



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

Sebebi Açıklanamayan İnfertilite ile İlişkili Genlerin Araştırılması

Proje No:TSA-2018-32135

Proje Türü: Normal araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Seher Başaran
İstanbul Tıp Fak., Tıbbi Genetik AD

Yardımcı Araştırmacılar

Prof. Dr. Birsen Karaman
Prof. Dr. Z. Oya Uyguner
Uz. Dr. Tuğba Kalaycı
Dr. Ezgi Gizem Berkay

TEŞEKKÜR: Bu çalışma İ.Ü. BAP Birimi tarafından TSA-2018-32135 no'lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ	10-21
2. TEKNİK BÖLÜM	21-26
3. SONUÇ	26-73
4. TARTIŞMA	74-101

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekiller

Sayfa

Şekil 1: Olgu 1'e ait aile ağacı	27
Şekil 2: Olgu 2'ye ait aile ağacı	29
Şekil 2: Olgu 3'e ait aile ağacı	31
Şekil 3: Olgu 4'e ait aile ağacı	33
Şekil 4: Olgu 5'e ait aile ağacı	35
Şekil 5: Olgu 6'ya ait aile ağacı	36
Şekil 7: Olgu 7'ya ait aile ağacı	39
Şekil 8: Olgu 8'e ait aile ağacı	40
Şekil 9: Olgu 9'e ait aile ağacı	42
Şekil 60: Olgu 10'a ait aile ağacı	44
Şekil 71: Olgu 11'e ait aile ağacı	46
Şekil 82: Olgu 12'e ait aile ağacı	47
Şekil 93: Olgu 13'e ait aile ağacı	50
Şekil 104: Olgu 14'e ait aile ağacı	52
Şekil 115: Olgu 15'e ait aile ağacı	53
Şekil 126: Olgu 16'ya ait aile ağacı	56
Şekil 137: Olgu 17'ye ait aile ağacı	58
Şekil 148: Olgu 18'e ait aile ağacı	60
Şekil 159: Olgu 19'a ait aile ağacı	62
Şekil 20: Olgu 20'ye ait aile ağacı	64
Şekil 21: Olgu 21'e ait aile ağacı	65
Şekil 22: Olgu 22'ye ait aile ağacı	67
Şekil 23: Olgu 23'e ait aile ağacı	69
Şekil 24: Olgu 24'e ait aile ağacı	70
Şekil 25: Olgu 25'e ait aile ağacı	72

Tablolar

Tablo 1: Sanger dizileme tekniği kullanarak TGK etiyolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve saptanan varyantlar	12-13
---	-------

Tablo 2: Farklı moleküler teknikler kullanarak TGK etiyolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve polimorfizmleri	14
--	----

Tablo 3: YND teknikleri ile saptanan TGK etiyolojisi ile ilişkili olabilecek aday genler	16-18
--	-------

Tablo 4: YND tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda saptanan erkek faktörü ile ilişkili genler ve fenotipik bulguları (Patel (213)'den değiştirilerek)	18-19
---	-------

Tablo 5: YND tekniği ile saptanan POY, ovaryan disgenezi, OOMD ve PKOS ile ilişkilendirilmiş genler ve fenotipik bulguları	19-21
--	-------

Tablo 6a: Olgu 1'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	27
--	----

Tablo 6b: Olgu 1'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları	28
--	----

Tablo 6c: Olgu 1 TED verisinin biyoinformatik analizinde tespit edilen varyantlar	28
---	----

Tablo 7a: Olgu 2'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları	29
---	----

Tablo 7b: Olgu 2'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları	30
---	----

Tablo 7c: Olgu 2'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	30
---	----

Tablo 8a: Olgu 3'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	31
--	----

Tablo 1b: Olgu 3'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	31
---	----

Tablo 8c: Olgu 3 TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	32
--	----

Tablo 9a: Olgu 4'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	33
--	----

Tablo 9b: Olgu 4'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	34
Tablo 9c:Olgu 4 TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	34
Tablo 10a: Olgu 5'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	35
Tablo 10b: Olgu 5'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	35
Tablo 10c:Olgu 5'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	36
Tablo 11a: Olgu 6'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları	37
Tablo 11c: Olgu 6'ya ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	37
Tablo 11c:Olgu 6'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	37
Tablo 12a: Olgu 7'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları	39
Tablo 12b:Olgu 7 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	39
Tablo 12c:Olgu 7'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	40
Tablo 13a: Olgu 8'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	41
Tablo 13b: Olgu 8'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	41
Tablo 13c:Olgu 8'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	42
Tablo 14a: Olgu 9'a ait klinik ve laboratuvar bulguları	42
Tablo 14b: Olgu 9'a ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	43
Tablo 14c:Olgu 9'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	43
Tablo 15a: Olgu 10'a ait klinik ve laboratuvar bulguları	44
Tablo 15b:Olgu 10 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	44
Tablo 15c:Olgu 10'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	45
Tablo 16a: Olgu 11'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	46
Tablo 16b:Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	46
Tablo 16c:Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	47
Tablo 17a: Olgu 12'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	48
Tablo 17b:Olgu 12 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	48
Tablo 17c:Olgu 12'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	49
Tablo 18a: Olgu 13'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	50
Tablo 18b: Olgu 13 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	51
Tablo 18c:Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	51
Tablo 19a: Olgu 14'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	52
Tablo19b:Olgu 14 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	53
Tablo 19c:Olgu 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	53
Tablo 20a: Olgu 15'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	54
Tablo 20b:Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	54
Tablo 20c:Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	55
Tablo 21a: Olgu 16'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları	56
Tablo 21b:Olgu 16 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	57
Tablo 21c:Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	57
Tablo 22a: Olgu 17'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	58

Tablo 22b:Olgu 17 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	59
Tablo 22c:Olgu 17'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	59
Tablo 23a: Olgu 18'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	60
Tablo 23b:Olgu 18 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	61
Tablo 23c:Olgu 18'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	61
Tablo 24a: Olgu 19'a ait klinik ve laboratuvar bulguları	62
Tablo 24b:Olgu 19 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	62
Tablo 24c:Olgu 19'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	63
Tablo 25a: Olgu 20'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	64
Tablo 25b:Olgu 20 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	64
Tablo 25c:Olgu 20'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	65
Tablo 26a: Olgu 21'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	65
Tablo 26b:Olgu 21 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	65
Tablo 26c:Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	66
Tablo 27a: Olgu 22'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	67
Tablo 27b:Olgu 22 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	68
Tablo 27c:Olgu 22'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	68
Tablo 28a: Olgu 23'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	69
Tablo 28b: Olgu 23 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	70
Tablo 28c:Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	70
Tablo 29a: Olgu 24'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	71
Tablo 29b:Olgu 24 TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	71
Tablo 29c:Olgu 24'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	71
Tablo 30a: Olgu 25'e ait klinik ve laboratuvar bulguları	72
Tablo 30b:Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları	73
Tablo 30c:Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar	73
Tablo 31: Çalışma kapsamında saptanan implantasyon ile ilişkili genler	79-80
Tablo 32: Çalışmada saptanmış POY ilişkili genler	101

Raporda yer alan tablolar ve şekiller ayrı listeler halinde sayfa numaraları belirtilerek listelenmelidir.

KISALTMALAR LİSTESİ:

Yazım sırasında raporda kullanılan dünyaca kabul görmüş kısaltmalar ve araştırmacıların kendilerinin oluşturduğu kısaltmalar bu bölümde belirtilmeli ve metin içinde de ilk kullanım yerinde açık şekilleri ile yer almalıdır.

World Health Organization: WHO
American College of Medical Genetics: ACMG
Tekrarlayan gebelik kaybı: TGK
Tekrarlayan implantasyon kusuru: TİK
Yeni nesil dizileme: YND
Tüm genom dizileme: TGD
Tüm ekzom dizileme: TED
Transposable elementler: TE
3' anlatımı olmayan bölgeler: UTR (untranslated region)
MikroRNA: miRNA
Complementary DNA: cDNA
mitokondriyal DNA: mtDNA
Uzun terminal tekrarlar: LTR (long terminal repeats)
Araya giren uzun diziler: LINE
Kopya sayısı değişiklikleri: CNV (copy number variation)
Otozomal dominant: OD
Otozomal resesif: OR
Variant of unknown significance: VUS

1. PROJE ÖZET BİLGİLERİ: Türkçe Özet ve İngilizce “Abstract” şeklinde hazırlanmalıdır. Projedeki faaliyetlerin kısa özetini içermeli ve 500 kelimeyi geçmemelidir.

ÖZET Günümüzde çiftlerin yaklaşık %20’si infertilite problemi ile karşı karşıyadır ve bu sorunun dünyada 50-80 milyon çifti ilgilendirdiği tahmin edilmektedir. İnfertilite, primer ve sekonder olmak üzere 2 grupta değerlendirilir. WHO’ya (World Health Organization) göre primer infertilite “bir yıl düzenli ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması” veya “canlı doğum öyküsü olmamasıdır” (Zegers-Hochschild et al., 2009; Mascarenhas et al., 2012). Sekonder infertilite ise canlı doğum sonrası en az bir yıl gebelik oluşmamasıdır. İki veya daha fazla 20. gebelik haftasından önce fetal kayıp öyküsünün varlığında “tekrarlayan gebelik kaybı” (TGK) terimi kullanılır. İnfertilite sorunun aşılmasında bugün için tek terapi yolu olan yardımcı üreme teknikleri ile yeni bir terim daha oluşmuştur; “tekrarlayan implantasyon kusuru (TİK)” en az 2 kez başarısız yardımcı üreme tekniği uygulaması bulunan olgular için kullanılır (Coughlan, 2014).

Gebelik oluşumunda çok sayıda fizyolojik yolak etkindir ve bu yolaklarda genetik ve nongenetik faktörler (endokrin, anatomik, immunolojik ve enfeksiyon, annenin kronik hastalıkları, teratojenik ajanlar gibi dış faktörler) önemli roller taşımaktadır.

İnfertilitenin etiyojisinde rol alan en önemli ve bilinen genetik faktörler, kromozom anomalileri ve tek gen hastalıklarıdır. Karyotip analizi kromozom anomalilerinin araştırılmasında rutin laboratuvar incelemelerindendir. Halbuki infertilite ilişkili tek gen hastalıklarının *CFTR*, *MTHFR* mutasyonları gibi çok azı bilinmekte ve ancak klinik bulguların yönlendirmesi ile incelenebilmektedir. Oysa infertilite ilişkili yüzlerce gen olduğu düşünülmektedir. Fakat, uygulanmakta olan moleküler testlerin (Sanger dizileme) sınırlı kapasitesi nedeniyle araştırmalar yetersiz kalmaktaydı. Son 10 yılda uygulamaya giren yeni teknoloji “yeni nesil dizileme (YND)” ise bu limitleri kaldırdı ve tüm genomun (TGD), tüm ekzom (TED) veya hedefli çoklu genlerin tek bir seferde dizilenmesi mümkün oldu ve bu teknoloji tıbbi genetikte yepyeni bir dönem başlattı ve yeni genlerin keşfedilmesine olanak sağladı. Özellikle tek gen hastalıklarının genetik etiyojisinin aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayan bu tekniğin infertilitenin açıklanmasında bugüne kadar, TED kullanımı ile çoğunlukla erkek infertilitesi ile ilişkili az sayıda, daha az sayıda ise kadın infertilitesi ile ilişkili, TGK ilişkili ile sadece 2 seri çalışması yayınlanmıştır.

Bu çalışmada ile Türk popülasyonunda infertilite ilişkili genlerin TED tekniği ile incelenmesi amaçlandı. Hasta seçim kriterleri ise olguların sitogenetik, immunolojik, anatomik ve biokimyasal testlerinin normal sonuçlanmış olması idi.

Bu çalışmada, infertilite olarak değerlendirilen ve araştırma için onam veren açıklanamayan 25 kadın TED tekniği ile incelendi ve 22 olguda 30 gende 34 varyant tespit edildi. Klinik ile ilişkili olabileceği düşünülen bazı varyantlar için segregasyon analizleri yapıldı. Varyantların patojenite değerlendirmesi tahmin veritabanları aracılığıyla yapıldı. Varyant saptanan genler, plasenta gelişiminde, implantasyonda, koagülasyonda, metabolizmada, immunitede, embriolojik gelişimde, hücre siklusunda, DNA tamir mekanizmasında, oogenezde ve oosit olgunlaşmasında etkin genlerdi.

Dokuz kadında 11 gende otozomal resesif kalıtılan hastalık ilişkili heterozigot 12 variant (VUS: n = 3, olası patojenik: n = 4, patojenik: n = 5) saptandı. Bu genlerden 6’sı siliyopati, 3’ü metabolik hastalık ve 2’si embriogenez ilişkiliydi.

Bizim bilgimiz dahilinde, bu seri açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı veya tekrarlayan implantasyon hatası olan kadınlarda yapılan Türkiye’den ilk TED çalışması ve dünyada da ilk çalışmalardandır. Bulgularımıza göre, tüm ekzom çalışması infertilite ilişkili yeni genlerin tanımlanmasında etkin bir yöntemdir. Tekniğin limitasyonu uzun dizi sekanslarına ait anomalileri yakalayamaması nedeniyle submikroskobik delesyon ve duplikasyonların gösterilememesidir. Bu çalışmada saptanan yeni varyantların tümünün segregasyon analizleri, gereken durumlarda fonksiyon analizlerinin tamamlanması gelecek projeler kapsamında

tamamlanması planlanmaktadır.

ABSTRACT Today, one out of every five couples is faced with infertility problem, and it is suggested that 50 to 80 million couples have this problem worldwide. Infertility is subdivided into 2 groups; primary and secondary infertility. According to WHO (World Health Organization), primary infertility is defined as “the failure of pregnancy at least for one year”, and also “who has spontaneous miscarriages or still-born, without having a live birth” (Zegers-Hochschild et al., 2009; Mascarenhas et al., 2012). The term secondary infertility is used for when a new pregnancy cannot occur after one or more live-born at least for twelve months. Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined as two or three miscarriages in first trimester or before the 20th gestational week. To overcome the infertility problem, assisted reproductive techniques (ART) are developed and it is the empirical therapy today. Recurrent implantation failure (RIF) is used for cases with ≥ 2 failure at implantation stage after in vitro fertilisation (IVF), intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) or transferring blastocysts attempts (Coughlan, 2014).

Pregnancy concerns numerous physiological pathways, where genetic factors and multifactorial conditions such as endocrinological, chromosomal, anatomical, immunological, maternal chronic diseases and environmental factors such as infections, teratogenic agents play important roles in both RPL and RIF patients.

The underlying genetic etiological factors in RPL and RIF are chromosomal anomalies and monogenic disorders. Karyotyping to rule out the chromosomal abnormalities is investigated as a part of routine laboratory investigation. However, only few of monogenic disorders are known related to infertility like as *CFTR*, *MTHFR* and mutations can be search in the routine diagnostic laboratories. However, it is clear that many genes are involved in the infertility, but these genes could not be investigated due to the limitation of the routine molecular techniques. The new technology “next generation sequencing (NGS)” allows to sequence the whole genome (WGS), whole exome (WES) or hundreds of targeted genes in one run, which opened a new era in the medical genetics and these new opportunities make it possible to discover new gene/s related to distinct phenotype including infertility. To the best of our knowledge, only two serial studies using WES technique in RPL and RIF patients with normal karyotypes have been published and new causative genes were described in infertility.

Here, we aimed to search the infertility related genes in a Turkish cohort. Patient selection criteria were having normal results in cytogenetic, immunological, anatomical and biochemical testing.

In this study, 25 Turkish women diagnosed with unexplained RPL (URPL) and/or RIF were investigated by WES technique, which revealed 34 variants in 33 genes in 22 women. Segregation studies for some variants, which might be associated with the phenotype were carried out who agreed to take part in this research study.

These genes were associated with several pathways: placental development, implantation, coagulation, metabolism, immunity, embryological development, cell cycle, DNA repair systems, oogenesis and oocyte maturation.

Twelve heterozygous variants in 11 genes associated with autosomal recessive inherited rare diseases/syndromes were determined in 9 women (VUS: $n = 3$, likely pathogenic: $n = 4$, pathogenic: $n = 5$). These genes were related with ciliopathies ($n = 6$), metabolic disorders ($n = 3$) and active during embryogenesis ($n = 2$)

To the best of our knowledge, this is the first series from Turkey and one of the pioneers in the world, investigating maternal genetic factors in unexplained RPL and RIF via WES. Due to our findings, whole exome sequencing was found quite successful in determining new candidate

genes. The limitations of the technique were the inability to examine long sequences and repeats, not detecting sub microscopic deletions and duplications. Some of the novel variants detected in this study should be further investigated by segregation analysis and/or by functional studies, which could be planned in future projects.

2. LİTERATÜRDEKİ GELİŞMELER: Proje konusunda proje teklifi sırasında kullanılmış ve kabul edildikten sonraki dönem içinde dünya literatüründe gerçekleşen yenilikler ve çıkmış olan makaleler konusunda bilgi verilmeli, eğilimler ve proje konusu ile ilgili gelişmeler bu bölümde irdelenmelidir.

Bu alanda proje süresince yayınlanan tek bir makale bulunmaktadır. Bu makale, projemizde kullanılan YND tekniği için hazırlanmış panel çalışması ve sonuçlarını kapsamaktadır (Lorenzi D, First custom next-generation sequencing infertility panel in Latin America: design and first results JBRA Assisted Reproduction 2020;24(2):104-114).

2018 yılında yayınlanan bir makalede, TGK olgularının yaklaşık yarısında ‘Jenga Hipotezi’ olarak adlandırılan bir yaklaşımın yıllardır yürütüldüğü, bilinen klinik parametreler ve tedavi yöntemleri takip edildiğinde herhangi bir sonuç elde edilemediği belirtilmiştir. Bu hipoteze göre; klasik yaklaşımda erken gebelik dönemi Jenga oyunundaki gibi dengesiz bir yapıdır ve maternal sağlığın etkilemediği varsayımına dayanarak bilinen faktörler dışlanmaktadır. Fakat bu yaklaşımın, TGK’nın Hill Nedensellik Kriterleri’ni (olabilirlik, geçicilik, doz-davranış ilişkisi, etki, özgünlük, tutarlılık, uyumluluk) karşılamadığı ve bu alanda yeni bir bakış açısına ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Alternatif bir yaklaşım olarak da implantasyon kontrol noktası hipotezi öne sürülmüştür (159). Bu hipoteze göre, gebeliklerin erken haftalarında üç önemli kontrol noktası olduğu ve bu kontrol noktalarında bir sorun yaşandığında ya da kontrol noktasını geçemeyen embriyolar varlığında gebelik kayıplarının gerçekleştiği belirtilmiştir.

İlk kontrol noktası desidual biyoalgılamadır. Desidualizasyon ile implantasyon aşamasında konseptus hücrelerce çevrelenir, trofoblast invazyonu ve endometriyal dokunun yarı geçirgen bir hale gelmesi sağlanır (160). Bu aşamada, desidual hücrelerin biyoalgılayıcı olarak görev yaptığı (161) ve gebeliğin devamı için gerekli faktörlerin üretimini seçici olarak azaltarak düşük kaliteli ya da anöploid embriyoların implantasyonunu engellediği belirtilmektedir (162).

İkinci kontrol noktası embriyonik uyum sinyalidir. Erken gebelik haftalarında korpus luteumdan, daha sonra sitotrofoblast ve desidual hücrelerden üretilen β -HCG, gebeliğin devamı için önemlidir ve üretiminin bir kontrol noktası oluşturduğu düşünülmektedir (159).

Üçüncü kontrol noktası desidual stres testidir. Bu aşamada desidual hücrelerin seçici olarak stres ile ilişkili yolları baskıladığı, hücrel stres seviyesi düştükçe implantasyon ve gebeliğin devamının sorunsuz devam ettiği gösterilmiştir. Hücrel stresin tamponlanabilir kapasitenin üzerine çıkması durumunda ise fetal-maternal ara yüzey hızlıca yıkıma programlanır ve bu da gebeliğin düşükle sonlanmasına yol açar (159).

Yardımcı üreme tekniklerinin her geçen gün daha sıklıkla kullanılmasına, mümkün olduğu kadar iyi kalitede embriyoların transfer edilmesine rağmen gebeliklerin gerçekleşme, devam etme ve doğumla sonlanma oranında artış aynı oranda olmamaktadır. Bu durum, gebelik oluşumunda temel basamaklardan biri olan implantasyon sürecindeki bozukluk ya da hataların gebelik kaybına yol açabileceği ihtimalini desteklemektedir. Endometriyal reseptivitenin önemi daha fazla anlaşılmakta, başarısız YÜT denemelerinin altında yatan ana nedenlerden biri olarak görülmekte ve bu alandaki çalışmalar giderek artmaktadır (160-162).

≥2 embriyo transferi sonrasında implantasyonun gerçekleşmemesi, ‘tekrarlayan implantasyon kusuru’ (TİK/TİD) olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda gelişmiş ülkelerde her bir transferde (transfer başı ortalama 2 embriyo) gebelik olasılığının %30-35 civarında olduğu bildirilmektedir (163). Tekrarlayan implantasyon kusurlarında en önemli problemin, embriyo kalitesi ile ilişkili olduğu ve kaotik mozaik embriyoların varlığının da katkısının bulunduğu gösterilmiştir (164). Ayrıca embriyolarda yapılan kromozom analizleri ve metabolik çalışmalarda anöploid blastosist, artmış metabolik hız (gürültülü embriyo); COX2, MUC-1, LIF, IL-6, PLGF ve integrinlerde azalma; SGK-1, IL-1 β , IL-15, IL-18 ve TNF- α da artma saptanmıştır.

Kök hücre çalışmalarında yeni yeni gündeme gelen ve oldukça umut vadeden bir grup da infertilite çalışmalarıdır. Endometriumda somatik kök hücrelerin varlığı 1970-80’lerde ortaya atılmıştır (165-167). 2004 yılında Cho ve arkadaşları insan endometriumundan CD117 ve CD34 yüzey belirteçlerine sahip hücreleri izole ettiler. Bu hücrelerin bazal tabakanın stromal bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir (168). CD9, CD44 ve CD90 yüzey belirteçlerinin fibroblast; CD34, CD133 ve VEGFR2 belirteçlerinin ise endotelial öncü hücrelere ait olduğu bilinmektedir (169). Kültür ortamındaki epitelyal hücrelerin %0,22’sinin ve stromal hücrelerin %1,25’inin yüksek proliferasyon ve kendini yenileme özelliği olduğu gösterilerek döngülerde atılan dokuların yerini bu hücrelerin doldurduğu ileri sürülmüştür (170). Yapılan bir çalışmada kemik iliğinden alınan kök hücreler insan endometriumuna eklenerek bu hücrelerin endometriumun epitelyal ve stromal hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (171). Asherman sendromu tedavisinde de kök hücre denemeleri yapılmaktadır. 2011 yılında yapılan bir çalışmada, Asherman sendromlu bir olgudan alınan otolog kemik iliği kök hücreleri endometriumuna transfer edilmiş, hormon replasmanı ile birlikte endometrial kavite kalınlığının implantasyona uygun hale geldiği gözlenmiş ve IVF uygulaması sonrası embriyo transfer edilerek implantasyonun tamamlandığı görülmüştür (172). Sebebi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında yapılan çalışmalarda endometrial stromal hücrelerin yetersiz desidualizasyonu gösterilmiştir (173). Bunun da kök hücrelerin (plasental veya endometrial) yetersiz çalışması ya da kusuru ile açıklanarak gebelik kayıpları ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (63).

Gen ekspresyonunun ilk aşaması olan transkripsiyon ile mesajcı RNA (mRNA), mRNA’nın translasyonu ile de aminoasit dizileri ve proteinler oluşur. İfade edilen gen, protein kodlamayan bir RNA da oluşturabilir, bu RNA’lardan biri, genin ifadesini transkripsiyonal ve post-transkripsiyonal düzenlenmesinde rol oynayan mikroRNA’dır (miRNA).

Yaklaşık 20 yıl önce keşfedilen miRNA’lar, endojen, 18-24 nükleotidlik, tek zincirli RNA molekülleridir. Bu moleküller mRNA’ların 3’ anlatımı olmayan bölgelerine (UTR) bağlanarak translasyonun durdurulmasını veya proteinin degradasyonunu sağlar. Bu mekanizmanın memeli genlerinin ~%30-60’ını kontrol ettiği düşünülmektedir (174, 175). Bugüne kadar 2.000’den fazla miRNA tanımlanmış olmasına rağmen, onbinlercesi olduğu tahmin edilmektedir (176).

Desidualizasyon ve implantasyon aşamalarında post-transkripsiyonal düzenlenmenin miRNA’lar ile kontrol edilebileceği öngörüsü ile 2009 yılında Qian ve arkadaşları tarafından mikarray yöntemi ile yürütülen çalışmada implantasyonla ilişkili olabilecek, farklı ekspresyon özelliklerine sahip 49 miRNA tespit edilmiştir (177). Bu miRNA’ların transkripsiyonal faktörler, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks enzimleri ve aktin filamanlarının düzenlenmesinde etkin interlökinleri hedef aldıkları belirlenmiştir. Bazı miRNA’lardaki polimorfizmlerin, TGK sorunu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (178, 179).

Hücrelerin enerji kaynağı olan mitokondri, kendine ait DNA’ya sahip olmasıyla diğer organellerden farklılık gösterir. Solunum zinciri enzim kompleksi 46 farklı alt birim içermekte olup 7 tanesinin anlatımı mitokondriyal DNA (mtDNA) genleri tarafından (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) yapılmaktadır (183). Gebeliğin oluşumu, implantasyon, plasenta ve

embriyonun gelişimi yüksek düzeylerde enerji gerektirdiğinden, yeterli enerjinin sağlanamamasının embriyo gelişimini etkileyerek gebelik kaybına yol açabileceğine dair ilk hipotez Jansen ve de Boer tarafından 1998 yılında ortaya atılmıştır (184). Ortaya atılan hipotezlerden biri de, bazı maternal mtDNA varyantlarının enerji metabolizmasını bozarak TKG'ya yol açabileceğidir. Bu konuda oldukça az çalışma olmakla birlikte 2017 yılında 73 TKG öykülü kadın ve 100 kontrol ile yapılan bir çalışmada mtDNA kompleks I genleri dizilenmiş; ND1'de T4216C, ND2'de A5153G, ND3'te C10142T, ND4'te C12063T, ND5'te A12662G, ND6'da G14179A ve C14623T varyantları tespit edilmiştir (185).

Embriyodaki fonksiyonel genlerin bazıları, maternal veya paternal olarak kalıtıldığı ebeveyne göre genomik baskılanmaya (imprinting) uğrar. Maternal genlerin baskılanması, plasental fonksiyonların sağlanması ve plasenta büyümesi lehine, paternal genlerin baskılanması ise fetusun büyümesi ve hayatta kalması üzerine odaklanır. Ayrıca, embriyolar cinsiyetlerine göre de oldukça farklı özellikler taşırlar. Erkekler Y kromozomuna sahip iken, dişilerde iki X kromozomu vardır ve X inaktivasyonu gerçekleşene kadar (implantasyon sonrası, geç blastosist aşaması) çift doz gen ekspresyonu gerçekleşir (186). Rastgele olmayan X inaktivasyonu ya da inaktivasyonun gecikmeleri, paternal X kromozomunun daha uzun aktif kalmasına yol açarak maternal endometriyumun embriyoyu 'yabancı' olarak algılama ihtimalini arttırmaktadır. Bu mekanizmanın da TKG etiolojisinde yer alabileceği düşünülmektedir (187). X inaktivasyonu sonucunda paternal kalıtılan X'ler aktif kalabilir; bu durum Y kromozomu varlığını ve erkek fetusların neden maternal endometriyum tarafından yabancı olarak algılanmadığını sorusunu akla getirir de, Y kromozomuna (57 Mb) göre daha büyük olan X kromozomunun (156 Mb) (dişideki paternal X), anne ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda 'yabancı' genomik bölge taşıdığı ileri sürülmüştür (188). Ayrıca çalışmalar, erkek embriyoların diş embriyolara göre daha hızlı geliştiğini, yavaş büyüyen dişilerin endometriyal reseptivite penceresini kaçırmaya daha yatkın olduğunu göstermiştir. İmplantasyon sonrasında ise, diş embriyoların metabolik olarak erkek embriyolara göre daha aktif olduğu, X kromozomu üzerinde yer alan G6PD1 geni ile ilişkili pentoz-fosfat yolunu kullanmaya daha meyilli oldukları gösterilmiştir. Memeli embriyolarında 'aktif' embriyolara göre 'sessiz' olanların yaşayabilirliğinin daha yüksek olduğu, bu artmış metabolik aktivitelerin de artmış DNA hasarı tamir yolları ve oksidatif metabolizma ile ilişkili olabileceği söylenmiştir (189). Farklı mekanizmalardan yola çıkarak diş embriyolar ile oluşan gebeliklerin düşükle sonlanma ihtimalinin daha yüksek olduğu, TKG etiolojisinde embriyonun diş cinsiyeti taşımasının yer alabileceği hipotezi öne sürülmüştür (188).

İnsan genomunun üçte ikisinden fazlasının tekrarlayan DNA dizilerinden oluştuğu, çoğunluğunu da transpozonların (transposable elementler, TE) oluşturduğu bilinmektedir (190). Bugüne kadar tanımlanmış iki sınıf TE bulunmaktadır; Sınıf I TE, RNA üzerinden ters transkripsiyon aktivitesi göstererek 'kopyala-yapıştır' mekanizması ile kendi cDNA'sının kopyasını genomun içerisine yerleştirir, LTR (uzun terminal tekrarlar) ve non-LTR olarak iki ana gruba ayrılır. Sınıf II TE ise DNA transpozonlarıdır, 'kes-yapıştır' mekanizmasını kullanarak replike olurlar ve insan genomu içerisinde aktif olan Sınıf II TE bulunmamaktadır.

LTR'ler, endojen retroviruslardır ve insan genomunun yaklaşık %8'ini oluştururlar. LINE'ler (araya giren uzun diziler; LINE-1, LINE-2 ve LINE-3) ve SINE'ler (araya giren kısa diziler; Alu, MIR ve MIR3) ise non-LTR grubundadır. LINE-1 (L1) tam boyda olduğunda aktiftir (6,1 kb, ~600.000 kopya). RNA bağlayıcı domain, endonükleaz ve ters transkriptaz enzimlerini kodlayan genleri içerir, bu genlerin aktiviteleri çok zayıftır, birçoğu güdük dizidir. Genomda AT nükleotitlerinden zengin dizilere eklenir. İnsan genomunda bu bölgelerde aktif gen sayısı daha az olduğundan mutasyon yükleri azdır. Çalışmalar, yenidoğanların yaklaşık %5'inde yeni bir retrotranspozon insersiyonu olduğunu göstermiş, 125 kalıtsal hastalıktan non-LTR aktivitelerinin sorumlu olduğu (191, 192) ve her 62 doğumda bir yeni bir L1 insersiyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir (193).

Embriyonik dokular ile yürütülen çalışmalarda, insan plasentasının L1 bölgelerinde hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon saptanmış, üçüncü trimester plasentasında metilasyon

oranın birinci trimestere göre azalmış olduğu gösterilmiştir (194). Mol gebelik plasentalarında L1'lerin normal plasentalara göre hipermetile olduğu, ancak diğer tekrar bölgeleri açısından mol gebelik ve normal gebelik plasentaları arasında fark olmadığı saptanmıştır (195). Öploid yapıdaki abortus materyalleri ile yapılan incelemelerde ise L1 bölgelerinin hipometile olduğu bildirilmiştir (196). L1 retrotranspozon hipotezinde, yeni bir L1 insersiyonun letal etkili bir gene eklenmesinin genin yapısını bozarak gebelik kaybına yol açabileceği öne sürülmektedir (196). Erken embriyolojik dönemde gelişimsel genlerde olası bir değişiklik veya retrotranspozon inhibe edici faktörlerin kaybı L1 aktivitesinin artmasına sebep olabilir. Bu aktivitelerin yeni kırılma bölgesi oluşumuna, poliadenilasyona, promotör ve bağlanma bölgelerinin değişmesine, gen anlatımının etkilenmesine, ayrıca gen içi delesyon veya duplikasyonlara neden olabileceği bilinmektedir (197, 198). Ayrıca L1 aktivitelerinin duplikasyona yol açmasıyla gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği düşünülen kopya sayısı değişikliklerinde (CNV) artış görülebilir (199, 200). Bu nedenle TGK etiolojisinde altta yatan nedenlerden biri de L1 aktivitesi olabileceğinden bu hipotezin araştırılması önerilmektedir (196).

Tablo 1: Sanger dizileme tekniği kullanarak TGK etiyojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve saptanan varyantlar

<i>ALPP</i>	c.265A>T (rs13026692)
<i>AMN</i>	c.829A>G (rs146499374) c.1339_1344dupGCCGGG
<i>BAX</i>	c.-179A>G (rs751678403) c.26G>A (rs74422693)
<i>C4BPA</i>	c.359G>A (rs867500835) c.671T>C (rs116795518) c.1268G>A (rs116700161)
<i>C4BPB</i>	c.694A>G (rs141922788)
<i>CD46</i>	c.971C>T (rs41317833) c.638A>T
<i>EPCR</i>	c.655A>G (rs867186)
<i>FGB</i>	c.-455G>A
<i>FOXD1</i>	c.1067C>G (rs917127030) c.1092C>G (rs992724147) c.1285_1286insGCCGCG (rs370819776)
<i>HLA-G</i>	c.-1179G>A (rs1233335) c.*29-126G>A (rs915670) c.-788C>A (rs114252012)
<i>PAI-1</i>	c.-816A>G (rs1799889 4G/5G polimorfizmi)
<i>TAFI</i>	c.505G>A (rs3742264) c.*310T>A (rs1087)
<i>THBD</i>	c.1418C>T (rs1042579) c.457T>G
<i>TIMP-3</i>	c.-1604C>T (5749511) c.-914A>G (rs2234921)
<i>TIMP-4</i>	c.*387G>A (rs17035945)

Tablo 2: Farklı moleküler teknikler kullanarak TKG etiyolojisi ile ilişkilendirilmeye çalışılmış genler ve polimorfizmleri

<i>ACE</i>	I/D (rs1799752)
<i>CTLA4</i>	+49A>G (rs232775)
<i>DICER</i>	rs3742330
<i>DROSHA</i>	rs10719
<i>eNOS</i>	894G>T (rs1799983)
<i>F13A1</i>	103G>T (rs5985) 614A>T (rs3024477) 1694C>T (rs5982)
<i>F2</i>	20210G>A (rs1799963)
<i>F5</i>	rs6025
<i>FOXP3</i>	-924A>G (rs2232365)
<i>FOXP4</i>	-3279C>A (rs3761548)
<i>FOXP5</i>	delATT (rs5902434)
<i>FOXP6</i>	rs2294021
<i>IL-1β</i>	-511T>C (rs16944)
<i>IL-10</i>	-819C>T (rs1800871) 2195A>G (rs1518111)
<i>IL-17</i>	-197G>A (rs2275913)
<i>IL-18</i>	137G>C (rs187238)
<i>IL-6</i>	-634C>G (rs1800796)
<i>mir125a</i>	rs12976445 rs41275794
<i>mir27a</i>	rs895819
<i>mir423</i>	rs6505162
<i>mir449b</i>	rs10061133
<i>MMP2</i>	-735C>T (rs2285053)
<i>MMP9</i>	-1562C>T (rs34016235)
<i>MTHFR</i>	677C>T (rs1801133) 1298A>C (rs1801131)
<i>PAI-1</i>	-844G>A (rs2227631) 11053T>G (rs7242)
<i>PGR</i>	Val660Leu (rs1042838)
<i>PKR2</i>	rs6053283
<i>RAN</i>	rs14035
<i>SELP</i>	2123C>G (rs6127)
<i>SERPINC1</i>	786G>A (rs2227589)
<i>TGF-B1</i>	915G>C (rs1800471)
<i>TNF-α</i>	-863C>A (rs1800630)
<i>TP53</i>	Arg72Pro (rs1042522)
<i>VEGFA</i>	-2549 I/D (rs35569394) -1154G>A (rs1570360)
<i>VEGFR-2</i>	1719A>T (rs1870377)
<i>XPO5</i>	rs11077

Multifaktöriyel hastalıklarda, genetik risk faktörlerinin tespiti için mikrosatellit belirteçler

kullanılarak yapılan genom-boyu çalışmalarda 15-30 nükleotidli kısa tekrarlı polimorfizmler kullanılmaktadır. 44 TKG olgusu ve 430 mikrosatellit ile yapılan bir çalışmada fenotip ile ilişkili olabilecek 3 farklı belirteç (6q27, 9q33.1 ve Xp22.11) ve bu bölgelerde aktif fonksiyonu olan 6 gen (MLLT4, KIF25, TNFSF15, TNFSF8, EIF1AX ve RPS6KA3) tespit edilmiştir (210). Bir başka çalışmada, kız kardeşinde de TKG öyküsü olan 30 olgu, 25 kız kardeş ve 9 erkek kardeşin dahil edildiği bir genom-boyu ilişkilendirme çalışmasında 4 kromozom bölgesindeki 4 gene ait 4 farklı varyant (FHIT (3p14.2, rs10514716), FAM154A/LOC 158297 (9p22.1, rs10511668), PDE2A (11q13.4, rs341048) ve GRIK2 (6q16.3, rs10485275)) tespit edilmiştir. FHIT gen varyantları sıklıkla intestinal kanserlerde tespit edilmekle birlikte, apoptotik yollarda aktiftir ve trofoblast invazyonunda görevli olduğu düşünülmektedir. PDE2A geni beyin, kalp, plasenta, akciğer, iskelet kası, böbrekler ve pankreasta cAMP-cGMP yollarında görevli protein anlatımı yapar. GRIK2 geni iyonotropik glutamat reseptörlerini kodlarken otizm ve Huntington hastalığı ile ilişkilendirilmiş ve şizofrenide anlatımının azaldığı gösterilmiştir (211).

Gebelik kaybı veya primer kadın ve erkek infertilitesi ile ilişkili olabilecek immün yanıt, koagülasyon, metabolizma, anjiyogenez, endokrin sistem ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi ile ilgili genlerden oluşan panel testi ile yapılmış bir çalışmada 187 gende 472 farklı varyant bulunmuştur (212). Başka bir çalışmada, kadın ve erkek infertilitesi ile ilişkili literatürde belirtilmiş 87 genden oluşan panel testi ile 118 bireyden oluşan heterojen bir olgu grubu çalışılmış, bu panelin primer infertilite olguları için tanı koydurucu, fakat TKG etiyojisinin açıklanmasında yetersiz kaldığı bildirilmiştir (213).

Transkriptomik incelemelerde en çok tercih edilen yöntem, mikroarray temelli gen ekspresyon çalışmalarıdır. İnsan endometriyumunda yapılan transkriptomik çalışmaların ana araştırma konuları; sıklık fazlar arasındaki gen ifadesi değişimleri ve ovaryan stimülasyonların etkisi ile fertil ve infertil olgular arasındaki endometriyal reseptivitenin karşılaştırılmasıdır (214). Endometriyumun reseptif olduğu dönemde ekspresyonu artmış olan genlerin implantasyon aşamasında etkin olduğu aşıkardır. 2012 yılında yapılmış olan iki ayrı çalışmada hücre döngüsü ve farklılaşması, adezyon, apoptoz, hücre içi sinyal iletimi ve mobilitesi, immünite ve embriyonik morfogenez ile ilişkili genlerde ekspresyon değişkenliği tespit edilmiştir (215, 216). TİK olgu grubunda yapılan bir transkriptomik çalışmada hücre döngüsü, hücrel adezyon yolları ve Wnt sinyal yolağında etkin 313 genin ekspresyonunun değiştiği, bunların %92'sinin azaldığı, %8'inin arttığı ve ekspresivitesi azalmış olan genlerin %8'inin de östrojen aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir (217). 2016 yılında yapılan benzer bir çalışmada TİK olgu grubu ile kontrollerin luteal faz ortasında endometriyal ekspresyonları karşılaştırıldığında 303 gende farklı örüntü tespit edilmiştir (218). Makak maymunlarının sekretuar fazda endometriyal gen anlatımlarının incelendiği bir başka çalışmada, 108 genin progesteron aktivitesi ile anlatımlarının değiştiği, progesteronun bu süreçteki etkin temel hormon olduğu ve bu genlerin embriyo implantasyonunda etkin oldukları gösterilmiştir (219).

Maternal gen varyantlarının araştırıldığı, Avrupa ve Güney Amerika kökenli TKG olgu grubundan 49 dişi bireyde tüm ekzom dizileme yöntemi kullanılarak yapılmış bir çalışma bulunmaktadır. Burada 234 gen değerlendirilmiş ve 22 gende 27 varyant bulunmuştur (220).

YND tekniği kullanılarak abortus dokusu ile anne ve babanın birlikte incelendiği (üçlü tüm ekzom dizileme) bir çalışmada, embriyolojik ve/veya intrauterin gelişme basamaklarını etkileyerek fetal letal etkili patojenik gen varyantlarının fetusta homozigot veya birleşik heterozigot, anne ve babada ise heterozigot olarak bulunacağı öngörüsü ile araştırılmıştır. TKG öykülü dört ailede yürütülen çalışmada DYNC2H1 ve ALOX15 genlerinde gebelik kaybına yol açabilecek varyantlar saptanmıştır (221). Ayrıca fetal ultrason izlemlerinde veya ileri gebelik haftalarındaki kayıpların postmortem fizik muayenelerinde dismorfik bulguların varlığı, ön tanıda bir sendromu düşündürdüğünde ilişkili olabilecek genin Sanger dizileme ile araştırılması mümkündür. Nonspesifik bulgular söz konusu olduğunda ise üçlü TED tanı koydurucu olabilmektedir. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada beyin ve böbrek gelişiminde etkin KIF14

geninde bir mutasyon bulunmuştur (220). YND tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar ile saptanmış etiolojide etkili olabilecek aday genler literatürden derlenerek gösterilmiştir (181, 220-248).

Tablo 3: YND teknikleri ile saptanan TGK etiyojisi ile ilişkili olabilecek aday genler

Gen	Genomik lokasyon	Genin işlevi veya ilişkili olduğu fenotip	Genin MIM numarası
<i>ADAMTS 1</i>	21q21.3	Ekstrasellüler matriks düzenlenmesi	605174 (218)
<i>ALOX15</i>	17p13.2	Anti-inflamatuvar, membran düzenlenmesi, kanser metastazı	152392 (219)
<i>AMN</i>	14q32.32	Metabolizma	605799 (218)
<i>ATF4</i>	22q13.1	Hücre çoğalması ve apoptozu	604064 (179)
<i>AURKB</i>	17p13.1	İg iplikçiklerinin oluşumunun kontrolü	604970 (221)
<i>BMP7</i>	20q13.31	Hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozu	112267 (218)
<i>C3</i>	19p13.3	Kompleman sistemi	120700 (179, 222)
<i>C4</i>	6p21.33	Kompleman sistemi	120810 (222)
<i>C4BP</i>		Kompleman sistemi	120830 (222)
<i>C6orf221</i>	6q13	Tekrarlayan mol gebelik	611687 (224)
<i>CD74</i>	1p32	İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	142790 (179)
<i>CDH1</i>	16q22.1	Kadherin-1, hücre adezyonu	192090 (218)
<i>CEP55</i>	10q23.33	Çok nükleuslu nöronlar, anhidramniyos, renal displazi, serebellar hipoplazi, hidranensefali, siliyopati	610000 (225)
<i>CHD11</i>	16q21	Kadherin-11, hücre adezyonu	600023 (218)
<i>CHRNA1</i>	2q31.1	Multipl pterygium ve fetal akinezi sendromu	100690 (226)
<i>COL6A3</i>	2q37.3	Ekstrasellüler matriks düzenlenmesi	120250 (218)
<i>CR1</i>	1q32.2	Kompleman komponent reseptörü-1; immün fonksiyonun düzenlenmesi	120620 (218)
<i>CTSA</i>	20q13.12	Galaktosialidoz	613111 (227)
<i>DAF (CD55)</i>	1q32.2	Kompleman sistemi	125240 (222)
<i>DF(CFD)</i>	19p13.3	Kompleman sistemi	134350 (222)
<i>DNAH14</i>	1q42.12	Mikrotübül ilişkili protein-motor kompleksi	603341 (227)
<i>DNMT3L</i>	21q22.3	Olgunlaşmanın duraklaması	606588 (228)
<i>DYNC2H 1</i>	11q22.3	Siliya oluşumu ve düzenlenmesi; Kısa kaburgalı torasik displazi-3, polidaktilili veya polidaktilisiz	603297 (219, 229)
<i>ECEL1</i>	2q37.1	Artrogripozis multipleks konjenita	605896 (230)

<i>EGR1</i>	5p31.2	Trofoblast invazyonu, proliferasyonu ve iletişimi	128990 (179)
<i>EPAS1</i>	2q21	Anjiyogenez	603349 (218)
<i>F5</i>	1q24.2	Koagülasyon faktörü-5	612309 (218)
<i>FGA</i>	4q31.3	Fibrinojen A alfa polipeptiti; koagülasyon kaskadı	134820 (218)
<i>FGFR2</i>	10q26.13	Hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozu	176943 (218)
<i>FLT1</i>	13q12.3	FMS ilişkili tirozin kinaz-1; anjiyogenez	165070 (218)
<i>FOXP3</i>	Xp11.23	Regülatör T hücrelerin gelişimi ve devamlılığı, IPEX sendromu	300292 (231)
<i>FZD6</i>	8q22.3	Wnt ailesi üyesi	603409 (227)
<i>GALNT14</i>	2p23.1	Glikoziltransferaz	608225 (227)
<i>GBE1</i>	3p12.2	Gilkojen depo hastalığı tip-IV	607839 (232)
<i>GLE1</i>	9q34.11	Letal konjenital kontraktür sendromu tip-1	603371 (229)
<i>GOLPH3</i>	5p13.3	Golgi fosfoproteini-3	612207 (233)
<i>GPX4</i>	19p13.3	İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	138322 (179)
<i>GUSB</i>	7q11.21	Mukopolisakkaridoz tip-VII	611499 (227)
<i>H19</i>	11p15.5	H19, maternal imprintinge uğrayan, anlatımı olmayan transkript-epigenetik düzenlenme	103280 (234)
<i>HERG</i>	7q36.1	Polimorfik ventriküler taşikardi	152427 (235)
<i>ICAM1</i>	19p13.2	Adezyon	147840 (179)
<i>IDO2</i>	8p11.21	İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	612129 (218)
<i>IFT122</i>	3q21.3-22	Kraniyoektodermal displazi tip-1	606045 (236)
<i>KHDC3L</i>	6q13	Tekrarlayan molar gebelik	611687 (237)
<i>KIF14</i>	1q32.1	Siliyopati, Meckel Sendromu tip-12	611279 (238)
<i>LAPTM5</i>	1p35.2	Hematopoez	601476 (179)
<i>LIFR</i>	5p13.1	Lösemi inhibitör faktör reseptörü; hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozu	151443 (218)
<i>LIT1</i>	11p15.5	Epigenetik düzenlenme	604115 (234)
<i>MAPK3</i>	16p11.2	Trofoblast invazyonu, proliferasyonu ve iletişimi	601795 (179)
<i>MMP10</i>	11q22.2	Matriks metalloproteinaz-10, ekstrasellüler yeniden düzenlenme	185260 (218)
<i>MMP9</i>	20q13.12	Matriks metalloproteinaz-9, ekstrasellüler yeniden düzenlenme	120361 (218)
<i>MSH4</i>	1p31.1	Olgunlaşmanın duraklaması	602105 (228)
<i>MuSK</i>	9q31.3	Fetal akinezi deformasyon sendromu	601296 (239)
<i>MYOM1</i>	18p11.31	Miyomesin-1, çizgili kas yapısının düzenlenmesi	603508 (227)

<i>NCOA1</i>	2p23.3	Nükleer steroid reseptörlerin aktivasyonu	602691 (218)
<i>NEB</i>	2q23.3	Nemalin miyopatisi tip-2	161650 (227)
<i>NLRP2</i>	19q13.42	Tekrarlayan molar gebelik	609364 (223)
<i>NLRP5</i>	19q13.43	Tekrarlayan molar gebelik	609658 (239)
<i>NLRP7</i>	19q13.42	Tekrarlayan molar gebelik	609661(241)
<i>NOP14</i>	4p16.3	TGK	611526 (242)
<i>PADI6</i>	1p36.13	Tekrarlayan erken embriyonik duraklama	610363 (246)
<i>PDLIM1</i>	10q23.33	Trofoblast invazyonu, proliferasyonu ve iletişimi	605900 (179)
<i>PDZD2</i>	5p13.3	PDZ domaini içeren tip-2	610697 (233)
<i>PHLDA2</i>	11p15.4	Plasental büyüme	602131 (179)
<i>PIGC</i>	1q24.3	Glikozilfosfatidilinositol sentezi	601730 (227)
<i>RYR1</i>	19q13.2	King-Denborough sendromu, Konjenital uniform nöromusküler hastalık tip-1	180901 (229, 243)
<i>SERPING1</i>	11q12.1	Koagülasyon yolağı	606860 (222)
<i>SLC16A2</i>	Xq13.2	Metabolizma	300095 (179)
<i>SNRPN</i>	15q11.2	Epigenetik düzenlenme	182279 (234)
<i>STIL</i>	1p33	Sitokinez-sentriolar duplikasyon, OR kalıtlı fetal mikrosefali tip-7	181590 (244)
<i>SYCP3</i>	15q11.2	Olgunlaşmanın duraklaması	604759 (228)
<i>THBD</i>	20p11.21	Trombomodulin, koagülasyon kaskadı	188040 (218)
<i>THSD1</i>	13q14.3	Adezyon glikoproteini	616821 (227)
<i>TLE6</i>	19p13.3	Zigot oluşumunda hata	612399 (218)
<i>TLR3</i>	4q35.1	TOLL-benzeri reseptör-3; İmmün fonksiyonların düzenlenmesi	603029 (238)
<i>TNC</i>	9q33.1	Ekstrasellüler matriks düzenlenmesi	187380 (218)
<i>TRAF3IP1</i>	2q37.3	İmmün fonksiyonun düzenlenmesi	607380 (218)
<i>TRO</i>	Xp11.21	Trofinin, hücre adezyonu, trofoblast-endometriyum etkileşimi	300132 (218)
<i>UBN1</i>	16p13.3	Çoğalma	609771 (227)
<i>WNT6</i>	2q35	Kanatsız tip MMTV integrasyon bölgesi ailesi üyesi-6	604663 (245)

İnfertilite başta olmak üzere üreme fonksiyonlarında görülen sorunların etiyolojisinde tek gen defektleri veya genetik bozuklukların da bulunduğu bilinmektedir. Bu heterojen grubun aydınlatılmasında YND kullanımı her geçen gün artmaktadır.

Tablo 4: YND tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda saptanan erkek faktörü ile ilişkili genler ve fenotipik bulguları (Patel (213)'den değiştirilerek)

<i>AR</i>	Androjen insensitivesi, hipospadias
<i>AURKC</i>	Spermatogenez defekti tip-5
<i>CATSPER1</i>	Spermatogenez defekti tip-7
<i>CATSPER2</i>	Sağırlık ve infertilite sendromu
<i>CFTR</i>	Vas deferens agenezisi
<i>DAZL</i>	Spermatogenez defekti
<i>DDX25</i>	Spermatogenez defekti
<i>DPY19L2</i>	Spermatogenez defekti tip-9
<i>FSHB</i>	Hipogondotropik hipogonadizm tip-24
<i>FSHR</i>	Spermatogenezde etkin, erkek infertilitesi
<i>LHB</i>	Hipogondotropik hipogonadizm tip-23
<i>LHCGR</i>	Leydig hücre hipoplazisi, erkekte erken puberte
<i>NR5A1</i>	Spermatogenez defekti tip-8, cinsel gelişim bozukluğu
<i>PRDM9</i>	Spermatogenezde mayoz bölünme hatası
<i>PRM1</i>	Spermatogenez defekti
<i>SRY</i>	Cinsel gelişim bozukluğu
<i>USP26</i>	Spermatogenez defekti
<i>USP9Y</i>	Spermatogenez defekti

Heterojen bir grup olan kadın infertilitesi de günümüzde YND teknolojisi ile araştırılmakta, yeni genler ve yolaklar bulunmaya çalışılmaktadır.

Tablo 5: YND tekniği ile saptanan POY, ovaryan disgenezi, OOMD ve PKOS ile ilişkilendirilmiş genler ve fenotipik bulguları

<i>AMH</i>	Primer/sekonder amenore
<i>AMHR2</i>	POY
<i>BMP15</i>	Gecikmiş puberte, primer/sekonder amenore, küçük overler, folikül yokluğu, hipoplastik uterus, hirsutizm, pubik ve aksiller kıllanma yokluğu
<i>CAPN10</i>	PKOS
<i>CYP11A1</i>	Steroidogenez
<i>CYP17A1</i>	Steroidogenez
<i>CYP19A1</i>	Steroidogenez
<i>DAZL</i>	Düşük over rezervi
<i>DIAPH2</i>	Sekonder amenore, POY2A
<i>EIF2B2</i>	Ökaryotik translasyon, POY
<i>EIF2B3</i>	Ökaryotik translasyon, POY
<i>EIF4ENIF1</i>	Sekonder amenore - mRNA translasyonu
<i>ERCC6</i>	Sekonder amenore - DNA tamiri
<i>FIGLA</i>	Küçük/atrezik overler, foliküllerin yokluğu, atrofik endometriyum
<i>FMR1</i>	Frajl X sendromu, pre-mutasyon taşıyıcılarında artmış POY riski
<i>FOXL2</i>	Hipoplastik uterus/overler, folikül yokluğu, sekonder amenore

<i>FSHB</i>	Primer amenore, infertilite
<i>FSHR</i>	Osteoporoz, primer amenore
<i>GALT</i>	Galaktoz fosfat transferaz, galaktozemi
<i>GDF9</i>	Primer amenore, meme gelişiminin olmaması, pubik kıllanmanın gecikmesi
<i>GNAS</i>	McCune-Albright sendromu, ACTH bağımsız makronodüler adrenal hiperplazi
<i>GNRH1</i>	Normosmik hipogonadotropik hipogonadizm
<i>GNRHR</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm
<i>HFM1</i>	Amenore - homolog rekombinasyon ve mayozda görevli
<i>INHA</i>	Primer amenore
<i>INS</i>	PKOS
<i>INSR</i>	PKOS
<i>IRS1</i>	Pre-ovulatuvar folikül gelişimi
<i>IRS2</i>	Pre-ovulatuvar folikül gelişimi
<i>KISS1</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm
<i>KISS1R</i>	Hipogonadotropik hipogonadizm
<i>LHB</i>	İnfertilite
<i>LHCGR</i>	Primer amenore
<i>MCM8</i>	Telârşın yokluğu, primer amenore, overlerin yokluğu, hipergonadotropik over yetmezliği - DNA tamiri
<i>MCM9</i>	Kısa boy, meme gelişiminin az olması, overlerin yokluğu, kemik yaşı geriliği, pubik ve aksiller kıllanma azlığı, primer amenore - DNA tamiri
<i>MSH5</i>	Oligomenore, atrofik overler, folikül yokluğu
<i>NANOS3</i>	Primer amenore
<i>NOBOX</i>	Sekonder amenore ve folikül yokluğu
<i>NR5A1</i>	Düzensiz ve anovulatuvar döngüler, sekonder amenore, disgenetik gonadlar ve germ hücrelerinin yokluğu
<i>NUP107</i>	Overlerin yokluğu, küçük uterus, spontan puberte yokluğu - DNA tamiri
<i>PATL2</i>	Germinal vezikül aşamasında oosit olgunlaşmasının duraklaması, anormal 1. polar cisim, erken embriyonik duraklama - OOMD
<i>PGRMC1</i>	Hipergonadotropik hipogonadizm, amenore
<i>POF1B</i>	POY2B
<i>POLG</i>	mtDNA polimeraz gama
<i>POU5F1</i>	Folikülsüz küçük overler
<i>PSMC3IP</i>	Memede gelişim geriliği, pubik kıllanma yokluğu, hipoplastik uterus, primer amenore
<i>SGO2</i>	OY
<i>SOHLH1</i>	Kısa boy, telârş yokluğu, primer amenore, hipoplastik overler veya yokluğu, küçük uterus, kemik yaşı geriliği - mRNA transkripsiyonu
<i>SPIDR</i>	Hipoplastik overler/over yokluğu
<i>STAG3</i>	Primer amenore ve ovaryan disgenezi - homolog

	rekombinasyon ve mayozda görevli	
<i>SYCE1</i>	Primer amenore, küçük uterus ve overler, foliküllerin yokluğu - homolog rekombinasyon ve mayozda görevli	
<i>TACR3</i>	Normosmik hipogonadotropik hipogonadizm	
<i>TGFBR3</i>	POY	
<i>TUBB8</i>	Metafaz I veya II'de oosit duraklaması, anormal iğ iplikleri - OOMD	
<i>WT1</i>	Sekonder amenore	
<i>ZP1</i>	Zona pellusida yokluğu – OOMD	
<i>ZP2</i>	Anormal zona pellusida - OOMD	
<i>ZP3</i>	Oosit dejenerasyonu, zona pellusida yokluğu - OOMD	

3. TEKNİK BÖLÜM:

Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç bölümlerinden oluşur. Sonuç bölümünün önerileri de kapsamı gerekmektedir.

3.1. Gereç ve Yöntem: Projede öngörülen iş paketleri özelinde faaliyetler ele alınmalı

3.1.1. İş Paketleri: Proje teklifinde önerilmiş olan iş paketleri sırasıyla ele alınmalı ve proje takvimi ile karşılaştırılmalı olarak gerçekleştirilen faaliyetler rapor edilmelidir. Verilen bilgilerde iş paketlerinde gerçekleştirilmiş olan faaliyetler detay olarak belirtilmelidir.

Bu çalışmanın ilk aşamadaki olgu grubunu İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2014-2019 yılları arasında başvuran 973 olgu oluşturdu ve olgulara ait dosya verileri retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışma, iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Dosya değerlendirmesinde, çiftlere ait demografik bilgiler, gebelik ve doğum öyküsü, preterm eylem riski, varsa gebeliklerindeki fetal ultrasonografi bulguları, fetal kromozom analiz sonuçları, eşler arasındaki akrabalık durumu ve etiyolojinin açıklanmasına yönelik yapılmış tüm tetkikler incelenerek Excel dosyası hazırlandı. İkinci aşamada bu ailelerden tüm klasik testleri (kromozom analizi, trombofili paneli, hormon görüntülemesi, dişi

üreme sistemi görüntülemesi, otoantikörlerin değerlendirilmesi, biyokimyasal testler) normal sonuçlanan çiftlerden tüm ekzom dizi analizi için onam veren 25 anne adayından kan örnekleme yapıldı.

Araştırma amacıyla yapılacak moleküler analizler için, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 19.02.2018 tarih ve 249 sayılı yazı ile etik açıdan onam alındı.

Olgulardan mor kapaklı K₃EDTA'lı tüplere yaklaşık 2 ml periferik venöz tam kan alındı. Her olgu için 400 µl kan örneğinden MagPurix® 12 cihazı ile, MagPurix® Blood DNA Extraction Kit 200 (OP02001) kullanılarak prosedüre uygun şekilde DNA izolasyonu yapıldı. MagPurix® teknolojisi, manyetik boncuklar kullanarak materyallerden nükleik asitlerin çıkarılmasını sağlayan otomatik bir sistemdir. DNA saflaştırma aşaması parçalama, bağlama, yıkama ve elüsyon aşamalarını içerir.

Genomik DNA'ların izolasyonunun ardından, her biri için Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c cihazı aracılığıyla spektrofometrik olarak yoğunluk (ng/µl) ve saflık derecesi absorpsiyon ölçümleri ile kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarına göre DNA konsantrasyonlarının gerekli olan >50 ng/µl üzerinde ve A260/A280 oranlarının da 1,8-2,0 aralığında olduğu tespit edildi.

25 olgudan elde edilen genomik DNA'ların kaliteleri değerlendirilip yeni nesil dizileme işlemleri için uygun oldukları tespit edildikten sonra, proje kapsamında maddi koşullar göz önüne alınarak TED ıslak laboratuvar çalışmalarının hizmet alımı ile gerçekleştirilmesi kararlaştırıldığından, materyaller ilgili merkezlere uygun koşullarda kargo ile gönderildi.

Engin Tıp-Berry Genomics'te yapılan ıslak laboratuvar çalışmaları şu şekildedir (Olgu No: 1-25): YND hazırlık aşamaları için DNA'ların uygunluğu bir kez daha kontrol edilmiş, çalışmaya uygunluğu ve yapısal bütünlüğü jel elektroforezi ile doğrulanmıştır, ileri kantitasyonu 'Qubit' ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme öncesi kütüphane hazırlanması basamağında ekzom bölgesini hedef alan 'xGen Exome Research Panel' (IDT) kiti kullanılmıştır. Bu kit ile hedef genlerde yer alan ekzonlar ve ekzon-intron sınır bölgeleri 20 bç uzaklıklar dahil olacak şekilde seçilmiş ve çoğaltılmıştır. Çalışma kapsamında kitin standart protokolü izlenmiştir. Kütüphane hazırlanmasının ardından örnekler Illumina NextSeq® platformunda dizilenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen yaklaşık 5.000.000 okuma ile hedef ekzom bölgeleri için ortalama 65x okuma derinliği elde edilmiştir. Elde edilen veriler biyoinformatik iş akışı ile analiz edilip

varyant listesi çıkarılmıştır.

Biyoinformatik analiz kapsamında 150 bç'lik tek uçlu dizi (single-end) ham verileri (.fastq) kullanılmıştır. Dizi verilerinin 5' ve 3' uçları kalite parametreleri göz önüne alınarak kesilmiştir (Trimmomatic). Elde edilen veriler referans genom verilerine göre hizalanmıştır (Burrows-Wheeler Aligner). Hizalama çalışması sonrasında varyantların çekimi 'GATK Unified Genotyper' ile yapılmıştır.

Sonraki basamaklarda tekrar hizalama ile in/del bölgelerindeki hizalama düzeltmelerinin yapılması, DNA dizilerinin kalite skor değerlerinin tekrar ayarlanması, düzenlenmiş dizilerdeki varyasyonlar için parametre optimizasyonlarının yapılması, varyasyon listesi için notların eklenmesi, varyantın tespit edilme yüzdesine ($<30\%$) ve okunma derinliğine göre ($<10x$) güvenilir olmayanların elenmesi, bölgesinin ekzonik veya intronik oluşuna göre filtreleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Dizileme işlemleri sonucunda elde edilen veriler ham data halinde (.fastq, .bam, .bai) ve excel formatında düzenlenmiş olarak tarafımıza ulaştırıldı. Sonrasında biyoinformatik analizlere geçildi. Varyantların incelenmesinde ACMG'nin (American College of Medical Genetics and Genomics) yayınlamış olduğu varyant analiz kriterleri göz önüne alındı (259).

Biyoinformatik analizlere başlamadan önce literatürde veri madenciliği yapılarak çalışmalar kapsamında bildirilmiş genler ile gebeliğin ilk trimesterinde etkin yolak genlerini içeren gen listesi oluşturuldu. Analizler sonucu TKG ile ilişkisi olabileceğinin düşünüldüğü varyantların etki spektrumu değerlendirilirken yapılan ilk filtrelemede, bu liste kapsamındaki gen varyantları incelendi. İkinci filtrelemede en az üç in siliko tahmin araçlarına göre patojenik veya olası patojenik özellik taşıyan tüm genlerdeki değişimler değerlendirmeye alındı. İncelenen varyantın okuma derinliğinin en az 20x olmasına dikkat edildi ve dizileme görüntüleri Interactive Genomic Viewer (IGV) aracılığıyla incelendi. TKG'nın toplum sıklığının en az %1 olduğu göz önüne alınarak saptanan varyantların toplum sıklığı değerlendirildi ve $<0,01$ değerinde olanlar göz önüne alındı.

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda patojenik ve olası patojenik olarak saptanan varyantlar içerisinden aile segregasyonu çalışması için seçilerek Sanger dizileme planlandı ve primerlerin tasarlanması aşamasına geçildi.

Varyant konfirmasyonu ve segregasyonu için bölgeye spesifik primerler tasarlama

aşamasında, primerlerdeki oligonükleotidlerin tekrarlayan dizi bölgesinde olmamasına, herhangi bir polimorfizm içermemesine ve içermesi kaçınılmaz ise toplum sıklığının %1'in altında olmasına, primerlerin DNA'ya bağlanma ısılarının birbirine yakın olmasına (~2-5°C farklılık), aralarında çift bağ yapısı bulunan A-T nükleotitlerinin sayısının üçlü bağ yapısı bulunan C-G sayısında olabildiğince eşit olmasına önem verildi. Ensembl veri tabanından alınan veriler ile tasarlanan primerler, USCS Genome Browser in siliko PZR aracı ile bağlanma ısıları, dizi uzunlukları ve spesifitesi açısından kontrol edildi.

Gen ve Ekzon	Primer dizisi	Primer bağlanma ısıları (°C)	PZR ürün boyu
ALPL-F9	5'-CTCCCAGCCACCATACT-3'	54,1	482 bç
ALPL-R9	5'-GAACCTAACTTGCATCTCCAT-3'	56	
CEP290-F53	5'-CCTTGAAGTCATTCGTTAGTGG-3'	57,3	296 bç
CEP290-R53	5'-AGGAATAGTCAGATGAACATAATTAAC-3'	55,6	
CFTR-F5	5'-CAACTAGAAGCATGCCAGT-3'	56	471 bç
CFTR-R5	5'-CAGAATGGTGCTCTGCTA-3'	54	
CFTR-F14	5'-CTCAGTCTGTTAACATGCAA-3'	60	1207 bç
CFTR-R14	5'-CTG GCT TAG TAG AGG ACCA-3'	58	
CFTR-F20	5'-CCCATCTCTGGTAGCCAA-3'	56	760 bç
CFTR-R20	5'-CTATCTGACAATCTGTGTGCA-3'	60	
CYP17A1-F8	5'-CTGGGCAGGGCCATGTCT-3'	64,7	473 bç
CYP17A1-R8	5'-GTAGGGAAGAATGGCGGAGA-3'	61,5	
IGF2-F2	5'-CTTGGCTAGGCTTAGGCG-3'	58	318 bç
IGF2-R2	5'-GCCAGAGGAGAGAGGATCA-3'	58	
NOP14-F16	5'-AGGACTTGAGCAGCCACAGT-3'	59,1	475 bç
NOP14-R16	5'-ACTGTTAAGGAAGCAAGAGTCTGT-3'	57,9	
PLG-F15	5'-GATGCTGGGCTTGCAGTC-3'	60,8	256 bç
PLG-R15	5'-GTATTTAAGACAAGACTTCATGTCAATT-3'	57,6	
PROKR2-F5	5'-GCTGGATAACAAGTACATGAGGA-3'	58,3	926 bç
PROKR2-R5	5'-GGAGGCATGAACACAGATGT-3'	58,5	
SLAIN1-F1	5'-CTGCCATGGGTTCTGCT-3'	58	380 bç
SLAIN1-R1	5'-CCAGTGAGGTCACCCCA-3'	58	
TTC21B-F13	5'-AACACTAGGGCTATCCGTAA-3'	54,1	309 bç
TTC21B-R13	5'-TTCAAGGAGGGTGATATGTC-3'	54,9	
ZMPSTE24-F9	5'-TTATGGATGCTACTGATCCATA-3'	58,5	276 bç
ZMPSTE24-R9	5'-AGCTCTAGATTTGAAGCAGGCA-3'	60,7	
ZP1-F3	5'-GGTACT TTCTGGAATCCACCAT-3'	59,2	731 bç
ZP1-R3	5'-GAGTTTCTGCCTAAAGTTAGGAAACA -3'	60,5	

Olgulara ait DNA'lar ve tasarlanan primerler ile termal döngü cihazı kullanılarak PZR çalışması yapıldı.

Malzemeler	Final konsantrasyonları
10X (NH ₄) ₂ SO ₄ tampon solüsyonu (Hibrogen)	1X
25 mM MgCl ₂ (Hibrogen)	2 mM
25 µM dNTP (Invitrogen 100 mM dNTP setten hazırlanmış)	0.2 mM
2 µM İleri ve geri primerler (Sentebiolab, Sentromer)	0,2 µM
500 U (5 U/µl) Taq polimeraz enzimi (Hibrogen)	0,1-0,2 µl
DMSO (Biomatik)	% 0-10 olacak şekilde (G-C oranına göre)
Distile su	25 µl'ye tamamlanacak şekilde
DNA	100-200 ng/g
Final konsantrasyon	25 µl

Denatürasyon	94°C	10 dakika	x1 döngü
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x10 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye-1,5 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x30 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye-1,5 dakika	
Uzama	72°C	10 dakika	x1 döngü
Bekleme	4°C	1 saat	x1 döngü
Duraklama	10°C	∞	x1 döngü

Çalışmanın özgünlüğü ve bant boylarının hedeflenen bç ile aynı olduğunun gösterilmesi için, 5 µl PZR ürünü ile 2 µl Gel Red boyası karıştırılarak 1X TBE tamponu içindeki %2'lik agaroz jele yüklendi. 120 Voltta, 50 bç'lik merdiven işaretleyicisi (Sigma) ile 30 dk yürütülerek PZR ürünleri boyutlarına göre ayrıldı. Elektroferez işlemi sonrasında jeldeki ürünler Vilber Lourmat Infinity cihazı aracılığıyla ultraviyole ışık altında görüntülendi. Özgünlüğü doğrulanmış

PZR ürünlerinin saflaştırılması Thermo Scientific Exonuclease-I 20 U/μl ve Alkaline Phosphatase 1 U/μl ile protokole uygun şekilde yapıldı.

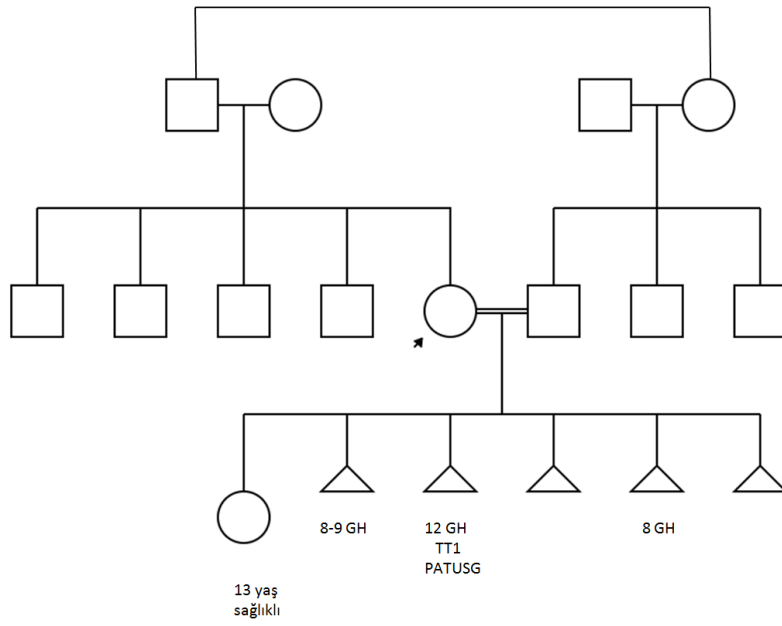
Dizi PZR işlemi sonrasında arta kalan primer ve diğer reaktiflerin temizlenmesi amacıyla plaktaki her bir kuyucuğa 1 μl 125 mM EDTA, 1 μl 3M sodyum asetat ve 25 μl %100 etanol eklenerek plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla kapatıldı ve 15 dakika oda ısısında tutuldu, ardından 3.810 rpm’de 45 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlemten sonra plak üzerindeki bant kaldırıldı, kuyucuk ağzları üstte kalacak şekilde ters çevrildi, 1.100 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Sonrasında kuyucuklara 35 μl %70’lik etanol ilave edildi. Plak tekrar bant ile kapatıldı ve 3.460 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Plağın üstü tekrar açıldı ve 1.170 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi. Ardından kuyucuklara tek tek 10 μl HiDi formamid (Highly Deionized formamid, enjeksiyon tampon çözeltisi) ilave edildi. Plaktaki ürünler 95°C’de 5 dakika denatüre edildikten sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi ve The Applied Biosystems (ABI) 3500 Genetic Analyzer cihazına yüklendi.

Kapiller elektroforez ile yürütülen ürünlerden elde edilen dizi verileri Seq Scape v3 ve Chromas v2.6.6 analiz programları ile bilgisayar ortamında incelendi.

3.2. Bulgular: Proje teklifinde belirtilmiş olan iş paketleri kapsamında yürütülen faaliyetler sıralaması ile elde edilen bulgular verilmelidir. Elde edilen bulgular gerekiyorsa tablo ve grafik olarak verilmelidir. Varsa istatistik sonuçlar, ara çıktılar ifade edilmelidir.

Araştırma kapsamında değerlendirilen olgulara ait bulgular, aile ağacı şeklinde, demografik bulgular “a”, TED analizinde saptanan varyantlar “b” ve fenotip ile ilişkili olabilecek varyantlar “c” tablolarında gösterildi.

3.2.1. Olgu 1



Şekil 16: Olgu 1'e ait aile ağacı

Tablo 6a: Olgu 1'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	38
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G6P1TT1A4
Akrabalık	Eşiyle 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1, 3-5: 8-9. GH, A2: 13. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	G3(TT1): 46,--, A4(G6): 46, --
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	G3(TT1): Üst ve alt ekstremitelerde distal kemikler yok, akrania, tek umbilikal arter, omfalosel, polidaktili, nazal kemik yok
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 6b: Olgu 1'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.473
Zararsız varyant sayısı	45.632
Olası zararsız varyant sayısı	94
VUS varyant sayısı	11.713
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	8
Homozigot varyant sayısı	19.820
Heterozigot varyant sayısı	37.653
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	1.647
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	3

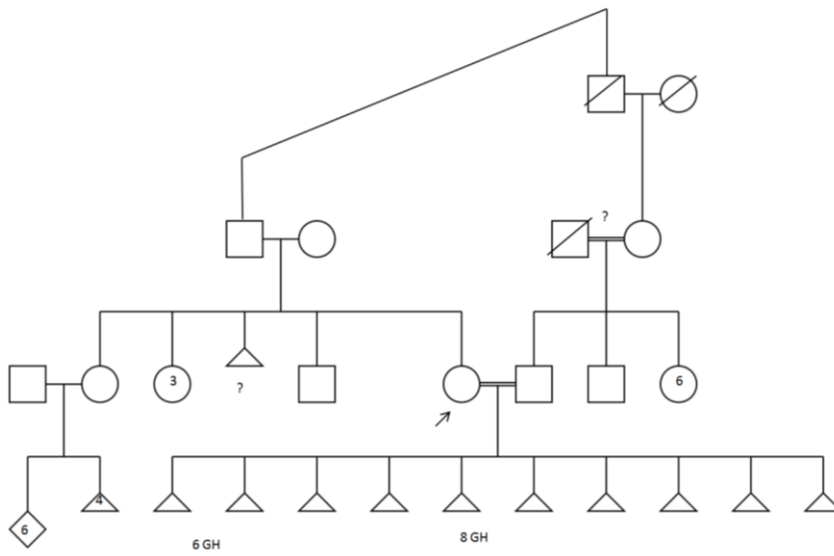
Tablo 6c: Olgu 1'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>TTC21B</i> (NM_024753.4)	OD, OR	c.1546C>T p.Q516X heterozigot	rs779134983 0,00002389	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>CFTR</i> (NM_000492.3)	OD, OR	c.2476G>A p.E826K heterozigot	rs397508381 0,00002597	Olası patojenik (ACMG, Polyphen, SIFT)
<i>MCM8</i> (NM_032485.5)	OR	c.482A>G p.H161R heterozigot	rs140044814 0,001092	Olası patojenik (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>NEK4</i> (NM_003157.4)	?	c.1972C>T p.R658X heterozigot	rs765561559 0,00001591	Olası patojenik (ACMG) patojenik (MutationTaster)
<i>ALPPL2</i> (NM_031313.2)	?	c.280C>T p.P94S heterozigot	rs146482704 0,006520	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>SHBG</i> (NM_001040.5)	?	c.1126G>A p.D376N heterozigot	rs138612626 0,0003857	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 1'de yapılan analiz sonucunda ACMG kriterleri ve tahmin araçları sınıflandırmalarına göre siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *TTC21B* geninde patojenik, *CFTR* ve

NEK4 genleri ile POY etiyojisi ile ilişkilendirilmiş olan *MCM8* geninde olası patojenik, plasentada aktivite gösteren *ALPPL2* ve anovulasyon ile ilişkilendirilmiş olan *SHBG* genlerinde ACMG kriterlerine VUS, tahmin araçlarına göre patojenik/olası patojenik olarak sınıflandırılmış toplam altı varyant bulundu. Patojenik olarak sınıflandırılmış *TTC21B* varyantının aile içi segregasyonu amacıyla eş DNA'sı ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda eşin bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi. Olası patojenik olarak sınıflandırılmış *CFTR* varyantı için segregasyon çalışmaları sonucunda eşin bu varyantı taşımadığı bulundu.

1.1.1.1. Olgu 2



Şekil 2: Olgu 2'ye ait aile ağacı

Tablo 7a: Olgu 2'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	30
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	20
Gebelik öyküsü	G10A10
Akrabalık	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	Kızkardeş: G10P6A4
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 6. GH, A3-10: 8. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-

Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	HSG: Uterus arkuatus, parsiyel septat uteri (gebeliklerin yarısı septoplasti sonrası oluşmuş)

Tablo 7b: Olgu 2'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.763
Zararsız varyant sayısı	45.166
Olası zararsız varyant sayısı	88
VUS varyant sayısı	11.476
Olası patojenik varyant sayısı	29
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	19.546
Heterozigot varyant sayısı	37.217
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.587
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	642

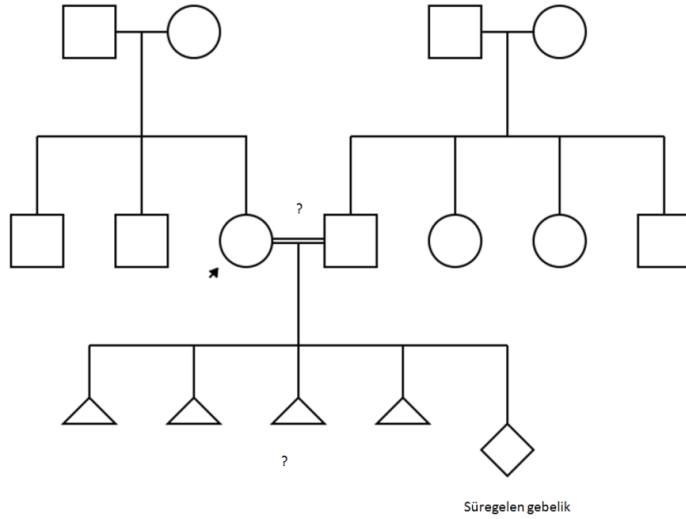
Tablo 7c: Olgu 2'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>ZMPSTE24</i> (NM_005857.4)	OR	c.1105C>T p.R369X heterozigot	rs281875373 0,000003978	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>CFTR</i> (NM_000492.3)	OD, OR	c.2476G>A p.E826K heterozigot	rs397508381 0,00002597	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>FREM2</i> (NM_207361.5)	OR	c.5264-5T>G p.(?) heterozigot	rs375059201 0,0001703	VUS (ACMG)
<i>F5</i> (NM_000130.4)	OD, OR	c.1340C>T p.P447L heterozigot	rs368387623 0,00003184	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen)

Sonuç: Olgu 2'de, ACMG kriterleri ve tahmin araçları ile yapılan analiz sonucunda daha önce letal restriktif dermopati ile ilişkilendirilmiş *ZMPSTE24* geninde patojenik, siliyopatiler ile ilişkili *CFTR* geninde olası patojenik varyantlar saptanırken; embriyogenezde aktif *FREM2* ile koagülasyon kaskadında görevli *F5* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen tahmin

aracına göre olası patojenik olarak sınıflandırılmış olan toplam dört varyant bulundu. Patojenik olarak sınıflandırılmış *ZMPSTE24* varyantının aile içi segregasyonu amacıyla eş DNA'sı ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda eşin bu varyantı taşımadığı tespit edildi.

1.1.1.2. Olgu 3



Şekil 17: Olgu 3'e ait aile ağacı

Tablo 8a: Olgu 3'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	22
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	17
Gebelik öyküsü	G5P1A4
Akrabalık bilgisi	uzak
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-4; 8-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 2b: Olgu 3'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.571
Zararsız varyant sayısı	44.845

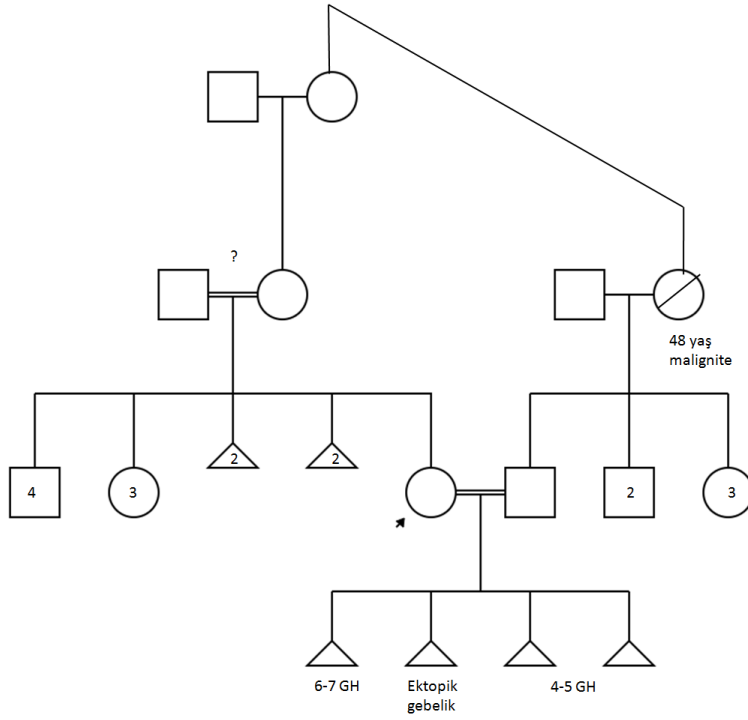
Olası zararsız varyant sayısı	91
VUS varyant sayısı	11.614
Olası patojenik varyant sayısı	18
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.685
Heterozigot varyant sayısı	36.886
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	8.122
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	617

Tablo 8c: Olgu 3’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CBS</i> (NM_000071.2)	OR	c.599C>T p.P200L heterozigot	rs758712880 0,00001603	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>COL11A1</i> (NM_001854.3)	OD, OR	c.3229C>A p.P1077T heterozigot	rs144562769 0,0001078	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster, SIFT)

Sonuç: Olgu 3’te, yapılan analiz sonucunda daha önce hiperhomosisteinemiye bağlı trombozlarla ilişkilendirilmiş *CBS* ve fibrokondrojenesis etiyolojisinde yer alan *COL11A1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

1.1.1.3. Olgu 4



Şekil 18: Olgu 4'e ait aile ağacı

Tablo 9a: Olgu 4'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	24
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	20
Gebelik öyküsü	G4A3Ektopik1
Akrabalık	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 6-7. GH, A2-3: 4-5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Anti CMV IgG-Toxo IgG +, AMH: 1,05 (↓)

Tablo 9b: Olgu 4’e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

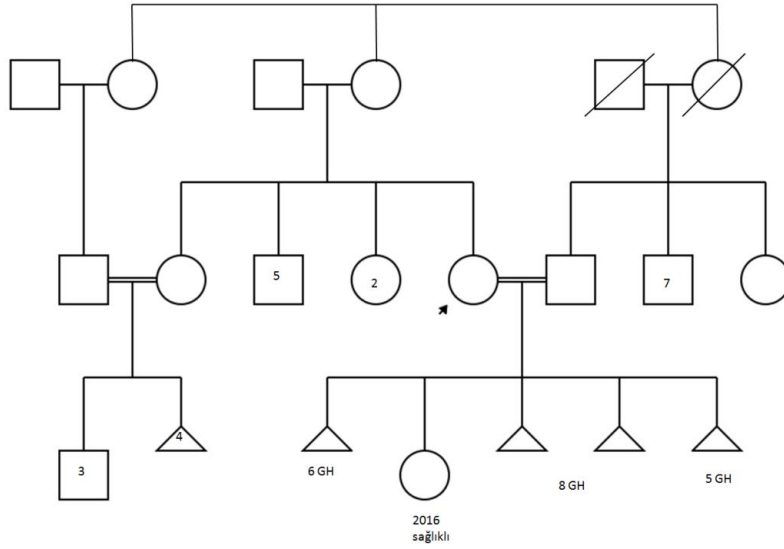
Toplam varyant sayısı	55.414
Zararsız varyant sayısı	43.972
Olası zararsız varyant sayısı	82
VUS varyant sayısı	11.327
Olası patojenik varyant sayısı	31
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	20.472
Heterozigot varyant sayısı	34.942
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.565
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	624

Tablo 9c: Olgu 4’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>MMS19</i> (NM_022362.4)	?	c.484C>G p.R162G heterozigot	rs373557835 0,000003982	VUS (ACMG) olası patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>SPICE1</i> (NM_144718.3)	?	c.2508delA p.R836fs heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>UBTFL1</i> (NM_001143975.1)	?	c.99_101del p.33_34del heterozigot	- -	VUS (ACMG) zararsız (GERP)

Sonuç: Olgu 4’te yapılan analiz sonucunda, daha önce hayvan çalışmalarında sürdürüldüğünde embriyolojik dönemde letal etki gösteren *MMS19* geninde Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre olası patojenik, hücre bölünmesinde etkin *SPICE1* geninde GERP tahmin aracına göre patojenik ve embriyogenezde görevli *UBTFL1* geninde GERP tahmin aracına göre zararsız olarak nitelendirilen üç varyant bulundu ve bu varyantlar ACMG kriterlerine göre ise VUS olarak sınıflandırıldı.

1.1.1.4. Olgu 5



Şekil 19: Olgu 5'e ait aile ağacı

Tablo 10a: Olgu 5'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	36
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	30
Gebelik öyküsü	G5P1A4
Akrabalık	Eşiyle 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	Kızkardeş: G8P3A5
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 6. GH, A2-3: 8. GH, A4: 5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	2011 ve 2016 yılında miyomektomi öyküsü
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 10b: Olgu 5'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.766
Zararsız varyant sayısı	45.881
Olası zararsız varyant sayısı	92
VUS varyant sayısı	11.766
Olası patojenik varyant sayısı	21
Patojenik varyant sayısı	6

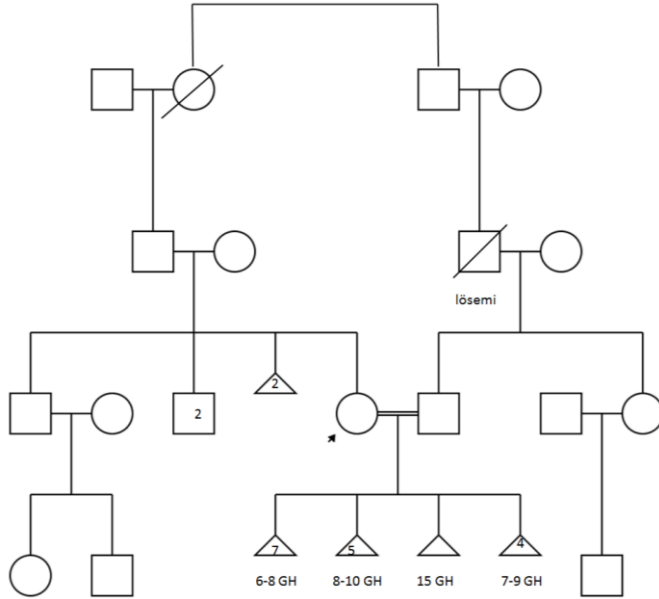
Homozigot varyant sayısı	19.795
Heterozigot varyant sayısı	37.971
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.304
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	676

Tablo 10c: Olgu 5'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen Transkript	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PATL2</i> (NM_001145112.1)	OR	c.839G>A p.R280Q heterozigot	rs569729547 0,00004854	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>ERCC6</i> (NM_001277059.1)	OD, OR	c.2609G>A p.R870Q heterozigot	rs200697187 0,0002349	Olası zararsız (ACMG, DANN, EIGEN, MVP, MutationTaster, REVEL, SIFT)

Sonuç: Olgu 5'te, yapılan analiz sonucunda OOMD ile ilişkilendirilmiş *PATL2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik ve OD kalıtmımlı POY nedeni olan *ERCC6* geninde ise ACMG kriterleri ve tahmin araçlarında olası zararsız olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

1.1.1.5. Olgu 6



Şekil 20: Olgu 6'ya ait aile ağacı

Tablo 11a: Olgu 6'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	39
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G17A17
Akrabalık	Eşiyle 2.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x2)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-12: 6-10. GH, A13: 15. GH, A14-17: 7-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A12: 46,XX, A13:46,XX, A14: 46,XX
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	Gebeliklerin yarısında düşük molekül ağırlıklı heparin kullanımı
Ek klinik bulgu	-

Tablo 11b: Olgu 6'ya ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	55.778
Zararsız varyant sayısı	44.460
Olası zararsız varyant sayısı	91
VUS varyant sayısı	11.198
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.932
Heterozigot varyant sayısı	35.846
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.355
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	661

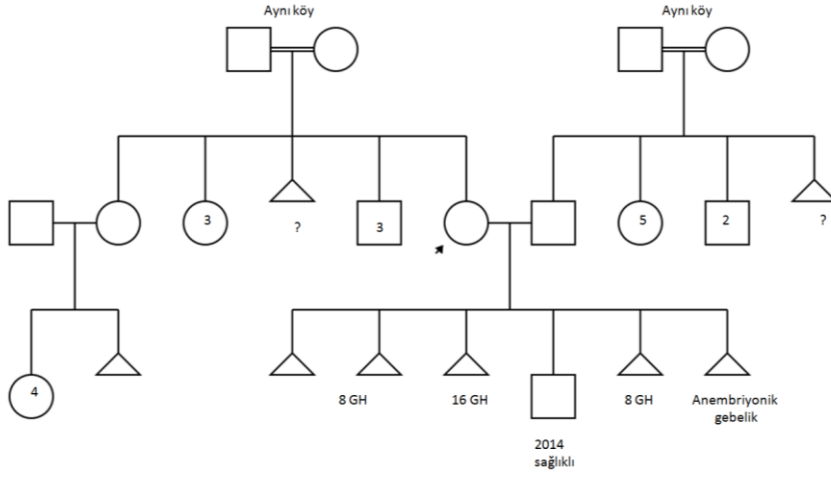
Tablo 11c: Olgu 6'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
---------------------	-------------------	---------	-------------------------------------	---------------------

<i>CEP290</i> (NM_025114.3)	OR	c.7153 delA p.I2385X heterozigot	rs781310385 0,00000861	patojenik (ACMG, GERP)
<i>SLAIN1</i> (NM_001040153.3)	?	c.93G>A p.W31X heterozigot	rs550883909 0,000007437	Olası patojenik (ACMG) patojenik (MutationTaster)
<i>CCDC141</i> (NM_173648.3)	?	c.2611C>T p.Q871X heterozigot	rs764893847 0,00002217	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>HSF1</i> (NM_005526.3)	?	c.430G>A p.V144M heterozigot	rs1564620538 0,00000398	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationAssessor, MutationTaster, SIFT)
<i>LRIF1</i> (NM_018372.3)	?	c.1151C>G p.S384C heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (MutationAssessor, MutationTaster, SIFT)
<i>MMP10</i> (NM_002425.2)	?	c.497-2A>G heterozigot p.(?)	rs17860955 0,01321	VUS (ACMG) patojenik (IGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 6’da, yapılan analiz sonucunda daha önce siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *CEP290* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, embriyolojik dönemde etkin *SLAIN1* geninde olası patojenik, gamet hücrelerinin üretimi ve plasenta gelişmesinde görevli *HSF1*, hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkili *CCDC141*, nükleer hormonların reseptör aktivitelerinin düzenlenmesinde yer alan *LRIF1* ve matriks metalloproteinazlarından kodlayan *MMP10* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam altı varyant bulundu. *CEP290* ve *SLAIN1* gen varyantlarının aile içi segregasyonu amacıyla aralarında 2.° kuzen evliliği olan eşe ait DNA ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda olgunun eşin *CEP290* c.7153delA ve *SLAIN1* c.93G>A varyantlarını taşımadığı tespit edildi.

1.1.1.6. Olgu 7



Şekil 7: Olgu 7'ye ait aile ağacı

Tablo 12a: Olgu 7'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	31
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	23
Gebelik öyküsü	G6P1A5
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-3, 5: 8. GH, A4: 16. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo12b: Olgu 7'ye ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	55.715
Zararsız varyant sayısı	44.537
Olası zararsız varyant sayısı	68
VUS varyant sayısı	11.083
Olası patojenik varyant sayısı	25

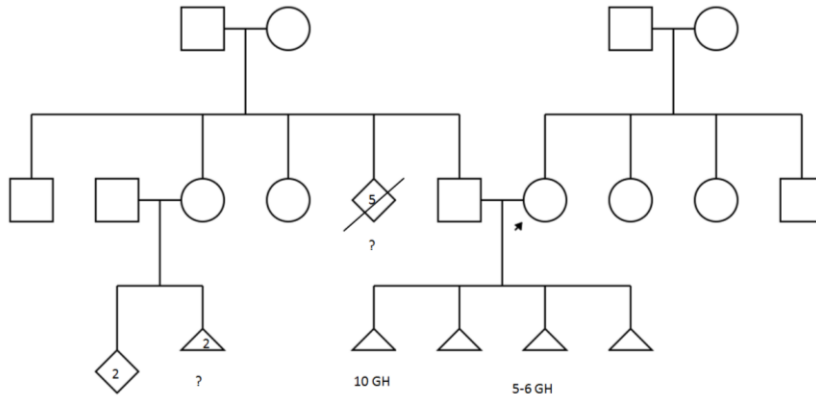
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.391
Heterozigot varyant sayısı	36.324
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.296
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	584

Tablo 12c: Olgu 7'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CPT1B</i> (NM_004377.3)	?	c.1237G>A p.E413K heterozigot	rs745702877 0,00001070	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>IGSF10</i> (NM_178822.4)	?	c.352C>T p.R118X heterozigot	rs142596318 0,00006167	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 7’de, yapılan analiz sonucunda daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında heterozigot taşıyıcılarda artmış abortus oranı ile ilişkilendirilmiş *CPT1B* ve GnRH nöronlarının embriyolojik dönemde göçünde etkin *IGSF10* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, varyant tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

1.1.1.7. Olgu 8



Şekil Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.21: Olgu 8’e ait aile ağacı

Tablo 13a: Olgu 18'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	26
Paternal yaş	28
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G4A4
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 10. GH, A2-4: 5-6. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 13b: Olgu 8'e ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.189
Zararsız varyant sayısı	45.214
Olası zararsız varyant sayısı	85
VUS varyant sayısı	11.853
Olası patojenik varyant sayısı	35
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.154
Heterozigot varyant sayısı	38.035
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	8.237
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	679

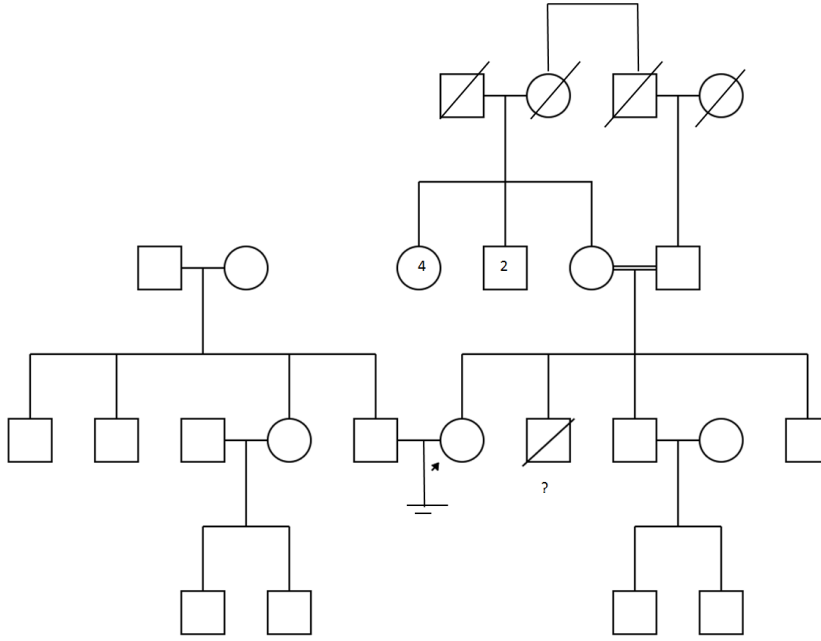
Tablo 13c: Olgu 8'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>FLT1</i> (NM_002019.4)	?	c.3720+1G> A p.(?) heterozigot	rs1158779072 0,000003977	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)

<i>DYNC2H1</i> (NM_001377.2)	OR	c.10433C>A p.S3478Y heterozigot	rs372499560 0,00003820	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen)
---------------------------------	----	---------------------------------------	---------------------------	---------------------------------------

Sonuç: Olgu 8’de, yapılan analiz sonucunda daha önce preeklampsi ile ilişkilendirilmiş ve plasenta gelişiminde etkin *FLT1* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, siliyopatiler ile ilişkili *DYNC2H1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen tahmin aracına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

1.1.1.8. Olgu 9



Şekil 22: Olgu 9’a ait aile ağacı

Tablo14a: Olgu 9’a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	31
Paternal yaş	33
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	-
Gebelik öyküsü	G0
Akrabalık	Anne ve babası 1.°kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH’sı	-
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-

Ek hastalık öyküsü	Boy kısalığı (-3,08 SD)
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	YÜT denemelerinde boş folikül sendromu şüphesi oluşmuş Grafide bilaretal proksimal radioulnar sinostoz, ulna hafif kısa

Tablo 14b: Olgu 9'a ait TED verisinin biyoinformatik analiz ile elde edilen varyant sayıları

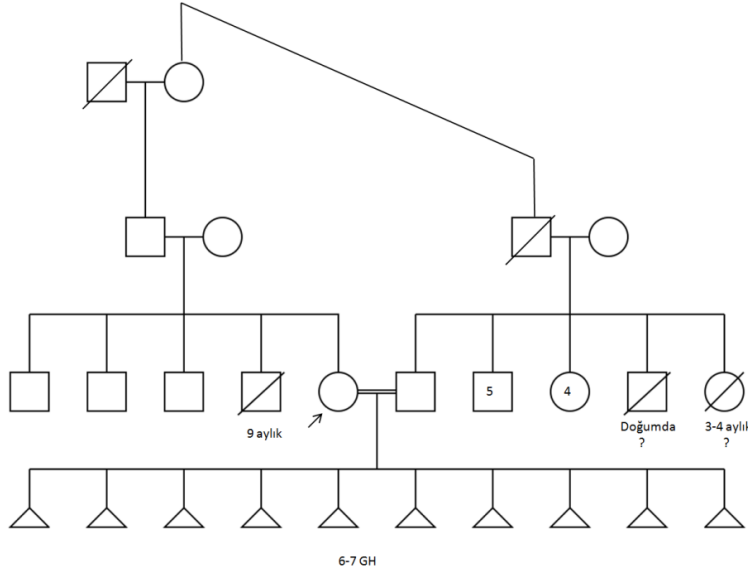
Toplam varyant sayısı	54.860
Zararsız varyant sayısı	43.560
Olası zararsız varyant sayısı	80
VUS varyant sayısı	11.199
Olası patojenik varyant sayısı	20
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	21.257
Heterozigot varyant sayısı	33.603
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	7.391
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	638

Tablo 14b: Olgu 9'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>ZP1</i> (NM_207341.3)	OR	c.628C>T p.Q210X homozigot	rs776515172 0,00000851	VUS (ACMG) patojenik (MutationTaster)

Sonuç: Olgu 9'da, yapılan analiz sonucunda OOMD ile ilişkilendirilmiş *ZP1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS ve MutationTaster tahmin aracına göre patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant bulundu. Aile içi segregasyonu amacıyla olgunun anne ve babasına ait periferik kanlardan elde edilen DNA ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda anne ve babanın aynı varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi.

1.1.1.9. Olgu 10



Şekil 23: Olgu 10'a ait aile ağacı

Tablo 15a: Olgu 10'a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	44
Paternal yaş	50
İlk gebelik yaşı	19
Gebelik öyküsü	G10A10
Akrabalık	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x2)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-A10: 6-7. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 15b: Olgu 10'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	54.308
Zararsız varyant sayısı	43.215
Olası zararsız varyant sayısı	79

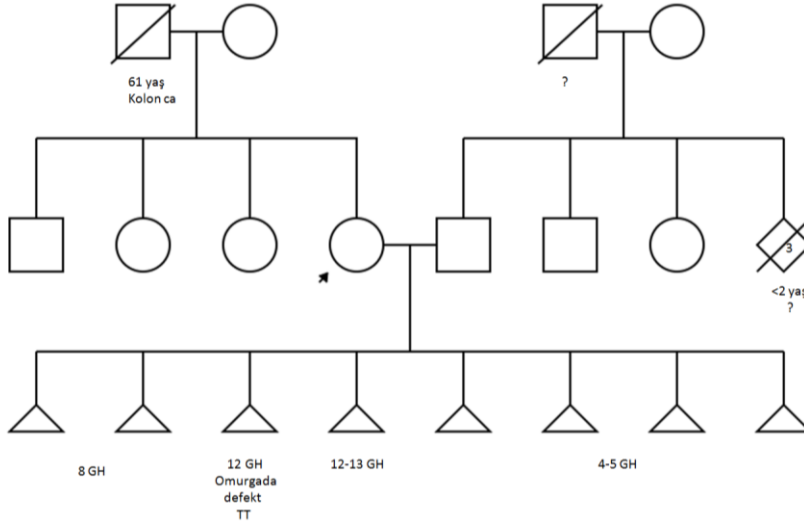
VUS varyant sayısı	10.996
Olası patojenik varyant sayısı	16
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	20.413
Heterozigot varyant sayısı	33.895
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	7.245
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	602

Tablo 15c: Olgu 10'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>ACE</i> (NM_000789.3)	OR, ?	c.596C>T p.P199L heterozigot	rs553520266 0,00005326	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen)
<i>EGFR</i> (NM_005228.4)	OD, OR	c.500T>C p.I167T heterozigot	rs765416003 0,000007955	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>GLI3</i> (NM_000168.5)	OD	c.2179G>A p.G727R heterozigot	rs121917710 0,005317	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>MMP10</i> (NM_002425.2)	?	c.497-2A>G p.(?) heterozigot	rs17860955 0,01321	VUS (ACMG) patojenik (EIGEN, MutationTaster)
<i>SLC27A3</i> (NM_024330.1)	?	c.1208C>T p.S403L heterozigot	rs199984591 0,0001869	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 10'da, kan basıncının düzenlenmesinde görevli *ACE*, embriyolojik gelişmede aktif *EGFR*, siliyopatiler ilişkili *GLI3*, metalloproteinazları kodlayan *MMP10* ve yağ asidi metabolizmasında yer alan *SLC27A3* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış beş varyant bulundu.

1.1.1.10. Olgu 11



Şekil 24: Olgu 11'e ait aile ağacı

Tablo 16a: Olgu 11'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	36
Paternal yaş	40
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G8A8
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 8. GH, A3-4: 12-13. GH, A5-A8: 4-5. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A3(G3-TT1): 46,--, A8: 46,--
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	G3(TT1): lomber spina bifida, kifoskolyoz
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 16b: Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.499
Zararsız varyant sayısı	44.950

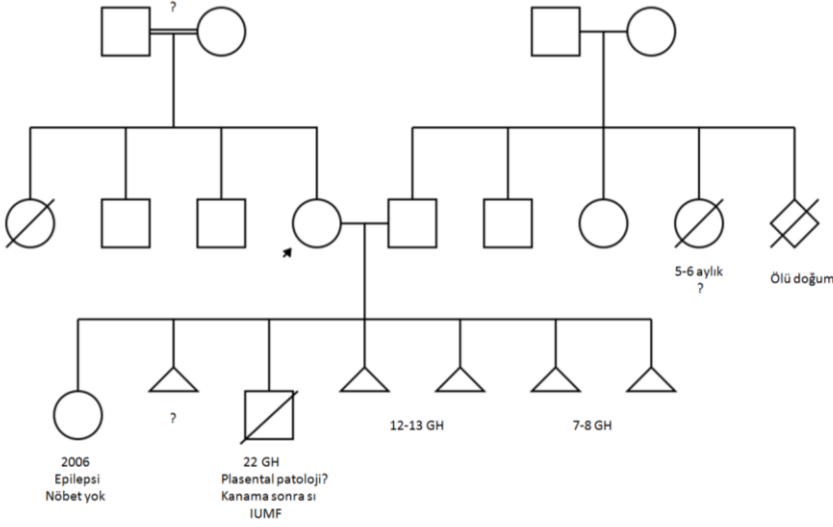
Olası zararsız varyant sayısı	69
VUS varyant sayısı	11.448
Olası patojenik varyant sayısı	31
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	19.698
Heterozigot varyant sayısı	36.801
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.830
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	631

Tablo 16c: Olgu 11'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PKHD1</i> (NM_138694.3)	OR	c.8519G>A p.R2840H heterozigot	rs373643848 0,00005336	Olası patojenik (ACMG, M-CAP)
<i>CELSR1</i> (NM_014246.1)	?	c.2110A>G p.S704G heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, MutationAssessor, MutationTaster, SIFT)
<i>MMP26</i> (NM_021801.4)	?	c.470-3C>T p.(?) heterozigot	- -	VUS (ACMG) zararsız (DANN)
<i>WNT6</i> (NM_006522.3)	?	c.208C>G p.R70G heterozigot	rs142171369 0,0007472	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 11'de, daha önce siliyer aktivite ve siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *PKHD1* geninde ACMG kriterleri ve M-CAP tahmin aracına göre olası patojenik; *CELSR1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik; metalloproteinazları kodlayan *MMP26* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, DANN tahmin aracına göre zararsız ve embriyolojik dönemde etkin *WNT6* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu.

1.1.1.11. Olgu 12



Şekil 25: Olgu 12'ye ait aile ağacı

Tablo 17a: Olgu 12'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	37
Paternal yaş	38
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	23
Gebelik öyküsü	G7P1A5IUFO1
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1: ?, A2,4: 12-13. GH, A5-6: 7-8 GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	G3: 22. GH
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 17b: Olgu 12'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	54.890
Zararsız varyant sayısı	43.722
Olası zararsız varyant sayısı	63
VUS varyant sayısı	11.063

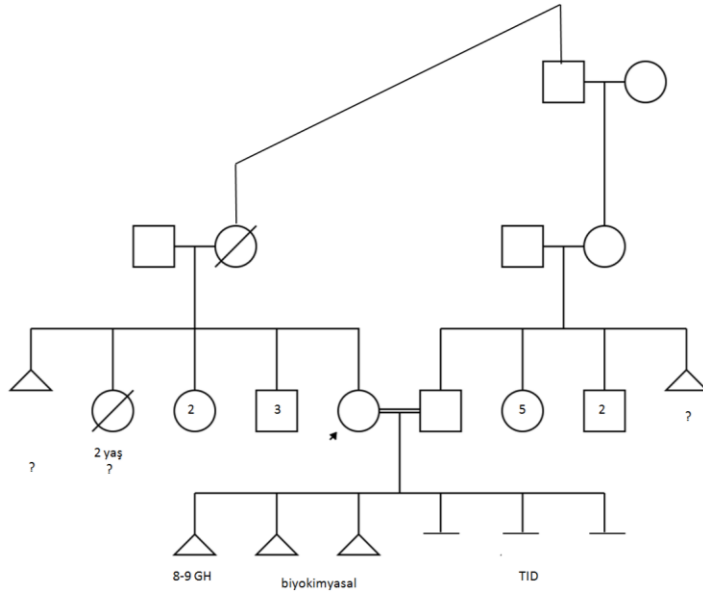
Olası patojenik varyant sayısı	38
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	20.818
Heterozigot varyant sayısı	34.072
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.267
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	610

Tablo 17c: Olgu 12'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>H6PD</i> (NM_004285.3)	OR	c.1171_1181del p.S391fs heterozigot	- -	patojenik (ACMG, GERP)
<i>ALPL</i> (NM_000478.5)	OR	c.931G>A p.E311K heterozigot	rs763457259 0,00003189	Olası patojenik (ACMG, Polyphen, SIFT)
<i>CXCL8</i> (NM_000584.3)	?	c.231T>A p.C77X heterozigot	rs536774132 0,00005997	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>HLA-DRB5</i> (NM_002125.3)	?	c.100+1G>C p.(?) heterozigot	rs79192142 0,02982	VUS (ACMG) zararsız (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 12'de, kortizon redüktaz eksiliğine yol açan *H6PD* geninde ACMG kriterleri ve GERP tahmin aracına göre patojenik; hipofofatazya ilişkili *ALPL* geninde ACMG kriterleri, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre olası patojenik; immün sistemde aktif rol alan *CXCL8* ve *HLA-DRB5* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik ve zararsız olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu. Olası patojenik olarak sınıflandırılmış *ALPL* varyantı, bu genin fetal letal sendromlar ile ilişkisi bilindiğinden ve elimizde tüm gen için tasarlanmış primerler olduğundan, eşe ait DNA ile tüm gen PZR ve Sanger dizileme çalışmalarının yapılması planlandı.

1.1.1.12. Olgu 13



Şekil 26: Olgu 13'e ait aile ağacı

Tablo 18a: Olgu 13'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	43
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	22
Gebelik öyküsü	G3A3
Akrabalık bilgisi	Eşiyle 1,5.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x3)
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 8-9. GH, A2-3: biyokimyasal, TİK (x3)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 18b: Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

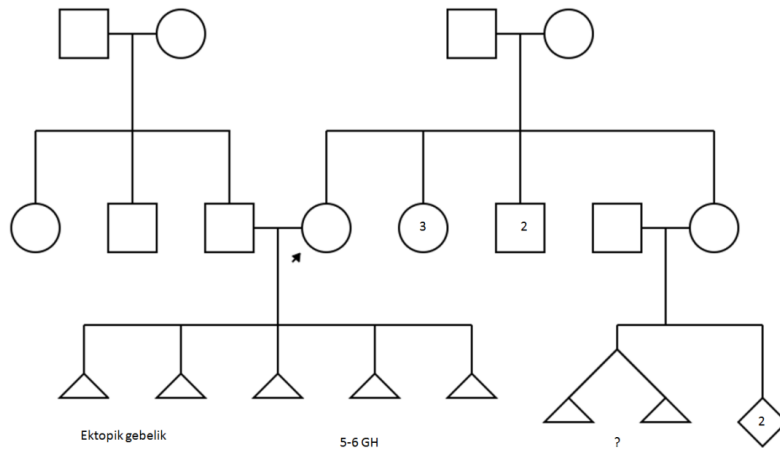
Toplam varyant sayısı	56.885
Zararsız varyant sayısı	45.155
Olası zararsız varyant sayısı	104
VUS varyant sayısı	11.593
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	7
Homozigot varyant sayısı	20.240
Heterozigot varyant sayısı	36.645
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.881
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	610

Tablo 18c: Olgu 13'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CCNO</i> (NM_021147.4)	OR	c.481_482del p.L161fs heterozigot	rs587777503 0,000007077	patojenik (ACMG, GERP)
<i>IGF2</i> (NM_001127598.2)	OD	c.97C>T p.Q33X heterozigot	rs200441006 0,0007939	patojenik (ACMG)
<i>PKD1L1</i> (NM_138295.3)	OR	c.5515delC p.L1839fs heterozigot	- -	patojenik (ACMG, GERP)
<i>CTBP2</i> (NM_001321013.1)	?	c.9delT p.L3fs heterozigot	rs144283283 -	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>EXO1</i> (NM_006027.4)	?	c.2222_2223de l p.L741fs heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>HLA-DRB5</i> (NM_002125.3)	?	c.100+1G>C p.(?) heterozigot	rs79192142 0,02982	VUS (ACMG) zararsız (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 13’te, daha önce siliyer aktivite ve siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *CCNO* ve *PKD1L1* genleri ile embriyolojik dönemde gelişme basamaklarında etkin *IGF2* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, hücre bölünmesinde aktif *CTBP2*, DNA tamir yolağında görevli *EXO1* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik ve immün sistemde yer alan *HLA-DRB5* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre zararsız olarak sınıflandırılmış toplam altı varyant bulundu. Patojenik olarak nitelendirilen *IGF2* varyantının konfirmasyonunun yapılmasının arkasından aile içi segregasyonu amacıyla olgunun babasına ait DNA ile yapılan PZR ve Sanger dizileme çalışmaları sonucunda babanın da bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edildi.

1.1.1.13. Olgu 14



Şekil 27: Olgu 14’e ait aile ağacı

Tablo 19a: Olgu 14’e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	34
Paternal yaş	42
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	30
Gebelik öyküsü	G5A3Ektopik2
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH’sı	A1-A5: 5-6. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-

Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Anti CMV IgG +, Anti Toxoplasma IgG +, Anti Rubella IgG +

Tablo 19b: Olgu 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

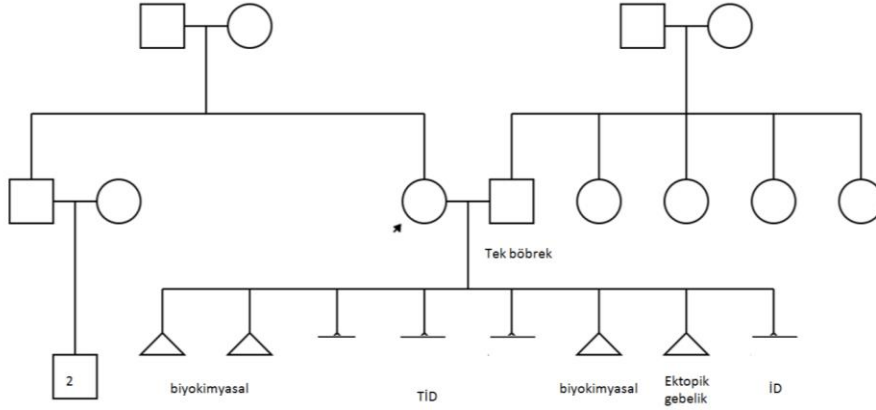
Toplam varyant sayısı	56.687
Zararsız varyant sayısı	45.150
Olası zararsız varyant sayısı	76
VUS varyant sayısı	11.430
Olası patojenik varyant sayısı	29
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.691
Heterozigot varyant sayısı	36.996
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.517
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	605

Tablo 19c: Olgu 14'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CCDC141</i> (NM_173648.3)	?	c.2611C>T p.Q871X heterozigot	rs764893847 0,00002217	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>CPT1B</i> (NM_004377.3)	?	c.167C>T p.P56L heterozigot	rs374480938 0,00001610	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 14'te, hipogonadotropik hipogonadizm etiyolojisinde yer alan *CCDC141* ve yapılmış hayvan çalışmalarında heterozigot taşıyıcılarda artmış spontan abortus oranı ile ilişkilendirilmiş *CPT1B* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

1.1.1.14. Olgu 15



Şekil 28: Olgu 15'e ait aile ağacı

Tablo 20a: Olgu 15'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	38
Paternal yaş	32
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	35
Gebelik öyküsü	G5A4Ektopik1
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-A4: biyokimyasal, TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Eşte tek böbrek
Varsa ilaç tedavisi	Gebelikler esnasında düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanımı
Ek klinik bulgu	-

Tablo 20b: Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.766
Zararsız varyant sayısı	45.243
Olası zararsız varyant sayısı	101

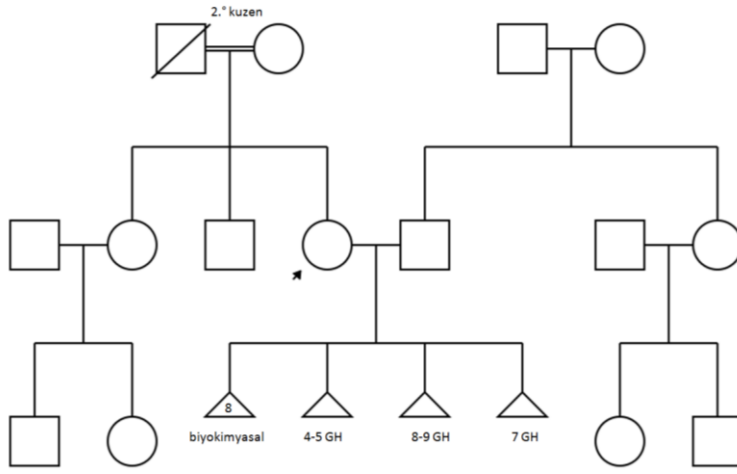
VUS varyant sayısı	11.392
Olası patojenik varyant sayısı	26
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	19.651
Heterozigot varyant sayısı	37.115
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	7.611
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	649

Tablo 20c: Olgu 15'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CCNA2</i> (NM_001237.4)	?	c.214-2insT p.(?) heterozigot	rs199853275 0,000253	VUS (ACMG) patojenik (GERP)
<i>MSH5</i> (NM_025259.5)	OR	c.1859A>G p.K620R heterozigot	rs61748589 0,005628	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>PAPLN</i> (NM_173462.3)	?	c.2077C>T p.R693W heterozigot	rs146740904 0,0001097	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>ZSCAN4</i> (NM_152677.2)	?	c.412C>T p.Q138X heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 15'te, yapılan analiz sonucunda embriyolojik dönemde etkin hücre döngüsünde görevli *CCNA2*, OR kalıtlımlı POY ile ilişkilendirilmiş *MSH5*, ayrıca embriyolojik gelişme basamaklarında yer alan *PAPLN* ve *ZSCAN4* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış dört varyant bulundu.

1.1.1.15. Olgu 16



Şekil 29: Olgu 16'ya ait aile ağacı

Tablo 21a: Olgu 16'ya ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	41
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	40
Gebelik öyküsü	G11A11
Akrabalık bilgisi	Anne ve babası 2.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-A8: biyokimyasal, A9: 4-5. GH, A10-11: 7-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	A9: 46,XY, A11: 47,XX,+15
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Memede fibrokistik hastalık Tiroid sağ lobda 5x3,5 mm nodül
Varsa ilaç tedavisi	Gebelikler esnasında düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanımı Tiroid hormon replasmanı (50 mcg 1x1)
Ek klinik bulgu	Anti Rubella IgG +

Tablo 21b: Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

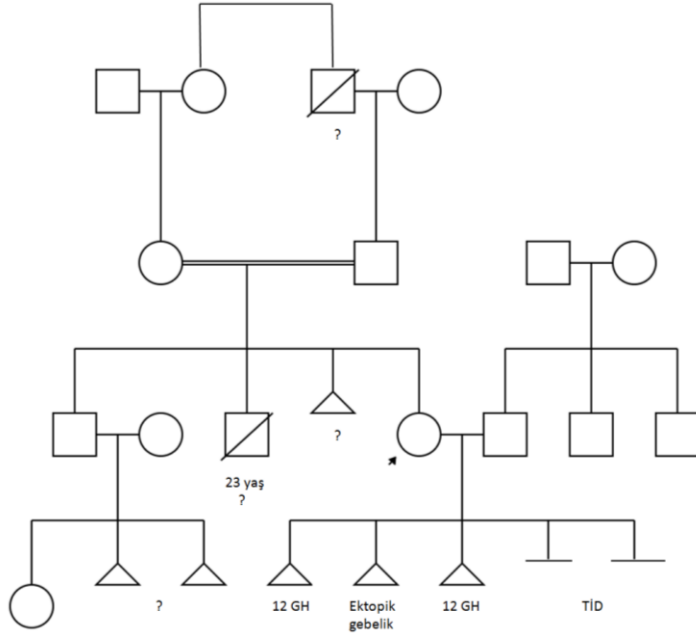
Toplam varyant sayısı	56.591
Zararsız varyant sayısı	44.930
Olası zararsız varyant sayısı	80
VUS varyant sayısı	11.556
Olası patojenik varyant sayısı	21
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	20.718
Heterozigot varyant sayısı	35.873
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.748
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	620

Tablo 21c: Olgu 16'ya ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PROKR2</i> (NM_144773.3)	OD	c.518T>G p.L173R heterozigot	rs74315416 0,002196	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 16'da, yapılan analiz sonucunda daha önce Kallmann sendromu ile ilişkilendirilmiş *PROKR2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant bulundu.

1.1.1.16. Olgu 17



Şekil 30: Olgu 17'ye ait aile ağacı

Tablo 22a: Olgu 17'ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	41
Paternal yaş	34
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	35
Gebelik öyküsü	G3A2Ektopik1
Akrabalık bilgisi	Anne ve babası 1.° kuzen
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x2)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-3: 12. GH, A2: 8-9. GH, TİK (x2)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	Hashimoto trioiditi 2019 yılında submüköz miyomektomi
Varsa ilaç tedavisi	Tiroid hormon replasmanı (75 mcg 1x1)
Ek klinik bulgu	Anti-TPO ve anti-TG ↑

Tablo 22b: Olgu 17'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

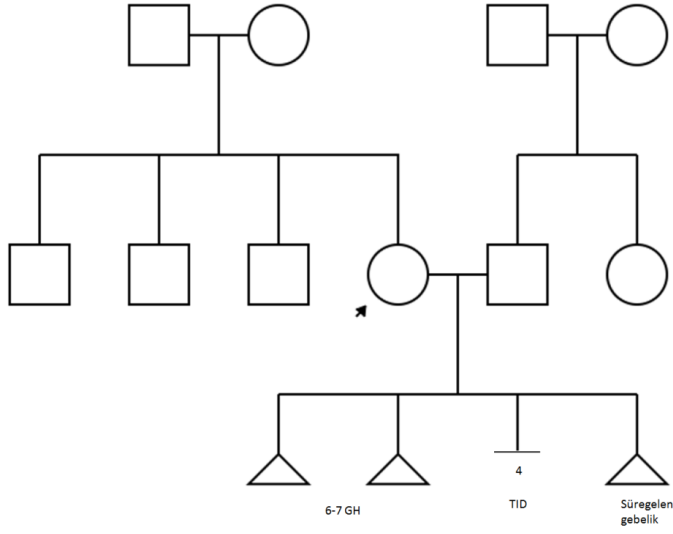
Toplam varyant sayısı	56.781
Zararsız varyant sayısı	45.010
Olası zararsız varyant sayısı	79
VUS varyant sayısı	11.667
Olası patojenik varyant sayısı	23
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.936
Heterozigot varyant sayısı	36.845
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.298
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	673

Tablo 22c: Olgu 17'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CBS</i> (NM_000071.2)	OR	c.1105C>T p.R369C heterozigot	rs117687681 0,003011	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>NOP14</i> (NM_003703.2)	?	c.376G>A p.E126K heterozigot	rs777356082 0,00003602	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>SLC5A5</i> (NM_000453.2)	OR	c.1225G>A p.G409R heterozigot	rs779236022 0,00003980	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 17'de, yapılan analiz sonucunda, hiperhomosisteinemiye bağlı tromboz ile ilişkili *CBS*, daha önce yapılmış çalışmalarda TGK ile ilişkili olabileceği öne sürülmüş *NOP14*, OR kalıtmı tiroid dishormonogezi ile ilişkili *SLC5A5* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış üç varyant bulundu.

1.1.1.17. Olgu 18



Şekil 31: Olgu 18'e ait aile ağacı

Tablo 23a: Olgu 18'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	32
Paternal yaş	39
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G3A2Süregelen1
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	YÜT (x7)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 6-7 GH, TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	G3(süregelen gebelik): 46,-- .arr[GRCh 37]Xp22.11 (23755758_24259891)x0
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	Ense kalınlığında artış (3,8 mm)
Ek hastalık öyküsü	PKOS
Varsa ilaç tedavisi	Tiroid hormon replasmanı (75 mcg 1x1)
Ek klinik bulgu	Anti-TPO ve anti-TG ↑

Tablo 23b: Olgu 18’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

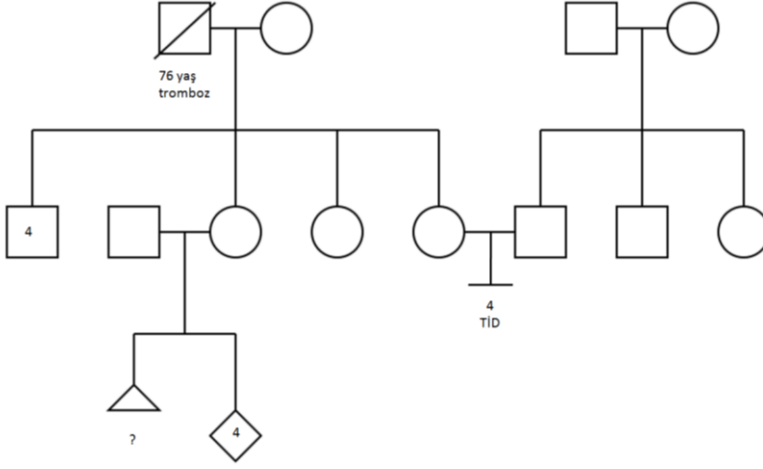
Toplam varyant sayısı	56.489
Zararsız varyant sayısı	45.119
Olası zararsız varyant sayısı	85
VUS varyant sayısı	11.262
Olası patojenik varyant sayısı	20
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.368
Heterozigot varyant sayısı	37.121
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.508
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	573

Tablo 23c: Olgu 28’e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>PROKR1</i> (NM_138964.3)	OD	c.886T>C p.C296R heterozigot	rs200892456 0,00003181	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>TPO</i> (NM_000547.5)	OR	c.512C>T p.T171M heterozigot	rs139312937 0,00002829	VUS (ACMG) patojenik (SIFT)

Sonuç: Olgu 18’de, Kallmann sendromu ile ilişkilendirilmiş *PROKR1* ve OR kalıtmı tiroid dishormonogezine yol açan *TPO* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış iki varyant bulundu.

1.1.1.18. Olgu 19



Şekil 32: Olgu 19'a ait aile ağacı

Tablo 24a: Olgu 19'a ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	45
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G0
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH'sı	TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Testis biyopsisi: spermatid düzeyinde duraklayan spermatogenez

Tablo 24b: Olgu 19'a ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.542
Zararsız varyant sayısı	44.912

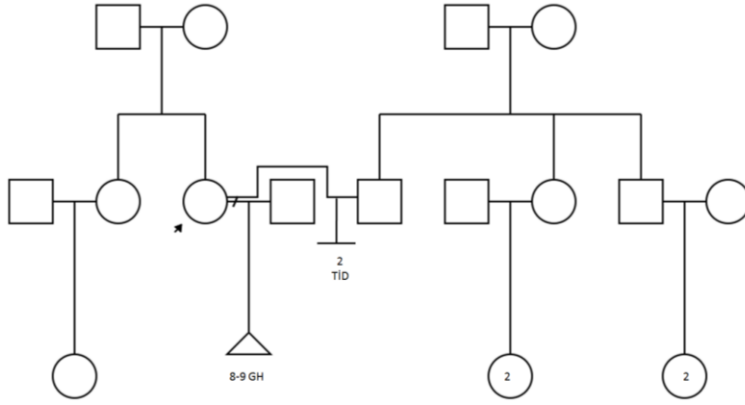
Olası zararsız varyant sayısı	88
VUS varyant sayısı	11.511
Olası patojenik varyant sayısı	30
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	19.720
Heterozigot varyant sayısı	36.822
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.700
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	590

Tablo 24c: Olgu 19’a ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CYP17A1</i> (NM_000102.3)	OR	c.1487G>A p.R496H heterozigot	rs763398879 0,000008281	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>ACE</i> (NM_000789.3)	OR	c.1739C>A p.P580H heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, SIFT)
<i>ALPPL2</i> (NM_031313.2)	?	c.68-1G>C p.(?) heterozigot	rs201675300 0,00008754	VUS (ACMG)

Sonuç: Olgu 19’da, 17 α hidroksilaz eksikliğine yol açan *CYP17A1* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre olası patojenik, kan basıncı düzenlenmesinde görevli *ACE* ve plasental alkalen fosfataz enzimini kodlayan *ALPPL2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam üç varyant bulundu.

1.1.1.19. Olgu 20



Şekil 33: Olgu 20’ a ait aile ağacı

Tablo 25a: Olgu 20’ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	42
Paternal yaş	43
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	30
Gebelik öyküsü	G1A1
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x5)
Gebelik kaybı GH’sı	A1: 8-9. GH, TİK (x2)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	Spermiyogram: az hareketli sperm

Tablo 25b: Olgu 20’ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.343
Zararsız varyant sayısı	44.920
Olası zararsız varyant sayısı	79
VUS varyant sayısı	11.305

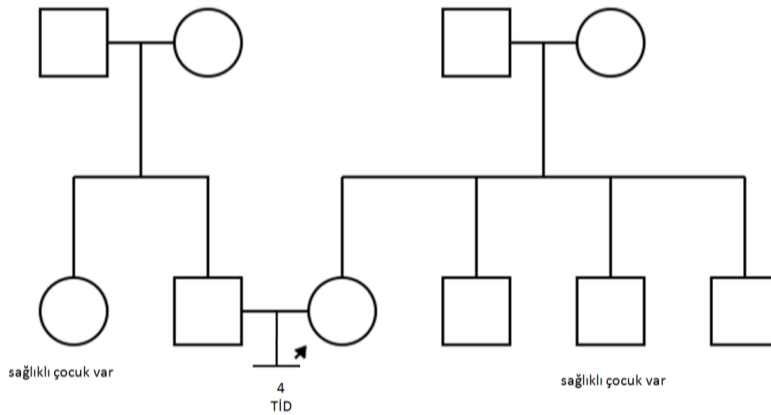
Olası patojenik varyant sayısı	38
Patojenik varyant sayısı	1
Homozigot varyant sayısı	19.512
Heterozigot varyant sayısı	36.831
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.675
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	551

Tablo 25c: Olgu 20'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CEP290</i> (NM_025114.3)	OR	c.5493delA p.K1831fs heterozigot	rs386834158 0,00002236	patojenik (ACMG, GERP)
<i>DUOX2</i> (NM_014080.4)	OR	c.1825C>T p.P609S heterozigot	rs201221237 0,00007665	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>FBN3</i> (NM_032447.4)	?	c.2957-2A>T p.(?) heterozigot	rs767566930 0,00002122	VUS (ACMG) patojenik (EIGEN, MutationTaster)

Sonuç: Olgu 20'de, yapılan analiz sonucunda siliyopatiler ile ilişkili *CEP290* geninde ACMG kriterleri ve GERP tahmin aracına göre patojenik, OR kalıtmı tiroid dishormonogenezine yol açan *DUOX2* geninde ACMG kriterleri ile SIFT ve Polyphen tahmin aracına göre olası patojenik ve PKOS ile ilişkisi olduğu öne sürülmüş *FBN3* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, EIGEN ve MutationTaster tahmin araçlarında patojenik olarak sınıflandırılmış toplam üç varyant bulundu.

1.1.1.20. Olgu 21



Şekil 34: Olgu 21'e ait aile ağacı

Tablo 26a: Olgu 21'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	43
Paternal yaş	43
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	-
Gebelik öyküsü	G0
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Başarısız YÜT (x4)
Gebelik kaybı GH'sı	TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 26b: Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	56.570
Zararsız varyant sayısı	45.263
Olası zararsız varyant sayısı	75
VUS varyant sayısı	11.203
Olası patojenik varyant sayısı	25
Patojenik varyant sayısı	4
Homozigot varyant sayısı	19.711
Heterozigot varyant sayısı	36.859
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.573
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	528

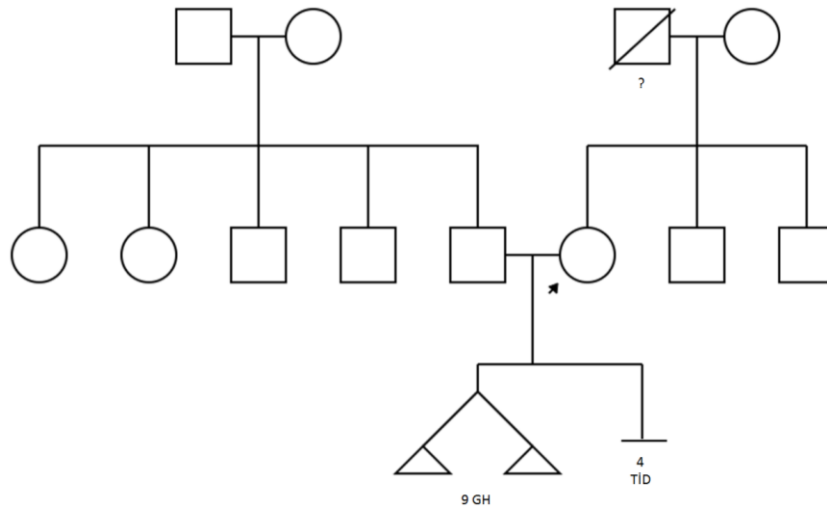
Tablo 26c: Olgu 21'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>MTOR</i> (NM_004958.3)	OD	c.307C>T p.R103X heterozigot	rs768374086 0,000003999	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)

<i>DUOX2</i> (NM_014080.4)	OR	c.1126C>T p.R376W heterozigot	rs119472029 0,00008131	Olası patojenik (ACMG, SIFT, polyphen)
<i>NOBOX</i> (NM_001080413.3)	OD	c.1067G>A p.R356Q heterozigot	rs749172175 0,00001209	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)
<i>VEGFA</i> (NM_001025366.2)	?	c.100C>T p.P34S heterozigot	rs749282093 0,000009305	VUS (ACMG) patojenik (SIFT)

Sonuç: Olgu 21’de, yapılan analiz sonucunda daha önce hücre döngüsünde etkin *MTOR* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, OR kalıtmımlı tiroid dishormonogenezine yol açan *DUOX2* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre olası patojenik, OD kalıtmımlı POY etiolojisinde yer alan *NOBOX* geni ve anjiyogenezde rol oynayan temel genlerden *VEGFA* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu.

1.1.1.21. Olgu 22



Şekil 35: Olgu 22’ye ait aile ağacı

Tablo 27a: Olgu 22’ye ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	61
Paternal yaş	63
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	31

Gebelik öyküsü	G1A2
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	YÜT (x5)
Gebelik kaybı GH'sı	A1-2: 9. GH, TİK (x4)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 27b: Olgu 22'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

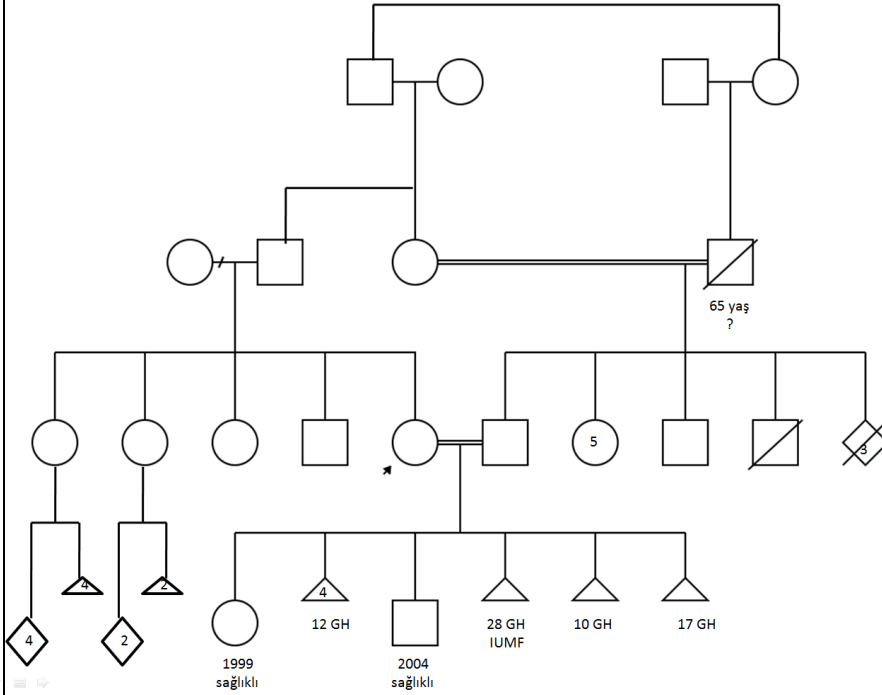
Toplam varyant sayısı	55.998
Zararsız varyant sayısı	44.791
Olası zararsız varyant sayısı	83
VUS varyant sayısı	11.108
Olası patojenik varyant sayısı	13
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.506
Heterozigot varyant sayısı	36.492
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	7.338
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	531

Tablo 27c: Olgu 22'ye ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>KIF13A</i> (NM_001105566.2)	?	c.932G>A p.W311X heterozigot	- -	patojenik (ACMG, DANN, EIGEN, MutationTaster)
<i>MAT1A</i> (NM_000429.2)	OD, OR	c.125T>C p.L42P heterozigot	rs148418705 5 0,000003976	VUS (ACMG) patojenik (SIFT, Polyphen)

Sonuç: Olgu 22'de, yapılan analiz sonucunda siliyer aktivitede rol oynayan *KIF13A* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre patojenik, hipermetiyoninemiye yol açan *MAT1A* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam iki varyant bulundu.

1.1.1.22. Olgu 23



Şekil 36: Olgu 23'e ait aile ağacı

Tablo 28a: Olgu 23'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	46
Paternal yaş	45
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	25
Gebelik öyküsü	G9P2A7
Akrabalık	1.° kuzen
Ailede benzer öykü	Kızkardeş: G8P4A4, Kızkardeş: G4P2A2
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan
Gebelik kaybı GH'sı	A1-4: 12. GH, A5: 28. GH, A6: 10. GH, A7: 17. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	G7: 28 GH
Fetal USG bulgusu	A7(G9): 17 GH erkek fetus, majör anomali yok, sendromik bulgu yok
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 28b: Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

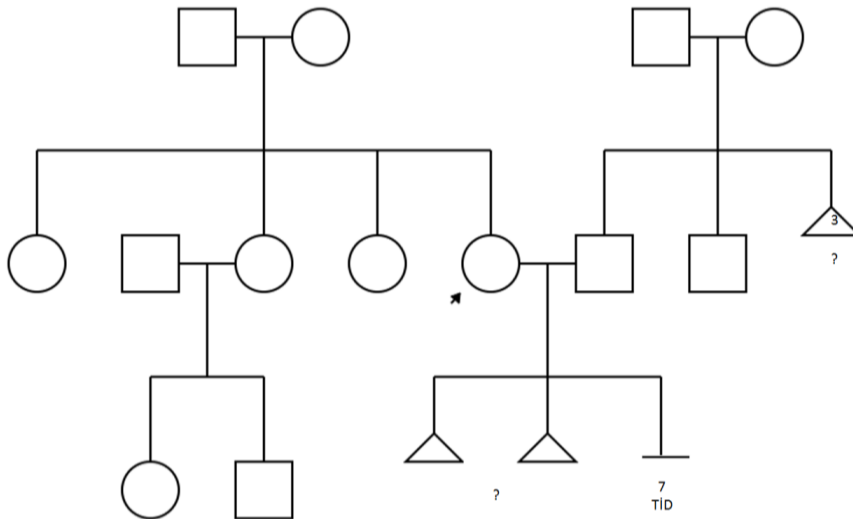
Toplam varyant sayısı	57.345
Zararsız varyant sayısı	45.309
Olası zararsız varyant sayısı	87
VUS varyant sayısı	11.914
Olası patojenik varyant sayısı	32
Patojenik varyant sayısı	3
Homozigot varyant sayısı	19.600
Heterozigot varyant sayısı	37.745
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.095
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	625

Tablo 28c: Olgu 23'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>CFTR</i> (NM_000492.3)	OD, OR	c.3154T>G p.F1052V heterozigot	rs150212784 0,0006282	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>ANXA6</i> (NM_001155.4)	?	c.1117C>T p.R373W heterozigot	rs124992919 2 -	VUS (ACMG) patojenik (Polyphen, SIFT)

Sonuç: Olgu 23'te, kistik fibroz etkeni olan *CFTR* geninde ACMG kriterleri ve tahmin araçlarına göre olası patojenik ve prostaglandin sekresyonunda yer alan *ANXA6* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Polyphen ve SIFT tahmin araçlarına göre patojenik olarak sınıflandırılmış toplam iki varyant bulundu.

1.1.1.23. Olgu 24



Şekil 37: Olgu 24'e ait aile ağacı

Tablo 29a: Olgu 24'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	40
Paternal yaş	39
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	?
Gebelik öyküsü	G9A9
Akrabalık bilgisi	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, Başarısız YÜT (x7)
Gebelik kaybı GH'sı	Bilinmiyor, TİK (x7)
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 29b: Olgu 24'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	58.172
Zararsız varyant sayısı	46.066
Olası zararsız varyant sayısı	85
VUS varyant sayısı	11.998
Olası patojenik varyant sayısı	21
Patojenik varyant sayısı	2
Homozigot varyant sayısı	19.840
Heterozigot varyant sayısı	38.332
Toplum sıklığı <0,1 olan varyant sayısı	8.540
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	636

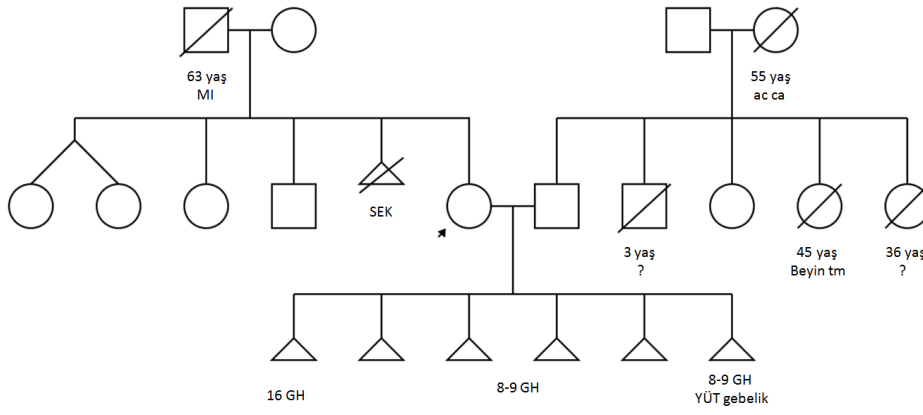
Tablo 29c: Olgu 24'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP Allel frekansı (gnomAD)	Varyant sınıflaması
<i>EGFR</i> (NM_005228.4)	OD, OR	c.2884C>T p.R962C heterozigot	rs17337451 0,00008484	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>GNRHR</i> (NM_000406.2)	OR	c.317A>G p.Q106R heterozigot	rs104893836 0,002749	Olası patojenik (ACMG, SIFT, Polyphen)
<i>MMP11</i> (NM_005940.4)	?	c.232C>T p.P78S heterozigot	rs61752251 0,0008988	VUS (ACMG) patojenik (SIFT, Polyphen)

<i>PRLR</i> (NM_000949.6)	OD, OR	c.508A>C p.I170L heterozigot	rs72478580 0,01884	VUS (ACMG) zararsız (SIFT, Polyphen)
------------------------------	-----------	------------------------------------	-----------------------	--

Sonuç: Olgu 24'te, embriyolojik dönemde etkin *EGFR* ve hipogonadotropik hipogonadizm etiolojisinde yer alan *GNRHR* genlerinde ACMG kriterleri ve varyant tahmin araçlarına göre olası patojenik, metalloproteinazları kodlayan *MMP11* ve hiperprolaktinemi nedenlerinden *PRLR* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre ise patojenik ve zararsız olarak sınıflandırılmış toplam dört varyant bulundu.

1.1.1.24. Olgu 25



Şekil 38: Olgu 25'e ait aile ağacı

Tablo 30a: Olgu 25'e ait klinik ve laboratuvar bulguları

Olgunun yaşı	46
Paternal yaşı	55
Pubertal gelişim	normal
İlk gebelik yaşı	24
Gebelik öyküsü	G6A6
Akrabalık	yok
Ailede benzer öykü	-
Gebeliğin oluşma şekli	Spontan, YÜT (x1)
Gebelik kaybı GH'sı	A1: 16. GH, A2-6: 8-9. GH
Fetal/abortus karyotip analizi	-
Geç fetal kayıp	-
Fetal USG bulgusu	-
Ek hastalık öyküsü	-
Varsa ilaç tedavisi	-
Ek klinik bulgu	-

Tablo 30b: Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları

Toplam varyant sayısı	57.748
Zararsız varyant sayısı	45.569
Olası zararsız varyant sayısı	76
VUS varyant sayısı	12.070
Olası patojenik varyant sayısı	27
Patojenik varyant sayısı	6
Homozigot varyant sayısı	19.876
Heterozigot varyant sayısı	37.872
Toplum sıklığı <%0,1 olan varyant sayısı	8.573
Daha önce tanımlanmamış varyant sayısı	669

Tablo 30c: Olgu 25'e ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda tespit edilen varyantlar

Gen (Transkript)	Kalıtım modeli	Varyant	dbSNP	Varyant sınıflaması
<i>CEP131</i> (NM_014984.3)	?	c.2120-3C>A p.(?) heterozigot	rs77382031 90,0000646 0	VUS (ACMG) zararsız (DANN)
<i>MCM2</i> (NM_004526.3)	OD	c.1670C>G p.T557R heterozigot	- -	VUS (ACMG) patojenik (DANN, EIGEN, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL, SIFT)
<i>MCM4</i> NM_005914.3	OR	c.1970C>T p.A657V heterozigot	- -	VUS (ACMG)

Sonuç: Olgu 25'te, yapılan analiz sonucunda daha önce mitotik hücre döngüsünde görevli olduğu tespit edilmiş *CEP131*, *MCM2* ve *MCM4* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, tahmin araçlarına göre ise zararsız ve patojenik olarak sınıflandırılmış toplam üç varyant bulundu.

3.3. Tartışma ve Sonuç: Projede elde edilen bulgular ve değerlendirmeleri sonucunda bir hüküm oluşturulmalı ve literatür verileri ile karşılaştırılmalıdır. Proje kapsamında varsa yöntemde gerekli görülen veya gerçekleştirilen değişiklikler gerekçeleri ile beraber bu bölümde ifade edilmeli ve sonucunda hedeflenen noktaya ulaşıp ulaşılmadığı hükmüne bağlanmalıdır.

Gebelik kaybı veya infertilite ile başvurmış olgularda ilişkili olabilecek genin saptanabilmesi, varsa nedene yönelik tedavinin ve yardımcı üreme tekniklerinde daha etkin tedavi seçeneklerinin uygulanabilmesine, bebek sahibi olabilmelerine ve ailedeki olası diğer taşıyıcıların saptanabilmesine yardımcı olabilir. Gebelik kaybı olgularında pozitif aile öyküsü özellikle kız kardeşlerde varsa, bu bireyler mutlaka çalışmaya dahil edilmelidir. Sebebi açıklanamayan olgu grubu hem büyüklüğü hem de olası nedene yönelik tedavi şansı bulamadığı için bu konuda bilimsel çalışma yapılmasını haklı kılmaktadır. Ancak, yakın geçmişe kadar Sanger dizileme ile yapılan çalışmalar gebeliğin oluşumu ve devamında etkin gen/yolakların çokluğu nedeniyle yetersiz kalmaktaydı, çünkü çalışmalar sadece belli bir gen/gen bölgesi ile sınırlı kalmaktaydı. YND yöntemleri ile çoklu gen/gen bölgeleri, genlerin anlatım düzeyleri ve fonksiyonel çalışmalar yapılabilmekte olup, her geçen gün artarak kullanımıyla pek çok hastalıkta olduğu gibi tekrarlayan fetal kayıp ya da infertilite sorununda etiyolojik etkenlerin aydınlatılmasına ve olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek ve ailelere çocuk sahibi olma imkanı sunabilecek güçtedir.

Literatür göz önüne alındığında, TGK olgu grubunda etiyolojiyi aydınlatmak için yapılan tüm ekzom dizileme çalışmalarında 4 ana olgu inceleme yolu izlendiği görülmektedir (262). En çok tercih edilen çalışma yöntemi, fetal materyallerde letal etkili varyant/ları araştırmak amacıyla, fetus ile anne ve babayı eş zamanlı incelemeyi hedefleyen üçlü TED analizleridir. Fetal materyal olmadan, anne ve baba adayında heterozigot patojenik varyantları hedefleyen ikili çalışmalar da mevcuttur. Embriyonik gelişim basamaklarını etkileyen genetik faktörleri gebelik ürününe olası etkileri açısından araştırmayı ele alan bu çalışma modelinin dışında, literatürde sadece anne adaylarının incelendiği, TGK ve/veya infertilite etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünülen genlerin Sanger dizileme ya da panel-gen testleri ile incelendiği çalışma modelleri de bulunmaktadır. Çalışma grubunu TGK öykülü dişi olgulardan oluşturarak yapılmış ilk TED çalışması, farklı ülkelerden 49 dişi olgu ile yapılmış olan 2017 yılında yayınlanan Quintero-Ronderos ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Mayıs 2020’de 61 TGK ve 14 dişi infertilite olmak üzere toplam 75 olgu ile yapılan ikinci bir TED analiz çalışmasının sonuçları yayınlanmıştır (263). İlgili çalışma olgu seçim kriterleri açısından bizim çalışmamız ile benzerlik

göstermektedir. Çalışmamızda en az 3 gebelik kaybı veya YÜT denemesi öyküsü olmasına dikkat edilmiş, ailelerin çocuk sahibi olması, olası OR kalıtmı genlerin tespitinde fayda sağlayabileceği için dışlama kriteri olmamıştır. Bugüne kadar TED analizleri ile tekrarlayan fetal kayıp ve infertilite etiyolojisinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaların yetersizliği açıktır. Bu tez çalışması, bu konuya bilimsel katkı sağlaması, ciddi olgu seçim kriterleri ve sadece Türkiye’den olgular seçilerek yapılmış olması nedeniyle ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.

1.1.2. Metabolik Yolaklarda Görevli Genler

Metabolik yolaklarda 13 olguda 14 gende ACMG sınıflandırmasına göre VUS olarak nitelendirilen 10 varyant ile 5 patojenik ve 1 zararsız varyant saptanmıştı. Bu genler şunlardır; **CBS** (Olgu 13), **COL11A1** (Olgu 13), **CPT1B** (Olgu 17 ve 24), **SLC27A3** (Olgu 20), **ALPL** (Olgu 22), **H6PD** (Olgu 22), **ALPPL2** (Olgu 11 ve 29), **CYP17A1** (Olgu 29), **MAT1A** (Olgu 32), **PRLR** (Olgu 34), **SLC5A5** (Olgu 27), **TPO** (Olgu 28), **DUOX2** (Olgu 30 ve 31), **ZMPSTE24** (Olgu 12).

Olgu 3’te farklı metabolik yolaklarda aktif **CBS** ve **COL11A1** genlerinde VUS kategorisinde iki varyant saptandı. Sistatyonin beta sentaz enzimini kodlayan **CBS** geni, homosistein ve serin aminoasitlerini birleştirerek sistatyonini oluşturur. OR kalıtmı hiperhomosisteinüri ve hiperhomosisteinemiye bağlı trombozlar ile (MIM #236200) ilişkilendirilmiştir. Homosistein yüksekliğinin gebelik kaybı, preeklampsi, IUGG ve nöral tüp defektleri gibi fetus ve gebelik üzerine olumsuz etkileri bilindiğinden TGK etiyolojisini açıklamaya yönelik olarak homosistein düzeyi ölçülmektedir. Fare çalışmalarında embriyolojik dönemde kalp, karaciğer, iskelet ve sinir sisteminde anlatımının olduğu gösterilmiş (277), biallelik olarak susturulduğunda ağır gelişme geriliği ve postnatal ilk birkaç gün içinde ölüm gözlenmiştir (278). Ayrıca birçok genin anlatımını etkileyerek implantasyon aşamasında desidualizasyonu bozduğu (279) ve uterin hücrelerde endoplazmik retikulum stresini arttırarak infertiliteye yol açtığı (280) gösterilmiştir. Uzak akraba evliliği olan çiftimizin, eşte de bu varyant/gen için incelenmesi, olgumuzda homosistein düzeyinin ölçülerek ve VUS olarak değerlendirilen varyantın gen anlatımını etkileyip etkilemediğinin ve monoallelik etkisinin araştırılması planlandı. Aynı olgudaki diğer VUS varyantın bulunduğu kollajen tip 11’i kodlayan **COL11A1** geni büyüme plağındaki kondrositlerin farklılaşması ve gelişiminde etkindir. Patojenik varyantları lumbar disk hernisine yatkınlık, OD kalıtmı sağırılık tip-37, Marshall sendromu, Stickler sendromu tip-2 ve OR kalıtmı fibrokondrojeniz tip-1 ile ilişkilendirilmiştir. Fibrokondrojeniz (MIM #228520), fasiyal dismorfizm, rizomelik cücelik,

çan şeklinde dar bir toraksın görüldüğü intrauterin dönemde ya da hayatın ilk günlerinde letalite ile sonuçlanan bir sendromdur (281). Olgunun eşinde monoallelizm ve abortus materyalinde biallelik yapının gösterilmesi durumunda, VUS olarak tanımlanan varyantın değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

İki olgumuzda 2 farklı VUS varyantı saptadığımız **CPT1B** geni (Olgu 7 ve 14), mitokondriyal yağ asidi β oksidasyon yolağında etkindir ve patojenik varyantlar, asemptomatik klinikten ani ölüme giden bir yelpazede değişken etki gösterebilir. Genin susturulduğu fare çalışmalarında, embriyoların daha preimplantasyon döneminde iken bu enerji yolağının yokluğunu tolere edemedikleri ve öldükleri bulunmuştur (282). Bu iki olgunun eşlerinde genin monoallelizm ve/veya abortus materyalinde biallelik değişimlerin gösterilmesi, VUS olarak tanımlanan varyantın değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

SLC27A3 gen ürünü, bir hücre membran proteini ve uzun zincirli yağ asitlerinin transferinde görev alır. Fare plasentaları ile yapılan çalışmalarda aktif anılamının olduğu ve maternal obezite ile anılamının değişebildiği gösterilmiştir (283). İnsan plasentaları ile yapılan transkriptom çalışmasında **SLC27A** (**FATP**) grubu genlerinin yüksek anılamının olduğu tespit edilmiştir (284). Olgumuzun VUS kategorisindeki varyantın (Olgu 10), kontrol grubu ile yapılacak fonksiyon çalışmaları ile gen anılamına etkisinin tespit edilebileceği düşünüldü.

ALPPL2 geni (OR), alkalen fosfatazin plaseenta için spesifik formunu kodlar. Fonksiyonları hala tam olarak bilinmemekle birlikte, pankreas kanseri için belirteç olarak değerlendirilmektedir (285). Mart 2020’de yayınlanan bir çalışmada, hem insan hem de fare embriyolarının pluripotent kök hücre yüzey belirteçlerini belirlemek ve embriyogenezin önemli yollarını açıklamak için gen anılamları incelenmiş, **ALPPL2** her iki canlıda en yüksek anılamı olan gen olarak tespit edilmiştir. Fare embriyolarında gen susturulduğunda hücre yapısının bozulduğu, hücre gelişimi, membran düzenlenmesi ve temel metabolik yollarla aktif genlerin anılamlarının düzensizleştiği görülmüştür (286). Olgu grubumuzla ilişkili olabilecek bu genin kalıtım modeli ve olası fenotipik etkileri üzerine yeterli çalışmalar henüz bulunmamaktadır. İki olgumuzda (Olgu 1 ve 19) monoallelizm saptanan varyantlar VUS olarak tanımlanmış olsa da, olguların eşlerinde aynı gen için dizi analizi ve ailede segregasyon analizi yapılması ve taşıyıcıların gebelik plasentalarında alkalen fosfataz düzeylerinin incelenmesinin varyantın etkisinin araştırılmasına katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Olgu 22’de VUS kategorisinde varyantını saptadığımız metabolik yolaç geni **MAT1A** (10q22.33), metiyonin ve ATP’den adenoilmetiyonin sentezinde görevli, S-adenoilmetiyonin

sentetaz olarak da bilinen metiyonin adenoiltransferaz enzimini kodlar. Adenoilmetiyonin, birçok transmetilasyon reaksiyonunda önemli bir metil grubu sağlayıcısıdır. Patojenik varyantların OD veya OR kalıtlı hipermetiyoninemi ve metiyoninasetil transferaz eksikliğine yol açtığı bildirilmiştir (MIM #250850). Çoğu hasta klinik olarak bulgu vermez, artmış serum metiyonin düzeyi ile fark edilebilir. 2018 yılında fareler ile yapılan bir çalışmada, maternal hipermetiyonineminin fetal gelişim esnasında nöron sayısı, apoptoz, sinir büyüme faktörü ve nörotrofik faktör düzeyleri; metabolik enerji yolağı (süksinat dehidrojenaz, kompleks II ve sitokrom c oksidaz), Na⁺/K⁺ ATPaz anlatımı; ödem oluşumu ve inflamatuvar belirteçler (tümör nekroz faktörü-alfa ve interlekin-6) ile fetal ensefalondaki mitokondriyal hidrojen peroksit düzeylerini etkileyerek beyin hasarı ile ilişkili olabileceği söylenmiştir (287). OD kalıtım olasılığı da göz önünde bulundurularak olgumuzda saptanan henüz VUS olarak değerlendirilen varyant için aile içindeki diğer olası taşıyıcıların gebelik öykülerinin değerlendirilmesi ve metiyonin düzeyinin araştırılmasının varyantın klinik etkisine önemli katkı sağlayabileceği düşünüldü.

PRLR geni, plasental laktojen, prolaktin ve büyüme hormonu tarafından kullanılan aynı prolaktin reseptörünü (PRLR) kodlar. Gen, OD ve OR kalıtlı hiperprolaktinemi ile ilişkilendirilmiştir (MIM #615555). Prolaktin düzeyi, korpus luteumun devamlılığında rol oynar ve 100 ng/ml gibi yüksek oranları progesteron sentezini durdurarak luteal faz defektine yol açar (288). *Prlr* geninin biallelik olarak sürdürüldüğü fare çalışmalarında, fertilizasyon sonrasında embriyonal gelişmenin durduğu, nadiren blastosist aşamasına geldikleri fakat implante olamadıkları görülmüştür (289). Ekzojen progesteron tedavisinin başarılı olması üzerine, patolojinin *Prlr* aracılığıyla uyarılan progesteron sentezinin yetersiz olması, implantasyon gerçekleştiğinde de desidual *Prlr* yokluğunun gebelik kaybına yol açması olduğu ileri sürülmüştür (290). Olgumuzdaki (Olgu 24) monoallelik varyantın zararsız olarak nitelendirilmesi etiyojolojiyi açıklamakta yetersiz kalmakta ancak, YND çalışmasında tüm genin kapsanıp kapsanmadığı varsa kapsanmayan bölgelerin araştırılması ve patojenik bir varyant saptanması durumunda varyantın etkisi yatkınlık ilişkili polimorfizm olarak yeniden tartışılabilir.

Çalışmamızda 4 olguda Tiroid Dishormonogezi (OR) ile ilişkilendirilmiş *SLC5A5* (Olgu 17), *TPO* (Olgu 18), *DUOX2* (Olgu 20 ve 21) genlerinde varyant tespit edilmişti. *TPO* gen polimorfizmlerinin otoimmün tiroid hastalıkları veya hipotiroidi ile ilişkisinin incelendiği çalışmalar bulunmakla birlikte (291), yetişkin gruptaki etkilerinin değerlendirildiği kapsamlı bilimsel çalışmalar bulunmamaktadır. Tiroid hormonu ile ilişkili patolojilerin gebelik

kayıplarındaki yeri çok iyi bilinmektedir. Örneğin, TKG etiolojisinde sıkça çalışılan genlerden biri *CTLA4* geni OD kalıtmımlı Hashimoto tiroiditi ile ilişkilidir (292). Bu nedenle tiroid patolojilerine yol açan diğler genlerin monoallelık varyantlarının tiroid hormonları ve fonksiyonları üzerine etkisinin değlerlendirilmesi de düşünölmelidir. *SLC5A5* ve *TPO* genlerinde saptanan varyantlarımız VUS kategorisinde kaldığı için etiolojiyi açıklamada yetersiz kalmaktadır. TİK öykömlü Olgu 20 ve 21’de klinik olarak hipotiroidi tespit edilmemiş olmakla birlikte olgularda saptanan olası monoallelık ‘olası patojenik’ varyantların klinik ile ilişkili olabileceğı düşünöldü. Bu varyantlar için aile içi ve daha yüksek sayıda olgu ve popölasyon çalışmaları ile *DUOX2* geninin monoallelık varyantlarının incelenmesi ile henüz ‘olası patojenik’ olarak değlerlendirilen varyantların ‘patojenik’ olarak değlerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

ZMPSTE24 genindeki biallelik patojenik varyantlar (OR) fasiyal dismorfizm, letal genodermatoz, eklem ankilozlarının göröldüğü intrauterin ya da doğumdan sonraki ilk haftada letal seyirli bir sendrom olan letal restriktif dermopati (MIM #275210) ve tip-B lipodistrofili mandibuloakral displazi (MIM #608612) ile ilişkilendirilmektedir. Saptadığımız gen varyantı, ACMG sınıflandırmasına göre ‘patojenik’ olarak nitelenmiştir. Akraba evliliğı nedeniyle olgunun eşinde aynı varyant araştırılmış ve saptanamamış, ancak tüm gen dizi analizi yapılmadığından diğler olası varyantlar dışlanmamıştır ve bu olguda genetik etioloji açıklanamamıştır.

ALPL geni, alkalen fosfataz enzimini kodlar ve patojenik gen varyantları OR hipofosfatazya (ağır prenatal letal, infantil, çocukluk, yetişkin) ve odontohipofosfatazya ilişkilidir. Infantil hipofosfatazya (MIM #241500), hiperkalsemi ve kemiklerin yetersiz mineralizasyonu nedeniyle ağır iskelet deformitelerinin göröldüğü, intrauterin dönemde ölümcöl bir hastalıktır (293). Olgumuzda saptanan patojenik gen varyantı, fetusta biallelik olması durumunda genetik etiolojiyi açıklayabileceğinden olgunun eşinde tüm gen Sanger dizileme yapılması planlandı. Ayrıca bu patojenik varyant için aile içindeki heterozigot taşıyıcılarının ve gebelik öykülerinin araştırılması uygun olacaktır. Bu olgumuzda patojenik olarak nitelendirilen ikinci bir varyant *H6PD* geninde saptanmıştır. Bu gen heksoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimini kodlar ve biallelik patojenik varyantları kortizon redöktaz eksikliği tip-1 (MIM #604931) ile ilişkilidir. Kortizon redöktaz eksikliği, 11β hidroksisteroid dehidrojenaz (HSD11B1) enzimi ile kortizondan aktif glukokortikoid kortizolün üretilmemesi nedeniyle oluşur. Kortizol döngüsünün yetersizliği sonucunda ACTH aracılı adrenal hiperandrojenizm oluşur, erkeklerde psödopuberte prekoks; dişilerde hirsutizm, oligomenore ve infertilite görölür (294). Bu

varyantın olgumuzda monoallelilik olması fenotipi açıklamada yetersizdir ancak YND tekniğinin limitlerinden olan kapsanmayan bölge ya da diğer alleldeki olası gen delesyonları olasılığı nedeniyle bu incelemelerin uygulanması planlandı. Ayrıca enzim aktivitesinin değerlendirilmesi ve yolak üzerine etkilerinin görülmesi amacıyla fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu görüldü.

Konjenital adrenal hiperplazi ile ilişkilendirilmiş (MIM #202110) **CYP17A1** geni, patojenik varyantları kısmi ya da tam 17 hidroksilaz/17-20 liyaz eksikliği oluşur ve gen mutasyonları olguların %2'den azından sorumludur. Steroidogenez basamaklarında etkin genlerin, TGK etiyojisindeki yerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada **CYP17A1** polimorfizmleri incelenmiş; yaştan ve düşük sayısından bağımsız, hem heterozigot hem de homozigot formdaki varyantların gen-doza etkisine bağlı olarak artmış risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (295). Olgu 19'da saptanmış olduğumuz heterozigot varyantın (c.1487G>A) incelendiği bir çalışmada, monoallelilik olgularda enzim aktivitesinin yaklaşık %30 azaldığı, gonad dokularında etkinin daha yüksek olabileceği belirtilmiştir (296). Bu nedenle, olgumuzda saptanan patojenik bu varyantın fenotip ile ilişkili olabileceği, ayrıca olguda saptanan **ACE** geninde de varyant saptanmış olması multigenik kalıtım olasılığının etiyojide etkin olabilme olasılığı düşünüldü.

1.1.3. İmplantasyonda Etkin Genler

TGK ve TİK olgularıyla yapılan çalışmalarda incelenmiş ve etiopatogenezde etkili olduğu ortaya konmuş implantasyon aşamasında etkin 5 gen ve varyantlarını 6 olgumuzda saptadık. Bu genlerin özellikleri ve yapılmış çalışmalar ayrıntılı olarak Tablo 5-1'de gösterildi.

Tablo 31: Çalışma kapsamında saptanan implantasyon ile ilişkili genler

Gen	Olgu	Etkin olduğu yolaklar	İlişkili fenotipler	Model organizma ve transkripsiyon çalışmaları	Fenotip ile ilişkisi
ANXA6 (5q33.1)	23	Miyometriyal aktivite, fibroblast göçü, endozom oluşumu, ekzositoz (297) Endometriyal reseptivitede kilit rol (298)	-	TİK'te anlatım ↑ (299)	Güçlü bir aday gen; aynı protein ailesinden ANXA5 OD kalıtlı TGK ile ilişkili (MIM #614391)

<i>GNRHR</i> (4q13.2)	24	Santral hormon düzenlenmesi, üreme fonksiyonlarının kontrolü	Hipogonadotropik hipogonadizm tip-7 (OR) (MIM #146110)	İlk trimesterde sitotrofoblast, sinsityotrofoblast, ekstrasillöz trofoblast hücreleri; desidua ve plasenta (300-306)	Monoallelik ve VUS varyant; etiyojolojiyi açıklamada yetersiz
<i>MMP10</i> (11q22.2)	6 - 10	Ekstrasellüler matriks ve bazal membran yeniden düzenlenmesi	Epidermolizis bülloza distrofi, TGK (c.595G>A) (220)	Geç sekretuvar fazda anlatımı ↑ (315); Sebebi açıklanamayan infertilite olgularında anlatımı ↓ (31)	Monoallelik ve VUS varyant (c.497-2A>G); tek başına etiyojolojiyi açıklamada yetersiz
<i>MMP11</i> (22q11.23)	24	Ekstrasellüler matriks yeniden düzenlenmesi embriyogenez, doku tamiri	Dermatofibrom (316)	Gebelik boyunca uterusu aktif (317); preeklampside anlatımı ↓ (318)	Tek başına etiyojolojiyi açıklamada yetersiz
<i>MMP26</i> (11p15.4)	11	GDF15 ile birlikte plasantasyon (319), implantasyon (320)	Sebebi açıklanamayan infertilite olgularında anlatımı ↓ (31)	PKOS'ta implantasyon penceresinde anlatımı ↓ (321)	Tek başına etiyojolojiyi açıklamada yetersiz

Anneksinler; membran hareketleri, proliferasyon, apoptoz gibi çok sayıda hücre içi faaliyetlerde görevli, Ca^{+2} iyonu ile regüle edilen fosfolipid ve membran bağlayıcı proteinlerdir (322). Desidualize endometriyal stroma hücreleri, implantasyonun gerçekleşeceği bölgede hareket halindedirler; bu hareketin bozulmasının implantasyon hatasına neden olduğu ileri sürülmüştür (323) ve bir çalışmada TGK olgu grubunda bu hareketliliğin oldukça artmış olduğu gösterilmiştir (324). *ANXA6* geninde (Olgu 23) saptanan varyant (rs1249929192) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, in silico varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak nitelendirilmekte ve gnomAD veri tabanında 248.132 bireyin genom çalışmasında hiç saptanmamış olması bu olasılığı desteklemektedir. *ANXA6* geninde saptanan bu varyantın etiyojolojiyi açıklayabileceği kararına varıldı. Olgunun benzer gebelik kaybı öyküsü olan iki kız kardeşinin de bu varyant açısından incelenmesi planlandı. Bu kardeşlerde aynı varyantın saptanması varyantın 'patojenik' etkisini destekleyecektir.

Trofoblastik hücre topluluklarında *GNRH* ve *GNRHR* genlerinin anlatımının yüksek

bulunması üzerine bu gen ürünlerinin otokrin ve/veya parakrin etkilerle hücrelerin davranışlarını düzenleyici etki gösterdiği hipotezi geliştirilmiştir (325). MMP'ler (matriks metalloproteinaz) ile sıkı etkileşim içinde olan GNRH ve GNRHR proteinlerinin plasental anlatımları 6 ila 12. GH arasında en yüksek düzeylerdedir ve ilk trimester boyunca yüksek seyrederek (326-328). Deskuamasyonda etkin matriks metalloproteinazlarından -1, -3 ve -10 menstrüel fazda artarken; -26 (endometaz) proliferatif fazda, implantasyon penceresinde artış gösteren tek MMP'dir ve bu doku yeniden düzenlenmesinde ve implantasyonda yer aldığının belirteçidir (329). Çalışmamızda saptanan *GNRHR* ve *MMP*- gen varyantlarının monoallelik olmaları nedeniyle etiyolojiyi açıklamakta yetersiz kaldığı görüldü. Ancak, diğer allellerin kapsanmayan bölge ve olası gen delesyonları ya da multigenik etkiler bu aşamada dışlanamadığından olguların çalışması henüz tamamlanmamıştır.

1.1.4. Plasentasyon, Anjiyogenez ve Koagülasyonda Etkin Genler

Gebeliğin oluşumu ve devamı için gerekli olan basamaklardan biri de damarların oluşumu, plasentanın gelişmesi ve fetal dolaşımın sağlanmasıdır. Bu yolakta 7 olguda, 7 gende 1 patojenik ve 7 VUS olarak nitelendirilmiş varyant saptadık.

Kalıtsal trombofili etiyolojisinde yer alan ve iyi bilinen genlerden *F5*'in TKG etiyolojisindeki yerini tespit etmek amacıyla *FVL* p.R506Q mutasyonunun sıkça incelendiği, OD kalıtsal TKG (MIM #614389) ile ilişkilendirildiği ve monoallelik formda ~%4 sıklıkla görüldüğü bilinmektedir (330). Toplum sıklığı <%1 olan varyantları değerlendirdiğimiz bu çalışmada saptadığımız ve veri tabanlarında VUS olarak nitelendirilmiş varyantlardan biri bu gende idi (Olgu 2). Trombofili ile ilişkili genlerin 20. GH sonrasındaki fetal kayıplarla ilişkili olduğundan ve <10. GH kayıplar ile ilişkisi henüz bilinmediğinden daha fazla olguya ait sonucun bilinmesi gerekmektedir. Olgunun kız kardeşinin de 4 gebelik kaybı bulunduğu, onda bu varyantın araştırılmasının çalışmaya katkısı olabileceği düşünüldü. Akraba evliliği olan olgunun 3 farklı gende daha 3 varyant (2 patojenik, 1 VUS) için heterozigot taşıyıcı olması nedeniyle bu varyantlar için de değerlendirilmesinin uygun olacağı kararlaştırıldı.

Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) anjiyotensin-I'i anjiyotensin-II'ye dönüştüren, vasküler homeostaz, inflamasyon ve anjiyogenezde etkin bir çinko metalloproteinazdır (333). Yapılan çalışmalarda embriyo implantasyonunda etkin olan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) aktivitesi ile etkileşimde olduğu tespit edilmiştir (334). Olgu 10 ve 19'da VUS olarak nitelendirilmiş iki farklı varyantını tespit ettiğimiz *ACE* geni, intron 16'daki 287 bp'lik insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmi ile TKG etiyolojisinde aday gen varyantlarından biri

olarak değerlendirilmektedir (335, 336). Olgu 19’da hormonal aktiviteleri ile bilinen *CYP17A1* (patojenik) ile plasenta gelişiminde etkin *ALPL2* (VUS) ve *ACE* genlerinin birlikte etki göstererek etiyojolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Bu üç genin birlikte etkisinin fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmesi kararlaştırıldı.

Plasentasyon ve anjiyogeneze etkin *EGFR* gen ürünü, plasentada en çok saptanan büyüme hormonlarından olup, trofoblastik çoğalma ve invazyonunu uyaran bir epiteliyal mitojendir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada erken gebeliğin devamında önemli yere sahip olduğu ve susturulduğunda 3.000’e yakın genin anlatımının bozulduğu gösterilmiştir (337). *EGFR* proteini, EGF, TGF- α , heparin bağlayıcı EGF, amfiregülin, betasellulin, epiregülin gibi immün hücrelerden salınan proteinler için reseptör görevi görür ve maternal immün toleransta etkindir (338, 339). Spontan abortus dokularıyla yapılan çalışmalarda desidual hücrelerdeki yüksek *EGFR* anlatımının invazyonu bozacak şekilde ekstrasvillöz trofoblastların uyarılmasına, agresif ve tahrip edici invazyona yol açarak düşüğe sebep olabileceği ileri sürülmüştür (340). Olgu 20’de etkileşimli genler olmasalar da implantasyon ve plasenta gelişiminde etkin olan *MMP10* (VUS), *EGFR* ve *ACE* varyantlarının birlikte etki ederek etiyojolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Birlikte poligenik etkilerinin gösterilebilmesi için fonksiyonel çalışmalar yapılması kararlaştırıldı.

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) ailesi plasental vaskülogenez ve anjiyogeneze temel işleve sahip proteinlerdir (61). Bu protein ailesinden VEGFA, VEGFB ve PIBF, VEGFR1 olarak da bilinen FLT1’e bağlanırlar. FLT1 sinsityotrofoblastlarda ve plasental villus endotel hücrelerinde bulunur (341). Villöz trofoblastların yüksek düzeylerde VEGFA ve reseptörü FLT1 anlatımı yaptıkları gösterilmiştir (342). Progesteron, östrojen ve androjenler; VEGFA anlatımını aktive eder (343-345). VEGFA, vazodilatasyon, anti-apoptoz ve damar geçirgenliğinin artması etkileriyle iyi bilinen anjiyogenik faktörlerdendir (346). Reseptörleri ile oosit gelişimi, implantasyon, fetal gelişme ve plasentasyon aşamalarında *FLT1* geni ile birlikte görev alır (347). Genin fonksiyon kayıplarında gebelik kayıpları, intrauterin fetal ölüm ve büyüme geriliği ile preeklampsi görülebilir (348, 349). *FLT1* geninde (Olgu 8) saptanan varyant (rs1158779072) ACMG kriterlerine göre patojenik olarak nitelendirilmiş ve gnomAD veri tabanında 115.552 bireyin genom çalışmasında sadece 1 erkek bireyde heterozigot olarak saptanmıştır. *FLT1* geninde saptanan bu varyantın etiyojolojiyi açıklayabileceği düşünülerek benzer öyküsü bulunan kızkardeşte aynı varyantın çalışılması kararlaştırıldı. Olgu 31’de saptanan *VEGFA* gen varyantı henüz VUS olarak nitelendirilmiş olup, tek başına etiyojolojiyi bu aşamada açıklayamamaktadır.

VEGF protein ailesi, tüm bu işlemleri yerine getirirken PROKR1 ve PROKR2 ile de etkileşimdedir (350). Prokinesitin deneni peptid ailesi PROK1, PROK2 ve PK2L olmak üzere 3 üye içerir. PROK1, anjiyogenik mitojendir ve feto-maternal kan dolaşımının sağlanmasında görevlidir (350), PROK2 ise olfaktör çıkıntının gelişmesinde etkindir (351). PROKR1 ve PROKR2, bu proteinlerin reseptörleri olarak tüm yolaklarda birlikte çalışır. PROKR2 beyin ve testislerde; PROKR1 dalak, prostat, kalp ve damar hücreleri gibi periferik dokularda yerleşirken; dişi üreme sisteminde, overler ve plasentada birlikte çalışarak gebeliğin devamında rol oynarlar (352). PROK1 overlerde hCG, östrojen ve FSH ile düzenlenir (353), plasental faaliyetleri hCG, PPAR γ ve hipoksi tarafından sağlanır (350, 354, 355). PROK2 ise santral sinir sisteminde sirkadiyen ritmin etkisi altındadır (356). PROK2 ve PROKR2 yolağının üreme sistemi üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan fare çalışmalarında genler susturulduğunda insandaki Kallmann sendromu benzeri fenotip olduğu görülmüş (357), embriyolojik dönemde overlerde foliküllerin gelişimindeki kusurlar nedeniyle siklus bozuklukları olduğu tespit edilmiştir (358). PROK1 ve PROKR sistemi erken gebelikte embriyonun implantasyonunda önemli bir yere sahiptir (359) ve implantasyon penceresi döneminde anlatımları artmaktadır (360). İlk trimesterde PROK1'in etkisi ve PROKR2 aracılığı ile ekstrasvillöz trofoblastik hücrelerin göçü, invazyonu ve spiral arterlerin yeniden düzenlenmesi sonucu kan dolaşımı sağlanır (361). *PROK1*, *PROKR1* ve *PROKR2* genlerinin gebelik kayıplarıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (362-364). Ayrıca 98 TGK öykülü kadın ve 142 kontrol ile yapılan bir çalışmada *PROKR2* geni V331M polimorfizminin artmış gebelik kaybı riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (365). ***PROKR1*** geninde (Olgu 18) saptanan varyant (rs200892456) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmasına rağmen, *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında 115.562 bireyin genom çalışmasında sadece 5 dişi bireyde saptanmış olması (allel frekansı 0,0000433) bu olasılığı desteklemektedir. *PROKR1* geninde saptanan bu varyantın etiyojolojiyi açıklayabileceği kararına varıldı.

PROKR2 geni monoallelik patojenik varyantları anosmili veya anosmisiz hipogonadotropik hipogonadizm tip-3 ile ilişkilendirilmekte olup (MIM #244200), digenik kalıtım (*KAL1* ile) veya eksik penetrans gibi özellikler gösterebilmektedir (366). *PROKR2* geninde (Olgu 16) saptanan varyant (rs74315416) ACMG kriterlerine göre zararsız olarak nitelendirilmiş olmasına rağmen, varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında dişi bireylerdeki allel frekansının 0,00219 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. Olgumuzun sendrom ile ilişkili bulguları

bulunmamaktaydı; ancak, aynı varyantın ekspresivite değişkenliği örneklerinin olması (367) ve hipotalamik amenore ile ilişkilendirilmesi (368), ayrıca TGK etiyolojisinde incelenmekte olan aday varyantlardan biri olması nedeniyle bu çalışmada değerlendirildi. 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada, antik dönemlerden beri aktarılan kurucu etkisi ('founder effect') olan bir varyant olduğu, üreme fonksiyonları üzerine olası etkileri ve santral sinir sisteminde embriyolojik dönemde etkin bir gen olmasına rağmen; ekspresivite değişkenliği ve digenik/oligogenik kalıtım kalıbında olduğunda tam fenotipik özelliklerini gösterebilmesi sayesinde korunarak aktarıldığı ileri sürülmüştü (369). Tüm bu çalışmalar ile *PROKR2* geninde saptanan bu varyantın gebelik kaybı öyküsü olmayan kızkardeş ve annede incelenmesinin literatüre katkı sağlayabileceği düşünüldü.

1.1.5. Embriyogeneizde Etkin Genler

Fertilizasyon sonrası zigotik aşamadaki blastomerler ile yürütülen çalışmalarda, erken embriyogeneizde paternal genom yerine maternal genomun daha etkili olduğu (370, 371), preimplantasyon aşamasında oosit içindeki maternal gen ürünlerinin ~%10 kadarının blastosist aşamasına kadar aktif kaldığı ve embriyonik gen aktivasyonu aşamasına geçişte kritik rollerinin bulunduğu gösterilmiştir (372, 373). YÜT denemelerindeki implantasyon başarısında da maternal etkili genlerin önemi ön plana çıkmaktadır (374). Embriyolojik gelişim basamaklarında aktif genlerden 9 olguda, 10 gende 10 VUS ve 1 patojenik olarak nitelendirilmiş varyant saptadık.

Hayvan deneylerinde *Mater*, *Zar1* ve *Npm2* genlerinin fonksiyon kayıplarının embriyonik genomun aktive olmasından hemen önce, embriyonun gelişiminde duraklamaya yol açtığı gösterilmiştir (375-377).

Fertilizasyon sonrasında, oositte depolanmış maternal RNA ve proteinler, embriyonun kendi genomu aktifleşene kadar görev yapar ve bu süreç 'zigotik genom aktivasyonu (ZGA)' olarak adlandırılır (378). ZGA'da aktif anlatımı olduğu en iyi bilinen genlerden biri *ZSCAN4*'tür ve insan trofoektoderm hücrelerinin transkriptom analizinde erken embriyolojik dönemdeki etkin genlerden biri olduğu tespit edilmiştir (379). Fare çalışmalarında embriyonun 2 hücreli aşamadan 4 hücreli aşamaya geçişinde aktif olduğu bulunmuş, yokluğunda ise blastosistin büyümesinin durduğu ve implante olamadığı gösterilmiştir (380). Ayrıca gen ürününün bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü, preimplantasyon aşamasında embriyo gelişiminde genlerin aktivasyonu için anahtar rolü olduğu düşünülmektedir (381). *ZSCAN4* geninde (Olgu 15) saptanan varyant daha önce tanımlanmamıştır. ACMG kriterlerine göre VUS

olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi, ‘novel’ bir varyant olması ve anlamsız mutasyona yol açarak protein seviyesinde terminasyona yol açmasıyla etiyojolojiyi açıklayabileceği düşünöldü. Aynı olguda perimplantasyon dönemdeki embriyoda aktif olan **PAPLN** geni varyantı saptanmıştır. Bu gen papilin proteinini kodlamaktadır ve fonksiyonları *Drosophila* çalışmalarında keşfedilmiş; gastrulasyon aşamasında ince matriks tabakaları içerisinde bulunan, fagositik hemositlerin göçü ve bazal membranların gelişiminde etkin bir hücre dışı matriks glikoproteini olduğu gösterilmiştir. Genin susturulduğu model organizmaların da embriyolojik dönemde iken öldüğü görölmüştür (382). Bu varyant (rs146740904), varyant değerlendirme tahmin araçlarıncı ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekle birlikte, aynı gende allel frekansının (0,0000866) daha az olduğu farklı varyantların (0,000119) zararsız olarak tespit edilmesi nedeniyle VUS olarak nitelendirilmiştir. Tek başına etiyojolojiyi açıklamamakla birlikte **ZSCAN4** ile bir arada iken fenotipe etki edebileceği düşünöldü. İki fenotipik açıdan normal çocuğı olan kızkardeşte de **ZSCAN4** varyantının araştırılması ve aralarında akrabalık olmayan eşinde **ZSCAN4** ve **PAPLN** tüm gen dizi yapılması planlandı.

NOBOX geni, embriyonik genomun aktivasyonu ve blastosist gelişiminde önemli bir role sahiptir. Foliköllerin gelişiminde direkt ve **FOXL2** ile işbirliği içerisinde diğeri genlerin anlatımlarını düzenleyerek indirekt etkilidir (383, 384). Germ hücre kistlerinde ve büyümekte olan primordiyal foliköllerde yüksek oranlarda anlatımı olur. Fare embriyoları ile yapılan çalışmalarda *Nobox*, *Zar1* ve *Dnmt1* gibi erken embriyogenezde etkin kritik öneme sahip genlerin anlatımını etkilediğı gösterilmiştir (385). Ayrıca **NOBOX**, **POY** etiyojolojisinde yeri **YND** teknikleri sayesinde tespit edilmiş genlerden biridir (386). Olgu 21’de saptanan varyant (rs749172175) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmesine karşın, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanında allel frekansının 0,00000881 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. Olgunun tartışması **POY** ile ilişkili genler başlığı altında verilmiştir.

NOP14 geni ile herhangi bir hastalık/sendrom ilişkilendirilmemiş, fakat TGK öykülü bir çiftin gebelik kaybı ürününe yapılan TED analizinde homozigot patojenik varyantı saptanmıştır (344). Ökaryotlar arasında evrimsel olarak korunmuş olan bu gen, 18S ribozomal RNA’nın işlenmesinde ve 40S ribozom alt biriminin oluşmasında etkindir (387). Zebra balığı çalışmalarında fonksiyon kaybına yol açan homozigot mutasyonların anomalilere yol açarak letal olduğu gösterilmiş ve embriyolojik gelişmede etkin olabileceğı düşünölmüştür (388). Olgu 17’de tespit edilen varyantın (rs777356082) allel frekansının 0,0000261 olması ve varyant

değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi nedeniyle etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Varyantın etkisinin gösterilebilmesi için aralarında akrabalık olmaması nedeniyle eşinde *NOP14* tüm gen dizileme yapılmasının ve gebelik ürünlerinin değerlendirilmesinin tanıya katkı sağlayabileceği kararlaştırıldı.

Son yıllardaki model organizmalardaki fonksiyonel çalışmalar ile keşfedilen genlerden biri olan **CTBP2**, farelerde başta serebral korteks gelişimi olmak üzere embriyolojik dönemde aktiftir (389, 390). Bu gende (Olgu 13) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmekte ve gnomAD veri tabanına göre hiç saptanmamış olması bu olasılığı desteklemektedir. Olgunun eşi ile akraba olması OR kalıtım modelini düşündürdüğünden eşinin de bu varyant açısından incelenmesi planlandı. Ešte aynı varyantın saptanması varyantın ‘patojenik’ etkisini destekleyecektir.

FREM2 geninin patojenik varyantları OR kalıtlı Fraser sendromu tip-2 (MIM #617666) ve izole kriptoftalmi (MIM #123530) ile ilişkilidir. Fraser sendromu, genito-üriner sistem anomalileri, sindaktili ve fasiyal dismorfizm ile karakterizedir (391) ve intrauterin ölüm ile sonuçlanmış gebelikler de bildirilmiştir (392). İlk dört gebelik kaybı sonrasında septat uteri saptanarak opere edilen Olgu 2’de operasyon sonrasında da 8 gebelik kaybı yaşanması nedeniyle olgu çalışmaya dahil edilmişti. Saptadığımız varyant (rs375059201) ACMG sınıflandırmasına göre VUS, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ise ‘zararsız’ olarak değerlendirilmekteydi. Olguda diğer 3 gende biri patojenik, biri olası patojenik ve biri VUS varyant bulunması TKG etiyolojisi ile ilişkili olabilir ancak, **FREM2** geninin OR olması nedeniyle eşinin de bu gen için incelenmesine ve taşıyıcılık varsa gen ürünlerinin moleküler ve klinik olarak değerlendirilmesinin varyant değerlendirmesine katkı sağlayacağı düşünüldü.

UBTF1, erken embriyolojik gelişim evreleri, implantasyon ve embriyonik kök hücrelerde etkin bir genidir ve preimplantasyon dönemde anlatılmaktadır (393, 394). **UBTF1** geninde (Olgu 4) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre daha önce tanımlanmamış bir varyant olması nedeniyle VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘zararsız’ olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler ışığında saptanan varyantın etiyolojiyi açıklamakta yetersiz olduğu düşünüldü ve dışlandı.

HSF1 geni oogenez, spermatogenez ve plasenta gelişiminde etkin ısı şok proteinlerini uyarıcı etki yapan ısı şok transkripsiyon faktörü-1’i kodlar (395). Geni susturulmuş dişi farelerin ovumlarının fertilize olabilmelerine rağmen, embriyolarının zigot aşamasından ileri

gidemedikleri gösterilmiş, yabancı tip varyant taşıyan spermilerin de bu durumu değiştirmemesi üzerine maternal etki gösteren genlerden biri olduğu anlaşılmıştır (396). *HSF1* geninde saptanan varyant (rs1564620538) (Olgu 6) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi ve gnomAD veri tabanında verilen genomik verilerde 115.434 dişi bireyde sadece bir adet saptanmış olması (allel frekansı 0,00000866) bu olasılığı desteklemektedir. Aynı olguda patojenik bir varyant *SLAIN1* geninde saptanmıştır. Bu gen ile ilişkili prenatal ya da postnatal henüz herhangi bir hastalık bildirilmemiş olmakla birlikte, yapılmış çalışmalarda, fare ve insanda embriyonik kök hücrelerde ve embriyolojik gelişmede aktif ve hipokampal nöronlar başta olmak üzere beyinde aksonların gelişiminde etkin olduğu gösterilmiştir (397). Aralarında 2.° kuzen evliliği olan çiftimizde, eş *SLAIN1* gen varyantı için dizilendi ve varyantı taşımadığı görüldü. Genetik etiolojinin açıklanmasında *HSF1* geninin dışlanması için olgunun kızkardeşi ve annesinin de gebelik öyküleri göz önüne alınarak dizilenmesi ve eşte saptanmayan ve ilgili bölümde tartıştığımız siliyopati ile ilişkili *CEP290* ve *SLAIN1* genleri için tüm gen dizilenmesi tanıya katkı sağlayacaktır.

IGSF10 geni embriyolojik dönemde gonadotropin aksının gelişiminde etkindir. Monoallelik patojenik varyantlarının gecikmiş puberte ile ilişkili olduğu ve zebra balıkları ile yapılan fonksiyonel çalışmalarda susturulduğunda GnRH nöronlarının göçünün bozulduğu tespit edilmiştir (398). POY etiolojisinin açıklanması için yapılan TED analizlerinde, hem OD hem de OR kalıtım kalıbına uyan ovaryan yetmezlik ile ilişkili bulunmuş iken, Kallmann fenotipi gösteren bir olguda biallelik anlamsız gen mutasyonu saptanmıştır (399). *IGSF10* geninde (Olgu 7) saptanan varyant (rs150750718) ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmiş olmakla birlikte, anlamsız mutasyona yol açarak varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmesi ve gnomAD veri tabanında allel frekansının 0,0000669 olarak verilmesi bu olasılığı desteklemektedir. Kızkardeşte ve annede de gebelik kaybı öyküsü olduğundan *IGSF10* geninde saptanan bu varyant için onların da incelenmesinin varyantın değerlendirmesine katkı sağlayabileceği düşünüldü.

WNT6 geninin endometriyumun desidualizasyonunda (407) ve embriyo 8 hücreli aşamada iken anlatım yaptığı gösterilmiş (408), Çin’de TGK öykülü 100 kadın ile yapılan bir çalışmada *WNT6* gen varyantlarının etioloji ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (247). *WNT6* geninde (olgu 11) saptanan varyant (rs142171369) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş olmakla birlikte, varyant değerlendirme tahmin araçlarında ‘patojenik’ olarak değerlendirilmektedir. Varyantın patojenitesinin değerlendirilmesinde olgunun kızkardeşlerinin

ve annesinin de incelenmesi katkı sağlayabilecektir.

1.1.6. Epigenetik Mekanizma ile Düzenlenen Genler

Embriyogenezde, paternal ya da maternal genetik materyalin seçici olarak baskılandığı ('imprinting') genomik bir denge vardır. Embriyonun temel gelişiminde maternal, ekstraembriyonik dokuların farklılaşmasında ve gelişmesinde ise paternal genler aktiftir. Maternal genom, embriyonun büyümesini annenin kendisine zarar vermeyecek şekilde düzenleme eğiliminde iken, paternal genom sürekli büyümeyi teşvik eder (409). Plasental dokuların farklılaşması, hormonlar ve büyüme faktörleri aracılığıyla metabolizmanın düzenlenmesi de bu mekanizmayla kontrol edilir (410). Çalışmamızda, bir olguda (Olgu 13) aktivitesi epigenetik mekanizma ile kontrol edilen *IGF2* geninde patojenik bir varyant saptadık.

IGF2, genomik baskılanma mekanizması ile maternal allelin susturulduğu ve paternal allelin aktif kaldığı genlerdendir. Genin metilasyonunda bozulma olduğunda Beckwith-Wiedemann sendromu ortaya çıkar (MIM #130650). *IGF2*, granüloza hücrelerini apoptozdan koruyan ve düzgün bir mikroçevre oluşmasını sağlayan faktörlerden biridir (411). *IGF2*'nin, insan luteinize granüloza hücrelerinin proliferasyonunu, östradiol ve progesteron üretimini uyardığı gösterilmiştir (412-414). Öne sürülen hipotezlerden biri de gebelik esnasında endometrial LIF anlatımı düzenlenmesinde *IGF1* ve *IGF2*'nin hCG benzeri etki gösterdiğidir (415). 38 gebelik kaybı materyalinde yapılan bir çalışmada *IGF2*, *PEG10*, *PHLDA2* ve *CDKN1C* gibi parental kökene göre baskılanan genlerin ekspresyonlarının normal gebeliklere göre farklılık olduğu gösterilmiştir (416). Gebelik kayıplarında sıklıkla maternal allellerin baskılanması gereken genlerde yüksek oranlarda hipometilasyona olduğu tespit edilmiştir (409). Ayrıca fare plasentalarında azalmış *Igf2* gen anlatımı küçük plasenta ve intrauterin gelişme geriliği ile ilişkilendirilmiştir (417). Büyümeyi sağlayan *IGF2* geninde, baskılanma defekti ile maternal allelin aktif kalmasının, ya da maternal alleldeki fonksiyon kaybına yol açan bir varyantın fetal gelişimi engelleyici etki göstereceği düşünülebilir. IVF uygulanan kadınların foliküler sıvısında yüksek düzeyde *IGF2* bulunmasının oosit olgunlaşması ve erken embriyo gelişimi için iyi prognoz göstergesi olduğu gösterilmiştir (418). FSH ile birlikte *CYP19A1* geninin aktivasyonunu sağlar. *IGF2* olmadığında bu aktivasyonu gerçekleştiremeyen ve LH salgılamasına cevap olarak yeterli östrojen üretemeyen granüloza hücreleri, korpus luteumun devamlılığını da sağlayamaz. FSH ve *IGF2* arasındaki birliktelik insan granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması için kritik ve gebeliğin devamlılığında gerekli olduğu düşünülebilir (419). Olgumuzda *IGF2* geni, HGMD veritabanında esas alınandan farklı bir

transkriptinde saptanan (NM_001127598.2) ve anlamsız mutasyona yol açan varyantını aile içi segregasyon analizinde, olgunun babasının da monoallelik olarak taşıdığı tespit edildi. Paternal allelin aktif anlatım yapan allel olması nedeniyle olgumuzda etiyolojiyi açıklamakta güçlü bir aday olarak değerlendirildi.

1.1.7. İmmün Regülasyonda Etkin Genler

Serimizde, immün cevap ve yolaklarında etkin 2 gende 2 farklı varyant 2 olguda saptanmıştı; **CXCL8** ve **HLA-DRB5** (Olgu 22) ile **HLA-DRB5** (Olgu 23) varyantlarıdır.

Olgu 12’de bulunan immünite ile ilişkili 2 genden biri olan **CXCL8** (**IL8**) oldukça iyi bilinen bir sitokin olan IL8’i kodlar. Sebebi açıklanamayan TGM olgu grubunda gen anlatımındaki farkların etkili olduğu düşünülmektedir (425). Serimizde **CXCL8** geninde saptanan varyant (rs536774132) VUS olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen gnomAD veri tabanında 0,00000872 allel frekansı ile nadir görülen bir varyant olarak belirtilmekte ve *in siliko* tahmin araçlarında patojenik etki beklenmektedir. Bu varyantın klinik etkisi için daha fazla olguda saptanması beklenmelidir.

HLA-DRB5 geninde 2 olguda aynı kırılma bölgesi varyantı (rs79192142) saptandı. Otoimmüniteye yatkınlık ve otoimmün tiroid hastalıkları ile ilişkilendirilmekte olan bu genin, artmış anlatımı ve varyantlarının TGM etiyolojisinde yeri olabileceği belirtilmiştir (426, 427). Bu varyant ACMG kriterlerine göre VUS olarak sınıflandırılmakta, fakat tahmin araçlarında ‘zararsız’ olarak nitelendirilmekte olduğundan Olgu 13’teki etiyolojiyi tek başına açıklayamayacağı düşünüldü. Olgu 12’de ise **CXCL8** ve **HLA-DRB5** gen varyantlarının birlikte görüldüğünden direkt etkileşimleri olmamasına rağmen aynı yolak üzerine etki gösterdikleri göz önüne alınarak etiyolojiyi açıklayabileceği düşünüldü. Eldeki bu veriler bugün için yetersiz olarak değerlendirildi.

1.1.8. Hücre Bölünmesi / Döngüsünde Etkin Genler

Hücrelerin büyüme ve çoğalma için izledikleri 4 aşamadan oluşan bir hücre döngüsü örüntüsü vardır; esas bölünme evresi (M fazı), DNA replikasyonu evresi (S fazı), hücrenin RNA, protein gibi materyallerini sentezlediği ve büyüdüğü G1 fazı ile hücre bölünmesine hazırlandığı G2 fazı. Bu aşamalarda sürecin düzgün işleyip işlemediğinin değerlendirildiği birçok kontrol noktası vardır. Siklinler ve siklin bağımlı protein kinazlar tarafından kontrol edilen döngü **RB1**, **TP53**, **CDKN2A** genlerinin aktif olduğu G1/S kontrol noktası; hücre boyutu,

DNA tamiri ve replikasyonun değerlendirildiği G2/M kontrol noktası ve tüm kromozomların tubulin iğciklerine tutunup tutunmadığı ya da metafaz-anafaz geçişinin temel alındığı M fazı kontrol noktalarında denetlenir. Bölünmeyen ve stabil konuma geçen hücreler için G0 fazı terminolojisi kullanılır.

Çalışma kapsamında 6 olguda, hücre döngüsünde etkin 6 gende bir patojenik ve 5VUS olarak nitelendirilmiş varyant saptandı. Bu genler; LRIF1 (Olgu 6), CCNA2 (Olgu 15), MCM2 ve 4 (Olgu 25), MTOR (Olgu 31) ve SPICE1'dir (Olgu 4).

LRIF1 geni, aynı isimli ligand bağımlı nükleer hormon reseptörü aktivatörü olan proteini kodlar. Bu gen ile ilişkilendirilmiş herhangi bir hastalık veya sendrom bulunmamakla birlikte, 2018 yılında yapılan bir çalışmada, hücre döngüsünde hücrenin seçeceği yolun kararını vermede aktif rolü olduğu ve heterokromatin protein 1 α ile birlikte mitoz bölünmede kromozomların sentromerlerden ayrılmasında görev aldığı gösterilmiştir (438). Olgu 6'da saptadığımız **LRIF1** gen varyantı ACMG sınıflandırmasıyla VUS olarak nitelenmiş, varyant tahmin araçlarında hem 'patojenik' hem de 'zararsız' olabileceği belirtilmiştir. Daha önce saptanmamış olan bu varyant ile ilişkili bilginin yetersiz olması nedeniyle tek başına genetik etiyojolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü.

CCNA2 geni siklin A2 proteinini kodlar. Siklin bağımlı kinazlar CDK1 ve CDK2'ye bağlanarak ve/veya etkileşerek G1/S ve G2/M geçişini tetikler (439). Farelerle yapılan çalışmalarda **Ccna2** geni susturulduğunda implantasyon öncesi letal etkili olduğu gösterilmiştir (440). 2019 yılında yayınlanmış başka bir çalışmada, **CCNA2** geni çalışmadığında trofoblastların göçünün durduğu, p53 yolağının aktifleştiği ve trofoblast apoptozuna giden sürecin başladığı gösterilmiş; TKG etiyojisinde bu yolların etkisinin olabileceği öne sürülmüştür (441). Olgu 15'te saptadığımız VUS olarak sınıflandırılmış **CCNA2** varyantı (rs199853275) için gnomAD verileri değerlendirildiğinde 'zararsız' olabileceği düşünüldüğünden etiyojinin açıklanmasında yetersiz bulundu.

DNA replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlayan **MCM**- genleri hormonal kontrol altında endometriyal hücre döngüsü ve proliferasyonda yer alırlar (442). DNA replikasyonu, heterohekzamerik minikromozom devamlılık kompleksine (**MCM**) ve beraberinde helikaz aktivitesine ihtiyaç duyar. Bu kompleks hücre siklusunun G1 aşamasında kromatin düzenlenmesinde görevlidir, aktive olmasıyla helikaz enzimi DNA'yı açar ve replikasyon çatalı oluşur (443). Hayvan çalışmalarında **Mcm** genlerindeki biallelik patojenik varyantların prenatal veya postnatal dönemde letal etkili olduğu gösterilmiştir (444). 2019 yılında yayınlanmış **Mcm2** ve **Mcm4** genleri susturulmuş bir çalışmada fare embriyolarının özellikle dişi embriyoların

erkeklerle oranla daha fazla öldüğü saptanmıştır (445). Bu cinsiyetler arasındaki dikkat çeken farklılığın dişilerde, Mcm yokluğunda cGAS-STING inflamasyon yolağının daha fazla aktif olmasının olabileceği, testosteron hormonunun anti-inflamatuvar özelliğinin erkek embriyoları nispeten koruduğu öne sürülmüştür (445, 446). Bunun yanında endometriyal stromal hücrelerin hormonlara yanıt olarak proliferasyonu ve poliploidizasyonu hücre siklusunu kontrol eden faktörlerin etkisiyle gerçekleştiği belirtilmiştir (447, 448). Fare endometriyumları ile yapılan başka bir çalışmada Mcm2-7 proteinlerinin implantasyon bölgelerinde artmış anlatımının olduğu, desidualizasyon için elzem oldukları, Mcm2'nin progesteron salınımı ile aktive olduğu gösterilmiştir (443). Olgu 25'te *MCM2* ve *MCM4* genlerinde VUS olarak nitelendirilen iki varyant tespit edildi. Aynı yolak ve kompleks içerisinde bulunan bu genlerin patolojilerinin digenik kalıtım kalıbında etkili olabileceği düşünüldü. Tanıya katkı sağlaması amacıyla olgunun kız kardeşlerinde ve annesinde ilişkili varyantların incelenmesi kararlaştırıldı.

MTOR geninin kodladığı protein kinaz ana metabolik yolakların temelinde yer alan, fizyolojik düzen içerisinde elzem moleküllerden biridir; hücre büyümesinde, glukoz metabolizması ve lipogenezde etkindir (449). mTOR, yapısal olarak farklı iki kompleks olan mTORC1 ve mTORC2'nin katalitik alt birimini oluşturur. mTORC1 hücre büyümesini ve çoğalmasını arttırırken, aktivitesi tüberoskleroz kompleks 1 ve 2 tarafından bastırılır (450). Fare çalışmaları, mTOR aktivatörlerinin primordial (451) ve sekonder folikül büyümesini aktive ettiği (452) ve primordial folikül aktivitesinin düzenlenmesinde PI3K-AKT ve mTOR sinyal yollarının birlikte çalıştığı gösterilmiştir (453). *MTOR* geninde saptadığımız varyant, ACMG kriterlerine göre 'patojenik' olarak sınıflandırılmıştır (rs768374086). Olgu 21'de *NOBOX* geninde VUS kategorisinde değerlendirilen diğer varyant ile göz önüne alındığında, *MTOR* geninin etiyolojiyi açıklamakta daha güçlü bir aday olduğu düşünüldü. İlk aşamada olgunun ebeveynleri ve kardeşlerinde segregasyon çalışması yapılması ve eşte *MTOR* tüm gen dizilenmesi; ayrıca *NOBOX* geninin OD kalıtım ile etki göstereceği göz önüne alınarak olgunun annesinde ilişkili gen varyantının incelenmesi planlandı.

SPICE1 geni tarafından kodlanan protein, hücre siklusunda etkindir ve mitozda sentriyollerin yapısında bulunur (454). Sentriyollerin duplikasyonunda CDC52 ve CEP120 proteinleri ile birlikte çalışır (455). HeLa hücreleri ile yapılan çalışmalarda anlatımı durdurulduğunda hücrelerde ciddi mitotik bölünme hataları olduğu gözlenmiştir (454). Çerçeve kayması mutasyonuna yol açan *SPICE1* gen varyantı, ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmesine rağmen daha önce hiç saptanmamıştır ve varyant tahmin araçlarında 'patojenik' etkili olacağı belirtilmektedir. Bu nedenle, varyantın Olgu 4'te etiyolojiyi

açıklayabileceği düşünüldü. Olgunun annesinde de gebelik kaybı öyküsü olması nedeniyle OD; hem anne ve babasının öyküsünde, hem de eşi ile arasında akraba evliliği öyküsü nedeniyle OR kalıtım gösterebileceği görüldü. Kalıtım modelinin belirlenmesi ve etiyolojideki yerinin gösterilmesi için anne, baba ve eşinde varyantın incelenmesi kararlaştırıldı.

1.1.9. DNA Hasarı Tamir Yolağı

DNA’da oluşan hasarların tamiri; direkt tamir, baz eksizyon tamiri, nükleotid eksizyon tamiri, yanlış eşleşme tamiri ve replikasyon sonrası tamir olarak farklı yolaklarla gerçekleşir. Yanlış eşleşme tamir yolağı, genom bütünlüğünün sağlanmasında ve devamında elzemdir, yanlış eşleşmiş bazların DNA’dan çıkarılmasını, rekombinasyonun düzenlenmesinin ve mayoz bölünmedeki kromozom segregasyonunu sağlamaktadır (456-458). Mayoz bölünme profaz I’in erken aşamalarında homolog kromozomlar arasında sinapsis denilen bir fiziksel temas meydana gelir; çift zincir DNA kırığı, parça değişimi ve ardından DNA tamiri ile homolog rekombinasyon gerçekleşir, buradaki DNA hasarı planlı ve genetik materyallerin paylaşımı açısından önemlidir. DNA hasarı tamiri yolaklarında 5 olguda, 5 farklı gende 4adet VUS ve 1 adet zararsız olarak nitelendirilmiş varyant saptandı. Bu genler; **MCM8** (1), **MSH5** (Olgu 15), **EXO1** (Olgu 13), **ERCC6** (Olgu 5) ve **MMS19**’dur (Olgu 4).

MCM8 gen ürünü, MCM2-7 kompleksi gibi replikasyonun ana basamaklarından birinde rol oynamaz; MCM9 ile kompleks oluşturur, RAD51’in DNA hasarının olduğu bölgeye gelmesini sağlar ve pakiten evresinde gerçekleşen homolog rekombinasyonda ve gametogenezde görev alır (463). Genin susturulduğu fare çalışmalarında fonksiyon kayıplarının POY ve infertiliteye yol açabileceği gösterilmiştir (464). YND teknolojilerinin kullanımıyla birlikte **MCM8** biallelik patojenik varyantları POY etiyolojisi ile ilişkilendirilmiştir (465). Olgu 1’de heterozigot formda saptamış olduğumuz **MCM8** geni varyantının (c.482A>G; p.H161R) aynı genomik lokasyonda farklı nükleotit değişiminin biallelik formu (c.482A>C; p.H161P) 2017 yılında primer amenore, atrofik overler ve uterusun olduğu bir olguda bildirilmiştir (466). Olgu 1’deki varyant monoallelik olduğundan etiyolojiyi açıklamada yetersiz bulunmuştur.

Memelilerde MutS (MSH2-6) ve MutL (MLH1 ve 3, PMS1-2) homologları tamir yolaklarında etkin protein grubunu kapsar. Mayoz bölünmenin profaz I aşamasında MSH4 ve MSH5 MutSy heterodimerini oluşturur, parça değişiminin olduğu pakiten evresinde MLH1 ve MLH3’ün oluşturduğu heterodimer ile etkileşime girer (457). Fareler ile yapılan çalışmalar sonrasında, *Msh4* veya *Msh5* fonksiyon kayıplarında profaz I’in erken aşamalarında bölünmenin durduğu, homolog kromozomlar arasındaki sinapsislerin bozulduğu belirtilmiştir (467, 468).

Mayoz bölünme ve homolog rekombinasyonda aktif genlerden biri olan **MSH5**'in embriyolojik dönemde overler ve adrenal bezde, yetişkinlerde granüloza hücrelerinde aktif anlatımının olduğu bulunmuş, patojenik varyantları POY ile ilişkilendirilmiştir (469). **MSH5** geninde tespit edilen varyant, VUS kategorisinde sınıflandırılmış olmasına rağmen literatürde bildirilen **MSH5** gen varyantlarının ~%96 (29/30) oranında zararsız olduğunun gösterilmesi nedeniyle (BP1) Olgu 15'teki etiyojolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü.

MLH1-MLH3 heterodimeri ile etkileşime giren proteinler arasında **EXO1** (5'-3' ekzonükleaz) de vardır, maya ve fareler ile yapılan çalışmalarda metafaz I aşamasında etkin olduğu gösterilmiştir (470-472). Ayrıca **Exo1** geninin biallelik olarak susturulduğu dişi farelerde infertilite tespit edilmiş, fakat ekzojen gonadotropin tedavisi ile normal foliküler gelişim olabileceği öne sürülmüştür (470). 2008 yılında yapılan başka bir çalışmada, **Exo1**'in mayozdaki parça değişimi esnasında Mlh1-Mlh3 heterodimerini stabilize ettiği, bu gen susturulduğunda oositlerin yaklaşık %85'inin metafaz I aşamasında durakladığı gösterilmiştir (473). **EXO1** geninde tespit edilen varyant, ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmesine rağmen, daha önce hiç tespit edilmemiş bir varyant olması, tek nükleotid delesyonu ile proteinde erken sonlanmaya yol açması nedeniyle patojenik etkili olma olasılığının yüksek olduğu düşünüldü. Olgu 13'te **IGF2** gen varyantının paternal allelin aktif olacağı düşünülmüş ön planda tutuldu. **EXO1**'in monoallelik patojenik varyantlarının ve **IGF2** geni ile birlikte etkisinin fonksiyonel çalışmalarla incelenerek tanıya katkısının olabileceği düşünüldü.

CSB-PGBD3 olarak da bilinen **ERCC6** geni patojenik varyantları Cockayne sendromu ile ilişkilendirilmektedir (MIM #133540); anlatımını yaptığı protein, DNA hasar bölgelerindeki duraklayan RNA polimeraz II'yi bağlar (474), mayoz bölünme, homolog rekombinasyon ve oositlerdeki DNA hasarı tamirinde etkindir. Monoallelik varyantlarının POY etiyojijisinde rolü olduğu tespit edilmiştir (475). **ERCC6** geninde (Olgu 5) saptadığımız varyant (rs200697187), ACMG'ye göre VUS ve bazı varyant tahmin araçlarına göre de zararsız olarak nitelendirildiğinden etiyojolojiyi açıklamayacağı kararlaştırıldı.

MMS19 geni nükleotid eksizyon tamiri ve RNA polimeraz II transkripsiyonunda yer alır (476). Patojenik varyantları metiyonin sentezinde kusurlara, genotoksik strese karşı hassasiyetin artmasına ve telomerlerin kısalmasına yol açar (477). Sadece nükleer DNA'nın değil ökaryotik hücreler için olmazsa olmaz enerji kaynağı olan mitokondrinin de DNA'sının tamirinde görevlidir (478). **MMS19** geninde saptanan ACMG'de VUS kategorisinde nitelendirilmiş varyant (rs373557835), tahmin araçlarında patojenik olarak belirtilmesine rağmen, literatürdeki

gen varyantlarının hemen hepsinin zararsız olması nedeniyle etiyojideki rolü netleşmemiştir. Olgu 4’te öncelikli olarak *SPICE1* gen varyantının incelenmesi, gerek duyulduğunda *MMS19* segregasyon analizine geçilmesi planlandı.

1.1.10. Siliyopatilerle ilişkili genler

Siliyopatiler, siliya yapısının veya fonksiyonlarının etkilenmesi/bozulması ile ortaya çıkan bir grup genetik, multisistemik hastalıktır. Genellikle bilişsel yetersizlik, böbrek kistleri, retinal kusurlar ve polidaktili ile ilişkilendirilmekte olup, situs inversus olgularında da ilk akla gelen hastalık grubudur.

Siliyalar, G0/G1 ve S fazının başlangıcında, mitotik içciklerin sentriyoller tarafından düzenlenmesinden önce oluşan yapılar ile hücre siklusunda görevlidirler. CP110 proteini sentrozomların duplikasyonunda ve sitokinez aşamasında CEP97 ve CEP290 proteinleri ile etkileşerek görev alır (479, 480).

Siliyopatiler genellikle OR kalıtım modeline uyar; Shh, Wnt ve PDGF yollarında kusurlar meydana gelir (481). Hareketli siliyanın temel aksonem hareketlerinin bozulduğu hastalık Primer Siliyar Diskinezidir (PSD-Kartagener sendromu). PSD olgularında erkek infertilitesi iyi bilinmekle birlikte, fallop tüplerindeki hareketli siliya yapısının da bozulması nedeniyle subfertilite görülebileceği (482) ve progesteron etkisiyle siliyar kamçı benzeri hareket azaldığı bildirilmiştir (483). Siliyalar ile ilişkili genlerin susturularak etkilerinin gözlenmesi amacıyla yapılan hayvan çalışmalarında, büyük bir çoğunluğunun embriyolojik dönemde ölümcül olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda 12 olguda, siliya ile ilişkili 13 gende, patojenik olarak nitelendirilmiş 10 ve VUS olarak nitelendirilmiş 6 varyant saptadık. Bu genler; *TTC21B* (Olgu 1), *NEK4* (Olgu 1), *CEP290* (Olgu 6 ve 20), *CCDC141* (Olgu 6), *DYNC2H1* (Olgu 8), *GLI3* (Olgu 10), *PKHD1* (Olgu 11), *CELSR1* (Olgu 11), *CCNO* (Olgu 13), *PKD1L1* (Olgu 13), *KIF13A* (Olgu 22), *CEP131* (Olgu 25) ve *CFTR*’dir (Olgu 1, 2 ve 23).

Olgu 1’de *TTC21B*, *CFTR* ve *NEK4* olmak üzere üç farklı siliyopati ile ilişkili gen tespit ettik. *NEK4* geni, hücre siklusu ve bölünmesinin kontrolünde etkindir ve siliyopati fenotipi olan olgularda yapılan çalışmalarda saptanan aday genlerden biridir (487, 488). *TTC21B* geni 29 ekzon içermekte olup, patojenik varyantları nefronofitizis tip-12 (Joubert sendromu tip-11; OD/OR kalıtlı; MIM #613820) ve asfikse edici torasik displazi tip-4 (OR; MIM #613819) ile

ilişkilendirilmiştir (489). Fragellar transport-A kompleksinde IFT139 (THM1) proteinini kodlar ve susturulduğu fare çalışmalarında, embriyoların ekstremiteler, göz ve beyin gelişiminde anomalilerin olduğu görülmüştür (490, 491). Her iki genin varyantı da patojenik olarak nitelendirildi. *TTC21B* geni ile ilişkilendirilmiş sendromik olgular olduğundan Olgu 1 ve eşinde ilk aşamada bu varyant incelendi (rs779134983). Eşin de aynı varyantı heterozigot olarak taşıdığı görüldü ve olgunun siliyopati bulguları taşıyan gebelik kaybı öyküsü olduğundan etiyoloji ile ilişkilendirildi. *NEK4* gen varyantı incelenemediğinden eşte de incelenmesi ve olgunun tamamlanması planlandı.

Siliyopatilerin genetik etiyopatogenezinde iyi bilinen genlerden olan ***CEP290***'da, iki olgumuzda (Olgu 6 ve 20) farklı noktalarda patojenik olarak sınıflandırılmış tek nükleotid delesyonları bulundu. *CEP290* (*NPHP6*) 54 ekzonlu bir gen olup, Leber'in konjenital amarozu tip-10, Senior-Loken sendromu tip-6, Meckel sendromu tip-4, Bardet-Biedl sendromu tip-14 ve Joubert sendromu tip-5 ile ilişkilendirilmektedir. Çerçeve kayması ya da stop kodon ile sonlanan varyantların ölümcül fenotip ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (492). Olgu 6 ve eşi arasında akrabalık olması nedeniyle ilk aşama olarak eşinde rs781310385 varyantı incelendi, fakat eşin taşımadığı tespit edildi. Sonraki aşamada genin büyüklüğü ve Sanger dizilemenin zorluğu nedeniyle olgunun eşinde de TED analizi, Olgu 20'nin eşinde ise sadece *CEP290* geninin dizilenmesi planlandı. Olgu 6'da saptanan bir diğer siliya ile ilişkili gen olan ***CCDC141***'in (2q31.2) fonksiyonları tam olarak çözümlenememiş olmakla birlikte fare çalışmalarında, GnRH-olfaktör sistemin ve kortikal nöronların gelişiminde aktif olduğu ve aksonların göçünde yer aldıkları gösterilmiştir. Gen susturulduğunda hipogonadotropik hipogonadizm (Kallmann sendromu) fenotipi olduğu, GnRH nöronlarının göçünün embriyolojik dönemde *CCDC141* geninin olduğu bir yolak ile sağlandığı, eksikliğinde pulsatil GnRH salınımının bozularak üreme sistemini etkileyebileceği söylenmiştir (493). *CCDC141* geninde saptadığımız varyant (rs764893847) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelenmiş, varyant tahmin araçlarında patojenik olarak değerlendirilmesine rağmen 0,000232 ile literatürde aynı gendeki zararsız varyantların allel frekanslarına göre daha yüksek olması nedeniyle (0,000177) fenotipik etki beklenmediği belirlenmiştir. Bu nedenle etiyolojiyi açıklamakta yetersiz görülmüş ve dışlanmıştır.

DYNC2H1 geni patojenik varyantları, kısa-dar toraks ve/veya polidaktili sendromu tip-3 (Asfikte edici torasik displazi; MIM #613091) ile ilişkilendirilmiş olup, siliya ve IFT fonksiyonlarında önemli yere sahiptir ve dinein organizasyonunu düzenler (494). OR kalıtmımlı Asfikte edici torasik displazide toraksın kısa ve dar oluşuna bağlı solunum problemleri, böbrek

anomalileri ve iskelet tutulumu sık görülen bulgular arasındadır, nadiren farklı organ anomalileri de görülebilir ve *NEK1* geni patojenik varyantları ile digenik kalıtım gösterebilir (495). Ağır tutulumlu olgularda intrauterin veya yenidoğan döneminde ölüm görülebileceği bildirilmiştir (496). *DYNC2H1* geninde (Olgu 8) saptadığımız varyant (rs372499560) VUS şeklinde değerlendirilmesine rağmen, varyant tahmin araçlarında patojenik etki beklendiği söylenmekte ve allel frekansı olarak 0,0000382 verilmektedir. Olgu 8’de *FLT1* geni etiyolojiyi açıklamakta ön planda tutuldu. Aile segregasyonu ile ilişkisi sağlanamazsa *DYNC2H1* geninin olgunun eşinde de incelenmesi planlandı.

GLI3, çinko parmak motifi içeren Shh yolağının bir parçası olan ve OD kalıtlı Greig sefalopolisindaktili (MIM #175700) ve Pallister-Hall sendromu (MIM #146510) gibi gelişimsel bozuklukların olduğu hastalıklarla ilişkilendirilmiş bir gendir. Farelerle yapılan çalışmalarda embriyolojik dönemde iskelet gelişiminde etkin olduğu gösterilmiştir (497). *GLI3* geni anlamsız mutasyonlarının homozigot formda olduğunda embriyolojik dönemde letal etki gösterdikleri tespit edilmiştir (498). Olgu 10’de saptadığımız varyant (rs121917710) VUS olarak nitelendirilmekte, fenotip üzerine zararsız olduğunu bildiren yayın nedeniyle etiyolojiyi açıklayamayacağı düşünüldü (499).

PKHD1 geni, neonatal veya intrauterin dönemde letal olabilen OR geçişli Polikistik böbrek hastalığı ile ilişkili olup (MIM #263200), fibrosistin proteinini kodlayan 66 ekzonlu büyük bir gendir, embriyogenezde aktiftir. Aynı zamanda bölünen hücrelerde mitotik iğciklerin yapısına katıldığı gösterilmiştir (500). Olgu 11’de saptanan patojenik olarak nitelendirilmiş *PKHD1* varyantının (rs137852944) etiyolojide yeri olabileceği düşünüldü. Aynı olguda VUS kategorisinde varyant saptadığımız ***CELSR1*** geni, embriyolojik dönemde santral sinir sisteminin geliştiği ve nöral tüp yapısının oluştuğu nörolasyon aşamasında aktif bir gendir. Aksonal gelişme, ventriküler ve dış granüler tabakalar başta olmak üzere nöronal öncül hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında rolü vardır (501). Bu aşamada Wnt, Shh gibi temel yolakların aktif olmasının yanı sıra, hücre adezyonu, sitoiskeletin düzenlenmesi ve apoptotik yolaklarda etkindir (502). Fareler üzerinde yapılmış yolak incelemelerinde *Celsr1* gibi genlerin susturulmasının kraniorakışızi (omurga ve kafatasının konjenital fissürü) ve koklear bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (503). Eşikle aynı köyden olan ve akraba evliliği olasılığının yüksek olduğu düşünülen çiftimizde etiyolojide OR kalıtlı bir patolojinin üzerine durulması ve öykülerinde total spina bifidalı fetus olması nedeniyle ilk aşamada *CELSR1* gen varyantının ve ardından tüm genin, sonraki aşamada da *PKHD1* geninin incelenmesi planlandı.

CCNO geni, OR kalıtlı primer siliyar diskinezi tip-29 ile ilişkilendirilmiş olup (MIM #615872) urasil DNA glikozilaz II'yi kodlar ve hücre siklusunda etkindir. Ayrıca Mayıs 2020'de yayınlanan bir çalışmada TKG ve başarısız YÜT etiolojisinde yer alabileceği ileri sürülmektedir (263). **PKD1L1** (7p12.3) geni polisistin proteinini kodlar ve bu protein embriyonik dönemde nodal gelişmeden sorumludur. Biallelik patojenik varyantları OR kalıtlı otozomal viseral heterotaksi tip-8 ile ilişkilendirilmiştir (MIM #617205) (504). Her iki gen varyantı da patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Aralarında akraba evliliği olan ve etiyojijiyi açıklamada ön planda **IGF2** gen varyantını tuttuğumuz Olgu 13'ün eşinde **CCNO** ve **PKD1L1** varyantlarının da incelenmesi kararlaştırıldı.

KIF13A geni, endozomal tübüllerin yapısını kontrol eder ve bunu GTP bağlayan RAB11 ile etkileşime girerek sağlar ve siliya yapısında elzemdir (505). **KIF13A** geninde saptadığımız (Olgu 22) daha önce bildirilmemiş varyant, ACMG'ye göre 'patojenik' olarak sınıflandırılmış olsa da heterozigot olması ve fonksiyonel çalışmalar ile etkilerinin gösterilmesi gerektiğinden bu aşamada etiyojijiyi açıklamakta yeterli bulunmadı.

CEP131 gen anlatımı santral sinir sistemi, testis ve overlerde yüksek oranlarda yapılmaktadır; siliyar organizasyon, sentriyol duplikasyonu ve satellit oluşumlarında etkindir (506). Ayrıca mitozda sentrozomdaki görevi ile genomik stabilizasyonu sağladığı düşünülmektedir (507). Saptadığımız **CEP131** (Olgu 25) gen varyantı (rs773820319), ACMG'de VUS olarak sınıflandırılmış, varyant tahmin araçlarında 'zararsız' etkili olacağı belirtildiğinden etiyojijiyi açıklamakta yetersiz bulunmuştur.

Genel popülasyondaki taşıyıcılık oranının yüksekliğine paralel olarak olgu grubumuzda da en sık varyant saptanan genlerden biri **CFTR** idi (Olgu 1, 2 ve 23). **CFTR** (transmembran iletkenlik düzenleyici gen) cAMP ilişkili epiteliyal klor iyonu transportunu düzenleyen bir protein kodlar ve biallelik patojenik varyantları Kistik fibroz hastalığına yol açar. KF öykülü kadınların oligomenore, sekonder amenore gibi menstrüal düzensizlikler yaşadıkları bilinmektedir ve bu durum multifaktöriyel etiyojijiyi ile hipotalamik baskılanmaya bağlanmış olup, öne çıkan patogenezlere biri de kusurlu **CFTR** proteinini içeren bölgelerde artmış cinsiyet hormon reseptörlerinin bulunmasıdır (508, 509). Kistik fibroz öykülü kadınlarda subfertilite beklenmekte ve bunun servikal mukusun yapısının bozulmasıyla servikal kanalın kapanması ve spermlerin inhibe edilmesi olduğu düşünülmektedir (510). Yaşa göre yapılmış karşılaştırmalı çalışmalarda da KF'li kadınlarda azalmış over rezervi bulunduğu saptanmıştır (511, 512). Patojenik varyantlarını heterozigot olarak tespit ettiğimiz üç olgunun eşlerinde aynı

varyantlar incelendi ve taşımadıkları görüldü. KF ile yapılan çalışmalar infertilite ile ilişkili olabileceği ancak TKG ile ilişkisini açıklamada yetersiz olduğu düşünülmekte, ancak OR bu genetik hastalık için çocuktaki %25 risk nedeniyle eşlerde de taşıyıcılığının tespiti gerektiğinden, eşlerde *CFTR* geninin dizilenmesi planlandı.

1.1.11. Polikistik Over Sendromu ile İlişkili Genler

Polikistik over sendromunun fertilite üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Çalışmamızda 2 olgumuzda PKOS'a yatkınlık ile ilişkilendirilmiş *SHBG* ve *FBN3* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmiş 2 varyant saptandı.

SHBG geni cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin proteinini kodlar, androjenik hormonların taşınmasında ve dişi üreme sisteminde hormonların üretiminde etkindir. Gen mutasyonlarının hirsutizm ve hiperandrojenizm ile ilişkili olabileceği ve PKOS öykülü olgularda etiyolojiyi açıklayabileceği bildirilmektedir (513). *SHBG* düzeylerinin yüksekliği - PKOS ilişkisi ve TKG etiyolojisindeki yeri araştırılan konulardan biridir (514). Olgu 1'de saptanan varyant (rs138612626) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirildiğinden ve allel frekansı yüksek olduğundan (0,0001), zararsız ve tek başına etiyolojiyi açıklamakta yetersiz olduğu düşünüldü.

FBN3 geni fibrilin olarak bilinen ekstraselüler matriks proteinlerinden fibrilin III'ü kodlar ve gen varyantlarının PKOS'a yatkınlık ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (515, 516). Sığırlar ile yapılan bir çalışmada fetal dönemde over ve folikül gelişiminde etkin genler arasında olduğu gösterilmiştir (517). Saptadığımız varyant (rs767566930) ACMG kriterlerine göre VUS olarak, ancak *in silico* varyant değerlendirme tahmin araçlarında patojenik olarak değerlendirilmiştir. Olgu 20'da saptanan varyantın etiyolojiyi açıklanmada yetersiz olduğu, ancak fonksiyonel çalışmalar ve ilişkili genlerin olgu serilerinde incelenmesinin katkı sağlayabileceği düşünüldü.

1.1.12. Oosit olgunlaşma Defekti ile İlişkili Genler

Oosit olgunlaşma defekti (OOMD), primer dişi infertilitesine yol açan mekanizmalardan oositlerin olgunlaşma basamaklarında meydana gelen aksaklıklar nedeniyle ortaya çıkan nadir bir durumdur (518). Bugüne kadar yedi alt tipi tanımlanmış olup, otozomal dominant veya resesif olarak kalıtılabilmektedirler (MIM #PS615774). Bu genler; *ZP1* (OR), *ZP2* (OR), *ZP3* (OD), *PANX1* (OD), *PATL2* (OR), *TUBB8* (OD/OR) ve *WEE2*'dir (OR).

Çalışmamızda 2 farklı olguda OOMD ile ilişkilendirilmiş 2 gende (*PATL2*, *ZP1*) VUS olarak nitelendirilmiş varyantlar saptadık. ***PATL2*** geni, traslasyonel baskılayıcı özellikteki bir RNA bağlayıcı protein kodlar. *Xenopus*'lar ile yapılan çalışmalar, *PATL2* proteininin ortoloğu olan P100'ün artmış anlatımının oositlerdeki mRNA translasyonunu azalttığını ve oositlerin gelişimini mayoz I aşamasında durdurduğunu göstermiştir (523). İnsanlarda *PATL2*'nin fonksiyon kaybettirici mutasyonlarının da oositlerin germinal veziküllerinde duraklamaya yol açtığı gösterilmiştir (524). YÜT uygulaması sonrasında oositlerin olgunlaşmadığı 180 dışı olgudan 5'inin (%2,78) biallelik *PATL2* mutasyonu taşıdığı gösterilmiş; az sayıda olguda oosit gelişebileceği ve döllenebilecekleri, ancak erken embriyonik aşamalarda gelişmenin duracağı belirtilerek farklı özellikteki mutasyonların farklı fenotipik etkiler gösterebileceği ileri sürülmüştür (525). Başka bir çalışmada *PATL2* mutasyonlarını heterozigot taşıyan kadınların fertil olabileceğine dikkat çekilmiştir (526). Bu gende saptadığımız varyant (rs569729547) ACMG kriterlerine göre VUS olarak nitelendirilmekte, fakat *in siliko* varyant değerlendirme tahmin araçlarında 'patojenik' olması öngörülmektedir. Olgu 5'in akraba evliliği öyküsü nedeniyle eşinde, 4 adet gebelik kaybı öyküsü olan ve olmayan kızkardeşlerinde bu varyantın incelenerek değerlendirilmesi kararlaştırıldı.

Çalışma kapsamında homozigot formda saptadığımız tek gen varyantı, öyküsünde başarısız YÜT denemeleri olup hiç gebelik oluşmamış olan Olgu 9'da ***ZP1*** genindeki anlamsız mutasyon idi. 1991 yılında Hughes ve Barratt tarafından tanımlanmış olan bu protein, diğer üç zona pellusida proteini ile birlikte oositin olgunlaşması, fertilizasyonda spermin bağlanması, akrozom reaksiyonunun başlaması, fertilizasyonun ardından polisperminin engellenmesi ve implantasyon öncesi embriyonun korunmasında etkin, kalın bir glikoprotein katman olan zona pellusidayı oluşturur (527). 11. kromozomun uzun kolunda (11q12.2) lokalize olan *ZP1* geni, 12 ekzon içerir. YÜT denemelerinin başarısız olduğu olgularda mikroskop altında yapılan incelemelerde oositlerde zona pellusida yokluğu görülmüş, YND analiziyle *ZP1* geninde patojenik varyantlar saptanmıştır (528, 529). Bizim olgumuzda saptanan varyant (rs776515172) ACMG sınıflamasına göre VUS kategorisinde olmakla birlikte, segregasyon çalışmasında anne ve babanın heterozigot formda aynı varyantı taşıdığının tespit edilmesi ve YÜT denemeleri esnasında olgumuz boş folikül sendromu/oosit olgunlaşma defekti ön tanısı almış olması nedeniyle bu varyantın genetik etiyojolojiyi açıklayabileceği kararı güçlendi.

1.1.13. Prematür Over Yetmezliği ile İlişkili Genler

Prematür over yetmezliği (POY), anormal apoptoz, azalmış primordiyal folikül veya

foliküllerin gelişmesinde bozukluk gibi mekanizmalarla ortaya çıkar ve dişi infertilitesinin nedenlerinden biridir. Bir kadının menopoza giriş yaşının ortalama 40 ila 60 yaş arasında olması beklenir, bu durum folikül sayısı ve ovulasyon aşamasında görevli olan genlerin etkisi ile değişmektedir. Tüm kadınların doğduklarında hemen hemen aynı sayıda folikül taşıdıkları (530), bu sayının erken atreziler ya da ovulasyon aşamasındaki bozukluklar nedeniyle bireylere göre değiştiği düşünülmektedir (531). Yapılan çalışmalar ile foliküler atrezi ve apoptozun; antral atrezi, bazal atrezi ve terminal farklılaşma apoptozu olmak üzere üç aşama ile düzenlendiği ortaya konmuştur (411). 40 yaşından önce menopoza girilmesi, ‘erken menopoz’ olarak adlandırılmakta olup, kadınların yaklaşık %1’ini etkilediği düşünülmektedir (532). Ooforektomi, kemoterapi/radyoterapi öyküsü, kromozom anomalileri, Turner sendromu, otoimmün hastalıklar, galaktozemi, geçirilmiş enfeksiyonlar, Frajil X sendromu ve bazı tek gen hastalıkları bilinen etiyolojik faktörler arasındadır. Ön tanı biyokimyasal olarak östrojen gibi gonadal hormonların azalması ve LH-FSH’ın artmasıyla konur. Over rezervi testleri; FSH, E2, inhibin B ve AMH ölçümü, USG eşliğinde antral folikül sayısı ile over volümü değerlendirmesini içerir. Klinik değerlendirmede ise FSH düzeyi ölçümü, kronolojik yaştan bağımsız olarak overin biyolojik yaşının değerlendirilmesinde en sık kullanılan testtir. Artmış değerler, azalmış over rezervi ve oosit kalitesi ile ilişkili artmış anöploidi riskinin yaştan bağımsız göstergesi olarak kabul edilmektedir (533). Ayrıca azalmış AMH seviyeleri de YÜT denemelerinde overlerin uyarılmasında azalmış cevap beklentisi ve kötü oosit kalitesi ile ilişkilendirilmektedir (534).

Oosit havuzundaki folikül sayısını ve kalitesini etkileyen yollardan biri de mayoz bölünmede aktif olan *MCM8*, *MCM9*, *STAG3*, *SYCE1*, *MSH3*, *MSH4* ve *MLH3* gibi genlerdir. YND tekniklerinin kullanılmaya başlanmasıyla ovulasyon, foliküler gelişim, granüloza hücrelerin farklılaşması ve çoğalması, metabolizma veya ekstraselüler matriks düzenlenmesi gibi farklı yolak genlerinin de POY etkeni olabileceği düşünülmektedir. Fransa’da, 69 POY öykülü olgu ile yapılan bir çalışmada, olguların %42’sinde iki veya daha fazla gende varyantlar tespit edilmiş olup, poligenik bir kalıtım kalıbının etkin olabileceği ileri sürülmüştür (252).

Azalmış over rezervi ve TGK ilişkisini ve biyokimyasal belirteçlerin araştırmak amacıyla yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır. TGK öyküsü olan ve olmayan dişi olgular ile yapılan ve FSH-AMH değerlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, maternal yaştan bağımsız olarak TGK ile azalmış over rezervi arasında bir ilişki olduğu, biyolojik over yaşının oosit kalitesi ve over rezervi üzerine etkisinin kronolojik yaştan daha etkin olduğu ileri sürülmüştür (535). Almanya’da benzer kohorttaki retrospektif bir çalışmada AMH ve östradiol düzeyleri incelenmiş, azalmış over rezervi ile TGK arasındaki ilişkinin sebebi açıklanamayan olgu

grubunda, açıklanabilen olgu grubuna göre daha güçlü olduğu belirtilmiştir (536). 2015 yılında Hollanda’da anket usulü ile yapılan bir çalışmada ise, POY tanısı ile takip edilen olguların gebe kalma, gebelik kayıpları, tekrar menstrüel kanama yaşayıp yaşamadıkları gibi sorular sorularak kontrol grubuyla karşılaştırılmış, gebelik kayıpları ile POY arasında bir ilişki saptanmamıştır (537).

YÜT uygulamalarının artmasıyla birlikte, ovum kalitesinin başarılı gebelik oluşumu ve implantasyon başarısı ile orantılı olduğu daha net görülebildi. Literatürde TGK etiyojisi ile POY fenotipine yol açan genler arasında bir ilişki olabileceğine işaret eden bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile ilk defa ovaryan yetmezlik ile ilişkilendirilmiş genlerin TGK etiyojisinde de yer alabileceği ortaya kondu.

Tablo 32: Çalışmada saptanmış POY ilişkili genler

Gen	Saptanan olgu	İşlevi	Fenotip	Olası kalıtım modeli	Referans
<i>MCM8</i>	11	gametogenez ve DNA tamiri	POY tip 10	OR	(538)
<i>ERCC6</i>	15	DNA tamiri	POY tip 11	OD	(472)
<i>IGSF10</i>	17	embriyolojik GNRH göçü	-	OD, OR	(396)
<i>MSH5</i>	25	mayoz bölünme ve DNA tamiri	POY tip 13	OR	(466)
<i>NOBOX</i>	31	transkripsiyon faktörü (primordiyal folikül → sekonder folikül)	POY tip 5	OD	(382)

Olgu 1’de akraba evliliği öyküsü de olması nedeniyle ön planda siliyopatiler ile ilişkili patojenik gen varyantlarının etiyojiiyi açıklayabileceği düşünüldü. Diğer varyantlar ile birlikte *MCM8* varyantının etkisinin (rs140044814) ancak model organizma çalışmaları ile görülebileceği düşünülerek etiyojideki yeri konusunda net bir kanıya varılamadı.

Olgu 5’te *PATL2* geni, etiyojii ile ilişkili en yakın gen olarak değerlendirildi ve aile içi segregasyon çalışmasının katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Olgu 7’de *IGSF10* geninde saptanan monoallelik anlamsız mutasyon nedeniyle etiyojide etkili olabileceği düşünülerek kızkardeşlerde ve annede ilgili varyantın incelenmesi kararlaştırıldı.

Olgu 15'te saptanan *MSH5* gen varyantının ise etiyolojiyi açıklayamayacağı düşünülerek dışlandı. Olgu 21'de tespit edilen *NOBOX* varyantının ise etiyolojiyi açıklamada katkısı olabileceği düşünüldü. Ancak, bu varyantın VUS olarak nitelendirilmesi nedeniyle olgudaki patojenik *MTOR* varyantının daha etkin olabileceği düşünüldü. Olgunun annesinde her iki gen varyantının da incelenmesi planlandı.

Ayrıca oligogenik varyant etkilerinin in siliko değerlendirildiği 'ORVAL' tahmin aracında 4 olguda digenik etki öngörüldü (Olgu 6: *HSF1-MMP10*, Olgu 10: *ACE-MMP10* ve *EGFR-MMP10*, Olgu 21: *MTOR-VEGFA*, Olgu 24: *EGFR-GNRHR* ve *MMP11*)(545).

6 genin etiyoloji ile ilişkilendirilebilmesi için büyük çalışma gruplarından elde edilen veriler ışığında değerlendirilmesinin gerektiği görüldü (*SLC27A3*, *PRLR*, *DUOX2*, *F5*, *CXCL8*, *HLA-DRB5*, *FBN3*). Yedi olguda poligenik etki öngörülerek aynı ya da benzer yolaklarda aktif olan genler tespit edildi (%20). Poligenik etki öngörülen olgular da dahil olmak üzere 10 olguda saptanan genler ile ilgili fonksiyonel çalışmalar planlandı (%28,5). Çalışmamızda saptanan varyantların etkin oldukları yolak ve sistemlere göre dağılımı şöyle idi; metabolizma, siliya aktivitesi ve embriyogenez gibi yaşamın erken evrelerinde yaşamsal etkili, hücre bölünmesi/hücre döngüsü, oosit olgunlaşması ve gelişimi ile gebeliğin ilk dönemlerindeki fetomaternal iletişimi sağlayan genler/yolaklar ile ilgili aile üyelerini kapsayan segregasyon çalışmaları, birden fazla gen varyantının saptandığı olguların eşlerinde de TED analizlerinin gerekliliği ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu görüldü.

Gerçekleştirilen bu tez projesinde kullanılan Tüm ekzom dizileme yönteminin ilişkilendirilmiş genler dışında yeni aday genler saptanmasında oldukça başarılı olduğu görüldü. Kapsanmayan bölgeler, uzun dizilerin ve tekrarların incelenememesi ve gen/gen içi submikroskobik delesyon ve duplikasyonları tespit edememesi tekniğin limitlerini oluşturdu. Yapılan çalışmada sebebi açıklanamayan TGK olgu grubu ile TİK olgu grubundan elde edilen veriler karşılaştırıldığında etkili olan yolakların aynı olduğu tespit edildi. Olgu 19'daki gibi herhangi bir fenotipik bulgunun olmasının, biallelik varyantların saptanmasında başarı sağladığı görüldü.

Son yıllarda gebelik kayıplarının ve yardımcı üreme tekniklerindeki başarısızlıkların altında yatan etiyolojileri açıklamak için birçok çalışma yapılmaktadır ve karşımıza multifaktöriyel etkenlerin yol açabildiği oldukça karışık ve çok etmenli heterojen bir durum çıkmaktadır. TED yöntemi, özellikle TGK gibi multifaktöriyel hastalık tanımına uyan ya da

üreme sistemi ve gebelik gibi oldukça karışık ve çok sayıda yolağın iç içe olduğu durumlarda hem tanı hem de araştırmalar için tercih edilebilir bir yöntemdir. Türkiye gibi akraba evliliği oranının yüksek olduğu toplumlarda OR kalıtmalı nadir hastalıklara yol açabilecek varyantların bir araya gelme ihtimalinin de artmasıyla panel testleri yerine TED kullanımı avantajlı olacaktır. Ayrıca gebelik kaybı materyallerine ulaşamadığı ve maddi yetersizlik gibi nedenlerle sebebi açıklanamayan TGK ve TİK olgu gruplarında ilk aşamada maternal genomun incelenmesi katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında sebebi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon kusurlarının aydınlatılabilmesi açısından önemli bilgilere ulaştığımızı düşünmekteyiz. Saptadığımız aday genlerin fonksiyonel çalışmalarla daha detaylı olarak incelenmesinin önemli katkılar sağlayacağına inanmaktayız.

3.4. Yapılan Bilimsel Etkinlikler: Proje kapsamında bilimsel toplantı, tanıtım ve eğitim toplantıları düzenlenmiş ise bu bölümde takvimlendirerek sıralı bir şekilde verilmeli ve katılımcılar hakkında bilgi verilmelidir.

Yoktur.

3.5. Darboğazlar ve çözüm önerileri: Takvim ve iş paketleri kapsamında karşılaşılan (varsa) olumsuzlukları ve/veya riskler ifade edilmeli, bu darboğazları gidermek için alınan önlemler ve gerçekleştirilen faaliyetler bu bölümde belirtilmelidir.

Proje kapsamında görev alan doktora öğrencisi Dr. Ezgi Berkay pandemiye bağlı olarak 2020 de laboratuvara gelememiş ve saptanan varyantların bazılarının konfirmasyon ve segregasyon çalışmaları tamamlanamamıştır. Ancak bu aşamadaki çalışmalar proje kapsamında yer almamaktadır ve yeni öğrencilerle tamamlanması planlanmıştır.

3.6. İş-Zaman Çizelgesi: Proje önerisinde oluşturulmuş olan iş zaman çizelgesi ele alınarak her bir iş paketinin tamamlama ve hedefe ulaşma durumları grafik olarak belirtilmelidir.

İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ

İş Paketi Adı/Tanımı	Projenin Dönem ve Ayları																																				
	1. 6 aylık dönem						2. 6 aylık dönem						3. 6 aylık dönem						4. 6 aylık dönem						5. 6 aylık dönem						6. 6 aylık dönem						
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
İş paketi 1: Olgu seçimi																																					
İş paketi 2: DNA izolasyonu																																					
İş paketi 3: Yeni Nesil Dizileme																																					
İş paketi 4: Biyoinformatik analiz																																					
İş paketi 5: doğrulama																																					
İş paketi 6:Segregasyon																																					
İş paketi 7: Veri analizi																																					

NOT: Tablodaki satırlar iş paketi sayısına ve ihtiyaca göre azaltılıp çoğaltılabilir. İş paketlerinin tamamlandığı ayları belirlemek için ayların karşılığına gelen gözleri koyu gri ile doldurunuz.

3.7. Proje Tamamlanma Tabloları: İş paketlerinde gerçekleştirilen faaliyetler göz önünde bulundurularak ilerleme tablosu oluşturulmalıdır. Bunun için genel değerlendirmede iş paketlerinin ne kadarının tamamlandığını ifade etmek için %... şeklinde tamamlandı şeklinde sayısal ifade kullanılmalıdır. İş paketlerinin hedefe ulaşma durumları irdelenmelidir.

İş Paketleri	Gerçekleşme oranı
1-Olgu seçimi, çalışma hakkında bilgilendirme, onam formlarının alınması ve maternal kan örneklerinin toplanması, Kapsadığı Ay Aralığı:1-3	%100
2-DNA izolasyonu, Kapsadığı Ay Aralığı:2-4,	%100
3-Yeni Nesil Dizileme (Tüm Ekzom Dizileme), Kapsadığı Ay Aralığı:4-7	%100
4- Biyoinformatik analizler, Kapsadığı Ay Aralığı:7-16,	%100
5-PZR ve Sanger dizileme ile konfirmasyon, Kapsadığı Ay Aralığı:14-17	%100
6-Paternal kanların, abortus materyallerin toplanması, DNA izolasyonu, PZR ve Sanger dizileme, Kapsadığı Ay Aralığı:14-17,	%100
7-Verilerin moleküler ve klinik açıdan değerlendirilmesi, yorumlanması, yayın haline getirilmesi, Kapsadığı Ay Aralığı:14-24,	%100

3.8. Çalışma Planı Değişiklikleri: Proje Çalışma Takvimine Uygun Yürütülememişse veya iptal edilmiş, değişiklik yapılmış olan iş paketleri varsa Gerekçeleri ve yapılan değişikliklerin hedefine ulaşp ulaşmadığı iş paketleri bazında gerekçeleri açıklanmalıdır.

Yoktur

4. İDARİ BÖLÜM

4.1. Gelişme Dönem İçindeki Proje Yönetimi ile İlgili Gelişmeler, Risklerin Değerlendirilmesi ve Çözüm Önerileri: Proje kapsamında faaliyetlerin yürütülmesi sırasında idari olarak karşılaşılan sorunlar ele alınmalıdır. Proje işleyişi ile ilgili veya malzeme

temininde yaşanan sıkıntılar ve nedenleri konusu bu bölümde ele alınmalıdır. Karşılaşılan problemler özelinde varsa çözüm önerileri ifade edilmelidir.

Yoktur

4.2. Personel Değişiklik Tablosu: Yürütücü değişikliği, yardımcı araştırmacı değişikliği veya eklenmesi gerekçeleri ile belirtilmelidir.

PROJE PERSONELİ DEĞİŞİKLİK TABLOSU					
T.C. Kimlik No.	Adı, Soyadı	Katılma Tarihi	Ayrılış Tarihi	Projedeki Görevi	Ayrılma/Katılma Nedeni

4.3. Proje ek süre ihtiyacının belirlenmesi: Proje işleyişi sırasında çıkan aksaklıklara bağlı olarak alınan ek süre ve gerekçeleri ayrıntılı olarak bu bölümde ifade edilmelidir. Hedefe ulaşmada katkısı vurgulanmalıdır.

Yoktur

5. MALİ BÖLÜM

5.1. Bütçe: Projede yapılan harcamalar ve bütçe durumu bu bölümde ele alınmalı ve bütçenin son hali tablo şeklinde verilmelidir.

Harcama Kalemi	Öngörölmüş Maliyet	Gerçekleşen Harcama	Kalan Bütçe
Demirbaş			
Bilgisayar ve Bilgisayar Parçası alımları			
Tüketime Yönelik Malzeme			
Kırtasiye Alımları ve Fotokopi			

Yolluk Yevmiye			
Hizmet Alımı	49.680,00 TL	49.545,00 TL	135,00 TL
Bakım Onarım			
Canlı Hayvan ve Yem Alımı			

5.2. Harcan(a)mayan Kalemlere İlişkin Açıklamalar: Projede öngörülmüş ama gerçekleşmemiş harcamaların neden gerçekleştirilemediği konusunda bilgi verilmelidir.

Pandemi nedeniyle kongre katılımı ve seyahat yapılmadı.

5.4. Harcamalara İlişkin Zorluklar: Harcamalarda karşılaşılan sorunlar ve nedenleri ifade edilmeli ve varsa çözüm önerileri belirtilmelidir.

Yoktur

6. PROJE ÇIKTILARI ve EKLER

6.1 Dönem İçinde Yayımlanan ve Toplantılarda Sunulan Yayınlar/Bildiriler: Proje faaliyetleri sırasında yapılmış makale, kongre bildirisi, teknik rapor, patent başvurusu gibi ara çıktılar belirtilmeli ve künyeleri ile hem akademik veri yönetim sistemine proje atıf edilerek işlenmeli hem de bu bölümde listelenmelidir. Yapılmış makalelere alınmış atıflar var ise bu bölümde bunlar da gösterilmelidir.

E-poster: **Ezgi G. Berkay**, Birsen Karaman, Guven Toksoy, Bilge Ozsait Selcuk, Zehra O. Uyguner, Seher Basaran. A case report of a rare nonsense ZP1 variant in a patient with oocyte maturation defect (P01.049.A). *ESHG 2020.2 Live in Your Living Room. Virtual Conference. June 6-9, 2020.*

Sözlü Sunum: **Ezgi Gizem Berkay**, Güven Toksoy, Çağrı Güleç, Zehra Oya Uyguner, Seher Başaran. Sebebi Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kaybı ve Tekrarlayan İmplantasyon Defekti Olgularında Etiyolojinin Açıklanmasına Yönelik Yeni Yolaklar ve Genler. *14. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 2020.*

Uluslararası dergilerde yayınlanmış özet: **Ezgi G. Berkay**, Birsen Karaman, Guven Toksoy, Bilge Ozsait Selcuk, Zehra O. Uyguner, Seher Basaran. Abstracts from the 53rd European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: Interactive e-Posters: A case report of a rare nonsense ZP1 variant in a patient with oocyte maturation defect. *European Journal of Human Genetics. 2020;28;141–797. doi: [10.1038/s41431-020-00739-z](https://doi.org/10.1038/s41431-020-00739-z)*

Uluslararası dergilerde yayınlanmış özet: ERGÜN, M. A. 14. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi “Uluslararası Katılımlı”. **Ezgi Gizem Berkay**, Güven Toksoy, Çağrı Güleş, Zehra Oya Uyguner, Seher Başaran. SB-03: Sebebi Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kaybı ve Tekrarlayan İmplantasyon Defekti Olgularında Etiyolojinin Açıklanmasına Yönelik Yeni Yolaklar ve Genler. *Gazi Medical Journal*, Vol. 31 No. 4A (2020): Gazi Medical Journal Supplement:P10.