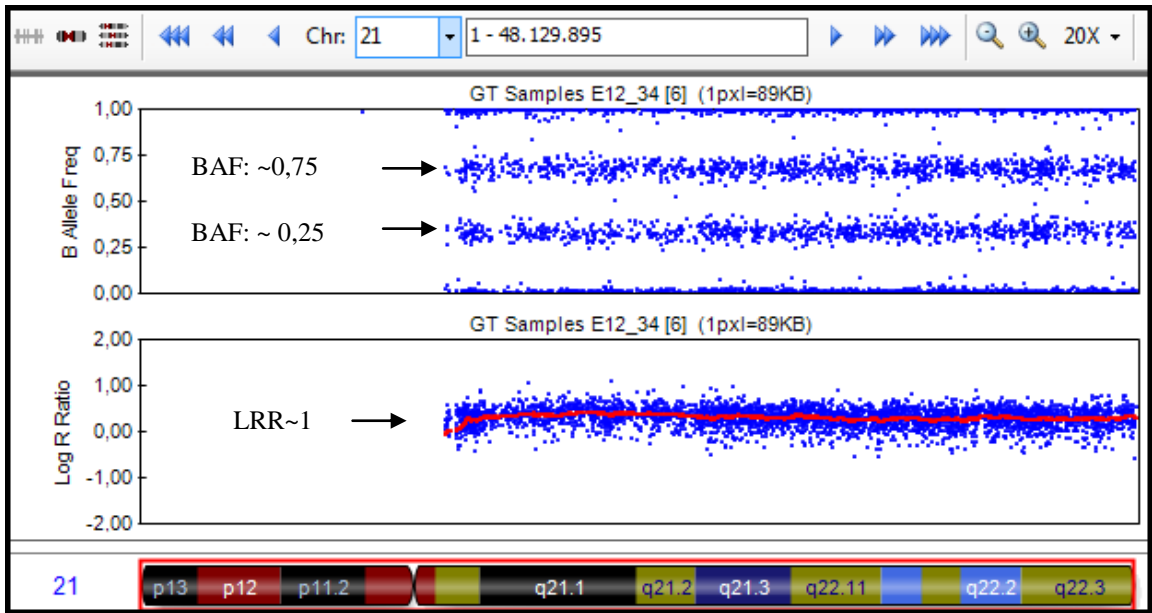
4.2. CNV Analiz Sonuçları

Tüm genom SNP-Array uygulaması sonucunda bireylere ait elde edilen ham veri GenomeStudio programında öncelikle görsel olarak her bir kromozom Chromosome Browser’ da incelenmiş ardından cnvPartition kullanılarak raporlaması yapılarak ikinci incelemeleri yapılmıştır. Dolayısıyla bireylerde tespit edilen CNV’ lere ait GenomeStudio görüntüleri cnvPartition raporları ile desteklenmiştir. Ayrıca GenomeStudio programı içerisinde bir eklenti olan Homozygosity Detector açılarak

bireylerin genomlarındaki homozigot bölgelerin işaretlenmesi sağlanmıştır. Bu sayede bireylerin hem genomlarındaki homozigot bölgeler hem de ebeveynlerine ait akrabalık durumları ile ilgili de fikir edinilmiştir. Gerekli görüldüğü durumlarda GenomeStudio programından SNP haritası ve ilgili allel frekansları listelenerek CNV' ler teyit edilmiş ya da elenmiştir. CNV bölgeleri için eleme yapılırken veya teyit etmek amaçlı olarak problemlerden düşük sinyal alınması veya hiç alınmaması, sentromer bölgesine denk gelmesi, sinyal yoğunluğunun ve allel frekanslarının tespit edilen CNV tipi açısından doğru sayısal değerlerde olup olmadığı dikkate alınmıştır. cnvPartition eklentisinden elde edilen rapor CNV değerine bağlı olarak renklendirilerek formatlanmıştır. Tespit edilen CNV bölgelerinin başlangıç ve bitiş pozisyonları kullanılarak değişimin olduğu bölge içerisine düşen genler NCBI veritabanından bulunmuş ve listelenmiştir. Bu listeleme yapılırken raporun belirttiği pozisyonların daha gerisinden bir pozisyon aralığı seçilmiştir. Bunu yapmadaki amaç bireylerin genomlarında belirlenen artış veya azalışların kırık noktalarına düşen genlerin tamamını görebilmektir.

4.2.1. H1 (E12-34) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları

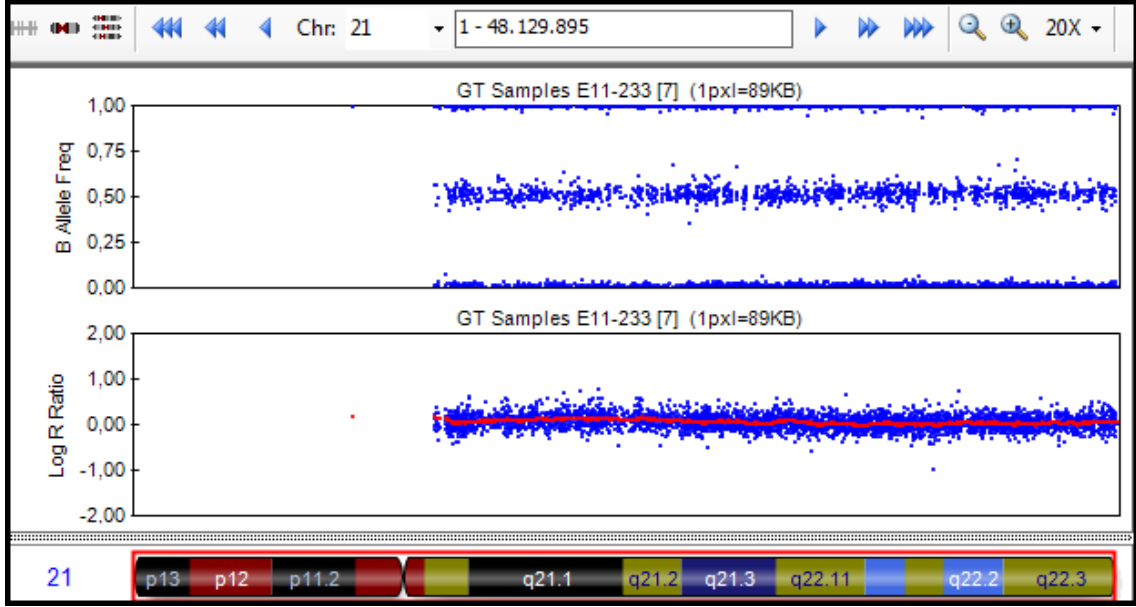
H1 Kodlu bireyin CNV analizinde Trizomi 21 tespit edilmiştir ardından klinik olarak da Trizomi 21' li olduğu konfirme edilmiştir. Bireye ait GenomeStudio görüntüsü görüntüsü Şekil 4-1.' de verilmiştir.



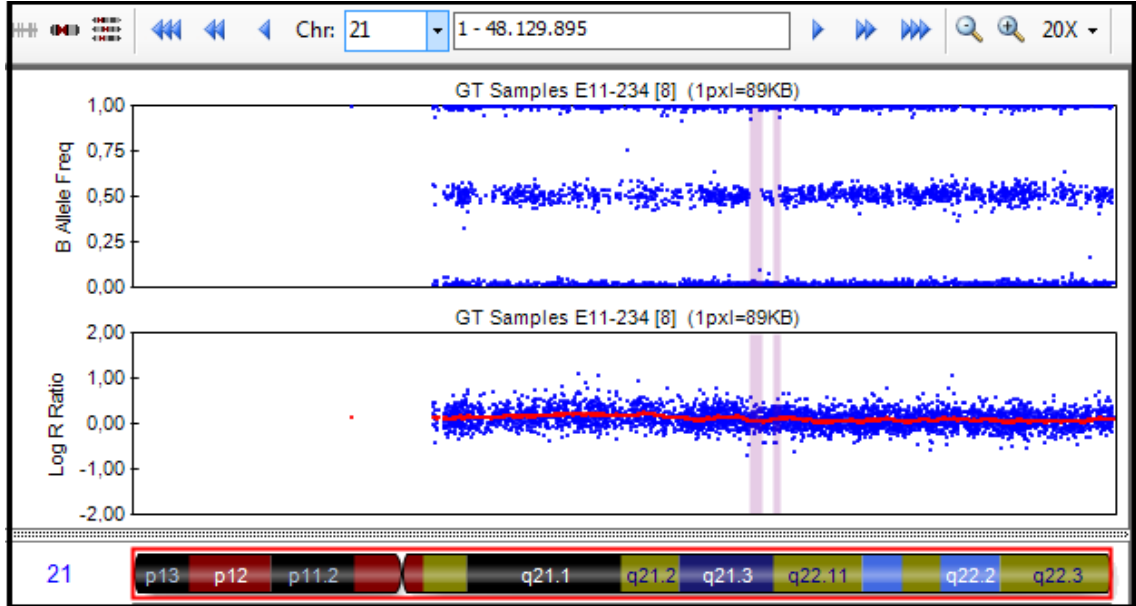
Şekil 4-1: H1 Bireyine Ait Trizomi 21 Veri Görüntüsü

Şekil 4-1 incelendiğinde B allel frekansının iki populasyona ayrıldığı açıkça görülmektedir ve LRR sıfırdan sapsması da bu veriyi desteklemektedir.

Ayrıca bireyin anne ve babasına ait normal 21. kromozom GenomeStudio veri görüntüsü de Şekil 4-2' ve Şekil 4-3' te verilmiştir.



Şekil 4-2: H1 (E12-34) ' in Annesine Ait 21.Kromozom Veri Görüntüsü



Şekil 4-3: H1 (E12-34) ' in Babasına Ait 21. Kromozom Veri Görüntüsü

H1' in anne ve babasına ait 21. kromozom veri görüntüleri olan Şekil 4-2 ve Şekil 4-3 incelendiğinde bu bireylerin normal 21.kromozoma sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4-2: H1 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H1	9	12.054.659	12.144.717	0,09	1	Chromosome browser' da teyit edildi.	YOK
H1	17	44.191.085	44.580.136	0,39	3	Chromosome browser' da elendi.	YOK
H1	21	14.687.571	48.098.824	33,41	3	Chromosome browser' da teyit edildi.	YOK
H1	22	25.665.985	25.910.879	0,24	3	Chromosome browser' da elendi.	YOK
H1	Tüm genom boyunca 55,47 Mb kopya nötral LOH (Heterozigote kaybı) bölgesi tespit edilmiştir.						

H1 kodlu bireye ait veri öncelikle GenomeStudio programında hem görsel olarak analiz edilmiş hem de cnvPartition ile raporlama yapılarak incelenmiş ve bulunan sonuçlar yukarıdaki Tablo. 4-2.' de listelenmiştir.

4.2.1.1 H1 Kodlu Bireyde Trizomi 21 İçin Ebeveyn Etkisinin Tespiti

E12-34 kodlu bireyde Trizomi 21 gözlenmesiyle bu çalışma kapsamında ebeveyn ve çocuk genotipleri kullanılarak ebeveyn etkisinin tespit edilebilmesi açısından yeni, hızlı ve efektif bir yöntem geliştirilmiştir. Metod kısmında da anlatıldığı gibi herhangi bir SNP'e ait genotip BAF değeri 0 ise AAA, 0,33 ise AAB, 0,66 ise ABB ve 1 ise BBB olarak hesaplanmıştır. Trizomi 21' li bireyin BAF değerleri göz önünde bulundurularak filtrelenen 11 SNP için hesaplanan genotipleri Tablo 4-3' te verilmiştir.

Tablo 4-3: H1 Bireyinde 11 SNP' ye Ait BAF Değerleri ve Belirlenen Genotipler

Örnek Adı	SNP Kodu	Kromozom	BAF Değeri	Hesaplanan Genotipler		
H1	rs1153323	21	0,6667302	A	B	B
H1	rs2824143	21	0,3441246	B	A	A
H1	rs2826303	21	0,6391581	A	B	B
H1	rs405227	21	0,6527141	A	B	B
H1	rs214488	21	0,3452057	B	A	A
H1	rs2832373	21	0,6742331	A	B	B
H1	rs8132833	21	0,7164754	A	B	B
H1	rs9808802	21	0,3564143	B	A	A
H1	rs2836055	21	0,6425369	A	B	B
H1	rs2837508	21	0,2915561	B	A	A
H1	rs2026886	21	0,3495094	B	A	A

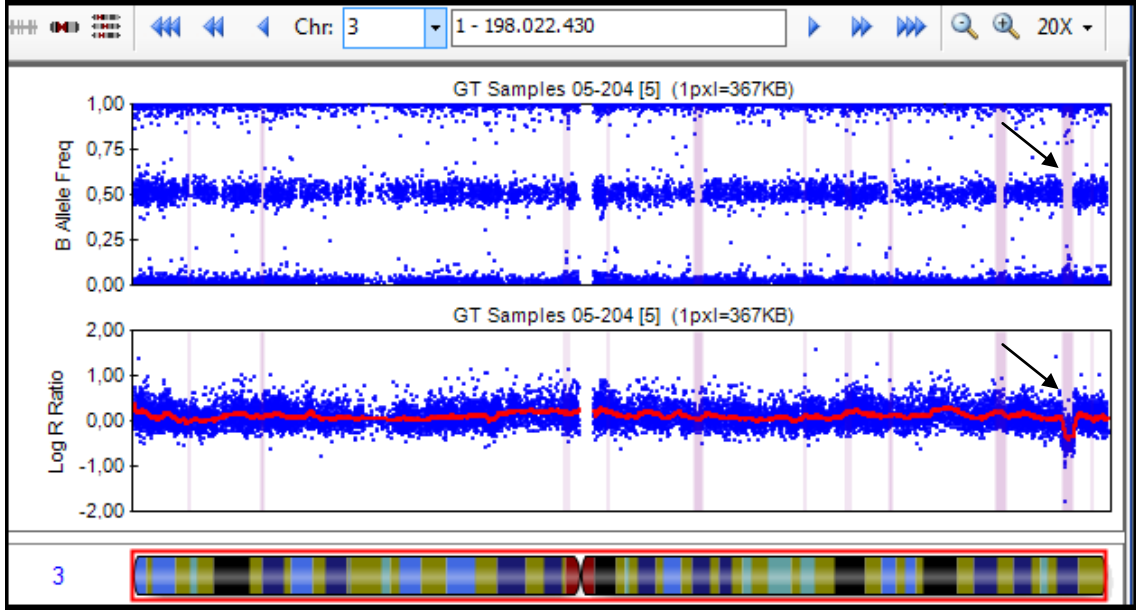
Tablo 4-4: Anne baba trizomili birey ve iki kardeşinde hesaplanan genotipler

SNP Kodu	Krm	Mb	E11-234		E11-233		E12-34			E11-235		E11-229	
rs1153323	21	15,68	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B
rs2824143	21	18,30	B	B	A	A	B	A	A	B	A	B	A
rs2826303	21	21,85	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B
rs405227	21	24,44	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B
rs214488	21	27,29	B	B	A	A	B	A	A	B	A	B	A
rs2832373	21	30,88	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B
rs8132833	21	33,67	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B
rs9808802	21	36,02	B	B	A	A	B	A	A	B	A	B	A
rs2836055	21	39,30	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B
rs2837508	21	41,59	B	B	A	A	B	A	A	B	A	B	A
rs2026886	21	46,83	B	B	A	A	B	A	A	B	A	B	A
			p	p	m	m	p	m	m	p	m	p	m

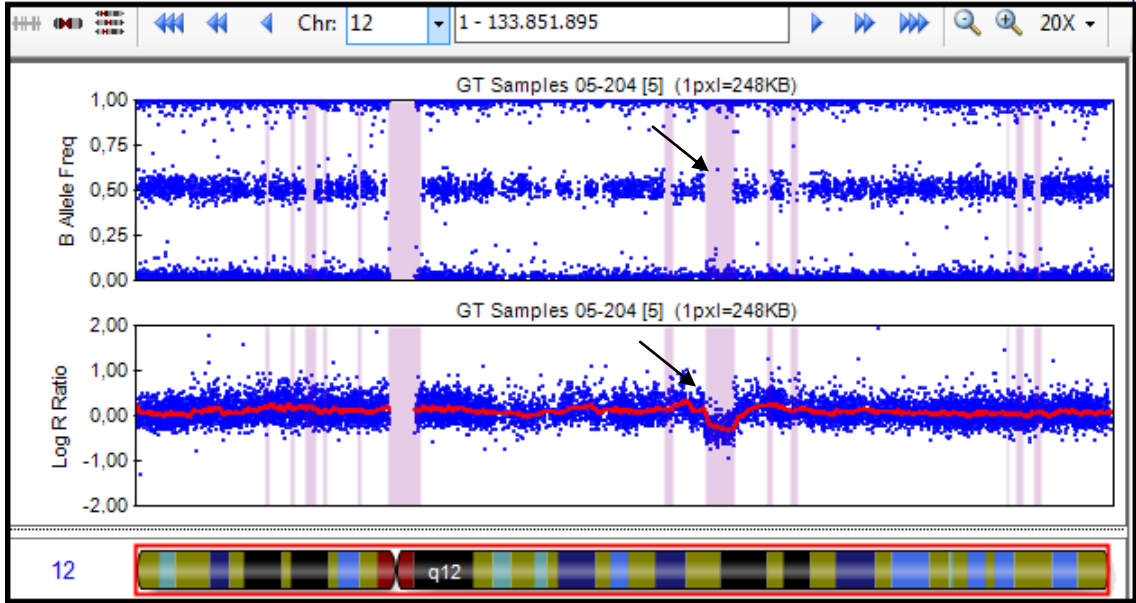
Ebeveyn etkisinin tespiti için kromozm 21 boyunca yer alan 11 SNP kullanılmıştır. Harf ve renk kodlarına göre filtrelenen bu SNP'lerde aranan özellik annede ve babada farklı homozigotluğa sahip olmasıdır. Bu özelliğe sahip 11 SNP için E12-34 kodlu bireyde frekansa dayalı genotipler manuel olarak belirlenerek ekstra kromozomal kopyanın anneden geldiği açıkça gözlenmiştir (Tablo 4-4). (Kısaltmalar; p: paternal; m: maternal; krm: kromozom)

4.2.2 H2 (05-204) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları

H2' ye ait veri için ilk olarak GenomeStudio programında yapılan görsel analizde 3. ve 12. kromozomda delesyon tespit edilmiştir. Tespit edilen delesyonlara ait GenomeStudio görüntüleri Şekil 4-4. ve Şekil 4-5' te verilmiştir.



Şekil 4-4: H2 Kodlu Bireyde 3.Kromozomda Bulunan Delesyona Ait GenomeStudio Görüntüsü



Şekil 4-5:H2 Kodlu Bireyde 12.Kromozomda Bulunan Delesyona Ait GenomeStudio Görüntüsü

Delesyonlar için hem LRR hem de B allel frekansı birlikte değerlendirilerek karar verilmiştir. B allel frekansında normalde heterozigot gözükmesi gereken kısmın homozigot gözükmesi ve LRR değerinin sıfırın altına düşmüş olması delesyon olduğunu doğrulamaktadır. Görsel analizinin ardından cnvPartition eklentisi ile yapılan raporlamaya ait sonuçlar. Tablo 4-5' te verilmiştir. Raporlamada 3. kromozomda 2,38

Mb ve 12. kromozomda 4,04 Mb'lık delesyonların olduğu tespit edilmiştir. 3. Kromozomda bulunan delesyon için bu bölgeden seçilen bir gen için Gerçek Zamanlı-qPZR ile validasyon yapılmıştır. 12. Kromozomda bulunan delesyon için de kırık noktasındaki genlerin incelenmiştir.

Tablo 4-5: H2 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H2	1	148.000.829	149.728.859	1,73	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H2	2	110.882.699	110.982.530	0,10	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H2	3	188.612.356	190.995.351	2,38	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	RT-qPZR ile validasyonu yapıldı.
H2	7	61.074.194	61.804.394	0,73	4	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H2	9	40.215.520	42.374.011	2,16	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H2	12	77.969.441	82.013.098	4,04	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	Kırık noktalarındaki genler incelendi.
H2	13	35.440.882	36.072.729	0,63	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H2	14	106.350.394	107.023.065	0,67	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H2	16	32.001.824	33.909.759	1,91	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H2	22	18.889.490	19.008.108	0,12	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H2	X	15.354.310	15.867.450	0,51	2	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H2	X	16.419.490	16.851.556	0,43	2	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H2	Bireyde genom boyu toplam 86,77 Mb Kopya Nötral LOH (Heterozigote kaybı) bölgesi tespit edildi.						

H2' de kromozom 3' te tespit edilen 188,612,356-190,995,351 pozisyonları arasındaki 2,38 Mb'lık delesyon bölgesi içerisindeki genler NCBI veritabanından faydalanılarak listelenmiştir. Bu aralıkta bulunan genlerin listesi Tablo 4-6' da verilmiştir. Validasyon aşaması için bu bölgeden *CLDNI* geni seçilmiş ve tabloda sarı renkte işaretlenmiştir.

Tablo 4-6: H2 Bireyinde 3.Kromozomda Bulunan Delesyon Bölgesi İçerisindeki Genler

Başlangıç	Bitiş	Sembol	Sitogenetik Pozisyon	Açıklama
188153310	188890671	<i>LPP</i>	3q28	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
188562237	188568666	<i>LPP-AS1</i>	3q28	LPP antisense RNA 1
188688781	188688866	<i>MIR28</i>	3q28	microRNA 28
188989385	188990135	<i>LOC647299</i>	3q28	enolase-phosphatase 1 pseudogene
189032961	189073255	<i>LOC102724756</i>		uncharacterized LOC102724756
189099442	189323482	<i>TPRG1</i>	3q28	tumor protein p63 regulated 1
189238686	189240594	<i>TPRG1-AS2</i>		TPRG1 antisense RNA 2

189631160	189897279	<i>TP63</i>	3q28	tumor protein p63
189829922	189830009	<i>MIR944</i>	3q28	microRNA 944
189956728	190122437	<i>LEPREL1</i>	3q28	leprecan-like 1
189969030	189969861	<i>MTAPP2</i>		methylthioadenosine phosphorylase pseudogene 2
190121001	190129355	<i>LOC101929152</i>		uncharacterized LOC101929152
190166764	190167629	<i>NMNAT1P3</i>	3q28	NMNAT1 pseudogene 3
190305701	190322446	CLDN1	3q28-q29	claudin 1
190350783	190362291	<i>LOC102724779</i>		uncharacterized LOC102724779
190387872	190412143	<i>CLDN16</i>	3q28	claudin 16
190428655	190449876	<i>TMEM207</i>	3q28	transmembrane protein 207
190514051	190657197	<i>IL1RAP</i>	3q28	interleukin 1 receptor accessory protein
190624599	190625166	<i>GCNT1P3</i>		glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 pseudogene 3
190714708	190717377	<i>CCT6P4</i>	3q28	chaperonin containing TCP1, subunit 6 (zeta) pseudogene 4
190830965	190832173	<i>LOC100131685</i>	3q28	enabled homolog (Drosophila) pseudogene
190852737	190892401	<i>GMNC</i>	3q28	geminin coiled-coil domain containing
190877930	190878050	<i>SNAR-1</i>	3q28	small ILF3/NF90-associated RNA

H2' de 12.kromozomda bulunan 77,969,441-82,013,098 pozisyonları arasındaki 4,04 Mb'lık delesyon bölgesi içerisindeki genler NCBI veritabanından bulunmuş ve Tablo 4-7' te listelenmiştir.

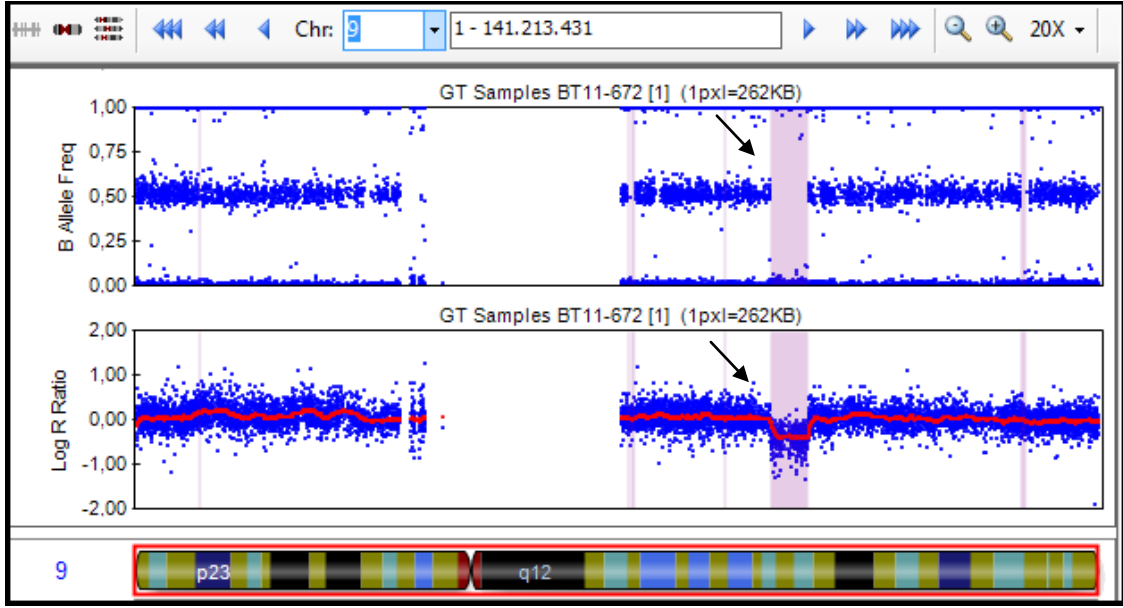
Tablo 4-7: H2 Kodlu Bireyde 12.Kromozomdaki Delesyon Bölgesindeki Genler

Başlangıç	Bitiş	Sembol	Sitogenetik Pozisyon	Açıklama
78171434	78177361	<i>LOC101928207</i>		uncharacterized LOC101928207
78224685	78606790	<i>NAV3</i>	12q14.3	neuron navigator 3
78524113	78524775	<i>LOC100420900</i>		family with sequence similarity 213, member A pseudogene
78720460	78753526	<i>LOC100507498</i>		uncharacterized LOC100507498
78867094	78867203	<i>MRPL11P3</i>	12q21.2	mitochondrial ribosomal protein L11 pseudogene 3
79187304	79187894	<i>LOC642550</i>	12q21.2	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related) pseudogene
79257773	79845788	<i>SYT1</i>	12cen-q21	synaptotagmin I
79701467	79702647	<i>LOC100420794</i>		RE1-silencing transcription factor pseudogene
79813037	79813101	<i>MIR1252</i>	12q24.23	microRNA 1252
79893802	79894530	<i>LOC101928252</i>		zinc finger protein 680-like
79985745	80084877	<i>PAWR</i>	12q21	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
80167343	80329235	<i>PPP1R12A</i>	12q15-q21	protein phosphatase 1, regulatory subunit 12A
80272085	80272199	<i>RNA5SP363</i>		RNA, 5S ribosomal pseudogene 363
80328722	80334313	<i>LOC101928294</i>		uncharacterized LOC101928294
80399767	80400355	<i>HSPD1P20</i>		heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) pseudogene 20
80422657	80423480	<i>RPL7P38</i>	12q21.31	ribosomal protein L7 pseudogene 38
80496639	80497137	<i>RPL26P32</i>	12q21.31	ribosomal protein L26 pseudogene 32
80524305	80525599	<i>LOC101928367</i>		uncharacterized

				LOC101928367
80583151	80772870	<i>OTOGL</i>	12q21.31	OTTHUMP00000242943
80838126	81073968	<i>PTPRQ</i>	12q21.2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, Q
80849235	80852596	<i>LOC101928395</i>		Uncharacterized LOC101928395
80954792	80955323	<i>LOC100418731</i>		akirin 1 pseudogene
81101408	81103257	<i>MYF6</i>	12q21	myogenic factor 6 (herculin)
81110708	81113447	<i>MYF5</i>	12q21	myogenic factor 5
81158001	81163670	<i>LOC101928420</i>		uncharacterized LOC101928420
81191171	81331702	<i>LIN7A</i>	12q21	lin-7 homolog A (C. elegans)
81226312	81226408	<i>MIR617</i>	12q21.31	microRNA 617
81254104	81255263	<i>LOC100420442</i>		tripartite motif-containing 75 pseudogene
81329515	81329612	<i>MIR618</i>	12q21.31	microRNA 618
81471797	81650538	<i>ACSS3</i>	12q21.31	acyl-CoA synthetase short- chain family member 3
81552167	81552240	<i>MIR4699</i>		microRNA 4699
81652045	82153109	<i>PPFIA2</i>	12q21.31	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 2

4.2.3. H3 (11-672) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları

H3 kodlu bireyin verisinin GenomeStudio programında yapılan görsel analizinde 9. kromozomunda delesyon tespit edilmiştir. Delesyon bölgesi için B allel frekansı ve LRR değeri birlikte incelendiğinde delesyonu doğruladığı görülmüştür. Delesyona ait GenomeStudio görüntüsü Şekil 4-6' da verilmiştir.



Şekil 4-6: H3 Kodlu Bireyde 9q22 ‘ deki Delesyona ait GenomeStudio Veri Görüntüsü

Ardından cnvPartition eklentisi ile birey için yapılan raporlamada da kromozom 9’ da 92,925,179-98,459,777 pozisyonları arasında 5,53 Mb’ lık bir delesyon olduğu teyit edilmiştir. cnvPartition raporlaması aşağıda Tablo 4-8’ de verilmiştir.

Tablo 4-8: H3 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H3	9	92.925.179	98.459.777	5,53	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	Kırk noktalarındaki genler incelendi.
H3	11	50.474.459	51.306.592	0,83	1	Chromosome browser' da elendi.	YOK
H3	Bireyde genom boyu toplam 150,60 Mb Kopya Nötral LOH (Heterozigote Kaybı) bölgesi tespit edildi.						

CNV analiz raporunda da bireyde 9q22 bölgesinde tespit edilen delesyon bulunmuştur ve doğruluğu teyit edilmiştir. Bireyin 9.kromozomundaki delesyon bölgesi içerisindeki genler NCBI veritabanından pozisyon bilgileri girilerek bulunmuş ve aşağıda Tablo 4-9’ da listelenmiştir.

Tablo 4-9: H3 Kodlu Bireyde 9.Kromozomda Bulunan Delesyon Bölgesindeki Genler

Başlangıç	Bitiş	Sembol	Sitogenetik Pozisyon	Açıklama
92978508	92979164	<i>OR7E31P</i>	9q22.2	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 31 pseudogene
92994381	92995406	<i>OR7E116P</i>	9q22.2	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 116 pseudogene
93063184	93195787	<i>LOC101927873</i>		uncharacterized LOC101927873
93224714	93345028	<i>LOC340515</i>	9q22.2	uncharacterized LOC340515
93372114	93405108	<i>DIRAS2</i>	9q22.2	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2
93504784	93505730	<i>OR7E109P</i>	9q22.2	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 109 pseudogene
93513500	93514522	<i>OR7E108P</i>	9q22.2	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 108 pseudogene
93564012	93660842	<i>SYK</i>	9q22	spleen tyrosine kinase
93825576	93837414	<i>LOC100129316</i>	9q22.2	uncharacterized LOC100129316
93867239	93881310	<i>LOC100507103</i>		uncharacterized LOC100507103
93976097	94124215	<i>AUH</i>	9q22.31	methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial
94171327	94186908	<i>NFIL3</i>	9q22	nuclear factor, interleukin 3 regulated
94246688	94249578	<i>LOC101927916</i>		uncharacterized LOC101927916
94373548	94374813	<i>PAICSP2</i>	9q22	phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase pseudogene 2
94398533	94398643	<i>MIR3910-1</i>		microRNA 3910-1
94398546	94398627	<i>MIR3910-2</i>		microRNA 3910-2
94484878	94712444	<i>ROR2</i>	9q22	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2

94614239	94615233	<i>LOC101927935</i>		uncharacterized LOC101927935
94768306	94768859	<i>RPL21P82</i>	9q22.31	ribosomal protein L21 pseudogene 82
94789780	94790103	<i>HSPE1P22</i>	9q22.31	heat shock 10kDa protein 1 pseudogene 22
94793416	94877756	<i>SPTLC1</i>	9q22.2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1
94866707	94867730	<i>LOC100420896</i>		UPF0607 protein ENSP00000381418- like pseudogene
94873147	94874114	<i>MTND4P15</i>		MT-ND4 pseudogene 15
94895116	94900911	<i>LOC100128076</i>	9q22.31	protein tyrosine phosphatase pseudogene
94903749	94921890	<i>LINC00475</i>	9q22.31	long intergenic non-protein coding RNA 475
94933513	94935776	<i>BEND3P2</i>	9q22.31	BEN domain containing 3 pseudogene 2
94972489	95056038	<i>IARS</i>	9q21	isoleucyl-tRNA synthetase
95054740	95054829	<i>MIR3651</i>		microRNA 3651
95054743	95054875	<i>SNORA84</i>	9q22.31	small nucleolar RNA, H/ACA box 84
95059640	95087876	<i>NOL8</i>	9q22.31	nucleolar protein 8
95087741	95377446	<i>CENPP</i>	9q22.31	centromere protein P
95101952	95102792	<i>LOC100420779</i>		chromosome 16 open reading frame 70 pseudogene
95146249	95166976	<i>OGN</i>	9q22	osteoglycin
95176527	95186836	<i>OMD</i>	9q22.31	osteomodulin
95218487	95244844	<i>ASPN</i>	9q22	asporin
95255829	95298374	<i>ECM2</i>	9q22.3	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific
95290266	95290340	<i>MIR4670</i>		microRNA 4670
95375466	95432547	<i>IPPK</i>	9q22.31	inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase

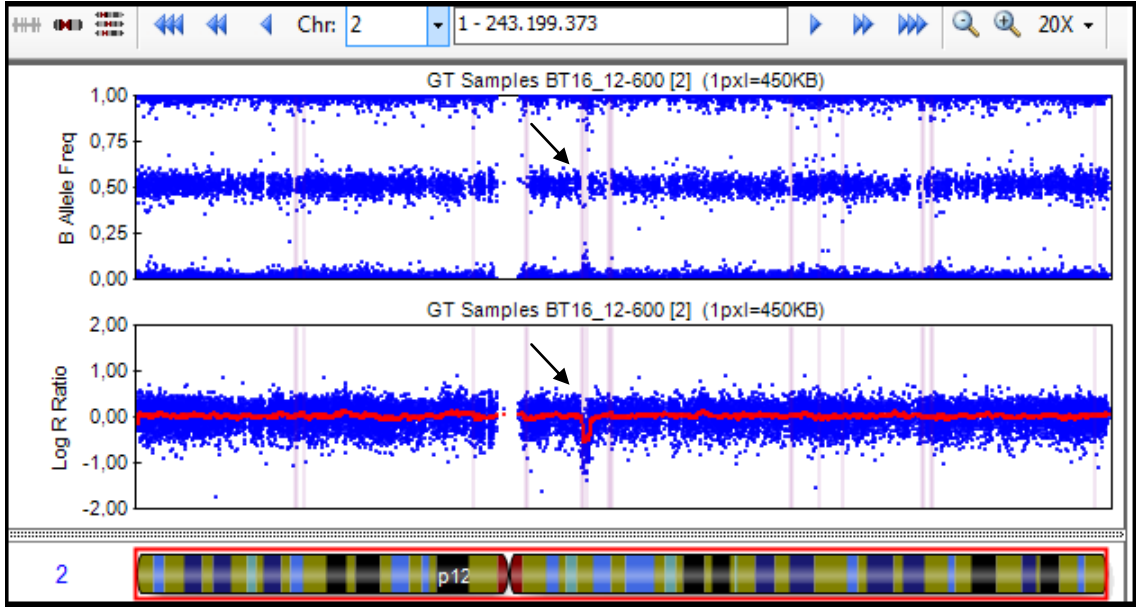
95380332	95382815	<i>LOC100128361</i>	9q22.31	uncharacterized LOC100128361
95439179	95439729	<i>RPL21P86</i>	9q22.31	ribosomal protein L21 pseudogene 86
95473645	95527083	<i>BICD2</i>	9q22.31	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)
95567667	95570649	<i>LOC101929748</i>		synaptojanin-1-like
95570828	95571599	<i>LOC101060123</i>		uncharacterized LOC101060123
95571893	95600739	<i>ANKRD19P</i>	9q22.31	ankyrin repeat domain 19, pseudogene
95599048	95600023	<i>EEF1DP2</i>	9q22.31	eukaryotic translation elongation factor 1 delta pseudogene 2
95603237	95603970	<i>LOC100419515</i>		zinc finger protein 41 pseudogene
95607313	95640320	<i>ZNF484</i>	9q22.31	zinc finger protein 484
95644821	95650702	<i>LOC642943</i>	9q22.31	SPATA31 subfamily A pseudogene
95655950	95656787	<i>SNX18P2</i>	9q22.31	sorting nexin 18 pseudogene 2
95675441	95683839	<i>ALOX15P2</i>	9q22.31	arachidonate 15-lipoxygenase pseudogene 2
95709601	95798518	<i>FGD3</i>		FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3
95770397	95777226	<i>LOC101927954</i>		uncharacterized LOC101927954
95820989	95847420	<i>SUSD3</i>	9q22.31	sushi domain containing 3
95824233	95826858	<i>LOC101927976</i>		uncharacterized LOC101927976
95853957	95857786	<i>LOC101927993</i>		uncharacterized LOC101927993
95858450	95875565	<i>C9orf89</i>	9q22.31	chromosome 9 open reading frame 89
95883771	95896570	<i>NINJ1</i>	9q22	ninjurin 1
95946437	96082854	<i>WNK2</i>	9q22.3	WNK lysine deficient protein kinase 2
96080481	96108696	<i>C9orf129</i>	9q22.31	chromosome 9 open reading frame 129
96208776	96215874	<i>FAM120AOS</i>	9q22.31	family with sequence similarity 120A opposite strand
96214173	96328397	<i>FAM120A</i>	9q22.31	family with sequence similarity 120A
96256004	96257274	<i>LOC100419516</i>		CTAGE family, member 5 pseudogene

96338909	96441869	<i>PHF2</i>	9q22.31	PHD finger protein 2
96357123	96357176	<i>MIR548AU</i>		microRNA 548au
96433303	96435032	<i>LOC101929519</i>		mucin-2-like
96581639	96581703	<i>MIR4291</i>		microRNA 4291
96619365	96620609	<i>LOC101928014</i>		uncharacterized LOC101928014
96713909	96717608	<i>BARX1</i>	9q12	BarH-like homeobox 1
96718116	96720204	<i>LOC101928040</i>		uncharacterized LOC101928040
96793076	96872138	<i>PTPDC1</i>	9q22.32	protein tyrosine phosphatase domain containing 1
96800312	96800627	<i>CYCSP24</i>	9q22.32	cytochrome c, somatic pseudogene 24
96938239	96938318	<i>MIRLET7A1</i>	9q22.32	microRNA let-7a-1
96938629	96938715	<i>MIRLET7F1</i>	9q22.32	microRNA let-7f-1
96938851	96966848	<i>MIRLET7DHG</i>	9q22.32	MIRLET7D host gene (non-protein coding)
96941116	96941202	<i>MIRLET7D</i>	9q22.32	microRNA let-7d
97021578	97065291	<i>ZNF169</i>	9q22.32	zinc finger protein 169
97048814	97050837	<i>VDAC1P11</i>		voltage-dependent anion channel 1 pseudogene 11
97080478	97090926	<i>NUTM2F</i>	9q22.32	NUT family member 2F
97094758	97123230	<i>LOC100132077</i>	9q22.32	uncharacterized LOC100132077
97109492	97109845	<i>LOC728026</i>	9q22.32	prothymosin alpha-like
97136833	97223202	<i>HIATL1</i>	9q22.32	hippocampus abundant transcript-like 1 yrdC N(6)-
97194916	97195538	<i>YRDCP1</i>		threonylcarbamoyltransferase domain containing pseudogene 1
97258554	97271866	<i>LOC100421692</i>		leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family) pseudogene
97317351	97331038	<i>LOC101928099</i>		uncharacterized LOC101928099
97321002	97356075	<i>FBP2</i>	9q22.3	fructose-1,6-bisphosphatase 2

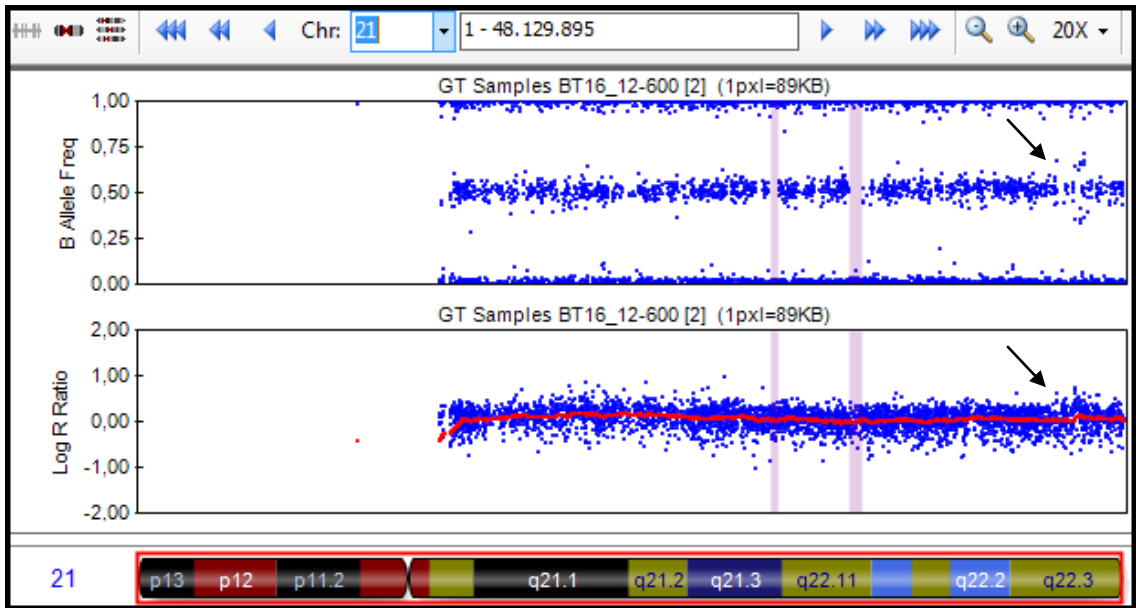
97365415	97402531	<i>FBP1</i>	9q22.3	fructose-1,6-bisphosphatase 1
97488886	97849500	<i>C9orf3</i>	9q22.32	chromosome 9 open reading frame 3
97572244	97572339	<i>MIR2278</i>		microRNA 2278
97683627	97699900	<i>LOC101928119</i>		uncharacterized LOC101928119
97847490	97847586	<i>MIR23B</i>	9q22.32	microRNA 23b
97847727	97847823	<i>MIR27B</i>	9q22.32	microRNA 27b
97848296	97848376	<i>MIR3074</i>	9q22.32	microRNA 3074
97848303	97848370	<i>MIR24-1</i>	9q22.32	microRNA 24-1
97861336	98079991	<i>FANCC</i>	9q22.3	Fanconi anemia, complementation group C
97885803	97886150	<i>RPS26P37</i>	9q22.3	ribosomal protein S26 pseudogene 37
98054620	98057089	<i>LOC643342</i>	9q22.32	ATM interactor pseudogene
98159485	98189074	<i>LOC101928148</i>		uncharacterized LOC101928148
98175399	98175797	<i>MT1P1</i>	9q22.32	metallothionein 1 pseudogene 1
98205264	98279247	<i>PTCH1</i>	9q22.3	patched 1
98225891	98232301	<i>LOC100507346</i>		uncharacterized LOC100507346
98415142	98415547	<i>PSMA7P</i>	9q22.32	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7 pseudogene

4.2.4. H4 (12-600) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları

H4 kodlu bireye ait veri incelendiğinde bireyde 2. kromozomda 111,392,259-223,200,014 pozisyonları arasında 1,71 Mb'lık delesyon 21. kromozomda 45,703,660-46,000,398 pozisyonları arasında 0,30 Mb'lık artış tespit edilmiştir. Bulgulara ait görsel GenomeStudio verileri sırası ile Şekil 4-7 ve Şekil 4-8' de verilmiştir.



Şekil 4-7: H4 Bireyinde Tespit Edilen 2. Kromozomdaki Delesyona Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü



Şekil 4-8: H4 Bireyinde Tespit Edilen 21. Kromozomdaki İnsersiyona Ait GenomeStudio Görüntüsü

H4 kodlu birey için cnvPartition ile yapılan raporlama sonuçları Tablo 4-10' da verilmiştir. Raporda kromozom 2' teki 1,71Mb' lık delesyon ve kromozom 21' deki 0,30 Mb' lık artış görülmektedir. BAF ve LRR değeri her iki değişim için de birbirini doğrulamaktadır.

Tablo 4-10: H4 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H4	2	111.392.259	113.100.014	1,71	1	Chromosome browser' da teyit edildi.	RT-qPZR ile yapıldı.
H4	21	45.703.660	46.000.398	0,30	3	Chromosome browser' da teyit edildi.	RT-qPZR ile yapıldı.
H4	Bireyde genom boyu toplam 49,31 Mb'lık Kopya Nötral LOH (Heterozigote Kaybı) bölgesi tespit edildi.						

Bireyin verisinde tespit edilen 2. kromozomdaki delesyon ve 21. kromozomdaki artış için pozisyon bilgilerinden faydalanılarak NCBI veritabanından bu bölgelerdeki genler sırası ile Tablo 4-11 ve Tablo 4-12' de listelenmiştir. Validasyon aşaması için 2. kromozomdaki delesyon bölgesi içerisindeki *FBLN7* geni, 21. kromozomdaki artış bölgesi içerisinde de *TRPM2* geni seçilmiştir.

Tablo 4-11: H4 Bireyinde 2. Kromozomdaki Delesyon Bölgesindeki Genler

Başlangıç	Bitiş	Sembol	Sitogenetik Pozisyon	Açıklama
110969106	110980517	<i>LINC00116</i>	2q13	long intergenic non-protein coding RNA 116
111003215	111024136	<i>LOC100507334</i>		two pore channel 3 pseudogene
111042430	111042520	<i>MIR4436B2</i>		microRNA 4436b-2
111118186	111121311	<i>LOC442041</i>	2q13	zinc finger protein 532 pseudogene
111132686	111142113	<i>LINC01106</i>	2q13	long intergenic non-protein coding RNA 1106
111140689	111142220	<i>ZBTB45P2</i>	2q13	zinc finger and BTB domain containing 45 pseudogene 2
111160494	111181393	<i>LOC100288570</i>	2q13	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment protein 1

				homolog (yeast) pseudogene
111194191	111230652	<i>LIMS3L</i>	2q13	LIM and senescent cell antigen-like domains 3-like
111271379	111336309	<i>RGPD6</i>	2q13	RANBP2-like and GRIP domain containing 6
111391269	111392074	<i>RPL22P12</i>	2q13	ribosomal protein L22 pseudogene 12
111395275	111435684	<i>BUB1</i>	2q14	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase
111490150	111875799	<i>ACOXL</i>	2q13	acyl-CoA oxidase-like
111725353	111726357	<i>RPL5P9</i>	2q13	ribosomal protein L5 pseudogene 9
111855922	111871762	<i>FLJ44006</i>	2q13	uncharacterized FLJ44006
111878491	111926022	<i>BCL2L11</i>	2q13	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
112003803	112006256	<i>LOC101927260</i>		uncharacterized LOC101927260
112023025	112037036	<i>LOC101927283</i>		uncharacterized LOC101927283
112053133	112053658	<i>RPS14P4</i>	2q13	ribosomal protein S14 pseudogene 4
112078590	112078663	<i>MIR4435-2</i>		microRNA 4435-2
112124579	112252692	<i>MIR4435-1HG</i>	2q13	MIR4435-1 host gene (non-protein coding)
112141139	112142720	<i>PAFAH1B1P2</i>	2q13	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 pseudogene 2
112315977	112317514	<i>DBF4P2</i>		DBF4 zinc finger pseudogene 2
112369476	112372164	<i>LOC101927306</i>		uncharacterized LOC101927306
112432603	112432920	<i>RPL34P8</i>	2q12.1	ribosomal protein L34 pseudogene 8
112500891	112502239	<i>LOC100133059</i>	2q13	centromere protein N pseudogene

112525214	112641765	<i>ANAPC1</i>	2q12.1	anaphase promoting complex subunit 1
112528638	112528711	<i>MIR4771-2</i>		microRNA 4771-2
				eukaryotic translation
112645463	112647062	<i>LOC100130388</i>	2q13	elongation factor 1 epsilon 1 pseudogene
112656056	112797293	<i>MERTK</i>	2q14.1	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase
112697695	112698632	<i>LOC100420892</i>		chromosome 14 open reading frame 166 pseudogene
112709748	112710248	<i>LOC100422091</i>		solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6 pseudogene
112812800	112876895	<i>TMEM87B</i>	2q13	transmembrane protein 87B
112895962	112945793	<i>FBLN7</i>	2q13	fibulin 7
112973439	113012664	<i>ZC3H8</i>	2q13	zinc finger CCCH-type containing 8
113033178	113097640	<i>ZC3H6</i>	2q13	zinc finger CCCH-type containing 6
113103622	113104482	<i>LOC100418696</i>		axin 2 pseudogene
113125946	113191222	<i>RGPD8</i>	2q13	RANBP2-like and GRIP domain containing 8

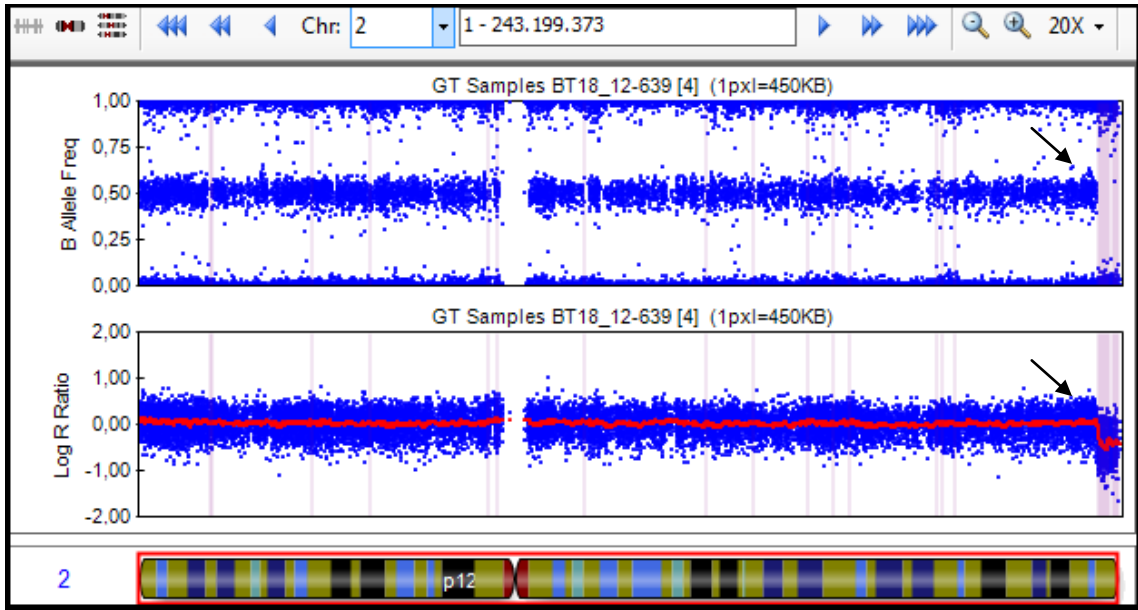
Tablo 4-12: H4 Kodlu Bireyde 21.Kromozomdaki İnsersiyon Bölgesindeki Genler

Başlangıç	Bitiş	Sembol	Sitogenetik Pozisyon	Açıklama
45666222	45682099	<i>DNMT3L</i>	21q22.3	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like
45705721	45718102	<i>AIRE</i>	21q22.3	autoimmune regulator
45719925	45747261	<i>PFKL</i>	21q22.3	phosphofruktokinase, liver
45748827	45759285	<i>C21orf2</i>	21q22.3	chromosome 21 open reading frame 2
45770046	45862964	TRPM2	21q22.3	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
45834473	45845525	<i>TRPM2-AS</i>		transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
45870869	45875167	<i>LRRC3-AS1</i>	21q22.3	LRRC3 antisense RNA 1 (head to head)
45875393	45878739	<i>LRRC3</i>	21q22.3	leucine rich repeat containing 3
45878827	45882079	<i>LRRC3DN</i>	21q22.3	LRRC3 downstream neighbor (non-protein coding)
45892778	45893622	<i>MTND6P21</i>		MT-ND6 pseudogene 21
45893621	45894956	<i>MTND5P1</i>		MT-ND5 pseudogene 1
45905454	45911025	<i>LOC100505727</i>		uncharacterized LOC100505727
45917775	46131495	<i>TSPEAR</i>	21q22.3	thrombospondin-type laminin G domain and EAR repeats
45925927	45936458	<i>TSPEAR-AS1</i>	21q22.3	TSPEAR antisense RNA 1
45937098	45938860	<i>C21orf90</i>	21q22.3	chromosome 21 open reading frame 90
45959068	45960078	<i>KRTAP10-1</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-1
45970240	45971388	<i>KRTAP10-2</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-2
45977906	45978643	<i>KRTAP10-3</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-3
45993606	45994987	<i>KRTAP10-4</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-4
45999564	46000481	<i>KRTAP10-5</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-5

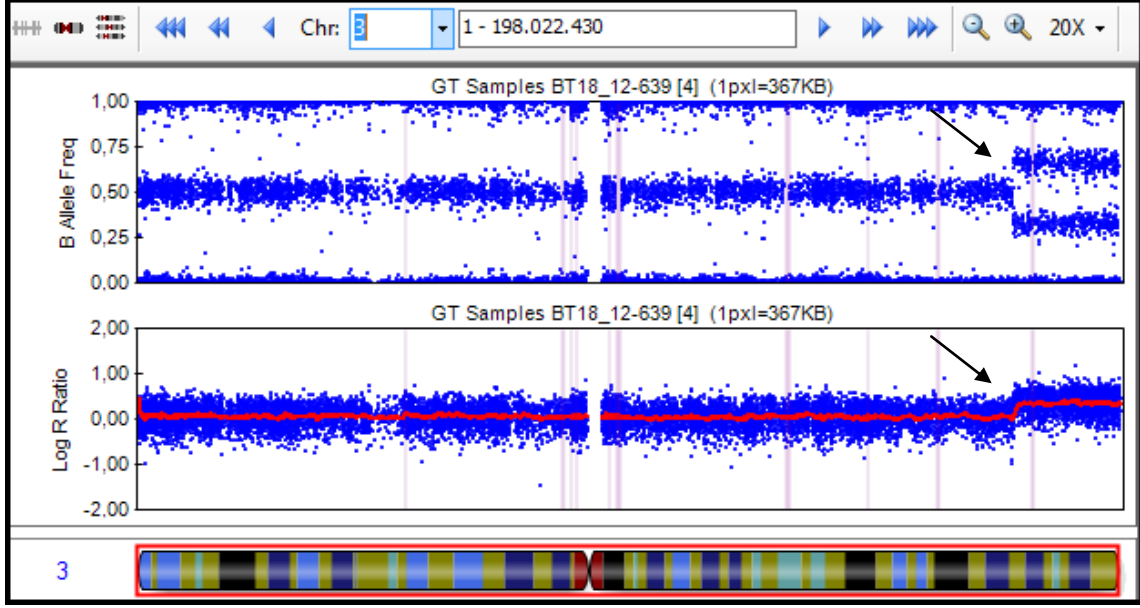
46011149	46012386	<i>KRTAP10-6</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-6
46020497	46022091	<i>KRTAP10-7</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-7
46031996	46032871	<i>KRTAP10-8</i>	21q22.3	keratin associated protein 10-8

4.2.5. H5 (12-639) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları

Veri öncelikle GenomeStudio programında görsel olarak incelendiğinde 2. kromozomun terminal bölgesinde 237,531,744-243,029,573 pozisyonları arasında 5.50 Mb'lık delesyon ve 3.kromozomun terminal bölgesinde 176,471,332-197,845,233 pozisyonları arasında 21,37 Mb'lık artış bölgesi tespit edilmiştir. Bu bölgelere ait GenomeStudio görselleri sırası ile Şekil 4-9 ve Şekil 4-10 'da verilmiştir.



Şekil 4-9: H5 Kodlu Bireyde Tespit Edilen 2.Kromozomdaki Delesyona Ait GenomeStudio Görüntüsü



Şekil 4-10: H5 Kodlu Bireyde 3.Kromozomdaki İnsersiyona Ait GenomeStudio Görüntüsü
Bireye ait cnvPartition eklentisi ile yapılan raporlama Tablo 4-13' te verilmiştir.

Tablo 4-13: H5 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H5	1	147.806.652	149.400.252	1,59	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H5	2	237.531.744	243.029.573	5,50	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	Kırık noktalarındaki genler incelendi.
H5	3	176.471.332	197.845.233	21,37	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	Kırık noktalarındaki genler incelendi.
H5	7	57.246.707	57.789.531	0,54	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H5	7	62.109.713	62.453.303	0,34	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H5	9	40.215.520	42.374.011	2,16	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H5	14	106.350.394	106.778.425	0,43	4	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H5	15	20.426.498	22.576.118	2,15	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H5	16	32.822.528	33.901.152	1,08	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H5	Bireyde genom boyu toplan 20,75 Mb' lık Kopya Nötral LOH (Heterozigote Kaybı) bölgesi tespit edildi.						

H5 kodlu bireyde 2. Kromozomdaki delesyon bölgesindeki genler Tablo 4-14' te listelenmiştir.

Tablo 4-14: H5 Kodlu Bireyde 2. Kromozomdaki Delesyon Bölgesindeki Genler

Başlangıç	Bitiş	Sembol	Sitogenetik Pozisyon	Açıklama
237957242	237964810	<i>LOC93463</i>	2q37.3	uncharacterized LOC93463
237993870	238007489	<i>COPS8</i>	2q37.3	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8
238232655	238322850	<i>COL6A3</i>	2q37	collagen, type VI, alpha 3
238395053	238463961	<i>MLPH</i>	2q37.3	melanophilin
238475217	238475818	<i>PRLH</i>	2q37.3	prolactin releasing hormone
238482965	238499769	<i>RAB17</i>	2q37.3	RAB17, member RAS oncogene family
238536224	238690290	<i>LRRFIP1</i>	2q37.3	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
238707032	238751451	<i>RBM44</i>	2q37.3	RNA binding motif protein 44
238768187	238820756	<i>RAMP1</i>	2q36-q37.1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1
238875587	238951423	<i>UBE2F</i>	2q37.3	ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)
238875587	239008054	<i>UBE2F-SCLY</i>		UBE2F-SCLY readthrough (NMD candidate)
238969565	239008054	<i>SCLY</i>	2q37.3	selenocysteine lyase
239008951	239041928	<i>ESPNL</i>	2q37.3	espin-like
239047310	239061547	<i>KLHL30</i>	2q37.3	kelch-like family member 30
239060579	239077516	<i>FAM132B</i>	2q37.3	family with sequence similarity 132, member B
239079043	239112343	<i>ILKAP</i>	2q37.3	integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase
239133754	239140318	<i>LOC151174</i>	2q37.3	uncharacterized LOC151174

239140327	239142986	<i>LOC643387</i>	2q37.3	TAR DNA binding protein pseudogene
239143097	239145847	<i>LOC101927958</i>		uncharacterized LOC101927958
239146908	239148681	<i>HES6</i>	2q37.3	hes family bHLH transcription factor 6
239152679	239198678	<i>PER2</i>	2q37.3	period circadian clock 2
239229185	239309541	<i>TRAF3IP1</i>	2q37.3	TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1
239335382	239360891	<i>ASB1</i>	2q37	ankyrin repeat and SOCS box containing 1
239363163	239363837	<i>LOC100419686</i>		zinc finger protein 256 pseudogene
239419331	239464140	<i>LINC01107</i>	2q37.3	long intergenic non-protein coding RNA 1107
239753187	239756320	<i>LOC100287387</i>	2q37.3	uncharacterized LOC100287387
239756673	239795893	<i>TWIST2</i>	2q37.3	twist family bHLH transcription factor 2
239831979	239832237	<i>TWIST2</i>	2q37.3	twist family bHLH transcription factor 2
239840998	239847965	<i>FLJ43879</i>	2q37.3	FLJ43879 protein
239969864	240323346	<i>HDAC4</i>	2q37.3	histone deacetylase 4
239990513	239990610	<i>MIR4440</i>		microRNA 4440
240007523	240007622	<i>MIR4441</i>		microRNA 4441
240115027	240117153	<i>MGC16025</i>	2q37.3	uncharacterized LOC85009
240227157	240227240	<i>MIR4269</i>		microRNA 4269
240273419	240273499	<i>MIR2467</i>		microRNA 2467
240323433	240324049	<i>LOC101928111</i>		uncharacterized LOC101928111
240499995	240507788	<i>FLJ45964</i>	2q37.3	uncharacterized FLJ45964

240684554	240722358	<i>LOC150935</i>	2q37.3	uncharacterized LOC150935
240832058	240851838	<i>LOC101927147</i>		uncharacterized LOC101927147
240882432	240882511	<i>MIR4786</i>		microRNA 4786
240896789	240964819	<i>NDUFA10</i>	2q37.3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa
240968382	240972324	<i>OR6B2</i>	2q37.3	olfactory receptor, family 6, subfamily B, member 2
240981230	240982399	<i>PRR21</i>	2q37.3	proline rich 21
240984494	240985489	<i>OR6B3</i>	2q37.3	olfactory receptor, family 6, subfamily B, member 3
241018850	241019777	<i>OR9S24P</i>	2q37.3	olfactory receptor, family 9, subfamily S, member 24 pseudogene
241048519	241049466	<i>OR5S1P</i>	2q37.3	olfactory receptor, family 5, subfamily S, member 1 pseudogene
241065980	241075764	<i>MYEOV2</i>	2q37.3	hCG_21693
241078446	241080073	<i>OTOS</i>	2q37.3	otospiralin
241375115	241407495	<i>GPC1</i>	2q35-q37	glypican 1
241388836	241396117	<i>PP14571</i>	2q37.3	uncharacterized LOC100130449
241395418	241395506	<i>MIR149</i>	2q37.3	microRNA 149
241418839	241500472	<i>ANKMY1</i>	2q37.3	ankyrin repeat and MYND domain containing 1
241499471	241503431	<i>DUSP28</i>	2q37.3	dual specificity phosphatase 28
241507952	241518149	<i>RNPEPL1</i>	2q37.3	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1
241522167	241525733	<i>CAPN10-AS1</i>	2q37.3	CAPN10 antisense RNA 1 (head to head)

241526133	241538526	<i>CAPN10</i>	2q37.3	calpain 10
241544825	241570676	<i>GPR35</i>	2q37.3	G protein-coupled receptor 35
241611820	241612514	<i>LOC100420500</i>		galactose-3-O-sulfotransferase 1 pseudogene
241615835	241622317	<i>AQP12B</i>	2q37.3	aquaporin 12B
241625751	241628539	<i>LOC285191</i>	2q37.3	uncharacterized LOC285191
241631262	241637900	<i>AQP12A</i>	2q37.3	aquaporin 12A
241653181	241759725	<i>KIF1A</i>	2q37.3	kinesin family member 1A
241808162	241818536	<i>AGXT</i>	2q37.3	alanine-glyoxylate aminotransferase
241825465	241836267	<i>C2orf54</i>	2q37.3	chromosome 2 open reading frame 54
241872287	241905525	<i>LOC728763</i>	2q37.3	rootletin-like
241894034	241906868	<i>LOC200772</i>	2q37.3	uncharacterized LOC200772
241906941	241931944	<i>LOC101927470</i>		putative ciliary rootlet coiled- coil protein-like 3 protein-like
241938213	242038515	<i>SNED1</i>	2q37.3	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
242026509	242041747	<i>MTERFD2</i>	2q37.3	MTERF domain containing 2
242045514	242089394	<i>PASK</i>	2q37.3	PAS domain containing serine/threonine kinase
242089012	242122439	<i>PPP1R7</i>	2q37.3	protein phosphatase-1 regulatory subunit 7 alpha1
242127924	242164791	<i>ANO7</i>	2q37.3	anoctamin 7
242166682	242255116	<i>HDLBP</i>	2q37.3	high density lipoprotein binding protein
242207191	242220114	<i>LOC101927509</i>		formin-like protein 18-like
242254723	242293442	<i>SEPT2</i>	2q37	septin 2
242295664	242434256	<i>FARP2</i>	2q37.3	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2

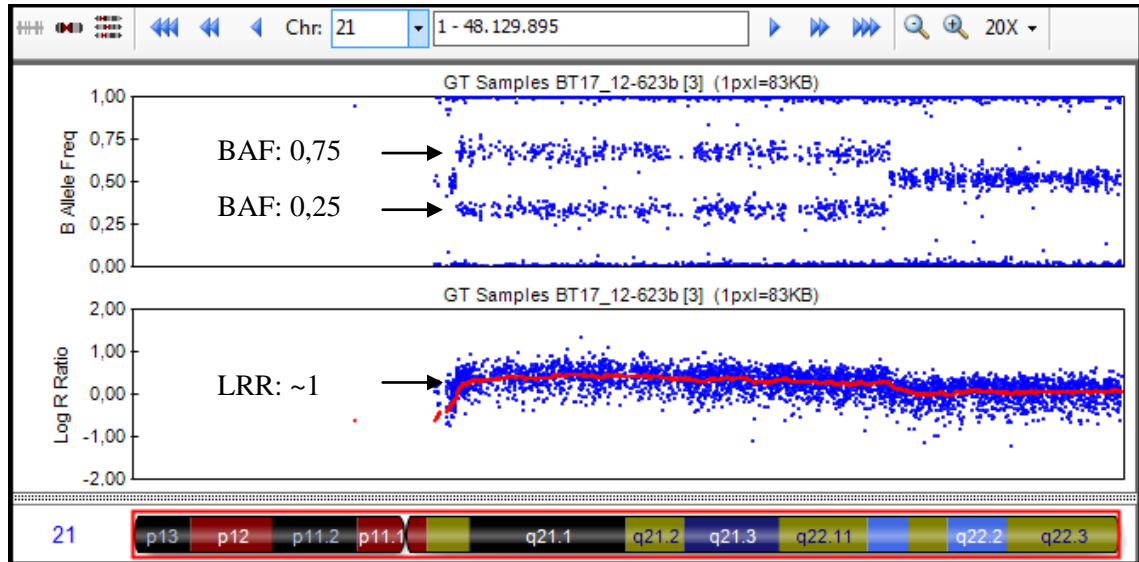
242417320	242417397	<i>MIR3133</i>		microRNA 3133
				potassium channel
242417726	242418405	<i>LOC100422094</i>		tetramerization domain containing 5 pseudogene OTTHUMP00000200205 Ste20, yeast
242434122	242449145	<i>STK25</i>	2q37.3	homolog serine/threonine kinase 25 serine/threonine kinase 25 (Ste20, yeast homolog)
242483799	242498558	<i>BOK-AS1</i>	2q37.3	BOK antisense RNA 1
242498146	242513553	<i>BOK</i>	2q37.3	BCL2-related ovarian killer
242523820	242576753	<i>THAP4</i>	2q37.3	THAP domain containing 4
242524383	242524490	<i>RNA5SP122</i>		RNA, 5S ribosomal pseudogene 122
242576775	242613272	<i>ATG4B</i>	2q37.3	autophagy related 4B, cysteine peptidase
242615157	242626383	<i>DTYMK</i>	2q37.3	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)
242627216	242633610	<i>LOC101927187</i>		uncharacterized LOC101927187
242641456	242668896	<i>ING5</i>	2q37.3	inhibitor of growth family, member 5
242674030	242708231	<i>D2HGDH</i>	2q37.3	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase
242716240	242743702	<i>GAL3ST2</i>	2q37.3	galactose-3-O-sulfotransferase 2
242749407	242751734	<i>LOC101927206</i>		uncharacterized LOC101927206
242749920	242758742	<i>NEU4</i>	2q37.3	sialidase 4
242792033	242801058	<i>PDCD1</i>	2q37.3	programmed cell death 1

242811886	242815482	<i>RTP5</i>	2q37.3	receptor (chemosensory) transporter protein 5 (putative)
242823517	242908523	<i>LINC01237</i>	2q37.3	long intergenic non-protein coding RNA 1237
242836139	242844774	<i>LOC285095</i>	2q37.3	uncharacterized LOC285095
242909140	242910397	<i>LOC101927349</i>		uncharacterized LOC101927349
242945675	242948164	<i>FLJ38379</i>	2q37.3	uncharacterized FLJ38379

H5 kodlu bireyde 3. kromozomdaki 21,37 Mb'lık insersiyon bölgesinde 223 tane gen bulunduğundan liste halinde verilememiştir.

4.2.6. H6 (12-623) Kodlu Bireyin CNV Analizi Sonuçları

21. Kromozomda 15,709,414- 36,816,352 pozisyonları arasında 21,11 Mb'lık parsiyel trizomi tespit edilmiştir. Bulguya ait GenomeStudio görüntüsü Şekil 4-11' de verilmiştir.



Şekil 4-11: H6 Kodlu Bireyde 21.Kromozomda Tespit Edilen Parsiyel Trizomi Verisi

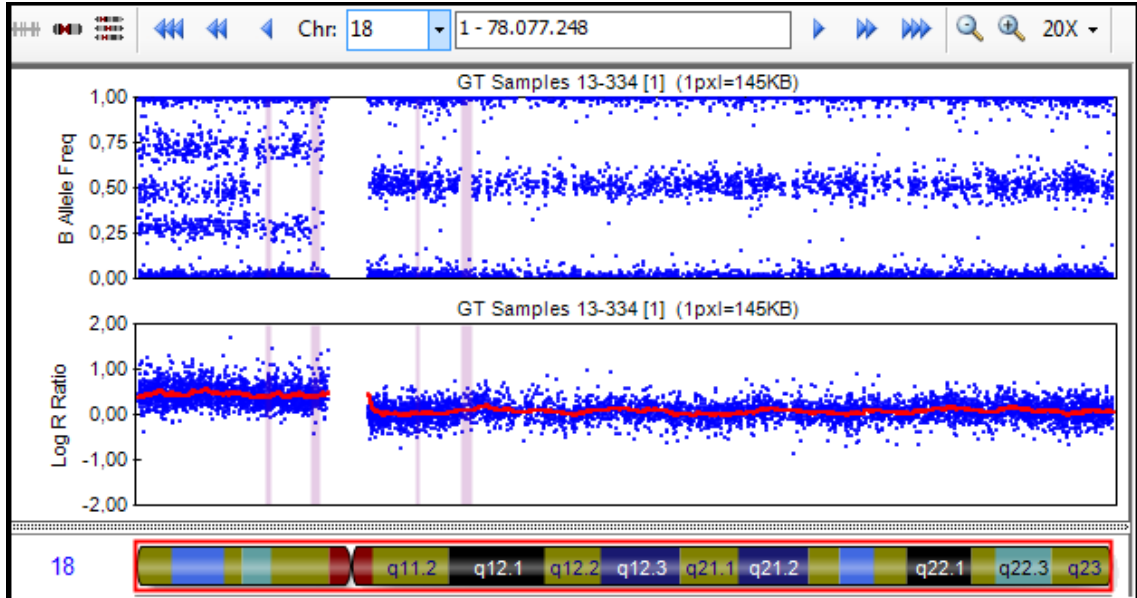
Tablo 4-15: H6 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H6	7	62.219.127	62.453.303	0,23	1	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H6	14	22.498.449	22.953.861	0,46	0	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H6	14	106.350.394	106.823.886	0,47	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H6	17	34.618.594	34.630.969	0,01	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H6	21	15.709.414	36.816.352	21,11	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H6	Bireyde genom boyu toplam 109, 22 Mb' LIK Kopya Nötral LOH (Heterozigote Kaybı) bölgesi tespit edilmiştir.						

Birey için cnvPartition eklentisi kullanılarak yapılan raporlama görüntüsü Tablo 4-15' de verilmiştir. Rapor da parsiyel trizomi bulgusunu desteklemektedir.

4.2.7. H7 (13-334) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları

GenomeStudio verisinde 18. kromozomda artışlar olduğu tespit edilmiştir. BAF ve LRR değerleri birlikte değerlendirildiğinde bu artışların 18p tetrazomisi olduğu tespit edilmiştir. 18. Kromozomdaki artışa ait GenomeStudio veri görüntüsü aşağıda Şekil 4-12' de verilmiştir.



Şekil 4-12: H7 Kodlu Bireyde 18. Kromozoma Ait Veri Görüntüsü

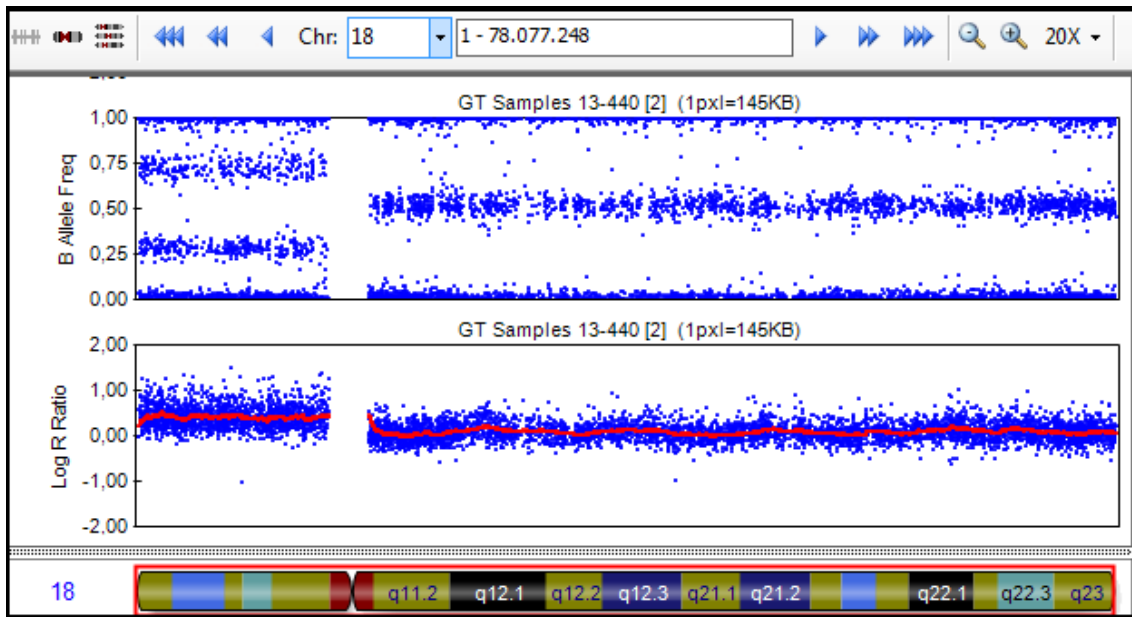
Tablo 4-16: H7 Kodlu Bireye Ait CNV Analizi Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H7	1	148.889.571	149.723.885	0,83	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H7	7	38.298.285	38.380.446	0,08	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H7	7	66.423.508	67.236.758	0,81	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H7	13	112.719.478	112.733.972	0,01	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H7	14	106.350.394	106.778.425	0,43	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H7	15	20.558.072	22.562.318	2,00	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H7	18	12.842	4.150.108	4,14	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H7	18	4.159.349	5.553.097	1,39	4	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H7	18	5.555.731	15.375.878	9,82	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK

Raporlamada (Tablo 4-16) 18. kromozomda 12,842-4,150,108 ve 5,555,731-15,375,878 pozisyonları arasında sırasıyla 4,14 Mb ve 9,82 Mb'lık artışların olduğu tespit edilmiştir.

4.2.8. H8 (13-440) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları

H8' in CNV analizinde 18. Kromozomun kısa kolunda artış gözlemlenmiştir. Artışa ait GenomeStudio veri görüntüsü Şekil 4-13' te gösterilmiştir. BAF ve LRR parametreleri birlikte değerlendirildiğinde bireyde 18p tetrazomisi olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4-13: H8 Kodlu Birey 18. Kromozoma Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü

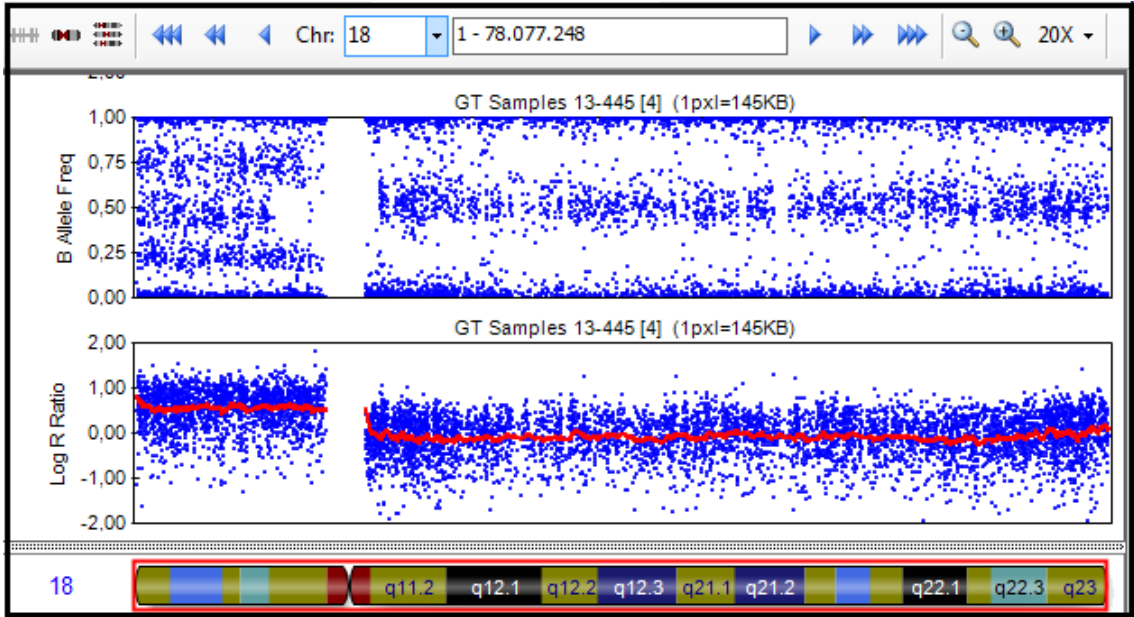
Tablo 4-17: H8 Kodlu Bireyin CNV Analiz Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H8	10	46.967.059	48.318.619	1,35156	1	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H8	18	12.842	15.375.878	15,363036	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H8	20	14.936.935	15.109.608	0,172673	1	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK

Rapor incelendiğinde (Tablo 4-17) 18. Kromozomda 12,842-15,375,878-pozisyonları arasında 15,36 Mb'lık artışı desteklediği görülmektedir. BAF ve LRR parametreleri birlikte değerlendirildiğinde 18p tetrazomisi olduğu tespit edilmiştir.

4.2.9. H9 (13-445) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları

H9 kodlu bireye ait GenomeStudio verisi incelendiğinde 18. Kromozomda artış gözlemlenmiştir. Aşağıda bu artışa ait veri görüntüsü Şekil 4-14' te verilmiştir.

**Şekil 4-14: H9 Kodlu Birey 18. Kromozoma Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü**

BAF ve LRR değerlendirildiğinde 18p tetrazomisi olduğu tespit edilmiştir.

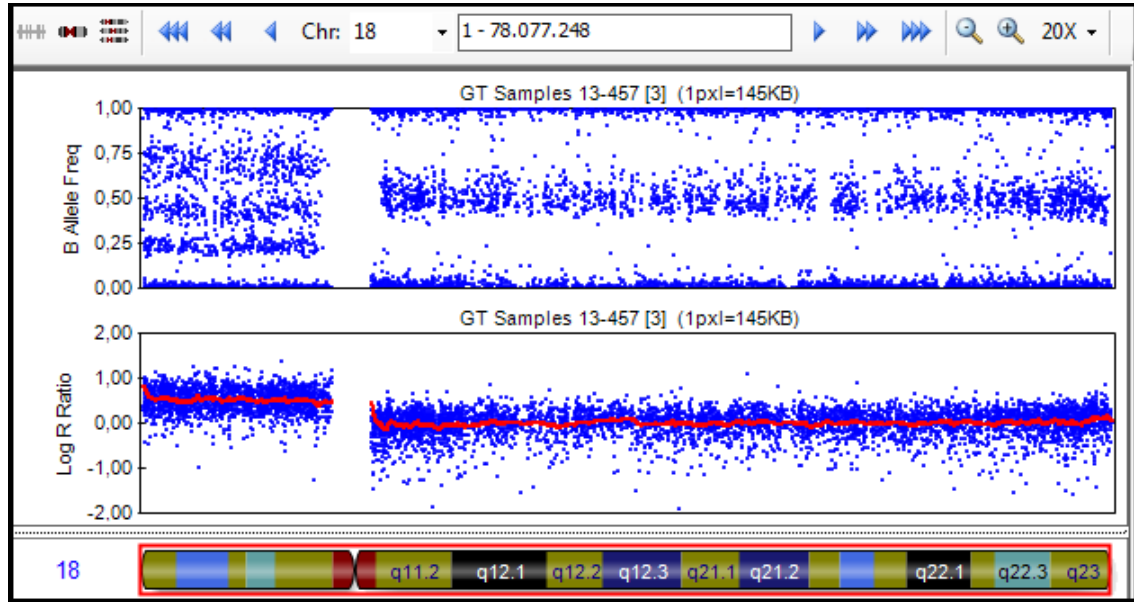
Tablo 4-18: H9 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H9	1	148.359.076	149.880.483	1,52	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H9	7	61.994.170	62.438.289	0,44	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H9	18	12.842	15.375.878	15,36	4	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H9	X	62.038.249	64.115.622	2,08	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H9	X	65.125.757	151.760.816	86,64	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H9	Y	9.931.428	10.091.529	0,16	4	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H9	Y	13.245.387	13.468.060	0,22	4	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H9	Y	20.828.795	22.230.508	1,40	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK

Tablo 4-18 incelendiğinde cnvPartition raporunun da 18. Kromozomda 12-842-15,375,878 pozisyonları arasında 15,36 Mb' lık bir artış olduğu tespit edilmiştir.

4.2.10. H10 (13-457) Kodlu Bireyin CNV Analiz Sonuçları

GenomeStudio verileri incelendiğinde 18. Kromozomun kısa kolunda artış olduğu tespit edilmiştir. BAF ve LRR birlikte değerlendirildiğinde bireyde 18p tetrazomisi olduğu görülmüştür. 18. Kromozom tetrazomisine ait GenomeStudio veri görüntüsü Şekil 4-15' te gösterilmiştir.



Şekil 4-15: H10 Kodlu Birey 18. Kromozoma Ait GenomeStudio Veri Görüntüsü

Tablo 4-19: H10 Kodlu Bireye Ait CNV Analiz Raporu

Örnek Adı	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Maksimum CNV Aralığı (Mb)	CNV Değeri	Yorum	Validasyon
H10	4	178.041.034	178.116.819	0,08	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	6	61.891.118	61.929.807	0,04	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	7	61.994.170	62.438.289	0,44	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	11	50.332.064	51.267.021	0,93	1	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	14	106.350.394	106.795.391	0,44	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	16	32.502.868	32.855.389	0,35	1	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	17	2.518.659	2.571.346	0,05	0	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	17	44.215.896	44.345.063	0,13	3	Chromosome Browser' da elendi.	YOK
H10	18	12.842	14.085.167	14,07	4	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H10	18	14.090.271	15.375.878	1,29	3	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK
H10	X	57.710.528	58.339.545	0,63	0	Chromosome Browser' da teyit edildi.	YOK

Rapor incelendiğinde (Tablo 4-19) 18. kromozomda 12,842-14,085,167 pozisyonları arasında 14,07 Mb'lık ve 14,090,217-15,375,878 pozisyonları arasında 1,29 Mb'lık artışlar olduğu tespit edilmiştir.

4.3 Validasyon Sonuçları

Bireylerde tespit edilen artış ve azalış görülen bölgelerden seçilen genlerin Gerçek Zamanlı-qPZR ile validasyonu yapılmıştır. Hangi CNV'lerin validasyonunun yapılacağına karar verilirken CNV'nin yapısı ve büyüklüğü göz önüne alınmıştır. Tespit edilen CNV'lerin yapılan analizlerde BAF ve LRR değerleri detaylı incelenerek gerçekliğinin tespit edilmesinin ardından küçük boyutlu CNV'lerin Gerçek Zamanlı-qPZR ile validasyonunun yapılmıştır. Küçük boyutlu ve şimdiye kadar herhangi bir hastalık veya fenotip ile ilişkilendirilmemiş olanlar yeni CNV bölgesi olmaya aday olabilir. Büyük boyutlu CNV'ler daha önce birçok hastalık ve fenotiple ilişkilendirilmiş olabilirler veritabanlarından pek çok bilgiye ulaşılabilir. Major CNV bölgelerinin validasyonunun yapılmaması tercih edilmiştir. Bu bölgelerde bulunan CNV'ler için kırık noktaları ve kırık noktaları içerisinde bulunan genlerin incelemesi yapılmıştır. Kırık noktalarının başlangıç ve bitiş bölgelerine denk gelen genlerin bireylerin fenotipleri ile ilişkili olup olmayacağı araştırılmıştır. Validasyon aşaması için bireylerde tespit edilen CNV bölgelerinden seçilen genler ve açıklamalar aşağıda Tablo 4-20' de verilmiştir.

Tablo 4-20: Validasyon için Seçilen Bireyler ve Genler

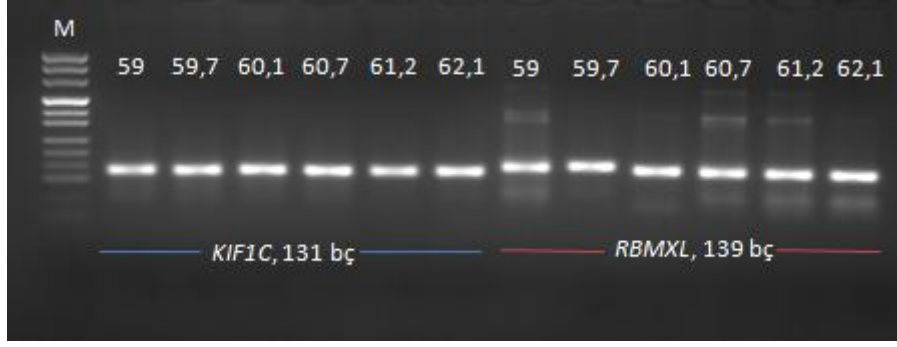
Örnek Adı	Kromozom	CNV Aralığı	Sembol	Açıklama
H2 (05-204)	3	2,38 Mb	<i>CLDN1</i>	Claudin 1
H4 (12-600)	2	1,71 Mb	<i>FBLN7</i>	Fibulin 7
H4 (12-600)	21	0,30 Mb	<i>TRPM2</i>	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member2

4.3.1. Gradient-PZR ile Yapılan Optimizasyon Çalışması Sonuçları

Seçilen genlerin herhangi bir ekzonuna denk gelecek şekilde dizayn edilen primerler için öncelikle optimum amplifikasyon sıcaklığı bulunması amacı ile farklı sıcaklıklarının denenmesini sağlayan Gradient-PZR yöntemi ile SYBR Green kiti kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır.

4.3.1.1. *RBMXL* ve *KIF1C* Genleri Optimizasyon Çalışması Sonuçları

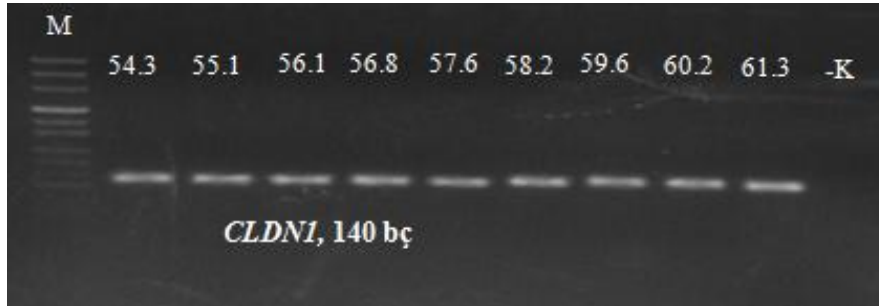
RBMXL (X kromozomunda) ve *KIF1C* (17. kromozomda) genleri için yapılan optimizasyon çalışmasında sağlıklı kontrol DNA' sını kullanılarak yapılan Gradient-PZR' de her biri için 59°C-62.1°C aralığında 6 farklı sıcaklık denenmiştir. Optimum sıcaklık olarak 59.7°C seçilmiştir. Deney sonucu aşağıda Şekil 4-16' da verilmiştir.



Şekil 4-16: *RBMXL* ve *KIF1C* Geni için Yapılan Optimizasyon Sonuçları

4.3.1.2. H2 Kodlu Bireyde Validasyon için Seçilen *CLDNI* Geni Optimizasyon Çalışması Sonuçları

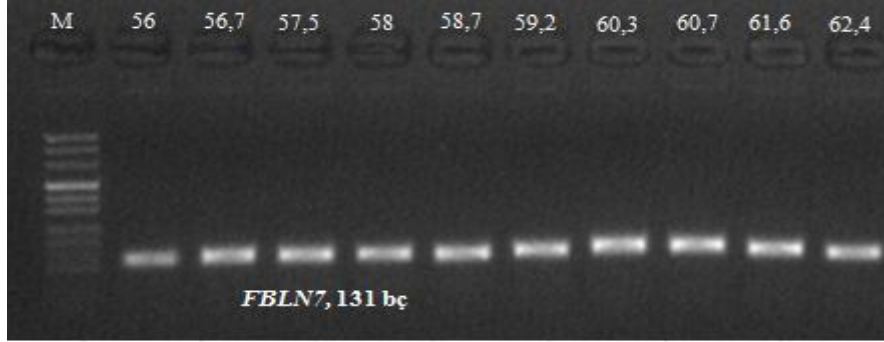
CLDNI geni için yapılan optimizasyon çalışmasında sağlıklı kontrol DNA' sını kullanarak 54.3°C-61.3°C aralığında 9 sıcaklık birden denenmiştir. Deney sonucu aşağıda Şekil 4- 17' te verilmiştir.



Şekil 4-17: *CLDNI* Geni için Yapılan Optimizasyon Deney Sonucu

Şekil 4-17' de görüldüğü gibi *CLDNI* geni 54.3°C-61.3°C aralığında denen 9 sıcaklığının hepsinde çalışmıştır.

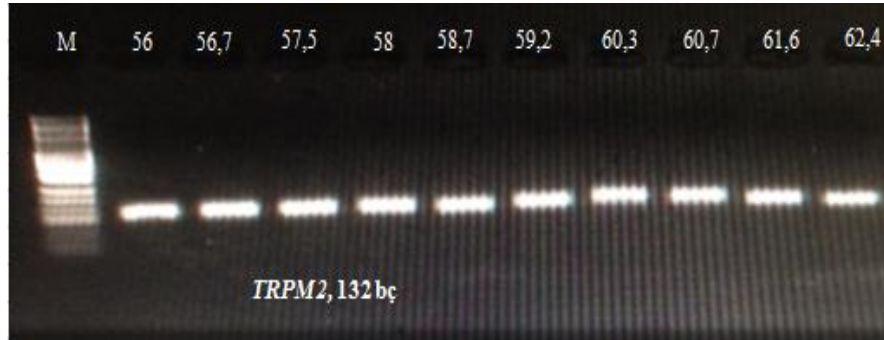
4.3.1.3. H4 Kodlu Bireyde Validasyon için Seçilen *FBLN7* Geni Optimizasyon Çalışması Sonuçları



Şekil 4-18: *FBLN7* Geni için Yapılan Optimizasyon Deney Sonucu

Şekil 4-18' de görüldüğü gibi *FBLN7* geni 56°C-62,5°C aralığında denenen 10 sıcaklık değerinde de çalışmıştır.

4.3.1.4. H4 Kodlu Bireyde Validasyon için Seçilen *TRPM2* Geni Optimizasyon Çalışması Sonuçları



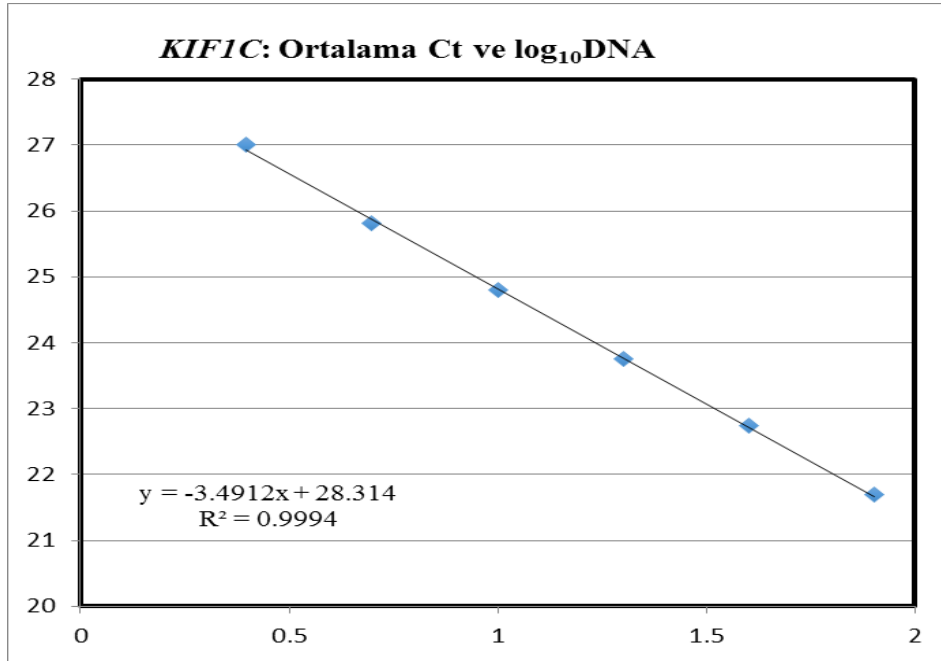
Şekil 4-19: *TRPM2* Geni için Yapılan Optimizasyon Deney Sonucu

Şekil 4-19' da görüldüğü gibi *TRPM2* geni 56°C-62,4°C aralığında denenen 10 sıcaklık değerinde de çalışmıştır.

4.3.2. Gerçek Zamanlı-qPZR Sonuçları

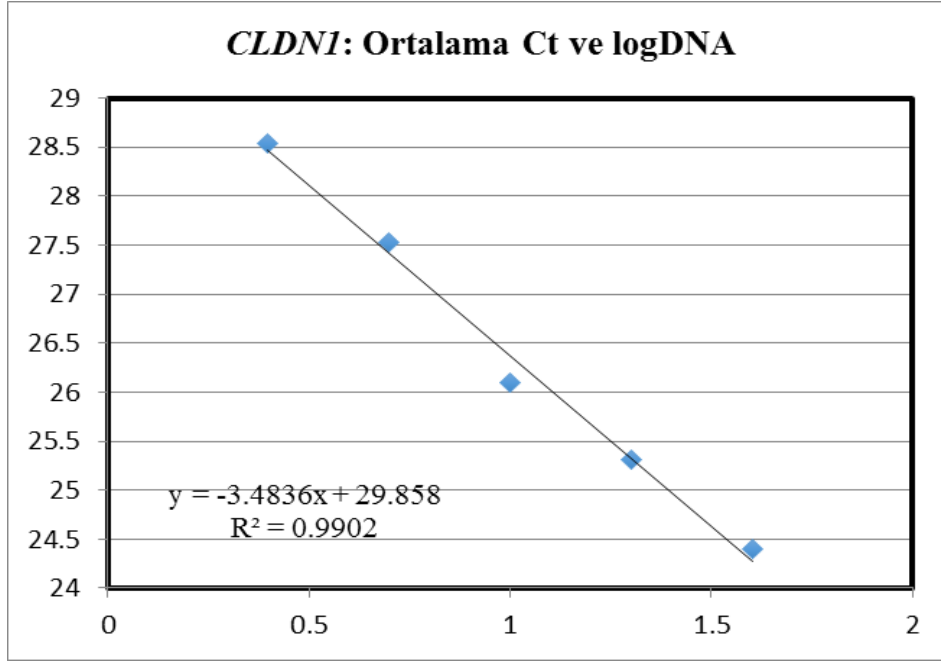
4.3.2.1.PZR Verimi Çalışması Sonuçları

PZR Verimi standart eğrinin eğim değerine eşittir. PZR veriminin 2 olması % 100 verimde amplifikasyon gerçekleştiğinin ifadesidir. R^2 değeri korelasyon katsayısıdır ve 0-1 arasında değişir. R^2 değerinin pozitif olması iki değişken arasında doğru orantı olduğunu gösterir, negatif olması ise ters orantı olduğunu gösterir. Gerçek zamanlı-qPZR için R^2 değeri eşik döngü değerleri ile konsantrasyonların arasındaki ilişkiyi ifade eder.



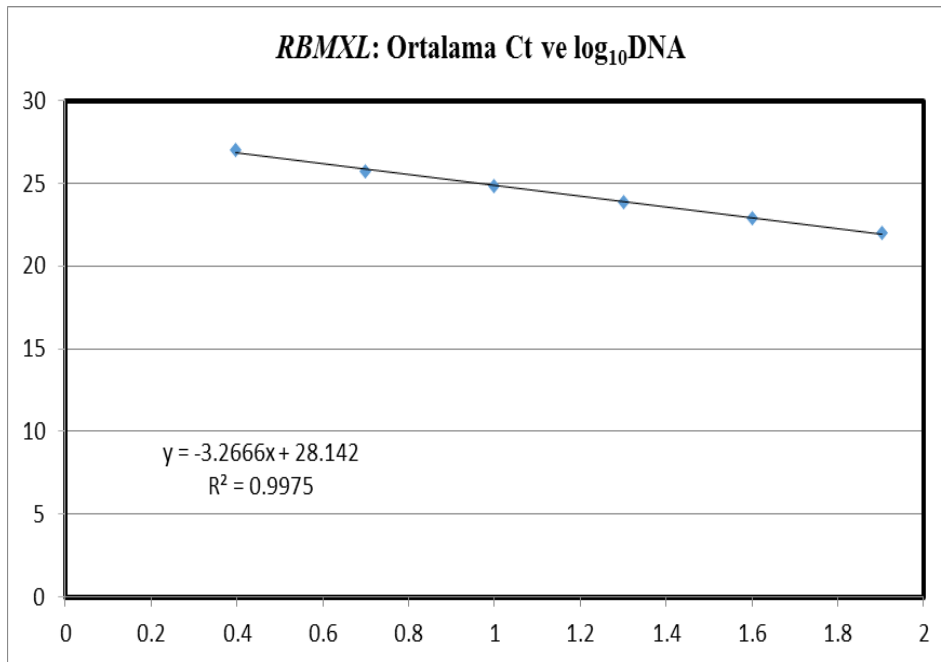
Şekil 4-20: KIFIC Geni için PZR Verim Çalışması Sonucu

PZR verimi Şekil 4-20' deki grafikte de görüldüğü gibi -3,49 değerine yani standart eğrinin eğimine eşittir. -3,49 eğim değeri PZR veriminin 2 üzerinden 1,93 yüz üzerinden ise %93 verimlilikte çalıştığını göstermiştir. R^2 değerinin 0-1 arasında hesaplanmış olması da eşik döngü ve DNA konsantrasyonları arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4-21: CLDNI Geni için PZR Verim Çalışması Sonucu

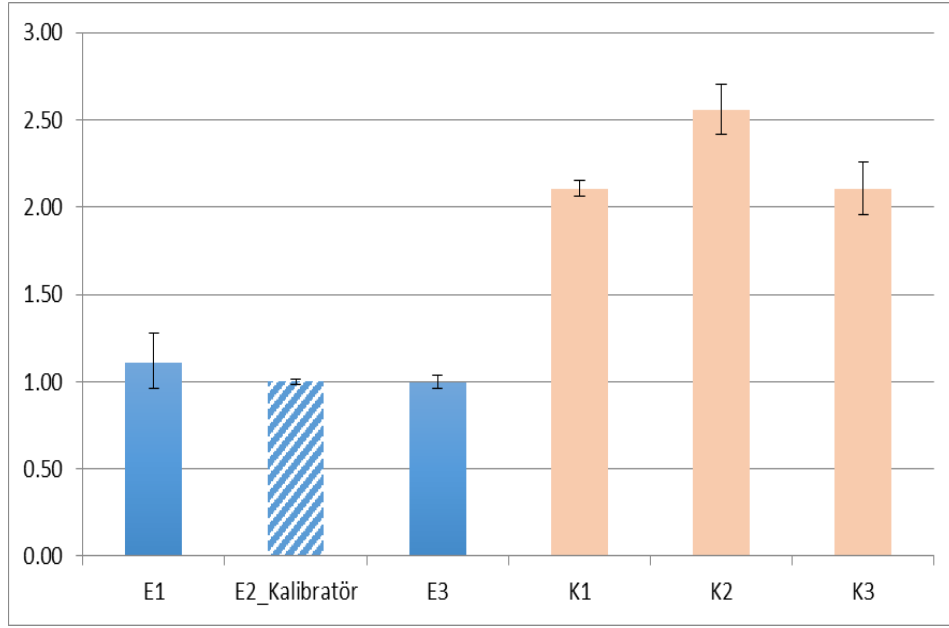
Yukarıda Şekil 4-21’deki grafikte görüldüğü gibi PZR verim değeri -3,4836 hesaplanmıştır. R^2 katsayısının 0,9902 olması da eşik döngü değerleri ve DNA konsantrasyonları arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir. -3,4836 değeri PZR veriminin 2 üzerinden 1,93 ve yüz üzerinden 93 olduğunu göstermiştir.



Şekil 4-22: RBMXL Geni için PZR Verim Çalışması Sonucu

Şekil 4-22' de görüldüğü gibi *RBMXL* geni için eğim değeri -3,2666 hesaplanmıştır. PZR verim değeri-3,2666' lık bir eğim değeri ile 2 üzerinden 2,02 yüz üzerinden ise 102 olarak hesaplanmıştır. R^2 değerinin 0-1 arasında olması da eşik döngü değeri ve DNA konsantrasyonları arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir.

4.3.2.2. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile X kromozomu CNV Tespiti Sonuçları

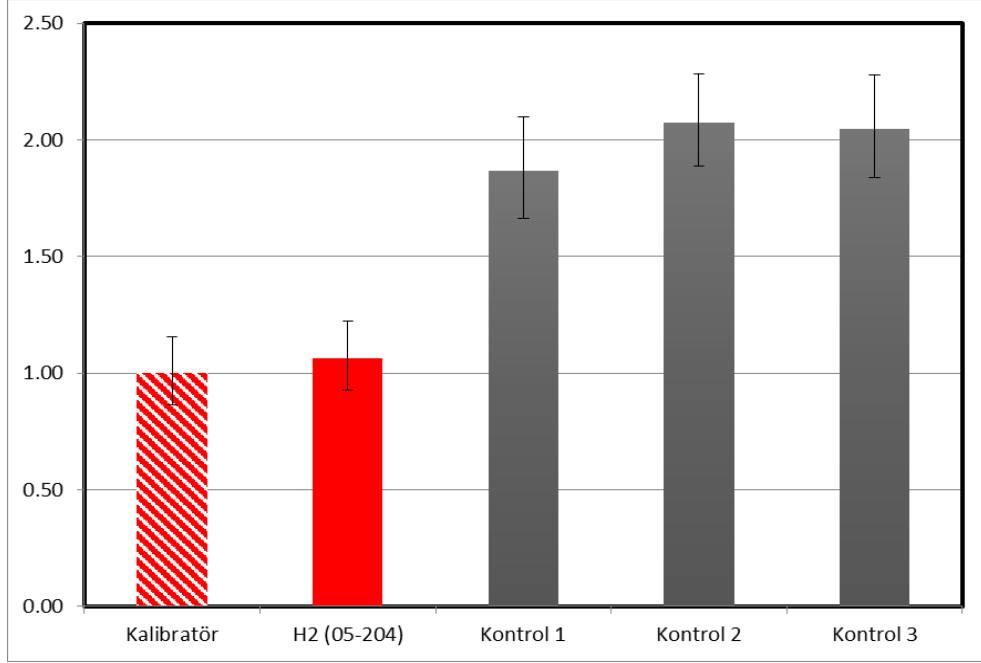


E: Erkek, K: Kadın

Şekil 4-23: X Kromozomu CNV Tespiti Sonuçları

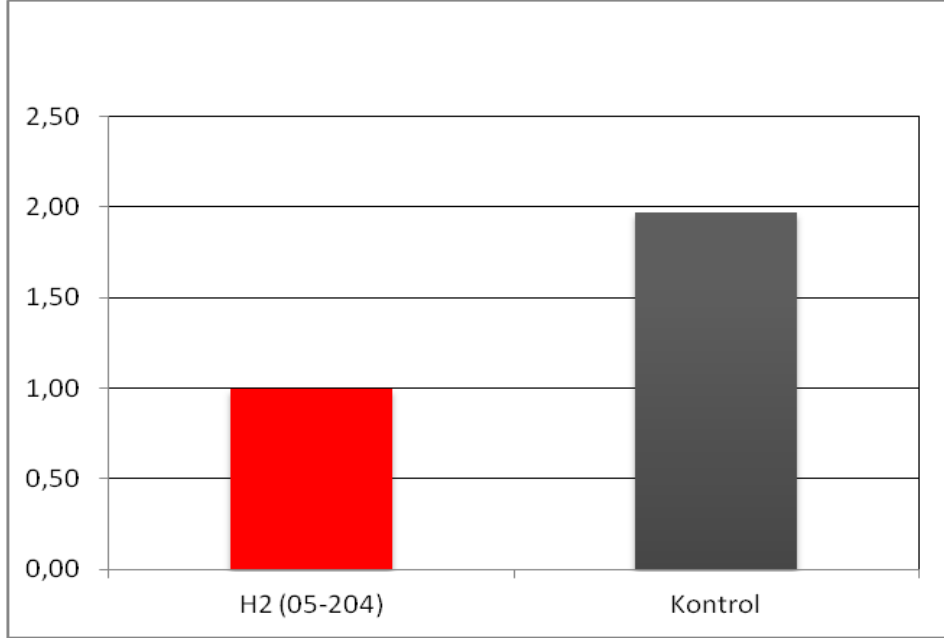
Eşit sayıda erkek ve kadın birey seçilerek X kromozomu üzerindeki *RBMXL* geni ile Gerçek Zamanlı-qPZR yapılarak X kromozom kopya sayısı farklılığı gösterilmiştir. Örneklerden Ct değeri, toplam Ct değerleri ortalamasına en yakın olan örnek kalibratör olarak değerlendirilmiştir. Normalizasyon amacıyla bu kalibratör değeri sayısal olarak bire (1.000) eşitlendi ve buna göre diğer örneklerin grafikte rölatif olarak artışları yada azalışları belirlendi. Şekil 4-23' de görüldüğü gibi kadınlarda X kromozom kopya sayısının 2 civarında olduğu erkeklerde ise 1 civarında olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2.3. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile H2 Kodlu Bireyde Seçilen *CLDN1* Geni Validasyon Çalışması Sonuçları



Şekil 4-24: *CLDN1* Geni için Validasyon Sonuçları

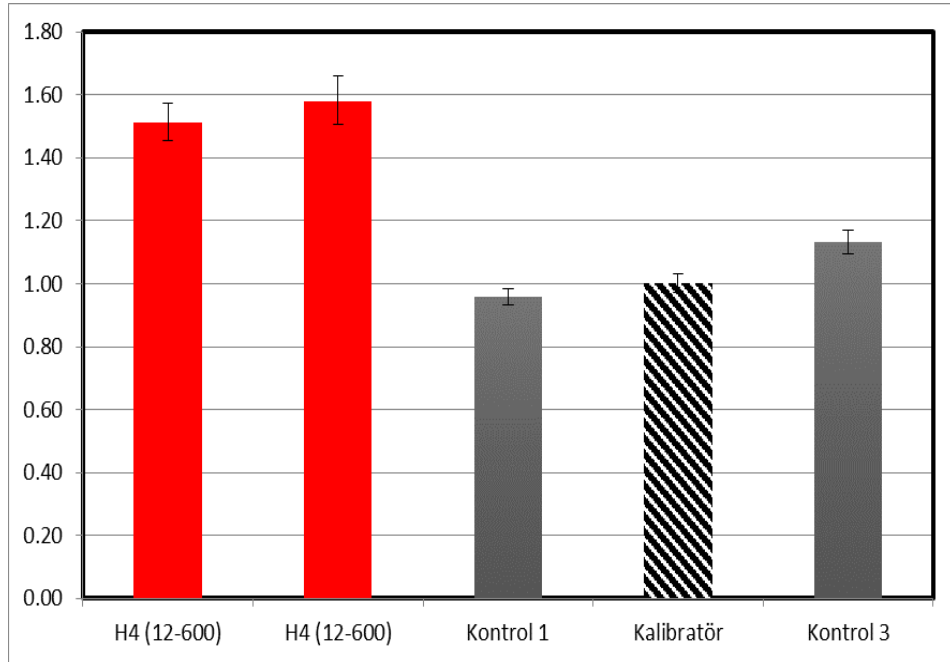
CLDN1 geni validasyonu için 3 farklı sağlıklı kontrol ve hasta örneği çalışılmıştır. Örneklerden Ct değeri, toplam Ct değerleri ortalamasına en yakın olan örnek kalibratör olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4-24 incelendiğinde H2 örneğinde *CLDN1* geni için tek kopya sağlıklı bireylerde ise bu gen için yaklaşık olarak 2 kopya bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4-25: CLDN1 Geni Validasyon Sonuçlarının Gruplandırılarak İncelenmesi

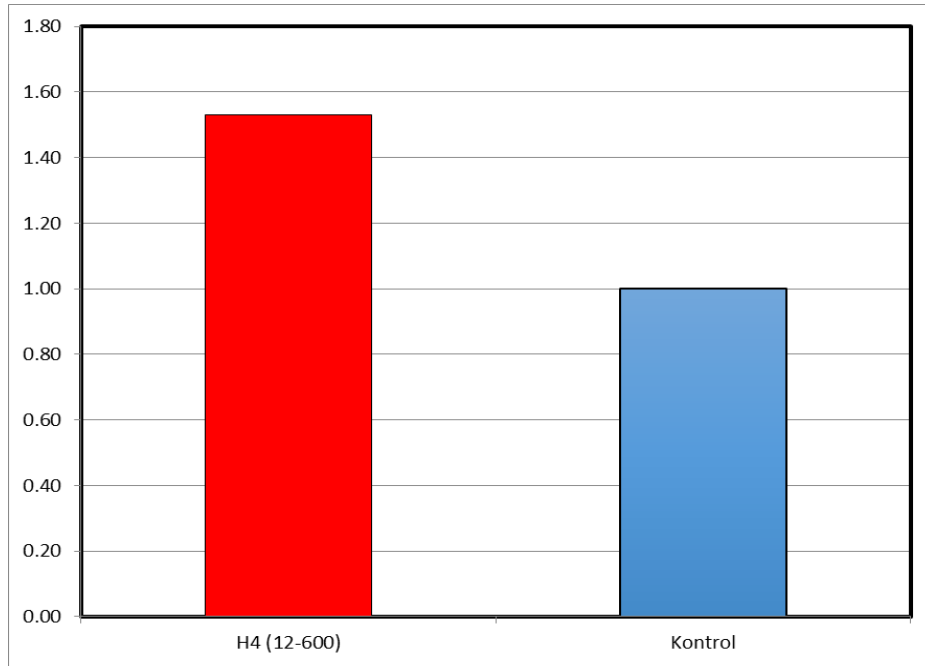
Şekil 4-25’ de hasta örnekleri ve sağlıklı kontrol örnekleri kendi aralarında gruplandırılarak incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda hasta örneklerinin 1 kopya sağlıklı kontrol örneklerinin 2 kopya taşıdıkları tespit edilmiştir.

4.3.2.4. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile H4 Kodlu Bireyde *TRPM2* İnsersiyon Validasyonu



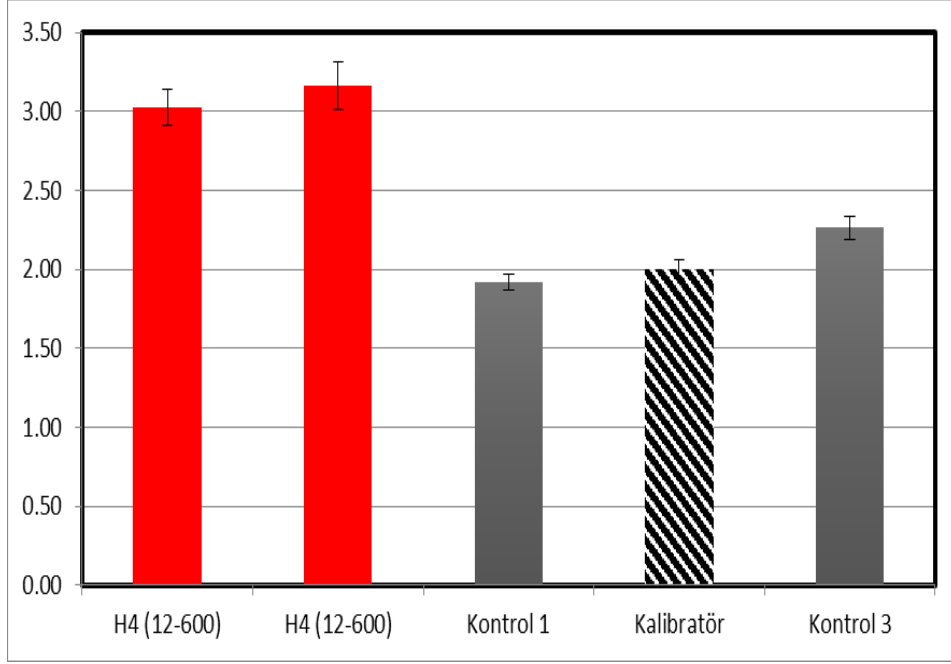
Şekil 4-26: *TRPM2* Geni için Validasyon Sonuçları

TRPM2 geni validasyonu için hasta örneği ve sağlıklı kontrol örnekleri birlikte çalışılmıştır. 3 sağlıklı kontrol ve hasta örneği ikili çalışılmıştır. Örneklerden Ct değeri, toplam Ct değerleri ortalamasına en yakın olan örnek kalibratör olarak değerlendirilmiştir Şekil 4-26' te görüldüğü gibi H4 kodlu bireyde kopya sayısının yaklaşık 1.60 civarında sağlıklı kontrollerin ise 1 civarında olduğu görülmektedir.

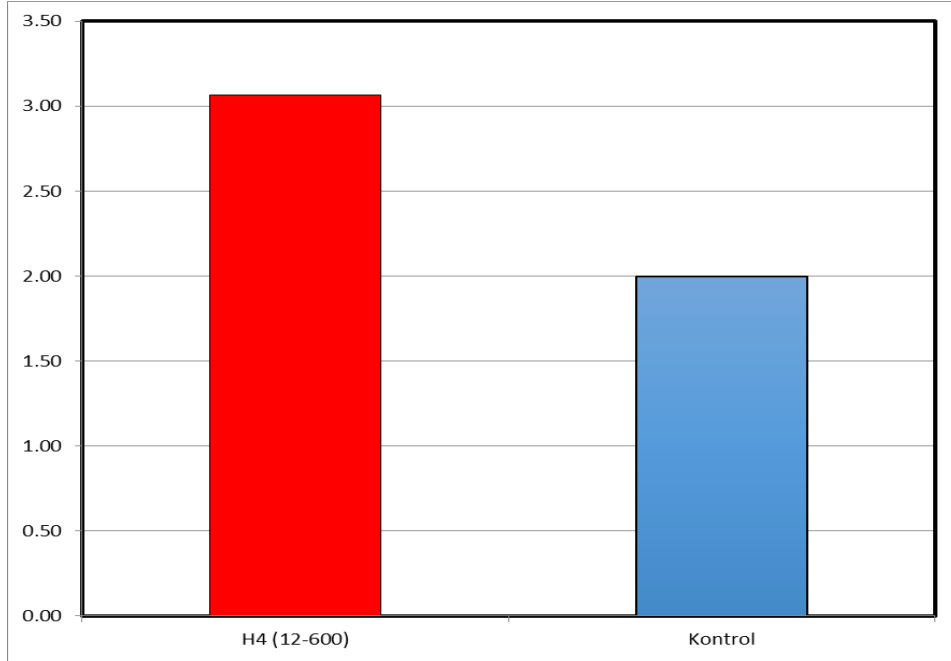


Şekil 4-27: *TRPM2* Geni Validasyon Sonuçlarının Gruplandırılarak İncelenmesi

Şekil 4-27' de hasta örnekleri ve sağlıklı kontrol örnekleri kendi aralarında gruplandırılarak incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda hasta örneklerinin yaklaşık 1.60 sağlıklı kontrol örneklerinin 1 civarında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4-28: TRPM2 Geni Kopya Sayısı Değişimi 2. Analizi

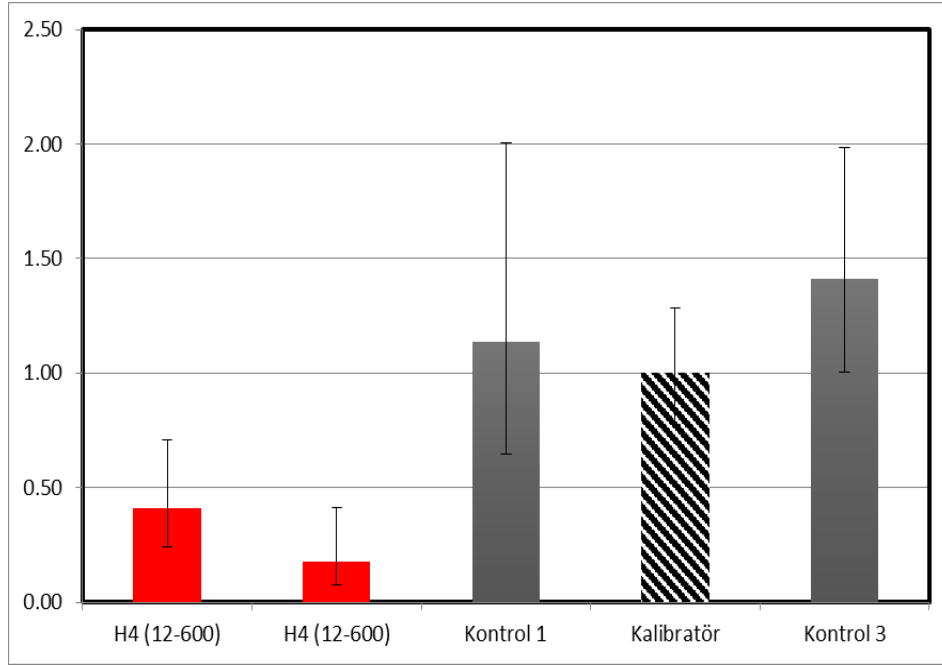


Şekil 4-29: TRPM2 Geni Validasyonu 2. Analizi

TRPM2 geni için yapılan 2. analizde sayısal değerler iki katına çıkarılarak kopya sayısı artışının daha net görülmesi sağlanmıştır. Şekil 4-28' de her örnek kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Şekil 4-29' da ise hasta ve sağlıklı kontrol örnekleri

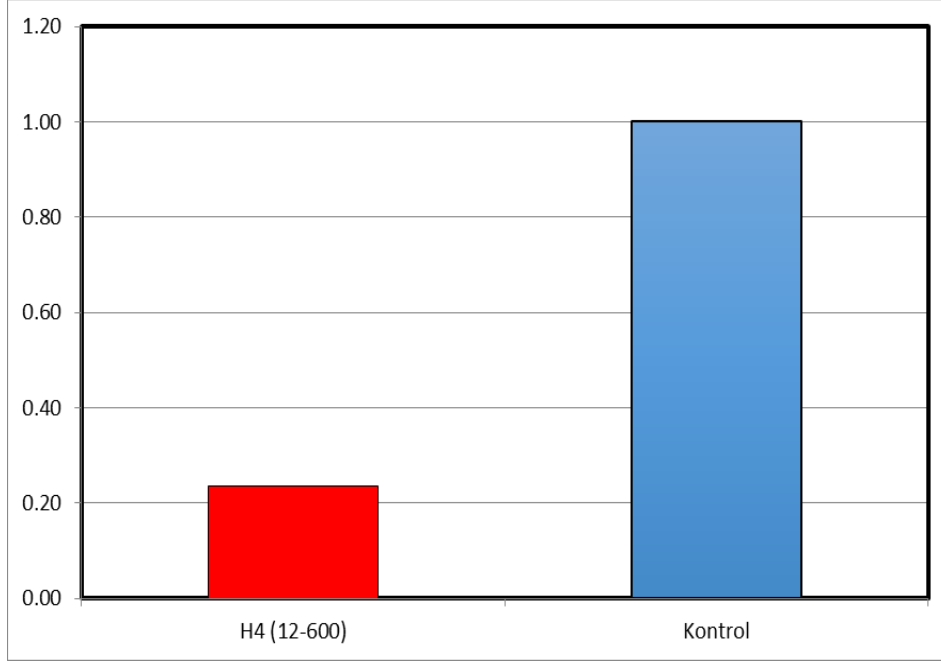
gruplandırılarak grafikler oluşturulmuştur. Şekil 4-28 ve Şekil 4-29’ da hasta örneğinde kopya sayısının 3 e çıktığı sağlıklı kontrol örneklerinin ise bu genin 2 kopyasını taşıdığı gösterilmiştir.

4.3.2.5. Gerçek Zamanlı-qPZR Yöntemi ile H4 Kodlu Bireye *FBLN7* Delesyonu Validasyonu



Şekil 4-30: *FBLN7* Geni için Validasyon Sonuçları

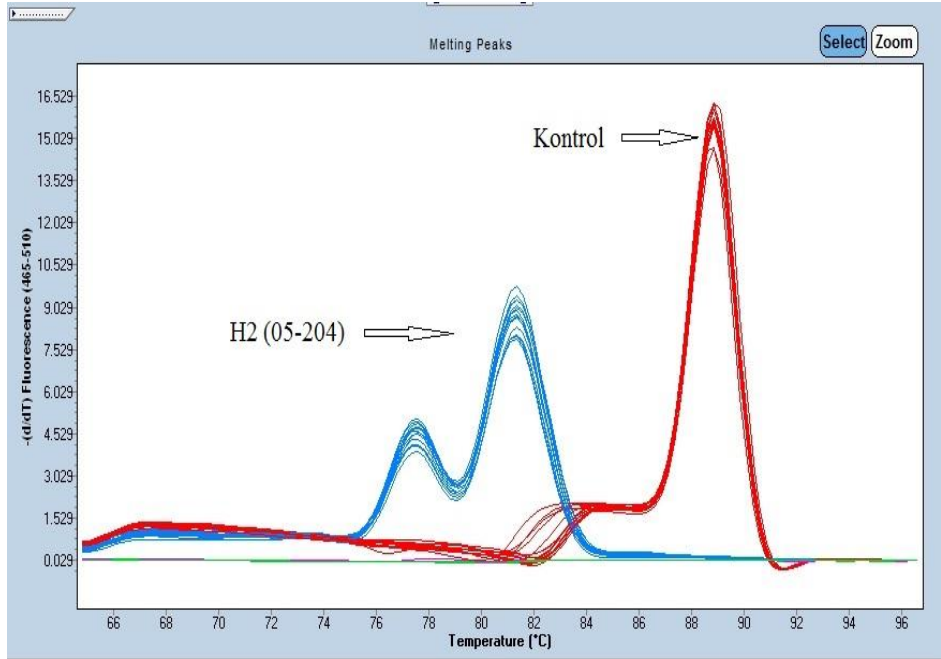
FBLN7 geni validasyonu için hasta ve sağlıklı kontrol örnekleri birlikte çalışılmıştır. Örneklerden Ct değeri, toplam Ct değerleri ortalamasına en yakın olan örnek kalibratör olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4-30 incelendiğinde H4 kodlu bireye ait örneğin kopya sayısının 0,50’ nin altına düştüğü sağlıklı kontrol örneklerinde ise yaklaşık olarak 1-1,50 değerleri arasında olduğu bulunmuştur.



Şekil 4-31: *FBLN7* Geni Validasyon Sonuçlarının Gruplandırılarak İncelenmesi

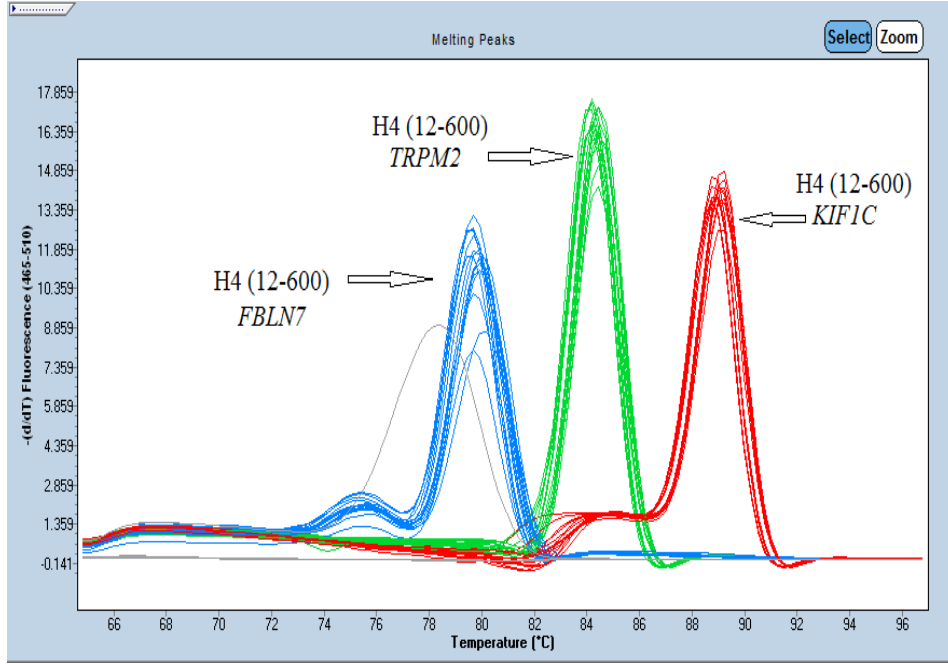
Şekil 4-31’ de görüldüğü gibi hasta ve sağlıklı kontrol örnekleri kendi içinde gruplandırılarak incelenmiştir ve sonuç olarak *FBLN7* geni açısından H4 kodlu bireyin kopya sayısının 0,20 sağlıklı kontrol örneklerinin ise 1 civarında olduğu görülmüştür.

4.3.3. Erime Eğrisi Analizleri



Şekil 4-32: H2 Kodlu Bireye Ait Erime Eğrisi Grafiği

Şekil 4-32 incelendiğinde delesyon bölgesinde bir gen olan *CLDN1* geni tek allelli olduğundan ışıma değeri daha düşük gözükmetedir ve sağlıklı kontrole oranla daha düşük sıcaklıkta ışıma vermektedir.



Şekil 4-33: H4 Kodlu Bireye Ait Erime Eğrisi Grafiği

Şekil 4-33 incelendiğinde insersiyon bölgesinde olan *TRPM2* geninin en yüksek ışımayı (Yeşil eğriler) verdiği görülüyor. Bu kısımda kopya sayısı artışı olduğundan erime sıcaklığının da daha yüksek olması beklenir. *TRPM2* geninin verisi insersiyon olduğunu doğrulamaktadır. H4 kodlu bireyde herhangi bir CNV bölgesinde yer almayan *KIF1C* geni erime sıcaklığı değerlendirildiğinde normal gözükmetedir. Delesyon bölgesi içerisinde olan *FBLN7* geni ise tek allelli kaldığından daha erken ışımaya girebilir dolayısıyla erime sıcaklığı da daha düşüktür.

5. TARTIŞMA

MKA/MR grubu hastalıkların araştırılmasında yüksek çözünürlükte tüm genom SNP-Array' ler özellikle submikroskopik değişimlerin tespitinde klasik sitogenetik yöntemlere göre çok daha duyarlı olması nedeni ile tercih edilen bir yöntemdir. Bu çalışmada, 10 hasta SNP-Array çalışması dahilinde değerlendirilmiş ve farklı boyut ve bölgelerde CNV' ler tespit edilmiştir. SNP- Array' lerin duyarlılığı prob sayısı ile doğru orantılı olduğundan tespit edilen küçük boyutta CNV' lerin daha detaylı incelenmesi ya da alternatif bir yöntem ile validasyonlarının yapılması gerekmektedir. Bunun için Gerçek Zamanlı-qPZR maliyeti uygun, uygulanabilir ve prob dizaynına gerek kalmadan CNV validasyonunda kullanılacak avantajlı bir yöntemdir. Tespit edilen değişimlerin özellikle minör olanların Gerçek Zamanlı-qPZR yöntemi ile validasyonu yapılmıştır. Major olan kayıp ve kazanç bölgeleri için ; yani boyutu 2,5 Mb' dan büyük CNV' lerin veritabanlarından pozisyon bilgileri girilerek kırık noktaları ve kırık noktaları arasındaki genler incelenmiştir.

Tez kapsamında tüm genom SNP- Array ile taranmış olan hastaların herbiri kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Tespit edilen CNV' lerin bireylerin fenotipleri ile olan ilişkisi anlaşılmaya çalışılmış ve hastalıklarla ilişkili olabilecek ya da etiyojisine ışık tutabilecek yeni CNV bölgelerinin keşfedilmesi hedeflenmiştir.

Bireylerin genomlarında tespit edilen CNV'ler Illumina GenomeStudio Modülü kullanılarak görsel olarak incelenmiştir. Bu analize paralel olarak CNV bölgeleri boyut ve türleri açısından bir GenomeStudio eklentisi olan cnvPartition programı ile listelenmiştir. Bu aşamadan sonra bulunan CNV bölgeleri MS Office-Excel ortamında filtrelenmiştir. Çeşitli sebeplerden dolayı yanlış pozitif sonuç olarak değerlendirilen CNV'ler (sentromer veya telomere bölgelerine denk gelmeleri, GenomeStudio Kromozom görüntüleme (Chromosome Browser) seçeneği ile teyid edilememesi vb.) listeden elenmiştir. Kopya sayısı değişikliği göstermeyen CNV'ler (copy-neutral LOH) her hastaya ait CNV tablosunun altında tüm genom boyutunu gösterecek şekilde gruplanmıştır.

Değerlendirilen ilk birey olan H1'de (E12-34) 21. kromozom boyunca trizomi tespit edilmiştir. H1 için Trizomi 21'in ebeveyn etkisini belirlemeye yönelik bir çalışma

yapılmıştır. Bireyin yine 300K SNP array ile genotiplenmiş olan anne (E11-233), baba (E11-234) ve iki kardeşi (E11-235 ve E11-229) Trizomi 21'in kaynak ebeveynini tespit etmek amacıyla değerlendirmeye alınmıştır. SNP array verisi ile öncelikle H1'de hastadaki Down Sendromu fenotipi ile ilişkili ve kromozom 21'in tümü etkileyen trizomi tespit edilmiştir. Trizomi 21 tespiti hem BAF hem de LRR değerlerinin yardımıyla yapılmıştır. Bu aşamadan sonra ebeveynlerinin kromozom 21'e ait genotip verisi BAF değerleri açısından özel olarak filtrelenerek (sadece annede ve babada farklı olarak homozigotluk gösteren SNP'ler), ebeveyn etkisini açıkça ortaya koyabilecek ve 21. kromozomu tarayan 11 SNP elde edilmiştir. Daha sonra bu 11 SNP'e ait frekans bazlı bir analiz yapılmış ve trizomik bireyin 3 kromozumuna ait genotipleri belirlenmiştir. Bu genotipler ile haplotip analizi yapılmış ve trizomi 21'in maternal kaynaklı olduğu tespit edilmiştir.

Geliştirdiğimiz yöntem sadece trizomi 21 için değil tüm trizomiler için kolaylıkla uygulanabilir. Trizominin kaynağı etkin bir şekilde tespit edildiğinde yaşam koşulları, yaş gibi kriterlerin trizomi oluşumunda etkileri incelenebilir. Bu çalışmamıza ait hazırlanan yayın Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsüne ait Deneysel Tıp Dergisi'nde yayımlanmak üzere başvurulmuş olup, şu an değerlendirilme aşamasındadır.

H2 (05-204) kodlu birey klinik olarak incelendiğinde öncelikle makrozomi sendromları düşünülmüştür. Makrozomi sendromlarından olan SOTOS Sendromu (Serebellar Gigantizm); aşırı büyüme, akromegalik özellikler ve bunlara eşlik eden mental retardasyon ile seyreden progresif olmayan serebellar bir hastalıktır (OMIM #117550). Bireyde SOTOS Sendromu şüphesi ile *NSDI* (nuclear receptor binding SET domain protein 1) geni mutasyonuna bakılmış ve bireyin bu mutasyon açısından negatif olduğu tespit edilmiş ve tarafımıza bildirilmiştir. Ardından bireyin SNP-Array ile çalışılmasına karar verilmiştir.

H2 (05-204) kodlu birey için yapılan CNV analizinde chr3: 188,612,356-190,995,351 pozisyonları arasında 2,38 Mb'lık bir delesyon tespit edilmiştir. Delesyon bölgesi boyut olarak küçük bir CNV bölgesi olduğundan bu bölgenin Gerçek Zamanlı-qPZR ile validasyonunun yapılması uygun bulunmuştur. Validasyon için seçilen genler yalnızca değişimin olduğu bölgenin ikinci bir teyiti için seçilmiştir dolayısı ile fenotipten bağımsız seçilmişlerdir. Validasyon için delesyon bölgesi içerisinden *CLDNI* (claudin 1) geni seçilerek çalışılmıştır. *CLDNI* geninin epitelyal veya endotelyal hücrelerde hücre adhezyonunda ve suyun geçişi sırasında fiziksel bariyer rolü olduğu

bilinmektedir ve bu gendeki fonksiyon kaybı mutasyonların neonatal ihtyozis skleroz cholangitis sendromuna yol açtığı bildirilmiştir. Otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. (MIM 607626) *CLDN1* geni defektleri genellikle deri, böbrek, kulak, ve genetik göz hastalıklarında rapor edilmiştir. (53). Bireyin kliniği incelendiğinde uyumlu olmadığı gözlenmiştir. Rölatif kantifikasyon analizinde hasta örneğinde *CLDN1* geni yaklaşık tek kopya seviyesinde sağlıklı kontrollerde yaklaşık olarak 2 kopya sayısında tespit edilmiştir. Dolayısı ile bu bölgede SNP-Array' in de tespit ettiği delesyon ikinci bir yöntem ile doğrulanmıştır.

3q24' te tespit edilen bu delesyon bölgesinde bulunan fenotipler OMIM' den listelenmiş ve bu delesyon bölgesi içerisinde SHFM4 (Split Hand Foot Malformation 4) bölgesinin olduğu görülmüştür. Decipher veritabanı kullanılarak bireyde tespit edilen bu delesyon bölgesi için belirlenmiş olan fenotipler incelenmiştir. Bunların arasında chr3: 185129533- 189676734 bölgesinin Mental Retardasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.(Decipher ID: 251880). Bunun dışında bu bölgede tanımlanmış kayıp ve kazançlarla ifade edilen CNV' ler olmakla birlikte bu bireyin fenotipi ile tam olarak ilişkili olabileceği söylenememektedir.

H2 kodlu bireyin 12q14-12q21.31 sitogenetik pozisyonlarında tespit edilen 4,04 Mb'lık bir delesyonun boyutları itibariyle validasyona ihtiyaç duyulmamıştır. Bu delesyon için kırık noktalarına denk gelen genler incelenmiştir. Kırık noktasının başlangıç pozisyonuna denk gelen herhangi bir gen NCBI veri tabanında bulunmamaktadır. Ancak delesyon için kırık noktasının bitişinde liprin alfa gen ailesinden *PPFIA2* (protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (*PTPRF*), interacting protein (liprin), alpha 2) geni bulunmaktadır. Yapılan immünofloresans çalışmalarında *PPFIA2* geninin hücre yüzeyinde lokalize olduğu gösterilmiştir (54). Bu gen herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. 12. kromozomda tespit edilen delesyon bölgesi için Decipher veritabanından şimdiye kadar tespit edilmiş CNV bölgeleri ve fenotipler bulunmaktadır ancak bireyin fenotipi ile birebir uyumlu gözükmemektedir. 12q14-12q21.31 bölgesi içerisindeki genler incelendiğinde ise mutasyonları otozomal resesif sağırlığa neden olan *OTOGL* ve *PTPRQ* geni bulunmaktadır. Ancak bireyde klinik olarak sağırlıkla ilgili hiçbir bulgu bulunmadığından ilişkilendirilememektedir. Bölgeye tamamen bakıldığında çoğunlukla tanımlanmamış lokuslar ve pseudogenler bulunmakta bunun dışındaki genler ise bireyin fenotipi ile ilişkili gözükmemektedir.

H2 kodlu bireyde genom boyu toplamda 86,77 Mb'lık LOH bölgesi tespit edilmiştir. Genomda LOH bölgelerinin fazla oluşu bireyin ebeveynleri için akrabalık durumunu gösterebilir ve sorgulanması gerekir. Birey için akrabalık durumu araştırıldığında annaanne ve babaannesinin teyze çocukları olduğu yani 5. Derece akrabalık olduğu anlaşılmıştır. Akrabalık derecesi ne kadar yakın ise genomda paylaşılan bölgeler o kadar fazla olacağından LOH bölgelerinin bu tarz bireyler için daha fazla olması beklenen bir durumdur. SNP- Array yöntemi akrabalık durumlarının incelenmesi açısından da fikir vermektedir.

H3 (11-672) kodlu bireyde 9q22' de 92,925,179-98,459,777 pozisyonları arasında 5,53 Mb'lık bir delesyon tespit edilmiştir. Büyük bir CNV bölgesi olduğu için kırık noktalarındaki genler incelenmiştir. Kırık noktasının tam olarak başlangıç ve bitiş bölgesinin lokalizasyonuna denk gelen herhangi bir gen NCBI veritabanından bulunamamıştır. Bireyde klinik değerlendirmeler sonucu atipik yüz, mental retardasyon, pektus ekskavatus, baş tutma oturma ve yürümede gecikme, şaşılık, eksik, yanlış yerleşimli ve diskolere dişler, kısa boyun, kısa el parmakları ve sağ el 5.ci parmakta kamptodaktili vb. bulgular tespit edilmiştir. Hastada toplamda 150,60 Mb'lık LOH bölgesi tespit edilmiştir. Akrabalık durumu sorgulandığında bireyin anne ve babasının 2.derece kuzen olduğu bildirilmiştir.

Kopya sayısı artış veya azalışları bireylerin fenotiplerini etkileyebilmektedir. 9q22 bölgesi kırık noktası içerisindeki genler incelendiğinde *SYK* (Spleen Tyrosine Kinase) geni dikkat çekmiştir. *SYK* geni osteoklast fonksiyonunda rolü olan bir tirozin kinazdır. *SYK* fonksiyonunun olmadığı bireylerde osteoklastların sitoskeleti organize etmede başarısız olduğu gösterilmiştir (55). H3 kodlu bireyde iskelet grafilerinde alt servikal ve üst dorsal vertebralarda çok sayıda segmentasyon anomalisi olması ve çatal kosta görüntüsünün olması dikkat çekicidir. Bunun dışında bölgede bulunan *ROR2* geni mutasyonlarının otozomal resesif Robinow Sendromuna yol açtığı bildirilmiştir (OMIM 602337) ve sendrom iskelet displazileri, kısa kemikler, omurga segmental defektleri, brakidaktili ve dismorfik yüz bulguları ile karakterizedir ve tamamen olmasa da H3 kodlu bireyin fenotipine uyum sağlaması; özellikle omurga segmental defektleri olmasından dolayı benzerlik göstermektedir. Ayrıca delesyon bölgesinde ektopik kemik gelişimini indükleyen *OGN* (Osteoglicin), kollajen ve kalsiyuma bağlanan *ASPN* (Asporin) genlerinin bulunması da bireyde kemiklerle ilişkili bulguları destekleyebileceği düşünülebilir.

H4 kodlu bireyin 2.kromozomunda 111,392,259-113,100,014 pozisyonları arasında 1,71 Mb'lık delesyon; 21. Kromozomunda ise 45,703,660-46,000,398 pozisyonları arasında 0,30 Mb'lık bir artış tespit edilmiştir. Tespit edilen her iki bölge için de validasyon çalışması yapılmıştır. Validasyon aşaması için 2. kromozomdaki delesyon bölgesi içerisinde *FBLN7* geni seçilmiştir. *FBLN7* geninin preodontoblastların apical periselüler bölgelerinde lokalize olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda *FBLN7*'nin ekstraselüler matriks molekülleriyle etkileşen bir adhezyon molekülü olduğu ve diş gelişimi ve dentin formasyonu ve odontoblast kaynağı olarak önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (56). Validasyon aşamasında yalnızca delesyonun ya da artışın gerçekliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Delesyon bölgesinin *FBLN7* geni ile validasyonunda hasta örneğinin yaklaşık tek kopya seviyesinde olduğu ve sağlıklı kontrollerin yaklaşık olarak normal 2 kopyaya sahip olduğu gösterilmiştir. İnsersiyon bölgesinin validasyonu için ise artış bölgesi içerisinde *TRPM2* (Transient reseptor potential cation channel, subfamily M, member 2) geni seçilmiştir. *TRPM2* geni oksidatif strese bağlı olarak aktive olan ve hücre ölümünde ve proliferasyonunda rolü olan bir genidir, ancak bu genin doğası tam olarak aydınlatılamamıştır. H4 bireyinde *TRPM2* için yapılan gerçek zamanlı-qPCR sonucunda 3 kopyaya çıktığı sağlıklı kontrollerde ise 2 kopya olduğu doğrulanmıştır. Bireyin 2. kromozomundaki delesyon için Decipher veritabanından uyumlu olabilecek fenotipler ve CNV bölgeleri incelenmiştir. Tanımlanan fenotipler arasında Tablo 4-1' de listelenen bireyin fenotipi ile uyumlu olabilecek bazı fenotipler tanımlanmıştır. Kromozom 21' de bulunan bölge Decipher' dan incelendiğinde Decipher ID #49463, #232488, #288278 olan CNV bölgelerinin bireyin fenotipi ile tamamen örtüşmesinde bazı bulgular açısından benzerlik gösterdiği düşünülebilir.

H5 Kodlu bireyde kromozom 2' de 237,531,744-243,029,573 arasında 5,50 Mb'lık bir delesyon kromozom 3' te 176,471,332 -197,845,233 arasında 21,37 Mb'lık bir artış tespit edilmiştir. Delesyon ve artış olan bölgelerin her ikisi de büyük boyutta olduğundan kırık noktalarındaki genler NCBI veritabanından incelenmiştir. 2.kromozomda tespit edilen delesyon bölgesinin kırık noktasının başlangıcına ve bitişine denk gelen pozisyonda herhangi bir gen tanımlanmamıştır. Decipher veritabanında bu bölge incelendiğinde daha önce pozisyon olarak birebir olmasa da tanımlanmış CNV bölgeleri bulunmaktadır. Kromozom 3' teki bölge Decipher veritabanından incelendiğinde çok sayıda CNV bölgesi tanımlanmış olduğu

görülmüştür. Bireyde klinik bulgu olarak yarı damak, üçgen yüz, klinodaktili, MR,gelişim geriliği, hipospadias, inmemiş testis, nefrokalsinozis ve idrarda hiperoksilüri, postnatal gerilik tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında delesyon bölgesi içerisindeki genler incelendiğinde *AGXT* (Alanin glikozilat transferaz) geninin bireyin fenotipi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu genin fonksiyonunun azalmış ya da tamamen ortadan kalkmış olması Hiperoksilüri, Primer, Tip I (OMIM # 259900)' e neden olmaktadır. Hiperoksilüri, Primer, Tip I; glikozilat mekanizmasının otozomal resesif kalıtılan nadir bir hastalığıdır. Hastalık renal tutulum ve idrarda kalsiyum oksalat kristallerinin görülmesi ile karakterizedir. Bireyin kliniğinde nefrokalsinozis ve idrarda hiperoksilüri tespit edilmiştir ve fenotip ile delesyon bölgesi içerisinde bulunan *AGTX* geninin uyumlu görülmüştür. Tespit edilen *AGTX* geninde bir mutasyon olup olmadığının tespiti yapılabilir ve bunun için gen bazlı araştırma yapılması gerekebilir.

H6 kodlu bireyde 21. kromozomda 15,709,414-36,816,325 pozisyonları arasında 21,11 Mb' lık bir artış görülmüş ve parsiyel trizomi olduğu tespit edilmiştir. Ancak fenotip olarak Trizomi 21' ler ile tamamen aynı özellikleri göstermemektedir. Hastanın kliniğinde hafif mongoloid aks, IQ: 93, normal boy ve motor gelişim, hipertelorizm rapor edilmiştir. Down Sendromu ile aynı bulguları göstermemesi parsiyel trizomi oluşundan kaynaklanmaktadır. Olgunun klasik parsiyel trizomili vakalardan önemli bir farkıda, kopya sayısı artışı olan parçanın Down Sendromu için kritik bölgeyi içermemesidir.. Down Sendromu kritik bölgesi 21q22.12-21q22.2' de 35,888,782-38,445,458 pozisyon aralığında bulunmaktadır (57). Hastada ise yalnızca 15,709,414-36,816,325 pozisyonları arasında Trizomi 21 bulunmaktadır Hastanın kritik bölgeyi içermemesi ancak klinik olarak down sendromlu olması dikkate değerdir. Bireyde yüz bulgularının olmayışı bu bulguların kritik bölgedeki genlerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

H7, H8,H9 ve H10 kodlu bireylerde 18. Kromozomun kısa kolunda tetrazomi tespit edilmiştir.Bireyler için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Bölümü tarafından FISH analizi yapılmış ve sonucunda 18p bölgesinden 4 sinyal alınmıştır. Bu tip durumlarda kromozomlarda ekstra kopya olduğundan BAF değerlerinin incelenmesi önemlidir. Bazı durumlarda 3 ve 4 kopya arasındaki LRR değeri ayırt edici olamamaktadır. Bireylerin tümünde BAF değerlerindeki artış gözlemlenmektedir. BAF değeri ekstra genotiplerin beirlenmesi açısından daha yardımcı olmaktadır. H7 kodlu bireyde BAF değerinin 5 panele bölüldüğü

gözlenlenmiştir ve bunların sırasıyla değerleri 0, 0,25, 0,5, 0,75 ve 1 olarak görülmüştür. Dolayısı ile mozaiklik durumu olmadığı ve bireyin bu bölgede 18p tetrazomisi olduğu söylenebilir. Ekstra haplotipler, 18p' nin distal kısmındaki 3 haplotip incelendiğinde bu amplifikasyonun mayotik orijinli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca ekstra genotiplerin telomerik olması da tetrazominin zamanlama olarak mayoz 2' de gerçekleştiğini göstermektedir.ve telomer bölgesine yakın olması bu amplifikasyonun mayoz 2' de kardeş kromatidlerin birbirinden ayrıldığı sırada gerçekleştiği düşünülmüştür. Daha önceden yapılmış bir çalışmada bu tip kromozomal anomalilerin mekanizması, gelişimsel olarak gerçekleşme zamanı ve parental orijini belirlenmiştir. H8 kodlu bireyde öncelikle hem trizomi hem de tetrazomi düşünülmüştür. Birey incelendiğinde ekstra haplotiplerin BAF değerlerinin belli bir bölge için 0,33 ve 0,66 civarında olduğu ancak bazı kısımlarda ise 0,25, 0,75 ve 1 civarlarında olduğu görüldüğünden tetrazomi olduğuna karar verilmiştir. Mozaikliğin elenmesi özellikle de mitoz sonrası gerçekleşen kromozomal anomaliler için zor olabilmektedir. Ekstra genotiplerin varlığı tetrazominin gerçekleştiği zamanın belirlenmesini sağlamaktadır. Ancak bu bireyde ekstra genotipler görülemediğinde gerçekleşme zamanının mayoz ya da mitoz olduğunun söylenmesi çok zordur. H8 ve H9 bireylerini aynı şekilde değerlendirdiğimizde; BAF değerinin her iki birey için de 5 panele ayrıldığını ve Log R değerinin de ekstra kromozom boyunca kopya sayısındaki artışı desteklediğinden mozaiklik olmadığı görülmüştür. İki bireyin verisi de 18p tetrazomisini desteklemektedir.

Bu çalışma ile MKA/MR fenotip spektrumuna sahip hastalar tüm genom SNP-Array ile çalışılmış ve birçok CNV bölgesi tespit edilmiştir. Hastalık ile ilişkili olan bölgelerin belirlenmesinin yanı sıra yeni hedef CNV bölgeleri de bulunmaya çalışılmıştır. Düşük çözünürlüklü yöntemler kompleks hastalıkların aydınlatılmasında yetersiz kalmaktadır. CNV değişimlerinin incelenmesi için SNP-Array yönteminin kullanılması yüksek çözünürlükte oluşu ,sistemik analiz yaklaşımları, mozaiklik bilgisine ulaşılabilmesi ve birçok parametreyi aynı anda analiz etme imkanı vermesinden dolayı uygun bir yöntem olduğu bu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada SNP-Array verisi ile biyoinformatik tabanlı analiz yapılabilmesi sayesinde alternatif yaklaşımlar geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Redon, R., S. Ishikawa, KR. Fitch, L. Feuk, GH. Perry, TD. Andrews, H. Fiegler, ve ark. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444(7118):444-54.
2. Valsesia, A., Stevenson BJ., Waterworth D., Mooser V., Vollenweider P., Waeber G. ve ark. Identification and validation of copy number variants using SNP genotyping arrays from a large clinical cohort. *BMC Genomics* 2012; 15:13:241. doi: 10.1186/1471-2164-13-241.
3. Li Mura, IE., B. Bauce, A. Nava, M. Fanciulli, G. Vazza, E. Mazzotti, ve ark. , Identification of a PKP2 gene deletion in a family with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Eur J Hum Genet*, 2013; 21(11):1226-31.
4. Mefford, HC., GM. Cooper, T. Zerr, JD. Smith, C. Baker, N. Shafer, ve ark, A method for rapid, targeted CNV genotyping identifies rare variants associated with neurocognitive disease. *Genome Res*, 2009; 19(9): 1579–1585.
5. Pelak, K., Need AC., Fellay J., Shianna KV., Feng S, Urban TJ. ve ark. Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *PLoS Biol.* 2011; 9(11):e1001208.
6. Männik, K., Parkel S., Palta P., Zilina O., Puusepp H., Esko T., ve ark. A parallel SNP array study of genomic aberrations associated with mental retardation in patients and general population in Estonia: *Eur J Med Genet.* 2011; 54(2): (136-43).
7. Sykulski, M., Gambin T., Bartnik M., Derwińska K., Wiśniowiecka B. - Kowalnik, P., ve ark. Multiple samples aCGH analysis for rare CNVs detection. *J Clin Bioinforma*, 2013; 11;3(1):12.
8. Grayton, Fernandes HM., Rujescu CD., Collier DA., Copy number variations in neurodevelopmental disorders. *Prog Neurobiol*, 2012; 99(1):81-91
9. Peiffer DA., Le JM., Steemers FJ., Chang W., Jenniges T., Garcia, FK. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping: *Genome Res*, . 2006; 16(9):1136-48.

10. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molecular Biology of the Cell, ed. Anderson M. ve Granum S., 5.Edisyon, 2007; New York, USA
11. The ENCODE Project Consortium, The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. 2004; 306(5696):636-40
12. Stranger, BE.,Forrest, MS., Dunning, M., Ingle, CE., Beazley, C.,Thorne, N., ve ark. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007; 315: 848-853.
13. Chen, X., Li X., P. Wang, Y. Liu, Z. Zhang, G. Zhao, ve ark. Novel association strategy with copy number variation for identifying new risk Loci of human diseases. *PLoS One*, 2010; (8): e12185
14. Li, X., Tan L., Liu X, Lei S., Yang T., Chen X. ve ark., A genome wide association study between copy number variation (CNV) and human height in Chinese population: *J Genet Genomics*, 2010; 37(12):779-85
15. McCarroll SA, Altshuler DM, Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet*, 2007; Jul;39(7 Suppl):S37-42. Review
16. Migita, O., Maehara,K. Kamura H., Miyakoshi K., Tanaka M., Morokuma S. ve ark., Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J Hum Genet*. 2014; doi:10.1038/jhg
17. Kang, TW., Jeon YJ, Jang E., Kim HJ., Kim JH., Park JL., ve ark. Copy number variations (CNVs) identified in Korean individuals. *BMC Genomics*, 2008; doi: 10.1186/1471-2164-9-492.
18. Pinto, D., Marshall C., Feuk L., Scherer SW., Copy-number variation in control population cohorts. *Hum Mol Genet*, 2008; 17(3):166-7
19. Baskin B, Choufani S, Chen YA, Shuman C, Parkinson N, Lemyre E, ve ark. High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet*. 2014; 133(3):321-30
20. Carey AS, Liang L, Edwards J, Brandt T, Mei H, Sharp AJ, ve ark. Effect of copy number variants on outcomes for infants with single ventricle heart defects. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; 6(5):444-51
21. Nagel B, Gruber-Sedlmayr U, Uhrig S, Stöllberger C, Klopocki E, Finsterer J. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction with epilepsy, other heart

- defects, minor facial anomalies and new copy number variants. *BMC Med Genet.* 2012; 13:60. doi: 10.1186/1471-2350-13-60
22. Tucker, T., Montpetit A., Chai D., Chan,S. Chénier S., Coe BP ve ark. Comparison of genome-wide array genomic hybridization platforms for the detection of copy number variants in idiopathic mental retardation.;*BMC Med Genomics*, 2011; 4:25.
 23. Friedman JM., Baross A., Delaney AD., Ally A., Arbour L., Armstrong L. ve ark., Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation, *Am. J. Hum. Genet.* 2006 79 (3): 500-513.
 24. Wagenstaller J., Spranger S., Lorenz-Depiereux B., Kazmierczak B., Nathrath M., Wahl D. ve ark., Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation, *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 81 (4) 768-779.
 25. Vandewalle J., Van Esch H., Govaerts K., Verbeeck J., Zweier,C., Madrigal I.ve ark. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copynumber gain at Xq28 mediated by an unusual recombination, *Am. J. Hum. Genet.* 2009 85 (6): 809-822.
 26. Hochstenbach, R., Buizer-Voskamp JE., Vorstman JA., ve Ophoff RA., Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res*, 2011; 135(3-4):174-202.
 27. Helbig, I., Swinkels ME., Aten E., Caliebe A., van 't Slot R., Boor R., ve ark. Structural genomic variation in childhood epilepsies with complex phenotypes: *Eur J Hum Genet.* 2014, 22(7):896-901.
 28. Bassuk AG, Geraghty E, Wu S, Mullen SA, Berkovic SF, Scheffer IE ve ark. Deletions of 16p11.2 and 19p13.2 in a family with intellectual disability and generalized epilepsy. *Am J Med Genet A.* 2013; 161A(7):1722-5.
 29. Iourov IY. Vorsanova SG. Kurinnaia OS., Zelenova MA., Silvanovich AP., Yurov YB. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. *Mol Cytogenet.* 2012; 31;5(1):46.

30. Wang P, Carrion P, Qiao Y, Tyson C, Hrynychak M, Calli K. ve ark. Genotype-phenotype analysis of 18q12.1-q12.2 copy number variation in autism. *Eur J Med Genet.* 2013; 56(8):420-5.
31. Ozgen, HM., van Daalen E., Bolton PF., Maloney VK., Huang S., Cresswell L., ve ark. Copy number changes of the microcephalin 1 gene (MCPH1) in patients with autism spectrum disorders. *Clin Genet*, 2009; 76(4):348-56.
32. Walker, S., ve SW. Scherer, Identification of candidate intergenic risk loci in autism spectrum disorder. *BMC Genomics*, , 2013;14:499.
33. Stefansson, H., Meyer-Lindenberg A., Steinberg S., Magnusdottir B., Morgen K., Arnarsdottir S. ve ark. CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature*, 2014; 505(7483):361-6.
34. Lundberg, G., Jin Y., Sehic D., Ora I., Versteeg R., ve Gisselsson D, Intratumour diversity of chromosome copy numbers in neuroblastoma mediated by on-going chromosome loss from a polyploid state. *PLoS One*, 2013; 8(3):e59268.
35. Wang, M., Zhou C., Cai R., Li Y., ve Gong L., Copy number gain of MYCN gene is a recurrent genetic aberration and favorable prognostic factor in Chinese pediatric neuroblastoma patients. *Diagn Pathol*, 2013, 8:5.
36. Kumps, C., Fieuw A., Mestdagh P., Menten B., Lefever S., Pattyn F. ve ark., Focal DNA copy number changes in neuroblastoma target MYCN regulated genes. *PLoS One*, 2013; 8(1):e52321.
37. Diskin, SJ., Hou C., Glessner JT., Attiyeh EF., Laudenslager M., Bosse K., Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma: *Nature*, 2009 459(7249):987-91
38. Larsen, MH., Zinyama R., Kallestrup P., Gerstoft, J. Gomo E., Thorner LW., HLA-G 3' untranslated region 14-base pair deletion: association with poor survival in an HIV-1-infected Zimbabwean population: *J Infect Dis*, 2013; 207(6):903-6.
39. Sagoo, GS., Butterworth AS., Sanderson S., Shaw-Smith C., Higgins JP., ve Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med*, 2009; 11(3):139-46.

40. Zhang, X., Du R., Li S, Zhang F., Jin L., ve Wang H., Evaluation of copy number variation detection for a SNP array platform. *BMC Bioinformatics*, 2014; 15:50.
41. Vissers, LE., de Vries BB., Osoegawa K., Janssen IM., Feuth T, Choy CO., Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*, 2003, 73(6):1261-70
42. R. Nussbaum , RR. McInnes, Huntington FW., Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 2007; 7. Edisyon
43. Phill-Seung J., Hye-Sung W., In-Ji ., Min-Kyung H., Jae-Yoon S., Pil-Ryang L., ve ark. A case report of prenatally diagnosed tetrasomy 18p *Obstet Gynecol Sci* 2013; 56(3):190-193.
44. Brambila Tapia AJ, Figuera L, Vazquez Cardenas NA, Ramirez Torres V, Vazquez Velazquez AI, Garcia Contre-ras C., ve ark.. The variable phenotype in tetrasomy 18p syndrome: a propos of a subtle dysmorphic case. *Genet Couns* 2010;21:277-83.
45. Plaiasu V., Ochiana D., Motei G., Georgescu A. A rare chromosomal disorder- isochromosome 18p syndrome. *Maedica (Buchar)* 2011; 6:132-6.
46. Sebold C, Roeder E, Zimmerman M, Soileau B, Heard P, Carter E., ve ark. Tetrasomy 18p: report of the molecular and clinical findings of 43 individuals. *Am J Med Genet A* 2010; 152:2164-72.
47. Habecker-Green JG, Naeem R, Gold H, O'Grady JP., Kanaan C., Bayer-Zwirello L., ve ark. Prenatal diagnosis and clinical features of an individual with tetrasomy 18p and trisomy 18q mosaicism. *J Perinatol* 1998;18:395-8.
48. Roeleveld, N., Zielhuis GA., ve Gabreels F., The prevalence of mentalretardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol*, 1997. 39(2):125-32.
49. Roselló M., Martínez F., Monfort S., Mayo S., Oltra S., Orellana C. Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2014; S1090-3798(14)00062-2.
50. Mullen, SA., Carvill GL., Bellows S., Bayly MA., Trucks H., Lal D., Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology*, 2013 81(17):1507-14.

51. Isrie, M., Froyen G., Devriendt K., de Ravel T., Fryns JP., JR. Vermeesch ve ark. Sporadic male patients with intellectual disability: contribution of X-chromosome copy number variants: *Eur J Med Genet*, 2012,. 55(11):577-85.
52. Sagner G and Goldstein C Principles, Workflows and Advantages of the New LightCycler Relative Quantification Software. *Biochemica*, 2001; 3: 15 – 17.
53. Grosse. B, Cassio. D, Yousef N., Bernardo C., Jacquemin E., Gonzales E. Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology*. 2012; 55(4):1249-59
54. Serra-Pages, C., Medley, QG., Tang, M., Hart, A., Streuli, M. Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* , 1998; 273: 15611-15620.
55. Zou, W., Kitaura, H., Reeve, J., Long, F., Tybulewicz, V. L. J., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. Syk, c-Src, the alpha-v-beta-3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J. Cell Biol.* 2007; 176: 877-888.
56. de Vega, S., Iwamoto, T., Nakamura, T., Hozumi, K., McKnight, DA., Fisher, LW.,ve ark. TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 30878-30888.
57. JR. Korenberg, SM. Pulst, Ikeuchi T. , Ogasawara N. , Yamamoto K. Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 1990; 47(2): 236–246.

FORMLAR

Çalışmanın Kapsamı

1. Yapılması planlanan genetik analizler için sizden 10 ml kan örneği alınacaktır.
2. Alınan kan örneğinden DNA' nız elde edilerek +4C ve -20C' de saklanacaktır. Örneğiniz kişi ismi kullanılmadan numara verilerek saklanacak ve bilgisayarda şifreli bir şekilde korunacaktır.
3. Zeka geriliği ve birden fazla doğumsal bozukluğa neden olduğu düşünülen genlerde araştırma yapılacaktır.
4. Araştırma kapsamında yapılan çalışmaların süresi kesin değildir ve sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilemeyebilir.
5. Araştırma sonrasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi ruhsal veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
6. Gönüllü olarak katılacağınız bu araştırma kapsamında sizden herhangi bir maddi katkı talebi olmayacaktır.

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU:**Tarih:**

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki çalışma kapsamını okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Bu klinik araştırmaya, gönüllü olarak, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı, Soyadı:**İmzası****Ebeveynin Adı, Soyadı:****İmzası****Aileden sorumlu Kişinin Adı, Soyadı:****İmzası****Açıklama Yapan Araştırmacının Adı, Soyadı:****İmzası**

ETİK KURUL KARARI

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



Sayı : 593

Tarih : 02.04.2014

Konu : Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ

Sayın Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ
Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi :Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsünün 11/10/2013 gün ve 262 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yeşim KESİM'in yürüteceği 2014/280 dosya numaralı "İnsan Genomundaki Kopya Sayısı Değişikliklerinin SNP-Array Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi ve Tespit Edilen Değişikliklerin Validasyonu" başlıklı çalışma kurulumuzun 21/03/2014 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


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

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>		Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BİYOGÖKİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI GÜNÜ ÖKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	HAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
KARAR BELGELERİ	Karar No:06	Tarih: 21/03/2014				
	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde görevli Doç. Dr. Sibel UĞUR İSERİ'nin sorumluluğunda ve Yeşim KESİM'in yürütteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul Üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI/ADI/SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **	İmza		
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyoistatistik	İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* Araştırma ile ilgili
** Toplantıda bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli izin alınması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma Yeşim	Soyadı	Kesim
Doğ.Yeri	EMİNÖNÜ	Doğ.Tar.	19.01.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	19898381894
Email	fyesimkesim@gmail.com	Tel	05547037478

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Uludağ Üniversitesi	2011
Lise	Yeşilköy 50. Yıl Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyoloji Öğretmeni	T.C. Feriha Uyar Lisesi	5 ay-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	80	
Dutch	Zayıf	Zayıf	Zayıf	-	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	74,		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Excel	İyi
Microsoft Word	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, dans etmek,