

Ekzom dizileme verilerinin tekrar değerlendirilmesi ile saptanan klinik olarak anlamlı ekzom tabanlı kopya sayısı değişimleri

CLINICALLY SIGNIFICANT EXOME-BASED COPY NUMBER VARIANTS DETECTED BY RE-EVALUATION OF EXOME SEQUENCING DATA

 Fatma KURT ÇOLAK

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, TÜRKİYE

ÖZ


Amaç: Son zamanlarda yeni nesil dizileme (next generation sequencing-NGS) birçok klinik laboratuvarda yaygınlaşmakta ve kullanımdaki bu artış neticesinde analiz platformlarına entegre edilmek üzere bazı özel yazılımlar geliştirilmektedir. Özel yazılıma sahip bu platformlar aynı anda tek nükleotid varyantları (single nucleotide variants-SNV) ile birlikte kopya sayısı değişikliklerini (copy number variation-CNV) tanımlamak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism-SNP) genotiplemesini içeren mikrodizin tabanlı teknolojiler, CNV karakterizasyonu için NGS'e paralel olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ekzom analizi yapılmış, herhangi bir varyant tespit edilememiş ve tanısı konulamamış 30 hasta tekrar değerlendirmeye alınmış ve tanıya olan katkısına bakılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastalarda NGS testi için Sophia genetics in Clinical Exome Solution (CES) kiti kullanıldı. Illumina Next Seq 550® cihazında çalışıldı. CNV olaylarının teyidi için mikrodizin çalışması olarak Illumina Infinium® HumanCytoSNP-12 v2.1 SNP-array çipleriyle Bluefuse® multi (v4.5) analiz programı ve Affymetrix® Cytoscan Optima çipleri ve Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 Thermo Fisher Scientific® programları kullanıldı. Bir hastada teyit için multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) testi için SALSA MLPA probemix P089 TK2® kiti kullanıldı.

Bulgular: Tekrar değerlendirilen 30 hastadan 4 vakada sırasıyla RRM2B geni delesyonu, Xq28 duplikasyonu, 22q11.21 delesyonu ve 15q21.2 delesyonu bulunmuştur.

Sonuç: NGS verilerini iyi geliştirilmiş yazılımlarla analiz etmenin birçok avantajı vardır. Özellikle bazı durumlarda hem SNV hem de CNV verilerini birlikte değerlendirebilen yazılım, klinik vakaların çözümüne yardımcı olabilmektedir. Teknolojideki gelişmeler daha iyi sonuçlar veren yazılım araçlarının geliştirilmesine yol açmaktadır. Bu tür analiz yöntemleri, özellikle genin bir kopyası silindiğinde, diğer kopya patojenik veya patojenik olabilen varyantlar taşıdığına, resesif koşullar için tıbbi genetikteki zorlu vakaların çözümünde zaman ve maliyet açısından fayda sağlamaktadır.

Fatma KURT ÇOLAK

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni.
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Kahramanmaraş-TÜRKİYE
E-posta: drfatmakurt@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0002-8777-8100>

Anahtar Sözcükler: mikrodizin, kopya sayısı değişikliği, yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Objective: The next-generation sequencing (NGS) method is becoming widespread in many clinical laboratories and as a result of this increase in usage some tools are developed to be integrated into analysis platforms. These platforms with dedicated software are increasingly being used to identify copy number variations (CNVs) along with single nucleotide variants (SNVs) simultaneously. Array-based technologies including single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping has been employed in parallel to NGS for further characterization of the CNV event. In this study, exome analysis was performed, no variant was detected and 30 patients who could not be diagnosed were re-evaluated.

Materials and Methods: Clinical Exome Solution (CES) kit by Sophia Genetics was used to IlluminaNextSeq550® platform. The data obtained after sequencing was uploaded to SophiaDDM software for analysis. HumanCytoSNP-12v2.1BeadChip Kit at IlluminaInfinium®SNP-array platform and Affymetrix®Cytoscan Optima chips kit was used for follow-up confirmation of CNV events. The RRM2B gene gains and/or losses were detected by the SALSA MLPAprobemix P089TK2®.

Results: In 4 cases out of 30 patients re-evaluation included RRM2B gene deletion, Xq28 duplication, 22q11.21 deletion, and 15q21.2 deletion.

Conclusion: There are many advantages of analyzing NGS data with well-developed software. Software that can evaluate SNV and CNV data together, especially in our cases, help in solving clinical cases. In technology, the steps will lead to the development of software tools that give better results. Such analysis methods are of time and cost benefit in solving challenging cases in medical genetics for recessive conditions, especially when one copy of the gene is deleted and the other copy carries variants that may be pathogenic.

Keywords: microarray, copy number variations, next generation sequencing.

Ekzom dizileme, genomdaki protein kodlayan bölgelerin (20.000 gen) kitlesel paralel dizilişinin gerçekleştirildiği bir tekniktir (1). Klinik ekzom dizileme ise şu ana kadar hastalıklarla ilişkilendirilmiş olan ya da henüz herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş ancak potansiyel aday gen olabilecek olan genlerin (4.500 gen) dizilendiği bir platformdur. Bu nedenle klinik ekzom dizileme rutin tanı kapsamında daha çok tercih edilmektedir (2). Klinik ekzom dizilemenin farklı çalışmalarda ve farklı hasta gruplarında tanı oranı %20 ile %30 arasında değişkenlik göstermektedir (1, 3). Tanı oranının %30 civarında olması nadir hastalıklar için kabul edilebilir olmakla birlikte nadir hastalıkların yaklaşık %70'inin genetik etiyojisi günümüzde halen belirlenememiştir (3).

İnsan genomunda kopya sayısı varyasyonu(copy number variation-CNV) büyük bir yer kaplamakla birlikte

tek bir genom içinde referans genoma göre %1,2'lik bir fark oluşturmaktadır (4). CNV'ler sadece normal genomik farklılıklar dışında önemli hastalıklara da sebep olabilmektedir. Örneğin zihinsel yetersizlik hastalarının %10-20'sinde CNV'ler tanımlanmıştır (5, 6). CNV'ler doğrudan genleri içerebilir, ama bu her zaman gerekli değildir ve genellikle klasik mendel kalıtımına uyan biçimde aktarılırlar. CNV'ler bir genin içinde bulunarak veya genin bir kısmını içererek hastalıklara neden olabileceği gibi dozaja hassas genlerin miktarlarını değiştirerek de hastalıklara neden olabilmektedir (7). Birçok ülkede nörogelişimsel bozukluklar için mikrodizin tabanlı CNV profili ilk tanı testi olarak son 10 yılda laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Araştırmalar birçok hastalık için CNV'lerin önemli olduğunu tespit etmiştir (8, 9).

Son zamanlarda yeni nesil dizileme (next generation sequencing-NGS) birçok klinik laboratuvarında yaygınlaşmakta ve kullanımdaki bu artış neticesinde analiz platformlarına entegre edilecek bazı araçlar geliştirilmektedir. Özel yazılıma sahip bu platformlar aynı anda tek nükleotid varyantları (single nucleotide variants - SNV) ile birlikte CNV'leri tanımlamak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism-SNP) genotiplemesini içeren array tabanlı teknolojiler, CNV karakterizasyonu için NGS'e paralel olarak kullanılmıştır (10, 11, 12). Bu tür yaklaşımlar, özellikle genin bir kopyası silindiğinde, diğer kopya patojenik ya da patojenik olabilen varyantlar taşıdığına, resesif koşullar için tanı açısından zorlu vakaları çözebilmektedir.

Kromozomal boyutta 50 bazdan daha büyük alanı kaplayan değişikliklere CNV adı verilmektedir (13). CNV kapsamında referans genoma göre kazanım (duplikasyon/insersiyon) ya da kayıp (delesyon) ilgili kromozomda olabilmektedir. 50 bazlık küçük bir değişimin patojenik olabileceği gibi sağlıklı popülasyonda çok büyük CNV'ler görülebildiği gösterilmiştir (14). CNV'ler belirli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup mendeliyen ve mikrodelesyon/ mikroduplikasyon gibi hastalıkların yanı sıra multifaktöriyel hastalıklar için risk faktörü olabilmektedir (8, 9, 15). Ayrıca aynı bölgenin delesyonu farklı, duplikasyonu farklı bir hastalık ya da klinikle ilişkilendirilebilmektedir(15).

Genetik bozukluklar geniş bir yelpazede yer alır ve bu durum içinde CNV'lerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tek yöntemli ekzom testlerine göre ekzom bazlı CNV profillemeye yöntemi, ek testler olmadan tespit ve teşhis artışına neden olabilmektedir(16).

Yeniden değerlendirme sırasında hastalardaki olası kopya sayısı değişikliklerinin saptanması amacıyla SOPHIA DDM MUSKAT® platformu kullanılmıştır. Bu yazılım 200 baz çifti çözünürlüğünde kopya sayısı değişikliklerini saptayabilmektedir.

Bu çalışmada ekzom dizileme ile hastanın kliniği ile ilişkilendirilebilecek bir varyant bulunamamış 30 hastanın ekzom bazlı CNV profillemeye ile tekrar değerlendirilip tanıya katkı oranına bakılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örnek seçimi

Etik kurul izni 22.01.2020 tarihinde 2030 karar numarası ile Ankara Keçiören Eğitim Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı. Ekzom analizi ile tanı konulamayan 30 hasta tekrar analiz edilip tanı konulan hastalara değerlendirilmiştir. Ekzom dizileme yapılmış 30 hasta için hastaların klinik bulgularına karşılık gelen panelde bulunan (potansiyel) patojenik küçük varyantlar için analiz edilmiş ve tanı konulamamıştır.

Ekzom dizileme

Hastalardan veya hasta velilerinden aydınlatılmış onam alınmıştır. Başlangıç olarak onamı alınan hastanın periferik kandan DNA eldesi QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) ile QIAcube cihazı kullanılarak kit protokolüne uygun olarak izole edilmiştir. Hastaların başlangıçta DNA konsantrasyonu 40-70 ng/ µL aralığında ölçülmüştür. Hastalarda NGS testi için sophia genetics, Clinical Exome Solution (CES) kiti kullanılmıştır. Yaklaşık 4490 gen içeren bu kit Next Seq 550®(Illumina, USA) cihazında çalışılmıştır. Sekanslamadan sonra elde edilen veriler analiz için Sophia DDM yazılımı (Sophia Genetics SA, Switzerland) kullanılmıştır. Bu yazılım ham verilerin analizinin yanında hem CNV hem de SNV analizi sağlayan bir ara yüzdür. CNV analizinde kullanılan MUSKAT platformu 200 bp çözünürlüğe kadar olan değişimlerin saptanmasını sağlar. CNV analizi hedef bölgelerin kapsama seviyeleri aynı çalışma içinde numuneler arasında analiz edilerek gerçekleştirilir. Her numune için algoritma kapsama modellerinin benzerliğine bağlı olarak aynı çalışmadan bir dizi referans numunesini otomatik olarak seçer. Ayrıca referans numuneler kullanılarak kapsama numune ve hedef bölge tarafından normalleştirilir, Hidden-Markov-model algoritması kullanarak CNV analizini gerçekleştirilir. Analiz sırasında SNV listesi ve CNV'de tespit edilen genleri, düşük alel frekanslı varyantları siliko araçlarda patojenik skorlara sahip varyantları içerecek şekilde özel olarak filtrelenmiştir. Ekzom testleri hedef bölgede %90 prob sekansına ve 20X kapsamı %97'sine sahiptir.

Mikrodizin

CNV bulunan hastalar takip ve teyidi için mikrodizin çalışmaları, Illumina Infinium® HumanCytoSNP-12 v2.1 SNP-array çipleriyle Bluefuse® multi (v4.5) analiz programı ve Affymetrix® Cytoscan Optima çipleri Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 Thermo Fisher Scientific® programı yardımıyla analiz edilip, elde edilen veriler güncel veritabanları (Pubmed, OMIM, DGV, Clinvar, DECIPHER) kullanılarak değerlendirilmiştir.

MLPA

Teyit için multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) testi için Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer cihazında SALSA MLPA probemix P089 TK2 kiti kullanılmıştır ve Coffalyser.NET (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) analiz programı kullanılarak raporlanmıştır. Ayrıca MLPA yöntemi için veri normalizasyonunda kontrol DNA örneği kullanılmıştır. MLPA yönteminde kopya sayısı değişimlerinin tanımlanması için kullanılan eşik değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. RRM2B geni kopya sayısı değişimlerinde kullanılan eşik değerler.(SALSA® MLPA® Probemix P089-B2 TK2 kiti ürün bilgisi)

Kopya sayısı durumu	Dozaj Bölümü (Dosage quotient)
Normal	0.80<DQ<1.20
Homozigot delesyon	DQ=0
Heterozigot delesyon	0.40<DQ<0.65
Heterozigot duplikasyon	1.30<DQ<1.65
Heterozigot triplikasyon / homozigot duplikasyon	1.75<DQ<2.15
Belirsiz kopya sayısı	Diğer tüm değerler

BULGULAR

Bölümümüzde ekzom dizileme çalışılmış 30 hastanın verileri daha önceden değişikliklerin toplumda görülme sıklığına, aminoasit ve protein düzeyindeki etkisine, fonksiyonel etkilerine, evrimsel korunmuşluğuna, inhouse ve web tabanlı veri tabanlarında (Pubmed, Clinvar, HGMD, OMIM, EXAC, GnomAD, Varsome) bulunup bulunmamasına göre değerlendirilmiştir ve hastaların klinik bulgularına karşılık gelen panelde bulunan (potansiyel) patojenik küçük varyantlar için analiz edilmiştir. Tanısı konulamamış bu hastaların ekzom tabanlı CNV çalışması tekrar değerlendirilmeye alınmış ve bu hastalardan 4 vaka da tanı açısından yol gösterici sonuçlar bulunmuştur. Bulunan değişimler ikinci bir yöntem ile doğrulanmıştır ve hastaların tanılarına katkıda bulunmuştur.

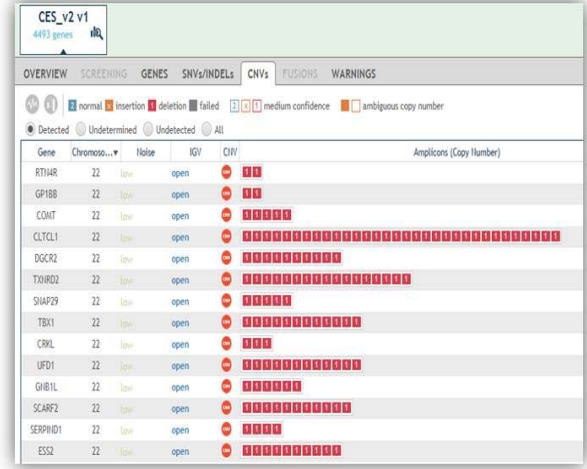
Vaka 1

1 yaşında kız hasta, 22 yaşında annenin ilk ve tek çocuğu, anne ile baba arasında 3. derece akrabalık mevcuttu. Sezaryen ile 37 haftalık 3000 gr olarak doğum ve ailede bilinen bir hastalık öyküsü bulunmamaktaydı. Muayenede aksiyel hipotonisite, baş traksiyonda iken geride kalıyordu ve hastada dilde fasikülasyon yoktu. Ekokardiyografide patent foramen ovale tespit edildi, abdominal ultrasonografi normal, kranial mr normal olarak sonuçlandı. Hipotonisite nedeni araştırılırken laktat yüksekliği saptandı. Göz muayenesi bilateral nonspesifik hipopigmente fundus olarak değerlendirildi. İdrar organik asit sonucu mitokondriyal hastalık lehine sonuçlandı. Hastanın kas biyopsi sonucu mitokondriyal hastalık ile uyumlu olarak raporlandı. Dış merkezde mitokondriyal hastalık paneli çalışılmış ve normal olarak sonuçlanmıştı. Hasta nükleer genom kaynaklı mitokondriyal hastalık için NGS çalışmasına alındı. Hastanın kliniğini açıklayacak herhangi bir varyant bulunamadı. Sonraki değerlendirmede hastanın ekzom tabanlı CNV analizinde RRM2B geninin ekzon 3-5 bölümünün homozigot olarak okunmadığı görüldü (Şekil 1) ve teyit etmek için MLPA çalışıldı. Hastada MLPA sonucu RRM2B geni ekzon 3-5 homozigot delesyon olarak teyit edildi (Şekil 2). Hastamız 18 aylıkken ex oldu. Aile taramasında anne ve baba heterozigot taşıyıcı olarak saptandı (Şekil 2).

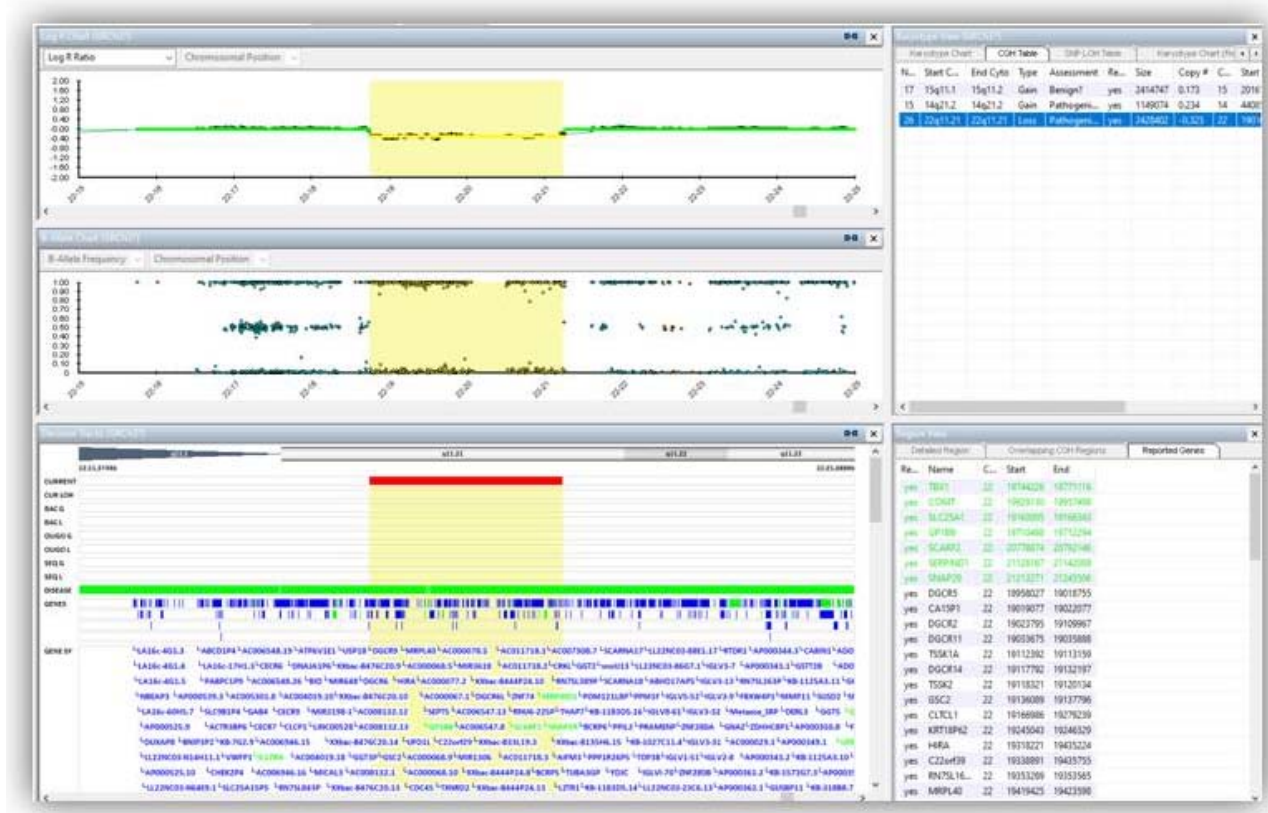
6 Ekzom sekans CNV analiz

Vaka 2

18 aylık kız hasta, 21 yaşındaki anneden ilk ve tek çocuk olarak normal vajinal yol ile 2475 gr olarak miadında doğum, anne ile baba arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Fizik muayenede retrognati, yuvarlak yüz yapısı, periorbital dolgunluk, ince ve küçük ağız yapısı mevcut olup ekokardiyografide sekundum ASD tespit edildi. Karyotip analizi 46,XX olarak gelen hastadan muayene bulguları eşliğinde Pierre Robin sendromu ön tanısı düşünülerek NGS çalışıldı ve verilerinin incelenmesinde klinikle ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyanta rastlanmadı. Daha sonraki ekzom tabanlı CNV analizinde 22q11.21 kromozomunda art arda gelen genlerde bir kopya kaybı tespit edildi(şekil 3). Teyit için mikrodizin analizi yapıldı arr[GRCh37]22q11.21(19016663-21445064)x1 delesyon saptandı ve delesyonun 2428 kb büyüklüğünde olduğu bulundu(şekil 4). Mevcut sonuç ile hasta Di George sendromu (DGS) tanısı konuldu.



Şekil 3: Vaka 2 CNV analizi Sophia DDM. Hastada 22. kromozom üzerinde ard arda gelen genlerde tek kopya okuma görülmektedir.

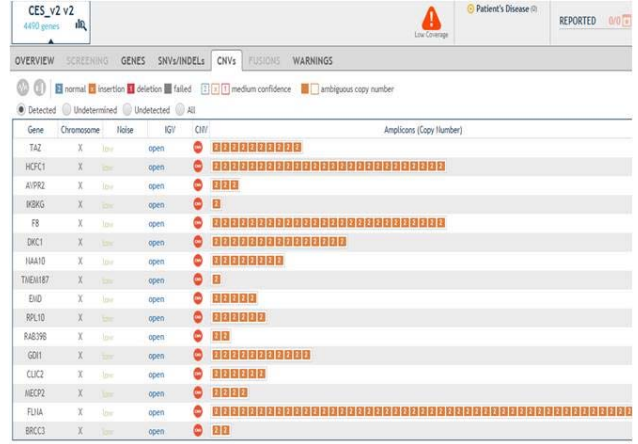


Şekil 4: Vaka 2 Illumina mikrodizin analizi arr[GRCh37]22q11.21(19016663-21445064)x1 bölgesinde 2428 kb delesyon

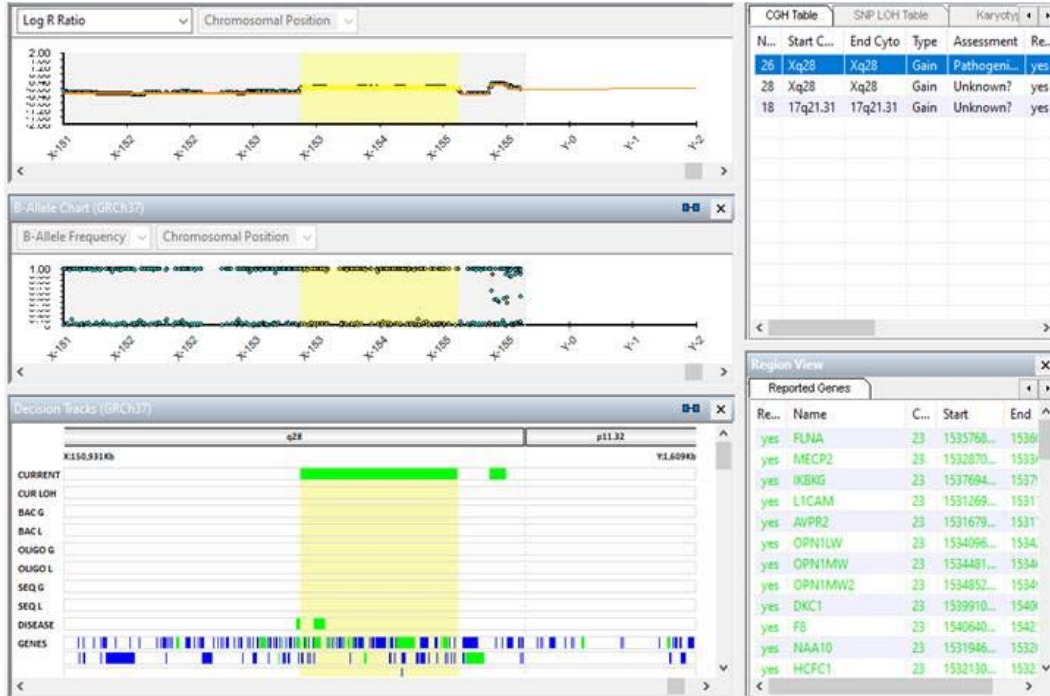
Vaka 3

5 yaşında erkek hasta hipotoni, mental retardasyon, febril konvülsiyon nedeniyle değerlendirilmeye alındı. 23 yaşında anneden ilk ve tek çocuk olarak ve normal vajinal yol ile hastanede 2960 gr olarak doğum olmuş, doğduğunda ağlama olmamış solunum sıkıntısı nedeniyle 9 gün küvezde kalmıştı. Anne ile baba arasında akrabalık yoktu. Muayenede hipotelorizm, gözler derin yerleşimli, kaşlar ortada seyrek, columella düşük, gaga burun yapısı, üçgen ağız, yüksek damak, kulaklar belirgin olarak bulundu. Hastadan kromozom analizi çalışıldı 46,XY olarak raporlandı. Frajil X için CGG tekrar sayısı bakıldı ve normal sayıda çıktı. Hastanın dış merkezde yapılmış array sonuç raporu normal olduğu için NGS çalışmasına alındı. NGS çalışmasının analizinde kliniği açıklayacak herhangi bir varyant bulunamadı. Sonraki değerlendirmede ekzom tabanlı CNV analizinde Xq28 bölgesindeki art arda gelen genlerin duplike olduğu görüldü ve mikrodizin çalışıldı (Şekil 5). Mikrodizin sonucu arr[GRCh37] Xq28(153162037-154649082)x2 olarak raporlandı ve 1487 kb büyüklüğünde

duplikasyon saptandı (Şekil 6). Hastaya Xq28 duplikasyon sendromu tanısı konuldu.



Şekil 5: Vaka 3 CNV analizi Sophia DDM. X kromozomu üzerinde art arda gelen genlerde 2 okuma olduğu görülmektedir.



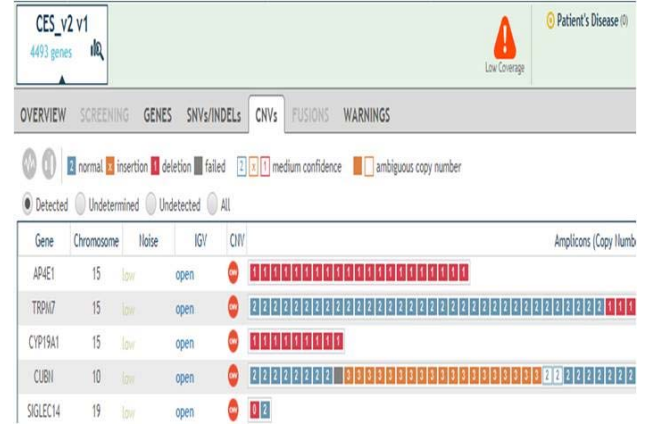
Şekil 6: Vaka 3 Illumina mikrodizin analizi arr[GRCh37] Xq28(153162037-154649082)x2 ve 1487 kb büyüklüğünde duplikasyon

8 Ekzom sekans CNV analiz

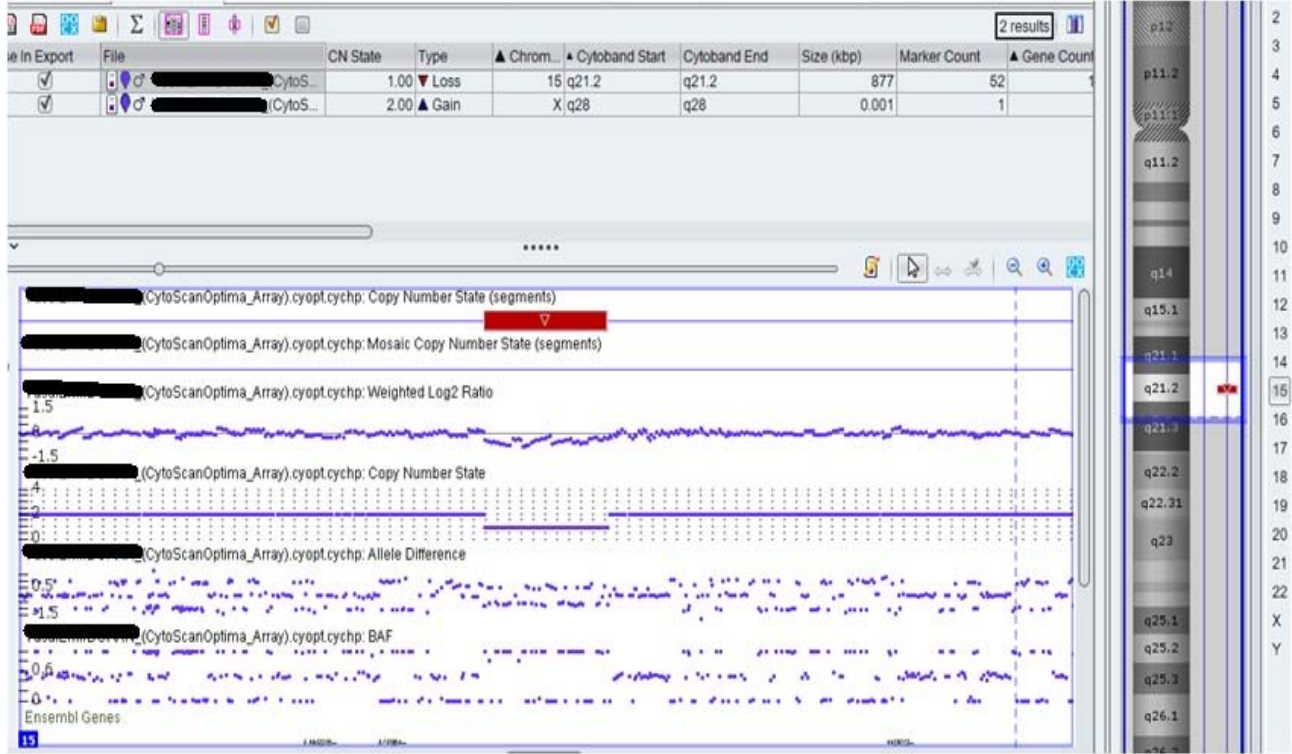
Vaka 4

Epilepsi tanısı nedeniyle değerlendirilen 33 aylık erkek hasta, 20 yaşında 3 çocuğu olan anneden 2. doğan olarak normal vajinal yol ile zamanında, 3560 gr olarak doğum olmuş ve 1 yaşında başlayan febril konvülsiyon öyküsü mevcuttu. Anne ile baba arasında akrabalık yoktu. Ailede amcada, babaannede febril konvülsiyon öyküsü vardı. Abdominal ultrasonda sol böbrek toplayıcı sistemde grade 1 hidronefroz, beyin mr normal, EEG normal olarak bulundu. Hasta CES çalışmasına alındı ve epilepsi gen panelinde anlamlı bir varyant bulunamadı ancak sonraki ekzom tabanlı CNV analizinde 15. Kromozomda bazı genlerde 1 kopya okuma olduğu görüldü ve array çalışıldı (Şekil 7). Mikrodizin sonucunda arr[GRCh37] 15q21.2 (50938977-51815643)x1 bölgesinde 877 kb'lık delesyon saptandı (Şekil 8). Ancak az sayıda hastada saptanmış olmasından ve bulunan varyant için yeterli sayıda sağlıklı

hasta verisi olmadığından klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirildi.



Şekil 7: Vaka 4 CNV analizi Sophia DDM.15. kromozom üzerinde bazı genlerin tek kopya okunduğu görülmektedir



Şekil 8: Vaka 4 Affymetrix mikrodizin analizi arr[GRCh37] 15q21.2 (50938977-51815643)x1 bölgesinde 877 kb'lık delesyon

TARTIŞMA

Dünya’da nadir hastalıkların tanısı ve tanı koyma süresinin uzaması hastaların değerlendirilmesinde profesyonel yaklaşımın önemini vurgulamaktadır. Nadir hastalıkların %80’ini genetik hastalıklar oluşturmaktadır. Hastaların yaklaşık olarak sadece %50’sine tanı konabilmektedir (17). Bu durumu genetikte güncel test ve analiz programlarının teknolojik olarak hızla ilerlemesi arttırmaktadır.

Yapılan çalışmalarda verilerin yeniden değerlendirilmesi sırasında ilk analiz sırasındaki varyant sınıflamalarının değiştiği, bilinen hastalıklarla ilişkili yeni varyantların tanımlandığı ve henüz herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş genlerin zamanla yeni hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir (18). Bu çalışmalar sonucunda dizileme verilerinin sistematik retrospektif analizin tanı oranlarını arttıracığı ortaya konulmuştur. Bu nedenle günümüzde hastalardan elde edilen yüksek genom ölçekli genetik verilerinin belirli aralıklar yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir (3).

Bu çalışmada NGS analizinde CNV değerlendirmesi ve sonrasında bulunan sonuçların mikrodizin ya da MLPA yöntemi ile teyidi yapıldı. Amaç, teşhis veriminin artması için ekzom tabanlı CNV analizinde kullanılabilirliğini göstermektir. Bazı yayınlar önceden tahmin edilen ekzom tabanlı CNV analizinin yanlış negatif veya yanlış pozitif oranlarının farklı olduğunu göstermektedir (19).

NGS verilerini iyi geliştirilmiş yazılımlarla analiz etmenin birçok avantajı vardır. Özellikle bazı durumlarda hem SNV hem de CNV verilerini birlikte değerlendirebilen yazılım, klinik vakaların çözümüne yardımcı olur. Teknolojideki gelişmeler daha iyi sonuçlar veren yazılım araçlarının geliştirilmesine yol açmaktadır. Her geçen gün yeni programlar yeni yazılımlar bu konuda önümüzü açmaktadır. Bulunan bir resesif kalıtım gösteren bir varyant için genin diğer allelinde delesyon ya da duplikasyon olması hastalığın tanısını kolaylaştırmaktadır ve analiz sırasında süre ve zaman açısından fayda sağlamaktadır.

Vaka 1’de RRM2B geninde ekzom CNV değerlendirmesinde ekzon 3-5 homozigot delesyon

saptanmış ve MLPA ile teyit edilmiştir. RRM2B geni 8q22.3 bölgesinde bulunur. Otozomal resesif (OR) veya otozomal dominant (OD) geçiş gösteren mitokondriyal hastalığa sebep olmaktadır. OR geçişli olan formda ebeveynler heterozigot ve asemptomatik taşıyıcıdır. Etkilenen bir bireyin her kardeşinin %25 etkilenme şansı, %50 asemptomatik taşıyıcı olma ve %25 etkilenmeme şansı vardır. OD kalıtım gösteren formunda ise genelde etkilenmiş bir ebeveyn bulunmaktadır. Denovo geçiş tam olarak bilinmemektedir. RRM2B ilişkili mitokondriyal hastalık tanısında %95 sekans analizi ile tanı konulmaktadır. Delesyon duplikasyon oranı tam bilinmemektedir (20, 21). Hastamızın anne ve babası sağlıklı olup heterozigot taşıyıcı olarak bulunduğu ve hastada homozigot formda olduğu için OR geçişli olarak kabul edilmiştir.

Vaka 2 de saptanan 22q11delesyonu Di George sendromu (DGS) bölgesidir. DGS, paratiroid bezi ve timüsün konjenital yokluğu, tekrarlayan enfeksiyon ile giden bir sendromdur. 22. kromozomun delesyonu sıklığı 4000 canlı doğumda birdir. Kraniofasial ve gelişimsel anomaliler ile birlikte kardiyak anomalilerin önemli bir sebebidir (22). Tanı alan hastaların hayatlarının farklı evrelerinde değişik problemlerle karşılaşacağı bilindiğinden, hasta ve ailesine genetik bilgi verilmiştir.

Bu makalede geçen hastalardan vaka 3 için dış merkez mikrodizin normal raporunun olması hastayı NGS yöntemleri ile incelememiz gerektiği yönünde bir karar aldırttı. Mikrodizin yönteminde bu tür tanı atlamalarına prob yerleşim sıklığı, prob sıklığının azaldığı bölgelerde CNV’ler hakkında bilgi alamama, özellikle bakılmak istenen bölgede prob olup olmadığı ve analiz yapan uzmanın tecrübesi gibi durumlar sonucun çıkmamasına ya da gözden kaçmasına neden olabilmektedir. Ayrıca mikrodizin yönteminde dengeli translokasyonlar, halkasal kromozomlar, inversiyonlar tespit edilememektedir. Hastanın NGS CNV analizi sonrasında görülen Xq28 duplikasyonu mikrodizin analizi sonucunda teyit edildi. Xq28 duplikasyonunda davranışsal ve psikiyatrik sorunlar, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, öğrenme güçlüğü, otizm spektrum bozukluğu, kognitif bozukluk görülebilmektedir. Hastalarda belirgin yüz bulguları olmaktadır bunlar geniş alın yapısı, geniş burun köprüsü,

kalın alt dudak yapısıdır(23). Hastamız dismorfik bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde tanısı Xq28 duplikasyon sendromu tanısını almıştır.

Vaka 4 de saptanan delesyon az sayıda hastada saptanmış olması ve bulunan varyant için yeterli sayıda sağlıklı hasta verisi olmadığından klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirilmiştir. Ancak ilerleyen zamanlarda bulunan delesyonun benzer klinikte olan hastalarda saptanması bulunan varyantın hastalık yapıcı bir değişim olduğunu gösterebilir.

Farklı merkezlerde metabolik ve nörogelişimsel hastalık, iskelet displazisi ve göz hastalıkları grubunda yer alan hastaların hali hazırda dizilenmiş olan verileri kullanılarak tekrar değerlendirme yapıldığında tanı koyma oranlarının yaklaşık %10 - %15 oranında arttığı görülmüştür (1, 2, 3). Bu çalışmada 30 hasta tekrar değerlendirilmiş ve 3 hastada kliniği açıklayan değişiklik bulunmuş ve literatüre uygun olarak %10 tanı koyma oranını arttırdığı görülmüştür.

Bununla birlikte, genetik bozuklukların çoğu için ekzom dizilemenin SNV ve CNV tespitini bir arada yapabilmesi tanı oranını arttırmaktadır. Bir çalışma ile klinik ekzom tabanlı CNV taramasının genetik testte uygulanabilirliği ile CNV analizinin, şimdiye kadar genel olarak SNV'ye odaklanmış olan ekzom dizilemenin tanısallık verimini % 6'ya kadar (ortalama% 2) artırır. Bu artış doğrudan herhangi bir laboratuvar maliyeti olmadan elde edilir (16). Bulgularımızın gelecekteki araştırmalarda klinik olarak benzer başka hastalar içinde değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Baker SW, Murrell JR, Nesbitt AI, Pechter KB, Balciuniene J, Zhao X, et al. Automated Clinical Exome Reanalysis Reveals Novel Diagnoses. *J Mol Diagn.* 2019;21:38-48.
2. Liu Z, Zhu L, Roberts R, Tong W. Toward Clinical Implementation of Next-Generation Sequencing-Based Genetic Testing in Rare Diseases: Where Are We? *Trends Genet.* 2019;35:852-67.
3. Bruel AL, Nambot S, Quéré V, Vitobello A, Thevenon J, Assoum M, et al. Increased

diagnostic and new genes identification outcome using research reanalysis of singleton exome sequencing. *Eur J of Hum Genet.* 2019;27:1519-31.

4. Pang AW, MacDonald JR, Pinto D, Wei J, Rafiq MA, Conrad DF, et al. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol.* 2010;11:R52.
5. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43:838-46.
6. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet.* 2009; 52:161-9.
7. Lee C, ve Scherer S W, The Clinical Context of Copy Number Variation in The Human Genome. *Expert Rev Mol Med.* 2010; 9;12:e8.
8. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy JG, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res.* 2014;115:884-96.
9. Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127:1360-7.
10. de Ligt J, Boone PM, Pfundt R, Vissers LE, Richmond T, Geoghegan J, et al. Detection of clinically relevant copy number variants with whole-exome sequencing. *Human Mutat.* 2013; 34:1439-48.
11. Tan R, Wang Y, Kleinstein SE, Liu Y, Zhu X, Guo H, et al. An evaluation of copy number variation

- detection tools from whole-exome sequencing data. *Human Mutat.* 2014;35:899-907.
12. Krumm N, Sudmant PH, Ko A, O'Roak BJ, Malig M, Coe BP, et al. Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome Res.* 2012;22:1525-32.
 13. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16:172-82
 14. Nussbaum, R, McInnes R, Willard H. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, ed 8, Canada, Elsevier Inc, 2016: 1-105.
 15. Jähn JA, von Spiczak S, Muhle H, Obermeier T, Franke A, Mefford HC, et al. Iterative phenotyping of 15q11. 2, 15q13. 3 and 16p13. 11 microdeletion carriers in pediatric epilepsies. *Epilepsy Res.* 2014;108:109-16
 16. Pfundt R, Del Rosario M, Vissers LE, Kwint MP, Janssen IM, De Leeuw N, et al. Detection of clinically relevant copy-number variants by exome sequencing in a large cohort of genetic disorders. *Genet Med.* 2017;19(6):667-75.
 17. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A diagnosis for all rare genetic diseases: the horizon and the next frontiers. *Cell.* 2019; 177: 32-7.
 18. Deignan JL, Chung WK, Kearney HM, Monaghan KG, Rehder CW, Chao EC. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2019;21:1267-70.
 19. Retterer K, Scuffins J, Schmidt D, Lewis R, Pineda-Alvarez D, Stafford A, et al. Assessing copy number from exome sequencing and exome array CGH based on CNV spectrum in a large clinical cohort. *Genet Med.* 2015;17: 623-9.
 20. Gorman GS, Taylor RW. RRM2B-Related Mitochondrial Disease. 2014 Apr 17. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021. [Erişim tarihi: 25.08.2020]] Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK195854>
 21. Chen YF, Lin IH, Guo YR, Chiu WJ, Wu MS, Jia W, et al. Rrm2b deletion causes mitochondrial metabolic defects in renal tubules. *Sci Rep.* 2019;9: 1-12.
 22. Göktürk B, Reisli İ. DiGeorge Syndrome. *Asthma Allergy Immunol.* 2017;14:129-42.
 23. Ballout RA, El-Hattab AW, Schaaf CP, Cheung SW. Adam MP, Ardinger HH, et al. Xq28 duplication syndrome, Int22h1/Int22h2 mediated. 2016 Mar 10. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021. [Erişim tarihi: 25.08.2020]] Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK349624>