



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI ARİTMİLERİNDE YENİ NESİL DİZİLEME
TEKNİKLERİ KULLANILARAK NOKTA MUTASYONLARIN
ANALİZİ**

ERDAL FIRAT ÇARALAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL-2018

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her anda bilgi ve tecrübesi ile destek olan saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye,

Yüksek Lisans Tezime ilgili çalışmamın planlanmasından, tezin basımına kadar her aşamada bana rehberlik eden, sorularıma çözüm sağlayan, her zaman kolaylaştırıcı olan ve daima örnek alacağım tez danışmanım saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na,

Bilimsel birikimi, yaklaşımı ve insanlığı ile her zaman bana ilham veren, Yeni Nesil Dizileme dahil genetiğin birçok alanı ile beni tanıştıran çok değerli hocam Prof. Dr. Duran Üstek Hocam'a,

Genetik verinin klinik olarak nasıl değerlendirileceğini sabır ve büyük bir özveri ile bize gösteren Prof. Dr. Hakan Cangül ve hasta datalarını benimle paylaşan, çocuk kardiyolojisi alanında önemli başarılarla imza atmış Prof. Dr. Volkan Tuzcu'ya,

Uzun yıllardır beraber çalıştığımız, çalışmaktan mutluluk duyduğum ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Nilgün Genç arkadaşım ile Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nde kuruluşundan bugüne kadar emek veren tüm çalışma arkadaşlarıma,

Emek ve özverileri için teşekkürü borç bildiğim annem ve babama,

Hayatımın her alanında olduğu gibi yüksek lisans dönemim süresince desteğini esirgemeyen hayat eşim, yol arkadaşım Derya Aktaş Çaralan'a ve yaşam sevincim kızım Mısra'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4.GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Kalbin Ritmi.....	5
4.2. Kasılma ve Gevşemenin Hücresel Mekanizması.....	7
4.3. Kasılma İçin Gerekli Yapıların Genetik Kökeni.....	11
4.3.1. Genetik materyalin aktarımı.....	11
4.3.2. Gen duplikasyonları.....	12
4.4. İyon Kanalları ve Diğer Bileşenler.....	13
4.4.1 Voltaj kapılı potasyum (K ⁺) kanalı.....	14
4.4.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum (Ca ⁺²) Kanalı:.....	16
4.4.3 Voltaj kapılı sodyum (Na ⁺) kanalı:.....	19
4.4.4. CAV3, AKAP ve ANK2 ailesi.....	21
4.4.5 Hormon ve sinyal molekülü NPPA.....	23
4.4.6 ABCC9.....	24
4.4.7 Hücre hücre bağlantı kompleksleri ve hücre içi bağlantı yapıları.....	24
4.4.8 RANGRF (MOG1-RAN guanine nucleotide release factor).....	25
4.4.9 Lamin A/C (LMNA) ve Emerin (EMD).....	25
4.5. Kalp Ritim Bozukluğu ve Kanalopatiler.....	26
4.5.1 Uzun QT sendromu (Long QT syndrome).....	26

4.5.2 Kısa QT sendromu (Short QT syndrome).....	28
4.5.3 Brugada sendromu.....	29
4.5.4. Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (KPVT).....	29
4.5.5. Ailesel atriyal fibrilasyon.....	30
4.5.6. Hasta sinüs sendromu HSS (Sick sinus syndrome 2).....	30
4.5.7. Aritmojenik sağ ventrikül displazisi (ASVD) (Arrhythmogenic right ventricular dysplasia).....	31
4.5.8. Atrial standstill 2 (Atrial sessizlik 2).....	31
4.6. Ailesel Kalıtım ve Nokta Değişimleri.....	31
4.7. Yeni Nesil Dizileme (YND) Çalışma Prensipleri.....	33
4.7.1 Kütüphane hazırlığı.....	34
4.7.2 Cihaz üzerinde klonal amplifikasyon ve dizileme.....	35
4.7.3 YND'nin sınırları.....	37
4.8. Data İşleme ve Biyoinformatik.....	38
4.8.1. Fotoğrafların nükleotid dizi dosyalarına dönüştürülmesi ve kalitesi.....	38
4.8.2. Sekans dizilerinin referans genom ile hizalanması.....	39
4.8.3. Varyant dosyasının oluşturulması.....	41
4.8.4. Varyant dosyasının veri bankaları ile ilişkilendirilmesi.....	42
5. METOT VE MATERYAL.....	47
5.1. Illumina TruSight Cardio Kit.....	47
5.2. DNA İzolasyonu.....	56
5.3. Kütüphane Oluşturulması.....	56
5.3.1. DNA kalitesinin tayini.....	56
5.3.2. Tagment genomic DNA.....	57
5.3.3. Tagment genomic DNA'nın temizlenmesi.....	57
5.3.4. Çoğaltma işlemi ile adaptör ve indeks dizisinin bağlanması.....	57
5.3.5. Çoğaltma ve adaptör Bağlanan DNA'nın Temizlenmesi.....	58
5.3.6. Hedef bölgelerin yakalanması, çoğaltılması ve temizlenmesi.....	58
5.3.7. Kütüphanenin miktar tayini ve kalite değerlendirmesi.....	61

5.3.8. Kütüphane Sulandırması, Denatürasyonu ve MiSeq Cihazına Yüklenmesi.....	62
5.3.9 MiSeq Dizileme ve Dataların Elde Edilmesi.....	62
5.3.10. Varyantların teknik hatalardan ayıklanması.....	63
5.3.11. Varyantların genetik veri tabanları kullanılarak anlamlandırılması.....	64
5.3.12. Analizi yapılan varyantların filtrelenmesi.....	65
6. BULGULAR.....	72
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	89
8. KAYNAKLAR.....	96
9. ETİK KURLUL ONAYI.....	105
10. ÖZGEÇMİŞ.....	108

KISALTMALAR

AP	Aksiyon potansiyeli
SAD	Sinoatrial düğüm
AV	Atrioventriküler
mV	Milivolt
mM	Milimolar
SR	Sarkoplazmik retikulum
LGM	Lateral Gen Mekanizması
TnC	Kardiyak troponin
YND	Yeni Nesil Dizileme
K _v	Voltaj kapılı potasyum kanalı
Ca _v	Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
Na _v	Voltaj kapılı sodyum kanalı
KPVT	Katekolaminerjik Polimorfik Ventriküler Taşikardi
ASVD	Aritmiyojenik Sağ Ventriküler Displazisi
cAMP	Cyclic-adenosine monophosphate
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
AF	Atriyal fibrilasyon
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
HGMD	Human Gene Mutation Database
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism database

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.2.1. Miyositlerin dinlenme halinde iken membran içi ve dışındaki iyon konsantrasyonu.....	8
Tablo 4.5.1.1 Uzun QT tipleri ile ilişkilendirilmiş genlerin listesi (57).....	28
Tablo 4.6.1. Noktasal değişimlerin kategorizasyonu.....	32
Tablo 4.8.1.1. Phred quality skor tablosu.....	39
Tablo 5.1.1. Aritmi ile ilişkili incelenen 39 gen ve OMIM kayıtları.....	48
Tablo 5.3.4.1. Trusight Cardio indeks listesi.....	57
Tablo 5.3.9.1 MiSeq cihazı içinde bulunan analiz programları.....	63
Tablo 5.3.12.1 Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan ACMG kriterleri ve kriter kodları.....	66
Tablo 5.3.12.2 Varyantların sınıflandırma kuralları.....	70
Tablo 6.1. Hastaların klinik ön tanıları.....	72
Tablo 6.2. Hastaların klinik ön tanıları, varisant, genotip, HGVS isimlendirmesi ve dbSNP kaydı.....	72
Tablo 6.2. Kliniğe doğrudan fayda sağlayabilecek patojenik ve muhtemel patojenik varyantlar.....	79
Tablo 6.3 Kliniğe yardımcı olabilecek ancak klinik anlamı henüz kesin olmayan varyantlar.....	79
Tablo 6.4. OMIM kayıtlarına göre ön tanı ile uyumsuz olarak değerlendirilen varyantların ilişkili olduğu hastalıklar.....	81
Tablo 6.5. Saptanan patojenik varyantların* MEDİGEN**, ACMG***, HGMD ve ClinVar**** veri tabanlarına göre sınıflandırılması.....	82
Tablo 6.6. MEDİGEN’de saptanan varyantların ACMG kriterlerine göre diğer veri tabanlarına göre karşılaştırılması.....	87
Tablo 6.7. ClinVar ve HGMD klinik veri tabanlarında bulunmayan varyantların merkezimiz ve ACMG tarafından değerlendirilmesi.....	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Kalbin uyarı ve ileti sistemi.....	6
Şekil 4.1.2. Ventriküler EKG Grafiği.....	7
Şekil 4.2.1. Kalpte polarizasyon-depolarizasyon diyagramı ve aksiyon potansiyeli grafiği.....	9
Şekil 4.2.2. Ventriküler ve atriyal kardiyomiyositlerin polarizasyon-depolarizasyon diyagramı.....	10
Şekil 4.4.1.1.. Voltaj kapılı potasyum (K^+) kanalı.....	14
Şekil 4.4.2.1. Voltaj kapılı kalsiyum (Ca^{+2}) iyon kanalı.....	17
Şeki 4.4.2.2. Ryanodin reseptörü kanalı.....	19
Şeki 4.4.3.1. Voltaj kapılı sodyum (Na^+) kanalı.....	20
Şekil 4.6.1. Genin Bölümleri: 1) Düzenleyici dizi. 2) İntergenik 5 üssü yönü. 3) 5 üssü UTR. 4) Ekzonun başlangıcı. 5) Ekzon. 6-7) Splice diziler. 8) İtron. 9) Stop kodon. 10) 3 üssü UTR. 11) 3 üssü yönü.....	31
Şekil 4.7.1.1. P5-P7 adaptörleri, indeks ve sekans dizilerinin oluşturduğu kütüphane fragmanı.....	35
Şekil 4.7.2.1 Paired-End Okuma.....	36
Şekil 4.8.1.1 Fastq file içeriği ve skorlama.....	38
Şekil 4.8.1.2 Fotoğraf dosyalarından dizi dosyalarının oluşturulması.....	39
Şekil: 4.8.2.1 Dizilerin IGV görüntüsü.....	40
Şekil 4.8.3.1. Brujin grafiğinin örnek gösterilişi. Burada $k=5$ (k-mers) olarak verilmiştir. Üstteki dizi forward yönü, alttaki dizi komplementerini göstermektedir..	41
Şekil 5.1.1 Hedef DNA'nın 80-mer lik proplar ile çekilmesi.....	48
Şekil 5.3.5.1. Zenginleştirmeye hazır DNA parçası eldesi.....	58
Şekil 5.3.6.1 Hedeflenen DNA parçalarının yakalanması.....	60
Şekil 5.2.7.1 Fragmente olmuş DNA'nın cihaz görüntüsü.....	61
Şekil 5.3.9.1. MiSeq Dizileme Cihazı ve kimyasalları.....	62
Şekil 5.3.10.1. Alternatif allel okumasının IGV görüntüsü.....	64

Şekil 7.2. ClinVar ve HGMD karşılaştırması.....	65
Şekil 6.1. 58 varyantın patojenitesinin sınıflandırılması.....	78
Şekil 6.2. Saptanan değişimlerin genlere göre dağılımı.....	81
Şekil 6.1. MEDİGEN’de saptanan varyantların diğer veri tabanlarına göre karşılaştırılması.....	87



1. ÖZET

ÇOCUKLUK ÇAĞI ARİTMİLERİNDE YENİ NESİL DİZİLEME TEKNİKLERİ KULLANILARAK NOKTA MUTASYONLARIN ANALİZİ

Normal kalp ritmindeki bozulmalar Uzun QT, Kısa QT, Brugada, Katekolaminerjik Polimorfik Ventriküler Taşikardi (KPVT) ve Aritmogenik Sağ Ventriküler Taşikardi (ASVT) gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Yeni nesil dizileme (YND) teknikleri kullanılarak bakılan genetik mutasyonlar ve elde edilen büyük data ların biyoinformatik araç larla incelenmesi tanı konmasına katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada YND ile elde edilen verilerin analizinde kullanılan ACMG, HGMD, ClinVar gibi klinik veri tabanlarının sonuç larının kıyaslanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Mart 2016 - Eylül 2017 tarihleri arasında İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'ne kalpte ritim bozukluğu test istemiyle gelen ≤ 16 yaşında 42 erkek, 30 kadın toplamda 72 kişi çalışma kapsamına alındı. Patojenik ve muhtemel patojenik olarak raporlanan 18 varyantdan , ACMG HGMD ve ClinVar sınıflandırmalarında sırasıyla 6, 5 ve 7 tanesi uyumlu bulundu. Klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS) olarak raporlanan 29 varyantdan, ACMG, ClinVar sınıflandırmasına göre sırasıyla 27 ve 12 tanesi uyumlu bulundu . HGMD veri tabanında VUS sınıflaması yapılmamıştır. HGMD ve Clin Var veri tabanlarında bulunmayan 15 varyant ACMG kriterlerine göre 13 tanesi VUS, 1 patojenik ve 1 tanesi muhtemel patojenik olarak değerlendirilmiş ve raporlanmıştır. ACMG den farklı olarak raporlanan 15 varyantın 4 tanesi farklı tanımlanmıştır. Sonuç olarak; HGMD, Clin Var, ACMG veri tabanları birbirini tamamlamaktadır. Hasta kliniği, hekimin deneyimi, güncel makalelerin henüz veri tabanları tarafından değerlendirilmemiş olması sonuçları değiştirebilmektedir. Laboratuvarın kendi veri bankası sonuç ların artması laboratuvar güvenilirliğini arttıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Ritim bozukluğu, iyon kanalları, yeni nesil dizileme

2. ABSTRACT

ANALYSIS OF POINT MUTATIONS USING A NEXT GENERATION OF SEQUENCING TECHNIQUES IN JUVENILE ARRHYTHMIA

Disturbances in normal heart rhythm cause Long QT, Short QT, Brugada, Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) and Arrhythmogenic Right Ventricular Tachycardia (ARVT). Examination of genetic mutations observed and large data obtained with next generation sequencing (NGS) techniques, using bioinformatics tools greatly contribute to the ability to establish diagnoses. The aim of this study is to compare the results of clinic databases such as ACMG, HGMD and ClinVar which are used for analyzing data obtained with NGS. For this aim, a total of 72 individuals, consisting of 42 male individuals and 30 female individuals, requesting cardiac arrhythmia tests in Istanbul Medipol University's Genetic Diagnostics Center were included in the study. These individuals are at or below 16 years old. Among the 18 variants reported as "pathogenic" and "possible pathogenic", six, five and seven individuals respectively were found to be in line with ACMG, HGMD and ClinVar classifications. Of the 29 variants which were reported as variant of uncertain significance (VUS), 27 and 12 respectively were found to be in line with ACMG and ClinVar classifications. HGMD database does not include a VUS classification. 15 variants who are not included in HGMD and ClinVar databases were evaluated according to ACMG criteria. 13 of these variants were evaluated and reported as VUS, one as pathogenic and one as possible pathogenic. Four of the 15 variants, which weren't reported in line with ACMG, were defined differently. As a result, the HGMD, ClinVar and ACMG databases complement each other. The results of this study might be subject to variances in patient clinics, physician's level of experience and the fact that current articles are not yet evaluated using databases. Gradual accumulation of the laboratory's own database results will increase laboratory reliability.

Key Words: Arrhythmia, ion channels, new generation sequencing

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp ritim bozukluğu ülkemizde ve dünyada çok yaygın olarak görülen bir kalp rahatsızlığıdır. Yapısal kalp bozukluğu bulunmayan bireylere de Elektrokardiyogram (EKG) verileri, aile öyküsü, konjenital sağırılık gibi klinik veriler ışığında tanısı konulabilen çocuk ve yetişkinlerde ortaya çıkabilen bir hastalıktır. Kalbin normal ritmini kaybederek normalden az (bradikardi) ya da fazla atması (taşikardi) gibi düzensizlikler hastalığın önemli belirtileridir. EKG verileri ile kalpteki bu dalgalanma klinik olarak uzun zamandır bilinmektedir ve bu verilere göre ritim bozukluğu hastalıkları sınıflandırılabilmiştir. Uzun QT, Kısa QT, Brugada, Katekolaminerjik Polimorfik Ventriküler Taşikardi (KPVT) ve Aritmogenik Sağ Ventriküler Taşikardi (ASVT) en sık görülen ve üzerinde uzun süredir çalışılan kalp ritim bozukluğu hastalıklarıdır. Bu hastalıklara sebep olan genetik değişimler de tanı koymak ya da tanıyı güçlendirmek amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır (1, 2).

1995 yılında Keating ve arkadaşları tarafından EKG’de ventriküler repolarizasyonun uzaması şeklinde kendini gösteren Uzun QT sendromunun voltaj kapılı iyon kanallarındaki otozomal dominant geçişli mutasyonlardan kaynaklandığını gösterdiler. Sonraki 10 yılda hastalığa sebep olan onlarca yeni mutasyon bulundu. Ani ölümlere de sebep olabilen Uzun QT hastalığının 10’un üzerinde formu vardır ve genetik çalışmalar hastalığın bu çeşitlerini tanımasını koymada önemlidir. İlk kez 1950’lerin başında tanımlanan Brugada sendromu 1990 larda belirgin yapısal kalp hastalığı bulunmayan, sağ ventriküler EKG abnormalitesi olan ve ani ölümlere eğilim gösteren hasta gruplarında tanımlandı. Yine bu sendromunda farklı alt tipleri bugün genetik çalışmalarla belirlenebilmektedir. KPVT ve Kısa QT gibi diğer ritim bozukluğu hastalıklarının tanısının konulmasında genetik çalışmalar kullanılmaktadır (2).

Kalpteki elektriksel faaliyetin temel ünitesi voltaj kapılı iyon kanallarıdır. Bu nedenle ritim bozukluğu hastalıklarına sebep olan genetik değişimler genel

olarak voltaj kapılı sodyum, potasyum ve kalsiyum iyon kanalları ve onların düzenleyici alt ünitelerinde saptanmıştır (3, 4).

Voltaj kapılı sodyum iyon kanalının alfa ünitesini kodlayan SCN5A genindeki değişimler farklı ritim bozukluğu hasatlıklarına sebep olabildiği gibi iyon kanallarının düzenlenmesinden sorumlu ya da kasılma eyleminin genel mekanizmasında rol alan farklı proteinleri sentezleyen genlerdeki mutasyonlar da ritim bozukluklarına sebep olmaktadır. Adrenalin ve nonadrenalin gibi hormonların hücre mekanizmasını düzenleyici etkisi, cyklik AMP gibi ikincil mesajcıların faaliyeti, genomik DNA'yı düzenleyen faktörler, kardiyomiyositlerin fiziksel ve yapısal özellikleri gibi pekçok faktördeki bozukluk ya da yetersizlik kalp ritminin bozulmasına sebep olabilmektedir (5–8).

Yeni nesil dizilemenin büyük veri üretebilme kapasitesi ile sunduğu olanaklardan biri de bu mekanizmanın bütüncül bir şekilde anlaşılmasına olanak vermesidir. Büyük verilerin analizi için farklı programlar kullanılmaktadır. Bunlar BWA (Burrows-Wheeler Aligner), Sequence Alignment Map (SAM), Genome Analysis Tool Kit (GATK) gibi analiz programları ile klinik olarak yorumlanmasını sağlayan ClinVar, HGMD, ACMG, ExAc, *in silico* fonksiyonel analiz gereçleridir (9, 10).

Bu çalışmada bu olanaktan yararlanılarak, aritmi ile klinik olarak ilişkilendirilmiş 39 genin biyoinformatik analizinin yapılması için kullanılan biyoinformatik araçların karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

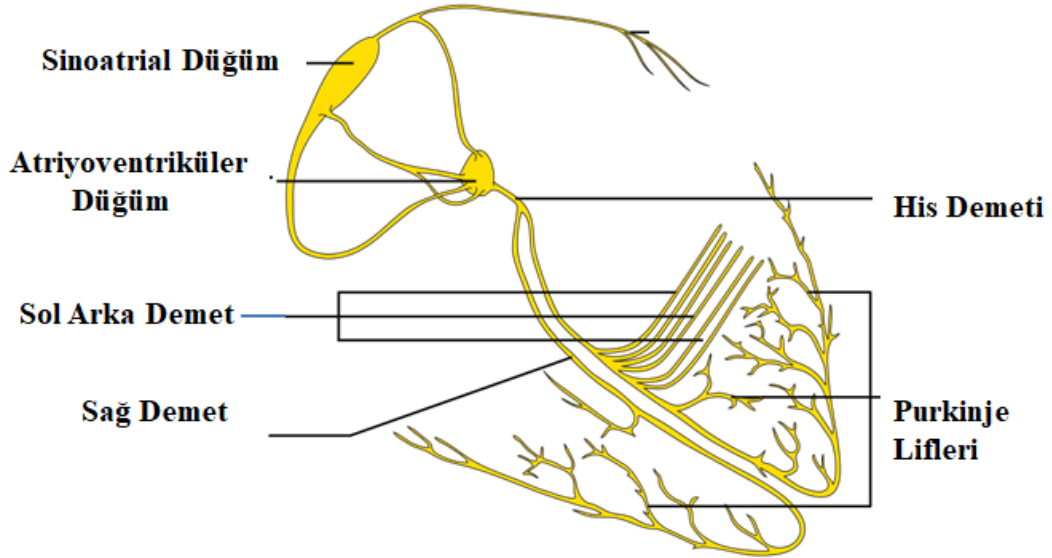
4.1. Kalbin Ritmi

Kalp ritmik olarak kasılan elektromekanik bir pompadır. Kalbin bu fonksiyonu aksiyon potansiyelin (AP) oluşumuna ve yayılmasına bağlıdır. Bir sonraki AP oluşana kadar kasılmayı gevşeme takip eder. AP, hücre içine ve dışına akım taşıyan iyon kanallarının sırasıyla aktifleşmesi ve inaktif olmasıyla oluşur. Kalbin farklı bölgelerinde AP yayılımı (dalga formu) belirgin farklılıklar içerir. Bu farklılık normal kardiak ritim ve aktivasyonunun direk olmayan dağılımı için normal olarak kabul edilir (9).

Normal kalp ritmi; iyon kanallarının birlikte çalışması ve kalp kas hücreleri (kardiyomiyosit) arasında elektrik akımının düzenli yayılmasına bağlıdır. Bu akımın düzenli oluşmasında temel fonksiyonel birimler iyon kanallarıdır. İyon kanalları, birden fazla ünitesi olan transmembran protein komplekslerinden oluşur. Bu makromoleküllerin temel fonksiyonu, biyolojik elektrikselliğin temel ünitelerinden biri olmasıdır (10).

19. yüzyıl süresince kalp kasılmasını sağlayan sinyallerin sinir sistemi mi yoksa kardiyomiyositler aracılığı ile mi taşındığı üzerine bir fikir birliği yoktu. Bu yüzyılda, 1852 yılında Hermann Friedrich Stannius (1808 – 1883) amfibiyen kalbi üzerinde yaptığı çalışmalarda elektriksel sinyallerin atriumdan ventriküle (atrioventriküler) birbiriyle iletişim halinde olan kalp kası hücreleri ile taşındığını gösterdi. Ancak elektriksel sinyallerin yayılımında özelleşmiş kalp kası hücrelerinin sorumluluğu tam olarak anlaşılamadı. Kalbin doğal uyarı kaynağı olan hücrelerin (pacemaker) varlığı Sör Arthur Keith tarafından 1907 yılında keşfedildi. Bu özel hücre grubunun bulunduğu yere sinoatrial düğüm (SAD) denildi (11).

SAD, sağ atriumda kümelenmiş özel kalp kası hücrelerinden (Pacemaker hücreleri) oluşur. Kalpte elektriksel sinyalin ilk oluştuğu yer burasıdır. Pacemaker hücrelerinde polarizasyonun bozulması (depolarizasyon) sonucu oluşan elektriksel ileti belirli bir iletim yolunu izleyerek **atrioventriküler (AV) düğümüne** gelir. AV düğümde ve onu takip eden **his demetinde** elektriksel ileti bu bölgedeki hücreler arası sıkı bağlantı kanallarının (Gap-Junction) azlığı nedeniyle yavaşlar. His-demetinden sağ ve sol ventrikülere iletim iki dala ayrılarak devam eder. İki ventrikülde depolarizasyon **purkinje lifleri kanalı** ile AV düğümde olduğundan çok daha hızlıca gerçekleşir. Bu hızda hücreler arası Gap-Junctions iyon kanallarının sayısının fazlalığı rol oynar. Bütün bu iletim sisteminin doğru çalışması sonucunda kalp kası sistematik bir şekilde kasılır ve gevşer (12, 13).



Şekil 4.1.1. Kalbin uyarı ve ileti sistemi

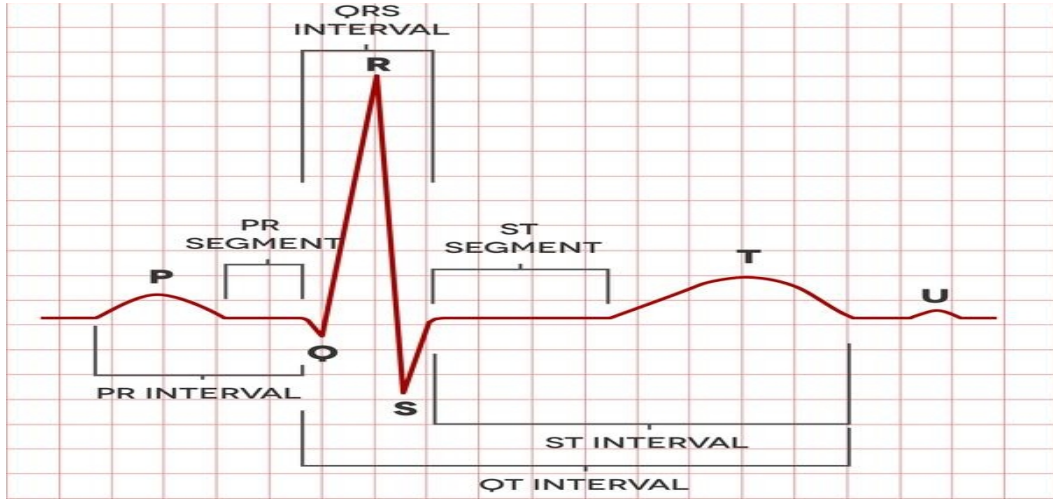
Elektrokardiyogram (EKG) grafiği kalbin bu elektriksel ritminin bir ifadesidir.

P dalgası: Sinoatrial düğümde başlayan depolarizasyon sonucu oluşan atrial aktiviteyi temsil eder.

P-R segmenti: Atrioventriküler düğümde gerçekleşen gecikme sonucu oluşan boşluk.

QRS piki: Kompleks ventriküler aktivite

T dalgası: kalp kası hücrelerinin repolarizasyonu sonucu oluşur (11).



Şekil 4.1.2. Ventriküler EKG Grafiği

4.2. Kasılma ve Gevşemenin Hücresel Mekanizması

Kalp hücrelerinde elektriksel iletimin oluşması ve hücrelerin kasılması kompleks bir süreçtir. Bu süreç hücre membranının içi ve dışı arasında ki potansiyel farkı, kardiomyosit membranlarının birbirleriyle ilişkisi, Sodyum (Na^+), potasyum (K^+), Kalsiyum (Ca^{+2}) iyon gradienti ve ATP bağımlı sodyum-potasyum pompası sistemlerini içerir (12).

Diğer bütün hücreler gibi kardiomyositler de hücre içi ve dışındaki iyon konsantrasyon farkından kaynaklı bir elektriksel potansiyeline sahiptir. Bu elektriksel potansiyel mikroelektrotlar ile milivolt (mV) cinsinden ölçülebilir. Örneğin dinlenme durumundaki bir ventriküler kardiomyositin membran potansiyeli -90 mV olarak ölçülmüştür. Bu dinlenme membran potansiyeli hücre membranının içi ve dışı arasındaki negatif ve pozitif iyon konsantrasyonu ile iyon pompalarının etkinliği ile oluşur. Dinlenme halindeki bir kardiomyositin K^+ iyon konsantrasyonu hücre içinde 150 mM iken hücre dışında 4 mM'dır. Na^+ iyon konsantrasyonu ise tam tersi, hücre içinde 20 mM iken hücre dışında 145 mM'dır.

Tablo 4.2.1. Miyositlerin dinlenme halinde iken membran içi ve dışındaki iyon konsantrasyonu

İyon	Hücre içi yoğunluk (mM)	Hücre dışı yoğunluk (mM)
Na ⁺	20	145
K ⁺	150	4
Ca ²⁺	‘0.001	2.5
Cl ⁻	25	140

Hücreler istirahat halindeyken (herhangi bir uyarın olmadığında) bu konsantrasyon farkını dengeleyen elektriksel yük **Nernst formülü** ile hesaplanır. Aşağıdaki formülde 37 °C’de K⁺ iyonunun membran potansiyelinin Nernst formülüne göre hesaplanması verilmiştir.

$$E_K = -61 \cdot \log \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} = -96mV$$

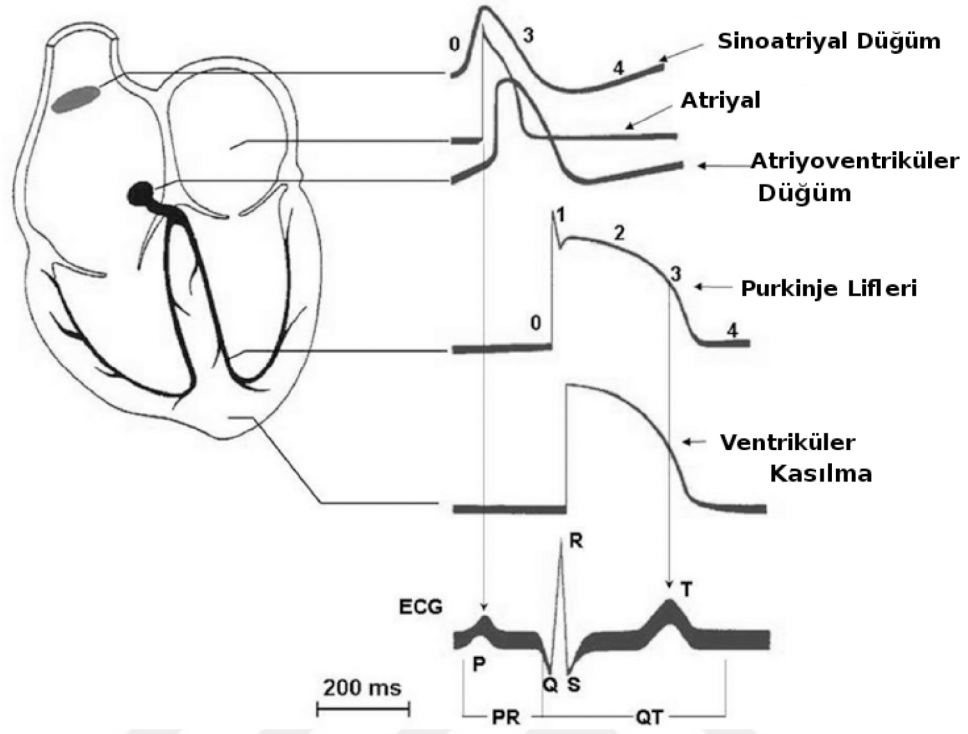
E_K: Denge Potansiyeli (Nernst Potansiyeli)

Potasyum konsantrasyonu: [K⁺]_i: 150 mM ve [K⁺]_o: 4 mM

-61: RT/zF (R üniversal gaz sabiti. Z iyon değeri. F Faraday sabit. T mutlak sıcaklık)

Na⁺ iyonunu bu formülde yerine koyduğumuzda +52 mV olarak bulunur. Diğer iyonların membran potansiyeli de aynı formül kullanılarak hesaplanabilir. Tüm bu etkilerin sonucunda hücre membran potansiyeli oluşur (13,14).

Dinlenme halindeki bu membran polarizasyonunun bozulması (depolarizasyon) ile Na⁺ iyonları hücre içine girer ve K⁺ iyonları hücre dışına çıkar. Bu olay hücre zarında bulunan voltaja bağlı çalışan transmembran proteinlerin kontrolünde gerçekleşir. Depolarizasyonun ardından zar potansiyeli eski haline döner. Bu olaya da repolarizasyon denir. Kardiak hücrelerinde şekil 4.2.1’de de görüldüğü gibi elektriksel aktivasyon farklılıkları belirgindir (15).

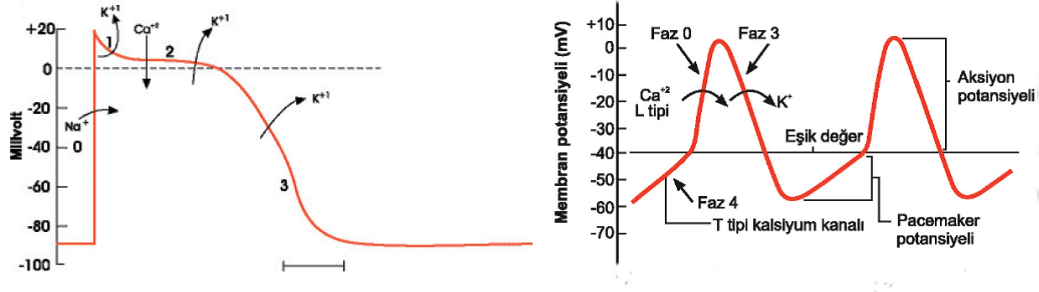


Şekil 4.2.1. Kalpte polarizasyon-depolarizasyon diyagramı ve aksiyon potansiyeli grafiği.

Kalbin purkinje hücrelerinde elektriksel aktivasyon grafiği belirgindir. Na^+ iyonunun hücre içine girmesi ile gerçekleşen depolarizasyon kardiyak aksiyon potansiyeli grafiği'nde faz 0 olarak gösterilmiştir. Hemen sonrasında K^+ iyonunun hücre dışına çıkışı faz 1'de gösterilmiştir. Faz 2'de yavaşça azalan plato, Ca^{++} iyonunun hücrelerarası alandan hücre içine alınmasını ve ventriküler kasılma sürecini gösteriyor. Aynı zamanda K^+ iyonları bu aşamada hücre dışına pompalanır. Faz 3 ise repolarizasyon ile hücrenin yeniden polarize olma durumunu ifade eder (16).

Kalbin kasılması, elektriksel enerjinin mekanik enerjiye dönüşmesidir. Bu dönüşüm, uyum içinde hareket edebilen hücresel birimlerde gerçekleşir ve Şekil 4.2.1'de görüldüğü gibi kalbin farklı bölgelerinde özel biçimler alır. Özellikle voltaj bağımlı iyon kanallarının sayısal ve fonksiyonel farklılığı kalbin kendi içinde özelleşmiş yapıların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Şekil 4.2.2'de ki grafikte görüldüğü gibi dinlenme halinde ventriküler membran potansiyeli

yaklaşık -90 mV iken sinoatrial pacemaker hücrelerinde polarize membran potansiyeli yaklaşık -65 mV tur.



Şekil 4.2.2. Ventriküler ve atriyal kardiyomiyositlerin polarizasyon-depolarizasyon diyagramı.

Bu membran polarizasyonu aksiyon potansiyelinin etkisi ile -55 mV'lara geldiğinde voltaj bağımlı Na^+ iyon kanalları açılır ve hücre içine hızlı bir şekilde giren Na^+ iyonları membran potansiyelini pozitif değerlere doğru çıkartmaya başlar. Bu süreç SAD, atrium ve atrioventriküler bölgede Na^+ yerine düşük voltajlarda aktive olabilen (-50 mV) T-Tipi Ca^{2+} kanallarını aktive eder ve hücre içine Na^+ ile birlikte daha yoğun olarak Ca^{2+} iyonları girer. Hücre membran potansiyeline Na^+ iyonu ile aynı etkiyi yapar ve membran potansiyeli pozitif değerlere doğru yükselir. Bu sürece depolarizasyon denir (faz 0). Membran potansiyeli -30 mV lara geldiğinde K^+ iyon kanalları aktive olarak potasyum iyonlarını hücre dışına pompalar. Hücre dışına K^+ iyonu pompalanmasına rağmen belirli bir süre membran potansiyeli pozitif değerlere çıkamaya devam eder ve membran potansiyeli 25-35 mV'lara kadar yükselir. Bu yükseliş -20 mV'larda iken voltaj-bağımlı L-tipi Ca^{2+} kanalları (LTCCs, $\text{Cav}1.2$) açılır ve Ca^{2+} iyonları hücre içine girerek $I_{\text{ca,L}}$ akımı oluşur. Bu Ca^{2+} akımı sarkoplazmik retikulumda (SR) bulunan ve **calsequestrin (CASQ2)** proteinlerinde depolanan Ca^{2+} iyonunun hücre sitoplazmasına salınmasını tetikler. Bu salınmaya SR üzerinde bulunan ve Ca^{2+} salınımından sorumlu **Ryanodin Reseptör Tip-2 (RYR2)** protein kompleksi aracılık eder. Sitozole salınan Ca^{2+} iyonları kardiyak troponin C (TnC) proteinine bağlanarak kasılmadan sorumlu kas filamentlerini (myofilament) aktive eder. Ca^{2+} iyonlarının sitozelden SR içine geri çekilmesi ile kardiyak hücrelerinin kasılması

durur. Bu süreç SR Ca^{+2} -ATPase tip-2a (*SERCA2a*) kanallarının kalsiyum iyonunu SR içine geri çekmesiyle ya da $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değişimini sağlayan hücre zarı iyon kanallarının (NCX) aktivasyonu ile olur. Membran potansiyeli bir süreliğine polarizasyon değerlerinin de altına düşerek hücrede hiperpolarizasyon yaşanır. Bunu sebebi Na^+ iyon kanallarının K^+ iyon kanallarından daha erken kapanmasıdır. Bu hiperpolarizasyon durumunda daha çok SAD'da (pacemaker) bulunan hyperpolarization activated **cyclic nucleotide gated potassium channel 4 (HCN4)** iyon kanalları aktive olur ve hücre içine K^+ ve Na^+ iyon akımı (funny akımı, I_f) gerçekleşir. (13,17,18).

4.3. Kasılma İçin Gerekli Yapıların Genetik Kökeni

4.3.1. Genetik materyalin aktarımı

Fred Griffith'in 1928 yılında hastalık yapıcı ve hastalığa sebep olmayan *Streptococcus pneumoniae* bakterisi suşları ile yaptığı deneyler, kalıtımın varlığına dair ilk çalışmalardan. Zatürre hastalığına yol açan bu bakterilerden patojen olan suşun yüksek ısıda öldürülmesinden sonra özelliklerini zararsız suşa aktarması kalıtıma dair önemli bilgiler sundu. Griffith'in deneyinden sonra Oswald Avery ve arkadaşları, temellerini Griffith'in deneyinden alan ve 14 yıl süren çalışmalarından sonra kalıtımın DNA molekülleri ile aktarıldığını gösterdiler. Ancak DNA'nın kalıtım materyali olduğuna dair şüpheleri ortadan kaldıran kesin bulgular 1952 yılında Alfred Hershey ve Martha Chase tarafından bakteriyi enfekte eden virüsler (faj) üzerinde gerçekleştirilen deneyler ile gerçekleşti (19).

Bakteri ve virüsler ile yapılan bu kalıtım deneyleri, kalıtımın; bir soyun kendi benzerini üretme mekanizması olduğu kadar, özellikle bakteri ve virüs gibi ilksel canlılarda kendilerinde olmayan belirli özellikleri edindikleri bir süreç olduğunu göstermiştir. Lateral Gen Mekanizması (LGM) olarak bilinen bu mekanizma günümüzde bakteri ve virüslerde hala çok yaygındır ve ilk canlı yaşamın ortaya çıktığı zamanlardan günümüze varlığını sürdürmektedir (20).

Yaklaşık 2 milyar yıl önce benzer bir mekanizma ökaryot yaşamın ortaya çıkmasını sağladı. Mitokondri ve kloroplastların atası olan bir bakteri türünün arkeaların içinde yaşam bulmasıyla iki organizma arasında gerçekleşen lateral gen aktarımı ökaryotların bugünkü yapısının ortaya çıkmasında etkili olmuştur (21,22).

Bu birleşmeden sonra, öncelikle bakteri ve arkealarda ortaya çıkan aktin-tubulin benzeri yapılar (FtsZ, MreB, FtsA, WACA vb.) sonradan ökaryotik hücrelerde yeni fonksiyonel özellikler kazanarak hücre içi iskelet sistemi ile birlikte kasılmanın temel yapılarından birine dönüştüler. Prokaryotlarda hareket etme ve bölünme gibi temel hücresel faaliyetlerin gerçekleşmesinden sorumlu bu yapıların homologları mitokondri ve kloroplast gibi ökaryotik hücre organellerinde korunmuş bir şekilde varlığını sürdürmektedir. Bu da ökaryot yaşamın ve hücresel kasılmanın kökenine dair önemli bilgiler vermektedir. Ökaryotlarda aktin ve tubulin benzeri yapıların dışında ileri derecede özelleşmiş kinesin, dynein ve myosin gibi motor proteinler de bulunmaktadır. Özellikle kalbin kasılmasından sorumlu motor protein 'alfa miyosin ağır zinciri', Miyosin Heavy Chain 6 (*MYH6*) geni tarafından kodlanır. Ökaryotik hücre içi iskelet sisteminin oluşumunda lateral gen aktarımı ile yeni özellikler kazanan filament yapısı ve ileri derecede özelleşmiş protein yapıları ile birlikte gen duplikasyonlarının rolü büyüktür (23,24).

4.3.2. Gen duplikasyonları

Günümüzden yaklaşık 800 milyon yıl önce tek hücreli ökaryotik ve prokaryotik yaşamın hemen yanında çok hücreli ökaryotik yaşam formları ortaya çıktı. Metazoan büyük alemi içinde tanımlanan bu çok hücreli yaşam, kas hücrelerinin de içinde bulunduğu atasal formlarının oluşacağı simetrik vücut planına (Bilateral) yaklaşık 700 milyon yıl önce kavuştu. Kas hücresinin iskelet kası, düz kas ve kalp kas hücrelerine farklılaşarak ilk kalp benzeri organı oluşturmasının ise yaklaşık 500 milyon yıl önce gerçekleştiği düşünülüyor. Çok hücreli organizmalar içindeki çeşitliliğin arttığı bu dönem (Kambriyen patlama)

vücut planında önemli rol alan homeobox gen ailesi gibi içinde iyon kanalı genlerinin de bulunduğu birçok genin kopya sayısının arttığı (gen duplikasyonları) moleküler çalışmalarla gösterilmiştir. Homeobox gen ailesi içinde yer alan **NK2 homeobox 5 (NKX2-5)** geninin kalbin embriyonik dönem gelişiminde önemli rolü bulunmaktadır ve bu gende oluşan mutasyonların kalp ritim bozukluğu da dahil birçok kalp problemine sebep olduğu bilinmektedir. Bu ve benzeri deneysel çalışmalar gen duplikasyonlarının canlı çeşitliliğinin oluşmasına önemli katkılar yaptığını gösterilmiştir (22).

4.4. İyon Kanalları ve Diğer Bileşenler

Hücrede bulunan proteinlerin yaklaşık %30'u hücre membran proteinleridir. Bunların da yaklaşık yarısı iyon kanallarının da içinde bulunduğu taşıyıcı proteinlerdir (25).

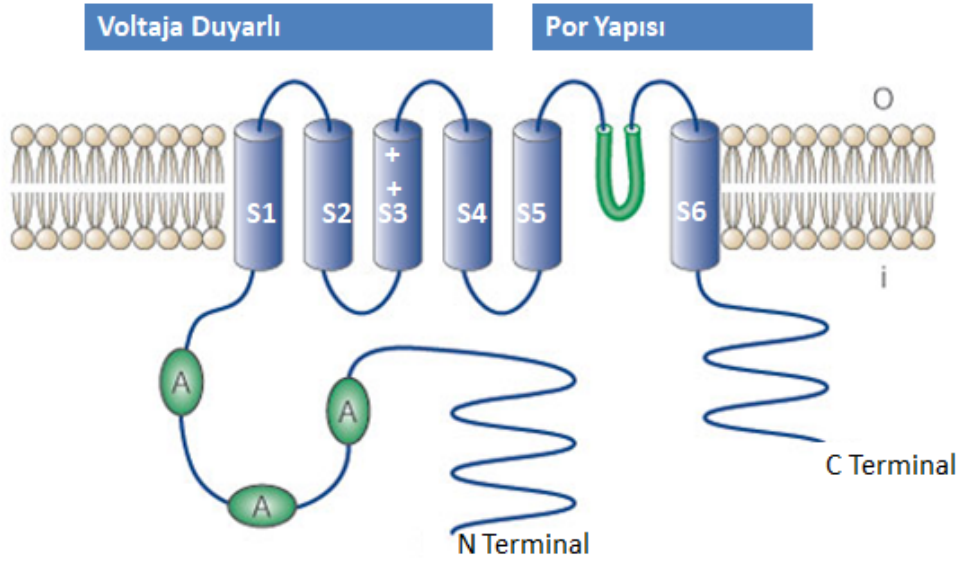
Biyolojik elektrikselliğin temel ünitesi olan iyon kanallarındaki çeşitlilik; genetik materyalde oluşan gen duplikasyonları ve noktasal baz değişimlerinin etkisiyle tek ya da sınırlı sayıda iyon kanalı tipinden oluşmuştur (10). 1970'lerin sonunda DNA dizilemenin başlamasıyla (26) ve özellikle 2000'li yıllarda Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojisinin gelişmesiyle birlikte filogenetik çalışmalarda sağlanan büyük ilerlemeler birçok ökaryotik membran kanalının bakteri ve arkealarda bulunan membran kanalları ile homolog olduğunu göstermiştir (27,28).

İyon kanallarının temel birimi por formundaki oyukla birbirinden ayrılan 2 transmembran (2-TM) segmentten oluşur. Bazı prokaryotlarda ve genel olarak ökaryotlarda bulunan iyon kanalları bu 2 transmembran segmentli proteinden gelişmiştir. İkili transmembran segment yapısı yaşamın erken dönemlerinde Symporter kanal özelliği olan proteinleri kodlayan genin duplikasyonu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu iki transmembran segmente 4 transmembran segment daha eklenmesiyle 6 transmembran segmentli yapılar meydana gelmiştir. Ökaryotik hücrelerde bulunan K^+ , Na^+ ve Ca^{+2} kanalları bu 6-TM'li yapılardan oluşur. 6-TM

üzerinde yapılan fonksiyonel çalışmalar ile voltaj sensörü görevi yapan 4. segment ve iyon spesifikliğini sağlayan pore yapısı ortaya çıkarılmıştır. Na^+ ve Ca^{+2} kanalları birbiri ile homolog 4 adet 6 segmentli transmembran protein ünitelerinden oluşurken K^+ kanalları bu dörtlü yapı yerine 6 segmentli tek bir domainden oluşur. Bu nedenle K^+ kanalının Na^+ ve Ca^{+2} kanallarının önceli olduğu düşünülür (31).

4.4.1 Voltaj kapılı potasyum (K^+) kanalı

Voltaj kapılı potasyum kanalı (Kv) çeşitlilik bakımından diğer kanallardan fazladır. Kv kanal ailesi ilk yapılan çalışmalarda Kv1, Kv2, Kv3, Kv4 olarak sınıflandırılmıştır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar dokudan dokuya ve türden türe değişen çok sayıda Kv kanalı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.4.1.1.. Voltaj kapılı potasyum (K^+) kanalı

Kv kanallarının; kontrollü hücre ölümü (Apoptosis), hücre farklılaşması ve büyümesi, hormon ve nörotransmitterlerin salınımı, kardiyak aktivite gibi hücresel süreçlerde önemli düzenleyici rolleri vardır. Bu nedenlerle bu gendeki mutasyonlar; kardiyak ritim bozukluğu, sağırılık, epilepsi gibi ailesel geçiş gösteren birçok hastalığa sebep olabilmektedir.

Kv kanalının α -subunitesi Şekil.4.3.3.1’de görüldüğü gibi helezon formunda ve transmembran yapıdadır. Bu transmembran kompleks fonksiyonel ve yapısal olarak 2 temel parçadan oluşur. Birincisi, K^+ iyonunun geçişini sağlayan S5-S6 helikslerinin oluşturduğu ve kanalın merkezinde yer alan por yapısıdır. Bu por yapısı ion seçiciliğine ve geçirgenliğine sahiptir. İkincisi ise membran potansiyelindeki elektriksel değişimi algılayan, S1-S4 heliks yapılarının oluşturduğu ve kanalın çevresini saran voltaj duyarlı yapıdır. Voltaj duyarlı yapı ve por yapısı S4-S5 bağlantısı üzerinden kovalent bağ ile birbirine bağlanır.

Kv kanalı transmembran kısmının yanı sıra N ve C uçlarının oluşturduğu sitoplazmik kısımlardan oluşur. Hücre sitoplazmasına uzanan bu N ve C uçları korunmuş bölge içermez ve farklı Kv kanal ailelerinde farklılaşmaktadır. Kv kanalları temelde iyon geçişini sağlayan α -subunit ve sitoplazmik ve/veya transmembran yapıdaki yardımcı β -subunits yapılardan oluşur. β -subunits ve diğer yardımcı alt üniteler α -subunit fonksiyonlarını düzenlerler. Bu kompleks yapı Kv kanalının fonksiyon ve özelliklerini belirleyerek çeşitli kanal yapılarının oluşmasını sağlamaktadır (25)

Bu geniş Kv kanal ailesinin memeli kalp, çizgili-düz kaslarında bulunan ve özellikle Uzun QT ve Kısa QT ritim bozukluklarına sebep olan türü Kv7.1 (*KCNQ1*)’dir (31).

***KCNQ1* (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1, Kv7.1):** Bu gen kardiyak aksiyon potansiyelinin repolarizasyonu için gerekli olan voltaj duyarlı potasyum iyon kanallarının α -subunit fonksiyonel birimini kodlar. Bu protein KCNE1 (**Potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 1**) ve KCNE3 (**potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 3**) potasyum kanal proteinleri ile heteromultimer bit yapı oluşturur. Bu gende oluşan mutasyonlar Uzun QT sendromu (Romano-Ward sendromu) Jervell and Lange-Nielsen sendromu ve Ailesel Atrial Fibrillasyon ile ilişkilendirilmiştir. Genin ifadesi dokulara spesifik özellikler gösterir.

KCNE1 ve *KCNE3* alt üniteleri alfa ünitesinin kanal dinamiğini düzenler ve potasyum kanalının stabilitesini artırır. Ayrıca *KCNE1* geninde oluşan mutasyonlar Jervell ve Lange-Nielsen ve aynı zamanda da Long QT sendromunun bir formu olan Romano-Ward hastalığı ile ilişkilidir (32)

***KCNH2* (potassium voltage-gated channel subfamily H member 2, Kv11.1):** Bu gen eag familyasına ait voltaj-duyarlı potasyum kanalını kodlar. Bu gendeki mutasyonlar Uzun QT tip-2 (LQT2) sendromuna sebep olur. Bu kanal proteinin düzenleyici alt ünitesi *KCNE2* (potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 2)'dir. *KCNE2* kalp ve kas hücrelerinde ifade edilir. Bu gendeki mutasyonlarda aritmi ile ilişkilendirilmiştir

Kalp ritim bozukluğu ile ilişkili diğer bazı gen kompleksleri ise aşağıda listelenmiştir (32).

- ***KCNA5* (potassium voltage-gated channel subfamily A member 5, Kv1.5)**

- ***KCNJ5* (potassium voltage-gated channel subfamily J member 5, KIR3.4)**

- ***KCND3* (Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3, KV4.3)**

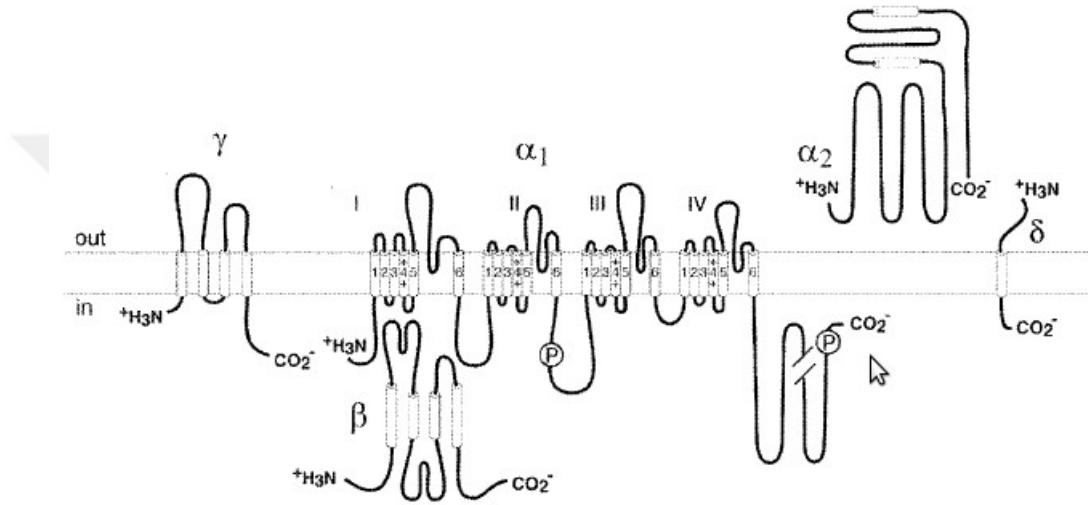
- ***KCNJ8* (potassium voltage-gated channel subfamily J member 8, KIR6.1)**

- ***KCNJ2* (potassium voltage-gated channel subfamily J member 2, KIR2.1)**

4.4.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum (Ca^{+2}) Kanalı:

Kalsiyum iyon kanalları 4 ya da 5 alt birimden oluşan kompleks protein yapılarıdır. Bu kompleks yapının en büyük birimi α_1 ünitesidir. Bu yapı por, voltaj duyarlı segment ve voltaj duyarlı kapı düzeneğinden oluşmuştur. Voltaj kapılı Ca^{+2} kanalının α_1 ünitesi Sodyum kanalının α ünitesi ile benzerlik gösterir. Dört homolog domainden (I-IV) oluşan 6 transmembran segmentten (S1-S6) oluşur. S4

Segmenti voltaj sensörü olarak bilinir. Transmembran her domaindeki S5 ve S6 segmentler por yapısını oluştururlar. α_1 ünitesi, kalsiyum kanalının lokalizasyonunda ve düzenlenmesinde önemli rol onayan β alt ünitesi ve disülfit bağı ile birarada duran $\alpha_2\delta$ alt ünite kompleksi kalsiyum kanallarının birçoğunda bulunur. γ alt ünitesi iskelet kas hücrelerinde bulunur ve ayrıca kalp ve beyin dokularında da ekspresse olur.



Şekil 4.4.2.1. Voltaj kapılı kalsiyum (Ca^{+2}) iyon kanalı

Memelilerde bulunan α_1 ünitesi en az on farklı gen tarafından kodlanır ve voltaj kapılı kalsiyum kanalı Ca_v olarak isimlendirilir. Ca_v dört farklı alt gruptan oluşur. Ca_v1 ($\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ ve $\text{Ca}_v1.4$) ailesi kalp kası hücrelerinede bulunan $\text{Ca}_v1.2$ kanalını da içeren L-Tipi kalsiyum kanallarıdır. Ca_v2 alt ailesi ($\text{Ca}_v2.1$ 'den $\text{Ca}_v2.4$ 'e kadar) P/Q-Tipi ve R-Tipi kanal ailesini içerir. Ca_v3 alt ailesi ($\text{Ca}_v3.1$ 'den $\text{Ca}_v3.4$ 'e kadar) ise T-tipi kanal ailesini içerir. Bu kanal yapıları doku spesifik kalsiyum kanal ailesini oluşturur (33,34).

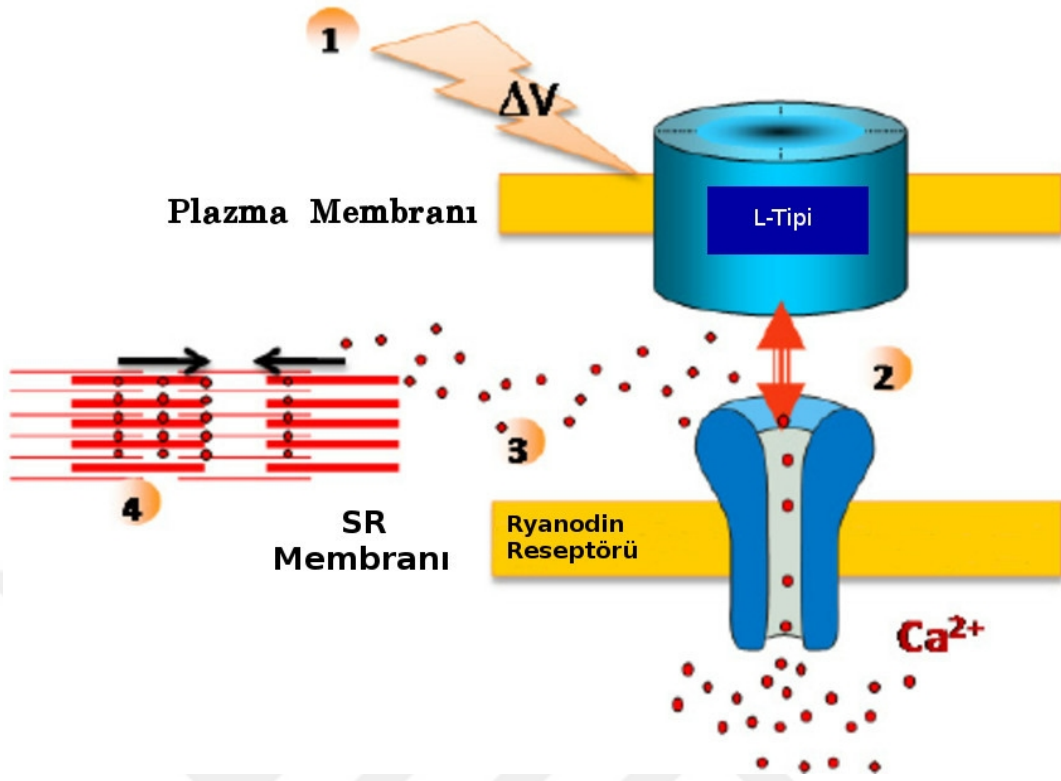
CACNA1C (calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C): Bu gen voltaj bağımlı kalsiyum kanalının 24 transmembran segmentten oluşan alfa-1-subunitisini kodlar (32).

CACNB2 (calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2): Bu gen voltaj-bağımlı kalsiyum iyon kanallarının beta alt ünitesini kodlar. Bu gendeki mutasyonlar Brugada Sendromu ile ilişkilendirilmiştir (32).

CACNA2D1 (calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta):

Bu gen voltaj-bağımlı kalsiyum kanallarının alfa2 ve delta subunitelerini kodlar. Aynı gen üzerinden sentezlene bu iki protein yapısında meydana gelen mutasyonlar Brugada ve Uzun QT Sendromları ile ilişkilendirilmiştir (32).

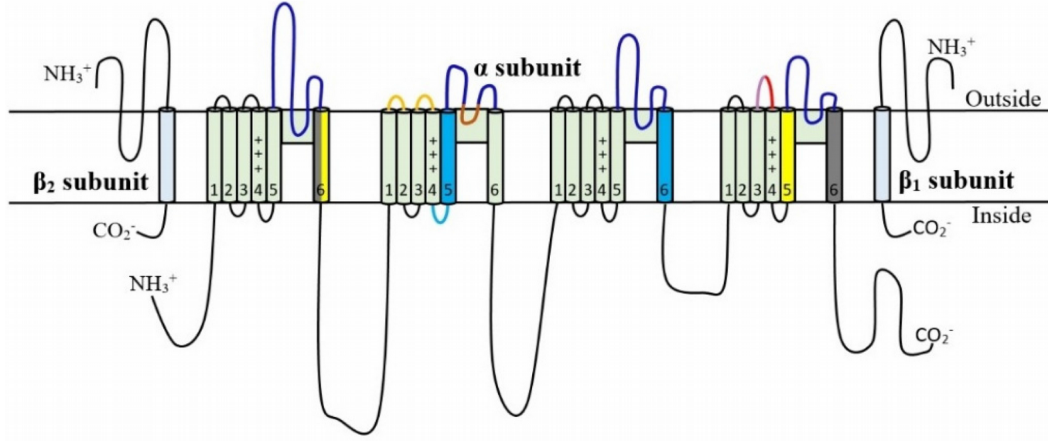
RYR2 (ryanodine receptor 2): Bu gen kalp kas hücrelerinin sarkoplasmik retikulumunda bulunan Ryanodine Reseptörü 2 proteinini kodlar. Ryanodine Receptor 2 proteini sarkoplasmic retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınımını kontrol altında tutar. Ca^{+2} iyonları herhangi bir uyarı gelmediğinde sarkoplasmik retikulum içinde **calsequestrin (CASQ2)** proteinlerinde depolanır. Hücre içine Ca^{+2} iyonu salınımı uyarısı geldiğinde RYR2 Ca^{+2} iyonlarını sarkoplasmik retikulumdan sitoplazma içine gönderir. RYR2 protein kompleksi ile CASQ2 arasındaki bağ **Triadin (TRDN)** protein zinciri ile kurulur. Kalp kası hücrelerinde T-Tübülü üzerinde lokalize olan Ca^{2+} iyon kanalı ile sarkoplasmik retikulumda bulunan RYR2 kanalı arasındaki yakın bağ ise **junctophilin 2 (JPH2)** protein yapısı ile kurulur. Sitoplazma içinde miktarı artan Ca^{2+} iyonları kalsiyum bağımlı sinyal proteini olan **Calmodulin 1 (CALM1)**'i aktifleştirerek iyon kanalları da dahil birçok mekanizmayı düzenler. Ayrıca sitoplazma içinde Troponine bağlanan Ca^{+2} iyonları kasılma eylemini başlatır. Bu gendeki mutasyonlar Katekolaminerjik Polimorfik Ventrikular Taşikardiya (KPVT) ve Aritmiyogenik Sağ Ventrikuler Displazia (ASVD) hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (35)



Şeki 4.4.2.2. Ryanodin reseptörü kanalı

4.4.3 Voltaj kapılı sodyum (Na^+) kanalı:

Memeli dokularında ifade edilen (eksprese olan) 9 farklı (Nav1.1–Nav 1.9) voltaj bağımlı sodyum iyon kanalı 11 farklı gen (*SCN1A–SCN11A*) tarafından kodlanır. Bu Sodyum kanalları yüzde 50'nin üzerinde ileri derecede benzerdir. Sodyum kanalının α ünitesi, dört homolog domainden (I-IV) oluşan 6 transmembran segmentten (S1-S6) oluşur. S4 Segmenti voltaj sensörü olarak bilinir. Transmembran her domaindeki S5 ve S6 segmentler por yapısını oluştururlar. α -subunit temelde düzenleyici olarak görev yapan β -subunitleri (β 1- β 4) ile kompleks bir yapı oluşturur. $\text{Na}_v1.5$ 'i kodlayan *SCN5A* genindeki ve β -subunitlerini kodlayan *SCN4B*, *SCN3B*, *SCN1B* genlerindeki mutasyonlar kalp ritim bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (36).



Şeki 4.4.3.1. Voltaj kapılı sodyum (Na^+) kanalı

***SCN5A* (sodium voltage-gated channel alpha subunit 5):** Bu gen 21 transmembran segmentten oluşan voltaj kapılı Na^+ iyon kanallarının alfa ünitesini kodlar. Bu gende oluşan mutasyonlar “Uzun QT 3” kalp ritim bozukluğu hastalığına sebep olur (32).

***SCN1B* (sodium voltage-gated channel beta subunit 1) :** Bu gen voltaj kapılı sodyum iyon kanallarının Beta 1 alt ünitesini kodlar. Bu protein kanal inaktivasyonunun kinetiğini düzenler. Gende oluşan mutasyonlar Brugada Sendromu 5 ile ilişkilendirilmiştir (32).

***SCN3B* (sodium voltage-gated channel beta subunit 3):** Bu gen voltaj kapılı Na^+ iyon kanallarının Beta 3 alt ünitesini kodlar. Protein kanal inaktivasyonunun kinetiğini düzenler (32).

***SCN4B* (sodium voltage-gated channel beta subunit 4):** Bu gen Voltaj bağımlı Na^+ iyon kanallarının Beta 4 alt ünitesini kodlar. Kodlanan protein iyon kanalının kinetiğinin düzenlenmesinde rol alır ve gende oluşan mutasyonlar Uzun QT 10 sendromu ile ilişkilendirilmiştir (32).

4.4.4. *CAV3*, *AKAP* ve *ANK2* ailesi

Kalp hücrelerinin membran yapısı ileri derecede özelleşmiştir ve bu özel membran yapısının oluşmasında *CAV3* geni tarafından kodlanan Caveolin-3 (*Cav3*) proteinin önemli rolü vardır. Bu protein kolestrol ve sfingolipidin yoğun olduğu hücre zarı bölgelerinde T-Tübülleri de dahil hücre membran oyuklarının (caveolae) oluşmasında görev alır. İyon kanalları ve sinyal molekküllerince zengin bu oyuklar hücrelerde iletim hızını arttıran kardiyomiyositlere özgü membran yapısını oluşturur. *CAV3* geninde oluşan mutasyonların Na^+ iyon kanalını etkileyerek Na^+ akımında gecikmelere neden olduğu ve Uzun QT hastalığına neden olabileceği bildirilmiştir (34).

Kalp kası hücreleri membranlarında bulunan bu oyuk sistemi (caveolae) Beta-Adrenerjik reseptörce zengindir. Katekolaminler (adrenalin-noradrenalin) Beta-Adrenerjik reseptörler tarafından algılandığında kalp atım hızı da dahil kasılma eylemini etkileyecek bir dizi uyarıcı etki yaparlar. Katekolaminler Beta-Adrenerjik reseptöre bağlandığında G-protein kompleksi uyarılır ve hücre içinde ADP'den ikincil mesajcı olan Cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) üretilir. cAMP hücrede inaktif şekilde bulunan Protein Kinaz A (*PKA*)'yı fosforlayarak aktifleştirir. Aktifleşen *PKA* molekülleri iyon kanalı protein kompleksleri ile birarada bulunan A-kinase anchoring protein (*AKAP*) ile biraraya gelir ve kanal fonksiyonunda düzenleyici rollerini oynarlar. *AKAP* proteini iyon kanallarına göre farklılık gösterir. Potasyum iyon kanalı (*KCNQ1*) *AKAP9*-Yatio, Kalsiyum iyon kanalı (*CaV 1.2*) *AKAP150* ve Sodyum iyon kanalı (*NaV 1.5*) *AKAP15* ile birarada bulunur. Ayrıca sarkoplasmik iyon kanlları *RYR2* ve *SERCA* da *PKA* aracılığı ile fosforlanan *AKAP* protein aileleri ile ilişki içindedir (37).

Katekolaminler ile aktive olan cAMP özellikle atriumda bulunan HCN4 (funny, f kanalı) iyon kanalı üzerinde herhargi bir aracı protein kompleksi olmadan direk etkide bulunarak, aktivasyon voltajının aralığını daha pozitif yöne doğru kaydırır. Bu etki kanalın açılmasını kolaylaştırır. Buna karşılık asetil kolin tarafından cAMP üretiminin inhibe edilmesiyle aktivasyon enerjisi daha negatif

değerlere doğru kayar ve HCN4 kanalının açılma olasılığını düşürür. Bu süreç kalp atım ritmini direkt olarak etkiler (38).

Voltaj duyarlı iyon kanallarının fonksiyonlarına etki eden bir diğer protein Ankyrin-B (*ANK2*)'dir. Ankyrin-B'nin kas hücresi iyon kanallarının yapısal organizasyonu ve fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli rolleri vardır (39).

Hücre membranının depolarizasyonu sonucu oluşan hücre içine Ca^{2+} iyon akımı sarkoplasmik retikulumda bulunan RYR2 protein kompleksinden hücre sitoplazmasına Ca^{2+} iyon akımını sağlar. Ca^{2+} iyonları troponin C ile bağlanarak kasılma eylemini başlatır. Hücre sitoplazmasına salgılanan Ca^{2+} iyonlarının bir kısmı SR Ca^{+} ATPase (SERCA) ile sarkoplazma içine geri alınır. Geri kalan bölümü de Na^{+}/Ca^{2+} değiştirici (NCD) iyon pompaları ile hücre dışına atılır. Böylece kasılma eylemi başlamış ve bitmiş olur. PKA iyon kanalını fosforlayarak kasılmayı başlatma yönünde düzenlerken protein fosfatase type 2A (PP2A) fosfatı iyon kanalından kopartarak kasılma eylemini durdurma yönünde düzenler. Böylece Beta-Adrenerjik sinyal mekanizması ile başlayan ve PKA üzerinden iyon kanallarının aktifleşme yönünde işleyen mekanizma PP2A ile tersi yönde yeniden düzenlenmiş olur (40).

PP2A bu düzenleyici etkisini B56 α altünite üzerinden iyon kanalları ile ilişki içindeki Ankyrin-B (*ANK2*) üzerinden gerçekleştirir. Ankyrinler ayrıca β II spectrin ile kompleks bir yapı oluşturarak hücre zarının altında temel yapısal filamentlerden aktin filamenti ile bağ kurarlar. Na^{+}/Ca^{2+} değiştirici (NCD) iyon pompası, Na/K pompası (Na/K ATPase), Ca_v 1.3 gibi iyon kanalları ile “ANK2- β II spectrin protein kompleksi” üzerinden gerçekleşen bu bağ iyon kanallarının hücre membranı üzerindeki konumunu ve stabilitesini belirler (41).

Ankyrin-B de oluşacak fonksiyon bozuklukları, konjenital aritmi, sinüs node hastalıkları, atrial fibrilasyon, ventriküler taşikardi ve katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (KPVT) ile ilişkilendirilmiştir (39).

Hücre içi indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları da iyon kanallarının düzenlenmesinde önemlidir. Örneğin Dihidroksiaseton fosfatı gliserol-3-fosfata çeviren glycerol-3-phosphate dehydrogenase-1-like (*GPD1-L*) proteini Sodyum iyon kanalı (*SCN5A*) alfa ünitesi ile sıkı ilişki içindedir. NaV ve *GPD1-L* arasındaki bu ilişki moleküler indirgenme-yükseltgenme reaksiyonunun NADH üzerinden etkisi olduğunu göstermiştir. NADH deki artış Na⁺ akımını direkt olarak azaltmıştır. Bu azalış NADH-bağımlı protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ya da mitokondrial süperoksidasyonu ile ilişkilidir. *GPD1-L* ile ilişkili olarak PKC aktivitesi, *SCN5A*'nın fosforlanmasını arttırarak iyon kanalının düzenlenmesinde etki göstermektedir (42).

4.4.5 Hormon ve sinyal molekülü *NPPA*

Caveolae yapıları natriüretik peptit reseptörlerince de zengindir (Atrial natriüretik peptit) ve bu reseptörle Cav-3 proteini ile sıkı ilişki içindedir (43). Kalp ritim bozuklukları ile ilişkili Atrial Natriuretic Peptit A (*NPPA*) natriuretic peptit ailesinin bir parçasıdır ve temelde kalbin atrial dokusundan sentezlenir. Kalp ritmine 2 farklı mekanizma üzerinden etki eder. Birincisi Kalpten salgılanan *NPPA* kalp kas hücrelerinde bulunan natriüretik peptit reseptörlerince algılanır ve guanosine diphosphate (GDP)'den hücre içi mesajcı olarak bilinen cyclic guanosine monophosphate (cGMP)'nin sentezlenmesini tetikler. cGMP düzeyi cGMP-bağımlı protein kinazları (PKG) aktifleştirir. PKG voltaj bağımlı kalsiyum iyon kanallarının çalışmasının düzenlenmesinde rol alır (44).

NPPA'in ikinci etki mekanizması yine cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-PKG yolağı üzerinden bu sefer böbrekler üzerindedir. Salgılanan peptit böbreklerde bulunan Natriuretic Peptide Receptor-A (NPR-A)'ya bağlanarak kalp kası hücrelerine benzer bir mekanizma ile glomerlerde filtrasyon oranını arttırarak kanın basınç, elektrolit (Na⁺ iyonu) ve miktar bakımından dengesini sağlar. Bu gendeki mutasyonlar Atrial Fibrilasyon (AF) ile ilişkilendirilmiştir (45).

4.4.6 *ABCC9*

ATP'ye duyarlı potasyum iyon kanalları (K_{ATP}) hücre ATP konsantrasyonu azaldığında açılır, arttığında ise bloklanır (42). Dokulara özgü farklı K_{ATP} kanalları vardır. Kardiak miyositlerinde bu kanallar *KCNJ11* geni tarafından kodlanan Kir6.2 ana ünitesi ile *ABCC9* geni tarafından kodlanan düzenleyici alt ünite sulfonylurea reseptör (*SUR2A*)'ünden oluşur (50, 51).

Bu kanal yapısı hücre içinde ATP azaldığında hücre dışına K^+ pompalayarak kalpte aksiyon potansiyeli süresini kısaltır ve kasılmayı azaltıcı yönde etki yaparak ATP tasarrufu sağlar (47).

4.4.7 Hücre hücre bağlantı kompleksleri ve hücre içi bağlantı yapıları

***SNTA1* (Syntrophin α -1):** Hücre dışı matriks ile hücre içi iskelet sistemi arasında bağ kuran Dystrophin protein kompleksi ile Na^+ iyon kanalı arasında bağ Syntrophin proteini (*SNTA1*, syntrophin alpha 1) ile kurulur. Syntrophin α -1'in Na^+ kanalı ile bağlantı noktası, sitoplazmik C-terminal uçta bulunan serine–isoleucine–valine ya da SIV motif olarak adlandırılan aminoasit dizisidir. *SNTA1* geninde oluşa mutasyonlar Na^+ akımının gecikmesine sebep olarak Uzun QT hastalığının ortaya çıkmasına sebep olurlar (34).

Desmozomal glikoprotein (*DSC2* ve *DSC3*): Desmozomlar hücre içi ara filamentlerle (intermediate filament) ilişki içinde olan güçlü hücreler arası bağlantı noktalarıdır. Bu bağlantı noktaları özellikle kalp ve deride dokuya hem esneklik hem de dayanıklılık vererek doku bütünlüğünün korunmasında önemlidir. Desmozom iki set desmozomal kaderin proteini içerir. Bunlar desmoglein ve desmokolindir(DSC). Desmozomal glikoprotein 2 (*DSC2*) ve Desmozomal glikoprotein 3 (*DSC3*) de oluşan mutasyonların kalp ritim bozuklukları ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (48).

***GJA5* (gap junction protein alpha 5, CX40):** Aralıklı kavşaklar (gap junction) iyonların, ikincil mesajcıların, suyun ve elektriksel sinyaller gibi küçük

bileşiklerin enerji gerektirmeyen, pasif geçişine izin veren hücreler arası bağlantı yapılarıdır. Aralıklı kavşaklar ailesinin *GJA5* geninden ifade edilen CX40 üyesi özellikle kardiyak miyositlerde ifade olur ve atrial ritim bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. (49).

4.4.8 RANGRF (MOG1-RAN guanine nucleotide release factor)

Ran proteini, Ras-ilişkili GTPase büyük protein ailesini evrimsel olarak iyi korunmuş bir üyesidir. Temel fonksiyonu hücre çekirdeği ile sitoplazma arasında protein ve RNA gibi büyük moleküllerin taşınmasıdır. MOG1 proteini direkt olarak Ran proteini ile bağlanarak bu moleküllerin taşınmasında rol alır. MOG1 proteininin bu görevi yanında mekanizması tam olarak anlaşılmasa da Na⁺ iyon kanalları (*NaV1.5/SCN5A*) üzerinde düzenleyici etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Na⁺ iyon kanalının sitoplazmik parçası ile ilişki halinde bulunan MOG1 proteininin gen ifadesindeki artışının Na⁺ iyon akımı üzerinde arttırıcı etkide bulunduğu, bu ifadedeki azalışın ise iyon akımını azalttığı gösterilmiştir (55,56, 57).

4.4.9 Lamin A/C (LMNA) ve Emerin (EMD)

Ökaryotik hücrelerde kalıtım materyali hücre çekirdeği içinde bulunur. Çift tabakalı lipid yapıdan meydana gelen hücre çekirdeğinin hemen altında Lamin ve Emerin gibi farklı protein yapıları bulunur. Bir ara filament (intermedated filament) çeşidi olan Lamin A, B, ve C hücre çekirdeğinin hemen altında lokalize olmuştur ve Emerin proteini ile bir arada kompleks bir yapı oluşturur. Bu yapı hücre çekirdeğine güç ve belirli bir yapı kazandırırken aynı zamanda genlerin ifadesinin düzenlenmesinde de rol alırlar. Örneğin Lamin A Gap Junction proteininin gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alırken Emerin proteinin hücre çekirdeğinde bulunan farklı proteinler aracılığı ile kromatin yapısı ve gen ifadesinde genel bir düzenleyici rolü vardır (52).

4.5. Kalp Ritim Bozukluğu ve Kanalopatiler

Normal kalp ritmi, iyon kanllarının birlikte çalışması ve kalp kas hücrelerinin boyunca elektrik akımının düzenli yayılmasına bağlıdır. Bu düzenin bozulması ile oluşan hastalıklara ritim bozukluğu ya da kanalopatiler denir. Normal Kalp Ritmi 60-100 atım/dakikadır.100'ün üzerindeki durumlar taşikardi , 60'ın altındaki durumlar bradikardi olarak tanımlanır (53).

Ani ölümlerin yaklaşık %10-20'sinde yapısal bir kardiyak anomali tespit edilememiştir. Kalp hastalığı bulunmayan ani kardiyak ölümlerin önemli potansiyel nedenleri Uzun QT sendromu, kısa QT sendromu, Brugada sendromu ve katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşiaritmi (KPVT) gibi ion kanalı hastalıklarıdır. Dinlenme ve egzersiz esnasında alınan EKG, iyon kanal hastalıklarının tanısında çok önemlidir. Moleküler genetik tarama, kardiyak iyon kanal hastalıkların tanısını %70'e kadar arttırabiliyor. Kanalopatisi olan hastalarda, senkop veya ani kardiyak ölüm gibi aritmik olaylar için egzersiz, yorucu aktivite, işitsel uyaranlar veya artmış vagal tonus gibi spesifik klinik tetikleyiciler belirlenmiştir (54).

4.5.1 Uzun QT sendromu (Long QT syndrome)

Uzun QT sendromu (LQTS); EKG de uzamış QT mesafesi, ventriküler aritmiler, torsade de pointes (TDP) ve ventriküler fibrilasyona eğilim sebebiyle oluşan senkop ve ani ölümle karakterize klinik ve genetik olarak heterojen bir sendromdur. QT mesafesindeki uzama ve T dalga morfolojisinde görülen anormallikler sendromun özelliklerini oluşturur.

LQTS, membran iyon kanallarındaki yapısal ve fonksiyonel defektlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüzde konjenital LQTS'nin 12 farklı alt tipi tanımlanmıştır. řu ana kadar yapılan çalışmalar sonucunda 300 civarında mutasyon saptanmıştır.

Konjenital Uzun QTS'nin ana tipleri; otozomal dominant geçişli Timothy sendromu, Andersen sendromu, Romano-Ward ve otozomal resesif geçişli Jervell

ve Lange-Nielsen sendromlarıdır. Akkiz olarak görülen form, konjenital forma kıyasla daha sık görülmektedir. İlaçlara, elektrolit bozukluklarına, bradikardiye, toksinlere ve miyokardiyal iskemiye bağlı olarak gözlenir. Akkiz formda tedavi sorumlu ajanın kesilmesi, elektrolit bozukluklarının giderilmesi gibi nedene yöneliktir. Konjenital LQTS de ise beta adrenoreseptör blokerleri tedavideki ilk basamaktır. Beta-blokerlere cevap alınamayan hastalarda servikal torasik sempatektomi, kalp pili ve implante edilebilir kardiyoverter defibrilatör (ICD) alternatif tedavi yöntemleridir (55).

Uzun QT sendromunun konjenital formu kalıtsal bir iyon kanalı hastalığıdır. Hastalık transmembranöz sodyum ve potasyum iyon kanalı proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayı meydana gelmektedir (56) 1995 yılında Keating ve meslektaşları Uzun QT hastalığına sebep olan iyon kanalı genlerindeki değişimlerin otozomal dominant (OD, sadece 1 mutant allelin hastalığın görülmesine neden olması) geçişli olduğunu açıkladılar. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar farklı birçok Uzun QT formunu ortaya çıkarmıştır. Uzun QT hastalığının toplumlarda görülme sıklığı 1:3000-5000'dir (10).

Tablo 4.5.1.1 Uzun QT tipleri ile ilişkilendirilmiş genlerin listesi (57)

Gen	Fenotip	Tanı Oranı	Nokta Mutasyonları
KCNH2	LQTS2	25%-30%	97%-98%
KCNQ1	LQTS1	30%-35%	97%-98%
SCN5A	LQTS3	5%-10%	Raporlananları hepsi
AKAP9	LQTS11		
ANK2	LQTS4	<1%	
CACNA1C	LQTS8	<1%	
CALM1	LQTS14	<1%	
CALM2	LQTS15	<1%	
CAV3	LQTS9	<1%	
KCNE1	LQTS5	<1%	
KCNE2	LQTS6	<1%	
KCNJ2	LQTS7	<1%	
KCNJ5	LQTS13	<1%	
SCN4B	LQTS10		
SNTA1	LQTS12	<1%	

4.5.2 Kısa QT sendromu (Short QT syndrome)

Kısa QT sendromu (SQTS), kısalmış QT intervali, uzun sivri ve simetrik T dalgası, atriyal fibrilasyona (AF) eğilim ve ani ölüm riskinde artış gösteren otozomal dominant bir hastalıktır (56).

Genellikle yapısal kalp hastalığı olmayan infantlar, çocuklar ve genç insanlarda görülmektedir. Hastaların başka bir ortak özelliği çoğunun ailesinde ani kardiyak ölüm öyküsünün bulunmasıdır. Hastalığın genetik temelinde kardiyak potasyum kanalı ile ilgili 3 farklı gen mutasyonunun (*KCNH2-KCNQ1-KCNJ2*) rol oynadığı bilinmektedir. Kısa QT sendromu olan hastalarda ani kardiyak ölüm riskinin yüksek olması nedeniyle, ICD kullanımı tedavinin en önemli parçasıdır (58).

4.5.3 Brugada sendromu

Brugada Sendromu ilk kez 1950'lerin başında tanımlandı. 1990 yılında Brugada belirgin yapısal kalp hastalığı olmayan, sağ ventriküler EKG anormalliği bulunan ve ani ölümlere eğilim gösteren hasta gruplarında tanımlandı. Günümüzde Brugada Sendromu sağ prekardial EKG abnormalitesi ile tanımlanır ve yüksek risk grubundaki hastalarda %40'lık 5 yıla kadar varan yaşam oranıyla ölüm oranı yüksek bir hastalıktır (10).

Na⁺ kanalının oluşumundan sorumlu *SCNA5* genindeki mutasyonlar Uzun QT 3 ve Brugada Sendromu için aday genlerdir ve bu iki sendromun sıkı ilişkisini göstermektedir. Idiopatik VT hastalarının bazı alt gruplarına sağ bundle-branch blok, ST-segment artışı ve ani ölümle karakterize olan belirgin EKG'ler açıklanmıştır ve yeni klinikler Brugada Sendromunda referans edilmiştir. Brugada Sendromu-2 (BrS2) ye yol açan mutasyonlar ise *GPD1L* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like) geninde tespit edilmiştir (1).

Prekordiyal derivasyonlarda (V1-V3) sağ dal bloğu ile birlikte ST yüksekliği görülen hastalar, ventriküler fibrilasyon gelişme riski taşırlar. Brugada sendromu, genellikle yapısal kalp hastalığı olmayan 4. Dekat , erkek hastalarda gözlenir. Hastalıktan, hücre membranında voltaj bağımlı Na⁺ kanalını kodlayan *SCN5A* gen mutasyonları sorumlu tutulmaktadır. Amiodaron ve β-Blokerler bu hastalarda etkili değildir. Tedavide ICD ve kinidin önerilir (59).

4.5.4. Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (KPVT)

Reid ve arkadaşları 1975 yılında kalbinde yapısal anomali bulunmayan, 6 yaşında bir kız çocuğunda efor ve duygusal stres ile artan çift yönlü ventriküler taşikardi saptadılar (60). Daha sonraki yıllarda, aileleri içeren vaka serileri ve ayrıca sporadik vakalar görüldü. KPVT prevalansı kesin olarak bilinmemekle birlikte 1:10,000 olarak tahmin edilmektedir.

Kalıtımsal aritmojenik bozuklukların en ciddilerinden birisidir. Genetik bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan 2 tipi vardır. Otozomal dominant olan tipte kardiyak ryanodine reseptör (*RyR2*) geninde; otozomal resesif olanda ise kardiyak calsequestrin (*CASQ2*) geninde oluşan mutasyonlar sebep olmaktadır. Senkop, polimorfik ventriküler taşikardi ve ani ölüm ile karakterizedir. %30 olguda, ailede bir veya daha fazla sayıda ani kardiyak ölüm öyküsü mevcuttur. Her iki tipte de hücre içinde Ca^{++} düzeyi artar. Sıklıkla erken çocukluk çağında semptomlar görülse de bazen 30'lu yaşlarda da bulgu verebilir.

Klinik değerlendirmeler ve genetik tarama ile erken tanı mümkündür ve önemlidir. Çünkü β -adrenerjik blokerler ve ICD tedavisi çoğu vakayı kurtarabilir (61).

4.5.5. Ailesel atriyal fibrilasyon

Atrial fibrilasyon kalbte SAD'da bulunan pacemaker hücrelerine benzer işlev yapan farklı merkezlerin ortaya çıkmasıyla oluşur (62)

Atrial fibrilasyon (AF) bulunan hastaların temel özelliği EKG de düzensiz RR aralıklarıdır ve belirgin bir P dalgası bulunmamaktadır. Hastalığın prevalansı % 1-2 ile en yaygın aritmi türüdür. Avrupada bu hastalıktan şikayetçi yaklaşık 6 milyon insan vardır. AF sol ventriküler işlev bozukluğu ile de ilişkilendirilmiştir (63)

4.5.6. Hasta sinüs sendromu HSS (Sick sinus syndrome 2)

Hasta sinüs sendromunda sinüs nodunda yapısal bozukluklara rastlanır. Sinüs nodunda duraklama, düzenli-düzensiz atriyal taşikardi, taşikardi-bradikardi atakları veya atriyal fibrilasyon, A-V ileti kusurları gibi çeşitli aritmi tipleri ile karakterize olur (64).

4.5.7. Aritmojenik sağ ventrikül displazisi (ASVD) (Arrhythmogenic right ventricular dysplasia)

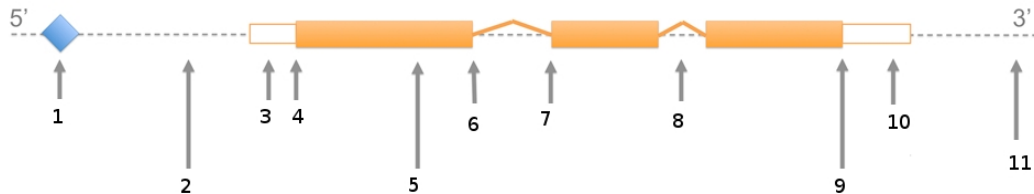
Aritmojenik sağ ventrikül displazisi (ARVD), sağ ventrikülde yer alan miyokardların fibröz yağ doku ile yer değiştirmesiyle oluşur. Prevalansı yaklaşık olarak 4.4-6:10000 arasındadır. En sık görülen semptomları, efor sonrası halsizlik göğüs ağrısı ve bayılmadır. Tanı yaşı genellikle 20-50 arasındadır ama hastaların % 10'unda 20 yaşından önce tanı konulabilmektedir. Klinik bulguları arasında sağ prekordial derivasyonlara lokalize depolarizasyon/repolarizasyon değişiklikleridir (65).

4.5.8. Atrial standstill 2 (Atrial sessizlik 2)

Atrial sessizlikte sinoatrial düğümden beklenen zamanda uyarı çıkmaz ve bradikardial ritm oluşur. Yüzeysel EKG sinde P dalgası yoktur ve QRS kompleksi ile arrest sonrası gelen ilk P dalgası arasında uzun bir izoelektrik çizgi bulunur. Uzun süren sinüs arrestte atriyal, nodal veya ventriküler escape atım (veya kaçış ritmi) görülür (66)

4.6. Ailesel Kalıtım ve Nokta Değişimleri

DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)'nin RNA (Ribo Nükleik Asit) düzeyinde ya da protein düzeyinde ifadesi olan fonksiyonel birimine gen denir. Gen, düzenleyici kısım (promoter), ifadesi olan dizi ve diğer fonksiyonel dizilerden oluşur. Genin bölümleri şekil 4.6.1'de gösterilmiştir (67).



Şekil 4.6.1. Genin Bölümleri: 1) Düzenleyici dizi. 2) İntergenik 5 üssü yönü. 3) 5 üssü UTR. 4) Ekzonun başlangıcı. 5) Ekzon. 6-7) Splice diziler. 8) İnteron. 9) Stop kodon. 10) 3 üssü UTR. 11) 3 üssü yönü.

İnsan genomu 23 çift kromozom, yaklaşık 20 ila 23 bin gen ve 3.2 milyar baz (Adenin-A, Guanin-G, Sitozin-S, Timin-T) çiftinden oluşmaktadır. 23 çift kromozomun yarısı anneden yarısı da babadan çocuğa aktarılır. Her bir çift kromozom genin iki allelini içerir. Kromozomların 1 den 22'ye kadar olanı otozomal olarak, 23. kromozom ise cinsiyet kromozomu (X ve Y) olarak adlandırılır. Kalıtım materyali olan DNA'nın kendini eşlemesine replikasyon, DNA'nın fonksiyonel birimlerinden RNA sentezine transcription, RNA'dan protein sentezine ise translation denilir. Bu mekanizmada DNA üzerinde meydana gelecek noktasal baz değişiklikleri eğer genler üzerinde meydana gelirse RNA düzeyinde ve protein düzeyinde bozulmalara sebep olacaktır. 19. yüzyılın ortalarında Gregor Mendel bu noktasal baz değişimlerinin ailesel geçiş mekanizmasını açıkladı ve 5 farklı kategoride topladı:

Otozomal Dominant (OD) geçiş: Mutasyonun anneden ya da babadan gelen tek bir allel üzerinde olsa dahi hastalığa sebebiyet vermesi.

Otozomal Resesif (OR) geçiş: Mutasyonun anneden ve babadan gelen iki allel üzerinde iken hastalığa sebebiyet vermesi.

X'e bağlı dominant geçiş: Mutasyonun dişi bireyi erkekten daha fazla etkilemesi.

X'e bağlı resesif geçiş: Mutasyonun Erkek bireyi dişi bireyden daha fazla etkilemesi.

Mitokondrial geçiş: Mitokondrial genetik yapı her zaman anneden çocuğa geçiş gösterir (68).

Tablo 4.6.1. Noktasal değişimlerin kategorizasyonu

Değişim	Açıklama	Örnek (Gen)
Nokta varyantlar (<i>a, b, c, d şıkları</i>) (<i>Tek nokta değişimi, TND</i>)	Baz değişimleri ile oluşan Nokta varyasyonlar Transisyon veya Transversiyon şeklinde olur. Pirimidin bazları olan Timin (T) ve Sitozin (C) değişirse ya da pürin bazları olan Adenin (A) ve Guanin (G) yer değişikliği olursa Transisyon denir. Pürin ile pürimidin bazları yer değişikliğine Transversiyon denir.	G>A, G>T, C>A, T>A

a- Missense (Yanlış anlamlı)	DNA üçlü (triplet) kodonunda bir baz değişimi sonrasında kodondan sentezlenen aminoasit değişir.	p.R23G
b- Silent (Sessiz, Sinonim değişim)	DNA üçlü (triplet) kodonunda bir baz değişimine rağmen kodondan sentezlenen amino asit değişmez.	p.R23R
c- Nonsense (Susturucu)	Üçlü (triplet) kodonda meydana gelen bir baz değişimi sonrasında STOP kodon oluşturur.	p.R23X
d- Nötral	Kodlamayan DNA bölgelerinde oluşan değişimler.	
Duplikasyon (Eklenmeler)	Sekans dizisinin eklenerek kendisini kopyalamasıdır. Eğer bu eklenme DNA'daki 3 lü kod yapısını bozarsa çerçeve kayması (frameshift) olarak adlandırılır.	c.81dupGTT
Delesyon (Eksilme)	Sekans dizisinde baz eksilmesidir. Eğer bu silinme DNA'daki 3 lü kod yapısını bozarsa çerçeve kayması (frameshift) olarak adlandırılır.	c.81delT
İnsersiyon (Eklenme)	Sekans dizisinde baz eklenmesidir. Eğer bu silinme DNA'daki 3 lü kod yapısını bozarsa çerçeve kayması (frameshift) olarak adlandırılır.	c.81nsT
Splice değişimler	İntronda meydana gelen (ekzon artı eksi 2 baz çifti) noktasal baz değişimleri sonucu bir ya da daha fazla ekzonun RNA düzeyinde ifadesini eksilten değişimler.	c.81-1T>C

4.7. Yeni Nesil Dizileme (YND) Çalışma Prensipleri

DNA dizileme metodu Sanger, Coulson, Maxam ve Gilbert tarafından 1977 yılında geliştirildi. DNA'nın otomatik cihazlar ile dizilenmeye başlandığı bu metotta Sanger daha popüler oldu ve birinci nesil (jenerasyon) dizileme metodunun adı Sanger dizileme olarak yaygınlaştı. Spesifik floresan boyalar ile işaretlenmiş ve dizi sonlandırıcı ddNTP (Dideoxynucleotides triphosphates) bazlarının kapiler elektrofez cihazından geçerek detektde edilmesine dayanan Sanger metodu bugün hala 'altın standart' olarak kabul edilmektedir (28, 74).

1977'den günümüze kadar farklı teknolojik alt yapılara dayanan ikinci ve üçüncü nesil dizileme metodları geliştirildi. YND olarak da adlandırılan bu metodların ikinci nesil olanların ilki 2004 yılında geliştirilen 454 Roche GS FLX Sistemi, ikincisi ise 2006 yılında geliştirilen Illumina genom analizatör sistemleridir. 2007 yılında SOLID dizileme cihazı ve 2010 yılında da Ion Torrent dizileme cihazları geliştirildi. YND'de çalışma temelde iki bölümde gerçekleştirilir. Genetik materyalin cihaza yüklemek için hazırlık aşaması (kütüphane oluşturma) ve cihazdaki DNA dizileme aşaması (69) .

4.7.1 Kütüphane hazırlığı

YND'de kütüphane hazırlığında ilk basamak genomik DNA'nın rastgele bir şekilde kırılarak parçalara ayrılmasıdır (fragmente edilmesi). Illumina nextera teknolojisinde bu rastgele kırma işlemi modifiye edilmiş transposon enzimleri ile gerçekleştirilir. Transposon enzimleri genomik DNA'yı rastgele kırarken, kırılan DNA parçalarının 5' ve 3' uçlarına sekans dizilerini içeren DNA parçalarını ekler. İkinci işlem; bu sekans dizileri kalıp DNA olarak kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile evrensel adaptör-barkod (P5 ve P7 adaptör dizileri ile örnek spesifik diziler) dizilerinin parçalarının fragmente olmuş DNA'ya eklenmesidir.

Transposon Sekansı:

5'-

GCCTCCCTCGCGCCATCAGAGATGTGTATAAGAGACAG

5'-

GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGATGTGTATAAGAGACAG

Adaptörler (örnek spesifik barkot ve P5 dizisi ile)

5'-

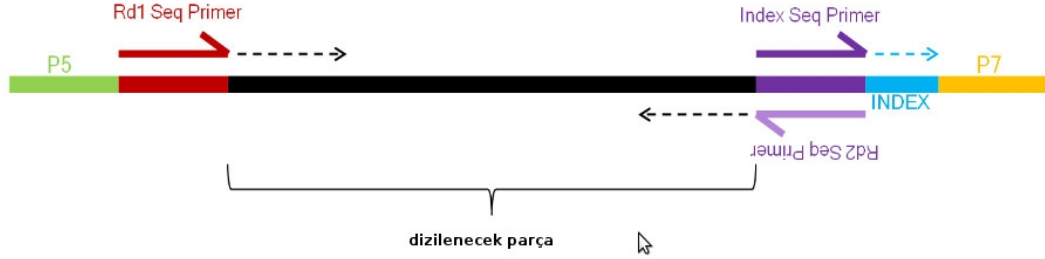
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[barcode]CGGTCTGCCTTGCCAGCC
CGCTCAG-3'

PZR Primerleri

5'-AATGATACGGCGACCACCGA

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA (70)

Rastgele kırılan ve uçlarına adaptör eklenen bu DNA parçalarının çalışmaya uygun uzunluktaki parçaların ayıklanması işleminde manyetik özellikleri olan özel boncuklar kullanılır (76, 77).



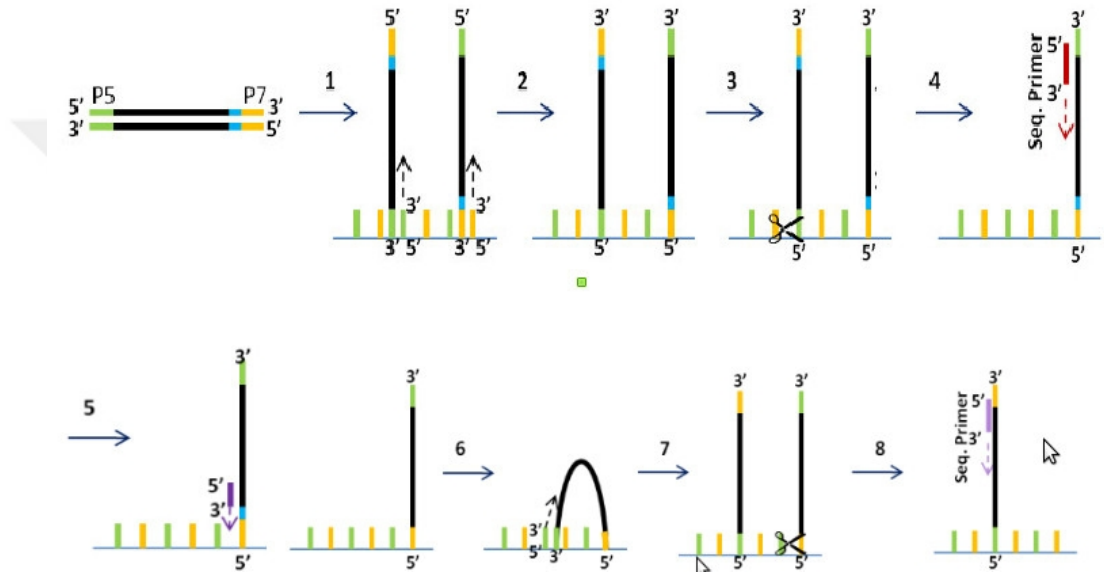
Şekil 4.7.1.1. P5-P7 adaptörleri, indeks ve sekans dizilerinin oluşturduğu kütüphane fragmanı

Parçalara bölünen ve adaptör-barkot bağlanan DNA fragmentlerinden incelenecek hedef bölgelerin ayıklanması işlemine yakalama (capture) denilir. Bu seçim hedef diziyeye uygun DNA parçalarının (prop) yardımı ile tüm DNA havuzundan istenilen parçaların çekilmesi ile gerçekleştirilir. Bu işleme hedef bölgenin zenginleştirilmesi de denilir (73).

4.7.2 Cihaz üzerinde klonal amplifikasyon ve dizileme

Illumina platformu (MiSeq, NextSeq500, HiSeq) dizileme aşamasında DNA parçalarına reaksiyonu durdurucu etkide floresan boyalı nükleotidlerin bağlanarak okunması ve bu nükleotidlerin ortamdaki uzaklaştırılarak bir sonraki nükleotidin okunmasına olanak vermesini içeren “Sequencing by reversible termination” dizileme mantığı ile çalışır. Uçları adaptör ve indeks dizileri ile uzatılmış DNA parçaları (kütüphane) cihaz içinde illumina dizileme platformuna özgü flow-cell (dizileme işleminin gerçekleştiği yüzey-cihaz parçası) (Şekil 4.7.2.1.) üzerinde “bridge PCR” yöntemi ile klonal olarak çoğalır (Şekil 4.7.2.2.). Klonal olarak çoğalan DNA parçalarına; 3'OH grubu bloke edilmiş ve floresan boya ile etiketlenmiş nükleotidler (dNTP), DNA polimeraz enziminin aktivasyonu ile her bağlandığında ışımaya yarar ve cihaz kamera ile bu floresan boyaların verdiği ışık

rengine göre DNA baz sırasını belirler. İkinci aşamada 3'OH grubudaki blokaj kaldırılır ve yeni reaksiyon için DNA parçaları hazır hale gelir. Tekrarlayan bu reaksiyonların her birine döngü (cycle) denir. YND teknolojilerinden sadece illumina sistemleri Paired-end okuma teknolojisini kullanır. DNA fragmentleri klonal olarak çoğalırken bridge-PCR teknolojisinin sağladığı bu olanakla yüksek kalitede ve yüksek miktarda data oluşturma esnekliğine kavuşur (69,74,75).



Şekil 4.7.2.1 Paired-End Okuma

Illumina teknolojisine özgü paired-end okumada şekil 4.7.2.1 de görülüşü gibi adaptör ve barkot dizileri eklenmiş kütüphane fragmanı köprü-amplifikasyonu (bridge-amplification) ile flowcell üzerinde klonal olarak çoğaltılarak dizileme gerçekleştirilir. Şekil üzerindeki numaraların açıklaması aşağıda verilmiştir.

1) Denaturasyon sonucu tek zincirli hale gelen DNA kütüphanesi Flow-cell'deki DNA parçalarına spesifik P5 ve P7 adaptör dizisi ile DNA'nı 3' ucundan FlowCell yüzeyine yapışır. Flow-Cell üzerindeki oligonükleotidler primer görevi görerek tek zincirli DNA'nın komplementini oluştur.

2) Orjinal dizi (DNA'nın 3' ucundan bağlanan ilk fragman) yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Geriye kovalent bağ ile Flow-Cell'e bağlanmış kütüphane dizileri kalır.

3) Her bir fragmentten bridge-amplifikasyon ile 1000 kopya oluşur (cluster generation). Bu cluster'lardan flow-cell'in kapasitesine göre milyonlarca ayrı birimler olarak oluşur.

P5 adöptörü kesilerek ortamdan uzaklaştırılır ve sadece P7 adaptör dizisi ile flow-cell' bağlı fragmentler kalır.

4) Sekans primeri P5 adaptör dizisine bağlanarak dizileme (sequencing by synthesis) işlemi başlar. Bu üretilen diziye Read-1 dizisi denilir.

5) Örnek spesifik barkotlar (indeks) Read-1 okuması gerçekleştikten ve Read-1 dizisi uzaklaştırıldıktan sonra indeks primer bağlanarak okunur. Böylece P7 ucundaki barkot dizisi dizilenmiş olur.

6) Flow-cell üzerinde yeniden bridge-amplifikasyon ile çoğalma işlemi gerçekleşir.

7) Bu sefer P7 adöptörü kesilerek ortamdan uzaklaştırılır ve sadece P5 adaptör dizisi ile Flow-cell'e bağlı fragmentler kalır.

8) Sekans primeri P7 adaptör dizisine bağlanarak dizileme (sequencing by synthesis) işlemi başlar. Bu üretilen diziye Read-2 dizisi denilir. (76).

4.7.3 YND'nin sınırları

1) Genomik DNA'da fragmente olmuş kütüphane hazırlığı birbirini takip eden bir dizi çalışma gerektirir. Hem kütüphane oluşturulurken hem de cihaz üzerinde gerçekleşen klonal amplifikasyon ile aynı DNA parçalarından birçok kopyanın oluşturulması PZR hatalarına yol açar. Bu hatalar orjinal DNA nukleotid dizilerinden bazılarının yanlış kopyalanmasına neden olur (PZR çoğaltma hataları, PZR duplication).

2) YND dizileme teknolojisinin getirdiği bir diğer sınırlama fragmente olmuş DNA'dan gelen verinin kısa okumalar ile oluşturulması. Bu kısa okumalar daha sonra biyoinformatik programlar ile birleştirilerek bütüne gidilir.

3) Bir yüzey üzerinde (Illumina-Flowcell) Bridge-Amplifikasyon (köprü kurarak çoğalma) ile klonlanan DNA fragmentlerinin nukleotidlerinin okunması (dizileme) 4 farklı boya ile işaretlenmiş deoksi-nukleotidlerin (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) cihaz üzerinde bulunan charge-coupleddevice (CCD) kameralar ile okunması ile gerçekleşir. Kamera her ışımayı gerçek zamanlı ve sıralı bir şekilde okuyarak kaydeder. Kameranın çözünürlüğü ve odaklanma kapasitesi bu teknolojinin sınırlarının belirlenmesinde bir diğer önemli husustur (69,77).

4.8. Data İşleme ve Biyoinformatik

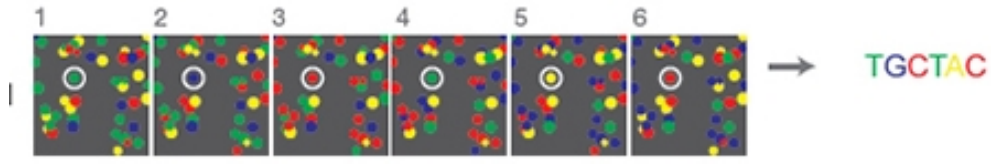
4.8.1. Fotoğrafların nükleotid dizi dosyalarına dönüştürülmesi ve kalitesi

Her bir nükleotid ışması kalitesine göre skorlanarak **bcl2fastq** dönüştürme programı ile BCL dosyasından (fotoğraf dosyası) baz kalite skorları ile sekans dizilerinin olduğu metin dosyasına (örnek olarak .txt uzantılı doyalar) dönüştürülür. Bu dönüştürme sırasında dosyalar birden fazla örneğin birbirinden ayrılmasını sağlayan barkot dizilerine uygun olarak örnekler birbirinden ayrılarak üretilir.

```
@DB775P1:229:C1JDAACXX:3:1101:17936:7565 1:N:0:  
CTATTACTGCCTGCAACAACATAAAGGATACCATAAAATTGTAATCTTAACAAAGCAGAGATCGGAAGCGGTTCAGCAG  
+  
CCCCFFFFHHHGGJIIJJJJGGJJJJJJIIJJJJGIGIIJJJJJJGIIJJIIJJIIHIIJJJJIIHHEDFCEEEE  
@DB775P1:229:C1JDAACXX:3:1101:17888:7593 1:N:0:  
TACATCAGCAAACCACGAGGTACGCAAATACATGGTGCTTTAATCTTCAGTCCTCGGCTTTCCTCATATACAT  
+  
CCCCFFFFHHHHJJJJJHIIHIIJJJJJJJJJJFHIIJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJIIJJJJHHHHHHFFFFFEE  
@DB775P1:229:C1JDAACXX:3:1101:17820:7597 1:N:0:  
GTAACGCAACATATGCTGGATTCTGGACAATGAATATCGAAGTAAATAAGAAAACCTCATACCTCATCTTTCTCAATGG  
+  
BCCDFFEFHHHHJJJJJJIIJJJJJJJJIIIGIIFIIJJJJFHIJGGIGIJJJJJHJHGHDIJCEEGHIGIGACEF
```

Şekil 4.8.1.1 Fastq file içeriği ve skorlama

MiniSeq ve MiSeq illumina sistemlerinde bu BCL'den Fastq dosyasına çevirme işlemi cihaz üzerinde gerçekleşirken, NextSeq, HiSeq ve Novaseq illumina platformlarında cihaz çıktısı olarak BCL dosyası alınır (78).



Şekil 4.8.1.2 Fotoğraf dosyalarından dizi dosyalarının oluşturulması.

Her bir bazın kalite skorlarının bulunduğu Fastq metin dosyalarında bu skorlama ‘Phred Kalite Skorlama ile yapılır. Dizileme sırasında oluşan olası nukleotid hataları bu skorlama ile belirlenir. Her bazın kalitesi “ $Q_{\text{phred}} = -10 \times \log_{10}(P_e)$ ” formülüne göre hesaplanır ve 1’den 60’a kadar skorlanır. Bu skorlamanın anlamı **Tablo 4.8.1.1**’de verilmiştir (84, 85).

Tablo 4.8.1.1.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%

4.8.2. Sekans dizilerinin referans genom ile hizalanması

Yapısal baz değişimlerinin (varyant) saptanabilmesi için YND cihazından gelen kısa okumaların büyük referans genomu (insan genomu) ile eşleştirilmesi gerekir (80). Bunun için Burro-Wheeler Aligment (BWA, Li and Durbin 2009], SOAP2 (Li et al. 2009) ve Bowtie (Langmead et al. 2009) gibi kısa okumaları büyük genomlar ile eşleştirebilen özel yazılımlar kullanılır (8)

İnsan üzerine yapılan çalışmalarda referans genom olarak Genome Reference Consortium (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc>)’un 2009/02/27 tarihinde erişime açtığı *Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37, hg19)* ya da 2017/12/21 atriğinde yayınlanan yeni versiyonu *Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 12 (GRCh38.p12)*

kullanılabilir. GRCh37'ye göre insan genomunun büyüklüğü 3,137,144,693 baz çifti GRCh38.p12'ye göre ise 3,257,319,537 baz çiftidir (81,82)

YND datasının referans genom ile karşılaştırılması sonucu “Sequence Alignment Map (SAM)” adında yeni bir metin dosyası elde edilir. Bu yeni dosyada YND dizilerinin genomda nereyle eşleştiği, kalitesi, okuma derinliği* ve genomik koordinatları gibi varyant analizi için gerekli bilgileri içerir. SAM dosyasının bilgisayarda kapladığı yeri azaltmak ve hızlı işleme olanak vermek için boyut olarak daha küçük boyutlu BAM (Binary Alignment Map) formata çevrilir (83).

BAM dosyaları Broad Enstitüsü tarafından geliştirilen ve işlenmiş datayı görsel olarak bakmaya imkan veren Integrative Genomics Viewer (IGV) programı kullanılarak incelenir (Şekil: 4.8.2.1) (84).



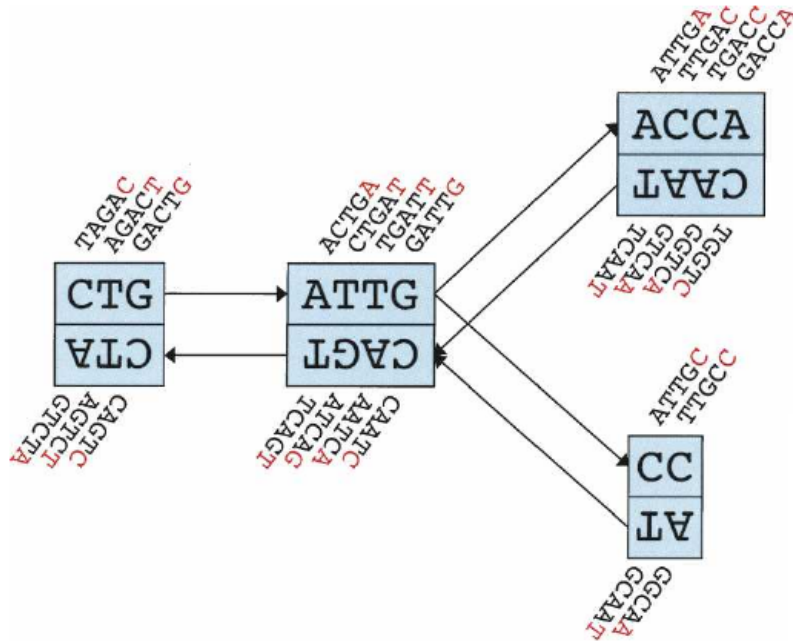
Şekil: 4.8.2.1 Dizilerin IGV görüntüsü.

*Okuma derinliği: Referansta aynı bölge ya da noktaya eşleşen sekans dizilerinin (Read1 ve Read2) sayısıdır.

4.8.3. Varyant dosyasının oluşturulması

Varyantlar (tek nokta değişimleri, insersiyon, delesyon) SAM/BAM dosyalarından referans ile eşleşmeyen dizilerin belirli programlar kullanılarak çağrılmasıyla elde edilir. Bu programların bazıları SAMtools, Genome Analysis Tool Kit (GATK) Unified-Genotyper and HaplotypeCaller , FreeBayes , Platypus, Atlas2, Suite, SNP and INDEL callers in the Short Oligonucleotide Analysis Package (SOAP, <http://soap.genomics.org.cn/>)’dır. Bu programlardan FreeBayes, GATK HaplotypeCaller ve Platypus “De Bruijn graph” algoritmasını kullanır ve direk olarak SAM/BAM dosyasından varyantları çekerler (85).

“de Bruijn” grafiği kısa okumalar üzerinde küçük diziler (k-mer = k-1 nukleotid) halinde tarama yaparak varyantları saptar. Bu yöntem aynı nukleotid bölgesinin derinlikli okuması ve kısa baz dizilerinde verimli çalışır (86).



Şekil 4.8.3.1. Brujin grafiğinin örnek gösterilişi. Burada k=5 (k-mers) olarak verilmiştir. Üstteki dizi forward yönü, alttaki dizi komplementerini göstermektedir.

4.8.4. Varyant dosyasının veri bankaları ile ilişkilendirilmesi

Bulunan varyantlar, klinik veri bankaları, populasyon veri bankaları, fonksiyonel analiz yazılımları gibi bulunan değişimin çok yönlü değerlendirmesine imkan verecek bilgiler ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Bu değerlendirmede American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* kriterleri de dahil birçok parametre uygulanır. Bu kriterlerde kullanılan veri bankalarının en yaygınları aşağıda açıklanmıştır (87).

*ACMG rehberi yeni bulunan varyantların sınıflandırılmasında toplumsal frekans, klinik veri bankaları, sekans bankaları, missense değişimler, splice etki, korunmuş bölgelerin fonksiyonel analizini yapan (*in silico*) programlardan gelen veriler birlikte değerlendirilir. Bu değerlendirme sonunda elde edilen skor varyantın patojenik etkisinin analizinde kullanılır.

İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı (HGMD)

İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı (Human Gene Mutation Database, HGMD) nükleer genlerdeki mutasyonların altında yatan veya insandaki kalıtsal hastalıklarla yakından bağlantılı yayınlanmış kapsamlı germline mutasyonlardan oluşmuştur. Yazıldığı tarih olan mart 2017'de veri tabanı 203.000 den fazla tanımlanmış gen lezyonunu içeriyordu. Halen yılda 17.000'i aşan yeni mutasyon girdileri ile Next-Generation Sequencing (NGS) datalarının yorumlanması için önemli bir biyoinformatik araçtır (88).

HGMD kayıtlarında verilerin sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

a) Hastalıkla ilişkili polimorfizm (Disease-associated polymorphism, DP): Hastalık ve fenotiple ilişkisi üzerinden rapor edilmiş ancak fonksiyonel (gen ifadesi çalışmaları) kanıtları yetersiz olan varyantlar bu kategori altındadır.

b) Hastalıkla ilişkili fonksiyonel polimorfizm (Disease-associated polymorphism with supporting functional evidence, DFP), Hastalık ve fenotiple ilişkisi üzerinden rapor edilmiş ve fonksiyonel (gen ifadesi çalışmaları) kanıtları sunulmuş varyantlar bu kategori altındadır.

c) Fonksiyonel polimorfizm (Functional poliyorphism, FP): Hastalıkla ilişkisi rapor edilmemiş ancak genin ifadesi, yapısı ve fonksiyonuna etki eden açısından rapor edilmiş varyantlar.

d) Hastalık nedeni mutasyon? (Disase causing mutation?, DM?): Muhtemel patojenik olarak rapor edilmiş varyantlar.

e) Hastalık nedeni mutasyon (Disase causing mutation, DM): Patojenik olarak rapor edilmiş varyantlar (89).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

OMIM insan gen ve genetik fenotipi ile ilgili verilerin tutulduğu ve günlük olarak güncellenen bir data bankasıdır. 15000'in üzerinde gen ve bilinen Mendelyen hastalıkların tümünü içeren veri bankası net ve kısa bilgiler sunar. OMIM'de bulunan kayıtlar fenotip ve genotip arasındaki ilişkiye odaklanmıştır. Bu data bankası 1960'lı yılların başında Dr. Victor A. tarafından hazırlanmaya başlanmıştır. Online versiyona 1987 yılında geçilmiştir ve günümüzde National Center for Biotechnology Information (NCBI) altında ücretsiz olarak hizmet vermektedir (90).

ClinVar

ClinVar insanlarda varyant ve fenotip arasındaki ilişkilerle ilgili yayınlanmış kaynakların verisini tutan ücretsiz faydalanılabilen veri bankasıdır. Bu veriler varyantların klinik yorumlanmasında önemlidir. Varyant kayıtları Human Genome Variation Society (HGVS) standartlarına uygun olarak tutulur (91).

Varyantların patojenik etkileri ACMG'nin 5'li sınıflandırmasına göre; patojenik, muhtemel patojenik, benign, mutemel benign ve klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS) olarak verilir. Değişim için birden fazla kayıt var ise 'conflict/çelişki' olarak tanımlanır (92).

HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee)

İnsan genomunda bulunan protein kodlayan genlerin, kodlamayan RNA (Ribonucleic Aside) genlerinin ve pseudogene bölgelerinin isimlendirilmesi ve sembolleştirilmesine katkıda bulunan komitedir. Kataloglarında 40.000'in üzerinde gen bölgesi sembolleştirilmiştir (93).

dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism database)

dbSNP data bankası tek baz nukleotid değişimlerini (single nucleotide polymorphisms, SNPs), sınırlı sayıda bazın sebep olduğu delesyon ve insersiyon değişimlerini (deletion insertion polymorphisms, DIPs) ve kısa nukleotid tekrar bölgelerinin (hort tandem repeats, STRs) kayıtlarının tutulduğu data bankasıdır. Bu kayıtlar fonksiyonel çalışmaların performansını, populasyon yapılarının açıklanmasını, genetik haritalandırma çalışmalarında kullanılır ve insan genetiğinin anlaşılmasında önemli veriler sunar (94).

Populasyon Frekansı

Genetik varyantların data bankasını oluşturmak, değişimlerin toplumsal frekansını öğrenmek için önemlidir. Çünkü nadir Mendelyen hastalıkların araştırılmasında ve varyantın klinik etkisinin araştırılmasında ilk olarak yapılan işlerden birisi değişimin toplumsal frekansına bakmaktır. Son zamanlara kadar Exome Sequencing Project (ESP) 6,503 ekzom datasından elde edilen varyantların kaydını tutarken, 1000 Genomes Project (1000G) 2,504 tüm genom ve ekzom datasından gelen kayıtları tutuyordu. Bugün Exome Aggregation Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>) yüksek kalitede 60,706 ekzom datasının verisini paylaşmaktadır. Bu sayı 91,000 ekzom datasından yüksek kalitede olanların filtrelenmesiyle elde edilmiştir. Böylece polimorfik (toplumda görülme sıklığı %1'in altında olan varyant) olan varyantlar daha güvenilir bir şekilde elde edilebilmektedir (87,95).

Varyantların Fonksiyonel Etkilerinin Belirlenmesi: *In Silico* Programlar

Amino asit değişiminin fonksiyonel etkisini analiz eden *in silico* analiz programlarının ACMG sınıflandırmasında yaygın kullanılanları ve skorlaması aşağıda belirtilmiştir.

1) MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>): A" ("disease_causing_automatic"); "D" ("disease_causing"); "N" ("polymorphism"); "P" ("polymorphism_automatic")

2) MutationAssessor (<http://mutationassessor.org>): H: high; M: medium; L: low; N: neutral. H/M means functional ve L/N non-functional

3) FATHMM (<http://fathmm.biocompute.org.uk>): D: Deleterious; T: Tolerated

4) SIFT (<http://sift.jcvi.org>): D: Deleterious (sift<=0.05); T: tolerated (sift>0.05)

5) PolyPhen-2 HDIV(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>): D: Probably damaging (>=0.957), P: possibly damaging (0.453<=pp2_hdiv<=0.956); B: benign (pp2_hdiv<=0.452)

6 PolyPhen-2 Hvar (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>):D: Probably damaging (>=0.909), P: possibly damaging (0.447<=pp2_hdiv<=0.909); B: benign (pp2_hdiv<=0.446)

7) PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>)

<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/user-guide/filter/>

Splice etkide bulunabilecek değişimlerin fonksiyonel analizini analiz programlarının ACMG sınıflandırmasında yaygın kullanılanları aşağıda belirtilmiştir.

1) Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>)

2)

GeneSplicer

(http://www.cbc.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml)

3) NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>)

4) NNSplice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

Evrimsel olarak korunmuş bölgede saptanan nukleotidlerin fonksiyonel etkisinin analizini yapan programların ACMG sınıflandırmasında yaygın kullanılanları aşağıda belirtilmiştir.

1) GERP(<http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html>)

2) PhastCons (<http://compgen.bscb.cornell.edu/phast/>)

3) PhyloP (<http://compgen.bscb.cornell.edu/phast/>)

ACMG sınıflandırması ve VarSome programı

ACMG varyantları; patojenik, muhtemel patojenik, klinik anlamı kesin olmayan (uncertain significance, VUS), muhtemel benign ve benign olarak sınıflandırır. ACMG kriterleri de dahil yaklaşık 33 milyar varyant ve genetik bilgiyi bir araya getiren ve birçok klinik veriyi bir arada sunan herkese açık VarSome arama motoru ise birçok akademik yapıyı içinde barındırır (96).

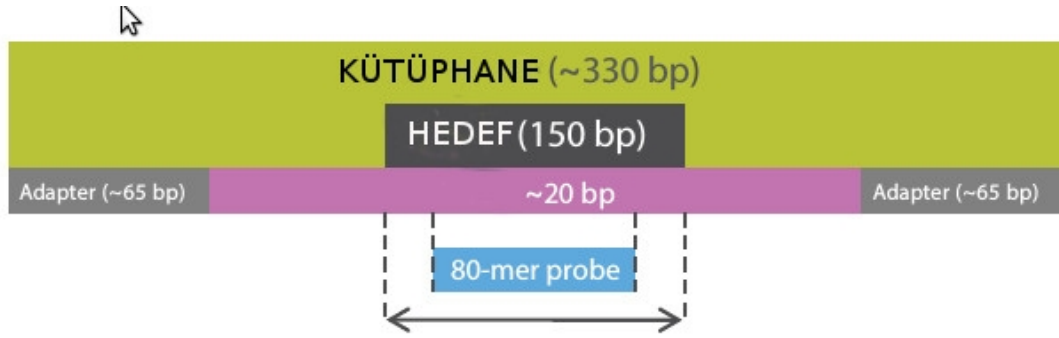
5. METOT VE MATERYAL

Mart 2016-Eylül 2017 tarihleri arasında İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'ne kalpte ritim bozukluğu test istemiyle gelen ≤ 16 yaşında 42 erkek, 30 kadın toplamda 72 kişi çalışma kapsamına alındı. Çalışmada materyal olarak, kalp ritim bozukluğu olan çocuklardan EDTA'lı tüplere alınan tam kan kullanıldı. Kan, soğuk zincir ile aynı gün merkezimize ulaştırıldı. Pıhtılaşmış ya da hemolize uğramış kanlar çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Gelen tam kan numunelerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, DNA kaliteleri bakıldı. Illumina TruSight Cardio kiti (FC-141-1010) kullanılarak örnek kütüphaneler TruSight Cardio Sequencing Kit Reference Guide (Document # 15063774 v01, January 2016) takip edilerek hazırlandı. Illumina Miseq cihazı ile kütüphane dizilendi. Veriler alındıktan sonra, analiz programlarının kullanılarak nokta mutasyonları, küçük delesyon ve insersiyonlar yönünden incelendi.

YND için uygun analiz programları (MiSeq analiz programı, ACMG, HGMD, ClinVar, OMIM vb.) kullanılarak hastalardan elde edilen dataalar biyoinformatik yöntemler kullanılarak karşılaştırıldı. Nokta mutasyon değişimleri anlaşıldı.

5.1. Illumina TruSight Cardio Kit

TruSight Cardio Sequencing Kit, Imperial College London'da geliştirilen 17 kardiyoloji hastalığını kapsayan 174 genlik hazır bir paneldir. Hedeflenen genlerin ekzonik bölgelerini en az 20X derinlikte yüzde en az 95 'lik bir başarı ile dizilenmesi için tasarlanmış ve optimize edilmiştir. 174 geni içeren hedef bölge genomda 572 milyon baz (Mb)'lık bir bölgeyi kapsar. Yakalama problemlerini uzunluğu 80-mer olarak olarak dizayn edilmiştir. Çalışmada 2x150 baz dizilebilme kapasitesindeki MiSeq Reagent Kit tavsiye edilmektedir ve bu kit ile indeks adaptörler kullanılarak 12 örneğe kadar çalışma önerilmektedir. Cardio kiti Nextera kütüphane hazırlama teknolojisini kullanır ve zenginleştirme protokolü ile hedef bölgeyi yakalamayı içerir (97).



Şekil 5.1.1 Hedef DNA'nın 80-mer lik probalar ile çekilmesi.

Çalışmada 174 genlik bu hazır panelin içinde ritim bozukluğu ile ilişkilendirilmiş 39 genin analizi yapılmış ve ritim bozukluğu bulunan hastalar bu 39 gen üzerinden değerlendirilmiştir. Genler ve ilişkili hastalıkların tablosu **Tablo 5.1.1.** de verilmiştir.

Tablo 5.1.1. Aritmi ile ilişkili incelenen 39 gen ve OMIM kayıtları

Gen Sembolü	Gen Açıklaması	OMIM	Fenotip	Geçiş mekanizması
<i>NPPA</i>	natriuretic peptide A	108780	Atriyal fibrilasyon, ailesel, 6 <i>Atrial fibrillation, familial, 6</i>	OD*
			Atriyal sessizlik 2 <i>Atrial standstill 2</i>	OR**
<i>KCND3</i>	potassium voltage-gated channel subfamily D member 3	605411	Brugada sendromu 9 <i>Brugada syndrome 9</i>	OD
<i>CASQ2</i>	calsequestrin 2	114251	Ventrikular taşikardi, katekolaminerjik polimorfik, 2 <i>Ventricular</i>	OR

			tachycardia, catecholaminergic polymorphic, 2	
<i>GJA5</i>	gap junction protein alpha 5	121013	Atriyal fibrilasyon, ailesel, 11 Atrial fibrillation, familial, 11	OD
			Atriyal sessizlik, digenik Atrial standstill, digenic (GJA5/SCN5A)	OD
<i>LMNA</i>	lamin A/C	150330	Kardiyomiyopati, dilated, 1A Cardiomyopathy, dilated, 1A	OD
<i>RYR2</i>	ryanodine receptor 2	180902	Aritmojenik sağ ventrikül displazisi (ARVD) 2 Arrhythmogenic right ventricular dysplasia 2	OD
			Ventrikular taşikardi, katekolaminerjik polimorfik, 1 Ventricular tachycardia, catecholaminergic polymorphic, 1	OD
<i>CAV3</i>	caveolin 3	601253	Uzun QT sendromu 9 Long QT syndrome	OD

			9	
<i>GPD1L</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase like 1	611778	Brugada sendromu 2 Brugada syndrome 2	?
<i>SCN5A</i>	sodium voltage-gated channel alpha subunit 5	600163	Atriyal fibrilasyon, ailesel, 10 Atrial fibrillation, familial, 10	OD
			Brugada sendromu 1 Brugada syndrome 1	OD
			Uzun QT sendromu -3 Long QT syndrome-3	OD
			Hasta Sinüs Sendromu 1 Sick sinus syndrome 1	OR
			Ventrikuler fibrilasyon, ailesel, 1 Ventricular fibrillation, familial, 1	
<i>ANK2</i>	ankyrin 2	106410	Kardiak aritmi, ankyrin-B ilişkili Cardiac arrhythmia, ankyrin-B-related	OD
			Uzun QT sendromu 4 Long QT syndrome 4	OD

<i>NKX2-5</i>	NK2 homeobox 5	600584	Atriyal septal hasarı 7 AV iletim hasarlı ya da hasarsız <i>Atrial septal defect 7, with or without AV conduction defects</i>	OD
			Hipoplastik sol kalp sendromu 2 <i>Hypoplastic left heart syndrome 2</i>	OD
			Ventrikular septal hasar 3 <i>Ventricular septal defect 3</i>	OD
<i>TRDN</i>	triadin	603283	Ventrikular taşikardi, katekolaminerjik polimorfik, 5 kas zyıflığı ile birlikte ya da bağımsız. <i>Ventricular tachycardia, catecholaminergic polymorphic, 5, with or without muscle weakness</i>	OD
<i>CACNA2D1</i>	calcium voltage- gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1	114204		
<i>AKAP9</i>	A-kinase anchoring protein 9	604001	?Uzun QT sendromu 11 <i>?Long QT</i>	OD

				syndrome-11	
<i>KCNH2</i>	potassium gated subfamily member 2	voltage- channel H	152427	Uzun QT sendromu 2 Long QT syndrome 2	OD
				Kısa QT sendromu 1 Short QT syndrome 1	
<i>CACNB2</i>	calcium gated auxiliary beta 2	voltage- channel subunit	600003	Brugada sendromu 4 Brugada syndrome 4	?
<i>KCNQ1</i>	potassium gated subfamily member 1	voltage- channel Q	607542	Atriyal fibrilasyon, ailesel, 3 Atrial fibrillation, familial, 3	OD
				Jervell ve Lange- Nielsen sendromu Jervell and Lange- Nielsen syndrome	OR
				Uzun QT sendromu 1 Long QT syndrome 1	OD
				Kısa QT sendromu 2 Short QT syndrome 2	OD
<i>KCNE3</i>	potassium gated subfamily regulatory subunit 3	voltage- channel E	604433	Brugada Sendromu 6 Brugada syndrome 6	
<i>SCN4B</i>	sodium	voltage-	608256	Atriyal fibrilasyon,	OD

	gated channel beta subunit 4		ailesel, 16 Atrial fibrillation, familial, 16	
			Uzun QT sendromu 10 Long QT syndrome-10	OD
<i>SCN3B</i>	sodium voltage-gated channel beta subunit 3	608214	Atrial fibrilasyon, ailesel, 17 Atrial fibrillation, familial, 17	OD
			Brugada sendromu 7 Brugada syndrome 7	OD
<i>KCNJ5</i>	potassium voltage-gated channel subfamily J member 5	600734	Uzun QT sendromu 13 Long QT syndrome 13	OD
<i>CACNA1C</i>	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C	114205	Brugada sendromu 3 Brugada syndrome 3	
			Timothy sendromu Timothy syndrome	OD
<i>KCNA5</i>	potassium voltage-gated channel subfamily A member 5	176267	Atrial fibrilasyon, ailesel, 7 Atrial fibrillation, familial, 7	OD
<i>KCNJ8</i>	potassium voltage-gated channel subfamily J member 8	600935		
<i>ABCC9</i>	ATP binding cassette subfamily C	601439	Atrial fibrilasyon, ailesel, 12	OD

	member 9		Atrial fibrillation, familial, 12	
<i>PKP2</i>	plakophilin 2	602861	Aritmojenik sağ ventrikül displazisi 9 Arrhythmogenic right ventricular dysplasia 9	OD
<i>MYH6</i>	myosin heavy chain 6	160710	Atriyal septal hasar 3 Atrial septal defect 3	
			Hasta Sinüs Sendromu 3 {Sick sinus syndrome 3}	
<i>CALM1</i>	Calmodulin 1, Na ile ilişkili. Listeden çıkar. Pseudogeni var.	114180	Uzun QT sendromu 14 Long QT syndrome 14	OD
			Ventrikular taşikardi, katekolaminerjik polimorfik, 4 Ventricular tachycardia, catecholaminergic polymorphic, 4	OD
<i>HCN4</i>	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4	605206	Brugada Sendromu 8 Brugada syndrome 8	
			Hasta Sinüs Sendromu 2 Sick sinus syndrome 2	OD

<i>RANGRF</i>	RAN guanine nucleotide release factor	607954		
<i>KCNJ2</i>	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2	600681	Andersen sendromu <i>Andersen syndrome</i>	OD
			Atriyal fibrilasyon, ailesel, 9 <i>Atrial fibrillation, familial, 9</i>	OD
			Kısa QT sendromu 3 <i>Short QT syndrome 3</i>	
<i>DSC3</i>	desmocollin 3	600271		
<i>DSC2</i>	desmocollin 2	125645	Aritmojenik sağ ventrikül displazisi 11 <i>Arrhythmogenic right ventricular dysplasia 11</i>	OR, OD
<i>SCN1B</i>	sodium voltage-gated channel beta subunit 1	600235	Atriyal fibrilasyon, ailesel, 13 <i>Atrial fibrillation, familial, 13</i>	OD
			Brugada sendromu 5 <i>Brugada syndrome 5</i>	
<i>SNTA1</i>	syntrophin alpha 1	601017	Uzun QT sendromu 12 <i>Long QT syndrome 12</i>	OD
<i>JPH2</i>	junctophilin 2	605267		

<i>KCNE2</i>	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 2	603796	Atriyal fibrilasyon, ailesel, 4 Atrial fibrillation, familial, 4	
			Uzun QT sendromu 6 Long QT syndrome 6	OD
<i>KCNE1</i>	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 1	176261	Uzun QT sendromu 5 Long QT syndrome 5	OD
<i>EMD</i>	emerin	300384		

* OD: Otozomal Dominant, ** OR: Otozomal Resesif

5.2. DNA İzolasyonu

EDTA'lı tam kandan DNA izolasyonu MagPurix (Zinext) cihazı kullanılarak robotik sistem tarafından gerçekleştirildi. DNA izolasyonunda cihaza uyumlu MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200 (Cat. OP02001-48) kullanıldı.

5.3. Kütüphane Oluşturulması

Kütüphane oluşturulurken TruSight Cardio Sequencing Kit Reference Guide (Document # 15063774 v01, January 2016) protokolü takip edildi.

5.3.1. DNA kalitesinin tayini

EDTA'lı tam kandan izole edilen DNA'lar Qubit 3.0 cihazı kullanılarak florometrik olarak ve Spektra Max i3 cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Spektrofotometrik ölçümde örneklerde kontaminasyondan kaçınmak için 260/280>1.8 olan örnekler tecih edildi. Florometrik ölçümde "Qubit dsDNA BR

Reagent (Q32853)’ kullanıldı ve ölçülen genomik DNA (gDNA)’lar protokole uygun olarak 5 ng/μl (nanogram/mikrolitre)’ye sulandırıldı.

5.3.2. Tagment genomic DNA

5 ng/μl’ye düşürülen gDNA’den 10 mikrolitre (totalde 50 μl olacak şekilde) alınarak üzerine 25 μl Tagment DNA Buffer (TD) ve 15 μl Tagment DNA Enzyme (TDE1) eklendi ve 58°C da 10 dakika bekletildi. Bu aşamada transpozon elementler gDNA’yı farklı uzunluklarda (ortalama 300 bp) parçalara böler ve uçlarına Read1 ve Read2 sekans primerlerini ekler.

5.3.3. Tagment genomic DNA’nın temizlenmesi

Transpozon enzimi ile kırılan ve uçlarına spesifik oligonukleotidler bağlanan DNA parçaları manyetik özelliği olan ve DNA’nın yapışabildiği örnek yıkama boncukları (Sample Purification Beads) ve %80’lik etil alkol kullanılarak enzim, buffer, artık DNA parçaları gibi istenmeyen artıklardan temizlendi.

5.3.4. Çoğaltma işlemi ile adaptör ve indeks dizisinin bağlanması

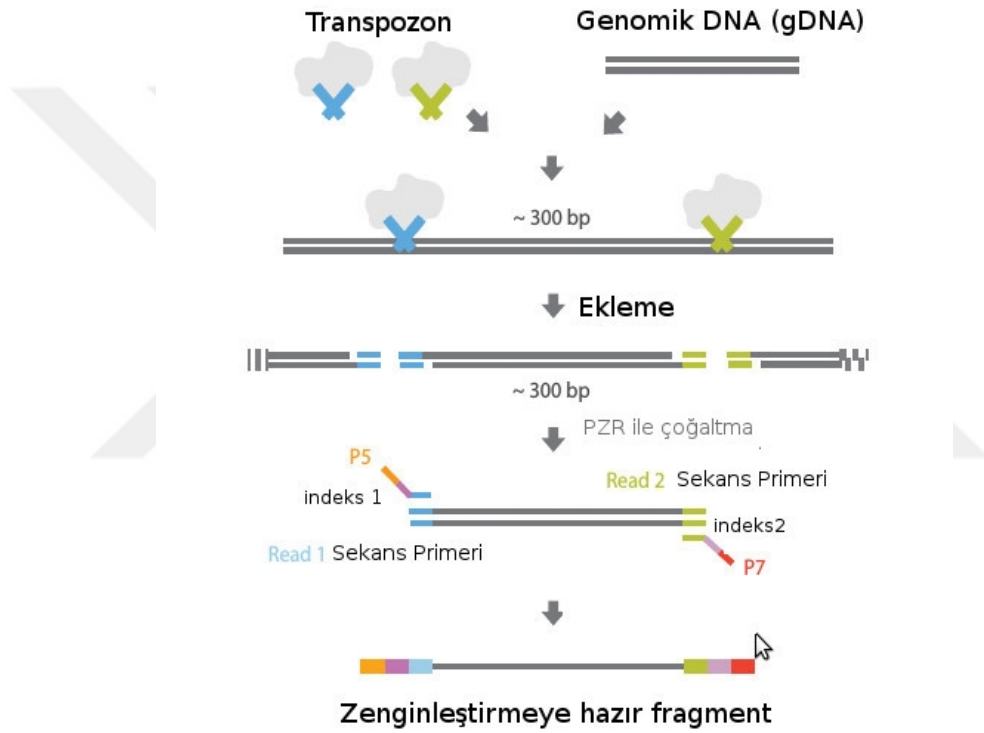
Transpozon enziminin kırılan DNA’nın uçlarına eklediği sekans dizileri kullanılarak P5 ve P7 adaptörleri ile birlikte örnek spesifik i5 ve i7 indeksleri 10 döngüden oluşan PZR yöntemi ile fragmente eklendi.

Tablo 5.3.4.1. Trusight Cardio indeks listesi

E505	GTAAGGAG
N701	TAAGGCGA
N702	CGTACTAG
N703	AGGCAGAA
N704	TCCTGAGC
N705	GGACTCCT
N706	TAGGCATG
N707	CTCTCTAC
N708	CAGAGAGG
N709	GCTACGCT
N710	CGAGGCTG
N711	AAGAGGCA
N712	GTAGAGGA

5.3.5. oğalan ve adaptör Bağlanan DNA'nın Temizlenmesi

PZR ile çoğalan ve uçlarına adaptör- indeks dizileri bağlanan DNA parçaları manyetik özelliği olan ve DNA'nın yapışabildiği örnek yıkama boncukları (Sample Purification Beads) ve %80'lik etil alkol kullanılarak enzim, buffer, artık DNA parçaları gibi istenmeyen artıklardan temizlendi. Bu işlemin sonunda zenginleştirmeye hazır DNA fragmenti hazır hale geldi.



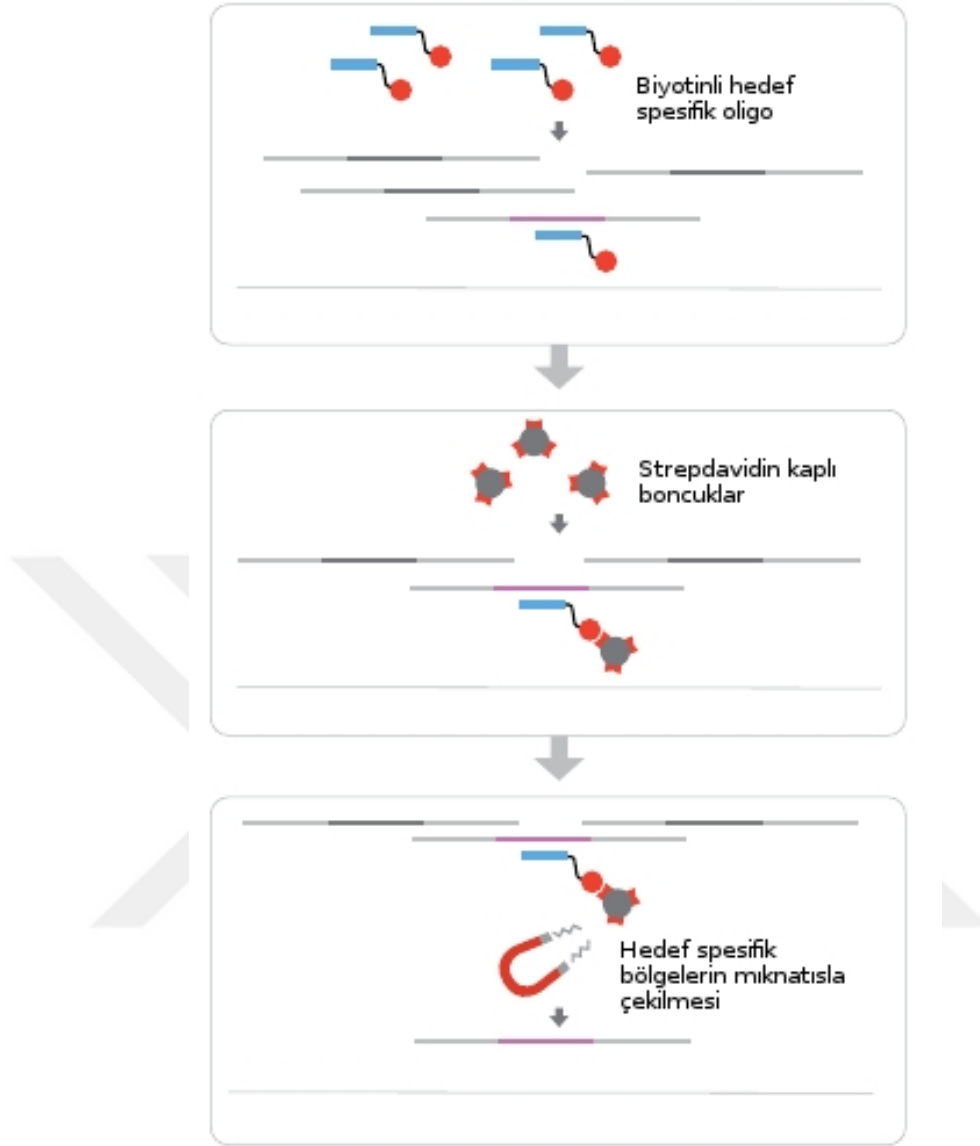
Şekil 5.3.5.1. Zenginleştirmeye hazır DNA parçası eldesi.

5.3.6. Hedef bölgelerin yakalanması, çoğaltılması ve temizlenmesi

Bu aşamada indeks bağlanan örnekler 500 ng (nano gram) olacak şekilde ayarlandı ve 12 örneğe kadar birleştirmeye (pooling) işleminin gerçekleştirildi. Birleştirilen örnekler hibridizasyon bufferı ve TruSight Cardio Oligos (hedef spesifik nükleotidler, yakalama boncukları) kullanılarak reaksiyona sokuldu. Şekil

5.2.6.1’de görüldüğü gibi uçlarında biyotin bulunan hedef spesifik nükleotid dizileri (yaklaşık 80 baz) uçlarında adaptörl-indeks bulunan DNA parçalarına bağlandı. Ardından bu karışıma streptavidin kaplı manyetik boncuklar (Streptavidin Magnetic Beads) eklendi ve böylece uçlarında biyotin bulunan hedef spesifik oligolar (probe) manyetik boncuklarla etkileşime girdi. Örnek tüpleri mıknatis özelliği bulunan tüp yerleştirme aletine takıldı. Böylece hedef spesifik biyotinli problara bağlanan adaptörlü DNA parçaları streptavidin kaplı manyetik boncuklar sayesinde mıknatısa doğru çekildi. Mıknatısa doğru çekilmeyen hedef dışı DNA parçaları sıvı ortamda kaldı. Yıkama işlemi hedef dışı DNA parçalarından kurtulundu (Zenginleştirme). Bu işlem 2 kez tekrarlandı.





Şekil 5.3.6.1 Hedeflenen DNA parçalarının yakalanması.

Zenginleştirilen DNA parçaları P5 ve P7 adaptör spesifik primerler kullanılarak 12 döngülük PZR işlemi ile çoğaltıldı. Ardından çoğaltılan DNA parçaları manyetik özelliği olan ve DNA'nın yapışabildiği örnek yıkama boncukları (Sample Purification Beads) ve %80'lik etil alkol kullanılarak enzim, buffer, artık DNA parçaları gibi istenmeyen artıklardan temizlendi. Bu işlem sonucunda kütüphane hazır hale geldi.

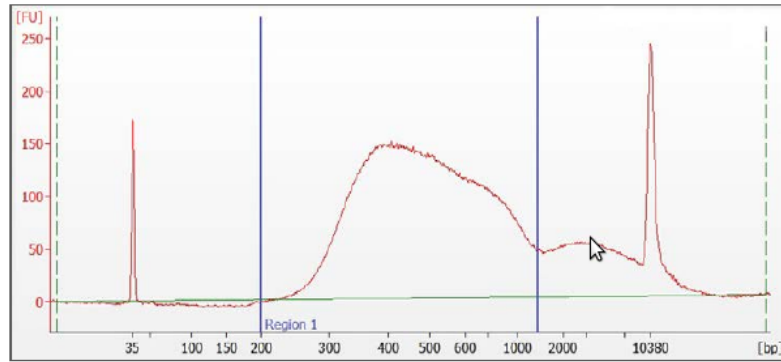
5.3.7. Kütüphanenin miktar tayini ve kalite değerlendirmesi

Hazırlanan kütüphane Qubit cihazı ve çift zincirli DNA'ya bağlanarak ışımalarını yoğunlaştıran boyalar kullanılarak (Qubit dsDNA HS Assay Kit) florometrik yöntemle ölçüldü. Ölçüm sonucu çıkan değer ile, aşağıdaki formül kullanılarak kütüphanenin nanomolaritesi (nM) hesaplandı.

Formül:

$$\text{nM cinsinden konsantrasyon} = \frac{\text{(Mikrolitresindeki DNA konsantrasyonu*1000000)}}{(660*\text{Ortalama kütüphane boyutu-bp})}$$

Hazırlanan kütüphanenin kalitesine fragment analizatörü kullanılarak bakıldı. Bu işlem ile DNA kırılma işleminin istenilen aralıkta olup olmadığını görüldü Yaklaşık 200 bp ile 1200 bp arası normal kabul edildi



Şekil 5.2.7.1 Fragmente olmuş DNA'nın cihaz görüntüsü.

5.3.8. Kütüphane Sulandırması, Denatürasyonu ve MiSeq Cihazına Yüklmesi

Hazırlanan çift zincirli kütüphane 4 nM'e düşürüldü ve ardından 0.2 Normal sodyom hidroksit (NaOH) kullanılarak tek zincirli hale getirildi (denaturasyon). İkinci aşamada kütüphane 20 pM'e indirildi. Bu konsantrasyondaki kütüphane çalışmaya göre 6 ila 20 pM arasında bir değere getirilerek kullanıldı. Son olarak kütüphaneye PhiX kontrol eklenerek cihaza yüklemeye hazır hale getirildi (98).

5.3.9 MiSeq Dizileme ve Dataların Elde Edilmesi

MiSeq cihazı üzerinde dizileme çalışmasında MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles, Cat No: MS-102-2002) kullanıldı. Bu kit ile yapılan her her çalışmada yüzde 80'i Q30'dan büyük, 2x150 paired okuma ile 300 bp'lik yaklaşık 30 milyon (M) Read (Read-1-Read-2) ve 4.5 Gb (gigabases) veri elde edildi.



Şekil 5.3.9.1. MiSeq Dizileme Cihazı ve kimyasalları

Dizileme sonunda elde edilen fotoğraf dosyaları cihaz üzerinde bulunan bcl2fastq dönüştürme programı ile barkot dizilerine göre ayrılmış olarak her bir

örnek için Read-1 ve Read-2 fastq metin dosyalarına dönüştürüldü. Fastq datası BWA (Burrows-Wheeler Aligner) hizalama programı ile hg19 insan genomu referansına eşleştirilerek “Sequence Alignment Map (SAM)” ve ardından SAMtools kullanılarak BAM (Binary Alignment Map) formatına çevrildi. Oluşturulan BAM dosyasından son olarak GATK 1.6 analiz programı ve ‘gvcftools version 0.12’ programı kullanılarak her bir örnek için SNP, insersiyon ve delesyon bilgilerinin bulunduğu varyant dosyaları (VCFv4.1 - versiyonu) oluşturuldu.

Tablo 5.3.9.1 MiSeq cihazı içinde bulunan analiz programları.

Software	Versiyon
Isis (Analysis Software)	2.5.1.3
BWA (Aligner)	0.6.1-r104-tpx
SAMtools	0.1.18 (r982:295)
GATK* (Variant Caller)	1.6

*Genome Analysis Tool Kit (GATK) YND datasından varyantların analiz edilmesi için Braod Enstitüsü tarafından geliştirilen programlar bütünü (99).

5.3.10. Varyantların teknik hatalardan ayıklanması

Her bir saptanan varyantın cihaz ve YND teknolojisinin sebep olduğu hatalardan ayıklanması için değişimler belirli teknik kriterlere göre ayıklandı. Bu filtrelemede:

- Okuma derinliği 20'nin altında olan varyantlar okuma kalitesi yüksek olsa da elendi.
- Phred Qualiti skora göre bazın doğruluk yüzdesi %99'un altında olan (<Q20) varyantla okuma derinliği yüksek olsa da elendi.
- Okuma derinliklerine göre alternatif allel oranı yüzde 20'nin altında kalan varyantlar elendi (Referans ile aynı olan bazların alternatif diziye göre yüzde oranı).

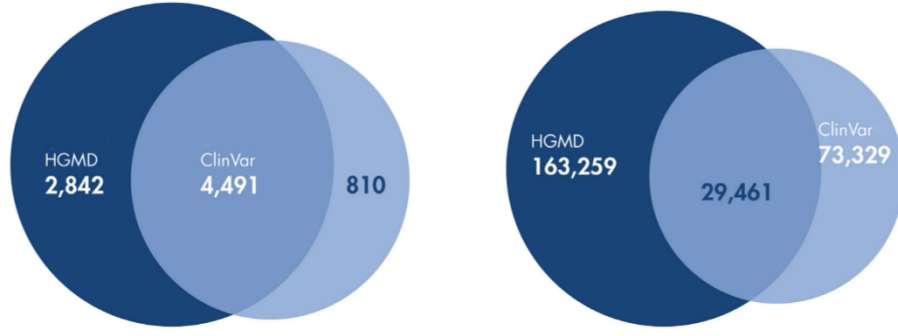


Şekil 5.3.10.1. Alternatif allel okumasının IGV görüntüsü.

5.3.11. Varyantların genetik veri tabanları kullanılarak anlamlandırılması

Cihaz çıktısı olarak alınan varyant dosyaları dbSNP numaraları ve genomik pozisyonları kullanılarak HGMD, OMIM, CinVar, HGNC, dbSNP, ExAC, *in silico* programlar ve VarSome programları ile birlikte analiz edilir. Referans genomdan farklı her bir değişim bu analiz sonucunda anlamlandırılır.

ClinVar ve HGMD’ki bütün varyantların Eylül 2017 itibariyle dağılımı şekil 7.2’de verilmiştir. Soldaki şekilde HGMD’de bulunan 7333 genin ClinVar veri bankası ile karşılaştırması, sağdaki şekilde ise 192,720 varyantın bu iki data bankasındaki dağılımı görülmektedir (100).



Şekil 7.2. ClinVar ve HGMD karşılaştırması

5.3.12. Analizi yapılan varyantların filtrelenmesi

Analizi yapılan varyantlardan hasta kliniğine uygun olanların saptanması için verilerin belirli parametrelere göre filtrelenmesi gerekir. Bu klinik filtrelemede:

- ExAc verileri kullanılarak toplumsal allel frekansı %1'in üzerinde olan bütün değişimler polimorfizm değerlerinin üzerinde olduğu için elendi.
- ClinVar, ACMG, HGMD klinik veri tabanları kullanılarak patojenitesi hakkında bilgimiz olan patojenik, muhtemel patojenik, klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS), muhtemel benign ve benign varyantlar belirlendi.
- Çerçeve kaymasında sebep olan frameshift varyantlar, splicing etki ile genin ifadesini değiştiren varyantlar (intronik ya da ekzonik) ve missense varyantlar dışındaki sinonim değişimler elendi.
- *In silico* tahmin araçları kullanılarak hasar yapıcı varyantlar değerlendirildi.
- Klinik olarak henüz sınıflandırılmamış değişimler ACMG kriterlerine göre anlamlandırılmaya çalışıldı.

Tablo 5.3.12.1 Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan ACMG kriterleri ve kriter kodları

Patojenik varyantların sınıflandırılma kriterleri	
	Patojenite için çok güçlü kanıt
	PVS1: Genin fonksiyon kaybına sebep olan nonsense, frameshift, splice bölgesi, başlangıç kodonu, tekli ya da çoklu ekzon kaybı varyasyonları (null varyantlar).
	Patojenite için güçlü kanıt
	PS1: Nükleotit değişiminden bağımsız olarak daha önce patojenitesi bildirilmiş aynı amino asit değişimine sebep olan varyantlar.
	PS2: Sadece hastada bulunan, anne ve babada bulunmayan, aile öyküsünde olmayan (de novo) varyantlar.
	PS3: In vivo ya da in vitro fonksiyonel çalışmalar ile gene ya da genini ürününe hasar yapıcı etkide bulunduğu anlaşılmış varyantlar.
	PS4: Hastalarda görülme sıklığı kontrol gruplarına (sağlıklı birey) göre daha fazla olan varyantlar.
	Patojenite için orta seviyeli kanıt

	PM1: Enzimlerin aktif bölümleri gibi iyi anlaşılmiş fonksiyonel domainlerde bulunan, benign varyantların görülmediği çoğunlukla hasar yapıcı varyantların yer aldığı lokasyonlardaki değişimler.
	PM2: Exome Sequencing Project, 1000 Genomes ya da ExAC veri bankalarına göre frekansı düşük olan varyantlar.
	PM3: Resesif geçişli hastalıklarda, patojenik varyant ile bulunan değişimin trans (diğer homolog gende olma durumu) pozisyonunda olması.
	PM4: inframe delesyon/insersiyon değişimler sonucu durdurucu ya da uzatıcı etki yaparak protein uzunluğunu değiştiren değişimler.
	PM5: Daha önce patojenik olduğu saptanan bir missens varyasyonun olduğu amino asitte olan yeni bir missense varyant
	PM6: Anne-babada varlığı araştırılmamış fakat de novo olarak varsayılan varyantlar.
	Patojeniteyi destekleyen kanıtlar
	PP1: Birçok aile üyesinin hastalık açısından etkilenmesine sebep olan gende oluşan varyasyonlar.
	PP2: Gende oluşan missense (aminoasit

	değiştiren) değişimlerin hastalığa sebep olduğu (Benign olmayan) varyantlar.
	PP3: Evrimsel olarak korunmuş bölgeler, splice etki alanları gibi gen ya da gen ürünü üzerinde hasar yapıcı yönde etkisinin in silico araçlarla hesaplanması, desteklenmesi.
	PP4: Tek bir genetik kökenden kaynaklanmakla birlikte hastalığın hasta fenotipi ve aile geçmişi ile özdeşleşmiş varyantlar. Hastalığa özgü aile fenotipi.
	PP5: ClinVar gibi güvenilir kaynaklar tarafından patojenik olarak sınıflandırılan varyantlar. Ancak kanıtlar bağımsız bir değerlendirme yapmak için laboratuvarda mevcut değil.
Benign varyantların sınıflandırılma kriterleri	
	Benign değerlendirme için tek başına yeterli kanıt
	BA1: Exome Sequencing Project, 1000 Genomes ya da ExAC veri tabanlarına göre toplumsal allel frekansı %5'in üzerinde olan varyantlar.
	Benign için güçlü kanıt
	BS1: Hastalık için beklenenden yüksek allel

	frekansı
	BS2: Erken yaşta ortaya çıkması beklenen resesif (homozigot), dominant (heterozigot) ya da X-linked (hemizigot) geçişli hastalıkların geç yaşta, yetişkinlikte ortaya çıkması.
	BS3: In vitro veya in vivo çalışmalar ile protein fonksiyonunda ya da splicingde hasar yapıcı etkisinin olduğu gösterilmiş varyantlar.
	BS4: Ailenin diğer üyelerinde görülmemesi.
	Benign değişimi destekleyen kanıtlar
	BP1: Yaptığı etki ile aminoasit uzamasını durduran (truncating) değişimlerin neden olduğu hastalıklarda missense varyantın saptanması.
	BP2: Dominant geçiş gösteren bir hastalıkta/gende trans (homolog gende) görülen ya da herhangi bir kalıtım modelinde patojenik varyantla cis (aynı kromozomda) bulunan varyantlar.
	BP3: Tekrar bölgelerinde çerçeve içi (inframe) delesyon ve insersiyonlar.
	BP4: Evrimsel olarak korunmuş bölgeler, splice etki alanları gibi gen ya da gen ürünü üzerinde hasar yapıcı etkisinin olmadığı in silico araçlarla hesaplanması, desteklenmesi.

	BP5: Varyantın farklı moleküler temelleri olan bir hastalıkta bulunması.
	BP6: ClinVar gibi güvenilir kaynaklar tarafından benign (iyi huylu) olarak sınıflandırılan varyantlar. Ancak kanıtlar bağımsız bir değerlendirme yapmak için laboratuvarında mevcut değil.
	BP7: Sinonim (suskun) olan ve splicing üzerinde etkisi olmayan, evrimsel olarak korunmamış benign varyantlar

Tablo 5.3.12.2 Varyantların sınıflandırma kuralları

Kriterlerin değerlendirme tablosu	
	Patojenik
	1 Çok Güçlü (PVS1) VE
	≥1 Güçlü (PS1–PS4) VEYA
	≥2 Moderate (PM1–PM6) VEYA
	1 Orta (PM1–PM6) ve 1 Destekleyici (PP1–PP5) VEYA
	≥2 Destekleyici (PP1–PP5)
	≥2 Güçlü (PS1–PS4) VEYA
	1 Güçlü (PS1–PS4) VE
	≥3 Orta (PM1–PM6) VEYA
	2 Orta (PM1–PM6) VE ≥2 Destekleyici (PP1–PP5) VEYA
	1 Orta (PM1–PM6) VE ≥4 Destekleyici

	(PP1–PP5)
	Muhtemel Patojenik
	1 Çok Güçlü (PVS1) VE 1 Orta (PM1–PM6) VEYA
	1 Güçlü (PS1–PS4) VE 1–2 Orta (PM1–PM6) VEYA
	1 Güçlü (PS1–PS4) VE ≥ 2 Destekleyici (PP1–PP5) VEYA
	≥ 3 Orta (PM1–PM6) VEYA
	2 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 2 Destekleyici (PP1–PP5) VEYA
	1 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 4 Destekleyici (PP1–PP5)
	Benign
	1 Sadece (BA1) VEYA
	≥ 2 Güçlü (BS1–BS4)
	Muhtemel Benign
	1 Güçlü (BS1–BS4) ve 1 Destekleyici (BP1–BP7) VEYA
	≥ 2 Destekleyici (BP1–BP7)
	Saptanan varyant için kriterler benign ya da patojenikliği ile çelişki yaratıyorsa ya da tam olarak karşılamıyorsa değişim klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS, Uncertain Significance) olarak sınıflandırılabilir.

6. BULGULAR

İstanbul Medipol Üniversitesi Medigen Genetik Laboratuvarı'na test istemiyle gelen kalpte ritim bozukluğu olan 42 erkek, 30 kadın toplamda 72 hastanın ön tanıları tablo 6.1'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Hastaların klinik ön tanıları

Klinik Ön Tanı	Hasta Sayısı	Cinsiyet
Genel Aritmi	5	3 Kadın, 2 Erkek
Brugada Sendromu	2	2 Erkek
KPVT	6	3 Kadın, 3 Erkek
Uzun QT	59	24 Kadın, 35 Erkek
Toplam	72	30 Kadın, 42 Erkek

Çalışmaya alınan hastaların 37'sinde aritmi ile ilişkili taradığımız 39 genden hiçbirinde hasta kliniği ile ilişkili varyant saptanmamıştır. 35 hastada ritim bozukluğu ile ilişkili 58 varyant saptanmıştır. Tablo 6.2.'de varyant saptanamayan negatif hastalar ve varyant saptanan hastalar genotip bilgisi, HGVS isimlendirmesi ve dbSNP kaydı ile birlikte verilmiştir.

Tablo 6.2. Hastaların klinik ön tanıları, varisant, genotip, HGVS isimlendirmesi ve dbSNP kaydı.

Örnek	Ön Tanı	Gen	Variant	Genotip	HGVS	dbSNP
1-ZD	Uzun QT Sendromu	Negatif				
2-OBS	Uzun QT Sendromu	ANK2	p.I3285T	Het	NM_001148.4: c.9854T>C	rs36210417
3-AB	Uzun QT Sendromu	Negatif				
4-HNO	Uzun QT Sendromu	KCNQ1	p.R366Q	Het	NM_000218.2: c.1097G>A	rs199473410
		ANK2	p.E3425G	Het	NM_001148.5: c.10274A>G	rs529128783

5-ABI	Uzun QT Sendromu	DSC2	p.V303M	Het	NM_024422.4: c.907G>A	rs145560678
6-ALA	Genel Aritmi	Negatif				
7-EK	Uzun QT Sendromu	Negatif				
8-BK	Uzun QT Sendromu	CAV3	p.T78M	Het	NM_033337.2: c.233C>T	rs72546668
		SCN5A	p.Q692K	Het	NM_00116016 1.1:c.2074C>A	rs45553235
9-MA	Genel Aritmi	ANK2	p.I3285T	Het	NM_001148.4: c.9854T>C	rs36210417
10-AB	CPVT	Negatif				
11-YD	Uzun QT Sendromu	Negatif				
12-NK	Uzun QT Sendromu	Negatif				
13-EA	Uzun QT Sendromu	Negatif				
14-AK	Genel Aritmi	Negatif				
15-BMC	Uzun QT Sendromu	ANK2	p.I3285T	Het	NM_001148.4: c.9854T>C	rs36210417
16-AK	Uzun QT Sendromu	Negatif				
17-AM	Uzun QT Sendromu	Negatif				
		Negatif				
18-SE	Uzun QT Sendromu	Negatif				
		Negatif				
19-BÇ	Brugada Sendromu	Negatif				
20-SD	Uzun QT Sendromu	Negatif				
21	Brugada	Negatif				

-YG	Sendromu					
22 - YEO	Uzun QT Sendromu	Negatif				
23 -SS	Uzun QT Sendromu	KCNQ1	c.1196del C	Het	NM_000218.2: c.1196delC	rs754934906
24 -OG	Uzun QT Sendromu	Negatif				
25 -HO	CPVT	KCNJ2	p.V93I	Hom	NM_000891.2: c.277G>A	rs147750704
26 - TMY	Uzun QT Sendromu	Negatif				
27 -MÍ	Uzun QT Sendromu	Negatif				
28 -DÖ	CPVT	KCNJ2	p.V200M	Hom	NM_000891.2: c.598G>A	yok
		SNTA1	p.A257G	Het	NM_003098.2: c.770C>G	rs56157422
		NKX2-5	p.R25C	Het	NM_004387.3: c.73C>T	rs28936670
29 -SA	Uzun QT Sendromu	Negatif				
30 -SEG	Uzun QT Sendromu	Negatif				
31 - TKD	Uzun QT Sendromu	Negatif				
32 -SN	Uzun QT Sendromu	Negatif				
33 -ST	Uzun QT Sendromu	KCNH2	p.E929Gfs Ter11	Het	NM_000238.3: c.2785dupG	rs794728458
		RYR2	p.M1975V	Het	NM_001035.2: c.5923A>G	rs200318013
		MYH6	p.R1532C	Het	NM_002471.3: c.4594C>T	rs201827489
		MYH6	p.Q1065H	Het	NM_002471.3: c.3195G>C	rs267606904

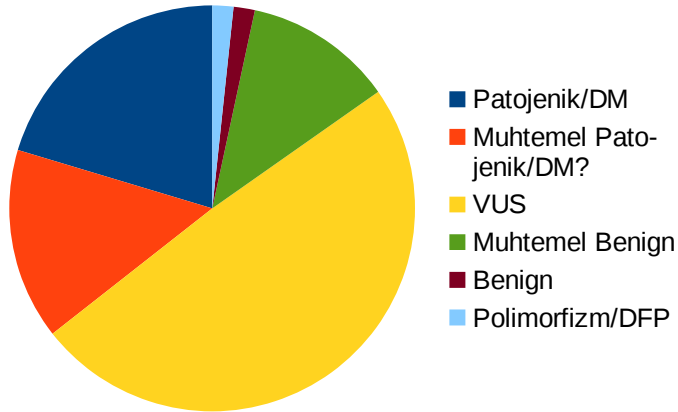
34 -RTB	Uzun QT Sendromu	Negatif				
35 -EG	Uzun QT Sendromu	KCNH2	p.A561E	Het	NM_000238.3: c.1682C>A	
36 - YAA	Uzun QT Sendromu	KCNJ2	p.V93I	Het	NM_000891.2: c.277G>A	rs147750704
		MYH6	p.D470Y	Het	NM_002471.3: c.1408G>T	rs777651128
37 -HY	Uzun QT Sendromu	KCNQ1	R259C	Het	NM_000218.2: c.775C>T	rs199472719
38 -FBY	Uzun QT Sendromu	RYR2	p.A567P	Het	NM_001035.2: c.1699G>C	rs753758467
39 - FAM	Uzun QT Sendromu	Negatif				
40 - HSK	Uzun QT Sendromu	KCNH2	p.A561V	Het	NM_000238.3: c.1682C>T	rs121912504
41 -MG	Uzun QT Sendromu	KCNQ1	c.1032G> A	Het	NM_000218.2: c.1032G>A	rs1800171
42 - ZAA	Genel Aritmi	Negatif				
43 -FAA	Uzun QT Sendromu	Negatif				
44 -NC	Uzun QT Sendromu	Negatif				
45 -AM	Uzun QT Sendromu	NPPA	p.S64R	Het	NM_006172.3: c.190A>C	rs61757261
		AKAP9	p.E3487K	Het	NM_005751.4: c.10459G>A	rs61757664
		CACNB 2	p.R606G	Het	NM_201596.2: c.1816C>G	rs61733968
46 - CKK	Uzun QT Sendromu	KCNQ1	p.R366Q	Het	NM_000218.2: c.1097G>A	rs199473410
		KCNE1	p.I82F	Het	NM_000219.4:	yok

					c.244A>T	
47 -ÖD	Uzun QT Sendromu	Negatif				
48 -AY	Uzun QT Sendromu	Negatif				
49 - BNK	Uzun QT Sendromu	SCN5A	Q692K	Het	NM_000335.4: c.2074C>A	rs45553235
50 -GID	Uzun QT Sendromu	Negatif				
51 -AS	Uzun QT Sendromu	KCNH2	p.P605L	Het	NM_000238.3: c.1814C>T	rs199472938
		KCNA5	p.R234L	Het	NM_002234.3: c.701G>T	rs371521698
52 -AB	Uzun QT Sendromu	ANK2	p.G487A	Het	NM_001148.4: c.1460G>C	YOK
		SNTA1	p.P74L	Het	NM_003098.2: c.221C>T	rs572545726
53 - MN K	Uzun QT Sendromu	KCNE1	p.D76N	Het	NM_000219.4: c.226G>A	rs74315445
		HCN4	p.A195V	Het	NM_005477.2: c.584C>T	rs201375192
54 -AA	Uzun QT Sendromu	SCN5A	p.M1851T	Het	NM_198056.2: c.5552T>C	YOK
		HCN4	p.H119Q	Het	NM_005477.2: c.357C>G	YOK
55 - DYK	Uzun QT Sendromu	SCN5A	p.S216L	Het	NM_198056.2: c.647C>T	rs41276525
		KCNJ8	p.A88G	Het	NM_004982.3: c.263C>G	rs117808169
56 -YK	CPVT	SCN3B	p.V167I	Het	NM_018400.3: c.499G>A	YOK
57 -BS	Uzun QT Sendromu	Negatif				
58	Uzun QT	KCNQ1	p.G314S	Het	NM_000218.2:	rs120074184

-YB	Sendromu				c.940G>A	
		RYR2	p.T2832I	Het	NM_001035.2: c.8495C>T	
		SCN5A	p.A672S	Het	NM_198056.2: c.2014G>T	
59 - YEB	Uzun QT Sendromu	KCNQ1	p.G314S	Het	NM_000218.2: c.940G>A	rs120074184
60 -OEE	Uzun QT Sendromu	DSC2	p.E896EX	Het	NM_024422.3: c.2686_2687dup GA	rs200056085
61 -RES	Uzun QT Sendromu	CACNB 2	p.S160T	Het	NM_201590.2 : c.479G>C	rs149253719
62 -EE		Negatif				
63 - UM A	Uzun QT Sendromu	Negatif				
64 - MA A	CPVT	DSC2	p.Q766H	Het	NM_024422.3: c.2298G>C	rs139558481
65 -İZB	Uzun QT Sendromu	KCNH2	p.L615R	Het	NM_000238.3: c.1844T>G	YOK
66 -İFB	Genetik Aritmiler	ANK2	p.T1113A	Het	NM_001148.4: c.3337A>G	rs150841275
67 -EK	Uzun QT Sendromu	KCNH2	p.Y493C	Het	NM_000238.3: c.1478A>G	rs199472911
68 -MA	Uzun QT Sendromu	ANK2	p.D905N	Het	NM_001148.4: c.2713G>A	rs759275920
		PKP2	p.R811S	Het	NM_004572.3: c.2431C>A	rs139734328
69 -AC	Uzun QT Sendromu	CACNA 1C	p.N2128S	Het	NM_00112982 7.1:c.6383A>G	rs886049209
		CACNA 2D1	p.N393S	Het	NM_000722.2: c.1178A>G	rs149828018
70	Uzun QT	CACNA	p.N2128S	Het	NM_00112982	rs886049209

-GC	Sendromu	IC			7.1:c.6383A>G	
		CACNA 2D1	p.N393S	Het	NM_000722.2: c.1178A>G	rs149828018
71 -BD	Genel Aritmi	CACNA 1C	p.E1948K	Het	NM_199460.2: c.5842G>A	rs200231105
72 -DY	CPVT	Negatif				

35 hastada saptanan, 58 varyanttan 29'u hasta klinik ön tanısı ile uyumludur. 23 Varyant ise ritim bozukluğu ile ilişkili olsa da OMIM kayıtlarına göre ön tanı ile uyumsuz olarak değerlendirilmiştir. Saptanan varyantların OMIM kayıtlarına göre sebep olduğu sendrom açısından karşılaştırması Tablo 6.3. de verilmiştir. Geriye kalan 6 değişimden 3'ü OMIM kayıtlarında bulunmadı ve diğer 3'ü genel ritim bozukluğu tanısı ile geldiği için sınıflandırılmadı. Saptanan 58 varyantın 12'si patojenik/DM, 9'u muhtemel patojenik/DM?, 29'u VUS, 7'si muhtemel benign, 1'i benign ve 1 tanesi de HGMD kayıtlarına göre polimorfizm (DFP) olarak raporlanmıştır. Hasta kliniğine doğrudan katkı sağlayabilecek patojenik ve muhtemel patojenik varyantların tüm varyantlara oranı %36.2 dir. Kliniğe katkı sağlayabilecek ancak fonksiyonu henüz tam netliğe kavuşmamış VUS olarak tanımlanan varyantların tüm varyantlara oranı % 50 dir.



Şekil 6.1. 58 varyantın patojenitesinin sınıflandırılması.

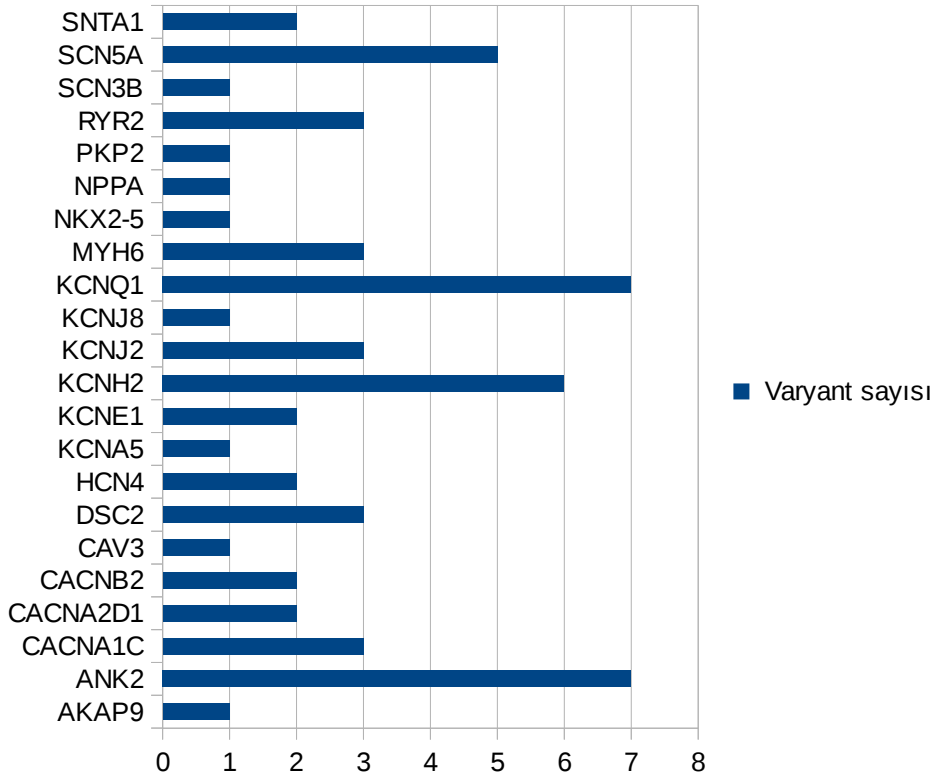
Saptanan değişimlerin genlere göre dağılımı tablo 6.2, tablo 6.3 de ve Şekil 6.2'de sütun grafiğinde verilmiştir.

Tablo 6.2. Kliniğe doğrudan fayda sağlayabilecek patojenik ve muhtemel patojenik varyantlar.

Değerlendirme	Gen	Varyant	Zigosite
Muhtemel Patojenik	CAV3	p.T78M	Het
Patojenik	KCNE1	p.D76N	Het
Muhtemel patojenik	KCNH2	p.E929GfsTer11	Het
Muhtemel Patojenik	KCNH2	p.A561E	Het
Patojenik	KCNH2	p.A561V	Het
Muhtemel Patojenik	KCNH2	p.P605L	Het
Muhtemel Patojenik	KCNH2	p.L615R	Het
Patojenik	KCNH2	p.Y493C	Het
Patojenik	KCNJ2	p.V93I	Hom
Patojenik	KCNJ2	p.V200M	Hom
Patojenik	KCNJ2	p.V93I	Het
Patojenik	KCNQ1	p.R366Q	Het
Muhtemel patojenik	KCNQ1	c.1196delC	Het
Patojenik	KCNQ1	R259C	Het
Patojenik	KCNQ1	c.1032G>A	Het
Patojenik	KCNQ1	p.R366Q	Het
Patojenik	KCNQ1	p.G314S	Het
Patojenik	KCNQ1	p.G314S	Het
Muhtemel patojenik	NPPA	p.S64R	Het
Muhtemel patojenik	SCN5A	p.M1851T	Het
Muhtemel Patojenik	SNTA1	p.A257G	Het

Tablo 6.3 Kliniğe yardımı olabilecek ancak klinik anlamı henüz kesin olmayan varyantlar.

Değerlendirme	Gen	Varyant	Zigosite
VUS	AKAP9	p.E3487K	Het
VUS	ANK2	p.E3425G	Het
VUS	ANK2	p.G487A	Het
VUS	ANK2	p.T1113A	Het
VUS	ANK2	p.D905N	Het
VUS	CACNA1C	p.N2128S	Het
VUS	CACNA1C	p.N2128S	Het
VUS	CACNA1C	p.E1948K	Het
VUS	CACNA2D1	p.N393S	Het
VUS	CACNA2D1	p.N393S	Het
VUS	CACNB2	p.R606G	Het
VUS	CACNB2	p.S160T	Het
VUS	DSC2	p.V303M	Het
VUS	DSC2	p.Q766H	Het
VUS	HCN4	p.A195V	Het
VUS	KCNA5	p.R234L	Het
VUS	KCNE1	p.I82F	Het
VUS	KCNJ8	p.A88G	Het
VUS	MYH6	p.R1532C	Het
VUS	MYH6	p.Q1065H	Het
VUS	MYH6	p.D470Y	Het
VUS	PKP2	p.R811S	Het
VUS	RYR2	p.M1975V	Het
VUS	RYR2	p.A567P	Het
VUS	RYR2	p.T2832I	Het
VUS	SCN3B	p.V167I	Het
VUS	SCN5A	Q692K	Het
VUS	SCN5A	p.S216L	Het
VUS	SCN5A	p.A672S	Het



Şekil 6.2. Saptanan değişimlerin genlere göre dağılımı

Tablo 6.4. OMIM kayıtlarına göre ön tanı ile uyumsuz olarak değerlendirilen varyantların ilişkili olduğu hastalıklar.

Ön Tanı	OMIM Hastalık Kaydı	Varyant Sayısı
Uzun QT	ARVD	3
	ARVD/KPVT	3
	Atrial Fibrilasyon (AF)/Atrial Sessizlik	2
KPVT	Atrial Septal Hasar/HSS	3
	Brugada Sendromu	6
	Uzun QT	3
	Atrial Septal Hasar	1
	AF	1
	ARVD	1

Hastalarda saptanan ve raporlanan varyantların klinik yorumları farklı veri tabanlarına göre farklılaşabildiği tablo 6.5’de verilmiştir.

Tablo 6.5. Saptanan patojenik varyantların* MEDİGEN**, ACMG***, HGMD ve ClinVar**** veri tabanlarına göre sınıflandırması

Patojenik					
GEN	varyant	MEDİGEN**	ACMG** *	HGMD	ClinVar* ***
KCNQ1	p.R366Q	Patojenik	Muhtemel Patojenik	CM002330, DM	YOK
KCNJ2	p.V93I	Patojenik	VUS	CM051940, DM	VUS (Apr 25, 2017)
KCNJ2	p.V200M	Patojenik	VUS	YOK	YOK
KCNQ1	R259C	Patojenik	Patojenik	CM003452, DM	Patojenik (May 25, 2017)
KCNH2	p.A561V	Patojenik	Patojenik	CM950709, DM	Patojenik (Jun 30, 2017)
KCNQ1	c.1032G>A	Patojenik	Muhtemel Patojenik	CS992245, DM?	Patojenik (Dec 28, 2017)
KCNE1	p.D76N	Patojenik	VUS	CM970800, DM	Patojenik (Aug 14, 2017)
KCNQ1	p.G314S	Patojenik	Patojenik	CM960902, DM	Patojenik (Nov 9, 2016)
KCNH2	p.Y493C	Patojenik	Muhtemel Patojenik	CM040437, DM	Muhtemel Patojenik

					(Mar 3, 2016)
Muhtemel Patojenik					
GEN	varyant	MEDI GEN	ACMG	HGMD	ClinVar
CAV3	p.T78M	Muhtemel Patojenik	VUS	CM065052, DM	Likely benign (Feb 13, 2018)
KCNQ1	c.1196delC	Muhtemel patojenik	Patojenik	YOK	YOK
SNTA1	p.A257G	Muhtemel Patojenik	VUS	CM087843, DM	Likely benign (Jan 30, 2018)
KCNH2	p.E929GfsTer11	Muhtemel patojenik	Patojenik	YOK	VUS
KCNH2	p.A561E	Muhtemel Patojenik	Muhtemel Patojenik	YOK	YOK
NPPA	p.S64R	Muhtemel patojenik	VUS	CM109498, DM	Likely benign (Sep 12, 2017)
KCNH2	p.P605L	Muhtemel Patojenik	Muhtemel Patojenik	CM097463, DM	YOK
SCN5A	p.M1851T	Muhtemel patojenik	VUS	YOK	YOK
KCNH2	p.L615R	Muhtemel Patojenik	Muhtemel Patojenik	YOK	YOK
VUS					
GEN	varyant	MEDI GEN	ACMG	HGMD	ClinVar
ANK2	p.E3425G	VUS	VUS	YOK	YOK

DSC2	p.V303M	VUS	VUS	CM117222, DM?	Benign (Nov 4, 2017)
RYR2	p.M1975V	VUS	VUS	YOK	VUS
MYH6	p.R1532C	VUS	VUS	YOK	VUS
MYH6	p.Q1065H	VUS	Muhtemel Patojenik	CM052258, DM	VUS (Apr 5, 2018)
MYH6	p.D470Y	VUS	VUS	YOK	VUS
RYR2	p.A567P	VUS	VUS	YOK	YOK
AKAP9	p.E3487K	VUS	Muhtemel Benign	YOK	Muhteme l Benign (Nov 13, 2017)
CACNB2	p.R606G	VUS	VUS	YOK	Benign (Dec 29, 2017)
KCNE1	p.I82F	VUS	VUS	YOK	YOK
SCN5A	Q692K	VUS	VUS	CM030273, DM?	Muhteme l benign (Jan 19, 2018)
KCNA5	p.R234L	VUS	VUS	YOK	VUS
ANK2	p.G487A	VUS	VUS	YOK	YOK
HCN4	p.A195V	VUS	VUS	CM134349, DM?	VUS
SCN5A	p.S216L	VUS	VUS	CM087603, DM?	Muhtem el Benign (Dec 9, 2017)
KCNJ8	p.A88G	VUS	VUS	YOK	VUS
SCN3B	p.V167I	VUS	VUS	YOK	YOK

RYR2	p.T2832I	VUS	VUS	YOK	YOK
SCN5A	p.A672S	VUS	VUS	YOK	YOK
CACNB2	p.S160T	VUS	VUS	CM109293, DM	Muhtemel benign (Jan 9, 2018)
DSC2	p.Q766H	VUS	VUS	YOK	VUS
ANK2	p.T1113A	VUS	VUS	YOK	YOK
ANK2	p.D905N	VUS	VUS	YOK	VUS
PKP2	p.R811S	VUS	VUS	CM102828, DM	Muhtemel Benign (Feb 13, 2018)
CACNA1C	p.N2128S	VUS	VUS	YOK	VUS
CACNA2D 1	p.N393S	VUS	VUS	YOK	YOK
CACNA1C	p.N2128S	VUS	VUS	YOK	VUS
CACNA2D 1	p.N393S	VUS	VUS	YOK	YOK
CACNA1C	p.E1948K	VUS	VUS	YOK	VUS (Jan 3, 2018)
Muhtemel Benign					
GEN	varyant	MEDI GEN	ACMG	HGMD	ClinVar
ANK2	p.I3285T	Muhtemel Benign	VUS	YOK	Benign (Dec 26, 2017)
SCN5A	p.Q692K	Muhtemel Benign	VUS	CM030273, DM?	Muhtemel benign (Jan 19, 2018)
ANK2	p.I3285T	Muhtemel	VUS	YOK	Benign

		Benign			(Dec 26, 2017)
ANK2	p.I3285T	Muhtemel Benign	VUS	YOK	Benign (Dec 26, 2017)
NKX2-5	p.R25C	Muhtemel Benign	VUS	DM?- Cardiac disease	Benign (Dec 28, 2017)
SNTA1	p.P74L	Muhtemel Benign	VUS	CM1111801, DFP	Muhtemel benign (Jan 30, 2018)
HCN4	p.H119Q	Muhtemel benign	VUS	YOK	YOK
Benign					
GEN	varyant	MEDİGEN	ACMG	HGMD	ClinVar
DSC2	p.E896EX	Benign	VUS	CI065824, DM?	Benign (Jan 12, 2018)

*Aynı değişim birden fazla hastada saptanmış ve diğer kriterle aynı ise varyant listeden çıkartıldı.

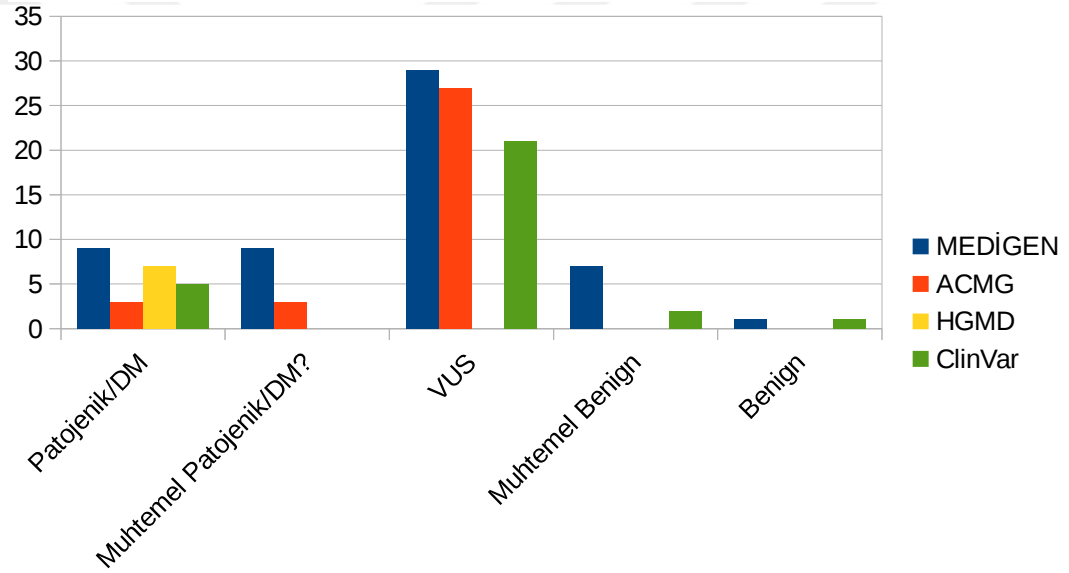
**Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi

***Varsome /<https://varsome.com/> erişim tarihi 27.05.2018

****ClinVar verisi için hastalıkla ilişkili birden fazla veri olanlardan en güncel yayının değerlendirmesi referans alındı.

Tablo 6.6. MEDİGEN’de saptanan varyantların ACMG kriterlerine göre diğer veri tabanlarına göre karşılaştırılması

	MEDİGEN	ACMG	HGMD	ClinVar
Patojenik/DM	9	3	7	5
Muhtemel Patojenik/DM?	9	3		
VUS	29	27		21
Muhtemel Benign	7			2
Benign	1			1



Şekil 6.1. MEDİGEN’de saptanan varyantların diğer veri tabanlarına göre karşılaştırılması

Tablo 6.7. ClinVar ve HGMD klinik veri tabanlarında bulunmayan varyantların merkezimiz ve ACMG tarafından değerlendirilmesi.

GEN	varyant	MEDİGEN	ACMG	HGMD	ClinVar
ANK2	p.E3425G	VUS	VUS	YOK	YOK
KCNQ1	c.1196delC	Muhtemel patojenik	Patojenik	YOK	YOK
KCNJ2	p.V200M	Patojenik	VUS	YOK	YOK
RYR2	p.A567P	VUS	VUS	YOK	YOK
KCNE1	p.I82F	VUS	VUS	YOK	YOK
ANK2	p.G487A	VUS	VUS	YOK	YOK
SCN5A	p.M1851T	Muhtemel patojenik	VUS	YOK	YOK
HCN4	p.H119Q	Muhtemel benign	VUS	YOK	YOK
SCN3B	p.V167I	VUS	VUS	YOK	YOK
RYR2	p.T2832I	VUS	VUS	YOK	YOK
SCN5A	p.A672S	VUS	VUS	YOK	YOK
KCNH2	p.L615R	Muhtemel Patojenik	Muhtemel Patojenik	YOK	YOK
ANK2	p.T1113A	VUS	VUS	YOK	YOK
CACNA2D1	p.N393S	VUS	VUS	YOK	YOK
CACNA2D1	p.N393S	VUS	VUS	YOK	YOK

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kardiyak iyon kanallarının işlevlerindeki bozukluklar elektrokardiyografik anormalliklerle ve aritmilerle kendini gösterir. Kardiyak iyon kanallarındaki bu bozukluklar kardiyak kanalopatiler olarak tanımlanmaktadır. Kanalopatiler, Na^+ , K^+ , Ca^{++} ve Cl^- kanallarını, akuaporin adı verilen su kanallarını, kanalların yerleşimi/işlevi ile ilgili çeşitli görevleri olan membran proteinlerini ve sinyal proteinlerini ilgilendirebilir (101). Kanalopatiler kapsamında adlandırılan, uzun QT sendromu, Brugada Sendromu, katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi ve kısa QT sendromunu içeren genetik nedenler ani kardiyak ölümlere sebebiyet veren kalp ritim bozukluğu hastalıklarıdır. Kanalopati olguları sıklıkla 1-35 yaşlarında ani olarak ölen, öncesinde herhangi bir sağlık problemi olmayan son derece sağlıklı bireylerdir. Makroskobik ve mikroskobik incelemeler tanı koymada yetersiz olduğundan bu olgularda genetik analiz yapılmalıdır. Voltaj kapılı iyon kanallarının ünitelerini kodlayan genlerde ve bu kanalların fonksiyonunu düzenleyici proteinleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar ritim bozukluğu hastalıklarının altında yatan genetik faktörleri oluşturmaktadır.

Son 15 – 20 yıl içinde YND teknikleri kullanılarak kısa zamanda alınan büyük data verimliliği beraberinde bu dataların işlenmesi için özel programların geliştirilmesine ve yorumlanması için biyoinformatik yaklaşımların gelişmesine sebep oldu. Data verimliliği ve buna paralel gelişen biyoinformatik yaklaşım farklı disiplinleri biraraya getirerek hastalıklara sebep olan genetik faktörlerin daha iyi anlaşılmasına olanak verdi. Bunun sonucu olarak, hastalıklarla ilişkilendirilmiş ailesel geçişli mutasyonların kayıtlarının yıllara göre dağılımı. 2007’den 2016’ye kadar iki kat arttı (89).

Bu tez çalışmamızda YND teknikleri ve biyoinformatik yaklaşımlardan yararlanarak kalp ritim bozukluğu tanısı ile MEDİGEN’e gelen 16 yaşında veya küçük 72 bireyin aritmi ile ilişkili 39 geni incelendi. 37 hastada incelenen genlerde hastalıkla ilişkili varyant saptanamamış ve negatif rapor verilmiştir.

Değişim saptanamamasının nedeni; incelenen genler dışında aritmiye sebep olabilecek farklı bir gende mutasyon olma olasılığıdır. Bu hastalara tüm ekzom çalışması gibi daha kapsamlı dizileme çalışmaları önerilebilir. Ayrıca çalışılan genlerin fazlalığı hedeflenen bölgelerin bir kısmında yeterli kalite ve derinlikte dizi olmamasına sebep olabilmektedir. Aranılan mutasyonun düşükte olsa kaplam dışı kalan bu bölgelerde olma olasılığı her zaman vardır. Negatif raporların bir diğer nedeni de NGS teknolojisi ile bugünlerde yeni yeni saptanmaya başlayan büyük DNA dizi kayıpları ya da eklenmelerine neden olan kopya sayısı değişimleri (Copy Number Variation, CNV) yönünden incelenmemiş olmasıdır (102).

35 hastada çalışılan genlerde kalp ritim bozukluğu ile ilişkili 58 varyant saptanmıştır. Fenotiple doğrudan ilişkili patojenik ve muhtemel patojenik 21 varyantın 17'si Uzun QT sendromuna yol açan ana genlerden (tanı değeri %5 ila %35 arasında değişen) *KCNQ1* (7 varyant), *KCNH2* (6 varyant), *RYR2* (1 varyant) ve Kısa QT sendromuna yol açan temel genlerden de *KCNJ2* (3 varyant) de saptanmıştır. Uzun QT ile nadir ilişkili (tanı değeri <%1) olarak tanımlanan diğer 3 mutasyon 1'er tane olmak üzere *KCNE1*, *CAV3*, *SNTA1* genlerinde saptanmıştır. Bu sonuçlar genel literatür bilgisi ile paralellik göstermektedir (57,58).

Kliniğe katkı sağlayabilecek ancak fonksiyonu henüz tam netliğe kavuşmamış ve VUS olarak tanımlanan varyantların tüm varyantlara oranı %50'dir. Voltaj kapılı iyon kanalları ve düzenleyici ünitelerini kapsayan 13 farklı gende saptanan varyantların patojenik netliğe kavuşturulabilmesi, bu genler üzerinde yapılacak fonksiyonel çalışmalara bağlıdır. YND tarafından üretilen ve analiz edilen datanın hasta kliniği ile birlikte fonksiyonel analiz ile desteklenmesi gerekmektedir.

NGS teknolojisinin bol miktarda data üretmesinin imkanları ile kişisel ve popülasyonlara özgü binlerce varyantın belirlenmesi hızlı bir şekilde mümkün olmuştur. Ancak bu datanın insan sağlığı ile ilişkisinin belirlenmesi aynı hızla

gerçekleştirilememektedir. 2013 yılında National Center for Biotechnology Information (NCBI)'in dbSNP (versiyon 137) databankasında 50 milyon varyant refere edilmiştir. Bununla birlikte bu varyantların protein değişimine sebep olan sadece 25,318 (%3'den azı) tanesi hastalıklarla ilişkilendirilebilmiştir. Büyük çoğunluğunun ise fenotipe etkisi hala araştırılmaktadır. Hastalıklarla ilişkili literatürlerin genetik temelli olanların kayıtlarının taranması ile oluşturulan Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databankasında hastalıklarla ilişkili 16,069 varyant kayıtlıdır. Bununla birlikte OMIM de dahil farklı veri tabanlarıdaki kayıtları içinde barındıran NCBI'in klinik veri bankası ClinVar databankasında rapor edilmiş 67,555 varyant bulunmaktadır ve bunların 13,465 tanesi klinik olarak sınıflandırılmıştır. Literatür kaynaklı bir diğer databankası Human Gene Mutation Database (HGMD)'nin profesyonel versiyonunda ise Nisan 2013 kayıtlarına göre bir ya da daha fazla literatürle refere edilmiş 109,521 hastalıkla ilişkilendirilmiş varyant bulunmaktadır (103). Aralık 2016 tarihi itibarıyla patojenik ya da muhtemel patojenik olarak bildirilmiş ClinVar veri tabanında 53,211 dbSNP veri tabanında ise 49,675 varyant bulunmaktaydı. HGMD veri tabanında ise 'hastalık nedeni mutasyon (DM)' ya da 'muhtemel hastalık nedeni mutasyon (DM?)' olarak bildirilen 193,904 varyant kayıtlıydı (104).

Bu veri bankalarında varyantların klinik olarak sınıflandırılmasında da farklılıklar bulunmaktadır. HGMD kayıtlarında veriler; Hastalıkla ilişkili polimorfizm (Disease-associated polymorphism, DP), Hastalıkla ilişkili fonksiyonel polimorfizm (Disease-associated polymorphism with supporting functional evidence, DFP), Fonksiyonel polimorfizm (Functional polymorphism, FP), Hastalık nedeni mutasyon? (Disease causing mutation?, DM?), Hastalık nedeni mutasyon (Disease causing mutation, DM) olarak sınıflandırılmıştır (89). ClinVar da ise varyantlar ACMG'nin 5'li sınıflandırmasına göre; patojenik, muhtemel patojenik, benign, muhtemel benign ve klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS) olarak verilir (92). Ancak bu sınıflandırmaya girmeyen polimorfizm, somatik ve klinik anlamı bilinmeyen (unknown significance) kategorileri de vardır. HGMD ve ClinVar veri tabanları açısından baktığımızda 'hastalık nedeni mutasyon' ile

‘patojenik’, ‘muhtemel hastalık nedeni mutasyon’ ile ‘muhtemel patojenik’ birbirini karşılarken HGMD veri tabanında ‘benign’, ‘mutemel benign’ ve ‘klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS)’un karşılığı bulunmamaktadır. Bu durum varyantların evrensel bir dille sınıflandırılmasının bugün için mümkün olmadığını göstermektedir. ACMG’nin varyantları sınıflandırma kriterleri ve bunun için geliştirdiği yöntem bu yönde atılmış önemli bir adım olarak görülebilir. Bir diğer adımda VarSome gibi birçok databankasından gelen verileri birarada sunabilen, birçok akademik yapıyı içinde barındıran ve karşılaştırma kolaylığı sağlayan platformların ortaya çıkmasıdır (96, 105).

Varyantların fonksiyonel etkisinin belirlenmesinde ve sınıflandırılmasında bilgisayar temelli *in silico* tahmin gereçleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Fonksiyonel etki; protein değişimlerinin yapısal etkisini belirleyen ya da korunmuş bölge temelli ‘skorlama matrisleri’ ile ‘makine öğrenme tekniği’ temelli modeller kullanılarak belirlenir. Bu *in silico* tahmin gereçlerinden CUP-SAT, I-Mutant2.0, LS-SNP, Parepro, PhD-SNP, SNPs&GO ve SNPs3D ‘support vector machines (SVMs)’ yöntemini kullanır. MutPred ve nsSNPAnalyzer ‘Random Forests’, PMUT ve SNAP ise ‘feed forward neural networks’ yaklaşımı ile çalışır. PolyPhen-2 ve MutationTaster ‘Naïve Bayes’ yaklaşımını kullanırken AUTO-MUTE SVM ya da ‘Random Forest’ algoritmasını kullanır. Align-GVGD, D-Mutant, DS-Score, FASTSNP, FoldX, GERP++, Gumby, LogR.E-value, MAPP, Mutation-Assessor, PANTHER, PhastCONS, PolyPhen-1, PopMuSiC, SCONE, SIFT, Skippy ve SNPeffect gibi diğer birçok *in silico* gereç ise farklı değerlendirme metodları kulnarak fonksiyonel etkiyi belirlerler. Belirli sınıflandırma kriterleri kullanan tüm bu programlar yaklaşım ve metod farklılıklarından kaynaklı olarak aynı varyantın fonksiyonel etkisi için farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu durum değişimin klinik etkisinin belirlenmesinde *in silico* metodların başarısını göreceli hale getirmektedir (103,106).

Varyantların klinik öneminin belirlenmesinde genetik testlerin dışında farklı moleküler projelerden gelen verilerin kullanılması bugün eldeki verinin yorumlanmasında daha önemli hale gelmektedir. 2003 yılında başlayan National

Human Genome Research Institute (NHGRI) ile işbirliği altında yürütülen The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) projesi daha 2013 yılında insan genomunun biyokimyasal fonksiyonunu %80'ini belirlemiştir. Sonrasında ise insan genomuna ait fonksiyonel elementler üzerine çalışmalar devam etmiştir. Bu kayıtlarda tek nokta değişimlerin yanında protein kodlayan genlerin transkript üniteleri, protein bağlanma üniteleri, korunmuş DNA elementleri, kromatin yapısı, histon farklılaşmaları gibi biyokimyasal fonksiyonlar yer almaktadır. Ve bu dataya <https://www.encodedcc.org> web sitesi ile University of California Santa Cruz (UCSC)'un internet platformundan ulaşılabilir. Bu ve benzeri projelerden gelen kayıtlar varyantların klinik değerlendirmesinde ve sınıflandırılmasında önemli veriler barındırmaktadır.

Raporlanan 58 varyantın ACMG sınıflandırma kriterleri ve HGMD, ClinVar veri tabanları ile karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki sonuçlar ortaya çıkmıştır:

- Patojenik olarak raporlanan 9 varyantın ACMG, HGMD ve ClinVar sınıflandırmasına göre sırasıyla 3, 5 ve 7 tanesi uyumlu bulundu.

- Muhtemel patojenik olarak raporlanan 9 varyantın ACMG, HGMD ve ClinVar sınıflandırmasına göre sırasıyla 3, 0 ve 0 tanesi uyumlu bulundu .

- Klinik anlamı kesin olmayan varyant (VUS) olarak raporlanan 29 varyantın, ACMG, ClinVar sınıflandırmasına göre sırasıyla 27, ve 12 tanesi uyumlu bulundu. HGMD veri tabanında VUS, benign ve muhtemel sınıflaması yapılmamıştır.

- Muhtemel benign olarak raporlanan 7 varyantın 2 tanesi , ClinVar veri tabanında da aynı şekilde değerlendirilmiştir.

- Benign olarak raporlanan 1 varyant, ClinVar veri tabanında da saptanmıştır.

- HGMD ve Clin Var veri tabanlarında bulunmayan 15 varyant ACMG kriterlerine göre 13 tanesi VUS, 1 patojenik ve 1 tanesi muhtemel patojenik olarak değerlendirilmiş ve raporlanmıştır.

Bizim değerlendirmemiz, klinik veri bankaları (ClinVar, HGMD) ve ACMG sınıflandırması arasındaki bu farklılıklar YND ile birlikte oluşan veri fazlalığının yanında datanın anlamlandırılmasının önemini göstermektedir. Varyantların patojenik etkisini yorumlamak için veri tabanlarından gelen bilgilere ilave olarak hasta kliniği, hekimin deneyimi, güncel makalelerin takibi bugün önemini korumaktadır. Hekim deneyimi ile birlikte HGMD, Clin Var, ACMG gibi veri tabanlarından gelen bilgiler ve laboratuvarın kendi veri bankası sonuçlarının güvenilirliğini arttırmaktadır.

Bu sonuçlar göstermektedir ki,

YND'nin sağladığı olanaklar fonksiyonel çalışmalar ile desteklenmelidir.

Varyantların patojenik etkisini yorumlamak için veri tabanlarından gelen bilgilere ilave olarak hasta kliniği, hekimin deneyimi, güncel makalelerin takibi bugün önemini korumaktadır.

Hekim deneyimi ile birlikte HGMD, Clin Var, ACMG gibi veri tabanlarından gelen bilgiler ve laboratuvarın kendi veri bankası sonuçlarının güvenilirliğini arttırmaktadır.

ACMG'nin varyantları sınıflandırma kriterleri ve bunun için geliştirdiği yöntem varyantların ortak bir dille sınıflandırılması için bir adım olarak görülebilir. Bu tür sınıflandırma kriterlerinin geliştirilmesi klinik datanın yorumlanmasında kolaylık sağlayacaktır.

VarSome gibi birçok databankasından gelen verileri birarada sunabilen, birçok akademik yapıyı içinde barındıran ve karşılaştırma kolaylığı sağlayan platformların ortaya çıkması varyantın klinik yorumunu hızlandırmaktadır.

Belirli değerlendirme kriterleri kullanan *in silico* analiz programları yaklaşım ve metod farklılıklarından kaynaklı olarak aynı varyantın fonksiyonel etkisi için farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle *in silico* gereçlerin sonuçlarını birarada değerlendirmek bir varyantın klinik etkisinin değerlendirilmesinde daha sağlıklı olacaktır.

ENCODE gibi genetiğin yanında insan genomunun biyokimyasal fonksiyonları üzerine yapılan çalışmaların kayıtlarını tutan veri bankalarının sunduğu imkanlardan yararlanmak, varyantların klinik değerlendirmesinde ve sınıflandırılmasında önemini korumaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Lehnart SE, Ackerman MJ, Benson DW, Brugada R, Clancy CE, Donahue JK, et al. Inherited arrhythmias: A National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affe. *Circulation*. 2007;116(20):2325–45.
2. Schulze-Bahr E. Arrhythmia Predisposition. Between Rare Disease Paradigms and Common Ion Channel Gene Variants. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(9 SUPPL.).
3. Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology* [Internet]. 2017;6(1):7. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-7737/6/1/7>
4. Ackerman MJ, Mohler PJ. Defining a new paradigm for human arrhythmia syndromes: Phenotypic manifestations of gene mutations in ion channel- and transporter-associated proteins. *Circulation Research*. 2010;107(4):457–65.
5. Cui Y, Giblin JP, Clapp LH, Tinker a. A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(2):729–34.
6. Akimoto M, Vanschouwen B, Melacini G. The structure of the apo cAMP-binding domain of HCN4 - a stepping stone toward understanding the cAMP-dependent modulation of the hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated ion channels. *FEBS Journal*. 2018;
7. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic Peptides. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(25):2357–68.
8. Lunter G, Goodson M. Stampy: A statistical algorithm for sensitive and fast mapping of Illumina sequence reads. *Genome Research*. 2011;21(6):936–9.
9. Horike-pyne MJ, Boshe L, Henderson GE, Ph D, Ph D, S MIRM, et al. HHS Public Access. 2017;19(2):176–81.

10. Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. Molecular basis of arrhythmias. *Circulation*. 2005;112(16):2517–29.
11. Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, Chandler NJ, Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clinical Anatomy*. 2009;22(1):99–113.
12. Renwick J, Kerr C, McTaggart R, Yeung J. Cardiac electrophysiology and conduction pathway ablation. *Canadian Journal of Anaesthesia*. 1993;40(11):1053–64.
13. Phd JN. Correspondence : Abstract : Albiger, N (no date) “Correspondence : Abstract :,” pp 1–36 doi: 101111/cen12763. :1–36.
14. Koz M. İstirahat membran potansiyeli & aksiyon potansiyeli.
15. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Science’s STKE*. 2005;85(4):1205.
16. Nerbonne JM. Molecular Basis of Functional Myocardial Potassium Channel Diversity. *Cardiac Electrophysiology Clinics*. 2016;8(2):257–73.
17. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circulation Research*. 2017;120(12):1969–93.
18. Bilimsel Dosya. Coralan. <http://studylibtr.com/doc/749277/bilimsel-dosya> Erişim Tarihi: 05.06.2018
19. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(23):4355–81.
20. Salzberg SL. Horizontal gene transfer is not a hallmark of the human genome. *Genome Biology*. 2017;18(1):1–5.
21. Koonin E V. The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology*. 2010;11(5).
22. Bishopric NH. Evolution of the heart from bacteria to man. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1047:13–29.
23. Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*. 2011;194(4):513–25.
24. England J, Loughna S. Heavy and light roles: Myosin in the morphogenesis of the heart. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70(7):1221–39.

25. Grizel A V, Glukhov GS, Sokolova OS. Mechanisms of Activation of Voltage- Gated Potassium Channels. *Acta Naturae*. 2014;6(23):10–26.
26. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1977;74(12):5463–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.12.5463>
27. Pohorille A, Schweighofer K, Wilson MA. The Origin and Early Evolution of Membrane Channels. *Astrobiology* [Internet]. 2005;5(1):1–17. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ast.2005.5.1>
28. Koonin E V, Lane N, Martin W, Lane N, Hudder A, Nathanson L, et al. Origin of eukaryotes from within archaea, archaeal eukaryome and bursts of gene gain: eukaryogenesis just made easier? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* [Internet]. 2015;370(1678):20140333. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323764>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4571572>
29. Zakon HH. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: The first 800 million years. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2012;109(Supplement_1):10619–25. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1201884109>
30. DeGrande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J, Dun W, et al. Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(2):1032–46.
31. Miceli F, Soldovieri MV, Iannotti FA, Barrese V, Ambrosino P, Martire M, et al. The voltage-sensing domain of Kv7.2 channels as a molecular target for epilepsy-causing mutations and anticonvulsants. *Frontiers in Pharmacology*. 2011;FEB(February):1–15.
32. www.ncbi.nlm.nih.gov. Erişim Tarihi: 22.02.2018.
33. Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacological Reviews* [Internet]. 2003;55(4):579–81. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/55/4/579.short>
34. Abriel H, Rougier JS, Jalife J. Ion Channel Macromolecular Complexes in Cardiomyocytes: Roles in Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*. 2015;116(12):1971–88.

35. Watanabe H, Minamino T. Genetics and Mechanisms of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Austin Journal of Clinical Cardiology* [Internet]. 2014;1(2):1–3. Available from: <http://austinpublishinggroup.org/clinical-cardiology/fulltext/ajcc-v1-id1011.php>
36. Savio-Galimberti E, Gollob MH, Darbar D. Voltage-gated sodium channels: Biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Frontiers in Pharmacology*. 2012;3 JUL(July):1–19.
37. Dai S, Hall DD, Hell JW. Supramolecular Assemblies and Localized Regulation of Voltage-Gated Ion Channels. *Physiological Reviews* [Internet]. 2009;89(2):411–52. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00029.2007>
38. Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: Structure, function, and modulation. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2002;12(5):206–13.
39. Degrande S, Nixon D, Koval O, Curran JW, Wright P, Wang Q, et al. CaMKII inhibition rescues proarrhythmic phenotypes in the model of human ankyrin-B syndrome. *Heart Rhythm*. 2012;9(12):2034–41.
40. Lei M, Wang X, Ke Y, Solaro RJ. Regulation of Ca²⁺ transient by PP2A in normal and failing heart. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2015;6(January):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2015.00013/abstract>
41. El Refaey MM, Mohler PJ. Ankyrins and spectrins in cardiovascular biology and disease. *Frontiers in Physiology*. 2017;8(OCT):1–7.
42. Kilfoil PJ, Tipparaju SM, Barski OA, Bhatnagar A. Regulation of ion channels by pyridine nucleotides. *Circulation Research*. 2013;112(4):721–41.
43. Fridolfsson HN, Patel HH. Caveolin and caveolae in age associated cardiovascular disease. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2013;10(1):66–74.
44. Tsai EJ, Kass DA. *Therapeutics*. 2010;122(3):216–38.
45. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovascular Research*. 2006;69(2):318–28.
46. Paige E. Cooper^{1,*}, Heiko Reutter^{2, 3,*}, Joachim Woelfle⁴, Hartmut Engels³, Dorothy K. Grange⁵, Gijs van Haaften⁶, Bregje W. van Bon⁷, Alexander Hoischen⁷ and CGN. Cantú Syndrome Resulting from Activating Mutation in the KCNJ8 Gene. 2014;86(3):573–9.

47. Ertuna E, Yasa M. Atp'Ye Duyarli Potasyum Kanal BloköGliBenklamidin VasküleReaktivitÜzerindekEtkileriniİncelenmesi. 2001;
48. Hatzfeld M. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2007;1773(1):69–77.
49. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*. 2004;62(2):228–32.
50. Steggerda SM, Paschal BM. The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(30):23175–80.
51. Zhou J, Wang L, Zuo M, Wang X, Ahmed ASI, Chen Q, et al. Cardiac sodium channel regulator MOG1 regulates cardiac morphogenesis and rhythm. *Scientific Reports* [Internet]. 2016;6(February):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21538>
52. Holaska JM. Emerin and the nuclear lamina in muscle and cardiac disease. *Circulation Research*. 2008;103(1):16–23.
53. Blomström-Lundqvist C, Scheinman MM, Aliot EM, Alpert JS, Calkins H, Camm AJ, et al. ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients with Supraventricular Arrhythmias - Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology [Internet]. Vol. 42, *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier Masson SAS; 2003. 1493-1531 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2003.08.013>
54. Schimpf R, Veltmann C, Wolpert C, Borggrefe M. Channelopathies: Brugada syndrome, long QT syndrome, short QT syndrome, and CPVT. *Herz*. 2009;34(4):281–8.
55. Anabilim K, Bektaşoğlu DG, Yılmaz DMB, Turgut DOO. Uzun QT sendromları. 2009;487–501.
56. Hedley PL, Jørgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: A mutation update. *Human Mutation*. 2009;30(11):1486–511.
57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1129/>, Erişim Tarih: 06.06.2018.
58. OC Y. Pseudo-infarct pattern on the electrocardiogram Elektrokardiyografide yalancı enfarkt görünümü. 2011;39(2):5543.



59. Sahinkaya HH, Yasar E, Tekgul ZT, Ozalp Horsanali B, Ozeroglu E. Anaesthetic Management of a Patient with Brugada Syndrome. *Turkish Journal of Anesthesia and Reanimation* [Internet]. 2016;44(2):96–8. Available from: <http://jtaics.org/jvi.aspx?pdire=tard&plng=eng&un=TARD-22230>
60. Reid DS, Tynan M, Braidwood L, Fitzgerald GR. Bidirectional tachycardia in a child. A study using His bundle electrography. *British heart journal* [Internet]. 1975;37(3):339–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=483978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Liu N, Ruan Y, Priori SG. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2008;51(1):23–30.
62. <https://www.bhf.org.uk/heart-health/conditions/atrial-fibrillation> ET 06. 06. 0201. No Title.
63. Ergin M, Dundar ZD, Aslay S, Emet M. Updated Management of Atrial Fibrillation. *Eurasian Journal of Emergency Medicine* [Internet]. 2015;14(3):138–41. Available from: <http://www.eajem.com/eng/makale/3344/241/Full-Text>
64. L SNI, Nalbantg İİL. HASTA S İ NÜS SENDROMU SICK SINUS SYNDROME. 2003;6(3):109–12.
65. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *The Lancet* [Internet]. 2009;373(9671):1289–300. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60256-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60256-7)
66. Bellmann B, Roser M, Muntean B, Tscholl V, Nagel P, Schmid M, et al. Atrial standstill in sinus node disease due to extensive atrial fibrosis: Impact on dual chamber pacemaker implantation. *Europace*. 2016;18(2):238–45.
67. http://www.sequenceontology.org/browser/current_svn/term/SO:0000704.
68. Mahdih N, Rabbani B. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iranian Journal of Pediatrics*. 2013;23(4):375–88.
69. Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*. 2016;56(4):394–404.
70. Illumina. Illumina adapter sequences. Illumina. 2009;(October):1–4.

71. Caruccio N. High-Throughput Next Generation Sequencing. 2011;733. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-089-8>
72. Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research* [Internet]. 2014;322(1):12–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.008>
73. Mertes F, ElSharawy A, Sauer S, van Helvoort JMLM, van der Zaag PJ, Franke A, et al. Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Briefings in Functional Genomics*. 2011;10(6):374–86.
74. <https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/patterned-flow-cell-technology-technical-note-770-2015-010.pdf>.
75. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* [Internet]. 2016;107(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
76. <http://nextgen.mgh.harvard.edu/IlluminaChemistry.html>, Erişim tarihi: 25.02.2018.
77. Fuller CW, Middendorf LR, Benner SA, Church GM, Harris T, Huang X, et al. The challenges of sequencing by synthesis. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2009;27(11):1013–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1585>
78. <https://emea.illumina.com/informatics/sequencing-data-analysis/sequence-file-formats.html>, Erişim tarihi 19.05.2018.
79. Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*. 2009;38(6):1767–71.
80. Mu JC, Jiang H, Kiani A, Mohiyuddin M, Asadi NB, Wong WH. Fast and accurate read alignment for resequencing. *Bioinformatics*. 2012;28(18):2366–73.
81. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.13/#/def.
82. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.38,
83. <https://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf>.
84. <https://software.broadinstitute.org/software/igv/home>.

85. Tian S, Yan H, Kalmbach M, Slager SL. Impact of post-alignment processing in variant discovery from whole exome data. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2016;17(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-016-1279-z>
86. Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 2008;18(5):821–9.
87. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015;17(5):405–24.
88. Documentation G. Qiagen Hgmd®. 2015;1–41. Available from: https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/docs/HGMD_global_document.pdf
89. http://resources.qiagenbioinformatics.com/white-papers/PROM-11650-001_WP_BIOX_HGMD_ClinVar_1117_WW.pdf, Erişim Tarihi: 10.06.2018).
90. <https://www.omim.org/about> ET 20. 05. 201. No Title.
91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/> Erişim Tarihi 20.05.2018.
92. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/compare_displays/ Erişim Tarihi 20.05.2018.
93. <https://www.genenames.org/> Erişim tarihi: 20.05.2018.
94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>, Erişim tarihi: 28.05.2018.
95. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* [Internet]. 2016;536(7616):285–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature19057>
96. <https://varsome.com/about/>, Erişim Tarihi: 03.06.2018.
97. www.illumina.com/cardio, Erişim tarihi: 28.05.2018.
98. Illumina. MiSeq® System. 2016;(April 2018):1–4. Available from: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_miseq.pdf
99. <https://software.broadinstitute.org/gatk/>, Erişim Tarihi: 03.06.2018.

100. Stenson PD, Mort M, Ball E V., Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. Development of a Comprehensive Sequencing Assay for Inherited Cardiac Condition Genes. *International Journal of Legal Medicine* [Internet]. 2016;130(1):59–66. Available from: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-49/v1>
101. Akyol A. Kardiyak kanalopatiler ve kısa QT sendromlar. 2007;35(3):187–94.
102. Parrish A, Caswell R, Jones G, Watson CM, Crinnion LA, Ellard S. An enhanced method for targeted next generation sequencing copy number variant detection using ExomeDepth. *Wellcome Open Research* [Internet]. 2017;2(0):49. Available from: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-49/v1>
103. Peterson TA, Doughty E, Kann MG. Towards precision medicine: Advances in computational approaches for the analysis of human variants. *Journal of Molecular Biology* [Internet]. 2013;425(21):4047–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.08.008>
104. <http://www.hgmd.org>.
105. Abouelhoda M, Faquih T, El-Kalioby M, Alkuraya FS. Revisiting the morbid genome of Mendelian disorders. *Genome Biology* [Internet]. 2016;17(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-1102-1>
106. Williams S. Analysis of in silico tools for evaluating missense variants A summary report. *Ngrl* [Internet]. 2012; Available from: http://www.ngrl.org.uk/Manchester/sites/default/files/publications/Add-To-Menu/Missense_Prediction_Tool_Report.pdf

9. ETİK KURLUL ONAYI

		
	<p>T.C. İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı</p>	<p>E-İmzalıdır</p>
	<p>Sayı : 10840098-604.01.01-E.5457 Konu : Etik Kurulu Kararı</p>	<p>15/02/2018</p>
	<p>Sayın Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI</p>	
	<p>Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Çocukluk Çağı Aritmilerinde Yeni Nesil Dizileme Teknikleri Kullanılarak Nokta Mutasyonların Analizi” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.</p>	
	<p>Bilgilerinize rica ederim.</p>	
	<p>Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı</p>	
	<p>Ek: -Karar Formu (2 sayfa)</p>	
<p>Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 15.02.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza linkinden 31234C00XF kodu ile doğrulayabilirsiniz.</p>		
<p>İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810 Beykoz/İSTANBUL</p>		<p>Tel: 444 85 44 İnternet: www.medipol.edu.tr Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr</p>

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çocukluk Çağı Aritmilerinde Yeni Nesil Dizileme Teknikleri Kullanılarak Nokta Mutasyonların Analizi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	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"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	15.01.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	15.01.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	Karar No: 131		Tarih: 14/02/2018			
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	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
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 checked="" type="checkbox"/>	H <input 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	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"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur 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"/>	
Yrd. Doç. Dr. 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"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Erda Fırat	Soyadı	Çaralan
E-mail	firatcaralan@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul İstanbul Üniversitesi	2005
Lise	Kazım İşmen Lisesi	1998

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Stajyer	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Histoloji bölümü	Ağustos 2008
Stajyer	Avcılar Simge Tıbbi Tahlil Laboratuvarı	30-22.08.2009
Yeni Nesil Dizileme Laboratuvar teknisyeni	İÜ Tıp Fakültesi Tüm Genom Analiz Laboratuvarı ve Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı	2009-2012
Sanger, RT-PCR, Yeni Nesi Dizileme Aplikasyon Uzmanı	MedSanTek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.	2012-2014
Genetik Tanı Merkezi (MEDİGEN) Laboratuvar sorumlusu	Medipol Üniversitesi REMER/Genetik Tanı Merkezi	2014-...

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	Orta

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	65,74	68,26	69,86

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
CLC Genomic Workbench/Bio	Çok iyi
Linux/Ubuntu	Orta
Photoshop	Orta
GATK/AnnoVar/BWA/IGV	Orta

Sertifikalar

MedSanTek	3500 Genetik Analiz Cihazı	2016
İstanbul Medipol Üniversitesi	İş Sağlığı ve Güvenliği	2016
GENOKS (Genetik Hastalıklar Tanı Mekezi, Qiagen CLC-Bio)	Yeni Nesil Dizileme Analiz Yöntemleri ile Elde Edilen Datanın Yorumlanması ve Bu Konuda Kullanılan Programlar	2016
Elips Sağlık Ürünleri	LightCycler 480 II cihazı Kullanım Sertifikası	2016
EMEA Roche Life Science Customer Support Center (CSC)	SeqCap EX Exome V3 training	2015