

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

**SHWACHMAN-DİAMOND SENDROMUNA NEDEN OLAN  
GENETİK ETYOLOJİNİN BELİRLENMESİ**

**Dr. Sümeyra OĞUZ**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2020**

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

**SHWACHMAN-DİAMOND SENDROMUNA NEDEN OLAN  
GENETİK ETYOLOJİNİN BELİRLENMESİ**

**Dr. Sümeyra OĞUZ**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

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

**ANKARA  
2020**

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim ve tez çalışmam sürecinde her zaman bilimsel ve içten yaklaşımıyla yol gösteren, kıymetli katkılarıyla destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nurten Akarsu'ya,

Tüm asistanlık eğitim sürecimde her zaman bilgisinden yararlandığım, destekleriyle yanımda olan ve yol gösteren değerli hocam anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet Alikeşifoğlu'na,

Tez süreci boyunca hastaların muayenelerinde ve tetkiklerinin tamamlanmasında büyük yardımları ve katkıları olan sayın Prof. Dr. Şule Ünal ve Doç. Dr. Pelin Özlem Şimşek Kiper'e ve ayrıca değerli bilgi ve birikimlerinden her zaman faydalandığım sayın Prof. Dr. Eda Utine'ye,

Tezin birçok basamağında değerli katkıları olan ve her konuda bilgisinden faydalandığım Dr. Öğr. Üyesi Arda Çetinkaya'ya,

Tezin tüm ekzom dizileme uygulamalarında ve sonuçların değerlendirilmesinde değerli katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Ekim Taşkiran'a ve Bio. Can Koşukcu'ya,

Laboratuvar uygulamaları için Bio. Deniz Ceylan, Bio. Serkan Kabaçam'a ve tüm çalışanları ile sevgili genetik ailesine,

Biyoinformatik analizler için vakit ayırıp özenli ve titiz çalışmaları ile önemli katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Ceren Sucularlı'ya,

Asistanlık eğitimimde ve tez sürecinde hastaların poliklinikte değerlendirilmesinde her zaman yardımları ile katkıda bulunan Dr. Gizem Ürel Demir ve Dr. Süleyman Atar'a,

Tez süreci boyunca birçok aşamaya tanıklık eden ve manevi destekleriyle yanımda olan hemşiremiz Fatma Kurşun'a ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Ayrıca çalışmamıza destek verdiği için Türk Hematoloji Derneği'ne içten teşekkürlerimi sunarım. Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca her zaman maddi-manevi destekleriyle yanımda olan aileme ve yakın dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Oğuz, S. Shwachman-Diamond sendromuna neden olan genetik etyolojinin belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2020.** Shwachman-Diamond sendromu (SDS, OMIM #260400) ekzokrin pankreas disfonksiyonu, iskelet bulguları, kemik iliği yetmezliği, miyelodisplastik sendrom ve lösemi (özellikle akut miyeloid lösemi) için artmış risk ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Ribozomopatiler içerisinde kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri altında sınıflandırılan klinik olarak heterojen ve tanısı zor olan bu sendrom için son yıllarda yeni genlerde mutasyonlar bildirilerek hastalığın genetik heterojenliği de ortaya konmuştur. Bu çalışmada Türkiye genelinden SDS ön tanısı ile gönderilen hastaların fenotipik ve genotipik bulguları incelenmiştir. Ayrıca SDS fenotipi gösteren fakat bilinen genlerde herhangi bir mutasyon saptanmayan 8 bireye tüm ekzom dizileme (WES) analizi yapılarak etiyolojiye yönelik yeni genlerin bulunması hedeflenmiştir. Yapılan WES analizi sonucunda bir hastada *TBXAS1* geninde patojen olduğu *in silico* olarak belirlenen bir varyant saptanmıştır ve asıl tanının Ghosal hematodiyafizyel sendrom olduğu belirlenmiştir. SDS fenotipinde görülen hemen hemen tüm bulgulara sahip bir hastada ise homozigotluk haritalamasının da yapılmasıyla güçlü bir aday gene ulaşılmıştır. Bu gen mikrotübül ilişkili protein ailesine ait bir protein kodlamakta olup günümüzde insanlarda herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmemiştir. Yine SDS fenotipi ile uyumlu bir hastada ekzositozda görevli olduğu bilinen bir gende nadir *nonsense* bir değişiklik saptanarak olası başka bir aday gene ulaşılmıştır. Kalan 5 hastada ise homozigot ve bileşik heterozigot filtrelemeler ile saptanan varyantlardan herhangi bir aday gene ulaşılamamıştır. Heterozigot varyant filtrelemesi ise devam etmektedir. Sonuç olarak çalışma hedefi olan yeni genlerin bulunmasına yönelik ilk basamak gerçekleştirilerek güçlü aday genler belirlenmiştir. Bu genlere yönelik fonksiyonel çalışmaların yapılması etyolojinin aydınlatılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Shwachman-Diamond sendromu, nötrojeni, tüm ekzom dizileme, mikrotübül ilişkili protein, ekzositoz.

**Destekleyen Kuruluş:** Türk Hematoloji Derneği, Proje no: 2018-4.

## ABSTRACT

**Oğuz, S. Determination of the genetic etiology causing Shwachman-Diamond syndrome. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Medical Specialty Thesis, Ankara, 2020.** Shwachman-Diamond syndrome (SDS, OMIM #260400) is an autosomal recessive disorder characterized by exocrine pancreatic dysfunction, skeletal manifestations, bone marrow failure, increased risk for myelodysplastic syndrome and leukemia (especially acute myeloid leukemia). SDS is classified under hereditary bone marrow failure among ribosomopathies. Recently mutations in new genes have been reported for this syndrome and genetic heterogeneity of the disease which is also clinically heterogeneous, has been demonstrated. In this study, phenotypic and genotypic findings of patients who have SDS preliminary diagnosis was examined. Besides it was aimed to find new genes for etiology by performing whole exome sequencing (WES) analysis in 8 individuals who had SDS phenotype but no mutation was detected in known genes. As a result of WES analysis, a variant which was identified as pathogenic in silico in *TBXAS1* gene (causes Ghosal hematodiaphyseal syndrome) was detected in one patient. In another patient with almost all findings of SDS phenotype, a strong candidate gene was revealed by WES analysis and homozygote mapping. This gene encodes a protein of the microtubule-associated protein family and is not currently associated with any phenotype in humans. And a rare nonsense change was detected in a gene which associated with exocytosis in the third patient compatible with SDS phenotype and so another possible candidate gene was revealed. In the remaining 5 patients, no candidate gene was identified from the variant tables by homozygote and compound heterozygote filtration. As a result, strong candidate genes were determined by performing WES as the first step to find new genes that are the aim of this study. Functional studies of these genes will contribute to the elucidation of the etiology and also disease pathogenesis.

**Keywords:** Shwachman-Diamond syndrome, neutropenia, whole exome sequencing, microtubule-associated protein, exocytosis.

**Supported by:** Turkish Society of Hematology, Project number: 2018-4.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Memeli Ribozom Yapısı ve Fonksiyonu	3
2.1.1. Pre-rRNA İşlenmesi	3
2.1.2. Ribozomal Alt Birimlerin Sentezi	4
2.1.3. Translasyon ve Elongasyon	6
2.1.4. Ribozomopatiler	7
2.1.5. Ribozom Disfonksiyonu ve Kemik İliği Yetmezlikleri	12
2.2. Hematolojik Hücre Serisi Gelişimi	12
2.2.1. Konjenital Nötropeniler	13
2.3. Shwachman-Diamond Sendromunun Klinik Bulguları	16
2.3.1. Hematolojik Bulgular	19
2.3.2. Gastrointestinal Bulgular	20
2.3.3. İskelet Bulguları	21
2.3.4. Nörolojik Bulgular	21
2.3.5. Diğer Bulgular	21
2.4. Ayırıcı Tanı	22
2.5. Tedavi	25
2.6. SDS'nin Moleküler Temeli	26
2.6.1. <i>SBDS</i> Geni	27
2.6.2. <i>DNAJC21</i> Geni	28
2.6.3. <i>EFL1</i> Geni	30
2.6.4. <i>SRP54</i> Geni	31

	<b>Sayfa</b>
3. BİREYLER ve YÖNTEMLER	34
3.1. Klinik Verilerin Toplanması	34
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Gereçler, Çözeltiler ve Cihazlar	34
3.2.1. DNA Eldesi ve Ölçümü	34
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
3.2.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizileme	35
3.2.4. Mikrodizin Analizi	35
3.2.5. Yeni Nesil Dizileme	35
3.2.6. Genom Boyu Tek Nükleotid Polimorfizm Analizi	36
3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	36
3.3.1. DNA Eldesi	36
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	37
3.3.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizileme	38
3.3.4. Affymetrix CytoScan Optima Array Analizi	40
3.3.5. Yeni Nesil Dizileme	43
3.3.6. Genom Boyu 250K Tek Nükleotid Polimorfizm Analizi	46
3.3.7. Üç Boyutlu Protein Modelleme	47
4. BULGULAR	49
4.1. Klinik Bulgular	49
4.2. Laboratuvar Bulguları	51
4.2.1. <i>SBDS</i> Geninde Saptanan Mutasyonlar	51
4.2.2. Genom Boyu Mikrodizin Analizi ve Kopya Sayısı Değişiklikleri	57
4.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Analizi Sonuçları	59
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	114
7. KAYNAKLAR	115
8. EKLER	
EK 1: Etik Kurul Onayı	
EK 2: Hacettepe Üniversitesi Kemik İliği Yetmezlikleri Merkezi Shwachman-Diamond Sendromu Şüphesi Olan Hastalarda Değerlendirme Formu	
EK 3: SDS Ön Tanısı ile Yönlendirilen Hastaların Bulguları	
EK 4: Kalıtsal Kemik İliği Yetmezlikleri ile İlişkilendirilmiş Genler	
EK 5: WES Validasyon ve Segregasyon Çalışmalarının Sanger Elektroferogram Görüntüleri	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ALP</b>	Alkaleen fosfataz
<b>ALT</b>	Alanin transaminaz
<b>AMAF</b>	Afrikalı Amerikan Minör Allel Frekansı
<b>AML</b>	Akut miyeloid lösemi
<b>AML-M7</b>	Akut miyeloid lösemi- M7 tipi
<b>ANS</b>	Absolut nötrofil sayısı
<b>ASD</b>	Atriyal septal defekt
<b>AST</b>	Aspartat transaminaz
<b>.bam</b>	<i>Binary alignment map</i>
<b>BC</b>	Bant hücresi
<b>BÇ</b>	Baş çevresi
<b>BT</b>	Bilgisayarlı tomografi
<b>CF</b>	Kistik fibrozis
<b>CFU-MK</b>	Megakaryosit progenitör
<b>CHH</b>	Kartilaj-saç hipoplazisi
<b>Chr</b>	Kromozom
<b>CIPA</b>	<i>Congenital insensitivity to pain with anhydrosis</i>
<b>CMP</b>	Genel miyeloid progenitör
<b>CNV</b>	Kopya sayısı değişikliği
<b>C/S</b>	Sezeryan
<b>DAG</b>	Diaçilgliserol
<b>DBA</b>	Diamond-Blackfan anemisi
<b>DC</b>	Diskeratozis konjenita



<b>DECIPHER</b>	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
<b>DGV</b>	<i>Database of Genomic Variants</i>
<b>early P</b>	Erken promiyelosit
<b>EMAF</b>	Avrupalı Amerikan Minör Allel Frekansı
<b>ER</b>	Endoplazmik retikulum
<b>ES</b>	Eritrosit süspansiyonu
<b>ETS</b>	Eksternal transkript dizileri
<b>FA</b>	Fankoni anemisi
<b>FHL</b>	Famlyal hemofagositik lenfohistiyositozis
<b>FMF</b>	<i>Familial Mediterranean Fever</i>
<b>g</b>	Gravity
<b>G-CSF</b>	Granülosit-koloni stimulan faktör
<b>GMAF</b>	Global Minör Allel Frekansı
<b>GMP</b>	Granülosit/monosit progenitör
<b>GnomAD</b>	<i>Genome Aggregation Database</i>
<b>Hb</b>	Hemoglobin
<b>HSCT</b>	Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
<b>HomSI</b>	<i>Homozygous Stretch Identifier</i>
<b>HPV</b>	Human papilloma virus
<b>HSC</b>	Hematopoetik kök hücre
<b>HUMAF</b>	Hacettepe Üniversitesi Minör Allel Frekansı
<b>HUVariantsDB</b>	Hacettepe Üniversitesi varyant veritabanı
<b>IGV</b>	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
<b>ISP</b>	<i>Ion Sphere Particle</i>
<b>ITS1</b>	İnternal transkript dizisi 1

<b>ITS2</b>	İnternal transkript dizisi 2
<b>IVF</b>	<i>In vitro</i> fertilizasyon
<b>JBS</b>	Johanson-Blizzard sendromu
<b>kb</b>	Kilobaz
<b>KCFT</b>	Karaciğer fonksiyon testleri
<b>KLL</b>	Kronik lenfosit lösemi
<b>late P</b>	Geç promiyelosit
<b>LCC</b>	Lökoensefalopati, intrakraniyal kalsifikasyonlar ve kistler
<b>MAF</b>	Minör Allel Frekansı
<b>MaxMAF</b>	Maksimum Minör Allel Frekansı
<b>MAP</b>	Mikrotübül ilişkili protein
<b>MCP</b>	Metakarpofalangeal eklem
<b>MDS</b>	Miyelodisplastik sendrom
<b>MEP</b>	Megakaryosit/eritroid progenitör
<b>MERLIN</b>	<i>Multipoint Engine for Rapid Likelihood Inference</i>
<b>MM</b>	Metamiyelosit
<b>MPP</b>	Multipotansiyel progenitör
<b>MRG</b>	Manyetik rezonans görüntüleme
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>mt</b>	Mitokondriyal kalıtım
<b>MY</b>	Miyelosit
<b>NES</b>	Nükleer eksport dizileri
<b>ng</b>	Nanogram
<b>OD</b>	Otozomal dominant
<b>OMIM</b>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>OR</b>	Otozomal resesif

<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Plt</b>	Platelet
<b>PMN</b>	Polimorfonükleer hücre
<b>PMPS</b>	Pearson ilik-pankreas sendromu
<b>rDNA</b>	Ribozomal Deoksiribo Nükleik asit
<b>RNAase</b>	Ribonükleaz
<b>RNAseq</b>	Ribo Nükleik asit dizileme
<b>RP</b>	Ribozomal protein
<b>RPL</b>	Ribozom büyük alt birim proteini
<b>RPS</b>	Ribozom küçük alt birim proteini
<b>rRNA</b>	Ribozomal Ribo Nükleik asit
<b>S</b>	Svedberg
<b>SBDS</b>	Shwachman-Bodian-Diamond sendromu geni
<b>SCN</b>	Şiddetli konjenital nötropeni
<b>SDS</b>	Shwachman-Diamond Sendromu
<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-activated protein receptor</i>
<b>snoRNP</b>	Küçük nükleolar ribonükleoprotein
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>T-ALL</b>	T hücreli akut lenfoblastik lösemi
<b>uORFs</b>	<i>Upstream open reading frames</i>
<b>USG</b>	Ultrasonografik görüntüleme
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i>
<b>ÜSYE</b>	Üst solunum yolu enfeksiyonu
<b>VA</b>	Vücut ağırlığı
<b>.vcf</b>	<i>Variant caller format</i>

<b>VIGENOS</b>	<i>Visual Genome Studio</i>
<b>VSD</b>	Ventriküler septal defekt
<b>YD</b>	Yenidoğan
<b>XL</b>	X'e bağlı kalıtım
<b>WES</b>	Tüm ekzom dizileme
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikrolitre
<b>5' UTR</b>	5' ucu <i>untranslated region</i>



## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. 90S pre-ribozomal partikülden pre-40S ve pre-60S alt birimlerinin oluşturulması sürecinin şematik gösterimi	5
2.2. Hematopoez	13
2.3. SDS klinik bulguları özet gösterimi	19
2.4. Nötropeniye yol açan proteostazis yolağı	26
2.5. <i>SBDS</i> geninin şematik gösterimi ve psödogen konversiyonu nedeniyle en sık saptanan mutasyonları	27
2.6. <i>DNAJC21</i> geninde saptanmış olan mutasyonların şematik gösterimi	30
3.1. Ion Proton™ Sistemi Ekzom İş Akış Şeması	44
3.2. GeneChip® <i>Mapping Assay</i> – Nsp I	47
4.1. <i>SBDS</i> mutasyonu saptanan hastaların pedigrileri ve sekans elektroferogram görüntüleri	52
4.2. TRSDS082_17 numaralı bireyin pedigrisi	63
4.3. TRSDS082_17 numaralı bireyin grafileleri	63
4.4. TRSDS082_17 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	64
4.5. <i>TBXAS1</i> c.1355C>T değişikliğinin pedigride segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri	65
4.6. TRSDS081_16 numaralı bireyin pedigrisi	67
4.7. TRSDS081_16 numaralı bireyin grafileleri	67
4.8. TRSDS081_16 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	68
4.9. <i>SCN9A</i> c.2868delA değişikliğinin pedigride segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri	70
4.10. <i>MAP7D1</i> c.601C>T değişikliğinin pedigride segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri	71

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>4.11. A)</b> MAP7D1 proteinin <i>in silico</i> olarak yapılan üç boyutlu protein modellemesi <b>B)</b> MAP7D1 proteinin tübülün ile olan <i>docking</i> çalışması	72
<b>4.12.</b> TRSDS016_03 numaralı bireyin pedigrisi	75
<b>4.13.</b> TRSDS016_03 numaralı bireyin kemik iliği yaymasında görülen megakaryosit	75
<b>4.14.</b> TRSDS016_03 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	76
<b>4.15.</b> <i>UNC13B</i> c.124C>T değişikliğinin pedigride segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri	77
<b>4.16.</b> TRSDS167_45 numaralı bireyin pedigrisi	79
<b>4.17.</b> TRSDS167_45 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	80
<b>4.18.</b> TRSDS156_42 numaralı bireyin pedigrisi	83
<b>4.19.</b> TRSDS156_42 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	84
<b>4.20.</b> TRSDS118_27 numaralı bireyin pedigrisi	87
<b>4.21.</b> TRSDS118_27 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	88
<b>4.22.</b> TRSDS146_40 numaralı bireyin pedigrisi	91
<b>4.23.</b> TRSDS146_40 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	92
<b>4.24.</b> TRSDS122_32 numaralı bireyin pedigrisi	95
<b>4.25.</b> TRSDS122_32 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları	96
<b>5.1.</b> Sekretuar hücrelerde ekzositoz basamakları	102
<b>5.2.</b> <i>UNC13B</i> 'nin ekspresyon seviyelerinin şematik gösterimi	104
<b>5.3.</b> Megakaryopoez	105
<b>5.4.</b> MAP7 proteininin mikrotübül ve kinezin ile olan etkileşimi	109

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. İnsan ribozomopati hastalıkları ve ilgili genler	8
2.2. Konjenital nötropenilerde ana hematolojik bulgular ve ilişkili organ disfonksiyonları	14
2.3. Shwachman-Diamond sendromu klinik ve moleküler tanısal bulguları	18
2.4. SDS ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar	23
2.5. <i>SRP54</i> geninde saptanan mutasyonlar	32
3.1. PCR karışımı ve reaksiyonu	38
3.2. Sekans reaksiyonu karışımı ve sekans PCR koşulları	39
4.1. <i>SBDS</i> geninde mutasyon saptanan hastaların klinik bulguları ve mutasyon bilgileri	56
4.2. Hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleri	58
4.3. İndeks vaka 2'nin eski ve yeni filtreleme yöntemi ile elde edilen varyant sayılarının karşılaştırılması	60
4.4. İndeks vaka 2'nin homozigotluk haritalaması	69
4.5. İndeks 4'ün homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri	81
4.6. İndeks 5'in homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri	85
4.7. İndeks 6'nın homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri	89
4.8. İndeks 7'nin homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri	93
4.9. İndeks 8'in homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri	97
5.1. FHL bulguları ile <i>UNC13B</i> mutasyonu saptanan hastanın bulgularının karşılaştırılması	103
5.2. MAP proteinleri ve ilişkilendirilmiş hastalıklar	108
5.3. SDS fenotipinde bulgulara göre öncelikli dizilenecek genler	112

## 1. GİRİŞ

Shwachman-Diamond sendromu (SDS, OMIM #260400) konjenital anomaliler, ekzokrin pankreas disfonksiyonu, kemik iliği yetmezliği, miyelodisplastik sendrom ve lösemi (özellikle akut miyeloid lösemi) için artmış risk ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Kemik iliğinde en çok etkilenen hücre grubu nötrofiller (nötropeni) olmakla birlikte tüm serilerdeki hücrelerde etkilenme eşlik edebilir. SDS'de ayrıca büyüme geriliği, iskelet anomalileri (metafizyel kondrodisplazi, göğüs kafesi displazisi ve osteopeni) ve kognitif bozukluk gibi bulgular da görülebilmektedir. Klinik tablo geniş bir spektrumu içermektedir ve yaklaşık prevalans 1/77.000 doğum olarak bildirilmektedir. 1964 'te Shwachman ve arkadaşları tarafından tanımlanmasına karşın, ilk olarak Nezelof ve Watchi tarafından ekzokrin pankreas yetmezliği ve lökopenisi olan iki çocukta "pankreasın konjenital lipomatozisi" şeklinde 1961'de tanımlanmıştır (1, 2).

2003 yılında ise sendroma neden olan gen Boocock ve ark. tarafından bulunmuştur (3). 1964'te sendromu tanımlayanlara (Amerikan doktor Harry Shwachman, İngiliz oftalmolog Martin Bodian ve Amerikan pediatrist Louis Diamond) ithafen ilgili gen adı *SBDS* olarak konulmuştur. SDS etiolojisinden yaklaşık olarak %90 oranında *SBDS* genindeki biallelik mutasyonlar sorumludur. *SBDS*, *EFL1* (*elongation factor-like GTPase 1*)'in 60S ribozomal alt ünitesinin son maturasyon evresinde anti-assosiyasyon faktörü eIF6'nın birleşme ara yüzünden uzaklaştırılmasında kofaktör rol oynamaktadır. Bu nedenle SDS ribozomopati grubundan bir hastalık olarak yorumlanmıştır. Ayrıca, 2017'de 60S ribozom montaj faktörü *DNAJC21* ve *EFL1* mutasyonlarının SDS fenotipi gösteren hastalarda saptanması hastalığın genetik heterojenitesinin açığa çıkarılmasının yanında ribozomopati olarak değerlendirilmesini güçlendirmiştir. Son olarak yine 2017'de endoplazmik retikulum için sinyal tanıma partikülünü kodlayan *SRP54* geninde saptanan heterozigot mutasyonlar SDS fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Sonrasında *SRP54* mutasyonlarının SDS dışında izole nötropeni olan olgularda da sıklıkla saptanmasının ardından genotipik ve fenotipik çeşitliliğin nozolojide zorluk oluşturduğu ve özellikle nötropeni nozolojisinin yeniden değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır.



Bu tez kapsamında Hacettepe Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bölümü'nde SDS ön tanısı ile izlenen hastalarda genetik etiyolojinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Öncelikle tüm hastalara *SBDS* genine yönelik dizi analizi yapılmıştır. Mutasyon saptanmayan hastalardan klinik bulguları ile daha kuvvetle SDS düşünülen 8 hastaya bilinen diğer genlere yönelik (*DNAJC21*, *EFL1* ve *SRP54*) dizi analizi ve mikrodizin analizleri uygulanması, etiyolojiye yönelik anlamlı bulgu saptanmayan hastalara ise tüm ekzom dizileme analizi yapılarak genetik etiyolojinin aydınlatılması hedeflenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Memeli Ribozom Yapısı ve Fonksiyonu

Ribozomlar, tüm canlılarda bulunan ve mRNA ile kodlanan bilgilerin proteinlere dönüştürülmesini sağlayan temel makromoleküler organellerdir. Ribozom gibi büyük yapılar molekül büyüklüğüne göre ultrasantrifüjde çökme hızlarına göre Svedberg birimleri cinsinden (küçük ribozomal alt ünite için 40S gibi) ifade edilir. Ökaryotik 80S ribozom, büyük 60S ve küçük 40S alt birimlerden oluşan bir ribonukleoprotein komplekstir. Büyük 60S alt birimi mayalarda 25S, 5.8S ve 5S ribozomal RNA (rRNA)'yı içerirken memelilerde 5.8S ve 5S yanısıra 28S rRNA içermektedir. Küçük 40S alt birimi ise maya ve memelilerde 18S rRNA bulundurmaktadır. Memeli ribozomu dört farklı rRNA ve 79 ribozomal proteinden (RP) oluşmaktadır (4-8). Ribozomal proteinler, büyük ribozomal alt birimin proteinleri için RPL ve küçük ribozomal alt birim proteinleri için ise RPS kullanılarak adlandırılır. Yapısal bileşenlere ek olarak ribozom sentezi esansiyel olan ek proteinler ve küçük nükleolar ribonukleoprotein partikülleri (snoRNP) içeren 200'den fazla non-ribozomal faktör gerektirmektedir (9).

Ribozom biyogenezi karmaşık ve iyi organize edilmiş birçok işlemin gerçekleştirilmesiyle sağlanır. Ökaryotlarda ribozom biyogenezi öncü rRNA'ların nükleolusta senteziyle başlar ve olgun alt birimlerin sitoplazmada birleştirilmesiyle tamamlanır. Ribozomun RNA bileşenleri RNA polimeraz I ve III ile, ribozomal proteinler ise RNA polimeraz II aracılığıyla sağlanır. Ribozomal protein transkriptleri sitoplazmada proteinlere çevrilir ve daha sonra rRNA'ların transkribe edildiği nükleoluslara transport edilir.

#### 2.1.1. Pre-rRNA İşlenmesi

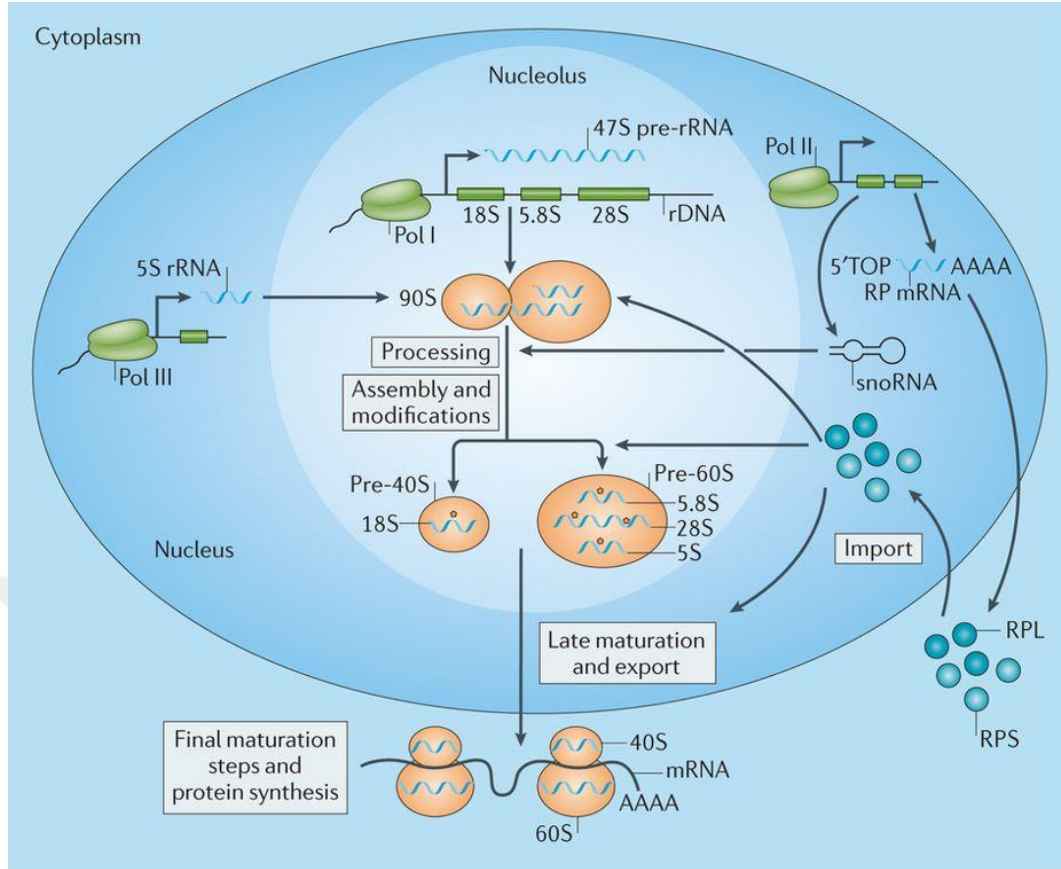
Memelilerde nükleolusta, 5S rRNA ve 47S (45S olarak da bilinir) rRNA için farklı olmak üzere rDNA kodlayan üniteler bulunur. İnsanlarda bu rDNA üniteleri tekrar eden şekilde 45S rRNA için akrosentrik kromozomlar (13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlar) üzerinde yerleşiktir (10, 11). Ribozom biyogenezi bu bölgeden RNA polimeraz I aracılığıyla sentezlenen büyük bir polisistronik transkript olan 47S pre-

rRNA sentezi ile başlar (Şekil 2.1.). 47S pre-rRNA'dan ribozomun dört olgun rRNA'sından üçü olan 18S, 5.8S ve 28S rRNA bileşenleri sağlanır. Bu birimde bulunmayan 5S rRNA ise bağımsız olarak ayrı bulunan 5S rDNA'dan RNA polimeraz III tarafından ayrı olarak transkribe edilir. 47S pre-rRNA eksternal yan dizileri (ETS: eksternal transkript dizileri) ile iki internal transkript dizisi (ITS1 ve ITS2) içerir (4). Olgun rRNA'ların oluşumu için 47S pre-rRNA bir takım endo- ve ekzonükleolitik işlem basamaklarına tabi tutulur. Ayrıca ko-transkripsiyonel olarak metilasyon ve psödoüridinilasyon gibi diğer işlemler meydana gelir (5).

### 2.1.2. Ribozomal Alt Birimlerin Sentezi

Ribozom sentezi sürecinde biyokimyasal olarak saptanabilen en erken kompleks 90S pre-ribozomal partiküldür. Bu kompleks, 47S/45S pre-rRNA'nın 5' ucunda bulunan 18S rRNA domaininde toplanan küçük alt ünite prosesomunu (*small subunit processome*-SSU) içerir. SSU, 5'-ETS ve ITS1'de endonükleolitik bölünmelerin gerçekleştirilmesinde yer alan ve 40S ribozomal alt ünitesinin olgunlaşmasında kritik bir rol oynayan U3 snoRNP'yi içerir (12). 40S alt ünitesinin montajı için birçok ribozomal protein ve faktör 90S biriminde bulunmasına karşın 60S büyük alt ünite için ribozomal proteinler veya faktörler bu erken komplekste bulunmamaktadır (4, 13).

90S birimi ITS1'deki işlemlerden geçtikten sonra alt birim matürasyonunda ileri bağımsız basamakların başlangıcı için pre-40S alt birimler pre-60S alt birimlerden ayrılır (Şekil 2.1.). Olgunlaşmamış 20S pre-rRNA içeren pre-40S alt birimler matürasyon sürecinde ilave proteinler alırlar ve pre-40S alt birimler nükleustan sitoplazmaya taşınır.



Nature Reviews | Cancer

**Şekil 2.1.** 90S pre-ribozomal partikülden pre-40S ve pre-60S alt birimlerinin oluşturulması sürecinin şematik gösterimi (Pelletier ve ark.'larının nat. Reviews 2018 çalışmasından alınmıştır (14).).

60S alt birimlerinin oluşumu, 40S alt birimininkinden çok daha karmaşıktır ve üç rRNA türünün olgunlaşmasını, 30'dan fazla ribozomal proteinin dahil edilmesini ve 100'ün üzerinde faktörün bulunmasını gerektirir. 60S alt birimlerin matürasyonu nükleolusta başlar ve sitoplazmada tamamlanır. Pre-40S ve pre-60S alt birimler oluşturulduktan sonra farklı işlem basamaklarına tabi tutulmak üzere, her iki alt birimde de mevcut olan ve Crm1 olarak da bilinen Xpo1 faktör tarafından tanınan nükleer eksport dizileri (NES) aracılığıyla nükleer por komplekslerine iletilirler (15). Crm1 tarafından tanınan pre-40S alt birimin molekülleri Ltv1, Dim2 ve Rio2'yi içerirken pre-60S alt birimlerle ilişkili olduğu bilinen NES'e sahip olan tek faktör Nmd3'tür (4, 7, 16).

Olgun 60S ile ilişkili olmayan ve pre-60S alt birimlerin geç sitoplazmik olgunlaşmasının bir parçası olan çeşitli faktörler vardır. Bunlar iki adet GTPaz: Lsg1 / Kre35 ve Efl1, iki ATPaz: Drg1 ve Jjj1-Ssa1 / Ssa2, bir  $Zn^{2+}$  parmak proteini: Rei1 ve bir fosfataz: Yvh1 faktörleridir (17). Bu faktörlerin çoğu, 40S ve 60S alt birimlerinin olgunlaşmalarının tamamlanmadan erken birleşmelerini önler. Bu tez kapsamında özellikle ilgi alanında olan GTPaz Efl1'dir. Shwachman-Bodian-Diamond sendromu proteini olan SBDS, Efl1 ile birlikte pre-60S alt biriminden anti-birleşme faktörü olan eIF6'nın uzaklaştırılmasında görev almaktadır (18, 19). Bu serbestleştirme işlemi eIF6'ların nükleusa geri dönerek daha fazla pre-60S alt biriminin sitoplazmaya transportunun sağlanmasında da gereklidir (20).

### 2.1.3. Translasyon ve Elongasyon

Protein sentezi sitoplazmada gerçekleşmektedir. Protein sentezi sırasında, 40S alt birimi mRNA'ya bağlanır ve bir AUG başlangıç kodonu ile karşılaşana kadar mRNA'yı tarar. 40S başlatma kompleksi olarak bilinen bu kompleks, 80S başlangıç kompleksi oluşturmak için bir 60S alt ünitesinin birleştirilmesini sağlayan birkaç başlangıç faktörü ve GTP gerektirir. 80S başlangıç kompleksi oluşturulduktan sonra ribozom, mRNA boyunca translasyona geçerek protein sentezi için elongasyon fazına geçmeye hazır hale gelir.

Tarama kompleksi AUG başlangıç kodonuna yerleştiğinde bu bölge P (peptidil) bölgesine denk gelir, eIF1 serbest kalır. 80S başlatma kompleksi oluşturulduktan ve Met-tRNA<sup>Met</sup> P sitesine yerleştikten sonra uzama başlayabilir. Başlatıcı AUG'dan bir sonraki kodon hangi aminoasıl-tRNA'nın EF1A ve GTP ile üçlü bir kompleks olarak doğru bir şekilde A (aminoasıl) bölgesine gireceğini belirler. GTP hidrolize edildiğinde ve EF1A salındığında, amino asitler arasında bir peptid bağı oluşur, sonrasında ribozom bir kodon 3' ucuna doğru kayar (EF2 ve GTP hidroliziyle katalize edilen). Böylelikle A bölgesi açılır ve yeni sentezlenen peptidil-tRNA P bölgesine taşınır. Daha önce P bölgesini işgal eden deaçile-tRNA, ribozomal kompleksten E (çıkış) bölgesi içinden çıkar (4). Elongasyon, çoğu durumda ribozom bir durdurma kodonu (stop kodon) ile karşılaşana kadar devam eder. Hücre ihtiyacına göre hızlı ve fazla protein sentezi gereken durumlarda birkaç ribozomun bir araya gelerek oluşturdukları yapı ise polizom (poliribozom) olarak adlandırılır.

Günümüzde içlerinde SDS'nin de bulunduğu birçok hastalık ribozom sentezi veya translasyon işlemi ile ilgili defektlerle ilişkilendirilmiştir. Bu grup hastalıklar ribozomopatiler olarak adlandırılmaktadır ve başlıca ilişkili hastalıklar kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri başlığı altında toplanmaktadır.

## **2.2. Ribozomopatiler**

Ribozomopatiler, ribozom yapısal proteinleri veya ribozom biyogenezinde anahtar rol oynayan faktörleri kodlayan genlerdeki defektlerle ilişkili olan kalıtsal veya sporadik görülebilen bir grup heterojen hastalıktır. Genel olarak iki kategori içermektedir: (i) spesifik ribozomal proteinlerde tek kopya mutasyonlarının neden olduğu bozukluklar ve (ii) ribozom biyogenez faktörlerindeki kusurlarla ilişkili hastalıklar (21). Her iki kategorideki ribozomopatiler arasındaki fenotipik modeller birbirinden farklıdır ancak kemik iliği ve iskelet dokusunu ilgilendiren bazı örtüşen özellikleri de bulunmaktadır. Günümüzde ribozomopati olarak bilinen veya ribozomopati şüphesi olan hastalıklar klinik özellikleri ile birlikte Tablo 2.1.'de sunulmuştur (22).

**Tablo 2.1.** İnsan ribozomopati hastalıkları ve ilgili genler (22)

Hastalık	İlişkili Gen(ler)	Ribozom ile ilişkili Fonksiyonu	Klinik Özellikler
<b>Otozomal resesif</b>			
Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS, EFL1</i>	eIF6 salınması	Nötropeni/infeksiyonlar Ekzokrin pankreatik yetmezlik
	<i>DNAJC21</i>	J-protein, HSP70 ko-şaperon, Arx1 salınımı	Metafizyel kondrodizplazi MDS/AML'ye yatkınlık
	<i>SRP54</i>	ER sinyal proteini	
Bowen-Conradi sendromu	<i>EMG1</i>	SPOUT ailesi psödotridin metiltransferaz; 18S rRNA matürasyonu ve 40S alt birim üretiminde gerekli	Büyüme geriliği, psikomotor gecikme, mikrosefali, mikrognati, eklem kontraktürü, <i>rockerbottom</i> ayak
<i>North American Indian</i> Çocukluk Sirozu	<i>CIRHIN</i>	U3 içeren 90S partikülünün altkompleksi t-Utp; rDNA transkripsiyonu ve 18S pre-rRNA üretimi	Siroz
Kartilaj Saç Hipoplazisi	<i>RMRP</i>	RNaz MRP'nin RNA komponenti; rRNA prekürsöründen 18S rRNA'nın endonükleolitik olarak ayrılması	Kısa ekstremiteli cücelik Metafizyel displazi Hipoplastik anemi Defektif B ve T hücre aracılı immünite Hipotrikozis Değişken intestinal aganglionozis

**Tablo 2.1. Devam.** İnsan ribozomopati hastalıkları ve ilgili genler

Hastalık	İlişkili Gen(ler)	Ribozom ile ilişkili Fonksiyonu	Klinik Özellikler
Diskeratozis konjenita	<i>PARN</i>	18S-E pre-rRNA üretimi	Kemik iliği yetmezliği Hipomiyelinizasyon Mukokutanöz defektler Pulmoner fibrozis Gelişme geriliği Serebellar hipoplazi Özofageal, üretral stenozis
Alopesi, nörolojik ve endokrinopati sendromu	<i>RBM28</i>	Nükleolar protein, 60S pre-ribozom komponenti, 27S pre-rRNA üretimi	Saç kaybı, mikrosefali, zihinsel yetersizlik, progresif motor gerilik, adrenal yetmezlik
<b>Otozomal dominant</b>			
Diamond-Blackfan anemisi	<i>RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS20, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29</i>	40S alt birim proteinleri	Makrositik anemi Kraniyofasiyal defektler Başparmak anomalileri Kısa boy Kansere yatkınlık
	<i>RPL5, RPL11, RPL15, RPL19, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35A</i>	60S alt birim proteinleri	
	<i>GATA1</i>	Transkripsiyon faktörü	
	<i>TSR2</i>	eS26 eskortin	
Treacher-Collins sendromu	<i>TCOF1, POLR1C, POLR1D</i>	rDNA transkripsiyonu, DNA hasar cevabında NBS1 takviyesi	Kraniyofasiyal anormallikler Zihinsel yetersizlik



**Tablo 2.1. Devam.** İnsan ribozomopati hastalıkları ve ilgili genler

Hastalık	İlişkili Gen(ler)	Ribozom ile ilişkili Fonksiyonu	Klinik Özellikler
Konjenital aspleni	<i>RPSA</i>	40S alt birim proteini	Dalak yokluğu
Aplasia kutis konjenita	<i>BMS1</i>	90S partikül komponenti, GTPaz	Verteks skalpte cilt agenezisi
Familyal kolorektal kanser tip X	<i>RPS20</i>	40S alt birim proteini	DNA tamir defekti olmayan herediter nonpolipozis kolorektal karsinom
RPS23-ilişkili ribozomopati	<i>RPS23</i>	40S alt birim proteini	Mikrosefali, işitme kaybı, zihinsel yetersizlik, otizm
Lökoensefalopati, intrakraniyal kalsifikasyonlar ve kistler (LCC)	<i>SNORD118</i>	box C/D snoRNA U8	Progresif serebral dejenerasyon
<b>X'e bağlı resesif</b>			
Diskeratozis konjenita	<i>DKC1</i>	H/ACA ribonükleoprotein kompleks subunit 4; rRNA psödoüridin sentaz, telomer devamlılığı	Anormal cilt pigmentasyonu Tırnak distrofisi Oral lökoplaki Kemik iliği yetmezliği Kansere yatkınlık Kısa boy, mikrosefali, immun yetmezlik
Otizm	<i>RPL10</i>	60S alt birim proteini	Mikrosefali, büyüme geriliği, nöbet
Mikrosefali	<i>RPL10</i>	60S alt birim proteini	Otizm
<b>Sporadik /somatik</b>			
Relaps KLL	<i>RPS15, RPSA, RPS20</i>	40S alt birim proteini, MDM2'yi bağlar	İlk basamak tedavi sonrası kötü prognoz KLL

**Tablo 2.1. Devam.** İnsan ribozomopati hastalıkları ve ilgili genler

Hastalık	İlişkili Gen(ler)	Ribozom ile ilişkili Fonksiyonu	Klinik Özellikler
Pediyatrik T-ALL	<i>RPL5, RPL10, RPL22</i>	60S alt birim proteini	T-ALL
5q- sendromu	<i>RPS14</i>	40S alt birim proteini	Makrositik anemi Hipolobüle mikromegakaryosit, MDS
<b>Yeni ribozomopatiler</b>			
Testiküler regresyon sendrom	<i>DHX37 (23)</i> (heterozigot varyantlar)	RNA helikaz (ribozom biyogenezi)	46,XY gonadal disgenezi Testiküler regresyon sendromu

Her ne kadar klinik belirtileri heterojen olsa da, ribozomopatiler, büyüme geriliği, kemik iliği yetmezliği, gelişimsel gerilik, maligniteye yatkınlık ve mitotik iğ anomalileri ve hücre döngüsü durması nedeniyle ekstra-ribozomal sonuçların ortak özelliklerini paylaşır. Ribozomopatilerin fenotipik heterojenliğinin, ribozom ile ilişkili genlerin hücre tipine özgü ribozomal kompozisyon ve spesifik mRNA'ların translasyonel kontrolüne yol açan farklı ekspresyonunun bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür (24).

Ribozomlar tüm vücut hücrelerinde bulunmalarına karşın SDS sendromu gibi ribozomopatilerde özellikle belli dokularda fenotipin açığa çıkması kafa karışıklığına neden olmaktadır. Bu durumun açıklaması olarak birkaç hipotez sunulmaktadır. Bu açıklamalardan ilki ribozomlara erişimdeki kısıtlılık nedeniyle mRNA'ların ribozomlara ulaştırılmasında spesifik bir grup tarafından yönlendirildiği ve bu grubun *upstream open reading frames* (uORFs) veya kompleks 5'UTR'lar sayesinde ayırt edilmekte olduğudur (22). Aslında granülositik hücrelerin farklılaşmasında (C/EBPalfa ve beta) kritik önemi bulunan regülatörlerden uORF-içeren mRNA'ların da translasyonu bozulmaktadır (25). Böylece hem bozulmuş global translasyonun hem de kompleks mRNA'ların azalmış doku-spesifik translasyonun SDS fenotipine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Ribozomopatilerdeki doku spesifitesinde diğerk bir hipotez ise hücre spesifik ribozom homeostazisinin bozulması ile ilgilidir. Ribozom homeostazisi; ribozom sentezi, normal translasyon döngüsü ve translasyonel olarak durmuş veya tıkanmış ribozomların tekrar ribozom havuzuna dönmesi işlemleri ile sağlanır. Normal bir hücrede ribozomlar yapışkan peptid motifleri, stabil mRNA yapıları, okside mRNA'lar, trunke mRNA'lar gibi sorunlu özelliklere sahip mRNA'ların translasyonu sırasında tıkanabilirler. Bu aşamada ribozom geri dönüşünü sağlayan PELOTA, HBS1L ve ABCE1 faktörleri gibi ribozom kurtarıcı faktörler (*ribosome rescue factors*) görev almaktadır (21). Bu faktörlerin ekspresyon seviyesinin spesifik hücre tiplerinin ribozom havuzunda bulunan ribozomlarda kullanım kısıtlılığı olması durumuna duyarlılıklarına göre düzenlendiği düşünülmektedir (22). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada RP mutasyonlarında eritroid seride ribozoma ulaşmada görevli ribozom düzenleyicilerinde normal dışı bir düzenlenmenin olduğu gösterilmiştir (26).

Son olarak p53 ekspresyonunun doku-spesifik stres cevabında önemli olduğu da düşünülmektedir. *Sbds* mutasyonu oluşturulmuş fare modelleri kullanılarak pankreas asiner hücrelerinde p53-aracılı sindirim enzimi sentezinin kaybolduğu ve hücrelerin yaşlanarak atrofiye gittiği gözlenmiştir (27).

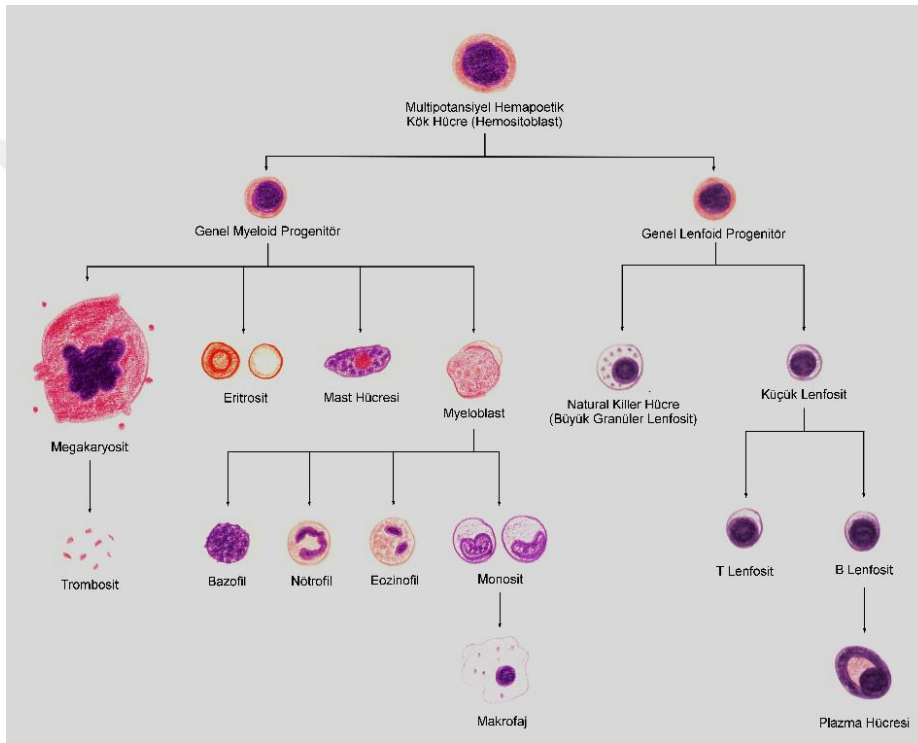
### 2.2.1. Ribozom Disfonksiyonu ve Kemik İliği Yetmezlikleri

Kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri bir veya birkaç kan hücre serisinin üretimindeki yetmezlik nedeniyle meydana gelen ve kansere yatkınlık oluşturan heterojen bir grup hastalıktır. Etiyolojide DNA tamir bozuklukları, telomer biyolojisi, ribozom yapısal proteinlerindeki defektler veya biyosentez kusurları yer almaktadır. Bu grup hastalık içerisinde bulunan Diamond-Blackfan anemisi, Diskeratozis konjenita, Shwachman-Diamond sendromu gibi hastalıklar ribozom sentezindeki defektler nedeniyle meydana gelmektedir.

### 2.3. Hematolojik Hücre Serisi Gelişimi

Hematolojik hücre serisi gelişimi hematopoez olarak adlandırılmaktadır ve hematopoetik kök hücreden matür kan hücrelerinin oluşması süreçlerinin tamamını

ifade etmektedir. Bu süreçler erişkinlerde kemik iliğinde meydana gelmektedir. Hematopoetik sistemin matür hücrelerini lenfositler, granüositler, monositler, megakaryositler ve eritrositler oluşturmaktadır (Şekil 2.2.). Granüositler eozinofiller, nötrofiller ve bazofillerden oluşmaktadır. SDS’de özellikle granüositler hücrelerden nötrofiller ön planda etkilendiği için bu tez kapsamında konjenital nötropeniler ayrı bir başlık olarak ele alınmıştır.



Şekil 2.2. Hematopoez.

### 2.3.1. Konjenital Nötropeniler

Nötropeni kandaki absolut nötrofil sayısının (ANS) azalması olarak tanımlanmaktadır. Normal ANS değerleri yaşa göre değişmektedir ve yenidoğan bir bebek için ilk 24 saatte alt sınır  $6000/\text{mm}^3$ , ilk hafta için  $5000/\text{mm}^3$ , ikinci hafta için  $1500/\text{mm}^3$ , ikinci haftadan 1 yaşa kadar  $1000/\text{mm}^3$  kabul edilmekte iken 1 yaştan sonra alt sınır  $1500/\text{mm}^3$  olarak belirlenmiştir (28).  $1001-1500/\text{mm}^3$  arası hafif,  $501-1000/\text{mm}^3$  arası orta,  $0-500/\text{mm}^3$  arası ise ağır nötropeni olarak sınıflandırılmaktadır (29). Nötropenin aralıklı veya kalıcı olarak 3 aydan uzun sürmesi kronik nötropeni

olarak adlandırılmaktadır. Fakat konjenital nötropeni tanımı içerisinde giren hastalıklar için literatürde tam bir anlaşma bulunmamaktadır. Bazı otörler immunolojik ve ekstra-hematolojik bulgunun olmadığı ciddi nötropenileri konjenital nötropeni olarak tanımlarken bazıları immunolojik veya ekstra-hematolojik bulgu olsun veya olmasın kronik nötropenilerin tamamını bu grup içerisinde değerlendirmektedir. Bu kapsamda SDS bazı otörlerce konjenital nötropeniler içerisinde sayılmaktadır. SDS'nin en sık bulgusunun nötropeni olması nedeniyle ayırıcı tanıda konjenital nötropeniler özel bir yer tutmaktadır. Bu nedenle konjenital nötropeniler ile ilişkilendirilmiş genlerin ayrıntılı listesi Tablo 2.2.'de sunulmuştur (30).

**Tablo 2.2.** Konjenital nötropenilerde ana hematolojik bulgular ve ilişkili organ disfonksiyonları (30)

<b>Sistem</b>	<b>Bulgular</b>	<b>Hastalık</b>	<b>Gen</b>
Kan/kemik iliği maturasyonu	Maturasyon arresti olan	ELANE nötropenisi	<i>ELANE</i>
		Kostmann hastalığı	<i>HAX1</i>
		Wiskott-Aldrich	<i>WAS</i>
		G-CSF reseptör	<i>CSF3R</i>
		CLPB sendromu	<i>CLPB</i>
	Maturasyon arresti olmayan	GSDIB	<i>SLC37A4</i>
		WHIM sendromu	<i>CXCR4</i>
		Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
		Cohen hastalığı	<i>VPS13B</i>
		Hermansky Pudlak tip 2	<i>AP3B1</i>
		TCIRG1	<i>TCIRG1</i>
		Nötropeni G6PC3	<i>G6PC3</i>
		Jagunal 1	<i>JAGN1</i>
	Miyelokateksis	WHIM sendromu	<i>CXCR4</i>
	Miyelofibrozis	VPS45 sendromu	<i>VPS45</i>
	Makrositoz	GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
	Monositopeni	WHIM sendromu	<i>CXCR4</i>
		GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
		STK4 (MTS1)	<i>STK4 (MST1)</i>
		Wiskott-Aldrich sendromu	<i>WAS</i>
Trombositopeni	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>	
	GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>	

**Tablo 2.2. Devam.** Konjenital nötropenilerde ana hematolojik bulgular ve ilişkili organ disfonksiyonları

<b>Sistem</b>	<b>Bulgular</b>	<b>Hastalık</b>	<b>Gen</b>
Pankreas	Eksternal pankreas yetmezliği	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
		Wolcott-Rallison	<i>EIF2AK3</i>
		Nötropeni G6PC3	<i>G6PC3</i>
		Jagunal 1 nötropeni	<i>JAGNI</i>
Sindirim sistemi	Crohn hastalığı kronik diyare	Glikojen depo tip 1	<i>SLC37A4</i>
		G6PC3 nötropeni	<i>G6PC3</i>
		SMARCD2	<i>SMARCD2</i>
Göz	Konjenital katarakt	CLPB sendromu	<i>CLPB</i>
		Charcot-Marie-Tooth	<i>DNM2</i>
	Retinokoroidal distrofi	Cohen hastalığı	<i>VPS13B</i>
Kalp	Kalp: aritmi	G6PC3 nötropeni	<i>G6PC3</i>
	Dilate kardiyomiyopati	Barth' hastalığı	<i>TAZ</i>
	Kardiyomiyopati	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
	Çeşitli kardiyak anomaliler	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
		WHIM sendromu (Fallot tetralojisi)	<i>CXCR4</i>
		Nötropeni G6PC3	<i>G6PC3</i>
		STK4 (MST1) eksikliği	<i>STK4</i>
Cilt	Cilt kserozis egzema	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
	Belirgin süperfisiyal venler	G6PC3 nötropeni	<i>G6PC3</i>
	Poikiloderma	SCN, poikiloderma tip Clericuzio	<i>USB1</i>
	Parsiyel veya komplet albinizm	Hermansky Pudlak tip 2	<i>AP3B1</i>
		AP14 defekti	<i>LAMTOR</i>
		Chediak Higashi hastalığı	<i>LYST</i>
		Griscelli hastalığı	<i>RAB27A</i>
	İnce, spars ve açık renkli saçlar	Kartilaj-saç hipoplazya	<i>RMRP</i>
	Lenfödem	GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
Cilt anjiomatozis	TCIRG1	<i>TCIRG1</i>	
Kemik	Metafizyel displazi	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
		Kartilaj-saç hipoplazya	<i>RMRP</i>
	Fasiyal dismorfizm	Cohen hastalığı	<i>VPS13B</i>
Santral sinir sistemi	Zihinsel yetersizlik	Kostmann hastalığı	<i>HAX1</i>
	Epilepsi	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
		Cohen hastalığı	<i>VPS13B</i>
		CLPB sendromu	<i>CLPB</i>
		VPS45 sendromu	<i>VPS45</i>

**Tablo 2.2. Devam.** Konjenital nötropenilerde ana hematolojik bulgular ve ilişkili organ disfonksiyonları

<b>Sistem</b>	<b>Bulgular</b>	<b>Hastalık</b>	<b>Gen</b>
Kas	Kas güçsüzlüğü	G6PC3 nötropeni	<i>G6PC3</i>
		Aksonal Charcot-Marie-Tooth hastalığı	<i>DNM2</i>
		Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
Metabolik yolak	Tip I diyabet	Wolcott-Rallison	<i>EIF2AK3</i>
	Açlık intoleransı ve glikogenezis	Glikojen depo hastalığı tip 1b	<i>SLC37A4</i>
	3-metil glukagonik asit	Barth sendromu	<i>TAZ</i>
		CLPB sendromu	<i>CLPB</i>
İç kulak	İç kulak defekti	GF11/ciddi kronik nötropeni	<i>GF11</i>
		GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
Ürogenital yol	Üropati	G6PC3 nötropeni	<i>G6PC3</i>
		GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
	Kriptorşidizm	Cohen hastalığı	<i>VPS13B</i>
		G6PC3 nötropeni	<i>G6PC3</i>
Nefromegali	VPS45 sendromu	<i>VPS45</i>	
Dismorfi	Yarı damak	Shwachman-Diamond sendromu	<i>SBDS</i>
	Hiperlaksite	Cohen hastalığı	<i>VPS13B</i>
Non-bakteriyel enfeksiyonlar	HPV	WHIM sendromu	<i>CXCR4</i>
		GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
		STK4 eksikliği	<i>STK4 (MST1)</i>
	Mikobakteriyel	GATA2 sendromu	<i>GATA2</i>
		WHIM sendromu	<i>CXCR4</i>

HPV: human papilloma virus, SCN: şiddetli konjenital nötropeni

#### 2.4. Shwachman-Diamond Sendromunun Klinik Bulguları

Birden fazla organı etkileyerek kompleks bir spektruma yol açan SDS, 1964 ‘te Shwachman ve arkadaşları tarafından tanımlanmasına karşın, ilk olarak Nezelof ve Watchi tarafından ekzokrin pankreas yetmezliği ve lökopenisi olan iki çocukta ‘‘pankreasın konjenital lipomatozisi’’ şeklinde 1961’de tanımlanmıştır (1, 2). Kemik iliği ve pankreas disfonksiyonu SDS’nin klasik klinik bulguları olarak kabul edilmektedir. Fakat bu klasik bulgular tüm hastalarda görülmemektedir ve bu nedenle sitopeni veya pankreatik disfonksiyon olmaması SDS’yi dışlamak için yeterli değildir.

Otozomal resesif bir kalıtım kalıbı gösterir. Hastalığa yol açan gen 2003 yılında Boocock ve ark. tarafından bulunmuştur (3). 1964'te sendromu tanımlayanlara (Amerikan doktor Harry Shwachman, İngiliz oftalmolog Martin Bodian ve Amerikan pediatriist Louis Diamond) ithafen ilgili gen adı **Shwachman\_Bodian\_Diamond** isimlerinin baş harflerinden esinle **SBDS** olarak konulmuştur (3). **SBDS** geninde homozigot ve bileşik heterozigot mutasyonlar hastaların büyük bir kısmını açıklarken klinik heterojenite belirgindir. Bu durum tanıda karmaşa yaşanmasına neden olmakta moleküler tanı ayırıcı tanının bir gerekliliği haline gelmektedir. Kuzey Amerika SDS kohortunda biallelik **SBDS** mutasyonu olan hastaların sadece %51'inde (19/37) klasik bulgular olan nötropeni ve steatore saptanmıştır (31). SDS tanısı için oluşturulan kılavuz Tablo 2.3.'te sunulmuştur (32, 33). İlgili sistem bulguları Şekil 2.3.'te özetlenmiştir.



**Tablo 2.3.** Shwachman-Diamond sendromu klinik ve moleküler tanısal bulguları

<b>SDS klinik ve moleküler tanısal bulguları</b>
<p><b>Tanısal Kriter:</b></p> <p><i>SBDS</i> geninde biallelik patojenik mutasyon veya SDS ilişkili diğer genlerde (<i>DNAJC21</i>, <i>EFLI</i>, <i>SRP54</i>-otozomal dominant) saptanan olası patojenik mutasyonlar</p>
<p><b>Klinik Tanı:</b></p> <p>Hematolojik Bulgular (en az iki kez)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nötropeni (absolut nötrofil sayısı &lt;1500)</li> <li>• Anemi veya makrositoz (diğer nedenlerle açıklanamayan-demir/B12 eksikliği gibi)</li> <li>• Trombositopeni (trombosit sayısı &lt;150,000- en az iki kez)</li> <li>• Kemik iliği bulguları <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hiposellülerite (yaşa göre)</li> <li>- Miyelodisplazi</li> <li>- Lösemi</li> <li>- Sitogenetik anormallikler</li> </ul> </li> </ul> <p>Pankreatik Bulgular</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pankreatik enzimlerin düşük seviyede olması (yaşa göre değerlendirme) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tripsinojen &lt;3 yaş</li> <li>- İzamilaz &gt;3 yaş</li> </ul> </li> <li>• Fekal elastazda düşük seviye</li> <li>• Destekleyen bulgular <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lipomatozis ile anormal pankreatik görüntüleme bulguları</li> <li>- &gt;72 saatte fekal yağ ekskresyonunda artış</li> </ul> </li> </ul> <p>Ek Destekleyici Bulgular</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Torasik distrofi dahil iskelet anormallikleri</li> <li>• Nörokognitif/davranış problemleri</li> <li>• Açıklanamayan boy kısalığı (&lt;3 persentil)</li> <li>• Birinci derece aile üyesinde SDS olması</li> </ul>



Şekil 2.3. SDS klinik bulguları özet gösterimi.

#### 2.4.1. Hematolojik Bulgular

SDS tipik olarak nötropeni ile bulgu vermesine karşın diğer sitopeniler de sıklıkla görülmektedir. Nötropeni, absolut nötrofil sayısının  $1500/\mu\text{L}$ 'den az olması olarak tanımlanmaktadır. Nötropeni tipik olarak yaşamın ilk yılında görülmesine rağmen erişkin yaşta da saptanabilmektedir veya bazı vakalarda görülmemektedir (31). Nötropenin şiddeti öngörülemez ve intermitant veya persistant olabilmektedir. Anemi ve retikülositopeni hastaların %80'inde saptanmaktadır ve genellikle normokromik normositer bir anemi görülse de bazı vakalarda makrositoz da bildirilmiştir (34). Trombositopeni ise değişken olarak bildirilmiştir.

Üç seride de sitopeni sonucu şiddetli aplastik anemiye gidiş SDS hastalarında yaşamboyu olan bir risktir. Fransa Şiddetli Kronik Nötropeni Kayıtları'na göre 102 SDS hastasının 41'inde (%40) geçici şiddetli sitopenilerin geliştiği ve bunların

yarısında hemoglobinin 7 g/dL'den veya trombositlerin 20000/mm<sup>3</sup> 'den daha düşük olduğu ilerleyici ciddi sitopenilere dönüştüğü bildirilmiştir (35).

MDS veya AML gibi malign transformasyonlar ise farklı çalışmalarda farklı oranlarda bildirilmiştir. Kanada Kalıtsal Kemik İliği Yetmezlikleri Kayıtları'na göre 18 yaş itibari ile hematolojik hastalık progresyon riski %20 (n=40) olarak bildirilmiştir (36). 102 SDS hastasının bulunduğu Fransız kohortunda MDS/AML için kümülatif insidans 20 yaşında %18,8, 30 yaşında ise %36,1 olarak bildirilmiştir (35). Şiddetli Konjenital Nötropeni Uluslararası Kayıtları'na göre ise 10 yaş üzerinde MDS/AML insidansı %8,1 (n=37) olarak saptanmıştır ve SDS hastalarında MDS/AML yıllık insidansı %1 olarak belirlenmiştir (37). Yapılan çalışmalara göre malign transformasyon riskinin yaş ile arttığı görülmektedir.

Solid tümör geliştirme riski tam olarak bilinmemesine karşın 18-38 yaş aralığındaki SDS hastalarında bilateral meme kanseri, santral sinir sistemi büyük B-hücreli lenfoma, pankreatik adenokarsinoma ve yavaş progresif dermatofibrosarkoma bildirilmiştir (38, 39).

MDS veya AML yokluğunda dahi sitogenetik anormallikler SDS'de sıklıkla saptanmaktadır. Kemik iliği örneklerinde sık saptanan sitogenetik anormallikler; del(20)(q11) ve izokromozom 7q (i[7][q10])'dur (32). Bu somatik değişiklikler geçici veya kalıcı olabilirler ve malign transformasyon işareti olmayabilirler (40-42). Ayrıca kromozom 7 dengesiz yapısal anomalileri, del(20)(q) içeren kompleks yeniden düzenlenmeler ve t(3;6) dengesiz translokasyonu gibi anormallikler de bildirilmiştir (43).

SDS hastalarının immun fonksiyonları tam net değildir. Nötropeniye bağlı olarak enfeksiyonlar görülebilir. Bazı hastalarda ise humoral ve sellüler defektler bildirilmiştir.

#### **2.4.2. Gastrointestinal Bulgular**

Pankreatik ekzokrin yetersizlik SDS hastalarında ana bulgulardan biridir. Pankreatik disfonksiyon tipik olarak yaşamın ilk 6 ile 12 ayında görülmekle birlikte hastalık bulguları geniş bir spektrum göstermektedir. Bazı hastalarda büyüme

geriliğine neden olacak şekilde ciddi pankreatik disfonksiyon görülürken bazı hastalar asemptomatik olabilmektedir (31, 44). Birçok hastanın ekzokrin pankreatik disfonksiyonu zamanla spontan olarak iyileşmektedir ve enzim eksikliği bulunmasına rağmen enzim replasman tedavisine olan ihtiyaç azalmaktadır (45).

Diğer gastrointestinal bulgular ise karaciğeri ilgilendiren anormalliklerdir. Hayatın erken dönemlerinde nedeni bilinmeyen transaminaz yüksekliği ve hepatomegali görülebilmektedir ve spontan olarak düzelmektedir (46).

### **2.4.3. İskelet Bulguları**

Klasik iskelet bulguları; kısa boy, progresif metafizyel displazi/uzun kemiklerde ve kostokondral bileşkelerde kalınlaşma, pektus, torasik distrofi, geniş kostalar gibi torasik anormallikler, normal şekilli epifiz gelişiminde gecikme ve kafatası kemiklerinde *wormian* görünümüdür (47). Bu bulgular zamanla ortaya çıkabilmektedir. SDS ayrıca yavaş döngülü osteoporozla da ilişkilendirilmiştir (48). Düşük z skoru ve vertebra kompresyon fraktürleri saptanabilmektedir.

### **2.4.4. Nörolojik Bulgular**

Kognitif etkilenme değişken derecelerde görülebilmektedir. SDS'li çocuklarda genel zihinsel akıl yürütme, üst düzey dil becerileri, algısal akıl yürütme, görsel-motor işlem hızı, görsel-motor bütünleşmesi, görsel yönetici problem çözme, dikkat ve akademik başarı gibi zihinsel becerilerin genel popülasyona göre daha zayıf olduğu gösterilmiştir (49). Sosyal problemler de dahil olmak üzere davranış problemleri SDS'li hastalarda tespit edilmiştir. Ayrıca bir çalışmada kognitif etkilenmesi olan SDS'li dokuz bireyin beyin MRG'sinde gri ve beyaz cevherde yaygın değişiklikler olduğu bildirilmiştir (50).

Nadir olarak SDS infant döneminde asfiksi, dar toraks ve şiddetli hipotoni ile nöromuskuler hastalık benzeri bulgular verebilmektedir (51).

### **2.4.5. Diğer Bulgular**

Endokrin ve kardiyak sistemi ilgilendiren bulgular SDS hastalarında görülebilmektedir. Neonatal dönemde hipoglisemi, mikropenis ve konjenital

hipopituitarizm, ayrıca tip I diyabet ve büyüme hormonu eksikliği gibi endokrin bulgular görülebilmektedir (52, 53).

Klinik müdahale gerektirebilen konjenital kalp defektleri veya kardiyomiyopati gibi kardiyak bulguların sıklığı bir çalışmada %11 (12/102, Fransa Şiddetli Kronik Nötropeni Kayıtları) olarak bildirilmiştir (54).

SDS hastarında ayrıca bebeklik döneminde topikal tedavilere yanıt vermeyen ekzamatöz benzeri cilt döküntüleri görülebilmektedir. Daha az sıklıkta iktiyozis gibi diğer cilt bulguları da saptanabilmektedir (55).

## 2.5. Ayırıcı Tanı

SDS, geçici nötropeni ve büyüme geriliği gibi çocuklarda sık görülen bulgular nedeniyle birçok durum ile ayırım gerektirmektedir ve ayırıcı tanıda öncelikle nötropeni nedeniyle Kostmann konjenital nötropeni ve *ELANE*-ilişkili nötropeni, pankreatik disfonksiyon nedeniyle kistik fibrozis, kemik iliği disfonksiyonunun eşlik ettiği mitokondriyal bir hastalık olan Pearson sendromu (bu sendromda kemik iliği disfonksiyonu da görülmektedir) yer almaktadır. Bu klinik tablolardan ayırım ayrıntılı fizik muayene, laboratuvar testleri ve moleküler genetik testlerle sağlanabilir. Ayırıcı tanıda bulunan hastalıklar ve özellikler Tablo 2.4.'te özetlenmiştir.

**Tablo 2.4.** SDS ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar (Tablo GeneReviews'dan uyarlanmıştır.)

Hastalık	Gen	Kalıtım	SDS ile örtüşen bulgular	Ayırıcı özellikler
<b>Kostmann konjenital nötropeni</b>	<i>HAXI</i>	OR	Nötropeni	Kostmann nötropenisinde: - Ciddi nötropeni ve hematolojik testlerde erken miyeloid arrest/ atipik nükleus ve sitoplazmik vakuolizasyon görülmektedir.
<b>ELANE-ilişkili nötropeni</b>	<i>ELANE</i>	OD	Nötropeni	<i>ELANE</i> -ilişkili nötropenide: - Ciddi nötropeni/ <i>ELANE</i> geninde mutasyon - İzole nötropeni
<b>Medikasyon veya enfeksiyonlar</b>	-	-	Nötropeni	Geçici nötropeni görülür.
<b>Diamond-Blackfan anemisi (DBA)</b>	<i>18 farklı gen</i>	OD ve XL	Kemik iliği yetmezliği	DBA'da: - Progresif makrositik anemi/ retikülositopeni - Normal sellüler kemik iliği/ eritroid prekürsörlerde belirgin azalma veya yokluk - Primer ekzokrin pankreatik disfonksiyon yoktur.
<b>Fankoni anemisi (FA)</b>	<i>21 farklı gen</i>	OR, OD, XL	Kemik iliği yetmezliği	FA'da: - Progresif pansitopeni/ pozitif kromozom kırık çalışması - Kemik iliğinde değişken sellülerite/ azalmış prekürsörler - Primer ekzokrin pankreatik disfonksiyon yoktur.
<b>Diskeratosis konjenita (DC)</b>	<i>11 farklı gen</i>	XL, OD, OR	Kemik iliği yetmezliği	DC'de: - Anormal kısalmış telomer uzunluğu - Kemik iliğinde değişken sellülerite/ azalmış prekürsörler - Primer ekzokrin pankreatik disfonksiyon yoktur.

**Tablo 2.4. Devam.** SDS ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar

Hastalık	Gen	Kalıtım	SDS ile örtüşen bulgular	Ayırıcı özellikler
<b>Kistik fibrozis (CF)</b>	<i>CFTR</i>	OR	Üst solunum yolu enfeksiyonları ve ekzokrin pankreatik disfonksiyon	CF'de: - Ter testinde artmış klor - Primer kemik iliği yetmezliği yoktur.
<b>Pearson ilik-pankreas sendromu (PMPS)</b>	mtDNA gen del/dup	mt	Ekzokrin pankreatik disfonksiyon ve kemik iliği disfonksiyonu	PMPS'de: - Kemik iliğinde normal sellülerite/miyeloid prekürsörlerde farklı sitoplazmik vakuolizasyon - mtDNA <i>contiguous</i> -gen delesyonları/duplikasyonları
<b>Johanson-Blizzard sendromu (JBS)</b>	<i>UBR1</i>	OR	Ekzokrin pankreatik disfonksiyon	JBS'de: - Anomaliler ve ciddi gelişme geriliği - Hematolojik anormallik yoktur.
<b>SPINK1-ilişkili izole ekzokrin pankreatik yetmezlik</b>	<i>SPINK1</i>	OR	Ekzokrin pankreatik disfonksiyon	Kemik iliği yetmezliği veya nötropeni yoktur.
<b>Ciddi malnütrisyon</b>	-	-	Büyüme geriliği	Ciddi malnütrisyonunda: - Klinik görünüm kalori/protein alımında yetersizlikle uyumlu - Sendromik bulgu yoktur. - Ekzokrin pankreatik disfonksiyon yoktur.
<b>Kartilaj-saç hipoplazisi (CHH)</b>	<i>RMRP</i>	OR	İskelet displazisi	CHH'de: - Doğumda kısalık/ uzun kemik büyümesinde anormallik. Artmış skolyoz insidansı, anormal pubertal büyüme ve iskeletin büyümesinde global sorun (aksiyel ve apendiküler) - Gastrointestinal bulgular enfeksiyon komplikasyonlarına sekonderdir.

OR: otozomal resesif, OD: otozomal dominant, XL: X'e bağlı, mt: mitokondriyal

## 2.6. Tedavi

SDS tedavisinde hastalığın tamamını ortadan kaldırmaya yönelik günümüzde küratif bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hematolojik bulgulara yönelik küratif tedavi yöntemi olarak sadece hematopoetik kök hücre transplantasyonu bulunmaktadır fakat mortalite ve morbidite oranları yüksek bir tedavi seçeneğidir. Bu nedenle tutulum saptanan sistemlere yönelik destek veya replasman tedavileri uygulanmaktadır.

**Kemik iliği yetmezliği tedavisi:** Nötropeni kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde enfeksiyon ajanına yönelik uygun antibiyotikler kullanılmaktadır. Ciddi tekrarlayan enfeksiyon ve ciddi nötropeni varlığında granülosit koloni stimülan faktör (G-CSF) kullanılmaktadır. K vitamini eksikliğinden kaynaklanan kanama bozuklukları tedavisinde K vitamin replasmanı yapılmaktadır. Ayrıca anemi veya trombositopeni durumlarında gerektiğinde eritrosit süspansiyonu veya trombosit transfüzyonu yapılmaktadır.

- **Hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HSCT):** Ciddi sitopeni, miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemi HSCT gerektirmektedir. HSCT sonrası hastalık olmaksızın 5 yıllık survi %60±15 olarak bildirilmiştir (56). Ayrıca akrabadan olan eşleşen donör ile yapılan HSCT ile akraba olmayan eşleşen donörlerden yapılanlara göre daha yüksek survi oranları bildirilmiştir (32).

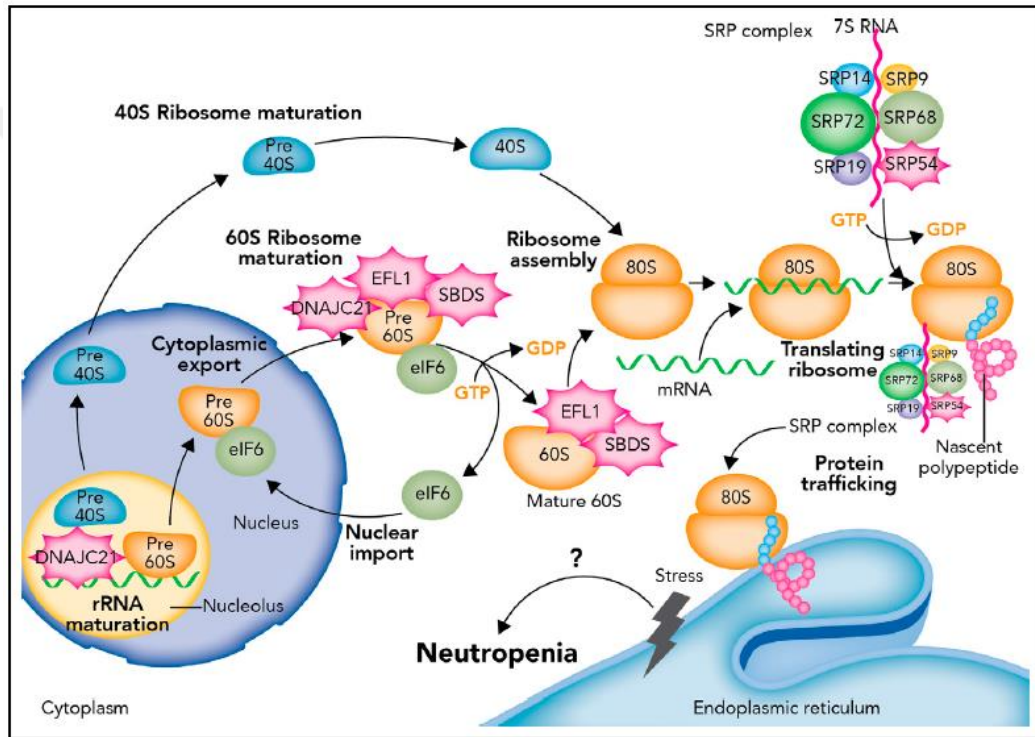
**Pankreatik enzim replasmanı:** Pankreas yetersizliği tüm öğünlerde olmak üzere pankreatik enzim replasmanı (lipaz (2000-10000 ünite/kg/gün), proteaz, amilaz) ile tedavi edilmektedir. Eğer enzim takviyesi yağ emilimini arttırmazsa ilave H2-reseptör antagonisti tedaviye eklenmektedir (32). Ayrıca yağda emilen vitaminlerin replasmanının yapılması önemlidir.

SDS'nin etkili bir tedavi yönteminin bulunmamasından dolayı hastalarda yaşam beklentisi azalmıştır (yaklaşık 35 yıl). Morbidite ve mortalitenin ana nedeni hematolojik sorunlardır. Bu nedenle hematolojik patogeneze yönelik çalışmaların yapılması yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi açısından kritiktir.



## 2.7. SDS'nin Moleküler Temeli

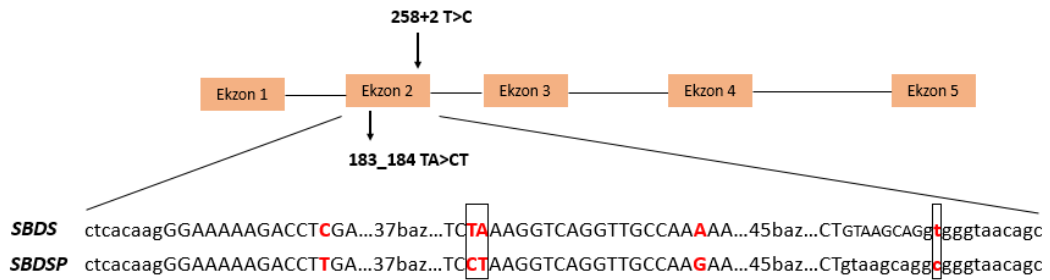
SDS etiyojisinden büyük oranda *SBDS* geni biallelik mutasyonları sorumludur. SDS klinik tanılı hastaların %10-25 kadarında ise *SBDS* geninde mutasyon saptanmamaktadır. Bu grup hastalarda son yıllarda *DNAJC21*, *EFL1*, *SRP54* genlerinde mutasyonlar bildirilmiştir (57-62). Bu durum SDS'nin heterojen genetik yapısını göstermektedir (Şekil 2.4.).



**Şekil 2.4. Nötropeniye yol açan proteostazis yolağı.** Orta-şiddetli nötropenisi olan bireylerde temel moleküler mekanizma protein katlanması ve transportu ile ilişkilidir. SDS'de en sık saptanan genetik temel *SBDS* biallelik mutasyonlarıdır. *SBDS*, *EIF1* ile birlikte *eIF6*'nın uzaklaştırılmasında görevlidir. *DNAJC21*, 60S ribozomu stabilize eder. *SRP* kompleksinin bir parçası olan *SRP54* ise yeni oluşan polipeptidlere translasyonun tamamlanması veya posttranslasyonel modifikasyonların yapılabilmesi için ER'ye kadar eşlik eder. Bu karmaşık ve sürekli süreçte meydana gelen aksaklıklar hücrede katlanmamış protein cevabına ve ER stresine neden olur. (Oyarbide ve Corey, 2018 çalışmasından alınmıştır (63).)

### 2.7.1. SBDS Geni

*SBDS* geni 7q11'de lokalize, 7.9 kb uzunluğunda bir bölgede 5 ekzondan oluşan, 1.6 kb'lık mRNA ve 250 aminoasitlik protein kodlayan bir genidir (3, 64). *SBDS* gen mutasyonları çoğunlukla (yaklaşık olarak %75'i) 5,8 Mb uzaklıkta distal paralog duplikonda bulunan psödogeniyle (*SBDSP1*) olan gen konversiyonu nedeniyle meydana gelmektedir. Psödogen transkripti %97 oranında *SBDS* geniyle özdeşdir. Konversiyon nedeniyle oluşan ve bileşik heterozigot olarak karşımıza çıkan en sık iki mutasyon: ekzon 2'deki c.183\_184TA>CT ve c.258+2T>C mutasyonlarıdır (Şekil 2.5.). c.183\_184TA>CT değişikliği in-frame stop kodona (Lys62Ter) neden olurken c.258+2T>C değişikliği ise donor splice bölgeyi bozmaktadır. Konversiyon mutasyonlarının yanı sıra kodlayan bölgelerde farklı mutasyonlar (*frameshift*, *nonsense*, *missense*) da bildirilmiştir (3). Ayrıca *SBDS* mutasyonlarının yaklaşık %10 kadarının *de novo* oluştuğu bildirilmektedir (65).



**Şekil 2.5.** *SBDS* geninin şematik gösterimi ve psödogen konversiyonu nedeniyle en sık saptanan mutasyonları (183\_184TA>CT, 258+2T>C). İki gen arasındaki nükleotid farklılıkları kırmızı renk ile gösterilmiştir ve mutasyona neden olan farklılıklar kutu içerisinde gösterilmiştir.

c.183\_184TA>CT mutasyonunun homozigot olarak hiç saptanmaması protein fonksiyonunu tamamen ortadan kaldıran mutasyonların yaşam ile bağdaşmadığını düşündürmektedir (3). Bu nedenle SDS'de en azından hipomorfik allel nedeniyle az miktarda *SBDS* proteini üretildiği düşünülmektedir.

**SBDS Protein Yapısı:** İnsan SBDS proteini üç domainden oluşmaktadır (19, 66). FYSH (fungal, Yhr087wp, Shwachman) olarak da bilinen ve S2-S96 rezidülerinde bulunan yüksek oranda korunmuş olan **N-terminal domain I**  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -tabakalarının bir karışımı olan  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$  dizisini içerir ve SDS ilişkili mutasyonlar için *hotspot* bölge kabul edilir. **Santral domain II** D97-A170 rezidülerinde bulunur ve üç  $\alpha$ -heliks içerir. **C-terminal domain III** H171-E250 rezidüleri boyuncadır ve bir nükleik asit bağlama motifi (*RNA recognition motif*) olduğu düşünülen  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  dizisinde bir ferrodoksin katlantı içerir. SBDS proteini hem sitoplazmada hem de nükleusta (yüksek konsantrasyonda nükleolusta) bulunmasına karşın nükleustaki fonksiyonu bilinmemektedir (67).

**SBDS Protein Fonksiyonu:** SBDS proteini GTPaz EFL1 ile birlikte pre-60S ribozomal subunitten anti-birleşme faktörü olan eIF6'nın birleşme ara yüzünden uzaklaştırılmasında görev almaktadır (19, 20). eIF6'nın uzaklaştırılmasıyla 60S ribozomal alt subunit 40S alt subunit ile birleşerek 80S ribozomu oluşturmaktadır. Afinite yakalama ve kütle spektrometrisi, SBDS'nin ribozom biyogenezi dışında görev alan proteinlerle olan etkileşimini göstermesi SBDS'nin çoklu fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmüştür (68). SBDS eksikliğinin, rRNA üretimi, *upstream open reading frame* (uORF)-bağımlı protein izoformlarının translasyonu, aktin remodeling ve aktin aracılı sinyal iletimi, mikrotübül stabilitesi, p53-aracılı apoptozis ve yaşlanma, Fas-aracılı apoptozis, reaktif oksijen türlerinin üretimi, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal solunum ve mTOR ve STAT3 hiperaktivasyonunu içeren birçok biyolojik süreçleri etkilediği gösterilmiştir (69). Bu süreçlerin doğrudan SBDS veya azalmış ribozom biyogenezi sonuçları olup olmadığı açık değildir.

### 2.7.2. DNAJC21 Geni

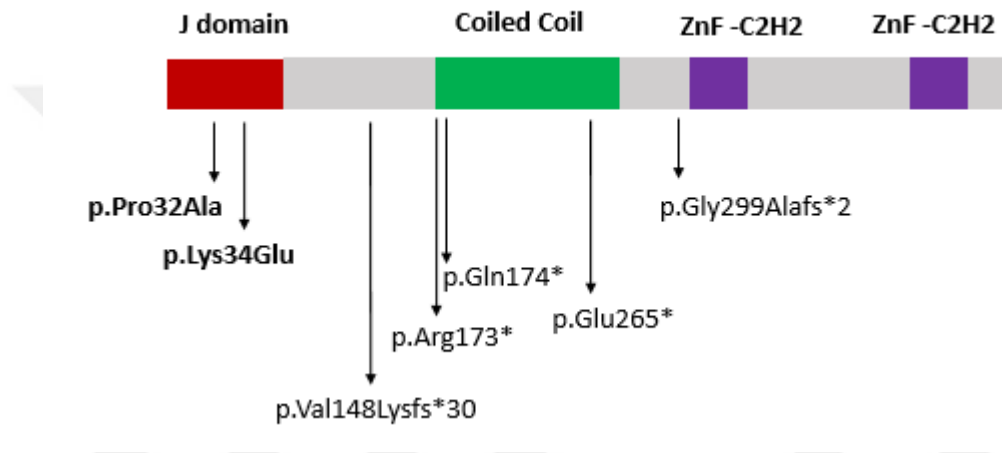
SBDS geninde mutasyon saptanmayan SDS fenotipi gösteren toplam sekiz bireyde DNAJC21 geninde biallelik mutasyonlar iki farklı çalışmada bildirilmiştir (57, 58). Tummala ve ark. yapmış olduğu ilk çalışmada kemik iliği yetmezliği, intra-uterin büyüme geriliği ve/veya boy kısalığı, dental anomaliler, hiperkeratozis, cilt pigmentasyonu, retinal distrofi gibi bulguları olan toplam 4 hastada DNAJC21'de homozigot mutasyonlar saptanmış olup bu bireylerden birinde akut megakaryositik lösemi (AML-M7) geliştiği bildirilmiştir (57). Saptanan mutasyonlar; iki tane

*nonsense* varyant (c.517C>T, p.Arg173Ter; c.793G>T, p.Glu265Ter), bir tane *splice* varyant (c.983+1G>T) ve bir tane *missense* varyant (c.94C>G, p.Pro32Ala) şeklindedir. Dhanraj ve ark. yapmış olduğu ikinci çalışmada SDS fenotipi gösteren üç farklı aileden dört bireyde *DNAJC21* geninde homozigot mutasyonlar saptanmıştır ve saptanan mutasyonlar iki tane *nonsense* varyant (c.520C>T, p.Gln174Ter; p.Val148Lysfs\*30) ve bir tane *missense* varyant (c.100A>G, p.Lys34Glu) olarak bildirilmiştir (58). Hastaların fenotipinde kemik iliği yetmezliği, ekzokrin pankreatik disfonksiyon ve metafizyel displazi bulguları mevcut olmakla birlikte sendromun daha ciddi seyrettiği ve kardeş olan iki hastanın sepsis ve şiddetli pansitopeni nedeniyle kaybedildiği görülmüştür. İlginç olarak bu hastalardan iki tanesinde de retinal distrofi bildirilmiştir.

*DNAJC21* (*E. coli* DnaJ'dan adını almıştır), ATPaz aktivitelerini uyarmak için ısı şok protein 70 (Hsp70) şaperonlar ile etkileşime giren J proteinleri ailesine ait bir proteindir (22). J proteinleri yüksek oranda korunmuş yaklaşık 70 aminosit içeren ve 4 heliksten oluşan J domaini içerirler. J domainde heliks II ve III arasında *hairpin* yapan ve etkileşime girdiği şaperonun Hsp70 ATPaz aktivitesini stimüle eden kritik bölgesinde korunmuş 3 peptid (His, Pro, Asp) bulunmaktadır (70). Bu bölge HPD motif olarak isimlendirilmektedir. *DNAJC21* ise yüksek oranda korunmuş N-terminal J domain ve iki çinko parmak domaini içerir.

Fonksiyonel açıdan; *DNAJC21*'in nükleer rRNA biyogenezi ve ribozom 60S subunit maturasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (57). *DNAJC21*'in maya homologu *Jjj1*, sitoplazmik çinko-parmak proteini *Rei1* ile Hsp70 şaperon protein olan *Ssa*'nın ATPaz aktivitesini stimüle etmektedir (71-74). Böylelikle ribozom nükleer eksport faktörü olan *Arx1* (*human proliferation-associated protein 2G4-PA2G4*)'in serbestleştirilmesi ve resiklusu sağlanmaktadır. İnsan *DNAJC21* proteininin de *PA2G4* (ErbB3-bağlayıcı protein, EBP1 ve IRES-spesifik sellüler transacting faktör 45, ITAF45 olarak da bilinmektedir)'ün serbestleştirilmesinde ve resiklusunda görevi korunmuştur. Ayrıca maya *Tif6* (insanda eIF6)'nın etkili olarak uzaklaştırılabilmesi için öncelikle *Arx1*'in *Jjj1-Rei1-Ssa* tarafından serbestleştirilmesi gerekmektedir (8). Bu durum 60S ribozomal subunitin geç sitoplazmik maturasyonunda *Jjj1* (*DNAJC21*) ve *Sdo1-Efl1* (*SBDS-EFL1*) yollarını bir araya getirmektedir.

*DNAJC21* mutasyonları (Şekil 2.6.) incelenecek olursa *nonsense* ve *frameshift* mutasyonların *DNAJC21* protein ekspresyonunda ciddi azalma veya kayba yol açacağı ön görülmektedir. Saptanan *missense* mutasyonların ise yukarıda bahsedilen kritik J domain HPD motifinde katlanma bozukluğuna yol açtığı düşünülmektedir. İlginç olarak ise *SBDS null* mutasyonları hayatla bağdaşmazken *DNAJC21 nonsense* homozigot mutasyonları yaşam ile bağdaşır görünmektedir (22).



**Şekil 2.6.** *DNAJC21* geninde saptanmış olan mutasyonların şematik gösterimi. J domaini bu grup proteini tanımlayan DNAJ domaini, ZnF -C2H2 domaini C2H2 yapıdaki çinko-parmak domainleri göstermektedir. *Missense* mutasyonların J domaininde bulunduğu dikkat ediniz.

### 2.7.3. *EFL1* Geni

*EFL1* mutasyonlarının, klinik olarak SDS benzeri bir fenotip oluşturacağı *EFL1* ve *SBDS*'nin, 60S ribozomal alt ünite olgunlaşmasında son sitoplazmik aşamada eIF6 salımını katalize etmek için işlevsel olarak işbirliği yapması nedeniyle tahmin edilebilmektedir (Şekil 2.4.).

Stepensky ve ark., SDS fenotipi gösteren üç farklı aileden toplam altı bireyde *EFL1* geninde; iki bireyde p.Met882Lys varyantı ve dört bireyde p.Arg1095Gln varyantı olmak üzere homozigot mutasyonlar bildirmişlerdir (59). Hastaların bulguları

klasik SDS ile çok uyumlu bir şekilde pansitopeni, ekzokrin pankreas yetmezliği ve iskelet bulguları olmuştur. Daha sonra Tan ve ark., spondilometafizyel displazi, trombositopeni öyküsü, büyüme geriliği, karaciğerde fibrozis, skolyoz ve öğrenme güçlüğü olan bir hastada *EFL1* geninde homozigot Thr127Ala varyantını bildirmiştir (60). İlk çalışmadaki hastalarda hastalık şiddeti ve mortalite yüksek olarak bildirilmiştir (59). Altı hastadan üçü büyük olasılıkla tedavi edilmemiş pankreatik yetmezlik nedeniyle çocukluk çağında kaybedilmiştir. İkinci çalışmada fenotip iskelet bulgularının ön planda olduğu hafif trombositopeni dışında kemik iliği yetmezliği bulgusunun belirgin olmadığı ve pankreatik disfonksiyonun ise aşikar olmadığı şeklindedir (60). Bu durumda hastalar arasındaki fenotipik farklılığın mutasyonun proteinde bulunduğu yere bağlı olarak ortaya çıktığı savunulmuştur. Stepensky ve ark. çalışmasında saptanan mutasyonlar proteinin C terminalinde (60S subunitten eIF6'nın salınımında bozukluk) bulunurken Tan ve ark. çalışmasında saptanan mutasyon N terminal bölgeye denk gelmektedir. N terminal bölge mutasyonunun proteinin GTPaz aktivitesinde değişiklik yapma potansiyeli olduğu ileri sürülmekle birlikte bunu destekleyecek fonksiyon çalışması bulunmamaktadır. Böylelikle ribozomopati grubu hastalıklarda da proteinde etkilenen bölgeye bağlı olarak fenotipik bulgularda ve hastalık şiddetinde farklılıkların saptanması ile genotip-fenotip ilişkisi kurulabileceği belirtilmiştir (60).

#### 2.7.4. *SRP54* Geni

Carapito ve ark., SDS benzeri bulgular ile sendromik nötropeni farklı ailelerden üç bireyde *SRP54* geninde heterozigot mutasyonlar bildirmişlerdir (61). Sonrasında Bellanné-Chantelot ve ark., Fransa Konjenital Nötropeni Kayıtları'nda bulunan 66 bireyin 23'ünde (16 sporadik, 7 familial) *SRP54* geninde heterozigot mutasyonlar saptamıştır (62). Saptanan mutasyonların çoğu ekzon 4'te bulunmaktadır ve ekzon 4 mutasyon açısından *hotspot* bölge gibi görünmektedir. Saptanan diğer mutasyonlar ise ekzon 5, 8 ve 9'dadır (Tablo 2.5.). Mutasyon saptanan hastaların neredeyse tamamında uzun süreli G-CSF tedavisi gerektiren ve tedavi yanıtı zayıf olan kronik ve belirgin nötropeni, bazılarında ise ek olarak ciddi nörogelişimsel gerilik (n=5) ve/veya enzim replasmanı gerektiren ekzokrin pankreatik yetmezlik (n=3) gibi SDS bulguları ile örtüşen bir fenotip bildirilmiştir.

**Tablo 2.5.** *SRP54* geninde saptanan mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon	Kalıtım	Saptanan birey sayısı
4	c.337G>C, p.Gly113Arg	<i>de novo</i>	1
4	c.343A>G, p.Thr115Ala	<i>de novo</i>	1
4	c.349_351del, p.Thr117del	Familyal dominant ve <i>de novo</i>	2 farklı aileden 4 birey familyal, 11 birey sporadik
4	c.353G>A, p.Cys118Tyr	Familyal dominant	1 aileden 3 birey
5	c.407G>A, p.Cys136Tyr	<i>de novo</i>	2
8	c.668C>A, p.Ala223Asp	<i>de novo</i>	1
8	c.677G>A, p.Gly226Glu	<i>de novo</i>	2
9	c.821G>A, p.Gly274Asp	<i>de novo</i>	1

*SRP54* proteini, sekresyon ve membran proteinlerinin endoplazmik retikulumu (ER) eş-translasyonel hedeflenmesine aracılık eden ribonükleoprotein kompleksinin önemli bir bileşenidir. Sinyal tanıma partikülü (*signal recognition particle*) olarak adlandırılan ribonükleoprotein kompleksi 6 proteinden oluşmaktadır: *SRP9*, *SRP14*, *SRP19*, *SRP54*, *SRP68* ve *SRP72* (Şekil 2.4.) (63). Daha önce *SRP72* de familyal aplastik ve miyelodisplastik sendrom ile ilişkili olarak bildirilmiştir (75). Carapito ve ark., mutant *SRP54* proteinlerinde GTPaz aktivitesinin bozulduğunu gözlemlemişlerdir (61). Bellanné-Chantelot ve ark. ise *SRP54* mutasyonları ile p53-aracılı apoptozis sonucu granülositik hücre farklılaşmasının dramatik olarak azaldığını *in vitro* olarak göstermiştir (62). *SRP54* mutasyonu olan bireylerin kemik iliği incelemesinde disgranülopoezis, ER stresi ve otofaji gösterilmiştir.

İlginç olarak SDS otozomal resesif bir hastalık olarak bilinmesine karşın bu ve takip eden çalışmalar ile *SRP54* geninde saptanan mutasyonların heterozigot durumda iken hastalık fenotipine yol açtığı saptanmıştır. *SRP54* mutasyonu olan bireylerin fenotipi şiddetli konjenital nötropeniler ile SDS arasında bir yerde gibi görünmektedir ve tam olarak nereye oturtulması gerektiği bilinmemektedir. Bu nedenle *SRP54* mutasyonları fenotipinin tam olarak nereye koyulması gerektiği kafa karışıklığına

neden olmuştur ve yeni bir nozoloji oluşturulması gerektiği bazı otörlerce savunulmuştur (63).

Özet olarak, geçtiğimiz 3 yıl içerisinde SDS fenotipi gösteren fakat *SBDS* mutasyonu taşımayan hastalarda yeni genlerde (*DNAJC21*, *EFL1*, *SRP54*) yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. Tüm bu genler aslında hücrenin rRNA veya ribozomal alt ünite maturasyonu ve proteinlerin ER'ye taşınması gibi protein sentezi ile ilişkili yolaklarında görev almaktadırlar. Bu durum belki de SDS'yi klasik anlamda ribozomopati olmaktan bir adım daha öteye taşımış durumdadır. SDS'nin fenotipik değişkenliğinin fazla ve genetik heterojen bir grup hastalık olması tanıda zorluk oluşturmaktadır. Yeni genlerin tanımlanmasıyla bu çeşitlilik daha da artmakta ve nozolojide karışıklığa neden olmaktadır. Bu nedenle hem patogenezin daha iyi anlaşılması hem de fenotipik yelpazenin daha iyi aydınlatılabilmesi için yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.



### 3. BİREYLER ve YÖNTEMLER

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20 Şubat 2018 tarih ve GO18/224-25 no'lu kararı ile gerçekleştirilmiştir (Bkz. **EK 1**). Proje giderleri Türk Hematoloji Derneği tarafından (Proje no: 2018-4) desteklenmiştir.

#### 3.1. Klinik Verilerin Toplanması

SDS ön tanısı ile yönlendirilen hastaların klinik verileri “Hacettepe Üniversitesi Kemik İliği Yetmezlikleri Merkezi Shwachman-Diamond Sendromu Şüphesi Olan Hastalarda Değerlendirme Formu” olarak belirtilen formda bulunan bilgilerden elde edilmiş ve Hacettepe Tıp Fakültesi'nde takipli hastaların eksik bilgileri *nucleus* sisteminden taranarak sağlanmıştır. Moleküler testleri sonrasında pozitif sonuç saptanan hastalar daha sonra tekrar muayeneye çağrılarak gelen hastaların ayrıntılı muayeneleri yapılmıştır.

Klinik bilgi olarak; hastaların demografik bilgileri yanında özellikle SDS fenotipinde görülen hematolojik bulguları, pankreas tutulumu ve iskelet sistemi tutulumu ile ek destekleyici bulgular açısından bilgileri toplanmıştır ve pedigrileri çizilmiştir.

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

##### 3.2.1. DNA Eldesi ve Ölçümü

Qiagen Puregene® Blood Core Kit A

Su banyosu (Memmer †)

IKA® HS 260 Control çalkalayıcı

Nanodrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific)

### 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR Malzemeleri (dH<sub>2</sub>O, Promega 2X Master miks, F ve R primer, DNA, Betain)

Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Foster City, CA)

UVP BioSpectrum 500 Jel Görüntüleme Cihazı

Pürifikasyon kiti (GeneAll® Expin™, PCR SV, 50p)

### 3.2.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizileme

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Seq Kit

Pürifikasyon kiti (Zymo Research DNA Sequencing Clean-up Kit™)

ABI Prism 3500 Genetik Analizör

### 3.2.4. Mikrodizin Analizi

Affymetrix CytoScan™ Optima Array Kit (Thermo Fisher Scientific)

GeneAmp® PCR System 9700 termal cycler

MagnaRack™ - mıknatıslı platform (Invitrogen™)

GeneChip™ Hibridizasyon fırını (Applied Biosystems™)

GeneChip™ *Fluidics* istasyonu (Applied Biosystems™)

GeneChip™ *Scanner* 3000 7G (Applied Biosystems™)

### 3.2.5. Yeni Nesil Dizileme

Qubit™ dsDNA HS Assay (Life Technologies)

Ion Proton™ Sistemi (Ion Torrent™)

Agencourt AMPure® XP Kit Beckman Coulter A63880

Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen 653-05)

DynaMag™ mıknatıs platform (Thermo Fisher Scientific)

Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 kit Life Technologies

Ion AmpliSeq™ Exome RDY-OT2 Kit, 1x8

Ion PI™ Template OT2 200 Kit v3

Ion OneTouch™ 2 Instrument

Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3

Ion PI™ Çip Kit v3

### 3.2.6. Genom Boyu Tek Nükleotid Polimorfizm Analizi

Affymetrix Genechip Human Mapping 250K SNP Array Kit

## 3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Bu tez kapsamında başlıca Sanger yöntemi ile DNA dizi analizi, mikrodizin analizi, tüm ekzom dizileme, genom boyu SNP genotipleme, biyoinformatik analizler ve *in silico* protein modellemesi yöntemleri kullanılmıştır. Kullanılan yöntemler DNA eldesinden itibaren alt başlıklar altında ayrıntılı olarak sunulmuştur.

### 3.3.1. DNA Eldesi

Periferik venöz kandan, üretici firmanın talimatları doğrultusunda *Qiagene Puregene* DNA kiti kullanılarak DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. DNA eldesi için talimatlar kısaca şu şekildedir: Öncelikle 1,5 ml'lik eppendorfa 900 µl RBC buffer koyulur, üzerine 300 µl periferik kan eklenip pipetle bir kez çekip bırakılır ve oda ısısında 3 dk beklenir. Sonrasında birkaç kez ters düz edilerek çırpılır ve 16000xg'de 45 sn santrifüj edilir. Sonrasında süpernatant kısmı çekilip atılır, dipteki beyaz pelet kısmı korunur. Dipteki peleti vorteksle ve el ile çırparak hareketlendirilir ve 300 µl

*cell lysis* buffer eklenir. 30-40 sn vorteksle iyice karıştırılır ve 1,5 µl RNAase eklenir. Sonrasında 15 kez alt-üst yapıp karıştırılır ve 15 dk 37°C’de inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında eppendorflar buz dolu kaba yerleştirilir ve 1-2 dk beklenir. Sonrasında 1-2 dk oda ısısında bekletilir ve üzerine 100 µl *protein precipitation* solüsyonu eklenir. Proteinlerin parçalanması için yüksek hızda 1 dk vortekslenir (şeffaf bir görünüm alınca kadar). Sonra 1 dk 16000xg’de santrifüj edilir ve süpernatant çekilerek 300 µl isopropanol koyulmuş ayrı temiz bir eppendorfa alınır ve 50 kez alt-üst edilerek karıştırılır ve 1 dk 16000xg’de santrifüj edilir. Süpernatant kısmı atılarak alttaki pelet kısmı korunur ve eppendorf içindeki alkol peçete ile iyice kurulanır. Sonrasında üzerine 300 µl %70’lik etanol eklenir ve 16000xg’de 1 dk santrifüj edilir. Yine süpernatant kısmı atılarak pelet korunur ve eppendorf içi peçete ile kurulanır. Pelet çok kurumadan 1-2 dk beklenir ve sonrasında 100 µl DNA *hydration* solüsyonu eklenir ve 65°C’de su banyosunda 5 dk inkübe edilir. Son olarak 1 gece düşük hızda çalkalayıcıda bırakılır. Ertesi gün eppendorflar etiketlenerek DNA eldesi tamamlanmış olur. Bu aşamadan sonra elde edilen DNA’nın *nanodrop* ile konsantrasyonu ölçülmüştür ve 50 ng/µl olacak şekilde distile su ile seyreltilerek reaksiyonlarda kullanılmak üzere ara stokları hazırlanmıştır.

### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

SDS fenotipi ile daha önce ilişkilendirilmiş olan *SBDS*, *DNAJC21*, *EFL1* ve *SRP54* genlerinin kodlayan ekzonları için ve WES validasyonu için kullanılan spesifik primerler Perl programı ile tasarlanmıştır. Liyofilize halde üretici firma aracılığıyla sentezlenmiş olan primerler distile su ile ana stok primerler 100 mikromolar ve ara stoklar 10 mikromolar olacak şekilde dilue edilmiştir. PCR için karışımlar 0,2 ml’lik eppendorflarda Tablo 3.1.’de verildiği şekilde hazırlanmıştır. Karışım vortekslenip *spin-down* edildikten sonra Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Foster City, CA) cihazı kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrası ürünler 50 bp’lik *ladder* ile birlikte %2’lik agaroz jele Orange-G ile karıştırılıp yüklenerek 125 V’de 25 dk elektroforezde yürütülmüştür. PCR koşulları optimize edilerek elde edilmiş olan ürünler GeneAll® Expin™, PCR SV, 50p pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Pürifikasyon için öncelikle PCR ürünleri 100 µl *binding* buffer ile pipetaj yapılarak pürifikasyon için özel üretilmiş

membran içeren minikolonlara alınmıştır. 16000 xg'de 1 dk santrifüj edilerek ürünlerin membranlara tutunması sağlandıktan sonra 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 16000 xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken solüsyon dökülerek tekrar 16000 xg'de 1 dk daha santrifüj edilmiştir. Sonrasında membranı taşıyan içteki minikolonlar alınarak yeni 2 ml'lik temiz eppendorflara alınmıştır ve 30 µl *elution* buffer eklenerek oda ısısında 1 dk beklenmiştir. Beklemenin ardından son kez 16000 xg'de 1 dk daha santrifüj edilerek saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

**Tablo 3.1.** PCR karışımı ve reaksiyonu

PCR karışımı içeriği		PCR reaksiyonu	
Promega 2X Master Miks:	8 µl	Denatürasyon	95°C – 5 dk
F primer:	1 µl	Bağlanma ( <i>Annealing</i> , Primere özgü sıcaklık)	95°C – 30 sn
R primer:	1 µl		50-60°C – 30 sn
DNA:	2 µl		72°C – 30 sn
dH <sub>2</sub> O:	8 µl	Son uzama dönemi	72°C – 7 dk
Total volüm:	20 µl		4°C – ∞

Not: Eğer PCR karışımında Betain (2 µl) kullanılmışsa dH<sub>2</sub>O 6 µl olarak eklenmiştir.

### 3.3.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizileme

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

**Tablo 3.2.** Sekans reaksiyonu karışımı ve sekans PCR koşulları

Sekans reaksiyonu karışımı içeriği		Sekans reaksiyonu	
Saflaştırılmış PCR ürünü:	1 µl	Denatürasyon	96°C – 1 dk
F/R primer:	1 µl		96°C – 10 sn
Big Dye Terminator karışımı:	1 µl	Bağlanma ( <i>Annealing</i> )	50°C – 5 sn
Sekans buffer:	2 µl	Uzama ( <i>Extension</i> )	60°C – 4 dk
dH <sub>2</sub> O:	5 µl		4°C – ∞
Total volüm:	10 µl		

Reaksiyondan sonra ürünler Zymo Research ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ kullanılarak saflaştırılmıştır. Pürifikasyon basamakları PCR pürifikasyonuna benzer şekilde üç basamaklı olup, önerilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ABI 3500 Genetik Analizör cihazı ile dizileme yapılmıştır. Dizileme sonuçları FinchTV programı kullanılarak değerlendirilmiş, tez kapsamında varyant pozisyonları GRCh37/hg19 referans genomuna göre sunulmuştur. Saptanan varyantların patojenitesi *in silico* olarak PredictSNP ve Varsome programları ile değerlendirilmiştir. PredictSNP, Varsome gibi programlar birçok *in silico* programın (MutationTaster, SIFT, PolyPhen-2... gibi) sonucunu birlikte değerlendirerek hepsinin öngörüsünün birleşimi ile varyantın patojenitesi hakkında sonuç veren *online* kullanıma açık olan veritabanlarıdır. PredictSNP programı bunun için MAPP, PhD-SNP, PolyPhen-1, PolyPhen-2, SIFT ve SNAP *in silico* programlarını kullanarak hesapladığı yüzde doğruluğa göre *deleterious* veya *neutral* olarak sonuç vermektedir. Varsome programında ise DANN, Mutation Taster, Mutation assessor, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, DEOGEN2, EIGEN, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, PROVEAN, MVP, MutPred, REVEL, PrimateAI, MetaSVM ve MetaLR *in silico* programlarının öngörüsünü hesaplayarak kaçının patojenik kaçının benign olarak sonuçlandığını sayısal olarak vermektedir.

### 3.3.4. Affymetrix CytoScan Optima Array Analizi

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

#### DNA'nın Hazırlanması ve Kesimi

Konsantrasyonu 50 ng/μl olacak şekilde hazırlanmış DNA örneğinden 5 μl alınarak buz üzerinde eppendorf tüpüne aktarılır. Bir örnek için; 11,55 μl nükleaz *free* su, 2 μl Nsp I buffer, 0,2 μl 100X BSA ve 1 μl Nsp I içeren kesim solüsyonları karışımı toplamda 14,75 μl olacak şekilde hazırlanır. GeneAmp® PCR System 9700 termal cycler cihazında 37°C'de 2 saat, 65°C'de 20 dk, 4°C'de 5 dk kaldıktan sonra kesim tamamlanır.

#### Ligasyon

Kesim işleminden sonra ligasyona başlanır. 2,5 μl DNA ligaz buffer, 0,75 μl adaptor Nsp I adaptör ve 2 μl DNA ligaz olacak şekilde 5,25 μl hacimdeki hazırlanan ligasyon karışımı kesilmiş DNA örneğinin üzerine eklenir. PCR cihazında 16°C'de 3 saat, 70°C'de 20 dk, 4°C'de 5 dk kaldıktan sonra ligasyon tamamlanır.

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kesilmiş ve ligasyonu yapılmış DNA örnekleri nükleaz *free* su ile %25 oranında (25 μl ligasyonu yapılmış DNA ve 75 μl nükleaz *free* su) seyreltilir. 10 μl ligasyon ürününün üzerine 50,3 μl nükleaz *free* su, 10 μl CytoScan Taq buffer, 20 μl 5M Betain, 3,5 μl dNTP, 4,2 μl PCR primer ve 2 μl CytoScan Taq DNA polimerazdan oluşan PCR karışımı eklenerek total volüm 100 μl'ye tamamlanır (her DNA için 2 örnek bu şekilde hazırlanır).

GeneAmp® PCR System 9700 termal cycler cihazında 95°C'de 1 dk denatürasyon, sonrasında 30 döngü 95°C'de 30 sn, 60°C'de 45 sn ve 68°C'de 60 sn ve son olarak 68°C'de 7 dk uzama ve 4°C'de 5 dk bekleme (gece boyu bekleyebilir)

basamaklarından oluşan PCR reaksiyonu başlatılır. PCR sonrası elde edilen üründen 3 µl'lik kısım 17 µl dilue yükleme buffer ile %2'lik TBE agaroz jelde 120 V'de bir saat boyunca yürütülür. Ürünlerin jelde yaklaşık 150-2200 baz çiftleri arasında olması deneyin sorunsuz ilerlediğini gösterir.

### PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Ölçülmesi

2 ml'lik eppendorfta (tüpte) her DNA için 2 ayrı örnek şeklinde çoğaltılan PCR ürünleri birleştirilir (100+100-3=197 µl total volüm olacak şekilde). Üzerine 360 µl *Purification Beads* eklenir ve 10 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra 16000xg'de 3 dk boyunca santrifüj edilir. Sonrasında eppendorflar mıknatıs platforma (Magnarack) alınarak pelletin bir tarafa doğru birikmesi beklenir ve süpernatant kısmı pelete zarar verilmeden uzaklaştırılır. Eppendorflara 800 µl *Purification Wash Buffer* eklenerek 2 dk boyunca vortekslenir, devamında 3 dk boyunca 16000xg'de santrifüj edildikten sonra tekrar mıknatıs platforma alınır. *Bead*'lerin bir tarafta toplanması beklenir sonrasında süpernatant kısmı pelete zarar verilmeden uzaklaştırılır ve 16000g'de 30 sn santrifüj edilir. Tüpler tekrar mıknatıs platforma alınarak kalan yıkama solüsyonu varsa 20 µl'lik pipet ucu ile pelete zarar verilmeden uzaklaştırılır. Sonrasında tüpler mıknatıs platformdan alınarak kapakları açık bir şekilde oda sıcaklığında kalan yıkama solüsyonunun uçmasının sağlanması için 7 dk boyunca beklenir. Ardından 27 µl *Elution Buffer* eklenir, 10 dk boyunca vortekslenir (*bead*'lerin homojen hale gelmesi sağlanır) sonrasında 16000xg'de 3 dk santrifüj edilir. Tüpler tekrar 10 dk boyunca mıknatıs platforma alınarak *bead*'lerin toplanması sağlanır. Sonrasında 25 µl *elute* edilen örnek yeni 96'lık *plate*'e alınır. Her örnekten 2 µl alınarak spektrofotometre ile kantitasyon yapılır ve DNA veriminin yeterliliği hakkında karar verilir.

### Fragmantasyon

Ölçülen PCR ürünleri 10 dk süresince buz üzerinde bekletilir. 215 µl nükleaz *free* su, 275 µl fragmantasyon buffer ve 10 µl fragmantasyon reaktifi ile fragmantasyon master miks hazırlanır. Daha sonra her örneğe (23 µl) 5 µl fragmantasyon master miksi eklenir. PCR cihazında 37°C'de 35 dk, 95°C'de 15 dk, 4°C'de 5 dk boyunca reaksiyon gerçekleştirilir. Fragmantasyon kontrolü jel



elektroforezde ürünlerin yürütülmesi ile yapılır ve ürünlerin 25-125 bp arasında yığılım göstermesi beklenir.

### **İşaretleme (*Labelling*)**

7 µl TdT buffer, 1 µl DNA işaretleme reaktifi, 1,8 µl TdT enzimi ile total volüm 9,8 µl olacak şekilde işaretleme master miksi hazırlanır. 26 µl fragmente DNA ürünü ile 9,8 µl işaretleme master miksi birleştirilir (total volüm: 38,5 µl). PCR cihazında 37°C’de 4 saat, 95°C’de 15 dk, 4°C’de 5 dk boyunca reaksiyon gerçekleştirilir.

### **Hibridizasyon**

Öncelikle hibridizasyon fırını 1 saat öncesinden sıcaklık 50°C’ye ayarlanarak açılır. Dönüş hızı 60 rpm’e ayarlanır. Sonrasında Command Console’dan AGCC (*Affymetrix® GeneChip® Command Console®*) portalına bağlanılır. *Samples* sekmesinden *Batch Registration* seçilir. Örnekler sisteme girilir. Sonrasında array çipleri (array) temiz bir zemine yükleme yüzü yukarıda olacak şekilde koyulur. Her bir çipin sağ üst bölgesindeki deliklere 200 µl’lik pipet ucu takılır ve her bir çip için 2 adet yapıştırma kağıdı hazırlanır. 82,5 µl Hyb buffer part 1, 7,5 µl Hyb buffer part 2, 3,5 µl Hyb buffer part 3, 0,5 µl Hyb buffer part 4 ve 1 µl oligo kontrol reaktifi (ayıraç) ile hibridizasyon master miksi hazırlanır ve örnekler eklenir. İyice karışana kadar vortekslendikten sonra önceden ısıtılmış PCR cihazında 95°C’de 10 dk, 49°C’de 3 dk olmak üzere CytoScan Optima Hyb programında reaksiyon gerçekleştirilir. Ardından 100 µl ürün alınarak çipe sol alttaki delikten yüklenir ve yüklemenin ardından delikler yapışkan kağıtlar ile kapatılır. Sonrasında çipler hibridizasyon fırınında 50°C’de 60 rpm hızında 16-18 saat bırakılır.

### **Yıkama, Boyama, Tarama**

Öncelikle yıkama için Fluidics istasyonu açılır ve Affymetrix Command Console uygulamasından “Affymetrix Launcher” başlatılır. Affymetrix Launcher’dan “AGCC Fluidics Control” uygulaması açılır. AGCC Fluidics Control panelinden “PRIME\_450” komut dosyasından spesifik fluidics istasyonu ve modülü seçilir. *Wash A* ve *B* bufferları uygun rezervuarlara yerleştirilir. Fluidics komutunu başlatmak için “Run” komutu seçilir. 500 µl boyama buffer 1 pozisyon 1’e, 500 µl boyama buffer 2

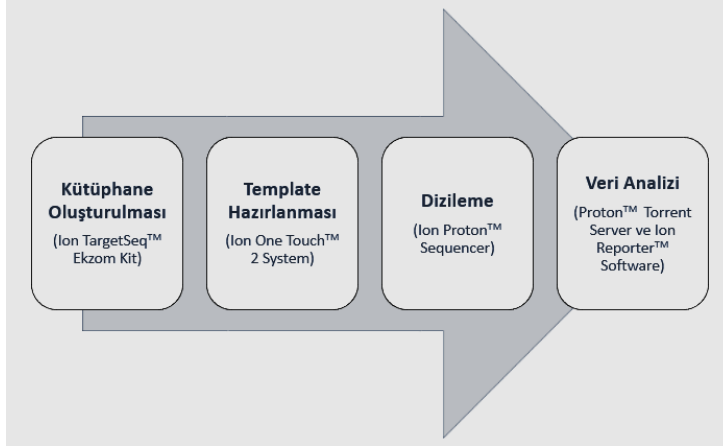
pozisyon 2'ye ve 800 µl array holding buffer pozisyon 3'e yerleştirilir. Sonrasında hibridizasyon fırınından çipler çıkarılıp hemen Fluidics istasyonuna alınır. Yıkama ve boyama işlemi tamamlandıktan sonra çipler hava kabarcığı açısından kontrol edilir ve hava kabarcığı yoksa tarama işlemi için Scanner'a alınır. Çipler AGCC yazılımı tarafından kontrol edilen GeneChip Scanner 3000 7G tarayıcısına yerleştirilir. Sonuçlar “.dat” formatında otomatik olarak dosyalanır. .dat formatındaki dosyalar AGCC Viewer ile “.CEL” formatına çevrilir. Tarama bittikten sonra *Analysis Workflow* programı kullanılarak ham veri olan .CEL uzantılı dosyadan “.CYCHP” dosyası oluşturulur.

### **Sonuçların Değerlendirilmesi**

“.CYCHP” formatındaki dosyalar *Chromosome Analysis Suite 3.1 (ChAS 3.1)* yazılımıyla analiz edilmiştir. Elde edilen veriler GRCh37/hg19 referans genomuna göre hizalanmıştır. Kalite skorları olarak  $MAPD \leq 0,29$  ve  $SNPQC \geq 8,5$  değerleri referans alınmıştır ve filtreleme sınırı 1 kb ve 1 marker olarak seçilmiştir. Saptanan kopya sayısı değişiklikleri daha önce Tıbbi Genetik Anabilim Dalımızda yapılmış olan yaklaşık 650 hastaya ait *inhouse* verinin bulunduğu veri dosyası, *online* kullanıma açık DECIPHER, ClinVar, DGV gibi veritabanları kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.3.5. Yeni Nesil Dizileme**

Tüm ekzom dizileme için Ion Proton™ sistemi (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Temel olarak dört basamaktan oluşan iş şeması Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilen bu basamaklar alt başlıklar halinde aşağıda kısaca anlatılmıştır.



**Şekil 3.1.** Ion Proton™ Sistemi Ekzom İş Akış Şeması.

### **Kütüphane Oluşturulması**

Kütüphane oluşturulması amplifikasyon temelli gerçekleştirilmiştir. Öncelikle konsantrasyonu 50 ng olacak şekilde DNA dilüe edilmiştir ve Qubit™ dsDNA HS ile ölçülmüştür. 96'lık plate'de 12 farklı kuyuda hedef bölgeler 5x Ion AmpliSeq™ HiFi miks kullanılarak Thermal Cycler cihazı ile çoğaltıldıktan sonra 12 farklı kuyudaki amplikonlar tek bir kuyuda toplanıp *FuPA* solüsyonu eklenerek yine Thermal Cycler'da kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında amplikonlara *Switch* solüsyonu ve IonExpress™ barkod adaptörler eklenerek Thermal Cycler'da adaptörlerin bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında elde edilen ürünler Qubit™ dsDNA HS ile ölçülerek kantitasyon yapılmıştır. Yeterli miktarda ürün olduğu saptanan örnekler Agencourt™ AMPure™ XP solüsyonu ile mıknatıslı platformda (DynaMag™ 96) pürifiye edildikten sonra kütüphane amplifikasyonu basamağına geçilmiştir.

### **Kütüphane Amplifikasyonu**

1x Library Amp miks ve 25x Library Amp primerleri ile kütüphane amplifikasyonu reaksiyonu Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonrası Agencourt™ AMPure™ XP solüsyonu ile mıknatıslı platformda pürifikasyon yapılmıştır. Sonrasında örneklerin Qubit™ dsDNA HS ile ölçümü yapılarak TE tampon ile 22 ng/μl'ye dilüe edilmiştir. Devamında Ion One Touch

cihazında emülsiyon PCR ile klonal çoğalma sağlanmıştır. Bunun için cihazda *recovery* tüplerine Ion One Touch™ Breaking solüsyonu, sonrasında amplifikasyon *plate*'i, yağ ve *recovery* solüsyonları yerleştirilmiştir. Ion PI™ enzim miksi ve Ion PI™ Ion Sphere™ ile birlikte hazırlanmış olan kütüphane karışımı portlara yüklenerek Ion One Touch™ cihazında emülsiyon PCR gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon PCR sonrası pozitif ISP (*Ion Sphere Particle*)'lerin elde edilmesi amacıyla santrifüj basamakları ve ISP resüspanسیون solüsyonu eklenmesi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında Ion One Touch™ ES cihazında stript üzerinde ilk kuyuda hazırlanan pozitif ISP'ler, ikinci kuyuda manyetik küreler (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin, MyOne™ Beads ), üç, dört ve beşinci kuyularda Ion One Touch™ yıkama solüsyonu ve yedinci kuyuda Melt Off (Tween™ solüsyonu ve NaOH) solüsyonu olacak şekilde yerleştirilerek ISP'lerin zenginleştirilmesi sağlanmıştır. Zenginleştirme işlemi sonrası ISP'lerin yıkanması gerçekleştirilmiştir.

### **Dizileme**

Ion Reporter™ yazılımında hastaların barkod numaraları tanımlanıp dizileme reaksiyonu planlanmıştır. Sonrasında Ion Proton™ cihazının yıkanması ve gaz basıncı kontrolü yapılmıştır. Yıkama solüsyonları ve nükleotid solüsyonları ilgili yerlere yerleştirildikten sonra çip yükleme basamağına geçilmiştir. Bunun için öncelikle pozitif ISP'ler kontrol ISP'ler ile birlikte Ion PI™ bağlanma solüsyonu, Ion PI™ primeri ile Thermal Cycler'da *annealing* gerçekleştirilmiştir. Sonrasında Ion PI™ yükleme tamponu eklenerek karışım çipe yüklenip 10 dk boyunca Ion Chip™ cihazında santrifüj edilmiştir. Sonrasında bağlanma tamponu ve *Foaming* solüsyonu ile köpük oluşturularak çipin yıkaması gerçekleştirilmiştir. Devamında bağlanma tamponu yüklenip tekrar santrifüj edilmiştir. Bu iki basamak tekrar edildikten sonra önce *Flushing* solüsyonu sonrasında bağlanma tamponu çipe yüklenip boşaltılmıştır. Son olarak Ion PI™ Hi-Q™ polimeraz ve bağlanma tamponu çipe yüklenerek 5 dk oda ısısında bekletildikten sonra çip Ion Proton™ cihazına yüklenmiştir.

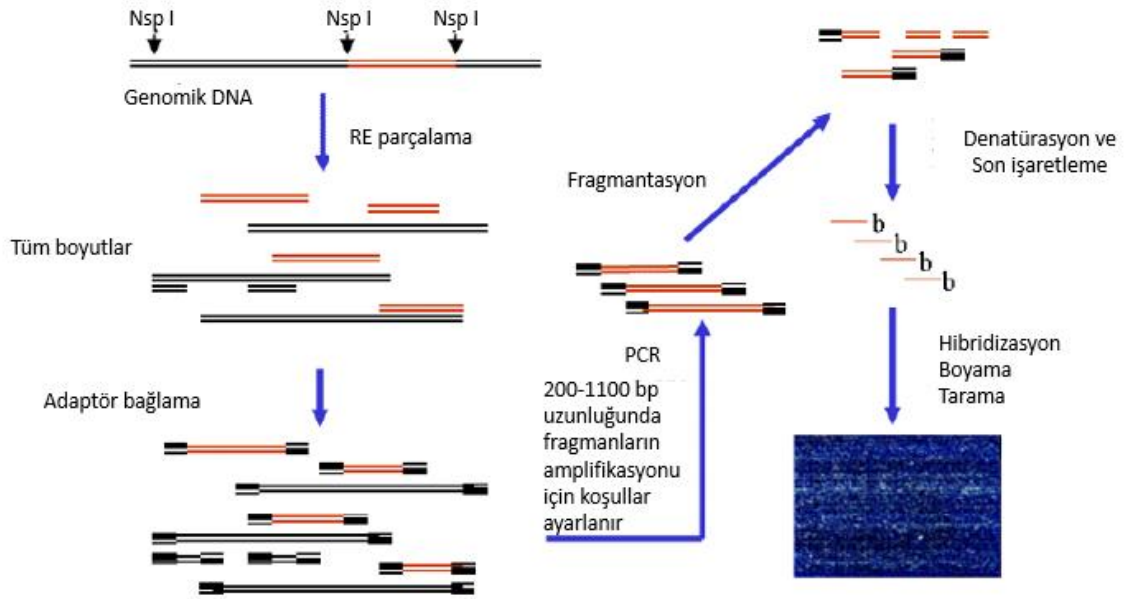
### **Verilerin Analizi**

Verilerin analizi Ubuntu 10.04 işletim sistemi yüklü, 128 GB RAM ve 27 TB veri depolama kapasitesine sahip, Dual 8-core 2.9 GHz işlemcili Proton™ Torrent

sunucusu ve Windows Server 2012 işletim sistemi yüklü, 32 GB RAM ve 1.25 TB veri depolama kapasitesine sahip, 2.33 GHz Intel Xeon işlemcili IBM x3650 sunucusundan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrasında .bam (*binary alignment map*, referans genomu göre hizalama bilgisini içeren dosya), .vcf (*variant call format*, referans genomu göre hizalanmış okumalarda saptanan varyantları içeren dosya) dosyaları ve HomSI verileri oluşturulmuştur. Bu dosyaların oluşturulmasında Ion Reporter™, Torrent Variant Caller ve HomSI yazılımları kullanılmıştır. .bam uzantılı dosyalar varyantların okuma hatası olup olmadığını değerlendirmede IGV (*Integrative Genomics Viewer*) görüntülemesinde kullanılmıştır. .vcf dosyaları ile oluşturulan varyant tabloları ise **HUVariantsDB** yazılımı kullanılarak filtrelenmiştir (76). HomSI ekzom verisinde genomda homozigot blokların görselleştirilmesine yönelik olarak yazılmış bir program olup tez kapsamında elde edilen varyantların homozigot segmentlere denk gelip gelmediğini belirlemede kullanılmıştır (77).

### 3.3.6. Genom Boyu 250K Tek Nükleotid Polimorfizm Analizi

Genom boyu SNP analizi için Affymetrix 250K SNP Array platformu kullanılmıştır. Protokol Optima Array ile benzer olduğu için uygulama basamakları tekrar detaylandırılmamıştır (Ayrıntılı protokol için GeneChip® Mapping 250K Assay Manual'e bakınız.). Her iki platform protokolündeki ana farklılıklar ise şu şekildedir: 250K SNP array platformu için; PCR pürifikasyonunda *Qiagen Minelute* pürifikasyon kiti ile mıknatıslı platform yerine 96'lık *plate* kullanılmaktadır ve hibridizasyon fırınında reaksiyon 49°C'de gerçekleştirilmektedir. Basamaklar Şekil 3.2.'de özetlenmiştir.



**Şekil 3.2.** GeneChip® Mapping Assay - Nsp I (Protokolden Türkçeleştirilmiştir.).

Sonuçlar “.dat” formatında otomatik olarak dosyalanır ve .dat formatındaki dosyalar AGCC Viewer ile “.CEL” formatına çevrilir. “.CEL” formatındaki veri dosyaları daha sonra genotip analiz yazılımına (Affymetrix, Genotyping Console Software) aktarılır ve “.CHP” uzantılı dosya haline çevrilir. SNP sinyal alımı yüzdesi olarak okuma oranları (*SNP Call Rate*) %90’ın üzerinde olması beklenir. GRCh37/hg19 referans genomuna göre hizalanan veriler genom boyu bağlantı analizi için “.CHP” uzantılı dosyalar üzerinden Visuel Genome Studio (VIGENOS, Homesoft) programına aktarılmıştır ve MERLIN Programı ile uyumlu dosyalar (.ped, .dat ve .map dosyaları) oluşturularak SNP analizleri yapılarak homozigot bloklar belirlenmiştir.

### 3.3.7. Üç Boyutlu Protein Modelleme

Kristalografik olarak protein modellemesi bilinmeyen aday genlerden biri için Hacettepe Üniversitesi Biyoinformatik Anabilim Dalı’ndan Dr. Öğr. Üyesi Ceren Sucularlı *in silico* üç boyutlu protein modellemesi ve *docking* çalışmalarını

tamamlamıştır. Bu kapsamda doğal ve mutant MAP7D1 proteinleri, yapısal şablonların Protein Data Bank'dan çoklu "threading" yaklaşımı LOMETS ile belirlendiği ve yinelemeli şablon-tabanlı parça birleştirme simülasyonları ile modellerin oluşturulduğu I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, (78-80)) ile modellenmiştir. Tahmin edilen modeller, modellerin kalitesini ölçmek için kullanılan c-skoruna (güven skoru) göre değerlendirilmiştir. Doğal ve mutant MAP7D1 protein modellerinin görüntülenmesi ve karşılaştırılması UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>, (81)) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. p.Arg201Trp değişiminin MAP7D1 proteini üzerindeki yapısal etkileri HOPE server (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>, (82)) kullanılarak analiz edilmiştir. MAP7D1 ve Tübülün etkileşimini araştırmak için Tübülün alfa yapısı 1Z2B (83) Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), (84))'dan elde edilmiştir. MAP7D1 ve tübülün alfa protein-protein bağlantısı HADDOCK 2.2 (85, 86) ile araştırılmıştır.

## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına SDS ön tanısı ile gönderilen toplam 61 aile incelenmiştir. Çalışma grubu “Hacettepe Üniversitesi Fankoni Anemisi ve Diğer Kemik İliği Yetmezlikleri Tanı, Tedavi ve Araştırma Merkezi” faaliyetleri kapsamında ülke genelinden gönderilen, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Ünitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Şule ÜNAL tarafından değerlendirilerek anabilim dalımıza genetik nedenin bulunması açısından yönlendirilen hastalardan oluşmaktadır.

İndeks vakalarda konjenital nötropeni genleri dışlanmış olduğu bildirilmesine karşın, toplam 61 ailenin 1 tanesinde konjenital nötropeni etiolojisinde sıklıkla rastlanan *HAX1* gen mutasyonu saptanmıştır. Kalan 60 aile içinde 5 tanesinde hastaların dış merkezde çalışıldığı ve farklı gen mutasyonlarının saptandığı (*ADA2*, *EPCAM*, *APECED*, *G6PC3*, *BRAF*) tarafımıza bildirilmiştir. Bir ailede *RPS19* bölgesini de içine alan geniş kromozom delesyonu tarafımızdan saptanmış olup hasta diğer bir ribozomopati fenotipi olan Diamond-Blackfan anemisi ile ilişkilendirilmiştir. Geri kalan 54 aile tez kapsamına alınmıştır.

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Toplantı tarihi 20 Şubat 2018, Karar no:GO18/224-25), Türk Hematoloji Derneği tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2018-4).

### 4.1. Klinik Bulgular

SDS ailelerinin büyük çoğunluğu ülke genelinden merkezimize incelenmek üzere gönderilmiştir. Örnekler **EK 2**'de sunulan “Hacettepe Üniversitesi Kemik İliği Yetmezlikleri Merkezi Shwachman-Diamond Sendromu Şüphesi Olan Hastalarda Değerlendirme Formu” ile toplanmıştır. İlgili formlar ve Üniversitemiz Hematoloji bölümünce yapılan değerlendirmeler SDS tanısı açısından kritik olan hematolojik, pankreatik ve sıklıkla eşlik eden destekleyici bulgular (iskelet sistemi, davranış problemleri, açıklanamayan boy kısalığı ve aile öyküsü) açısından değerlendirilmiş ve



bulgular **EK 3**'te özetlenmiştir. Tez kapsamına alınmasına karar verilen bireyler tekrar muayene edilerek bulgular detaylandırılmıştır.

Merkezimize ilk gönderildiği anda kayıtlı bulunan ve hastane sisteminden ulaşılan bilgileri incelendiğinde 27 hastanın Hacettepe Üniversitesinde Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Ünitesinde incelendiği 27 hastanın dış merkezden ünitemize refere edildiği görülmüştür. 54 indeks vakanın 26'sının kız, 28'inin erkek çocuktan oluştuğu, şikayetlerin başlangıç yaşının ortalama 2,99 yaş (n=42) olduğu izlenmiştir. Hastaların 17 kadarının ebeveynleri arasında akrabalık bulunduğu saptanmıştır. En sık saptanan bulgunun nötropeni olduğu ve vakaların %87,7 (n=49)'sinde var olduğu tespit edilmiştir. Diğer sık bulgular ise sırasıyla anemi %55 (n=49), trombositopeni %48 (n=50) ve diyare %47,7 (n=44) olarak saptanmıştır. Pansitopeni varlığı ise %31 (15/48) olarak hastaların yaklaşık üçte birinde gözlenmiştir. Nötropeni ve diyare birlikteliği ise %32,5 (14/43) ile yine yaklaşık olarak hastaların üçte birinde görülmüştür.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan 37 hastanın bulguları incelendiğinde ise 4 hastada orta sellüler kemik iliği olduğu, 3 hastada sellüleritenin belirgin azaldığı, 7 hastada displastik değişiklikler izlendiği, 3 hastada miyeloid duraksama olduğu saptanmıştır. Ayrıca bir hastada ileri derecede hipoplazi ve ekstrasellüler demir birikimi olduğu ve diğer bir hastada ise osteoblastlarda ve osteoklastlarda artış bulunduğu görülmüştür.

32 hastaya pankreas ve karaciğere yönelik görüntülemenin yapıldığı ve bunlardan 6 hastanın pankreas görüntülemesinde diffüz yağlanma veya hipoplazi gibi bulgular olduğu, 1 hastada karaciğer ekojenitesinde heterojen kaba granüler görünüm ve diğer 1 hastada da karaciğerde steatoz olduğu saptanmıştır.

İskelet bulguları açısından değerlendirme yapıldığında 3 hastada belirgin iskelet anormallikleri olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular; bir hastada dar toraks, genişlemiş kondrokostal bileşke, kısa femur, geniş metafiz şeklinde ağır bulgular iken diğer iki hastada ise sırasıyla metafizer displazi ve tibia distalinde metafizyel bant şeklindedir. Ayrıca bir hastada 'O' şeklinde alt ekstremitte olduğu ve başka bir hastada ise ekstremitelerinde kısalık olduğu saptanmıştır. Bir hastanın yarık damak nedeniyle

opere edildiği diğer bir hastanın amniyotik banda bağlı ekstremitte deformiteleri nedeniyle operasyon geçirdiği belirlenmiştir.

Kardiyak bulgular incelendiğinde; bir hastanın ASD nedeniyle opere edildiği, başka bir hastanın ise multipl ASD nedeniyle izlemde olduğu görülmüştür. Bir hastada sekundum ASD ile sol ventrikülde hipertrofik değişiklikler olduğu saptanmıştır. Diğer bir hastada ise opere büyük arter transpozisyonu, opere VSD gibi ciddi kardiyak bulguların olduğu izlenmiştir. Ve bu hastaya ayrıca kalp pili takılmış olduğu da öğrenilmiştir.

Ek ve destekleyici bulgular açısından bakıldığında; 13 hastada büyüme geriliği olduğu, 5 hastada gelişme geriliği olduğu ve 3 hastada ise hiperaktivitenin görüldüğü ve davranış problemi olduğu belirlenmiştir. Fizik muayene bulgusu olarak 4 hastada hepatosplenomegali, 5 hastada hepatomegali ve birisi masif olmak üzere 3 hastada ise splenomegali olduğu saptanmıştır.

olarak bir hastada beraberinde Sathre-Chotzen sendromu olduğu, başka bir hastada ise Ataksi-Telenjektazi bulunduğu gözlenmiştir.

İzlemi hastanemizde yapılan bir hastanın ileri pansitopeni nedeniyle 14 yaş iken eksitus olduğu saptanmıştır.

Bu bulgularla merkezimize nötropeni ve/veya kemik iliği yetersizliği bulgusu yanında diyare gibi pankreas bulguları ile destekleyici bulguları olan hastaların Shwachman-Diamond Sendromu ön tanısı ile ilk planda *SBDS* gen dizi analizinin tamamlanması amaçlı olarak gönderilmiş olduğu belirlenmiştir.

## **4.2. Laboratuvar Bulguları**

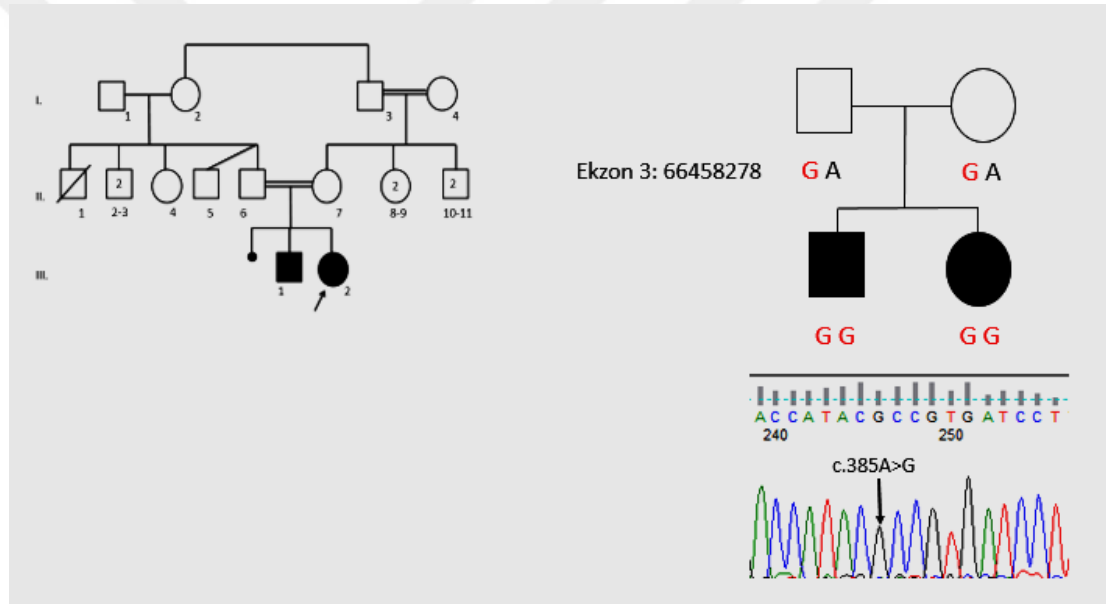
### **4.2.1. *SBDS* Geninde Saptanan Mutasyonlar**

*SBDS* geninde 3 hastada homozigot ve 4 hastada bileşik heterozigot olmak üzere toplam 7 hastada biallelik mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların çoğunluğunu gen konversiyonu nedeniyle oluştuğu düşünülen ve sıklıkla bildirilen c.258+2T>C ve c.183\_184delTAinsCT değişiklikleri oluşturmaktadır. Bir hastada

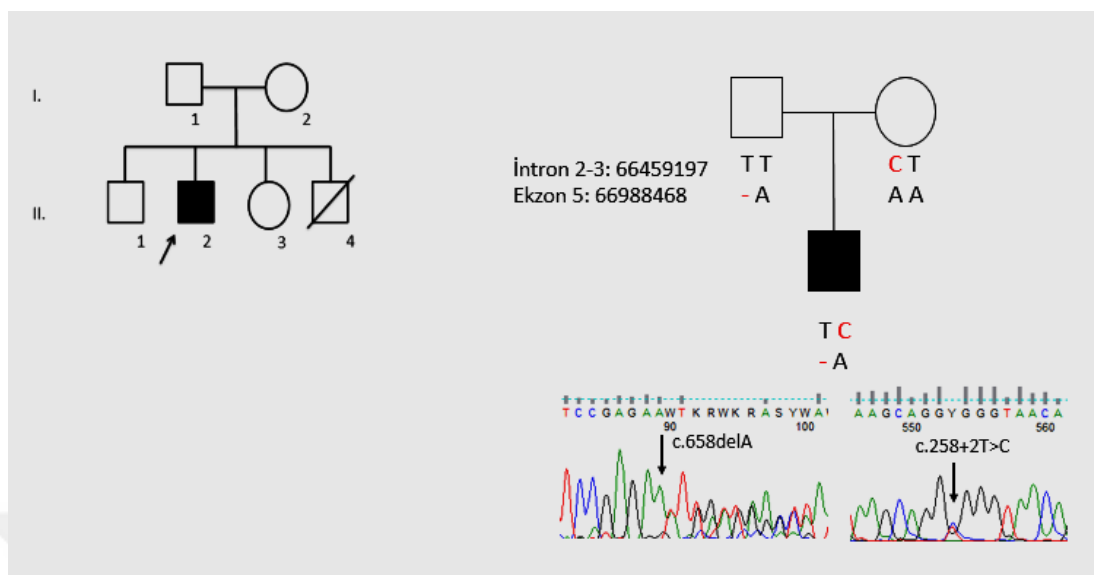
c.385A>G (p.Thr129Ala) değişikliği homozigot olarak saptanmıştır. Bileşik heterozigot mutasyon saptanan hastaların anne ve babaları da çalışılarak kalıtım kalıbı ile uyumlu segregasyon olduğu belirlenmiştir. Hastaların pedigrileri ve sekans elektroferogram görüntüleri şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Hastaların klinik bulguları ve mutasyon bilgileri ise Tablo 4.1.'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

**şekil 4.1.** *SBDS* mutasyonu saptanan hastaların pedigrileri ve sekans elektroferogram görüntüleri.

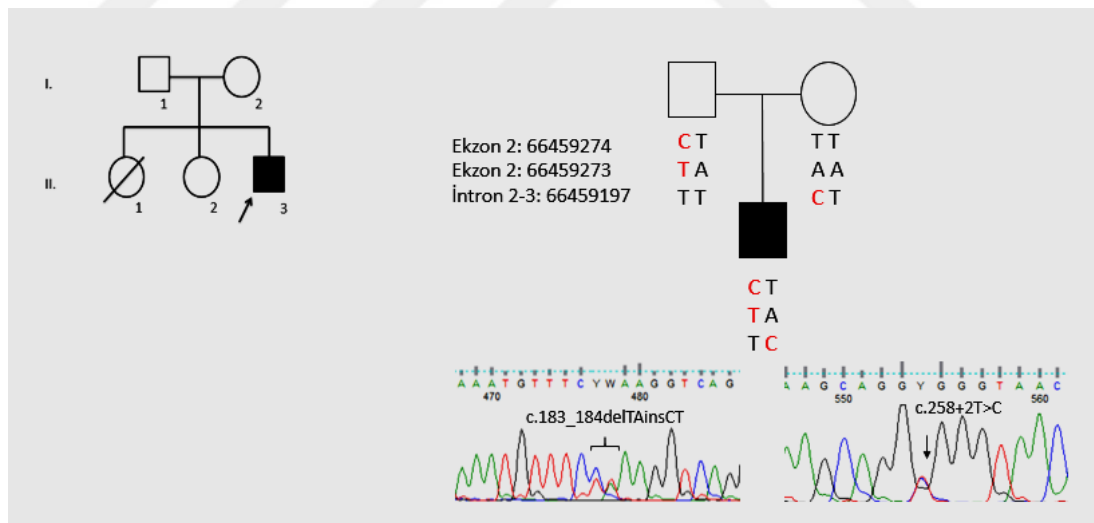
TRSDS068\_12



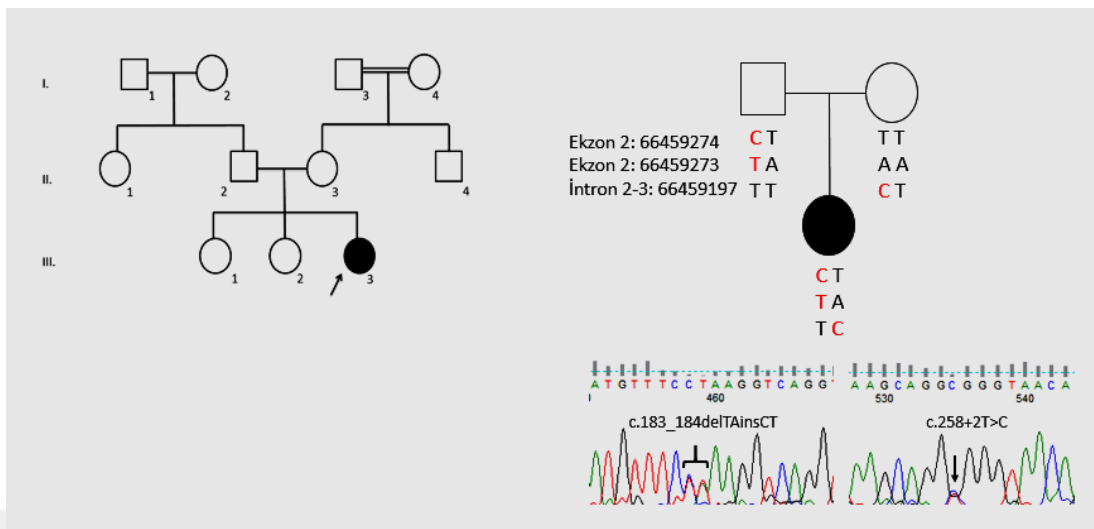
## TRSDS020\_04



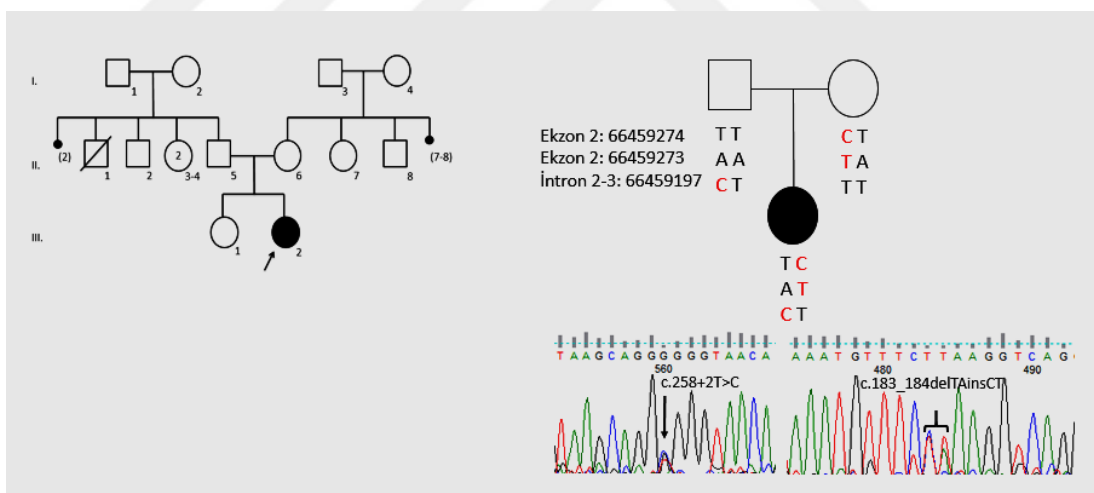
## TRSDS004\_02



## TRSDS177\_47



## TRSDS165\_44





**Tablo 4.1.** SBDS geninde mutasyon saptanan hastaların klinik bulguları ve mutasyon bilgileri. TRSDS068 kodlu ailede benzer bulgulu erkek kardeş (Şekil 4.1., TRSDS068; III:1) çalışma sırasında laboratuvarımıza gönderilmiş , Sanger dizileme ile SBDS geninde bu kardeşte de homozigot c.385A>G (p.Thr129Ala) değişikliği saptanmıştır.

Hasta Kodu	Cinsiyet	Sitopeni Bulguları	Pankreas Bulguları	Büyüme Parametreleri	Ek Bulgular	Mutasyon
TRSDS068_12	Kız	?	?	?	?	Ekzon 3: c.385A>G (p.Thr129Ala) homozigot
TRSDS020_04	Erkek	Anemi yok Nötropeni var Trombositopeni var	Batın USG: Pankreas ekojenitesi diffüz artmış Kreon kullanıyor.	22 yaş iken; Boy: 160 cm (<3p, 3p: 163 cm) VA: 57 kg (3-10p)	Kemik Grafileri: Alt dorsal vertebraların alt ve üst end platelerinde yaygın Schmorl nodülleri izlenmiştir. Bilateral femur boyunları kalın izlenmektedir.	Ekzon 2: c.258+2T>C (p.84Cysfs*3) Ekzon 5: c.658delA (p.Ile220Leufs*4)
TRSDS004_02	Erkek	Anemi var Nötropeni var Trombositopeni var	Abdomen BT: Pankreas atrofik ve yağlı	8 yaş iken; Boy: 110 cm (<3p, 3p: 117 cm) VA: 17 kg (<3p, 3p: 20 kg )	Hepatosplenomegali + KCFT'de bozukluk Femur O-bain şeklinde Epifizyel ve metafizyel displazi yok	Ekzon 2: c.183_184delTAinsCT (p.Lys62Stop) ve c.258+2T>C (p.84Cysfs*3)
TRSDS177_47	Kız	Anemi yok Nötropeni var Trombositopeni yok	Diyare var Amilaz düşük Kreon kullanıyor.	3 yaş 8 ay iken; Boy: 87 cm (<3p, 3p: 91 cm) VA: 11 kg (<3p, 3p: 12 kg) BÇ: 48 cm (boya göre 50p) Kulaç: 85 cm	Bir dönem KCFT yüksekliği (AST, ALT, ALP) olmuş Kemik Grafileri: Normal	Ekzon 2: c.183_184delTAinsCT (p.Lys62Stop) ve c.258+2T>C (p.84Cysfs*3)
TRSDS165_44	Kız	Hafif anemisi var Nötropeni var Trombositopeni aralıklı var	Diyare var Amilaz düşük Batın USG: Pankreasta diffüz yağlanma	6 yaş 11 ay iken; Boy: 116,5 cm ( 10-25p) VA: 17,5 kg (3p) BÇ: 48,5 cm (boya göre <3p, 3p: 48,8 cm) Kulaç: 109 cm	Yarı damak + (opere) Perinatal-YD döneminde AST-ALT yüksekliği Kemik Grafileri: Normal Davranış problemi yok Alın geniş, yüz üçgen şekilli MCP eklem laksitesi +	Ekzon 2: c.183_184delTAinsCT (p.Lys62Stop) ve c.258+2T>C (p.84Cysfs*3)
TRSDS119_28	Kız	Anemi var Nötropeni var Trombositopeni var Kemik iliği: Hipoplazik	Diyare var	13 yaş 3 ay iken; Boy: 132,5 cm (<3p, 3p: 145 cm) VA: 42 kg (25-50p) BÇ: 50,5 cm (boya göre 10p) Kulaç: 142 cm	Splenomegali + Hiperaktivite + Kısa boyun, 5. metakarplar kısa, kubitus valgus, genu valgum	Ekzon 2: c.258+2T>C (p.84Cysfs*3) homozigot
TRSDS116_26	Erkek	Anemi var Nötropeni var Trombositopeni var	Batın USG: Pankreas normal	VA: <3p	Masif splenomegali + Metafiz displazi + Aplastik anemi? nedeniyle 14 yaş iken exitus	Ekzon 2: c.258+2T>C (p.84Cysfs*3) homozigot

Tezin bu aşamasında ilk planda *SBDS* dizi analizi normal saptanan toplam 47 hastada *DNAJC21*, *ELF1* ve *SRP54* genlerinin dizilenmesi planlanmıştır. Ancak genlerin büyük oluşu ve çok sayıda ekzon dizilenmesi gerektiği göz önüne alınarak klasik SDS bulguları gösteren hasta seçimine gidilmesi ve bu indeks vakalarda sistematik incelenmesinin tamamlanmasına karar verilmiştir.

1-) Hastanemizde takip edilen;

2-) Konjenital nötrojeni genleri dışlanmış olan;

3-) Nötrojeni ve/veya anemi, trombositopeni, pozitif kemik iliği bulguları yanında pankreas tutulumu olduğunu düşünülen 8 hasta ve aileleri detaylı analiz için seçilerek bu bireylerde önce *DNAJC21*, *EIF1*, *SRP54* genlerinin kodlanan bölgeleri ve ekzon-intron bağlantı noktaları dizilenmiştir. Dizileme analizleri yapılan bu 8 hastada hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen bir mutasyon saptanmamıştır. Bu aşamadan sonra kopya sayısı değişikliği açısından mikrodizin ve tek gen değişiklikleri açısından tüm ekzom dizileme analizleri tez kapsamında uygulanmaya başlanmıştır.

#### **4.2.2. Genom Boyu Mikrodizin Analizi ve Kopya Sayısı Değişiklikleri**

Affymetrix CytoScan Optima array oligonükleotit çipleri kullanılarak 8 bireye mikrodizin analizi yapılmıştır. Hastalarda çeşitli kromozomlarda, 5 tanesi delesyon ve 5 tanesi duplikasyon olmak üzere toplamda 10 farklı kopya sayısı değişikliği saptanmıştır. Saptanan değişiklikler 2017 yılından itibaren anabilim dalımızda aynı array platformu kullanılarak SDS dışı çeşitli genetik hastalıklar nedeniyle yaklaşık 650 kadar hastada uygulanmış olan array sonuçlarının bulunduğu kurumsal veritabanımız, DECIPHER, ClinVar ve DGV gibi online kullanıma açık veritabanları kullanılarak değerlendirilmiştir. Hastalarda saptanan değişiklikler Tablo 4.2.'de detaylandırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucu iki bireyde (TRSDS016\_03 ve TRSDS118\_27) etkisi bilinmeyen duplikasyon saptanmış olmakla birlikte saptanan değişiklikler doğrudan hastalıkla ilişkilendirilecek nitelikte bulunmamıştır.



**Tablo 4.2.** Hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleri. Delesyonlar kırmızı renk, duplikasyonlar mavi renk ile gösterilmiştir. Etkisi bilinmeyen CNV değişiklikleri sarı ile işaretlenmiştir.

	Kromozom	Bant	Boyut (kb)	OMIM Genleri	DGV	DECIPHER/ClinVar	Inhouse
İndeks vaka 1 TRSDS082_17	chr1:247728961- 247921100	q44	192	OR13G1	DGV yok	1 tane kapsayan del olan birey var, normal babadan kalıtılmış ve <b>olası benign</b> olarak veri tabanına eklenmiş	<i>inhouse</i> yok
İndeks vaka 2 TRSDS081_16	chr1:24663585- 28491833	q11.223	3,828	TTY17A, TTY4, DAZ1, CDY1...	DGV yok	Etkisi bilinmeyen ( <i>unknown</i> ) CNV	<b><i>inhouse +</i></b>
İndeks vaka 3 TRSDS016_03	chr5:172501972- 172662313	q35.1	160	CREBRF, BNIP1, NKX2-5	DGV yok	biraz daha büyük dup olan bir hasta var, etkisi bilinmeyen ( <i>unknown</i> ) CNV denilmiş	<i>inhouse</i> yok
	chr7:152516252- 153544730	q36.1	1,028	DPP6	DGV yok	Etkisi bilinmeyen ( <i>unknown</i> ) CNV	<i>inhouse</i> yok
İndeks vaka 4 TRSDS167_45	chr14:22450090- 22937656	q11.2	488	TRDC	5 tane DGV +	<b>benign</b>	benzer bölge <i>inhouse +</i>
İndeks vaka 5 TRSDS156_42	chr10:46293590- 47149411	q11.22	856	NPY4R, GPRIN2, SYT15, PTPN20	2 tane DGV +	yakın del <b>olası benign</b> olarak bildirilmiş	dup <i>inhouse</i> var
	chr14:22392498- 22978516	q11.2	586	TRDC	3 tane DGV +	<b>benign</b>	benzer bölge <i>inhouse +</i>
İndeks vaka 6 TRSDS118_27	chr5:12164977- 13995045	p15.2	1,830	LINC0119 4, DNAH5	DGV yok	1 tane yakın kapsayan dup olan birey var, etkisi bilinmeyen ( <i>unknown</i> ) CNV denilmiş, parental kalıtılmış	<i>inhouse</i> yok
İndeks vaka 7 TRSDS146_40	chr22:25627998- 25910555	q11.23	283	OMIM geni yok	çok sayıda DGV +	<b>benign</b>	<i>inhouse +</i>
İndeks vaka 8 TRSDS122_32	chr8:137553709- 137849821	q24.23	296	OMIM geni yok	1 tane DGV +	<b>olası benign</b>	benzer bölge <i>inhouse +</i>

Bu aşamadan sonra tüm ekzom dizileme analizlerinin uygulanmasına geçilmiştir.

### 4.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Analizi Sonuçları

#### Filtreleme Basamakları

8 hastanın IonProton alt yapısından elde edilen WES sonuçları daha önce yine Prof. Dr. Nurten Akarsu danışmanlığında yürütülen ve Yavuz Adabalı tarafından biyoinformatik yüksek lisans tezi (Ekzom Veri Setinden Hastalığa Özgü Varyant Veri Tabanı Oluşturulması, Ankara, 2019) kapsamında geliştirilmiş olan **HUVariantsDB** yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (76). Geliştirilen bu yazılım ve veritabanı yönetim sisteminde daha önce yapılmış olan kurum içi WES sonuçları (n=67) ve hastalık grubu kullanılarak varyant eleme verimini artırmak hedeflenmiştir. Ayrıca kalite skorları ve homopolimer hatalarını elemeye yönelik ek filtreleme basamakları eklenmiştir. Populasyon veri tabanlarından elde edilen MAF değerleri, homozigotluk bilgileri, ekzonda yerleşim ve proteinin fonksiyonunu etkileme göz önüne alınarak yapılan eski filtreleme yöntemine göre elde edilen varyant tabloları **HUVariantsDB** veri yönetim sistemi ile elde edilen filtreleme verileri ile karşılaştırılarak tablolar oluşturulmuştur. Yeni filtreleme yönteminde varyantlar patojenite ihtimaline göre (ekzonik, *missense*, *nonsense*, *frameshift* gibi) üç gruba ayrılarak 3 farklı şekilde varyant tabloları oluşturulmuştur. Bu üç grup *loose* (gevşek), *medium* (orta) ve *strict* (sıkı) olarak isimlendirilmiştir. *Strict* varyant tablosunda *nonsense*, *stoploss*, *frameshift*, *splicesite* gibi proteinde fonksiyon kaybı yapması en muhtemel varyantlar alınmıştır. *Medium*da ise bunlara ek olarak *missense* ve *inframe indel* varyantlar eklenmiştir. *Loose* varyant listesinde ise gen içi ve dışı tüm varyantlar dahil edilmektedir (*synonymous*, UTR bölge ve intronik varyantları kapsayan). Her üç varyant filtrelemesi Hacettepe Üniversitesi kurumsal veri tabanımızda SDS dışı farklı hastalıklarda kalıtım modeline göre homozigot veya heterozigot olarak görülen varyantlara yönelik filtreleme yaparak aday varyant sayısını azaltmaktadır. Varyant tabloları değerlendirilirken öncelikle *strict* tablolar değerlendirilmiş olup eğer *strict* filtre ile herhangi bir varyant gözlenmemiş ya da olası kritik varyant saptanamamış ise *medium* tabloların analizi ile devam edilmiştir.

Sonuç olarak yeni filtreleme yöntemi ile gerçek varyantlarda kayıp olmadan daha etkili olarak varyant sayısında azalma sağlanmıştır. Filtreleme yönteminin verimini değerlendirmek açısından 2 numaralı indeksin karşılaştırmalı WES filtreleme sonuçları **Tablo 4.3.**'te sunulmuştur. Eski yöntem ile homozigot varyant tablosunda 84 varyant kalmış iken yeni yöntemde kurumsal veri tabanımız içinde eleme de yapıldığı için bu sayı 34'e indirilmiştir.

**Tablo 4.3.** İndeks vaka 2'nin eski ve yeni filtreleme yöntemi ile elde edilen varyant sayılarının karşılaştırılması. Kalite skorları elemesinde kritik sınırlar okuma derinliği (*coverage*) için 5; *Phred* skoru için 30 olarak belirlenmiştir. MAF: Minor allel frekansı; MaxMAF: *Ion Reporter* yazılımındaki MAF, AMAF, EMAF, GMAF değerleri ile verilen farklı popülasyonlara göre 4 farklı MAF değerinden en büyüğü; HUMAF: Her bir varyant için veritabanı içerisinde hesaplanan MAF değeri (bu çalışmada filtreleme için  $HUMAF \leq 0,05$  değeri alınmıştır). Gevşek (*loose*) filtrelemede Shwachman-Diamond hastalık tanısı almayan diğer hastalıklara göre filtreleme yapılmaktadır ve gen içi ve dışı tüm değişiklikler alınmaktadır. Orta (*medium*) filtre ile *splice* bölge varyantları ile ekzonik sessiz olmayan varyantlar alınmaktadır.

Eski Filtreleme Yöntemi	Yeni Filtreleme Yöntemi
Toplam varyant: <b>45513</b>	Toplam varyant: <b>45513</b>
	<b>Kalite skorları</b> (coverage, Phred skoru gibi): <b>40052</b>
MAF<0,01: <b>4172</b>	maxMAF≤0,01: <b>3683</b>
Homozigot varyantlar: <b>367</b>	Homozigot varyantlar: <b>1337</b>
	<b>HUMAF: 187</b>
Ekzonik varyantlar: <b>123</b>	<b>*Farklı tanıya sahip bireylerde bulunmayan varyantlar: 164</b>
Protein yapısına etki eden varyantlar: <b>84</b> (sinonim olmayan varyantlar)	<b>Orta (Medium) homozigot: 45</b>
	<b>Homopolimer≤3: 34</b>

\*Bu aşamada filtreleme yaparken hastalık alt grubu olarak SDS seçilir ve SDS tanısı olmayan (Diamond-Blackfan anemisi, Fankoni anemisi, mikrootia gibi) hastalarda saptanmış olan varyantlar elenir.

Yeni filtreleme yönteminin güvenilir ve daha etkin bulunması nedeniyle diğer hastalarda WES analizleri yeni filtreleme yöntemi ile elde edilmiş varyant tablolarına göre yapılmıştır.

Varyant tabloları elde edildikten sonra kalan varyantlar tek tek .bam dosyasından IGV ile bakılarak gerçek mi yoksa okuma hatası mı oldukları değerlendirilmiştir. Gerçek olduğuna karar verilen varyantların daha sonra GnomAD'dan bakılarak sağlıklı popülasyonda bildirilip bildirilmediği göz önüne alınmıştır. GnomAD'da homozigot olarak bildirilen varyantlar elenmiştir. Homozigot değişiklikler için GnomAD'da en az bir tane homozigot görülmüş olması eleme için yeterli sayılmıştır. Bileşik heterozigotlukta allellerden bir tanesinde görülen değişiklik GnomAD'da yine en az bir bireyde homozigot olarak bildirilmiş ise eleme kapsamına alınmıştır. Tüm bu basamaklar sonucunda hastalıktan sorumlu olduğu düşünülen veya olası aday gen olarak değerlendirilen varyantın Sanger dizileme ile doğrulama çalışması yapılmıştır. Herhangi bir hastalıktan sorumlu veya güçlü aday gen saptanmayan hastalarda ise homozigot ve bileşik heterozigot filtrelemeyle elde edilen varyant tablolarının IGV ve GnomAD ile değerlendirilmeleri yapılarak son halleri oluşturulmuştur ve kalan varyantlar her birey için tablo şeklinde sunulmuştur. Ayrıca tüm hastalarda heterozigot varyantlar **EK 4**'te sunulan ve günümüzde kalıtsal kemik iliği yetmezlikleri ile ilişkilendirilen 116 gen açısından taranmıştır. Herhangi bir hastada belirtilen genler ile ilgili bir değişiklik saptanmamıştır.

## Bireylerin Klinik ve Moleküler Sonuçları

### İndeks Vaka 1 (TRSDS082\_17):

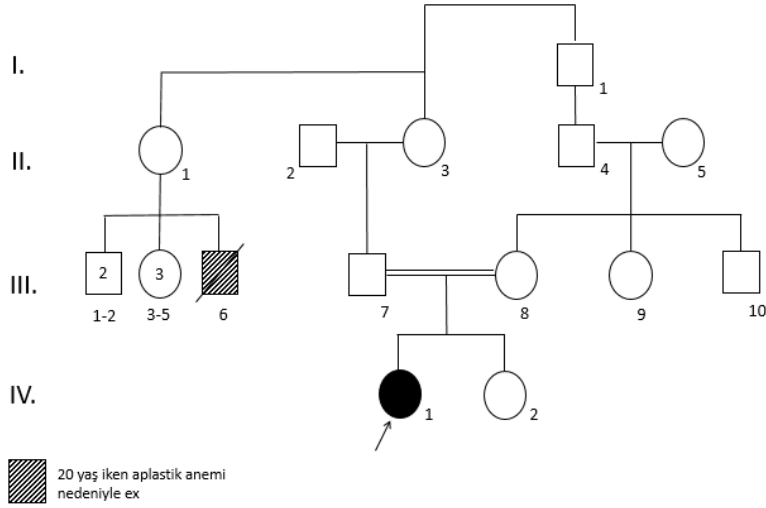
Prenatal ve natal dönemde özellik bulunmayan, Şubat 2014 doğumlu olan, anne ve babası arasında akrabalık bulunan ve 4-5 ay iken ishal, kilo alamama ve anemi şikayetleri nedeniyle araştırılan kız hastanın yapılan laboratuvar tetkiklerinde anemisinin ve aralıklı olarak nötropeni ve trombositopesinin olduğu saptanmıştır. Aile hikayesinde ileri aplastik anemi nedeni ile kaybedilen bir akrabasının bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.2.). İzlemde zaman zaman pansitopenik durumlarının da olduğu saptanan hastanın pansitopenik olduğu dönemde kan değerleri; Hb: 5,6 g/dL, ANS: 800-900/mm<sup>3</sup> ve Plt: 85000/mm<sup>3</sup> olarak bulunmuştur. Hikayesinde anemisi ön planda olan hastanın 3 yaşa kadar ortalama yılda 5 kez eritrosit süspansiyonu (ES) desteği aldığı öğrenilmiştir. Ayrıca hastanın izleminde ishallerinin devam etmediği ve FMF (*Familial Mediterranean Fever*, Ailevi Akdeniz Ateşi) nedeniyle de Çocuk Romatoloji bölümünde takipte olduğu ve kolşisin kullandığı öğrenilmiştir. FMF tanısını 3 yaş iken aldığı ve o dönemden itibaren Kolşisin-Lyrcya kullanmasının ardından ES ihtiyacının kaybolduğu (son 2 yıldır) öğrenilmiştir. Gelişim basamakları ise yaşlılarıyla uyumlu olarak bulunmuştur ve nöbet öyküsü olmadığı belirlenmiştir.

5,5 yaş iken yapılan fizik muayenede; boy: 104,5 cm (3-10p), VA: 17 kg (10-25p), BÇ: 50 cm (25p) olduğu belirlenmiştir. Yukarı eğilimli palpebral aralıklar, kısa burun köprüsü, kalkık burun ucu ve yüksek damak dışında dismorfik bulgu saptanmamıştır.

Pankreatik amilaz değeri düşük saptanan hastanın, kolonoskopi değerlendirmesi ve pankreas görüntülemesi ile ter testi (40 mmol/l) normal bulunmuştur. Yapılan kemik iliği aspirasyonunda; orta sellüler kemik iliği ve osteoblast, osteoklast ve plazma hücrelerinde artış olduğu saptanmıştır.

Hastanın kemik grafilerinde ise bilateral alt ekstremitelerde femur, her iki tibia ve fibulada kemiklerin diyafiz kısımlarında belirgin genişleme ve kortikal kalınlaşma, incelemeye dahil olan sol üst ekstremitede humerus, radius ve ulnada da diyafizyel genişleme, metakarpal kemiklerde ve falanksalarda genişleme olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.).

Hasta şu anda 5,5 yaşında olup herhangi bir şikayeti bulunmamaktadır.

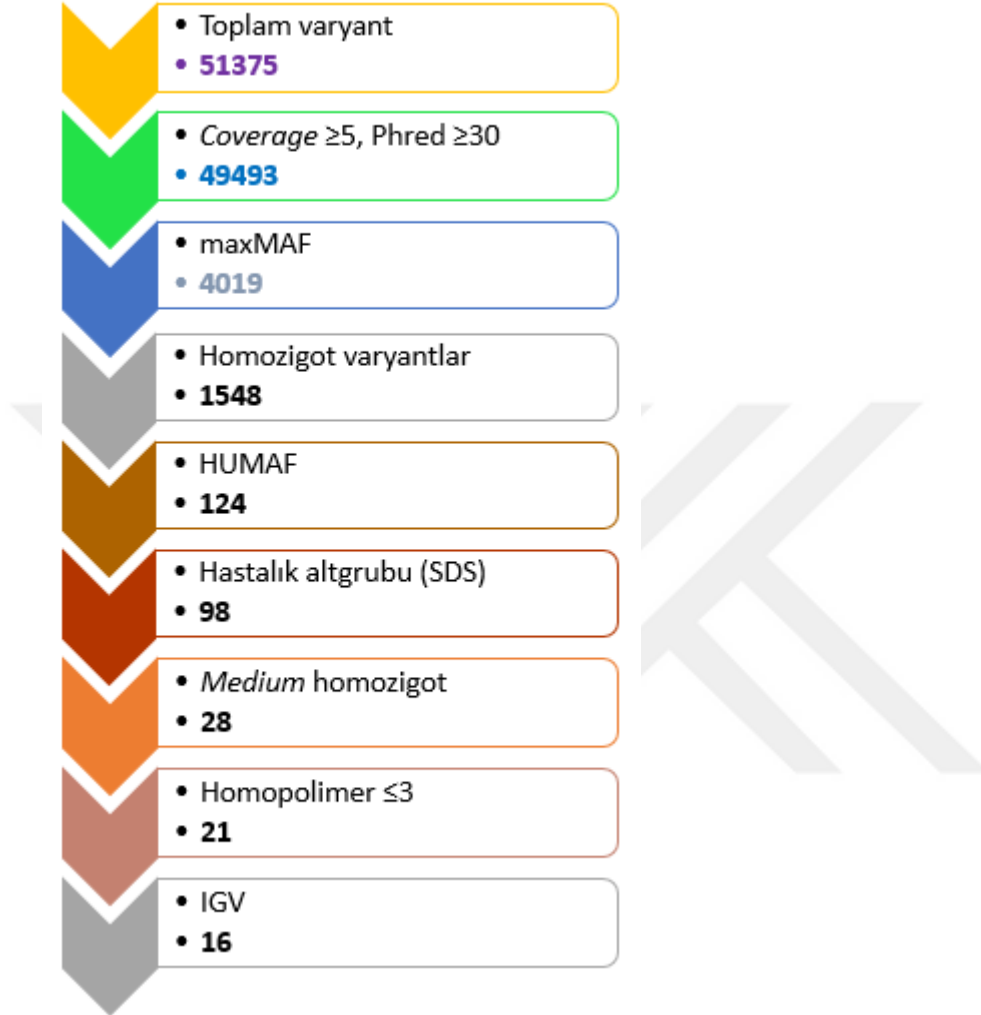


Şekil 4.2. TRSDS082\_17 numaralı bireyin pedigrisi.



Şekil 4.3. TRSDS082\_17 numaralı bireyin grafileri. Uzun kemiklerde genişleme ve diyafizyel kalınlaşma dikkat çekmektedir.

Hastanın aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre WES analizi değerlendirilmiştir.

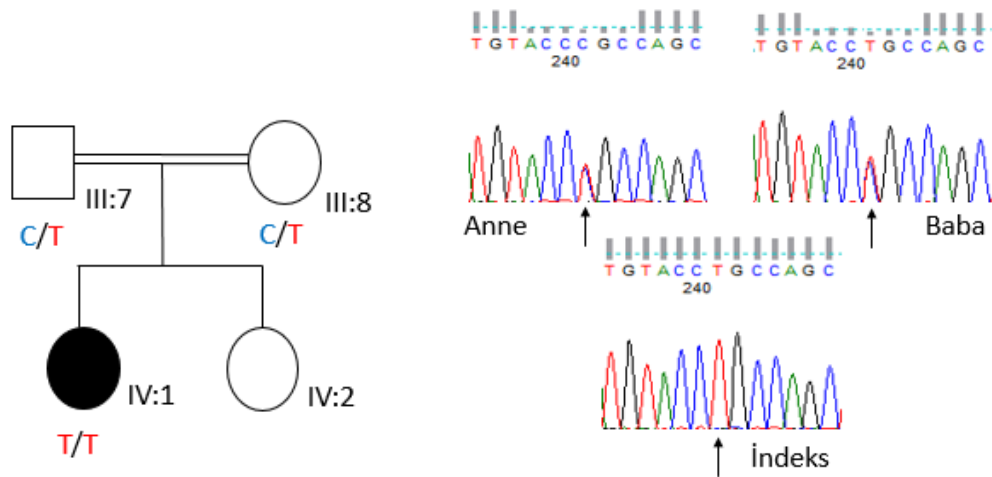


Şekil 4.4. TRSDS082\_17 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastada saptanan homozigot varyantlardan; **MEFV** c.2080A>G (p.Met694Val) *missense* değişikliği hastanın FMF tanısının genetik olarak doğrulanmasını sağlamıştır. Kalan homozigot varyantlar incelendiğinde sitopeni ile ilişkilendirilmiş 2 gen bulunduğu dikkat çekmiştir. Bunlardan **USB1** otozomal resesif kalıtım gösteren nötropeni ve poikiloderma birlikteliği (*Poikiloderma with neutropenia*, OMIM #604173) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Hastada cilt bulgusu olmadığı ve nötropeniden ziyade anemisi bulunması nedeniyle hastanın kliniğinden

sorumlu olmadığı düşünülmüştür. *USBI* geninde saptanan varyantın (c.335G>A, p.Arg112Gln) GnomAD'da heterozigot olarak 37 bireyde bildirildiği homozigot olarak ise hiç bildirilmediği görülmüştür; fakat varyantın *in silico* (Mutation Taster) değerlendirmesi “benign polimorfizm” olarak saptanmıştır. İkinci gen *TBXAS1* ise yine otozomal resesif kalıtım gösteren ve anemi ile birlikte iskelet bulgularının görüldüğü **Ghosal hematodiyafizyel sendrom (OMIM #231095)** fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. *TBXAS1* geninde 15. ekzonda saptanan c.1355C>T (p.Pro452Leu) varyantı GnomAD'da 7 bireyde heterozigot olarak bildirildiği homozigot olarak ise hiç bildirilmediği saptanmıştır. *In silico* (Mutation Taster) değerlendirme ile patojenik olduğu öngörülmüştür. Hasta, kliniği ile tekrar değerlendirildiğinde Ghosal hematodiyafizyel sendrom fenotipine uyduğu belirlenmiştir ve hastanın kemik bulguları Ghosal hematodiyafizyel displazi yönünden anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3.).

Bu nedenle saptanan varyantın Sanger dizileme ile validasyonu yapılmıştır. Ayrıca anne ve baba dizileme analizleri ile her ikisinin de heterozigot taşıyıcı oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.5.).



**Şekil 4.5.** *TBXAS1* c.1355C>T değişikliğinin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.



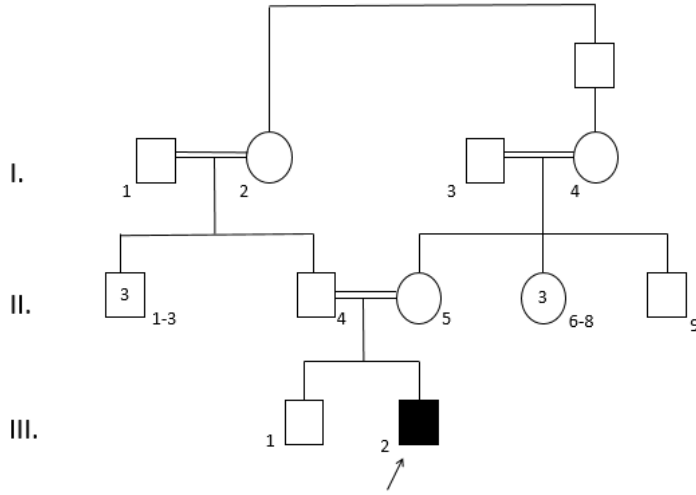
## İndeks Vaka 2 (TRSDS081\_16):

Mart 2008 doğumlu, anne ve babası arasında akrabalık bulunan ve 7 ay iken büyüme-gelişme geriliği nedeniyle araştırılan erkek hastanın yapılan laboratuvar tetkiklerinde pansitopenisinin olduğu ve bu dönemde kan değerleri; Hb: 6,6 g/dL, ANS: 400-700/mm<sup>3</sup> ve Plt: 33000/mm<sup>3</sup> şeklinde saptanmıştır. Sık enfeksiyon öyküsü bulunmayan hastanın zaman zaman ES ihtiyacı olduğu ve şu an 11 yaşında olan hastanın bir yıldır ES almadığı belirlenmiştir. Steatoresi bulunan hastanın 1,5 yaş iken pankreas yetmezliği tespit edildiği, Çocuk Gastroenteroloji bölümünde pankreas yetmezliği nedeniyle takipte olduğu ve Kreon kullandığı saptanmıştır. Ağrıya duyarsız olan hastanın CIPA (*Congenital Insensitivity to Pain with Anhydrosis*) ön tanısı ile Çocuk Nörolojide izlendiği, ayrıca self mutilasyonlarının olduğu ve bu nedenle Çocuk Ruh Sağlığı takibinde Risperdal kullandığı, self mutilasyon sonucu sol alt ekstremitesinde kemik kırığı olduğu öğrenilmiştir. Bebeklik döneminde hipotonisitesi olan hastanın gelişim basamaklarının yaşlarından belirgin geri olduğu, 1,5 yaşından itibaren özel eğitim aldığı ve baş kontrolünün 2 yaş, yürümesinin 3 yaş iken kazanıldığı, konuşmasının ise olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca kendi başına yemek yiyemediği ve tuvalet eğitiminin olmadığı öğrenilmiştir. Nöbet öyküsü olmayan hastanın ayrıca yutma disfonksiyonu bulunduğu saptanmıştır.

11 yaş 3 ay iken yapılan fizik muayenede; boy: 115 cm (<3p, 3p: 131 cm), VA: 23 kg (<3p, 3p: 27 kg), BÇ: 50,5 cm (boya göre 25p) olarak bulunmuştur. Dismorfik bulgular olarak; kaba yüz, belirgin alın, hipoplazik kulak memeleri, geniş ve dağınık kaşlar, yukarı eğilimli palpebral aralıklar, derin yerleşimli gözler, hafif epikantus inversus, kısa, geniş ve deforme burun köprüsü (burun kemiğini kırmış), kısa filtrum, anormal avuç içi çizgilenmeleri, brakidaktili ve *tapered* parmaklar tespit edilmiştir.

Hastanın yapılan kemik iliği aspirasyonunda; sellüler kemik iliği olduğu ve miyeloid duraklamanın, hemofagositoz, ring sideroblast ve vakuolizasyonun ise olmadığı saptanmıştır. Abdominal USG normal bulunan hastanın abdomen BT'sinde pankreas parankimi normalden ince, atrofik, parankim içinde yağ infiltrasyonu ile uyumlu hipodens milimetrik alanlar (SDS ile uyumlu) saptanmıştır. Radyografik görüntülemelerinde sağ kalça ekleminde dislokasyon, sol kalça ekleminde ise sublüksasyon bulunan hastanın ayrıca sol tibia ve fibulasında kırıklara sekonder yeni

kemik formasyonlarıyla uyumlu kemik oluşumu izlenmiştir. Dış merkezde yapılan kranial görüntülemesinin ve ekokardiyografisinin normal olduğu sözel olarak öğrenilmiştir. İşitme ve görmesi normal olarak değerlendirilen hastanın self mutilasyon nedeniyle gözlerinde keratit olduğu belirlenmiştir.

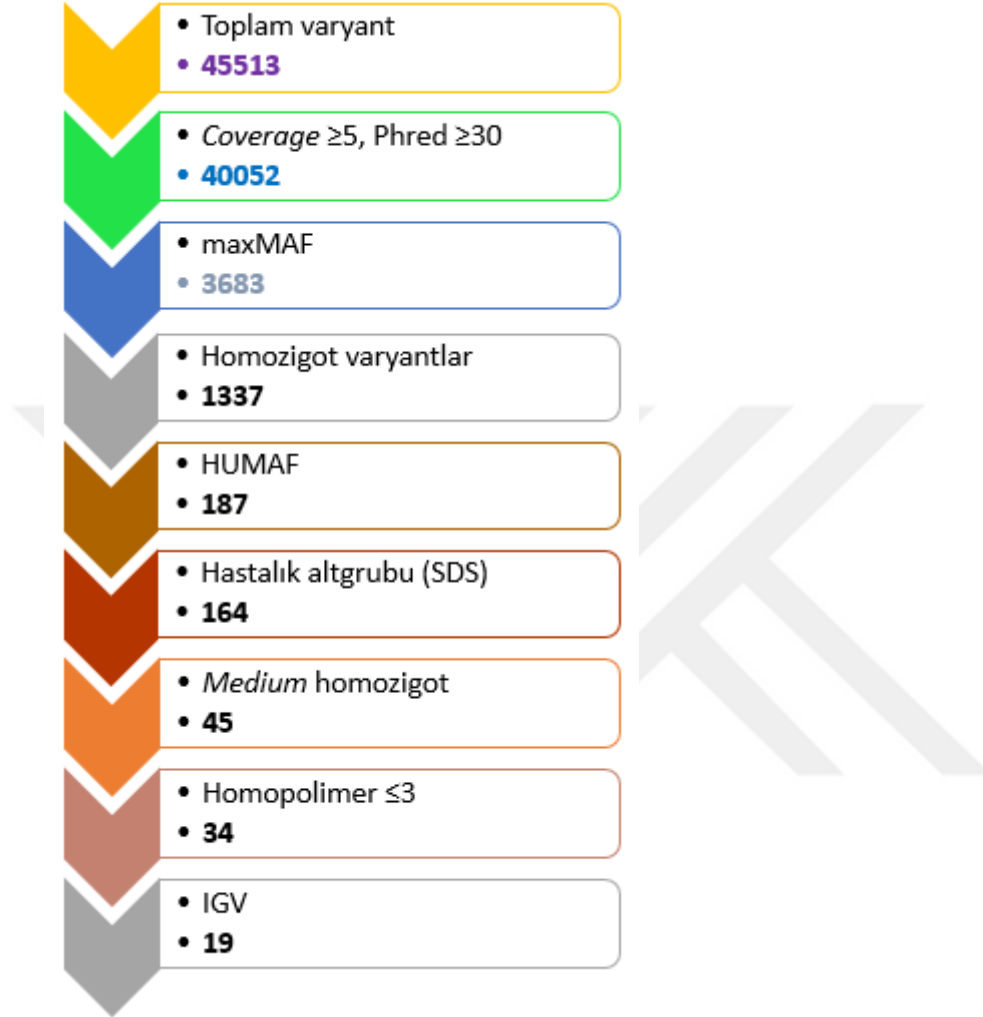


Şekil 4.6. TRSDS081\_16 numaralı bireyin pedigrisi.



Şekil 4.7. TRSDS081\_16 numaralı bireyin grafileri. Sağ kalça ekleminde dislokasyon, sol kalça ekleminde ise sublüksasyon dikkat çekmektedir. Sol tibia ve fibulada orta diyafiz kesiminde birbiri ile köprüleşme yapan kemik oluşumu izlenmektedir.

Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. TRSDS081\_16 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Akrabalık göz önüne alınarak hastaya ve sağlıklı erkek kardeşine genom boyu homozigot bölgeleri belirlemek amacı ile Affymetrix 250K Nsp I kesim enzimi ile SNPChip analizi uygulanmıştır. Genom boyu homozigot bloklar VIGENOS programı ile tespit edilmiştir. Eş zamanlı olarak WES analizi yapılmış ve filtreleme basamakları uygulanmıştır. Genomda tespit edilen homozigot bloklara düşen kritik varyantlar tespit edilerek aday genler belirlenmiştir. Homozigotluk haritalaması ile eşleştirilen aday genler Tablo 4.4.'te sunulmuştur.

**Tablo 4.4.** İndeks vaka 2'nin homozigotluk haritalaması

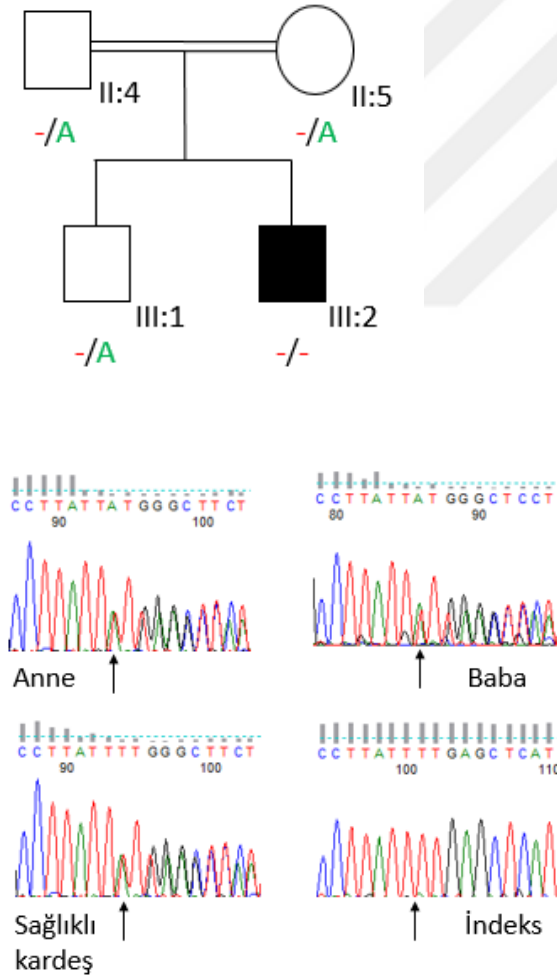
CHR	Bölge	SNP genotipleme Başlangıç (rs) (GrCH 37/Hg19)	SNP genotipleme Bitiş (rs) (GrCH 37/Hg19)	WES analizinde saptanan genler	Gen bilgisi-fenotip / Varyant rs ve bilgiler
1	Bölge 1 p36.23-p36.13	rs914999 hg19:8990311	rs1192618 hg19:18336903		
1	Bölge 2 p35.1-p32.3	rs12029535 hg19:34383662	rs11206237 hg19:54356361	<b>MAP7D1</b>  <b>ORC1</b>	MAP7D1: Mikrotübül ilişkili protein rs368982084 GnomAD: het: 49 hom: 0  ORC1: Meier-Gorlin sendrom 1 (OMIM #224690), otozomal resesif rs61756136 GnomAD: het: 290 <b>hom: 1</b>
1	Bölge 3 q23.3-q25.1	rs182269 hg19:165436456	rs4650704 hg19:175118923		
2	q23.1-q31.1	rs7592576 hg19:148839547	rs11693430 hg19:171106816	<b>DPP4</b>  <b>SCN9A</b>	DPP4: Dipeptidil peptidaz 4 rs200298322 GnomAD: het: 7 hom: 0  SCN9A: <i>Insensitivity to pain, congenital</i> (OMIM #243000), otozomal resesif GnomAD: het: 0 hom: 0
5	q15-q21.3	rs3777220 hg19:95098825	rs446774 hg19:106861796		
9	q31.1-q32	rs10991509 hg19:107819715	rs4375078 hg19:115910023		
11	p13-q12.3	rs4307693 hg19:33903882	rs7928792 hg19:61698488	<b>TNKS1BP1</b>	TNKS1BP1: Tankiraz 1-bağlayıcı protein 1 rs143166487 GnomAD: het: 385 <b>hom: 1</b>
12	p13.31-p13.2	rs7973211 hg19:8116021	rs4763531 hg19:10738298	<b>PHC1</b>	PHC1: ?Mikrosefali 11, primer, otozomal resesif (OMIM #615414) rs201210657 GnomAD: het: 874 <b>hom: 6</b>
13	q32.3-q33.3	rs9513515 hg19:99596450	rs9558798 hg19:107274242		
14	Bölge 1 q12-q21.2	rs7146681 hg19:33254248	rs807326 hg19:45185840		
14	Bölge 2 q31.2-q32.12	rs17118908 hg19:84126127	rs876561 hg19:91944911		
16	p12.1-p12.1	rs7593 hg19:24583406	rs2204118 hg19:26801513		
18	q21.31-q22.3	rs17064502 hg19:55898088	rs878202 hg19:70713037		

\*Tabloda sarı renk ile işaretlenmiş genler hastanın fenotipinden sorumlu olası genler olarak değerlendirilmiştir.

Homozigotluk haritalaması sonucu 19 olan varyant sayısı 6'ya indirilmiştir. Bu varyantlardan *ORC1*, *TNKS1BP1* ve *PHC1* genlerinde saptanan varyantların GnomAD'da homozigot bildirilmiş oldukları görülmüştür.

Kalan 3 varyantın (*MAP7D1*, *DPP4*, *SCN9A*) ise anne, baba, sağlıklı kardeş ve hastada Sanger dizileme ile validasyonu ve segregasyon çalışmaları yapılarak doğrulanmıştır (Şekil 4.9. ve 4.10.).

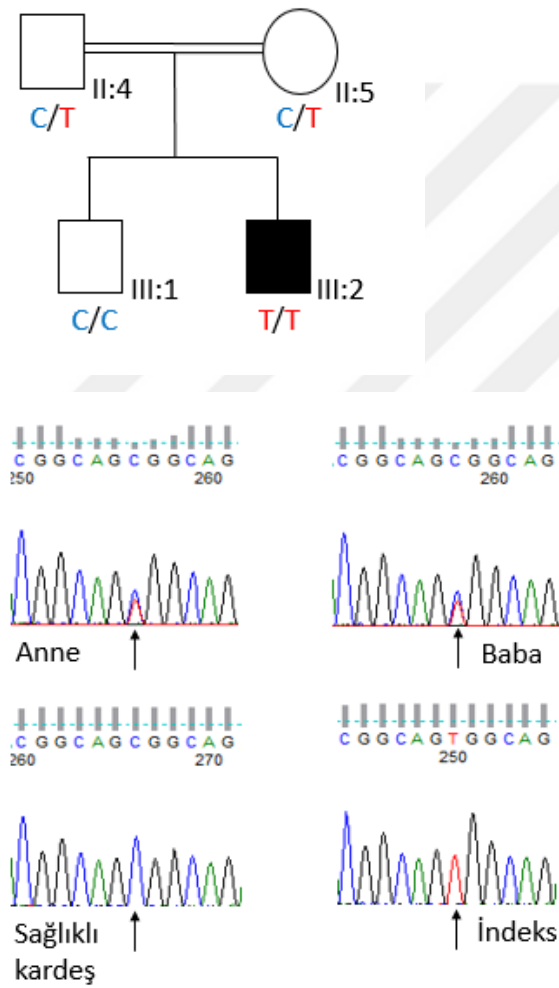
*SCN9A* (*Insensitivity to pain, congenital*, OMIM #243000)'da 17. ekzonda saptanan c.2868delA (p.Leu956Phefs\*2) varyantı hastanın ağrıya duyarsızlığı ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.9.** *SCN9A* c.2868delA değişikliğinin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.

Kalan 2 varyantın da Sanger ile validasyonu ve segregasyonu sağlandıktan sonra *in silico* analizler ile (PredictSNP) patojeniteleri araştırılmıştır ve **MAP7D1** geni öncelikli aday gen olarak belirlenmiştir.

Aday gen	Saptanan varyant	PredictSNP sonucu
<b>MAP7D1</b>	c.601C>T (p.Arg201Trp)	%87 <b>deleterious</b>
<b>DPP4</b>	c.1876A>G (p.Ile626Val)	%74 <b>neutral</b>



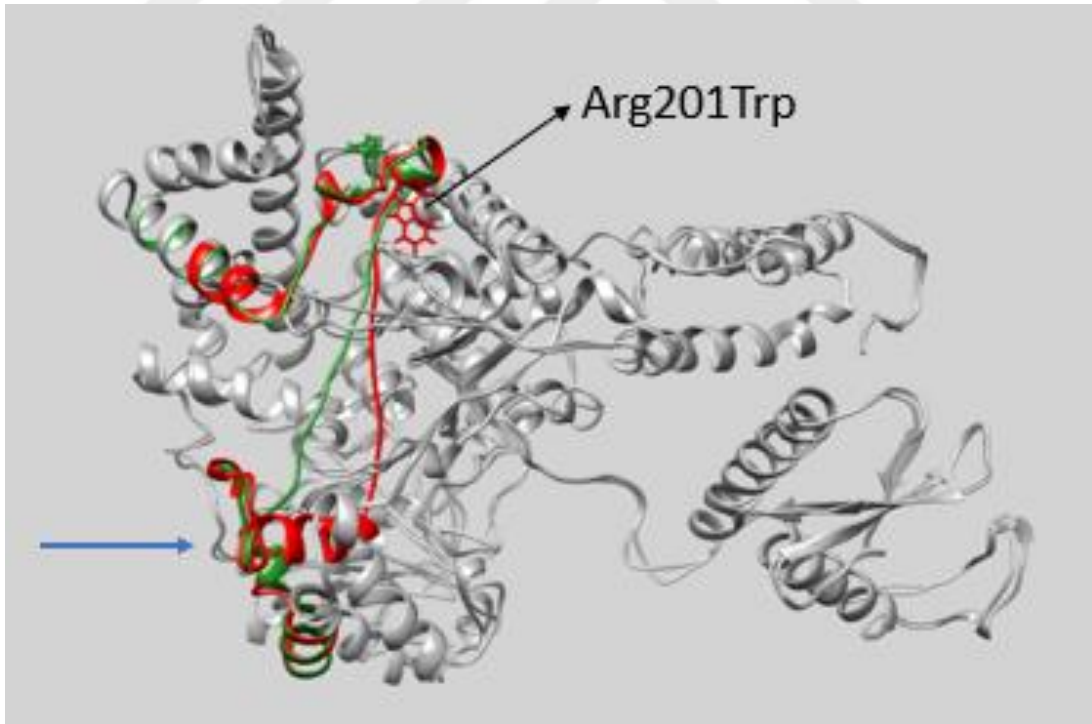
**Şekil 4.10.** **MAP7D1** c.601C>T değişikliğinin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.

MAP7D1, mikrotübül ilişkili protein ailesi 7 grubunun bir üyesi olup günümüzde herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmemiştir. Kristalografik olarak protein modellemesinin de bulunmaması nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Biyoinformatik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Ceren Sucularlı ile MAP7D1 proteininin *in silico* olarak üç boyutlu modellemesi yapılmıştır. *Wild type* ve mutant protein modellemeleri yapılarak mutasyonun proteinin üç boyutlu yapısını değiştirdiği görülmüştür (Şekil 4.9.A). Ayrıca tübülün ile *docking* çalışmaları yapılarak mutant proteinin olası bağlanma bölgesinin değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.9.B).

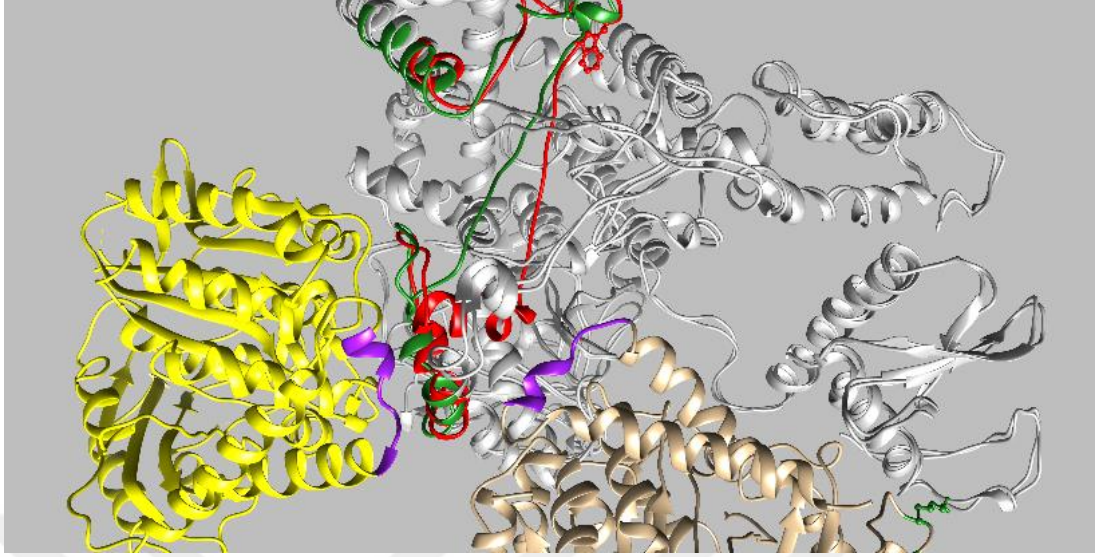
### MAP7D1 Protein Modellemesi:

Modelleme görüntüleri bu tez kapsamında oluşturulmuştur.

A)



B)



**Şekil 4.11. A)** MAP7D1 proteinin *in silico* olarak yapılan üç boyutlu protein modellemesi. Yeşil renk *wild-type* MAP7D1 proteinini, kırmızı renk ise mutant MAP7D1 proteinini (p.Arg201Trp) göstermektedir. Bazik bir aminoasit olan arjininin hidrofobik ve halkasal yapıda olan triptofan ile değişimi, proteinin bu bölgesinde polipeptid zincirinde içeriye doğru katlanmasına neden olduğu görülmektedir. Bu durum ilginç olarak ise mutant proteinin mutasyondan uzak bir bölgede (mavi ok ile gösterilen bölge) üç boyutlu yapıyı belirgin olarak değiştirmektedir. **B)** MAP7D1 proteinin tübülün ile olan *docking* çalışması. *Wild-type* (wt) MAP7D1 proteini (yeşil) ile tübülünin (sarı) en olası ilişki şekli *docking* çalışması ile gösterilmiştir. Mutant-MAP7D1 (kırmızı) ile tübülün (bej) en olası ilişki şekli wt-MAP7D1'den farklılık göstermektedir. Bu durum *docking* modellemesinde mutant MAP7D1'in tübülün ile doğal ilişkisinin bozulduğuna işaret etmektedir.

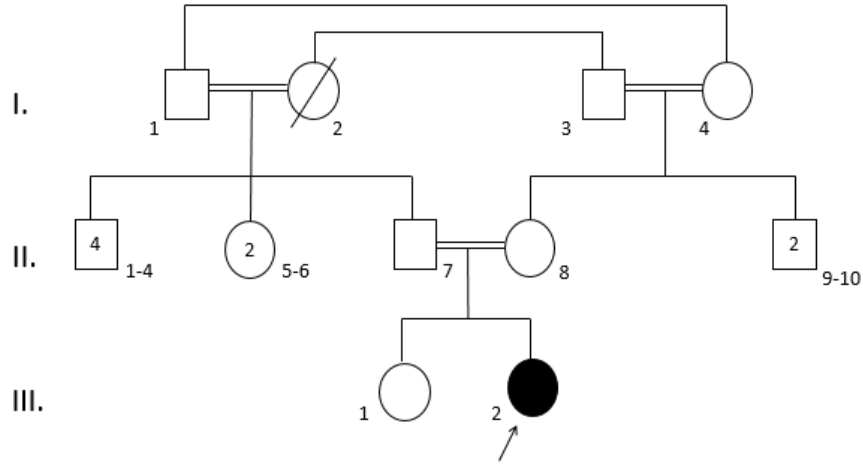


### İndeks Vaka 3 (TRSDS016\_03):

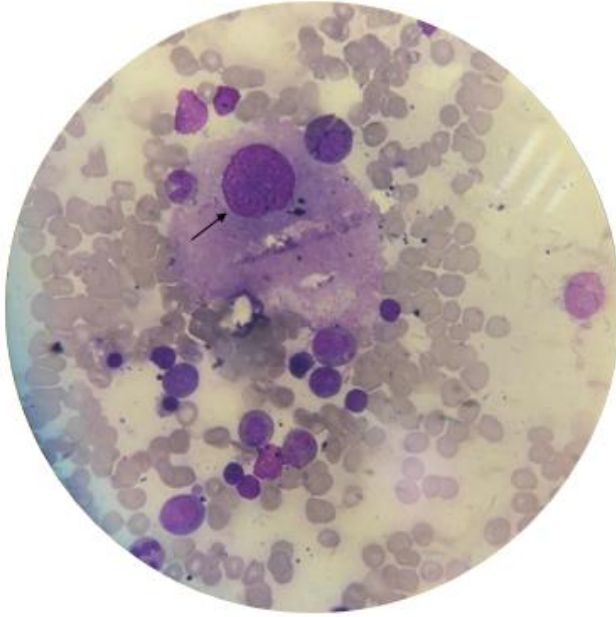
Aralık 2007 doğumlu olan, anne ve babası arasında akrabalık bulunan kız hastanın yenidoğan döneminde bez bölgesinde peteşiler nedeniyle yapılan laboratuvar tetkiklerinde; trombositopenisinin olduğu, nötropenisinin olmadığı ve aralıklı olarak da hafif bir anemisinin bulunduğu (Hb: 9,1 g/dL, ANS: 2400/mm<sup>3</sup>, Plt: 70000-80000/mm<sup>3</sup> olarak) saptanmıştır. İleri anne yaşı (38 yaş) bulunan hastanın prenatal dönemde üçlü tarama testinin trizomi 21 açısından yüksek riskli geldiği fakat ailenin prenatal tanı yaptırmadığı ve natalinde herhangi bir sorun olmadığı öğrenilmiştir. Dört-beş yaş iken steatoresi farkedilen hastanın pankreas yetmezliği bulunduğu, bu nedenle Çocuk Gastroenteroloji’de takipte olduğu ve Kreon kullandığı tespit edilmiştir. Hastanın 2 yaşında ASD nedeniyle opere edildiği ve Çocuk Kardiyoloji’de takipte olduğu saptanmıştır. Gelişim basamakları yaşıtları ile uyumlu olan hastanın okul başarısının iyi olduğu ve nöbet öyküsü, davranış problemi olmadığı öğrenilmiştir.

11,5 yaşında yapılan fizik muayenede; boy: 141 cm (10-25p), VA: 34 kg (10-25p), BÇ: 52 cm (25p) olarak belirlenmiştir. Hafif sinofris, aşağı yerleşimli kolumella, bilateral el 5. parmaklarda klinodaktili, sağ el 4. metakarpta kısalık, kubitus valgus, göğüs ön duvarında insizyon skarı ve dinlemek ile 3/6 sistolik üfürümü olduğu saptanmıştır.

Kemik iliği aspirasyonunda hafif yağlanma artışı ile birlikte sellüler olduğu, granülositer seri elemanlarının normal olduğu, hemofagositoz olmadığı, megakaryosit sayısında belirgin azalma ile boyutunun küçük ve nükleus lobulasyonunun az olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11.). Abdominal USG’de minimal splenomegali ve aksesuar dalak saptanan hastanın abdomen BT görüntülemesinde pankreas hipoplazisi ve splenomegalisi bulunduğu tespit edilmiştir. Hastanın radyografik görüntülemelerinde ise herhangi bir patoloji saptanmamıştır.

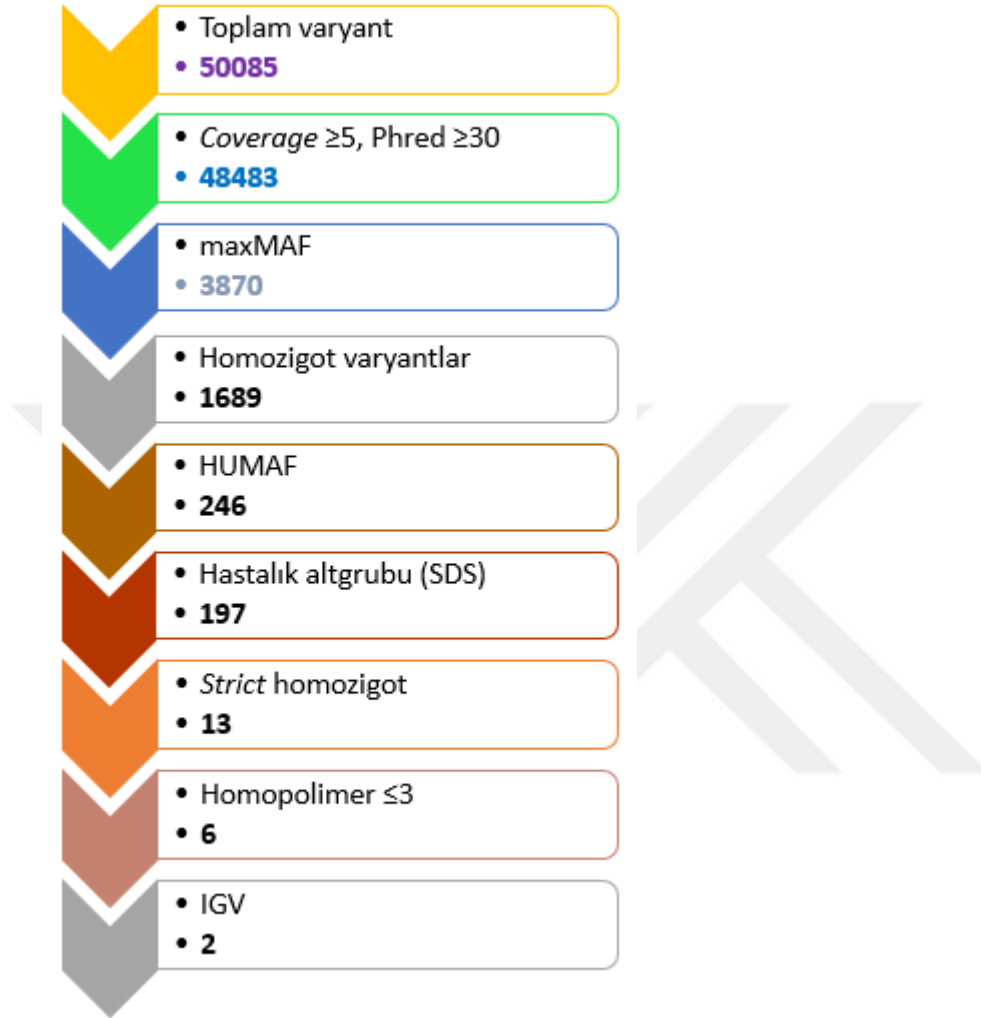


**Şekil 4.12.** TRSDS016\_03 numaralı bireyin pedigrisi.



**Şekil 4.13.** TRSDS016\_03 numaralı bireyin kemik iliği yaymasında görülen megakaryosit. Boyutunun küçük olması ve nükleus (ok işareti ile gösterilmektedir) lobulasyonunda belirgin azalma dikkat çekmektedir.

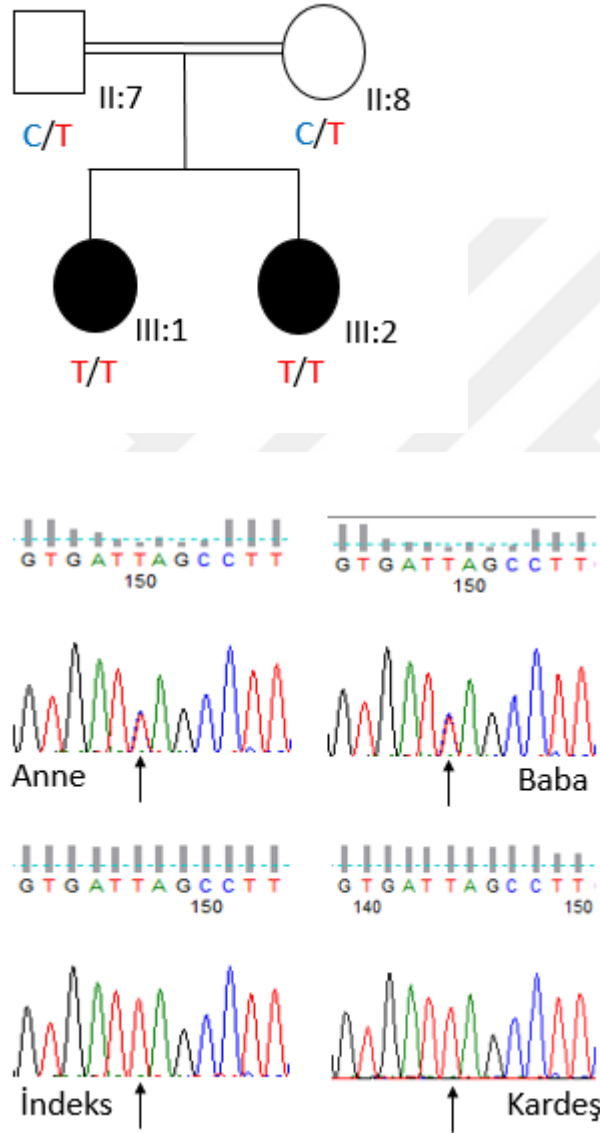
Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.14. TRSDS016\_03 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastada saptanan homozigot varyantlar fonksiyon kaybı yapması açısından önceliklendirilerek (*strict* homozigot filtreleme) değerlendirildiğinde saptanan 15 varyantın homopolimer ve IGV’de doğrulama aşamalarından sonra iki tane kritik varyanta indiği görülmüştür. Bu varyantlardan *ATP2C2* geninde saptanan c.2482-2A>C *splice site* değişikliğinin GnomAD’da 21 bireyde homozigot olarak bildirildiği görülmüştür. Hastada saptanan diğer varyant olan *UNC13B* 3. ekzonundaki c.124C>T (p.Gln42Ter) *nonsense* değişikliğinin ise daha önce hiç bildirilmediği saptanmıştır ve

Sanger ile doğrulaması yapılmıştır (Şekil 4.15.). Hastada *medium* homozigot filtreleme ile elde edilen varyant tablosunda IGV ve GnomAD'la değerlendirilmesinden sonra kalan toplam 22 varyanttan olası aday gen belirlenemediği için daha önce hiç bildirilmemiş olan bu *nonsense* değişiklik olası kritik varyant olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.15. *UNC13B* c.124C>T değişikliğinin pedigrinde segregasyonu ve sekans elektroferogram görüntüleri.

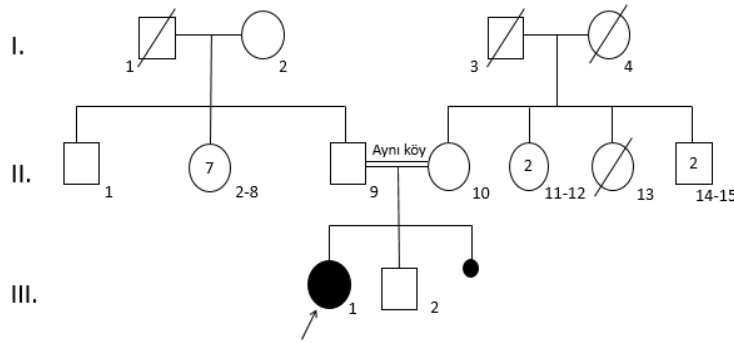
Daha sonra segregasyon çalışmasını genişletmek amacıyla hastanın sağlıklı olarak bildirilen kız kardeşine de Sanger yöntemiyle belirtilen *nonsense* değişiklik açısından dizileme çalışması yapılmıştır. Dizileme analizi sonucunda aynı varyant homozigot olarak sağlıklı kardeşte de saptanmıştır. Bu nedenle 26 yaşında olan hastanın ablası da muayeneye çağrılarak ayrıntılı değerlendirilmesi yapılmıştır. Ayrıntılı tetkikler sonucunda ablada da hafif bir trombositopeni bulunduğu ( $132000/\text{mm}^3$ ), anemisi ve nötropenisinin bulunmadığı, periferik yaymasında herhangi bir patoloji olmadığı, ekzokrin pankreatik yetmezlik açısından yapılan tetkiklerinde ise fekal elastaz düzeyinde ve A, D ve E vitamin düzeylerinde düşüklük saptanmıştır. Fekal elastaz düzeyinin normal aralığı  $>200 \mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmişken hastada  $<15 \mu\text{g/ml}$  değerle fekal elastazda belirgin azalma görülmüştür. Pankreatik amilaz düzeyi ise alt sınırdan normal olarak bulunmuştur. Yapılan abdominal ultrasonografik değerlendirmede ise hafif splenomegali ve pankreas ekojenitesinde diffüz minimal artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca anamnezinden daha önce kilo alamama şikayetiyle dış merkeze başvurduğu ve bu merkez tarafından Kreon başlandığı fakat ablanın kendi isteği ile Kreon kullanmadığı öğrenilmiştir. Tüm bu incelemeler sonucunda sağlıklı olarak bildirilen ablanın da etkilenmiş olduğu ve bulgularının kız kardeşine göre daha hafif olması nedeniyle sağlıklı olarak değerlendirildiği düşünülmüştür.

#### **İndeks Vaka 4 (TRSDS167\_45):**

Mayıs 2010 doğumlu, anne ve babası arasında akrabalık tanımlanmayan ancak aynı köy doğumlu olmaları nedeniyle uzak akrabalık bulunabileceği not edilen kız hastanın ilk kez 2 yaşında iken dış merkezde kabızlık şikayeti nedeniyle yapılan tetkikleri sırasında nötropenisi olduğu saptanmıştır. Anemisi ve trombositopenisi bulunmayan ve sık hastalanma öyküsü olmayan hastanın ANS:  $200-300/\text{mm}^3$  olarak bulunmuş olup farklı değerlendirmelerde ilgili değerler çok düşük "0" olarak saptandığı da görülmüştür. Prenatal ve natalinde herhangi bir özellik olmadığı öğrenilmiştir. İshal, steatore şikayetleri olmayan hastanın gelişim basamaklarının yaşitlarıyla uyumlu ve okul başarısının iyi olduğu öğrenilmiştir. Ayrıca davranış problemi de olmadığı belirlenmiştir.

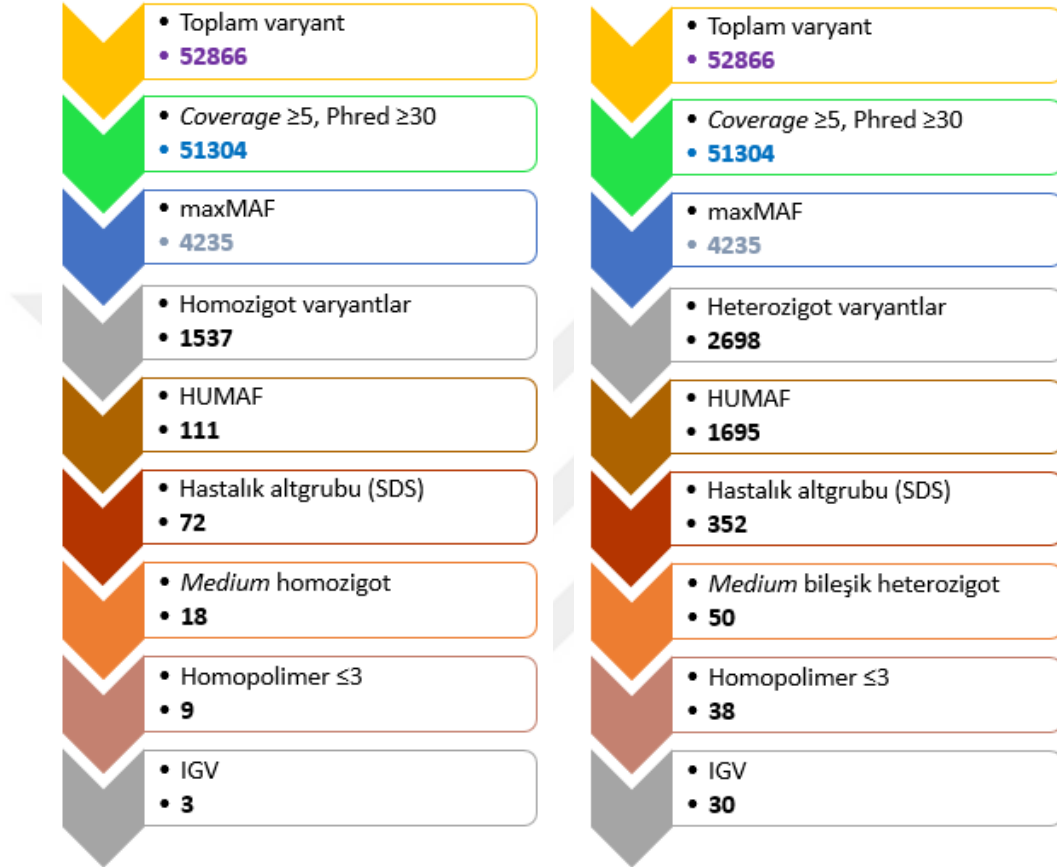
9 yaş 3 ay iken yapılan fizik muayenede; boy: 127,5 cm (10-25p), VA: 25 kg (10-25p), BÇ: 51 cm (10-25p) olarak bulunmuştur. Uzun yüz, bilateral pes planus, ayak 2-3. parmaklarda parsiyel kutanöz sindaktili dışında dismorfik bulgu saptanmamıştır.

Hastanın yapılan kemik iliği aspirasyon sonucu; sellüler, histiyositler artmış, dejenere nükleusları olan, displazi görülen, megakaryositleri artmış kemik iliği şeklinde bulunmuştur. Konjenital nötrojeni açısından dış merkezde yapılan genetik testleri ise normal olarak sonuçlanmıştır. Abdominal USG ve kemik grafileri ise normal olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.16. TRSDS167\_45 numaralı bireyin pedigrisi.

Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir. Homozigot filtreleme sol, bileşik heterozigotluğa göre filtreleme sağ tarafta yer almaktadır.



Şekil 4.17. TRSDS167\_45 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastanın kalan varyantları GnomAD veritabanında homozigot bulunmalarına göre elenerek homozigot değişiklik saptanan 2 gen ve bileşik heterozigotluğun bulunduğu toplam 7 gen aday olarak belirlenmiştir. İlgili genlerin dökümü aşağıda Tablo 4.5.'te sunulan öncelik belirleme tablosunda gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** İndeks 4'ün homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<b>Homozigot varyantlar</b>					
<i>DNAH7</i>	<i>Dynein, axonemal, heavy chain 7</i>	c.2516C>G (p.Pro839Arg)	Het: 25, hom: 0	<b>9P1B</b> *Sanger ile valide Anne ve sağlıklı kardeş hom. Segregasyon uymuyor	ELENDİ
<i>FCHO2</i>	<i>FCH domain only protein 2</i>	c.1481A>G (p.Asn494Ser)	Het: 14, hom: 0	<b>2P8B</b> *Sanger ile valide Segregasyon uyuyor	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<b>Bileşik heterozigot varyantlar</b>					
<i>CNTRL</i> ( <i>CEP1</i> )	<i>Centrosomal protein 1</i>	c.4907C>A (p.Thr1636Asn) ve c.6580G>A (p.Glu2194Lys)	Het: 36, hom: 0 Het: 42, hom: 0	<b>1P10B</b> <b>1P9B</b> *Sanger ile valide Anne her 2 varyantı taşıyor, baba normal	ELENDİ
<i>ENPP7</i>	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 7</i>	c.1217T>C (p.Leu406Pro) ve c.1310C>A (p.Pro437His)	Het: 3, hom: 0 Het: 0, hom: 0	<b>1P7B</b> <b>2P8B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>HK3</i>	<i>Hexokinase 3</i>	c.2089C>T (p.Arg697Trp) ve c.707C>T (p.Pro236Leu)	Het: 12, hom: 0 Het: 80, hom: 0	<b>6P3B</b> <b>1P8B</b>	
<i>HRNR</i>	<i>Hornerin: epidermal protein</i>	c.2203C>G (p.Gln735Glu) ve c.1318G>A (p.Gly440Ser)	Het: 0, hom: 0 Het: 15, hom: 0	<b>1P10B</b> <b>1P10B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)



**Tablo 4.5. Devam.** İndeks 4'ün homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<i>ITPR3</i>	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3</i> - <i>Diabetes, type 1, susceptibility to (OR)</i>	c.197C>T (p.Ser66Leu) ve c.1468G>A (p.Gly490Arg)	Het: 3, hom: 0 Het: 2, hom: 0	<b>11P</b> <b>10P1B</b>	
<i>VPS13D</i>	<i>Vacuolar protein sorting 13, yeast, homolog of, D</i> - <i>Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 4</i>	c.6464G>A (p.Cys2155Tyr) ve c.10288G>A (p.Glu3430Lys)	Het: 0, hom: 0 Het: 4, hom: 0	<b>8P2B</b> <b>4P6B</b>	ELENDİ (fenotip uygun değil)
<i>DNAH9</i>	<i>Dynein, axonemal, heavy chain 9</i> - <i>Ciliary dyskinesia, primary, 40 (OR)</i>	c.4295G>A (p.Gly1432Asp) c.9337G>A (p.Val3113Met)	Het: 118, hom: 0 Het: 40, hom: 0	<b>2P8B</b> <b>5P4B</b>	ELENDİ (fenotip uygun değil)

P: Patojenik; B: Benign

\*Sekans elektroferogram görüntüleri için **EK 5**'e bakınız.

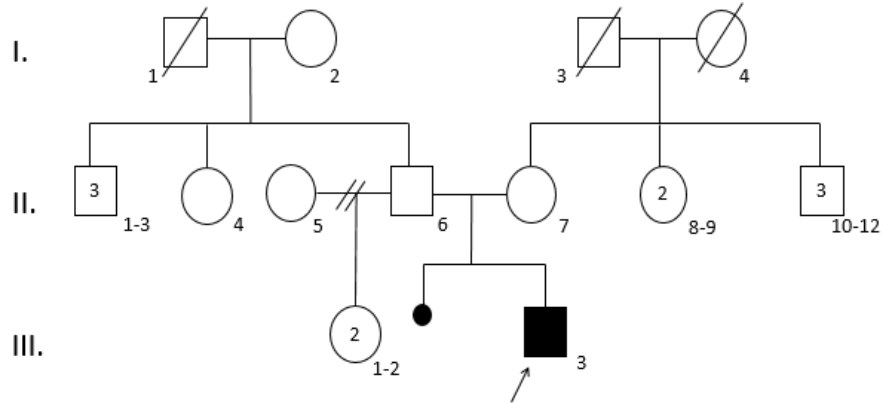
### İndeks Vaka 5 (TRSDS156\_42):

Mayıs 2015 doğumlu, anne ve babası arasında akrabalık bulunmayan ve ilk kez 1,5 yaşında iken ateşsiz nöbet geçirdiği sırada yapılan tetkikleri sırasında nötropenisi farkedilen erkek hastanın ANS: 200/mm<sup>3</sup> olarak saptanmıştır. Prenatal döneminde özellik olmayan hastanın 47 yaşındaki anneden ve 57 yaşındaki babadan IVF gebelik sonucu olduğu ve preeklampsi nedeniyle 32 haftalık 1570 gr C/S ile doğduğu, sonrasında 1 ay küvözde solunum cihazına bağlı olarak izlendiği öğrenilmiştir. Anemisi ve trombositopenisi bulunmayan hastanın nötropenisi için 4 kez G-CSF aldığı ve 4 yaş iken yapılan tetkiklerinde nötropenisinin düzelmiş (ANS: 5000/mm<sup>3</sup>) olduğu belirlenmiştir. İshal şikayeti olmayan hastanın bebekliğinden itibaren kabızlık şikayeti olduğu saptanmıştır. Ayrıca amniyotik bant nedeniyle 4 kez opere edildiği ve gelişim

basamaklarının yaşlılarıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir. İlk nöbetinden başka nöbet öyküsünün olmadığı ve herhangi bir ilaç kullanmadığı öğrenilmiştir.

4 yaş 3 ay iken yapılan fizik muayenede; boy: 108 cm (75-90p), VA: 18,8 kg (75-90p), BÇ: 50,5 cm (25-50p) olarak bulunmuştur. Dismorfik bulgular olarak; dolikosefali, bitemporal darlık, gri-mavi sklera, epikantus, uzun filtrum, dişlerde diskolorasyon-hipoplazi?, hafif yüksek damak ve mikrognati saptanmıştır. Ayrıca ellerde ve bacaklarda amniyotik bantlar nedeniyle oluşmuş çeşitli deformiteler belirlenmiştir. Sol el parmaklarında yapışıklık (ameliyat ile düzeltilmiş), sağ el parmaklarında boğumlar, bilateral bacaklarda ameliyat skarları, ayak parmaklarında şekil bozukluğu ve sol bacakta sağa göre yaklaşık olarak 2-3 cm'lik kısalık tespit edilmiştir.

Kemik iliği aspirasyonunda; sellüler kemik iliği, duraklama izlenmeyen, yağlanma artışı olan, megakaryositlerin artmış olduğu saptanmıştır. Abdominal USG'si normal bulunan hastanın radyografik görüntülemelerine ise ulaşamamıştır.



**Şekil 4.18.** TRSDS156\_42 numaralı bireyin pedigrisi.

Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir. Homozigot filtreleme sol, bileşik heterozigotluğa göre filtreleme sağ tarafta yer almaktadır.



Şekil 4.19. TRSDS156\_42 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastanın kalan varyantları GnomAD veritabanında homozigot bulunmalarına göre elenerek homozigot değişiklik saptanan 3 gen ve bileşik heterozigotluğun bulunduğu toplam 3 gen aday olarak belirlenmiştir. İlgili genlerin dökümü aşağıda Tablo 4.6.'da sunulan öncelik belirleme tablosunda gösterilmiştir.

**Tablo 4.6.** İndeks 5'in homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<b>Homozigot varyantlar</b>					
<i>RASGEF1C</i>	<i>RASGEF domain family, member 1B: RAS sinyal aktivasyonu</i>	c.28A>C (p.Met10Leu)	Het: 0, hom: 0	<b>3P7B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>AKR1B10</i>	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B10</i>	c.659+1G>T (p.?)	Het: 0, hom: 0	<b>4P</b>	Enzimin ekspresyon verisi uygun değil
<i>SRPK3</i>	<i>Protein kinase, serine/arginine-specific, 3</i>	c.453G>C (p.Arg151Ser)	Het: 0, hom: 0, hemi: 0	X krom., erkek hasta <b>3P8B</b> Sanger ile valide	*Segregasyon genotipik olarak uyumsuz
<b>Bileşik heterozigot varyantlar</b>					
<i>PRODH2</i>	<i>Proline dehydrogenase (oxidase) 2</i>	c.694C>T (p.Leu232Phe) ve c.655C>T (p.Arg219Trp)	Het: 3, hom: 0 Het: 4, hom: 0	<b>3P7B</b> <b>4P6B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>TNXB</i>	<i>Tenascin XB - Ehlers-Danlos syndrome, classic-like, 1 (OR) - Vesicoureteral reflux 8 (OD)</i>	c.11575G>A (p.Ala3859Thr) ve c.7856C>T (p.Pro2619Leu)	Het: 115, hom: 0 Het: 241, hom: 0	- -	ELENDİ (fenotip uygun değil)
<i>TXNDC2</i>	<i>Thioredoxin domain-containing protein 2</i>	c.709A>G (p.Ser237Gly) ve c.736A>G (p.Thr246Ala)	Het: 0, hom: 0 Het: 2, hom: 0	<b>11B</b> <b>1P10B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)

P: Patojenik; B: Benign

\*WES analizinde saptanan ve X kromozomu üzerinde bulunan homozigot *SRPK3* geni varyantı (c.453G>C) validasyon amacıyla Sanger yöntemi ile dizilenmiştir. Dizileme sonucunda validasyon sağlanmıştır. Segregasyon açısından aynı varyantın annede

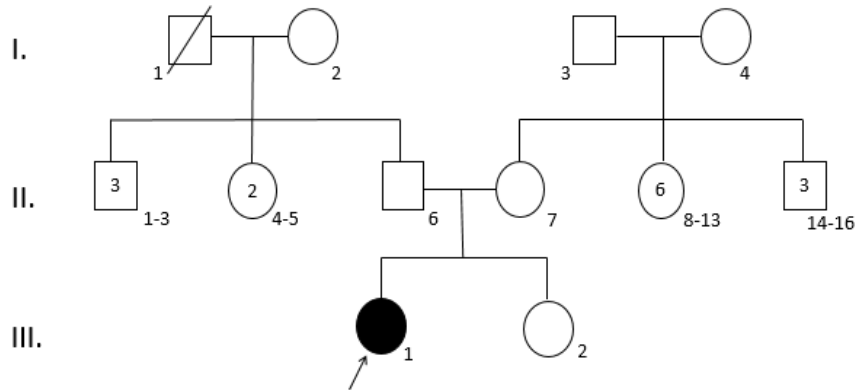
dizilemesi yapıldığında ise annenin homozigot olarak *wild type* (homozigot G) olduğu saptanmıştır. IVF gebelik olduğu bilinen hastada bu varyantın *de novo* mu olduğu yoksa parental açıdan uyumsuzluk mı söz konusu olduğunu belirlemek amacıyla anneye de Affymetrix CytoScan Optima array analizi yapılmıştır. Sonrasında anne ve etkilenmiş bireyin SNP sonuçları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda %15,99 oranında bir uyumsuzluk olduğu görülmüştür. Bu oranın normal mi yoksa normalin üzerinde mi olduğunu belirlemek amacıyla daha önce anne-oğul birlikte array yapılmış bir ailede uyumsuzluk oranı hesaplanmıştır ve bu oran %0,21 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda tamamen bağımsız üç farklı kadın bireyin array SNP analizi sonuçları ile indeksin SNP sonuçları karşılaştırılmıştır ve anne olduğu söylenen birey ile benzer oranda uyumsuzluk olduğu saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar ile indeksin anne olarak bildirilen birey ile genotipik açıdan uyumsuz olduğu düşünülmüştür.

### İndeks Vaka 6 (TRSDS118\_27):

Eylül 2014 doğumlu, anne ve babası arasında akrabalık bulunmayan kız hastanın 1,5 yaşında iken şikayetlerinin başladığı, nötropeni (ANS:  $293/\text{mm}^3$ ) ve anemisinin bulunduğu, trombositopenisinin bulunmadığı öğrenilmiştir. Nadir olarak ishal öyküsü bulunan hastanın herhangi bir davranış problemi olmadığı belirlenmiştir.

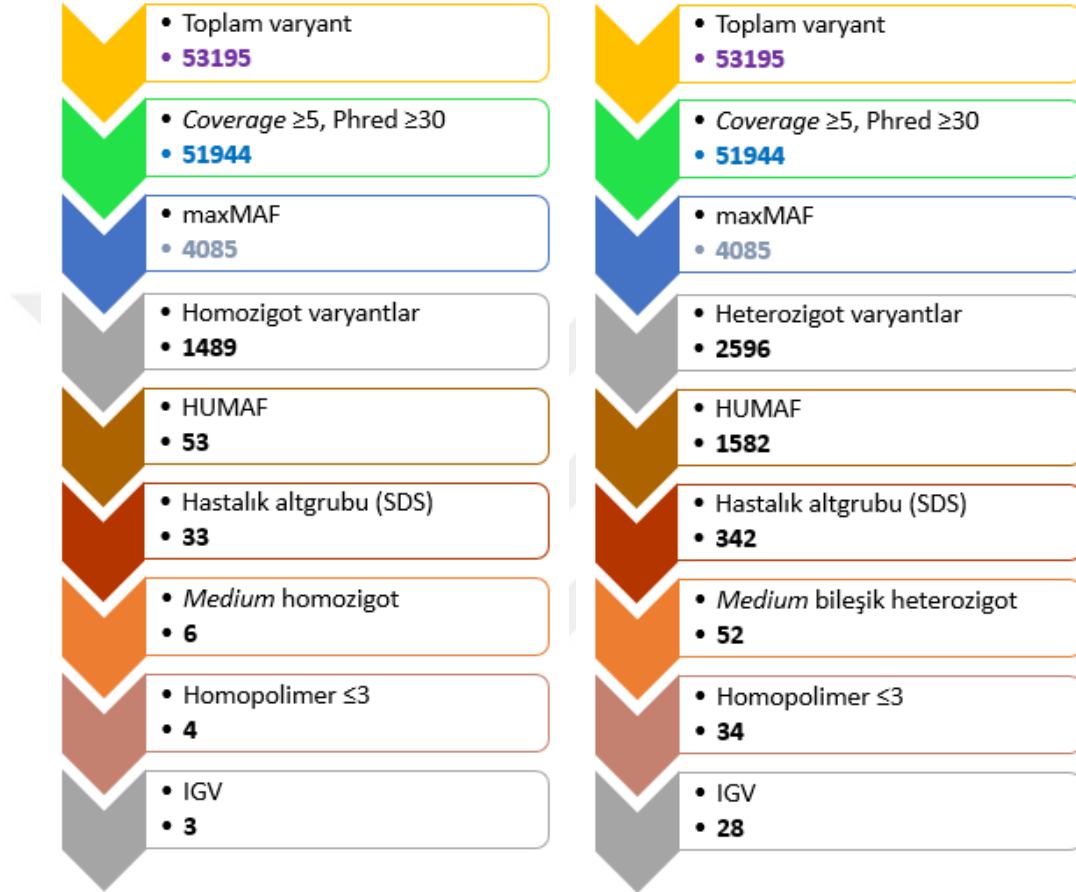
Yapılan kemik iliği aspirasyonu sellüler, miyeloid duraklama ve displazi görülmeyen, çift çekirdekli normoblast izlenmeyen kemik iliği olarak saptanmıştır. Abdominal USG'si normal olarak bulunmuştur.

Hasta tekrar muayene edilemediği için klinik bulguları daha fazla detaylandırılmamıştır.



Şekil 4.20. TRSDS118\_27 numaralı bireyin pedigrisi.

Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir. Homozigot filtreleme sol, bileşik heterozigotluğa göre filtreleme sağ tarafta yer almaktadır.



Şekil 4.21. TRSDS118\_27 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastanın kalan varyantları GnomAD veritabanında homozigot bulunmalarına göre elenerek homozigot değişiklik saptanan 1 gen ve bileşik heterozigotluğun bulunduğu toplam 6 gen aday olarak belirlenmiştir. İlgili genlerin dökümü aşağıda Tablo 4.7.'de sunulan öncelik belirleme tablosunda gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** İndeks 6'nın homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<b>Homozigot varyantlar</b>					
<i>CEACAM6</i>	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6</i>	c.919G>T (p.Gly307Cys)	Het: 375, hom: 0	<b>3P5B</b> *Sanger ile valide Segregasyon uyuyor	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<b>Bileşik heterozigot varyantlar</b>					
<i>ABL1</i>	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 - Congenital heart defects and skeletal malformations syndrome (OD), - Leukemia, Philadelphia chromosome-positive, resistant to imatinib (SMu)</i>	c.92G>A (p.Arg31Gln) ve c.3076G>A (p.Ala1026Thr)	Het: 24, hom: 0 Het: 6, hom: 0	<b>6P5B</b> <b>11B</b>	
<i>DNHD1</i>	<i>Dynein heavy chain domain 1</i>	c.4771C>T (p.His1591Tyr) ve c.9724G>C (p.Glu3242Gln)	Het: 11, hom: 0 Het: 35, hom: 0	<b>2P9B</b> <b>6P4B</b>	
<i>JMJD4</i>	<i>Jumonji domain containing 4</i>	c.899C>T (p.Thr300Met) ve c.466A>T (p.Met156Leu) ve c.-5C>G (p.?)	Het: 4, hom: 0 Het: 61, hom: 0 -	<b>4P6B</b> <b>4P7B</b> -	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>SNAP47</i>	<i>Synaptosome associated protein 47</i>	c.-659T>A (p.?) ve c.7G>C (p.Ala3Pro)	- Het: 19, hom: 0	- <b>2P9B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)



**Tablo 4.7. Devam.** İndeks 6'nın homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	In silico (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<i>TTN</i>	<i>Titin</i> - <i>Cardiomyopathy (OD)</i> - <i>Muscular dystrophy (OR, OD)</i> - <i>Myopathy (OD, OR)</i>	c.93371C>G (p.Ala31124Gly) ve c.56999G>A (p.Arg19000Gln)	Het: 832, hom: 0 Het: 779, hom: 0	<b>7P1B</b> <b>7P1B</b>	ELENDİ (fenotip uygun değil)
<i>SALL1</i>	<i>Sal-like 1</i> - <i>Townes-Brocks branchiootorenal-like syndrome (OD)</i> - <i>Townes-Brocks syndrome 1 (OD)</i>	c.1922T>A (p.Val641Asp) ve c.472A>G (p.Ser158Gly)	Het: 5, hom: 0 Het: 429, hom: 0	<b>11B</b> <b>10B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)

P: Patojenik; B: Benign

\* Sekans elektroferogram görüntüleri için **EK 5**'e bakınız.

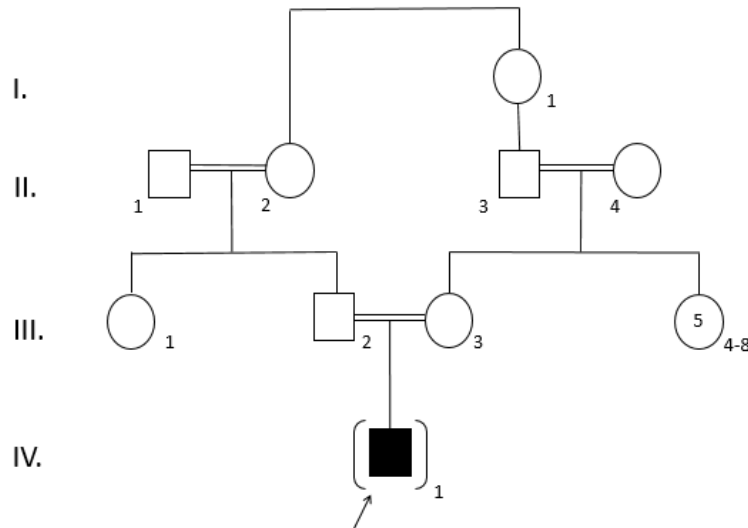
### İndeks Vaka 7 (TRSDS146\_40):

Aralık 2011 doğumlu, anne ve babası arasında akrabalık durumu bilinmeyen (adopt evlat) ve bebekliğinden beri sık enfeksiyon öyküsü olan erkek hastanın 4 yaşında iken enfeksiyon nedeniyle hastane yatışı olduğu sırada nötropenisi saptanmıştır. Prenatal ve natal öyküsü bilinmeyen hastanın 4 günlükken evlatlık edinildiği öğrenilmiştir. Hb: 11,5 g/dL, ANS: 200/mm<sup>3</sup>, Plt: 260000/mm<sup>3</sup> olarak saptanan hastada anemi ve trombositopeni olmadığı görülmüştür. Bebeklik döneminde ishal öyküsü olan fakat şu an devam etmediği öğrenilen hastanın ayrıca hiperaktivitesinin bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca dirseklerde ve sırtta eritemli kaşıntılı lezyonları olduğu, dermatoloji tarafından kserozis kutis/ atopik dermatit olarak değerlendirildiği öğrenilmiştir. Gelişim basamaklarının yaşlarıyla uyumlu olduğu ve okul başarısının iyi olduğu belirlenmiştir. Nöbet öyküsü yoktur.

7,5 yaş iken yapılan fizik muayenede; boy: 116 cm (3-10p), VA: 18,7 kg (<3p; 3p: 19 kg), BÇ: 50,5 cm (10-25p), kulaç: 111 cm olarak bulunmuştur. Dismorfik

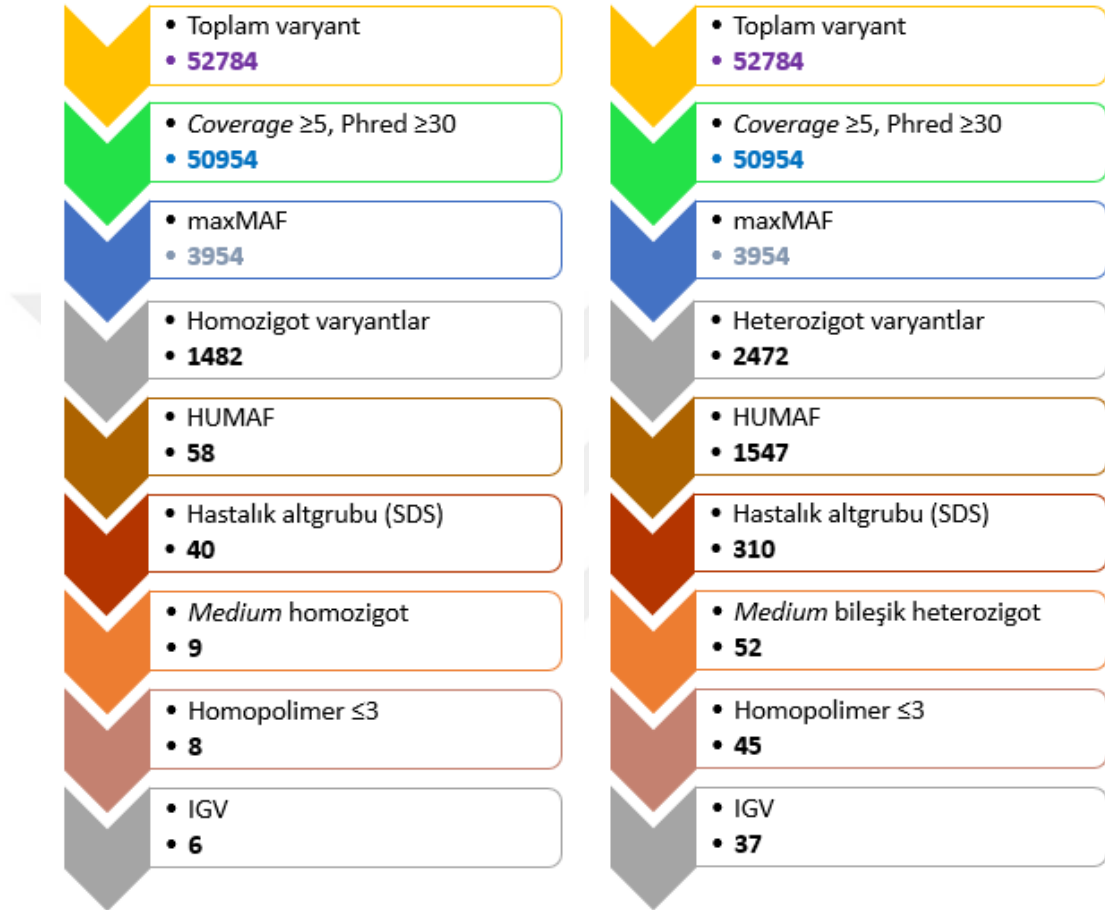
bulgular olarak; sol kulakta heliks katlantı anomalisi, dar toraks, pektus karinatum, ayırık meme başları, bilateral MCP eklem laksitesi, belirgin palmar çizgiler, sağ elde tek palmar çizgi, sol bacakta pigmenter mozaisizm, sandal gap, geniş ayaklar ve pes planus saptanmıştır.

Kemik iliği aspirasyonu ve abdominal USG'si normal olarak bulunmuştur. Konjenital nütropeniye yönelik dış merkezde yapılan genetik testleri normal olarak sonuçlanmıştır. Nötrofil aktivasyon testinin normal sonuçlandığı saptanmıştır. Dış merkezde yapılan ter testinin de normal sonuçlandığı öğrenilmiştir. Pankreatik amilaz değeri ise alt sınırın hemen altında olarak sonuçlanmıştır (12, alt sınır: 13). Radyografik görüntülemeleri ise normal olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.22.** TRSDS146\_40 numaralı bireyin pedigrisi.

Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir. Homozigot filtreleme sol, bileşik heterozigotluğa göre filtreleme sağ tarafta yer almaktadır.



Şekil 4.23. TRSDS146\_40 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastanın kalan varyantları GnomAD veritabanında homozigot bulunmalarına göre elenerek homozigot değişiklik saptanan 2 gen ve bileşik heterozigotluğun bulunduğu toplam 7 gen aday olarak belirlenmiştir. İlgili genlerin dökümü aşağıda Tablo 4.8.'de sunulan öncelik belirleme tablosunda gösterilmiştir.

**Tablo 4.8.** İndeks 7'nin homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<b>Homozigot varyantlar</b>					
<i>EMX1</i>	<i>Empty spiracles homeobox 1</i>	c.269C>T (p.Ala90Val)	Het: 0, hom: 0	<b>5P3B</b> Sanger ile valide değil	ELENDİ
<i>SSX1</i>	<i>Sarcoma, synovial, X breakpoint 1</i> - ? <i>Sarcoma, synovial</i>	c.184+2T>C (p.?)	Het: 0, hom: 0, hemi: 0	-X krom, erkek <b>1P2B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<b>Bileşik heterozigot varyantlar</b>					
<i>AHNAK2</i>	<i>Ahnak nucleoprotein 2</i>	c.2474A>C (p.Glu825Ala) ve c.1198G>A (p.Gly400Ser)	Het: 103, hom: 0 Het: 460, hom: 0	<b>10B</b> <b>1P9B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>ALPK2</i>	<i>Alpha kinase 2</i>	c.2610G>C (p.Glu870Asp) ve c.505A>G (p.Asn169Asp)	Het: 0, hom: 0 Het: 1, hom: 0	<b>3P7B</b> <b>11B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>DTHD1</i>	<i>Death domain-containing protein 1: Leber konjenital amorozis (hafif-orta nonspesifik mskler distrofi ile birlikte olan) iin aday gen</i>	c.551T>G (p.Val184Gly) ve c.1906G>C (p.Val636Leu)	Het: 120, hom: 0 Het: 3, hom: 0	<b>11B</b> <b>2P9B</b> Her iki varyant da Sanger ile valide değil	ELENDİ
<i>ICAM3</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 3</i>	c.837_842delAGCC AC (p.Ala280_Thr281del) ve c.686G>T (p.Arg229Leu)	Het: 0, hom: 0 Het: 1, hom: 0	<b>1B</b> <b>2P9B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)

**Tablo 4.8. Devam.** İndeks 7'nin homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<b>MAP1A</b>	<i>Microtubule-associated protein 1A</i>	c.1441C>T (p.Pro481Ser) ve c.6842C>T (p.Ala2281Val)	Het: 1, hom: 0 Het: 20, hom: 0	<b>6P5B</b> <b>1P10B</b> *Her iki varyant da Sanger ile valide Segregasyon çalışması yapılamadı	
<b>MKI67</b>	<i>Marker of proliferation KI67</i>	c.3200C>T (p.Thr1067Met) ve c.1487G>A (p.Ser496Asn)	Het: 18, hom: 0 Het: 4, hom: 0	<b>11B</b> <b>1P10B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<b>PCNX1</b>	<i>Pecanex, Drosophila, homolog of, 1</i>	c.1928T>C (p.Leu643Pro) ve c.5389T>G (p.Cys1797Gly)	Het: 5, hom: 0 Het: 0, hom: 0	<b>3P8B</b> <b>8P3B</b>	

P: Patojenik; B: Benign

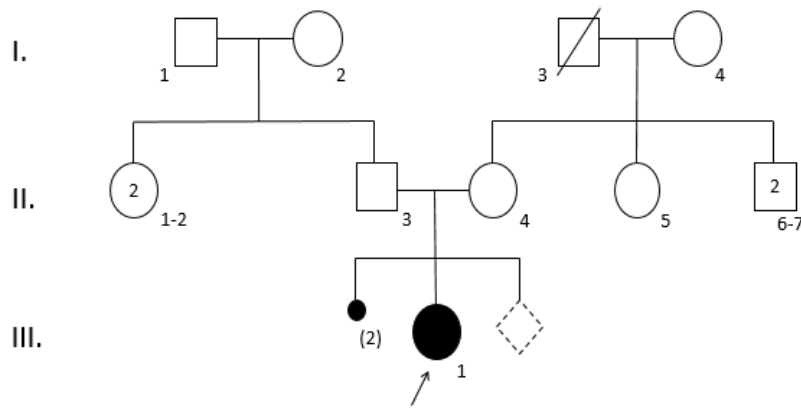
\*Sekans elektroferogram görüntüleri için **EK 5**'e bakınız.

### İndeks Vaka 8 (TRSDS122\_32):

Ocak 2012 doğumlu, anne ve babası arasında akrabalık bulunmayan ilk kez 4 yaşında iken üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) sırasında nötropenisi farkedilen kız hastanın ANS: 200/mm<sup>3</sup> olarak saptanmıştır. Prenatalinde düşük ve erken doğum tehdidi dışında herhangi bir sorun olmadığı ve natalinde ise herhangi bir özellik olmadığı öğrenilmiştir. Sık enfeksiyon öyküsü bulunmayan hastanın nötropenisinin ÜSYE sonrası devam ettiği tespit edilmiştir. Trombositopeni ve anemi saptanmayan hastada ishal ve steatore öyküsünün bulunmadığı saptanmıştır. Gelişim basamakları yaşlılarıyla uyumlu olan hastanın okul başarısının iyi olduğu belirlenmiştir. Nöbet öyküsü ve davranış problemi olmadığı tespit edilmiştir.

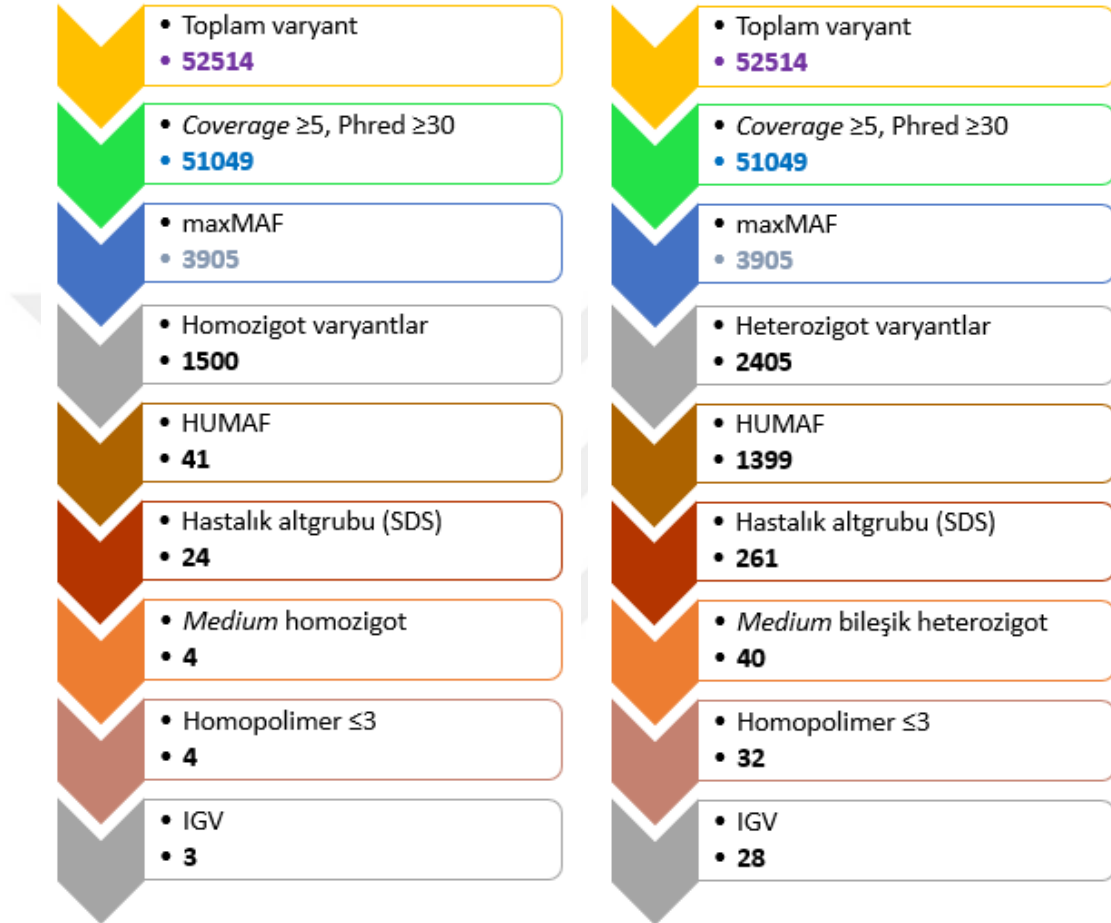
7,5 yaş iken yapılan fizik muayenede; boy: 128 cm (50-75p), VA: 24,5 kg (50p), BÇ: 51 cm (25-50p) olarak bulunmuştur. Bilateral epikantus, hafif hipoplazik ala naziler dışında dismorfik bulgu saptanmamıştır.

Kemik iliği aspirasyonu sellüler ve duraklama olmayan kemik iliği olarak değerlendirilmiştir. Radyografik görüntülemeleri ise normal olarak saptanmıştır.



Şekil 4.24. TRSDS122\_32 numaralı bireyin pedigrisi.

Hastanın WES analizi aşağıdaki filtreleme basamaklarına göre değerlendirilmiştir. Homozigot filtreleme sol, bileşik heterozigotluğa göre filtreleme sağ tarafta yer almaktadır.



Şekil 4.25. TRSDS122\_32 numaralı bireyin WES analizi filtreleme basamakları.

Hastanın kalan varyantları GnomAD veritabanında homozigot bulunmalarına göre elenerek homozigot değişiklik saptanan 1 gen ve bileşik heterozigotluğun bulunduğu toplam 7 gen aday olarak belirlenmiştir. İlgili genlerin dökümü aşağıda Tablo 4.9.'da sunulan öncelik belirleme tablosunda gösterilmiştir.

**Tablo 4.9.** İndeks 8'in homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<b>Homozigot varyantlar</b>					
<i>NUP107</i>	<i>Nucleoporin, 107-KD</i> - ? <i>Ovarian dysgenesis 6 (OR)</i> - <i>Galloway-Mowat syndrome 7 (OR)</i> - <i>Nephrotic syndrome, type 11 (OR)</i>	c.352C>T (p.Arg118Cys)	Het: 34, hom: 0	<b>9P6B</b>	ELENDİ (fenotip uygun değil)
<b>Bileşik heterozigot varyantlar</b>					
<i>CTTNBP2</i>	<i>Cortactin-binding protein 2</i>	c.2666_2668delGAG (p.Gly889del) ve c.724C>T (p.Arg242Cys)	Het: 8, hom: 0 Het: 5, hom: 0	<b>1B</b> <b>8P2B</b>	
<i>FBN3</i>	<i>Fibrillin 3</i>	c.5889G>T (p.Gln1963His) ve c.4199G>A (p.Arg1400Gln) ve c.2942G>A (p.Arg981Gln)	Het: 0, hom: 0 Het: 457, hom: 0 Het: 433, hom: 0	<b>6P4B</b> <b>3P7B</b> <b>3P6B</b>	
<i>MGA</i>	<i>Max dimerization protein MGA</i>	c.5827A>G (p.Ser1943Gly) ve c.7618A>G (p.Ile2540Val)	Het: 9, hom: 0 Het: 5, hom: 0	<b>5P4B</b> <b>9B</b>	
<i>TTN</i>	<i>Titin</i> - <i>Cardiomyopathy (OD)</i> - <i>Muscular dystrophy (OR, OD)</i> - <i>Myopathy (OD, OR)</i>	c.93508C>T (p.Arg31170Cys) ve c.90472A>G (p.Ile30158Val)	Het: 24, hom: 0 Het: 16, hom: 0	<b>6P2B</b> <b>2P8B</b>	ELENDİ (fenotip uygun değil)



**Tablo 4.9. Devam.** İndeks 8'in homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile kalan varyantları ve varyant bilgileri

Gen	Fonksiyon ve ilişkilendirilen hastalık bilgisi	Varyant	GnomAD	<i>In silico</i> (Varsome) ve Validasyon	Sonuç
<i>SYNE1</i>	<i>Spectrin repeat-containing nuclear envelope protein 1</i> - <i>Arthrogryposis multiplex congenita, myogenic type (OR)</i> - <i>Emery-Dreifuss muscular dystrophy 4, autosomal dominant</i> - <i>Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 8</i>	c.15940A>G (p.Asn5314Asp) ve c.6889G>A (p.Gly2297Arg)	Het: 0, hom: 0 Het: 257, hom: 0	<b>10B</b> <b>4P6B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>UTRN</i>	<i>Utrophin: Büyük iskelet kas proteini (Distrofin gibi)</i>	c.1150G>C (p.Asp384His) ve c.6487A>G (p.Ser2163Gly)	Het: 1, hom: 0 Het: 23, hom: 0	<b>4P6B</b> <b>3P8B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)
<i>ZNF850</i>	<i>Zinc finger protein 850</i>	c.1886G>A (p.Arg629His) ve c.1322G>A (p.Arg441Gln)	Het: 14, hom: 0 Het: 28, hom: 0	<b>8B</b> <b>1P6B</b>	ELENDİ ( <i>in silico</i> benign)

P: Patojenik; B: Benign

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında klinik ve genetik heterojen bir fenotip olan SDS'nin genetik etiyojisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Literatürde SDS hastalığının etiyojisinin büyük bir bölümünden sorumlu olan *SBDS* gen mutasyonları bizim çalışmamızda sadece %12,9 (7/54) oranında etiyojiden sorumlu bulunmuştur. Bu durum klinik yelpazenin geniş olması nedeniyle ayırıcı tanıda zorluk yaşandığını ve bu zorluğu aşma adına SDS şüphesi uyandıran herhangi bir bulgusu olan hastaların moleküler tanı amaçlı yönlendirildiğini göstermektedir. *SBDS* geninde saptanan mutasyonlar incelendiğinde literatür ile uyumlu bir şekilde *SBDSPI* psödogeni ile olan konversiyon nedeniyle oluşan biallelik c.258+2T>C ve c.183\_184delTAinsCT değişiklikleri en sık saptanan mutasyon olarak görülmüştür. Bu mutasyonlar *SBDS* proteininin N terminal (FYSH domain) bölgesine denk gelmektedir. Saptanan diğer mutasyonlar ise ekzon 3'te yerleşik homozigot c.385A>G ve c.258+2T>C mutasyonuna eşlik eden ekzon 5'te bulunan c.658delA değişiklikleri olmuştur. Ekzon 3'teki değişiklik proteinin santral domaininde bulunurken ekzon 5'teki değişiklik C terminal bölgeye denk gelmektedir. Bir çalışmada *SBDS* proteini yapısına göre mutasyonlar proteinde trunkasyona neden olan mutasyonlar, protein katlanmasını bozan *missense* değişiklikler ve proteinin yüzey epitoplarnını bozan *missense* değişiklikler olarak 3 gruba ayrılmıştır (87). Buna göre ekzon 3'te saptanan mutasyon dışında diğer mutasyonlar trunkasyona neden olarak proteinde fonksiyon kaybına yol açarken ekzon 3'te saptanan *missense* değişikliğin ise proteinin yüzey elektrostatikliğini bozarak yüzey epitoplarnını etkilediği düşünülmektedir. Saptadığımız mutasyonlardan ekzon 5'te bulunan c.658delA değişikliği daha önce bildirilmemiş olan yeni bir mutasyondur.

*SBDS* gen mutasyonu olan hastaların bulguları incelendiğinde klinik bilgilerine ulaşamayan 1 hasta dışında kalan 6 hasta içerisinde; 5 hastada SDS'nin klasik bulguları olan kemik iliği yetmezliği (özellikle nötrojeni), pankreatik disfonksiyon ve büyüme geriliği bulgularının her üçüne de bizim veri setimizde de rastlanmıştır. Sendromun ana bulgularından olan iskelet bulguları ise 2 hastada belirlenmiştir. Bir hastada ise yine sendromun bulgularından olan yarı damak saptanmıştır. Kemik iliği bulguları açısından çoğunlukla bisitopeni veya pansitopeni olduğu, bir hastada ise sadece nötrojeni bulunduğu gözlenmiştir. Pankreatik yetmezlik bulguları olmayan

ancak kemik iliği yetmezliği bulgularının ön planda olduğu bir hastanın ise aplastik anemi nedeniyle 14 yaş iken kaybedildiği saptanmıştır. Tüm bu bulgular mutasyonlar ile birlikte değerlendirildiğinde gene özgü genotip-fenotip ilişkisi açısından herhangi bir ilişki kurulamamıştır. Mutasyon tipi ile SDS fenotipi arasında herhangi bir ilişki kurulamamış olsa da, *SBDS* geninde mutasyon saptanan hasta klinikleri değerlendirildiğinde, hastaların çoğunlukla SDS fenotipi ile ilişkilendirilen ana bulguların çoğunu bulundurduğu gözlenmiştir. Bu nedenle nötropeni ile birlikte ek sitopeni, belirgin ekzokrin pankreatik disfonksiyon ve büyüme geriliği olan bireylerde *SBDS* gen mutasyonu saptanması daha olasıdır.

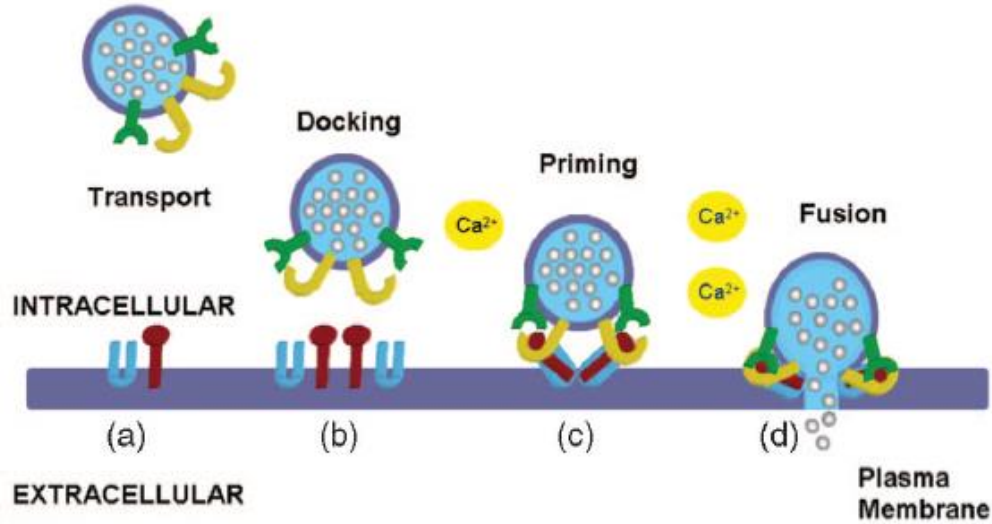
*SBDS* geninde mutasyon saptanmayan 8 hastada daha sonra SDS fenotipi ile ilişkilendirilmiş *DNAJC21*, *EFL1*, *SRP54* genlerine yönelik dizi analizi çalışmaları yapılmıştır ve bu genlerde de hastalıktan sorumlu olabilecek bir değişiklik saptanmamıştır. SDS hastalarında bildirilen CNV'ler için literatür taraması yapıldığında ise bir vakada *SBDS* gen lokusunda küçük yapısal yeniden düzenlenme ile *missense* değişiklik birlikteliği raporlanmıştır (88). Bu nedenle tez kapsamında kopya sayısı değişikliklerini belirlemeye yönelik hastalara Affymetrix CytoScan Optima array yapılmıştır. Yapılan mikrodizin analizleri sonucunda iki hastada klinik anlamı bilinmeyen toplamda 3 tane duplikasyon belirlenmiştir. Bu duplikasyonlardan ikisinin bulunduğu hastada (TRSDS016\_03) daha sonra yapılan WES analizi sonucunda kuvvetli bir aday gen saptanmıştır. Diğer hastada (TRSDS118\_27) saptanan 5p15.2'de 1,830 kb büyüklüğündeki duplikasyon bölgesi incelendiğinde ise bölgede 2 tane OMIM geni bulunduğu gözlenmiştir. Bu genlerden *LINC01194* geni *long intergenic noncoding RNA 1194*'ü kodlamakta olup günümüzde herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmemiş iken *DNAH5* geni dinein, aksonemal, ağır zincir 5 proteinini kodlamakta olup insanlarda silier diskinezi (*Ciliary dyskinesia, primary, 3, with or without situs inversus*; OMIM #608644) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Primer silier diskinezi normal silier aktivitenin kaybı ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Bu hastalıkta respiratuvar siliaların incelenmesinde siliar akinezi saptanmaktadır. Ve bazı hastalarda sağ/sol vücut aksının değiştiği situs inversus gözlenmektedir. Hastanın bulguları bu sendrom bulguları açısından incelendiğinde silier diskinezi düşündürülen herhangi bir bulgusunun olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle saptanan kopya sayısı değişikliği klinik anlamı bilinmeyen kopya sayısı

değişikliği olarak yorumlanmış olup SDS fenotipi ile herhangi bir ilişki kurulamamıştır.

Mikrodizin analizleri sonrasında 8 birey WES analizine alınmıştır. WES analizi sonucunda bir bireyde (TRSDS016\_03) *UNC13B* geninde protein sentezinde durmaya neden olan *nonsense* bir mutasyon tespit edilmiştir. Üçüncü ekzonda yer alan bu varyant 40 ekzondan oluşan proteinin sentezinin çok erken sonlanmasına neden olacak bir varyant olarak fonksiyon kaybı yapması açısından kritiktir. Bu gen *UNC13* Homolog B geni olup (*UNC13B/MUNC13*), sinaptik vezikül transportu ile ilişkili bir presinaptik protein kodlamaktadır. Sinaptik veziküllerin ekzositozu sırasında veziküllerin membran ile füzyonu SNARE protein kompleksi ile sağlanmaktadır. SNARE protein kompleksi sinaptobrevin, SNAP-25 ve sintaksin proteinlerinden oluşmaktadır. SNARE proteinlerine ek olarak sinaptik veziküllerin ekzositozunda *Unc18/Munc18* ve *Unc13/Munc13* protein aileleri de belirgin bir rol almaktadır (89). *Unc18* ailesi hücrede tüm SNARE ilişkili füzyon olayları için gerekli iken *Unc13* protein ailesi kalsiyum-tetikleyici sinaptik vezikül salınımında özelleşmiş bir grup proteindir.

Ekzositoz sırasında sekretuar vezikül membranı plazma membranı ile füzyon yaparak veziküler içeriğin ekstrasellüler alana salınması gerçekleştirilir. Ekzositoz yapısal (*constitutive*) ve düzenlenmiş (*regulated*) olmak üzere iki şekilde olmaktadır (90). Yapısal ekzositozda yeni üretilmiş veziküller sentez sonrası hemen salınırlar. Düzenlenmiş ekzositozda ise üretilmiş veziküller sekretuar veziküllerde depolanır ve diacilgliserol (DAG) ve kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ikinci mesajcılarının stimülasyonu sonrasında salınırlar (91-93). Düzenlenmiş ekzositoz sekretuar veziküllerin oluşturulmasını ve plazma membranına transportunu içerir. Sonrasında vezikülün plazma membranına *dockingi* gerçekleştirilir. Son basamakta ise her iki membranın (vezikül membranı ile plazma membranı) füzyonu sağlanır. Bu son basamak SNARE (*soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor-activated protein receptor*) kompleksinin vezikül membran proteinleri ile birleşmesini gerektirir. Fiziksel yaklaştırma (*docking*) füzyonun gerçekleşmesi için yeterli değildir ve kalsiyum-tetikleyici biyokimyasal olayları içeren bir ara basamak olan *primingi* gerektirmektedir (Şekil 5.1.) (94, 95).

Unc13'ün ise özellikle *docking* ve *priming* aşamalarında gerekli olduğu bilinmektedir (96-98).



**Şekil 5.1.** Sekretuar hücrelerde ekzositoz basamakları. (a) Vezikül formasyonu, (b) vezikül “*docking*”, (c) veziküllerin füzyon-yetkin hale dönüşmesi “*priming*”, (d) füzyon. Düzenlenmiş ekzositoz SNARE kompleksini (mavi ve kırmızı ile gösterilen çizgiler) ve kalsiyum iyonlarını gerektirmektedir (Diaz ve ark., 2008 çalışmasından alınmıştır (99).).

Unc13 ailesi üyeleri diaçilgliserol (DAG)-bağlayıcı domain (C1 domain), kalsiyum ve fosfolipid-bağlayıcı domain (C2 domain) ve yığılmış alfa helikslerden oluşan korunmuş MUN domaininden oluşmaktadır (100). Ekzositoz sırasında Unc13 öncelikle sintaksin-Unc18 ile etkileşime girerek sintaksinin açık konfigürasyona dönüşmesini sağlamaktadır. Sonrasında Unc13 ve Unc18 birlikte SNARE kompleksini biraraya getirmektedir. Devamında Unc13 yalnız başına sinaptobrevin ile birlikte *priming* aşamasını sağlamaktadır.

Munc13 proteinlerinin santral sinir sisteminde sinaptik vezikül ekzositozu dışında non-nöronal hücre ekzositozunda mast hücrelerinde de görev aldıkları gösterilmiştir (93). Yeni yapılan bir çalışmada ise endotel hücrelerinden histamin

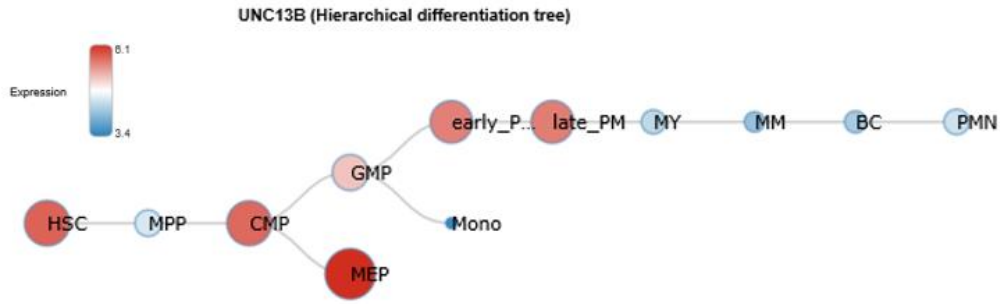
uyarımli Weibel-Palade cisimciklerinin ekzositozunda ve von Willebrand faktör salınımında Munc13-2 (UNC13B)'nin görevli olduğu gösterilmiştir (101).

Ayrıca bu protein ailesinden olan UNC13D insanlarda familyal hemofagositik lenfohistiyositozis (FHL, OMIM #608898) ile ilişkilendirilmiştir. Hastamızın bulguları bu fenotip bulguları açısından incelendiğinde ise kemik iliği aspirasyon örneğinde hemofagositoz görülmemesi, T lenfosit ve makrofaj hiperaktivasyon öyküsünün olmaması, buna ek olarak pansitopeni yerine izole trombositopeni bulunması nedeniyle FHL ile örtüşmediği belirlenmiştir. FHL bulguları ve indeks vakanın bulguları Tablo 5.1.'de karşılaştırılmıştır.

**Tablo 5.1.** FHL bulguları ile *UNC13B* mutasyonu saptanan hastanın bulgularının karşılaştırılması

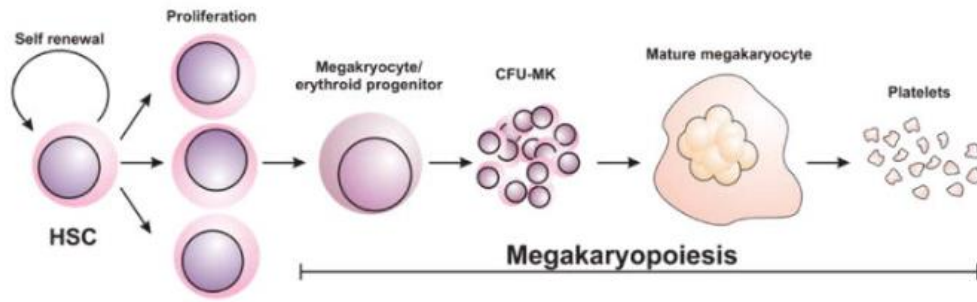
<b>Hemofagositik lenfohistiyositozis, familyal, 3 (OMIM #608898) - <i>UNC13D</i></b>	<b>Hastamız (TRSDS016_03) - <i>UNC13B</i></b>
OR	OR
Hepatosplenomegali	Hafif splenomegali Pankreas küçük ve disfonksiyonu var
Karaciğer disfonksiyonu	Karaciğer fonksiyonları normal
Pansitopeni	Trombositopeni
Hemofagositozis (kemik iliği veya BOS'ta)	Kemik iliğinde hemofagositozis yok, megakaryosit sayısı çok az ve megakaryosit nükleus lobulasyonunda belirgin azalma mevcut
T lenfosit ve makrofaj <i>over</i> aktivasyonu	yok
Düşük fibrinojen seviyesi	?
Hipertrigliseridemi	?
Bebeklik döneminde başlangıç	Yenidoğan döneminden itibaren şikayetler +

Bu bilgiler dışında *UNC13B* bir çalışmada kalıtsal trombositopenilerin moleküler genetik araştırmasında platelet sayı/fonksiyonu ile ilişkili olabilecek 358 aday gen listesi içerisinde bildirilmiştir (102). Kan hücrelerinde ve prekürsörlerinde genlerin ekspresyon düzeyini gösteren *BloodSpot* veritabanında da *UNC13B* için en yüksek ekspresyon seviyesi megakaryositlerde ve eritroid progenitörlerinde saptanmıştır (Şekil 5.2.).



**Şekil 5.2.** UNC13B'nin ekspresyon seviyelerinin şematik gösterimi. Maviden kırmızıya doğru ekspresyon seviyesi artmaktadır. En yüksek ekspresyon görülen seri **MEP**: megakaryosit/eritroid progenitör. Kısaltmalar; HSC: hematopoetik kök hücre, MPP: multipotansiyel progenitör, CMP: genel miyeloid progenitör , GMP: granülosit/monosit progenitör, Mono: monositler, early P: erken promiyelosit, late PM: geç promiyelosit, MY: miyelosit, MM: metamiyelosit, BC: bant hücresi, PMN: polimorfonükleer hücre.

Megakaryositler trombosit üretiminden sorumlu hücrelerdir ve trombosit (platelet) üretimi süreci megakaryopoez olarak adlandırılmaktadır (Şekil 5. 3.) (103). Olgun megakaryositler kemik iliğinin çekirdek lobulasyonu gösteren büyük hücreleridir ve endo-reduplikasyon/endomitoz olarak adlandırılan nükleus bölünmesinin başarılı olup sitoplazma bölünmesinin başarılı olmadığı özel bir bölünme şekli ile bu olgun yapıya ulaşmaktadırlar. Trombosit üretiminin olgun megakaryosit büyüklüğü ile ilişkili olduğu, özellikle sitoplazma boyutunu ve sentezlenmiş protein miktarını artırmak amacıyla endomitoz şeklinde özel bir bölünme gerçekleştirdiği düşünülmektedir (103). Trombositler megakaryosit sitoplazmalarından fragmentasyon ile ayrılarak oluşan ve çekirdek taşımayan hemostaz ve koagülasyonda görevli hücrelerdir.



**Şekil 5.3.** Megakaryopoez. HSC: hematopoetik kök hücre, CFU-MK: megakaryosit progenitör (Geddis ve ark., 2010 çalışmasından alınmıştır (103).).

Hastamızın kemik iliği aspirasyon incelemesinde tüm sahalarda toplamda 5 tane olgun megakaryosit görülerek megakaryosit sayısının belirgin olarak azalmış olduğu ve olgun megakaryositlerin yapı olarak küçük boyutta ve çekirdek lobulasyonunda ise belirgin azalma olduğu dikkat çekmiştir (Bkz. Şekil 4.11.).

UNC13B ekspresyon bilgisi ile birlikte hastada gözlenen megakaryosit displazisi, hangi aşamada ve nasıl olduğu bilinmemekle birlikte UNC13B'nin megakaryopoezde etkili olduğunu göstermektedir. Pankreas asiner hücrelerinde depo edilen sindirim enzimleri (zimojen granülleri) asetilkolin gibi segretagoların uyarımı ile  $Ca^{+2}$  aracılı ekzositoz ile hücre dışına salınmaktadır (104). Bu açıdan bakıldığında saptanan aday genin moleküler mekanizma ile uyumlu bir şekilde anlamlı olduğu görülmektedir. Literatürde trombositopeni ve pankreatik yetmezlik ile giden SDS dışında herhangi bir hastalık bulunmamaktadır. Tüm bu bilgiler sonucunda UNC13B'nin kemik iliği hücreleri serisinden özellikle megakaryositleri etkileyerek trombositopeni ve pankreatik ekzokrin tutulum ile pankreatik yetmezlik yapan SDS ile benzer fakat SDS olmayan yeni bir fenotipe neden olduğu düşünülmüştür.

Ayrıca bu ailede aday gene yönelik olarak segregasyon çalışması genişletildiğinde hastanın sağlıklı olarak bildirilen ablasında da aynı mutasyon homozigot olarak saptanmıştır. Genotipten fenotipe doğru *reverse* genetik ile yapılan tekrar değerlendirmede ise ablanın da etkilenmiş bir birey olduğu belirlenmiştir. Bu durum bazı fenotiplerin hafif bulgular nedeniyle gözden kaçabildiğini ve özellikle



genetik hastalık şüphesinde diğer aile bireylerinin de ayrıntılı değerlendirilmesinin önemini açığa çıkarmaktadır.

Bu bulgulara ek olarak literatürde *UNC13B* heterozigot *de novo splicesite* mutasyonu bipolar hastalıkla ilişkili olarak bir vakada bildirilmiştir (105). Trio WES analizi sonucunda saptanan ve ekzon atlamaya neden olan bu değişiklik bipolar hastalıkla güçlü olmayan bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Hastamızın anne ve babası saptadığımız *nonsense* değişiklik açısından heterozigot durumda bulunmaktadır ve bipolar hastalık tanısı bulunmamaktadır. Yine de ebeveynlerin bipolar hastalık açısından izlemi faydalı olabilir. Fakat öncesinde *UNC13B* bipolar hastalık nedensellik ilişkisinin iyi kurulması ve büyük vaka gruplarında çalışmalar yapılması gerektiği aşikardır.

Tezde belirlenen ikinci önemli başarı da diğer bir bireyde (TRSDS081\_16) *MAP7D1* aday geninin saptanması olmuştur. Hasta bulguları incelendiğinde SDS fenotipi ile birlikte ağır zihinsel yetersizlik ve buna ek olarak ayrıca ağrıya duyarsızlığı olduğu belirlenmiştir. WES analizi sonucunda ise hastada *novel* homozigot *frameshift SCN9A* mutasyonu saptanmıştır. Sodyum kanal proteini kodlayan bu gen hastanın ağrıya duyarsızlığı (*Insensitivity to pain, congenital*; OMIM #243000) ile ilişkilendirilmiş olup hastanın diğer bulgularını açıklamadığı görülmüştür. Akriba evliliklerinde aynı bireyde birden fazla resesif hastalık görülebildiği bilinmektedir. Bu nedenle hasta ve sağlıklı kardeşine homozigotluk haritalaması yapılarak kritik bölgeler belirlenerek ve diğer bulguların olası nedeni olarak *MAP7D1* değişikliği saptanmıştır. *MAP7D1* mikrotübül ilişkili protein ailesinden olan bir protein kodlamaktadır. Mikrotübüller hücre iskeletini oluşturan ve dinamik yapıda olan protein fiberlerdir. Mikrotübül ilişkili proteinler (MAP proteinleri) ise mikrotübüllerle çeşitli etkileşimler ile onların yapı ve fonksiyonlarını düzenleyen proteinlerdir. MAP proteinlerinin tanımlanması beyin lizatlarından mikrotübüllerle birlikte ko-pürifikasyonu ile elde edilen proteinlerin tanımlanmasıyla olmuştur. Görevlerine göre başlıca 5 ana grupta toplanmışlardır (106). Bu gruplar; i) motil MAP (motor proteinler), ii) enzim MAP (kesme veya depolimerizasyon), iii) mikrotübül nükleator, iv) *end-binding* proteinler (+/-), v) yapısal MAP proteinleri şeklindedir. Mikrotübül ilişkili proteinler özellikle nöronal gelişim, aktivite ve onarımda görev almaktadırlar. Bunun bir sonucu olarak

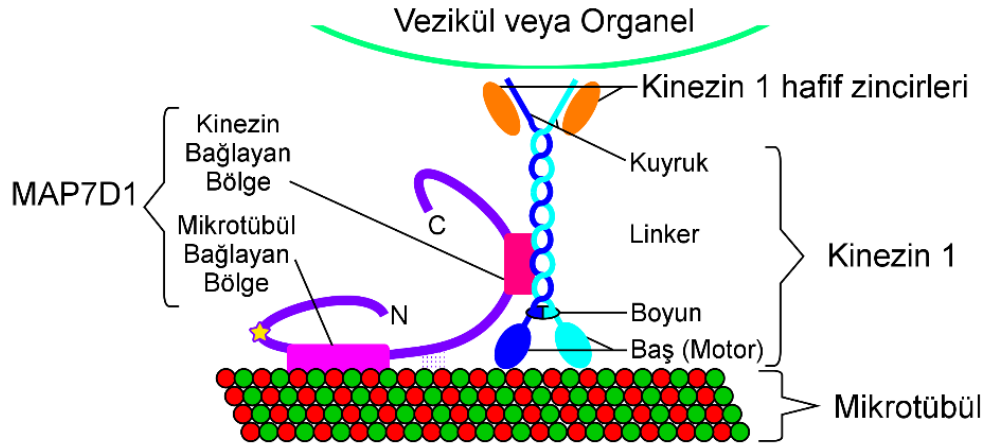
bazı MAP protein mutasyonları nörogelişimsel, nörodejeneratif hastalıklar ve psikiyatrik durumlar ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 5.2.) (107). MAP proteinleri gelişimsel zamana ve hücrel duruma göre post-transkripsiyonel olarak fosforilasyon ile düzenlenmektedirler. Fosforilasyon mikrotübül affinitesini, hücrel lokalizasyonu ve tüm fonksiyonunu etkileyebilmektedir (107). Bu nedenle fosforilasyon bölgesinde bulunan varyantların protein fonksiyonunu etkilemesi açısından daha anlamlı oldukları görülmektedir.

Günümüzde çok sayıda MAP proteini tanımlanmış olup başlıcaları MAP1, MAP2, MAP4, MAP6, MAP7, MAP9, Tau ve DCX'tir. Bu proteinlerin bazılarının alt üyeleri de tanımlanmıştır: MAP1A, MAP1B, MAP1S gibi. Bazı MAP proteinleri ilk tanımlandığında farklı bir protein sanılıp ayrı numara ile adlandırılmış olup sonrasında yapılan çalışmalarda aynı protein oldukları belirlenenler birden fazla isimle anılır olmuşlardır (MAP4/MAP3). Tablo 5.2.'de MAP proteinleri ile ilgili bilgiler ve ilişkilendirilmiş hastalıklar sunulmuştur. Bu üyelerden ilk olarak saptananları MAP1, MAP2, Tau gibi proteinler özellikle santral sinir sisteminde yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir (106, 107). Santral sinir sistemi dışında farklı dokularda da eksprese edilen MAP proteinlerinden olan MAP7 ailesi ile ilgili yapılan çalışmalar da günümüzde çoğunlukla santral sinir sistemi üzerine olmuştur (108, 109).

**Tablo 5.2.** MAP proteinleri ve ilişkilendirilmiş hastalıklar

MAP proteini	Görevi	İlişkili hastalık
MAP1	Beyin beyaz cevherde	-
MAP2	Beyin gri maddesinde	-
MAP4/MAP3		-
MAP6/STOP ( <i>Stable- Tubule- Only Polipeptide</i> )		-
<b>MAP7 ailesi</b> ( <i>Ensconsin</i> )	İntrasellüler transport	-
MAP9/ASAP ( <i>ASter- Associated Protein</i> )	İntrasellüler <i>trafficking</i>	-
Tau	Mikrotübül <i>bundling</i>	Fronto-temporal demans Alzheimer's hastalığı
DCX	Protofilamentler arasında bulunur	X'e bağlı lizensefali X'e bağlı subkortikal laminal heterotropi

MAP7 (*Ensconsin*, E-MAP-115 olarak da bilinmektedir) ailesi mikrotübüllerin motilitesini düzenleyen proteinlerdir (Şekil 5.4.) ve MAP7, MAP7D1, MAP7D2 ve MAP7D3 alt üyeleri bulunmaktadır (106, 109). MAP7 en bilinen ve en çok çalışılan üyesi olmakla birlikte MAP7 ile en çok benzerlik gösteren alt üye ise MAP7D1'dir. Bu grup proteinlerin mikrotübül bağlayan N terminal bölge ile kinezin bağlayan C terminal bölge olmak üzere fonksiyonel başlıca iki bölgesi bulunmaktadır (109). Hücre iskeletinin motor proteinlerinden olan kinezin ile birlikte mikrotübülün + yönde (hücrenin merkezinden perifer) hareket ettirilmesinde görev almaktadırlar. Özellikle santral sinir sisteminde kinesin-1 ile birlikte aksonal vezikül ve organel transportunda görev aldıklarına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (109). Yapılan yeni bir çalışmada ise MAP7'nin kinesin-1'in mikrotübül bağlamasını artırarak organel transportunda görev aldığı gösterilmiştir (110). Bu çalışmaya göre kargo transportunda kinezinin tek başına görev aldığı MAP7'nin ise kinezinin mikrotübüle bağlanma hızını etkilediği, taşıma sürecini etkilemediği savunulmuştur.



**Şekil 5.4.** MAP7 proteininin mikrotübül ve kinezin ile olan etkileşimi. Sarı yıldız ile işaretli bölge hastada saptanan mutasyonun (p.Arg201Trp) yerini göstermektedir (Şekil bu tez kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Arda Çetinkaya tarafından çizilmiştir.).

Hastada saptanan *MAP7D1* missense değişikliği proteinin fosforilasyon bölgesinde bulunmamasıyla birlikte *in silico* analizlere göre patojenik olarak öngörülmüştür. Kristalografik olarak protein modellemesi bulunmayan bu protein için ilk kez bu tez kapsamında Hacettepe Üniversitesi Biyoinformatik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Ceren Sucularlı ile birlikte *in silico* olarak protein modellemesi yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.9.). Mutant protein modellemesi de yapılarak mutant proteinin üç boyutlu yapısında değişiklik meydana geldiği saptanmıştır. Saptanan değişikliğin fonksiyonel açısından etkisini tahmin etmeye yönelik tübülün ile *docking* çalışmaları yapılmıştır. Analizler sonucunda mutant proteinde mikrotübül bağlanma bölgesinin etkilendiği gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında ileri fonksiyonel çalışmaların yapılmasına yönelik olarak hastadan cilt örneği alınmış ve *in vitro* fonksiyonel çalışmalar başlatılmıştır. Ayrıca *in silico* olarak kinezin ile *docking* çalışmaları devam etmektedir.

Hastanın *SCN9A* mutasyonu ile açıklanamayan bulguları *MAP7D1* mutasyonu nedensel olarak kabul edilip tekrar incelendiğinde ise MAP proteinlerinin özellikle nöronal gelişimde önemli proteinler olması hastanın zihinsel yetersizliği ile uyumlu

bulunmuştur. Ekzokrin pankreatik disfonksiyon ise MAP7 protein ailesinin özellikle hücrede organel ve veziküllerin transportunda görevli olmaları nedeniyle pankreas hücrelerinde ekzositoz veziküllerinin transportunun bozulması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca SBDS proteininin ribozom biyogenezi dışında mikrotübül stabilitesi de dahil hücre içerisinde birçok farklı görevi olduğu bilinmektedir. Özellikle yapılan çalışmalarda SBDS proteininin hücre bölünmesi sırasında mikrotübül organizatör bölgede görev aldığı gösterilmiştir (111). Başka bir çalışmada ise SDS hastalarından elde edilen primer kemik iliği stromal hücreleri ve lenfoblastlar mikrotübül destabilizan ajan olan nocodazol ile muamele edildiğinde mitotik *spindle* oluşumunun bozulduğu, mitotik arrest sonucu hücrelerin apoptoza gittiği gösterilmiştir (112). Yine aynı çalışmada SDS hasta hücrelerinin mikrotübül stabilizan ajan olan taksole karşı dirençli oldukları saptanmıştır. Bu durum *spindle* instabilitesinin SDS hastalarında kemik iliği yetmezliği ve lökomogeneze katkıda bulunduğunu göstermekle birlikte hastamızda saptanan SDS fenotipi bulgularını açıklamada moleküler temele işaret etmektedir. Sitogenetik olarak normal olan genç akut miyeloid lösemi hastalarında prognoz tayinine yönelik yapılan bir çalışmada da kötü prognoz işareti olarak MAP7 yüksek ekspresyonu saptanmıştır (113).

Homozigot filtreleme ile güçlü aday gen saptanmayan bir hastada (TRSDS146\_40) ise bileşik heterozigot filtreleme ile *MAP1A* geninde 2 farklı *missense* değişiklik saptanmıştır. Saptanan varyantların Sanger ile validasyonu sağlanmıştır (Bkz. **EK 5**). *In silico* olarak varyantlardan birinin patojenik olduğu diğerinin ise benign karakterde olduğu öngörülmüştür. Evlat edinilmiş çocuk olması nedeni ile ailede segregasyon çalışmaları yapılamamıştır. Hasta bulguları incelendiğinde gelişiminin normal olduğu, zihinsel yetersizliğinin bulunmadığı saptanmıştır. Davranış bulguları olarak ise hiperaktivitesinin bulunduğu belirlenmiştir. *MAP1A*'nın özellikle santral sinir sisteminde eksprese olması ve hastada gelişimsel gerilik bulgularının olmaması nedeniyle olası aday gen olarak güçlü bir pozisyonda bulunmamasına neden olmaktadır. Yine de varyantlardan birinin daha benign karakterde olması nedeniyle fenotipin davranış problemi gibi nispeten hafif bir fenotip ile ortaya çıkmış olması da muhtemeldir. Ayrıca segregasyon çalışmasının yapılamamış olması çalışmanın eksikliğini oluşturmaktadır. Bu ailede homozigot veya

bileşik heterozigot varyantlardan hastalık ile ilişkili olabilecek başka aday gen saptanmamıştır.

WES analizi sonucunda bir bireyde (TRSDS082\_17) ise kemik iliği ve iskelet tutulumu ile giden farklı bir fenotipe (Ghosal hematodiyafizyel sendrom, OMIM #231095) neden olan *TBXAS1* geninde homozigot novel *missense* bir değişiklik saptanmıştır. *TBXAS1* geni tromboksan A sentaz 1'i kodlamaktadır. Bu enzim sitokrom p450 enzimlerinden olup prostaglandinlerin endoperoksidaz ile tromboksan A2'ye dönüşmesini sağlamaktadır. Tromboksan A2 ise plateletlerin agregasyonunu ve vazokonstriksiyonu sağlayan bir ajandır. Bu sendrom kemik iliğinde özellikle eritrositer seriyi etkileyen ve anemi ile giden, ayrıca uzun kemiklerde kortikal kalınlaşmaya neden olan bir durumdur. Daha önce bildirilmemiş olan bu değişiklik *in silico* olarak patojenik olarak değerlendirilmiştir. Hasta bulguları bu sendrom bulguları açısından değerlendirildiğinde ise sendrom ile uyumlu bulunmuştur. Hastanın zaman zaman pansitopenik dönemlerinin ve ishal şikayetlerinin olması ön tanı olarak SDS düşünülmesine neden olmuştur. Ghosal hematodiyafizyel sendrom hastalarının kemik iliğinde miyelofibrozis saptanmaktadır (114). Hastanın kemik iliği aspirasyonu ise bu durumla uyumlu olarak aspirasyonda az miktarda örnek gelmiş olup ayrıca osteoblast ve osteoklast sayısında belirgin artış saptanmıştır.

Ghosal hematodiyafizyel sendrom saptanan hastada ayrıca *MEFV* geninde homozigot patojen bir varyant saptanarak FMF klinik tanısının genetik olarak doğrulanması sağlanmıştır. İlginç olarak ise aileden alınan anamnezde hastanın FMF klinik tanısı ile birlikte kolşisin kullanmaya başlamasının ardından anemisi nedeniyle ES ihtiyacının ve anemisinin belirgin azaldığı öğrenilmiştir. Normalde Ghosal hematodiyafizyel sendromda ES ihtiyacını azaltmak amacıyla steroid tedavisi kullanılmaktadır (115). Bu hastada görülen durum belki de bu hastalarda kolşisin tedavisinin steroide alternatif olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Ayrıca yeni filtreleme basamakları ile yapılan bu WES analizlerinde kullanılan *inhouse* verilerden oluşturulan huMAF'a göre yapılan elemelerde *MEFV* geninde saptanan varyant elenmiştir. huMAF'a bakıldığında bu varyantın frekansı *inhouse* olarak 0,051 olarak saptanmıştır ve huMAF sınırı olarak 0,05 alındığından Türk toplumunda FMF'in sık olması dolayısıyla taşıyıcılığının yüksek olması nedeniyle elendiği

görülmüştür. Bu nedenle toplumda taşınma sıklığı yüksek olan hastalıklar için bu tür filtreleme stratejilerinin hastalıktan sorumlu varyantların elenmesine yol açabileceği daima göz önünde bulundurulmalıdır.

Kalan hastalarda ise homozigot ve bileşik heterozigot filtreleme ile yapılan analizler sonrasında hastalıkla doğrudan ilişkilendirilebilecek bir aday gene ulaşılamamıştır. Hastaların heterozigot varyantları da kemik iliği yetmezlikleri ile ilişkilendirilen genler (**EK 4**) açısından taranmıştır ve bildirilen genlerde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bu nedenle heterozigot varyantlar açısından özellikle *de novo* varyantların belirlenmesi için trio şeklinde WES analizi yapılması da faydalı olacaktır. Ayrıca bu hastalarda ileriye yönelik olarak *noncoding* bölgelerin araştırılması, yüksek çözünürlüklü array platformları ile küçük kopya sayısı değişikliklerinin aranması, literatürde daha önce *SBDS* geninde bildirildiği gibi yapısal varyantlara yönelik çalışmaların yapılması ve tüm genom dizileme, RNAseq gibi ileri genetik testlerin uygulanması düşünülebilir.

Çalışma sonucunda tanımlanmış olan yeni fenotip ile birlikte fenotipik özelliklere göre SDS etiyojisinin araştırılmasına yönelik önceliklendirme Tablo 5.3.'te sunulmuştur.

**Tablo 5.3.** SDS fenotipinde bulgulara göre öncelikli dizilenecek genler

Spesifik Bulgular	Gen
Nötropenin olduğu bisitopeni veya pansitopeni ile birlikte pankreatik disfonksiyon bulguları, büyüme geriliği	<i>SBDS</i>
SDS bulguları yanında özellikle retinal distrofi bulunması	<i>DNAJC21</i>
SDS bulguları, özellikle iskelet bulgularının varlığında	<i>EFL1</i>
Ek bulguların belirgin olmadığı izole nötropeni	<i>SRP54</i>
Trombositopeni ve pankreatik disfonksiyon	<i>UNC13B</i>

Sonuç olarak bu tez çalışmasında Türkiye genelinden SDS ön tanıları ile izlenen hastalarda ilk kez kapsamlı genetik etiyoloji araştırılmıştır. Bu çalışma ile birçok farklı fenotipin SDS ile karışabildiği gösterilmiştir ve ayırıcı tanı zorluğu moleküler testlerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Çalışma sonucunda yeni genlerin bulunmasına yönelik iki kritik aday gen saptanarak hedefe ulaşılmıştır. Ayrıca bu genlerden biri ile yeni bir fenotip tanımlanmıştır. Trombositopeni ve pankreatik disfonksiyon ile karakterize bu fenotipte bulguların belirgin şikayet oluşturmayacak şekilde silik olabileceği ortaya konmuştur. Bu nedenle özellikle herediter trombositopenisi olan hastalarda olası pankreatik disfonksiyon araştırılması ve pankreatik disfonksiyon saptanan bireylerde ise *UNC13B* gen analizi yapılması faydalı olacaktır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu çalışma Türkiye genelinde SDS'ye yönelik ilk büyük ve kapsamlı araştırma özelliği taşımaktadır.
- Araştırma sonucunda fenotipin ve etiyojinin heterojenliği açığa çıkarılmıştır ve moleküler testlerin gerekliliği ortaya konmuştur.
- Etiyojinin aydınlatılmasına yönelik yeni aday genlerin saptanması hedefine ulaşılmıştır.
- Çalışma sonucunda iki ailede kritik aday genler saptanmıştır.
- Bu genlerden biri ile SDS fenotipi ile benzer fenotipik bulgulara sahip bir ailede yeni bir fenotip tanımlanmıştır.
- Kristalografik olarak protein modellemesi bulunmayan ikinci aday gen için ise ilk kez bu tez kapsamında *in silico* protein modellemesi yapılmıştır.
- Saptanan iki aday gen için de ileri fonksiyonel testler planlanarak *in vitro* çalışmaları başlatılmıştır.
- Etiyojinin aydınlatılmadığı hastalarda ise heterozigot varyantlara yönelik analizler devam etmektedir.
- Son olarak nedenin aydınlatılmadığı bireyler için yeni filtreleme stratejileri ile reanaliz ve tüm genom dizileme, RNAseq gibi yöntemler ile *noncoding* bölgelerin ve yapısal varyantların araştırılması önerilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Shwachman H, Diamond LK, Oski FA, Khaw K-T. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *The Journal of pediatrics*. 1964;65(5):645-63.
2. Nezelof C, Watchi M. Lipomatous congenital hypoplasia of the exocrine pancreas in children.(2 cases and review of the literature). *Archives francaises de pediatrie*. 1961;18:1135.
3. Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman–Diamond syndrome. *Nature genetics*. 2003;33(1):97.
4. Henson AL. Molecular bases of inherited bone marrow failures: Shwachman-Diamond syndrome and Diamond Blackfan anemia. 2013.
5. Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. 2003;313:17-42.
6. Henras A, Soudet J, Gerus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mougou A, et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(15):2334-59.
7. Kressler D, Hurt E, Baßler J. Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2010;1803(6):673-83.
8. Thomson E, Ferreira-Cerca S, Hurt E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *The Company of Biologists Ltd*; 2013.
9. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(2):113.
10. Henderson A, Warburton D, Atwood K. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972;69(11):3394-8.
11. Salim D, Gerton JL. Ribosomal DNA instability and genome adaptability. *Chromosome research*. 2019;27(1-2):73-87.
12. Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, et al. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*. 2002;417(6892):967.
13. Grandi P, Rybin V, Baßler J, Petfalski E, Strauß D, Marzioch M, et al. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular cell*. 2002;10(1):105-15.
14. Pelletier J, Thomas G, Volarević S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(1):51.
15. Hurt E, Hannus S, Schmelzl B, Lau D, Tollervey D, Simos G. A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *The Journal of cell biology*. 1999;144(3):389-401.
16. Zemp I, Kutay U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS letters*. 2007;581(15):2783-93.
17. Panse VG, Johnson AW. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(5):260-6.
18. Menne TF, Goyenechea B, Sánchez-Puig N, Wong CC, Tonkin LM, Ancliff PJ, et al. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nature genetics*. 2007;39(4):486.

19. Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, Drynan LF, Goyenechea B, Menne TF, et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes & development*. 2011;25(9):917-29.
20. Wong CC, Traynor D, Basse N, Kay RR, Warren AJ. Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*. 2011;118(16):4305-12.
21. Mills EW, Green R. Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science*. 2017;358(6363):eaan2755.
22. Warren AJ. Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome. *Advances in biological regulation*. 2017.
23. McElreavey K, Jorgensen A, Eozenou C, Merel T, Bignon-Topalovic J, Tan DS, et al. Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46, XY gonadal dysgenesis and 46, XY testicular regression syndrome. *Genetics in Medicine*. 2019:1.
24. Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, et al. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*. 2011;145(3):383-97.
25. In K, Zaini MA, Müller C, Warren AJ, von Lindern M, Calkhoven CF. Shwachman–Bodian–Diamond syndrome (SBDS) protein deficiency impairs translation re-initiation from C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  mRNAs. *Nucleic acids research*. 2016;44(9):4134-46.
26. Mills EW, Wangen J, Green R, Ingolia NT. Dynamic regulation of a ribosome rescue pathway in erythroid cells and platelets. *Cell reports*. 2016;17(1):1-10.
27. Tourlakis ME, Zhang S, Ball HL, Gandhi R, Liu H, Zhong J, et al. In Vivo senescence in the Sbds-deficient murine pancreas: cell-type specific consequences of translation insufficiency. *PLoS genetics*. 2015;11(6):e1005288.
28. Segel GB, Halterman JS. Neutropenia in pediatric practice. *Pediatrics in review*. 2008;29(1):12.
29. Walkovich K, Connelly JA. Congenital Neutropenia and Rare Functional Phagocyte Disorders in Children. *Hematology/Oncology Clinics*. 2019;33(3):533-51.
30. Donadieu J, Beaupain B, Fenneteau O, Bellanné-Chantelot C. Congenital neutropenia in the era of genomics: classification, diagnosis, and natural history. *British journal of haematology*. 2017.
31. Myers KC, Bolyard AA, Otto B, Wong TE, Jones AT, Harris RE, et al. Variable clinical presentation of Shwachman–Diamond syndrome: update from the North American Shwachman–Diamond syndrome registry. *The Journal of pediatrics*. 2014;164(4):866-70.
32. Dror Y, Donadieu J, Kogelmeier J, Dodge J, Toiviainen-Salo S, Makitie O, et al. Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman-Diamond syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1242(1):40-55.
33. Nelson AS, Myers KC. Diagnosis, Treatment, and Molecular Pathology of Shwachman-Diamond Syndrome. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2018.
34. Woods WG, Krivit W, Lubin BH, Ramsay NK. Aplastic anemia associated with the Shwachman syndrome. In vivo and in vitro observations. *The American journal of pediatric hematology/oncology*. 1981;3(4):347-51.
35. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Beaufils S, Bellanger F, Mahlaoui N, et al. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica*. 2012;97(9):1312-9.
36. Cada M, Segbefia CI, Klaassen R, Fernandez CV, Yanofsky RA, Wu J, et al. The impact of category, cytopathology and cytogenetics on development and progression of clonal and malignant myeloid transformation in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica*. 2015;100(5):633-42.

37. Dale DC, Bolyard AA, Schwinzer BG, Pracht G, Bonilla MA, Boxer L, et al. The severe chronic neutropenia international registry: 10-year follow-up report. *Supportive cancer therapy*. 2006;3(4):220-31.
38. Singh SA, Vlachos A, Morgenstern NJ, Ouansafi I, Ip W, Rommens JM, et al. Breast cancer in a case of Shwachman Diamond syndrome. *Pediatric blood & cancer*. 2012;59(5):945-6.
39. Sack JE, Kuchnir L, Demierre MF. Dermatofibrosarcoma Protuberans Arising in the Context of Shwachman-Diamond Syndrome. *Pediatric dermatology*. 2011;28(5):568-9.
40. Crescenzi B, La Starza R, Sambani C, Parcharidou A, Pierini V, Nofrini V, et al. Totipotent stem cells bearing del (20q) maintain multipotential differentiation in Shwachman Diamond syndrome. *British journal of haematology*. 2009;144(1):116-9.
41. Maserati E, Pressato B, Valli R, Minelli A, Sainati L, Patitucci F, et al. The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: the role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *British journal of haematology*. 2009;145(2):190-7.
42. Cunningham J, Sales M, Pearce A, Howard J, Stallings R, Telford N, et al. Does isochromosome 7q mandate bone marrow transplant in children with Shwachman–Diamond syndrome? *British journal of haematology*. 2002;119(4):1062-9.
43. Valli R, De Paoli E, Nacci L, Frattini A, Pasquali F, Maserati E. Novel recurrent chromosome anomalies in Shwachman–Diamond syndrome. *Pediatric blood & cancer*. 2017;64(8):e26454.
44. Andolina JR, Morrison CB, Thompson AA, Chaudhury S, Mack AK, Proytcheva M, et al. Shwachman-Diamond syndrome: diarrhea, no longer required? *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013;35(6):486.
45. Mack DR, Forstner GG, Wilschanski M, Freedman MH, Durie PR. Shwachman syndrome: exocrine pancreatic dysfunction and variable phenotypic expression. *Gastroenterology*. 1996;111(6):1593-602.
46. Toiviainen-Salo S, Durie PR, Numminen K, Heikkilä P, Marttinen E, Savilahti E, et al. The Natural History of Shwachman-Diamond Syndrome–Associated Liver Disease from Childhood to Adulthood. *The Journal of pediatrics*. 2009;155(6):807-11. e2.
47. McLennan TW, Steinbach HL. Shwachman's syndrome: the broad spectrum of bony abnormalities. *Radiology*. 1974;112(1):167-73.
48. Toiviainen-Salo S, Mäyränpää MK, Durie PR, Richards N, Grynepas M, Ellis L, et al. Shwachman–Diamond syndrome is associated with low-turnover osteoporosis. *Bone*. 2007;41(6):965-72.
49. Kerr EN, Ellis L, Dupuis A, Rommens JM, Durie PR. The behavioral phenotype of school-age children with shwachman diamond syndrome indicates neurocognitive dysfunction with loss of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene function. *The Journal of pediatrics*. 2010;156(3):433-8. e1.
50. Perobelli S, Alessandrini F, Zoccatelli G, Nicolis E, Beltramello A, Assael BM, et al. Diffuse alterations in grey and white matter associated with cognitive impairment in Shwachman–Diamond syndrome: Evidence from a multimodal approach. *NeuroImage: Clinical*. 2015;7:721-31.
51. Topa A, Tulinius M, Oldfors A, Hedberg-Oldfors C. Novel myopathy in a newborn with Shwachman–Diamond syndrome and review of neonatal presentation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2016;170(5):1155-64.
52. Jivani N, Torrado-Jule C, Vaiselbuh S, Romanos-Sirakis E. A unique case of Shwachman-Diamond syndrome presenting with congenital hypopituitarism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2016;29(11):1325-7.

53. Gana S, Sainati L, Frau M, Monciotti C, Poli F, Cannioto Z, et al. Shwachman-Diamond syndrome and type 1 diabetes mellitus: more than a chance association? *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 2011;119(10):610-2.
54. Hauet Q, Beaupain B, Micheau M, Blayo M, Gandemer V, Gottrand F, et al. Cardiomyopathies and congenital heart diseases in Shwachman–Diamond syndrome: a national survey. *International journal of cardiology*. 2013;167(3):1048-50.
55. Goeteyn M, Oranje AP, Vuzevski VD, de Groot R, van Suijlekom-Smit LW. Ichthyosis, Exocrine Pancreatic Insufficiency, Impaired Neutrophil Chemotaxis, Growth Retardation, and Metaphyseal Dysplasia (Shwachman Syndrome): Report of a Case With Extensive Skin Lesions (Clinical, Histological, and Ultrastructural Findings). *Archives of dermatology*. 1991;127(2):225-30.
56. Donadieu J, Michel G, Merlin E, Bordigoni P, Monteux B, Beaupain B, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for Shwachman-Diamond syndrome: experience of the French neutropenia registry. *Bone marrow transplantation*. 2005;36(9):787.
57. Tummala H, Walne AJ, Williams M, Bockett N, Collopy L, Cardoso S, et al. DNAJC21 mutations link a cancer-prone bone marrow failure syndrome to corruption in 60S ribosome subunit maturation. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(1):115-24.
58. Dhanraj S, Matveev A, Li H, Lauhasurayotin S, Jardine L, Cada M, et al. Biallelic mutations in DNAJC21 cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*. 2017;129(11):1557-62.
59. Stepensky P, Chacón-Flores M, Kim KH, Abuzaitoun O, Bautista-Santos A, Simanovsky N, et al. Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. *Journal of medical genetics*. 2017:jmedgenet-2016-104366.
60. Tan QK-G, Cope H, Spillmann RC, Stong N, Jiang Y-H, McDonald MT, et al. Further evidence for the involvement of EFL1 in a Shwachman–Diamond-like syndrome and expansion of the phenotypic features. *Molecular Case Studies*. 2018;4(5):a003046.
61. Carapito R, Konantz M, Paillard C, Miao Z, Pichot A, Leduc MS, et al. Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond–like features. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(11):4090-103.
62. Bellanné-Chantelot C, Schmaltz-Panneau B, Marty C, Fenneteau O, Callebaut I, Clauin S, et al. Mutations in SRP54 gene cause severe congenital neutropenia as well as Shwachman-Diamond-like syndrome. *Blood*. 2018:blood-2017-12-820308.
63. Oyarbide U, Corey SJ. SRP54 and a need for a new neutropenia nosology. *Blood*. 2018;132(12):1220-2.
64. Goobie S, Popovic M, Morrison J, Ellis L, Ginzberg H, Boocock GR, et al. Shwachman-Diamond syndrome with exocrine pancreatic dysfunction and bone marrow failure maps to the centromeric region of chromosome 7. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68(4):1048-54.
65. Steele L, Rommens J, Stockley T, Baskin B, Ray P. De novo mutations causing Shwachman-Diamond syndrome and a founder mutation in SBDS in the French Canadian population. *J Investig Genomics*. 2014;1(2):00008.
66. de Oliveira JF, Sforça ML, Blumenschein TM, Goldfeder MB, Guimarães BG, Oliveira CC, et al. Structure, dynamics, and RNA interaction analysis of the human SBDS protein. *Journal of molecular biology*. 2010;396(4):1053-69.
67. Austin KM, Leary RJ, Shimamura A. The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood*. 2005;106(4):1253-8.

68. Ball HL, Zhang B, Riches JJ, Gandhi R, Li J, Rommens JM, et al. Shwachman-Bodian Diamond syndrome is a multi-functional protein implicated in cellular stress responses. *Human molecular genetics*. 2009;18(19):3684-95.
69. Ng WMS. Phenotypic and Transcriptional Consequences of Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome (SBDS) Deficiency during Hematopoietic Development 2017.
70. Pellecchia M, Szyperski T, Wall D, Georgopoulos C, Wüthrich K. NMR Structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich Region of the Escherichia coli DnaJ Chaperone. *Journal of molecular biology*. 1996;260(2):236-50.
71. Hung N-J, Johnson AW. Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(10):3718-27.
72. Demoinet E, Jacquier A, Lutfalla G, Fromont-Racine M. The Hsp40 chaperone Jjj1 is required for the nucleo-cytoplasmic recycling of preribosomal factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*. 2007;13(9):1570-81.
73. Meyer AE, Hung N-J, Yang P, Johnson AW, Craig EA. The specialized cytosolic J-protein, Jjj1, functions in 60S ribosomal subunit biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(5):1558-63.
74. Meyer AE, Hoover LA, Craig EA. The cytosolic J-protein, Jjj1, and Rei1 function in the removal of the pre-60 S subunit factor Arx1. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(2):961-8.
75. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, Velangi M, Ho A, Hossain U, et al. Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;90(5):888-92.
76. Adabalı Y. Ekzom Veri Setinden Hastalığa Özgü Varyant Veri Tabanı Oluşturulması [Thesis]: Hacettepe University; 2019.
77. Görmez Z, Bakır-Gungör B, Sağiroğlu MŞ. HomSI: a homozygous stretch identifier from next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2013;30(3):445-7.
78. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 2010;5(4):725.
79. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 2015;12(1):7.
80. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*. 2015;43(W1):W174-W81.
81. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605-12.
82. Venselaar H, te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC bioinformatics*. 2010;11(1):548.
83. Gigant B, Wang C, Ravelli RB, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*. 2005;435(7041):519-22.
84. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-42.
85. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(7):1731-7.
86. Van Zundert G, Rodrigues J, Trellet M, Schmitz C, Kastiris P, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of molecular biology*. 2016;428(4):720-5.

87. Shamma C, Menne TF, Hilcenko C, Michell SR, Goyenechea B, Boocock GR, et al. Structural and mutational analysis of the SBDS protein family Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(19):19221-9.
88. Carvalho CM, Zuccherato LW, Williams CL, Neill NJ, Murdock DR, Bainbridge M, et al. Structural variation and missense mutation in SBDS associated with Shwachman-Diamond syndrome. *BMC medical genetics*. 2014;15(1):64.
89. Palfreyman MT, Jorgensen EM. Unc13 Aligns SNAREs and Superprimes Synaptic Vesicles. *Neuron*. 2017;95(3):473-5.
90. Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual review of cell biology*. 1987;3(1):243-93.
91. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal*. 1984;220(2):345.
92. Pang ZP, Südhof TC. Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(4):496-505.
93. Rodarte EM, Ramos MA, Davalos AJ, Moreira DC, Moreno DS, Cardenas EI, et al. Munc13 proteins control regulated exocytosis in mast cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(1):345-58.
94. Klenchin VA, Martin TF. Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie*. 2000;82(5):399-407.
95. Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. 2013;80(3):675-90.
96. Hammarlund M, Palfreyman MT, Watanabe S, Olsen S, Jorgensen EM. Open syntaxin docks synaptic vesicles. *PLoS biology*. 2007;5(8):e198.
97. Brose N, Hofmann K, Hata Y, Südhof TC. Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(42):25273-80.
98. Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N. Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(4):2520-6.
99. Diaz E, Ayala G, Diaz-Fernandez M, Gong L, Toomre D. Automatic detection of large dense-core vesicles in secretory cells and statistical analysis of their intracellular distribution. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics*. 2008;7(1):2-11.
100. Xu J, Camacho M, Xu Y, Esser V, Liu X, Trimbuch T, et al. Mechanistic insights into neurotransmitter release and presynaptic plasticity from the crystal structure of Munc13-1 C1C2BMUN. *Elife*. 2017;6:e22567.
101. Holthenrich A, Drexler HC, Chehab T, Naß J, Gerke V. Proximity proteomics of endothelial Weibel-Palade bodies identifies novel regulator of von Willebrand factor secretion. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;134(12):979-82.
102. Johnson BD. Molecular genetic investigation into inherited thrombocytopenia: University of Birmingham; 2017.
103. Geddis AE, editor *Megakaryopoiesis*. *Seminars in hematology*; 2010: Elsevier.
104. Wäsle B, Edwardson JM. The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cellular signalling*. 2002;14(3):191-7.
105. Nakamura T, Jimbo K, Nakajima K, Tsuboi T, Kato T. De novo UNC13B mutation identified in a bipolar disorder patient increases a rare exon-skipping variant. *Neuropsychopharmacology reports*. 2018;38(4):210-3.
106. Bodakuntla S, Jijumon A, Villablanca C, Gonzalez-Billault C, Janke C. Microtubule-associated proteins: structuring the cytoskeleton. *Trends in cell biology*. 2019.

107. Ramkumar A, Jong BY, Ori-McKenney KM. ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. *Developmental Dynamics*. 2018;247(1):138-55.
108. Koizumi H, Fujioka H, Togashi K, Thompson J, Yates III JR, Gleeson JG, et al. DCLK1 phosphorylates the microtubule-associated protein MAP7D1 to promote axon elongation in cortical neurons. *Developmental neurobiology*. 2017;77(4):493-510.
109. Pan X, Cao Y, Stucchi R, Hooikaas PJ, Portegies S, Will L, et al. MAP7D2 Localizes to the Proximal Axon and Locally Promotes Kinesin-1-Mediated Cargo Transport into the Axon. *Cell reports*. 2019;26(8):1988-99. e6.
110. Chaudhary AR, Lu H, Kremmentsova EB, Bookwalter CS, Trybus KM, Hendricks AG. MAP7 regulates organelle transport by recruiting kinesin-1 to microtubules. *Journal of Biological Chemistry*. 2019:jbc. RA119. 008052.
111. Orelia C, Verkuijlen P, Geissler J, van den Berg TK, Kuijpers TW. SBDS expression and localization at the mitotic spindle in human myeloid progenitors. *PloS one*. 2009;4(9):e7084.
112. Austin KM, Gupta ML, Coats SA, Tulpule A, Mostoslavsky G, Balazs AB, et al. Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(4):1511-8.
113. Fu L, Fu H, Zhou L, Xu K, Pang Y, Hu K, et al. High expression of MAP7 predicts adverse prognosis in young patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Scientific reports*. 2016;6:34546.
114. Datta K, Karmakar M, Hira M, Halder S, Pramanik K, Banerjee G. Ghosal hematodiaphyseal dysplasia with myelofibrosis. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2013;80(12):1050-2.
115. John RR, Boddu D, Chaudhary N, Yadav VK, Mathew LG. Steroid-responsive anemia in patients of Ghosal hematodiaphyseal dysplasia: simple to diagnose and easy to treat. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2015;37(4):285-9.



## 8. EKLER

### EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 375

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 20 ŞUBAT 2018 SALI  
**Toplantı No** : 2018/06  
**Proje No** : GO 18/224 (Değerlendirme Tarihi: 20.02.2018)  
**Karar No** : GO 18/224-25

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU' nun sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Şule ÜNAL, Prof. Dr. Mualla ÇETİN, Prof. Dr. Fatma GÜMRÜK ile birlikte çalışacakları ve Dr. Sümeyra OĞUZ' un uzmanlık tezi olarak, GO 18/224 kayıt numaralı, "*Shwachman Diamond Sendromuna Neden Olan Genetik Etiyolojinin Belirlenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

#### KATILMADI

- |   |  |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)     | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)      |
| 2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Üye)   | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)          |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SAĞLAM (Üye)   | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)            |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)        | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)        |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | İZİNLİ<br>14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| 6. Prof. Dr. R. Köfal ÖZGÜL (Üye)       | 15. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)      |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)      | 16. Yrd. Doç. Dr. Müge DEMİR (Üye)         |
| İZİNLİ                                  |  |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)    | 17. Öğr.Gör.Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye)      |
| 9. Prof. Dr. Mîntaze Kerem GÜNEL (Üye)  | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                |

**EK 2.**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KEMİK İLİĞİ YETMEZLİKLERİ MERKEZİ**

**SHWACHMAN-DIAMOND SENDROMU ŞÜPHESİ OLAN HASTALARDA**

**DEĞERLENDİRME FORMU**

Hasta kodu:

Cinsiyeti: Erkek  Kız

Doğum tarihi:

Örnek alınma tarihi:

Doğum yeri:

Örneği gönderen hastane / doktor / doktor telefonu:

Anne-baba arası akrabalık: Var  Yok

Varsa açıklayınız .....

Ailede Shwachman-Diamond Sendromu öyküsü: Var  Yok

Varsa belirtiniz;.....

**Fizik muayene bulguları:**

Boy: ..... cm (....p) Ağırlık:... kg (....p) Baş çevresi:..... cm (....p)

Cilt bulgusu: Var  ..... Yok

Hepatomegali: Var  Yok

Splenomegali: Var  Yok

Ekstremitte anomalisi: Var  Yok

Varsa belirtiniz.....

Başka pozitif bulgu varsa belirtiniz.....

**Hematolojik Değerlendirme:**

Nötropeniye girme öyküsü: Var  Yok

Nötropeni varsa belirtiniz; Kronik  Aralıklı

Nötropenin ilk tespit edildiği yaş:

Nötropenik olduğu dönemde tam kan sayımı bulguları:

Hemoglobin:.....gr/dL MCV:..... fL RDW:..... % Retikülosit:.....%

Beyaz küre sayısı: ..... 10<sup>9</sup>/L Nötrofil sayısı:..... 10<sup>9</sup>/L

Trombosit sayısı:..... 10<sup>9</sup>/L Hemoglobin F düzeyi:.....%

Transfüzyon öyküsü:

Kemik iliği değerlendirilmesi ve tarihi:

Daha önce çalışılan moleküler tetkikler (örneğin Pearson mutasyonu):

**Gastroenterolojik Değerlendirme:**

Kronik ishal öyküsü: Var  Yok

Varsa başlama yaşı, halen devam ediyor mu?.....

Serum tripsinojen düzeyi (< 3 yaş için):

Serum izoamilaz/amilazdüzeyi (>3 yaş için):

Serum lipaz düzeyi:

Fekal elastaz düzeyi:

72 saatlik gaitada yağ incelemesi:

Karaciğer fonksiyonları: ALT:..... AST:..... GGT:..... Albumin:.....

Vitamin düzeyleri: A vitamini:..... D vitamini:..... E vitamini:..... K vitamini:.....

Pankreas görüntülemesinde yağlanma: Var  Yok  Değerlendirilmedi

Değerlendirilen yöntem: USG  .....

Bilgisayarlı tomografi  .....

**İskelet Sistemi Değerlendirilmesi:**

Ekstremitte anomalisi: Var  Yok

Varsa belirtiniz.....

Direk grafide metafizyal diyastozis: Var  Yok

Varsa hangi kemiklerde belirtiniz.....

Göğüs deformitesi: Var  Yok

Varsa belirtiniz.....

**Diğer Sistemlerin Değerlendirilmesi:**

Ekokardiyografi (Çekilme yaşı, sonucu ve ejeksiyon fraksiyonu):

Serum immünglobin düzeyleri: IgA:..... IgG:..... IgM:.....

Lenfosit altgrubu çalışması sonucu:

Davranış problemi var mı?: Var  Yok

Varsa belirtiniz.....

### EK 3. SDS Ön Tanısı ile Yönlendirilen Hastaların Bulguları

AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
1	TRSDS003_01	K	26.07.12 A: yok DM: +	9 ay	var (0) Febril nötropeni	yok	yok	Normosellüler, myeloid hiper, eritroid rölatif hipoaktivite Myelositer seride olgunlaşmada duraklama yok. Eozinofili dikkate değer. MK (-)	Kronik ishal yok	yok	Büyüme ve gelişme geriliği
2	TRSDS004_02	E	31.10.11 A: yok DM: +	3 yaş	var (300)	var (101000)	var	?	var	BT: pankreasta atrofi ve diffüz yağlanma	Hepatosplenomegali, KCFT'de bozukluk Femur O-bain şeklinde Epifizyel ve metafizyel displazi yok Büyüme geriliği
3	TRSDS016_03	K	13.12.07 A: var	YD dönemi	yok	var	var aralıklı-hafif	?	Steatore+	BT: Pankreas hipoplazisi, splenomegali	Pankreas yetmezliği, Splenomegali, opere ASD
4	TRSDS020_04	E	03.06.97 A: yok DM: +	18 yaş iken gönderilmiş	var	var	yok	?	?	Batın USG: Pankreas ekojenitesi diffüz artmış Kreon kullanıyor.	Kemik Grafileri: Alt dorsal vertebraların alt ve üst end platelerinde yaygın Schmorl nodülleri izlenmiştir. Bilateral femur boyunları kalın izlenmektedir. Büyüme geriliği
5	TRSDS022_05	E	15.05.14 A: yok DM: +	5 ay	var (1100/100)	yok	var	?	?	?	Dışkıda elastaz düşüklüğü 7 günlükken büyük arter transpozisyonu nedeniyle, 37 günlükken VSD nedeniyle opere, 50 günlükken kalp pili takılmış. Büyüme geriliği
6	TRSDS051_06	E	18.03.14 A: yok	2 ay	En düşük 1400	var (2 değer)	var	Sellüler kemik iliği, hafif megaloblastik değişiklikler, eritroid-myeloid vakuolizasyon izlenmedi.	var (2 aylıkken başlamış)	Abd USG: normal (pankreas değerlendirilememiş) Fekal elastaz: >500 (N)	KF? Ter testi: normal
7	TRSDS054_07	K	? A: var	8 yaş 9 ay	var	var	var	Sellüler kemik iliği, myeloid arrest yok, megakaryosit	yok		Mikrosefali Kemik survey: normal

AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
			DM: + ? A: yok DM: +	?	?	var	var	görülmüdü.			
8	TRSDS060_08	K	DM: + ? A: yok DM: +	?	?	var	var				Hepatosplenomegali Gaita elastazı düşük Dar toraks, genişlemiş kondrokondral bileşke Kısa femur, geniş metafiz Atipik yüz, düşük kulak
9	TRSDS061_09	K	02.07.12 A: var	3 ay	yok	yok	var	Orta derecede sellüler kemik iliği. Eritroid ve myeloid hücrelerde vakuol yok	Kabızlık+	?	Hepatomegali KCFT boz Beslenme güçlüğü Konuşması geri Smith-Lemli-Opitz? düşünülmemiş.
10	TRSDS062_10										G6PC3 -dışlandı
11	TRSDS065_11	E	? A: yok DM: +	1 yaş					var (YD döneminde)		Büyüme-gelişme geriliği yok
12	TRSDS068_12	K	? A: var DM: +	?	?	?	?	?	?	?	Aile öyküsü+ (erkek kardeşinde de aynı mut)
13	TRSDS070_13	E	? A: yok DM: +	3,5 yaş	var (1200)	var	var	Hafif hiposellüler kemik iliği Hafif yağlanma artışı mevcut. Megakaryosit görülemedi. Normoblastlar arasında nükleer ve sitoplazmik köprüleşme dikkat çekti.	Yağlı dışkılama hikayesi yok		Ailesel aplastik anemi? Hepatosplenomegali
14	TRSDS079_14	E	? A: yok DM: ?	6 yaş	var (600)	var	var	Sellülerite %5'ten az, aplazik hipoplazik kemik iliği Hematopoetik hücrelerde azalma, ekstraselüler demir birikimi + Hematolojik FISH: normal	yok Serum amilaz düzeyi (>3 yaş için): 46	USG: pankreasta yağlanma yok	İskelet değerlendirmesi: normal Davranış problemi yok
15	TRSDS080_15	K	01.03.04 A: yok DM: +	11 yaş	var (900)	var	var	Sellülerite azalmış, myeloid seride granülasyon hücresi, birkaç adet hemafagositer hücre görüldü.	yok	USG: pankreasta yağlanma yok	İskelet değerlendirmesi: normal Davranış problemi yok
16	TRSDS081_16	E	12.03.08 A: var	1 yaş	var (700)	var	var	Megaloblastik değişiklikler	var	USG: pankreasta yağlanma yok Abdomen BT:	İskelet değerlendirmesi: normal MMR

AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
17	TRSDS082_17	K	11.02.14 A: var	4 ay	aralıklı var	aralıklı var	var	Orta sellüler kemik iliği, Osteoblastlar ve osteoklastlar artmış	var (4-5 aylıkken başlamış, şu an yok) pankreatik amilaz düşük	USG: normal?	Ağrıya duyarsızlık Büyüme geriliği
18	TRSDS087_18	E	30.09.14 A: yok DM: +	20 günlük	var (200)	var	yok	Megakaryosit görüldü. Eritroid öncüllerde vakolizasyon görüldü. Aktif makrofaj görüldü. Birkaç adet hemofagositoz görüldü. Hafif megaloblastik eritroid seri hücreler görüldü. Vakuolizasyon nadir olarak myeloid seride de görüldü.	var Serum amilaz (>3 yaş için): 63 Serum lipaz: 25 Fekal elastaz: >500	USG: pankreasta yağlanma yok	Büyüme geriliği EKO: sekundum ASD, LV'de hipertrofik değişiklikler
19	TRSDS092_19	E	? A: ? DM: ?	?	var (900)	yok	yok		var	USG: pankreasta yağlanma yok	İskelet değerlendirmesi: normal Davranış problemi yok SCID ile uyumlu olabilir denilmiş.
20	TRSDS097_20	K	27.08.14 A: var	10 ay	var (200)	var	yok	Sellüler kemik iliği, serbest histiyositlerde artış, eritroid seride megaloblastik değişiklikler, yer yer myeloid vakuolizasyon, gaucher benzeri depo hücreleri görüldü. Hipo/orta sellüler sonuç da mevcut.	yok	USG: pankreas normal	ADA2 eks? Minimal hepatomegali, KC ekojenitesinde minimal difuz artış
21	TRSDS100_21										RPS19- DEL
22	TRSDS103_22	E	08.05.13 A: yok	1,5 yaş	var (300) aralıklı	yok	var	Sellüler kemik iliği, duraklama yok, hafif megaloblastik	yok	USG: pankreasta yağlanma yok	Davranış problemi yok

AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
								değişiklikler izlendi.			
23	TRSDS105_23										BRAF -dışlandı
24	TRSDS111_24	E	02.07.15 A: var	4 ay	var (300)	yok	var		var	USG: pankreasta yağlanma yok	İskelet değerlendirmesi: normal Davranış problemi yok
25	TRSDS115_25	K	24.10.15 A: yok DM: ?	5 ay	var (200)	yok	yok		yok	USG?: pankreasta yağlanma yok	Davranış problemi yok
26	TRSDS116_26	E	? A: yok	?	var	var	var	?	?	USG:normal	Metafizler displazi Büyüme geriliği Masif splenomegali 14 yaş ex
27	TRSDS118_27	K	11.09.14 A: yok	1 yaş 6 ay	var (293)	yok	var	Sellüler kemik iliği, myeloid duraklama yok, displazi yok, çift çekirdekli normoblast görülmedi.	nadir olarak+	USG: pankreas normal	Davranış problemi yok
28	TRSDS119_28	K	09.07.06 A: yok DM: +	8 ay	var (400)	var	var	Hipoplazik	var	?	Splenomegali Hiperaktivite+ Büyüme geriliği
29	TRSDS120_29	K	06.12.15 A: var DM: +	?	var (200)	yok	var	Yetersiz materyal gelmiş	var Serum amilaz (>3 yaş için): 32 Serum lipaz: 57 Fekal elastaz: >500 72 saatlik gaitada yağ incelemesi: 4+	USG: pankreasta yağlanma yok	Büyüme geriliği İskelet değerlendirmesi: normal Davranış problemi yok
30	TRSDS121_30										HAX1 -dışlandı
	TRSDS121_31										HAX1 -dışlandı
31	TRSDS122_32	K	03.01.12 A: yok	4 yaş 3 ay	var (200)	yok	yok	Sellüler kemik iliği, duraklama yok	yok	?	Davranış problemi yok Grafipleri normal
32	TRSDS123_33	K	07.03.15	?	?	yok	?	Normosellüler kemik iliği.	var	?	Davranış problemi yok



AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
			A: yok DM: +		(2400)			Eritroid seride dikkati çeken vakuollu görünüm mevcuttur.	Serum lipaz: 25 (N)		
33	TRSDS129_34	E	08.09.15 A: var DM: ?	?	yok	var	yok	Eritroid hipoaktivite izlenen, megaloblastik değişiklik saptanmayan megakaryosit izlenen ve vakuolizasyon saptanmayan kia	var	USG: pankreasta yağlanma yok	İskelet değerlendirmesi: normal Davranış problemi yok
34	TRSDS132_35	E	15.01.03 A: var	40 günlükken	yok	var	var	Sellüler kemik iliği, çift çekirdekli normoblastlar, eritroid seride vakuolizasyon, megaloblastik ve displastik değişiklikler gözlemlendi.	var	USG: pankreas normal	Hepatomegali MMR Crohn FMF, immun yetmezlik
35	TRSDS134_36	K	06.08.16 A: var	3 günlükken	var (300)	var	yok		var	?	Büyüme geriliği
36	TRSDS136_37										APECED-dışlandı
37	TRSDS141_38										EPCAM -dışlandı
	TRSDS141_39										EPCAM -dışlandı
38	TRSDS146_40	E	10.12.11 A: ? (Adopt)	4 yaş 10 ay	var (200)	yok	yok	Normal	var (bebeklik döneminde)	USG: pankreas normal	Büyüme geriliği Hiperaktivite+ Bebekliğinden itibaren sık enfeksiyon+
39	TRSDS153_41	E	08.01.10 A: yok	1 yaş	var (500)	var	sınırdan	Orta sellüler, HFS yok, birkaç mikromegakaryosit, birkaç çift çekirdekli normoblast izlenmiştir.	yok Serum amilaz (>3 yaş için) : 24 Serum lipaz: 38	USG: pankreasta yağlanma yok	Hiperaktivite+
40	TRSDS156_42	E	28.05.15 A: yok	1,5 yaş	var (800)	yok	yok	Sellüler kemik iliği Duraklama izlenmedi, yağlanma artışı mevcut, megakaryositler artmış izlendi. Myeloid seride vakuolizasyon izlenmedi, megaloblastik değişiklik izlenmedi. HFS görülmedi.	yok kabızlık+	USG: pankreasta yağlanma yok	Amniyotik bantta bağlı ekstremelerde deformiteler Davranış problemi yok
41	TRSDS158_43										ADA2 -dışlandı
42	TRSDS165_44	K	29.11.12 A: yok	YD döneminde	var	var (aralıklı)	var (aralıklı)	Sellüler kemik iliği, yağlanma artışı var. Displastik	var amilaz düşük	USG: diffüz yağlanma	Yarık damak YD döneminde AST-ALT

AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
								mikromegakaryositler görüldü. Megakaryositlerde artış saptandı. Her üç seriye ait displastik değişiklikler saptandı.			yüksekliği+
43	TRSDS167_45	K	14.05.10 A: yok	2 yaş	var (0-100)	yok	yok	Sellüler, histiyositlerde artış, dejenere nükleusları olan, displazi görülen, megakaryositleri artmış olan kila	yok	görüntüleme yok	Davranış problemi yok
44	TRSDS176_46	E	23.05.06 A: yok DM: +	?	var (600)	var	sınırdadır, var	Normosellüler, tüm seriler mevcut. Megakaryositler sayıca artmış ve displazi ile uyumlu mikromegakaryositler görüldü. Myeloid maturasyonda duraklama olduğu düşünülmüş.	Çölyak +	USG: pankreasta yağlanma yok	
45	TRSDS177_47	K	12.02.16 A: yok	3-4 ay	var	yok	yok	?	var amilaz düşük Kreon kullanıyor.	?	Büyüme geriliği Bir dönem AST-ALT yüksekliği+ Grafipleri: normal
46	TRSDS178_48	E	18.05.15 A: var	9 ay	var (0-100)	var	var	Sellüler kemik iliği, myeloid elemanlarda artış, belirgin sola kayma, megakaryositlerde artış	yok?	USG: pankreas normal	Hepatosplenomegali Ataksi telenjiyektazi Otoimmün hemolitik anemi Yürüme: 2 yaş
47	TRSDS186_49	E	10.10.17 A: var	7 ay	var (200)	yok	var	Sellüler ki, megakaryosit var, myeloid seride duraksama yok	yok	USG: pankreas normal	Chotzen sendromu
48	TRSDS187_50	K	? A: yok DM: +	?	var (800)	yok	var	Eritroid seride displazi görülmedi. Myeloid seride displazi mevcut.		USG: KC ekojenitesinde heterojen kaba granüler görünüm	Büyüme geriliği Tibia distalinde metafizyel bant
49	TRSDS188_51	E	07.05.17 A: yok	8 ay	var (200)	yok	yok	Sellüler kemik iliği, megakaryositlerde artış, dismegakaryopoezis var. Erken promyelosit sonrası arrest var. Megaloblastik değişiklikler var.	yok?	görüntüleme yok	
50	TRSDS189_52	E	03.06.08 A: yok DM: ?	9 yaş	var (900) aralıklı	yok	yok	Yağlanma artışı, megakaryositlerde artış var, displazi izlenmedi. Myeloid seride duraklama izlenmedi.	yok	?	Davranış problemi yok

AİLE	BİREY	Cinsiyet	Doğum Tarihi/ Akrabalık (A)/ Dış Merkez (DM)	Başlangıç Yaşı	HEMATOLOJİK				PANKREAS		Destekleyici Bulgular
					Nötropeni	Trombositopeni	Anemi	K.İ Bulguları	Diyare	Görüntüleme (USG/BT)	
51	TRSDS190_53	E	28.06.11 A: yok	4 yaştan sonra	var (200)	yok	yok	Tüm serilere ait hücreler görülmüş, duraksama yok, megakaryositlerde artış	yok	?	
52	TRSDS191_54	E	?	?	?	?	?	?	?	?	?
53	TRSDS194_55	E	01.01.09 A: yok DM: ?	2015 6 yaş	var (?) aralıklı lökopeni+ (3900)	yok	yok	Duraklama yok	var	Görüntüleme:? Serum lipaz, amilaz, p. amilaz değerleri normal	Davranış problemi yok
54	TRSDS197_56	E	26.05.18 A: ? DM: +	2 ay	var (200)	yok	var	Sellüler kemik iliği, myeloid seri maturasyonunda duraklama, bazı normoblastlarda displazi izlenmiş.		USG: KC steatoz+ Pankreas değerlendirilememiş.	Ketolaktik asidoz+ Hepatomegali Trigliserid yüksekliği+
55	TRSDS198_57	K	17.07.18 A: var	1,5 ay	var (100)	var	var	Granülositer seri elemanlarında belirgin azalma Myelositer seride belirgin vakuolüsyon (sepsiste de olabilir denmiş)	yok	Batın USG: normal	EKO: multipl ASD Kemik survey: normal
56	TRSDS200_58	K	01.07.14 A: yok	3 yaş 8 ay	var (200)	yok	yok	Sellüler kemik iliği, myeloid ve eritroid seride megaloblastik değişiklikler görüldü, duraklama izlenmedi.	yok	USG: pankreas normal	İzole benign nötropeni denilmiş.
57	TRSDS211_59	E	? A: var DM: ?	?	?	?	?	?	?	?	
58	TRSDS212_60	K	08.05.15 A: yok	3 yaş	var (0)	yok	yok	Sellüler kemik iliği	yok	yok?	Davranış problemi yok
59	TRSDS215_61	K	12.05.03 A: ? DM: ?	2018 15,5 yaş	var (1300)	var	var	Biyopsi: tüm hücre serilerinde azalma			Aplastik anemi??
60	TRSDS219_62	K	28.07.14 A: yok DM: ?	? 1 yıldır ishal+	yok	yok	yok		var	BT: pankreasta yağlanma var	Davranış problemi yok
61	TRSDS220_63	K	31.01.07 A: var	9 yaş	var (400)	yok	yok		var 4 aylıkken varmış artık devam etmiyor	Batın USG: normal	Hepatomegali Ekstremitelerde kısalık varmış. Önceden konuşması garipmiş, artık yokmuş.

YD: yenidoğan, sarı renk ile işaretli olanlar SBDS gen mutasyonu pozitif olan hastalar, kırmızı renk ile işaretli olanlar WES analizine alınan hastalar.

#### EK 4.

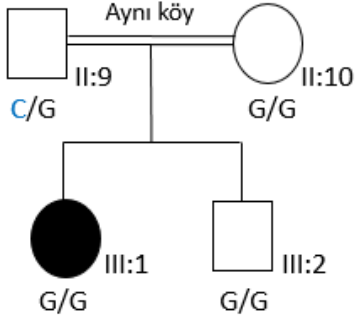
#### Kahtsal Kemik İliği Yetmezlikleri ile İlişkilendirilmiş Genler

<i>ABCB7</i>	<i>ACD</i>	<i>ADA2 (CECR1)</i>	<i>AK2</i>	<i>AP3B1</i>	<i>ATM</i>
<i>ATR</i>	<i>BLM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CD40LG</i>
<i>CLPB</i>	<i>CSF3R</i>	<i>CTC1</i>	<i>CXCR2</i>	<i>CXCR4</i>	<i>DKC1</i>
<i>DNAJC21</i>	<i>EFL1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>ELANE</i>	<i>EPO</i>	<i>ERCC4</i>
<i>ERCC6L2</i>	<i>FANCA</i>	<i>FANCB</i>	<i>FANCC</i>	<i>FANCD2</i>	<i>FANCE</i>
<i>FANCF</i>	<i>FANCG</i>	<i>FANCI</i>	<i>FANCL</i>	<i>FANCM</i>	<i>G6PC3</i>
<i>GATA1</i>	<i>GATA2</i>	<i>GF11</i>	<i>HAX1</i>	<i>HYOU1</i>	<i>JAGN1</i>
<i>LAMTOR2</i>	<i>LIG4</i>	<i>LYST</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>MPL</i>	<i>MRTFA (MKL1)</i>
<i>MYSM1</i>	<i>NAF1</i>	<i>NBN</i>	<i>NHEJ1</i>	<i>NHP2</i>	<i>NOP10</i>
<i>NSMCE3</i>	<i>PALB2</i>	<i>PARN</i>	<i>POT1</i>	<i>RAB27A</i>	<i>RAC2</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RBM8A</i>	<i>RFWD3</i>	<i>RMRP</i>	<i>RNF168</i>
<i>RPL11</i>	<i>RPL15</i>	<i>RPL18</i>	<i>RPL26</i>	<i>RPL27</i>	<i>RPL31</i>
<i>RPL35</i>	<i>RPL35A</i>	<i>RPL5</i>	<i>RPL9</i>	<i>RPS10</i>	<i>RPS15</i>
<i>RPS15A</i>	<i>RPS17</i>	<i>RPS19</i>	<i>RPS24</i>	<i>RPS26</i>	<i>RPS27</i>
<i>RPS27a</i>	<i>RPS28</i>	<i>RPS29</i>	<i>RPS7</i>	<i>RTEL1</i>	<i>RUNX1</i>
<i>SBDS</i>	<i>SLC37A4</i>	<i>SLX4</i>	<i>SMARCD2</i>	<i>SRP54</i>	<i>SRP72</i>
<i>STK4</i>	<i>STN1</i>	<i>TAZ</i>	<i>TCIRG1</i>	<i>TCN2</i>	<i>TERC</i>
<i>TERF2IP</i>	<i>TERT</i>	<i>TINF2</i>	<i>TP53</i>	<i>TSR2</i>	<i>UBE2T</i>
<i>USB1</i>	<i>VPS13B</i>	<i>VPS45</i>	<i>WAS</i>	<i>WDR1</i>	<i>WIPF1</i>
<i>WRAP53</i>	<i>XRCC2</i>				

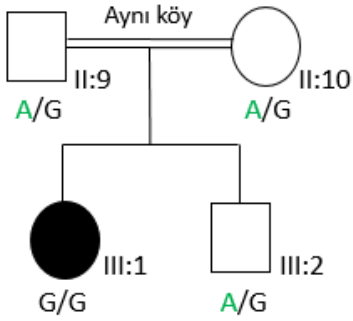
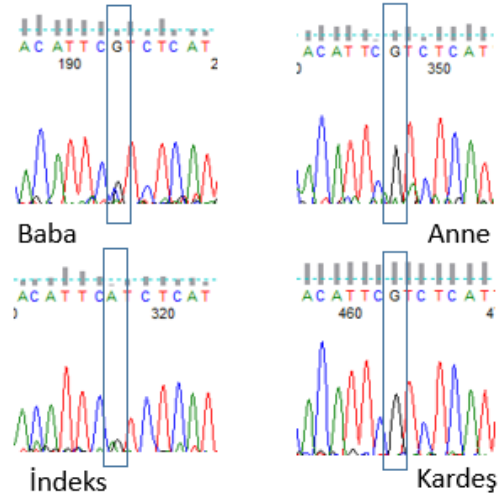
*Cincinnati Children's* Hastanesinin "Kemik İliği Yetmezliği Gen Sekans Paneli" nden alınmıştır.

## EK 5. WES Validasyon ve Segregasyon Çalışmalarının Sanger Elektroferogram Görüntüleri

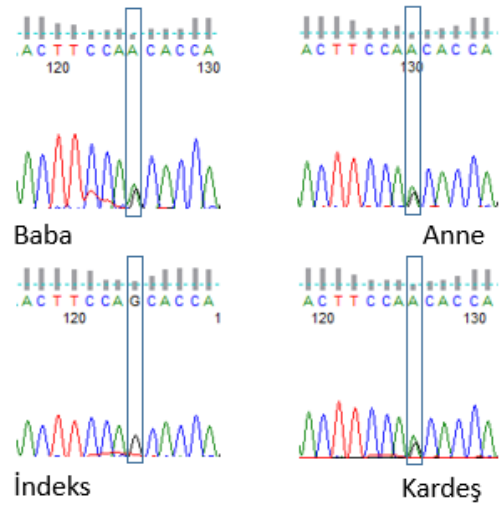
TRSDS167\_45:

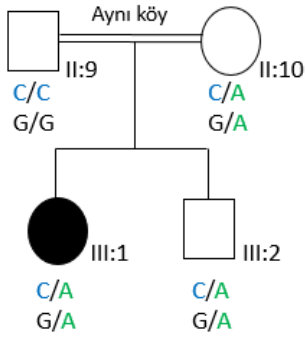


*DNAH7*, ekzon 18, c.2516C>G (p.Pro839Arg)

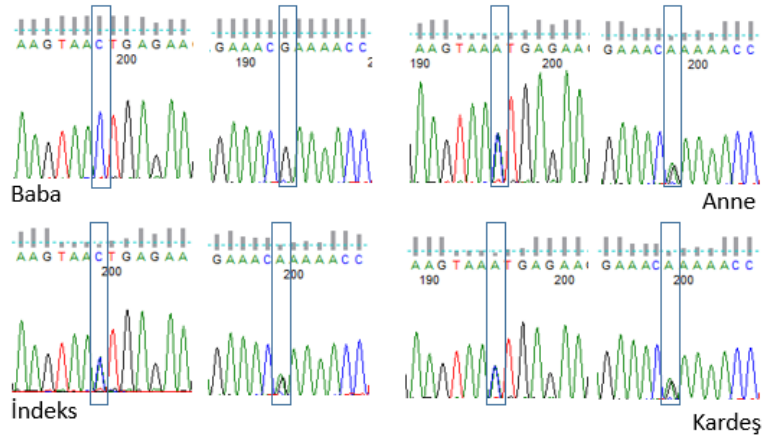


*FCHO2*, ekzon 19, c.1481A>G (p.Asn494Ser)

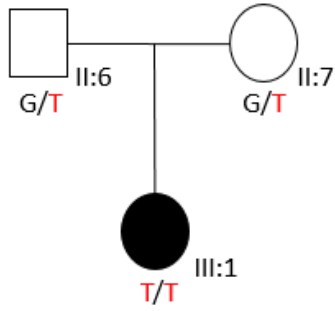




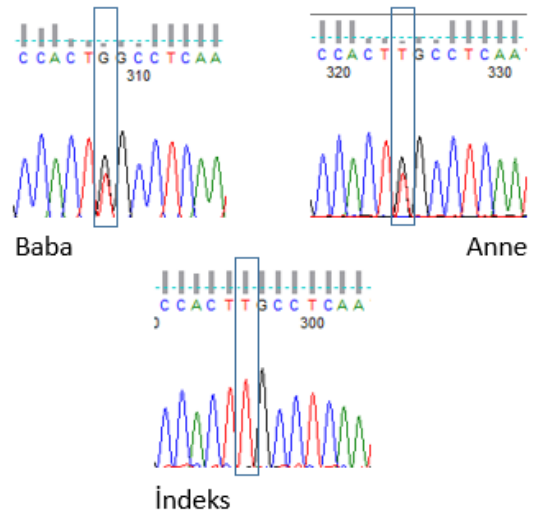
CNTRL (CEP1), ekzon 29, c.4907C>A (p.Thr1636Asn) (solda)  
 CNTRL (CEP1), ekzon 39, c.6580G>A (p.Glu2194Lys) (sağda)



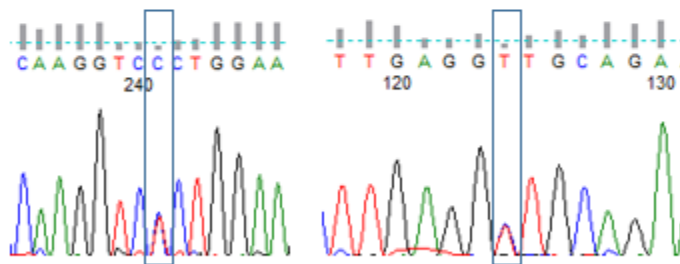
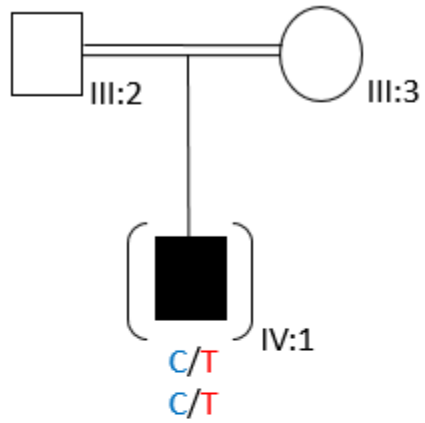
TRSDS118\_27:



CEACAM6, ekzon 4, c.919G>T (p.Gly307Cys)



TRSDS146\_40:



MAP1A, ekzon 4, c.1441C>T (p.Pro481Ser) (solda)  
MAP1A, ekzon 4, c.6842C>T (p.Ala2281Val) (sağda)