



**T.C.**  
**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TET2 GENİ VARYANTLARININ MULTIPL SKLEROZ İLE  
OLASI İLİŞKİSİ**

**Dr. Burak BAŞER**  
**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**SIVAS 2019**



**T.C.**  
**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TET2 GENİ VARYANTLARININ MULTİPL SKLEROZ İLE  
OLASI İLİŞKİSİ**

**Dr. Burak BAŞER**  
**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**Dr. Öğr. Üyesi Malik Ejder YILDIRIM**  
**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**SIVAS 2019**



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010 / 1-2 sayılı kararı ile uygun görülen Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesine göre hazırlanmıştır. Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No. T-828)

## ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye: Prof. Dr. İlhan SEZGİN

Üye: Prof. Dr. Çetin SAATÇI

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Malik Ejder YILDIRIM



Bu tez 10.12.2019 tarih ve 2019/7.. sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

  
Prof.Dr. İlhan ÇETİN  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik uzmanlık eğitimim boyunca engin tecrübelerini ve bilgisini benden esirgemeyen, iyi bir hekim ve insan olma yolunda bizlere ışık tutan saygıdeğer hocam anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. İlhan SEZGİN'e,

Asistanlık sürem boyunca eğitimime katkıda bulunan, bana akademik çalışmalar için fırsat veren, araştırmaya teşvik eden ve tez hazırlama sürecinde desteğini hiç esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Malik Ejder YILDIRIM'a,

Gerek klinik gerekse laboratuvar alanda bilgi ve deneyimlerinden her fırsatta yararlanmaktan mutluluk duyduğum, bana daima yol gösteren ve hocam olarak çalışma ayrıcalığına eriştiğim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hande KÜÇÜK KURTULGAN'a

Tez kapsamında örnek toplanması ve hasta bilgilerinin sağlanmasında yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Şeyda FİGÜL GÖKÇE'ye,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı personeline,

Beni yetiştiren, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman bana destek olan kıymetli aileme ve son olarak karşılaştığım her zorlukta yardımını eksik etmeyen, eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, hekimliği ve duruşuyla bana örnek olan manevi abim Uzm. Dr. Serdar ŞİRİN'e sonsuz teşekkürler.

Dr. Burak BAŞER

Sivas, 2019

## ÖZET

### **TET2 Geni Varyantlarının Multipl Skleroz İle Olası İlişkisi, Dr. Burak BAŞER, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas, 2019**

Multipl Skleroz (MS); genetik yatkınlığı bulunan bireylerde otoantijenlere karşı otoimmün yanıt sebebiyle oluşan progresif, nörodejeneratif multifokal demiyelinizan hastalıktır. Son zamanlarda, MS de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde epigenetik değişikliklerin rolü gösterilmiştir. MS hastalarının CD8 + T hücrelerinde belirgin DNA hipermetilasyonu saptanmıştır. MS hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde TET2 geni ekspresyonu azalmıştır. TET1, TET2 ve TET3 proteinlerinden oluşan ten-eleven-translocation (TET) protein ailesi 5-metilsitozinin (5mC) 5 hidrosimetilsitozine (5hmC) dönüşümünü katalizleyerek DNA demetilasyonunu sağlar. TET2, otoimmünitede IL-6'nın transkripsiyonunu baskılayarak inflamasyonun çözülmesinde rol oynar. MS deneysel modelinde Tet2 ekspresyonunun indüklenmesi ile T hücre proliferasyonu güçlü bir şekilde baskılanmaktadır.

Bu çalışmada MS tanısı almış bireylerde TET2 geni olası mutasyon profilini çıkarmayı ve 5 gen polimorfizmini (rs2726518, rs3733609, rs2454206, rs34402524, rs17253672) -kontrol grubu ile kıyaslayarak- değerlendirmeyi amaçladık. MS tanısı almış bireylerdeki TET2 geni varyantlarının sıklıkları sağlıklı bireylerle karşılaştırılarak, bu varyantların hastalıkla olası ilişkisi ortaya konulması hedeflenmiştir.

Çalışmaya MS tanılı 50 hasta ve 30 sağlıklı kontrol dahil edildi. Alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. TET2 geninin kodlayan ekzon, intron-ekzon bileşkeleri ve bilinen intronik varyant bölgesi PCR ile çoğaltıldı. DNA dizi analizi için yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi kullanıldı.

TET2 genine ait 5 polimorfik varyant (SNP) açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Mutasyon taraması bağlamında bir MS hastasında TET2 c.1572\_1580del (p.E524\_Q526del) değişimi yeni (novel) varyant olarak tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Multipl skleroz, TET2 geni, gen polimorfizmi, yeni nesil dizileme

## ABSTRACT

**Possible Association of TET2 Gene Variants with Multiple Sclerosis, Dr. Burak BAŞER, Department of Medical Genetics, Sivas Cumhuriyet University Faculty of Medicine, Sivas, 2019**

Multiple Sclerosis (MS); is a progressive, neurodegenerative multifocal demyelinating disease caused by autoimmune response to autoantigens in individuals with genetic predisposition. Recently, the role of epigenetic changes in the development of neurodegenerative diseases including MS has been shown. Strong evidence of DNA hypermethylation in CD8<sup>+</sup> T cells in MS patients was identified. TET2 gene expression is decreased in peripheral blood mononuclear cells of MS patients. The ten-eleven-translocation protein family of TET1, TET2 and TET3, catalyzes the conversion of methyl-cytosine (5mC) to 5-hydroxymethyl-cytosine (5hmC) and provides DNA demethylation. TET2 plays a role in the resolution of inflammation by inhibiting the transcription of IL-6 in autoimmunity. In the experimental model of MS, T cell proliferation is strongly suppressed by the induction of Tet2 expression.

In this study we aimed to obtain the possible mutation profile of TET2 gene in individuals diagnosed with MS and to evaluate 5 gene polymorphisms by comparing them with the control group (rs2726518, rs3733609, rs2454206, rs34402524, rs17253672). We want to compare the frequencies of TET2 gene variants in individuals diagnosed with MS to those of healthy controls and to investigate the possible association of these variants with the disease.

Fifty patients with MS and thirty healthy controls were included in the study. DNA was isolated from peripheral blood samples. All coding regions, intron-exon junction regions and an intronic variant of the TET2 gene were amplified by PCR. Next generation sequencing (NGS) method was used for DNA sequence analysis.

There was no difference between the patient and control groups in terms of single nucleotide polymorphisms, rs2726518, rs3733609, rs2454206, rs34402524, rs17253672 respectively ( $p>0.05$ ). In the context of mutation screening, the change of TET2 gene, c.1572\_1580del (p.E524\_Q526del) in an MS patient was detected as a novel mutation.

**Keywords:** Multiple sclerosis, TET2 gene, gene polymorphism, next generation sequencing

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Multipl Skleroz.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Tarihçe .....	3
2.1.3. Epidemiyoloji .....	3
2.1.4. Etiyoloji .....	4
2.1.5. Patoloji.....	9
2.1.6. İmmün Patofizyoloji .....	10
2.1.7. Klinik Bulgular .....	11
2.1.8. MS Klinik Alt Tipleri .....	12
2.1.9. Tanı .....	13
2.1.10. Ayırıcı Tanı.....	16
2.2. TET2 GENİ .....	17
2.2.1. TET2 Geni Yapısı.....	17
2.2.2. TET Protein Ailesi.....	17
2.2.3. TET2 Geni Varyantları .....	19
2.2.4. TET2 Geni ve MS.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	21
3.1. Hasta ve Kontrol Grupları .....	21
3.2. Moleküler Analiz.....	21
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	21
3.2.2 TET2 Geni Referans Transkripti ve Primerler .....	22
3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Aşaması .....	22
3.2.4 Agaroz jel elektroforezi .....	24
3.2.5 Yeni Nesil Dizi Analizi .....	24
3.2.6 Verilerin Analiz Edilmesi .....	27
3.3. İstatistiksel yöntem.....	27
4. BULGULAR.....	31
4.1. c.3804-7577A>C (rs2726518) Tek Nükleotid Polimorfizmi .....	36
4.2. c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609) Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	37
4.3. c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206) Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	38
4.4. c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) Tek Nükleotid Polimorfizmi .....	39
4.5. c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) Tek Nükleotid Polimorfizmi .....	40
5. TARTIŞMA .....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	48



7.KAYNAKLAR .....	49
8.ÖZGEÇMİŞ .....	60
EKLER .....	61



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. MS epidemiyolojisi.....	4
Şekil 2. 2. MS ile ilişkili genom bölgeleri .....	6
Şekil 2. 3. MS hastasına ait periventriküler lezyonların aksiyel MRG görüntüleri. .	15
Şekil 2. 4. TET2 geni genomik pozisyonu.....	17
Şekil 2. 5. TET2 enzim izoformları .....	17
Şekil 4. 1. c.1572_1580del (p.E524_Q526del) varyantını gösteren analiz görüntüsü	33



## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2. 1.</b> MS'de gözlenen epigenetik değişimler .	8
<b>Tablo 2. 2.</b> MS tanısı için revize edilmiş McDonald 2017 kriterleri – 2018 Multipl skleroz tanı ve tedavi kılavuzu'ndan	14
<b>Tablo 2. 3.</b> MS'in ayırıcı tanısı	16
<b>Tablo 3. 1.</b> DNA izolasyonu için gerekli ekipman ve reaktifler.	21
<b>Tablo 3. 2.</b> TET2 geni primer dizileri.....	23
<b>Tablo 3. 3</b> PCR mix karışımı.....	23
<b>Tablo 3. 4.</b> PCR şartları.....	24
<b>Tablo 3. 5.</b> Kütüphane amplifikasyonu PCR şartları.....	25
<b>Tablo 3. 6.</b> ACMG 2015 sınıflandırma kriterleri .	28
<b>Tablo 3. 7.</b> Patojenik varyantların sınıflandırılması için kriterler.	29
<b>Tablo 3. 8.</b> Benign varyantların sınıflandırılması için kriterler	30
<b>Tablo 4. 1.</b> Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.	31
<b>Tablo 4. 2.</b> Hasta grubunda saptanan varyantlar ve sınıflandırmaları.....	34
<b>Tablo 4. 3.</b> Kontrol grubunda saptanan varyantlar ve sınıflandırmaları. ....	35
<b>Tablo 4. 4.</b> Tespit edilen varyantların hasta, kontrol grubu ve gnomAD popülasyon veritabanı minör allel frekans (MAF) değerleri. ....	35
<b>Tablo 4. 5.</b> Hasta ve kontrol gruplarındaki c.3804-7577A>C (rs2726518) genotip ve allel dağılımı.....	37
<b>Tablo 4. 6.</b> Hasta ve kontrol gruplarındaki c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609) genotip ve allel dağılımı.....	38
<b>Tablo 4. 7.</b> Hasta ve kontrol gruplarındaki c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206) genotip ve allel dağılımı.....	39
<b>Tablo 4. 8.</b> Hasta ve kontrol gruplarındaki c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) genotip ve allel dağılımı.....	40
<b>Tablo 4. 9.</b> Hasta ve kontrol gruplarındaki c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) genotip ve allel dağılımı.....	41

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>2-OG</b>	: 2-oksoglutarat
<b>5mC</b>	: 5-metilsitozinin
<b>5hmC</b>	: 5-hidroksimetil-sitozin
<b>ACMG</b>	: Amerikan Genetik ve Genomik Koleji
<b>AML</b>	: Akut Myeloblastik Lösemi
<b>APC</b>	: Antijen Sunan Hücreler
<b>BOS</b>	: Beyin Omurilik Sıvısı
<b>C</b>	: Karbon
<b>CADASIL</b>	: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and Leukoencephalopathy
<b>CIS</b>	: Klinik İzole Sendrom
<b>CXXC4</b>	: CXXC finger protein 4
<b>dbSNP</b>	: Database Of Single Nucleotide Polymorphisms
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DNMT</b>	: DNA Metil Transferaz
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleosid Trifosfat
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr Virüsü
<b>EDSS</b>	: Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği
<b>EtOH</b>	: Etanol
<b>EVS</b>	: Exome Variant Server
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
<b>FOXP3</b>	: Forkhead Box Protein P3
<b>gnomAD</b>	: Genome Aggregation Database
<b>GM-CSF</b>	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
<b>GWAS</b>	: Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları
<b>HDAC2</b>	: Histon Deasetilaz 2
<b>HGMD</b>	: Human Gene Mutation Database
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IMSGC</b>	: Uluslararası Multipl Skleroz Genetiği Konsorsiyumu
<b>KBB</b>	: Kan Beyin Bariyeri

<b>MAF</b>	: Minör Allel Frekansı
<b>MDS</b>	: Miyelodisplastik Sendrom
<b>MPN</b>	: Myeloproliferatif Neoplazi
<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>MS</b>	: Multipl Skleroz
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>N</b>	: Azot
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PPMS</b>	: Primer progresif MS
<b>RISC</b>	: RNA ile ilişkili susturma kompleksi
<b>RIS</b>	: Radyolojik İzole Sendrom
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>rpm</b>	: Dakika Devir Sayısı
<b>RRMS</b>	: Relapsing Remitting MS
<b>SIFT</b>	: Sorts Intolerant From Tolerant
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>SPMS</b>	: Sekonder Progresif MS
<b>SPSS</b>	: Statistical Package For The Social Sciences
<b>TBE</b>	: Tris-Borat-EDTA
<b>TET</b>	: Ten-Eleven-Translokasyon
<b>Th</b>	: Yardımcı T Hücreleri
<b>TNF</b>	: Tümör Nekrozis Faktör
<b>Treg</b>	: Düzenleyici T Hücreleri
<b>NGS</b>	: Next Generation Sequencing
<b>VUS</b>	: Önemi Bilinmeyen Varyant

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl Skleroz (MS); genetik yatkınlığı bulunan bireylerde otoantijenlere karşı otoimmün yanıt sebebiyle oluşan progresif, nörodejeneratif multifokal demiyelinizan bir hastalıktır. Klinik semptomlar, nörolojik lezyonların bulunduğu bölgeye göre değişiklik gösterir ve genellikle kan-beyin bariyeri boyunca inflamatuvar hücrelerin invazyonu ile ortaya çıkan demiyelinizasyon ve ödem ile korelasyon gösterir (1).

MS patogenezinin, periferde aktifleşmiş olup kan beyin bariyerinden (KBB) merkezi sinir sistemine (MSS) geçen otoreaktif CD4+ T hücreleri ile aktive miyeloid hücreler ve B lenfositler tarafından yönlendirildiği düşünülmektedir. İnfiltr hücreler MSS'de yeniden aktive hale geldikten sonra beyinde yerleşik immün hücreler ile birlikte, akson demiyelinizasyonuna ve nöron kaybına yol açan bir inflamatuvar ortama katkıda bulunur. Genler ile çevresel faktörler arasındaki karşılıklı etkileşim, hastalık etyolojisinde rol oynar. Çok merkezli yapılan büyük çalışmalarda, içlerinden HLA-DRB1\*15:01 haplotipi en güçlü etkiye sahip olmakla birlikte, 100'ün üzerinde MS ile ilişkili risk lokusunun varlığı rapor edilmiştir (2).

MHC genlerini de içeren, genetik temelli yöntemler ile yapılan MS'e kalıtsal yatkınlık çalışmalarının sonuçları tatmin edici değildir. Bununla birlikte monozigotik ikizlerde MS konkordans oranının %20-30 civarında olmasından dolayı, hastalığın patogenezinde çevresel ve epigenetik faktörlerin önemi üzerinde durulmaktadır. Epigenetik, nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesinde kararlı ve kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Epigenetik fenomen, hücre döngüsü ve gelişimi gibi normal fizyolojik fonksiyonlar sırasında gen ekspresyonu kalıplarını kontrol etmede ve çevre faktörlerine tepki için oldukça önemlidir (3). Temel epigenetik mekanizmalar, deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan ribonükleik asitlerin (RNA) regülasyonundan oluşur (4). TET1, TET2 ve TET3 proteinlerinden oluşan ten-eleven-translokasyon (TET) protein ailesi,  $\alpha$ -ketoglutarat ve Fe<sup>2+</sup> bağımlı enzimlerden olup, 5-metilsitozinin (5mC) 5-hidroksimetil-sitozine (5hmC) dönüşümünü katalizleyerek DNA demetilasyonunu sağlar ve DNA metilasyon profili değişiminde rol oynar (5). Metilsitozin dioksigenaz olan TET2, otoimmünitedeki İnterferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ve İnterlökin-17 (IL-17) üretimini kontrol etmek için DNA demetilasyonunu gerçekleştirir ve histon deasetilaz

2 (HDAC2)'nin histon deasetilasyonu yoluyla IL-6'nın transkripsiyonunu baskılayarak inflamasyonun çözümlenmesinde rol oynar (6,7). DNA metilasyon inhibitörü olan desitabinin farelere yüksek doz verilmesiyle MS'in deneysel modeli olan otoimmün ensefalomyelitinin oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca naif CD4+ T hücrelerinin, Th1 ve Th17 dönüşümünün desitabin tarafından in vivo ve in vitro olarak baskılandığı görülmüştür. Daha da önemlisi TET2 ekspresyonunun artışının yol açtığı bazı hücre döngüsü inhibitörlerinin (p15, p16, p21) ekspresyonlarının artması ile T hücre proliferasyonunun kuvvetli bir biçimde baskılandığı tespit edilmiştir (8). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, MS hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde TET2 geni ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı ve bununla paralel olarak 5hmC düzeyinin de azalış gösterdiği rapor edilmiştir (9). TET2'nin inaktive edici mutasyonları, miyeloid kanserlerde saptanmakta ve 5-metilsitozinin hidroksilasyonunu bozmaktadır (10).

Tüm bu bilgiler ışığında bu araştırmada MS tanısı almış bireylerdeki TET2 geni varyantlarının sıklıkları sağlıklı bireylerinkiler ile karşılaştırılarak hasta bireylerdeki bu varyantların hastalıkla olası ilişkisi ortaya konulması hedeflendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Multipl Skleroz

#### 2.1.1. Tanım

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik, enflamatuar, demiyelinizan, nörodejeneratif, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen, heterojen, multifaktöryel, immün aracılı bir hastalıktır (11). MS tipik olarak 20 ila 40 yaşları arasında olan genç erişkinleri etkiler ve kadınlarda daha yüksek prevalansa sahiptir (12). MS'in patolojik özelliği, tipik olarak postkapiller venüllerin etrafına yerleşmiş ve kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulmasıyla karakterize olan fokal plaklarıdır (13).

#### 2.1.2. Tarihçe

Açıkça fark edilebilen ilk multipl skleroz vakası, hastalığını günlüğünde detaylıca belgeleyen İngiliz Kralı III. George'un torunu ve Kraliçe Victoria'nın kuzeni olan Augustus d'Este (1794-1848) olarak görünmektedir. Aynı zamanda bazı tarihçilere göre, 1380 doğumlu olan Hollandalı Lidwina multipl skleroz hastasıdır. Hastalığın ayrı bir antite olarak tanımlanması 1868'de Fransız nörolog Jean-Martin Charcot tarafından yapılmıştır. Multipl skleroz tedavisi için immün sistemi modüle eden ilaçlar arasında ilk grup Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanıp 1990'larda kullanıma sunulmuştur. Araştırmacıların hastalık sürecini görmesini sağlayan ve sonuçta FDA'nın multipl skleroz için ilaç onayına yol açan temel teknolojik ilerleme manyetik rezonans görüntüleme (MRG) olmuştur (14).

#### 2.1.3. Epidemiyoloji

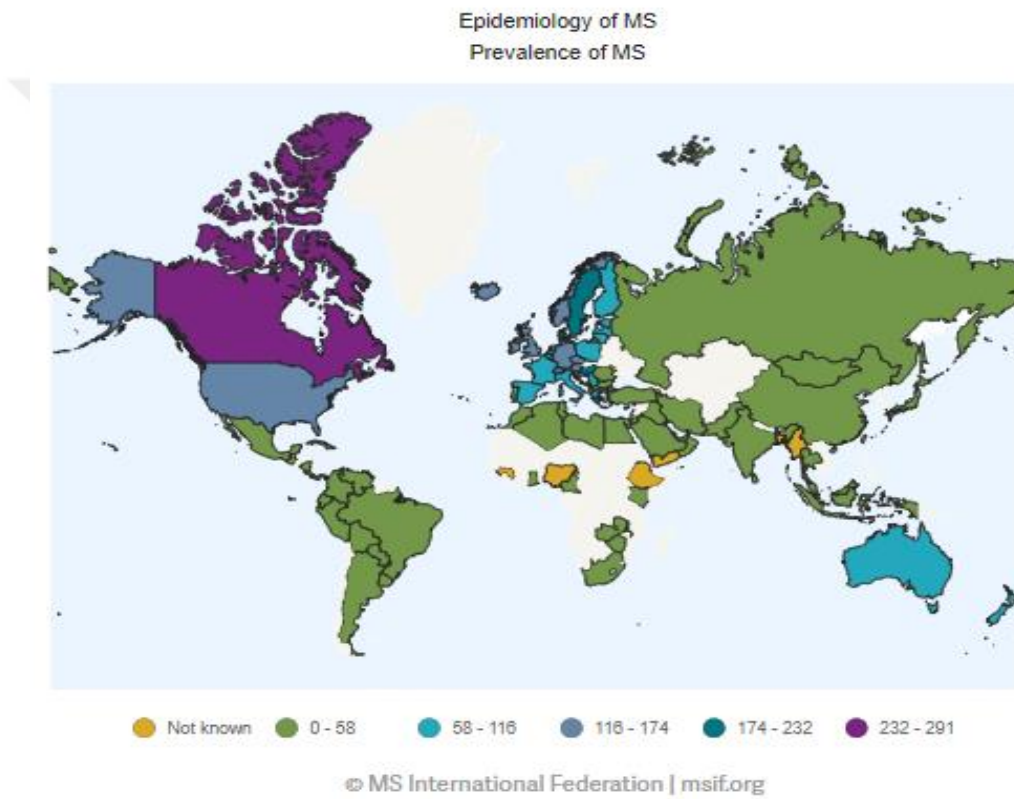
MS, yaşam kalitesini etkileyen, yüksek sağlık maliyetlerine sebep olan ve genç hastaların travmatik olmayan sakatlıklarının en yaygın sebebidir (15). MS'in Avrupa'da 700.000 kişiyi ve dünya genelinde 2.3 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda MS prevalansında artış olduğu gözlenmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da her yıl 100000'de 0.064 oranında artış rapor edilmiştir (16).

En yüksek MS prevalansı 291/100000 olarak Kanada popülasyonunda raporlanmıştır. Bunun yanı sıra San Marino'da 250/100000, İsveç'te 189/100000, Macaristan'da 176/100000, Kıbrıs'ta 175/100000, Birleşik Krallık'ta 164/100000,



Çek Cumhuriyeti'nde 160/100000, Norveç'te 160/100000, Danimarka'da 154/100000 ve Almanya'da 49/100000 olarak bulunmuştur. En düşük prevalans, Sahra altı Afrika'da 2.1/100000, Doğu Asya'da 2.2/100000 ve ekvator bölgesinde 3/100000 olarak bildirilmiştir (17).

“MS Atlası” 2013 verilerine göre MS Türkiye'deki prevalansının 55/100000 olduğu görülmektedir (18). (Şekil 2.1) Multipl sklerozun Sivas kent popülasyonundaki prevalansı ise 288/100000 olarak saptanmıştır (19).



**Şekil 2. 1.** MS epidemiyolojisi (18).

#### 2.1.4. Etiyoloji

MS'in nedenleri hala kesin olarak ortaya konulmuş olmasa da hastalığın etiolojisinde genetik yatkınlığın ve çevresel risk faktörlerinin etkileşiminin rol oynadığı bilinmektedir. Multipl skleroza genetik yatkınlık sadece hastalık riskinin bir kısmını açıklar; yaşam tarzı ve çevresel faktörler, MS riskinde anahtar rol oynamaktadır (20,21).

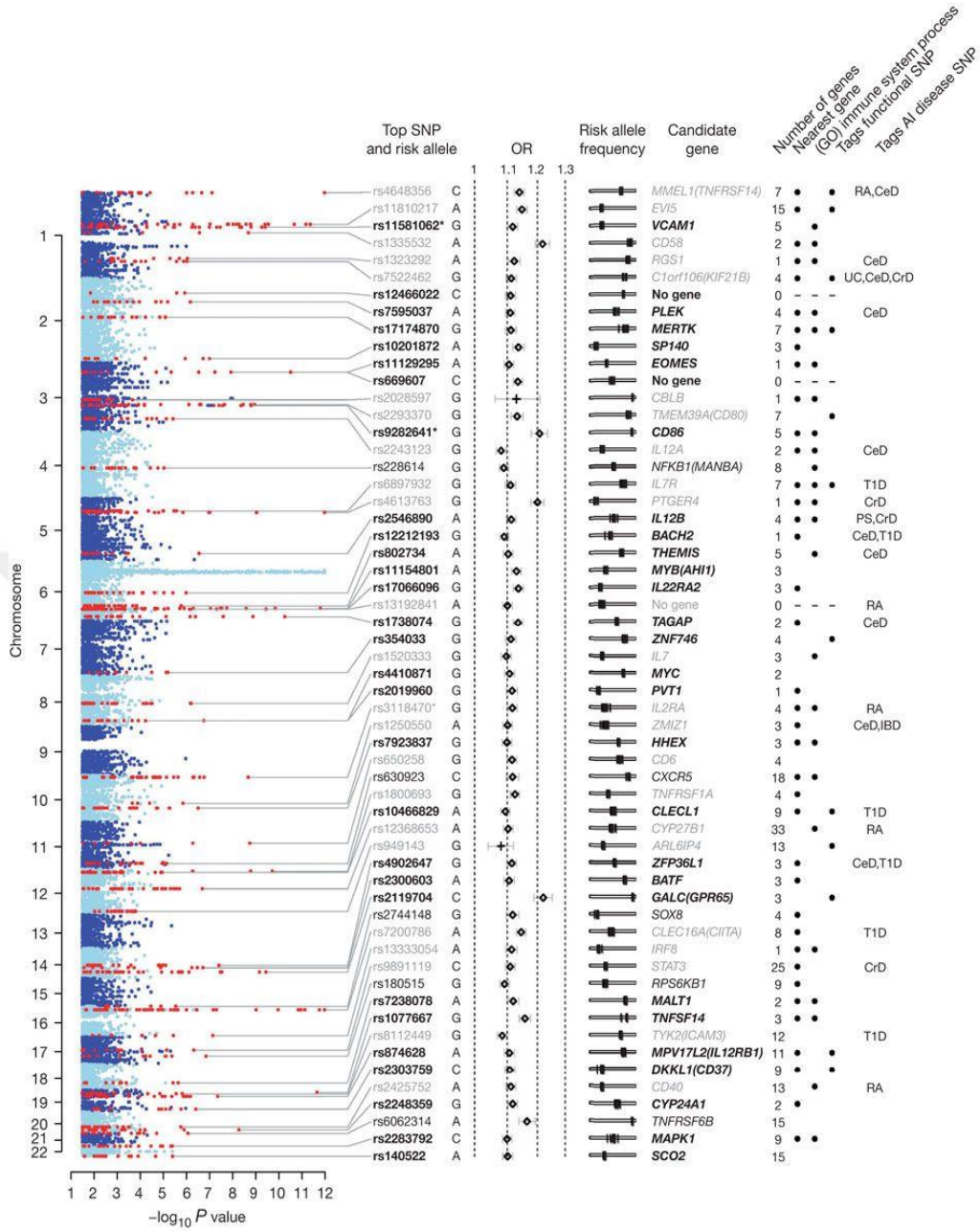
## **Risk Faktörleri**

### **Çevresel faktörler ve yaşam şekli**

Genetik olmayan faktörler, patojenik yolakları etkileyebilmekte ve bazılarının modifiye edilebilmesi önem arz etmektedir. MS ile ilişkilendirilmiş yüksek enlem, kadın cinsiyet, sigara içme, yetersiz güneş ışığına maruz kalma ve / veya diyet alımının neden olduğu düşük D vitamini düzeyleri ve Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu gibi risk faktörlerinin yanı sıra ergenlik döneminde obezitenin varlığı da MS riskini arttıran faktörler arasında yer almaktadır. Organik çözücülere maruziyet ve vardiyalı çalışmanın hastalık riskini arttırdığı bildirilirken, nikotin veya alkol kullanımı, sitomegalovirüs enfeksiyonu ve yüksek kahve tüketimi gibi faktörlerin azalmış risk ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (21).

### **Genetik Faktörler**

Ailesel MS prevalansı, tüm MS fenotipleri için ~%13'tür (22). MS poligenik olarak kalıtılır ve birçok genin polimorfizmi hastalık riskiyle ilişkilidir. Bunlar arasında sınıf I ve II HLA genlerindeki polimorfizmler, MS için en yüksek riski taşırlar (23). Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile insan genomunda 230'dan fazla MS'e yakınlık yaratan risk varyantı tespit edilmiştir. Bu varyantların çoğu, immün sistemde rol alan molekülleri kodlarlar (örneğin, kromozom 6 üzerindeki HLA genleri, HLA-DRB1 \* 15: 01 polimorfizmleri ve IL2 ve IL7R'deki polimorfizmler) ve diğer sistemik immün hastalıklar için daha yüksek risk ile ilişkilidirler (24). MS'e yakınlık yaratan ana HLA haplotipi DRB1 \* 15: 01'dir. Teorik olarak HLA-DRB1 \* 15: 01 bağlanma paketi MSS ilişkili otoantijenlerin optimal şekilde sunulmasına, bağlanmasına ve T hücrelerinin MSS'ne saldırmasına sebep olmaktadır. En güçlü ikinci MS gen varyantı, koruyucu olan HLA A02'dir. HLA A02 allellerinin, EBV gibi MS ile ilişkili virüslerin eliminasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (25). IL2R ve IL7R regülatör T hücrelerinde eksprese olurlar ve multipl sklerozda immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (26). MS için yapılan farklı GWAS analizleri ve meta analizlerde tespit edilen CD58, IL2RA, EVI5, CLEC16A, IL7RA, TYK2, TNFRSF1A, IRF8 ve CD6 genlerinin yanı sıra 2011 yılında 9000 MS vakası ile yapılan uluslararası GWAS analizi ile daha önce belirtilenlere ek olarak 29 yeni yakınlık lokusu tespit edilmiştir (Şekil 2.2) (27,28,29).



Şekil 2. 2. MS ile ilişkili genom bölgeleri (29).

## Epigenetik ve MS

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesinde kararlı ve kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Epigenetik fenomen, hücre döngüsü ve gelişimi gibi normal fizyolojik fonksiyonlar sırasında gen ekspresyonu kalıplarını kontrol etmede ve çevre faktörlerine tepki için oldukça önemlidir (30). Temel epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve küçük RNA unsurlarının (miRNA, siRNA) gen ekspresyonu ile ilişkili düzenlemelerinden oluşur.

DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin gendeki promotor bölgesine bağlanmasını önlemeyi amaçlar ve böylece gen ifadesini susturur. Bu işlem, promotor gen bölgelerindeki CpG adalarındaki sitozini 5-metilsitozine dönüştüren DNA metil transferazlar (DNMT) ile sağlanır. Histon değişiklikleri asetilasyon ve fosforilasyon gibi transkripsiyonu düzenleyen çeşitli prosedürleri içerir. Bir histonun N-terminal ucunun asetilasyonu kromatin dekompresyonuyla transkripsiyonun upregülasyonuna neden olur. Mikro-RNA'lar, tek sarmallı, az miktarda nükleotidi içeren, protein kodlamayan RNA'lardır. Mikro-RNA'lar gen ekspresyonunu, transkripsiyondan sonra etkileyebilirler ve ekspresyonları farklı iki mekanizmanın etkileşimine bağlıdır. Mikro-RNA'lar, RNA ile ilişkili susturma kompleksi (RISC) adı verilen bir ribonükleoproteine, spesifik veya çoklu mRNA dizilerine uygun olmayan bir şekilde bağlanarak gen ekspresyonunu sustururlar (31).

Yakın zamana kadar, DNA'da bilinen tek modifiye baz, DNMT'ler tarafından epigenetik olarak işaretlenen 5-metilsitozin (5mC) idi. Somatik hücrelerde, 5mC yalnızca CpG dizisinde bulunurken, CpG olmayan metilasyon embriyonik kök hücrelerde ve nöronlarda gösterilmiştir. Yüksek düzeyde eksprese olan genlerin promoter bölgeleri oldukça az düzeyde CpG metilasyonuna sahiptirler. DNA metilasyonuna iki sınıf DNMT katılır. De novo DNA metil transferazları DNMT3A ve 3B, DNA metilasyon paternleri oluşturmak için gereklidir, buna karşılık bakım yapan (maintenance) DNA metil transferaz olan DNMT1, DNA replikasyonunu takiben DNA metilasyon paternlerini yeniden kurar (32). TET1, TET2 ve TET3 proteinlerinden oluşan TET protein ailesi 5mC'nin 5hmC'ne dönüşümünü katalizleyerek DNA demetilasyonunu sağlar (5).

Otoimmün hastalıklarda epigenetik kalıtımının etkisinin en önemli göstergesi ikiz çalışmalarıdır. Multipl sklerozda monozigotik ikizlerin sadece üçte biri konkordans gösterir. Bunu açıklayan en olası epigenetik mekanizma ikizlerin farklı metilasyon kalıplarına sahip olmasıdır. MS, kadınlarda erkeklerden iki kat daha yaygındır (33). MS hastalarında kadın cinsiyet baskınlığı, X kromozomunun epigenetik düzensizliği ile açıklanabilir. X kromozomundaki inflamatuvar genlerde olası bir inkomplet inaktivasyon kromozoma özgü bu genlerin ekspresyonunu artırabilir ve bu durum MS etiyolojisinde yer alabilir (34). MS'de gözlenen epigenetik değişiklikler ile ilgili çalışmalar ve sonuçları tablo 2.1. 'de gösterilmiştir.

**Tablo 2. 1.** MS'de gözlenen epigenetik değişimler (34).

Epigenetik Değişim	Hücre/doku	Sonuç	Referans	
DNA metilasyonu	Plazma DNA	Değerlendirilen 56 CpG bölgelerinde genel hipermetilasyon	Liggett ve ark. (2010)	
	Tam kan	MHC2TA promotor metilasyonunda fark yok	Ramagopalan ve ark. (2008)	
	PKMH	PAD2 promotor hipermetilasyonu	Calabrese ve ark. (2012)	
	PKMH	SHP-1 promotor hipermetilasyonu	Kumagai ve ark. (2012)	
	PKMH	TET2 promotorunda 3 farklı metile CpG, global 5hmC düşüklüğü	Calabrese ve ark. (2014)	
	CD4 T hücresi		IL-17, FoxP3 promotor hipometilasyonu	Janson ve ark. (2011)
			Monozigotik ikizlerin 2 milyon CpG adacığında farklılık yok	Baranzini ve ark. (2010)
			74 farklı metile bölge	Graves ve ark. (2014)
			Genel hipermetilasyon eğilimi	Bos ve ark. (2015)
		Beyin	PAD2 promotor hipometilasyonu 20 hipometile, 319 hipermetile bölge	Mastronardi ve ark. (2007) Huynh ve ark. (2014)
Histon modifikasyonu	Beyin	Asetile histon H3 artışı	Pedre ve ark. (2014)	
MikroRNA	Serum/plazma	Artmış: miR-614, 572, 648, 422a, 1826, 22	Siegel ve ark. (2012)	
		Azalmış : miR-1979 Azalmış: miR-15b, 223	Fenoglio ve ark. (2013)	

**Tablo 2.1** (Devamı) MS’de gözlenen epigenetik değişimler (34).

Epigenetik Değişim	Hücre/doku	Sonuç	Referans
MikroRNA	PKMH	Artmış: miR-326	Du ve ark. (2009)
		Azalmış: miR-18b, 599	Otaegui ve ark. (2009)
	PKMH (T reg)	Artmış: miR-155, 92a, 19a, let7f	Paraboschi ve ark. (2011)
		Azalmış: miR-15a, 16-1	Lorenzi ve ark. (2012)
PKMH (CD4 ve CD8 hücreler)	PKMH (CD4 ve CD8 hücreler)	Artmış: miR-19b	De Santis ve ark. (2010)
		Azalmış: miR-15a, 16-	Lorenzi ve ark. (2012)
Beyin lezyonu	Beyin lezyonu	Artmış: miR-16, 155, 142-3p	Arruda ve ark. (2015)
		Artmış 14 miRNA (önemli olarak miR-142-5p, 219-5p, 338-5p, 219-2-3p, 584)	Noorbakhsh ve ark. (2011)
		Azalmış 8 miRNA (önemli olarak miR-656, 184, 139, 23b, 328)	

---

PKMH: Periferik kan mononükleer hücre

---

### 2.1.5. Patoloji

Multipl skleroz, hem enflamatuar hem de nörodejeneratif komponentlere sahip kompleks patogenezi olan immün aracılı bir hastalıktır. Hastalığın temel patolojisi lenfosit ve lipid yüklü makrofajların perivasküler invazyonu ve hastalığın erken evresinde dahi gözlenen aksonal transeksiyondan oluşur. Harabiyet sadece beyaz madde alanlarını değil aynı zamanda gri madde ve bazal ganglionların ince miyelinli alanlarını da içerir. Akut lezyonların kenarları devam eden demiyelinizasyon nedeniyle belirsiz ve lezyon merkezi ödemli olabilir (35). Plaklar hem beyaz hem de gri cevherde oluşurlar ve tipik olarak beyin, optik sinir ve omurilik dahil olmak üzere MSS boyunca bulunurlar (36,37) .

### 2.1.6. İmmün Patofizyoloji

Multipl sklerozun immün patofizyolojisinde T ve B lenfositler, periferik miyeloid hücreler mikroglia ve astrositler gibi MSS'nin yerleşik hücreleri yer almaktadır (38). Periferik immün hücreler ile birlikte MSS hücreleri immün mediatörler salgılayarak, inflamatuvar hücreleri MSS'ne çekerler ve böylece nöronal demyelinizasyona ve parankimde inflamasyona sebep olurlar (39).

#### T lenfositler

CD4+ ve CD8+ T hücreleri yüzey molekülleri, T hücrelerinin tanınmasında rol oynarlar (40). Sitotoksik T lenfositleri olarak da adlandırılan CD8+ T hücreleri, spesifik olarak mutant hücreleri ve virüs tarafından enfekte edilen hedef hücreleri sitotoksisite yoluyla öldürür. CD4+ T hücreleri yaygın olarak yardımcı T hücreleri (Th) olarak adlandırılırlar ve Th1, Th2 ve Th17 alt tiplerinden oluşurlar. CD4+ T hücreleri, inflamatuvar sitokinleri sentezleyerek ve salgılayarak immün cevaba yardımcı olur. T hücreleri, kan beyin bariyerini inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle geçerek MSS'ne geçebilir (41). Multipl sklerozdaki miyelin hasarını otoreaktif CD4+ T hücrelerinin yönlendirdiği ve CD8+ T hücrelerinin hasar bölgesinde oligoklonal artışının olduğu gösterilmiştir (42). Bu bozulmuş efektör T hücre aktivasyonunun potansiyel sebebi düzenleyici T hücrelerinin (Treg) azalmış fonksiyonu ya da MSS spesifik efektör T hücrelerinin Treg hücre aracılı regülasyona direnç göstermesidir. Multipl sklerozda Treg hücrelerinde forkhead box protein P3 (FOXP3) ekspresyonu azalmıştır. Bu sebeple Treg fonksiyon bozukluğu MS'in otoimmünitesinde önemli yere sahiptir (43).

MS hastalarının periferik kanlarında ve MSS'de proinflamatuvar efektör T hücreleri olan ve IL-17 eksprese eden CD4+ (Th17) ve CD8+ hücrelerinin artmış olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin direkt olarak nöron ve oligodendrosit hasarına ve makrofajlar gibi diğer hücrelerin aktivasyonu ile indirekt olarak doku hasarına sebep olduğu düşünülmektedir. Multipl sklerozda rol oynayan diğer efektör T hücre alt kümeleri, IFN- $\gamma$  salgılayan CD4+ T hücreleri (TH1 hücreleri) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) eksprese eden CD4+ ile CD8 + T hücrelerini içerir (44). IL-17 multipl sklerozun erken evresinde etkinken, IFN- $\gamma$  ise hem hastalığın erken evresinde hem de nökslerinde rol almaktadır (45).

Multipl sklerozda anormal T hücresi aktivasyonu için, periferde ve MSS'de bulunan B lenfositler ve miyeloid hücreleri (makrofajlar, dendritik hücreler ve mikroglia) gibi antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından T hücrelerine antijen sunumu gereklidir. Bununla birlikte sorumlu antijenler kesin olarak tanımlanamamıştır (46). Miyelin ilişkili antijenler, nöronal ve glial hücre yüzey antijenlerinin MS ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (47). MS hastalarının dolaşımdaki miyeloid hücrelerinin, mikroRNA miR-155'in ekspresyonunda ve TNF, IL-12, IL-6, IL-23 ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerinde artış vardır. Bunlar da Th1 hücresi ve Th17 hücre farklılaşmasında rol oynarlar. Bütün bunlar Th1 ve Th17 hücrelerinin multipl sklerozun relapslarında rol aldığıın göstergesidir (11).

### **B lenfositler**

Sağlıklı bireylerin normalde MSS'deki antikor seviyeleri düşüktür. MS hastalarında ise beyin omurilik sıvısında (BOS) oligoklonal band varlığı ve artmış immünoglobulin seviyesi gibi bulgular MSS'deki antikor seviyelerinin anormal olarak yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bulgu multipl sklerozdaki anti-B hücre terapilerinin temelini oluşturur. Anti-CD20 terapisi ile relaps oranı düşse de BOS immünoglobulin profilinde değişim olmaması MS relapsları ile B lenfositlerinin antikordan bağımsız ilişkisi olduğunu desteklemektedir (48). MS'li bireylerde B lenfositlerden IL-6, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), tümör nekrozis faktör (TNF) ve lenfotoksin- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokin salınımı artarken IL-10 gibi düzenleyici sitokinlerin düzeyi azalmıştır. MS hastalarındaki B lenfositlerin anormal sitokin profili, TNF ve IL-6 yoluyla bozulmuş Th1 ve Th17 yanıtına sebep olarak miyeloid hücrelerde pro-inflamatuvar salınımı indükler ve bu yolla B lenfositler relapslardaki hücrel immün yanıt kaskadına katılırlar (11,49).

#### **2.1.7. Klinik Bulgular**

Multipl sklerozun ilk belirtileri hem lezyonların konumuna hem de semptom başlangıcına göre değişmektedir. İlk nörolojik disfonksiyon epizodu klinik izole sendrom olarak adlandırılır. Klinik izole sendrom yaygın olarak kendini akut unilaterale optik nörit, kısmi miyelit ya da beyin sapı sendromu olarak gösterir. Multipl sklerozun sık görülen semptom ve belirtileri şu şekilde sıralanabilir (50,51);



- Akut unilateral optik nörit
- İnternükleer oftalmopleji ya da VI. sinir palsi sebebi ile diplopi
- Fasiyal sensöriyal duyu kaybı ya da trigeminal nevralsi
- Serebellar ataksi ve nistagmus
- Parsiyel miyelopati
- MSS'ne ait sensöriyel semptomlar
- Lhermitte bulgusu
- Asimetrik ekstremite güçsüzlüğü
- Üriner inkontinans

Diğer semptomlar olarak bilişsel yetersizlik (%40-70 hastada), bitkinlik (%95), uyku bozuklukları (%54) olarak sıralanabilir (11).

Multipl sklerozun klinik belirtilerini derecelendirmek için birkaç kalitatif ve yarı kantitatif ölçek önerilmiştir. Bunlardan Genişletilmiş Engellilik Durum Ölçeği (Expanded Disability Status Scale – EDSS), klinik engellilik değerlendirmesi için en yaygın kabul gören ölçektir (11, 52).

### **2.1.8. MS Klinik Alt Tipleri**

#### **Radyolojik izole sendrom (Radiologically isolated syndrome-RIS)**

Nörolojik bulgusu olmayan, MRG bulgusu kuvvetli şekilde multipl sklerozu destekleyen hastalar için kullanılmaktadır (53).

#### **Klinik izole sendrom (Clinically isolated syndrome-CIS)**

Klinik izole sendrom, klinik bulguları multipl sklerozu düşündüren ilk nörolojik tablodur. Genellikle genç erişkinlerde görülür, monofokaldır, akut ya da subakut gelişir ve optik siniri, beyin sapını veya omuriliği etkiler. Diğer MS atakları gibi ateş ya da enfeksiyon bulguları olmaksızın klinik tablo en az 24 saat sürmesi beklenir. (54).

#### **Ataklarla seyreden MS (Relapsing remitting MS –RRMS)**

En yaygın MS fenotipi, MS hastalarının yaklaşık%85'inde bulunur. RRMS, nörolojik disfonksiyonların olduğu “relaps” ve yeni nörolojik bulguların olmadığı “remisyon” periyodları ile karakterizedir. Yaşla ve hastalığın ilerlemesi ile birlikte

relaps sıklığı ve inflamatuvar patoloji büyüklüğü azalır. Enfeksiyonlar, stres ve hamilelik relaps ile ilişkisi ortaya konmuş en önemli faktörlerdir (55).

### **Sekonder progresif seyreden MS (Secondary progressive MS-SPMS)**

Sekonder progresif seyreden MS, RRMS seyrinin kademeli kötüleşmesi ve özürülülüğün eklenmesi ile karakterizedir (56). RRMS'ten sekonder progresif MS'e geçiş genellikle hastalığın başlamasından 10 ila 20 yıl sonra gerçekleşir (57).

### **Primer progresif seyreden MS (Primary progressive MS-PPMS)**

Hastalığın başlangıcından itibaren progresyon gösteren, relaps ve remisyon fazlarının gözlenmediği MS fenotipidir. %10-20 hastada gözlenir (58). PPMS klinik olarak kendini genellikle asimetrik spastik paraparezi ile karakterize omurilik sendromu ile gösterir (59). Daha az sıklıkla, PPMS hastalarında bilişsel, beyin sapı veya görsel semptomlarla birlikte ilerleyici serebellar ataksi gelişir (60).

### **2.1.9. Tanı**

MS öncelikle klinik bir tanıdır. Anamnez ve fizik muayene tanı koymada en önemli araçlardır. MRG, multipl sklerozun klinik tanısını desteklemek için tercih edilen radyolojik incelemedir (Şekil 1.3) (61). Paraklinik diye adlandırılan BOS incelemesi, ürodinami çalışmaları, uyarılmış potansiyeller, optik koherens tomografi tanı için yardımcı olabilecek diğer testlerdir (62).

Multipl sklerozun tanısı için 2017 yılında revize edilen McDonald tanı kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 2.2.). MS tanısı için kullanılan bu kriterler RRMS başlangıcını gösteren tipik klinik izole sendromu olan hastalar için uygulanır. McDonald kriterleri, PPMS'i düşündüren sinsi nörolojik progresyon ile başvuran hastalara da uygulanabilir (63).

**Tablo 2. 2.** MS tanısı için revize edilmiş McDonald 2017 kriterleri – 2018 Multipl skleroz tanı ve tedavi kılavuzu'ndan (64)

Atak	Objektif klinik bulgulu lezyon sayısı	MS tanısı için gerekli ek veri
≥2 atak	≥2	Yok*
≥2 atak	1+ öyküde başka bir alanda ki lezyona ait atak**	Yok*
≥2 atak	1	SSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG*** ile mekanda yayılımın gösterilmesi
1 atak	≥2	Ek bir klinik atak veya MRG**** ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB***** varlığı
Sinsi progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin 2'si <ul style="list-style-type: none"> <li>• MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥1 lezyon</li> <li>• Spinal kordda ≥2 lezyon</li> <li>• BOS-spesifik OKB varlığı</li> </ul>

\* : Mekanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Ancak beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MR bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.

\*\* : Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güveniliridir.

Öyküdeki atağa ait

dökümanede edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuvar demyelinizan olaya ait tipik semptom ve

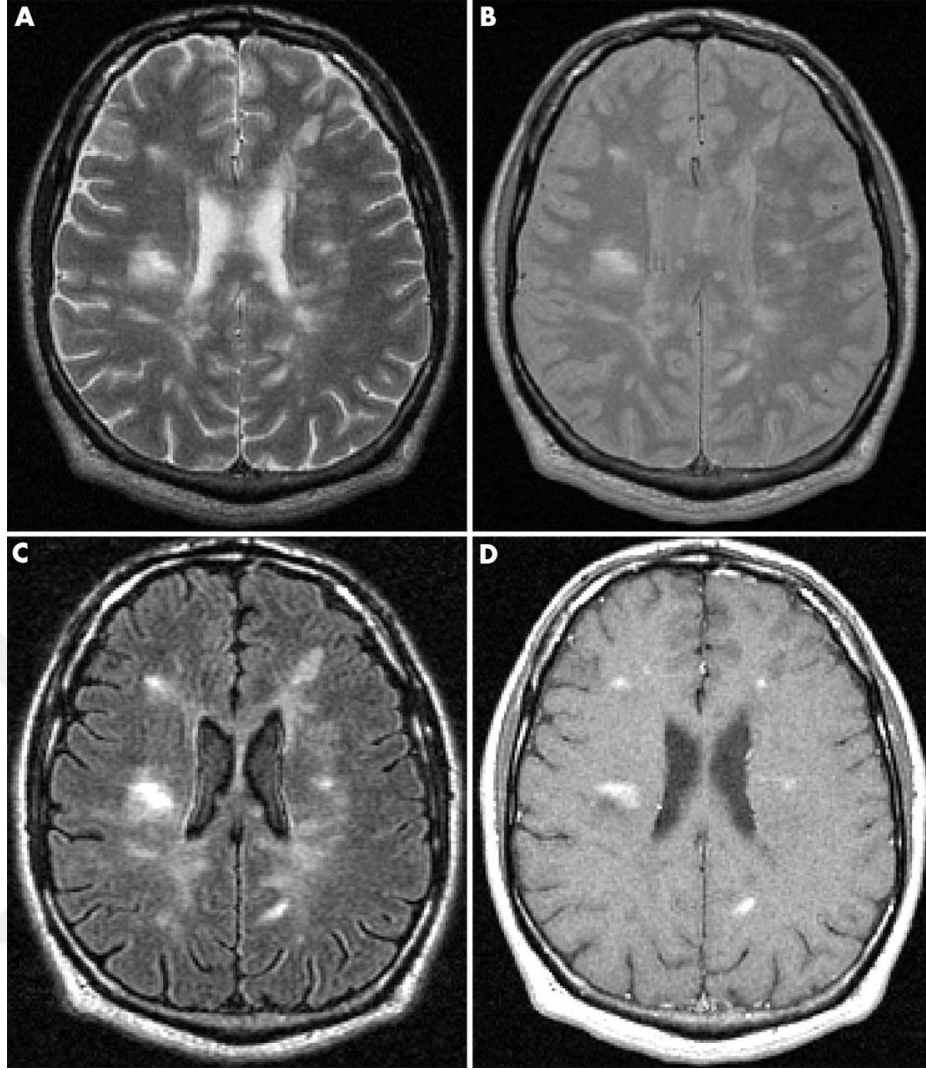
klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.

\*\*\*: MRG'de alanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın ≥2'sinde ≥1 lezyon olması

\*\*\*\*: MRG'de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG'de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG'sinde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması.

\*\*\*\*\*: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer.

MS: Multipl skleroz, SSS: Santral sinir sistemi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BOS: Beyin omurilik sıvısı, OKB: Oligoklonal band



Şekil 2. 3. MS hastasına ait periventriküler lezyonların aksiyel MRG görüntüleri.  
(65)

A) T2 ağırlıklı görüntü  
görüntü

B) Proton Dansite ağırlıklı

C) FLAIR görüntü

D) T1 ağırlıklı görüntü

### 2.1.10. Ayırıcı Tanı

Klinik ve radyolojik olarak Multipl sklerozu taklit eden hastalık sayısı oldukça fazladır. Bu hastalıklar tablo 2.3.'te gösterilmiştir (11).

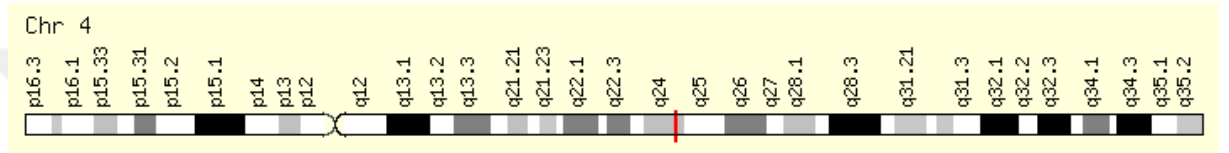
**Tablo 2. 3.** MS'in ayırıcı tanısı (11).

<b>Enfeksiyon hastalıkları</b>	
•	Menenjit
•	Ensefalit
•	Lyme hastalığı
•	İntraserebral abse
<b>Genetik hastalıklar</b>	
•	Lökodistrofiler
•	Leber'in hereditör optik nöropatisi
•	Fabry hastalığı
<b>Metabolik hastalıklar</b>	
•	B12 vitamini eksikliği
•	Bakır eksikliği
<b>Vasküler hastalıklar</b>	
•	Serebral küçük damar hastalığı
•	CADASIL (Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and Leukoencephalopathy)
•	Susac sendromu
•	MSS'nin primer anjiiti
•	Dural arteriovenöz fistül
<b>İmmün aracılı sistemik hastalıklar</b>	
•	Sistemik lupus eritematozus
•	Behçet hastalığı
•	Sarkoidoz
•	Sjögren sendromu
<b>MS dışı idiyopatik inflamatuvar demiyelinizan hastalıklar</b>	
•	Nöromiyelitis optika spektrumu hastalıklar
•	Miyelin-oligodendrosit glikoprotein (MOG) ensefalomyeliti
•	Akut dissemine ensefalomyelit
•	Steroidlere yanıtı pontin perivasküler tutulumun olduğu kronik lenfositik inflamasyon
<b>MS varyantları</b>	
•	Balo konsentrik skleroz
•	Schilder hastalığı
•	Marburg MS
<b>Bağ ağrısı</b>	
•	Migren

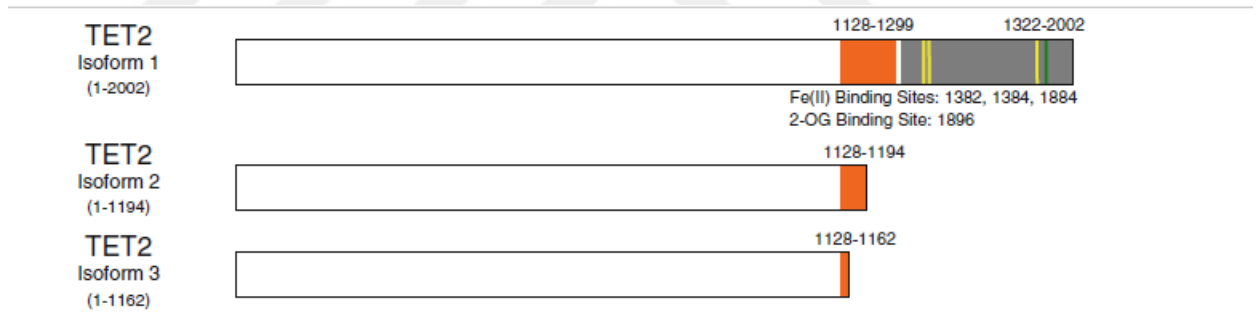
## 2.2. TET2 GENİ

### 2.2.1. TET2 Geni Yapısı

İnsan TET2 geni, 4. kromozomun uzun kolunda (4q24) bulunur, 133,942 baz büyüklüğündedir (Şekil 2.4.). Bu gen 11 ekzon içerir, ve alternatif splicing yoluyla elde edilen üç TET2 izoformunu kodlar (Şekil 2.5.). En uzun TET2 formu ~ 2.002 amino asitten oluşur ve katalitik alanları da dahil olmak üzere C-terminal bölgelerinde yaklaşık % 70 TET1 ile homoloji gösterir. TET2'nin diğer iki izoformu katalitik domain içermezler ve daha kısadırlar (1,164 ve 1,194 aminoasit uzunluğunda) (66).



Şekil 2. 4. TET2 geni genomik pozisyonu (GeneCards)



Şekil 2. 5. TET2 enzim izoformları (64)

### 2.2.2. TET Protein Ailesi

TET proteinleri  $Fe^{2+}$  ve  $\alpha$ -ketoglutarat bağımlı dioksijenazlardır.  $5mC$ 'yi oksidize ederek  $5hmC$ 'ye dönüştürürler ve DNA demetilasyonunda görev alırlar (67). Memelilerde TET protein ailesi, hepsi C-terminal katalitik bölgelerinde yüksek derecede homoloji içeren TET1, TET2 ve TET3 olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır (68). TET enzimleri isimlerini akut myeloid lösemide sıklıkla gözlenen kromozomal translokasyondan (t(10;11)(q22;q23)) almışlardır (69). Üç TET proteininin tümü, 2-oksoglutarat (2-OG) oksijenazlara benzeyen katalitik domaine sahiptirler. Bu tür enzimler 2-OG ve oksijenin karbondioksit ve süksinat haline dönüştürülmesi yoluyla,

bazın azotu (N) veya karbonu (C) üzerinden metillenmiş DNA ve RNA'yı okside edebilirler (68).

TET2 kök hücrelerin kendini yenilemesi, monositlerin terminal farklılaşması gibi hematopoezle ilgili olaylarda önemli rol oynar (70). TET2'nin hematopoetik kök/progenitör hücrelerde ekspresyonu düzeyi oldukça yüksektir. Kemik iliği hücrelerindeki TET2 delesyonlarında immatür c-Kit+Lin- hücrelerindeki artış TET2 fonksiyon kaybında kök/progenitör hücre farklılaşmasının bozulduğunun göstergesidir (71). TET2 genindeki homozigot ve heterozigot mutasyonlar, insan hematopoetik malignitelerinde tespit edilmektedir. TET2 geni mutasyonları miyelodisplastik sendromda (MDS) %20-35, kronik miyelomonositik lösemide %30-60, akut miyeloid lösemide %12-34 ve lenfoid malignitelerde %2-33 oranında görülmektedir (72).

Farelerde heterozigot ve homozigot Tet2 kaybının, muhtemelen makrofaj kaynaklı inflamasyon mekanizmasıyla ateroskleroza hızlandırdığı gözlenmiştir. Bu durum için özellikle, iki makrofaj aracılı mekanizma önerilmektedir. Bunlar; inflamazom aracılı IL-1  $\beta$  salınımı ve anormal kemokin ekspresyonudur (73). Bu mekanizmaların dışında embriyogenez esnasında gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi, kanser gelişimi ve somatik hücre programlanmasında önemli rol oynar (74).

Son zamanlarda, TET2'nin bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde de yer aldığı bildirilmiştir (32). TET2 diğer TET ailesi genlerine nazaran tüm Th hücrelerinde yüksek ekspresyon düzeyine sahiptir. TET2 -/- hücrelerde azalmış p300 alımına bağlı IFN- $\gamma$  and IL-10 üretiminin mRNA ve protein düzeyindeki üretiminin azalması, TET2'nin Th1 ve Th17 hücre farklılaşmasını düzenlendiğini göstermektedir (75). Multipl sklerozlu bir fare modelinde (otoimmün ensefalomyelit), TET2 upregulasyonu naif CD4+ T hücre proliferasyonunu ve Th1, Th17 hücrelerine farklılaşmasını inhibe ederek otoimmün ensefalomyelitin gelişmesine karşı koruyucu etki göstermiştir (8). Başka bir çalışmada, RhoA ile birlikte TET2 mutasyonunun, anormal CD4+ T hücre proliferasyonuna ve T hücre homeostazının bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir (76). TET2 ayrıca Treg farklılaşmasını ve immün homeostazı sağlamak için Foxp3 demetilasyonunda görev alır (77). TET2'nin fare makrofaj farklılaşması sırasında yüksek oranda eksprese edildiğinin tespiti ile doğal immün sistemin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (78). TET2/TET3 fonksiyon kaybı ile B hücre

farklılaşmasında ve fonksiyonlarında defektler meydana gelebilmektedir (79). TET2 eksikliği, plazma hücre farklılaşmasını bozar, germinal merkez hiperplazisine sebep olur ve B hücresi lenfomagenezini artırır (80).

Özetle TET2, immün toleransın korunmasında ve/veya oluşturulmasında kritik bir rol oynar. Bu nedenle TET2 fonksiyonunun manipülasyonu, toleransın artırılması (örneğin otoimmünite sırasında) veya antitümör immünitesinin artırılması için makul bir seçenek olabilir (72).

### 2.2.3. TET2 Geni Varyantları

Mutasyon, nükleotit dizisindeki kalıcı bir değişiklik olarak tanımlanırken, polimorfizm %1'in üzerinde bir frekansa sahip varyant olarak tanımlanır. Bununla birlikte, "mutasyon" ve "polimorfizm" terimlerinin kullanılması çoğunlukla patojenik ve iyi huylu etkilerin anlaşılmasında karışıklığa sebep olabilmektedir. Bu nedenle 2015 yılında Amerikan Genetik ve Genomik Koleji (ACMG) tarafından bir kılavuz yayınlanarak mutasyon ve polimorfizm yerine önüne (i) patojenik, (ii) olası patojenik, (iii) önemi bilinmeyen, (iv) olası benign, or (v) benign tanımlayıcıları getirilerek "varyant" teriminin kullanılması önerilmiştir (81).

TET2 geninin fonksiyonunu bozan mutasyonların myeloid kanserlerin etiolojisinde yer aldığı bilinmektedir (10). TET2 c.4140T>C/p.H1380H (rs3733609) tek nükleotid polimorfizmi (SNP) myeloproliferatif neoplazilere (MPN) kalıtsal yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir (82). TET2 geninin tanımlanan bir başka SNP'si 11. ekzonda bulunan TET2 rs2454206 (p.Ile1762Val)'dir. Bu SNP pediatrik akut myeloblastik lösemnin (AML) prognozu ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalarında Tip 2 diyabet ile ilişkilendirilmektedir (83,84). Uluslararası Multipl Skleroz Genetiği Konsorsiyumu (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium-IMSGC)'nin yaptığı Immunochip çalışmasında TET2 geni intronik tek nükleotid varyantı c.3804-7577A>C (rs2726518) multipl skleroza yatkınlık ile ilişkili bulunmuştur (85). Anwar ve ark. yaptıkları vaka takdiminde MDS hastasında tespit edilen c.5162 T>G, p. L1721W (rs34402524) yanlış anlamlı varyantının TET2 geninin fonksiyonunu bozabileceğini bildirmiştir (86). Sistemik mastositoz hastalarında yapılan TET2 geni analizi dizi analizi sonucunda c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) varyantının hastalıkla ilişkili olabileceği bildirilmiştir. (87)



#### 2.2.4. TET2 Geni ve MS

Metilsitozin dioksigenaz olan TET2, otoimmüitedeki IFN- $\gamma$  ve IL-17 üretimini kontrol etmek için DNA demetilasyonunu sağlar ve HDAC2'nin histon deasetilasyonu yoluyla IL-6'nın transkripsiyonunu baskılayarak inflamasyonun çözülmesinde rol oynar (6,7). İn vivo olarak TET2, otoimmün hastalıkların sitokin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. TET2 DNA demetilasyonunu gerçekleştirerek T hücrelerinde sitokin gen ekspresyonunu aktifleştirir (75). Wang ve ark. çalışmalarında DNA metilasyon inhibitörü olan desitabini farelerde yüksek dozda kullanarak multipl sklerozun deneysel modeli olan otoimmün ensefalomyelitini oluşumunu engellediğini göstermiştir. Ayrıca naif CD4+ T hücrelerinin, Th1 ve Th17 dönüşümünün desitabin tarafından in vivo ve in vitro olarak baskılandığı tespit edilmiştir. Daha da önemlisi TET2 ekspresyonunun artışının yol açtığı bazı hücre döngüsü inhibitörlerinin (p15, p16, p21) de ekspresyonlarının artması ile T hücre proliferasyonunun kuvvetli bir biçimde baskılandığı ortaya konulmuştur (8). R. Calabrese ve ark. yaptıkları bir çalışmada, MS hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde TET2 geni ekspresyonunun ve 5hmC düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını göstermişlerdir (9).

TET enzimleri proinflamatuvar sitokinlerin baskılanmasında etkili olmaktadır. MS hastalığında TET2 enzim ve 5hmC düzeylerinin azalması MS patogenezinin inflamatuvar boyutuna katkı sunabilir. TET2 geni varyantlarının TET2 ekspresyonunu etkileyerek multipl sklerozdaki inflamasyon süreci ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte TET2 geni varyantlarının multipl sklerozdaki rolü üzerine yapılmış çok az araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmamızda TET2 geni varyantlarının MS ile ilişkisi araştırılarak, multipl sklerozun kompleks fizyopatolojisi ile altında yatan epigenetik mekanizmanın anlaşılması için katkı sağlanması ve literatürde bildirilen tek nükleotid polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubunda kıyaslanarak olası multipl skleroza yakınlıkla ilişkilerinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Bu çalışmanın protokolü Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26.06.2018 tarih ve 2018-06/13 sayılı karar numarası ile onaylandı. Çalışmaya katılan bireylerden bilgilendirilmiş onam alındı.

Çalışmaya Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji polikliniğine başvuran Multipl skleroz tanısı almış 50 hasta dahil edildi. Kontrol grubu 30 sağlıklı bireyden oluşturuldu. Hasta grubu için çalışmadan dışlanma kriterleri; 18 yaşından küçük olmak, kognitif ya da aktif psikotik bozukluk, MS harici otoimmün hastalık varlığı, aktif ya da geçirilmiş malignite öyküsü, MS dışında sistemik hastalık varlığı, sağlıklı kontrol grubu için dışlanma kriterleri; 18 yaşından küçük olmak, herhangi bir nedenle ilaç kullanmak ve sistemik bir hastalık sahibi olmak olarak belirlendi.

Hastalar ve kontrol grubundan genetik analiz için 1 adet EDTA'lı tüpe venöz kan örneği alınıp DNA izolasyonu yapılanaya kadar 20° C derecede bekletildi.

#### 3.2. Moleküler Analiz

##### 3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu

Prosedüre başlamadan önce 20° C derecede bekletilen örnekler, çözünmesi için oda ısısında bekletildi. Genomik DNA izolasyonu için QIAGEN EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Almanya) tam otomatik izolasyon robotu kullanıldı (Tablo 3.1.).

**Tablo 3. 1.** DNA izolasyonu için gerekli ekipman ve reaktifler.

QIAGEN EZ1 Advanced XL ((kat. no. 9001492)
QIAGEN EZ1 DNA blood 200µl kit (kat. no. 951034)
QIAGEN EZ1 Advanced XL DNA Blood Card (kat. no. 9018695)
Sarstedt 2 ml mikrosantrifüj tüpü (kat. no. 72693 ve 72694)

#### Yöntem

1. 200 µl tam kan pipet ile 2 ml'lik örnek tüpüne aktarıldı.
2. EZ1 Advanced XL DNA Blood Card, EZ1 kart slotuna yerleştirildi.

3. 200 µl protokolü için 1. kurulum seçildi.
4. 100 µl elüsyon volümü için 2. kurulum seçildi.
5. Manyetik partiküllerin karışması için reaktif kartuşu 4 kez alt üst edildi.
6. Reaktif kartuşları, kartuş raflarına yerleştirildi.
7. Kapakları açılan elüsyon tüpleri, tüp rafının ilk sırasına yerleştirildi.
8. Filtre içeren tip holder rafın ikinci sırasına yerleştirildi.
9. 200 µl tam kan içeren örnek tüpleri rafın dördüncü sırasına yerleştirildi.
10. Cihaz kapağı kapatıldı ve “Start” tuşuna basılarak purifikasyon prosedürü başlatıldı.
11. Prosedür sonrası elde edilen purifiye DNA içeren elüsyon tüpleri -20° C ‘de saklandı.

-20° C ‘de saklanan DNA örnekleri uygun transport koşulları ile yeni nesil dizileme analizini yapan Multigen Laboratuvarı/İZMİR adresine gönderildi.

### **3.2.2 TET2 Geni Referans Transkripti ve Primerler**

Referans dizi olarak insan TET2 geni NM\_001127208.2 transkripti kullanılmıştır. Kodlayan bölgeler, ekzon-intron bileşkeleri ve intronik SNP’leri kapsayacak şekilde kullanılan primer dizileri tablo 3.2.’de gösterilmiştir.

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

Her bir örnek için hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımı totalde 25 mikrolitre olacak şekilde hazırlandı. H<sub>2</sub>O, 10X tampon, MgCl<sub>2</sub> (25Mm), dNTP (10 mM), ileri ve geri yönlü primerler ve Taq polimerazdan (1 ünite) oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi (Tablo 3.3.), Tablo 3.4.’te verilen termal döngü koşullarında amplifiye edildi.

**Tablo 3. 2.** TET2 geni primer dizileri.

	Primer dizileri	Uzunluk	İlgili SNP
TET2-3F/1	CACCCTTGTTCTCCATGACC	2271BP	
TET2-3R/1	GAGAAGTGCACCTGGTGTGA		
TET2-3F/2	CAAGCGGAATCCCATCTAAA	2032BP	
TET2-3R/2	TTTGCTGCCTAGCTGTCTCTC		
TET2-4F	TAAGCTTTGTGGATGTAGCCTTT	237BP	
TET2-4R	TGAAGGCTGGAAAAATTCTGA		
TET2-5F	TTGATTGCCTCTTGAATTCATTT	234BP	
TET2-5R	ACCCAATTCTCAGGGTCAGAT		
TET2-6F	TGCAAGTGACCCTTGTTTTG	340BP	
TET2-6R	ACCAAAGATTGGGCTTTCTT		
TET2-7F	ATCAGCTGCACAGCCTATATAATG	338BP	
TET2-7R	TCTACAGTTTGGGAAAACTTTGAT		
TET2-8F	TGTTTGGGATTCAAATGTAAGG	328BP	
TET2-8R	TGCAGTGGTTTCAACAATTAAGA		
TET2-9F	TGTCATTCCATTTTGTCTGG	347BP	rs3733609
TET2-9R	TGCATATGTCTTTATTAGCAGTGTGA		
TET2-10F	ACGTTTTCTTTGGGACCTGTAG	519BP	
TET2-10R	CTGCATGTGTACCCCAGAACT		
TET2-11F	TCAAGCAGAGGCATGTTTCAG	1860BP	rs2454206
TET2-11R	ACTGTGACCTTTCCCCACTG		
TET2-6İNT-F	GTGCATAGCCTCCCTCATTATC	211BP	rs2726518
TET2-6İNT-R	CAGAGGACTTTTAAGGCAGTGAA		

F: Forward, R: Reverse, İNT: İntron, BP: Baz çifti, SNP: Tek nükleotid polimorizmi, rs: Referans SNP

**Tablo 3. 3** PCR mix karışımı.

H <sub>2</sub> O		12.5 µl
10X tampon		2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25Mm)		2.5 µl
dNTP (10 mM)		1 µl
Primerler	Forward	1 µl
	Reverse	1 µl
Taq Polimeraz		0.5 µl
DNA		100 ng
<b>Toplam</b>		<b>25 µl</b>

**Tablo 3. 4.** PCR şartları.

Sıcaklık	Süre	
94 °C	5 dk.	
94 °C	30 sn.	35 döngü
60 °C	30 sn.	
72 °C	45 sn.	
72°C	5 dk.	
4 °C	∞	

### 3.2.4 Agaroz jel elektroforezi

Amplifikasyon olup olmadığının kontrolü için, %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 ml'lik erlen içine, 2 gr agaroz ve 100 ml 1X Tris-borat-EDTA (TBE) konulup mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi. Berrak görünüm sağlanınca, hazırlanan tabağa döküldü. Jel donması için beklendi, jel donduktan sonra örnekler jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elde edilen PCR ürünlerinin doğru amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için, her jele marker yüklendi. 120 volt akımda yürüdüktan sonra jel görüntüleme sistemi ile incelendi.

### 3.2.5 Yeni Nesil Dizi Analizi

Yeni nesil dizi analizi için Illumina MiniSeq (San Diego, ABD) platformu kullanıldı. Nextera XT DNA kütüphanesi hazırlama kiti (San Diego, ABD) ile DNA tagmentasyonu için DNA fragmentasyonu ve adaptör dizi eklenerek, kalıp DNA dizilenmeye uygun hale geldi. Başlangıçta tagmentasyon aşaması için 1 ng miktarında DNA kullanıldı. Transpozomlarla enzimatik fragmentasyon ve adaptör solüsyonları ile DNA tagmentasyonu gerçekleştirildi.

Tagmente olan DNA ile amplifikasyon aşamasında, indeks primerleri ve Nextera PCR Mastermix kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi ve tagmente DNA'nın uçlarına indeks diziler eklenerek barkodlandı. Amplifikasyon aşamasından sonra AMPure XP beads ve %80 etanol (EtOH) kullanılarak PCR ürünleri saflaştırıldı. Bu aşamadan sonra her biri farklı kütüphane konsantrasyonuna sahip saflaştırılmış indeks PCR ürünleri normalize edildi. Tüm örnekler tek tüpte birleştirilerek pooling yapıldı. Pool DNA kütüphanesi dilüsyon ve

denatrasyon işlemlerinden geçirildi ve kartuş ile cihaza yüklenerek dizileme işlemi gerçekleştirildi.

### Yöntem

#### 1. Genomik DNA'nın Tagmentasyonu

10 µL Tagment DNA tamponu üzerine 1 ng DNA'dan 5 µL eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı. 20°C'de 280×g'de 1 dk santrifüjlendi. 100 °C'de kapak ısıtması yapılan reaksiyon koşullarında 55 °C'de 5 dk inkübe edildi ve sıcaklık hızla 10 °C'ye düşürüldü. Sonrasında 5 µL nötralize tagment tamponu eklenerek pipetaj yapıldı. Karışımı bir arada tutmak için tekrardan 20°C'de 280×g'de 1 dk santrifüjlendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Sonrasında kütüphanelerin amplifiye edilmesi aşamasına geçildi.

#### 2. Kütüphanelerin amplifikasyonu

Bu aşamada, tagmente DNA'nın sınırlı döngü sayısına sahip PCR programıyla, indeks adaptör primerler kullanılarak amplifiye edilmesi sağlandı. Buna göre kullanılan indeks adaptör kiti için önerildiği üzere, her bir kuyuya 15 µL Nextera master miksi üzerine 5'er µL i5 ve i7 primerleri eklendi ve pipetaj yapıldı. Sonrasında, tüpler kapatılarak 20°C'de 280×g'de 1 dk santrifüjlenerek reaksiyon bileşimi bir araya toplandı ve protokolde önerilen döngü koşullarında reaksiyona tabii tutuldu (Tablo 3.5.).

**Tablo 3. 5.** Kütüphane amplifikasyonu PCR şartları

Kapak ısısı 100 °C'ye ayarlandı.		
Sıcaklık	Süre	
72 °C	3 dk.	
95 °C	30 sn.	
95 °C	10 sn.	12 döngü
55 °C	30 sn.	
72 °C	30 sn.	
72 °C	5 dk.	
10 °C	∞	

#### 3. Kütüphanelerin saflaştırılması

Amplifiye edilmiş kütüphanelerin saflaştırılması için bu aşamada boncuklar kullanıldı. Kütüphane amplifikasyonundan elde edilen reaksiyon 20°C'de 280×g'de 1 dk santrifüjlenerek tüpün dibinde birleştirilen 50 µL hacimli içerik, midi plakaya aktarıldı. Üzerine 30 µL AMPure XP boncukları eklendi ve karıştırmak için 1800

rpm'de 2 dk çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi ve manyetik standda alınarak yaklaşık 2 dk reaksiyonun berraklaşması beklendi. Boncukların formu bozulmadan, süpernatant uzaklaştırıldı ve ortam 2 kez 200 µL taze %80'lik alkol ile yıkandı. Manyetik stand açık havada 15 dk kurutuldu ve reaksiyon manyetik standdan uzaklaştırıldı. Boncukların üzerine 52.5 µL resüspanسیون tamponu eklendi. Plakaların üzeri kapatılarak 1800 rpm'de 2 dk çalkalandı. Oda sıcaklığında da 2 dk inkübe edildi ve yeniden manyetik standda alınarak, yaklaşık 2 dk reaksiyonun berraklaşması beklendi. 50 µL hacimli süpernatant yeni bir plakaya alındı.

#### 4. Kütüphanenin kalite kontrolü

1 µL seyreltilmemiş kütüphane solüsyonu, Agilent 2100 Bioanalizer kullanılarak koşturuldu. 250-1000 bç arasında gözlenen pikler, kütüphanenin dizilenebilecek kalitede olduğuna işaret etmektedir.

#### 5. Kütüphanenin normalizasyonu

Havuzlanmış kütüphaneden her bir temsilcinin benzer konsantrasyonda bulunduğu doğrulanması için bu aşama gerçekleştirildi. Bunun için, 20 µL süpernatant yeni bir midi plakaya transfer edildi. Üzerine 45 µL LN master miksi eklendi ve kapağı bantlanarak 1800 rpm'de 30 dk çalkalandı. Manyetik standda alındı ve solüsyon berraklaşana kadar yaklaşık 2 dk beklendi. Boncuklara zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı. İki kez LNWI solüsyonu ile yıkandı ve her bir reaksiyona 30 µL 0.1 N NaOH eklendi. Kapağı bantlanarak 1800 rpm'de 5 dk çalkalandı. SGP ile işaretlenmiş her bir kuyuya 30 µL LNS1 solüsyonu eklendi. Elüsyon tamamlandıktan 5 dk sonra, tüm örneklerin resüsüpanse olduğu doğrulanıp manyetik standda yaklaşık 2 dk solüsyonun berraklaşması beklendi. SGP plakasından midi plakaya 30 µL solüsyon aktarıldı ve kapakları örtülüp 1000 ×g'de 1 dk santrifüjlendi.

#### 6. Kütüphanenin seyreltilmesi

Bu aşamada hazırlanan ve adaptör eklenen kütüphaneler başlangıç konsantrasyonuna döndürüldü. Bunun için, RSB kullanılarak ardışık seyreltmeler sonrasında denatürasyon yapıldı ve böylece kütüphanelerin dizilemeye hazır hale getirildiği varsayıldı. Sonrasında MiniSeq sistemi ile dizileme uygulaması gerçekleştirildi.

### 3.2.6 Verilerin Analiz Edilmesi

Yürütme sonrası örneklerin analizleri The Integrative Genomics Viewer (IGV\_2.5.3) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Tespit edilen varyantların yorumlanmasında ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), Genome Aggregation Database (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org>), Exome Variant Server (EVS, <https://evs.gs.washington.edu/EVS>), Human Gene Mutation Database (HGMD, <https://www.hgmd.org>) veritabanları kullanıldı. Veritabanlarında yer almayan varyantların patojenitesinin yorumlanmasında in silico (PolyPhen-2, SIFT, MutationTaster v.b.) tahmin programları ve sınıflandırılmalarında American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), 2015 kriterleri kullanıldı (Tablo 3.6., 3.7., 3.8.).

### 3.3. İstatistiksel yöntem

Çalışmamızdan elde edilen veriler Statistical Package For The Social Sciences (SPSS) versiyon 22.0 programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metodlar kullanıldı. Grup ortalamalarını değerlendirirken ve kıyaslarken independent sample t testi, genotip ve allel frekanslarının karşılaştırılmasında khi-kare testi uygulandı. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı. Çalışmada  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



**Tablo 3. 6.** ACMG 2015 sınıflandırma kriterleri (81).

<b>SINIFLAMA</b>	<b>KANIT</b>
<b>Patojenik</b>	i. Çok güçlü (PVS1) ve (a) $\geq 1$ Güçlü (PS1–PS4) ya da (b) $\geq 2$ Orta (PM1–PM6) ya da (c) 1 Orta (PM1–PM6) ve 1 destekleyici (PP1–PP5) ya da (d) $\geq 2$ Destekleyici (PP1–PP5) ii. $\geq 2$ Güçlü (PS1–PS4) ya da iii. 1 Güçlü (PS1–PS4) ve (a) $\geq 3$ Orta (PM1–PM6) ya da (b) 2 Orta (PM1–PM6) ve $\geq 2$ Destekleyici (PP1–PP5) ya da (c) 1 Orta (PM1–PM6) ve $\geq 4$ Destekleyici (PP1–PP5)
<b>Olası Patojenik</b>	i. 1 Çok güçlü (PVS1) ve 1 Orta (PM1–PM6) ya da ii. 1 Güçlü (PS1–PS4) ve 1–2 Orta (PM1–PM6) ya da iii. 1 Güçlü (PS1–PS4) ve $\geq 2$ destekleyici (PP1–PP5) ya da iv. $\geq 3$ Orta (PM1–PM6) ya da v. 2 Orta (PM1–PM6) ve $\geq 2$ destekleyici (PP1–PP5) ya da vi. 1 Orta (PM1–PM6) ve $\geq 4$ destekleyici (PP1–PP5)
<b>Benign</b>	i. 1 Tek başına (BA1) ya da ii. $\geq 2$ Güçlü (BS1–BS4)
<b>Olası Benign</b>	i. 1 Güçlü (BS1–BS4) ve 1 destekleyici (BP1–BP7) ya da ii. $\geq 2$ Destekleyici (BP1–BP7)
<b>Önemi Bilinmeyen</b>	i. Yukarıdaki kriterleri karşılamayan diğer kriterler ya da ii. Benign ve Patojenik kriterleri çelişkili

**Tablo 3. 7.** Patojenik varyantların sınıflandırılması için kriterler (81).

<b>Patojenite Kanıtı</b>	<b>Kodu ve Kategorisi</b>
<b>Çok Güçlü</b>	<b>PVS1</b> Anlamsız, Çerçeve kayması, $\pm 1$ veya 2 splice bölge varyantları, başlangıç kodonu, tekli veya çoklu ekzon delesyonları
<b>Güçlü</b>	<p><b>PS1</b> Patojenik olduğu bilinen bir anlamsız varyantla aynı noktada aynı aminoasit değişimine yol açan varyant</p> <p><b>PS2</b> De novo varyant (anne ve babada olmadığı doğrulanmış)</p> <p><b>PS3</b> İyi kurgulanmış in vivo veya in vitro fonksiyonel analizlerde gene ya da gen ürününe zararlı etkisinin gösterilmesi</p> <p><b>PS4</b> Kontrollerle kıyaslandığında etkilenmiş bireydeki varyant prevalansının anlamlı derecede artması</p>
<b>Orta</b>	<p><b>PM1</b> Varyantın fonksiyonel domende ve/veya iyi tanımlanmış mutasyonel hotspot bölgelerde olması</p> <p><b>PM2</b> 1000 GP, ESP, ExAC gibi kontrol popülasyonlarında varyantın gözlenmemesi veya resesif olgularda çok düşük sıklıkta olması.</p> <p><b>PM3</b> Resesif hastalıklarda patojenik bir varyantla trans halde bulunan varyant</p> <p><b>PM4</b> Tekrar bölgeleri dışında in-frame insersiyon/delesyonlar veya Protein boyunu etkileyen varyantlar</p> <p><b>PM5</b> Daha önceden bilinen patojenik bir yanlış anlamlı değişimle aynı pozisyondaki amino asidi etkileyen başka bir yanlış anlamlı değişim.</p> <p><b>PM6</b> De novo olarak düşünülen varyant (anne ve babada olmadığı doğrulanmamış)</p>
<b>Destekleyici</b>	<p><b>PP1</b> Hastalığa sebep olduğu kesin olarak bilinen bir gende etkilenmiş diğer aile bireylerinde varyantın segregasyonu</p> <p><b>PP2</b> Bir gende tespit edilen benign yanlış anlamlı varyant çok az sayıda ise ve ilgili gendeki yanlış anlamlı varyantlar hastalığın yaygın sebebi ise, tespit edilen yeni yanlış anlamlı varyant</p> <p><b>PP3</b> Çoklu bilgisayar tahmin algoritmalarında varyantın zararlı olarak öngörülmesi</p> <p><b>PP4</b> Hastanın fenotipi ve aile hikayesi ilgili hastalık için çok tipikse ve bu hastalığa sadece tek bir gen sebep oluyorsa varyant bu sınıfta değerlendirilebilir.</p> <p><b>PP5</b> Yakın zamanda güvenilir kaynaklarda varyantın patojenik olarak değerlendirilmesi</p>

**Tablo 3. 8.** Benign varyantların sınıflandırılması için kriterler (81).

<b>Benign Kanıt</b>	<b>Kodu ve Kategorisi</b>
<b>Tek Başına Güçlü</b>	<p><b>BA1</b> Allel frekansı &gt;%5</p> <p><b>BS1</b> Allel sıklığının hastalık için beklenenden yüksek olması</p> <p><b>BS2</b> Erken yaşta tam penetransı beklenen bir hastalık için varyantın sağlıklı bireyde gözlenmesi</p> <p><b>BS3</b> İyi kurgulanmış in vivo veya in vitro fonksiyonel analizlerde protein fonksiyonu veya splicing üzerine zararlı etkisinin gösterilememesi</p> <p><b>BS4</b> Etkilenmiş aile bireylerinde segregasyonun olmaması</p>
<b>Destekleyici</b>	<p><b>BP1</b> Hastalık esas olarak anlamsız değişimler sonucu oluşuyorsa; burada tespit edilen gende yeni bir yanlış anlamlı varyant bulunması</p> <p><b>BP2</b> Tam penetransı olan dominant bir hastalıkta patojenik bir varyantla trans olarak belirlenen varyant; herhangi bir kalıtım kalıbında patojenik bir varyantla cis olarak gözlenen varyant.</p> <p><b>BP3</b> Bilinen bir fonksiyonu olmayan tekrar bölgelerinde in-frame insersiyon/delesyonlar</p> <p><b>BP4</b> Çoklu bilgisayar tahmin algoritmalarında varyantın zararsız olarak öngörülmesi.</p> <p><b>BP5</b> Alternatif moleküler temeli net bilinen hastalıklardaki varyantlar</p> <p><b>BP6</b> Güvenilir kaynaklarda varyantın benign olarak değerlendirilmesi</p> <p><b>BP7</b> Alternatif kesim veya yeni kesim bölgesi oluşturmayan sessiz varyant</p>

#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza 50 hasta ve 30 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri tablo 4.1. de özetlenmiştir. Buna göre hasta grubu 33 (%66) kadın, 17 (%34) erkek bireyden oluşmaktadır. Cinsiyetler birbirine oranlandığında kadın/erkek oranı 1,94'tür. Hasta grubunun yaş aralığı 23-67, yaş ortalaması  $36,16 \pm 8,95$ 'tir. Kontrol grubu 18 (%60) kadın, 12 (%40) erkek bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubu yaş aralığı 20-44 ve yaş ortalaması ise  $33,4 \pm 8,22$ 'dir. Hasta ve kontrol grubunun yaşları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır ( $p=0,168$ ). Her iki grup kadın ve erkek cinsiyetler için karşılaştırıldığında yine istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p=0,588$ ). Aralarında akrabalık bağı bulunmayan 50 MS hastasından 38'i (%76) RRMS, 12'si (%24) SPMS klinik fenotipine sahiptir.

**Tablo 4. 1.** Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.

	Hasta grubu (n=50)	Kontrol grubu (n=30)	p değeri
Yaş ortalaması	$36,16 \pm 8,95$	$33,4 \pm 8,22$	0,168
Kadın	33	18	0,588
Erkek	17	12	

Yapılan yeni nesil dizileme analizi sonucunda hasta grubunda saptanan varyantlar ve sınıflandırmaları tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Elli hastanın 47'sinde 15 farklı TET2 geni varyantı bulundu. Bu varyantların 14'ü daha önce database of single nucleotide polymorphisms (dbSNP) ve/veya ClinVar veritabanlarında bulunmaktadır. TET2 c.1572\_1580del (p.E524\_Q526del) varyantı kontrol grubumuzda bulunmamakla birlikte daha önce literatürde bildirilmemiş olup çalışmamızda tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). Hasta grubunda yapılan çalışmada; 5 örnekte heterozigot c.1064G>A (p.G355D), 20 örnekte heterozigot, 17 örnekte homozigot c.3804-7577A>C, 21 örnekte heterozigot, 6 örnekte homozigot c.5284A>G (p.I1762V), 5 örnekte heterozigot, 1 örnekte homozigot c.1088C>T (p.P363L), 14 örnekte heterozigot, 2 örnekte homozigot c.5162T>G (p.L1721W), 3 örnekte heterozigot c.5333A>G (p.H1778R), 4 örnekte heterozigot, 1 örnekte homozigot c.86C>G (p.P29R), 1 örnekte heterozigot c.3970T>A (p.S1324T), 3 örnekte heterozigot c.652G>A (p.V218M), 2 örnekte heterozigot

c.4140T>C (p.H1380H), 1 örnekte heterozigot c.3084G>A (p.M1028I), bir örnekte heterozigot c.2599T>C (p.Y867H), bir örnekte heterozigot c.5167C>T (p.P1723S), bir örnekte heterozigot c.1572\_1580del (p.E524\_Q526del) ve 1 örnekte c.100C>T (p.L34F) TET2 geni varyantları saptanmıştır. Bu varyantlardan 8'i 3. ekzonda, 1'i 8. ekzonda, 1'i 9. ekzonda, 4'ü 11. ekzonda bulunurken sadece 1 tanesi 6. intronda bulunmaktadır. Mutasyon tipleri olarak değerlendirildiğinde hasta grubunda tespit edilen varyantlardan 12'si yanlış anlamlı (missense), 1'i intronik, 1'i sessiz ve 1'i delesyon tipindedir. MS hastalarındaki sekans varyantları yorumlandığında 8 tanesi benign, 4 tanesi olası benign ve 3 tanesi önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

Kontrol grubunun yeni nesil dizileme analizi sonucunda bulunan varyantlar ve sınıflandırmaları tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Buna göre 30 sağlıklı kontrolde 12 farklı varyant tespit edildi. TET2 c.4964C>T (p.P1655L) hariç geri kalan 11 varyantın hepsi hasta grubunda da saptanmıştır. Kontrol grubunda tespit edilen TET2 geni varyantları ve zigositeleri; 3 örnekte heterozigot 1 örnekte homozigot c.1064G>A (p.G355D), 16 örnekte heterozigot, 8 örnekte homozigot c.3804-7577A>C, 15 örnekte heterozigot, 2 örnekte homozigot c.5284A>G (p.I1762V), 1 örnekte heterozigot c.1088C>T (p.P363L), 10 örnekte heterozigot, 2 örnekte homozigot c.5162T>G (p.L1721W), 1 örnekte heterozigot c.4964C>T (p.P1655L), 2 örnekte heterozigot c.5333A>G (p.H1778R), 3 örnekte heterozigot c.86C>G (p.P29R), 1 örnekte heterozigot c.652G>A (p.V218M), 2 örnekte heterozigot c.4140T>C (p.H1380H), 2 örnekte heterozigot c.2599T>C (p.Y867H), 2 örnekte heterozigot c.5167C>T (p.P1723S) şeklindedir. Tespit edilen bu varyantların 5 tanesi TET2 geninin 3. ekzonunda, 1 tanesi 9. ekzonunda, 5 tanesi 11. ekzonunda ve 1 tanesi 6. intronunda bulunmaktadır. Saptanan 12 varyantın 10'u yanlış anlamlı, 1'i sessiz ve 1 tanesi intronik mutasyon tipine sahiptir. Kontrol grubunda tespit edilen varyantların 8'i benign, 3'ü olası benign ve 1 tanesi de önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı.

Çalışmamızda saptanan 16 farklı TET2 geni varyantının hasta ve kontrol grubunda saptanan minör allel frekansı (MAF) değerleri ile gnomAD popülasyon veritabanındaki global MAF değerlerinin karşılaştırılması tablo 4.4.'te gösterilmiştir.



**Tablo 4. 2.** Hasta grubunda saptanan varyantlar ve sınıflandırmaları.

cDNA değişimi	Aminoasit Değişimi	Ekzon/ İntron	Mutasyon Tipi	Zigosite	Bilinen/Yeni	Sınıf
<b>Gen ve Transkript: TET2 (NM_001127208.2)</b>						
c.1064G>A	p.G355D	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs61744960	Olası benign
c.3804-7577A>C	-	6	intronik	Homozigot/ Heterozigot	rs2726518	Benign
c.5284A>G	p.I1762V	11	yanlış anlamlı	Homozigot/ Heterozigot	rs2454206	Benign
c.1088C>T	p.P363L	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs17253672	Benign
c.5162T>G	p.L1721W	11	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs34402524	Benign
c.5333A>G	p.H1778R	11	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs62621450	Benign
c.86C>G	p.P29R	3	yanlış anlamlı	Homozigot/ Heterozigot	rs12498609	Benign
c.3970T>A	p.S1324T	8	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs1283545990	Önemi bilinmeyen
c.652G>A	p.V218M	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs6843141	Benign
c.4140T>C	p.H1380H	9	sessiz	Heterozigot	rs3733609	Bening
c.3084G>A	p.M1028I	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs375794667	Önemi bilinmeyen
c.2599T>C	p.Y867H	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs144386291	Olası benign
c.5167C>T	p.P1723S	11	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs146348065	Olası benign
c.1572_1580del	p.E524_Q526del	3	delesyon	Heterozigot	Yeni	Önemi bilinmeyen
c.100C>T	p.L34F	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs111948941	Olası benign

**Tablo 4. 3.** Kontrol grubunda saptanan varyantlar ve sınıflandırmaları.

cDNA değişimi	Aminoasit Değişimi	Ekzon/İntron	Varyant Tipi	Zigosite	Bilinen/Yeni	Sınıf
<b>Gen ve Transkript: TET2 (NM_001127208.2)</b>						
c.1064G>A	p.G355D	3	yanlış anlamlı	Homozigot/ Heterozigot	rs61744960	Olası benign
c.3804-7577A>C	-	6	intronik	Homozigot/ Heterozigot	rs2726518	Benign
c.5284A>G	p.I1762V	11	yanlış anlamlı	Homozigot/ Heterozigot	rs2454206	Benign
c.1088C>T	P363L	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs17253672	Benign
c.5162T>G	p.L1721W	11	yanlış anlamlı	Homozigot/ Heterozigot	rs34402524	Benign
c.4964C>T	p.P1655L	11	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs372419310	Önemi bilinmeyen
c.5333A>G	p.H1778R	11	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs62621450	Benign
c.86C>G	p.P29R	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs12498609	Benign
c.652G>A	p.V218M	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs6843141	Benign
c.4140T>C	p.H1380H	9	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs3733609	Bening
c.2599T>C	p.Y867H	3	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs144386291	Olası benign
c.5167C>T	p.P1723S	11	yanlış anlamlı	Heterozigot	rs146348065	Olası benign

**Tablo 4. 4.** Tespit edilen varyantların hasta, kontrol grubu ve gnomAD popülasyon veritabanı minör allel frekans (MAF) değerleri.

Varyant	MS hastalarında MAF* (n=100 allel)	Kontrol grubu MAF (n=60 allel)	gnomAD * MAF
c.1064G>A	A= %6	A= %8,3	A= %2,84
c.3804-7577A>C	C= %54	C= %53,3	C= %63,14
c.5284A>G	G= %33	G= %31,7	G= %30,09
c.1088C>T	T= %7	T= %1,7	T= %4,97
c.5162T>G	G= %18	G= %23,3	G= %11,56
c.5333A>G	G= %3	G= %3,3	G= %3,67
c.86C>G	G= %6	G= %5	G= %6,29
c.3970T>A	A= %1	A= %0	A= %0,0019
c.652G>A	A= %3	A= %1,7	A= %5,11
c.4140T>C	C= %2	C= %5	C= %3,41
c.3084G>A	A= %1	A= %0	A= %0,0051
c.2599T>C	C= %1	C= %3,3	C= %0,73
c.5167C>T	T= %1	T= %3,3	T= %0,72
c.1572_1580del	del= %1	del= %0	del= %0
c.100C>T	T= %1	T= %0	T= %1,56
c.4964C>T	T= %0	T= %1,7	T= %0,0051

\*MAF: Minör Allel Frekansı, \*\*gnomAD: genome aggregation database



Daha önce literatürde klinikle ilişkisi olduğu bilinen, hasta ve kontrol grubunda sık karşılaşılan TET2 geni rs2726518 (c.3804-7577A>C), rs3733609 (c.4140T>C / p.H1380H), rs2454206 (c.5284A>G / p.I1762V), rs34402524 (c.5162T>G / p.L1721W), rs17253672 (c.1088C>T / p.P363L) tek nükleotid polimorfizmleri genotipleri ve her bir polimorfizm için ayrı ayrı allel frekansları hesaplanmış, MS hasta grubu ve kontrol grubu arasında ayrıca hasta grubunun MS'in klinik fenotipleri RRMS ve SPMS'e sahip bireyleri arasında karşılaştırılarak hastalıkla ilişkileri her iki grupta araştırılmıştır.

#### **4.1. c.3804-7577A>C (rs2726518) Tek Nükleotid Polimorfizmi**

c.3804-7577A>C SNP'sine bakıldığında hasta grubunda AA genotipi 13 (%26), AC genotipi 20 (%40) ve CC genotipi 17 (%34) olguda bulunurken kontrol grubunda ise AA genotipi 6 (%20), AC genotipi 16 (%53.3) ve CC genotipi 8 (%26.7) olguda bulunmuştur. c.3804-7577A>C SNP'si genotipleri ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.51). Allel frekansları karşılaştırıldığında hasta grubunda 46 A alleli ve 54 C alleli varken kontrol grubunda 28 A ve 32 C alleli bulunmuştur. A ve C allel frekansları ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.93) (Tablo 4.5.).

c.3804-7577A>C varyantı genotipleri ile MS klinik fenotipleri arasındaki ilişki incelendiğinde RRMS grubunda bulunan hastalarda AA genotipi 8 (%21.1), AC genotipi 17 (%44.7), CC genotipi 13 (%34.2) olguda saptanmıştır. SPMS grubunda bulunan hastalarda AA genotipi 5 (%41.7), AC genotipi 3 (%25) ve CC genotipi 4 (%33.3) olguda saptanmıştır. c.3804-7577A>C SNP'si genotip dağılımları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.304). Allel frekansları karşılaştırıldığında RRMS grubunda bulunan hastalarda 33 A alleli ve 43 C alleli varken SPMS grubunda bulunan hastalarda 13 A ve 11 C alleli bulunmuştur. A ve C allel frekansları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.357).

**Tablo 4. 5.** Hasta ve kontrol gruplarındaki c.3804-7577A>C (rs2726518) genotip ve allel dağılımı.

c.3804-7577A>C		HASTA (n,%)	KONTROL (n,%)	p değeri
Genotip	AA	13 (26)	6 (20)	0.51
	AC	20 (40)	16 (53.3)	
	CC	17 (34)	8 (26.7)	
	TOPLAM	50 (100)	30 (100)	
Allel	A	46 (46)	28 (46.7)	0.93
	C	54 (54)	32 (53.3)	
	TOPLAM	100 (100)	60 (100)	

#### 4.2. c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609) Tek Nükleotid Polimorfizmi

c.4140T>C / p.H1380H SNP'si değerlendirildiğinde hasta grubunda TT genotipi 44 (%96), TC genotipi 2 (%4) olguda bulunurken CC genotipine sahip olgu yoktur. Kontrol grubunda ise TT genotipi 28 (%93.3), TC genotipi 1 (%3.3) ve CC genotipi 1 (%3.3) olguda bulunmuştur. c.4140T>C / p.H1380H SNP'si genotipleri ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p=0.43$ ). Allel frekansları karşılaştırıldığında hasta grubunda 98 T alleli ve 2 C alleli varken kontrol grubunda 57 T ve 3 C alleli bulunmuştur. T ve C allel frekansları ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p=0.93$ ) (Tablo 4.6.).

c.4140T>C / p.H1380H varyantı genotipleri ile MS klinik fenotipleri arasındaki ilişki incelendiğinde RRMS grubunda bulunan hastalarda TT genotipi 36 (%94.7), TC genotipi 2 (%5.3) olguda saptanırken CC genotipine rastlanmamıştır. SPMS grubunda bulunan 12 hastanın hepsi TT genotipine sahiptir. c.4140T>C / p.H1380H varyantı genotip dağılımları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p=0.417$ ). Allel frekansları karşılaştırıldığında RRMS grubunda bulunan hastalarda 74 T alleli ve 2 C alleli bulunmuştur. SPMS grubunda bulunan hastalarda 24 T alleli varken hiç C alleli bulunmamaktadır. T ve C allel frekansları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p=0.576$ )

**Tablo 4. 6.** Hasta ve kontrol gruplarındaki c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609) genotip ve allel dağılımı.

c.4140T>C / p.H1380H		HASTA (n,%)	KONTROL (n,%)	p değeri
Genotip	TT	48 (96)	28 (93.3)	0.43
	TC	2 (4)	1 (3.3)	
	CC	- (0)	1 (3.3)	
	TOPLAM	50 (100)	30 (100)	
Allel	T	98 (98)	57 (95)	0.29
	C	2 (2)	3 (5)	
	TOPLAM	100 (100)	60 (100)	

#### 4.3. c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206) Tek Nükleotid Polimorfizmi

c.5284A>G / p.I1762V SNP'Si için hasta grubunda AA genotipi 23 (%46), AG genotipi 21 (%42) ve GG genotipi 6 (%12) olguda bulunurken kontrol grubunda ise AA genotipi 13 (%43.3), AG genotipi 15 (%50) ve GG genotipi 2 (%6.7) olguda bulunmuştur. c.5284A>G / p.I1762V SNP'si genotipleri ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.66). Allel frekansları karşılaştırıldığında hasta grubunda 67 A alleli ve 33 G alleli varken kontrol grubunda 41 A ve 19 G alleli bulunmuştur. A ve G allel frekansları ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.86) (Tablo 4.7.).

c.5284A>G / p.I1762V varyantı genotipleri ile MS klinik fenotipleri arasındaki ilişki incelendiğinde RRMS grubunda bulunan hastalarda AA genotipi 15 (%39.5), AG genotipi 17 (%44.7), GG genotipi 6 (%15.8) olguda saptanmıştır. SPMS grubunda bulunan hastalarda AA genotipi 8 (%66.7), AG genotipi 4 (%33.3) olguda saptanırken, GG genotipine rastlanmamıştır. c.5284A>G / p.I1762V varyantı genotip dağılımları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.162). Allel frekansları karşılaştırıldığında RRMS grubunda bulunan hastalarda 47 A ve 29 G alleli varken SPMS grubunda bulunan hastalarda 20 A ve 4 G alleli bulunmuştur. A ve G allel frekansları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.050)

**Tablo 4. 7.** Hasta ve kontrol gruplarındaki c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206) genotip ve allel dağılımı.

c.5284A>G / p.I1762V		HASTA (n,%)	KONTROL (n,%)	p değeri
Genotip	AA	23 (46)	13 (43.3)	0.66
	AG	21 (42)	15 (50.0)	
	GG	6 (12)	2 (6.7)	
	TOPLAM	50 (100)	30 (100)	
Allel	A	67 (67)	41 (68.3)	0.86
	G	33 (33)	19 (31.7)	
	TOPLAM	100 (100)	60 (100)	

#### 4.4. c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) Tek Nükleotid Polimorfizmi

c.5162T>G / p.L1721W SNP'si için hasta grubunda TT genotipi 34 (%68), TG genotipi 14 (%28) ve GG genotipi 2 (%4) olguda bulunurken kontrol grubunda ise TT genotipi 18 (%60), TG genotipi 10 (%33.3) ve GG genotipi 2 (%6.7) olguda bulunmuştur. c.5162T>G / p.L1721W SNP'si genotipleri ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0.73). Allel frekansları karşılaştırıldığında hasta grubunda 82 T alleli ve 18 G alleli varken kontrol grubunda 46 T ve 14 G alleli bulunmuştur. T ve G allel frekansları ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0.41) (Tablo 4.8.).

c.5162T>G / p.L1721W varyantı genotipleri ile MS klinik fenotipleri arasındaki ilişki incelendiğinde RRMS grubunda bulunan hastalarda TT genotipi 27 (%71.1), TG genotipi 9 (%23.7), GG genotipi 2 (%5.2) olguda saptanmıştır. SPMS grubunda bulunan hastalarda TT genotipi 7 (%58.3), TG genotipi 5 (%41.7) olguda bulunurken GG genotipine rastlanmamıştır. c.5162T>G / p.L1721W varyantı genotip dağılımları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.386). Allel frekansları karşılaştırıldığında RRMS grubunda bulunan hastalarda 63 T alleli ve 13 G alleli varken SPMS grubunda bulunan hastalarda 19 T ve 5 G alleli bulunmuştur. T ve G allel frekansları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0.678).

**Tablo 4. 8.** Hasta ve kontrol gruplarındaki c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) genotip ve allel dağılımı.

c.5162T>G / p.L1721W		HASTA (n,%)	KONTROL (n,%)	p değeri
Genotip	TT	34 (68)	18 (60)	0.73
	TG	14 (28)	10 (33.3)	
	GG	2 (4)	2 (6.7)	
	TOPLAM	50 (100)	30 (100)	
Allel	T	82 (82)	46 (76.7)	0.41
	G	18 (18)	14 (23.3)	
	TOPLAM	100 (100)	60 (100)	

#### 4.5. c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) Tek Nükleotid Polimorfizmi

Son olarak c.1088C>T / p.P363L SNP'si değerlendirildiğinde hasta grubunda CC genotipi 44 (%88), CT genotipi 5 (%10) ve TT genotipi 1 (%2) olguda bulunmuştur . Kontrol grubunda ise CC genotipi 29 (%96.7), CT genotipi 1 (%3.3) olguda bulunurken CC genotipi bulunmamaktadır. c.1088C>T / p.P363L SNP'si genotipleri ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.39). Allel frekansları karşılaştırıldığında hasta grubunda 93 C alleli ve 7 T alleli varken kontrol grubunda 59 T ve 1 C alleli bulunmuştur. C ve T allel frekansları ile MS arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.2) (Tablo 4.9.).

c.1088C>T / p.P363L varyantı genotipleri ile MS klinik fenotipleri arasındaki ilişki incelendiğinde RRMS grubunda bulunan hastalarda CC genotipi 32 (%84.2), CT genotipi 5 (%13.2) TT genotipi 1 (%2.6) olguda saptanmıştır. SPMS grubunda bulunan 12 hastanın hepsi CC genotipine sahiptir. c.1088C>T / p.P363L varyantı genotip dağılımları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.341). Allel frekansları karşılaştırıldığında RRMS grubunda bulunan hastalarda 69 C alleli ve 7 T alleli bulunmuştur. SPMS grubunda bulunan hastalarda 24 C alleli varken hiç T alleli bulunmamaktadır. C ve T allel frekansları ile MS klinik fenotipleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.137)

**Tablo 4. 9.** Hasta ve kontrol gruplarındaki c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) genotip ve allel dağılımı.

<b>c.1088C&gt;T / p.P363L</b>		<b>HASTA (n,%)</b>	<b>KONTROL (n,%)</b>	<b>p değeri</b>
<b>Genotip</b>	CC	44 (88)	29 (96.7)	0.39
	CT	5 (10)	1 (3,3)	
	TT	1 (2)	- (0)	
	TOPLAM	50 (100)	30 (100)	
<b>Allel</b>	C	93 (93)	59 (98.3)	0.2
	T	7 (7)	1 (1.7)	
	TOPLAM	100 (100)	60 (100)	

## 5.TARTIŞMA

Merkezi sinir sisteminin kronik enflamatuvar bir hastalığı olan MS, genç erişkinlerde travmatik olmayan nörolojik sakatlığın yaygın nedenidir (88). Genetik ve çevresel faktörler, multiple sklerozun ortaya çıkması ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (58). MS etiyolojisi hakkında az bilgi mevcuttur ve bu inflamatuvar hastalığın gelişiminde rol oynayan epigenetik olayların araştırılmasına olan ilgi artmaktadır (89). Multipl sklerozda periferik kan mononükleer hücrelerinde TET2 geni ekspresyonu ve 5hmC düzeyi belirgin olarak azalmaktadır. MS deneysel modelinde Tet2 ekspresyonunun indüklenmesi ile T hücre proliferasyonu güçlü bir şekilde baskılanmaktadır. GWAS analizlerinde MS patogenezi ile ilişkilendirilen 48 yeni varyantın arasında TET2 geni de bildirilmiştir (85). Multipl sklerozun inflamatuvar özelliği göz önüne alındığında, TET2 enziminin ve 5hmC seviyelerinin azalması, MS patogenezinin inflamatuvar süreçleri ile ilişkili olabilir (8,9). Çalışmamızda TET2 geninin genel mutasyon taramasıyla birlikte yaygın olarak tespit edilen SNP'leri dizilenerek, bu polimorfik varyantların MS etiyolojisi ve hastalığa yakınlıkla ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalaması yönünden istatistiksel anlamlı fark yoktu ( $p>0.05$ ). Çalışmamızdaki MS hastalarının cinsiyetleri kıyaslandığında kadın/erkek oranı 1,94:1 olarak bulunmuştur. Kadınlarda MS daha sık görülmekle birlikte, 2013 MS atlasına göre hastalığın global olarak kadınlarda erkeklere göre görülme oranı yaklaşık 2 kat daha fazladır. Türkiye için ise kadın/erkek oranı 1,96/1 olarak bildirilmiştir (18). Çalışmamızın sonucu bu literatür verileri ile uyumludur.

MS hastaları klinik olarak hastalık seyrine göre dört ana kategoride gruplandırılmaktadır (90). Bu hastalık fenotiplerinden RRMS %85-90 sıklıkta, PPMS ise %10-15 sıklıkta rastlanmaktadır (50). Türk MS hasta popülasyonu ile yapılan bir çalışmada %67.8 oranla RRMS sıklığının Avrupa popülasyonuna göre azaldığı bildirilmiştir (91). Çalışmamızdaki MS hastalarının %76'sı RRMS, %24'ü SPMS klinik fenotipine sahipken diğer klinik fenotiplerine rastlanmamıştır. Avrupa merkezli yapılan çalışmalarda RRMS sıklığı Fransa'da %87, Finlandiya'da %89 olarak rapor edilmiştir (92,93). Türkiye'de SPMS sıklığının %31.4 ve Fransa'da ise %37 olduğu bildirilmiştir (91,92). Bu verilerle çalışmamız Avrupa popülasyonu ile kıyaslandığında Türk popülasyonunda RRMS ve PPMS sıklığının azaldığını desteklemektedir.

TET2 geninin fonksiyonunu bozan mutasyonlar, 5-metilsitozinin hidroksilasyonunu etkilemekte ve miyeloid kanserlerin etiyolojisinde rol almaktadır (10). Bununla birlikte, germline SNP'leri ile hastalık prognozunu ilişkilendiren kanıtlar yapılan çalışmalarla artmaktadır (94). TET2 geninin 9. Ekzonunda bulunan rs3733609 C/T (p.H1380H) genotipi myeloproliferatif neoplazilere (MPN) herediter yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir. TET2 rs3733609 C/T varyantına sahip MPN hastalarında tespit edilen TET2 mRNA transkripsiyonu azalmasının, CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPA) ve TET2 rs3733609 C/T lokusları arasındaki etkileşimin bozulmasına sebep olduğu ve bu şekilde TET2 genindeki fonksiyon kaybından sorumlu olduğu öne sürülmüştür (82). TET2 geninin tanımlanan bir başka SNP'si 11. ekzonda bulunan TET2 rs2454206 (p.Ile1762Val)'dir. Yapılan fonksiyonel analizlerde rs2454206 ile CXXC finger protein 4 (CXXC4) ekspresyonu arasındaki ilişki gösterilmiştir. CXXC4, kaspaz aktivitesini bozarak TET2 geninin negatif regülasyonunda rol alır. Pediatrik AML hastalarında bu SNP'nin prognostik belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (83). TET2 rs2454206 SNP'si hematolojik maligniteler dışında, nonalkolik yağlı karaciğer hastalarında çalışılmış, p.Ile1762Val substitüsyonu ile Tip 2 diyabet arasında bir ilişki gösterilmiştir (84). International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC)'un yaptığı Immunochip çalışmasında TET2 geni intronik tek nükleotid varyantı rs2726518 (c.3804-7577A>C) MS'e yatkınlık ile ilişkili bulunmuştur (85). Anwar ve ark. yaptıkları vaka takdiminde MDS hastasında tespit edilen c.5162 T>G, p.L1721W (rs34402524) varyantının TET2 geninin fonksiyonunu bozabileceğini bildirmiştir (86). B. C. Schroer ve arkadaşları yayınladıkları bildiride TET2 p.P363L (rs17253672) varyantının sistemik mastositoz ve hipereozinofilik sendrom ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (87). Çalışmamızda ayrıntılı olarak irdelediğimiz 5 SNP; c.3804-7577A>C (rs2726518), c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609), c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206), c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) ve c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) genotipleri ve allelleri ile MS arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda aynı varyantların MS klinik alt tipleri olan RRMS ve SPMS grubunda bulunan hastaların genotip dağılımları ve allelleri ile MS arasında anlamlı bir ilişki de tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ). Bunun sebebi kısıtlı MS hasta grubu katılımcı sayısı ve TET2 geni ekspresyon düzeyi gibi fonksiyonel analizlerin yapılamamasından olabilir.



Yapılan çalışmalar, 5hmC kaybının glioma, melanom ve miyeloid tümörler gibi malignitelerin önemli bir özelliği olduğunu göstermektedir (95-100). TET2 mutasyonlarında 5hmC düzeyinin düştüğü gösterilmiştir (101). Kraus ve ark. glioma olguları ile yaptıkları çalışmalarında TET2 geninde p.V218M, p.G355N, p.P363L, p.L1721W, p.P1723S, p.I1762V, p.H1778R olmak üzere 7 farklı varyant saptamışlardır. Bu saptanan varyantlarla 5-hmC düzeyi arasında korelasyon tespit edememişlerdir. 5-hmC düzeyinin düşük olmasına sebep olan mekanizmanın TET2 geni mutasyonlarından ziyade gen ekspresyonunun bozulması, TET proteinlerinin fonksiyonel inhibisyonu gibi olayların sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir (102). Bizim çalışmamızda da aynı varyantlar tespit edilmiş olup, 5-hmC düzeyi ölçülmesi mümkün olmamıştır. MS'deki epigenetik değişikliklere ve TET2 geni fonksiyon bozukluklarına benzer mekanizmalar sebep oluyor olabilir. Daha geniş MS hasta grubu, 5-hmC düzeyi, TET2 geni ekspresyonunun ölçülmesi, TET proteinlerinin fonksiyonel analizi gibi yöntemlerle zenginleştirilerek bu konunun araştırılması etiyopatogenezin aydınlatılması için gereklidir.

MS'in genetik etiyolojisi ve nadir genetik varyantların hastalığa katkısı henüz açık değildir. Ailevi MS formları tanımlanmış olmasına rağmen, bugüne kadar hastalığın etiyolojisini açıklayan nadir ve penetran varyantlar bildirilmemiştir (103). MS yaygın, kompleks genetik bir hastalıktır ve kalıtım riskinin %20'si ancak GWAS araştırmaları ile elde edilen sık rastlanan genetik varyantlarla açıklanabilmektedir (104). IMSSGC tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada düşük frekanslı (MAF<%5) varyantların MS riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (105). Çalışmamızda 11 adet popülasyon veritabanlarında düşük frekanslı varyant saptanmıştır. Bunlardan c.1064G>A ve c.1088C>T varyantlarının çalışmamızdaki MS hasta grubundaki MAF değeri %5'in üzerinde tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.4.). Ziliotto ve ark. yaptıkları çalışmalarında üç ailenin MS hastalarının tamamında ve aralarında akrabalık bağı bulunmayan MS hastası kohortunda c.1064G>A (rs61744960) varyantı A allel frekansının popülasyon veritabanlarına göre artmış olduğunu ve bu varyantın MS ile ilişkisi açısından araştırılması gerektiğini önermişlerdir (106). Çalışmamızın bulguları bu veriyi desteklememekle birlikte, kontrol grubunda da A alleli frekansının popülasyon veritabanına göre artmış olması nedeniyle daha geniş çalışma grubu ile çalışmaların yapılması gereklidir. Bunun yanında düşük frekanslı varyant olarak c.3970T>A (rs1283545990) 1 hastada tespit edilmiştir. ClinVar'da herhangi bir klinik

ile ilişkilendirilmeyen bu varyant popülasyon veritabanlarında 3 kontrol örneğinde bildirilmiş olup MAF değeri 0.0019'dur. TET2 geninin evrimsel olarak korunmuş domaininde bulunan bu yanlış anlamlı varyantın yapılan in-silico analizine göre MutationTaster'da hastalık yapıcı, SIFT (Sorts Intolerant From Tolerant, skor: 0.082) ve Provean'da (skor: -1.49) ise benign olarak öngörülmektedir. Bu verilerle c.3970T>A varyantı 2 patojenik orta (PM1, PM2) ve 1 destekleyici benign (BP4) kanıt düzeyi ile önemi bilinmeyen varyant (VUS) olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyantın patojenitesinin değerlendirilebilmesi için daha çok hastada araştırılmasına ve fonksiyonel analizlere ihtiyaç vardır. Bir başka saptanan düşük frekanslı varyant TET2 geni 3. ekzonunda bulunan c.3084G>A (rs375794667) değişimidir. Bu değişim hasta grubunda 1 allelde saptanmıştır. Kontrol grubunda ise bulunmamaktadır. Yapılan in-silico analizlere göre; MutationTaster hastalık yapıcı, SIFT hasarlayıcı (skor= 0.004) olarak öngörmektedir. ACMG 2015 kriterlerine göre sadece 1 destekleyici patojenik (PP3) kriterini karşılamakta olup hakkında daha çok veri sağlamak için aile içinde hasta olan ve olmayan bireylerdeki dağılımının araştırılması ve fonksiyonel çalışmakarka desteklenmelidir. Son düşük frekanslı varyant olarak TET2 c.100C>T (rs111948941) değişimi çalışmamızın hasta grubunda 1 allelde saptanmış, kontrol grubunda hiç rastlanmamıştır. Uniprot veritabanında bu değişim polimorfizm olarak değerlendirildiği için ACMG 2015 kriterlerine göre bu varyant olası benign (kanıtlar; PP3, BS1, BP6) olarak sınıflandırılmıştır ve fenotiple ilişkisi olduğu düşünülmemektedir.

Yapılan dizi analizi sonucunda çalışmamızda tespit edilen TET2 c.1572\_1580del / p.E524\_Q526del varyantı kontrol grubumuzda bulunmamakla birlikte daha önce literatürde bildirilmemiş olup yeni (novel) varyant olarak değerlendirilmiştir. Bu çerçeveye içi (in-frame) delesyon sonucunda TET2 geninin 3. ekzonunda 9 bazlık (GCTACAGGA) yani 3 kodonluk bir kayıp meydana gelmiştir. Bu çerçeveye içi delesyon TET2 geninin tekrar bölgeleri dışında olup; 3 kodon kaybı ile birlikte protein uzunluğunda 3 aminoasitlik bir kısalmaya sebep olmuştur. Bu varyant ClinVar, dbSNP veritabanlarında ve gnomAD exomes, gnomAD genomes, ESP, 1000 Genomes Project, ExAC gibi popülasyon veritabanlarındaki kontrollerde bulunmamaktadır. AML hastaları ile yapılan bir çalışmada TET2 geninde saptanan mutasyonlarının %61.1'i nokta mutasyonu, %22.1'i delesyon, %16'sı duplikasyon ve %0.8'i insersiyon olarak bildirilmiştir. Bu mutasyonlar bütün ekzonlara yayılmış

olmakla birlikte mutasyonların büyük çoğunluğu 3. ve 11. ekzonda yer almaktadır (107). TET2 geninin ilki 1104-1478. ikincisi ise 1845-2002. aminoasitler arasında bulunan iki adet evrimsel korunmuş domaini mevcuttur (108). TET2 p.E524\_Q526del varyantı bu domainlerin dışında olup in-silico analizlere göre (GERP++ rejected substitutions = 0.359 skoru 6.8'den küçük) benign olarak öngörülmektedir. Ayrıca hastanın aile bireylerinde bu varyantın analizi mümkün olmamıştır. Bu veriler ışığında ACMG 2015 kriterlerine göre patojenite için 2 orta (PM2,PM4) ve 1 adet destekleyici benign (BP4) kanıtları ile önemi bilinmeyen (VUS) varyant olarak sınıflandırılmıştır. Saptanan bu yeni varyantın kesin olarak yorumlanabilmesi için bu değişimin aile içindeki etkilenmiş ve etkilenmemiş bireylerde analiz edilmesi ve fonksiyonel çalışmaların yapılması gereklidir.

MS'in patogenezindeki nörodejeneratif süreç ve immün sistemin fonksiyonun bozulmasında, ilgili genlerin ekspresyonlarının düzensizliği yani modifiye protein fonksiyonu önemli role sahiptir. MS'de bu genlerin transkripsiyonları epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenir (3). TET2 önemli bir epigenetik düzenleyicidir ve MS'de ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir (9). Bildiğimiz kadarıyla literatürde MS hastalarında tüm TET2 geni varyantlarının araştırıldığı bir çalışma yoktur. Yeni nesil dizi analizi yöntemiyle TET2 geni varyantlarını analiz ettiğimiz bu çalışmada c.3804-7577A>C (rs2726518), c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609), c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206), c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) ve c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) gibi literatürde başka fenotiplerle ilişkilendirilmiş polimorfik varyantlar hasta ile kontrol grubu ve ayrıca hastaların klinik alt grupları arasında karşılaştırılmış olup MS ile anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Hasta ve kontrol grubunun az katılımcıdan oluşması çalışmamızın kısıtlamalarından biridir. TET2 genindeki bu polimorfizmlerinin Türk MS hasta popülasyonundaki etkilerinin daha etkin değerlendirilebilmesi için daha geniş hasta ve kontrol grubu örneklerine ihtiyaç vardır. Yine de mevcut verilerimiz Türk MS hasta popülasyonu için literatüre başlangıç verisi sunmuştur.

SNP'lerin yanı sıra son zamanlarda MS'te düşük frekanslı varyantların (MAF<%5) öneminden bahsedilmektedir (105). Çalışmamızda tespit edilen düşük frekanslı varyantlardan c.1064G>A (rs61744960) hem hasta hem de kontrol grubunda oldukça yüksek çıkıp, literatür verisini desteklememektedir. Ayrıca çalışmamızda

yapılan yeni nesil dizileme analizi sonucunda bir adet yeni TET2 geni varyantı olan TET2 c.1572\_1580del (p.E524\_Q526del) hasta grubunda saptanmıştır.

Özetle bu tez çalışması bilgilerimize göre Türk toplumunda MS hastalarında TET2 geni varyantlarının araştırıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca literatürde MS hastalarını c.3804-7577A>C (rs2726518), c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609), c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206), c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) ve c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) SNP'leri açısından değerlendiren başka bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca bir yeni TET2 geni varyantı tanımlanmıştır. Bu yönüyle çalışmamız bundan sonra yapılacak olan TET2 geni dizi analizleri için literatüre zengin ve kritik öneme sahip verileri sağlamaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

50 MS hastası ve 30 sağlıklı kontrol ile yaptığımız çalışmada TET2 genine ait tüm varyantların MS ile ilişkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte MS klinik subtipleri ve çalışma popülasyonunun demografik veriler de elde edilmiştir.

Çalışmamızda MS kadınlarda 1.96 kat daha siktir. MS klinik seyir tiplerinden literatürle uyumlu olarak en çok % 76 oranla RRMS'e rastlanmıştır. Bu veri diğer popülasyonlardaki RRMS sıklığından azdır. Türk popülasyonunda arttığı bildirilen SPMS klinik fenotipi çalışmamızda da %24 oranla ikinci en sık gözlenen MS klinik subtipidir.

Literatürde MS dışında başka klinik fenotiplerle ilişkilendirilmiş, TET2 geninin fonksiyonunu etkilediği önerilen ya da GWAS çalışmaları ile MS'e yatkınlık yarattığı bildirilen 5 SNP; c.3804-7577A>C (rs2726518), c.4140T>C / p.H1380H (rs3733609), c.5284A>G / p.I1762V (rs2454206), c.5162T>G / p.L1721W (rs34402524) ve c.1088C>T / p.P363L (rs17253672) genotipleri ve allelleri ile MS arasında ilişki bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Aynı polimorfizmler için RRMS ve SPMS hastaları ve MS arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Çalışmamıza kısıtlı sayıda katılımcı alındığından, daha geniş bir hasta grubunda bu varyantların çalışılması ve TET2 geni ekspresyon düzeylerinin ölçülmesinin faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızda saptanan düşük frekanslı ve nadir varyantları olan TET2 c.1064G>A / p.G355D, c.3970T>A / p.S1324T, c.3084G>A / p.M1028I ve c.1572\_1580del / p.E524\_Q526del'in klinik önemleri bilinmemektedir. Ayrıca TET2 c.1572\_1580del / p.E524\_Q526del daha önce literatürde bildirilmemiş yeni (novel) bir mutasyondur. Bu varyantlar için çalışmalara daha geniş popülasyonların dahil edilmesi, aile çalışmaları ve fonksiyonel analizlerin yapılması önerilerimiz arasındadır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(4):1180-8.
2. Zheleznyakova GY, Piket E, Marabita F, Kakhki MP, Ewing E, Ruhrmann S, ve ark. Epigenetic research in multiple sclerosis: progress, challenges, and opportunities. *Physiological genomics*. 2017;49(9):447-61.
3. Aslani S, Jafari N, Javan MR, Karami J, Ahmadi M, Jafarnejad M. Epigenetic modifications and therapy in multiple sclerosis. *Neuromolecular medicine*. 2017;19(1):11-23.
4. Sokratous M, Dardiotis E, Tsouris Z, Bellou E, Michalopoulou A, Siokas V, ve ark. Deciphering the role of DNA methylation in multiple sclerosis: emerging issues. *Autoimmunity Highlights*. 2016;7(1):12.
5. Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(6):341.
6. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(4):193-201.
7. Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, ve ark. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature*. 2015;525(7569):389-93.
8. Wang X, Wang J, Yu Y, Ma T, Chen P, Zhou B, ve ark. Decitabine inhibits T cell proliferation via a novel TET2-dependent mechanism and exerts potent protective effect in mouse auto-and allo-immunity models. *Oncotarget*. 2017.
9. Calabrese R, Valentini E, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, Ricigliano V, ve ark. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(7):1130-6.
10. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, ve ark. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839-43.
11. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, ve ark. Multiple sclerosis. *Nature reviews Disease primers* 2018;4(1):43.

12. Greer JM, McCombe PA. Role of gender in multiple sclerosis: clinical effects and potential molecular mechanisms. *Journal of Neuroimmunology*. 2011 May;234(1-2):7-18.
13. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2003 Dec;9(6):540-9.
14. Orrell RW. Multiple Sclerosis: The History of a Disease. *Journal of Royal Society of Medicine*. 2005;98(6):289.
15. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D ve ark.ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2018 Feb;25(2):215-237.
16. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*. 2010 May;9(5):520-32.
17. Moreno-Torres, Irene, Julia Sabín-Muñoz, ve Antonio García-Merino. Multiple Sclerosis: Epidemiology, Genetics, Symptoms, and Unmet Needs. *Emerging Drugs and Targets for Multiple Sclerosis*. (2019): 1-32.
18. Atlas of MS 2013, Mapping Multiple Sclerosis Around the World, Multiple Sclerosis International Federation, London, 2013, Available at, <http://www.msif.org/about-ms/publications-and-resources/>, Accessed September 01, 2018)
19. Gökçe ŞF, Çiğdem B, Nemmezi Karaca S, Bolayır A, Kayım Yıldız Ö, Topaktaş AS ve ark. Prevalence of multiple sclerosis in an urban population of Sivas province in Turkey. *Turk Journal of Medical Sciences*. 2019 Feb 11;49(1):288-294.
20. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological Reviews*. 2012 Jul;248(1):87-103.
21. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*. 2017Jan;13(1):25-36.

22. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2018 Feb;20:43-47.
23. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002 Apr 6;359(9313):1221-31. Review. Erratum in: *Lancet* 2002 Aug 24;360(9333):648.
24. Cotsapas C, Mitrovic M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology*. 2018 May 31;7(6):e1018. doi: 10.1002/cti2.1018. eCollection 2018. Review. Erratum in: *Clinical & translational immunology*. 2018 Aug 16;7(8):e1038.
25. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, Langer-Gould A. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2019 Sep;6(9):1905-1922.
26. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2004 Apr 5;199(7):971-9.
27. Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nature Genetics*. 2009 Jul;41(7):824-8.
28. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, ve ark. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature Genetics*. 2009 Jul;41(7):776-82.
29. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, ve ark. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug10;476(7359):214-9.
30. Aslani S, Jafari N, Javan MR, Karami J, Ahmadi M, Jafarnejad M. Epigenetic Modifications and Therapy in Multiple Sclerosis. *Neuromolecular Medicine*. 2017 Mar;19(1):11-23.
31. Sokratous M, Dardiotis E, Tsouris Z, Bellou E, Michalopoulou A, Siokas V, ve ark. Deciphering the role of DNA methylation in multiple sclerosis: emerging issues. *Auto-Immunity Highlights*. 2016 Dec;7(1):12.



32. Tsagaratou A, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in the immune system. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2013;78:1–10.
33. Küçükali Cİ, Kürtüncü M, Çoban A, Çebi M, Tüzün E. Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular Medicine*. 2015;17(2):83–96.
34. Miyazaki Y, Niino M. Epigenetics in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2015;6: 49-58.
35. Bendszus M, Storch-Hagenlocher B. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In *Inflammatory Diseases of the Brain*. (pp. 3-18). Springer, Berlin, Heidelberg., 2013.
36. Gilmore CP, Donaldson I, Bö L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 2009;80(2):182–187.
37. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R. Ocular pathology in multiple sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain*. 2010;133(Pt 6):1591–1601.
38. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nature Immunology*. 2018;19(7):696–707.
39. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews. Immunology*. 2015;15(9):545–558.
40. Miceli MC, Parnes JR. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Seminars Immunology*. 1991;3(3):133–141.
41. KhorshidAhmad T, Acosta C, Cortes C, Lakowski TM, Gangadaran S, Namaka M. Transcriptional Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) by Methyl CpG Binding Protein 2 (MeCP2): a Novel Mechanism for Re-Myelination and/or Myelin Repair Involved in the Treatment of Multiple Sclerosis (MS). *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1092–1107.
42. Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunologic Research*. 2014;59(1-3):254–265.

43. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, ve ark. Regulatory T cells fail to suppress CD4T<sup>+</sup>-bet<sup>+</sup> T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology*. 2009;127(3):418–428.
44. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, ve ark. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- $\beta$  Therapy. *Journal of Immunology*. 2015;194(11):5085–5093.
45. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Caggiula M, ve ark. IL17 and IFN $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine*. 2008;44(1):22-5.
46. Jelcic I, Al Nimer F, Wang J, Lentsch V, Planas R, Jelcic I, ve ark. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4<sup>+</sup> T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell*. 2018;175(1):85–100.e23.
47. Bar-Or A. The immunology of multiple sclerosis. *Seminars in Neurology*. 2008 Feb;28(1):29-45.
48. Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons JA. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*. 2006 Nov;180(1-2):63-70.
49. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, ve ark. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*. 2007 May 15;178(10):6092-9.
50. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*. 2017;389(10076):1336–1346.
51. Brownlee WJ, Miller DH. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2014;21(12):2065–2071.
52. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–1452.
53. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, ve ark. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018 Feb;17(2):162-173.

54. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology*. 2012;11(2):157–169.
55. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(9):a028928. Published 2018 Sep 4.
56. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, ve ark. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014 Jul 15;83(3):278-86.
57. Eriksson M, Andersen O, Runmarker B. Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis [published correction appears in *Mult Scler*. 2003 Dec;9(6):641]. *Mult Scler*. 2003;9(3):260–274.
58. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502–1517.
59. Rice CM, Cottrell D, Wilkins A, Scolding NJ. Primary progressive multiple sclerosis: progress and challenges. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 2013;84(10):1100–1106.
60. Khaleeli Z, Ciccarelli O, Mizski K, Altmann D, Miller DH, Thompson AJ. Lesion enhancement diminishes with time in primary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2010;16(3):317–324.
61. Filippi M, Rocca MA. MR imaging of multiple sclerosis. *Radiology*. 2011;259(3):659–681.
62. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handbook of Clinical Neurology*. 2014;122:269–290.
63. Olek MJ, Jonathan H. Evaluation and diagnosis of multiple sclerosis in adults. *UptoDate*: Waltham, MA, USA, 2019
64. Türk Nöroloji Derneği, *Multipl Skleroz tanı ve tedavi kılavuzu*, 2018
65. Trip SA, Miller DH. Imaging in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2005;76:iii11-iii18.
66. Kinney SR, Pradhan S. Ten eleven translocation enzymes and 5-hydroxymethylation in mammalian development and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;754:57–79.
67. Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Aijö T, Pastor WA, ve ark. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):122-6.

68. Loenarz C, Schofield CJ. Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation. *Chemistry and Biology*. 2009;16(6):580–583.
69. Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, Hayashi Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Research*. 2002 Jul 15;62(14):4075-80.
70. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014;28(3):485–496.
71. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, ve ark. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011 Jul 12;20(1):11-24.
72. Feng Y, Li X, Cassady K, Zou Z, Zhang X. TET2 Function in Hematopoietic Malignancies, Immune Regulation, and DNA Repair. *Frontiers in Oncology*. 2019 Apr 2;9:210.
73. Kaasinen E, Kuismin O, Rajamäki K, Ristolainen H, Aavikko M, Kondelin J, ve ark. Impact of constitutional TET2 haploinsufficiency on molecular and clinical phenotype in humans. *Nat Commun*. 2019 Mar 19;10(1):1252.
74. Lou H, Li H, Ho KJ, Cai LL, Huang AS, Shank TR, ve ark. The Human TET2 Gene Contains Three Distinct Promoter Regions With Differing Tissue and Developmental Specificities. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019 Jun 7;7:99.
75. Ichiyama K, Chen T, Wang X, Yan X, Kim BS, Tanaka S, ve ark. The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):613-26.
76. Zang S, Li J, Yang H, Zeng H, Han W, Zhang J, ve ark. Mutations in 5-methylcytosine oxidase TET2 and RhoA cooperatively disrupt T cell homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017 Aug 1;127(8):2998-3012.
77. Yang R, Qu C, Zhou Y, Konkel JE, Shi S, Liu Y, ve ark. Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity*. 2015 Aug 18;43(2):251-63.

78. Cull AH, Snetsinger B, Buckstein R, Wells RA, Rauh MJ. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Experimental Hematology*. 2017;55:56–70.e13.
79. Orlanski S, Labi V, Reizel Y, Spiro A, Lichtenstein M, Levin-Klein R, et al. Tissue-specific DNA demethylation is required for proper B-cell differentiation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 May 3;113(18):5018-23.
80. Dominguez PM, Ghamlouch H, Rosikiewicz W, Kumar P, Béguelin W, Fontán L, et al. TET2 Deficiency Causes Germinal Center Hyperplasia, Impairs Plasma Cell Differentiation, and Promotes B-cell Lymphomagenesis. *Cancer Discovery*. 2018 Dec;8(12):1632-1653.
81. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015 May;17(5):405-24.
82. Shen XH, Sun NN, Yin YF, Liu SF, Liu XL, Peng HL, et al. A TET2 rs3733609 C/T genotype is associated with predisposition to the myeloproliferative neoplasms harboring JAK2(V617F) and confers a proliferative potential on erythroid lineages. *Oncotarget*. 2016 Feb 23;7(8):9550-60.
83. Kutny MA, Alonzo TA, Gamazon ER, Gerbing RB, Geraghty D, Lange B, et al. Ethnic variation of TET2 SNP rs2454206 and association with clinical outcome in childhood AML: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia*. 2015 Dec;29(12):2424-6.
84. Pirola CJ, Scian R, Gianotti TF, Dopazo H, Rohr C, Martino JS, et al. Epigenetic Modifications in the Biology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role of DNA Hydroxymethylation and TET Proteins. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep;94(36):e1480.
85. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*. 2013 Nov;45(11):1353-60.

86. Anwar N, Shahid S, Arshad A. A benign course of MDS with del 7q and ASXL1 mutation. *Hematology and Transfusion International Journal*, 6(1), 44-45. 2018.
87. Schroer BC, Han YC, Hsieh FH. Identification of TET2 mutations in subjects with systemic mastocytosis and hypereosinophilic syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), AB232. 2010.
88. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 2015;64:13–25.
89. Huynh JL, Casaccia P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol*. 2013;12(2):195–206.
90. Hauser SL, Goodwin DS. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. II. New York: McGraw-Hill Medical; 2008. pp. 2611–2621
91. Simsek H, Geckin H, Sensoz NP, List EO, Arman A. Association Between IL7R Promoter Polymorphisms and Multiple Sclerosis in Turkish Population. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2019;67(1):38–47.
92. Debouverie M. Gender as a prognostic factor and its impact on the incidence of multiple sclerosis in Lorraine, France. *J Neurol Sci*. 2009 Nov 15;286(1-2):14-7
93. Sumelahti ML, Holmberg MH, Murtonen A, Huhtala H, Elovaara I. Increasing Incidence in Relapsing-Remitting MS and High Rates among Young Women in Finland: A Thirty-Year Follow-Up. *Mult Scler Int*. 2014;2014:186950.
94. Langemeijer SM, Jansen JH, Hooijer J, van Hoogen P, Stevens-Linders E, Massop M, et al. TET2 mutations in childhood leukemia. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):189-92.
95. Kraus TF, Globisch D, Wagner M, Eigenbrod S, Widmann D, Munzel M, et al. Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012; 131: 1577-90.

96. Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, ve ark. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*. 2012;150: 1135-46.
97. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, ve ark. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009; 114: 144-7.
98. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, ve ark. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*. 2009; 360: 2289-301
99. Konstandin N, Bultmann S, Szwagierczak A, Dufour A, Ksienzyk B, Schneider F, ve ark. Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011; 25: 1649-52.
100. Gambichler T, Sand M, Skrygan M. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma. *Melanoma research*. 2013; 23: 218-20.
101. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, ve ark. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010; 468: 839-43.
102. Kraus TF, Greiner A, Steinmaurer M, Dietinger V, Guibourt V, Kretzschmar HA. Genetic Characterization of Ten-Eleven-Translocation Methylcytosine Dioxygenase Alterations in Human Glioma. *J Cancer*. 2015;6(9):832–842.
103. Maver A, Lavtar P, Ristić S, Stopinšek S, Simčič S, Hočevan K, ve ark. Identification of rare genetic variation of NLRP1 gene in familial multiple sclerosis. *Scientific Reports*. 2017 Jun 16;7(1):3715.
104. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019 Sep 27;365(6460):eaav7188.
105. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk. *Cell*. 2018;175(6):1679–1687.e7.

106. Ziliotto N, Marchetti G, Scapoli C, Bovolenta M, Meneghetti S, Benazzo A, ve ark. C6orf10 Low-Frequency and Rare Variants in Italian Multiple Sclerosis Patients. *Front Genet.* 2019 Jun 26;10:573.
107. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, ve ark. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012 May;26(5):934-42.
108. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, ve ark. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):838-42.





## 8.ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER:

**Adı Soyadı** : Burak BAŞER  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri** : Ankara  
**Doğum Tarihi** : 15.02.1987  
**Medeni Durum** : Bekar  
**E-Posta** : dr.burakbaser@gmail.com  
**Adres** : Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıbbi Genetik A.D. / SİVAS

### EĞİTİM:

**Tıpta Uzmanlık** : Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.,  
Halen  
**Lisans** : Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kırıkkale, 2014.  
**Orta Öğrenim** : Beypazarı NKV Anadolu Lisesi, Ankara, 2005.  
**Yabancı Dil** : İngilizce (ÜDS: 77,500)

### MESLEKİ DENEYİM:

**2015 -** : Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik  
A.D.Araştırma Görevlisi (TUS-Eylül 2015).  
**2014-2015** :T.C. Sağlık Bakanlığı Ilgaz Devlet Hastanesi Acil Servisi,  
Pratisyen hekim.

## EKLER

## Ek 1. Etik kurul onay karar formu

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	TET2 geni varyantlarının Multipl Skleroz ile olası ilişkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092
	FAKS	-
	E-POSTA	cuetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğret. Üyesi Malik Ejder Yıldırım			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	--			
	DESTEKLEYİCİ	--			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	--			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	--			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>				
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkan Vekili  
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülay Yıldırım  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

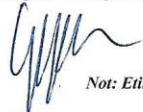
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	TET2 geni varyantlarının Multipl Skleroz ile olası ilişkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018-06/13	Tarih: 26.06.2018				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. N. Özlem Saygılı Yöner

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	İmza	
Prof. Dr. N. Özlem Saygılı Yöner	Gastroenteroloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Ayşe Demirkazak	Biyofizik	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Derya Özdemir Doğan	Protetik Diş Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzinli
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzinli
Doç. Dr. Ahmet Altun	Tıbbi Farmakoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzinli
Dr. Öğret. Üyesi Ziynet Çınar	Biyostatistik	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzinli
Dr. Öğret. Üyesi Mahmut Ekiçi	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzinli
Dr. Öğret. Üyesi Hatice Acar Çınar	Din Psikolojisi	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	İzinli
Uzm. Dr. Levent Sağlam	Aile Hekimi	Hafik ASM	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"/>	İzinli



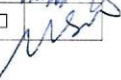
Etik Kurul Başkan Vekili  
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülay Yıldırım  
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

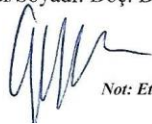
## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	TET2 geni varyantlarının Multipl Skleroz ile olası ilişkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Uzm. Dr. Mustafa Tosun	Dermatoloji	Sivas Numune Hastanesi	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"/>	
Öğrt. Gör. Mehmet Sevim	Hukukçu	Cumhuriyet Üniversitesi	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"/>	
Öğret. Mehmet Şahin	Türk Dili Edebiyat Öğretmeni	Sivas Kongre Anadolu Lisesi	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"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkan Vekili  
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülay Yıldırım  
İmza:



*Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.*