



## EDİTÖRE MEKTUP / LETTER TO THE EDITOR

### Tıbbi genetik uygulamalarında altın standart fenomiks: tüm ekzom analizi yapılan 3 nörojenetik hasta örneği

Phenomix as the gold standard in medical genetics applications: three neurogenetic patient samples with full exome analysis

Sevcan Tuğ Bozdoğan<sup>1,2</sup>, İbrahim Boğa<sup>1,2</sup>, Atıl Bişgin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Balcı Hastanesi ve Klinikleri, Adana, Turkey

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi AGENTEM (Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi) Adana, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2021;46(2):869-871*

Sayın Editör,

Tüm ekzom dizileme analizi (Whole-exome-sequencing-WES) genetik etiyojisinde heterojenite gösteren hastalıkların tanısında etkili bir yöntemdir<sup>1</sup>. Ancak, çok sık görülen ve klinik etkisi bilinmeyen varyantların analizi veya genotip-fenotip korelasyonunun kısıtlı olduğu olgularda ileri düzeyde klinik yorumlama gerektirmektedir. Ekzom sekanslamanın uygulanmaya ve varyant analizinin etkin yapılmaya başlanmasından sonra daha önceden moleküler tanı konamamış veya klinik tanı sonrasında yapılan hedef moleküler test sonuçları normal bulunmuş birçok hastaya tanı konabilmiştir<sup>2</sup>. Bu yazıda, genotipleme ve fenotiplemenin önemini vurgulamak amacıyla 3 olgu sunulmaktadır.

Hipotoni, gelişim geriliği ve ataksi nedeniyle başvuran 3 hastaya ilk planda yapılan genetik testler ile mutasyon saptanmaması sebebi ile WES çalışması planlanmıştır. Olgulardan alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu otomatize sistem (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen DNA örneklerinin kalite ve miktar ölçümleri Qubit™ Fluorometric Quantitation system (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tüm ekzom dizileme için iş akışında üretici firmanın belirttiği gibi fragmantasyon, ligasyon, zenginleştirme, hibridizasyon ve sekanslama

aşamaları uygulandı. Sekanslama işlemi Illumina Next-Seq (Illumina, California, ABD) yeni nesil dizileme sistemi ile gerçekleştirildi.

Sekans sonuçları kalite kontrol aşamalarından sonra CLC Genomic Workbench (Qiagen, Hildenberg, Almanya) biyoinformatik analiz aracı kullanılarak varyantlar analiz edildi. Elde edilen varyantların klinik değerlendirmeleri ve biyoinformatik analizler QCI-I (Qiagen, Hildenberg, Almanya) analiz aracı ile HGMD (Human Gene Mutation Database), ClinVar, NCBI (National Center for Biotechnology Information), VarSome (The Human Genomic Variant Search Engine), ExAC (The Exome Aggregation Consortium), 1000 Genome Frequency, ESP (Exome Sequencing Project), Ancestry, Ingenuity Knowledge Base, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) gibi birçok veri tabanı karşılaştırılarak gerçekleştirildi. Ayrıca in-siliko analizler CADD, MutationTaster, PolyPhen and DANN gibi birçok in-siliko analiz aracı kullanılarak yapılmıştır.

İlk olgumuz, 2 yaşında hipotonik infant olarak takip edilmekte olan kız hastaydı. Ailede öyküsünde anne ile babası arasında akrabalık vardı ve ailede indeks olgu dışında hasta yoktu. Çekik gözler, bülböz burun, glabellada hemanjiyom ve kalın dudaklar gibi minör dismorfik bulgular ile beraber motor gelişimde geriliği vardı. Hastanın bronkoskopisinde bronşlarda hipoplazi, batin ultrasonografisinde hafif pelvik kaliektazi ve beyin MR görüntülemelerinde serebellar

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Atıl Bişgin, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Adana, Turkey E-mail: abisgin@yahoo.com

Geliş tarihi/Received: 04.01.2021 Kabul tarihi/Accepted: 26.04.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 20.05.2021

atrofisi olduğu belirlenmişti. EMG sonucu konjenital müsküler distrofi ile uyumlu olan hastanın 1,5 yaşından sonar trakeostomisi açılmıştı ve ayrıca gastrotomi ile besleniyordu.

Normal olarak sonuçlanan bazı moleküler analizlerden sonra yapılan WES analizi ile *ACTA1* geninde çerçeve kaymasına neden olan bir mutasyon saptandı (*ACTA1*: p. (Leu112Profs\*16) homozigot). Bu genin mutasyonları; skapulohumeroperoneal miyopati, nemaline miyopati tip-3 veya konjenital kas lifi orantısızlığı ile giden miyopatiye neden olmaktadır (<https://omim.org/entry/102610>).

Skapulohumeroperoneal miyopati otozomal dominant kalıtılan ve nispeten daha hafif seyir gösteren bir miyopati idi. Bu nedenle hastanın mutasyonu homozigot olarak taşınması nedeniyle otozomal resesif olarak da kalıtılan ve daha ağır klinik ile giden nemalin miyopati tip-3 veya konjenital kas lifi orantısızlığı ile giden miyopati açısından klinik takibe alındı.

İkinci olgumuz ise progresif ataksisi olan 16 yaşında kız hastaydı. Anne – babasının arasında akrabalık vardı ve ailede başka hasta birey yoktu. Bir yaşına kadarki döneminde öyküsünde özellik olmayan hastanın çocukluk çağında başlayan progresif ataksisi. Son 2-3 yıldır dizartrik konuşmaya başlayan hastanın mental durumu da gerilemeye başlamıştı. Yapılan analizler sonucunda *PLA2G6* geninde yanlış anlamlı değişime neden olan homozigot mutasyon (p. Asn214Ser) saptandı. Söz konusu bu genin mutasyonu, infantil nöroaksonal distrofi-1 veya beyinde demir birikimi ile seyreden nörodejenerasyon tip 2B ile ilişkilendirilmişti (<https://omim.org/entry/603604>). Hastada her iki kliniğe de uyan bulgular olması ve ayırıcı tanının tam olarak yapılamaması nedeniyle hasta izleme alındı.

Üçüncü olgumuz, 3 yaşında hipotoni ve gelişme geriliği olan erkek hastaydı. Anne-baba arasında akrabalık vardı ve ailenin 3 çocuğundan tek hasta olan çocuğu idi. Başvuru sırasında yürüme ve konuşması yoktu, ayakta duramıyordu ancak emekleyebiliyordu. Yapılan muayenesinde motor gelişim geriliği, entellektüel yetersizlik ile makrosefalisi vardı. Ekzom analizi sonucunda *PIEZO2* geninde erken dur kodonuna yol açan homozigot bir mutasyon saptandı (p. Arg1611\*). Bu mutasyon, propriosepsiyon bozukluğu, distal artrogripoz tip-3 ve 5 veya Marden-Walker etyolojisinde yer almaktaydı (<https://omim.org/entry/613629>). Hastada eklem kontraktürleri olmaması ve klinik bulguların tam

olarak uymaması nedeniyle ayırıcı tanının yapılabilmesi amacı ile takibe alındı.

Son yıllarda aynı anda çok sayıda gen çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan yeni nesil dizileme yöntemlerinin gelişmesi ile tüm ekzom dizileme yöntemlerine ulaşma olasılığı da artmış ve genetik heterojenite gösteren veya klinik olarak örtüşen farklı hastalıkların tanısını koymak mümkün hale gelmiştir. Tüm ekzom analizi ile bireyin protein kodlayan DNA'sının %90'dan fazlası taranmakta ve ekzom başına düşen maliyet giderek azalmaktadır<sup>2,3</sup>. Hastalığa neden olan varyantların %80'den fazlası ekzonlarda veya ekzon-intron bağlantı bölgelerinde yer almaktadır<sup>4,5</sup>. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre tüm ekzom dizilemenin tanı oranı %16-68 arasında değişmektedir<sup>6,7</sup>. Nadir hastalıkların temelinde yatan genetik etyolojiyi belirlemek, koruyucu hekimlik açısından çok önemli olduğu gibi hastalığa özgü tedavilerin geliştirilmesi için de zemin hazırlayacaktır.

Ancak tanıda sağladığı tüm yararlarla rağmen ekzom analizinde de sık karşılaşılan zorluklar bulunmaktadır. OMIM istatistik verilerine göre günümüzde 6414 fenotipin moleküler temeli aydınlatılmış olmakla beraber ancak 4083 genin hastalığa veya kliniğe neden olduğu belirlenmiştir. Klinik fenotipe yol açan bu genlerin 1272 tanesi 2 ve daha fazla kliniğe yol açmaktadır

(<https://www.omim.org/statistics/geneMap>, updated May 3rd, 2019). Aynı genin birden fazla fenotipe yol açtığı göz önünde bulundurulduğunda genotip-fenotip korelasyonunun önemi görülmektedir.

Ekzom analizi ile her bireyde çok sayıda varyant bulunmaktadır. Bu varyantların hangisinin gerçek varyant olduğunu belirlemeye yönelik algoritmalar ve yazılımlar geliştirilmiş ve bu sayede yanlış mutasyonu arama oranı (mutasyonu yanlış arama hızı / false calling rate) oldukça düşürülmüştür. Ancak yine de bu konuda hala gelişmelere ihtiyaç vardır. Yine saptanan varyantların hangisinin bir kliniğe yol açacağı ya da yakınlık oluşturacağı çeşitli in-siliko analizler aracılığı ile öngörülmeye çalışılmaktadır. İn-siliko analiz araçları ile patojen olacağı öngörülen mutasyonun oluşturacağı klinik ile hastada saptanan klinik bulgular karşılaştırılmalı ve hastada bulunan bulguları açıklayacak mümkünse tek bir varyant belirlenmelidir. Bu varyantların belirlenmesinde klinik belirtinin yanı sıra kalıtım kalıbından da yarar elde edilebilir.

WES analizi için yüksek kaliteli DNA elde edilmesi, hedef bölgelerin verimli bir şekilde zenginleştirilmesi ve biyoinformatik analiz araçlarının kullanılması başta olmak üzere bütün çalışma basamaklarının belli bir kalitede ve standartta olması, sonuç elde edilmesi için mutlaka gereklidir. Ayrıca tüm ekzoma ait varyantlar elde edildikten sonra; ayrıntılı klinik fenotiplemenin elde edilen veriler ile birlikte değerlendirilmesi, genomik verinin in-silika modelleri veya hesaplama analizi ile öngörüldüğünden çok daha karmaşık olması nedeniyle, doğru sonuca ulaşmak için olmazsa olmaz zorunlu bir basamaktır.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: STB, AB; Veri toplama: STB, İB; Veri analizi ve yorumlama: STB, AB, İB; Yazı taslağı: STB; İçeriğin eleştirel incelenmesi: AB; Son onay ve sorumluluk: STB, İB, AB; Teknik ve malzeme desteği: STB, İB; Süpervizyon: STB, AB, İB; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editöryal değerlendirme.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Author Contributions:** Concept/Design : STB, AB; Data acquisition: STB, İB; Data analysis and interpretation: STB, AB, İB; Drafting manuscript: STB; Critical revision of manuscript: AB; Final approval and accountability: STB, İB, AB; Technical or material support: STB, İB; Supervision: STB, AB, İB; Securing funding (if available): n/a.

**Peer-review:** Editorial review.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

## KAYNAKLAR

1. Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, et al. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet.* 2012;49:353-61.
2. Shakiba M, Keramatipour M. Effect of whole exome sequencing in diagnosis of inborn errors of metabolism and neurogenetic disorders. *Iran J Child Neurol.* 2018;12:7-15.
3. Al-Nbaheen MS. Analysis of Down's syndrome with molecular techniques for future diagnoses. *Saudi J Biol Sci.* 2018;25:558-62.
4. Scriver CR. *The Metabolic Basis of Inherited Disease:* New York, McGraw Hill, 1995.
5. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> edition. New York, McGraw Hill, 2000.
6. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *New Engl J Med* 2012;367:1921-9.
7. Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ, Horvath GA, Salvarinova R, Ye XC et al. Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders. *New Engl J Med* 2016;374:2246-55.