



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKRABA EVLİLİĞİ BULUNAN KONJENİTAL HİPOTİROİDİ  
HASTALARINDA YENİ VARYASYONLARIN KEŞFİ**

FATMA BÜŞRA IŞIK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVI

İSTANBUL-2019

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca laboratuvarında çalışma şansı vererek deneyim kazanmama olanak sağlayan Prof. Dr. Hakan Cangül'e, tez yazım sürecim boyunca göstermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Esra Çağavi'ye, Değerli jüri üyem Dr. Öğretim Üyesi Gülşah Koç'a ve Dr. Öğretim Üyesi Cüneyd Parlayan'a teşekkür ederim.

Verimli ve keyifli bir yüksek lisans dönemi geçirmemi sağlayan ve her çalışmamda sonsuz desteklerini gördüğüm değerli MEDİGEN ailesine ve tez yazım sürecimde bana destek olan tüm arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak hem tezimde hem hayatımda en büyük katkıya sahip olan aileme, maddi manevi tüm destekleri ve yardımları için can-ı gönülden teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>i</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>6</b>
<b>4.1 Konjenital hipotiroidi</b> .....	<b>6</b>
<b>4.2 Konjenital hipotiroidi tanısı ve semptomları</b> .....	<b>6</b>
<b>4.3 Hastalık etiyojisi</b> .....	<b>7</b>
<b>4.3.1 Tiroid disgenezi</b> .....	<b>8</b>
<b>4.3.2 Tiroid dishormonogenezi</b> .....	<b>10</b>
<b>4.4 Ailesel kalıtım modelleri ve nokta mutasyonları</b> .....	<b>12</b>
<b>4.5 Kalıtsal hastalıklarda akraba evliliğinin önemi</b> .....	<b>14</b>
<b>4.6 Dizileme teknolojileri</b> .....	<b>15</b>
<b>4.6.1 Birinci nesil dizileme</b> .....	<b>15</b>
<b>4.6.2 Yeni nesil dizileme</b> .....	<b>16</b>
<b>4.6.2.1 YND için kütüphane hazırlığı</b> .....	<b>16</b>
<b>4.6.2.2 YND için cluster oluşturma</b> .....	<b>16</b>
<b>4.6.2.3 Miseq cihazında dizileme</b> .....	<b>17</b>
<b>4.6.3 Cihaz çıktılarının analizi</b> .....	<b>18</b>
<b>4.6.3.1 Cihaz çıktılarının işlenmesi</b> .....	<b>19</b>
<b>4.6.3.2 Varyant dosyalarının veri bankalarıyla ilişkilendirilmesi</b> .....	<b>19</b>
<b>4.6.3.3 Cihaz çıktılarının işlenmesi</b> .....	<b>19</b>
<b>5. MATERYAL METOT</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1 Periferik kandan dna izolasyonu</b> .....	<b>27</b>

5.2 DNA örneklerinin konsantrasyon ve kalitesinin belirlenmesi .....	28
5.3 Truseq custom amplicon low input protokolü .....	29
5.3.1 Pozitif ve negatif kontrol hazırlama .....	29
5.3.2 Custom amplicon oligo tüp hazırlanması.....	29
5.3.3 Ürün pürifikasyon boncuğu ile örnek saflaştırması .....	29
5.3.4 İndex bağlama .....	30
5.3.5 Temizleme (clean-up) aşaması.....	30
5.4 Agaroz jel elektroforezi .....	31
5.5 Kütüphane normalizasyonu.....	31
5.6 Örneklerin miseq cihazına yüklenmesi .....	32
5.7 Sanger dizileme .....	32
5.7.1 Primer dizaynı .....	33
5.7.2 PCR reaksiyonu.....	36
5.7.3 PCR ürün temizleme (clean-up) aşaması .....	37
5.7.4 DNA dizileme .....	37
5.7.5 PCR ürün saflaştırması.....	38
5.7.6 Kapiler elektroforez .....	38
5.8 Dizileme analizi .....	38
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
6.1 Çalışmaya alınan hastaların klinik bulguları.....	41
6.2 Yeni nesil dizileme sonuçları .....	44
6.3 Yeni nesil dizileme sonucunda hastalarda tespit edilen varyantlar.....	44
6.4 Yeni nesil dizileme sonucunda tespit edilen aday novel varyantlar .....	50
6.5 Sanger dizi analizi ile varyantların doğrulanması ve aile segregasyonu.....	52
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>61</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>65</b>
<b>9. ETİK KURUL ONAYI</b>	
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
ACMG	: American Collage of Medical Genetics
BAM	: Binary alignment map
BKH	: Biricil Konjenital Hipotiroidi
Bp	: Base Pair (Baz Çifti)
CAT	: Custom amplicon oligo tube
dbSNP	: Single Nucleotide Polymorphism Database
DMD	: Duchenne Musküler Distrofi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
DOXA2	: Dual oxidase maturation factor 2
dsDNA	: Doublestand-DNA (çift zincirli DNA)
DUOX1	: Dual oxidase 1
DUOX2	: Dual oxidase 2
ExAC	: The exom aggregation consorstium
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
FOXE1	: Forkhead box E1
GLIS3	: Glis family zinc finger protein 3
HGMD	: Human Gene Mutation Database
IGV	: Integrative Genome Viewer
IKH	: İkincil Konjenital Hipotiroidi
IYD	: Iodotyrosine deiodinase
KH	: Konjenital Hipotiroidi
LHON	: Leber'in Herediter Optik Nöropatisi
MAF	: Minor Allel Frequency
ml	: Mililitre
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: Nanogram
NKX2-1	: NK2 homebox 1
NKX2-5	: NK2 homebox 5

OD	: Otozomal Dominant
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
OR	: Otozomal Resesif
PAX8	: Paired box gene 8
PCR	: Polimerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PMID	: PUBMED ID
RNA	: Reoksiribonükleik Asit
Rpm	: Rotation per minute (Dakikada Dönüş Sayısı)
RSB	: Resuspension buffer
SAM	: Sequence alignment map
SLC26A4	: Solute carrier family 26
SLC26A7	: Solute carrier family 26
SLC5A5	: Solute carrier family 5
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotit Polimorfizmi)
SPB	: Sample purification bead
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TG	: Thyroglobulin
THRA	: Thyroid hormone receptor alpha-1
TPO	: Thyroid dyshormonogenesis
TSH	: Tiroid Stimulating Hormone (Tiroid uyarıcı hormon)
TSHB	: Thyroid stimulating hormone beta chain
TSHR	: Thyroid stimulating hormone receptor
VCF	: Variant call format
VUS	: Variant of Uncertain Significance
YND	: Yeni Nesil Dizileme

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 4.1. Sanger dizileme yöntemi iş akışı .....	15
Şekil 4.2. YND için kütüphane hazırlığı.....	16
Şekil 4.3. YND için cluster oluşturma .....	17
Şekil 4.4. Miseq cihazında dizileme .....	18
Şekil 4.5. Cihaz çıktılarının analizi.....	19
Şekil 4.6. Örnek IGV görüntüsü .....	20
Şekil 5.1. Çalışma kapsamında izlenecek metodoloji.....	26
Şekil 5.2. MagPurix manyetik boncuklu izolasyon işlemi .....	27
Şekil 6.1. 21A ve 21B kodlu hastaların <i>SLC26A7</i> geni üzerindeki G94R değişiminin IGV görüntüsü.....	51
Şekil 6.2. 13A ve 13B kodlu hastaların <i>SLC5A5</i> geni üzerindeki R516* değişiminin IGV görüntüsü.....	51
Şekil 6.3. 2A ve B kodlu hastaların <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleriyle pedigrî şeması	52
Şekil 6.4. 4A ve B kodlu hastaların <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleriyle pedigrî şeması	53
Şekil 6.5. 6A kodlu hastanın <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması .....	53
Şekil 6.6. 28A ve 28B kodlu hastaların <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	53
Şekil 6.7. 29A kodlu hastanın <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması .....	54
Şekil 6.8. 31A ve 31B kodlu hastaların <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	54
Şekil 6.9. 32A ve 32B kodlu hastaların <i>TPO</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	55
Şekil 6.10. 5A, 5B ve 5C kodlu hastaların <i>SLC6A4</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	55
Şekil 6.11. 6A kodlu hastanın <i>TG</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	56
Şekil 6.12. 8A kodlu hastanın <i>TG</i> geni Sanger görüntüsü ve pedigrî şeması.....	56
Şekil 6.13. 12 kodlu hastanın <i>TG</i> ve <i>SLC26A7</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	56
Şekil 6.14. 20A ve 20B kodlu hastaların <i>TG</i> gen mutasyonu Sanger görüntüleri ile pedigrî şeması.....	57

<b>Şekil 6.15.</b> 25A, 25B ve 25C kodlu hastaların <i>TG</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	57
<b>Şekil 6.16.</b> 34A kodlu hastanın <i>TG</i> geni Sanger görüntüsü ile pedigri şeması.....	57
<b>Şekil 6.17.</b> 11A kodlu hastanın <i>DUOX2</i> geni Sanger görüntüsü ve pedigri şeması..	58
<b>Şekil 6.18.</b> 16A ve 16B kodlu hastaların <i>DUOX2</i> gen mutasyonu Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	58
<b>Şekil 6.19.</b> 12 kodlu hastanın <i>TG</i> ve <i>SLC26A7</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	59
<b>Şekil 6.20.</b> 16A ve 16B kodlu hastaların <i>SLC26A7</i> gen mutasyonu Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	59
<b>Şekil 6.21.</b> 21A ve 21B kodlu hastaların <i>SLC26A7</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	59
<b>Şekil 6.22.</b> 13A ve 13B kodlu hastaların <i>SLC5A5</i> geni Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	60
<b>Şekil 6.23.</b> 20A ve 20B kodlu hastaların <i>TSHR</i> gen mutasyonu Sanger görüntüleri ile pedigri şeması.....	60



# TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 4.1.</b> Konjenital hipotiroidi için erken ve geç dönem semptomları.....	7
<b>Tablo 4.2.</b> Birincil konjenital hipotiroidiye sebep olan durumlar .....	8
<b>Tablo 4.3.</b> Tiroid disgeneziyle ilişkili incelenen genler ve OMIM kayıtları.....	9
<b>Tablo 4.4.</b> Tiroid dishormonogeneziyle ilişkili incelenen genler ve OMIM kayıtları .....	10
<b>Tablo 4.5.</b> Noktasal değişiklikler ve etkileri .....	12
<b>Tablo 4.6.</b> Kalıtım modelleri, tanımları ve örnekleri.....	13
<b>Tablo 4.7.</b> Phred quality skor tablosu.....	18
<b>Tablo 4.8.</b> <i>In silico</i> programlar ve kriterleri .....	21
<b>Tablo 4.9.</b> Patojenik varyantların sınıflandırılma kriterleri.....	22
<b>Tablo 4.10.</b> Benign varyantların sınıflandırılma kriterleri .....	23
<b>Tablo 4.11.</b> Varyantların değerlendirilmesi.....	24
<b>Tablo 5.1.</b> KH panelinde bulunan genler, gen referans ID'leri ve ilgili yayın kodları .....	26
<b>Tablo 5.2.</b> MagPurix 'Blood DNA extrati on kit' kartuş kuyucuk içerikleri .....	28
<b>Tablo 5.3.</b> Tasarlanan primer dizileri .....	34
<b>Tablo 5.4.</b> PCR protokolleri .....	36
<b>Tablo 5.5.</b> PCR için cihaz koşulları.....	36
<b>Tablo 5.6.</b> Dizileme için gerekli cihaz koşulları .....	37
<b>Tablo 5.7.</b> Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar .....	39
<b>Tablo 5.8.</b> Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemeler .....	40
<b>Tablo 6.1.</b> Demografik bilgiler .....	41
<b>Tablo 6.2.</b> YND sonucu elde edilen varyant listesi örneği.....	45
<b>Tablo 6.3.</b> Hastaların filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listeleri .....	45
<b>Tablo 6.4.</b> Aday novel varyantların <i>In silico</i> analiz sonuçları.....	50

## 1. ÖZET

### AKRABA EVLİLİĞİ BULUNAN KONJENİTAL HİPOTİROİDİ HASTALARINDA YENİ VARYASYONLARIN KEŞFİ

Konjenital hipotoidi (KH) bir tiroid hormon yetersizliğidir. Dünyada en sık görülen neonatal endokrin hastalığıdır ve tedavi edilmediğinde mental retardasyon ve gelişimsel bozukluklara sebep olabilmektedir. Yeni doğan grubunda tiroid aktivitesi bozukluğu gözlenmesi güç olduğundan KH taraması oldukça önemlidir. Hastalık otozomal resesif kalıtım göstermesinden dolayı özellikle akraba evliliği bulunan ailelerde görülme sıklığı daha yüksektir. Bu çalışmada ailesinde akraba evliliği bulunan 35'i kadın 28'i erkek 63 konjenital hipotiroidi hastası ile çalışılmıştır. Yeni nesil dizileme teknolojisi ve custom tasarlanmış gen paneli kullanılarak hasta DNA'larında; *PAX8*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *FOXE1*, *TSHR*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DOUXA2*, *IYD*, *SLC26A7*, *DUOX1*, *GLIS3*, *TSHB* ve *THRA* genleri taranmıştır. Çalışmamız sonucunda *TPO* geninde 5, *SLC5A5* geninde 1, *DUOX2* geninde 1, *SLC26A7* geninde 2 ve *TSHR* geninde 1 mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan ikisi; *SLC5A5* genindeki 516. aminoasitin durdurucu kodona dönüşümü ve *SLC26A7* genindeki G94R aminoasit değişimi, daha önce veribankalarında bildirilmemiş, bu tez çalışmasında yeni tanımladığımız mutasyonlardır. Bu mutasyonların *in silico* tahmin gereçleriyle yapılan fonksiyonel analizleri ve hastaların fenotipleri birlikte incelendiğinde bu iki varyant tarafımızca novel patojenik varyantlar olarak değerlendirilmişlerdir. Yeni nesil dizileme sonuçları Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanmıştır ve aile segregasyonları fenotiplerle uyum göstermiştir. Elde edilen bu bilgiler veri bankalarına katkı sağlayacak ve hastalığın tanısı için yeni belirteç görevi göreceklere düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Konjenital hipotiroidi, *SLC5A5*, *SLC26A7*, Yeni Nesil Dizileme

\*Bu araştırma TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 214S637 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

## 2. ABSTRACT

### THE DISCOVERY OF NEW VARIATIONS IN CONGENITAL HYPOTHYROID PATIENTS WITH CONSANGUINEOUS MARRIAGES

Congenital Hypothyroidism (CH) is a thyroid hormone deficiency. It is the most common neonatal endocrin disease and may lead to mental retardation and developmental disorders if not treated. Since the dysfunction of thyroid activity is difficult to detect in newborns, CH screening is very important. Since the disease shows autosomal recessive inheritance, it is more common in families with consanguineous marriages. In this study, we performed a new variation screening in 35 female, 28 male and a total of 63 CH patient with consanguinity marriages. Next-generation sequencing technology and custom-designed gene panel were used to screen the genes; *PAX8*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *FOXE1*, *TSHR*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DOXA2*, *IYD*, *SLC26A7*, *DUOX1*, *GLIS3*, *TSHB* and *THRA* in the patients' DNA samples. As a result of our study, 5 mutations in the TPO gene, 1 in the SLC5A5 gene, 1 in the DUOX2 gene, 2 in the SLC26A7 gene and 1 mutation in the TSHR gene were identified. Two of these mutations; a G94R amino acid change in the SLC26A7 gene and amino acid change into a stop codon at the 516. Position in the SLC5A5 gene is the mutations that have not been previously reported in the databases. The functional analyzes of these mutations with *in silico* estimation tools and the phenotypes of the patients were evaluated together and resulted as novel pathogenic variants by this thesis study. New generation sequencing results were confirmed by Sanger sequencing and family segregations were consistent with phenotypes. This information will contribute to the databases and serve as a new marker for the diagnosis of the disease in the future.

**Key words:** Congenital hypothyroidism, Next-generation sequencing, *SLC5A5*, *SLC26A7*

\*This study was supported TÜBİTAK under 1001 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 214S63

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kojenital Hipotiroidi (KH) en sık görülen neonatal endokrin hastalığıdır. Erken dönemde tanısı yapıp tedavisi uygulanmadığında mental retardasyon ve büyüme geriliğine sebep olabilmektedir. Dünya üzerinde her 3000-4000 doğumda bir görülmekle birlikte geç tanı ve tedavi sebebiyle ülkemizde çocuk çağında zeka geriliğinin görülen pek çok çocuğun bulunmasının ana nedenlerinden biridir [1].

KH otozomal resesif olarak kalıtıldığından akraba evliliği bulunan ailelerde hastalığın görülme sıklığı çok daha yüksektir. Türkiye’de akraba evliliği görülme sıklığı oldukça yüksek olduğundan bağlantı analizlerinin yapılabilmesi için önemli bir avantaj sağlanmaktadır.

KH genetik olarak multigeniktir. Bu sebeple hastalıkla ilişkilendirilmiş bir çok farklı gen ailesi bulunmaktadır. Bu genler tiroid hormon senteziyle ilişkilendirilenler ve tiroid bezi gelişimiyle ilişkilendirilenler olarak incelenmektedir [2]. Bizim çalışmamızda incelediğimiz genler; *PAX8*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *FOXE1*, *TSHR*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DOUXA2*, *IYD*, *SLC26A7*, *DUOX1*, *GLIS3*, *TSHB* ve *THRA*’dır. Bu genler hem tiroid hormon disgeneziyle hem de tiroid dishormonogeneziyle ilişkilendirilen genlerdir. OMIM veritabanı kullanılarak; tiroid, hipotiroidi, konjenital hipotiroidi, dishormonogenez, disgenез vb. anahtar kelimelerin taranmış, elde edilen genlerden oluşan bir yeni nesil dizileme paneli oluşturulmuştur [3].

KH ile ilgili genetik çalışmaları hala yapılmaya devam etmekte ancak hastalığın etiyolojisi ve patogenezini tam anlamıyla açıklığa kavuşturamaya yetmemektedir. Bizim çalışmamız da hem bu alanda literatür katkısı sağlamayı hedeflemiş hem de hastalığın tanı ve tedavisinde kişiye ve özellikle ailesel temelli taşınan türlerinde hastanın ailesine ve gelecek jenerasyonlarına tanı belirteçleri oluşturma amaçlanmıştır. Yeni genlerin ve varyasyonların keşfi, tiroid fizyolojisi açısından yeni bilgiler ortaya çıkaracak ve hastalığa sebep olan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada tamamı ailevi vakalardan oluşan 35’i kadın 28’i erkek toplamda 63 primer KH hastası, Türkiye’deki çeşitli endokrinoloji ve pediatrik endokrinoloji doktorları tarafından tanıları konularak tarafımıza yönlendirilmiştir. Hastalardan, ebeveynlerinden ve varsa kardeşlerinden doktorlar tarafından periferik kan örneği alınmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Önceden seçtiğimiz genler ile tasarladığımız panel ile yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak hasta DNA’larında ilgili genler açısından dizileme yapılmıştır. Dizileme sonunda elde edilen veriler referans genom bilgisi ile kıyaslanarak hasta DNA’larında bulunan değişimler belirlenmiştir. Belirlenen bu noktasal değişimler patojenik etkilerine göre değerlendirildikten sonra hastalık yapıcı etkiye sahip olduğu düşünülenler için altın standart olarak kabul edilen Sanger dizileme yöntemi ile varlıkları kontrol edilmiş ve doğrulanmıştır. Ardından hastaların anne-babalarında ve varsa kardeşlerinde ilgili varyant yönünden Sanger dizileme yöntemi ile nokta mutasyon analizi yapılarak aile segregasyonları incelenmiştir. Aday novel varyantlar *in silico* tahmin gereçlerince değerlendirilip proteine fonksiyonel ve yapısal etkisi araştırılmış ve önemli ölçüde patojenik sonuç veren varyantlar tarafımızca novel varyant olarak değerlendirilmiştir.

Ülkemizin özellikle belirli bölgelerinde akraba evliliğinin oldukça yüksek oranda görülmesi sebebiyle ailevi konjenital hipotiroidi vakalarının genetik çalışmalar açısından önemli bir avantaja sahip olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışmada da sadece akraba evliliği bulunan aileler ile çalışılmıştır.

Bu çalışmamızın amacı konjenital hipotiroidi’ye neden olabilecek değişimlerin keşfedilmesidir. Bu sayede hastalığın tanımlanması, tiroid fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, bu alanda yeni bilgiler ortaya konulması hedeflenmiştir. Elde edilecek yeni bilgilerin, hastalığın tanısı için önemli belirteçler oluşturacağı düşünülmüştür. Veri bankalarına sağlayacağı bilgi sayesinde de ileriki dönemlerde bu bankaları tanı amaçlı kullananlara önemli bir bilgi sağlaması öngörülmektedir.

Çalışma sonunda elde edilen verilerin bilimsel makale olarak sunulması planlanmıştır. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji Kongresinde ve Avrupa İnsan Genetiği Kongresinde de sözlü ve poster sunumu olarak sergilenecektir.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Konjenital hipotiroidi

Konjenital hipotiroidi (KH) tiroid hormon yetmezliği olarak tanımlanmaktadır. En sık görülen neonatal endokrin hastalığıdır ve tedavi edilmezse mental retardasyon ile sonuçlanabilir. Özellikle beyin gelişimindeki kritik rolü sebebiyle, mental retardasyon sebeplerinden en önlenebilir olanı olarak görülür [4]. KH'nin dünya üzerinde 3000-4000 doğumda bir görüldüğü belirtilmiştir [5]. Guthrie ve Susi'nin öncülüğünde fenilketonüri tanısı için yapılan yeni doğan topuk kanı taraması yönteminin geliştirilmesi ile bebeklere doğumdan sonraki ilk haftalarda tiroid uyarıcı hormon (TSH) miktar tayini yapılarak KH tanısı konmaya başlanmış olup [6] ülkemizde de 2006 yılından bu yana KH taraması zorunlu hale getirilmiştir [7]. Birçok ülkede yapılan bu tarama çalışmaları neticesinde, hastalığın coğrafik lokasyonlara göre çeşitlilik gösterdiği gözlemlenmiştir [6]. Ayrıca birçok ülkede yapılan yeni doğan taramaları neticesinde, hastalığın görülme sıklığında 2 katına varan bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu artışın sebebinin ise tarama programlarında uygulanan değişiklikler ve artmış duyarlılık parametreleri olabileceği düşünülmüştür [8].

### 4.2. Konjenital hipotiroidi tanısı ve semptomları

Hipotiroidi azalmış tiroid aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Yetişkinlerde genellikle yavaş metabolizma hızı ve tiroid fizyolojisinden bozuklukla gözlemlenebileceği gibi bebek ve çocuklarda gelişimsel gerilik ve bozukluklar sebebiyle kendini göstermektedir.

Yetişkinlerde periferik kanda, yenidoğan grubunda ise topuk kanı taramasında serum TSH düzeyinin ve serbest T4 düzeyinin incelenmesi ile tanı konmaktadır. Bu hastaların TSH düzeyleri yüksek, serbest T4 değerleri ise düşüktür. Topuk kanı taraması olmadan neonatal dönemde KH tanısı konması oldukça güçtür. Özellikle plasenta yoluyla tiroid hormonunun geçişi, bebeğin klinik tablosunda KH'nin dışlanmasına sebep olabilmektedir. Yeni doğanların birçoğunda neonatal dönemde tiroid aktivitesi de gözlemlenebilmekte olup belirgin bir atireozis göstermediği sürece

yeni doğanda tiroid aktivite bozukluğu gözlemlenmesi oldukça güçtür. Bu sebeple yeni doğanda KH taraması oldukça önemlidir [9].

KH tanısı koymak hastaların klinik bulgularına göre zorluk gösterebilmektedir. KH, mental retardasyona sebep olabilecek en önlenbilir hastalık olması açısından da oldukça önem taşımaktadır. KH için erken dönem ve geç dönem belirti ve semptomları Tablo 4.1.'de verilmiştir [10]. Özellikle nörolojik bulgular dikkate alınarak yapılacak tedavinin zamanlaması, süresi ve takibinin önemi literatürde belirtilmiştir. Tanı çok erken zamanda konmuş olsa bile, ilk 2-3 yılda tedavi düzenli şekilde takip edilmez ve ilaç dozu ayarlanmazsa nörolojik gelişimde sorunlar oluşabilir [11].

**Tablo 4.1. Konjenital hipotiroidi için erken ve geç dönem semptomları**

<b>Erken Dönem Semptomları</b>	<b>Geç Dönem Semptomları (Neonatal Dönem Sonrası)</b>
Makrozomi	Zayıf emme gücü
Azalmış hareketlilik	Gelişimsel Gecikme
Büyümüş Bıngıldak	Azalmış hareketlilik ve letarji
Göz kapağı, el ve ayaklarda ödem	Yetersiz büyüme
Uzamış Sarılık	Göbek fıtığı
Hipotoni	Benekli, soğuk, kuru deri
Kaba yüz özellikleri	Soluk almada zorlanma
Hipotermia	Büyük dil
Beniz Sarılığı	Miksedema
Tiroid Büyümesi	Boğuk sesle ağlama
Şişik Karın	

### **4.3. Hastalık etiyolojisi**

KH etiyolojik olarak 2 gruba ayrılır; bunlar birincil ve ikincil KH'dir. Birincil KH (BKH), tiroid bezinin kendisinde ya da tiroid hormonu üretimi sırasında oluşabilecek problemler sonucu ortaya çıkar. KH vakalarının yaklaşık %95'inde görülür. İkincil (merkezi) KH (İKH) ise hipotalamus-hipofiz fonksiyon bozuklukları sebebiyle oluşmaktadır. KH vakalarının %5'lik kısmını kapsar [12]. BKH tiroid disgenez ve



tiroid dishormonogenez olarak 2'ye ayrılır. Tiroid disgenez vakaları, BKH vakalarının %85'lik kısmını, tiroid dishormonogenez vakaları ise %15'lik kısmını oluştururlar [9]. Her iki durumu oluşturabilecek durumlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2. Birincil konjenital hipotiroidiye sebep olan durumlar**

<b>Tiroid Disgenezi</b>	<b>Tiroid Dishormonogenezi</b>
Aplazi	Sodyum-iyot geçişinde defekt
Hipoplazi	Tiroid Peroksidaz defekti
Ektopik bez	Thyroglobulin defekti
	Deiodinaz defekti

#### **4.3.1. Tiroid disgenezi**

Tiroid disgenezi bozukluğu tiroid ektopi, atireozis ve tiroid hipoplazi olmak üzere 3 şekilde görülebilmektedir [9]. Tiroid ektopi, tiroid bezinin ektopik lokasyonda olması durumudur. Tiroid disgenez vakalarının 2/3'lük kısmı tiroid ektopiden muzdariptir ve bu hastalığın kadınlarda görülme sıklığı, erkeklerde görülme sıklığının iki katıdır [13]. Tiroid atireozis, tiroid dokusunun tamamının olmaması durumu olarak tanımlanmakta olup, tiroid hipoplazi ise tiroid bezinin olması gerekenden küçük olması durumudur. Atireozis ve tiroid hipoplazi birlikte tiroid disgenezinin kalan 1/3'lük kısmını oluşturmaktadır [10].

Tiroid disgenezi çoğunlukla sporadik olarak ortaya çıkmakla birlikte genetik temelli de oluşabilmektedir. Tiroid disgenezi vakalarının incelendiği çalışmalarda, hastalığın %2 oranında ailesel geçişli olduğu gösterilmiştir [14]. Yapılan bir başka çalışmada da KH hastalarının birinci derece akrabalarında %7,9 oranında tiroid gelişim bozukluğu gözlemlenmiştir [15]. Tiroid disgeneziyle ilişkilendirilen bazı genler ve OMIM kayıtları Tablo 4.3'de verilmiştir.

**Tablo 4.3. Tiroid Disgeneziyle ilişkili incelenen genler ve OMIM kayıtları**  
 (\*:otozomal dominant, \*\*:otozomal resesif, otozomal:otozom kromozomlarına dair)

Gen Sembolü	Gen Açıklaması	OMIM no	İlgili Fenotip	Kalıtım
<i>PAX8</i>	PAIRED DOMAIN GENE 8	167415	Tiroid disgenezine ya da hipoplaziye bağlı konjenital hipotiroidi	OD*
<i>NKX2-1</i>	NK2 HOMEODOMAIN 1	600635	koreatetoz, hipotiroidizm ve neonatal solunum hastalıkları	OD
<i>NKX2-5</i>	NK2 HOMEODOMAIN 5	600584	Konjenital guatratsızlık, hipotiroidi	OD
<i>FOXE1</i>	FORKHEAD BOX E1	602617	Bamforth-Lazarus syndrome	OR**
<i>GLIS3</i>	GLIS FAMILY ZINC FINGER PROTEIN 3	610192	Neonatal diabetes mellitus, konjenital hipotiroidi	OR
<i>TSHR</i>	THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR	603372	hipotiroidizm konjenital guatratsızlık	OD-OR

*PAX8* geni birden fazla doku formasyonunda gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Özellikle organogenezde erken dönem hücre farklılaşmasında tetiklemede

görevlidir [16]. *NKX2-1* ve *NKX2-5* genleri özellikle tiroid, akciğer, hipotalamus ve önbeyin erken dönem gelişiminde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörleridir [17], [18]. *FOXE1* geni forkhead box gen ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür ve daha önce tiroid organogeneziyle ilişkilendirilmiştir [19]. *TSHR* geni ise tiroid stimüle hormon yanıtı olarak aktive edilen bir reseptördür [20].

#### 4.3.2. Tiroid dishormonogenezi

Tiroid hormonunun biyosentezinde birden çok organ ve hormon görevlidir. Bu hormonun biyosentezinde ve salınımında oluşabilecek bir sorun, tiroid dishormonogeneziye sebep olabilir. Tüm KH vakalarının %15’lik kısmını kapsayan bu bozukluk, genellikle T3, T4 tiroid hormonlarının sentezinde görevli olan tiroid peroksidaz aktivitesindeki sorunlar sonucu ortaya çıkar ve büyük çoğunlukla otozomal resesif olarak kalıtılır. Tiroid dishormonogeneziyle ilişkilendirilen bazı genler ve OMIM kayıtları Tablo 4.4’de verilmiştir;

**Tablo 4.4. Tiroid Dishormonogeneziyle ilişkili incelenen genler ve OMIM kayıtları (\*:Otozomal resesif)**

Gen Sembolü	Gen Açıklaması	OMIM no:	İlgili Fenotip	Kalıtım
<i>SLC5A5</i>	SOLUTE CARRIER FAMILY 5	601843	Troid dishormonogenezi	OR
<i>SLC26A4</i>	SOLUTE CARRIER FAMILY 26, MEMBER 4	605646	Pendred syndrome	OR
<i>TG</i>	THYROGLOBULIN	188450	Tiroid dishormonogenezi	OR
<i>TPO</i>	THYROID PEROXIDASE	606765	Tiroid dishormonogenezi	OR
<i>DUOX2</i>	DUAL OXIDASE 2	606759	Tiroid dishormonogenezi	OR

<i>DUOXA2</i>	DUAL OXIDASE MATURATION FACTOR 2	612772	Tiroid dishormonogenezi	OR
<i>IYD</i>	IODOTYROSINE DEIODINASE	612025	Tiroid dishormonogenezi	OR
<i>SLC26A7</i>	SOLUTE CARRIER FAMILY 26, MEMBER 7	608479	-	-
<i>DUOX1</i>	DUAL OXIDASE 1	606758	-	-
<i>SLC6A4</i>	SOLUTE CARRIER FAMILY 6, MEMBER 4	182138	-	-

*SLC5A5* geni tiroid ve diğ er bazı dokulardaki iyot alımında görev alan önemli bir plazma membran proteini, bir sodyum-iyot simporter'ıdır [21]. *SLC26A4*, *SLC6A4*, *SLC26A7* de tıpkı *SLC5A5* gibi solute carrier gen ailesindedir. *SLC26A4* anyon transportunda görevlidir [22]. *SLC6A4* geni de bir transpor proteindir. Özellikle erken gelişim döneminde memeli tiroid dokusundaki gen ifadesi yüksektir. *SLC26A7* geni de tiroidle ilişkilendirilmiş, literatüre yeni kazandırılmış bir gen dir. Tiroid hormon biyosentezinde görev aldığı düşünölen bir transporter'dır [23]. *TG*, tiroid hormon öncülü bir glikoproteindir ve direkt olarak tiroid dishormonogenezi ile ilişkilendirilmiştir [24]. *TPO* geni ise ürettiğı tiroid peroksidaz ile tiroid hormon sentezinde görevli önemli bir katolizördür ve o da *TG* gibi dishormonogenezi ile ilişkilendirilmiştir[25] *DUOX1*, *DUOX2* ve *DOUXA2* aynı gen ailesi üyesi olup tiroid hormon sentezinden görevli protein kompleksinin birer parçasıdır [24]. *IYD* ise tiroid hormon sentezinde görevli bir katölizördür [26].

#### 4.4. Ailesel kalıtım modelleri ve nokta mutasyonları

İnsan genomu 20.000 -23.000 gen ve 3.2 milyar baz (Adenin-A, Guanin-G, Sitozin-S, Timin-T) çiftinden meydana gelmektedir. Tüm genom 23 çift olmak üzere 46 kromozomdan oluşmaktadır. Bu 46 kromozomun yarısı anneden ve diğer yarısı ise babadan çocuğa aktarılmakta olup 22 tanesi otozomal kromozom ve 23. Kromozom ise cinsiyet (gonozomal, eşey) kromozomu olarak adlandırılırken X,Y olarak sembolize edilmektedir.

Genetik hastalıklar kromozomal bozukluklardan dolayı oluşabileceği gibi genlerde oluşabilecek değişiklikler de özellikle transkripsiyonel ve translasyonel sorunlara yol açarak hastalıklara sebep olmaktadır. Genotip-fenotip ilişkisi göz önüne alındığında hastalıkların patofizyolojisini anlamak, tanı ve tedavisine ışık tutmak için genomu çok iyi değerlendirmek gerekir. Genomda oluşabilecek değişikliklerin başında ise noktasal varyasyonlar gelmektedir. Genetik hastalıklara yol açan mutasyonların belirlenmesi de ilgili hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılması açısından oldukça önem taşımaktadır. Genomda oluşabilecek noktasal değişiklikler ve etkileri aşağıdaki tabloda kategorize edilmiştir (Tablo 4.5)

**Tablo 4.5. Noktasal Değişiklikler ve Etkileri**

Mutasyon	Tanımı	Örnek (Gen)
Nokta Mutasyonu	Tek bir baz çiftinde meydana gelen değişiklik	A>G, A>T
Missense (Yanlış anlamlı)	Bir baz değişimi sebebiyle kodonun ve sentezlenen aminoasitin değişmesi	A82P (HSD3B2)
Nonsense (Susturucu)	Kodonda meydana gelen bir bazlık değişim sonrası STOP kodon oluşması	G23X (HBB)
Sinonim	Bir baz değişimi sebebiyle kodonun değişmesi ancak sentezlenen aminoasitin değişmemesi	V153I (GJB2)

Nötral	Kodlanmayan DNA bölgesindeki nükleotidin değişmesi	
Duplikasyon (Eklenmeler)	Bir ya da birden fazla bazın kendini kopyalayarak diziyeye eklenmesi 3lü kod yapısı bozulursa çerçeve kayması olarak adlandırılır.	920dupTCAG ( <i>LDLR</i> ) delE120
Delesyon (Eksilme)	Diziden bir ya da birden fazla bazın silinmesi 3lü kod yapısı bozulursa çerçeve kayması olarak adlandırılır.	delE120 ( <i>GJB2</i> )
İnsersiyon (Eklenme)	Diziyeye bir ya da birden fazla bazın eklenmesi 3lü kod yapısı bozulursa çerçeve kayması olarak adlandırılır.	3524insA ( <i>FBN1</i> )
Splice Değişimler	Değişimin intronda meydana gelmesi ve bu sebeple bir ya da birden fazla ekzonun RNA düzeyinde ifadesinin eksilmesi	IVS1+1G>A ( <i>GJB2</i> )

Bu değişikliklerin paternine göre sınıflandırılması sonucu hastalıkların kalıtım modelleri 5 kategoriye ayrılmıştır ve aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.6) [27].

**Tablo 4.6. Kalıtım modelleri, tanımları ve örnekleri**

Kalıtım Modeli	Tanımı	Örnek
Otozomal Dominant (OD)	Mutasyona uğramış bir allelin, hastalığa sebep olması	Marfan Sendromu, Miyotonik distrofi
Otozomal Resesif (OR)	Hastalığa sebep olmak için her iki allelin de mutasyona uğramış olması	Kistik Fibroz, Beta Talasemi

X'e Bağlı Dominant	Mutasyonun X kromozomu üzerinde olması. Bu durumda kadınlar erkeklere göre daha sık etkilenmektedirler	Rett sendromu, Hipofosfatemi
X'e Bağlı Resesif	Mutasyonun X kromozomu üzerinde olması. Bu durumda erkekler kadınlara göre daha sık etkilenmektedir	Hemofili, DMD
Mitokondriyal	Mitokondriyal DNA üzerinde mutasyon bulunması Sadece anneden çocuğa aktarılabilir	LHON

#### 4.5. Kalıtsal hastalıklarda akraba evliliğinin önemi

Genetik hastalıklar; multifaktöriyel kalıtımla geçenler, kromozomal bozukluklar ve tek gen hastalıkları olarak 3 kategoride incelenmektedir. Multifaktöriyel kalıtımla geçen hastalıklar için birden fazla gen mutasyonu ve/veya çevresel etkenlerin birlikte sorumlu olduğu düşünölmektedir. Kromozomal anomaliler genelde *De novo* oluşum gösterip nadiren kalıtsaldırlar. Tek gen mutasyonları ise Mendelyen Kalıtım gösterirler [28].

Akraba evliliklerinde en çok etkilenen grup tek gen hastalıklarıdır. Özellikle otozomal resesif kalıtım gösteren hastalıklar açısından akraba evlilikleri bu genlerin bir araya gelme ihtimalini artırmaktadır. Bir genetik mutasyonun toplumun genelinde görülmesine kıyasla kan bağı olan bireyler arasından görülme sıklığı daha fazla olduğundan akraba evlilikleri resesif kalıtsal hastalıklar için risk oluşturmaktadır [29].

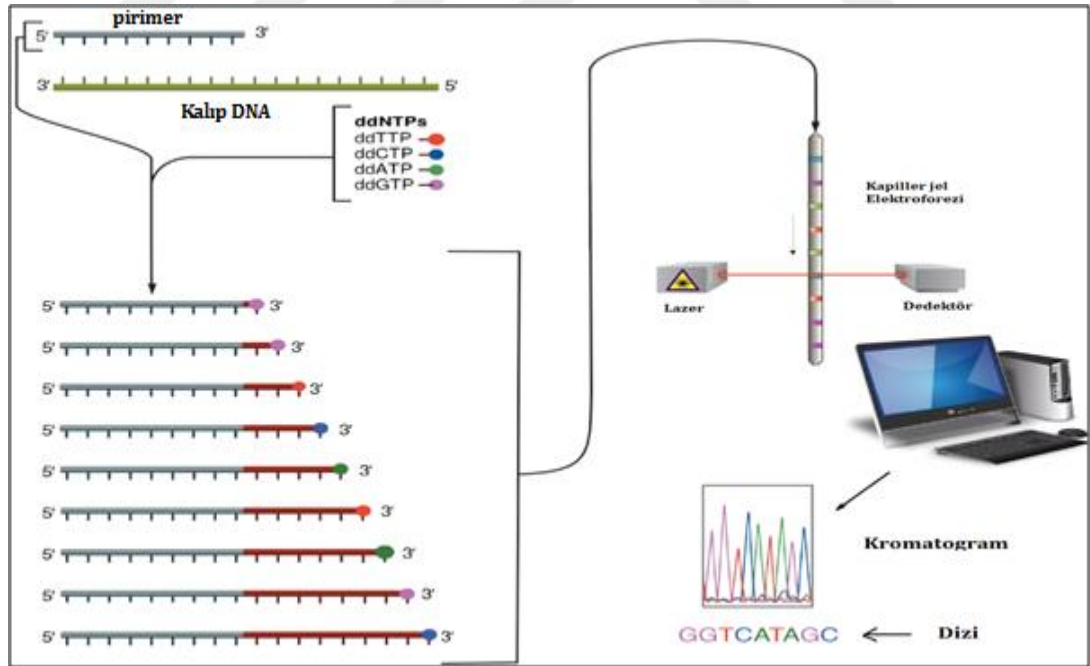
Ölkemizde akraba evliliğine bağlı görölen ve zeka geriliğine sebep olan en önemli hastalıklardan biri KH'dir. Dünya genelinde yaklaşık 4000 doğumda bir görülmemekte olsa da ölkemizde bu sayı daha da fazladır [29]. Ölkemiz Avrupa ve Amerika'ya kıyasla akraba evliliklerinin yüksek oranda olduğuna bir ölkede olduğundan

özellikle akraba evliliği yapmış/yapacak ailelerin genetik danışmanlık alma konusunda bilinçlendirilmesi toplum sağlığı açısından faydalı olacaktır.

#### 4.6. Dizileme teknolojileri

##### 4.6.1. Birinci nesil dizileme (sanger dizileme)

DNA dizileme metodu 1970’li yıllarda Sanger, Coulson, Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilmiştir. Bu metod, DNA replikasyonu sırasında zincir sonlandırıcı dideoksinükleotidlerin floresan boyayla işaretlenmesine ve kapiler elektroforez cihazından geçerek saptanması prensibine dayanmaktadır. İlk kez 1987 yılında “Applied Biosystems” tarafından otomatize, kapiler elektroforez tabanlı dizileme cihazı AB370 piyasa sürülmüş, ardından 1998 yılında AB3730xl ile kendini yenilemiştir [30]. 70’lerden günümüze kadar farklı teknolojilerle dizileme metotları geliştirilmiştir ancak Sanger dizileme metodu bugün hala “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Sanger dizileme yönteminin genel prensibi aşağıda şematize edilmiştir [31].



Şekil 4.1. Sanger dizileme yöntemi iş akışı

Sanger dizileme metodunun ardından, farklı teknolojik alt yapılarla yeni nesil dizileme metodları geliştirilmiştir. İkinci nesil dizileme olarak da adlandırılan Roche



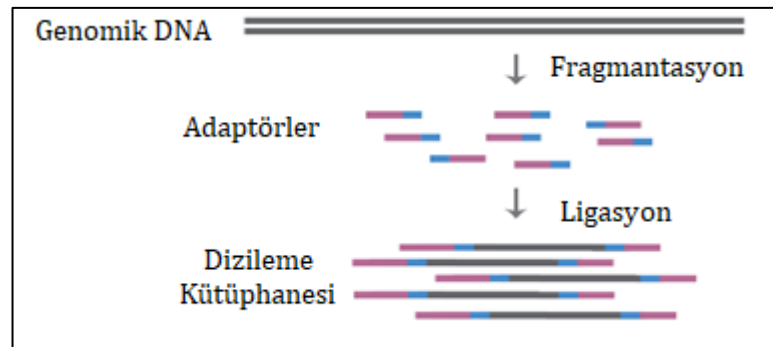
GS FLX sistemi 2004 yılında, illumina genom analizatör sistemi ise 2006 yılında kullanıma sunulmuştur. 2007 yılında SOLID dizileme cihazı ve 2010 yılında da Ion Torrent dizileme cihazı geliştirilmiştir. Tüm bu yöntemler yeni nesil dizileme yöntemleri olarak geliştirilmiş olup her geçen gün yenilenmeye devam etmektedir [32].

#### 4.6.2. Yeni nesil dizileme

Yeni nesil dizileme (YND) teknolojisi, temel prensipte kapiler elektroforez dizilemesiyle benzerlik göstermektedir. DNA polimeraz enzimi, DNA sentezi sırasında her döngüde floresan işaretli dNTP'leri kullanarak DNA kalıbını katalizler ve her döngüde birleşme noktasındaki nükleotidler tarafından salınan florofor ışımalar tanınır. YND ile Sanger dizileme sistemi arasındaki temel fark bu noktada ortaya çıkmaktadır. Sanger dizileme yönteminde bir DNA fragmanı dizilenirken, YND yönteminde bu işlem milyonlarca fragmanın paralel olarak dizilmesiyle gerçekleşmektedir. Tüm dünyadaki dizileme datalarının %90'ı Illumina sistemleriyle üretilmektedir. Illumina YND iş akışı ise 4 temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar kütüphane hazırlığı, cluster oluşturma, dizileme ve data analizi ve biyoinformatiktir [30].

##### 4.6.2.1. Kütüphane hazırlığı

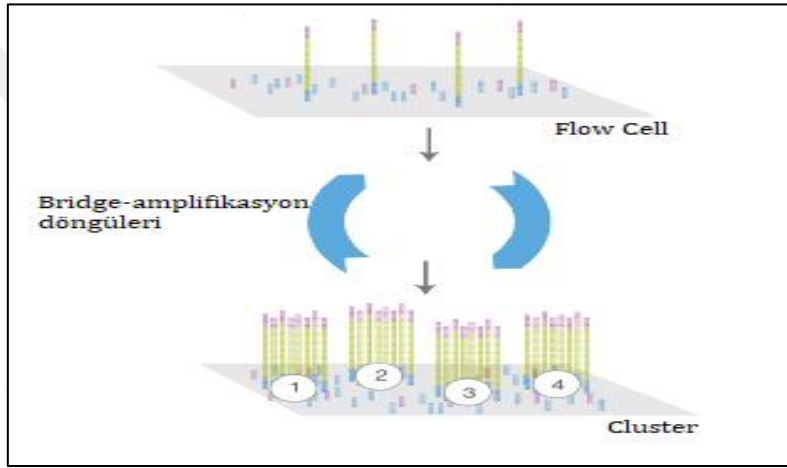
Bu aşamada öncelikle genomik DNA rastgele bir şekilde fragmanlara bölünür. Ardından 5' 3' uçlarına ligasyon işlemiyle adaptörler takılır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. YND için kütüphane hazırlığı [30]

#### 4.6.2.2. Cluster oluşturma

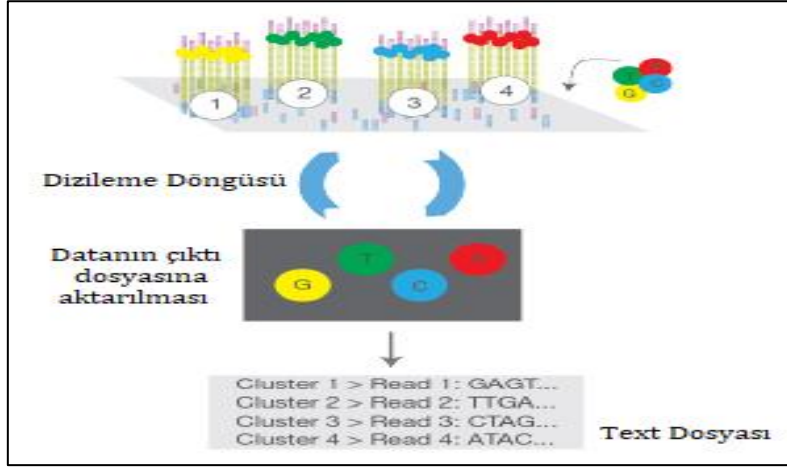
Cluster oluşturma aşaması için, oluşturulan kütüphane flow cell'e yüklenir. Burada, yüklenen kütüphanedeki fragman örnekleri P5 ve P6 adaptör dizileri sayesinde flow cell yüzeyine yapışır. Flow cell üzerindeki oligonükleotidler primer görevi görerek tek zincirli DNA'nın komplementini oluşturur. Orijinal dizi (bağlanan ilk fragman) yıkanarak uzaklaştırılır ve geriye kovalent bağ ile flow cell'e bağlanmış kütüphane dizileri kalır. Her bir fragmandan bridge-amplifikasyon ile 1000 kopya oluşturulur. Bu noktada cluster oluşturulmuştur. P5 adaptörleri kesilerek uzaklaştırılır ve sadece P7 adaptör dizileri ile flow cell'e bağlı fragmanlar kalır (şekil 4.3).



şekil 4.3. YND için cluster oluşturma [30]

#### 4.6.2.3. Miseq cihazında dizileme

Sekans primeri, P5 adaptör dizisine bağlanarak dizileme işlemini başlatır (Sequencing by Synthesis, SBS). Bu işlem sonucunda read-1 dizisi üretilmiş olur. Read-1 dizisinin okuması gerçekleştikten ve dizi uzaklaştırdıktan sonra index primer bağlanarak okunur. Böylece P7 ucundaki barkod dizisi de dizilenmiş olur. Ardından flow cell üzerinde tekrar bridge-amplifikasyon ile çoğalma işlemi gerçekleşir. P7 adaptörü kesilerek uzaklaştırılır ve sadece P5 adaptör dizisi ile flow cell'e bağlı fragmanlar kalır. Sekans primeri P7 adaptör dizisine bağlanarak dizileme işlemi başlar. Bu üretilen diziye de read-2 denilir (şekil 4.4) [30].



**Şekil 4.4.** Miseq cihazında dizileme [30]

Her bir nükleotidin ışına kalitesi skorlanır ve BCL dosyasından (fotoğraf dosyası) metin dosyasına (.txt uzantılı dosyalar) dönüştürülür. Bu dönüştürme işlemi MiniSeq ve MiSeq Illumina sistemlerinde cihaz üzerinde gerçekleştirilir. NextSeq, HiSeq ve NovaSeq cihazlarında ise cihaz çıktısı olarak BCL dosyası alınır [34]. Her bazın kalitesi “Phred quality” skorlamasına göre belirlenir ve 1’den 60’a kadar yapılır. Bu skorlama Tablo 4.7’de gösterilmiştir [35].

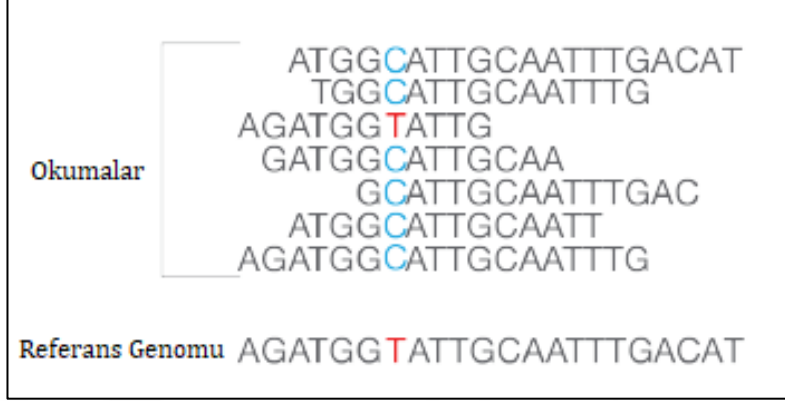
**Tablo 4.7. Phred quality skor tablosu**

Phred quality skor	Kalite aralığı	Bazın doğruluk yüzdesi
10	1-10	%90
20	1-100	%99
30	1-1,000	%99,9
40	1-10,000	%99,99
50	1-100,000	%99,999

#### 4.6.3 Cihaz çıktılarının analizi

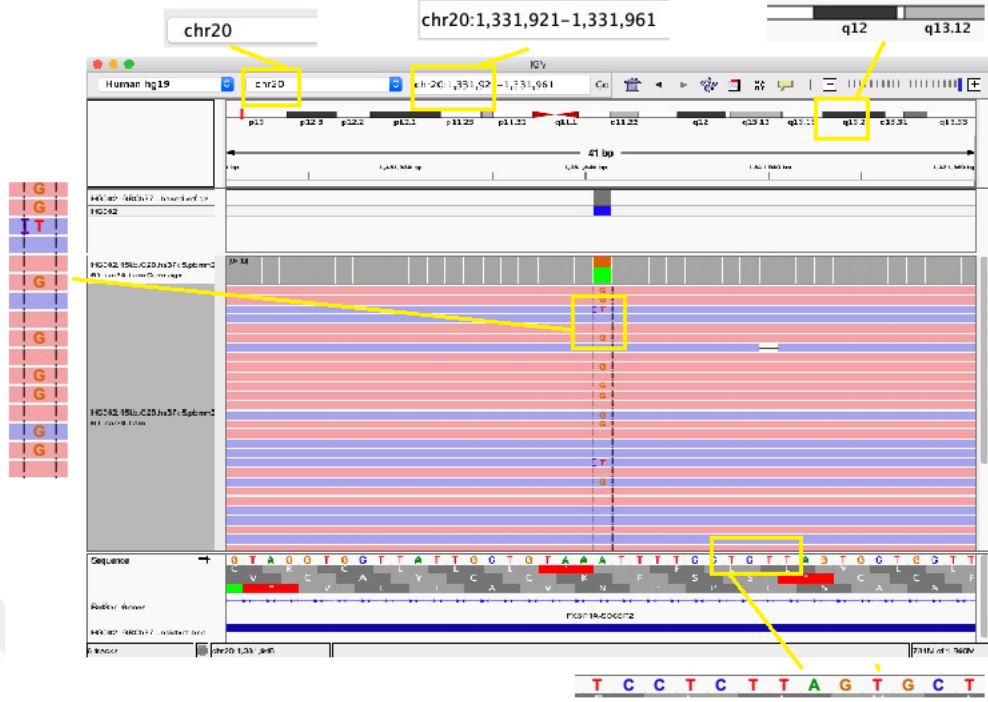
Data analizi ve alignment sırasında, yeni tanımlanmış diziler referans genomu göre sıralanır. İnsan üzerinde yapılan çalışmalarda referans genomu olarak: Genom Referans Konsorsiyumu Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37, hg19) ya da yeni versiyonu Genome Reference Consortium Human Build 38 patch

release 12 (GRCh38.p12) kullanılabilir. Bu işlem temsili olarak Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Cihaz çıktılarının analizi [30]

Bu karşılaştırma sonrasında Sequence Alignment Map (SAM) adında yeni bir metin dosyası elde edilir. SAM dosyası dizilerin genomda eşleştiği bölgeleri, kalitesini, okuma derinliğini (Referansta aynı bölge ya da noktaya eşleşen sekans dizilerinin (Read1 ve Read2) sayısıdır) ve genomik koordinatlarını içerir. Daha sonra SAM dosyası boyut olarak daha küçük olan BAM (Binary Alignment Map) formatına çevrilir [36]. İşlenmiş datanın görsel olarak incelenmesi için Integrative Genomics Viewer (IGV) programı ve üretilmiş olan BAM dosyaları kullanılır [37]. Şekil 4.6’da örnek IGV görüntüsünde görüldüğü gibi hasta BAM dosyası programa yüklendikten sonra referans genom ile kıyaslanır. Kromozom numarası ve lokasyonu gibi bilgiler üst kısımdaki araç çubuğunda görülür. Kırmızı ve mavi renkli her bir satır, cihazdaki bir okumayı sembolize eder ve yakınlaştırıldıkça sıralanmış nükleotid dizisi olarak görülür. Dizileme işleminin kalitesi bu çizgilerin sürekli olması ve sayısının fazla olmasıyla doğru orantılıdır. Alttaki araç çubuğunda ise referans genom gözlemlenebilmektedir.



Şekil 4.6. Örnek IGV görüntüsü

#### 4.6.3.1. Cihaz çıktılarının işlenmesi

Varyantlar hasta dosyalarından referans ile eşleşmeyen dizilerin belirli programlar kullanılarak çağrılmasıyla elde edilir. Binary alignment map (BAM) dosyaları cihaz üzerinde varyant calling format (.vcf) dosyası haline getirilir. Buraya kadar olan aşamalar cihazın kendi içinde gerçekleşir. Daha sonra .vcf formatındaki dosyaları ANNOVAR programı ile inforomatik uzmanları tarafından anotasyon ile excell dosyası haline getirilir [38].

#### 4.6.3.2. Varyant dosyalarının veri bankalarıyla ilişkilendirilmesi

Referans genomundan farklı bulunan varyantlar, belirli klinik veri bankalarında aranarak değerlendirilir. Bu değerlendirmelerde American College of Medical Genetics (ACMG) kriterleri de dâhil olmak üzere birçok parametre mevcuttur. En yaygın kullanıma sahip klinik veri bankaları şunlardır;

- İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı (HGMD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- ClinVar
- Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP)
- Popülasyon Frekansı

DNA dizisindeki bir değişimin sebep olacağı fonksiyonel etki protein bazında olacak değişimlerin farklı matematiksel ve bilgisayar temelli değerlendirmeler sonucunda skorlanmaktadır. Örneğin en sık kullanılanları olan PolyPhen-2 ve Mutation Taster ‘Naive Bayes’ yaklaşımını kullanmaktayken SIFT ve Mutation Assessor farklı değerlendirme metodları kullanılır. Varyantların fonksiyonel etkilerinin belirlenmesinde kullanılan *In silico* programlar ve kriterleri ise Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.8. *In Silico* Programlar ve kriterleri**

<b>MutationTaster [39]</b>	<b>MutationAssessor [40]</b>	<b>FATHMM [41]</b>	<b>SIFT [42]</b>	<b>PolyPhen-2 [43]</b>
<b>A;</b> Disease causing automatic	<b>H;</b> High	<b>D;</b> Deleterious	<b>D;</b> Deleterious	<b>D;</b> Probably damaging
<b>D;</b> Disease causing	<b>M;</b> Medium	<b>T;</b> Tolerated	<b>T;</b> Tolerated	<b>P;</b> Possibly damaging
<b>N;</b> Polymorphism	<b>L;</b> Low			<b>B;</b> Benign
<b>P;</b> Polymorphism automatic	<b>N;</b> Neutral			
	<b>H/M;</b> Functional			
	<b>L/N;</b> Non-functional			

#### 4.6.3.3. ACMG sınıflandırılması ve Varsome

ACMG sınıflandırmasında varyantlar patojenitesine göre şöyle sıralanır; benign, muhtemel benign, klinik anlamı kesin olmayan (uncertain significance, VUS), Muhtemel Patojenik ve Patojenik. Bu varyantlar kendi içinde de sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırılma Tablo 4.9 ve Tablo 4.10’da, varyantların sınıflandırma kriterleriyle değerlendirilmesi ise Tablo 4.11’da gösterilmiştir [44].

**Tablo 4.9. Patojenik varyantların sınıflandırılma kriterleri**(PVS: pathogenic very strong, PS:pathogenic strong, PM:pathogenic moderate, PP: pathogenic supporting)

<b>Patojenite için çok güçlü kanıt</b>	
<b>PVS1</b>	Gende fonksiyon kaybına sebep olan mutasyonlar (nonsense, frameshift, splice site, başlangıç kodunu, ekzon kaybı)
<b>Patojenite için güçlü kanıt</b>	
<b>PS1</b>	Nükleotid değişimi ne olursa olsun daha önce patojenitesi bildirilmiş aynı aminoasit değişimine sebep olan variant
<b>PS2</b>	Sadece hasta kişide olan, anne ve babanın hastalığı taşımadığı kesin olan <i>de novo</i> variant
<b>PS3</b>	Genin ya da genin ürününün hasar yapıcı etkiye sahip olduğunun <i>in vitro</i> ya da <i>in vivo</i> deneylerle kanıtlandığı variant
<b>PS4</b>	Hastalarda görülme sıklığı kontrol gruplarına göre daha fazla olan variant
<b>Patojenite için orta seviyeli kanıt</b>	
<b>PM1</b>	İyi anlaşılmiş fonksiyonel domainlerde bulunan, benign varyantların görülmediği, çoğunlukla hasar yapıcı varyantların olduğu lokasyondaki varyantlar
<b>PM2</b>	Exome Sequencing Project, 1000 Genomes ya da Exome Aggregation Consortium'a göre düşük frekansı olan variant
<b>PM3</b>	Resesif geçişli hastalıklarda patojenik varyant ile trans pozisyonda olan variant
<b>PM4</b>	Inframe delesyon/ insersiyon değişimler sonucu durdurucu ya da uzatıcı etki yaparak protein uzunluğunu değiştiren varyant
<b>PM5</b>	Daha önce missense varyasyon bulunan bir aminoasitte bulunan yeni bir missense variant
<b>PM6</b>	Anne-babada varlığı araştırılmamış fakat <i>de novo</i> varsayılan variant
<b>Patojeniteyi destekleyen kanıt</b>	
<b>PP1</b>	Birçok aile üyesinin hastalık açısından etkilenmesine sebep olan variant
<b>PP2</b>	Gende oluşan missense mutasyonların hastalığa sebep olduğu varyantlar
<b>PP3</b>	Gen ya da gen ürünü üzerinde hasar yapıcı etkisinin olduğu <i>in silico</i> araçlar ile tahmin edilmiş olan variant
<b>PP4</b>	Hasta fenotipi veya aile öyküsünün tek bir genetik etiyolojiye sahip bir hastalık için spesifik olan variant
<b>PP5</b>	Güvenilir kaynaklar tarafından patojenik olarak sınıflandırılmış fakat laboratuvar değerlendirmesi mevcut olmayan variant

**Tablo 4.10. Benign varyantların sınıflandırılma kriterleri** (BA: benign stand-alone, BS: benign strong, BP: benign supporting, VUS: variant uncertain significance)

<b>Benign için tek başına yeterli kanıt</b>	
<b>BA1</b>	Exome Sequencing Project, 1000 Genomes ya da Exome Aggregation Consortium'a göre frekansı %5'in üzerinde olan variant
<b>Benign için güçlü kanıt</b>	
<b>BS1</b>	Hastalık için beklenenden yüksek allel frekansı olan variant
<b>BS2</b>	Erken yaşta ortaya çıkması beklenirken yetişkinlikle ortaya çıkan, resesif (homozigot), dominant (heterozigot) ya da X e bağlı (hemizigot) geçişli hastalıklara sebep olan variant
<b>BS3</b>	<i>In vitro</i> veya <i>in vivo</i> çalışmalar ile protein fonksiyonunda ya da splicing'de hasar yapıcı etkisinin olmadığı gösterilmiş variant
<b>BS4</b>	Ailenin hasta diğer bireylerinde görülmemiş olan variant
<b>Benign'ı destekleyen kanıt</b>	
<b>BP1</b>	Hastalık yaptığı bilinen, aminoasit uzamasını durdurma etkisine sahip missense mutasyona sebep olan variant
<b>BP2</b>	Dominant geçiş gösteren bir hastalıkta/gende trans (homolog gende) görülen ya da herhangi bir kalıtım modelinde patojenik varyantla cis (aynı kromozomda) bulunan varyant
<b>BP3</b>	Fonksiyonu bilinmeyen, tekrar bölgelerinde çerçeve içi (in frame) delesyon ve insersiyonlara sebep olan variant
<b>BP4</b>	Gen ya da gen ürünü üzerinde hasar yapıcı etkisinin olmadığı <i>in silico</i> araçlarla hesaplanmış olan variant
<b>BP5</b>	Farklı moleküler temelleri olan bir hastalıkla bulunan variant
<b>BP6</b>	Güvenilir kaynaklarca benign olarak sınıflandırılan ancak yeterli laboratuvar kanıtının bulunmadığı variant
<b>BP7</b>	Sinonim olan ve splicing üzerinde etkisi olmayan, evrimsel olarak korunmamış benign variant
<b>VUS</b>	Benign ya da patojenikliği çelişkili ise klinik anlamı kesin olmayan variant



**Tablo 4.11. Varyantların Değerlendirilmesi**

<b>Patojenik</b>	(i) <b><u>1 çok güçlü (PV1) VE</u></b> (a) $\geq 1$ güçlü (PS1–PS4) VEYA (b) $\geq 2$ orta seviyeli (PM1–PM6) VEYA (c) 1 (PM1–PM6) ve 1 destekleyen (PP1–PP5) VEYA (d) $\geq 2$ destekleyen (PP1–PP5)
	<b><u>(ii) <math>\geq 2</math> güçlü (PS1–PS4) VEYA</u></b>
	<b><u>(iii) 1 güçlü (PS1–PS4) VE</u></b> (a) $\geq 3$ orta seviyeli (PM1–PM6) VEYA (b) 2 orta seviyeli (PM1–PM6) VE $\geq 2$ destekleyici (PP1–PP5) VEYA (c) 1 orta seviyeli (PM1–PM6) VE $\geq 4$ destekleyici (PP1–PP5)
<b>Muhtemel patojenik</b>	<b>(i) 1 çok güçlü (PVS1) VE 1 orta seviyeli (PM1– PM6) VEYA</b>
	<b>(ii) 1 güçlü (PS1–PS4) VE 1–2 orta seviyeli (PM1–PM6) VEYA</b>
	<b>(iii) 1 güçlü (PS1–PS4) VE <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1–PP5) VEYA</b>
	<b>(iv) <math>\geq 3</math> orta seviyeli (PM1–PM6) VEYA</b>
	<b>(v) 2 orta seviyeli (PM1–PM6) VE <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1–PP5) VEYA</b>
	<b>(vi) 1 orta seviyeli (PM1–PM6) VE <math>\geq 4</math> destekleyici (PP1–PP5)</b>
<b>Benign</b>	<b>(i) 1 sadece (BA1) VEYA</b>
	<b>(ii) <math>\geq 2</math> güçlü (BS1–BS4)</b>
<b>Muhtemel Benign</b>	<b>(i) 1 güçlü (BS1–BS4) ve 1 destekleyici (BP1– BP7) VEYA</b>
	<b>(ii) <math>\geq 2</math> destekleyici (BP1–BP7)</b>
<b>VUS</b>	<b>Yukarıdaki kriterlerden hiç biriyle uyuşmayan YADA</b>
	<b>Benign ya da patojenikliğiyle ilgili çelişki varsa</b>

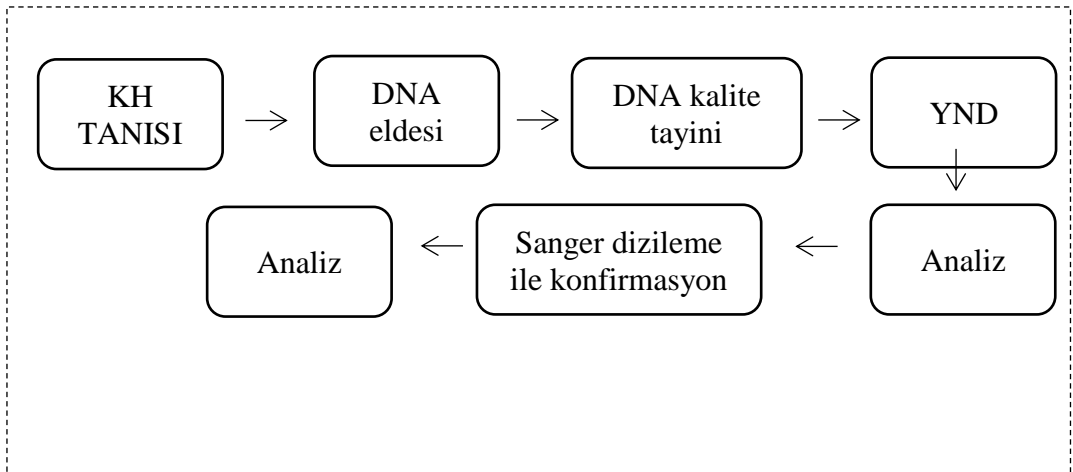
## 5. MATERYAL METOT

Bu tez çalışmasında Türkiye'deki farklı hastanelerin endokrinoloji ve pediatrik endokrinoloji bölümlerinden konjenital hipotiridi tanısı almış 35 kadın 28 erkek hasta olmak üzere toplam 63 hasta ile çalışılmıştır. Çalışmalar İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nde 214S637 kodlu Tübitak projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Medipol Üniversitesi Etik Kuruluna yapılan başvuru sonrasında çalışma için proje kapsamında etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmada KH tanısı alan kişiler, varsa ebeveynleri ve kardeşlerinden EDTA'lı tüplere alınan periferik tam kan örnekleri kullanılmıştır. Alınan kan örnekleri, soğuk zincirle aynı gün merkezimize ulaştırılmış, otomatize sistem ile DNA izolasyonu ve kalite tayini yapılmıştır. Dizileme çalışmaları için TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit (FC-134-2001) kullanılmış, "TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit Reference Guide" protokolü izlenerek MiSeq cihazı ile dizileme gerçekleştirilmiştir [45]. Cihaz çıktıları analiz programları kullanılarak anote edilmiş, nokta mutasyonları, küçük delesyonlar ve insersiyolar incelenmiştir.

KH ile ilgili literatür taraması sonrasında hastalıkla ilişkilendirilen genler belirlenmiş ve custom bir panel dizayn edilmiştir. Bu tarama OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)'de; konjenital hipotiroidi, dishormonogenez, disgenез ve tiroid gibi anahtar kelimeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Panel kapsamında incelenen genler Tablo 5.1'de, çalışma kapsamında izlenecek metodoloji Şekil 5.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.1. KH panelinde bulunan genler, gen referans ID'leri ve ilgili yayın kodları**

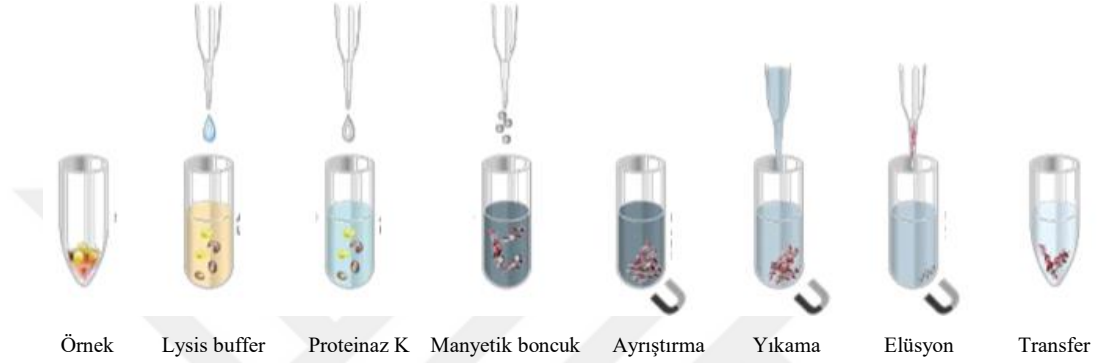
Gen sembolleri	Gen referans ID no	PMID
<i>PAX8</i>	7849	23647375, 9590296
<i>NKX2-1</i>	7080	24714694, 11854319
<i>NKX2-5</i>	1482	16418214
<i>FOXE1</i>	2304	20484477, 9697705
<i>TSHR</i>	7253	22876533, 7528344
<i>SLC5A5</i>	6528	16418213, 9171822
<i>SLC26A4</i>	5172	11932316, 9398842
<i>TG</i>	7038	23164529
<i>TPO</i>	7173	27166716, 12938097
<i>DUOX2</i>	50506	27166716, 24423310
<i>DUOXA2</i>	405753	21367925
<i>IYD</i>	389434	18765512
<i>SLC26A7</i>	115111	30333321
<i>DUOX1</i>	53905	28633507
<i>GLIS3</i>	169792	26259131, 16715098
<i>TSHB</i>	7252	2792087
<i>THRA</i>	7067	23940126, 22168587



**Şekil 5.1. Çalışma kapsamında izlenecek metodoloji**

### 5.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, MagPurix (Zinext) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. EDTA'lı kandan DNA izolasyonuna uyumlu MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200 (Cart. OP02001-48) kullanılmıştır. Bu cihazda manyetik boncuk teknolojisini kullanılmaktadır. Cihazdaki robotik sistem Şekil 5.2.'deki görseldeki gibi sırasıyla numuneye lysis, binding, washing ve elution buffer'ları ekleyerek izolasyon prosesini gerçekleştirir [46].



Şekil 5.2 MagPurix manyetik boncuklu izolasyon işlemi

Kit içeriğinde bulunan kartuşta 10 adet kuyucuk bulunmaktadır. Bu kuyucuklarda bulunan ürünler Tablo 5.2'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. MagPurix 'Kandan DNA izolasyonu kiti' kartuş kuyucuk içerikleri

Kuyucuk No	İçerik
1	Proteinaz K solüsyonu
2	Lysis buffer
3	Binding buffer
4	Manyetik boncuk solüsyonu
5	Washing buffer
6	Washing buffer
7	Washing buffer
8	Elution buffer
9	Elution buffer
10	Boş

## 5.2. DNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesinin belirlenmesi

Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve kalite tayini Qubit 3.0 cihazı ile florometrik olarak ve Spectra Max i3 cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Spectra Max i3 cihazının ‘microplate reader’ özelliği kullanılarak 2 mikrolitre DNA plate’in bir kuyucuguna, izolasyonda kullanılan elution buffer ise bir kuyucuğa konulmuştur. Bu şekilde DNA’nın konsantrasyonu buffer’ın aynı dalgaboylarında verdiği ışımaya kıyaslanarak elde edilmiştir.  $260/280 \geq 1.8$  olan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir [47]. Yeterli verim alınamayan örnekler için izolasyon tekrarlanmıştır. Qubit cihazı için dsDNA BR Reagent (Q32853) kullanılmıştır. Herbir örnek için 1 mikrolitre boya, 199 µl buffer olacak şekilde örnek sayısı+2 olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Örnek sayısından iki fazla sayıda tüp hazırlanıp numaraları işaretlenmiştir. İki tüpe 190 µl, geri kalan tüplere 198 µl olacak şekilde karışımdan dağıtılmıştır. Ardından ilk iki tüpe kit içeriğinde olan standart1 ve standart2 solüsyonlarından 10’ar µl eklenmiştir. Ortalama 2 dakika beklenerek cihazda okuma yapılmıştır. Ardından örnek tüplerindeki karışımların üzerine 2’şer µl DNA örneklerinden konup ortalama iki dakika beklenerek ölçüm sonuçları alınmıştır [48]. Bu ölçülen genomik DNA’lar 10 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilmiştir.

## 5.3. Truseq Custom Amplikon Low Input Protokolü

10 ng/µl’ye getirilen DNA’lar santrifüj edilmiştir. Tec semi-skirted PCR plate’inde kullanılacak kuyucuklar işaretlenmiş, her biri kuyucuğa 1 µl Sample Stabilizasyon solüsyonu 1 ve ardından 3 µl Resuspension Solüsyonu 1 dağıtılmış, pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarıboş bırakılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 1 µl DNA örneği dağıtılmış ve Thermal Cycler’da HYB programında çalıştırılmıştır. HYB programı “TruSeq custom amplicon low input kit reference guide” da bildirilmiştir [45].

### 5.3.1. Pozitif ve negatif kontrol hazırlama

2,5 µl Control Oligo Pool ile 2,5 mikrolitre Resuspension solüsyonu 1,5 ml’lik eppendorf tüpte birleştirilmiştir. 2 µl 2800M (Control DNA 2800M), 2 µl RS1 ve 1 µl SS1 1,5 mililitrelik eppendorf tüpte birleştirilmiştir. 5 µl 2. tüpten alınmış ve pozitif kontrol kuyucuguna koyulmuştur, üzerinde 1. tüpten 5 µl koyulmuştur. Hazırlanan bu

kuyucuk pozitif kontrol örneğidir. 5 µl RS1 negatif kontrol olarak işaretlenen kuyucuğa koyulmuştur. Hazırlanan bu kuyucuk ise negatif kontrol örneğidir.

### **5.3.2. Custom amplicon oligo tüp hazırlanması**

DNA Lobind tüp içinde CAT, RS1 ile 1:1 oranında sulandırılmıştır. Her bir örnek kuyusuna 5 µl dağıtılmıştır. 15 µl Oligo Hybridization for Sequencing 2 tüm kuyucuklara yavaş yavaş eklenmiş ve 3-5 defa pipetaj yapılmıştır. Örnekler Thermal Cycler’da HYB programında çalıştırılmıştır.

### **5.3.3. Ürün pürifikasyon boncuğu ile örnek saflaştırması**

Oda sıcaklığına getirilen beadler en az 1 dakika vortexlenmiştir. PCR plate’i Thermal Cycler’den alınıp oda sıcaklığına gelmesini takiben her bir kuyucuğa 25 mikrolitre ürün pürifikasyon boncuğu konup pipetaj yapılmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra manyetik standı konup, örneklerin boncuğa yapışması beklenmiştir. İyice şeffaflaştıktan sonra süpernatant çekilmiştir. Her bir kuyucuğa 80 µl Stringent Wash 1’den koyulmuştur. Plate manyetik stand üzerinde hareket ettirilip, süpernatant çekilip atılmıştır. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanıp takiben her kuyucuğa 80 µl yeni hazırlanmış %60’lık etanol dağıtılmıştır ve plate manyetik stand üzerinde hareket ettirilip ardından tüm alkol pipetle alınıp atılmıştır. Oda sıcaklığından 5 dakika inkübe edilip tüm etanol uzaklaştırılmıştır.

137 µl Extension-ligation buffer, Extension ligation tüpüne aktarılarak ELE-ELB (extension-ligation buffer, extension-ligation enzyme) mixi hazırlanmıştır. Etanolü uzaklaştırılmış plate’in her bir kuyucuğuna 22 µl ELB-ELE mixinden eklenip pipetaj yapıp Thermal Cycler’da Extension & Ligation programında çalıştırılmıştır. Program “TruSeq custom amplicon low input kit reference guide” da bildirilmiştir [45].

### **5.3.4. İndex bağlama**

PCR bittikten sonra plate oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. İndex bağlama işlemi buz üstünde yapılacağından bu sırada kırık buz alınır. Turuncu kapaklı i7 indexleri her sütuna ayrı olacak şekilde 4’er µl her kuyucuğa dağıtılmıştır. Her index tüpü kullanıldıktan sonra turuncu kapağı atılıp yeni kapak takılmıştır. Ardından i5

indexleri her bir satıra ayrı numaralar olacak şekilde yine 4'er µl olarak dağıtılmıştır. Her index tüpü kullanıldıktan sonra beyaz kapağı atılıp yeni kapak takılmıştır. Indexler konduktan sonra örnek başı 21 µl zenginleştirilmiş master karışım (Enhanced Master Mix) ile örnek başı 1,1 µl Zenginleştirilmiş DNA polimerazı (Enhanced DNA Polimerase) karıştırılarak oluşturulan mix'den her bir kuyucuğa 20 µl koyulup pipetaj yapılmasına takiben Thermal Cycler cihazında Illumina 3 programı çalıştırılmıştır. Program "TruSeq custom amplicon low input kit reference guide" da bildirilmiştir [45].

### **5.3.5. Temizleme aşaması**

PCR protokolü tamamlandıktan sonra plate cihazdan çıkarılmıştır. Yeni bir midi plate'in her bir kuyucuğuna örneklerden 45 µl süpernatant çekilip ardından her bir kuyucuğa 36 µl ürün pürifikasyon boncuğu eklenmiştir. 1800 rpm' de 2 dakika karıştırılıp homojen olana kadar pipet ile pipetaj yapılmıştır. 5 dakika oda ısısında inkübe edilip 280xg'de 1 dakika santrifüj edilmesini takiben manyetik standda alınmıştır. Yaklaşık 2 dakika süpernatant berraklaşana kadar beklenilip 81 µl süpernatant çekilip atılmıştır. Ardından her bir kuyuya yeni hazırlanmış %80 etanol eklenip manyetik stand üzerinde hareket ettirilmesini takiben alkol pipetle çekilip atılmıştır. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmıştır. Tüm alkolü uzaklaştırmak için plate manyetik standtan alınıp, 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Her bir kuyuya 25 µl Resuspension Buffer eklenip 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılıp, ardından pipet ile pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışmaları sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilip 280xg'de 1 dakika santrifüj edilip ardından manyetik standda koyulmuştur. Yaklaşık 2 dakika bekletilerek süpernatantın berraklaşması sağlanmıştır. Yeni bir midi plate alınıp eski plate'deki örneklerden 20'şer µl süpernatant yeni midi plate'e aktarılıp +4°C'de saklanmıştır. Eski midi plate'te kalan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütmek üzere kaldırılmıştır.

### **5.4. Agaroz jel elektroforezi**

Örnekleri yürütmek için %4'lük agaroz jel hazırlanmıştır. 4 gr agaroz tartılıp 100 ml TAE ile mikrodalga fırında ısıtılmıştır. TAE hazırlamak için 4.84 gr 2M Trisbase, 1.21 ml 1M asetik asit ve 0.372 gr 50 mM EDTA tartılarak 1lt deiyonize su ile çözülür

ve 1X lik TAE buffer elde edilir. Agaroz tamamen çözüldükten sonra 4 µl biomatik boya eklenerek, tarakları takılmış tanka dökülüp donması beklenmiştir. Örnekler Ladder ile birlikte 100V'da 30 dk yürütülmüştür. Pozitif kontrol örneğinden 310 bp'de bant vermesi, örneklerin 350 bp dolaylarında bant vermesi ve negatif kontrolün bant vermemesi beklenmektedir. Bu aşamalar doğru şekilde tamamlandığından normalizasyon aşamasına geçilebilmiştir.

### **5.5. Kütüphane normalizasyonu**

Her bir örnek için 44 µl Library Normalization Additives1 ve her bir örnek için 8 µl Kütüphane normalizasyon boncuğu-1 olacak şekilde mix hazırlanmıştır. 20'şer µl örneğin olduğu plate +4° C'den çıkarılmıştır. Her bir kuyucuğa 45 µl mix'den eklenip 1800 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Bu sırada kartuş çözünmeye bırakılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra flow cell oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Isı bloğu 98 dereceye ayarlanmıştır. Plate karıştırıcıdan alınıp üzeri açılarak manyetik standda koyulup yaklaşık iki dakika süpernatantın berraklaşması beklenmiştir. Tüm süpernatant pipetle çekilip atılmıştır. Plate manyetik standtan alınıp her bir kuyucuğa 45 µl kütüphane normalizasyon yıkama-1 eklenmiştir. 1800 rpm'de 5 dakika karıştırılıp ardından manyetik standda alınmıştır ve süpernatantın berraklaşması için yaklaşık iki dakika bekletilmiştir. Süpernatant pipetle çekilip atılmış, tekrar 45 µl kütüphane normalizasyon yıkama solüsyonu eklenip 1800 rpm'de 5 dakika karıştırılmıştır. Manyetik standda alınıp yaklaşık iki dakika süpernatantın berraklaşması beklenmiş, ardından süpernatant pipetle çekilip atılmıştır. Plate manyetik standtan alınmıştır. Her kuyuya 20 µl yeni hazırlanmış 0.1N NaOH eklenmiştir. 1800 rpm'de 5 dakika karıştırılıp ardından pipet ile pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Tekrar manyetik standda alınıp süpernatantın berraklaşması beklenmiştir. Yeni bir PCR plate'i çıkarılıp bu yeni PCR plate'inin her bir kuyucuğuna 30 µl Library Normalization Storage buffer2 (LNS2) dağıtılmıştır. Midi plate'den 30 µl süpernatant çekilip, LNS2 eklediğimiz yeni PCR plate'ine koyulup 1000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından her bir kuyucuktan 5 µl örnek alınıp ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpte birleştirilmiştir. Bu işlem pooling işlemidir. Jelde ışması az olan örnekler için miktar 5 yerine 7 µl alınmıştır.



## **5.6. Örneklerin miseq cihazına yüklenmesi**

Pool hazırladığımız tüp +4°C 'de bekletilmiştir. Kartuştan çıkan ve oda sıcaklığına gelmiş olan Hybridization Buffer1'den 590 µl yeni bir eppendorf tüpüne aktarılıp ardından üzerinde pooling yaptığımız eppendorf tüpünden 10 µl alınarak eklenmiş, ardından kısa bir süre vortex yapıp 280xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Isıtıcı bloğa koyulup 98°C'de 2 dakika bekletilmiştir. Ardından hemen buz üzerine koyulup beş dakika bekletilmiştir. Hazırlanmış olan bu kütüphane, kartuşun ilgili bölümüne yüklenmiştir.

Cihaz çıktıları giriş bölümünde de belirtildiği gibi ANNOVAR programı ile anote edilip referans genomuyla eşleştirilerek varyantlar çağırılmıştır. Analiz edilmek istenen varyantların özelliklerine göre filtreleme işlemi yapılmıştır.

## **5.7. Sanger dizileme**

Okuma sayısı az olan varyantların varlığını konfirme etmek ve aday varyantların hastanın aile üyelerinde de bakılarak segregasyonunu öğrenmek için "altın standart" olarak kabul edilen Sanger dizileme metodu uygulanmıştır.

### **5.7.1. Primer dizaynı**

Hem aday varyantların segregasyonuna bakmak hem de okuma sayısı düşük varyantların konfirmasyonu için 24 primer çifti dizayn edilmiştir. Bu dizileme için NCBI Blast kullanılmış olup, dizilenen primerler ve bilgileri Tablo 5.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.3. Tasarlanan primer dizileri**

<b>Primer no</b>	<b>Gen sembolü</b>	<b>Ekzon-intron lokasyonu</b>	<b>Forward primer dizisi (5'-3')</b>	<b>Reverse primer dizisi (5'-3')</b>	<b>Bağlanma sıcaklığı (°C)</b>
1	<i>TG</i>	Ekzon 2	ATGAGAGCCCGTCTCTGTC	GGGGAAGGCACAAGATG	59
2	<i>TG</i>	Ekzon 12	GAGCCACACAGAGCAGG	AGTGTGGGGCTCTGTCCTC	60
3	<i>TG</i>	Ekzon 17	ATGCTCAGTCGTCCCGAG	ACGCCTCCATATCTCGGTC	59
4	<i>TG</i>	Ekzon 18	CAGAGGAAATCCCAAACAAAG	TTTCTGACACCGTAACCCTG	58
5	<i>DUOX2</i>	Ekzon 8	TGGGCTCAGACCCTTCC	CAGCTCATTCTGCACCTTTC	59
6	<i>DUOX2</i>	Ekzon 17	AGGAATTGACCTGAAGGCG	CGCTTGTGATAATGGAGTCG	60
7	<i>DUOX2</i>	Ekzon 25	AGGAGTGGAAAGCCCTCTG	TTCCATCTCCCCACTGT TTC	59
8	<i>SLC5A5</i>	Ekzon 13	AGCTTTTGAGTGCAGGCAG	AGCCTTGAGGCAGAGAGATG	59
9	<i>SLC6A4</i>	Ekzon 5	TTCAGCCTTTTGCCGTTG	TAAGAAGCCAAACCCCAGG	60
10	<i>IYD</i>	Ekzon 2	CGGTCACCTTATGACCAAGG	TTTTCCATTGTTGGAGTCACAC	60

11	<i>SLC26A7</i>	19 UTR	ACCCACCAAACCAACAGGAT	AGATGCCAGAGAAAGCACCT	59
12	<i>SLC26A7</i>	19 UTR	TGGACACAGTATTGTCTGAGCA	AGCCTTGGTGTGTGGAAGTC	59
13	<i>TSHR</i>	Ekzon 10	GCTCTCCTGGGCAATGTCTT	GGTGATGACCGTCAGCGTAT	60
14	<i>TG</i>	Intron 5	ATGCTGCTCGACTGCAGAAAT	TGCACATATGACACATGGAGGC	60
15	<i>SLC5A5</i>	1 UTR	GATTCCTAACCCAGGGAGCC	AGGAGCATGAGGGCAAAGAC	59
16	<i>TG</i>	Ekzon 9	CTTGGCACAAGAGGCACATT	ATCCACAGAGAGTGGCTTG	59
17	<i>TPO</i>	Ekzon 14	AGAGAGAAGCACCTCCAGA	CTACGCAGGTTCTCCATCG	59
18	<i>TPO</i>	Ekzon 8	CTGGGTGACCTTGA ACTCCC	GGGAGAGAGAAGCCACGATG	60
19	<i>TPO</i>	Ekzon 6	CGATGGCTCCCTCCAGTCTA	GCACGAGCAAGAACCCAGTA	60
20	<i>TPO</i>	Ekzon 9	AGCAGTACGTGGGTCCCTAT	TCCATGGGCTGAAGAAAGCC	60
21	<i>TPO</i>	Ekzon 15	AGGTTCTTCTAACCAGGCCTCT	AGTCAAAAAGTGAAGGACTTACCAC	59

### 5.7.2. PCR reaksiyonu

Dizayn edilen primerler ile BioMix™ Red ve MyTaq protokollerine uygun şekilde hazırlanan PCR karışımları Veriti Thermal Cycler cihazında Tablo 5.3’de belirtilen sıcaklıklara göre çalıştırılmıştır [49]. PCR protokolleri Tablo 5.4’de, cihaz koşulları Tablo5.5’de gösterilmiştir [50], [51].

**Tablo 5.4. PCR protokolleri**

<b>BioMix™ Red PCR protokolü</b>	<b>MyTaq™ DNA Polymerase PCR protokolü</b>
15 µl BioMix Red	10 µl 5x MyTaq Reaction Buffer
2 µl Template DNA	2 µl Template DNA
0,7 µl forward, 0,7 µl reverse Primer(20µM)	1 µl Forward, 1 µl Reverse Primer (20µM)
11,6 µl (ddH2O)	1 µl MyTaq DNA Polymerase
	35 µl (ddH2O)

**Tablo 5.5. PCR için cihaz koşulları**

<b>Step</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Devir</b>
İnitial denaturation	95	1 dk	1
Denaturation	95	15 sn	25
Annealing	Bkz. Tablo 3.3	15 sn	
Extension	72	10sn	

PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler %2’lik hazırlanan agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntülenmiştir.

### 5.7.3. PCR ürün temizleme aşaması

Agaroz jel elektroforezi sonunda doğru yerde bant görüntüsü veren PCR ürünleri için dizileme aşamasından önce fazla primer ve nükleotitlerden arındırmak için yıkama işlemi yapılmıştır. Applied Biosystems firmasının Exo-Sap-IT ürünü ile PCR ürününe protokolüne uygun şekilde muamele edilmiştir [52]. Protokole göre her 5 µl örnek için 2 µl ExoSAP- IT™ reagent kullanılmıştır. Thermal Cycler’da önce 37°C de 15 dakika, ardından 80°C’de 15 dakika inkübe edilip +4 °C’de saklanmıştır.

### 5.7.4. DNA dizileme

Exo-SAP ile pürifiye edilmiş PCR ürünü dizileme protokolü için +4’den çıkarılmıştır. Her bir reaksiyon için 1 µl BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 1 µl BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer ve 3,8 µl Deionize Su (RNase/DNase-free) karıştırılarak mix oluşturulmuştur. Her kuyucuğa, her bir reaksiyon için 5,8 µl mixden dağıtılır. Üzerine 3,2 pmol 0,7 µl primer eklenip pürifiye edilmiş PCR ürünlerinden 3,5 µl her bir kuyuya eklenmiştir. Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler cihazında, “BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit user guide” da belirtilmiş programa göre çalıştırılmış, koşullar Tablo 5.6’de belirtilmiştir [53].

**Tablo 5.6. Dizileme için gerekli cihaz koşulları**

Step	Sıcaklık (°C)	Süre	Devir
İnitial denaturation	96	1 dk	1
Denaturation	96	10 sn	25
Annealing	50	5 sn	
Extension	60	4 dk	
Hold	4		

### 5.7.5. PCR ürün saflaştırması

Saflaştırma için “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol” içerisinde bulunan Etanol/ EDTA/ Sodyum Asetat presipitasyon protokolü uygulanmıştır.

Plate, Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler’den alınır ve kısaca santrifüj cihazından döndürülüp örnek başına 1 µl 125mM EDTA ve 1 µl 3M Sodyum asetat olacak şekilde mix hazırlanmıştır. Her bir örneğin üzerine 2 µl hazırlanan mix’den eklenip üzerine 50 µl yeni hazırlanmış ve dolapta bekletilmiş %100 etanol eklenip üzeri seal ile sıkıca kapatılıp 4 kez ters-düz edilmiştir. Ardından oda ısısında 15 dakika inkübe edilip 1650xg’de 4°C de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Plate bir peçeteye ters çevrilip 185xg’de 1 dakika santrifüj cihazında spin edilmiştir. Ardından her bir kuyucuğa 35 µl yeni hazırlanmış ve soğutulmuş %70 etanol eklenip 1650xg’de 4°C de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Plate tekrar bir peçeteye ters çevrilip 185xg’de santrifüj cihazında kısa spin edilmiştir. Her bir kuyucuğa 10 µl formamid eklenilmiştir [54].

### 5.7.6. Kapiler elektroforez

Elektroforez aşaması ABI3500 Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirilmiştir. Modül olarak StdSeq50\_POP7, Polymer olarak POP-7 kullanılmıştır. Kapiler uzunluğu 50-cm’dir. “BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit user guide” protokolüne uygun şekilde çalışılmıştır [53].

### 5.8. Dizileme analizi

Sanger datarlarının analizi için QIAGEN CLC Genomic Workbench programı kullanılmıştır [55]. Referans genomu olarak Genom Referans Konsorsiyumu Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37, hg19) kullanılmıştır. Hasta dizileri referans genomu ile kıyaslanarak, nükleotid değişimleri saptanmıştır. Saptanan değişimlerin hem ailedeki segregasyonu incelenmiş, hem de yeni nesil dizileme sonuçlarının doğrulaması tamamlanmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemeler Tablo 5.7’de, kullanılan cihazlar ise Tablo 5.8’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.7. Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemeler**

<b>Sarf malzemeler</b>	<b>Marka</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Tec semi-skirted PCR plate	BIO-RAD	HSS9601
Eppendorf tüpü	NEST	605001
DNA Low binding tüp	eppendorf	30123,344
Midi plate	AXYGEN	P-DW-11-C-S
Etanol	Merck	1.00983.2500
NaoH	Sigma Aldrich	1.06498.1000
EDTA	Fisher Scientific	BP120-500
Sodyum Asetat	Sigma Aldrich	25022
Deiyonize su	Wisent	809-115-CL
Agaroz	Biomax	IB70073
Trizma Base	Sigma Aldrich	T1503
Loadig dye	Thermo Scientific	R0611
Ladder	Biomatik	M7123
Exo-Sap-IT	ABI	78201.1.ML
Formamid	MC Lab	SDI-100
Polymer POP-7	ABI	4393708

**Tablo 5.8. Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar**

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>	<b>Model</b>
Yeni nesil dizileme cihazı	Illumina	MiSeq
DNA izolasyon cihazı	Zinext	MagPurix
Spectramax cihazı	SpectraMax-Parandigm	Multi-Mode Microplate Detection Platform from Molecular Devices LLC
Qubit cihazı	ThermoFisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer
PCR cihazı	BIO-RAD	T100

PCR cihazı	Veriti	Veriti 96-well fast thermal cycler
Elektroforez cihazı	Wealtec	Wealtec Elite 300 plus
Agaroz jel görüntüleme cihazı	DNR Bio imaging systems	Minibis Pro- DNR Bio imaging systems
Vortex cihazı	VELP	VELP-Vortex-421516
Isı bloğu	Scigene	Hybex micro sample - Scigene
Shaker	Eppendorf	Eppendorf Themomixer C
Santrifüj cihazı	Tehtnica	Tehtnica Centric 200R - 400R
Soğutucu +4	Siemens	KD53NNW22N
Derin Dondurucu -20	Siemens	GS33VWV31N
Hassas Terazı	Shimadzu	D310030094
Mikrodalga Fırın	Siemens	HF12G240
Micro-pipet seti	Gilson	Pipetman set
Sanger dizileme cihazı	Applied Biosystems	ABI3500 Genetic analyzer



## 6. BULGULAR

### 6.1. Çalışmaya alınan hastaların klinik bulgular

İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezine Türkiye'deki farklı coğrafi bölgelerden endokrinolog ve pediatrik endokrinologlar tarafından gönderilen KH tanısı almış, ailede akraba evliliği saptanan, ebeveynleri tarafından onam formu imzalanmış 63 olgu 214S637 nolu Tübitak Projesi kapsamında çalışmaya dahil edilmiştir. Olgularla birlikte varsa ebeveynlerinden ve sağlıklı/hasta kardeşlerinden de periferik kan örneği alınmıştır. Tüm olgularda akraba evliliği mevcut olup doktorları tarafından alınan tanıları, cinsiyetleri ve kardeşlik durumları Tablo 6.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 6.1. Demografik Bilgiler**

Aile	Hasta	Cinsiyet	TANI	Akraba evliliği
1	1A	K	Hipotiroidi	Mevcut
	1B	K	Hipotiroidi	
2	2A	K	Dishormonogenez	Birinci derece kuzen evliliği
	2B	E	Dishormonogenez	
3	3A	K	Dishormonogenez	Birinci derece kuzen evliliği
	3B	E	Dishormonogenez	
4	4A	E	Dishormonogenez	Birinci derece kuzen evliliği
	4B	E	Dishormonogenez	
	4C	E	Dishormonogenez	
5	5A	E	Kardeş olgu	Birinci derece kuzen evliliği
	5B	K	Dishormonogenez	
	5C	K	Dishormonogenez	
6	6A	K	Agenezi	Birinci derece kuzen evliliği
7	7A	K	Sol lob agenezi	İkinci derece kuzen evliliği

8	8A	K	Hipoplazi	Birinci derece kuzen evliliği
9	9A	E	Hipoplazi	Birinci derece kuzen evliliği
10	10A	E	Hipoplazi	Birinci derece kuzen evliliği
11	11A	K	Hipoplazi	Birinci derece kuzen evliliği
12	12A	E	Hipoplazi	Birinci derece kuzen evliliği
13	13A	K	Ağır boy kısalığı, geri kemik yaşı, zeka geriliği	Birinci derece kuzen evliliği
	13B	K		
14	14A	E	TSH yüksekliği	Mevcut
	14B	E		
15	15A	E	KH	Birinci derece kuzen evliliği
	15B	E	Dishormonogenez	
16	16A	K	Primer hipotiroidi	Mevcut
	16B	E	Yüksek TSH	
17	17A	K	Dishormonogenez	Mevcut
	17B	E	Dishormonogenez	
18	18A	K	TSH yüksekliği	Birinci derece kuzen evliliği
	18B	K		
19	19A	K	Yüksek TSH	Birinci derece kuzen evliliği
	19B	K		
20	20A	K	KH	Birinci derece kuzen evliliği
	20B	E		
21	21A	K	Yüksek TSH, tiroid USG abnormal	Birinci derece kuzen evliliği
	21B	K		
22	22A	E	Yüksek TSH	

	22B	E		Üçüncü derece akraba evliliği
23	23A	K	Hipotiroidi ve Down tanılı	Birinci derece kuzen evliliği
	23B	K	Hipotiroidi	
24	24A	K	Yüksek TSH	Birinci derece kuzen evliliği
	24B	E		
25	25A	K	Yüksek TSH, Dishormonogenez	Birinci derece kuzen evliliği
	25B	E	Yüksek TSH	
	25C	E	Yüksek TSH	
26	26A	E	Yüksek TSH	Mevcut
	26B	E		
27	27A	K	KH	İkinci derece kuzen evliliği
	27B	E		
28	28A	K	Konjenital Hipotiroidi	Mevcut
	28B	K		
29	29A	K	Konjenital guatr ve KH	Mevcut
30	30A	E	Konjenital guatr ve KH	Mevcut
	30B	E		
31	31A	K	Konjenital guatr ve KH	Mevcut
	31B	K		
32	32A	K	Konjenital guatr ve KH	Birinci derece kuzen evliliği
	32B	K		
33	33A	E	Agenezi	Birinci derece kuzen evliliği
34	34A	K	Hipotiroidi	Mevcut
35	35A	K	Hipotiroidi	Mevcut
	35B	E		

## 6.2. Yeni Nesil Dizilime Sonuçları

Illumina Truseq Custom Amplicon Low Input Protokolü ile MiSeq cihazında yapılan dizileme işlemini takiben, ANNOVAR programı kullanılarak elde edilen datalar referans genomu olarak Genom Referans Konsorsiyumu (*Genome Reference Consortium Human Build 37*) ile eşleştirilerek varyantlar çağrılmıştır. Cihazdan .vcf dosyası olarak alınan datalar ClinVar, OMIM, HGMD ve HGVS veritabanlarından elde edilen bilgilerin bulunduğu bir excell formatına dönüştürülmüştür. Her hasta için kromozom numarası, kromozom lokasyonu, varyantın patojenite değeri, değişen nükleotid bilgisi, referans nükleotid bilgisi ve dbSNP numarası gibi bilgilerin olduğu bir excel dosyası elde edilmiştir. Bu excell dosyaları her bir hasta için 9000-10000 arası varyant bilgisi içermektedir. Bu varyantlar öncelikle bir filtreleme aşamasından geçirilmiş ardından bahsedilmiş olan tüm veritabanlarında tek tek incelenmiştir. Elde edilen excell dosyasının bir kısmı örnek olarak Tablo 6.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 6.2. YND sonucu elde edilen varyant listesi örneği**

Chr	dbSNP	Start	End	Ref	Alt	CLNSIG	ExonicFunc.refGene
chr1	rs8997	949654	949654	A	G	.	synonymous SNV
chr1	rs2799066	977330	977330	T	C	Benign	.
chr1	rs2465128	981931	981931	A	G	Benign	synonymous SNV
chr1	rs10267	982994	982994	T	C	Benign	synonymous SNV
chr1	rs9442391	984302	984302	T	C	Benign	synonymous SNV
chr1	rs9803031	987200	987200	C	T	Benign	.
chr1	rs4275402	990280	990280	C	T	Benign	synonymous SNV
chr1	rs307377	1269554	1269554	T	C	.	nonsynonymous SNV
chr1	rs307362	1277533	1277533	T	C	.	synonymous SNV
chr1	rs874516	1635004	1635004	T	C	.	synonymous SNV
chr1	rs1136997	1635749	1635749	C	A	.	synonymous SNV
chr1	rs1059822	1636044	1636044	G	A	.	synonymous SNV
chr1	rs72901773	1647778	1647778	C	G	.	.
chr1	rs72901775	1647814	1647814	T	C	.	synonymous SNV
chr1	rs72909014	1647871	1647871	T	C	.	synonymous SNV
chr1	rs2229110	1957037	1957037	T	C	Benign	synonymous SNV
chr1	rs28408173	1960674	1960674	C	T	Benign	synonymous SNV
chr1	rs28398772	1961466	1961466	C	T	Benign	synonymous SNV
chr1	rs11586985	2337277	2337277	C	T	Likely_benign	.
chr1	rs2494598	2340200	2340200	T	C	Benign	synonymous SNV
chr1	rs4648658	2560882	2560882	G	A	.	synonymous SNV

### **6.3. Yeni nesil dizileme sonucunda hastalarda tespit edilen varyantlar**

Varyantlar filtrelenirken sinonim değişimler elenmiştir. Ardından dbSNP, 1000 Genome ve ExAC değerleri %1'den büyük olan varyantlar çıkarılmış ve geri kalan varyantlar klinik veri tabanları kullanılarak değerlendirilmiştir. Her hastadan elde edilen varyantlar ve bazı veri bankalarındaki varyant bilgileri Tablo 6.3'de gösterilmiş, benign varyantlar düşük patojenite değerleri sebebiyle tabloya eklenmemiştir. Yapılan filtrelemeler sonrasında bulunan varyantların ilgili hastadaki okuma sayıları ve kaliteleri, hasta BAM dosyalarının IGV programında çalıştırılmasıyla kontrol edilmiştir. Ortalama 20 okumanın altında kalan varyantlar elenmiştir.



**Tablo 6.3. Hastaların YND sonuçlarının filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi**

Hasta Kodu	Kromozom	Pozisyon	Referans allel	Örnek allel	Gen sembolü	Gen bölgesi	Protein varyantı	dbSNP ID	Translasyon etkisi	MAF	Zigosite
2B	2	1426940	G	T	<i>TPO</i>	intronik		rs28909374	-	T=0.0233 /2521 (ExAC)	homo zigot
	2	1507727	C	G	<i>TPO</i>	ekzonik	N798K	-	missense	-	homo zigot
2A	2	1426940	G	T	<i>TPO</i>	intronik		rs28909374	-	T=0.0233 /2521 (ExAC)	homo zigot
	2	1507727	C	G	<i>TPO</i>	ekzonik	N798K	-	missense	-	homo zigot
	2	1437204	C	A	<i>TPO</i>	intronik	-	rs78253418		0.0212	homo zigot
4A	2	1480993	G	A	<i>TPO</i>	ekzonik	G319R	rs1043843717	missense	A=0.0000 08/1 (TOPMED)	homo zigot
	8	134026010	G	A	<i>TG</i>	intronik	-	rs2020940	-	-	homo zigot
4B	2	1480993	G	A	<i>TPO</i>	ekzonik	G319R	rs1043843717	missense	A=0.0000 08/1 (TOPMED)	homo zigot

	17	38249450	G	C	<i>THRA</i>	ekzonik	V310L	-	missense	-	homo zigot
4C	2	1480993	G	A	<i>TPO</i>	ekzonik	G319R	rs104384 3717	missense	A=0.0000 08/1 (TOPME D)	homo zigot
	17	28549980	C	G	<i>SLC6A4</i>	intronic	-	rs202094 0	-	G=0.0176 /88 (1000 Genomes)	homo zigot
5B	17	28545221	T	A	<i>SLC6A4</i>	ekzonik	N205Y	-	missense	-	homo zigot
5C	17	28545221	T	A	<i>SLC6A4</i>	UTR	-	rs729989 48	-	A=0.0110 /551000g enom	homo zigot
6A	2	1457594	C	T	<i>TPO</i>	ekzonik	P204L	rs746942 915	missense	T=0.0000 6/7 (ExAC)	homo zigot
	8	13390999 0	C	T	<i>TG</i>	ekzonik	A1033V	rs780538 772	missense	T=0.0000 7/9 (ExAC)	homo zigot

8A	8	13392051 3	C	T	TG	ekzonik	Y1310=	rs143023 529	sinonim	T=0.0001 /18 (ExAC)	homo zigot
11A	15	45391997	A	G	DUOX2	ekzonik	M1093T	rs127332 5710	missense	-	homo zigot
12A	8	92408426	A	G	SLC26A7	UTR	-	rs976124 800	-	G=0.0001 /18 (TOPME D)	homo zigot
	8	13388037 5	C	T	TG	ekzonik	A28V	rs114543 085	missense	T=0.0002 /20 (ExAC)	homo zigot
13A ve 13B	19	17999159	C	T	SLC5A5	ekzonik	R516*	rs371248 346	nonsense	T=0.0000 2/3 (ExAC)	homo zigot
16A	15	45402883	G	C	DUOX2	ekzonik	P303R	rs151261 408	missense	C=0.0107 /1290 (ExAC)	homo zigot
16B	8	92409428	T	G	SLC26A7	UTR	-	rs789793 12	-	G=0.0146 /73 (1000 Genomes)	homo zigot



20A	14	81609751	G	A	<i>TSHR</i>	ekzonik	R450H	rs189261 858	missense	A=0.0003 /35 (ExAC)	homo zigot
	8	13388037 5	C	T	<i>TG</i>	Ekzonik	A28V	rs114543 085	missense	T=0.0002 /20 (ExAC)	homo zigot
21A ve 21B	8	92301450	G	A	<i>SLC26A7</i>	ekzonik	G94R	-	missense	-	homo zigot
	6	15072375 5	A	G	<i>IYD</i>	UTR	-	rs568274 468	-	G=0.0020 /10 (1000 Genomes)	homo zigot
25A ve 25B	8	13388547 1	G	A	<i>TG</i>	intronik	-	rs774274 702	-	A=0.0000 3/3 (ExAC)	homo zigot
28A ve 28B	2	1488506	G	A	<i>TPO</i>	ekzonik	rs778515 113	Rs778515 113	missense	A=0.0000 7/9 (ExAC)	homo zigot
29A	2	1520714	G	A	<i>TPO</i>	ekzonik	G860R	rs556552 435	missense	A=0.0000 2/3 (ExAC)	homo zigot

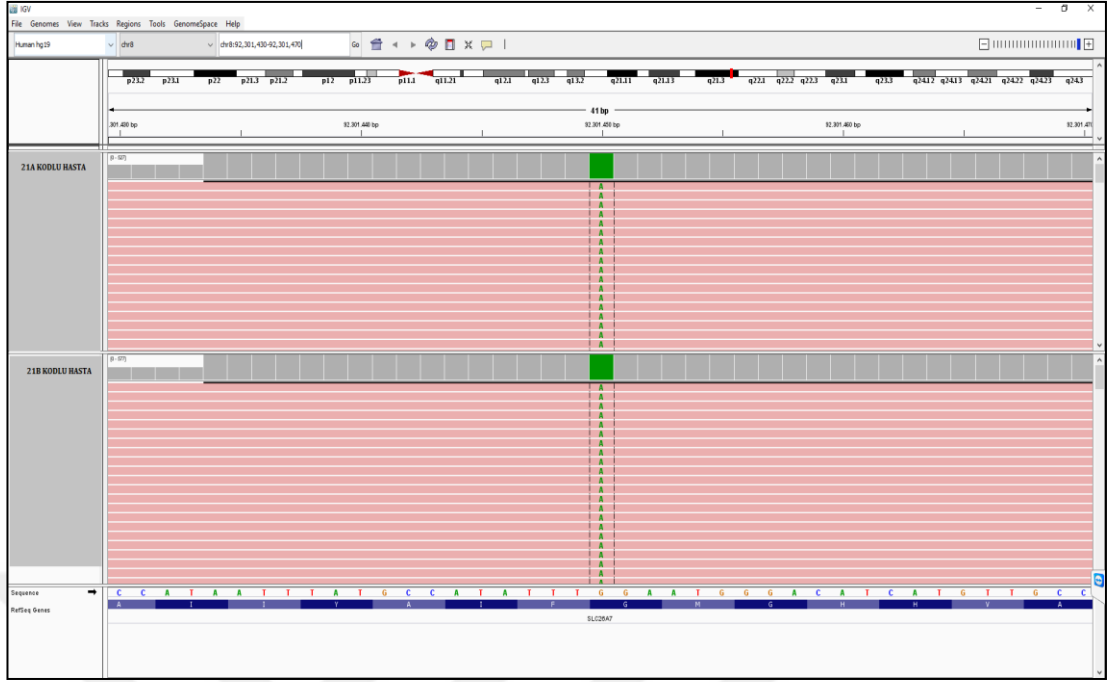
<b>31A ve 31B</b>	<b>2</b>	<b>1507728</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b><i>TPO</i></b>	<b>ekzonik</b>	<b>E799K</b>	<b>rs121908 085</b>	<b>missense</b>	<b>A=0.0002 /1 (1000 Genomes</b>	<b>homo zigot</b>
<b>32A ve 32B</b>	<b>2</b>	<b>1480981</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b><i>TPO</i></b>	<b>ekzonik</b>	<b>Q315*</b>	<b>-</b>	<b>nonsense</b>	<b>-</b>	<b>homo zigot</b>
<b>34A</b>	<b>8</b>	<b>13391910 6</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b><i>TG</i></b>	<b>ekzonik</b>	<b>R1270C</b>	<b>rs754517 497</b>	<b>missense</b>	<b>T=0.0002 /23 (ExAC)</b>	<b>hetero zigot</b>

#### 6.4. Yeni nesil dizileme sonucunda tespit edilen aday novel varyantlar

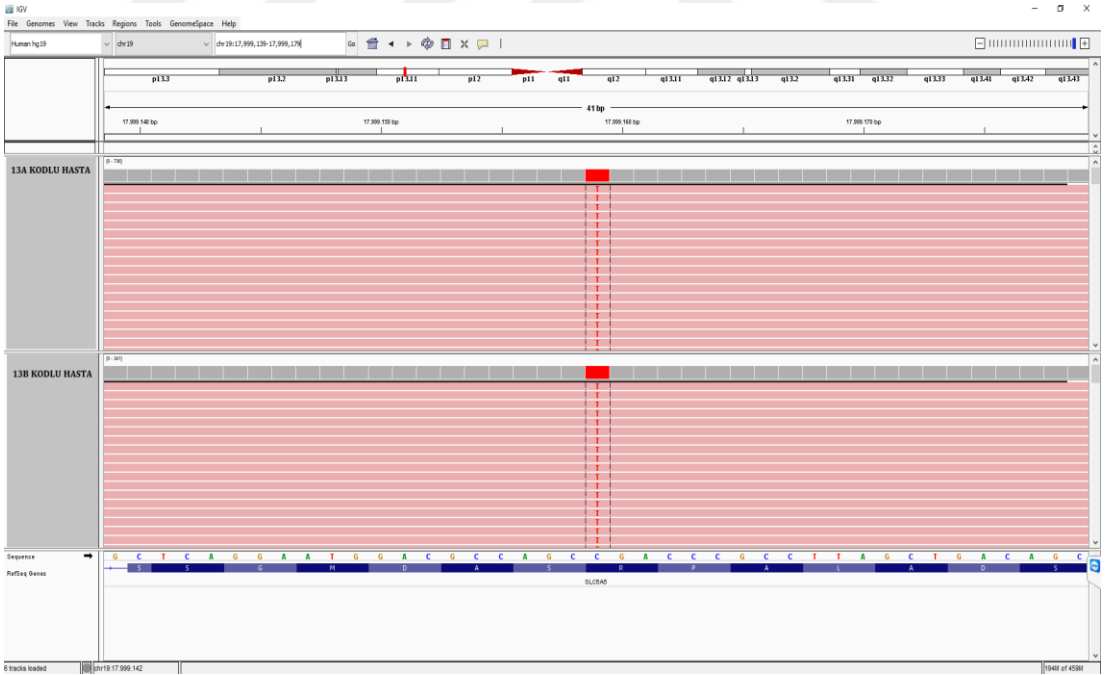
YND analizleri sonrasında elde edilen aday varyantların IGV görüntülerinin, okuma derinlikleriyle birlikte değerlendirilmesi sonunda 2 olası novel varyant tespit edilmiştir. Bu varyantların fonksiyonel etkilerinin belirlenmesinde *in silico* tahmin araçları kullanılmıştır. Her tahmin aracının çalışma prensibi farklı olduğundan aynı varyant için farklı fonksiyonel etki bildirebilmektedirler. Bu sebeple *in silico* tahmin gereçlerinin sonuçlarının oluşan değişimin klinikteki etkisini belirlemedeki başarıları göreceli hale gelmiştir [56]. Aday novel varyantlar ve *in silico* analiz sonuçları Tablo 6.4’de belirtilmiş, IGV görüntüleri Şekil 6.1- 6.2’de gösterilmiştir. Her iki varyant için de kalite okuma sayısı görülmüştür.

**Tablo 6.4 Aday novel varyantların *In silico* analiz sonuçları**

Gen sembolü	Varyant	Hasta kodu	Mutation Taster	SIFT	FATHMM	Mutation Assessor
<i>SLC26A7</i>	G94R	21A 21B	Disease causing	Damaging	Damaging	High
<i>SLC5A5</i>	R516*	13A 13B	Disease causing automatic	-	Neutral	-



**Şekil 6.1.** 21A ve 21B kodlu hastaların *SLC26A7* geni üzerindeki G94R değişiminin IGV görüntüsü

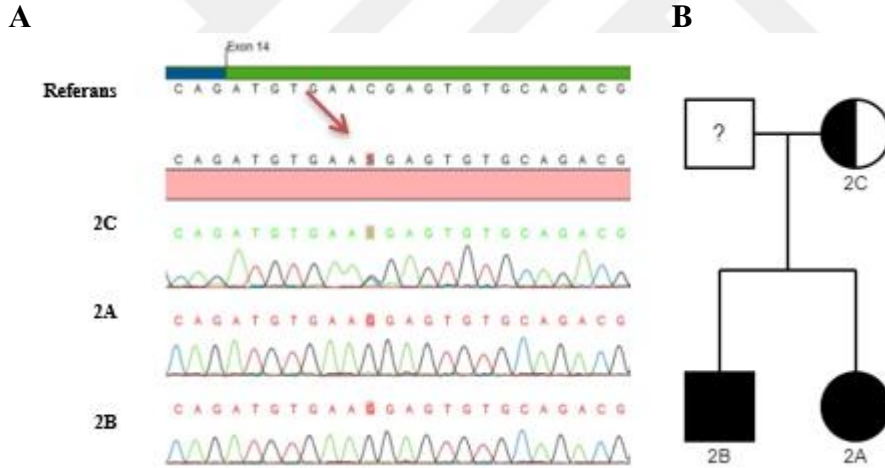


**Şekil 6.2.** 13A ve 13B kodlu hastaların *SLC5A5* geni üzerindeki R516\* değişiminin IGV görüntüsü

### 6.5. Sanger dizi analizi ile variant doğrulanması ve aile segregasyonu

IGV programı ile okuma sayıları ve bilgileri kontrol edilen varyantların içinde okuma sayısı sınırdan geçen, tek yönlü okuma elde edilmiş olan varyantlar için ve varyantların segregasyonunun gözlemlenmesi için olguların kendisinde ve varsa aile bireylerinde sanger dizileme tekniği ile bilinen nokta mutasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Her aile, hasta olgudaki varyant açısından analiz edilmiş olup Şekil 4.3- 4.23'de sanger dizileme verileri ile pedigree şemaları gösterilmiştir.

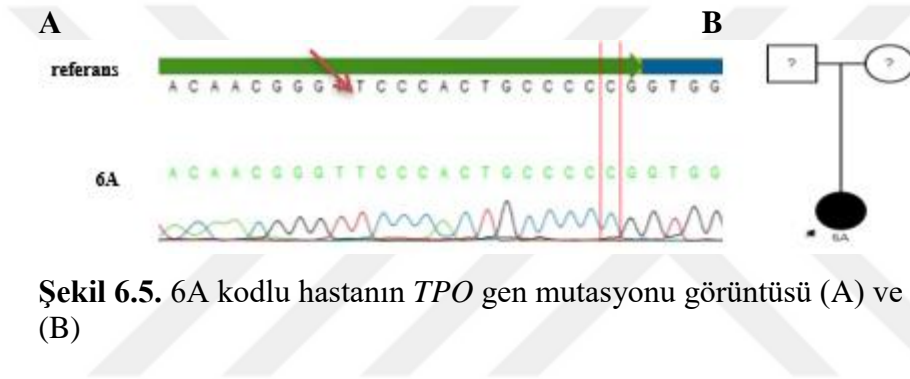
Yapılan çalışmalar sonucunda *TPO* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda N798K, G319R, P204L, G493S, G860R, E799K ve Q315\* aminoasit değişimleri gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonları Şekil 6.3 – 6.9'da gösterilmiştir.



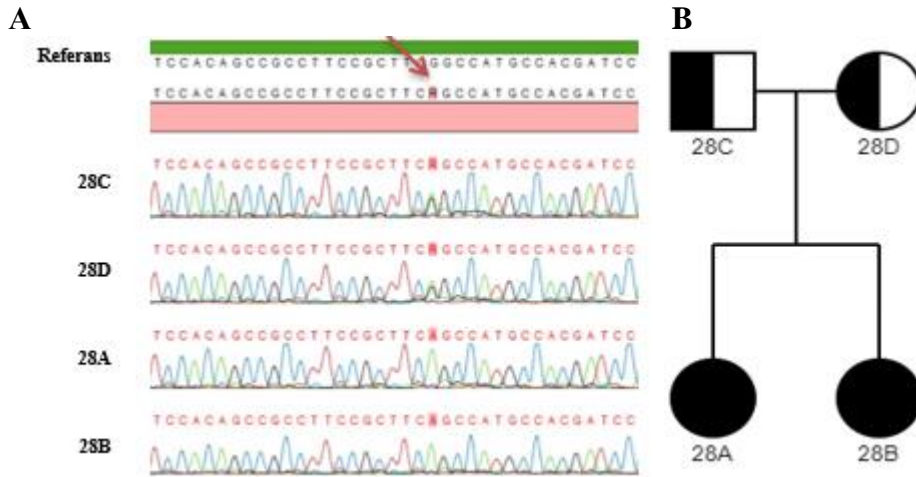
**Şekil 6.3.** 2A ve 2B kodlu hastalar ile 2C kodlu bireylerin *TPO* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigree şeması (B)



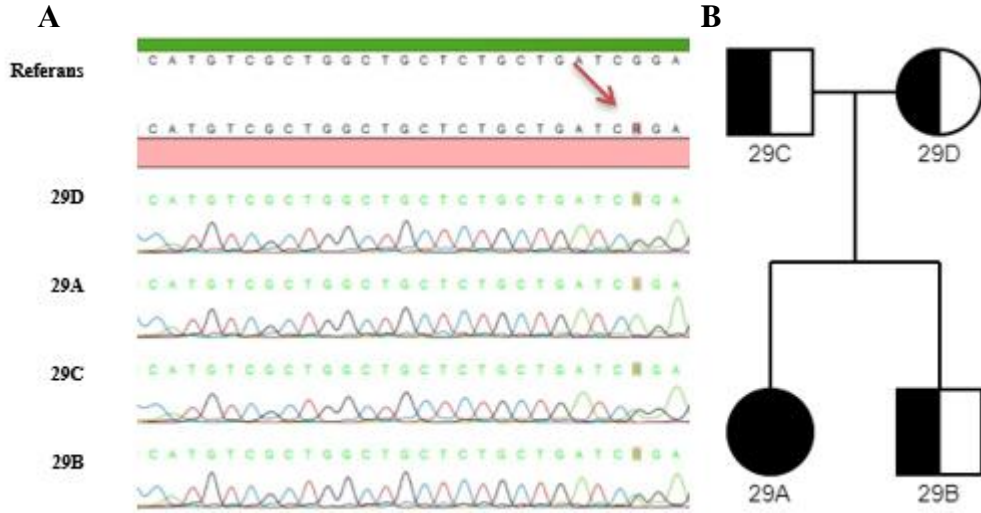
Şekil 6.4. 4A, 4B ve 4C kodlu hastaların *TPO* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)



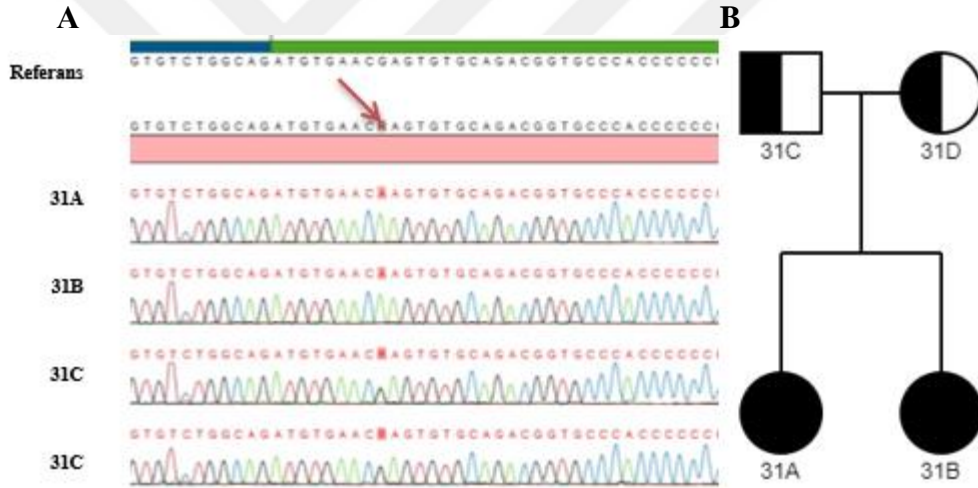
Şekil 6.5. 6A kodlu hastanın *TPO* gen mutasyonu görüntüsü (A) ve pedigrî şeması (B)



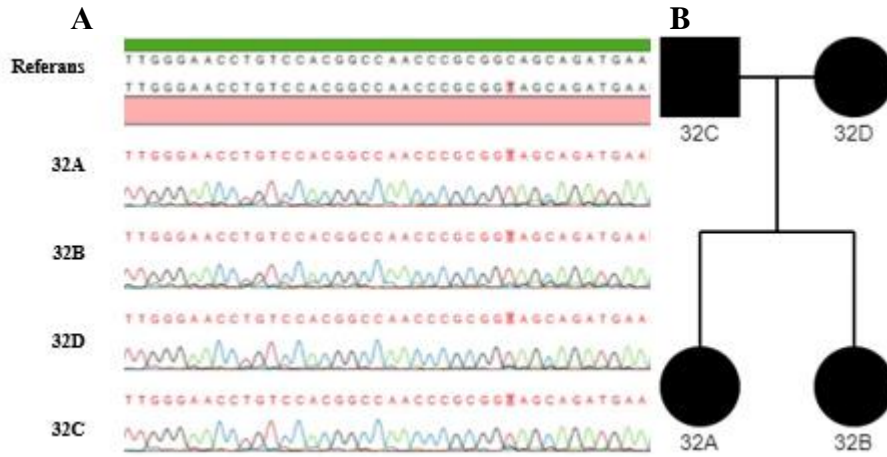
Şekil 6.6. 28A ve 28B kodlu hastalar ile 28C ve 28D kodlu bireylerin *TPO* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)



**Şekil 6.7.** 29A kodlu hasta ile 29B, 29C ve 29D kodlu bireylerin *TPO* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)

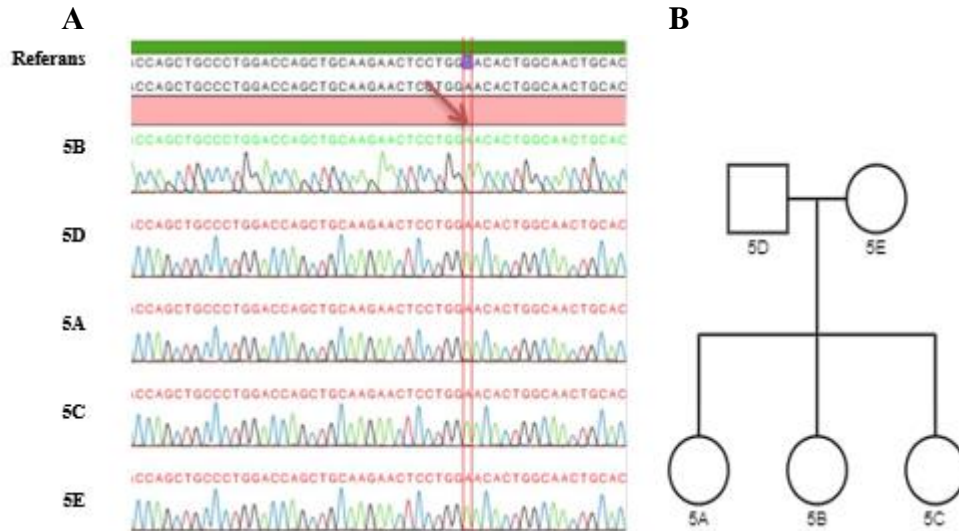


**Şekil 6.8.** 31A ve 31B kodlu hastalar ile 31C ve 31D kodlu bireylerin *TPO* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)



**Şekil 6.9.** 32A ve 32B kodlu hastalar ile 32C ve 32D kodlu bireylerin *TPO* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)

Yapılan çalışmalar sonucunda *SLC6A4* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda N205Y aminoasit değişiminin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonu Şekil 6.10'da gösterilmiştir.



**Şekil 6.10.** 5A, 5B ve 5C kodlu hastalar ile 5D ve 5E kodlu bireylerin *SLC6A4* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)



Yapılan çalışmalar sonucunda *TG* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda A1033V, A28V, R1270C aminoasit değişimleri ile rs774274702 dbSNP numarası ile intronik varyant gözlemlenmiştir. Y1310= aminoasit değişiminin ise bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonları Şekil 6.11- 6.16'da gösterilmiştir



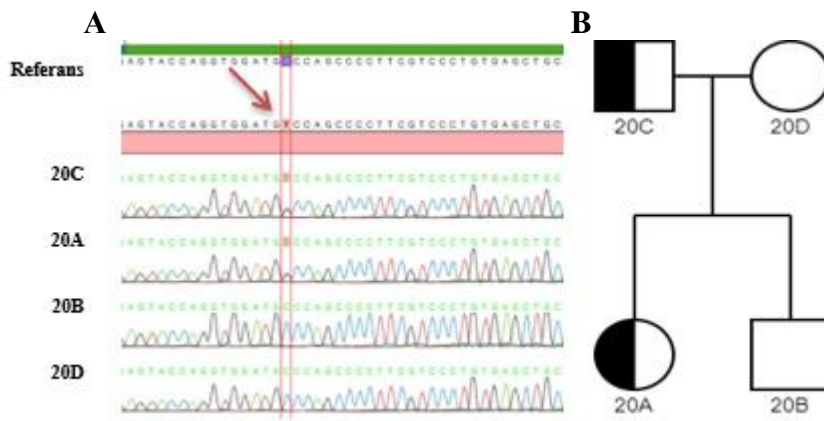
**Şekil 6.11.** 6A kodlu hastanın *TG* gen mutasyonu görüntüsü (A) ve pedigrî şeması (B)



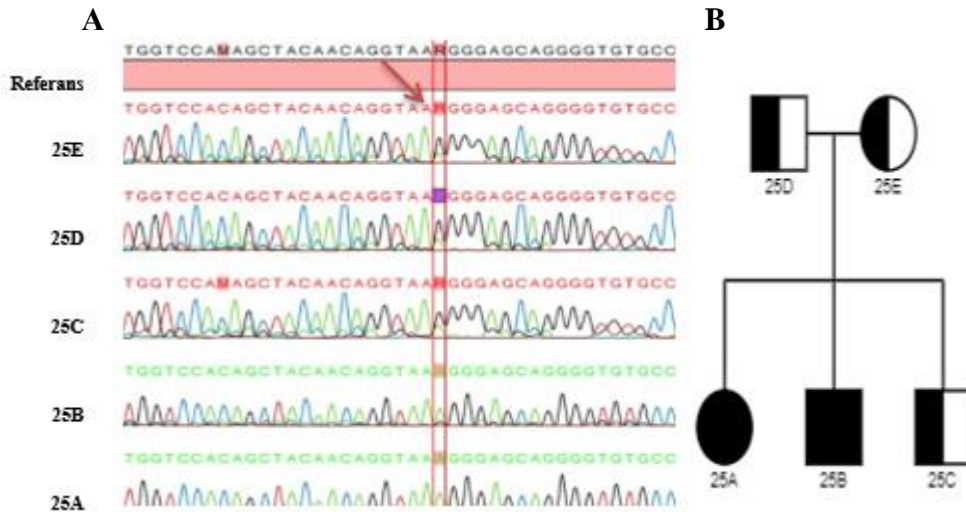
**Şekil 6.12.** 8A kodlu hastanın *TG* gen mutasyonu görüntüsü (A) ve pedigrî şeması (B)



Şekil 6.13. 12A kodlu hastanın *TG* gen mutasyonu görüntüsü (A) ve pedigrî şeması (B)



Şekil 6.14. 20A ve 20B kodlu hastalar ile 20C ve 20D kodlu bireylerin *TG* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)



Şekil 6.15. 25A, 25B ve 25C kodlu hastalar ile 25D ve 25E kodlu bireylerin *TG* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)

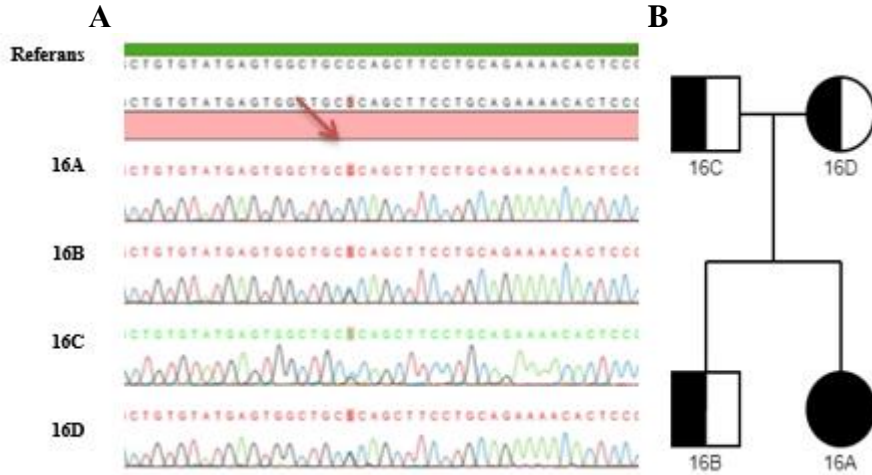


**Şekil 6.16.** 34A kodlu hastanın *TG* gen mutasyonu görüntüsü (A) ve pedigrî şeması (B)

Yapılan çalışmalar sonucunda *DUOX2* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda M1093T ve P303R aminoasit değişimleri gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonları Şekil 6.17- 6.18’de gösterilmiştir.



**Şekil 6.17.** 11A kodlu hastanın *DUOX2* gen mutasyonu görüntüsü (A)ve pedigrî şeması (B)

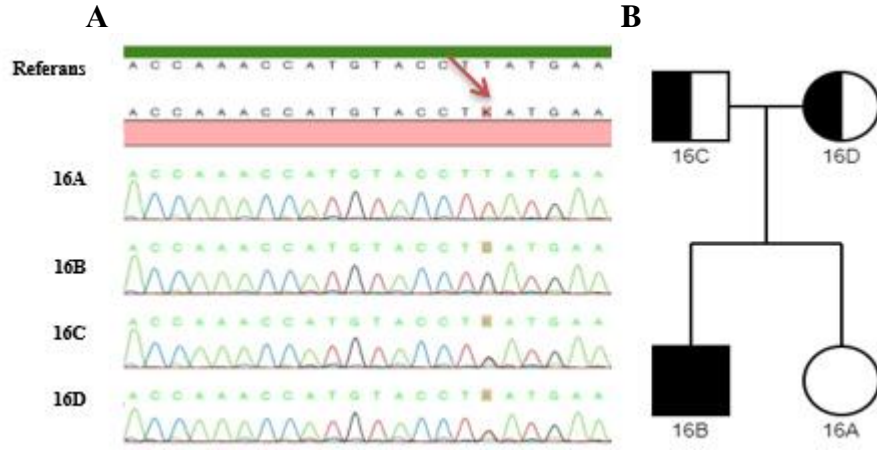


**Şekil 6.18.** 16A ve 16B kodlu hastalar ile 16C ve 16D kodlu bireylerin *DUOX2* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigri şeması (B)

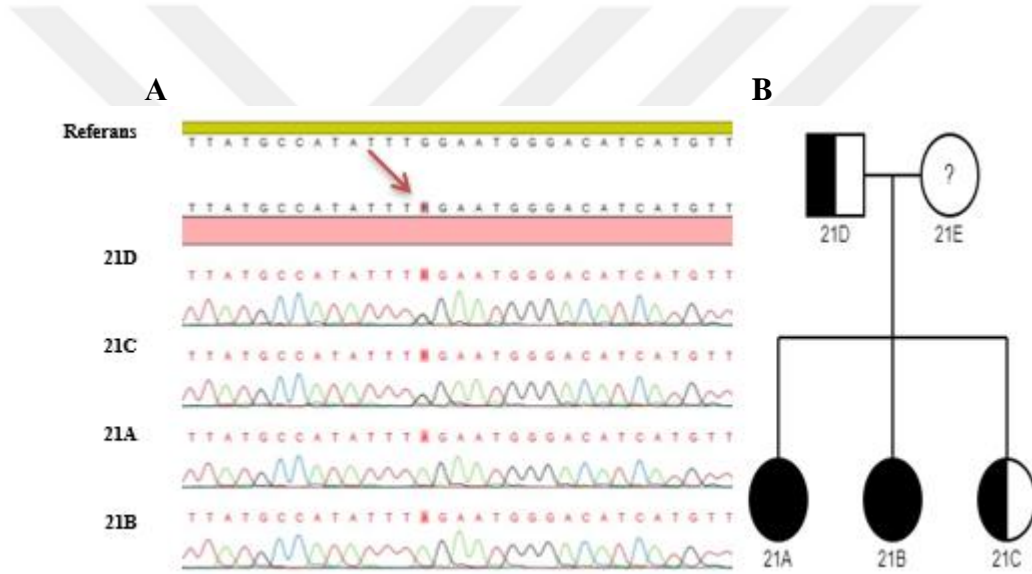
Yapılan çalışmalar sonucunda *SLC26A7* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda G94R aminoasit değişimi ile rs976124800 ve rs78979312 dbSNP numaraları ile UTR varyantlar gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonları Şekil 6.19-6.21’de gösterilmiştir.



**Şekil 6.19.** 12A kodlu hasta ile 12B ve 12C kodlu bireylerin *SLC26A7* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigri şeması (B)

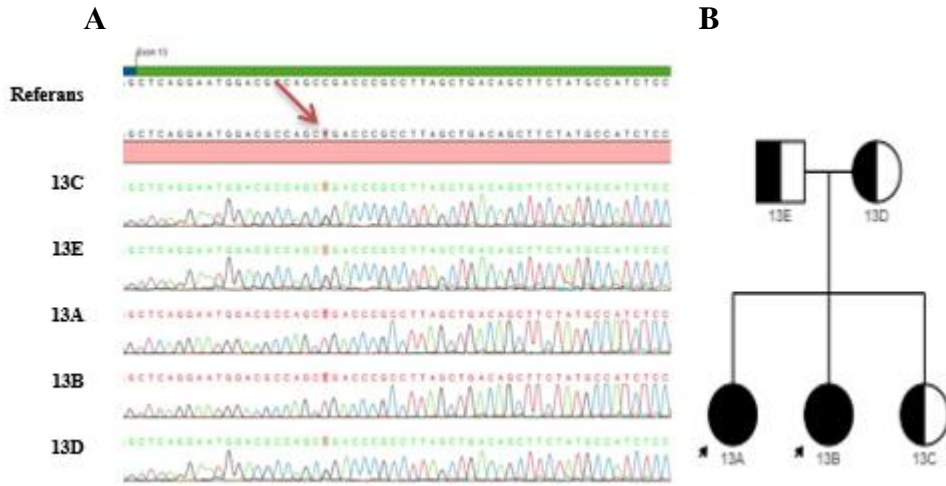


**Şekil 6.20.** 16A ve 16B kodlu hastalar ile 16C ve 16D kodlu bireylerin *SLC26A7* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrisi (B)



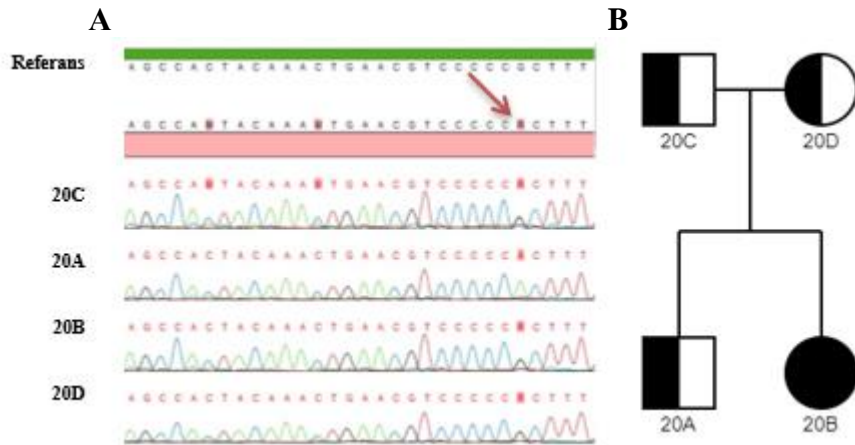
**Şekil 6.21.** 21A ve 21B kodlu hastalar ile 21C ve 21D kodlu bireylerin *SLC26A7* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrisi (B)

Yapılan çalışmalar sonucunda *SLC5A5* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda R516\* aminoasit değişimi gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonları Şekil 6.22’de gösterilmiştir.



**Şekil 6.22.** 13A ve 13B kodlu hastalar ile 13C, 13D ve 13E kodlu bireylerin *SLC5A5* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)

Yapılan çalışmalar sonucunda *TSHR* geninde bulunan ve yeni nesil dizileme analizi sonuçlarını doğrulamak için yapılan Sanger dizilemeleri sonucunda R450H aminoasit değişimi gözlemlenmiştir. Bu değişime sebep olan nokta mutasyonu Şekil 6.23'de gösterilmiştir.



**Şekil 6.23.** 20A ve 20B kodlu hastalar ile 20C e 20D kodlu bireylerin *TSHR* gen mutasyonu görüntüleri (A) ve pedigrî şeması (B)

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

KH çocukluk çağında tedavi edilmediğinde gelişimsel bozukluklara sebep olabilmektedir. Tedavi edildiğindeyse mental retardasyon gibi sebep olabileceği bir çok hastalığın önlenmesi mümkündür [57]. Hastalığın genetik etiyojisi üzerine uzun süredir çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde genetik analizler hastalığın patogeneziyi açıklamakta, hastalıkla ilişkilendirilmiş olan her yeni bulgu moleküler mekanizmayı bir adım daha aydınlığa kavuşturmaktadır.

Çalışılan her hasta sayesinde yeni veriler elde edilmekte, özellikle KH tanısı bulunan aileler için gelecek nesillerde hastalığın görülme riski önceden göz önünde bulundurularak takibinin yapılması sağlanmaktadır. KH otozomal resesif geçişli olarak kalıtıldığından, özellikle akraba evliliği bulunan ailelerde görülme sıklığı daha yüksektir [58]. Türkiye, akraba evliliği açısından oldukça yüksek bir orana sahip olduğundan, gen havuzu daralmaktadır ve özellikle otozomal resesif geçişli hastalıklar açısından görülme sıklığı, akraba evliliğinin sık görülmediği ülkelere göre yüksek orandadır [7]. Bugüne kadar, 15'den fazla gen KH ile ilişkilendirilmiştir ve yeni genler literatüre katılmaya devam etmektedir. Bu çalışmamızda KH ile ilişkilendirilmiş 17 gen ile çalışılmıştır. Bu genler hem dishormonogenez hem de disgenез ile ilişkilendirilmiş genlerdir ve literatür taraması sonucunda oluşturulacak panele eklenmek üzere seçilmiştir. KH tanısında 2004 yılı öncesine kıyasla görülen artışın sebebi Bakanlık taramasıyla topuk kanından TSH değeri tayininin zorunlu hale gelmiş olması olarak görülebilir [7].

Çalışmalarımız sırasında incelediğimiz bir ailede 2004 yılı öncesinde doğan, TSH taraması yapılmamış olan ve patojenik mutasyon taşıdığından ileri seviye mental retardasyon gözlenen bir hastanın ailesinde, aynı mutasyona sahip diğer kardeş bakanlık taraması sonucunda TSH yüksekliği sebebiyle ilaç kullanmaya başlamış ve bu sayede sağlıklı bir gelişim göstermiştir. Bu aile bize KH'nin sebep olabileceği sonuçları ve doğru genetik danışmanlık ve yönlendirme sayesinde oluşturabileceği hasarların önlenebileceğini çok açık bir şekilde göstermiştir.

Bu tez çalışmasında yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak 35'i kadın 28'i erkek toplam 63 hastanın DNA dizisi incelenmiştir. Bu dizileme KH ile ilişkilendirilen ve daha önce bahsetmiş olduğumuz genleri içeren panel ile gerçekleştirilmiştir. Bu dizileme sonucunda hastalarımızda tespit edilen mutasyonlar, önce Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanmış, ardından doğrulanan varyantlar için hastaların anne, baba ve varsa sağlıklı kardeşlerinden alınan kanlardan elde edilen DNA'larda ilgili mutasyonlar açısından nokta mutasyonu taraması gerçekleştirilmiştir. En sık *TPO* geninde mutasyon gözlemlenmiştir. Ailesel segregasyonlar hastalık fenotipleriyle uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamız neticesinde panelimizde bulunan genler açısından 2 novel mutasyon tespit edilmiştir. Bunlardan ilki *SLC5A5* geninde bulunan R516\* aminoasit değişimine sebep olan rs371248346 dbSNP numaralı nonsense varyanttır. Bu değişim 13A ve 13B kodlu hastalarda görülmüştür. Diğer değişim ise *SLC26A7* geninde bulunan G94R aminoasit değişimine sebep olan missense varyanttır. Bu değişim 21A ve 21B kodlu hastalarda görülmüştür.

*SLC5A5* geni 90'lı yıllarda yapılan çalışmalarla KH ile ilişkilendirilmiştir [59, 60]. *SLC5A5* aktif iyot alınımında anahtar rol oynayan bir plasma membran proteini ve sodyum-iyot simporterıdır [21]. Bu çalışmalarda incelenen hastalarda da iyot transport defekti saptanmış, gen sodyum-iyot simporter fonksiyonu sebebiyle hastalığa sebep olabilecek aday bir gen olarak değerlendirilip, incelemeye dahil edilmiştir. Günümüze kadar bu gen üzerinde bir çok değişim tanımlanmıştır [21, 61]. Ancak tespit ettiğimiz R516\* aminoasit değişimi veribankalarında bulunmamaktadır. Bu çalışma ile literatüre yeni bir varyant bilgisi eklemiştir.

*SLC5A5* geninde novel bir mutasyon bulduğumuz ailedeki 13A ve 13B kodlu hastalarda ağır boy kısalığı, kemik yaşı ve zeka geriliği sebebiyle KH şüphesi oluşmuştur. Hastalarda TSH taraması yapılmış, yüksek TSH ve düşük serbest T4 değerleri bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda 9 ve 10 yaşlarında KH tanısı konan ve L-tiroxin tedavisi başlanan hastalarda devam eden tedavi ile bugün, serbest T4 ve TSH değerleri normale dönmüştür. Vakalarda diğer genler açısından patojenik hiç bir



mutasyon olmayışı, ailenin başka bir sağlıklı çocuğunun daha oluşu ve bu sağlıklı çocuğun, annenin ve babanın aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıyor oluşu, hasta çocuklarda başka herhangi bir hastalığın olmayışı ve başka bir ilaç kullanmıyor oluşları bu mutasyonun KH'ye sebep olduğunu kanıtlar niteliktedir.

*SLC26A7* geni ise literatüre yeni kazandırılmış bir genidir. Bu gen klorür, sülfat ve oksalat taşınmasında görevli bir anyon transportu olarak görev almaktadır [62]. *SLC26* membran protein ailesi üyesidir. 2018 yılında yayınlanmış 2 makaleyle birlikte KH ile ilişkilendirilmişlerdir [23, 63]. Bu çalışmalara kadar, yalnızca *SLC5A5* ve *SLC26A4* genlerinde oluşabilecek mutasyonlar sebebiyle iyot transport defekti sonucu tiroid dishormonogenezi oluşabileceği düşünülmüktü. Zou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 47 aileden 55 hastada tüm exom dizilemesi yapılmış, bu ailelerden birinde *SLC26A7* geninde 2 delesyon saptanmıştır. Bulunan mutasyonlar segregasyonla uyumlu aile fenotipleri ile desteklenmiştir [63]. Bu hastalar yüksek TSH değeri ve düşük serbest T4 değerleri sebebiyle çalışmaya seçilmişlerdir. Bizim çalışmamızda da aynı kriterler göz önünde bulundurularak hasta seçimi gerçekleştirilmiştir.

*SLC26A7* geninde oluşabilecek mutasyonların wildtype *SLC5A5* ve *SLC26A4* ile tolere edilemeyeceği, çünkü tiroid hormon sentezi için üç protein aktivitesinin de mevcut olması gerektiği bildirilmiştir. *SLC26A7* geninin KH ile ilişkilendirilmesi kayda değer bir bilgi olarak değerlendirilmiş, bu değerlendirmeyi üç aşamada desteklemişlerdir; birincisi, aile segregasyonunun uyumlu olması, ikincisi, normal bireylerde mutasyon gözlenmemesi, üçüncüsü ise *SLC26A7* delesyonu bulunan farelerde yapılan çalışmalarla genin hastalığa etkisinin desteklenmesidir [63].

Diğer çalışmada ise Cangül ve arkadaşları, birbiriyle ilişkisi bulunmayan 6 Türk, Pakistanlı ve Finli ailede yine exom dizilemesi sonucu *SLC26A7* geninde mutasyon saptamışlar ve ardından *in vitro* deneylerle *SLC26A7* geninin hipotiroidi ile ilişkisini desteklemişlerdir [23]. Bu çalışmada öncelikle farklı dokularda mRNA ekspresyonuna bakılıp, gen aktivitesinin en çok tiroid dokusundan olduğu gözlemlenmiş, ardından GFP etiketli vektörler transfekte edilmiş wildtype ve mutant

HEK293 hücre hatlarında immunohistokimyasal boyamalar yapılmış ve normalin dışında hücrel lokalizasyon gözlemlenmiştir. Bu yayınlardan elde edindiğimiz bilgi ile *SLC26A7* geni de gen panelimize eklenmiştir.

Bu varyantı elde ettiğimiz aile; hasta kardeşlerin ikisinin de bu değişimi homozigot mutant olarak taşıması ve sağlıklı kardeş ile sağlıklı babalarının bu varyantı heterozigot olarak taşıması, genin patojenitesinin uyumlu bir segregasyon göstermesini fenotipleriyle kanıtlamışlardır. Bu ailedeki vakalar 21A ve 21B kodlu hastaların ikisi de bakanlık taraması sonucu yüksek TSH değerleri göstermiş, tanıları hemen konmuş ve ilaç tedavilerine başlanmıştır. Her iki hasta da normal seyrinde bir gelişim göstermekte ve aynı varyantı heterozigot olarak taşıyan sağlıklı kardeşlerinde de herhangi bir problem gözlemlenmemiştir. Bu iki olguda hipotiroidi ile ilişkilendirilmiş diğer genlerde patojenik bir mutasyona rastlanmamış olması da literatüre yeni kazandırılmış *SLC26A7* geninin KH'ye etkisini ve bu bağlamda yapılan eski çalışmaları destekler niteliktedir.

Tiroid hormon sentezi doğrudan iyot metabolizmasıyla ilişkilidir. Bu sebeple sodyum-iyot simpoterları büyük öneme sahiptir. İyot, sodyum-iyot kanalları ile tiroid folikül hücrelerine taşınır. Bazal membranda yer alan bu kanalların oluşumunda olabilecek mutasyonlar doğrudan iyot metabolizmasını etkilemekte ve iyot geçişini sekteye uğrattığı için tiroid hormonlarının üretilmemesine sebep olmaktadır. *SLC5A5* geninde tanımladığımız mutasyon stop kodona dönüşerek proteinin doğru şekilde üretilmemesine ve iyot metabolizmasında fonksiyonel bozukluk sonucu hipotiroidi ile doğrudan ilişkilendirilebilmiştir. *SLC26A7* geni ise bazolateral membranda lokalize olmakta ve hücre içi asit-baz homeostazına etki edebilmektedir. Hücre içi pH değişimi hem mevcut enzimlerinin çalışmasını olumsuz etkileyebilmekte, hem de iyot alımını etkileyerek tiroid hormon sentezinde bozukluklara sebep olabilmektedir. *SLC26A7* geninde tanımladığımız mutasyon bir missense mutasyondur. Mutasyon sonucu farklı bir protein yapısının oluşmasına sebep olması ve *in silico* tahmin araçlarınca çok güçlü hastalık yapıcı etki gösterdiğinden hipotiroidi ile ilişkilendirilmiştir.

Bu iki varyantın dışında, çalışmamızdaki olgularda daha önce literatürde KH ile ilişkilendirilmiş; *TPO* geninde beş, *DUOX2* geninde bir, *SLC26A7* geninde bir, *TSHR* geninde bir varyant Sanger dizilemesi ile doğrulanmıştır. Panelimizde bulunan genler açısından herhangi bir mutasyon saptanamamış hastalar 3. nesil dizileme çalışmalarına yönlendirilerekmiştir.

Tanımlanan değişimlerle KH'yle ilgili literatüre ve tiroid fizyolojisinin anlaşılmasına yönelik çalışmalara özgün bir katkı sağlanmıştır. Bu değişimlerin tanı amaçlı kullanılan veribankalarına kaydedilmesiyle de ileriki dönemde yapılacak genetik taramalara ve araştırmalara da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## 8. KAYNAKLAR

- [1] H. Cangül, K. Demir, H. Ö. Babayiğit, A. Abacı, and E. Böber, “The Missense Alteration A5T of the Thyroid Peroxidase Gene is Pathogenic and Associated with Mild Congenital Hypothyroidism,” vol. 7, no. 3, pp. 238–241, 2017.
- [2] C. H., A. B.K., and B. F., “A Homozygous TPO Gene Duplication (c1184-1187dup4) Causes Congenital Hypothyroidism in Three Siblings Born to a Consanguineous Family,” *J. Pediatr. Genet.*, vol. 4, no. 4, pp. 194–198, 2015.
- [3] <https://www.omim.org/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [4] Cangul, H., Aycan, Z., Saglam, H., Forman, J. R., Cetinkaya, S., Tarim, O., ... & Bas, V. TSHR is the main causative locus in autosomal recessively inherited thyroid dysgenesis. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 25(5-6), 419-426, 2012.
- [5] Baş, V. N., Aycan, Z., Cangul, H., Kendall, M., Ağladıoğlu, S. Y., Çetinkaya, S., & Maher, E. R. A common thyroid peroxidase gene mutation (G319R) in Turkish patients with congenital hypothyroidism could be due to a founder effect. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 27(3-4), 383-387, 2014.
- [6] D. Dilli, S. Özbaş, D. Acıcan, N. Yamak, M. Ertek, and U. Dilmen, “Newborn Screening Programme for Congenital Hypothyroidism in Turkey,” *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, 2013.
- [7] <https://dosyaism.saglik.gov.tr/Eklenti/11173,259822214447pdf.pdf?0>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [8] Rabbiosi, S., Vigone, M. C., Cortinovis, F., Zamproni, I., Fugazzola, L., Persani, L., ... & Weber, G. Congenital hypothyroidism with eutopic thyroid gland: analysis of clinical and biochemical features at diagnosis and after re-evaluation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(4), 1395-1402, 2013.
- [9] M. Rastogi, “Congenital hypothyroidism,” *Orphanet J. Rare Dis.*, 2010.
- [10] A. Diaz and E. G. L. Diaz, “Hypothyroidism,” *Pediatr. Rev.*, 2018.
- [11] J. Alm, L. Hagenfeldt, A. Larsson, and K. Lundberg, “Incidence of congenital hypothyroidism: retrospective study of neonatal laboratory screening versus clinical symptoms as indicators leading to diagnosis.,” *Br. Med. J.*, vol. 289, no.

6453, pp. 1171–5, 1984.

- [12] B. A., “Newborn Screening for Congenital Hypothyroidism,” *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, vol. 5, no. 1, pp. 8–12, 2013.
- [13] M. Castanet, M. Polak, C. Bonaïti-Pellié, S. Lyonnet, P. Czernichow, and J. Léger, “Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: Familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 5, pp. 2009–2014, 2001.
- [14] I. C. Nettore, V. Cacace, C. De Fusco, A. Colao, and P. E. Macchia, “The molecular causes of thyroid dysgenesis: A systematic review,” *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 36, no. 8, pp. 654–664, 2013.
- [15] J. Léger, D. Marinovic, C. Garel, C. Bonaïti-Pellié, M. Polak, and P. Czernichow, “Thyroid developmental anomalies in first degree relatives of children with congenital hypothyroidism,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 2, pp. 575–580, 2002.
- [16] A. Mansouri, L. St-Onge, and P. Gruss, “Role of Pax genes in endoderm-derived organs,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 10, no. 4, pp. 164–167, 1999.
- [17] S. Ichiro, “Assignment of cardiac homeobox gene CSX to human chromosome 5q34,” *Int. J. Mol. Med*, 1995.
- [18] Thorwarth, A., Schnittert-Hübener, S., Schruppf, P., Müller, I., Jyrch, S., Dame, C., ... & Ebert, G. (2014). Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum. *Journal of medical genetics*, 51(6), 375-387.
- [19] I. Venza, M. Visalli, L. Parrillo, M. de Felice, D. Teti, and M. Venza, “MSX1 and TGF- $\beta$ 3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 5, pp. 1016–1025, 2011.
- [20] Y. Nagayama, K. D. Kaufman, P. Seto, and B. Rapoport, “Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 165, no. 3, pp. 1184–1190, 1989.
- [21] O. Dohan, C. Portulano, C. Basquin, A. Reyna-Neyra, L. M. Amzel, and N. Carrasco, “The Na<sup>+</sup>/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no.

- 51, pp. 20250–20255, 2007.
- [22] D. A. Scott, R. Wang, T. M. Kreman, V. C. Sheffield, and L. P. Karniski, “The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein,” *Nat. Genet.*, vol. 21, no. 4, pp. 440–443, 1999.
- [23] Cangul, H., Liao, X. H., Schoenmakers, E., Kero, J., Barone, S., Srichomkwun, P., ... & Tarim, O. Homozygous loss-of-function mutations in SLC26A7 cause goitrous congenital hypothyroidism. *JCI insight*, 3(20), 2018.
- [24] De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., ... & Miot, F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23227-23233, 2000.
- [25] S. M. Park and V. K. K. Chatterjee, “Genetics of congenital hypothyroidism,” *J. Med. Genet.*, vol. 42, no. 5, pp. 379–389, 2005.
- [26] J. E. Friedman, J. A. Watson, D. W. H. Lam, and S. E. Rokita, “Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 5, pp. 2812–2819, 2006.
- [27] N. Mahdied and B. Rabbani, “An overview of mutation detection methods in genetic disorders,” *Iran J Pediatr*, vol. 23, no. 4, pp. 375–388, 2013.
- [28] F. W. Nussbaum, Robert L; McInnes, Roderick R; Huntington, *Thompson & Thompson Genetics in Medicine 8eTh*. 2016.
- [29] Tabak Ahsen, Endokrinoloji Ve Metabolizma Polikliniğimizden Takipli Hastalarda Akraba Evliliği Sıklığı Ve Akraba Evliliğini Etkileyen Faktörler. Dr. Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.
- [30] Illumina Inc, “illumina An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.”, 2015.
- [31] <https://orbitbiotech.com/genome-sequencing-chain-termination-method/ctm/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [32] S. Ambardar, R. Gupta, D. Trakroo, R. Lal, and J. Vakhlu, “High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry,” *Indian J. Microbiol.*, vol. 56, no. 4, pp. 394–404, 2016.
- [33] [https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation sequencing](https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing), Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.

- [34] <https://emea.illumina.com/informatics/sequencing-data-analysis/sequence-file-formats.html>, Erişim tarihi 28 Mayıs 2019.
- [35] S. Tian, H. Yan, M. Kalmbach, and S. L. Slager, “Impact of post-alignment processing in variant discovery from whole exome data,” *BMC Bioinformatics*, vol. 17, no. 1, pp. 1–13, 2016.
- [36] T. Sam, B. A. M. Format, and S. Working, “SAM (Sequence Alignment / Map) Format Specification,” pp. 1–16, 2018.
- [37] <https://software.broadinstitute.org/software/igv/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [38] <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [39] <http://www.mutationtaster.org/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [40] <http://mutationassessor.org/r3/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [41] <http://fathmm.biocompute.org.uk/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [42] <http://sift.bii.a-star.edu.sg>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [43] <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019..
- [44] Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Voelkerding, K. 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*, 17(5), 405, 2015.
- [45] R. Guide, “TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit,” no. June, 2017.
- [46] Z. P. Magpurix, B. Dna, and E. Kit, “MagPurix Extraction Kit Handbook,” pp. 1–95, 2013.
- [47] A. Note, DNA and RNA absorbance measurements using SpectraMax Microplate Readers, 2015.
- [48] ThermoFisher Scientific, “Qubit dsDNA BR Assay Kit,” pp. 1–10, 2015.
- [49] Applied Biosystems, “Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler User Guide,” p. 124, 2010.
- [50] B. Red, “BioMix™ Red,” vol. 49, no. 0, p. 50020, 2018.
- [51] Bionline, “Standard MyTaq Protocol,” pp. 4–5, 2018.
- [52] A. Biosystems, “ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Brief Protocol,” no. 78200, 2017.

- [53] T. Fisher Scientific, “For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE,” *Thermo Fish.*, vol. 4337454, no. 4337457, pp. 1–50, 2016.
- [54] “Sequencing on ABI PRISM 3130x/ Genetic analyzer,” 2002.
- [55] “CLC Genomics Workbench - QIAGEN Bioinformatics.” <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/>, Erişim tarihi: 28 Mayıs 2019.
- [56] T. A. Peterson, E. Doughty, and M. G. Kann, “Towards precision medicine: Advances in computational approaches for the analysis of human variants,” *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 21, pp. 4047–4063, 2013.
- [57] Cangul, H., Aycan, Z., Olivera-Nappa, A., Saglam, H., Schoenmakers, N. A., Boelaert, K., ... & Bas, V. Thyroid dysmorphogenesis is mainly caused by TPO mutations in consanguineous community. *Clinical endocrinology*, 79(2), 275-281, 2013.
- [58] M. Hashemipour, “Parental consanguinity among parents of neonates with congenital hypothyroidism in Isfahan,” *East. Mediterr. Heal. J.*, vol. 13, no. 3, 2007.
- [59] Fujiwara, H., Tatsumi, K. I., Miki, K., Harada, T., Miyai, K., Takai, S. I., & Amino, N. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Nature genetics*, 16(2), 124, 1997.
- [60] P. E. Macchia, “PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis,” *Nat. Genet.*, 1998.
- [61] Arturi, F., Russo, D., Schlumberger, M., du Villard, J. A., Caillou, B., Vigneri, P., ... & Filetti, S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7), 2493-2496, 1998.
- [62] Lohi, H., Kujala, M., Mäkelä, S., Lehtonen, E., Kestilä, M., Saarialho-Kere, U., ... & Kere, J. Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7,-A8, and-A9. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14246-14254, 2002.
- [63] Zou, M., Alzahrani, A. S., Al-Odaib, A., Alqahtani, M. A., Babiker, O., Al-Rijjal et al. Molecular analysis of congenital hypothyroidism in Saudi Arabia:



- SLC26A7 mutation is a novel defect in thyroid dysmorphogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(5), 1889-1898, 2018.
- [64] J. Pohlenz, "Genetics of congenital hypothyroidism," *Pediatr. Prax.*, vol. 70, no. 3, pp. 423–432, 2007.
- [65] A. Spina, S. Rea, V. De Pasquale, V. Mastellone, L. Avallone, and L. M. Pavone, "Fate Map of Serotonin Transporter-Expressing Cells in Developing Mouse Thyroid," *Anat. Rec.*, vol. 294, no. 3, pp. 384–390, 2011.
- [66] S. Kosugi, "Novel, Missense and Loss-of-function mutations in the Sodium/Iodide Symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 83, no. 9, pp. 3373–3376, 1998.
- [67] Long, W., Lu, G., Zhou, W., Yang, Y., Zhang, B., Zhou, H. et al. Targeted next-generation sequencing of thirteen causative genes in Chinese patients with congenital hypothyroidism. *Endocrine journal*, EJ18-0156, 2018.
- [68] Hsiung, Y. C., Lin, P. C., Chen, C. S., Tung, Y. C., Yang, W. S., Chen, P. L., & Su, T. C. Identification of a novel LDLR disease-causing variant using capture-based next-generation sequencing screening of familial hypercholesterolemia patients in Taiwan. *Atherosclerosis*, 277, 440-447, 2018.
- [69] Chen, X. M., Guo, K., Li, H., Lu, Q. F., Yang, C., Yu, Y. et al. A novel mutation KCNQ1p. Thr312del is responsible for long QT syndrome type 1. *Heart and vessels*, 34(1), 177-188, 2019.
- [70] Thomson, K. L., Ormondroyd, E., Harper, A. R., Dent, T., McGuire, K., Baksi, J et al. Analysis of 51 proposed hypertrophic cardiomyopathy genes from genome sequencing data in sarcomere negative cases has negligible diagnostic yield. *Genetics in Medicine*, 2018.
- [71] T. J. Sluckin, S. Ennis, A. Collins, C. Horscroft, and R. J. Pengelly, "Sequencing era methods for identifying signatures of selection in the genome," *Brief. Bioinform.*, no. February, pp. 1–12, 2018.
- [72] H. Anbunathan and A. M. Bowcock, The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: The Era of Genome-Wide Association Studies and Statistical, Big Data, and Computational Topics, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 137, no. 5, pp. e113–e118, 2017.
- [73] Narumi, S., Araki, S., Hori, N., Muroya, K., Yamamoto, Y., Asakura, Y. et al.

- Functional characterization of four novel PAX8 mutations causing congenital hypothyroidism: new evidence for haploinsufficiency as a disease mechanism. *European journal of endocrinology*, 167(5), 625-632, 2012.
- [74] S. Narumi, K. Muroya, Y. Asakura, M. Adachi, and T. Hasegawa, Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: Systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 4, pp. 1981–1985, 2010.
- [75] Liu, S., Zhang, W., Zhang, L., Zou, H., Lu, K., Li, Q. et al. Genetic and functional analysis of two missense DUOX2 mutations in congenital hypothyroidism and goiter. *Oncotarget*, 9(4), 4366, 2018.
- [76] R.-S. C. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 , *N Engl J Med*, vol. 347, no. 2, pp. 95–102, 2002.
- [77] A. J. Wassner and R. S. Brown, Congenital hypothyroidism: Recent advances, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, vol. 22, no. 5, pp. 407–412, 2015.
- [78] P. E. Macchia, M. De Felice, and R. Di Lauro, Molecular genetics of congenital hypothyroidism, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1999.
- [79] Dalili, S., Mohtasham-Amiri, Z., Rezvani, S. M., Dadashi, A., Medghalchi, A., Hoseini, S. et al. The prevalence of Iodine Deficiency Disorder in two different populations in Northern Province of Iran: a comparison using different indicators recommended by WHO. *Acta Medica Iranica*, 822-826, 2012.
- [80] K. E., V. A.A., and M. M.R., The incidence of congenital hypothyroidism and its determinants from 2012 to 2014 in Shadegan, Iran: a case-control study, *Epidemiol. Health*, vol. 38, p. e2016021, 2016.
- [81] Khammarnia, M., Siakhulak, F. R., Ansari, H., & Peyvand, M. (2018). Risk factors associated with congenital hypothyroidism: a case-control study in southeast Iran. *Electronic physician*, 10(2), 6286.
- [82] U. S. N. L. of M. NCBI, National Center for Biotechnology Information and 20894 USA 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Erişim adresi: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2018.
- [83] <http://provean.jcvi.org/index.php>, Erişim Tarihi: 28 Mayıs 2019.

- [84] K. Wang, M. Li, and H. Hakonarson, ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 16, pp. 1–7, 2010.
- [85] F. Sanger and A. R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, vol. 94, no. 3, pp. 441–448, 1975.
- [86] L. Smith, “fluorescence detection in automated DNA sequence analysis,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 320, pp. 264–265, 1986.
- [87] A. Bereket, X. H. Liao, T. Turoglu, E. Aribal, and S. Refetoff, Analysis of the PAX8 gene in congenital hypothyroidism caused by different forms of thyroid dysgenesis in a father and daughter, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 17, no. 7, pp. 1021–1029, 2004.
- [88] Illumina Inc, Patterned Flow Cell Technology, pp. 1–2, 2015.
- [89] F. Sanger, S. Nicklen, and R. Coulson, “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, p. 59S–76S, 1977.
- [90] G. Szinnai, “Clinical genetics of congenital hypothyroidism,” *Paediatr. Thyroidol.*, vol. 26, pp. 60–78, 2014.
- [91] A. M. Maxam and W. Gilbert, A new method for sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977.
- [92] M. Klett, Epidemiology of congenital hypothyroidism, *Endocrinol. Diabetes Epidemiol. Congenit. hypothyroidism*, vol. 105, 1997.
- [93] H. Grasberger and S. Refetoff, Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis, *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 23, no. 4, pp. 421–428, 2011.
- [94] S. M. Park and V. K. K. Chatterjee, Genetics of congenital hypothyroidism, *J. Med. Genet.*, vol. 42, no. 5, pp. 379–389, 2005.
- [95] D. Bezen, E. Dilek, N. Torun, and F. Tutunculer, Etiological evaluation of primary congenital hypothyroidism cases, *Türk Pediatr. Arşivi*, vol. 52, no. 2, pp. 85–91, 2017.
- [96] M. Medici, T. J. Visser, and R. P. Peeters, Genetics of thyroid function, *Clin Biochem Rev*, vol. 31, no. 2, pp. 129–142, 2011.
- [97] Maciel, L. M. Z., Kimura, E. T., Nogueira, C. R., Mazeto, G. M., Magalhães,

- P. K. R., Nascimento et al. Congenital hypothyroidism: recommendations of the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 57(3), 184-192, 2013.
- [98] C. E. Cherella and A. J. Wassner, Congenital hypothyroidism: insights into pathogenesis and treatment, *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 2017, no. 1, p. 11, 2017.
- [99] Léger, J., Ecosse, E., Roussey, M., Lanoë, J. L., Larroque, B., & French Congenital Hypothyroidism Study Group. Subtle health impairment and socioeducational attainment in young adult patients with congenital hypothyroidism diagnosed by neonatal screening: a longitudinal population-based cohort study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(6), 1771-1782, 2011.
- [100] C. Ridaura-sanz, Experimental Models of Developmental Hypothyroidism, *Horm Metab Res*, 2012.
- [101] Cangul, H., Aycan, Z., Kendall, M., Bas, V. N., Saglam, Y., Barrett, T. G., & Maher, E. R. A truncating DUOX2 mutation (R434X) causes severe congenital hypothyroidism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 27(3-4), 323-327, 2014.
- [102] Cangül, H., Doğan, M., Sağlam, Y., Kendall, M., Boelaert, K., Barrett, T. G., & Maher, E. R. One base deletion (c. 2422delT) in the TPO gene causes severe congenital hypothyroidism. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 6(3), 169, 2014.
- [103] Cangul, H., Saglam, H., Saglam, Y., Eren, E., Dogan, D., Kendall, M. et al. An essential splice site mutation (c. 317+ 1G> A) in the TSHR gene leads to severe thyroid dysgenesis. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 27(9-10), 1021-1025, 2014.
- [104] Cangul, H., Bas, V. N., Saglam, Y., Kendall, M., Barrett, T. G., Maher, E. R., & Aycan, Z. A nonsense thyrotropin receptor gene mutation (R609X) is associated with congenital hypothyroidism and heart defects. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 27(11-12), 1101-1105, 2014.
- [105] Cangul, H., Morgan, N. V., Forman, J. R., Saglam, H., Aycan, Z., Yakut, T., ...

- & Kirby, G. A. Novel TSHR mutations in consanguineous families with congenital nongoitrous hypothyroidism. *Clinical endocrinology*, 73(5), 671-677, 2010.
- [106] Nicholas, A. K., Serra, E. G., Cangul, H., Alyaarubi, S., Ullah, I., Schoenmakers, E. et al. Comprehensive screening of eight known causative genes in congenital hypothyroidism with gland-in-situ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(12), 4521-4531, 2016.
- [107] Cangul, H., Schoenmakers, N. A., Saglam, H., Doganlar, D., Saglam, Y., Eren, E. et al. A deletion including exon 2 of the TSHR gene is associated with thyroid dysgenesis and severe congenital hypothyroidism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 27(7-8), 731-735, 2014.
- [108] Cangul, H., Darendeliler, F., Saglam, Y., Kucukemre, B., Kendall, M., Boelaert, K. et al. A truncating TPO mutation (Y55X) in patients with hypothyroidism and total iodide organification defect. *Endocrine research*, 40(3), 146-150, 2015.
- [109] Cangul, H., Boelaert, K., Dogan, M., Saglam, Y., Kendall, M., Barrett, T. G., & Maher, E. R. Novel truncating thyroglobulin gene mutations associated with congenital hypothyroidism. *Endocrine*, 45(2), 206-212, 2014.

## 9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.14954  
Konu : Etik Kurulu Kararı

06/05/2019

**Sayın Fatma Büşra Işık**

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Akraba Evliliği Bulunan Konjenital Hipotiroidi Hastalarında Yeni Varyasyonların Keşfi" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

**Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

Ek:  
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 06.05.2019 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evruginızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 5F2897A1XC kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacak Mah. Ekinçiler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU







<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Akraba Evliliği Bulunan Konjenital Hipotiroidi Hastalarında Yeni Varyasyonların Keşfi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Fatma Büşra Işık			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Öğrenci			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR**  
**ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>Değerlendirilen Belgeler</b>	<b>Belge Adı</b>	<b>Tarihi</b>	<b>Versiyon Numarası</b>	<b>Dili</b>	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
<b>Karar Bilgileri</b>	<b>Karar No: 358</b>		<b>Tarih: 03/05/2019</b>		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.				

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI** Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Onay		Araştırma ile İlgili		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İkmur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Bulunma



## 10. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgileri

<b>Adı</b>	Fatma Büşra	<b>Soyadı</b>	Işık
<b>Doğum Yeri</b>	Üsküdar	<b>Doğum Tarihi</b>	04.09.1992
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kimlik No</b>	56245254722
<b>E-mail</b>	i.fatmabusra@gmail.com	<b>Tel</b>	5533080181

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Üsküdar Üniversitesi	2016
<b>Lise</b>	Biltek Lisesi	2010

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	82,86		
<b>Diğer Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Office	İyi
CLC genomic workbench	İyi

### Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

- **Fatma Busra Isik**, Mavi Deniz Sozuguzel, Banu Kucukemre Aydin, Cuneyd Parlayan, Melek Yildiz, Hakan Cangul ; “A novel homozygous nonsense mutation (p.R516X) in the SLC5A5 gene causing congenital hypothyroidism.” Poster presentation, ESHG Conference 2019. Gothenburg, Sweden
- Aslı Derya Kardelen Al, **Fatma Büşra Işık**, Esin Karakılıç Özturan, Mavi Deniz Sözüğüzel, Ayşe Pınar Öztürk, Şükran Poyrazoğlu, Cüneyd Parlayan, Hakan Cangül, Firdevs Baş, Feyza Darendeliler; “The investigation of genetic etiology in familial cases with congenital hypothyroidism.” Oral presentation, UPEK 2019. Antalya, Türkiye
- **Fatma Busra Isik**, Mavi Deniz Sozuguzel, Nilgun Genc, E Fırat Caralan, Zeynep Dogru, Celal Akdeniz, Volkan Tuzcu, Hakan Cangul ; “A novel candidate frameshift mutation for CPVT.” Poster presentation, ESHG Conference 2018. Milan, Italy
- Mavi Deniz Sozuguzel, **Fatma Busra Isik**, Nilgun Genc, E Fırat Caralan, Zeynep Dogru, Celal Akdeniz, Hakan Cangül ; “A novel missense KCNJ2 gene mutation associated with Andersen Tawil Syndrome.” e-poster presentation, ESHG Conference 2018. Milan, Italy
- Arslan, B. A., **Isik, F. B.**, Gur, H., Ozen, F., & Catal, T. (2017). Apoptotic effect of Nigella sativa on human lymphoma U937 cells. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 3), S628.

- Salcini, C., Atasever-Arslan, B., Sunter, G., Gur, H., **Isik, FB.**, Saylan, C. C., & Yalcin, A. D. (2016). High Plasma Pentraxin 3 Levels in Diabetic Polyneuropathy Patients with Nociceptive Pain. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 239(1), 73-79.
- Arslan BA, Yilancioglu K, Kalkan Z, Timucin AC, Gür H, **Isik FB**, Deniz E, Erman B, Cetiner S ; “Screening of New Antileukemic Agents from Essential Oils of Algae Extracts and Computational Modelling of Their Interactions with Intracellular Signalling Nodes.  
*Eur J Pharm Sci.* 2015 Dec 18.pii: S0928-0987(15)30075-0. doi:10.1016/j.ejps.2015.12.001.
- Atasever Arslan B, Yilancioglu K, Enisoglu-Atalay V, Kalkan Z, Gür H, **Işık FB**, Deniz E, Erman B, Cetiner S ; “Antileukemic Drug Potentials of Essential Oils of Algae Extracts.” Turkish Society of Physiological Sciences 41st National Physiology Congress. 2015. Çanakkale, Turkey. *Acta Physiologica.* 2015. 15

