



T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR VE/VEYA
KONJENİTAL ANOMALİLERİ OLAN
OLGULARIN MOLEKÜLER KARYOTİPLEME
VE YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Arzu GULİYEVA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Mayıs 2024
İSTANBUL**



T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR VE/VEYA
KONJENİTAL ANOMALİLERİ OLAN
OLGULARIN MOLEKÜLER KARYOTİPLEME
VE YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Arzu GULİYEVA

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Filiz ÖZEN**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Mayıs 2024
İSTANBUL**

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik Kliniğinde asistan hekim olan Dr. Arzu GULİYEVA'nın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR VE/VEYA KONJENİTAL ANOMALİLERİ OLAN OLGULARIN MOLEKÜLER KARYOTİPLEME VE YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı uzmanlık tezi başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Filiz ÖZEN

.....

Üyeler:

.....

.....

Tez Savunma Tarihi: __/__/2024

YAZAR BİLDİRİMİ

“NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR VE/VEYA KONJENİTAL ANOMALİLERİ OLAN OLGULARIN MOLEKÜLER KARYOTİPLEME VE YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ” isimli uzmanlık tezinde Dr. Arzu GULİYEVA,

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını “Bilgilendirme” bölümünde belirtmiştir.
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları “Bilgilendirme” bölümünde eksiksiz olarak belirtmiştir.
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını “Bilgilendirme” bölümünde belirtmiştir.
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tınak içerisine alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Mayıs, 2024

Dr. Arzu GULİYEVA

İmza:

BİLGİLENDİRME

- Bu tez kabulünden önce hiçbir yerde yayınlanmamıştır.
- Bu tez ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.
- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkim yoktur.

Dr. Arzu GULİYEVA



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgeliği, tecrübeleri ve başarılı yönetici kimliği ile bana rol model olan, bir anne şefkati ve koruyuculuğu ile desteğini her zaman hissettiğim, tez danışmanım ve değerli hocam, Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik Kliniği İdari Sorumlusu Doç. Dr. Filiz ÖZEN'e;

Özgün yaklaşımları ve öğretici yöntemleri ile bana daim yol gösteren, pozitif enerjisi ve güler yüzü ile ilham kaynağım olan İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Elif YILMAZ GÜLEÇ'e;

Uzmanlık eğitimine beraber başladığım, 4 sene boyunca iyi ve kötü günlerde birlikte yürüdüğüm kıymetli eşkıdemim Dr. Canberk AKKAŞ'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutlu olduğum Dr. Mustafa GÜNEŞ, Dr. Sena ÇETİN, Dr. Diyar SAYIT, Dr. Simge Tuana AY ve diğer çok kıymetli asistan doktor arkadaşlarıma;

Çalışmaktan mutluluk duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden sıkça yararlandığım, Cem Murat ÇELEBİ başta olmak üzere kliniğimizin bağlı olduğu sitogenetik ve moleküler laboratuvarlarındaki tüm biyolog ve teknisyen arkadaşlara;

Tıp fakültesi eğitimim ve tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bana aktaran tüm hocalarıma;

Türkiye'deki denklik ve uzmanlık eğitimlerim boyunca bana her koşulda destek olan canım annem ve babam, Mehriban ve Şaig ORUJOV'lara;

Beni her zaman sonsuz sevgi, sabır ve şefkatle destekleyen sevgili eşim Ceyhun GULİYEV'e, çocuklarımız Ceyla ve Aydın'a;

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Arzu GULİYEVA

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	i
YAZAR BİLDİRİMİ	ii
BİLGİLENDİRME	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR	vii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. MOLEKÜLER KARYOTİPLEME- aCGH	4
2.1.1. aCGH Metodolojisi	6
2.1.1.1. Teşhis amaçlı aCGH'nin avantajları ve sınırlamaları	8
2.2. YENİ NESİL DİZİLEME	8
2.2.1. Kısa Okuma Dizileme.....	10
2.2.1.1. Kütüphane hazırlığı	10
2.2.2. Ion Torrent	14
2.2.3. Illumina	14
2.2.4. Avantajlar ve Sınırlamalar	15
2.2.5. Uzun Okuma Dizileme.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. ÇALIŞMA TASARIMI	18
3.2. HASTALARININ ÇALIŞMAYA DÂHİL EDİLMESİ VE HASTA VERİLERİNİN KAYDEDİLMESİ	19
3.3. YÖNTEM.....	19
3.3.1. DNA İzolasyonu	19
3.3.2. Microarray Çalışması.....	24
3.3.4. Klinik Ekzom Dizileme Çalışması.....	28
3.3.5. Tüm Ekzom Dizileme Çalışması	36
3.3.6. Nextseq Run Verilmesi	43

3.3.7. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	72

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Onay Formu

Ek-2: Orijinallik Beyan Formu



KISALTMALAR

ACD	Acid Citrate Dextrose (Asit Sitrat Dekstroz)
aCGH	Array Comparative Genomic Hybridization
ACMG	American College of Medical Genetics (Amerikan Tıbbi Genetik Kurulu)
ADCY5	Adenylate Cyclase 5 (Adenilat siklaz 5)
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder (Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu)
AGAT	Arginine Glycine Aminotransferase (Arjinin glisin aminotransferaz)
ARS	Antigen Recognition Site (Antijen tanıma alanı)
ASD	Atrial Septal Defekt
BAC	Bacterial Artificial Chromosomes (Bakteriyel yapay kromozomu)
BAF	B Allel Frekansı
CACNA1C	Calcium Voltage Gated Channel Subunit Alpha1 C (Kalsiyum voltaj kapısı kanalı altünitesi alfa 1C)
CDD	Creatine Deficiency Disorders (Kreatin eksikliği bozuklukları)
CDH2	Cadherin 2 (Kaderin 2)
CES	Clinical Exome Sequencing (Klinik ekzom dizileme)
CFHR5	Complement Factor H Related 5 (Kompleman faktör H ilişkili 5)
CHD3	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3 (Kromo alan helikaz DNA bağlayıcı protein 3)
ChIP-Seq	Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (Kromatin immün çöktürme dizileme)
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductors (Tamamlayıcı metal oksit semi iletkenleri)
CNV	Copy Number Variation (Kopya sayısı değişikliği)
CRTR	Creatine Transporter (Kreatin taşıyıcı)
CT	Computer Tomography (Bilgisayarlı tomografi)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonukleik asit)

dNTP.....	Deoxyribonucleotide triphosphate (Deoksiribonukleotid trifosfat)
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı, 5. Baskı)
DTR	Derin tendon refleksi
DTT.....	Dithiothreitol (Ditiotreitol)
EDTA.....	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Etilen diamin tetraasetik asit)
EEG.....	Elektroensefalografi
EKO	Ekokardiyografi
ES.....	Exome Sequencing (Ekzom dizileme)
ETHE1	ETHE1 persulfide dioxygenase (ETHE1 persülfid dioksijenaz)
FISH.....	Fluorescence In Situ Hybridization (Floresan in situ hibridizasyon)
FMR1	Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 (Frajil X haberci ribonucleoprotein 1)
FUCA1.....	Alpha L Fucosidase 1 (Alfa L fukosidaz 1)
GAMT.....	Guanidinoacetate N-Methyltransferase (Guanidinoasetat N metiltransferaz)
GDD.....	Global Development Delay (Global gelişim geriliği)
gDNA.....	Genomic Deoxyribonucleic Acid (Genomik deoksiribonukleik asit)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Glial fibrillar asidik protein)
GGG.....	Global Gelişim Geriliği
HIBCH	3 Hydroxyisobutyryl CoA Hydrolase (3 hidroksiizobutiril CoA hidrolaz)
HLA	Human Leucocyte Antigen (İnsan lökosit antijeni)
HLXB9.....	Homeobox gene HB9 (Homeobox geni HB9)
HPE.....	Holoprosensefali
ID	Intellectual Disability (Zihinsel yetersizlik)
IQ	Intelligence Quotient (Zeka Katsayısı)
IRD.....	Infantile Refsum Disease (İnfanıl Refsum Hastalığı)

ISCN	An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (İnsan Sitogenomik Nomenklatürü İçin Uluslararası Sistem)
KAT8	Lysine Acetyltransferase 8 (Lizin asetiltransferaz 8)
KMT2A.....	Lysine Methyltransferase 2A (Lizin metiltransferaz 2A)
KMT2E	Lysine Methyltransferase 2E (Lizin metiltransferaz 2A)
LRR.....	Log R Ratio (Log R oranı)
MBOAT7	Membrane Bound O-Acetyltransferase Domain Containing 7 (Membrana bağlı O- asetiltransferaz etki alanı içeren 7)
MCPH1	Microcephalin 1 (Mikrosefalin 1)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Majör histokompatibilite kompleksi)
Mnase.....	Micrococcal Nuclease (Mikrokokkal nukleaz)
MR	Mental Retardasyon
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NALD	Neonatal Adrenoleukodystrophy (Neonatal Adrenolökodistrofi)
NDD.....	Neurodevelopmental Disorders (Nörogelişimsel bozukluklar)
NGS	Next Generation Sequencing (Yeni nesil dizileme)
NLGN4X	Neurologin 4 X-linked (Nöroligin 4 X'e bağlı)
NNT	Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nikotinamid nükleotid transhidrojenaz)
NRXN1	Neurexin 1 (Nöroksin 1)
NSUN2.....	NOP2/Sun RNA Methyltransferase 2 (NOP2/Sun RNA metiltransferaz 2)
OMIM	An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders (İnsan Genleri ve Genetik Bozuklukların Çevrimiçi Kataloğu)
ONT	Oxford Nanopore Technology (Oxford nanopore teknolojisi)
OSB.....	Otizm Spektrum Bozuklukları
PAC.....	P1 Derived Artificial Chromosome (P1 Derived Artificial Chromosome)
PacBio.....	Pacific Biosciences (Pasifik Biyobilimleri)
PCR.....	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PDD-NOS	Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified (Başka Türü Belirtilmemiş Yaygın Gelişimsel Bozukluk)

PEPD.....	Peptidase D (Peptidaz D)
PEX5.....	Peroxisomal Biogenesis Factor 5 (Peroksizomal Biyogenez Faktörü 5)
PHF21A	PHD Finger Protein 21A (PHD Parmak proteini 21A)
PTPN11.....	Protein Tyrosine Phosphatase Non Receptor Type 11 (Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11)
RNA.....	Ribonucleic Acid (Ribonukleik asit)
RSE	Regional Spesific Extraction (Bölgesel Spesifik Ekstraksiyon)
SCN2A.....	Sodium Voltage Gated Channel Alpha Subunit 2 (Sodyum Voltaj Kapılı Kanal Alfa Alt Birimi 2)
SHH	Sonic Hedgehog Signaling Molecule (Sonic Hedgehog Sinyal Molekülü)
SLC1A2	Solute Carrier Family 1, Member 2 (Çözünen madde taşıyıcı ailesi 1, üye 2)
SLC6A8	Solute Carrier Family 6, Member 8 (Çözünen madde taşıyıcı ailesi 6, üye 8)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
SNRPN.....	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (Küçük Nükleer Ribonükleoprotein Polipeptit N)
SNV	Single Nucleotide Variant (Tek nükleotid varyantı)
SOS1	Sos Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1 (Sos Ras/Rac guanin nükleotid değişim faktörü)
TS.....	Targeted Sequencing (Hedefli dizileme)
VUS	Variant of Uncertain Significance (Anlamı belirsiz varyant)
WES.....	Whole Exome Sequencing (Tüm ekzom dizileme)
WGBS.....	Whole Genome Bisulfite Sequencing (Tüm genom bisülfite dizileme)
WGS.....	Whole Genome Sequencing (Tüm genom dizileme)
WTS	Whole Transcriptome Sequencing (Tüm transkriptom dizileme)
YDYBÜ	Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitesi
YND.....	Yeni nesil dizileme
ZMYM2	Zinc Finger, MYM Type 2 (Çinko parmak, MYM tip 2)
ZNF292.....	Zinc Finger Protein 292 (Çinko parmak protein 292)

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1.	Hastaların cinsiyet dağılımları ve yaş ortalaması	45
Tablo 4.2.	Hastaların microarray analizi sonuçları	45
Tablo 4.3.	Microarray cnv gözlenen 41 hasta içerisindeki dağılımlar	46
Tablo 4.4.	Microarray patojenik /muhtemel patojenik ve VUS hasta gruplarında GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması	47
Tablo 4.5.	Yeni nesil dizileme yapılan hastalar	47
Tablo 4.6.	Hastaların yeni nesil dizileme (NGS) analizi sonuçları	48
Tablo 4.7.	CES ve WES dağılımı	48
Tablo 4.8.	Yeni nesil dizileme sonucu varyantların dağılımı	48
Tablo 4.9.	Klinik Ekzom Dizileme (CES) sonucu varyantların dağılımı	48
Tablo 4.10.	Tüm Ekzom Dizileme (WES) sonucu varyantların dağılımı	49
Tablo 4.11.	CES dağılımına göre GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması	50
Tablo 4.12.	WES dağılımına göre GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması	51
Tablo 4.13.	CES ve WES Patojenik / muhtemel patojenik veya VUS hasta gruplarında GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması	52
Tablo 4.14.	Microarray ve NGS tanı alan hasta gruplarında GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması	53
Tablo 4.15.	Moleküler karyotipleme sonucu tanı alan olgular.	54
Tablo 4.16.	Yeni nesil dizileme sonucu tanı alan olgular	55

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	aCGH teknolojisinin prensipleri.....	7
Şekil 2.2.	Lab-Aid 824s Kan DNA Ekstraksiyon Şeması	21



ÖZET

NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR VE/VEYA KONJENİTAL ANOMALİLERİ OLAN OLGULARIN MOLEKÜLER KARYOTİPLEME VE YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda; Moleküler karyotipleme- mikrodizin tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) testlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çalışmamıza, 01.09.2020-29.09.2023 tarihleri arasında hastanemizde takip edilen, global gelişim geriliği (GGG), mental retardasyon, otizm spektrum bozuklukları (OSB), dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, öğrenme güçlüğü şikayetleri olan nörogelişimsel bozuklukları (NGB) ve konjenital anomalileri olan 0-25 yaş arası 150 hasta dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların moleküler ve klinik verilerine retrospektif olarak ulaşılarak verileri kaydedildi ve sonuçlar değerlendirildi. Hastalara öncelikle kromozom analizi ve mikroyarray testleri çalışılmıştır. Karyotip analizinde 1 hastada 5mb üzeri delesyon tespit edilirken daha sonra microarray ile de konfirme edildi. Sebebi açıklanamayan mental retardasyonu ve OSB olan 20 erkek hastaya Frajil X testi çalışılarak normal sonuçlanmıştır. Mikroyarray testi sonucunda %6 (n=9) hasta tanı alırken %27.3 hastada VUS varyantlar saptandı. Kalan 141 hastaya yeni nesil dizileme yöntemleri-klinik ekzom dizileme ve tüm ekzom dizileme- ile devam edildi. %19.1 (n=27) hasta tanı alırken %39 hastada fenotiple ilişkili VUS varyantlar saptandı.

Tanı alan hastalar incelendiğinde, moleküler karyotipleme yöntemi ile en yüksek teşhis verimi %17.6 ile sendromik global gelişim geriliği alt grubu olurken konjenital anomaliler grubunda patojenik/muhtemel patojenik varyant saptanmadı. Yeni nesil dizileme yönteminde epilepsi eşlik eden OSB ve izole diğer NGB alt grupları %50 hastada

başarılı olurken epilepsi eşlik eden GGG altgrubunda %13.3 ile en düşük tanı yüzdesi görüldü.

Çalışmamızın birincil ve ikincil amacı başarı ile tamamlanmıştır. Bunun sonucunda; yeni nesil dizileme yöntemlerinin moleküler karyotiplemeye nazaran daha yüksek tanı yüzdesine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda yeni nesil dizilemenin moleküler karyotipleme ile birlikte birinci basamak test olarak çalışılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: moleküler karyotipleme, yeni nesil dizileme, nörogelişimsel bozukluklar, otizm spektrum bozuklukları, konjenital anomaliler, kopya sayısı değişiklikleri.



ABSTRACT

COMPARATIVE EVALUATION OF MOLECULAR KARYOTYPING AND NEXT GENERATION SEQUENCING DATA IN CASES WITH NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS AND/OR CONGENITAL ANOMALIES

In our study, a comparative evaluation was conducted on molecular karyotyping- array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and Next Generation Sequencing (NGS) tests.

Between 01.09.2020-29.09.2023 a total of 150 patients aged 0-25 with diagnoses of global developmental delay (GDD), mental retardation, autism spectrum disorders (ASD), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), learning difficulties, and congenital anomalies, who were followed up at our hospital, were included in our study.

Retrospectively, molecular and clinical data of the included patients were accessed, recorded, and evaluated. Initially, chromosome analysis and microarray tests were performed on the patients. In the karyotype analysis, a deletion of over 5 Mb was detected in one patient, which was later confirmed by microarray. The Fragile X test was conducted on 20 male patients with unexplained mental retardation and ASD, yielding normal results. While 6% (n=9) of the patients received a diagnosis based on the microarray test, VUS variants were detected in 27.3% of the patients. The remaining 141 patients underwent further testing using next-generation sequencing methods - clinical exome sequencing and whole exome sequencing. Among them, 19.1% (n=27) received a diagnosis, and phenotypically associated VUS variants were found in 39% of the patients.

Upon examination of diagnosed patients, the molecular karyotyping method showed the highest diagnostic yield of 17.6% in the syndromic GDD subgroup, while no pathogenic/likely pathogenic variants were detected in the congenital anomalies group. In the NGS method, epilepsy accompanying ASD and isolated other NGB subgroups were

successful in 50% of cases, whereas the epilepsy accompanying GDD subgroup had the lowest diagnostic percentage at 13.3%.

The primary and secondary objectives of our study have been successfully accomplished. Consequently, it has been demonstrated that next-generation sequencing methods have a higher diagnostic yield compared to molecular karyotyping. Based on our findings, next-generation sequencing should be considered as a first-line test alongside molecular karyotyping.

Key Words: molecular karyotyping, next generation sequencing, neurodevelopmental disorders, autism spectrum disorders, congenital anomalies, copy number variations.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörogelişimsel bozukluklar terimi (NGB) beyin gelişimi ve nörogelişimsel bozulmalar dahil, klinik ve etiyolojik olarak farklı olan bir sıra nörolojik ve psikiyatrik sorunları içeren geniş bir alanı kapsamaktadır (1). Bilişsel, dil, davranış ve/veya motor becerilerde gelişimsel eksikliklere sahip olan ve kişisel, sosyal, akademik ve/veya mesleki işlevselliğin bozulmasına neden olan durumları ifade eder (2,3).

“The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM-5), son versiyonunda, Nörogelişimsel Bozuklukları (Neurodevelopmental Disorders- NDD) bu şekilde sınıflandırılmıştır:

- Global Gelişim Geriliği/ Entelektüel Yetersizlik (Global Developmental Delay-GDD/ Intellectual Disability-ID);
- Otizm Spektrum Bozuklukları (Autism Spectrum Disorders - ASD);
- Dikkat Eksikliği Hiperaktivite bozukluğu (Attention Deficit Hyperactivity Disorder - ADHD);
- İletişim bozuklukları;
- Özgün öğrenme bozuklukları;
- Motor fonksiyonda bozukluklar (2,4).

NGB’ler monogenik ve multifaktöryel kalıtı olarak hem klinik, hem de genetik açıdan heterojen hastalıklardır, bu da genetik teşhisi zorlaştırmaktadır (1,5,6). Bugüne kadar 2000’den fazla ilişkili gen tanımlanmıştır (Deciphering Developmental Disorders, www.ddduk.org). Kalıtımın kompleks ve karmaşık olması birden fazla genetik test yapılmasını gerektirmekte ve buna rağmen uzun ve maliyetli süreçten sonra hastaların %50 den fazlası tanısız kalabilmektedir (6,7). Teşhisin kesin olarak ve zamanında konulabilmesi hem hasta, hem de ailelerin yönetimi açısından önemlidir (3,8).

Klinik olarak, GGG/EY, bilişsel ve adaptif fonksiyonlarda belirgin bir bozulma ile karakterizedir ve 18 yaşından önce ortaya çıkar (5-7) . EY, bebeklik veya erken çocukluk döneminde gelişimsel gecikme olarak kendini gösterebilir, ancak en iyi şekilde okul yıllarında teşhis edilir (4).

Standart bireysel olarak uygulanan testlerden biri veya daha fazlası ile yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen zeka katsayısı (Intelligence Quotient-IQ) tarafından, EY (ID) beş dereceye ayrılır:

- Sınırdan ID (IQ düzeyi 70-85);
- Hafif ID (IQ düzeyi 50-55 ila yaklaşık 70);
- Orta düzeyde ID (IQ düzeyi 35-40 ila 50-55);
- Şiddetli ID (IQ düzeyi 20-25 ila 35-40) ve
- Derin ID (IQ düzeyi 20-25'in altında).

Genellikle başvuru belirtileri, adaptif fonksiyonlarda bozulmalardır (8).

OSB'ler, Otizm, Asperger sendromu, başka türlü belirtilmemiş yaygın gelişimsel bozukluklar (PDD-NOS) ve çocukluk disintegre bozukluğu gibi klinik olarak heterojen bir grup bozukluğu içerir (3). Bunlar, sosyal etkileşimde belirgin olarak anormal veya bozulmuş gelişme, iletişimde ve faaliyetlerde sınırlı bir repertuar ile karakterizedir ve EY ile birlikte görülebilir. EY/OSB'ler, halk sağlığı ve toplum için büyük endişe kaynağıdır ve etkilenen bireyi günlük yaşamının tüm alanlarında kısıtlamakla kalmaz, aynı zamanda aileler için de bir kısıtlama oluşturur (9) .

Kromozomal anöploidiler (fazla veya eksik kromozomlar) ve yapısal değişiklikler (delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve marker kromozomlar), doğuştan gelen anomaliler, dismorfizm, global gelişimsel gecikme, otizm, düşükler ve birçok genetik sendromun altında yatan nedenlerdir (10).

Bugüne kadar, yalnızca GGG/EY ve OSB için genetik test önerileri bulunmaktadır. Güncel kılavuzlar 2010 tarihine dayanmakta olup moleküler karyotipleme ve Frajil X testlerinin sebebi açıklanamayan GGG/EY ve/veya OSB'lerde ilk basamak olarak çalışılmasını önermektedir (11-13). Moleküler karyotiplemenin bildirilen teşhis verimi, GGG/EY, OSB ve/veya konjenital anomalilere sahip bireyler için incelenen serilere bağlı olarak %10 ila %20 arasında değişmektedir (13-15). Çalışmaların sağladığı fenotipik ayrıntı düzeyinde çeşitlilik olmasına rağmen, nörogelişimsel bozukluğa sahip hastalarda

aCGH (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon mikrodizini) ve ES (ekzon dizileme) üzerine rapor veren birkaç yazar, belirli özelliklerin ve ek tanılarının artan tanı verimlilikleri ile ilişkilendirildiğini öne sürmektedir (16-24).

Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing- NGS), hedefli panel testleri, ekzom dizileme ve tüm genom dizileme gibi teknikleri içerir ve nadir monogenik sendromlara sahip hastaların, özellikle durum genetik olarak heterojen olduğunda, %25-30'unun teşhis serüvenini sonlandırır (25). Özellikle CNV analizinin NGS verilerinden mümkün olduğu ve yöntemlerin giderek optimize edildiği günümüzde, yeni nesil dizilemenin NDD'lerin ve konjenital anomalilerin genetik teşhisinde birinci basamak test olarak kullanışlı olabileceğini önermektedir. NGS, çözilemeyen durumlarda veya NGS ile belirlenen büyük bir CNV'nin genomik bölgesinin doğru bir şekilde sınırlanması gereken durumlarda aCGH ile takip edilebilir ve yalnızca yüksek şüpheli durumlarda Frajl X testi yapılabilir (4).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MOLEKÜLER KARYOTİPLEME- aCGH

Array Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyon (aCGH), moleküler karyotipleme veya microarray olarak da adlandırılan, segmental genom kopya sayısı varyasyonlarının yüksek çözünürlüklü, tüm genom kapsamında taranmasını sağlayan bir tekniktir (26,27). Bu, DNA kopya sayısı kazançları ve kayıpları için yüzlerce belirli genomik lokusun kapsamlı bir şekilde taranmasına olanak tanır. aCGH'nin geçmiş birkaç yılda geliştirilmesi ve klinik uygulamaları, hastaların tanı sürecini devrim niteliğinde değiştirdi ve birçok genetik hastalığın moleküler temelini belirlenmesine büyük ölçüde yardımcı oldu. İlk olarak kanser hastalarında genomdaki dengesizliklerini araştırmak için geliştirildikten sonra, aCGH, temel ve rutin bir tanı aracı haline gelmiş ve genetik laboratuvarlarda sitogenetik yöntemleri giderek daha fazla yerine geçmektedir (24,28,29).

CNV Tanımı

Genomun belirli dizileri tekrarlanır ve tekrar sayıları aynı türün bireyleri arasında değişkendir. Genom kopya sayısı değişikliği (Copy Number Variation- CNV), bu değişimleri tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Oluşan kopya sayısı varyantlarının (CNV'ler) biyolojik rolleri, yaygın fizyolojik özelliklerin ortak değişkenliği üzerinde görünüşte hiçbir etkiden (30), morfolojik varyasyon (31,32), değişmiş metabolik durumlara (33), bulaşıcı hastalıklara karşı duyarlılık (34,35) ve ev sahibi-mikrobiyom etkileşimleri (36–38) arasında değişir, nadir genetik bozukluklara/sendromlara sebebiyet verebilir (39) .

CNV'nin bir fenotipe ilişkilendirilmesine dair ilk raporlanan durum, *Bar* geninin duplikasyonuna bağlı olarak bar göz fenotipine sahip azalmış göz sayısı olan mutant *Drosophila melanogaster* örneğiydi (40). İnsan kromozomlarının "genel" karyotipi belirlendikten sonra, 1960'ların başlarında insan genomundaki mikroskopik olarak görülebilen kromozomal anomalilerin raporları ortaya çıktı. Sitogenetikçiler 5. kromozomun kısa kolunun parsiyel silinmesi ile ilişkili Cri du Chat sendromu dahil bir çok hastalığın genetik sebebini ortaya çıkardılar (41).

Uzun seneler, mikroskop tabanlı sitogenetik yöntemlerin sınırlı çözünürlüğü nedeniyle, raporlar genellikle birkaç geni içeren büyük patojenik anormalliklerle sınırlıydı ve fizyolojik süreçler üzerinde belirgin olumsuz etkilere sahipti. Ancak büyük yapısal değişiklikler, duplikasyon ve delesyonlar, tanınan ilk genetik anormallikler arasında yer alsa da, CNV'nin bugünkü algımızı oluşturan kavramı, yaklaşık 20 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu dönemde, önce nadir mutasyonlar olarak kabul edilen, normal bireyler arasında yaygın olan farklılıkların, tür içi fizyolojik değişkenliğimizin önemli bir bölümünü oluşturduğu gösterildi (42,43).

CNV'lerin genomun yaklaşık %4.8-9.5'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir (44), bu, tek nükleotid varyantlarından (single nucleotide variants- SNV) (45) daha büyük bir fraksiyondur.

CNV'lerin genel olarak yapısal genom varyantlarının bir alt tipi olduğu kabul edilse de, tanımları hala biraz belirsizdir. Tekrarlanma doğası ve bireyler arasındaki sayısal değişkenlik temel kriterlere ek olarak, genellikle bir "önemli" uzunluk da gereklidir. Daha önceki çalışmalar, bir CNV'yi 1000 bp'den büyük bir DNA segmenti olarak tanımlamıştır (46), ardından ~100 bp (30), ancak şu anda CNV'lerin boyutu 50 bp'den (47) birkaç Mb'ye kadar (48) tanımlanmaktadır.

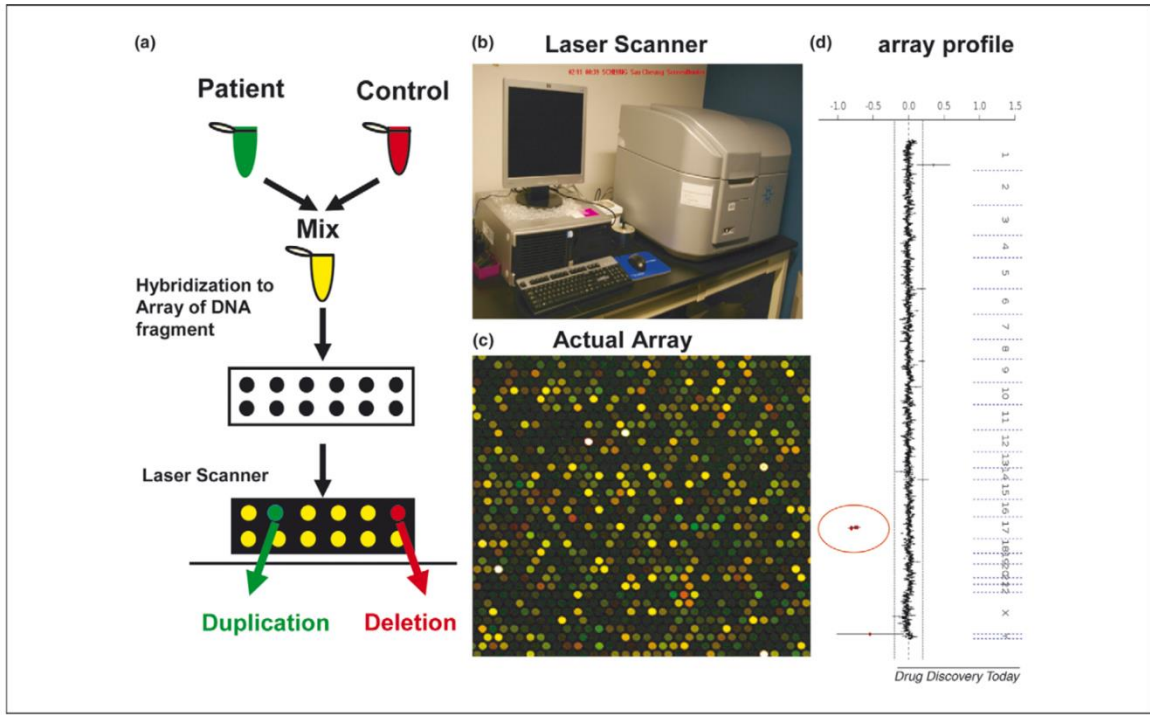
CNV'lerin Sınıflandırılması

CNV'ler, 50 bp'den büyük olan DNA dizilerinin kayıpları veya kazançları ile karakterize edilir (44,47,48). Büyük sayıda genom segmentinin bireyler arasındaki dozaj farklılığına sahip olması nedeniyle önemli bir varyant sınıfıdır ve bu da büyük bir kişiden kişiye çeşitlilik sağlar (42). Bu tür varyantlar, hastalık fenotipleri ile açıkça ilişkili olmayan sağlıklı bireylerde de bulunur ve benign CNV'ler olarak kabul (42,43,45). Ayrıca, çok sayıda insan hastalığının etiyolojisinden sorumlu olan CNV'ler de vardır; bunlar arasında doğumsal anomalilere bağlı olan çoklu sendromlar, karmaşık nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklar, bilişsel bozukluklar, kanser ve immunolojik hastalıklar bulunur (49,50). Bunların fenotip üzerindeki etkisinin tanınması, ancak kolay bir görev değildir. Bazı CNV haritaları ve veritabanları sağlıklı bireyler (örneğin DGV- <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) ve etkilenen hastalar (örneğin DECIPHER- <https://decipher.sanger.ac.uk/>) için oluşturulmuş olsa da, CNV'lerin klinik etkisinin değerlendirilmesi hala büyük bir zorluktur (51,52,53). Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Kurulu (ACMG), CNV'lerin yorumlanması için rehberler sunmuş ve "patojenik",

"muhtemel patojenik", "anlamı belirsiz ", "muhtemel benign" ve "benign" olmakla belirli standart terimlerin kullanımını önermiştir (54).

2.1.1. aCGH Metodolojisi

aCGH'de, bir hasta ve bir referans örneğinden gelen eşit miktarda etiketli genomik DNA'lar, DNA hedeflerini içeren bir diziye ortak hibridize edilir. Bazı laboratuvarlar, kontroller olarak havuzlanmış erkek ve dişi DNAsı kullanırken, bazıları bireysel erkek ve dişi kontroller kullanır. Ayrıca, aynı cinsiyet veya zıt cinsiyet kontrolleri farklı laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Hasta ve kontrolün genomik DNA'ları, Cyanine 3 (Cy3) ve Cyanine 5 (Cy5) ile farklı şekilde etiketlenir (Şekil 2.1a). Tekrarlayan dizilerin hibridizasyonu, Cot-1 DNA eklenerek engellenebilir. Slaytlar, bir mikroarray tarayıcı kullanılarak görüntü dosyalarına taranır (Şekil 2.1b). Spotların yoğunlukları ölçülür (Şekil 2.1c) ve görüntü dosyaları özellik çıkarma yazılımı kullanılarak nicel olarak değerlendirilir ve nicel analizlerden elde edilen metin dosyaları, kopya sayısı analizi için yazılım programlarına aktarılır (Şekil 2.1d) (28,55). Elde edilen floresans yoğunluk oranı, hasta ve referans genomlarındaki DNA dizilerinin kopya sayılarının oranına orantılıdır. Eğer floresan boyalarının yoğunlukları bir probda eşitse, hastanın genomunun bu bölgesi, hasta ve referans örneklerde eşit miktarda DNA içeriyor olarak yorumlanır; eğer değişmiş bir Cy3: Cy5 oranı varsa, bu belirli genomik bölgede hastanın DNA'sında bir kayıp veya kazanç olduğunu gösterir. Bu genomik dengesizlikler, diğer sitogenetik ve moleküler yöntemlerle doğrulanır; bunlar arasında metafaz veya interfaz FISH analizleri, uzun menzilli (long range) ve nicel (quantitative) PCR yöntemleri, özel multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) testleri ve daha yüksek çözünürlüklü diğer aCGH platformları bulunur (51).



Şekil 2.1. aCGH teknolojinin prensipleri (10).

Sorgulama problemleri (hedefler), bakteriyel yapay kromozomlar (Bacterial Artificial Chromosomes-BAC'ler) veya P1 (PAC) klonları şeklindeki insan genomik DNA parçaları (75-200 kb boyutunda), daha küçük insert klonları olan kozmidler (30-40 kb boyutunda) ve fosmidler (40-50 kb boyutunda) veya oligonükleotidler (25-85 mer) olarak bulunur. Farklı aCGH platformlarının genomik çözünürlüğü, DNA problemlerinin aralığı ve uzunluğu tarafından belirlenir. Klinik olarak kullanılabilir çoğu aCGH platformu, anöploidileri, iyi karakterize edilmiş mikrodelsiyon veya mikroduplikasyon sendromlarını ve subtelomerik veya diğer dengesiz kromozomal yeniden düzenlemeleri tespit etmek üzere tasarlanmış hedefli microarray'lerdir. Ayrıca, hedeflerin megabaz başına bir klon ile 100kb başına bir klonu kapsayacak şekilde eşit aralıklarla yerleştirildiği tüm genom aCGH platformları da vardır (56). Şu anda ticari olarak bulunan, tüm genom oligonükleotid array'lerin kapsamı, bir probun 6 kb ila 70 kb'ye kadar değişmektedir. Farklı ticari olarak bulunan oligonükleotid aCGH platformlarının ayrıntılı bir incelemesi ve karşılaştırılması mevcuttur (57). Bazı klinik olarak kullanılabilir aCGH'lar, BAC'yi taklit etmek veya rastgele genomik dizilimlere hedeflenmek üzere tasarlanan oligonükleotidler içerir (58). Odaklanmış veya tüm genom oligonükleotid array'ler kullanmanın avantajları, ortalama BAC boyutundan küçük değişiklikleri daha yüksek çözünürlük ve geliştirilmiş dinamik aralığında (sinyal gürültü oranı) inceleyebilmeyi içeriyor (57-59).

2.1.1.1. Teşhis amaçlı aCGH'nin avantajları ve sınırlamaları

Yüksek çözünürlük ve yüksek işlem kapasitesi ile otomasyon olasılıkları, sağlamlık, basitlik, yüksek tekrarlanabilirlik ve sapmaların kesin haritalanması, aCGH'nin diğer sitogenetik yöntemlere göre en önemli avantajlarıdır. Ayrıca, hücre kültürü yapılmasına gerek olmadığı için sonuç verme süresi, sitogenetik yöntemlere kıyasla daha kısadır. Çoğu klinik aCGH platformu sadece birkaç mikrogram genomik DNA gerektirir ve tüm genom amplifikasyon prosedürleri, analiz için gerekli miktarı daha da azaltmaya olanak tanır. Bazı durumlarda, aCGH, ek ve klinik olarak şüphelenilmeyen genomik dengesizlikleri ortaya çıkarır, bu da odaklanmış lokus-spesifik yöntemlere kıyasla tüm genom yaklaşımının avantajını vurgular; çünkü bunlar sadece sorgulanan lokuslar hakkında bilgi sağlayabilir. Ayrıca, aCGH, metafaz veya hatta interfaz FISH analizleri ile belirlenemeyen genomik duplikasyonları tespit eder. Ek olarak, aCGH'nin sitogenetik analiz tarafından kaçırılacak kromozomal mozaikliği tespit ettiği kanıtlanmıştır (60, 61). Yakın zamanda, üç tanesinde ilk yapılmış kromozom analizi normal olan trizomi 14 mozaizmi olan beş hasta bildirilmiştir (62). Diğer klinik teşhis yöntemleri gibi, aCGH teknolojisinde de sınırlamalar vardır. aCGH, translokasyonlar ve inversiyonlar gibi dengeli düzenlemeleri tespit edemez. Bu teknoloji, sadece aynı örnekteki diğer DNA bölgelerine göre kopya sayısı dengesizliklerini tespit edebilir ve bu nedenle aCGH, poliploidiyi tespit edemez. Ayrıca, çok yüksek çözünürlükte tüm genomu kapsayan platformlar daha pahalıdır ve anlamı belirsiz genomik dengesizlikleri tespit etme olasılığı daha yüksektir (10).

2.2. YENİ NESİL DİZİLEME

DNA'nın yapısı keşfedildikten neredeyse 25 yıl sonra, DNA'nın dizilimini belirleme yöntemi yayınlanmıştır (63,64). Bu yöntem, dizilimi sorgulanan şablon zincire tamamlayan bir DNA zincirinin dizilimini gerçekleştirmek için zincir-sonlandırıcı ve radyoaktif olarak etiketlenmiş (önceki yaklaşım) veya floresan olarak etiketlenmiş (sonraki yaklaşım) didoksinükleotidlerin eklenmesini içermiştir. Ardından, fragmentler boyutlarına göre ayrılarak ve jel elektroforezi ile analiz edilerek dizilim belirlenmiştir. Sanger dizilimi olarak bilinen bu yöntem, kapiller elektroforezin tanıtılması ile gelişmeye devam etmiş ve bakteri ve faj genomlarından insanlara kadar küçük ve büyük genomları dizilemek için bir "birinci nesil dizileme" yöntemi olarak geniş kabul görmüştür. Yalnızca bir dizilim reaksiyonunun aynı anda analiz edilebileceği bir durumda, yöntem sınırlı bir kapasiteye sahipti. Diploid DNA'nın dizilimi ayrıca birçok tanısal ve araştırma amaçlı kritik olan

haploid dizilerin ayırt edilmesini karmaşık hale getirdi ve dizilimden önce bireysel alt klonların altklonlamasını, tabaklamasını ve DNA hazırlığını gerektirdi. Bu işgücü yoğun süreçler, 3 milyar dolarlık bir maliyetle on yıl süren ilk insan genom projesine katkıda bulundu (65). Ek insan genom dizilemelerine olanak tanıyan ek gelişmelerin olmasına rağmen, teknoloji zaman ve maliyet açısından sınırlarına ulaşmıştı (66). Dizileme kapasitesini genişletmek için yeni teknolojilerin geliştirilmesi gerekiyordu (67).

2004 ile 2006 yılları arasında "yeni nesil dizileme-next generation sequencing (NGS)" teknolojileri tanıtıldı ve biyomedikal araştırmalara yeni yön verdi, bu da dizileme veri raporlarında dramatik bir artışa neden oldu (68). Verilerdeki önemli artış, tek DNA moleküllerinin çoklu paralel dizilenmesine olanak tanıyan nanoteknoloji prensipleri ve yeniliklerinden kaynaklanmaktadır. Yüksek verimlilik ve tek-molekül DNA dizileme özellikleri, dizileme platformundan bağımsız olarak NGS'in imzasıdır. Teknolojinin evrimleşen prosedürleri, veri toplama ve analizle daha iyi birleştirilmiş, topluluğu daha işgücü yoğun ve düşük verimli tarihsel Sanger dizileme yaklaşımlarından kurtarmış ve veri çıktısında olağanüstü bir artışa olanak tanımıştır. Illumina veya Ion Torrent platformları gibi ikinci nesil yaklaşımlar genellikle DNA fragmentasyonu, DNA uç onarımı, adaptör ligasyonu, yüzeye bağlanma ve in situ amplifikasyon ile başlar. Bu "kısa okuma" dizileme teknolojileri, milyonlarca bireysel dizileme reaksiyonunun paralel olarak gerçekleştiği çoklu paralel dizilemeyi içerir. Bununla birlikte, kısa okuma teknolojileri olmalarının doğasından dolayı, DNA'nın uzun kesimleri üzerindeki dizileme verileri yeniden monte edilmelidir ve bu da yapısal varyasyonlar veya düşük komplekslikli bölgelerin okunmasıyla ilgili zorluklar ortaya çıkarabilir (67).

Üçüncü nesil dizileme, Pacific Biosciences veya Oxford Nanopore teknoloji platformları gibi, Sanger veya kısa okuma dizileme teknolojilerinin çok ötesinde 10 kb'nin üzerinde okuma uzunluklarına ulaşabilir. Bu "uzun okuma" teknolojileri, genom genelinde tekrarlar ve yapısal varyant tespiti gibi kısa okumalarla karşılaşılan sorunları aşabilir. İkinci nesil yöntemlere kıyasla, işlem değişiklikleri minimal kütüphane hazırlık adımlarını içerir ve gerçek zamanlı olarak fragmente edilmemiş DNA moleküllerine doğrudan hedefleme içerir, burada sınırlayıcı faktör bu amaçlar için yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA üretimidir. Bu üçüncü nesil teknolojilerin ikinci nesil yöntemlere kıyasla erken bir sınırlaması da, okumaların doğruluğuydu ve zaman içinde özellikle yazılım analizi geliştikçe iyileşmeye devam etmektedir.

Şu anda mevcut teknolojiler ve ilişkili avantajlar veya dezavantajlar göz önüne alındığında, kısa okuma veya uzun okuma dizilemenin kullanımı araştırma veya klinik uygulamaya bağlıdır. Şimdiye kadar, araştırma ve klinik ihtiyaçlar, teknolojinin daha da gelişmesine neden olmuştur. Ancak bu teknolojilerin sınırlamaları, ek bilimsel keşifleri veya klinik uygulamaları engellemiştir. Bu teknolojilerin geleceği, sınırlayıcı faktörlerden potansiyel faktörlere doğru bir evrimdir, yeni araştırma ve klinik uygulamalara yol açmaktadır (67).

2.2.1. Kısa Okuma Dizileme

Kısa okuma NGS veya ikinci nesil dizileme, geleneksel birinci nesil Sanger dizilemesinden sonraki dizileme teknolojilerinin bir sonraki aşamasıdır. Kısa okuma teknolojilerinin ortak özelliği, paralel olarak dizilenen kısa (250–800 bp) ve klonal olarak amplifiye edilmiş DNA moleküllerinin çoklu şekilde dizilenmesidir (69) . NGS iş akışı, kütüphane hazırlığı, dizileme ve veri analizi içerir (70).

2.2.1.1. Kütüphane hazırlığı

NGS için iyi kalitede bir kütüphane gereklidir. Kütüphane hazırlığı, öncelikle dizilenecek moleküllere karşılık gelen şablonları elde etmeyi ve ardından bu fragmentleri kullanılan dizileme platformuyla uyumlu hale getirmeyi içerir (71). NGS, genel olarak DNA dizileme (DNA-Seq) ve RNA dizileme (RNA-Seq) olarak ayrılabilir (72,73).

DNA-seq Kütüphane Hazırlığı

Dizileme şablonuna bağlı olarak, DNA-Seq, Tüm Genom Dizileme (WGS), Tüm Ekzom Dizileme (WES), Epigenom Dizileme veya Hedefli Dizileme (Targeted Sequencing-TS) içerebilir (72,74). Şablon hazırlığı için iki yaklaşım bulunmaktadır: polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction-PCR) ve hibridizasyon yakalama tabanlı yöntemler. PCR tabanlı yaklaşımlar, TS için şablon hazırlamak için yaygın olarak kullanılır (71,75). Erken aşamada amplikon dizileme sınırlı sayıda gen veya ekzon dizilemeye odaklanmıştı (kısa menzilli PCR). Başlangıçta HLA genotiplemesi için kullanılıyordu; burada, antijen-tanıma bölgesini (antigen recognition site- ARS) kodlayan ekzonların amplifikasyonu yapılıyordu, ancak bu yaklaşım, Sanger tabanlı dizilemede görülen aynı sorunları içeriyordu (76).

Uzun menzilli PCR'nin (Long Range-PCR) ortaya çıkışı, shotgun dizilemenin (rastgele kırılmış, amplikondan daha kısa fragmentlerin dizilenmesi) ana yaklaşım olarak

kullanılmasına yol açtı ve bütün genler, intronik, untranslated, upstream ve downstream bölgeler dahil, dizilenebildi.

Bu nedenle, LR-PCR, kısa amplicon dizilemesiyle görülen belirsizlik sorunlarını ortadan kaldırdı (77,78). Ancak, LR-PCR tabanlı yaklaşımın, özellikle HLA genotipleme için, zaman zaman alel düşmeleri ile karakterize edildiğini belirtmek gerekir.

Şablon hazırlığı için hibridizasyon yakalama tabanlı yaklaşım, WES ve TS için kullanılmaktadır (79,80). Bu yaklaşımda, dizilenecek bölgeler komplementer biyotinleştirilmiş proplar, biotin ile kaplı streptavidin manyetik boncuklar kullanılarak izole edilir. PCR tabanlı yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, bu hedef zenginleştirme yaklaşımı, daha büyük genomik bölgelerin ve azalan alel düşme durumları ile daha fazla genin TS için cost efektif bir yöntemdir. Ancak, bu iki yöntem birbirini dışlamayan yöntemlerdir. Kombine bir yaklaşım olan Bölgesel Özel Ekstraksiyon (Regional Specific Extraction- RSE), büyük bir genomik bölge olan ana histokompatibilite kompleksi (MHC) (81) ve diğer genomik bölgeleri yakalamak için kullanılmaktadır (82,83). RSE metodolojisi, belirli bir diziye hibride edilmiş biyotinleştirilmemiş bir oligonükleotidin enzimatik genişlemesidir ve genişledikçe biyotinleştirilmiş nükleotidleri içerir. Genişletilmiş DNA daha sonra streptavidin ile kaplı manyetik boncuklarla yakalanır, tüm genom amplifikasyon teknikleri ile zenginleştirilir ve dizileme için hazırlanır.

Epigenetik modifikasyonların ve bunların gen düzenlemesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi için tüm genom bisülfitle dizileme (Whole Genome Bisulfite Sequencing- WGBS) ve kromatin immünopresipitasyonu, ardından NGS, en yaygın kullanılan tekniklerdir (ChIP-Seq) (71,84,85). WGBS, DNA metilasyonunu (5mC) baz çift çözünürlüğünde genom genelinde analiz etmeyi sağlar. WGBS için genomik örneklerin hazırlanması genellikle DNA'nın post-bisülfite işlenmesi ve NGS dizileme için indeks adaptör ligasyonu öncesinde etiketin kaldırılmasıyla gerçekleştirilir (71). ChIP-Seq, DNA bağlayıcı proteinlerin ve histon modifikasyonlarının baz çift çözünürlüğünde genom genelinde haritalanmasına olanak tanır. ChIP-Seq için örneklerin hazırlanması, formaldehit ile sabitlenmiş veya doğal kromatinin mikrokokal nükleaz (MNase) veya sonikasyon ile parçalanmasıyla gerçekleştirilir, ardından manyetik boncuklara konjüge olan hedefe özgü antikor ile immünopresipitasyon yapılır. Çöktürülen protein-DNA komplekslerinden izole edilen DNA kütüphaneler oluşturulur (71).

DNA-Seq kütüphane oluşturma, fragmentasyon, uç tamiri, adaptör ligasyonu ve boyut seçimi gibi temel adımları içerir (86). Fragmentasyon, DNA'yı platforma özgü boyut

aralığına getirmek için kullanılır. Fragmentasyon için üç yaklaşım arasında fiziksel (örneğin, akustik parçalanma veya sonikasyon), enzimatik (örneğin, fragmentaz veya transpozaz fragmentasyon) veya kimyasal (ısı ile divalent metal kationu) yöntemler bulunmaktadır (71). Fragmentasyonun, WGBS ve ChIP-Seq için şablon hazırlığına entegre edilmesi, ek adımları ortadan kaldırmıştır. Hem küçük, hem büyük parçaların temsil edilmesine izin veren fragmentasyon, kısa okumalı dizileyici olan Illumina MiSeq cihazında yapılan HLA genotiplemesi açısından önemlidir. Daha küçük fragmentler yüksek kaliteli dizileme verilerine katkıda bulunurken, daha uzun fragmentler distal faz bilgisi sağlar (87). Daha sonra uç tamiri, DNA fragment uçlarının adaptör ligasyonu için uygun olmasını sağlayarak, 5' fosfat ve 3' hidroksil grup içermeyen asimetric uçlardan arındırma işlemini içerir. Bu, Illumina için blunt ending (kör uçlama) ve dA kuyruğu ekleme (kör uçlara komplementer dT-uçlarına sahip adaptörlere ligasyon için uçlara non-şablon deoksiadenozin 5'-monofosfat eklenmesi) veya Ion Torrent için sadece blunt ending gerçekleştirilebilir.

Adaptörler, DNA fragmentinin Illumina platformlarının akış hücrelerine bağlanmasını sağlamak için dizileme cihazı tarafından tanınan platforma özgü dizileri içerir. Adaptörler, aynı zamanda her bir örneği tanımlamak için kullanılan kısa, benzersiz bir dizi olan barkod veya indeksi içermeye başlamıştır. Bu, büyük sayıda örneğin havuzlanıp aynı anda tek bir çalışmada dizilenmesine izin veren (çoklu dizileme) bir yöntemdir. Bu barkodlar, veri analizi sırasında okumaları bireysel örneklerle eşleştirmek ve atamak için tanımlanabilir ve kullanılabilir. HLA genotipleme bağlamında, tek bir örnekteki birden fazla HLA lokusu, tek bir barkod ile birlikte hazırlanır ve analiz sırasında aynı anda dizilenip farklılaştırılmasına izin verir (87).

Adaptör ligasyonundan sonra, boyut seçimi, belirlenen bir boyut aralığı içindeki DNA fragmentlerini zenginleştirir ve dizileme verimliliğini artırmak için kontaminantları uzaklaştırır. Boyut seçimi, boncuk tabanlı (Beckman Coulter'ın SPRI select ve Agencourt AMPure XP boncukları) veya elektroforetik tabanlı (Sage Sciences' Pippin Prep) yaklaşımlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Boncuk tabanlı yöntemler, havuzları aynı anda yoğunlaştırma avantajına sahiptir, elektroforetik tabanlı yöntemler ise hassasiyeti artırır. Doğru boyut seçimi, dizileme çalışmasını optimize eder, dizilenen örnek sayısını artırır, daha yüksek kaliteli veri sağlar ve özellikle HLA tiplemesi için önemli olan aşamaları maksimuma çıkarır (87). Seçilen boyutlu kütüphane doğrudan dizilebilir veya dizilemeden önce PCR ile çoğaltılabilir. Illumina'nın Nextera teknolojisi, DNA fragmentlerini hazırlamak için alternatif bir yöntem sunar ve bu, DNA normalleştirme, fragmentasyon ve

boyut seçimi adımlarını entegre eden bir bead üzerinde tagmentasyon kütüphane hazırlığı kullanır. Tagmentasyonun ardından, dizileme için adaptörleri ve örneğin dizinlenmesi için barkodları entegre etmek için sınırlı bir PCR gerçekleştirilir. Bu iş akışı hızlı ve basittir, dizilemeye hazır kütüphanelerin 90 dakikadan daha kısa sürede ve 15 dakikadan kısa uygulama süresi ile oluşturulmasını sağlar (67).

RNA-seq Kütüphane Hazırlığı

RNA-Seq, diferansiyel gen ekspresyonu, alternatif birleştirme ve varyant keşfi gibi fonksiyonel genomik çalışmalar için faydalıdır (71,88-90). RNA-Seq, Tüm Transkriptom Dizileme (Whole Transcriptome Sequencing -WTS), mRNA Dizileme (mRNA-Sequencing) ve small RNA Dizileme (smRNA-Sequencing) olarak üçe ayrılabilir. Örnek hazırlığı genellikle üç adımı içerir: total RNA izolasyonu, hedef RNA zenginleştirilmesi ve RNA'nın komplementer DNA (cDNA)'ya reverse transkripsiyonu. Memeli hücrelerinden veya dokularından izole edilen toplam RNA'nın en az %90'ını rRNA oluşturduğu göz önüne alındığında, WTS için örnek hazırlığına rRNA çıkartılmalıdır (71). WTS için kütüphaneleri hazırlamak için popüler bir kit olan Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero, total RNA'dan rRNA'nın izole edilmesini, kalan RNA'nın kimyasal olarak parçalanmasını ve ters transkripsiyon için rastgele priming yapmayı içerir (91). Sonraki uç tamiri, adaptör ligasyonu ve nihai PCR amplifikasyonu bir cDNA kütüphanesi oluşturur. mRNA-Seq örnek hazırlığı için, mRNA, oligo-dT manyetik boncukları ile yakalanır ve toplam RNA'dan ayrılır. mRNA için kütüphane hazırlığı, WTS'nin kütüphane hazırlığına benzer şekilde, Illumina TruSeq Stranded mRNA kit kullanılarak yapılır (92).

Küçük RNA'lar, 200 nükleotitten daha kısa olan bir tür non-coding RNA'dır. En yaygın ve iyi çalışılmış türlerden biri mikroRNA'lar (miRNA) olup, gen regülasyonunda kritik roller oynarlar. smRNA-Seq'in kütüphane hazırlığı, miRNA'nın doğal halinde bulunan 5' fosfat nedeniyle basittir (71). Kütüphane hazırlığı, iki adımlı bir ligasyonla başlar. İlk olarak, T4 RNA ligaz 2 kullanılarak 3' uç adenile DNA adaptörü, ardından da ikinci bir 5' RNA adaptörü, RNA ligaz 1 ile RNA'lara bağlanır. Ligasyondan sonra, ligasyon yapılmış miRNA'ları cDNA'lara dönüştürmek için ters transkripsiyon-PCR gerçekleştirilir ve amplifikasyon ürünü, jel boyutu seçimi takip eden dizileme işlemi için işlenir. Kısa okuma işlemleri, klonal amplifikasyon ve dizilemeden oluşur (68), (93), (94), (95). Klonal amplifikasyon, DNA fragmentlerinin güçlü, algılanabilir sinyaller üretecek şekilde solid fazda amplifikasyonunu içerir. Tek DNA fragmentlerinin bağlandığı solid faz, boncuklar (Thermo Fisher'ın Ion Torrent'i) veya akış hücresi yüzeyleri (Illumina) olabilir.

Dizileme platformuna bağılı olarak, emülsiyon PCR (Ion Torrent) veya “bridging” PCR (Illumina), ankrajlanmış DNA fragmentlerini milyonlarca ayrılmış şablon fragmentine amplifiye etmek için kullanılır. Illumina ve Ion Torrent platformları için dizileme prensibi, genişlemiş DNA zincirindeki DNA polimeraz bağımlı nükleotidleri içeren “sentezle dizileme (Sequencing by Synthesis-SBS)” yaklaşımına dayanır (95). Her iki platform da aşağıda gözden geçirilmiştir.

2.2.2. Ion Torrent

Ion Torrent platformundaki klonal amplifikasyon, emülsiyon PCR ile mikro kuyucuk içindeki Ion Sphere partiküllerine dayanan boncuk tabanlı bir yöntemle elde edilir. Bu süreçte, adaptör dizileri DNA fragmentlerine bağlanır ve daha sonra bir suda yağ (water-in-oil) emülsiyon damlasında (micelle) yakalanırlar; ayrıca, komplementer adaptörler ile kaplanmış boncuk, deoksinükleotidler (dNTP'ler), primerler ve DNA polimeraz içerir. Her micelle, birbirinden bağımsız PCR amplifikasyonuna izin veren bir mikro-PCR reaktörü olarak işlev görür. Ion Torrent yarı iletken çipi, bir akış odası ve bir komplementer metal-oksit yarı iletken (Complementary metal oxide semiconductors-CMOS) pH sensörü içerir. Miceller, mikrokuyucuklu bir yarı iletken çipe yüklenir ve çip, dizileme sırasında sırasıyla modifiye edilmemiş A, T, G veya C nükleotitleri ile yıkanır. Bir nükleotidin dahil edilmesi, CMOS pH sensörü tarafından tespit edilen bir hidrojen iyonunun salınmasına neden olur. Ion Torrent, optik algılama olmadan yarı iletken dizileme gerçekleştiren ilk platformdur (94,95). Bu teknoloji, hızlı dizileme çalışma süreleri (2.5 ile 4 saat arasında) ve 200 ile 600 bp arasında okumaları sunar (96). Ion Torrent'in zayıf noktası, homopolimer bölgeleri boyunca dizilenmenin zor olmasıdır. Birden fazla benzer bazın kurulumu ile voltaj darbe büyüklüklerinin ölçümleri yanlış olabilir bu da tek bir okumada insersiyon/delesyon hataları olarak görülebilir. Öte yandan, teknolojinin düşük bir değiştirme hata oranı vardır (baz başına <0.1% oranında) (97). Ion Torrent platformları arasında Ion PGM Dx, Ion GeneStudio S5 ve Genexus cihazları bulunmaktadır (98).

2.2.3. Illumina

Illumina'nın NGS teknolojisi, floresan işaretli tersine dönebilen sonlandırıcı (terminatör) teknolojisi ile SBS'e dayanmaktadır (68,95). Dizilemeye başlamadan önce, DNA kütüphanelerinin klonal amplifikasyonu ("köprü amplifikasyonu" PCR yoluyla) dizileme akış hücresinde gerçekleşir ve dizileme enstrümanı tarafından kontrol edilir. Dizileme, DNA polimeraz ile reversible sonlandırıcıya bağlanmış bileşik flüoresan

nükleotidlerin optik okunmasına dayanır. Her dizileme döngüsünde, tek bir floresanla işaretli reverse sonlandırıcıya bağlı dNTP, nükleik asit zincirine birleştirilir ve oluşan floresan sinyali görüntülenir. Terminatör ve floresan boya, birleşmiş dNTP'den çıkarılarak bir sonraki işaretlenmiş dNTP'nin eklenmesine izin verilir (99). Ayrıca, Illumina NGS platformları, bir DNA fragmentinin her iki ucundan da gerçekleşen, derin ve yüksek okuma ile kaliteli dizi verileri üreten çift uçlu dizilemeye olanak tanır. Çift uçlu dizileme, distal polimorfik bölgeler boyunca dizilemeye izin vermesi ile, HLA tiplendirmesi için kullanışlıdır. Klinik HLA tiplendirmesi için yaygın olarak kullanılan Illumina MiSeq, 350-500 baz uzunluğundaki fragmentleri tercih etse de, 600-900 baz veya daha uzun olan fragmentler distal polimorfizm dizilemesi için uygundur, ki bu da çift uçlu dizileme ile mümkün olabilmektedir (87,100).

Illumina'nın tersine dönebilen terminatör teknolojisi ve çift uçlu dizileme, onu, pazardaki en doğru baz-baz dizileme teknolojisi haline getirmiştir, %0.1 hata oranına sahiptir (esas olarak değiştirme hataları, çok nadiren insersiyonlar/delesyonlar). Illumina'nın masaüstü dizileme cihazları farklı dizileme çıkışlarına ve çalışma başına toplam okuma sayısına sahiptir (iSeq, MiniSeq, MiSeq, NextSeq 550, NextSeq 1000 ve NextSeq 2000) (101) ve iki in-vitro tanı cihazı (MiSeqDx ve NextSeq 550Dx) (102) bulunmaktadır. Illumina platformlarının zayıf tarafı, MiSeq'in 2x300 bp okuma uzunluğuyla 3. sürüm reaktif kiti kullanarak toplam dizileme süresinin 56 saate kadar uzun olmasıdır. MiniSeq, NextSeq 550 ve NovaSeq 6000 gibi daha yeni modeller, iki kanallı SBS teknolojisini kullanarak her dört baz çağrısını yapmak için her döngüde iki görüntü kullanır, bu da dizileme süresini ve veri işleme süresini azaltırken yüksek kalite ve doğruluğu korur (103).

2.2.4. Avantajlar ve Sınırlamalar

NGS'in belirgin özellikleri yüksek verimli, çoklu ve klonal dizilemeyi içerir (69). NGS, geleneksel Sanger dizilemesine göre birçok avantaja sahiptir (104). Çoklu gen ve örnek kullanımı, maliyeti dramatik bir şekilde azaltır. Ayrıca, NGS, haploid fragmentlerin klonal dizilemesi nedeniyle Sanger dizilemesinde karşılaşılan çoğu aşama sorununu çözebilir. Kısa dizileme, mevcut dizileme pazarını domine etmektedir. NGS teknolojilerinin ilerlemesi ile üçüncü nesil dizileme platformları, daha uzun okuma uzunlukları ve gerçek zamanlı tek molekül dizileme nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür (105). Uzun dizileme ile karşılaştırıldığında, kısa dizileme sınırlamaları arasında daha uzun çalışma süreleri ve de novo montaj, haplotip aşamaları, transkript izoformları ve yapısal

varyantların tanımlanması gibi zorluklar bulunmaktadır. Kısa dizilemenin bir avantajı, birçok hesaplama aracının kısa dizileme veri madenciliği için tasarlanmış ve ayrılmış olmasıdır. Yakın zamana kadar, kısa dizileme, uzun dizilemeden daha doğru olma avantajına sahipti (67) .

2.2.5. Uzun Okuma Dizileme

Kısa dizileme teknolojilerine kıyasla, uzun dizileme teknolojileri, aynı zamanda üçüncü nesil dizileme teknolojileri olarak adlandırılanlar, doğrudan doğal DNA'dan > 10 kb uzunluğunda diziler üretebilir. Bu teknolojilerin erken sürümleri doğruluk sorunlarıyla uğraşırken, daha sonraki modifikasyonlar ve iyileştirmeler çok daha yüksek doğruluk oranları sağlamış ve genetik hastalıkların teşhisi gibi büyük DNA moleküllerini dizileme konusunda heyecan verici olanaklar sunmuştur (106). Uzun dizileme, özellikle HLA genotiplendirme için arzu edilendir çünkü bu, alellerin tam fazlanmasına izin verir ve tiplendirmedeki belirsizlik sorunlarını aradan çıkarır. Farklı prensiplerle çalışan iki temel uzun dizileme teknolojisi, Pacific Biosciences (PacBio) ve Oxford Nanopore Technology (ONT), incelenmiştir (67). İnsan genomunun ilk tam dizilimiyle birlikte, dizilim teknolojisi, büyük veri çıkışı ve verimlilikteki gelişmeleri mümkün kılan teknolojik değişikliklerle bir paradigma değişimi geçirdi. Süregelen teknolojik ilerlemenin nihai amacı, araştırma ve klinik uygulamalara daha iyi hizmet etmektir. Bir dizilim teknolojisinin klinik bir ortamda kullanılabilmesi için, teknolojinin belirli bir zaman çerçevesinde duyarlı, özgül ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlaması ve makul bir maliyetle bu sonuçları sunması gerekir. Üretilen büyük miktardaki verilerin güvenilir bir şekilde özümzenmesi ve uygun bir şekilde biçimlendirilmesi, klinik açıdan anlamlı ve uygulanabilir sonuçlar sağlamak için gereklidir. Bu faktörleri karşılayabilme yeteneği, kısa dizilim okumalarının araştırmadan klinik ortama kolayca geçmesini sağlamıştır, bunlar arasında kalıtsal bozukluklarda nadir varyantların tespiti (107), solid tümörler veya hematolojik maligniteleri olan hastaların teşhis ve yönetimi (108,109) ve nakil, farmakogenomik ve hastalık ilişkileri için HLA tiplendirmesi (77,100,110-112) bulunmaktadır. Ama PCR amplifikasyonu ve kısa okuma uzunlukları nedeniyle sınırlamaları bulunmaktadır. Üçüncü nesil teknolojiler, doğal DNA'dan çok daha uzun okuma uzunlukları sağlayarak, dizinin daha düzenli ve doğrudan değerlendirilmesine olanak tanır ve kısa okuma teknolojilerinin sınırlamalarını ortadan kaldırır. Bu üçüncü nesil teknolojilerin ana sınırlayıcı faktörü, onları klinik olarak uygunsuz hale getiren yüksek hata oranıydı. Bu üçüncü nesil teknolojilerin ve bioinformatik araçlarının

doğruluğu artırmak için sürekli olarak iyileştirilmesi, önemli etkiye sahip bir sonraki ilerleme dalgası için umut vaat ediyor (67).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA TASARIMI

Çalışmada; hasta verilerine retrospektif ulaşılarak 01.09.2020-29.09.2023 tarihleri arasında moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme testleri çalışılan hastaların verileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Hastalar Global Gelişim Geriliği (70 hasta), Otizm Spektrum Bozukluklukları (31 hasta), Diğer Nörogelişimsel Bozukluklar (17 hasta) ve Konjenital Anomaliler (32 hasta) olarak 4 ana grupta incelendi.

GGG grubuna global gelişim geriliği (6 yaş>) ve entellektüel yetersizlik (6 yaş<), OSB grubuna otizm ve atipik otizm, diğer NGB grubuna DEHAB, iletişim bozuklukları, öğrenme güçlüğü öntanıları ile kliniğimize başvuran hastalar bölündü.

GGG, OSB ve diğer NGB'ler izole, epilepsi eşlik eden ve sendromik olarak altgruplara ayrıldı. İzole alt grubunda başka sistemlerin etkilenmediği hastalar; Epilepsi eşlik eden alt grupta nöbetleri olan veya EEG'de epileptiform aktivite ile takip edilen hastalar; Sendromik alt grubunda dismorfik bulguları olan veya iskelet, kardiyak, ürogenital, görme, işitme anomalileri eşlik eden hastalar incelendi.

Konjenital anomaliler grubunda iskelet displazileri, konjenital kalp hastalığı, beyin anomalileri, gastrointestinal ve genitoüriner sistem anomalileri, tiroid agenezisi ve yarık damak olan hastalar vardı.

Öncelikle, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotipleme çalışılmış 0-25 yaş arası 150 hasta incelendi. Sebebi açıklanamayan MR ve OSB olan 20 erkek hastaya frajil X testi çalışıldı. Frajil X testi sonuçları normal olarak raporlandı. Karyotip analizinde 1 hastada 5mb üzeri delesyon tespit edilirken daha sonra microarray ile de konfirme edildi. Patojenik /muhtemel patojenik CNV saptanarak tanı alan 9 hasta seçilerek değerlendirildi. VUS olarak tanımlanan ve herhangi CNV saptanmayan 141 hastanın Yeni Nesil Dizileme

yöntemi ile çalışılan sonuçları incelendi. 82 hasta Klinik Ekzom Dizileme (CES), 59 hasta Tüm Ekzom Dizileme (WES) panelleri kapsamında değerlendirildi.

Tanı alan toplam 36 olgu, 1-9 mikroyarray çalışması, 10-36 yeni nesil dizileme panelleri olarak numaralandırıldı.

Çalışma için T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulundan etik kurul onayı alındı (Tarih: 19.10.2022, Karar No: 2022/0604).

3.2. HASTALARININ ÇALIŞMAYA DÂHİL EDİLMESİ VE HASTA VERİLERİNİN KAYDEDİLMESİ

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

1. Nörogelişimsel bozukluk ve konjenital anomali ötanısı ile polikliniğimize refere edilmiş hastalar;
2. Hastaların 0-25 yaş grubu aralığında olmaları;
3. Daha önceden moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme yöntemi ile analiz edilmemiş hastalar;
4. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik kliniğinde onam formunun imzalanmış olması.

Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

1. Dahil olma ölçütlerinden en az birini sağlamamak olarak belirlenmiştir.

3.3. YÖNTEM

Hastaların periferik venöz kan örneklerinden (5 ml) elde edilen DNA ile moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme analizleri yapılmıştır.

3.3.1. DNA İzolasyonu

Kullanım amacı

DNA izolasyonu çalışmaya katılan bütün hastalarımızda, Lab-Aid 824s Kan DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak Xiamen ZEESAN Biotech Co., Ltd cihazında otomatik olarak yapılmıştır. Bu sistem tüm kan örneğinden genomik DNA'nın otomatik olarak izole edilmesi ve saflaştırılması için manyetik partikül teknolojisini kullanır. Kit, amplifikasyon

veya diğ er enzimatik reaksiyonlar gibi doğrudan downstream uygulamalar için uygun yüksek kaliteli DNA sağlar. Lab-Aid 824s izolasyon sistemi, tek bir çalışmada 24 örneğe kadar numune hazırlama işlemi adımlarını gerçekleştirir.

Prosedür ilkeleri

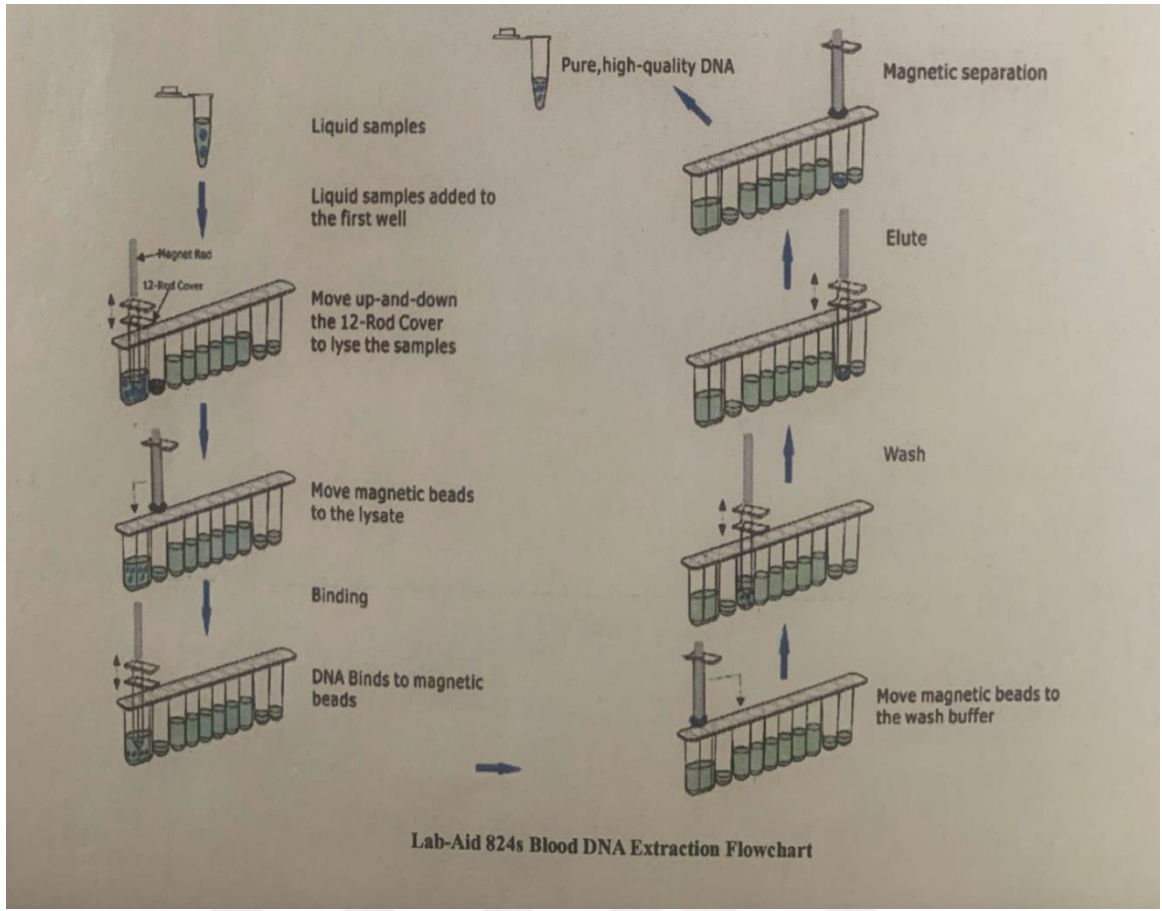
Saflaştırma prosedürü dört adımdan oluşur: lizis, bağlanma, yıkama ve elüsyon.

Lizis: Örnekler, nükleik asitlerin serbest bırakılmasını sağlayan lizis tamponunun varlığında önce lizis edilir.

Bağlanma: Lizis edilmiş örneklerde bağlanma tamponu eklenir ve bağlanma koşulları ayarlanır. Nükleik asitlerin silika yüzeyine optimal bir şekilde adsorbe edilmesine izin vermek için lizatlar manyetik parçacıklarla iyice karıştırılır. Tuz ve pH koşulları, PCR ve diğ er akışkan altı enzimatik reaksiyonları engelleyebilen protein ve diğ er kirleticilerin manyetik parçacıklara bağlanmadığından emin olunur.

Yıkama: Nükleik asitler manyetik parçacıklara bağlı kaldığı sürece, kirleticiler W1 yıkama tamponu, ardından W2 yıkama tamponu kullanılarak bir dizi yıkama adımı sırasında etkili bir şekilde uzaklaştırılır.

Elüsyon: Yüksek saflıkta DNA, elüsyon tamponunda el te edilir. Saflaştırılmış nükleik asitler, akışkan altı uygulamalarda hemen kullanılabilir veya gelecekteki kullanım için saklanabilir.



Şekil 2.2. Lab-Aid 824s Kan DNA Ekstraksiyon Şeması

Reaktifler ve malzemeler

Lab-Aid 824s Blood DNA Extraction Kiti		(48)
Katalog no.		606101
Preparat sayısı		48
Bileşenler	Miktar	Açıklama
Reaktif kartuş	48	Bir reaktif kartuş, türüne bağlı olarak bir örneğin fil seviyelerini içerir. Her kuyruk, lizis tamponu, manyetik boncuklar ve elüsyon tamponu gibi gereken miktarda yalnızca reaktifi içerir.
12-Rod Cover (Çubuk kapağı)	2x3	Çubuk kapağı, kısa sekmesinin içe, uzun sekmesinin dışa doğru bakacak şekilde, doğru konuma yerleştirilmelidir ve çubuk kapağı yuvasına yerleştirilmelidir.
Buffer EL	5 ml x 1	Buffer EL, DNA konsantrasyonunu ölçmek için bir kalibrasyon çözeltisi olarak kullanılabilir veya DNA seyreltme amaçlı kullanılabilir.
0.45 g DTT	1 tüp	/

*İçerisinde guanidin tuzu bulunduran bir üründür. Ağartıcı içeren dezenfektanlar ile uyumsuzdur.

- Pipetler ve steril, RNase-free pipet uçları
- Vortex mixer (karıştırıcı)
- Thermomixer Comfort

- 12,000 xrpm döngü kapasiteli mikrosentrifuj
- Kimyasal maddelerle çalışırken, her zaman uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler giyin.

Lab-Aid 824s kullanıcıları için

- Lab-Aid 824s cihazı

Depolama Koşulları ve Raf Ömrü

- Reaktif kartuşlar, 2-30 °C'de saklanabilirler. Reaktif kartuşlar dondurulmamalıdır. Presipitat (siyah manyetik boncuklu kuyucuğa en yakın olan en büyük kuyucuk) 0 °C'nin altında depolama sırasında reaktif kartuşun 1. kuyucuğunda çökebilir ve kullanımdan önce 30-40 °C'de inkübe edilerek çözölmelidir.
- Buffer EL, 2-30 °C'de 18 ay boyunca depolanabilir ve düşük sıcaklıkta taşınmalıdır.
- 0,45g DTT 18 ay boyunca 2-8°C'de saklanabilir ve düşük sıcaklıkta taşınmalıdır. Çözöndükten sonra, DTT çözöltisi 2-8 °C'de 2 hafta veya -18 °C'nin altında (dondurulma-çözölme döngüleri 5 kereden fazla olmamak koşöluyla) 12 ay boyunca depolanabilir.

Reaktif hazırlığı

1 mol/L DTT'nin hazırlanması: 0.45 g DTT tüpüne 3000 uL arıtılmış su ekleyin ve tamamen çözöünene kadar vortexlenir. DTT çözöltisi şu anki kullanım için önerilir, kullanılmadığında 2-8 °C'de iki haftaya kadar saklanabilir veya tüketilmediğinde 1-8 °C'nin altında (dondurulma-çözölme döngüsü en fazla 5 kez olacak şekilde) 12 ay boyunca saklanabilir.

Örnek gereksinimi

EDTA, ACD* ile işlenmiş tam kan örnekleri kullanılabilir. Dondurulmuş örnekler, işleme başlamadan önce hafif çalkalama ile 15~30 °C'de çözölmelidir. Saflaştırılmış DNA'nın verimi ve kalitesi, kanın depolama koşöullarına bağıdır. Daha taze kan örnekleri daha iyi sonuçlar verebilir. Toplanan örnekler, 2-8 °C'de 10 gün boyunca saklanabilir. Ancak, Southern blotting gibi maksimum fragman boyutu gerektiren uygulamalar için, düşük seviyelerde DNA bozulması meydana gelebileceğinden, önerilen kullanım süresi 3 gün içinde tüketilmelidir. Uzun süreli depolama (10 günden fazla), kanın -20°C'nin altında

saklanması gerekmektedir, ayrıca, yüksek moleküler ağırlıkta DNA gerekiyorsa EDTA önerilir. Pıhtılaşma belirtileri gösteren kanı kullanmamak gerekir.

İzolasyon işlemi

Örneklerin çalışmaya başlamadan önce 15-30 °C'ye homojenleştirilmesi ve aşağıdaki adımların 15~30 °C'de gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

1. Lab-Aid 824s güç anahtarından açılır.
2. Reaktif kartuşları tepsinin kartuş rafına yüklenir.
3. 10-Tüplü Reaktif Kartuşun yüzeyindeki sızdırmazlık membranı çıkarılır.
4. Not: Reaktif kartuşundaki lizis buffer depolama sırasında presipitat oluşturabilir. Gerektiğinde presipitat 30-40 °C'de inkübe edilerek çözdürülür ve sonra oda sıcaklığına yerleştirilir.
5. 200 µL-500 µL kan örneği (tavsiye olunan miktar 500 µL) ve 60 µL DTT(1mol/L) reaktif kartuşun ilk kuyucuğuna aktarılır.
6. Tepsi Lab-Aid 824s cihazına yerleştirilir.
7. 12-çubuk kapağı yuvasına yerleştirilir ve kısa sekmenin içe dönük olduğundan emin olunur, yani kapak sonuna doğru itilmelidir. Her zaman bir Reaktif Kartuşun sütunu üzerinde 12-çubuk kapağı bulunmalıdır, 24 örneğin dolu bir tepsi için iki çubuk kapağı gereklidir.
8. Lab-Aid 824s'in ön kapısını kapatılır.
9. Ekran mesajını takip edin ve Lab-Aid 824s çalışma istasyonunda "NA-DNA" protokolünü seçilir. Daha sonra protokol çalışmasını başlatmak için "START" düğmesine basılır.
10. Çalışma sona erdiğinde, ekran kalan zamanı "00: 00" olarak gösterir. Tepsi dışarıya kaydırılır. Her Reaktif Kartuşun 10. kuyucuğundan izole edilmiş DNA diğer tüplere aktarılır ve daha fazla kullanım veya uzun süreli depolama için saklanır.
11. Not: Eluatlarda manyetik boncuk taşınması, DNA depolamasını etkilemeyecektir. Manyetik boncuk taşınması riskinin en aza indirilmesi gerekiyorsa, eluat içeren tüpleri manyetik ayrıştırıcıya aktararak manyetik boncukları yakalamak için kullanılır, böylece DNA çözeltisi temiz tüplere aktarılabilir.
12. Rod cover ve reaktif kartuş çıkarılır ve güvenlik kurallarına uyarak ihya edilir.

3.3.2. Microarray Çalışması

İzole edilen DNA örnekleri Illumina Infinium Global Screening Array-24 v1.0 (GSA-Cyto) mikroarray çipi ile çalışılmış ve Illumina iScan platformunda taraması yapılmıştır. Bu yöntem ile örneğin tüm genomu ~700,000 probe ile taranmaktadır, yaklaşık 4485 gen hedeflenmektedir. Illumina mikroarray çip problemlerinin medyan aralığı ~3.9kb/2.3kb'dır. Ortalama çözünürlüğü ~10kb / ~25kb'dır. Gerçekleştirilen çalışmada, DNA örneğinin analizi sonrasında hesaplanan genotipleme oranı (Call Rate)>0.99 olduğu tespit edilmiştir. Bu değer SNP belirteçlerinin çok yüksek doğruluk oranı ile genotiplendirildiğini göstermektedir. CNV (Copy Number Variation) analizi, tüm genom SNP verisinden BAF ve LRR değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. Kopya sayısı varyasyonları Biodiscovery tarafından geliştirilen NxClinical (v.6.0) analiz programları aracılığıyla tespit edilmekte ve görselleştirilmektedir. İlgili pozisyonlar Human Genome Build 37 (GRCh37/hg19) referans alınarak raporlanmıştır.

BAF (B Allel Frekansı): İlgili SNP için B alleli sinyalinin toplam sinyal miktarına oranını gösterir. 0 ve 1 değerleri homozigotluğu, 0.5 değeri heterozigotluğu gösterir. Kopya sayısı değişimlerinde veya mozaizim durumlarında ara değerler (örn: 0.25 / 0.75) olabilir.

LRR (Log R Ratio): Belirtilen SNP için ortalama toplam sinyal miktarının logaritmik ifadesidir. Kopyasayısı hakkında bilgi verir. 0 değeri 2 kopya sayısını, pozitif değerler artmış, negatif değerler ise azalmış kopya sayısını işaret eder. Tespiti yapılan varyantlar, ISCN 2020 nomenklaturüne göre adlandırılmıştır. Bu yöntem ile yapılan çalışmalar sonucunda nokta mutasyonları, kromozomların sentromerik, subtelomerik ve heterokromatin bölgelerindeki bulgular, çok küçük delesyonlar (<100 Kb) ya da duplikasyonlar, segmental duplikasyonlar gibi dizi tekrarları, düşük oranlı mozaizizm (<%20), resiprokal ve robertsonian translokasyonlar gibi dengeli kromozomal değişiklikler kapsam dışında bırakılmıştır.

Çalışma basamakları

1. Gün (Denatürasyon, Nötralizasyon, Amplifikasyon)

Reaktifler	1x Örnek için
MA1 Solüsyonu	20 µl
NaOH (0,1 N)	4 µl
MA2 Solüsyonu	34 µl
MSM Solüsyonu	38 µl

1. -20 °C’de duran MA1, MA2 ve MSM solüsyonları oda ısısında bekletilerek erimesi sağlanır ve hibridizasyon fırını amplifikasyonun gerçekleşeceği 37°C’ye ayarlanır.
2. Eriyen solüsyonlar 10 kez alt-üst edilerek karıştırılır ve 280g de pulse spin yapılır.
3. Midiplate’in ilgili kuyusuna 20 µl MA1 solüsyonu koyulur üzerine 4 µl, 50 ng/µl konsantrasyonda örnek eklenir.
4. 1 N NaOH taze olarak 0,1 N’e dilüe edilir ve bu dilüe edilen 0,1 N’lik NaOH’tan ilgili kuyuya 4 µl eklenir ve Midiplate Capmat ile kapatılır.
5. Midiplate, karıştırıcıya koyularak 1 dk boyunca 1600 rpm de örnek ile reaktiflerin karışması sağlanır.
6. Ardından Midiplate 280g de 1 dk santrifüj yapılarak 10 dk oda ısısında bekletilir.
7. Süre bitiminde Capmat açılır, ilgili kuyuya 34 µl MA2 ve 38 µl MSM solüsyonları eklenir, aynı Capmat ile Midiplate kapatılır ve 1 dk boyunca 1600 rpm de örnek ile reaktiflerin karışması sağlanır.
8. Ardından Midiplate 280g de 1 dk santrifüj yapılır ve 20-24 sa. 37 °C’de amplifikasyon için inkübe edilir.

2. Gün (Fragmantasyon, Presipitasyon, DNA resuspansiyonu, Hibridizasyon)

Reaktifler	1x Örnek için
FMS	25 µl
PM1	50 µl
2-Propanol	155 µl
RA1	23 µl

1. -20 °C’de duran RA1 ve FMS solüsyonları oda ısısında bekletilerek erimesi sağlanır ve ısı bloğu
2. fragmantasyonun gerçekleşeceği 37 °C’ye ayarlanır.
3. Eriyen FMS solüsyonu 10 kez alt-üst edilerek karıştırılır ve 280g de pulse spin yapılır.
4. FMS solüsyonunun eridikten sonra Midiplate fırından çıkartılır ve 280g de 1 dk santrifüj yapılır.
5. Capmat açılarak ilgili kuyuya 25 µl FMS solüsyonu eklenir ve capmat geri kapatıldıktan sonra midiplate karıştırıcıya koyularak 1 dk boyunca 1600 rpm de örnek ile reaktiflerin karışması sağlanır.
6. Ardından Midiplate 280g de 1 dk santrifüj yapılır ve 1 sa. 37 °C’de ısı bloğunda fragmantasyonun gerçekleşmesi için inkübe edilir.

7. 4 °C’de duran PM1 solüsyonu oda ısısında bekletilir ve kullanılmak üzere %100 lük 2-propanol taze olarak bench üzerinde hazırlanır.
8. Oda ısısına gelen PM1 solüsyonu 10 kez alt-üst edilerek karıştırılır ve 280g de pulse spin yapılır.
9. 1 saatlik sürenin bitiminde Midiplate ısı bloğundan alınarak capmat çıkarılır ve ilgili kuyuya 50 µl PM1 solüsyonu eklenir.
10. Capmat geri kapatıldıktan sonra midiplate karıştırıcıya koyularak 1 dk boyunca 1600 rpm de örnek ile reaktiflerin karışması sağlanır.
11. Midiplate, 5 dk 37 °C’de ısı bloğunda inkübe edilir.
12. Süre bitiminde Capmat açılarak ilgili kuyuya 155 µl 2-Propanol eklenir ve Midiplate yeni bir Capmat ile kapatılarak 10-15 kez ters-yüz edilerek solüsyonlar karıştırılır.
13. 30 dk 4 °C’de bekletilir.
14. Bu sırada santrifüj soğuması için 4 °C’de 3000 rpm’de 20 dk’ya ayarlanır.
15. Süre bitiminde Midiplate 4 °C’den alınır ve 20 dk bir önceki basamakta belirtilen şekilde santrifüj edilir.
16. Santrifüj işlemi tamamlanan örneklerin üzerindeki sıvı fazın uzaklaştırılması için, capmat açılır ve Midiplate ters çevrilerek sıvı faz lavaboya dökülür.
17. Ardından Midiplate dibinde kalan mavi pelletlere zarar vermeden Midiplate 1 dk boyunca filtre kağıtlarının üzerine vurulur ve kalan sıvılardan uzaklaşma sağlanır.
18. Midiplate ters şekilde tutularak bir rack üzerinde kuruması için 1 sa. Bekletilir.
19. Hibridizasyon fırını 48 °C’ye ayarlanır.
20. Süre bitimine 10 dk kala thermo sealer açılır (180 °C’de 5 sn.’ye ayarlanmış olacak)
21. Süre tamamlanınca presipitasyon işlemi tamamlanmış örneğin bulunduğu ilgili kuyuya 23 µl RA1 solüsyonu koyulur ve üzeri ısı ile yapışan seal ile kapatılarak thermo sealer’da kapatılır.
22. 1 sa. boyunca resuspansiyon için 48 °C’deki fırında inkübe edilir
23. Isı bloğu 95°C’ye ayarlanır.
24. Süre sonunda Midiplate fırından çıkarılır ve karıştırıcıya koyularak 1 dk boyunca 1800 rpm de örnek ile RA1’in homojenize olması sağlanır.
25. Ardından Midiplate 280g de 1 dk santrifüj yapılır ve 20 dk 95 °C’de ısı bloğunda inkübe edilir.
26. 4 °C’deki Chip ve PB2 solüsyonu oda ısısına çıkartılır.

27. Süre bitiminde Midiplate ısı bloğundan alınarak 30 dk oda ısısında bekletilir.
28. Süre dolmasına 10 dk kala hibridizasyon haznesi hazırlanır. Turuncu conta, hazne içine yerleştirilir ve yükleme yapılacak chip sayısına göre (maksimum 4 chip) hibridizasyon haznesinde bulunan kuyulara 400'er µl PB2 solüsyonu eklenir(1 chip için 2 adet kuyucuk mevcut). Ve haznenin kapağı kapatılarak hazır şekilde bekletilir.
29. Hibridizasyon fırını 48 °C'de tutularak sallanma özelliği açılır (hızı 5'e ayarlı olacak).
30. Oda ısısına gelen Midiplate 280g de 1 dk santrifüj yapılır.
31. Yükleme yapılacak chip, hibridizasyon hazne aparatına yerleştirilir.
32. Seal açılarak ilgili örnek daha önceden belirlenmiş chip pozisyonuna 15 µl yüklenir.
33. Yükleme tamamlanan chip, aparat içinde hibridizasyon haznesine yerleştirilir ve kapak kapatılarak hibridizasyonun gerçekleşmesi için 16-24 sa. hibridizasyon fırınında inkübasyona bırakılır.
34. Oda ısısındaki XC4 solüsyonu %100 EtoH ile 350 ml'ye tamamlanır 15 sn çalkalanarak ertesi gün kullanılmak üzere 1 gece boyunca bekletilir.
35. Kullanılan RA1 solüsyonu ertesi gün kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edilir.

3. Gün (Yıkama, Tek baz uzaması, Boyama, Tarama)

1. RA1 solüsyonu 4 °C'den, Formamid, XC1, XC2, TEM, STM ve ATM solüsyonları -20 °C'den çıkartılarak oda ısısına gelmeleri sağlanır.
2. Eriyen XC1, XC2, TEM, STM ve ATM solüsyonları 10 defa alt üst edilip karıştırılır ve 3000 g'de 3 dk santrifüj yapılır.
3. Su sirkülasyonu ile ısı sağlayan TECAN rack haznesi 44 °C'ye ayarlanır.
4. Hibridizasyon haznesi fırından çıkartılır ve 25 dk oda ısısında soğuması sağlanır.
5. Bu sürede yıkama ve boyama hazırlığının yapılabilmesi için PB1 ve XC4 solüsyonları ilgili kaplara koyulur.
6. Süre bitiminde chip, hibridizasyon haznesinden çıkartılır ve üzerindeki film tek seferde nazik ancak çok yavaş olmayacak şekilde çıkartılır.
7. Chip yıkama rack'ına yerleştirilir ve içinde 200 ml PB1 olan yıkama kabında 1 dk boyunca yukarı aşağı hareket ettirerek yıkaması yapılır.

8. Daha sonra chip yıkama rack'ı ile beraber içinde 200 ml PB1 olan 2. Yıkama kabında 1 dk boyunca yukarı aşağı hareket ettirerek yıkaması tamamlanır.
9. Chip yıkama rack'ından alınır ve içinde 150 ml PB1 bulunan Hizalama fikstürüne, siyah çerçeve içinde barkod kısmı aşağı bakacak şekilde yerleştirilir.
10. Yerleştirilen chip üzerine şeffaf spacer koyularak hizalama çubuğu ile hizalama fikstüründe sabitlenir.
11. Chip üzerine Cam arka plaka rezervuar kısmı aşağı ve içe bakacak şekilde yerleştirilir ve cam plaka hizalama çubuğuna doğru hafifçe ittilererek metal klipsler ile tüm sistem birbirine sabitlenir.
12. Hizalaması yapılan chip, fikstürden çıkarılarak spacer'ın dışarıda kalan kısımları makas ile kesilir.
13. Formamid çözününce 95% formamide/1 mM EDTA solüsyonu boyaması yapılan chip sayısına göre hazırlanır.
14. Boyamanın bitmesinin ardından chip TECAN'dan çıkarılır.
15. Chip üzerindeki klipsler spatül ile çıkartılır ve cam plaka chip üzerinden kaldırılır.
16. Spacerlar chip yüzeyine değmeden cımbız yardımı ile chip üzerinden alınır ve chip, boyama rack'ına barkod kısmı yukarı bakacak şekilde yerleştirilir.
17. Boyama rackindeki chip önce içinde 310 ml PB1 bulunan kap içine alınarak 10 kez yukarı-aşağı hareket ettirilir ve 5 dk kap içinde bekletilir.
18. Ardından chip rack ile beraber içinde 310 ml XC4 bulunan kap içine alınarak 10 kez yukarı-aşağı hareket ettirilir ve 5 dk kap içinde bekletilir.
19. XC4 ile kaplanan chip, boyama rack'i ile beraber kap içinden çıkartılarak rack üzerine barkod kısmı yukarı bakacak şekilde yatay biçimde yerleştirilir.
20. Chip'in altındaki fazla sıvı kim-wipe mendil ile silinerek vakum desikatör içerisindeki rack üzerine barkod kısmı yukarı bakacak şekilde yerleştirilir.
21. 508 mm Hg (0.68 bar)'de 50-55 dk kurutmaya bırakılır.
22. Kuruyan chip, tarama işleminin tamamlanması için iScan'e yerleştirilir ve tarama işlemi gerçekleştirilir.

3.3.4. Klinik Ekzom Dizileme Çalışması

Laboratuvar süreci kısaca, hastalık ile ilişkilendirilmiş gen bölgesinin/bölgelerinin zincirleme polimeraz reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmasını ve bu bölgenin yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizilenmesini içermektedir. Bu amaçla Clinical Exome

Solution by Sophia Genetics kiti kullanılmaktadır. CES_v3 v2 paneli kapsamında 5500 gen sekanslanmaktadır. Dizileme reaksiyonu ise Illumina NextSeq® sistemi ve uyumlu reaktif kitleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Hem klinik ekzom dizileme, hem de tüm ekzom dizileme çalışmalarında ham veri Sophia DDM® veri analizi platformu aracılığı ile analiz edilmiştir. Hizalama ve varyant bulma işlemleri Sophia Genetics'in tescilli bir temel algoritması olan Pepper® tarafından hg19 insan genom referansına göre gerçekleştirilmiştir.

Varyant anotasyonu Sophia Genetics'in MOKA® yazılımı ile gerçekleştirilmiş ve her bir varyant için varyantın protein dizilimi üzerindeki etkisi (missense, stop gain vs), çeşitli populasyonlardaki (1000G, ESP, ExAC, gnomAD) görülme sıklığı, tahminleme algoritmaları (SIFT, PolyPhen) ile varyantın yıkıcılık etkisi gibi bilgiler eklenmiştir. CNV bulunması Sophia Genetics' in MUSKAT® yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Varyant sınıflandırılması için, Clinvar veri tabanının uzman çalışma grupları ve Maxwell ve ark. tarafından oluşturulan veri bankaları referans alınmıştır. Veri bankalarında bulunmayan diğer varyantlar için Maxwell ve ark. tarafından oluşturulan kriterler dikkate alınmıştır. Bu kriterler American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) dizileme /sekans varyantları sınıflandırma yönetmeliği temel alınarak belirlenmiştir (113).

SOPHIA GENETICS PANELLERİ İLE KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi:

Örnek Sayısı (n) = Standart Sayısı (2) + Hasta Sayısı (x)

Çalışma Solüsyonu = n x 1 µL Florescent Dye + n x 199 µL Qubit Buffer

	DNA (µl)	Çalışma Solüsyonu (µl)
Standart (A ve B)	10	190
Örnek (Yüksek Kaliteli DNA)	2	198

DNA'nın kalitesinin belirlenmesi için A260/280 ve A260/230 oranları da ölçülmelidir.

Reaksiyona girecek DNA'ların tümünün aynı standartta olmaları için DNA'lar konsantrasyonlarına göre final ürün 15 µl olacak şekilde IDTE ile sulandırılırlar.

gDNA Dilüsyonu:

gDNA	120 ng	
IDTE	15 µl'ye tamamlanır	5-6 kez pipetleyerek nazıkçe karıştırılır, kısa spin yapılır.

Güvenli saklama noktası (1 gece 4°C)

DNA'lar aynı konsantrasyona getirildikten sonra buz bloğu üzerine alınırlar ve Fx Reaction Pre-Mix hazırlanır.

Pre-Mix'lerin Hazırlanması:

FX REACTION PRE-MIX	12 Örnek (4X4)	16 Örnek (8X4)	
FX Buffer 10x	37.5 µl	50 µl	10 kez nazıkçe pipetle, kısa spin yap, buzda beklet
FX Enzyme Mix	75 µl	100 µl	

Enzimatik Fragmentasyon, Uç tamiri ve A-tailing:

- Buz bloğu üzerindeki örneklerin her birine 2,5 µl Fx Enhancer eklenir ve yaklaşık 10 kez nazıkçe pipetaj yapıldıktan sonra kısa bir spin yapılır.
- Sonrasında örneklerle 7,5 µl Fx Reaction Pre-Mix eklenir ve yaklaşık 10 kez nazıkçe pipetaj yapıldıktan sonra kısa bir spin yapılır.
- FXFrag PCR programında ilk basamak olan 4°C'ye gelinceye kadar örnekler buz bloğu üzerinde bekletilirler ve derece 4°C'ye geldiğinde PCR cihazına konulurlar.

Adaptör Ligasyonu:

PCR programı devam ederken Ligation Pre-Mix ve PCR Pre-Mix hazırlanır ve buz bloğuna kaldırılırlar.

- FXFrag programı bittiğinde örnekler fazla bekletmeden buz bloğuna alınırlar ve üzerlerine 2,5µl spin yapılmış index adapterler eklenir, yaklaşık 10 kez nazıkçe pipetaj yapılır.
- Daha sonra 22,5µl Ligation Pre-Mix eklenir ve yaklaşık 10 kez nazıkçe pipetaj yapılır. Daha sonra kısa bir spin yapılır ve 20°C'de 15 dakika inkübe edilir.

Ligasyon Sonrası Temizleme:

- İnkübasyon sonrası toplam 50 µl olan ürün üzerine 40 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılır.
- Ardından 200µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 52,5 µl su ile çözülür ve 5 dakika bekletilir.
- Daha sonra manyetik stand'e alınır ve 3 dakika bekletilir.
- Sonrasında 50 µl süpernatantlar yeni bir tüpe alınırlar.

Çift Boyut Seçim (Dual Size-Selection):

- 50 µl ürün üzerine 30µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda 70 µl süpernatant yeni bir tüpe alınır.
- 70 µl ürün üzerine 10 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda 75 µl süpernatant uzaklaştırılır.
- Ardından 200 µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 10 µl IDTE ile çözülür ve üzerinde daha önce hazırlanmış olan 15 µl PCR Pre-Mix eklenir. Yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır ve spin yapılarak LibAmp programına konulur.

Güvenli saklama noktası (1 gece 4°C)

Amplifikasyon Sonrası Temizleme:

- Kütüphanenin amplifikasyonu sonrası toplam 25 µl olan ürün üzerine 25 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılır.
- Ardından 200 µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 14 µl su ile çözülür ve 5 dakika bekletilir.
- Daha sonra manyetik stand'e alınır ve 3 dakika bekletilir.
- Sonrasında 13 µl süpernatantlar yeni bir tüpe alınırlar.

Güvenli saklama noktası (1 gece 4°C veya daha uzun -20°C)

Bireysel Kütüphanelerin Kalite Kontrolü:

PCR sonrası ürünlerin Qubit ölçümleri yapıldıktan sonra;

Kütüphane Havuzunun Oluşturulması- Library Pooling:

Ürünler DNA-LoBind tüpünde birleştirilir. Oluşturulan pool içine 2 µl Blocking oligos xGen Universal Blockers - TS Mix ve 5 µl Human Cot DNA eklenir. Pipetaj yapılır ve pool vakum altında 45-50°C'de liyofilize edilir.

Güvenli saklama noktası (-20°C)

Hibridizasyon (Hedef Bölgelerin 'Capture-Prob'larca Yakalanması):

- Yanyana duran PCR cihazlarından bir tanesi kapak sıcaklığı 99°C olacak şekilde 95°C inkübasyona, diğeri ise kapak sıcaklığı 75°C olacak şekilde 65°C inkübasyona ayarlanır.
- Sonrasında Hybridization Mix hazırlanır.

HYBRIDIZATION MIX	1 Pool için	2 Pool için	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir
2X Hybridization Buffer	8.5 µl	18.7 µl	
Hybridization Buffer Enhancer	3.4 µl	7.48 µl	
NFW	1.1 µl	2.42 µl	
Toplam Hacim	13 µl	28.6 µl	

- Liyofilize pelet, 13 µl Hybridization Mix içinde pipetleyerek çözülür.
- Resüspense pelet her pool ayrı tüpe olacak şekilde yeni bir PCR tüpüne aktarılır.
- Ardından 4 uL prob eklenir ve diğer yüksek hacimli pipet ile pipetleyerek karıştırılır.
- 95°C'taki PCR cihazında 2 dakika inkübe edilir.
- 2 dakika sonunda pool tüpü 65°C'taki PCR cihazına aktarılır.
- Dikkat! Sakın 65°C'nin altına düşürme sıcaklığı.
- 65°C'taki PCR cihazında 4 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

NOT: Inkübasyon süresi içinde, bir sonraki aşamada kullanılacak olan yıkama tamponları hazırlanırlar ve en az 2 saat boyunca 65°C'ta inkübe edilecek olan bufferlar 65°C'ye koyulur.

Wash Buffer'ların Hazırlanması (2 Pool İçin):

BUFFER	STOCK BUFFER (µl)	WATER (µl)	FINAL VOLUME 1x (µl)
10x Wash Buffer I	66	594	660
10x Wash Buffer II	44	396	440
10x Wash Buffer III	44	396	440
10x Stringent Wash Buffer	88	792	880
2x Bead Wash Buffer	550	550	1100

1x Stringent Buffer'ı ve 220 µl 1x Wash Buffer 1'i 65°C'taki kuru blok ısıtıcı içine yerleştirilir. (En az 2 saat inkübasyon). Geri kalan WB oda sıcaklığında tutulur.

Streptavidin Bead'lerin Yıkınması (2 Pool İçin):

Çalışmaya başlamadan yaklaşık yarım saat önce Streptavidin Beads çıkarılır ve oda sıcaklığına gelmesi sağlanır.

	1 Pool için	2 Pool için
Oda sıcaklığına getirilmiş Streptavidin Beads	100 µl	200 µl
1X Bead Wash Buffer	200 µl	400 µl
1X Bead Wash Buffer	100 µl	200 µl

- 1,5ml'lik tüpe Streptavidin Beads konulur ve manyetik stand'a yerleştirilerek süpernatant berraklaşuncaya ve bead'ler bir pellet oluşturuluncaya kadar bir süre beklenir.
- Süpernatant atılır ve kalan pellete 1X Bead Wash Buffer eklenir. 10 saniye kadar vortekslenir. Manyetik stand'a yerleştirilerek süpernatant berraklaşuncaya ve bead'ler bir pellet oluşturuluncaya kadar bir süre beklenir.
- Yıkama aşaması tekrarlanır.
- Son olarak yıkanmış beadler üzerine 1X Bead Wash Buffer eklenir ve 100 µl PCR tüpüne aktarılır. PCR tüpü manyetik stande yerleştirilir ve süpernatant atılır.
- Beadlerin kurumasına izin verilmeden hızlı davranılmalıdır.

Hibridize Olan Hedef Bölgelerin Bead'lere Bağlanması (Binding of Hybridized Targets to the Beads):

Kritik Aşama! 65°C'tın altına düşmeyin!

- Yıkanmış Streptavidin Bead'leri 65°C'taki PCR cihazına yerleştirir yerleştirmez, 4 saattir hibridize olan 17 ul'lik Hibridizasyon reaksiyonu ile nazikçe pipetleyerek karıştırılır.
- PCR cihazının kapağını kapatıp 45 dk boyunca inkübe edilir. Her 15 dakikada bir nazikçe pipetaj yapılır. Böylelikle, biotin-bağlı problemlere streptavidin beadlerin bağlanması sağlanmış olur. (Bu sırada 1,5 ml lik lobind tüpleri ısınması için 65°C'taki kuru blok ısıtıcı içine yerleştirir)

Streptavidin Bead'lere Bağlanmayan DNA'nın Uzaklaştırılması:

65°C'taki basamaklar:

- 45 dakikanın sonunda 100 uL 1X Wash Buffer 1 (65°C'taki)'i yine 65°C'ta streptavidin bead'lerle inkübe olan hibridizasyon reaksiyonuna eklenir.
- Hemen 1.5'luk temiz DNA Lo-bind tüpe aktarılır.
- Hızlıca magnetic stand'a yerleştirilir, süpernatanın şeffaflaşmasını beklenir ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırılır.
- 200 µl 1x Stringent Wash Buffer (65°C'taki) nazikçe bead peletinin üzerine eklenir ve nazikçe resüspanse edilir. (Max 3 kez pipetleme)
- 65°C'ta 5 dk inkübe edilir.

- Tüp tekrar magnetic stand'a alınır ve Stringent Wash Buffer ile yıkama basamağı tekrar edilir.

Oda sıcaklığındaki basamaklar:

- 5 dakikanın sonunda tüp manyetik stand'a yerleştirilir ve şeffaf süpernatant uzaklaştırılır.
- Tüpün üzerine 200 µl 1x Wash Buffer 1, (oda sıcaklığındaki WB1) eklenir ve 2 dakika vortekslenir.
- Manyetik stand'a yerleştirilir ve şeffaf süpernatant uzaklaştırılır.
- Tüpün üzerine 200 µl 1x Wash Buffer 2, (oda sıcaklığındaki WB2) eklenir ve 1 dakika vortekslenir.
- Manyetik stand'a yerleştirilir ve şeffaf süpernatant uzaklaştırılır.
- Tüpün üzerine 200 µl 1x Wash Buffer 3, (oda sıcaklığındaki WB3) eklenir ve 30 saniye vortekslenir.
- Manyetik stand'a yerleştirilir ve şeffaf süpernatant uzaklaştırılır.
- Tüp manyetik stand'te iken pelletin üzerine 200 µl IDTE (oda sıcaklığında) eklenir ve şeffaflaştıktan hemen sonra uzaklaştırılır.
- Artta kalan süpernatant spin edilir ve 10 ul'lik pipet ile tamamen uzaklaştırılır. **Hiç IDTE kalmamalı!**
- Pellet üzerine 20 µl nuclease-free water eklenir ve pipetleyerek resuspanse edilir. Ardından bead/water karışımı yeni bir PCR tüpüne aktarılır.
- KAPA AMP Pre-Mix hazırlanır.

Post-Capture Amplifikasyon:

- Streptavidin beads/water suspansiyonunu (20 µl) içeren son ürün ve KAPA Amp Pre-Mix (30 uL) ile pipetleyerek karıştırılır, KAPA Amp PCR programına konulur.

Güvenli saklama noktası (1 gece 4°C veya daha uzun -20°C)

Post-capture Amplifikasyon Temizleme:

- PCR sonrası toplam 50 µl olan ürün üzerine 50 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'a alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılır.

- Ardından 200 µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 20 µl IDTE ile çözülür ve 5 dakika bekletilir.
- Daha sonra manyetik stand'e alınır ve 3 dakika bekletilir.
- Sonrasında 18 µl süpernatantlar yeni bir lobind tüpe alınırlar.

Güvenli saklama noktası (1 gece 4°C veya daha uzun -20°C)

Final Kütüphane (Pool) Kalite Kontrolü:

Qubit ölçümü: Her bir pool'dan 2 ul alınarak florometrede ölçülür.

Bioanalyzer ile fragman boyutunun belirlenmesi (ölçümde 1 µl pool kullanılır).
Fragman boyutu 300-700 bp aralığında olmalıdır.

3.3.5. Tüm Ekzom Dizileme Çalışması

Laboratuvar sürecinde, hastalık ile ilişkilendirilmiş gen bölgesinin/bölgelerinin zincirleme polimeraz reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmasını ve bu bölgenin yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizilenmesini içermektedir. Bu amaçla Twist Human Core Exome v2 by Sophia Genetics kiti kullanılmaktadır. Twist Human Core Exome v2 paneli kapsamında 21589 gen sekanslanmaktadır. Dizileme reaksiyonu ise Illumina NextSeq® sistemi ve uyumlu reaktif kitleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi:

Örnek Sayısı (n) = Standart Sayısı (2) + Hasta Sayısı (x)

Çalışma Solüsyonu = n x 1 µL Florescent Dye + n x 199 µL Qubit Buffer

	DNA (µl)	Çalışma Solüsyonu (µl)
Standart (A ve B)	10	190
Örnek (Yüksek Kaliteli DNA)	2	198

DNA'nın kalitesinin belirlenmesi için A260/280 ve A260/230 oranları da ölçülmelidir.

Reaksiyona girecek DNA'ların tümünün aynı standartta olmaları için DNA'lar konsantrasyonlarına göre final ürün 3 µl olacak şekilde NFW ile sulandırılırlar.

gDNA Dilüsyonu:

gDNA	50 ng	
NFW	10 µl'ye tamamlanır	5-6 kez pipetleyerek nazıkçe karıştırılır, kısa spin yapılır.

Güvenli saklama noktası (1 gece 4°C)

DNA'lar aynı konsantrasyona getirildikten sonra buz bloğu üzerine alınırlar ve Fragmentation Mix hazırlanır.

AŞAMA 1: DNA FRAGMENTASYONU, UÇ TAMİRİ VE dA-TAILING:

Enzymatic Fragmentation Master Mix Hazırlanması:

Fragmentation mix	1 Örnek	8 Örnek	16 Örnek	32 Örnek	
NFW	25 µl	212,5 µl	425 µl	825 µl	
10x Fragmentation Buffer	5 µl	42,5 µl	85 µl	165 µl	
5x Fragmentation Enzyme	10 µl	85 µl	170 µl	330 µl	
Toplam	40 µl	340 µl	680 µl	1320 µl	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir

FRAG PCR Programı

	TEMPERATURE (°C)	TIME (dakika)
Lid	70	
Step 1	4	1
Step 2	32	22
Step 3	65	30
Step 4	4	Hold

* Step 1'deki blok sıcaklığı 4°C'a ulaştığında program durdurulur.

gDNA	10 µl
Fragmentation mix	40 µl

- Fragmentation Mix hazırlandıktan sonra buz üzerindeki örneklerin üzerine 40 µl eklenir ve yaklaşık 10 kez nazıkçe pipetaj yapıldıktan sonra kısa bir spin yapılır.
- FRAG PCR programında ilk basamak olan 4°C'ye gelinceye kadar örnekler buz bloğu üzerinde bekletilirler ve derece 4°C'ye geldiğinde PCR cihazına konulur.

AŞAMA 2: TWIST UNIVERSAL ADAPTÖRLERİNİN BAĞLANMASI VE SAFLAŞTIRMA:

TWIST UNIVERSAL ADAPTÖRLERİN BAĞLANMASI:

Ligasyon mix	1 Örnek	8 Örnek	16 Örnek	32 Örnek	
NFW	15 µl	127.5 µl	255 µl	495 µl	
DNA Ligation Buffer	20 µl	170 µl	340 µl	660 µl	
DNA Ligation Mix	10 µl	85 µl	170 µl	330 µl	
Toplam	45 µl	382.5 µl	765 µl	1485 µl	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir

Fragmantasyon Reax Ürünü	50 µl	
Twist Universal Adaptörleri	5 µl	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir
Ligasyon Master Mix	45 µl	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir
Toplam	100 µl	

- Ligation Mix hazırlanır ve buzda bekletilir.
- Frag programı bittiğinde örnekler fazla bekletilmeden buz bloğuna alınır ve üzerlerine 5 µl Twist Universal Adapters eklenir.
- Ardından hazırlanan Ligation Mix'ten de 45 µl eklendikten sonra PCR programında 20°C'de 15 dakika (open lid) inkübasyona bırakılır.

SAFLAŞTIRMA:

- Inkübasyon sonrası toplam 100 µl olan ürün üzerine 80 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılır.
- Ardından 200 µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 17 µl NFW ile çözülür ve 5 dakika bekletilir.
- Daha sonra manyetik stand'e alınır ve 3 dakika bekletilir.
- Sonrasında 15 µl süpernatantlar yeni 8'li strip tüpe aktarılır.

AŞAMA 3: TERMAL CYCLER VE PCR MIX HAZIRLANMASI

FXFragmentation Reax Ürünü	15 µl				
	1 Örnek	8 Örnek	16 Örnek	32 Örnek	
Twist UDI Primer	10 µl	85 µl	170 µl	330 µl	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl	212,5 µl	425 µl	825 µl	
TOPLAM	35 µl	297,5 µl	595 µl	1155 µl	

15 µl ürün üzerine 10 µl Twist UDI Primer ve 25 µl KAPA HiFi HotStart ReadyMix eklenir ve pipetlenip spin yapılır ve PCR programına konulur.

- PCR sonrası toplam 50 µl olan ürün üzerine 50 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılır.
- Ardından 200 µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 22 µl NFW ile çözülür ve 5 dakika bekletilir.
- Daha sonra manyetik stand'e alınır ve 3 dakika bekletilir.
- Sonrasında 20 µl süpernatantlar yeni 8'li strip tüpe aktarılır.

Ürünlerden 2 µl alınarak tekrardan Qubit ölçümü yapılır. Sonuçlar 80 ng/µl den yüksek olmalıdır.

Güvenli saklama noktası (-20°C)

Twist Target Enrichment Protocol- Twist Hedef Zenginleştirme Protokolü

AŞAMA 1: HİBRİDİZASYON İÇİN KÜTÜPHANE HAZIRLANMASI

Library Pooling:

Pool'a giren Örnek Sayısı	8 örnek
Kütüphane Başı DNA Miktarı (ng)	187,5
Pooldaki Toplam DNA Miktarı (ng)	1500

Ürünler tabloya uygun olacak şekilde 0,2 lik PCR tüpünde birleştirilir. Pipetaj ve spin yapılır. Pool boş bir eppendorf tüp içine kapağı açık şekilde koyularak vakum altında ısısız veya en düşük ısıda liyofilize edilir.

Güvenli saklama noktası (-20°C) 24 saat

AŞAMA 2: KAPSAMA PROBLARINI POOL'LARLA HİBRİDİZE EDİLMESİ

- Buz bloğu çıkarılır.
- Isı bloğu 65°C' ye hazırlanır
- PCR cihazı 95°C' ye ayarlanır. (lid: 105°C)
- Diğer PCR cihazı da 70°C ye ayarlanır. (lid: 85°C)

	1 Örnek	8 Örnek	16 Örnek	32 Örnek	
Hybridization Mix	20 µl	170 µl	340 µl	660 µl	10 kez nazıkçe pipetlenir, kısa spin yapılır, buzda bekletilir
Twist Fixed or Custom Panel	4 µl	34 µl	68 µl	132 µl	
Optional: Secondary Panel	4 µl	34 µl	68 µl	132 µl	
NFW	-	-	-	-	
Toplam Hacim	28 µl	238 µl	476 µl	924 µl	

Not: Eğer 2. Panel için prob kullanılmıyacaksa su ile tamamlanır.

- Hybridization Mix'ten pool başına 20 µl olacak şekilde ependorfa alınıp 65°C de 10 dk inkübe edilir.
- Ardından oda ısısında 5 dk bekletilir ve 0,2 lik PCR tüpüne aktarılır.
- Üzerine 4 µl Exome Probe ve 4 µl Refseq Panel eklenip pipetaj yapıp spinlenir.
- 95°C'de 2 dk inkübe edilir.
- Bu arada liyofilize poolun üzerine 5 µl Blocker Solution ve 7 µl Universal Blockers eklenip pipetaj ve spin yapılır.
- Prob Mix 95°C'de 2 dk sını tamamladıktan sonra alınır ve yerine poollar koyularak 95 °C'de 5 dk inkübe edilir. Aynı anda Prob Mix buz bloğunda 5 dk bekletilir.
- 5 dk sonunda hem Prob Mix hem de poollar oda sıcaklığına alınır ve 5 dk bekletilir.
- Ardından her pool üzerine Prob Mix'ten 28 µl eklenir ve vortekslenir.
- Üzerine 30 Hybridization Enhancer eklenir, pipetlenip spinlenir. Ve 70°C'deki PCR 16 saat inkübasyona bırakılır.

PROB MIX

- Prob mix 95°C deki PCR'da 2 dk bekletilir.
- Buz bloğunda ve oda ısısında 5 dk bekletilir

LIBRARY POOL

- Bu arada library pool hazırlanır;
- 95°C deki PCR'da ve oda ısısında 5 dk bekletilir.

AŞAMA 3: HİBRİDİZE HEDEFLERİ STREPTAVİDİN BONCUKLARA BAĞLANMASI:

Hazırlık:

- Binding Buffer, Wash Buffer 1 ve Wash Buffer 2 çözülene kadar 48°C ısı bloğunda tutulur.
- Her pool için 200 µl Wash Buffer 1 oda ısısına alınır.
- Her pool için 700 µl Wash Buffer 2 48°C ısı bloğunda ısıtılır.
- Streptavidin Binding Bead kullanılmadan 30 dk önce oda ısısına alınır.

BONCUKLARIN HAZIRLANMASI

- Streptavidin Binding Bead vortexlenir. Pool başına 100 µl bead 1,5 luk ependorf tüpe alınır.
- 200 µl Binding Buffer eklenir, pipetaj yapılır.
- Magnetic stand'a alınır ve 1 dk bekletilip süpernatant atılır.
- Yıkama işlemini 3 kere tekrarlanır.
- 4. kez 200 µl Binding Buffer eklenip ve homojen olana kadar vortexlenir.
- Ardından 70°C de ki PCR ürünü içine eklenip pipet ile karıştırılır sonra midi plate e alınır.

HEDEFLERİN BAĞLANMASI

- Midi plate 30 dk oda ısısında shaker a koyulur. (Vortexleme)
- Spin yapılır.
- Magnetic stand'a alınır ve 1 dk bekletilip süpernatant atılır.
- 200 µl oda ısısındaki Wash Buffer 1 eklenip pipetaj yapılır.
- 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılır ve magnetic stand a alınıp 1 dk bekletilir. Süpernatant atılır.
- 200 µl 48°C deki Wash Buffer 2'den eklenip pipetaj yapılır.
- 48°C de 5 dk bekletilir.
- Magnetic stand'a alınıp 1 dk bekletilir. Süpernatant atılır.
- Yıkama işlemini 3 kere tekrarlanır.
- Sonunda 45 µl NFW eklenir ve bead çözülür.

AŞAMA 4: KAPSAMA SONRASI AMPLİFİYE PCR, SAFLAŞTIRMA VE QC:

PCR Programı

	TEMPERATURE (°C)	TIME (saniye)	
Lid	105		
Initial Step	98	45	
Step 1	98	15	8 Cycles
Step 2	60	30	
Step 3	72	30	
Final Step	72	60	
	4	Hold	

- 22,5 µl si 0,2 ml lik PCR tüpüne alınır. Kullanana kadar buz üstünde tutulur. (Kalan yarısı -20 de saklanır.)
- Üzerine 2,5 µl Amplification Primers, ILMN ve 25 µl Kapa Hifi Hot Start Ready Mix eklenir. 10 kez nazıkçe pipetaj yapıp spinlenir ve PCR programına konulur.

Saflaştırma

- DNA Purification Beads vortexlenir.
- PCR sonrası toplam 50 µl olan ürün üzerine 50 µl AMPure XP Beads eklenir ve yaklaşık 10 kez pipetaj yapılır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Sonrasında manyetik stand'e alınır ve 3 dakika beklenir. 3 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılır.
- Ardından 200 µl %80 EtOH eklenir, 30 saniye bekletilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.
- Daha sonra manyetik stand üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve kalan alkolün uzaklaşması sağlanır.
- Beklenen sürenin sonunda pellet 32 µl NFW ile çözülür ve 5 dakika bekletilir.
- Daha sonra manyetik stand'e alınır ve 3 dakika bekletilir.
- Sonrasında 28 µl süpernatantlar yeni 0,5 lik Lobind tüpe aktarılır.

QC (QUBİT QUANTİFİKATION- QUBİT ÖLÇÜMÜ)

- Qubit ölçümü yapılır. Ölçüm sonuçları 15 ng/µl den yüksek olmalıdır.
- Bioanalyzer ile fragman boyutu belirlenir.

- Fragman boyutu 375-425 bp aralığında olmalıdır.

Güvenli saklama noktası (-20°C)

3.3.6. Nextseq Run Verilmesi

Poolun Hazırlanması:

- Öncelikle NextSeq 500/550 Mid/High Output Reagent Cartridge V2 – 300 cycle kiti - 20°den çıkarılır, su içinde ve HT buffer -20°den çıkarılır ve +4°C’de çözölmeye bırakılır.
- NaOH ve Tris-HCl çözüleleri de +4°C’den çıkarılır ve oda sıcaklığına getirilirler. NaOH 1/5 oranında su ile dilüe edilir. Aynı zamanda reaksiyon hazırlanmaya başlarken +4°C’den NextSeq 500/550 Mid/High Output Flow Cell Cartridge v2.5 çıkarılarak oda sıcaklığına getirilir.
- Örneklerin Qubit ve Bioanalyzer ölçümleri yapıldıktan sonra 100nM olan örnekler su ile dilüe edilerek 10nM’lara indirilir.
- Tek bir hasta için 16000000 milyon okuma olacak şekilde kite dahil edilecek poolar, okuma oranlarına göre tek bir poolda birleştirilirler. Bu 10nM’lık bir MegaPool’dur.
- Sonrasında MegaPool 4nM’a indirilir ve içinden 5 µl örnek yeni bir 1,5’luk LoBind tüpe
- aktarılır.
- Üzerine 5 µl daha önce dilüe edilmiş 0,2 NaOH eklenir. Hızlı bir pipetaj ardından spin yapılır ve 5 dakika beklenir.
- 5 dakikanın sonunda üzerine 5µl Tris-HCl eklenir. Kısa bir pipetaj ve spinin ardından üzerine 985 µl HT Buffer eklenir ve böyle 1000 µl’lik 20pM’lık bir pool elde edilmiş olur.
- HT buffer eklendikten sonra tüp alt-üst yapılır ve ardından spin edilir.
- Daha sonra yükleyeceğiniz örneğin miktarına (1,6 – 1,65 veya 1,7) bağlı olarak;
- $20\text{pM} \times ? = 1,65 \times 1300$ formülü ile 20pM’lık pool’dan 107,25µl yeni bir tüpe alınır ve üzeri 1300µl final hacim olacak şekilde HT Buffer ile tamamlanır. Bu formülde 1,65 değışkenlik gösterebilir.
- Final poolumuzu elde ettikten sonra NextSeq 500/550 Mid/High Output Reagent Cartridge V2’de işaretilenen kuyucuğa tüm örnek yüklenir.

Cihaza Yükleme:

- Yükleme yaparken öncelikle NextSeq programına tarih ve pool adları yazılır, index bilgisi girilir ve kaydedilir.
- Daha sonra NextSeq programı açılır; Experiment ve ardından Sequence tıklanır.
- Yazmış olduğumuz run adı seçilir ve Next denilir.
- Cihazın bizi yönlendirmesi ile açılan kısma NextSeq 500/550 Mid/High Output Flow Cell Cartridge v2.5 yerleştirilir. Kapak kapandıktan sonra Load ve Next denir.
- Devamında cihazın sağ tarafındaki kapağı açılarak NextSeq 500/550 Buffer Cartridge v2
- yerine yerleştirilir ve atık kutusu boşaltılır.
- Kapak kapatılır ve Next denilir.
- Daha sonra cihazın sol kapağı açılır ve örneği yüklemiş olduğumuz NextSeq 500/550 Mid/High Output Reagent Cartridge V2 yerleştirilir. Load ve ardından Next denir.
- Devamında cycle sayıları ve run'ın yükleneceği yer kontrol edilerek Next denilir.
- Tüm kontroller cihaz tarafından otomatik olarak yapılır ve run yine cihaz tarafından başlatılır.

3.3.7. İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler; kategorik değişkenlerin tanımlanmasında ise frekans (n) ve yüzde (%) değerleri verilmiştir. Değişkenlerin normallik varsayımları Kolmogorov Smirnov testi ile incelenmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki kare/Fisher exact analizi ile incelenmiştir. Bütün analizlerde IBM SPSS.25 programı kullanılmış ve anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Araştırmaya 58 (%38.7) kadın ve 92 (%61.3) erkek hasta dahil edildi. Bütün hastaların yaş ortalaması .02 ile 24 (yıl) arasında değişmekte olup ortalama 7.48, standart sapma 5.37 olarak bulundu. Hastaların cinsiyet dağılımları ve yaş ortalaması frekans ve yüzdeleri tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların cinsiyet dağılımları ve yaş ortalaması

Parametreler	Frekans	Yüzde
Cinsiyet		
Kadın	58	38.7
Erkek	92	61.3
	Medyan (Min.- Maks)	Ort.±SS.
Yaş	7.00 (.02 – 24)	7.48±5.37

Araştırmaya dahil edilen 150 hastanın microarray analizi sonuçları incelendiğinde 109 (%72.7) hastada fenotiple ilişkili değişim gözlenmedi, 9 (%6.0) hastada patojenik / muhtemel patojenik cnv, 32 (%21.3) hastada ise VUS cnv görüldü.

Tablo 4.2. Hastaların microarray analizi sonuçları

Parametreler	Frekans	Yüzde
Microarray varyant		
Değişim gözlenmedi	109	72.7
Microarray patojenik / muhtemel patojenik varyant	9	6.0
Microarray VUS varyant	32	21.3
Toplam	150	100

Ayrıca varyant gözlenen 41 hastanın kendi içerisindeki dağılımları incelendiğinde 8 (%19.5) hastada patojenik varyant, 1 (%2.4) hastada muhtemel patojenik varyant ve 32 (%78.0) hastada microarray VUS varyant gözlemlendi.

Tablo 4.3. Microarray cnv gözlenen 41 hasta içerisindeki dağılımlar

Parametreler	Frekans	Yüzde
Microarray patojenik cnv		
Yok	33	80.5
Var	8	19.5
Microarray muhtemel patojenik cnv		
Yok	40	97.6
Var	1	2.4
Microarray VUS cnv		
Yok	9	22.0
Var	32	78.0

Tablo 4.4'te gösterildiği gibi microarray patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda GGG oranı %77.8, microarray VUS hasta grubunda %56.3'di ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Microarray patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda OSB oranı %11.1, microarray VUS hasta grubunda %15.6'di ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Microarray patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda diğer NGB oranı %11.1, microarray VUS hasta grubunda %9.4'dü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Microarray patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda konjenital anomali oranı %0.0, microarray VUS hasta grubunda %18.8'dü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Tablo 4.4. Microarray patojenik /muhtemel patojenik ve VUS hasta gruplarında GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması

	Microarray patojenik veya muhtemel patojenik (%)	Microarray VUS n (%)	Toplam n (%)	p
GGG				.441
Yok	2 (22.2)	14 (43.8)	16 (39.0)	
Var	7 (77.8)	18 (56.3)	25 (61.0)	
GGG türü				-
İzole	2 (28.6)	12 (66.7)	14 (56.0)	
+Epilepsi	2 (28.6)	3 (16.7)	5 (20.0)	
Sendromik	3 (42.9)	3 (16.7)	6 (24.0)	
OSB				1.00
Yok	8 (88.9)	27 (84.4)	35 (85.4)	
Var	1 (11.1)	5 (15.6)	6 (14.6)	
OSB türü				1.00
İzole	1 (100.0)	2 (40.0)	3 (50.0)	
Sendromik	0 (0.0)	3 (60.0)	3 (50.0)	
Diğer NGB				1.00
Yok	8 (88.9)	29 (90.6)	37 (90.2)	
Var	1 (11.1)	3 (9.4)	4 (9.8)	
Diğer NGB türü				-
İzole	0 (0.0)	1 (33.3)	1 (25.0)	
+Epilepsi	0 (0.0)	1 (33.3)	1 (25.0)	
Sendromik	1 (100.0)	1 (33.3)	2 (50.0)	
Konjenital anomali				.309
Yok	9 (100.0)	26 (81.3)	35 (85.4)	
Var	0 (0.0)	6 (18.8)	6 (14.6)	

Tablo 4.5'te gösterildiği gibi toplam 150 hastanın 141'inde (%94.0) yeni nesil dizileme çalışıldı.

Tablo 4.5. Yeni nesil dizileme yapılan hastalar

Yeni nesil dizileme	Frekans	Yüzde (150 hasta içerisinde)
Yok	9	6.0
Var	141	94.0

Araştırmaya dahil edilen 141 hastanın NGS analizi sonuçları incelendiğinde 86 (%60.9) hastada fenotiple ilişkili değişim gözlenmedi, 27 (%19.1) hastada patojenik / muhtemel patojenik varyant, 28 (%19.8) hastada ise fenotip ilişkili VUS varyant görüldü.

Tablo 4.6. Hastaların yeni nesil dizileme (NGS) analizi sonuçları

Parametreler	Frekans	Yüzde
NGS varyant		
Değişim gözlenmedi	86	60.9
NGS patojenik / muhtemel patojenik varyant	27	19.1
NGS VUS varyant	28	19.8
Toplam	141	100

Tablo 4.7’de gösterildiği gibi 82 (%58.2) hastaya yeni nesil dizileme paneli CES, 59 (%41.8) hastaya WES çalışıldı.

Tablo 4.7. CES ve WES dağılımı

Yeni nesil dizileme türü	Frekans	Yüzde (141 hasta içerisinde)
CES	82	58.2
WES	59	41.8

Tablo 4.8’de gösterildiği gibi toplam 141 hasta içerisinde yeni nesil dizileme sonucuna göre dağılım incelendiğinde, patojenik, muhtemel patojenik ve vus varyantların toplamı, 86 (%61.0) hastada varyant yok, 55 (%39.0) hastada varyant vardı.

Tablo 4.8. Yeni nesil dizileme sonucu varyantların dağılımı

Yeni nesi dizileme	Frekans	Yüzde (141 hasta içerisinde)
Varyant yok	86	61.0
Varyant var	55	39.0

Tablo 4.9’da ise Klinik Ekzom Dizileme (CES) sonucunun dağılımı gösterilmiştir. 14 hastada patojenik / muhtemel patojenik, 17 hastada VUS varyant gözlemlendi, 51 hastada ise ilişkili varyant saptanmadı.

Tablo 4.9. Klinik Ekzom Dizileme (CES) sonucu varyantların dağılımı

Klinik Ekzom Dizileme (CES)	Frekans	Yüzde (31 hasta içerisinde)	Yüzde (82 hasta içerisinde)	Yüzde (141 hasta içerisinde)
CES patojenik / muhtemel patojenik	14	45.2	17.1	10.0
CES VUS	17	54.8	20.7	12.1
Varyant yok	51	-	62.2	36.2

Tablo 4.10’da ise Tüm Ekzom Dizileme (WES) sonucunun dağılımı gösterilmiştir. 13 hastada patojenik / muhtemel patojenik, 11 hastada VUS varyant gözlemlendi, 35 hastada ise ilişkili varyant yoktu.

Tablo 4.10. Tüm Ekzom Dizileme (WES) sonucu varyantların dağılımı

Tüm Ekzom Dizileme (WES)	Frekans	Yüzde (24 hasta içerisinde)	Yüzde (59 hasta içerisinde)	Yüzde (141 hasta içerisinde)
WES patojenik / muhtemel patojenik	13	54.1	22.1	9.2
WES VUS	11	45.8	18.6	7.8
Varyant yok	35	-	59.4	24.8

Tablo 4.11’de görüldüğü gibi, CES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda GGG oranı %42.9, VUS hasta grubunda %70.6 ve varyant olmayan grupta %41.2’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

CES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda OSB oranı %28.6, VUS hasta grubunda %5.9 ve varyant olmayan grupta %25.5’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

CES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda diğer NGB oranı %0.0, VUS hasta grubunda %5.9 ve varyant olmayan grupta %7.8’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

CES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda konjenital anomali oranı %78.6, VUS hasta grubunda %17.6 ve varyant olmayan grupta %25.5’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Tablo 4.11. CES dağılımına göre GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması

	CES dağılımı			Toplam n (%)	p
	Patojenik veya muhtemel patojenik n (%)	VUS n (%)	Varyant yok n (%)		
GGG					.102
Yok	8 (57.1)	5 (29.4)	30 (58.8)	43 (52.4)	
Var	6 (42.9)	12 (70.6)	21 (41.2)	39 (47.6)	
GGG türü					-
İzole	5 (83.3)	7 (58.5)	11 (52.4)	23 (59.0)	
+Epilepsi	0 (0.0)	3 (25.0)	6 (28.6)	9 (23.1)	
Sendromik	1 (16.7)	2 (16.7)	4 (19.0)	7 (17.9)	
OSB					.204
Yok	10 (71.4)	16 (94.1)	38 (74.5)	64 (78.0)	
Var	4 (28.6)	1 (5.9)	13 (25.5)	18 (22.0)	
OSB türü					-
İzole	2 (50.0)	1 (100.0)	9 (69.2)	12 (66.7)	
+Epilepsi	2 (50.0)	0 (0.0)	2 (15.4)	4 (22.2)	
Sendromik	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (15.4)	2 (11.1)	
Diğer NGB					.818
Yok	14 (100.0)	16 (94.1)	47 (92.2)	77 (93.9)	
Var	0 (0.0)	1 (5.9)	4 (7.8)	5 (6.1)	
Diğer NGB türü					-
+Epilepsi	-	0 (0.0)	1 (25.0)	0	
Sendromik	-	1 (100.0)	3 (75.0)	0	
Konjenital anomali					.815
Yok	10 (71.4)	14 (82.4)	38 (74.5)	62 (75.6)	
Var	4 (28.6)	3 (17.6)	13 (25.5)	20 (24.4)	

Tablo 4.12’de görüldüğü gibi, WES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda GGG oranı %46.2, VUS hasta grubunda %45.5 ve varyant olmayan grupta %37.1’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

WES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda OSB oranı %15.4, VUS hasta grubunda %9.1 ve varyant olmayan grupta %25.7’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

WES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda diğer NGB oranı %23.1, VUS hasta grubunda %18.2 ve varyant olmayan grupta %17.1’di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

WES dağılımına göre patojenik veya muhtemel patojenik hasta grubunda konjenital anomali oranı %15.4, VUS hasta grubunda %27.3 ve varyant olmayan grupta %20.0'di ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Tablo 4.12. WES dağılımına göre GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması

	WES dağılımı			Toplam n (%)	p
	Patojenik veya muhtemel patojenik n (%)	VUS n (%)	Varyant yok n (%)		
GGG					.812
Yok	7 (53.8)	6 (54.5)	22 (62.9)	35 (59.3)	
Var	6 (46.2)	5 (45.5)	13 (37.1)	24 (40.7)	
GGG türü					-
İzole	2 (33.3)	2 (40.0)	7 (53.8)	11 (45.8)	
+ Epilepsi	2 (33.3)	0 (0.0)	4 (30.8)	6 (25.0)	
Sendromik	2 (33.3)	3 (60.0)	2 (15.4)	7 (29.2)	
OSB					
Yok	11 (84.6)	10 (90.9)	26 (74.3)	47 (79.7)	
Var	2 (15.4)	1 (9.1)	9 (25.7)	12 (20.3)	
OSB türü					-
İzole	1 (50.0)	0 (0.0)	4 (44.4)	5 (41.7)	
+Epilepsi	1 (50.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	2 (16.7)	
Sendromik	0 (0.0)	1 (100.0)	4 (44.4)	5 (41.7)	
Diğer NGB					.897
Yok	10 (76.9)	9 (81.8)	29 (82.9)	48 (81.4)	
Var	3 (23.1)	2 (18.2)	6 (17.1)	11 (18.6)	
Diğer NGB türü					-
İzole	1 (33.3)	0 (0.0)	1 (16.7)	1 (18.2)	
+Epilepsi	0 (0.0)	1 (50.0)	5 (83.3)	6 (54.5)	
Sendromik	2 (66.7)	1 (50.0)	0 (0.0)	3 (27.3)	
Konjenital anomali					.815
Yok	11 (84.6)	8 (72.7)	28 (80.0)	47 (79.7)	
Var	2 (15.4)	3 (27.3)	7 (20.0)	12 (20.3)	

Tablo 4.13'te gösterildiği gibi CES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda GGG oranı %58.1, WES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda %45.8'di ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

CES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda OSB oranı %16.1, WES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda %12.5'di ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

CES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda diğer NGB oranı %3.2, WES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda %20.8'di ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

CES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda konjenital anomali oranı %22.6, WES patojenik veya muhtemel patojenik veya VUS hasta grubunda %20.8'di ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>.05$).

Tablo 4.13. CES ve WES Patojenik / muhtemel patojenik veya VUS hasta gruplarında GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması

	CES Patojenik / muhtemel patojenik veya VUS n (%)	WES Patojenik / muhtemel patojenik veya VUS n (%)	Toplam n (%)	p
GDD				.368
Yok	13 (41.9)	13 (54.2)	26 (47.3)	
Var	18 (58.1)	11 (45.8)	29 (52.7)	
GDD türü				-
İzole	12 (66.7)	4 (36.4)	16 (55.2)	
+ Epilepsi	3 (16.7)	2 (18.2)	5 (17.2)	
Sendromik	3 (16.7)	5 (45.5)	8 (27.6)	
ASD				1.00
Yok	26 (83.9)	21 (87.5)	47 (85.5)	
Var	5 (16.1)	3 (12.5)	8 (14.5)	
ASD türü				-
İzole	3 (60.0)	1 (33.3)	4 (50.0)	
+Epilepsi	2 (40.0)	1 (33.3)	3 (37.5)	
Sendromik	0 (0.0)	1 (33.3)	1 (12.5)	
Diğer NDD				.075
Yok	30 (96.8)	19 (79.2)	49 (89.1)	
Var	1 (3.2)	5 (20.8)	6 (10.9)	
Diğer NDD türü				-
İzole	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (16.7)	
+Epilepsi	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (16.7)	
Sendromik	1 (100.0)	3 (60.0)	4 (66.7)	
Konjenital anomali				.876
Yok	24 (77.4)	19 (79.2)	43 (78.2)	
Var	7 (22.6)	5 (20.8)	12 (21.8)	

Tablo 4.14. Microarray ve NGS tanı alan hasta gruplarında GGG, OSB, diğer NGB türlerinin ve konjenital anomali durumunun karşılaştırılması

	Microarray		NGS	
	Patojenik veya muhtemel patojenik n (%)	Toplam n	Patojenik veya muhtemel patojenik n (%)	Toplam n
GGG				
Toplam	7 (10.0)	70	12 (19.0)	63
GGG türü				
İzole	2 (5.5)	36	7 (20.5)	34
+Epilepsi	2 (11.7)	17	2 (13.3)	15
Sendromik	3 (17.6)	17	3 (21.4)	14
OSB				
Toplam	1 (3.2)	31	6 (20.0)	30
OSB türü				
İzole	1 (5.5)	18	3 (17.6)	17
+Epilepsi	-	6	3 (50.0)	6
Sendromik	-	7	-	7
Diğer NGB				
Toplam	1 (5.8)	17	3 (18.7)	16
Diğer NGB türü				
İzole	-	2	1 (50.0)	2
+Epilepsi	-	7	-	7
Send	1(12.5)	8	2 (28.5)	7
Konjenital anomali				
Toplam	-	32	6 (18.7)	32

Tablo 4.15. Moleküler karyotipleme sonucu tanı alan olgular.

Nº	Genetik Tanı (MIM #)	Genomik Koordinat	Ölçü	Zigosite	Sınıf	Cinsiyet
1.	1q21.1-q21.2 deletion (MIM # 612474)	<i>Chr 1:</i> 145985385- 147825662	1.8 Mb	Heterozigot	Patojenik	e
2.	2p16.3 deletion (MIM # 614332)	<i>Chr 2:</i> 47952231- 48233949	281.7 Kb	Heterozigot	Patojenik	k
3.	6q27 deletion (MIM # 618709)	<i>Chr 6:</i> 170329978- 170919470	589.5 Kb	Heterozigot	Patojenik	k
4.	7q36.3 deletion (MIM # 620270)	<i>Chr 7:</i> 155728192- 159119486	3.4 Mb	Heterozigot	Patojenik	e
5.	11q24.2-q25 deletion (MIM # 147791)	<i>Chr 11:</i> 126458263- 134944006	8.5 Mb	Heterozigot	Patojenik	e
6.	15q13.2-q13.3 deletion (MIM # 612001)	<i>Chr 15:</i> 31094479- 32515681	1.4 Mb	Heterozigot	Patojenik	k
7.	16p11.2 deletion (MIM # 611913)	<i>Chr 16:</i> 29634212- 30347731	713.5 Kb	Heterozigot	Patojenik	e
8.	Xq28 duplication (MIM # 300815)	<i>Chr X:</i> 153113912- 153579448	465.5 Kb	Hemizigot	Patojenik	e
9.	2p16.3 deletion (MIM # 614332)	<i>Chr 2:</i> 51119268- 51383069	263.8 Kb	Heterozigot	Muhtemel Patojenik	e

Tablo 4.16. Yeni nesil dizileme sonucu tanı alan olgular

Nº	Genetik Tanı (MIM #)	Gen/Transkript/c.DNA	Zigosite	Sınıf	Cinsiyet	YND paneli
10.	#618205	<i>CHD3</i> : NM_001005271.2 c.5344_5345del	heterozigot	Muhtemel Patojenik	e	CES
11.	#300352	<i>SLC6A8</i> : NM_005629.3 c.1222_1224del	hemizigot	Muhtemel Patojenik	e	CES
12.	#619188	<i>ZNF292</i> : NM_015021.3 c.976dup	heterozigot	Muhtemel Patojenik	e	WES
13.	#203450	<i>GFAP</i> : NM_002055.4 c.1246C>T	heterozigot	Muhtemel Patojenik	e	WES
14.	#619522	<i>ZMYM2</i> : NM_001190964.2 c.2338C>T	heterozigot	Patojenik	k	WES
15.	#618725	<i>PHF21A</i> : NM_001101802.1 c.1701_1702del	heterozigot	Muhtemel Patojenik	k	WES
16.	#170100	<i>PEPD</i> : NM_000285.4: c.611_623dup	homozigot	Patojenik	e	CES
17.	#618974	<i>KAT8</i> : NM_032188 c.649A>G	heterozigot	Muhtemel Patojenik	k	WES
18.	#614736	<i>NNT</i> : NM_182977.2 c.1098+1G>C	homozigot	Muhtemel Patojenik	k	WES
19.	#611091	<i>NSUN2</i> : NM_017755.6 c.815+1G>T <i>NSUN2</i> : NM_017755.6: c.815+2T>C	homozigot	Muhtemel Patojenik	k	CES
20.	#602473	<i>ETHE1</i> : NM_014297.5 c.3G>T	homozigot	Patojenik	e	CES
21.	#605130	<i>KMT2A</i> : NM_001197104.2: c.6333del	heterozigot	Patojenik	k	CES
22.	#606703	<i>ADCY5</i> : NM_183357.3: c.3533-2A>C	heterozigot	Muhtemel Patojenik	e	CES
23.	#230000	<i>FUCA1</i> : NM_000147.5: c.768+1G>A	homozigot	Patojenik	k	CES
24.	#618929	<i>CDH2</i> : NM_001792.4 c.2065C>T	heterozigot	Muhtemel Patojenik	k	WES
25.	#617105	<i>SLC1A2</i> : NM_004171.3 c.2T>C	heterozigot	Patojenik	k	WES
26.	#610733	<i>SOS1</i> : NM_005633.4 c.2183A>C	heterozigot	Muhtemel Patojenik	k	CES
27.	#163950	<i>PTPN11</i> : NM_001330437.1 c.794G>T	heterozigot	Muhtemel Patojenik	k	CES

№	Genetik Tanı (MIM #)	Gen/Transkript/c.DNA	Zigosite	Sınıf	Cinsiyet	YND paneli
28.	#214110	<i>PEX5</i> : NM_001131023/1 c.151del <i>PEX5</i> : NM_001131023/1 c.159del	homozigot	Muhtemel Patojenik	e	CES
29.	#617188	<i>MBOAT7</i> : NM_001146056.2 c.907del	homozigot	Muhtemel Patojenik	e	CES
30.	#251200	<i>MCPH1</i> : NM_024596.4 c.215C>T	homozigot	Muhtemel Patojenik	e	WES
31.	#608593	<i>CFHR5</i> : NM_030787 c.1511_1513delinsAA	heterozigot	Muhtemel Patojenik	e	WES
32.	#618512	<i>KMT2E</i> : NM_182931.2: c.1623+1G>A	heterozigot	Patojenik	e	WES
33.	#618924	<i>SCN2A</i> : NM_001040142.2 c.4903C>T	heterozigot	Patojenik	e	CES
34.	#300495	<i>NLGN4X</i> : NM_181332.3 c.444C>A	hemizigot	Patojenik	e	CES
35.	#620029	<i>CACNA1C</i> : NM_000719.6 c.492T>G	heterozigot	Patojenik	k	WES
36.	#250620	<i>HIBCH</i> : NM_014362.3: c.488G>T	homozigot	Patojenik	k	WES

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, nörogelişimsel bozuklukları ve/veya konjenital anomalileri olan hastalara yapılan moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme yöntemlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Nörogelişimsel bozuklukların tanısı aşamasında moleküler karyotipleme testi birinci basamak olarak kullanılması güncel kılavuzlar tarafından önerilmektedir (11-13). Moleküler karyotiplemenin bildirilen teşhis verimi, GDD/ID, ASD ve/veya konjenital anomalilere sahip bireyler için incelenen serilere bağlı olarak %10 ila %20 arasında değişmektedir (13-15). Çalışmaların sağladığı fenotipik ayırtı düzeyinde çeşitlilik olmasına rağmen, nörogelişimsel bozukluğa sahip hastalarda aCGH (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon mikrodizini) ve ES (Exon Sequencing-Ekzon Dizileme) üzerine rapor veren birkaç yazar, belirli özelliklerin ve ek tanıların artan tanı verimlilikleri ile ilişkilendirildiğini öne sürmektedir (16-24).

Martinez ve ark. (4) tarafından yapılan araştırmada nörogelişimsel bozuklukları olan 1412 hasta araştırılmış ve patojenik/ muhtemel patojenik cnv grubunda tanı konulan hasta yüzdesi aCGH ile %5.7 olurken klinik ekzom dizileme sonucunda %20 diagnostik hedefe ulaşılmıştır.

Biz araştırmamızda aCGH sonucu %6'ya ulaşırken, yeni nesil dizileme yöntemi ile (CES ve WES birlikte) %19.1 rakamına ulaştık.

Moleküler karyotipleme sonucunda 150 hastadan 9'unda patojenik/muhtemel patojenik varyant, 32'sinde fenotip ilişkili VUS varyant, toplam 41 hastada ilişkili varyant saptandı (%27.3).

NGS ile bakılan hastalarda 141 hastadan 27'sinde patojenik/muhtemel patojenik, 28'inde fenotip ilişkili VUS varyant, toplam 55 hastada (patojenik/ muhtemel patojenik ve VUS) %39 sonucu elde edildi.

Tanı alan toplam 36 olgu, 1-9 mikroarray çalışması, 10-36 yeni nesil dizileme panelleri olarak numaralandırıldı.

Moleküler karyotipleme sonuçları

Hastaları altgruplar şeklinde inceler olursak, moleküler karyotipleme sonucu en yüksek sonuç yüzdesi %17.6 ile sendromik global gelişim geriliği öntanısı ile başvuran hasta grubu idi. Toplam 17 hastanın 3'ünde patojenik cnv saptanmıştır.

Olgu 1: Hastaya yapılan microarray analizi sonucunda Chr 1: 145985385-147825662 bölgesinde 1,8 mb heterozigot delesyon saptandı. 1q21 mikrolelesyon sendromu, de novo veya otozomal dominant kalıtım paternlerine sahip nadir bir bozukluktur ve fenotipik özellikleri arasında mental retardasyon, belirgin yüz dismorfizmi, mikrosefali, kalp anormallikleri ve katarakt yer alır (114). Diğer yayınlarda da nörogelişimsel gecikmeler, kraniofasial anormallikler ve kalp anomalileri gibi belirli klinik fenotipler bildirilmiştir. Diğer göreceli yaygın fenotipler arasında entellektüel yetersizlikler (ID'ler), dikkat eksikliği hiperaktivite bozuklukları, otizm spektrum bozukluğu ve şizofreni yer alır (115). Kliniğimize hipotonisite, nöromotor gelişim geriliği, öğrenme güçlüğü nedeniyle başvurmuş. Desteksiz oturamıyor, yürümesi yok. FM'de bilateral epikantal foldlar, geniş burun kökü ve ağız yapısı, mikrognati, kısa filtrum saptandı. DTR alınamıyor, hipotoni mevcut.

Olgu 2: Yapılan microarray analizinde Chr 2: 47952231-48233949 bölgesinde 281,7 Kb heterozigot delesyon saptandı. 2p16.3'teki de novo mutasyonlar ve kopya sayısı varyasyonları (CNV'ler), otizm spektrum bozuklukları (ASD), şizofreni ve mental retardasyon hastalarında tekrar tekrar gözlemlenmiştir. Nadir de olsa, bu CNV kayıpları genellikle heterozigot delesyonlarla kendini gösterir ve çoklu nöropsikiyatrik bozukluk riskinde önemli bir artış sunarlar (116).

Tarafımıza hiperlipidemi, işitme kaybı ve mental retardasyon şikâyetleri ile refere edilmiş. Yürüme gecikmiş, konuşma tek-tük kelimelerle başlamış, sonra azalmış. Hiperlipidemi mevcut, metabolik testleri normal. Beyin MRG ve EKO normal. Epilepsi-sağ kolunda kasılmalar şeklinde, EEG'de hafif epileptiform bozukluk saptanmış. Batın USG'de karaciğer grade 2 steatozis, HbA1c-6,3. FM'de kilo >97p, boy 10-25p, hipotelorizm, epikantus, burun kökü basık, tübüler burun, sol yanakta hafif hiperpigmentasyon, hafif retrognati, ensede akantozis, buffalo hump, karında strialar görüldü.

Olgu 3: Kliniğimizde yapılmış olan microarray analizi sonucunda Chr 6: 170329978-170919470 bölgesinde 589,5 kb heterozigot delesyon saptanmıştır. 6q27

mikrodelesyonu, beyin malformasyonlarına ve nörogelişimsel bozukluklara yol açan çeşitli fenotipleri içeren karmaşık bir sendromdur. Fenotipler normal zeka-minimum klinik semptomlardan ciddi nörolojik hasara ve ciddi gelişimsel gecikmelere kadar değişebilir. 6q terminal delesyonunun en yaygın klinik özellikleri arasında doğum öncesi/sonrası gelişimsel gecikmeler, zihinsel engellilik, mikrosefali ve/veya hidrosefali ve yüz dismorfizmi yer alır (117). Nöromotor gelişim geriliği, mental retardasyon, uzun boy ve skolyoz şikayetleri ile kliniğimize refere edildi. FM'de üçgen yüz, dar alın, pectus carinatum, ciltte cafe au lait lekeleri ve hipopigmente lezyonlar görüldü. Marfanoid habitus yok. Anne baba akraba değil.

Sendromik diğer nörogelişimsel bozukluklar altgrubunda %12.5 oranla 1 olgumuz tanı aldı.

Olgu 4: Yapılan microarray analizi sonucunda Chr 7: 155728192-159119486 bölgesinde 3,4 mb heterozigot delesyon saptandı. Literatürde, Sonic Hedgehog geni (*SHH*) ve homeobox genini (*HLXB9*) içeren 7q36 delesyonu saptanmış 4 olgu bildirilmiştir. Hastalarda hafif mental retardasyon ve boy kısalığının yanısıra mikrosefali, ptoz, sakral agenezi gibi holoprosensefali (HPE) bulguları da görülmüştür (118).

Koanal atrezi, laringomalazinedenli 30 gün YDYBÜ yatışı olmuş hastanın anne babası yakın köylü, 14 yaş abide epilepsi tanısı mevcut. Diğer kardeşleri sağlıklı. Boy kısalığı, mikropenis, öğrenme güçlüğü şikayetleri ile kliniğimize refere edildi. FM'de üçgen yüz, saç çizgisi düşük, sağ gözde ptoz, tübüler burun, yüksek damak, overcrowded dişler, retrognati, mikrognati, hafif mikrosefali, hafif yele boyun, mikropenis, artmış torakal kifoz, ciltte atopi bulguları saptandı.

%11.7 oranla epilepsi eşlik eden global gelişim geriliği grubunda 2 olgu tanı aldı.

Olgu 5: Kromozom analizi sonucunda 46,XY, del(11)(q24.2q25) belirlendi. Microarray analizi saptanmış delesyonu konfirme etti, Chr 11: 126458263-134944006 bölgesinde 8,5 mb delesyon tespit edildi. Saptanan değişim OMIM veritabanında Chromosome 11q deletion syndrome (Jacobsen syndrome) olarak bildirilmiştir. Jacobsen sendromu (OMIM #147791), kromozom 11'in uzun kolunun terminal olarak silinmesine dayanan bir kontik gen sendromudur (119). Sendrom ilk olarak Jacobsen ve ark. tarafından tanımlandı (120). 11q delesyon sendromundaki ana klinik bulgular trombositopeni, Paris-Trousseau sendromu, gelişimsel gecikme, konjenital kalp hastalığı, kısa boy, anormal beyin görüntüleme ve pilorik stenozdur (121). Tarafımıza nöbet öyküsü, başını iyi

tutamama, yüzde asimetri, hipertelorizm, sağ gözde kayma, hafif dolikosefali, sağ göz kapağında nevus flammeus, bilateral simian ve klinodaktili, mongol lekesi, sakral dimple, solda herni, sağda inmemiş testis, her ikisi opere, belirgin penil hipospadias şikayetleri ile başvurdu.

Hastanın tarafımızca takibi devam etmektedir.

Olgu 6: Microarray analizi sonucunda Chr 15: 31094479-32515681 bölgesinde 1,4 mb heterozigot delesyon saptandı. 15q13.2-q13.3 kromozomundaki tekrarlayan bir mikrodelsiyon sendromu yakın zamanda tanımlandı. Minör dismorfik özellikler, zeka geriliği, epilepsi ve/veya EEG anormallikleri literatürde rapor edilmiştir (122). Epilepsi ve mental retardasyon tanılı hasta kliniğimize yönlendirildi, ilk nöbetleri 2,5 yaşında başlamış. Küçük kardeşi 4 aylıkken konjenital kalp hastalığı nedeniyle ex olmuş. FM’de üçgen yüz yapısı, ayrıık dişler, pectus carinatum, ayrıık meme başı, pes planus saptandı.

İzole global gelişim geriliği öntanısı ile başvuran 36 hastadan 2’sinde (%5.5) patojenik cnv saptandı.

Olgu 7: Kliniğimizde yapılmış olan microarray analizi sonucunda Chr 16: 29634212-30347731 bölgesinde 713.5 kb heterozigot delesyon saptanmıştır. 16p11.2 BP4 ve BP5 bölgesi, tekrarlayan ~600 kb CNV ve delesyonlar, yaklaşık 1/2000 görülme sıklığı ile nörogelişimsel bozuklukların ve otizm spektrum bozukluğunun en sık görülen etiyolojilerinden biridir. Delesyon taşıyıcılarının erken nörolojik gelişimde, özellikle konuşma, fonoloji ve dili %70 oranında bozan gecikmelere sahip oldukarı bildirilmiştir (123).

Tarafımıza açıklanamayan mental retardasyon, konuşma bozukluğu nedeniyle refere edilmiş. Doğumda makroglossi, hidrosel bulguları varmış. Soltarafli opere inguinal herni ve kriptorşidizm öyküsü mevcut. FM’de uzun yüz yapısı, geniş burun kökü, ayrıık dişler, mikrognati, yüksek damak, pectus excavatum görüldü. Anne baba akraba değil, ailede benzer öykü yok.

Olgu 8: Microarray analizi sonucunda Chr X: 153113912-153579448 bölgesinde 465,5 kb duplikasyon saptanmıştır. Xq28 duplikasyon sendromunun ana klinik belirtileri entellektüel yetersizlik, nörodavranışsal anormallikler ve non-spesifik dismorfik yüz bulgularıdır. Ancak X'e bağıli kalıtım nedeniyle sendromdan etkilenen erkekler, heterozigot etkilenmiş kadınlara göre, hastalığın daha şiddetli ve yaygın özelliklerini sergileme

eğilimindedir. Örneğin, şimdiye kadar bildirilmiş etkilenen tüm erkeklerde hafif veya orta derecede zihinsel engellilik belirtileri saptanmıştır (124).

1 yaş erkek hasta çocuk nöroloji tarafından global gelişim geriliği öntanısıyla kliniğimize refere edilmiş. 10 aylıkken oturmuş, emekleme, konuşma, göz teması yok. Beyin MRG’de sol temporal bölgede 47x54mm,sağda 28x22mm boyutunda kistik lezyonlar izlenmiş olup araknoid kist ile uyumlu bulunmuştur. Corpus callosum incelmış olup volümü azalmış. Anne baba akraba değil. FM’de dismorfik özellikler yok, göz teması kuruyor, yüksek, dar damak, pectus carinatum mevcut.

Hastanın tarafımızca takibi devam etmektedir.

Microarray testi sonucu, izole otizm spektrum bozukluğu altgrubundan çalışmaya alınan 18 hastadan 1’inde (%5.5) patojenik cnv saptandı.

Olgu 9: Tarafımızca yapılan microarray analizi sonucunda olgu 6 ile aynı 2p16.3 delesyonu fakat farklı Chr 2: 51119268-51383069 bölgesinde 263,8 kb heterozigot delesyon saptanmıştır. 2p16.3’teki mutasyonlar ve CNV’ler nörogelişimsel bozukluklarda, özellikle otizm spektrum bozukluklarında bildirilmiştir (116). *NRXN1*’i içeren 2p16.3’teki heterozigot delesyonlar ve aynı genin intragenik mutasyonları, izole entellektüel yetersizlik (ID)/global gelişim geriliği (GDD), otizm spektrum bozukluğu (ASD), DEHAB (ADHD), şizofreni ve bipolar bozukluk dahil olmak üzere geniş bir nörogelişimsel ve psikiyatrik bozukluklar yelpazesinden etkilenen bireylerde rapor edilmiştir (125). Otizm öntanısı ile kliniğimize refere edilen hastanın konuşması yok, göz teması kurmuyor. Kranial MRG’de frontal lob bölgesinde araknoid kist saptanmış. Annenin babasında hafif zeka geriliği varmış, teyzelerde erken menopoiz öyküsü, babanın babasında zeka geriliği, atipik hareketler öyküsü mevcut. Frajil X testi normal saptandı.

Moleküler karyotipleme sonucu konjenital anomaliler grubunda çalışılan 32 hastadan hiçbirinde patojenik/muhtemel patojenik cnv saptanmamıştır.

Yeni nesil dizileme sonuçları

Epilepsi eşlik eden Otizm Spektrum Bozukluğu tanılı 6 hastadan 3’ü (%50.0) tanı aldı.

Olgu 10: OSB öntanısı ve dalma, gülme şeklinde nöbet öyküsü olan hastanın FMR1 tekrar sayısı 46 ve *SNRPN* metilasyon testleri normal saptanmıştır. Klinik ekzom panelinde

CHD3 geninde heterozigot c.5344_5345del p.(Trp1782Alafs*3) varyantı saptandı. Hastaya *Snijders Blok-Campeau sendromu* (SNIBCPS, MIM# 618205), tanısı konuldu, şu ana kadar yalnızca yaklaşık 60 vakanın bildirildiği son derece nadir bir hastalıktır. SNIBCPS'li hastaların klinik özellikleri arasında gelişim geriliği, entellektüel yetersizlik, konuşma ve öğrenme güçlükleri ve otizm spektrum bozukluğu gibi davranış bozuklukları yer alır. Ek olarak, SNIBCPS'li hastalar makrosefali, hipertelorizm, seyrek kaşlar, geniş alın, belirgin burun ve sivri çene gibi tipik dismorfik özellikler sergiler (126) ki, aynı fenotip hastamızda da mevcuttu.

Olgu 11: Atipik otizm ve fotosensitivite ile tetiklenen nöbet öyküsü olan hastaya çalışılan ekzom panelinde *SLC6A8* geninde c.1222_1224del hemizigot varyant saptandı. *Cerebral Creatine Deficiency syndrome 1*, MIM#300352 tanısı ile uyumlu bulunan kreatin eksikliği bozuklukları (Creatine Deficiency Disorders- CDD'ler), kreatin metabolizması ve taşınmasıyla ilgili doğuştan gelen hatalar, üç bozukluğu içerir: kreatin biyosentezi bozuklukları, guanidinoasetat metiltransferaz (GAMT) eksikliği ve L-arginin: glisin amidinotransferaz (AGAT) eksikliği; ve kreatin taşıyıcı (CRTR) eksikliği. Gelişimsel gecikme, bilişsel işlev bozukluğu, otizm spektrum bozuklukları veya zihinsel engellilik ve konuşma-dil bozukluğu, her üç CDD'de de ortaktır. Bireylerin çoğunda epilepsi vardır ve bir davranış bozukluğu gelişir (örn. hiperaktivite, otizm veya kendine zarar verme davranışı) (127) .

Olgu 12: Klinik ekzom panelinde *ZNF292* geninde c.976dup p.(Pro1691Asnfs*10) varyantı heterozigot saptandı. *ZNF292*'deki de novo ve baskın olarak kalıtsal varyantlar, entelektüel yetersizlik ve OSB dahil bir dizi nörogelişimsel özelliklerle ilişkilidir. Klinik spektrum geniş olduğundan bireyler diğer sendromik özelliklerle birlikte veya bunlar olmadan hafif ila orta derecede ID ile başvurur. Sonuçlarımız, *ZNF292*'deki varyantların muhtemelen ASD olsun veya olmasın ID olarak ortaya çıkan nörogelişimsel bir bozukluğun tekrarlayan bir nedeni olduğunu göstermektedir (128). Otizm, DEHAB, EEG-de epileptiform aktivite nedenli antikonvulzan tedavi alan hastaya *Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 64*; MIM#619188 tanısı konuldu.

İzole diğer nörogelişimsel bozukluklar altgrubunda olan 2 hastadan 1'i (%50.0) tanı almıştır.

Olgu 13: Tüm ekzom dizileme kapsamında *GFAP* geninde c.1246C>T p.(Arg416Trp) varyantı heterozigot gözlenmiştir. *Alexander Disease* (MIM#203450) başlangıç yaşına göre infantil, juvenil ve erişkin formları olmak üzere üç alt gruba ayrılır

(129). İnfantil Alexander hastalığından etkilenen hastalar, doğumdan sonraki ilk iki yıl içinde nöbetler, megalensefali, gelişimsel gecikme, ilerleyici bozulma ve yenidoğan hasta şiddetinin artması gibi çeşitli semptomlar gösterir (130). Juvenil form başlangıç yaşıyla (2-14 yaş arası) ataksi, hiperrefleksi, bulber semptomlar gibi semptomlarla karakterizedir. Juvenil form, infantil forma göre daha hafif ilerleme gösterir ve kognitif ve motor fonksiyonlarını korur. Yetişkin Alexander hastalığı hastalarında juvenil formla daha fazla benzerlik vardır ve esas olarak spastik paraparezi, palatal miyoklonus, bulber semptomlar ve ataksi görülür (131). AxD tanısı genellikle CT ve MRI karakteristik görünümünün sonuçlarına göre konur (132). 12 yaşında konuşma ve yürüme bozukluğu, beyin MRG’de orta alt serebellar pediküllerde ve bulbusta T2-Flair gliosis ile uyumlu sinyal artımları mevcut olup literatür bilgileri ile karşılaştırılarak hastaya *Alexander Disease* (MIM#203450) tanısı konuldu.

Sendromik diğer nörogelişimsel bozukluklar altgrubundan 7 hastadan 2’si (%28.5) tanı aldı.

Olgu 14: Tüm ekzom panelinde *ZMYM2* geninde c.2338C>T p.(Arg780*) heterozigot varyanti gözlemlendi. *Neurodevelopmental-craniofacial syndrome with variable renal and cardiac abnormalities* (Değişken renal ve kardiyak anormalliklerle birlikte nörogelişimsel-kraniyofasiyal sendrom -NECRC), hafif gelişim geriliği, hafif düzeyde bozulmuş entelektüel gelişim veya öğrenme güçlükleri, konuşma gecikmesi ve davranışsal anormalliklerle ilişkili dismorfik kraniyofasiyal özelliklerle karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık yarısında böbrek ve idrar yollarında konjenital anomaliler ve/veya septal defektler dahil konjenital kalp defektleri bulunur (133). Boy kısalığı, öğrenme güçlüğü nedeniyle tarafımıza yönlendirilen hasta tekrarlayan İYE nedeniyle çocuk nefrolojiden de takip ediliyor.

Olgu 15: Tüm ekzom dizileme çalışılan hastada *PHF21A* geninde c.1701_1702del p.(Lys568Valfs*3) varyantı heterozigot gözlenmiştir. Nöbetli veya nöbetsiz davranışsal anormallikleri ve kraniyofasiyal dismorfizmi (IDDBCS) olan entelektüel gelişim bozukluğu olan hastalarda, motor becerilerde bozulma ve dil gecikmesi ile birlikte zihinsel gelişimde bozulma veya değişen şiddette gelişimsel gecikme vardır. Makrosefali, obezite ve aşırı büyüme sıklıkla görülür. Hastaların yaklaşık yarısı nöbet geçirir ve genellikle otizm dahil nörodavranışsal bozukluklar bulunur (134,135) . Hasta dismorfik bulgular, sınırda IQ, kendi kendine zarar vermeğe eğilim gibi şikayetlerle tarafımıza yönlendirildi.

Intellectual developmental disorder with behavioral abnormalities and craniofacial dysmorphism with or without seizures, MIM#618725 tanısı almıştır.

Sendromik global gelişim geriliği olan altgrupta 14 hastadan 3'üne (%21.4) tanı konulmuştur.

Olgu16: Klinik ekzom panelinde *PEPD* geninde c.611_623dup p.(Val209Glyfs*4) varyantı homozigot gözlenmiştir. *PEPD* geninde compound heterozigot veya homozigot klinik olarak heterojendir ve şiddeti büyük ölçüde değişir. Özellikleri arasında özellikle bacaklarda ve ayaklarda kronik, yavaş iyileşen ülserasyonlar yer alır. Hafiften şiddetliye kadar zeka geriliği sıklıkla görülen bir özelliktir ve bazen ölümcül olabilen tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları yaygındır. Yüz dismorfizmi, düşük saç çizgisi ve hirsutizm, semer burun, oküler hipertelorizm, mikrognati, yüksek damak, mandibular çıkıntı ve ekzoftalmiyi içerebilir. Klinik bulgular genellikle doğumdan sonra veya erken çocukluk döneminde tespit edilebilir, ancak geç başlangıçlı vakalar da rapor edilmiştir (136). Tarafımıza sınırda IQ, mikropenis, dismorfik yüz bulguları gibi şikâyetlerle yönlendirilen hastanın anne babası 1. derece kuzen, *Prolidase deficiency*,(MIM#170100) fenotipi ile uyumlu bulundu.

Olgu 17: Tüm ekzom panelinde *KAT8* c.649A>G p.(Met217Val) varyantı heterozigot saptanmıştır. *Li-Ghorbani-Weisz-Hubshman sendromu*, genel gelişimsel gecikme, dil gecikmesi ile birlikte hafif ila orta derecede bozulmuş entelektüel gelişim ve hafif dismorfik özellikler ile karakterize edilen nörogelişimsel bir hastalıktır. Bazı hastalarda nöbet görülebilir (137). Hasta kliniğimize entelektüel yetersizlik, nöbet öyküsü ve obezite şikâyetleriyle başvurdu, fenotiple uyumlu bulundu.

Olgu18: Hastaya yapılmış olan tüm ekzom panelinde *NNT* geninde c.1098+1G>C varyantı homozigot saptanmıştır. Ailesel glukokortikoid eksikliği, nadir görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Etkilenen bireyler tipik olarak yaşamlarının ilk birkaç ayında, gelişememe, tekrarlayan hastalıklar veya enfeksiyonlar, hipoglisemi, konvülsiyonlar gibi kortizol eksikliğine bağlı semptomlarla ortaya çıkar (138). Global gelişim geriliği, adrenal yetersizlik öntanılarıyla başvuran hastanın fenotipi *Glucocorticoid deficiency 4, with or without mineralocorticoid deficiency* (MIM#614736) ile uyumludur.

İzole global gelişim geriliği altgrubunda 34 hastadan 7'sinde (%20.5) patojenik/muhtemel patojenik varyant saptanmıştır.

Olgu 19: Klinik ekzom panelinde *NSUN2* geninde iki homozigot varyant c.815+1G>T ve c.815+2T>C tespit edildi. Literatürde ortadan şiddetliye doğru değişken mental retardasyonu olan hastalarda mikrosefali, sinofris, hipotelorizm gibi dismorfik bulgular bildirilmiştir (139). Hastanın fenotipi *Intellectual developmental disorder, autosomal recessive 5*, (MIM#6111091) ile uyumlu bulunmuştur.

Olgu 20: *ETHE1* geninde c.3G>T p.Met1? homozigot varyantı saptanmıştır. Etilmalonik ensefalopati (EE), bebeklik döneminde beyin, gastrointestinal sistem ve periferik damarları etkileyen, otozomal resesif geçişli ciddi bir metabolik hastalıktır. Bozukluk nörogelişimsel gecikme ve gerileme, belirgin piramidal ve ekstrapiramidal belirtiler, tekrarlayan peteşiler, ortostatik akrosiyanoz ve kronik ishal ile karakterizedir (140). Anne babası 1. derece kuzen olan hasta hipotonik, konuşma yok, fenotipi *Ethylmalonic encephalopathy* (MIM#602473) ile uyumlu bulundu.

Olgu 21: *KMT2A* geninde c.6333del p.(Glu2112ArgfsTer9) varyantı heterozigot saptanmıştır. *Wiedemann-Steiner sendromu*, kısa boyla ilişkili hipertrikoz ile karakterize konjenital bir malformasyon sendromudur; uzun kirpikler, kalın veya kavisli kaşlar, geniş burun köprüsü ve aşağı doğru eğimli ve dikey olarak dar palpebral fissürleri olan dismorfik yüz; hafif ila orta derecede entelektüel yetersizlik gibi bulgularla bildirilmiştir(141,142) . Hastamızın klinik bulguları *Wiedemann-Steiner syndrome* (MIM#605130) ile uyumludur.

Olgu 22: *ADCY5* geninde c.3533-2A>C heterozigot varyant saptanmıştır. Orofasiyal tutulumlu otozomal dominant diskinezi- Dyskinesia with orofacial involvement, autosomal dominant (MIM# 606703), yaşamın ilk on yılında boyun, ekstremit ve yüz kaslarını içeren istemsiz koreiform, miyoklonik ve distonik hareketlerin başlamasıyla karakterize karmaşık bir nörolojik hastalıktır. Hastalığın belirtileri ve şiddeti değişkendir; Bu bozukluk aynı zamanda yürüme ve konuşma güçlüğü ile sonuçlanan epizodik zayıflık ve spastisiteyi de içerebilir (143–146). Olgumuzda bilişsel gerilik, hipotoni, konuşmada zorlanma belirtileri mevcut. Ayrıca de novo mutasyonlar ve mozaizm gibi değişken moleküler bulgular da vardır; bunlar da ekspressiviteyi etkileyebilir (146).

Olgu 23: *FUCA1* geninde c.768+1G>A varyantı homozigot gözlenmiştir. Gen, OMIM veri tabanında otozomal resesif kalıtılan *Fucosidosis* (MIM#230000) ile ilişkilendirilmiştir. Fukosidoz, dokularda fukoz birikimi ile giden bir lizozomal depo hastalığıdır. Klinik özellikler arasında anjiyokeratom, ilerleyici nörogelişimsel gerilik, kaba yüz özellikleri ve dizostozis multipleks yer alır. Fukosidoz 2 ana tipe ayrılmıştır. Tip 1, yaklaşık 6 aylıkken başlayan hızlı nöromotor gerileme, terde sodyum klorürün yükselmesi

ve yaşamın ilk on yılında ölümle karakterizedir. Tip 2, daha hafif gelişim geriliği ve nörolojik bulgular, anjiyokeratoma korporis diffusum gelişimi ve daha uzun hayatta kalma ile karakterizedir(147) . Olgumuz 1. derece kuzen evliliğinden doğan, boy kısalığı, gelişim geriliği ve entelektüel yetersizlik bulgularıyla tarafımıza refere edildi ve tanıyla uyumlu bulundu.

Olgu 24: Tüm ekzom panelinde *CDH2* geninde c.2065C>T p.(Pro689Ser) varyantı homozigot gözlenmiştir. Korpus kallozum agenezisi, kardiyak, oküler ve genital sendrom (*Agnesis of corpus callosum, cardiac, ocular, and genital syndrome -ACOGS*) MIM# 618929, genel gelişimsel gecikme ve/veya zihinsel yetersizlik, korpus kallozum agenezisi veya hipoplazisi, kraniyofasiyal dismorfizmler ve oküler, kardiyak ve genital anomalilerle karakterize sendromik bir nörogelişimsel bozukluktur(148) . Olgumuzda beyin MRG’de her iki serebral hemisferlerde hipoplazi, global gelişim geriliği, yürüme ve konuşmanın olmaması bulguları mevcut. Sendrom değişken fenotiple gidebilir ve bütün bulguları içermeyen olgular literatürde bildirilmiştir (148,149).

Olgu 25: Tüm ekzom dizileme panelinde *SLC1A2* geninde c.2T>C p.(Met1?) heterozigot varyantı saptandı. Gelişimsel ve epileptik ensefalopati-41 (*Developmental and epileptic encephalopathy-41 - DEE41*) (MIM#617105), etkilenen bebeklerde hipotoni, spastisite, konuşma eksikliği, beslenme güçlükleri, gelişim geriliği ve mikrosefali görülür. Beyin görüntülemelerde gecikmiş miyelinizasyon, ince korpus kallozum ve serebral atrofi görülebilir (150). Olgumuzda beyin MRG’de corpus callosumda inceltme, yürüyememe, konuşmama, global gelişim geriliği literatürde bildirilen olgularla örtüşüyor (150).

Konjenital anomalileri olan hasta altgrubundan 32 hastadan 6’sı (%18.7) tanı almıştır.

Olgu 26: Klinik ekzom panelinde *SOS1* geninde c.2183A>C p.(Lys728Thr) heterozigot varyantı saptandı. Son of Sevenless Homologue 1 (*SOS1*), Noonan sendromu (MIM#610733) için *PTPN11*’den sonra ikinci dominant gendir ve bu genin mutasyonu, keratoz pilaris ve kıvrıkcık saç ile ayırt edici bir fenotipe neden olur. Çalışmalar, *SOS1* germ hattı mutasyonuna sahip NS hastalarında tümör geliştiğini göstermiştir. NS’li bireylerde sendromik olmayan pulmoner stenoz, atriyal septal defektler ve ventriküler septal defektler gibi kardiyak anomaliler görülür. *SOS1*, RAS sinyal yolağını düzenleyerek insan gelişiminde değişikliklere yol açan ve ayrıca RAS ve RAC1 yollarını değiştiren bir guanin nükleotid değişim faktörüdür. (151) Hastamızda hidronefroz, ASD ve dismorfik yüz bulguları- bilateral epikantus, burun kökü basık, düşük kulaklar, uzun çene, humerusta

rizomelik kısalık, dar toraks, pectus carinatum, el ve ayak üstünde artmış cilt kıvrımları mevcuttu.

Olgu 27: PTPN11 geninde c.794G>T p.(Arg265Leu) heterozigot varyantı saptanmıştır. Noonan sendromu (MIM#163950) iyi tanımlanmış bir sendromdur, ilk kez 1883'te Kobylinski ve ardından 1963'te Dr. Noonan ve Ehmke tarafından bildirilen dismorfik sendrom olup belirgin yüz hatları, konjenital kalp kusurları, kısa boy gibi özelliklerin birleşimiyle ayırt edilir, çeşitli gelişimsel anormallikler, iskelet bozuklukları, gelişimsel gecikme, kriptorşidizm ve kanama diyatezi gibi bulgular eşlik eder. Bu yaygın görülme sıklığına sahip kardiyo-fasiyal malformasyonun insidansı 1000-2500'de 1 canlı doğuma denk gelmektedir (152). Varyant klinik ekzom panelinde saptanmış olup tarafımıza spina bifida, hidrosefali ve unilateral böbrek öntanılarıyla başvuran hastanın takibi devam etmektedir.

Olgu 28: PEX5 geninde c.151del p.(Ser51Valfs*21) ve c.159del p.(Glu54Argfs*18) varyantları homozigot saptanmıştır. Yenidoğan adrenolökodistrofinin (Neonatal Adrenoleucodystrophy- NALD) ve İnfantil Refsum hastalığının (Infantile Refsum Disease-IRD) örtüşen fenotipleri, peroksizom biyogenez bozukluklarından olan Zellweger sendromu spektrumunun (ZSS) daha hafif belirtilerini temsil eder. NALD ve IRD sunumu olan hastaların klinik seyri değişkendir ve gelişimsel gecikme, hipotoni, karaciğer fonksiyon bozukluğu, sensörinöral işitme kaybı, retinal distrofi ve görme bozukluğunu içerebilir (153). Hastada yarık damak-dudak, brakisefali, kontraktürel araknodaktili, dar toraks, pes planus mevcut, takip amaçlı çocuk metabolizma bölümüne yönlendirildi.

Olgu 29: Klinik ekzom panelinde MBOAT7 geninde c.907del p.(Glu303Argfs*12) varyantı homozigot saptanmıştır. Varyant OMIM veri tabanında otozomal resesif kalıtılan *Mental retardation, autosomal recessive 57* (MIM#617188) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Johansen ve ark. (2016), Orta Doğu kökenli akraba olmayan 6 aileden 16 hasta bildirmiştir. Hastalarda zayıf veya eksik konuşma ile birlikte psikomotor gelişimde gecikme vardı. 13'ü 2 ila 7 yaşları arasında yürümeye başladı, 3'ü ise hiç yürümeyi başaramadı. 6'sı infantil başlangıçlı fokal, multifokal veya miyoklonik epilepsili, 2'si 1,5 veya 2 yaşında nöbet başlangıcı ve 2'si ateşli nöbet olmak üzere 10 hastada nöbet gelişti. Nöbetler genellikle iyi kontrol edildi ve çoğu hastada çocukluk çağında daha sonra geriledi. Ek özellikler arasında trunkal hipotoni ve apendiküler hipertoni vardı. Üç hastanın baş çevresi küçüktü ve 2 hastanın beyin görüntülemesinde kortikal atrofi ve hafif polimikrogiri görüldü, ancak diğer en az 4 hastada beyin görüntüleme normaldi. Yedi hastada otizm spektrum bozukluğu

vardı (154) . Olgumuzda mikrosefali, bilateral hidronefroz, nöbet öyküsü vardı, FM’de frontal bossing, yüksek damak, hipotoni görüldü.

Olgu 30: Tüm ekzom panelinde *MCPH1* geni c.215C>T p.(Ser72Leu) varyantı saptanmıştır. Primer mikrosefali, ilerleyici bir nörodejeneratif durumu ifade eden sekonder mikrosefaliden ayrılan statik bir gelişimsel anomalidir. Mikrosefali, fetal beyin büyümesinde görülen bir bozukluktur; Mikrosefali olan bireylerin beyinleri küçüktür ve neredeyse her zaman zeka geriliği vardır, ancak nadir olarak hafif mikrosefali (-3 SD) ve normal zekaya sahip bireyler de rapor edilmiştir. Ek klinik özellikler arasında boy kısalığı veya hafif nöbetler bulunabilir (155) . Hastada mikrosefali, sağ elde polidaktili, ambigü genitalya, yarık damak, beyin BT’de monoventrikül görünümü, holoprosensefali saptanmıştır. OMIM veri tabanında *Microcephaly 1,primary, autosomal recessive* (MIM#251200) fenotipi ile ilişkili bulunmuştur.

Olgu 31: Cerebral palsy, konjenital unilateral renal agenezi, kronik böbrek yetmezliği, hipokalsemi şikâyetleri ile başvuran hastaya yapılan tüm ekzom dizileme panelinde *CFHR5* geninde c.1511_1513delinsAA p.(Leu504Glnfs*11) varyantı muhtemel patojenik olarak saptanmıştır. C3 glomerülopati-3 (C3G3), yaşamın ilk 30 yılında mikroskopik veya makroskopik hematürinin başlaması ve ardından böbrek hastalığının değişken ilerlemesi ile karakterize otozomal dominant bir böbrek hastalığıdır. 30 yaşından sonra hastaların yaklaşık yarısı normal böbrek fonksiyonunu korurken epizodik hematüri yaşamaya devam ederken, diğer yarısında proteinüri ve ilerleyici böbrek yetmezliği veya son dönem böbrek hastalığı gelişir. Erkekler kadınlara göre daha ciddi bir fenotipe sahip olma eğilimindedir ve genellikle diyaliz veya böbrek nakli gerektiren son dönem böbrek hastalığı geliştirme olasılıkları daha yüksektir (156).

İzole otizm spektrum bozuklukları altgrubunda 17 hastadan 3’ü (%17.6) tanı almıştır.

Olgu 32: Yapılan tüm ekzom analizinde *KMT2E* geninde c.1623+1G>A varyantı saptanmıştır. *O'Donnell-Luria-Rodan sendromu* (ODLURO) (MIM#618512), genel gelişim geriliği, konuşma gecikmesi, değişken şiddette entelektüel gelişim ve hafif dismorfik özellikler ile karakterize edilen nörogelişimsel bir hastalıktır. Bazı hastalarda otizm, nöbet, hipotoni ve/veya beslenme güçlüğü olabilir (157). İzole otizm öntanısı ile başvuran hastanın FM’de sinofris, tübüler burun, düşük saç çizgisi mevcuttu tanıyla uyumlu bulundu.

Olgu 33: Klinik ekzom panelinde *SCN2A* geninde c.4903C>T p.(Arg1635*) nonsense varyantı heterozigot gözlenmiştir. *Gelişimsel ve epileptik ensefalopati-11* (DEE11) (MIM#613721), yaşamın ilk günleri, haftaları veya aylarında nöbetlerin başlamasıyla karakterize nörolojik bir hastalıktır. Bazı hastalarda hastalığın başlangıcı daha geç olabilir. Hastaların yaklaşık yarısı çocukluk çağında nöbetsiz hale gelir. Etkilenen bireylerde genel gelişimsel gecikme vardır ve genellikle entelektüel gelişim ciddi şekilde bozulmuştur, ancak bazıları daha az ciddi şekilde etkilenebilir ve otizm spektrum bozukluğu gösterebilir. Ek ortak özellikler arasında mikrosefali, hipotoni ve distoni, diskinezi ve koreoatetotik hareketler gibi anormal hareketler bulunur. Aynı mutasyona sahip hastalarda bile fenotip oldukça değişkendir (158–160). Olgumuz tarafımıza 2 yaşında atipik otizm ötanısı ile başvurmuştur.

Olgu 34: Yapılan klinik ekzom panelinde *NLGN4X* geninde c.444C>A p.(Tyr148*) varyantı patojenik saptanmıştır. Prototipik yaygın gelişimsel bozukluk olan otizm, genellikle 3 yaş civarında belirgindir. Sınırlı veya yok derecesinde sözlü iletişim, karşılıklı sosyal etkileşim veya yanıt verme eksikliği ve sınırlı, basmakalıp ve ritüelleştirilmiş ilgi ve davranış kalıpları üçlüsü ile karakterize edilir (161,162). Otizm ötanısı ile başvuran hasta *Autism susceptibility, X-linked 2* (MIM#300495) fenotipi ile uyumlu bulundu.

Epilepsisi olan global gelişim geriliği altgrubunda 15 hastadan 2'si tanı aldı.

Olgu 35: Tüm ekzom dizileme yapılan hastada *CACNA1C* geninde c.492T>G p.(Tyr164*) varyantı patojenik saptanmıştır. Hipotoni, dil gecikmesi ve nöbetlerle birlikte veya nöbetsiz iskelet defektlerinin eşlik ettiği nörogelişimsel bozukluk, bebeklikten itibaren belirgin olan genel gelişim geriliği ile karakterizedir. Etkilenen bireylerde, gecikmiş yürüme veya yürüyememe, zayıf veya eksik konuşma ve davranışsal anormalliklerle birlikte zihinsel gelişimde bozulma ile birlikte şiddetli hipotoni görülür. Çoğu hastada erken başlangıçlı nöbetler, genellikle distalde hafif iskelet defektleri ve spesifik olmayan dismorfik özellikler bulunur. Daha ciddi şekilde etkilenen bireylerde ek konjenital anormallikler vardır; ancak kalp tutulumu nadirdir (163) . *Neurodevelopmental disorder with hypotonia, language delay, and skeletal defects with or without seizures* (MIM#620029) fenotipi ile ilişkili bulunmuştur.

Olgu 36: Tüm ekzom dizileme panelinde *HIBCH* geninde c.488G>T p.(Cys163Phe) varyantı homozigot saptanmıştır. *3-hydroxyisobutryl-CoA hydrolase deficiency* (MIM#250620) *3-hidroksiizobütiril-CoA hidrolaz eksikliği*, kromozom 2q32

zerindeki *HIBCH* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot mutasyondan kaynaklanır. Ciddi derecede gecikmiş psikomotor gelişim, nörodejenerasyon, laktik asit artışı ve bazal ganglionlarda beyin lezyonları ile karakterize, otozomal resesif, doğuştan bir metabolizmal hastalıktır (164). Hipotoni, epilepsi, global gelişim geriliği şikayetleri olan ve 1. Derece kuzen evliliğinden doğan hastanın aile öyküsünde aynı şikayetlerle ex olan iki kuzeni mevcut. Aileye ilgili gen açısından tarama önerildi.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yaptığımız retrospektif araştırma sonucunda, moleküler karyotipleme analizi sonucu tanı alan hasta yüzdemiz 6 olurken yeni nesil dizileme ile bu sonuç %19 olmuştur.
- ACMG'ye göre patojenik ve muhtemel patojenik olarak sınıflandırılan ve hastaların fenotipleri ile uyumluluk gösteren varyantlar ele alınmıştır.
- Fenotiple ilişkili VUS varyantlar moleküler karyotipleme sonucu %27.3, yeni nesil dizileme sonucunda %39 olmuştur. VUS varyantlar açısından hastalarda aile segregasyon çalışmaları devam etmektedir.
- Yeni nesil dizileme panelleri çalışılırken hastanemizin dahil olduğu ihale kapsamında 82 hastaya klinik ekzom dizileme, 59 hastaya tüm ekzom dizileme paneli çalışılmıştır. Tüm ekzom dizileme panelinde 21589 gen dizilendiğini göz önüne alırsak bütün hastalara tüm ekzom dizileme çalışıldığında düşüncemiz tanı yüzdesinin artacağı yönündedir.
- Sebebi açıklanamayan mental retardasyon, otizm spektrum bozuklukları, dikkat eksikliği hiperaktivite bozuklukları, öğrenme güçlüğü gibi nörogelişimsel gerilikleri ve konjenital anomalileri olan hastalarda moleküler karyotipleme testi yapıldıktan sonra sonuç elde edilemezse, yeni nesil dizileme ile devam edilmesi gerektiği görülmektedir.
- Bizim araştırmamızda konjenital anomaliler grubunda moleküler karyotipleme sonuç vermezken bu hastalarda test algoritması kromozom analizi ve yeni nesil dizileme olarak başlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Thapar A, Cooper M, Rutter M. Neurodevelopmental disorders. *Lancet Psychiatry* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2024 Mar 4];4(4): 339–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979720/>
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 2013 May 22;
3. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2024 Mar 4];3(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30002876/>
4. Martinez-Granero F, Blanco-Kelly F, Sanchez-Jimeno C, Avila-Fernandez A, Arteché A, Bustamante-Aragones A, et al. Comparison of the diagnostic yield of aCGH and genome-wide sequencing across different neurodevelopmental disorders. *NPJ Genom Med*. 2021 Dec 1;6(1).
5. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2010 Sep 22 [cited 2024 Mar 4];11: 161–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20822471/>
6. Vorstman JAS, Parr JR, Moreno-De-Luca D, Anney RJL, Nurnberger JI, Hallmayer JF. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Mar 4];18(6): 362–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28260791/>
7. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2024 Mar 4];21(11): 2413–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31182824/>
8. Coulter ME, Miller DT, Harris DJ, Hawley P, Picker J, Roberts AE, et al. Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genet Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2024 Mar 4];13(9): 770–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21716121/>
9. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2013 Nov;17(6): 589–99.
10. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. Vol. 13, *Drug Discovery Today*. 2008. p. 760–70.
11. Schaefer GB, Mendelsohn NJ. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med* [Internet]. 2013 [cited 2024 Mar 7];15(5): 399–407. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23519317/>
12. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* [Internet]. 2010 Nov [cited 2024 Mar 7];12(11): 742–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962661/>
13. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2010 May 14 [cited 2024 Mar 7];86(5): 749–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20466091/>
14. Lee JS, Hwang H, Kim SY, Kim KJ, Choi JS, Woo MJ, et al. Chromosomal Microarray With Clinical Diagnostic Utility in Children With Developmental Delay or Intellectual Disability. *Ann Lab Med* [Internet]. 2018 [cited 2024 Mar 7];38(5): 473–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29797819/>

15. Jang W, Kim Y, Han E, Park J, Chae H, Kwon A, et al. Chromosomal Microarray Analysis as a First-Tier Clinical Diagnostic Test in Patients With Developmental Delay/Intellectual Disability, Autism Spectrum Disorders, and Multiple Congenital Anomalies: A Prospective Multicenter Study in Korea. *Ann Lab Med* [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 7];39(3): 299–310. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30623622/>
16. Fan Y, Wu Y, Wang L, Wang Y, Gong Z, Qiu W, et al. Chromosomal microarray analysis in developmental delay and intellectual disability with comorbid conditions. *BMC Med Genomics*. 2018 May 24;11(1).
17. McGrew, peters. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis in an autism primary care practice: which guidelines to implement?
18. Schaefer GB, Starr L, Pickering D, Skar G, Dehaai K, Sanger WG. Array comparative genomic hybridization findings in a cohort referred for an autism evaluation. *J Child Neurol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2024 Mar 7];25(12): 1498–503. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729506/>
19. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2024 Mar 7];18(7): 696–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26633542/>
20. Tammimies K, Marshall CR, Walker S, Kaur G, Thiruvahindrapuram B, Lionel AC, et al. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2024 Mar 7];314(9): 595–903. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26325558/>
21. Roesser J. Diagnostic yield of genetic testing in children diagnosed with autism spectrum disorders at a regional referral center. *Clin Pediatr (Phila)* [Internet]. 2011 Sep [cited 2024 Mar 7];50(9): 834–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21525079/>
22. Eriksson MA, Liedén A, Westerlund J, Bremer A, Wincent J, Sahlin E, et al. Rare copy number variants are common in young children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatr* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2024 Mar 7];104(6): 610–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25661985/>
23. Lubala TK, Lumaka A, Kanteng G, Mutesa L, Mukuku O, Wembonyama S, et al. Fragile X checklists: A meta-analysis and development of a simplified universal clinical checklist. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2024 Mar 7];6(4): 526. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30623622/>
24. Vissers LELM, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Mar 7];17(1): 9–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26503795/>
25. Lakshmi D, Girisha M. Genomic Testing for Diagnosis of Genetic Disorders in Children: Chromosomal Microarray and Next-Generation Sequencing I I O N O N O N O N A A A A L L L L L L D D D D I I I I I G G G G N N N N N O O O. Vol. 549, INDIAN PEDIATRICS. 2020.
26. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances - Solinas-Toldo - 1997 - Genes, Chromosomes and Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291098-2264%28199712%2920%3A4%3C399%3A%3AAID-GCC12%3E3.0.CO%3B2-I>
27. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* [Internet]. 1998 [cited 2024 Mar 8];20(2): 207–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9771718/>
28. Cheung SW, Shaw CA, Yu W, Li J, Ou Z, Patel A, et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med* [Internet]. 2005 Jul [cited 2024 Mar 8];7(6): 422–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024975/>
29. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* [Internet]. 2006 [cited 2024 Mar 8];149(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16860135/>
30. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2009 Sep [cited 2024 Mar 8];10: 451–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19715442/>

31. Wright D, Boije H, Meadows JRS, Bed'hom B, Gourichon D, Vieaud A, et al. Copy Number Variation in Intron 1 of SOX5 Causes the Pea-comb Phenotype in Chickens. *PLoS Genet* [Internet]. 2009 Jun [cited 2024 Mar 8];5(6): 1000512. Available from: [/pmc/articles/PMC2685452/](https://pmc/articles/PMC2685452/)
32. Henkel J, Saif R, Jagannathan V, Schmocker C, Zeindler F, Bangerter E, et al. Selection signatures in goats reveal copy number variants underlying breed-defining coat color phenotypes. *PLoS Genet* [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 8];15(12): e1008536. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1008536>
33. Elder PJD, Ramsden DB, Burnett D, Weickert MO, Barber TM. Human amylase gene copy number variation as a determinant of metabolic state. *Expert Rev Endocrinol Metab* [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2024 Mar 8];13(4): 193–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30063422/>
34. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* [Internet]. 2005 Mar 4 [cited 2024 Mar 8];307(5714): 1434–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15637236/>
35. Hartevelde CL, Higgs DR. α -thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2010 May 28 [cited 2024 Mar 8];5(1): 1–21. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-5-13>
36. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2024 Mar 8];57(Suppl 1): 1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29748817/>
37. Poole AC, Goodrich JK, Youngblut ND, Luque GG, Ruaud A, Sutter JL, et al. Human Salivary Amylase Gene Copy Number Impacts Oral and Gut Microbiomes. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2019 Apr 10 [cited 2024 Mar 8];25(4): 553–564.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30974084/>
38. Greenblum S, Carr R, Borenstein E. Extensive strain-level copy-number variation across human gut microbiome species. *Cell* [Internet]. 2015 Feb 12 [cited 2024 Mar 8];160(4): 583–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25640238/>
39. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2024 Mar 8];14(10): 417–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9820031/>
40. Pös O, Radvanszky J, Buglyó G, Pös Z, Rusnakova D, Nagy B, et al. DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. Vol. 44, *Biomedical Journal*. Elsevier B.V.; 2021. p. 548–59.
41. LEJEUNE J, LAFOURCADE J, BERGER R, TURPIN R. S'EGR'EGATION FAMILIALE D'UNE TRANSLOCATION 5-13 D'ETERMINANT UNE MONOSOMIE ET UNE TRISOMIE PARTIELLES DU BRAS COURT DU CHROMOSOME 5: MALADIE DU "CRI DU CHAT" ET SA "R'ECEPROQUE". *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1964 Jun 8;258: 5767–70.
42. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* [Internet]. 2004 Sep [cited 2024 Mar 8];36(9): 949–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15286789/>
43. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* [Internet]. 2004 Jul 23 [cited 2024 Mar 8];305(5683): 525–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15273396/>
44. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2015 Mar 26 [cited 2024 Mar 8];16(3): 172–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25645873/>
45. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* [Internet]. 2006 Nov 23 [cited 2024 Mar 8];444(7118): 444–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17122850/>
46. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2006 Feb [cited 2024 Mar 8];7(2): 85–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16418744/>
47. Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2011 May [cited 2024 Mar 8];12(5): 363–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21358748/>

48. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RKC, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2024 Mar 8];42(Database issue): D986. Available from: [/pmc/articles/PMC3965079/](https://pmc/articles/PMC3965079/)
49. Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* [Internet]. 2010 Feb 18 [cited 2024 Mar 8];61: 437–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20059347/>
50. Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2011 [cited 2024 Mar 8];45: 203–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21854229/>
51. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* [Internet]. 2007 [cited 2024 Mar 8];39(7 Suppl): S48–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17597782/>
52. Gijsbers ACJ, Schoumans J, Ruivenkamp CAL. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2011 Dec [cited 2024 Mar 8];135(3–4): 222–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22086107/>
53. de Godoy VCSM, Bellucco FT, Colovati M, de Oliveira-Junior HR, Moysés-Oliveira M, Melaragno MI. Copy number variation (CNV) identification, interpretation, and database from Brazilian patients. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2020 [cited 2024 Mar 8];43(4): 1–7. Available from: [/pmc/articles/PMC7783508/](https://pmc/articles/PMC7783508/)
54. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015 17: 5 [Internet]. 2015 Mar 5 [cited 2024 Mar 8];17(5): 405–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/gim201530>
55. Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, et al. Clinical Implementation of Chromosomal Microarray Analysis: Summary of 2513 Postnatal Cases. *PLoS One* [Internet]. 2007 Mar 28 [cited 2024 Mar 8];2(3): 327. Available from: [/pmc/articles/PMC1828620/](https://pmc/articles/PMC1828620/)
56. Veltman JA, de Vries BBA, Bejjani BA, Shaffer LG. Diagnostic Genome Profiling : Unbiased Whole Genome or Targeted Analysis? *J Mol Diagn* [Internet]. 2006 [cited 2024 Mar 8];8(5): 534. Available from: [/pmc/articles/PMC1876178/](https://pmc/articles/PMC1876178/)
57. Shaikh TH. Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med* [Internet]. 2007 Sep [cited 2024 Mar 8];9(9): 617–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17873650/>
58. Ou Z, Kang SHL, Shaw CA, Carmack CE, White LD, Patel A, et al. Bacterial artificial chromosome-emulation oligonucleotide arrays for targeted clinical array-comparative genomic hybridization analyses. *Genet Med* [Internet]. 2008 Apr [cited 2024 Mar 8];10(4): 278. Available from: [/pmc/articles/PMC2782565/](https://pmc/articles/PMC2782565/)
59. Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* [Internet]. 2007 [cited 2024 Mar 8];39(7 Suppl): S16–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17597776/>
60. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2006 Dec 15 [cited 2024 Mar 8];140(24): 2757–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17103431/>
61. Cheung SW, Shaw CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2024 Mar 8];143A(15): 1679–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17607705/>
62. Shinawi M, Shao L, Jeng LJB, Shaw CA, Patel A, Bacino C, et al. Low-level mosaicism of trisomy 14: phenotypic and molecular characterization. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2024 Mar 8];146A(11): 1395–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18412278/>
63. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953 171: 4356 [Internet]. 1953 Apr 25 [cited 2024 Mar 8];171(4356): 737–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/171737a0>

64. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 [cited 2024 Mar 8];74(12): 5463–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/271968/>
65. The Cost of Sequencing a Human Genome [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
66. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2024 Mar 8];5(10): 2113–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17803354/>
67. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021 Nov 1;82(11): 801–11.
68. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* [Internet]. 2013 Jun [cited 2024 Mar 8];6: 287–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23560931/>
69. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2009 Aug 14 [cited 2024 Mar 8];85(2): 142–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19679224/>
70. Next-Generation Sequencing for Beginners | NGS basics for researchers [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html>
71. Head SR, Kiyomi Komori H, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques* [Internet]. 2014 Feb [cited 2024 Mar 8];56(2): 61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440557/>
72. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2024 Mar 8];10(1): 57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19845894/>
73. Lightbody G, Haberland V, Browne F, Taggart L, Zheng H, Parkes E, et al. Review of applications of high-throughput sequencing in personalized medicine: barriers and facilitators of future progress in research and clinical application. *Brief Bioinform* [Internet]. 2019 Sep 27 [cited 2024 Mar 8];20(5): 1795–811. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30084865/>
74. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* [Internet]. 2012 Jul [cited 2024 Mar 8];5(7): 887–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22617168/>
75. Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Mar 10 [cited 2024 Mar 8];322(1): 12–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440557/>
76. Bentley G, Higuchi R, Hoglund B, Goodridge D, Sayer D, Trachtenberg EA, et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens* [Internet]. 2009 Nov [cited 2024 Mar 8];74(5): 393–403. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19845894/>
77. Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, Heron S, Rogers M, Slavich L, et al. Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Hum Immunol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2024 Mar 8];71(10): 1033–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20603174/>
78. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. *Clin Biochem Rev* [Internet]. 2011 [cited 2024 Mar 8];32(4): 177. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20603174/>
79. Liang WS, Stephenson K, Adkins J, Christofferson A, Helland A, Cuyugan L, et al. Whole Exome Library Construction for Next Generation Sequencing. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2018 [cited 2024 Mar 8];1706: 163–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29423798/>
80. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* [Internet]. 2010 Feb [cited 2024 Mar 8];7(2): 111–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20111037/>
81. Dapprich J, Ferriola D, Mackiewicz K, Clark PM, Rappaport E, D’Arcy M, et al. The next generation of target capture technologies - large DNA fragment enrichment and sequencing determines regional genomic variation of high complexity. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 [cited 2024 Mar 8];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27393338/>

82. Gupta T, Marlow FL, Ferriola D, Mackiewicz K, Dapprich J, Monos D, et al. Microtubule actin crosslinking factor 1 regulates the Balbiani body and animal-vegetal polarity of the zebrafish oocyte. *PLoS Genet* [Internet]. 2010 Aug [cited 2024 Mar 8];6(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20808893/>
83. Pinney SE, Ganapathy K, Bradfield J, Stokes D, Sasson A, Mackiewicz K, et al. Dominant Form of Congenital Hyperinsulinism Maps to HK1 Region on 10q. *Horm Res Paediatr* [Internet]. 2013 Aug [cited 2024 Mar 8];80(1): 18–27. Available from: [/pmc/articles/PMC3876732/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984855/)
84. Sarda S, Hannenhalli S. Next-Generation Sequencing and Epigenomics Research: A Hammer in Search of Nails. *Genomics Inform* [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 8];12(1): 2. Available from: [/pmc/articles/PMC3990762/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984855/)
85. Meaburn E, Schulz R. Next generation sequencing in epigenetics: insights and challenges. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2012 [cited 2024 Mar 8];23(2): 192–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22027613/>
86. Podnar J, Deiderick H, Hunicke-Smith S. Next-generation sequencing fragment library construction. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 8];107: 7.17.1-7.17.16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984855/>
87. Gandhi MJ, Ferriola D, Huang Y, Duke JL, Monos D. Targeted Next-Generation Sequencing for Human Leukocyte Antigen Typing in a Clinical Laboratory: Metrics of Relevance and Considerations for Its Successful Implementation. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Mar 8];141(6): 806–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28234015/>
88. Podnar J, Deiderick H, Huerta G, Hunicke-Smith S. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 8];106(SUPL.106). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733242/>
89. Love MI, Anders S, Kim V, Huber W. RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Res* [Internet]. 2015 Oct 14 [cited 2024 Mar 8];4: 1070. Available from: [/pmc/articles/PMC4670015/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733242/)
90. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2024 Mar 8];24(1): 22–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23020966/>
91. Illumina. Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Reference Guide. 2021 [cited 2024 Mar 8]; Available from: www.illumina.com/company/legal.html.
92. Illumina. TruSeq Stranded mRNA Reference Guide (1000000040498). 2017;
93. EL van D, H A, Y J, C T. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2024 Mar 8];30(9): 418–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25108476/>
94. Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2016 [cited 2024 Mar 8];17: 95–115. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27362342/>
95. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2024 Mar 8];17(6): 333–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27184599/>
96. Ion GeneStudio System | Thermo Fisher Scientific - TR [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/instruments/ion-genestudio-system.html>
97. Merriman B, Torrent I, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* [Internet]. 2012 [cited 2024 Mar 8];33(23): 3397–417. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23208921/>
98. Ion Torrent NGS Instruments | Thermo Fisher Scientific - TR [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence.html>
99. NGS Workflow Steps | Illumina sequencing workflow [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>

100. Duke JL, Lind C, Mackiewicz K, Ferriola D, Papazoglou A, Gasiewski A, et al. Determining performance characteristics of an NGS-based HLA typing method for clinical applications. *HLA* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Mar 8];87(3): 141–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26880737/>
101. iSeq 100 System | Our most affordable benchtop sequencer [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/iseq.html>
102. IVD Instruments | NGS platforms for diagnostic use [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://emea.illumina.com/systems/ivd-instruments.html>
103. Sequencing Technology | Sequencing by synthesis [Internet]. [cited 2024 Mar 8]. Available from: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>
104. Bahassi EM, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis* [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 8];29(5): 303. Available from: [/pmc/articles/PMC7318892/](https://pmc/articles/PMC7318892/)
105. van Dijk EL, Jaszczyzyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Mar 8];34(9): 666–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29941292/>
106. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2024 Mar 8];21(10): 597–614. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32504078/>
107. Jamuar SS, Hekhar, Tan EC. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Hum Genomics* [Internet]. 2015 [cited 2024 Mar 8];9(1): 10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26076878/>
108. Fisher KE, Zhang L, Wang J, Smith GH, Newman S, Schneider TM, et al. Clinical Validation and Implementation of a Targeted Next-Generation Sequencing Assay to Detect Somatic Variants in Non-Small Cell Lung, Melanoma, and Gastrointestinal Malignancies. *J Mol Diagn* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Mar 8];18(2): 299–315. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26801070/>
109. Wagle N, Berger MF, Davis MJ, Blumenstiel B, De Felice M, Pochanard P, et al. High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* [Internet]. 2012 Jan [cited 2024 Mar 8];2(1): 82–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22585170/>
110. Illing PT, Purcell AW, McCluskey J. The role of HLA genes in pharmacogenomics: unravelling HLA associated adverse drug reactions. *Immunogenetics* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2024 Mar 8];69(8–9): 617–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28695285/>
111. Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zhernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol* [Internet]. 2017 Apr 27 [cited 2024 Mar 8];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28449694/>
112. Vogiatzi P. Some considerations on the current debate about typing resolution in solid organ transplantation. *Transplant Res* [Internet]. 2016 [cited 2024 Mar 8];5(1). Available from: [/pmc/articles/PMC4782307/](https://pmc/articles/PMC4782307/)
113. Maxwell KN, Hart SN, Vijai J, Schrader KA, Slavin TP, Thomas T, et al. Evaluation of ACMG-Guideline-Based Variant Classification of Cancer Susceptibility and Non-Cancer-Associated Genes in Families Affected by Breast Cancer. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2024 Apr 11];98(5): 801–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27153395/>
114. Ha K, Shen Y, Graves T, Kim CH, Kim HG. The presence of two rare genomic syndromes, 1q21 deletion and Xq28 duplication, segregating independently in a family with intellectual disability. *Mol Cytogenet*. 2016 Sep 29;9(1).
115. Pang H, Yu X, Kim YM, Wang X, Jenkins JK, Yin J, et al. Disorders Associated With Diverse, Recurrent Deletions and Duplications at 1q21.1. *Front Genet*. 2020 Jun 23;11.
116. Sebastian R, Jin K, Pavon N, Bansal R, Potter A, Song Y, et al. Schizophrenia-associated NRXN1 deletions induce developmental-timing- and cell-type-specific vulnerabilities in human brain organoids. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).

117. Striano P, Malacarne M, Cavani S, Pierluigi M, Rinaldi R, Cavaliere ML, et al. Clinical phenotype and molecular characterization of 6q terminal deletion syndrome: Five new cases. *Am J Med Genet A*. 2006 Sep 15;140(18): 1944–9.
118. Horn D, Tönnies H, Neitzel H, Wahl D, Hinkel GK, Von Moers A, et al. Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36.3. *Am J Med Genet*. 2004 Jul 1;128 A(1): 85–92.
119. Mattina T, Perrotta CS, Grossfeld P. Jacobsen syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4(1).
120. Jacobsen P, Hauge M, Henningsen K, Hobolt N, Mikkelsen M, Philip J. An (11;21) translocation in four generations with chromosome 11 abnormalities in the offspring. A clinical, cytogenetical, and gene marker study. *Hum Hered* [Internet]. 1973 [cited 2024 Mar 10];23(6): 568–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4134631/>
121. Grossfeld PD, Mattina T, Lai Z, Favier R, Jones KL, Cotter F, et al. The 11q terminal deletion disorder: A prospective study of 110 cases. *Am J Med Genet*. 2004 Aug 15;129 A(1): 51–61.
122. Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, et al. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet*. 2009 Apr;46(4): 242–8.
123. Chung WK, Roberts TP, Sherr EH, Snyder LAG, Spiro JE. 16p11.2 deletion syndrome. Vol. 68, *Current Opinion in Genetics and Development*. Elsevier Ltd; 2021. p. 49–56.
124. Ballout RA, El-Hattab AW. The int22h1/int22h2-Mediated Xq28 Duplication Syndrome: An Intersection between Neurodevelopment, Immunology, and Cancer. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/genes>
125. Alfieri P, Scibelli F, Sinibaldi L, Valeri G, Caciolo C, Novello RL, et al. Further insight into the neurobehavioral pattern of children carrying the 2p16.3 heterozygous deletion involving NRXN1: Report of five new cases. *Genes Brain Behav*. 2020 Sep 1;19(7).
126. Pascual P, Tenorio-Castano J, Mignot C, Afenjar A, Arias P, Gallego-Zazo N, et al. Snijders Blok-Campeau Syndrome: Description of 20 Additional Individuals with Variants in CHD3 and Literature Review. *Genes (Basel)* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2024 Mar 13];14(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37761804/>
127. Schütz PW, Stöckler S. Creatine Deficiency Disorders. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2022 Feb 10 [cited 2024 Mar 14];33–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3794/>
128. Mirzaa GM, Chong JX, Piton A, Popp B, Foss K, Guo H, et al. De novo and inherited variants in ZNF292 underlie a neurodevelopmental disorder with features of autism spectrum disorder. *Genet Med* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Mar 14];22(3): 538. Available from: <https://pmc/articles/PMC7060121/>
129. Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* [Internet]. 2001 [cited 2024 Mar 14];27(1): 117–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11138011/>
130. Springer S, Erlewein R, Naegele T, Becker I, Auer D, Grodd W, et al. Alexander disease--classification revisited and isolation of a neonatal form. *Neuropediatrics* [Internet]. 2000 Apr [cited 2024 Mar 14];31(2): 86–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10832583/>
131. Johnson AB. Alexander disease: A review and the gene. *International Journal of Developmental Neuroscience* [Internet]. 2002 [cited 2024 Mar 14];20(3–5): 391–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12175878/>
132. Heshmatzad K, Naderi N, Masoumi T, Pouraliakbar H, Kalayinia S. Identification of a novel de novo pathogenic variant in GFAP in an Iranian family with Alexander disease by whole-exome sequencing. *Eur J Med Res* [Internet]. 2022 Sep 10 [cited 2024 Mar 14];27(1): 174–174. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC9464415>
133. Connaughton DM, Dai R, Owen DJ, Marquez J, Mann N, Graham-Paquin AL, et al. Mutations of the Transcriptional Corepressor ZMYM2 Cause Syndromic Urinary Tract Malformations. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2024 Mar 14];107(4): 727–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32891193/>

134. Kim HG, Rosenfeld JA, Scott DA, Bénédicte G, Labonne JD, Brown J, et al. Disruption of PHF21A causes syndromic intellectual disability with craniofacial anomalies, epilepsy, hypotonia, and neurobehavioral problems including autism. *Mol Autism* [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2024 Mar 14];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31649809/>
135. Hamanaka K, Sugawara Y, Shimoji T, Nordtveit TI, Kato M, Nakashima M, et al. De novo truncating variants in PHF21A cause intellectual disability and craniofacial anomalies. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2024 Mar 14];27(3): 378–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30487643/>
136. Lupi A, Tenni R, Rossi A, Cetta G, Forlino A. Human prolidase and prolidase deficiency: an overview on the characterization of the enzyme involved in proline recycling and on the effects of its mutations. *Amino Acids* [Internet]. 2008 Nov [cited 2024 Mar 14];35(4): 739–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18340504/>
137. Li L, Ghorbani M, Weisz-Hubshman M, Rousseau J, Thiffault I, Schnur RE, et al. Lysine acetyltransferase 8 is involved in cerebral development and syndromic intellectual disability. *J Clin Invest* [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2024 Mar 14];130(3): 1431–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31794431/>
138. Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, et al. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet* [Internet]. 2012 Jul [cited 2024 Mar 14];44(7): 740–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22634753/>
139. Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Chen W, et al. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet* [Internet]. 2007 Mar [cited 2024 Mar 14];121(1): 43–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17120046/>
140. Drousiotou A, Dimeo I, Mineri R, Georgiou T, Stylianidou G, Tiranti V. Ethylmalonic encephalopathy: application of improved biochemical and molecular diagnostic approaches. *Clin Genet* [Internet]. 2011 Apr [cited 2024 Mar 14];79(4): 385–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20528888/>
141. Jones WD, Dafou D, McEntagart M, Woollard WJ, Elmslie F V., Holder-Espinasse M, et al. De novo mutations in MLL cause Wiedemann-Steiner syndrome. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2012 Aug 10 [cited 2024 Mar 14];91(2): 358–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22795537/>
142. Miyake N, Tsurusaki Y, Koshimizu E, Okamoto N, Kosho T, Brown NJ, et al. Delineation of clinical features in Wiedemann-Steiner syndrome caused by KMT2A mutations. *Clin Genet* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Mar 14];89(1): 115–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25810209/>
143. Chen YZ, Friedman JR, Chen DH, Chan GCK, Bloss CS, Hisama FM, et al. Gain-of-function ADCY5 mutations in familial dyskinesia with facial myokymia. *Ann Neurol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 14];75(4): 542–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24700542/>
144. Carapito R, Paul N, Untrau M, Le Gentil M, Ott L, Alsaleh G, et al. A de novo ADCY5 mutation causes early-onset autosomal dominant chorea and dystonia. *Mov Disord* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2024 Mar 14];30(3): 423–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25545163/>
145. Dean M, Messiaen L, Cooper GM, Amaral MD, Rashid S, Korf BR, et al. Child Neurology: Spastic paraparesis and dystonia with a novel ADCY5 mutation. *Neurology* [Internet]. 2019 Sep 10 [cited 2024 Mar 14];93(11): 510–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31501304/>
146. Vijiaratnam N, Bhatia KP, Lang AE, Raskind WH, Espay AJ. ADCY5-Related Dyskinesia: Improving Clinical Detection of an Evolving Disorder. *Mov Disord Clin Pract* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2024 Mar 14];6(7): 512–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31538084/>
147. Fucosidosis type 2 - PubMed [Internet]. [cited 2024 Mar 14]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/814528/>
148. Accogli A, Calabretta S, St-Onge J, Boudrahem-Addour N, Dionne-Laporte A, Joset P, et al. De Novo Pathogenic Variants in N-cadherin Cause a Syndromic Neurodevelopmental Disorder with Corpus Collosum, Axon, Cardiac, Ocular, and Genital Defects. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2019 Oct 3 [cited 2024 Mar 14];105(4): 854–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31585109/>

149. Uccella S, Accogli A, Tortora D, Mancardi MM, Nobili L, Berloco B, et al. Dissecting the neurological phenotype in children with callosal agenesis, interhemispheric cysts and malformations of cortical development. *J Neurol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Mar 14];266(5): 1167–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30796522/>
150. Myers CT, McMahon JM, Schneider AL, Petrovski S, Allen AS, Carvill GL, et al. De Novo Mutations in SLC1A2 and CACNA1A Are Important Causes of Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Aug 4 [cited 2024 Mar 14];99(2): 287–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27476654/>
151. Sigamani V, Rajasingh S, Gurusamy N, Panda A, Rajasingh J. In-Silico and In-Vitro Analysis of Human SOS1 Protein Causing Noonan Syndrome - A Novel Approach to Explore the Molecular Pathways. *Curr Genomics* [Internet]. 2021 Dec 12 [cited 2024 Apr 10];22(7): 526. Available from: </pmc/articles/PMC8905634/>
152. Chan D, Lo I, Lam A, Tong T, Chan D, Lam S. A Clinical and Molecular Study of 51 Chinese Families with Noonan Syndrome. *new series*. 2006;11: 290–6.
153. Waterham HR, Ebberink MS. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2012 Sep [cited 2024 Apr 10];1822(9): 1430–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871920/>
154. Johansen A, Rosti RO, Musaev D, Sticca E, Harripaul R, Zaki M, et al. Mutations in MBOAT7, Encoding Lysophosphatidylinositol Acyltransferase I, Lead to Intellectual Disability Accompanied by Epilepsy and Autistic Features. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Oct 6 [cited 2024 Apr 10];99(4): 912–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27616480/>
155. Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2005 [cited 2024 Apr 11];76(5): 717–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15806441/>
156. Athanasiou Y, Voskarides K, Gale DP, Damianou L, Patsias C, Zavros M, et al. Familial C3 glomerulopathy associated with CFHR5 mutations: clinical characteristics of 91 patients in 16 pedigrees. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2024 Apr 11];6(6): 1436–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21566112/>
157. O'Donnell-Luria AH, Pais LS, Faundes V, Wood JC, Sveden A, Luria V, et al. Heterozygous Variants in KMT2E Cause a Spectrum of Neurodevelopmental Disorders and Epilepsy. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2024 Apr 11];104(6): 1210–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31079897/>
158. Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, Masnada S, Rubboli G, Gardella E, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Apr 11];140(5): 1316–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28379373/>
159. Howell KB, McMahon JM, Carvill GL, Tambunan D, Mackay MT, Rodriguez-Casero V, et al. SCN2A encephalopathy: A major cause of epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Neurology* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2024 Apr 11];85(11): 958–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26291284/>
160. Ogiwara I, Ito K, Sawaishi Y, Osaka H, Mazaki E, Inoue I, et al. De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology* [Internet]. 2009 [cited 2024 Apr 11];73(13): 1046–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19786696/>
161. Bailey A, Phillips W, Rutter M. Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives. *J Child Psychol Psychiatry* [Internet]. 1996 Jan [cited 2024 Apr 11];37(1): 89–126. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8655659/>
162. Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1999 [cited 2024 Apr 11];65(2): 493–507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417292/>
163. Rodan LH, Spillmann RC, Kurata HT, Lamothe SM, Maghera J, Jamra RA, et al. Phenotypic expansion of CACNA1C-associated disorders to include isolated neurological manifestations. *Genet Med* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 Apr 11];23(10): 1922–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34163037/>

164. Ferdinandusse S, Waterham HR, Heales SJ, Brown GK, Hargreaves IP, Taanman JW, et al. HIBCH mutations can cause Leigh-like disease with combined deficiency of multiple mitochondrial respiratory chain enzymes and pyruvate dehydrogenase. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2013 Dec 4 [cited 2024 Apr 11];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24299452/>



EKLER

Ek-1: Etik Kurul Onay Formu

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 19.10.2022

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Nörogelişimsel bozukluklar ve/veya konjenital anomalileri olan olguların moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme verilerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
	TELEFON	216 570 91 90
	FAKS	216 565 55 26
	E-POSTA	etik@sbgoztepehastanesi.gov.tr

BASVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Filiz Özen-Dr. Arzu Guliyeva			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TORU	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐			
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐			
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐			
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐			
	İlaç dışı klinik araştırma	☐			
	Retrospektif	☒			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama	
	SIGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐			
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	PLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
DİĞER:	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2022/0604	Tarih: 19.10.2022			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.				

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 19.10.2022

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nörogelişimsel bozukluklar ve/veya konjenital anomalileri olan olguların moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme verilerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Işıl MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Asif Yıldırım	Üroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Süleyman Daşdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Sıdika Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Hacer Hıran Mutlu	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Uzm. Dr. Ergül Demirçivi	Kadın Hastalıkları ve Doğum	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Saliha Şahin	İşçi		E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi

T.C.S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
Etik Kurulu Başkanı
Unvanı: Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER
İmza: [İmza]

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA

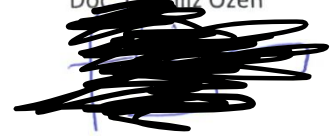
2022/0604 Etik Kurul karar numaralı, 19.10.2022 Etik Kurul onay tarihli “Nörogelişimsel bozukluklar ve/veya konjenital anomalileri olan olguların moleküler karyotipleme ve yeni nesil dizileme verilerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi” konu başlıklı tez çalışması retrospektif olarak çalışılmaktayken hasta sayısı 60’tan 150’ye çıkarılmıştır.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Arş. Gör. Dr
Arzu Guliyeva

Tıbbi Genetik Kliniği İdari Sorumlusu

Doç. Dr. Filiz Özen



28.09.2023

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

Uygundur

Ek-2: Orijinallik Beyan Formu

NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR VE/VEYA KONJENİTAL ANOMALİLERİ OLAN OLGULARIN MOLEKÜLER KARYOTİPLEME VE YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ

arzu tez (2).docx

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 7	% 3	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr	% 2
İnternet Kaynağı		
2	acikerisim.uludag.edu.tr	% 1
İnternet Kaynağı		
3	www.seruvenyayinevi.com	<% 1
İnternet Kaynağı		
4	www.uniprot.org	<% 1
İnternet Kaynağı		
5	www.qiagen.com	<% 1
İnternet Kaynağı		
6	edisciplinas.usp.br	<% 1
İnternet Kaynağı		
7	www.researchgate.net	<% 1
İnternet Kaynağı		
8	egetipdergisi.com.tr	<% 1
İnternet Kaynağı		
9	medigen.medipol.edu.tr	<% 1
İnternet Kaynağı		