

**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**NON-SENDROMİK KONJENİTAL KALP**  
**HASTALIKLARINDA**  
**ADAY GENLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sinem KOCAGİL**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR**

**2020**



**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**NON-SENDROMİK KONJENİTAL KALP**  
**HASTALIKLARINDA**  
**ADAY GENLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sinem KOCAGİL**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI**

**Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR**

**ESKİŞEHİR**

**2020**

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĐINA,

Dr. Sinem KOCAGİL'e ait "Non-Sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Aday Genlerin Değerlendirilmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 21.08.2020

Jüri BaŐkanı: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Gazi Üniversitesi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun Tarih  
ve Sayılı Kararı ile OnaylanmıŐtır.

Prof.Dr.İ.Özkan ALATAŐ  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince her konuda bana yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e; kıymetli bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sevilhan ARTAN başta olmak üzere değerli hocalarım Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS'a, Dr. Öğr. Üy. Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP'e; kendilerini tanımaktan ve aynı bölümde çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma; değerli çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Sabri AYNACI, Bio. Büşra ÖZKAN başta olmak üzere tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na; olguların değerlendirilmesi ve yönlendirilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Birsen UÇAR'a, Dr. Öğr. Üy. Pelin KÖŞGER'e, Uzm. Dr. Tuğçem KESGİN'e, Uzm. Dr. Hikmet KIZTANIR'a ve tüm hayatım boyunca yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, babam Uzm. Dr. Kazım KOCAGİL, annem Tijen KOCAGİL ve ağabeyim Şerif KOCAGİL'e sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

Konjenital kalp hastalıkları (KKH) toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlar olup, süt çocukluklarında %1 sıklıkta izlenmektedir. Konjenital kalp hastalıkları etiyojisinde yer alan nedenlerin %20-25'lik kısmını genetik nedenler oluşturmaktadır. İzole/non-sendromik konjenital kalp hastalıkları herhangi bir ilave doğumsal malformasyonun veya nörolojik bulgunun eşlik etmediği gruptur. Bu grupta rol oynayan moleküler yolakların genellikle primordial kardiyojenik odaklar, kardiyak kresent, primitif kalp tüpleri, primitif atriyumlar, primitif ventriküller, girim ve çıkım yolaklarının morfogenezisi sırasında kesintiye uğraması sonucu hastalığın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, ekokardiyografi ile değerlendirme sonrası non-sendromik KKH tanısı alan ve yapılan mikroarray analizinde herhangi bir patojenik/olası patojenik kopya numarası değişikliği saptanmayan 0-18 yaş grubundaki 40 hasta ve benzer yaş grubunda olan 40 kontrol bireyde, KKH etiyojisinde yer aldığı bilinen *MYH6*, *NKX2-5*, *GATA4*, *NOTCH1*, *TBX1* genleri yeni nesil dizi analizi yöntemi ile dizilendi. Saptanan tüm varyantlar ACMG kriterlerine göre sınıflandırılıp patojenite skorlaması yapıldı. Patojenik/olası patojenik sınıfına uygun herhangi bir varyant saptanmamış olmakla birlikte, *NKX2-5* geninde (NM\_004387.3) c.355G>T p.(Ala119Ser) varyantı, *NOTCH2* geninde (NM\_017617.3) c.700C>T p.(Arg234Cys) varyantı ve *MYH6* geninde (NM\_002471.3) c.3251+72G>A (rs372656808) varyantları "Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant" olarak sınıflandırıldı ve kontrol grubunda bu varyantlara rastlanmadı. Saptanan varyantların segregasyon çalışmaları yapıldı ve çalışma sonuçları literatür verileri ile kapsamlı bir şekilde değerlendirildi.

**Anahtar kelimeler:** Konjenital Kalp Hastalıkları, Yeni Nesil Dizileme,  
Aday Genler

**Destekleyen Kurumlar:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Komisyonu, Proje No 2019-2758

## ABSTRACT

Congenital heart disease is the most common congenital malformation in the population. The prevalence of the disease is 1% in the infantile period. All the known genetic factors explain approximately 20-25% of the cases. Nonsyndromic congenital heart diseases are the heart defects without any detected extracardiac anomalies or neurologic symptoms. Disruption of the molecular pathways during the morphogenesis of the primordial cardiogenic cords, primitive cardiac tubes, primitive atrium, primitive ventricles and outflow tracts are believed to be the main reasons of the nonsyndromic congenital heart disease. In this study, MYH6, NKX2-5, GATA4, NOTCH1 and TBX1 genes, that are known to be involved in the etiology of nonsyndromic congenital heart disease, were sequenced by next generation sequencing platform in the 40 patients between the ages of 0-18. Patients were diagnosed with congenital heart defects by echocardiography and did not have any likely pathogenic/pathogenic CNVs detected by microarray analysis. Also age-matched 40 controls without any cardiac defects were evaluated. All the variants are analyzed and classified according to the ACMG criteria. There were no pathogenic or likely pathogenic variants according to the classification, yet c.355G>T p.(Ala119Ser) variant in NKX2-5 gene, c.700C>T p.(Arg234Cys) variant in NOTCH1 gene and c.3251+72G>A (rs372656808) variant in MYH6 gene were classified as “Variant of Uncertain Significance” and were not detected in the control group. Segregation analyses have been done for the relevant variants and the results are evaluated with previously published literature.

**Key words:** Congenital Heart Disease, New Generation Sequencing, Candidate genes

**Supporting Institutions:** Scientific Research Project Commission, Eskisehir

Osmangazi University, Project No 2019-2758

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Epidemiyolojisi	3
2.2. Kardiyogenez	3
2.2. Konjenital kalp hastalıkları sınıflandırılması	8
2.2.1. Septal Defektler	8
2.2.2. Atriyoventriküler Kanal Defektleri	10
2.2.3. Konotrunkal Anomaliler	12
2.2.4. Heterotaksi	13
2.2.5. Sol Ventrikül Çıkım Yolu Defektler	14
2.2.6. Sağ Ventrikül Çıkım Yolu Defektleri	14
2.2.7. Pulmoner Venöz Dönüş Anomalileri	14
2.2.8. Kompleks Kardiyak Anomaliler	14
2.3. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezi	15
2.3.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Genetik Olmayan Nedenler	15
2.3.2. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Genetik Nedenler	17
2.3.3. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Epigenetik Nedenler	32
2.4. Yeni Nesil Dizi Analizi ve Konjenital Kalp Hastalıklarındaki Yeri	34



3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Araştırma Grubu	36
3.2. Kullanılan Alet ve Malzemler	37
3.2.1. Kullanılan Aletler	37
3.2.2. Kullanılan Malzelemer	37
3.3. Yöntem	38
3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi	38
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Amplikon Basamağı	38
3.3.3. Kütüphane Hazırlama	39
3.3.4. Hazırlanan Kütüphanenin Denatürasyonu ve Cihaza Yükleme	40
3.3.5. Verilerin Analizi	41
3.3.6. . Varyantların Doğrulanması ve Segregasyon Çalışması	46
4. BULGULAR	47
4.1. Olguların Demografik Özellikleri	48
4.2. Olguların Klinik Özellikleri	48
4.3. Olgularda Saptanan Varyantlar	49
4.3.1. <i>NKX2-5</i> Geninde Saptanan Varyantlar	50
4.3.2. <i>TBX1</i> Geninde Saptanan Varyantlar	50
4.3.3. <i>NOTCH1</i> Geninde Saptanan Varyantlar	52
4.3.4. <i>GATA4</i> Geninde Saptanan Varyantlar	55
4.3.5. <i>MYH6</i> Geninde Saptanan Varyantlar	56
4.4. Olgularda Saptanan Varyantlar Sınıflandırılması ve Özellikleri	59
4.4.1. Saptanan Klinik Önemi Bilinmeyen Değişiklikler	61
4.4.2. Saptanan Nadir Benign Varyantlar	67
5. TARTIŞMA	72
5.1. Çalışmamıza Ait Demografik ve Klinik Verilerinin Literatürle Karşılaştırılması	72
5.2. Çalışmamızda Saptanan Varyant Verilerinin Literatür Verileri ile Karşılaştırılması	73
5.2.1. Çalışmamızda <i>MYH6</i> Geninde Saptanan Klinik Önemi	75

Bilinmeyen Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması	
5.2.2. Çalışmamızda <i>NOTCH1</i> Geninde Saptanan Klinik Önemi	76
Bilinmeyen Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması	
5.2.3. Çalışmamızda <i>NKX2-5</i> Geninde Saptanan Klinik Önemi	77
Bilinmeyen Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması	
5.2.4. Çalışmamızda <i>NOTCH1</i> Geninde Saptanan Nadir Benign Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması	80
5.2.5. Çalışmamızda <i>NKX2-5</i> Geninde Saptanan Nadir Benign Varyantların Literatür Verileri ile Karşılaştırılması	82
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR	85

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ANK3	<i>Ankyrin-3</i>
ASD	Atriyal Septal Defekt
ATM	Amplicon Tagment Miks
AV	Atriyovenriküler
BA	<i>Benign Stand Alone</i>
BAM	<i>Binary Alignment Map</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BP	<i>Benign Supporting</i>
BS	<i>Benign Strong</i>
cDNA	komplementer DNA
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CGH	<i>Comperative Genomic Hibridisation</i>
c-TGA	Konjenital Düzeltilmiş Büyük Arter Transpozisyonu
DANN	<i>Deep Learning Approach for Annotating</i>
dbSNP	<i>Database of SNP</i>
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	Deoksiribonükleik Asit MetilTransferaz
DOLV	Çift Çıkımlı Sol Ventrikül
DORV	Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül
dsDNA	<i>Doublestrand DNA</i>
D-TGA	Sağ-Büyük Arter Transpozisyonu
ExAC	<i>The Exome Aggregation Consortium</i>
G	Gravite
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
GERP	<i>Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>

GWAS	Genom çapında ilişkilendirme alışmaları
HSKS	Hipoplastik Sol Kalp Sendromu
HT1	Hibridizasyon tamponu
IGV	<i>The Integrative Genomics Viewer</i>
Indel	İnseriyon/Delesyon
KKH	Konjenital Kalp Hastalıkları
KND	Kopya Numarası Değişiklikleri
LncRNA	<i>Long Noncoding RNA</i>
μl	mikrolitre
ml	mililitre
miRNA	Mikro RNA
N	Normalite
ND	Normal Değer
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBDPS	<i>National Birth Defects Prevention Study</i>
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAPVDA	Parsiyel Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi
PDA	Patent Duktus Arteriozus
piRNA	Piwi etkileřimli RNA
pM	pikomolar
PM	<i>Pathogenic Moderate</i>
PS1	<i>Pathogenic Strong</i>
PP	<i>Pathogenic Supporting</i>
PS	Pulmoner Stenoz
PVS	<i>Pathogenic Very Strong</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>

RSB	<i>Resuspension Buffer</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SiRNA	<i>Silencer RNA</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Değişimi
SVC	Superior Vena Kava
VEP	<i>Variant Effect Predictor</i>
VCF	<i>Variant Call File</i>
VSD	Ventriküler Septal Defekt
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance</i> – Klinik Önemi Bilinmeyen Değişiklik
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> – Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WT	<i>Wildtype</i>
TM	<i>Tinman</i>
TOF	Fallot Tetralojisi
TAPVDA	Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi
TD	<i>Tagment DNA</i>
UTR	Tranlasyona Uğramayan Bölgeler

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Embriyonik Dönemde 21-28. Günler Arasında Kardiyak Tübülün Oluşumu ve Bulboventriküler Boğumlanma	4
2.2. Primordiyal Kalbin Bölümlerine Ayrılması	5
2.3. Primordiyal Atriyumun Gelişimi	6
2.4. Bulbus Kordisden Trunkus Arteriosus ve Semilunar Kapakçıklıkların Gelişimi	7
2.5. Ventriküler Septal Defekt Çeşitleri	9
2.6. Atriyal Septal Defekt Çeşitleri	10
2.7. Atriyovenriküler Kanal Defekt Çeşitleri	11
2.8. Sık İzlenen Konotrunkal Anomaliler	12
2.9. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Tek Genler	22
2.10. <i>NKX2-5</i> Geninin <i>TBX5</i> ve <i>MEF2C</i> ile Birlikte Oluşturduğu Heterodimer Yapı ve Transkripsiyon Aktivasyonu	25
2.11. Miyozin Proteini Yapısı ve Aktin-Miyozin Etkileşimi	27
2.12. Miyozin Ağır Zincir Proteinlerinin Embryonik Dönemdeki Aktivasyonu	27
2.13. <i>TBX1</i> Geni Aracılı Birincil ve İkincil Kardiyak Alanlardan Ventrikül Diferansiyasyonu	28
2.14. Notch Reseptörlerinin İntrasellüler ve Ekstrasellüler Kompartmanları	31
2.15. Kardiyogenezde NOTCH1 (N1ICD) Sinyal Yolağı ve Fonksiyonel Etkileri	31
4.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Takip Formu	47
4.2. Çalışmada Saptanan Varyantların ACMG Kriterlerine Göre Sınıflandırılmış Patojenite Skorlarının Dağılımı	61

4.3.	Olgu 12’de <i>NKX2-5</i> Geninde (NM_004387.4) Saptanan c.355G>T (rs137852684) Varyantının IGV Görüntüsü ve Olguya Ait Pedigri Analizi	63
4.4.	Olgu 34’de <i>NOTCH1</i> Geninde (NM_017617.5) c.700C>T (rs567890045) Varyantı IGV Görüntüsü ve Olguya Ait Pedigri Analizi	65
4.5.	Olgu 22’de <i>MYH6</i> Geninde (NM_002471.3) Saptanan İntronik c.3251+72G>A (rs372656808) Varyantı IGV Görüntüsü ve Olguya Ait Pedigri Analizi	66
5.1.	Hastalarda Saptanan Kardiyak Anomali Çeşitleri ve Oranları	73
5.2.	<i>NOTCH1</i> Geninde Yer Alan Yanlış Anlamlı ve Fonskiyon Kaybına Neden Olan Varyantlar	77
5.3.	<i>NKX2-5</i> Geninde Saptanan Varyantların Lokalizasyonu	78

## TABLOLAR

		Sayfa
2.1.	Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Saptanan Kopya Numarası Değişiklikleri	21
2.2.	Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Genler ve İlişkili Defektler	23
3.1.	Çalışmaya Dahil Edilen Genlere Ait Kapsama Bilgileri	41
3.2.	Varyantların Patojenik Olarak Sınıflandırılmasında Kullanılan Kriterler	44
3.3.	Varyantların Benign Olarak Sınıflandırılmasında Kullanılan Kriterler	45
3.4.	Patojenite Sınıflandırması ve Kullanılan Kriterler	46
4.1.	Olguların Cinsiyetlere Göre Dağılımı	48
4.2.	Hasta Grubunda Saptanan Kardiyak Defektler	48
4.3.	<i>NKX2-5</i> Geninde Saptanan Varyantlar	50
4.4.	<i>TBX1</i> Geninde Saptanan Varyantlar	51
4.5.	<i>NOTCH1</i> Geninde Saptanan Varyantlar	52
4.6.	<i>GATA4</i> Geninde Saptanan Varyantlar	55
4.7.	<i>MYH6</i> Geninde Saptanan Varyantlar	57
4.8.	Çalışmada Saptanan Eşanlı Olmayan Varyantlar	60
4.9.	Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant Saptanan Olgularda Bulunan Konjenital Kalp Hastalıkları	61
4.10.	<i>NKX2-5</i> (NM_004387.4) geninde saptanan c.355G>T p.(Ala119Ser) Varyantının Sınıflandırılma Kriterleri	62
4.11.	<i>NOTCH1</i> (NM_017617.5) geninde saptanan c.700C>T p.(Arg234Cys) varyantının sınıflandırma kriterleri	64
4.12.	<i>MYH6</i> (NM_002471.3) geninde saptanan intronik c.3251+72G>A varyantının sınıflandırma kriterleri	66
4.13.	<i>NOTCH1</i> (NM_017617.5) geninde saptanan c.3836G>A p.(Arg1279His) varyantının sınıflandırma kriterleri	67



4.14.	<i>NKX2-5</i> (NM_004387.4) geninde saptanan c.63A>G (p.Glu21=) varyantının sınıflandırma kriterleri	68
4.15.	<i>NKX2-5</i> (NM_004387.4) geninde c.63A>G (p.Glu21=) Varyantı Saptanan Olgular ve Bu Olgularda Saptanan Konjenital Kalp Hastalıkları	69
4.16.	<i>NKX2-5</i> (NM_004387.4) geninde c.809G>A (p.Cys270Tyr) varyantının sınıflandırma kriterleri	70
4.17.	<i>NOTCH1</i> (NM_017617.5) geninde saptanan c.5949C>G p.(Asn1983Lys) varyantının sınıflandırma kriterleri	71

## 1.GİRİŞ

Konjenital kalp hastalıkları (KKH) toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlar olup, süt çocukluklarında %1 sıklıkta izlenmektedir (1). Toplumlar arasında değişkenlik göstermekle birlikte her yıl yaklaşık 1.35 milyon yeni hastanın hayata geldiği bilinmektedir (2). Konjenital kalp hastalıkları etiyojisinde genetik ve genetik dışı nedenler yer almaktadır (2, 3). Bilinen tüm genetik nedenler, KKH'larının yaklaşık %20-25'lik kısmını açıklayabilmektedir (4). Genetik nedenler oldukça heterojen bir grup olup olguların yaklaşık %25-40'ında diğer konjenital malformasyonlar ve sendromların eşlik ettiği bilinmektedir (5). Konvansiyonel sitogenetik analizlerle saptanabilecek kromozomal aberasyonların konjenital kalp hastalıkları genetik etiyojisinin %10-12'lik kısmını oluşturduğu, 22q11.2 delesyon sendromu, Williams sendromu gibi submikroskopik aberasyonların ise KKH genetik etiyojisinin %3-20'lik kısmını oluşturduğu bilinmektedir (6). Alagille sendromu, Noonan sendromu, Kabuki sendromu, Holt-Oram sendromu, Sotos sendromu gibi monogenik hastalıkların ise konjenital kalp hastalıklarının genetik etiyojisinin % 3-5'lik kısmından sorumlu olduğu bilinmektedir (3).

İzole/non-sendromik konjenital kalp hastalıkları gelişim geriliği, bilişsel gerilik veya herhangi bir ek konjenital malformasyonun eşlik etmediği hastalık grubu olarak sınıflandırılmaktadır. Bu grup için güncel literatürde olguların yaklaşık %20-25'lik kısmının genetik etiyojenezi aydınlatılabilirken, ekstakardiyak bulgusu olan hastalık grubundan genetik etiyojenezin %51'lik kısmı aydınlatılabilmektedir (7). Geniş hasta gruplarında yapılan farklı çalışmalarda, massif parallel sekanslama yöntemlerinin de gelişmesiyle birlikte tek gen ilişkili nokta mutasyonlarının KKH'ların %2-10 arasında saptandığı bildirilmiştir (8). Yapılan ikiz çalışmaları, hastalığın ekspresyon farklılığı gösterse bile genetik bir geçişe sahip olduğunu düşündürmektedir ve aile öyküsü pozitif olan bireylerde KKH saptanma riskinin % 4.2 olduğu bildirilmektedir. Diğer taraftan, yapılan çalışmalarda ebeveynler arası akrabalığın KKH çocuk doğurma riskini 2-3 kat arttırdığını ortaya koymaktadır (4). İzole KKH'ya neden olan genetik etkenlerin aydınlatılması, model organizma çalışmaları sayesinde

hız kazanmıştır. Moleküler yolakların genellikle primordial kardiyojenik odaklar, kardiyak kresent, primitif kalp tüpleri ve atriyal, ventriküler, girim ve çıkım yolaklarının morfogenezi sırasında kesintiye uğraması sonucu hastalık ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu moleküler yolaklarda önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerini, kardiyak yapısal proteinlerini ve sinyal iletim yolaklarını kodlayan genlerdeki patojenik varyantların hastalık ortaya çıkmasındaki önemi ortaya çıkmıştır (9, 10). DNA linkaj analizleri, GWAS (genom çapında ilişkilendirme çalışmaları), ekspresyon analizleri ve fonksiyonel çalışmalar kompleks bir hastalık grubu olan KKH etiyopatogenezinin aydınlatılmasında son yıllarda önemli bir rol oynamaktadır. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte de; tüm genom - ekzom analizleri veya hastalık spesifik gen panelleri kullanılarak hedefe yönelik analizler yapılmakta ve KKH'nın olası Mendelyen kalıtımından sorumlu genlerdeki patojenik varyantlar tanımlanabilmektedir (11, 12).

Bu çalışmada; non-sendromik KKH'nda hastalık etiyojisinde yer aldığı bilinen *MYH6*, *NKX2-5*, *GATA4*, *NOTCH1*, *TBX1* gen varyantları belirlenerek aday patojenik mutasyonlar ve hastalığa yatkınlık sağlayan tek nükleotid polimorfizmlerinin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 0-18 yaş grubunda non-sendromik KKH tanısı alan ve periferik kan örneklerinden çalışılan mikroarray (CGH+SNP Microarray Kit 4x180K, Agilent Inc, USA) analizi sonucunda olası patojenik/patojenik herhangi bir kopya numarası değişikliği (KND) saptanmayan, 40 hasta ve benzer yaş grubundaki 40 sağlıklı kontrol bireyde aday genlerin ekzon, intron, ekzon-intron kavşakları, 5'UTR ve 3'UTR uçlarının yeni nesil dizi analizi yöntemi ile dizilenmesi hedeflenmiştir.

Elde edilen veriler ışığında multifaktöriyel kalıtım gösterdiği bilinen KKH'larının altında yatan moleküler etiyopatogenezin aydınlatılması ve gelecekte hedefe yönelik yeni nesil tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bilgilerimiz dahilinde bu çalışma ülkemizde KKH genetiği ile ilgili en geniş verilerin elde edileceği ilk araştırma olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışma verileri, KKH patogenezinde ilişkili gen ve yolakların belirlenmesi, ekspresyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi açısından yeni çalışmalara öncülük edebilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Epidemiyolojisi

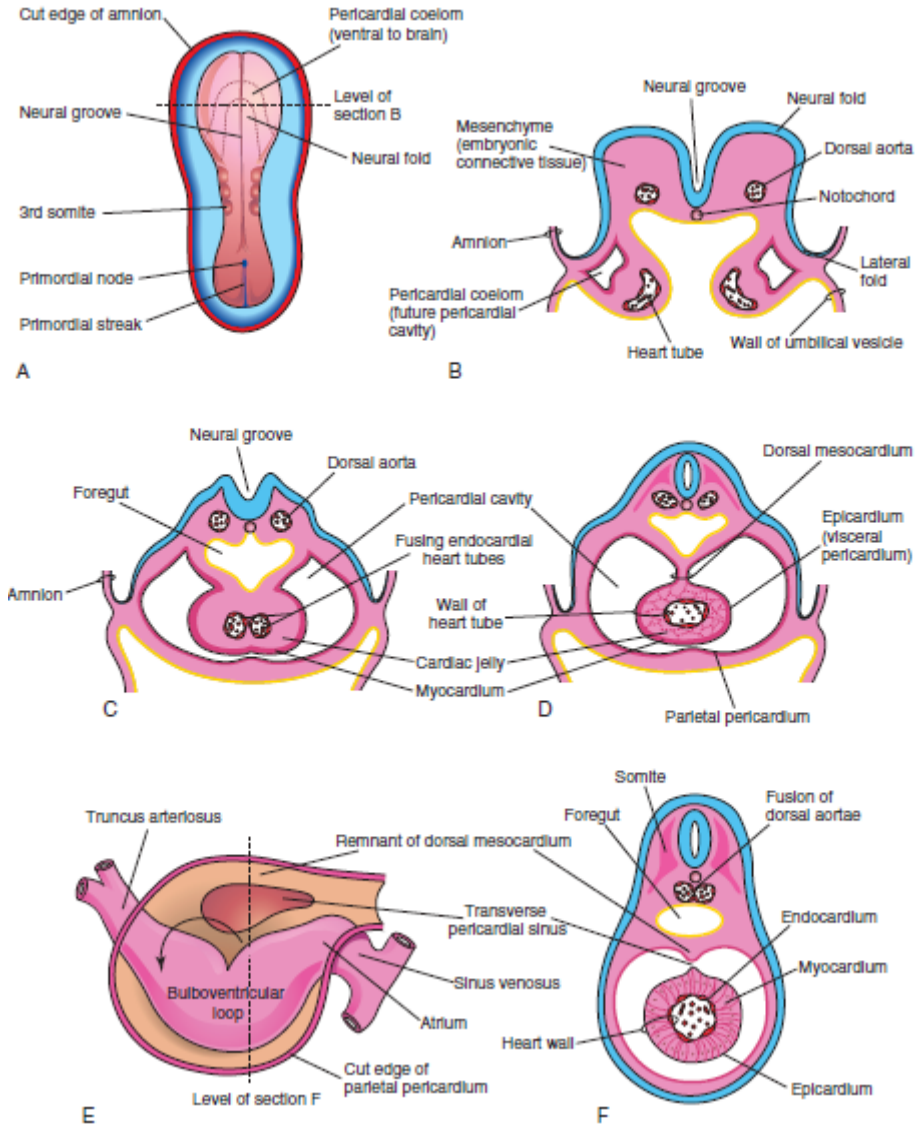
Konjenital kalp hastalıkları (KKH) toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlar olup, süt çocukluklarında %1 sıklıkta izlenmektedir (1). Toplumlar arasında değişkenlik göstermekle birlikte her yıl yaklaşık 1.35 milyon yeni hastanın hayata geldiği bilinmektedir (2). Yeni nesil cerrahi ve ilaç tedavilerinin son yıllarda hızlı bir şekilde gelişmesi ile birlikte hastaların sağ kalım oranları artmış olup, erişkin KKH'larının görülme sıklığının artmasına neden olmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda hastalığın çocukluk çağı için prevalansının %1.3, erişkinlik çağı için ise %0.6 olduğu bildirilmiştir (13).

### 2.2. Kardiyogenez

Kardiyovasküler sistem embriyonik dönemde fonksiyon göstermeye başlayan ilk sistemdir. Gelişmekte olan embriyoda üçüncü hafta içerisinde kardiyogenez başlar. Erken embriyonik dönemde anterolateral mezodermden göç eden kardiyojenik prekürsör hücrelerin kardiyak kresenti oluşturmasıyla birlikte primer kardiyak alan oluşur. Primer kardiyak alanda yer alan hücreler endokardiyal tüpleri meydana getirir. Üçüncü hafta sonunda bu oluşan endokardiyal tüpler embriyonun rostral-kaudal ve lateral kıvrılması sonucu birleşmesiyle tek lineer kalp tüpünü oluşturur ve bu yapı sol ventrikül, atriyumlar ve sağ ventrikülün bir kısmını oluşturur. Oluşan primitif kalp 22-23. günlerde atmaya başlar ve kan akımı dördüncü hafta içerisinde başlar. Oluşan lineer kalp tüpü ve perikardiyal boşluğun etrafı farengeal ve splankik mezodermden köken alan hücrelerle çevrilir ve miyokardı oluşturacak olan ikincil kardiyak alan buradan gelişir (14).

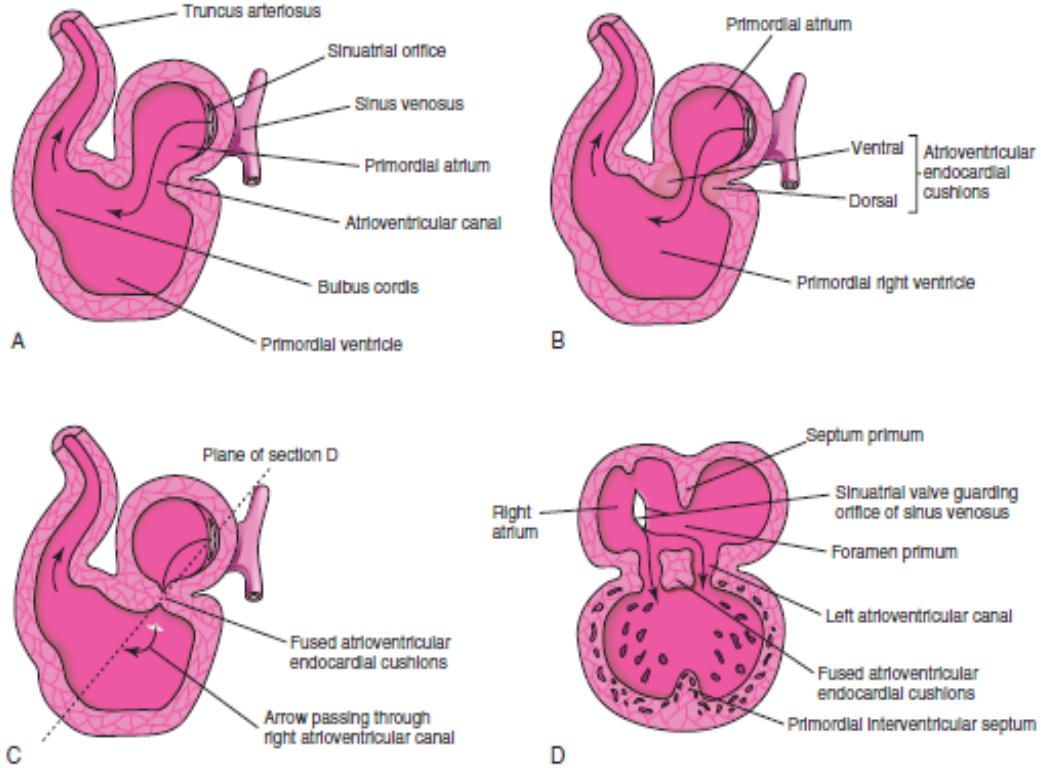
Embriyonun rostral bölgesinin katlanmasıyla devam etmesi ile birlikte kalp ve perikardiyal kavite orofarengeal membran kaudaline doğru konumlanır ve burada kalp tüpü uzayarak gelişimine devam eder. Bu aşamada ortaya çıkan yapılar; bulbus kordis, ventriküller, atriyumlar ve sinus venozusdur. Bulbus kordis, trunkus arteriosus, konus arteriosus ve konus kordisi oluşturur. Sinus venosus, plasentadan gelen umbilikal veen

ve diğer sistemik venlerin bağlandığı bir bölge olarak görev alır. 23-28. Günler arasında tübüler kalp yapısı spesifik bir katlanmaya uğrayarak kalpin sola açılan axisinin yönünü oluşturur. Bu U-şeklinde bulboventriküler boğumlanmadan sorumlu olan sinyal yolları BMP, Notch, Wnt ve SHH yollarıdır (15). (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. : Embriyonik Dönemde 21-28. Günler Arasında Kardiyak Tübülün Oluşumu ve Bulboventriküler Boğumlanma - Moore KL ve ark. 2018 uyarlanmıştır (14).

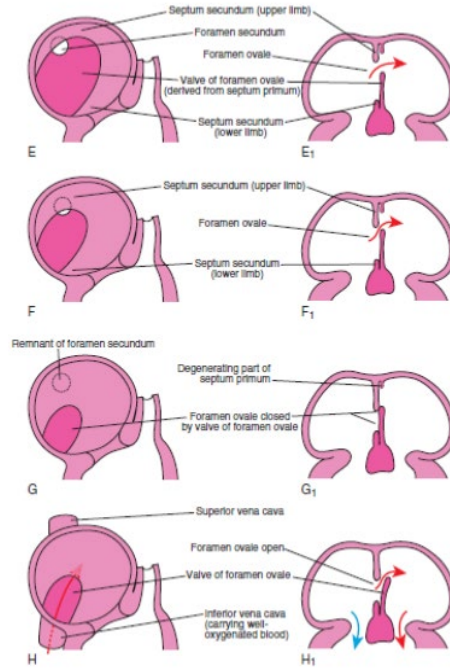
Primordiyal kalbin bölümlerine ayrılması dördüncü hafta içinde başlar ve sekizinci hafta sonunda tamamlanır. Atriyovenriküler kanalın ayrılması dördüncü hafta başında atriyovenriküler kanalın dorsal ve ventral yüzeylerinde yer alan endokardiyal yastıkların gelişimiyle başlar. Bu endokardiyal yastıklar mezenkimal hücrelerin göçü sonrasında birbirlerine yaklaşıp füzyone olur, sağ ve sol atriyovenriküler kanalları oluştururlar. Bu kanallar atriyum ve ventrikülleri birbirlerinden ayırır ve primordiyal AV kapakçıklar olarak görev oynarlar. Bu dönemde endokardiyal yastıklarda sentezlenen TGFB1, TGFB2, BMP2a, BMP4, SNAI2 ve CHALK2 proteinlerin, AV kapakların ve kalbin membranöz septumunun oluşumundan sorumlu olduğu bilinmektedir (14) (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. Primordiyal Kalbin Bölümlerine Ayrılması - Moore KL ve ark. 2018 uyarlanmıştır (14).

Primordial atriyumun oluşması dördüncü haftada başlar. Primordiyal atriyum, sağ ve sol atriyuma septum primum ve septum sekundumun füzyone olması ile

dönüşür. Septum primum kresentik yapıda bir membran olup gelişmekte olan atriyum duvarından endokardiyal yastıkçıklara doğru gelişir ve endokardiyal yastıkçıklarla birleşir. Septum primum gelişmeye başladıkça foramen primumda gelişmeye başlar ve sağ-sol atriyum arasında bir şant görevi görür. Septum primum, AV endokardiyal yastıkçıklarla birleşerek primordial AV septumu oluşturur. Foramen primumun AV endokardiyal yastıkçıklarla füzyone olması ile eş zamanlı olarak foramen primumun santralinde yer alan hücrelerde apoptotik süreç başlar ve burada foramen sekundum olarak isimlendirilen yeni bir açıklık ortaya çıkar. Septum primumla eş zamanlı olarak sağ atriyumun ventrokranial duvarından septum sekundum gelişmeye başlar ve foramen sekundumu örtterek iki atriyum duvarı arasında inkomplet bir açıklık bırakır. Fonksiyonel olan bu açıklık doğum sonrası fizyolojik olarak kapanması beklenen foramen ovaleyi oluşturur (15). (Şekil 2.3.)

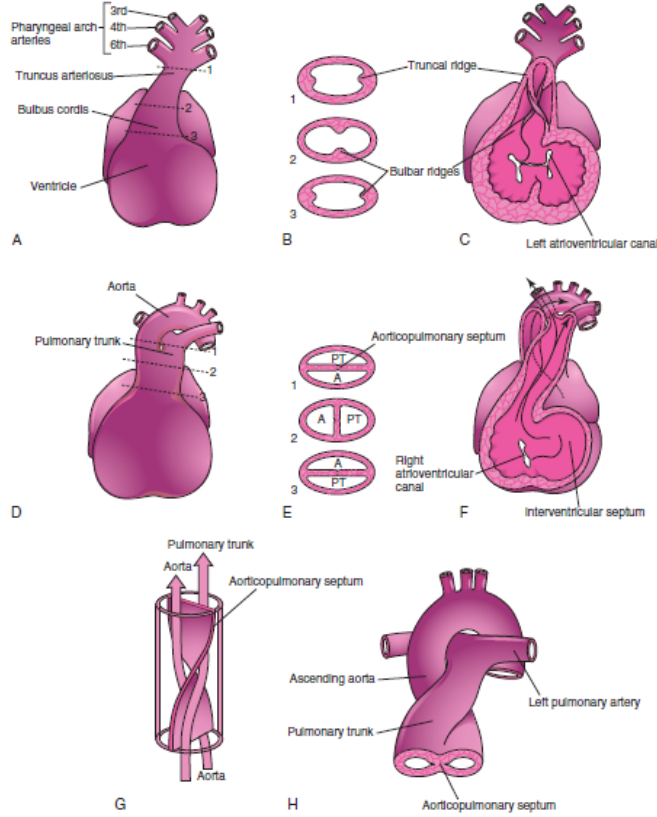


Şekil 2.3. Primordiyal Atriyumun Gelişimi - Moore KL ve ark. 2018 uyarlanmıştır (14).

Ventriküllerin gelişimi orta hatta yer alan interventriküler septumun gelişimi ile başlar. Miyoblastların septumda çoğalmasıyla birlikte septumun kalınlığı artar. 7.

Haftanın sonunda interventriküler foramen kapanmaya başlar ve bu bölgede yer alan membranöz interventriküler septum endokardiyal yastıkçıklardan, septumun muskuler kısmından ve nöral krest hücrelerinden meydana gelir (16).

5. hafta civarında bulbus kordis duvarında bulbar katlantıların meydana gelmesi ile trunkus arteriozus oluşur. Nöral krest hücrelerinin göç etmesiyle birlikte bulbar ve trunkal katlantılar 180 derece spiral şekilde dönmeye başlar ve aortikopulmoner septumu oluşturur. Bulbus kordis sağ ventrikülde konus arteriozusu, sol ventrikülde de aortik vestibülü oluşturur. Trunkus arteriozusun bölünmesi ile eş zamanlı olarak subendokardiyal dokudan semilunar kapakçıklar gelişmeye başlar. AV kapaklarda benzer mekanizma ile AV kanalları oluşturan dokudan meydana gelir (17). (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. Bulbus Kordisten Trunkus Arteriosus ve Semilunar Kapakçıkların Gelişimi - Moore KL ve ark. 2018 Uyarlanmıştır (14).



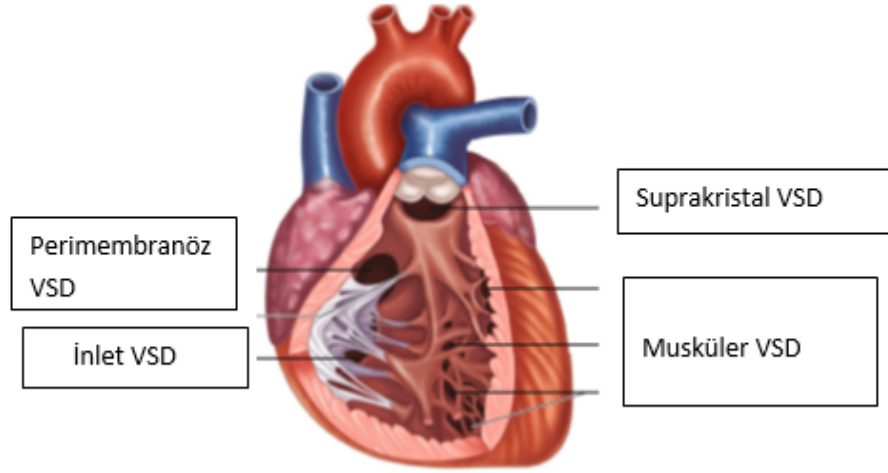
## 2.2. Konjenital kalp hastalıkları sınıflandırılması

Konjenital kalp hastalıkları anatomik, klinik, epidemiyolojik ve gelişimsel süreçte incelendiğinde oldukça heterojen bir hastalık grubunu temsil eder. Hastaları patofizyolojik olarak, eşlik eden ilave bulgulara göre, malformasyonunun lokalizasyonuna göre sınıflandırmak mümkündür. Çalışmamızda Konjenital Kalp Hastalıkları, 2008 yılında Botto ve ark.'larının Doğumsal Anomalileri Önleme Çalışmaları (NBDPS) için öne sürdüğü gelişimsel ve klinik bazlı etiyolojik sınıflandırma kullanılarak yapılmıştır. Bu sınıflandırmada 86 gruba yer verilmiş ve KKH'lar; septal defektler, konotrunkal anomaliler, AVKD'ler, sol ventrikül çıkım yolu darlıkları, sağ ventrikül çıkım yolu darlıkları, pulmoner venöz dönüş anomalileri, heterotaksi ve kompleks anomaliler olmak üzere 8 ana başlıkta sınıflandırılmıştır (18).

### 2.2.1 Septal Defektler

#### Ventriküler Septal Defektler

Konjenital kalp hastalıklarının %20-40'ını ventriküler septal defektler oluşturur. VSD'ler 1000 canlı doğumda 6 sıklığında izlenmektedir (4). Ventriküler interseptumu oluşturan membranöz, musküler, infundibular, atriyoventriküler ve inlet kısımlarının embryonik dönemde gelişimi sırasında anormal gelişme veya füzyon hatalarına neden olan durumlar nedeni ile ortaya çıkmaktadır (19). Ventriküler septal defektler lokalizasyonuna göre 4 alt gruba ayrılırlar. Bunlar; membranöz, suprakristal, inlet ve musküler tip VSD'lerdir. Membranöz interventriküler septumda veya septum yakınında yer alan VSD'lere perimembranöz tipte VSD denir. Suprakristal VSD'ler subaortik veya subpulmoner yerleşimli VSD'leri tanımlamaktadır. Inlet VSD'ler atriyoventriküler kapaklara komşu VSD'ler, musküler VSD'ler ise trabeküler kas yapısında yer alan VSD'ler olarak sınıflandırılmaktadır. Musküler VSD'ler genellikle çoklu olarak izlenmektedir (20) (Şekil 2.5.). NK2 homeobox, T-box ve GATA bağlayan proteinlerinin de arasında yer aldığı transkripsiyon faktörlerinin birbirleri ile etkileşiminin ventriküler septumun gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmektedir. *NKX2-5*, *GATA4* ve *TBX20* genlerindeki fonksiyon kaybettiren patojenik varyantların VSD oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (21).



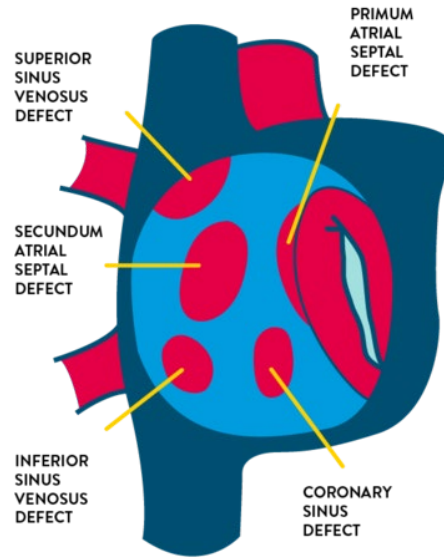
Şekil 2.5. Ventriküler Septal Defekt Çeşitleri - Rickert-Sperling S ve ark. 2015 alınmıştır (20).

### **Atriyal Septal Defektler**

Atriyal septal defektler en sık görülen konjenital kalp hastalıklarından biridir. 1500 canlı doğumda 1 sıklığında toplumda görülmektedir. Tüm KKH'ların %6-10'luk kısmını oluşturmaktadır. Atriyal septal defektler görülme sıklıkları ve anatomik lokalizasyonuna göre dört alt ana grupta sınıflandırılmıştır: Ostium septum sekundum (%70), ostium septum primum (%15), sinus venosum defektleri (%5-10), koroner sinus defektleri (<%1) (22).

Ostium septum primum; septum primumun atriyovenriküler kanal ile füzyonundan kaynaklı hatalardan kaynaklanmaktadır. Ostium septum sekundum; septum primumun artmış reabsorpsiyonundan veya septum sekundumun ostiumu sekundumu tam olarak kaplayamamasından kaynaklanmaktadır. Sinus venosus defektlerinde ise sıklıkla superior vena kava ile sağ atriyal venler arasındaki atriyal duvarın kapanamamasından kaynaklı olarak superior sinus venosus defekti izlenir. Koroner sinus defektleri ise en nadir olarak izlenen ASD tipi olmakla birlikte sol atriyumla koroner sinus arasındaki duvarın kapanmasındaki hatalardan kaynaklı olarak ortaya çıkmaktadır (23).

ASD'lerin etiopatogenezinde *NKX2-5*, *GATA4*, *TBX5*, *TBX20* genlerinin rol oynadığı bilinmektedir (4). *NKX2-5* geninde yer alan patojenik varyantların izole ASD olgularının %1-4'lük kısmından sorumlu olduğu ve atriyoventriküler iletim defektlerine neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (24). *GATA4* genindeki çerçeve kayması ve yanlış anlamlı varyantlar sekundum ASD, VSD ve pulmoner stenoz gibi ventriküler çıkım yolu defektlerine neden olmaktadır (25). Sarkomer proteinlerinden birini kodlayan *MYH6* geninin patojenik varyantlarının sekundum ASD gelişimi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (26).



Şekil 2.6. : Atriyal Septal Defekt Çeşitleri - Kaynak (27)'den uyarlanmıştır.

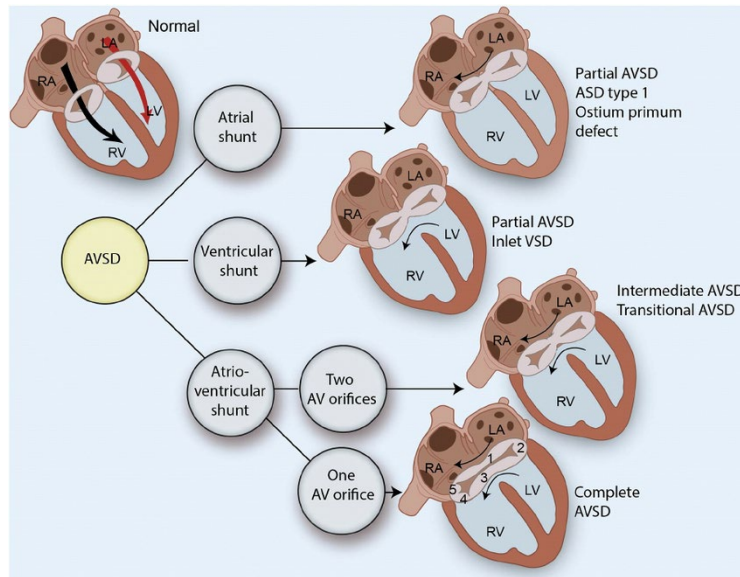
### 2.2.2. Atriyoventriküler Kanal Defektleri

Atriyoventriküler kanal defektleri (AVKD) kardiyak morfogenez aşamasında endokardiyal yastık gelişiminde ortaya çıkan hatalardan dolayı sık izlenen ve KKH'ların %4-5'inden sorumlu olduğu bilinen, toplamda 1000 canlı doğumda 0.19 sıklığında görülen anomalilerdir. AVKD'ler anormal kardiyak kapak varlığı ve lokalizasyonuna göre üç alt ana grupta toplanmaktadır: Komplet, Parsiyel, Transizyonel AVKD'ler (28). (Şekil 2.7.)

Komplet AVKD'lerde sıklıkla hem atriyal septum hem de ventriküler septumda açıklık bulunmaktadır. İlave olarak tek bir AV orifis ve anormal kapakçıklar

izlenmektedir. Parsiyel AVKD'lerde interventriküler septum veya interatriyal septumdaki açıklığa ilave mitral kapak anteromedial yaprakçığında kleft ile karakterize iki ayrı atriyoventriküler kapak bulunmaktadır. Transizyonel AVKD'ler ise parsiyel AVKD'lere eşlik eden küçük çaplı bir VSD'nin bulunmasıdır (29).

Komplet AVKD'lerin %65'i Down sendromlu bireylerde saptanmaktadır. Daha nadir olarak Ellis-van Creveld, CHARGE, Noonan ve Holt-Oram sendromlu bireylerde de izlenmektedir (20). İzole/non-sendromik olarak saptanan sporadik olguların ailesel geçiş gösterenlere göre daha sık saptandığı bilinmektedir. İzole AVKD'lerin %6'sının *CRELD1* geninde ortaya çıkan yanlış anlamlı patojenik özellikteki varyantlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (30). Kromozom 3p25'de AVCD2 lokusunda yer alan *CRELD1* geninin, calcineurin/NFATc1 sinyal yolağını regüle ettiği ve bu yolağın kardiyak kapakların gelişimini indükleyerek VEGF aracılı epitel-mezenkimal transizyonu başlattığı ve atriyoventriküler kanallarının gelişimine neden olduğu bilinmektedir (28).

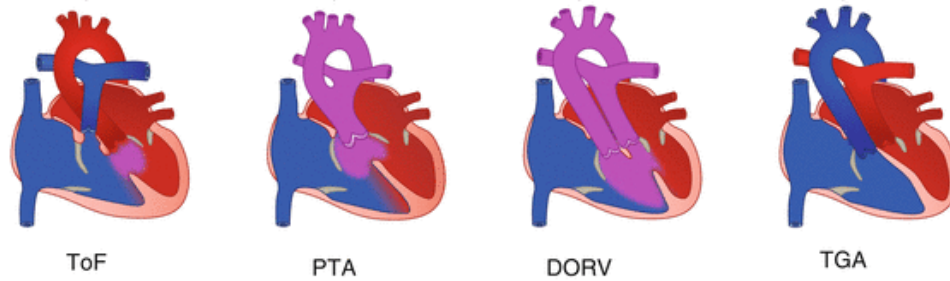


Şekil 2.7. Atriyoventriküler Kanal Defekt Çeşitleri Calkoen ve ark.'dan uyarlanmıştır(31).

### 2.2.3. Konotrunkal Anomaliler

Konotrunkal anomaliler, TOF ve TOF varyantları, kesintili aortik arkus tip B, DORV (Çift çıkımlı sağ ventrikül), DOLV (Çift çıkımlı sol ventrikül), D-TGA'lar, c-TGA'lar, Konoventriküler septal defektler ve Trunkus asteriozus 'ın dahil olduğu geniş bir KKH spektrumunu tanımlamaktadır (Şekil 2.8.). Sık izlenen KKH'lar olup tüm KKH'ların %10-12'sini oluşturduğu düşünülmektedir (32). Embriyonik dönemde ikinci kardiyak alandaki mezenkimal hücrelerin ve nöral krest hücrelerinin migrasyon hatalarına bağlı olarak konotrunkal gelişimin, septasyonunun, rotasyonun hatalı olması ile karakterizedir. Bütün konotrunkal anomaliler ventriküloatriyal hizalanma ve bağlantıların anormal olması sonucu ile karakterizedir (33, 34).

TOF ve TOF varyantları en sık izlenen konotrunkal anomalilerdir ve sıklıkla 22q11.2 delesyon spektrumuyla ilişkilidirler; ancak *NKX2.5*, *GATA4* ve *NOTCH1* genlerinin veya 22q11.2 lokusunda yer alan *TBX1* geninin haployetmezliği ve fonksiyon kaybettiren varyantlarının hastalığın etiyopatogenezde yer aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (35).



Şekil 2.8.: Sık İzlenen Konotrunkal Anomaliler - Lacour-Gayet ve ark.(34)'dan uyarlanmıştır.

### 2.2.4. Heterotaksi

Heterotaksi/situs ambiguus, toraks ve abdomendeki organların anormal simetrik konumlanmasından dolayı ortaya çıkan bir anomalidir. Anormal primer silia yapısı ve fonksiyonun heterotaksi ve ilişkili sendromlara neden olduğu düşünülmektedir. Embriyonik dönemde sensuar silia motilitesinin, sağ ve sol kalpte *CERL2*, *NODAL*,

*LEFTY, PITX2* vb. genlerin eşit olmayan ekspresyonuna neden olması ile sağ-sol kalp yapılarının asimetrik gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Bu genlerde yer alan patojenik varyantların kardiyak heterotaksilere neden olması beklenmektedir. Kardiyak heterotaksi saptanan olguların %50-95'inde ilave konjenital kalp anomalileri izlenmektedir ve olguların %20-30'luk kısmında altta yatan genetik nedeni aydınlatmak mümkündür (36, 37). Eşlik eden kardiyak anomaliler sıklıkla büyük arter transpozisyonu, çift çıkımlı sağ ventrikül, atriyal septal defektler, ventriküler septal defektler ve persistan sol superior vena cava benzeri anomalilerdir. Ortaya çıkan anomalilerin mezodermin anormal indüksiyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir (6).

### 2.2.5. Sol Ventrikül Çıkım Yolu Defektleri

Hipoplastik sol kalp sendromu ağır seyirli bir KKH'dır. Toplumda görülme sıklığının 1000 canlı doğumda 0.06-0.22 arasında olduğu düşünülmektedir. Tüm KKH'ların %4-8'ini oluşturmaktadır. Asendan aortanın ve sol ventrikülün çok küçük ve fonksiyonel olmaması ile karakterizedir. Ventriküler septal defektin eşlik etmediği aort atrezisi/stenozu, mitral atrezi/stenozu eşlik eden bulgular arasındadır. Sıklıkla Monozomi X ve Jacobsen sendromunun bir komponenti olarak bildirilmiştir; daha nadir olarak ise Noonan sendromu ve Holt-Oram sendromunda izlenmektedir. İzole olarak HSKS saptanan olgularda *NOTCH1*, *ERBB4*, *NKX2-5* genlerinin patojenik mutasyonları bildirilmiştir (20, 37).

Biküspid aorta (BA) en sık izlenen KKH olup erişkin popülasyonda görülme sıklığı %0,5-2 arasında izlenmektedir. Aort yetmezliği, aort stenozu, torasik asendan aorta dilatasyonu vb. komplikasyonlara neden olduğu bilinmektedir. Turner sendromu, Loey Dietz sendromu, 22q11.2 delesyonu sendromu gibi sendromlara eşlik edebileceği gibi çoğunlukla ailesel geçiş gösteren izole olarak izlenen konjenital kalp hastalığıdır (38). Literatürde sporadik BA olgularının %4'ünde *NOTCH1* geni nokta mutasyonlarının izlendiği, daha nadir olarak da *GATA5*, *AXIN1*, *EGFR* gibi genlerin de aort kapağı gelişiminde önemli rolü olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (39, 40).

### 2.2.6. Sağ Ventrikül Çıkım Yolu Defektleri

Ebstein anomalisi nadir görülen bir KKH'dır. Tüm KKH'ların %0,5'ini oluşturmaktadır ve toplumda görülme sıklığının 1/20.000 olduğu düşünülmektedir. ASD, VSD, PS ve sıklıkla sol ventrikül nonkompakt kardiyomiyopatiler gibi anomalilerle birlikte seyredebileceği gibi izole olarak da ortaya çıkmaktadır. Ebstein anomalisinde triküspid kapak yaprakçıklarının yanlış konumlanması ve buna bağlı olarak gelişen disfonksiyonu ile ortaya çıkmaktadır (41). Ebstein anomalisi gelişiminin gebelikte annenin lityum kullanımına bağlı olarak ortaya çıktığı bilinen en eski nedenler arasında yer almaktadır. Nadir bir KKH olması nedeniyle henüz net bir genotip-fenotip korelasyonu kurulamamış olsa bile yapılan geniş aile çalışmaları ve hayvan modellemelerinde *NKX2-5* ve *MYH7* genlerinin patojenik varyantlarının Ebstein anomalisi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (42, 43).

### 2.2.7. Pulmoner Venöz Dönüş Anomalileri

Pulmoner venöz dönüş anomalileri, pulmoner venlerin sol atriyum yerine sistemik venöz sisteme açılmasıyla karakterize nadir bir KKH'dır. Klinik seyir anomalinin total (TAPVDA)/parsiyel (PAPVDA) olması veya venöz dönüş obstrüksiyonun eşlik edip etmediği ile karakterizedir(20). Pulmoner venlerin embriyonik dönemde gelişiminde çok sayıda yolak tanımlanmıştır. Total pulmoner venöz dönüş anomalileri Holt-Oram sendromu, Cat eye sendromu, Kardiyofasiyokutanöz sendrom ve heterotaksi sendromlarında sık eşlik etmektedir. TAPVDA'lı aile çalışmalarında *TAPVR1*, *ANKRD1/CARP*, *SEMA3D* genlerinde mutasyonlar tanımlanmış olup, hayvan modellemelerinde ikincil kardiyak alanda spesifik olarak ekspresse olan *Islet1*, *GATA4-6*, *BMP*, *NKX2-5*, *SRF*, *TBX* ailesinde yer alan transkripsiyon faktör kodlayan genlerin pulmoner ven ve kardiyak venöz havuz gelişiminde sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (44)

### 2.2.8. Kompleks Kardiyak Anomaliler

Kompleks kardiyak anomaliler genellikle 3 veya daha fazla sayıda anomalinin birlikte izlendiği konjenital kalp hastalıklarıdır. Tek ventrikül, L-TGA ile birlikte Sol

çıkım yolu defektlerinin izlendiği durumlar kompleks kardiyak anomalilere örnek olarak verilebilir. Genetik etiyopatogenezi net aydınlatılmış değildir; ancak sporadik olarak 22q11.2 delesyonu, trizomi 8, trizomi 18, VACTERL assosiasyonu, Tuberoskleroz ve CHARGE sendromu olan olgularda birlikte izlenmektedir (36, 45).

### **2.3. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezi**

Konjenital kalp hastalıkları etiyopatogenezi henüz net olarak aydınlatılamamış olsa da genetik ve genetik dışı nedenlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Genetik nedenler arasında kromozomal anöploidiler, submikroskopik kromozom aberasyonları, nokta mutasyonlar ve epigenetik nedenler yer almaktadır. KKH'ların başlıca transkripsiyon faktörleri, hücre sinyal yolları ve adhezyon molekülleri, yapısal kardiyak proteinleri, histon düzenleyicilerini kodlayan genlerin kardiyogenez aşamasında kesintiye uğramasına neden olan patolojik varyantları aracılığı ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (9). Bu biyolojik yollara en önemli örnekler de; NOTCH sinyal yolağı, siliogenez, sarkomer yapı ve fonksiyonları ile ilişkili yollar ve RAS sinyal yollarıdır (1, 20).

Genetik dışı nedenler arasında ise; çevresel faktörler, gebelikte geçirilmiş enfeksiyonlar, maternal hastalıklar, obezite, ilaç kullanımı gibi teratojenik nedenler yer almaktadır(46).

#### **2.3.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Genetik Olmayan Nedenler**

Konjenital kalp hastalıkları etiyojisinde genetik ve genetik dışı çok sayıda neden yer almaktadır. Genetik dışı nedenler arasında ise en sık olarak; maternal dönemde geçirilen enfeksiyonlar ve teratojenik ajanlar yer almaktadır. Teratojenite konsepsiyon öncesi 3 ay ve embriyonik/fetal hayatta maruz kalınması sonrasında oluşum veya fonksiyon bozukluğuna yol açan ajanlardan kaynaklanmaktadır. Konjenital kalp hastalıklarına neden olduğu bilinen teratojenik ajanlar ise; maternal enfeksiyonlar, gebelikte ilaç kullanımı, maternal obezite, maternal diabetes mellitus, maternal fenilketonüriler ve maternal alkol kullanımını kapsamaktadır (2, 3, 47). Fetal



hayatta kardiyak gelişim açısından en önemli olan haftalar 2-7. gestasyonel haftalar arası olarak sayılmaktadır. Bu haftalar arasında teratojenik ajan maruziyeti ile konjenital anomali gelişimi riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (48).

Gebelik süresince ilaç kullanımı ile fetal anomali gelişimi riski uzun yıllardır bilinmektedir. Bu nedenle Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından gebelikte kullanımı güvenli olan ve olmayan ilaçların yer aldığı bir sınıflandırma geliştirilmiştir (Grup A, B, C, D, X, N) . Konjenital kalp hastalıkları gelişimi ile ilişkisi en iyi bilinen ilaçlar arasında lityum, karbamazepin, valproik asit, nitrofurantoin, talidomid, mikofenolat mofetil yer almaktadır (49). Bipolar hastalık tedavisinde kullanılan lityumun fetusta Ebstein anomalisi ve sıklıkla fetal hidropsa neden olduğu bilinmektedir. Antiepileptik ajan olan fenitoin kullanımının Fetal Hidantoin sendromu olarak adlandırılan ve fetusta multipl konjenital anomaliye neden olan sendroma neden olduğu bilinmektedir. Antiepileptik ajanlardan olan valproik asit kullanımının fetusta ASD, VSD, TOF ve hipoplastik sol kalp ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Sık kullanılan bir antibiyotik olan nitrofurantoin fetusta ASD ve hipoplastik sol kalp gelişimine neden olmaktadır (50).

Son yıllarda tüm toplumda sıklıkla izlenen obezite riski gebe kadınlarda da önem kazanmıştır. Maternal obezite ile tüm fetal KKH'lar arasında anlamlı bir ilişki bulunmakla birlikte özellikle fetusta sol ventrikül hipoplazisi, pulmoner stenoz ve TOF gelişimi daha yüksek sıklıkta saptanmıştır (51).

Gebelik süresince geçirilen enfeksiyonların konjenital malformasyon gelişimi açısından risk faktörü olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Gebeliğin ilk trimesterinde ateşli hastalık öyküsü bulunan anne adayının doğacak bebeğinde KKH riskinin 2 kat arttığına dair veriler bulunmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni de annenin gebelikte geçirdiği rubella enfeksiyonunun fetusta PDA, pulmoner stenoz ve VSD gelişimine neden olmasıdır. İlave olarak annede geçirilen influenza enfeksiyonunun fetusta konotrunkal anomaliler, TGA, çıkım yolu obstrüksiyonları, aort koarktasyonu gibi KKH'ların gelişimini arttırdığı bildirilmiştir (47).

Fenilketonüri otozomal resesif bir hastalık olup tedavisiz kalındığında fenilalanin metabolitlerinin toksik birikimi nedeniyle klinik bulguları ortaya çıkan bir hastalıktır. Gebelik süresince tedavi almayan gebelerin çocuklarında KKH gelişim

riskinin 6 kat arttığı bilinmektedir. En sık izlenen KKH'lar arasında TOF, VSD'ler, PDA yer almaktadır (50).

Gebeliğin ilk trimesteri süresince ağır alkol kullanımının (günde 5 ve üstü kadeh) fetal musküler VSD'lerin gelişimine neden olduğu ve yine benzer şekilde fetal ASD gelişimi riskini arttırdığını gösteren vaka-kontrol çalışmaları bulunmaktadır (47).

Anne adayının pregestasyonel diabetes mellitus tanısının olması KKH gelişim riski açısından bir risk faktörü sayılmaktadır. Özellikle organogenez aşamasında hipergliseminin TGA, AVKD, ASD, PDA ve hipoplastik sol kalp gibi KKH'ların gelişimi açısından risk yarattığı bilinmektedir (51).

### **2.3.2. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Genetik Nedenler**

Bilinen tüm genetik nedenler, KKH'larının yaklaşık %20-30'lik kısmını açıklayabilmektedir (4). Genetik nedenleri kendi içerisinde sendromik ve non-sendromik olarak sınıflandırmak mümkündür. Tüm KKH etiyolojisinde yer alan genetik nedenlere bakıldığında tek gen hastalıkları %3-5'ini, büyük kromozomal aberasyonlar/anöploidiler %8-10'unu, patojenik KND'ler ise sendromik olguların %3-15'ini, sendromik olmayan olguların ise %3-10'unu oluşturmaktadır. Non-sendromik konjenital kalp hastalıklarında tek gen ilişkili varyantların oranının da yaklaşık %2-3 civarında olduğu düşünülmektedir (8). Tek gen ilişkili *de novo* nokta mutasyonların sendromik olguların %8'inden, non-sendromik olguların ise %3'lük bir kısmından sorumlu olduğu bilinmektedir (12). Non-sendromik KKH'ların izlendiği ailelerde yapılan çalışmalarda ise bu oranın arttığı bildirilmiştir (52). Etiyolojisi henüz açıklanamayan olgularda ise multifaktöriyel kalıtımın çevresel nedenlerinin ve nadir epigenetik mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir (8).

Sendromik konjenital kalp hastalıkları ekstrakardiyak malformasyonların ve/veya nörogelişimsel geriliğin mevcut olduğu gruptur. Konjenital kalp hastalığı saptanan yenidoğanların yaklaşık % 20'sinin sendromik grupta olduğu düşünülmektedir (6). Sendromik olgularda en sık saptanan genetik anomalileri

anöplidiler, KND ilişkili sendromik KKH'lar, tek gen ilişkili sendromlar olarak sınıflandırmak mümkündür.

### **Anöplidiler**

Konjenital kalp hastalıkları ve genetik nedenler içinde en iyi ilişkisi bilinen hastalık grubu anöplidilerdir. Büyük kromozomal aberasyonlar ve anöplidiler, tüm konjenital kalp hastalıklarının %8-10'unu oluşturmaktadır. Anöplidiler arasında canlı doğan trizomi 21'li olguların %35-50'sinde, trizomi 13'lü olguların %60'ında, trizomi 18'li olguların %80'inde ve monozomi X'li olguların %33'ünde KKH izlenmektedir (1). Anöplidi ilişkili KKH'lara bakıldığında, trizomi 21 için sıklıkla atriyoventriküler kanal defektlerinden bahsetmek mümkündür. Çok sayıda dozaj sensitif genin anöplidi ilişkili fenotiplere yol açtığı, özellikle de KKH'ların *DSCAM* ve *COL6A* genlerinin ekspresyonunun artmasına bağlı olarak ortaya çıktığını düşündüren çalışmalar bulunmaktadır (53). Trizomi 18'li olgularda en sık saptanan KKH'lar arasında ASD, VSD, PDA ve kapak hastalıkları yer almaktadır (54). Trizomi 13'lü olguların yaklaşık %80'inden fazlasında KKH izlenmekte olup en sık olarak ASD, VSD, PDA ve kapak hastalıkları bulunmaktadır (55). Monozomi X'li olgularda en sık izlenen KKH'lar ise aort koarktasyonu, biküspid aortik kapak, hipertrofik sol kalp, ASD'siz parsiyel anormal pulmoner venöz dönüş anomalisidir. (56).

### **Kopya Numarası Değişiklikleri İlişkili Sendromik Konjenital Kalp Hastalıkları**

Kopya numarası değişiklikleri; genomda boyutu 1kb ve üstünde olan kazanç ve kayıpları ifade etmektedir. KND'ler sıklıkla, insan genomunda yer alan tekrar dizilerinde oluştuğu bilinmektedir. Etkilenen bölgenin dozaj sensitif gen içerip içermediği ve büyüklüğüne göre fenotip farklılık göstermektedir. Büyük ve gen içeriği zengin KND'ler sendromik KKH'larına neden olmaktadır (57). Patojenik KND'ler ile ortaya çıkan mikrolelesyon/duplikasyon ilişkili tüm KKH'ların %3-15'lik kısmını oluşturmaktadır. KKH'ların sık izlendiği KND ile ilişkili mikrolelesyon

sendromlarına en iyi örnekler; Williams-Beuren sendromu, 22q11.2 delesyon sendromu, 1p36 delesyonu, Cri du Chat sendromu gibi sendromlardır (2).

Williams-Beuren sendromu 7q11.23 bölgesinin sıklıkla 1.5-1.8 MB büyüklüğündeki delesyonları ile karakterize 10.000 canlı doğumda 1 izlenen nadir bir mikrodelsyon sendromudur. Delesyon bölgesinde yer alan ve Elastin proteinini kodlayan *ELN* geninin haployetmezliğinin sendromun kardiyak ve vasküler bulgularının ortaya çıkmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Williams-Beuren sendromlu olgularda sık izlenen kardiyak ve vasküler bulgular arasında; supravavüler aort stenozu, periferik pulmoner arter stenozu, ventriküler septal defect, supravavüler pulmoner stenoz sayılabilir (58, 59).

22q11.2 delesyon sendromu 4-6.000 yenidoğanda 1 görülme sıklığına sahip, olguların %60-80'inde kardiyak malformasyonların eşlik ettiği bir mikrodelsyon sendromudur. Bu bölgede yer alan *TBX1* ve *CRKL* geninin haployetmezliğinin kardiyak malformasyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. 22q11.2 delesyonu sendromunda sık izlenen KKH'lar konotrunkal anomaliler (Fallot tetralojisi, trunkus arteriosus, Tip b kesintili arkus aorta, ventriküler septal defekt ve atriyal septal defektlerdir (60).

### **Tek Gen İlişkili Sendromik Konjenital Kalp Hastalıkları**

Tek gen ilişkili sendromik konjenital kalp hastalıkları ilave kardiyak anomalilerle birlikte seyretmektedir ve KKH'ların %3-5'lik kısmını oluşturmaktadır. KKH'larla ilişkisi en iyi bilinen tek gen hastalıkları Noonan sendromu, Holt oram sendromu, Allagile sendromu, Kabuki sendromu, Smith Lemli Opitz sendromu, Rubinstein-Taybi sendromudur (61).

Noonan sendromu, rasopatiler grubunda yer alan genetik olarak heterojenite gösteren ve çok sayıda genle ilişkilendirilmiş bir sendrom olup tanı alan olguların yaklaşık %80-90'ında KKH izlenmektedir. RAS/MAPK yolağında yer alan *BRAF*, *KRAS*, *MAP2K1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, ve *SOS1* genlerinde patojenik fonksiyon kazancına neden olan varyantların hastalık etiyopatogenezinde rol oynadığı

bilinmektedir. Bu hastalarda sık izlenen KKH'lar arasında hipertrofik kardiyomiyopati, valvular displaziler özellikle pulmoner stenoz yer almaktadır (62).

Alagille sendromu nadir izlenen, otozomal dominant kalıtım gösteren, *JAG1* ve *NOTCH2* genlerinin patojenik varyantlarının sorumlu olduğu bilinen bir sendromdur. Diğer sistemik bulguların yanı sıra olguların %90-97'sinde başlıca pulmoner stenoz ve TOF olmak üzere KKH'lar eşlik etmektedir (63).

Holt-Oram sendromu üst ekstremitte anomalileri ve KKH'larla giden nadir bir genetik hastalıktır. Holt-Oram sendromlu olgularda en sık izlenen kardiyak anomaliler ASD ve VSD olup olguların %70'inde *TBX5* geni mutasyonları saptanmaktadır (64).

Kabuki sendromu multisistemik bir sendrom olup *KMT2D* geninde oraya çıkan fonksiyon kaybettiren mutasyonlar aracılığı ile ortaya çıkmaktadır. Fasiyal dismorfik bulgular, boy kısalığı, iskelet sistemi ilişkili anomaliler, büyüme gelişme geriliği ve dermatogliklik anomaliler sendromun en sık izlenen bulguları arasında yer almaktadır. Olguların %30-55'lik kısmında KKH'lar izlenmekte olup en sık izlenen kardiyak anomaliler arasında ASD, VSD ve aort koarktasyonu yer almaktadır (65).

Smith-Lemli-Opitz sendromu nadir izlenen ve *DHCR7* geninin mutasyonlarından kaynaklanan bir kolesterol sentez defekti olup olgularda kuşku genitalya, postaksiyal polidaktili, hipotoni ve yarı damak dudak gibi bulgular dışında AV kanal defektleri, pulmoner venöz dönüş anomalilerin de sık izlendiği bir sendromdur (66).

Non-sendromik konjenital kalp hastalıkları herhangi bir ekstra kardiyak malformasyonun veya nörogelişimsel geriliğin izlenmediği konjenital kalp hastalıklarıdır. KKH ile doğan olguların yaklaşık %80'nin non-sendromik grupta yer aldığı bilinmektedir (6).

Non-sendromik konjenital kalp hastalıklarının etyopatogenezinin aydınlatılması, genetik heterojenite, penetrans eksikliği, değişken ekspresivite ve genetik dışı nedenlerin de sık izlenmesi nedeniyle güç bir konu olmuştur. Non-sendromik KKH'larda sıklıkla, KND'ler, aday tek genler nokta mutasyonları ve epigenetik düzenlemelerin etkili olduğu düşünülmektedir (9).

### Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Kopya Numarası Değişiklikleri

Non-sendromik konjenital kalp hastalıklarında KND'lerin önemi; içeriğinde dozaj sensitif bir genin varlığı, daha önce tanımlanmış hastalıkla ilişkili bir bölgenin olup olmadığı, *de novo*/ailesel geçiş gösterip göstermediği, gen içeriği zengin bir bölge olup olmadığı, bölgenin büyüklüğü ve sağlıklı kontrol bireylerde rastlanıp rastlanmadığına göre değişkenlik göstermektedir (67). Bilinen morbid gen içermeyen; ancak gen ekspresyonunu düzenleyici regülatuar bölgelerin yer aldığı KND'lerin de hastalık fenotipi üzerine etkisi olduğu bilinmektedir (57). Literatürde bildirilmiş izole kardiyak malformasyonu mevcut olan bireylerde saptanan KND'lere Tablo 2.1'de yer verilmiştir (68-72).

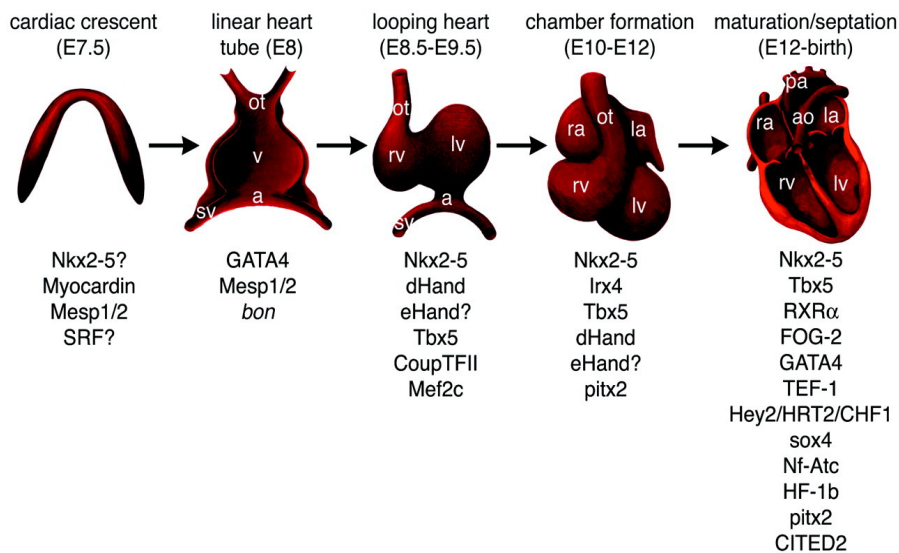
Tablo 2.1. Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Saptanan Kopya Numarası Değişiklikleri

Genomik lokalizasyon	Aberasyonun çeşidi ve büyüklüğü	KKH tipi
9q34.3	Kazanç (0.23 MB)	Hipoplastik sol ventrikül
15q11.2	Kayıp (0.23-2.2 MB)	Fallot tetralojisi
16p11.2	Kayıp (0.53MB)	Çift çıkımlı sağ ventrikül
16p11.2	Kazanç (0.60-0.71MB)	Fallot tetralojisi, tek ventrikül
16p13.11	Kayıp ( 1.24 MB)	ASD
18q23	Kayıp (3.50 MB)	Fallot tetralojisi
Xp11.2	Kazanç (0.05 -0.15 MB)	Fallot tetralojisi

### Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Aday Genler

Non-sendromik KKH'ların gelişiminde, transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler, hücre sinyal yolları ve adhezyon modellerinde rol oynayan genler, kardiyak yapısal proteinler ve histon düzenleyicilerini kodlayan genlerin, fonksiyon kaybına/kazancına neden olan mutasyonları, kodlayan veya kodlamayan regülatuar bölgelerin nokta mutasyonları ve insersiyon/delesyon tip mutasyonlarının sorumlu olduğu düşünülmektedir (2, 73). (Şekil 2.8.)

Bugüne kadar izole KKH patogenezinde rol oynayan yaklaşık 400 adet gen tanımlanmıştır. Bunların en iyi bilenen örneklerine Tablo 2.2 'de yer verilmiştir. Bu genler embriyonik dönemde kardiyogenez aşamasında, eş zamanlı ve geniş fonksiyonel bir ağ aracılığı ile etkileşimde bulunmaktadır. Bu genler arasında yer alan *NKX2-5* geni, *MYH6* geni, *TBX1* geni, *NOTCH1* ve *GATA4* genleri tarihsel süreçte de non-sendromik KKH'lı olgularda hastalığın ortaya çıkmasında rol oynadığı bilinen genlerdir; ancak özellikle allelik heterojenitenin sık izlenmesi ve düşük penetrans gösteren özellikte olmaları nedeni ile saptanan varyantlarla hastalık korelasyonu kurulmasını güçleştirmekte bu konuda yapılması planlanan çalışmaların gerekliliğini ön plana çıkarmaktadır (46).



Şekil 2.9. Konjenital Kalp Hastalığı Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Genler

Bruneau ve ark. (74)'dan uyarlanmıştır.

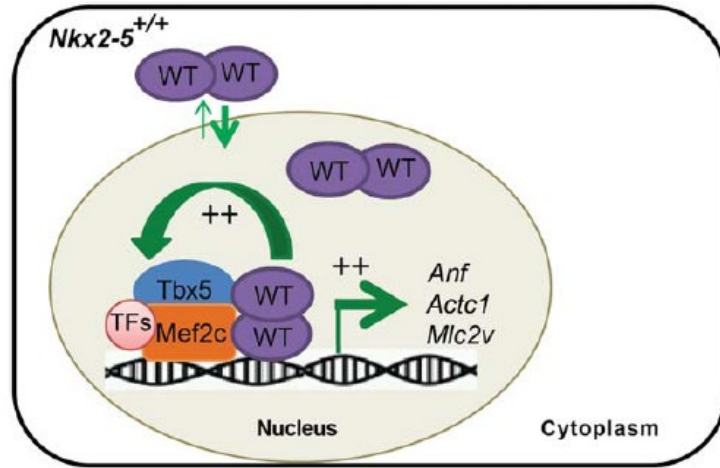
Tablo 2.2. Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol

## Oynayan Genler ve İlişkili Defektler

Gen	Lokus	Kalıtım	KKH tipi
<i>ACTC1</i>	15q14	O.D	ASD
<i>CITED2</i>	6q24.1	O.D	ASD, VSD
<i>CRELD1</i>	3p25.3	O.D	ASD, AVKD
<i>GATA4</i>	8p23.1	O.D	ASD, VSD, AVKD, PS, TOF
<i>GATA5</i>	20q13.33	OD/OR	ASD, BA, TOF, VSD, DORV
<i>GATA6</i>	18q11.2	O.D	TA, TOF
<i>HAND1</i>	5q33.2	O.D	Tek ventrikül, VSD
<i>HAND2</i>	4q34.1	O.D	PS, TOF, VSD
<i>MEIS2</i>	15q14	O.D	ASD, VSD, Aort koarktasyonu
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	O.D	ASD, PDA, VSD
<i>MYH6</i>	14q11.2	O.D/O.R	ASD, HLHS
<i>MYH7</i>	14q11.2	O.D	Ebstein anomalisi
<i>NODAL</i>	10q22.1	O.D	Düzeltilmiş-TGA, DORV, TOF, VSD
<i>NOTCH1</i>	9q34.3	O.D	ASD, VSD, Aort koarktasyonu, VSD, Hipoplastik sol ventrikül, DORV
<i>NKX2-5</i>	5q35.1	O.D	ASD, TOF, Hipoplastik sol ventrikül
<i>NR2F2</i>	15q26.2	O.D	AVKD, AS, Aort koarktasyonu, VSD, Hipoplastik sol ventrikül, TOF, DORV
<i>SMAD2</i>	18q21.1	O.D	Heterotaksi, DORV, ASD, VSD, PDA
<i>SMAD6</i>	18q21.1	O.D	Bisküspid aorta, Aort koarktasyonu, AS
<i>TAB2</i>	6q25.1	O.D	Biküspid aorta, AS, TOF
<i>TBX1</i>	22q11.2	O.D	Konotrunkal anomaliler, VSD, ASD, Kesintili arkus aorta
<i>TBX5</i>	12q24.1	O.D	VSD, ASD, AVKD



Non-sendromik konjenital kalp hastalığı etiyolojisinde yer aldığı bilinen genlerden ilki olan *NKX2-5* geni, 5q35.1 de lokalize olan, 3 ekzondan oluşan, evrimsel süreçte iyi korunmuş bir gendir (75). *NKX2-5* geni esas olarak üç korunmuş bölgeden oluşmaktadır. Bunlar; DNA bağlanmasından sorumlu olan homedomain bölgesi, intramoleküler transaktivasyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan NK2 spesifik domaini ve genin baskılayıcı aktivitesinden sorumlu olan *Tinman* (TN) domainidir. Protein yapısında yer alan diğer fonksiyonel kısımlar; dimerizasyonda rol oynayan tirozinden zengin bölge, nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içeren bölgeler, sumolizasyon, asetilasyon, fosforilasyon bölgeleri, proteinin C-terminal ucu tarafından transkripsiyonun devam etmesinde görev alan *NKX2-5* box motifi ve protein-protein etkileşiminden sorumlu olan *GIRAW* motifi olarak sıralanmaktadır (10, 76). Primer olarak kardiyak doku, tiroid dokusu ve dalak dokusunda ekspresye olduğu bilinen genin 4 adet alternatif transkripti (ENST00000329198, ENST00000424406, ENST00000517440, ENST00000521848) bulunmaktadır (27). *NKX2-5* proteini genellikle homodimer olarak veya *TBX5* proteini ile birlikte heterodimerik yapı oluşturarak DNA'ya bağlanır (76). *GATA4* ve *TBX5* genleri ile eş zamanlı olarak atriyalnatriüretik faktörü kodlayan *ANF* geninin promoterinin aktivasyonundan sorumludur (Şekil 2.9). Embriyogenez sırasında primer ve sekonder kardiyak alanlarda farengal mesoderm ve komşu endoderm dokusunda *NKX2-5* geninin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (77). *HAND2* ve *MEFC2* genleri ile birlikte *NKX2-5* geni birincil ve ikincil kardiyak odakta ventriküllerdeki miyositlerin differansiyasyonunda rol oynamaktadır. İlave olarak *GATA4* ve *SRF* genleri ile birlikte sarkomerik genleri de aktive ettiği bilinmektedir (10).



Şekil 2.10. NKX2-5 Geninin TBX5 ve MEF2C ile Birlikte Oluşturduğu Heterodimer Yapı ve Transkripsiyon Aktivasyonu – Zakariyah ve ark. (9)'dan uyarlanmıştır.

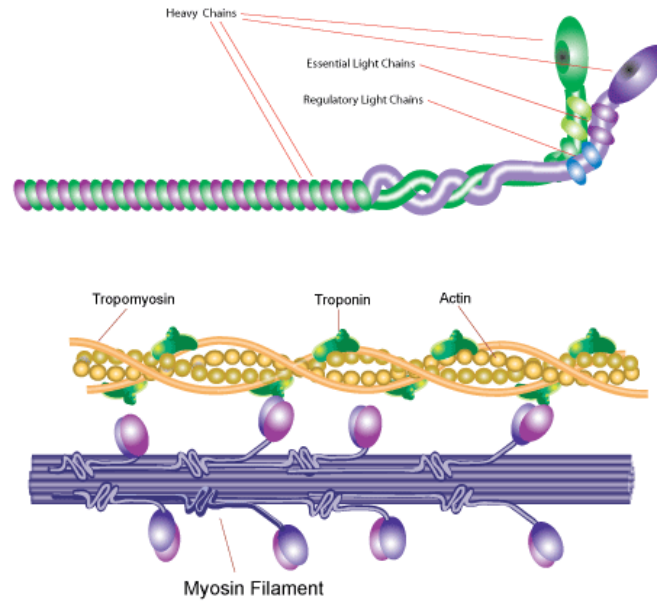
*NKX2-5* geni izole KKH'lı olgularda rolü ilk tanımlanan aday genlerden biridir ve bu genin patojenik varyantlar sıklıkla ASD ve atriyal iletim defektleri mevcut olan bireylerde saptanmıştır (78). *NKX2-5* geninde saptanan patojenik varyantların izole, sporadik ASD'lerin %1-4'ünden, ailesel olguların ise %12,5'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir (1). *NKX2-5* geninin kardiyak mezoderm dokusundaki monoallel/biallelik delesyonu sonucunda fare embriyolarında kardiyak çıkım yolu defektleri ve sağ ventrikül hipoplazisi gibi ağır kardiyak anomaliler de izlenmektedir (10). Non-sendromik ASD, AVKD, TOF, Ebstein anomalisi ve iletim defektleri bulunan hastalarda, *NKX2-5* geni dizi analizi sonucunda yanlış anlamlı nokta mutasyonlar saptanmış olup genin homeodomain bölgesinde yer alan mutasyonlarının hastalık penetransını arttırdığı öne sürülmüştür (41).

*MYH6* geni kardiyak miyozin alfa ağır zincirini kodlayan 14q11.2'de lokalize ve 39 ekzonu olan bir gendir. Miyozin alfa ağır zinciri 6 proteini, kardiyak kas kontraksiyonundan sorumlu olan sarkomer yapısında yer alan miyozin tip 2 proteininin alt ünitesi olarak görev almaktadır (79). Klasik bir miyozin alfa ağır zinciri olarak baş, boyun ve kuyruk yapılarından oluşur ve uç uca gelen iki ardışık kuyruk yapısı sarmal bir yapı oluşturarak miyozinlerin baş kısmının aktinle etkileşim

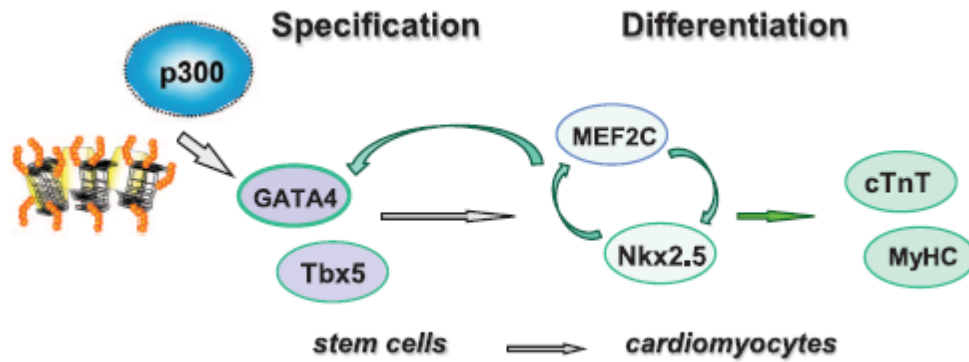
haline geçip sarkomerdeki hareketi sağlayacak olan kuvveti oluşturmaya sebep olur (Şekil 2.10) (80). Primer olarak iskelet kası ve kardiyak kas dokusunda eksprese olan genin 2 transkripti (ENST00000356287, ENST00000405093) ve 27. intronundan *antisense* olarak kodlanan bir mikroRNA olan *miRNA208A*, bulunmaktadır (27).

*MYH6* geni embriyonik dönemde, *MEFC2* ile etkileşime geçen *TBX5* geni aracılığı ile aktive olmaktadır. *NKX2-5* geni, *MEFC2* geninin upstream regülatörü olarak görev yaparak, *MYH6* geninin ekspresyonunu dolaylı olarak kontrol etmektedir (Şekil 2.11). *GATA4* genindeki patojenik varyantların, *MYH6* geninin transkripsiyonunun baskılanmasına neden olduğu ve regülatör etkisi olduğu bilinmektedir (79).

Kardiyak yapısal bir protein olan MYH6 proteininin, atriyumda yoğun eksprese olması nedeni ile bu gene ait patojenik varyantların primum ve sekundum ASD ile dilate/hipertrofik kardiyomiyopati gelişimine neden olduğu düşünülmektedir (81). Diğer sarkomerik proteinler arasından *MYH6* geni, familial ASD'lerle ilişkisi en iyi bilinen genler arasındadır. *MYH6* geni patojenik varyantlarının, atriyumun kontraksiyonundan sorumlu olan aksiyon potansiyellerinin iletimini ve sarkomer bütünlüğünü bozduğunu ve sinus nodu dejenerasyonuna yol açarak hasta sinus sendromuna neden olduğu da bildirilmiştir (82).



Şekil 2.11. Miyozin Proteini Yapısı ve Aktin-Miyozin Etkileşimi - (27). Kaynaktan uyarlanmıştır.

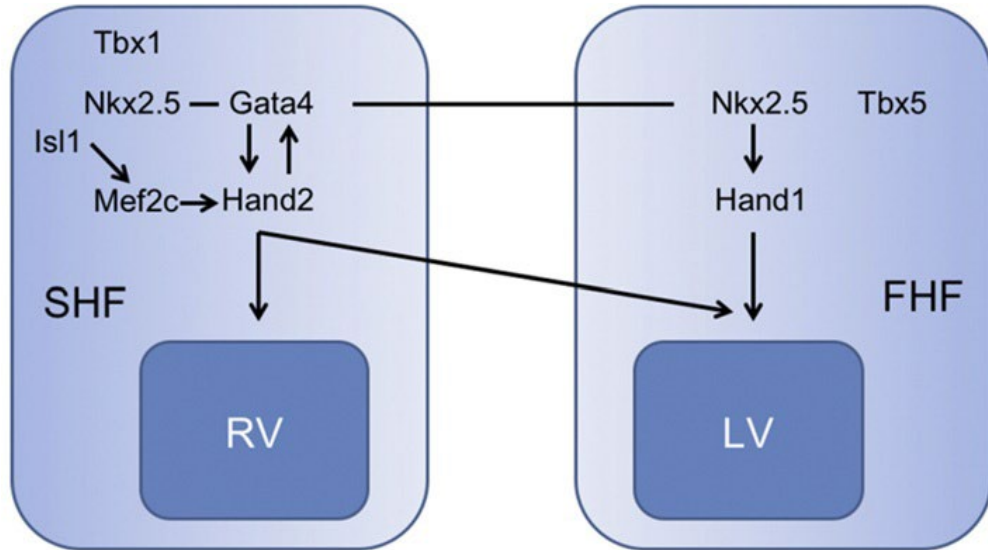


Şekil 2.12. Miyozin Ağır Zincir Proteinlerinin Embryonik Dönemdeki Aktivasyonu Yilbas ve ark. (87) 'lardan alınmıştır.

T-box gen ailesi, 5 alt grup ve 18 genden oluşan, kardiogenez için oldukça önemli olduğu bilinen transkripsiyon faktörleri kodlayan bir gen ailesidir. *TBX1*, *TBX2*, *TBX3*, *TBX5*, *TBX18*, ve *TBX20* genlerinin kardiyak çıkım yolu, sinoatriyal nod oluşumu, miyokard dokusunun gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (83).

*TBX1* geni 22q11.2 lokusunda lokalize olan 13 ekzondan oluşan bir gendir. Embriyonik dönemde farengial arklardan ve bu arklardan köken alan dokulardan ekspresse olduğu bilinmektedir. Farengial arklardan köken alan dokularda saptanan 3 adet alternatif transkripti bulunmaktadır (ENST00000329705, ENST00000332710, ENST00000359500) (27).

*TBX1* geni 22q11.2 delesyon sendromunun gelişiminde major rolü olduğu bilinen genlerdendir ve farengial mesoderm dokusunda myokard öncülü hücrelerin ve kardiyak çıkım yolunu oluşturacak olan hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği bilinmektedir (84). *TBX1* geninin aktivasyonu, SHH yolağı aracılığı ile *FoxA2*, *FoxC1*, *FoxC2* genlerinin kodladığı transkripsiyon faktörlerinin *TBX1* promotörüne bağlanması sonucu oluşmaktadır. *TBX1* genin ikincil kardiyak alanda yoğunlukla ekspresse olduğu sağ ventrikül ve çıkım yolunun gelişimine neden olduğu bilinmektedir (85) (Şekil 2.12).



Şekil 2.13. *TBX1* Geni Aracılı Birincil ve İkincil Kardiyak Alanlardan Ventrikül Diferansiyasyonu – Tagaki ve ark. (85).’den uyarlanmıştır.

Heterozigot *TBX1* gen delesyonu olan fare çalışmalarında 22q11.2 delesyonlu olgulara benzer şekilde kardiyak, kraniyofasiyal, timik ve paratiroid deformiteleri izlenmiştir. İzole TOF, VSD, PA, çift çıkımlı sağ ventrikül, kesintili aortik arkus ve

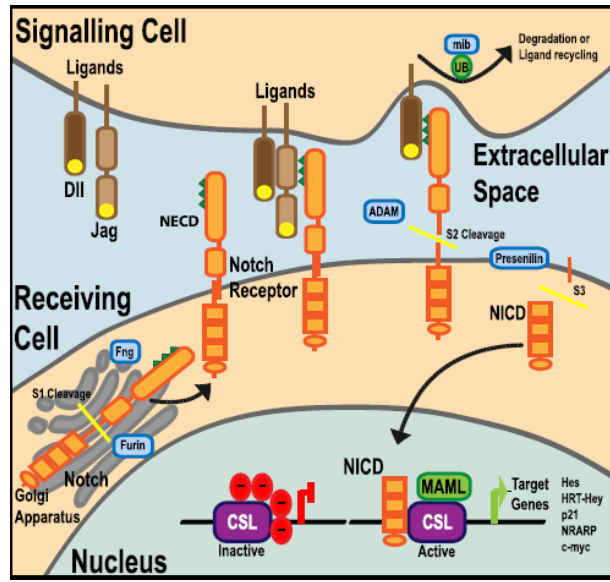
aortic arkus anomalili olgularda da *TBX1* geninde fonksiyon kaybına neden olan patojenik varyantlar ve fonksiyon kazancına neden olan yanlış anlamlı varyantlar da saptanmıştır (84) .

*GATA* gen ailesi 6 üyeden oluşan, A/G, GATA, A/T DNA dizilerine spesifik bağlanan çinko-parmak transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir gruptur. *GATA4* geni 8p23.1’de lokalize, 6 ekzondan oluşan kardiyak spesifik bir transkripsiyon faktördür (86). Gelişmekte olan kalp dokusunda, erişkin kardiyak kas hücrelerinde, pankreas, over dokusu gibi çok sayıda dokuda da *GATA6* ile birlikte eksprese olduğu bilinmektedir. *GATA4* geninin çeşitli dokularda alternatif kırılmaya uğrayan bugüne kadar tanımlanmış 8 adet transkripti (ENST00000335135, ENST00000526716, ENST00000526974, ENST00000528027, ENST00000528712, ENST00000532059, ENST00000532977, ENST00000622443) bulunmaktadır (27). *GATA4* geninin embriyogenezde miyokardiyal differensiyasyondan sorumlu olduğu ve *HAND2*, *NKX2-5*, *MEF2C*, *SRF* ve *TBX5* genleri ile etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. *NKX2-5* geni ve *MEF2C* geninin ikincil kardiyak alanda ekspresyonunu da arttırmaktadır (Şekil 2.13). İlave olarak kas kontraktıl elemanları olan alfa ve beta ağır zincir proteinleri, atriyal ve beyin natriüretik peptid gibi hücrel sinyal moleküllerinin sentezinden sorumlu olan genlerin düzenlenmesinde görev almaktadır (20). *GATA4* geninin DNA’ya bağlanma affinitesinin artmasından sorumlu olan genlerden biri histon asetil transferaz fonksiyonu olan *p300* geni iken bağlanma affinitesinin azalmasından sorumlu olan gen bir histon deasetilaz olan *HDAC4* genidir (87). Bu gene ait fonksiyon kaybettiren patojenik varyantların kardiyak septal defektler, kardiyak çıkım yolu defektleri, biküspid aorta ve ventriküler septal defeketlere neden olduğu bilinmektedir (46, 88).

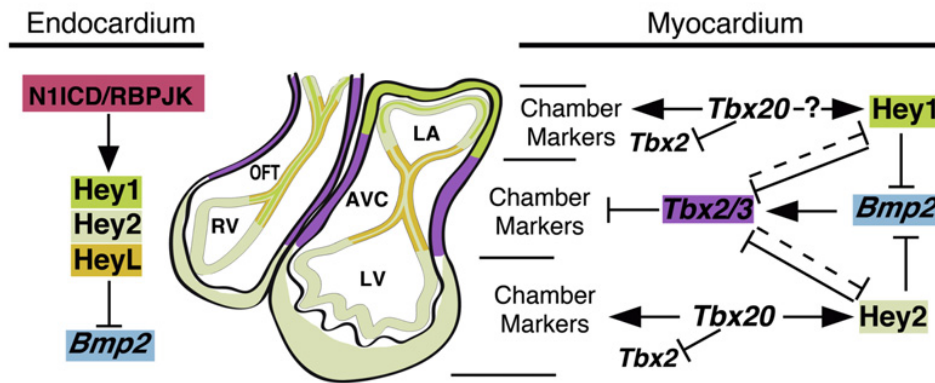
*NOTCH1* geni önemli bir gen ailesi mensubu olmakla birlikte, evrimsel süreçte iyi korunmuş intrasellüler sinyal yolağında rol alan NOTCH1 proteinini kodlayan, 9q34’de lokalize olan bir gendir. NOTCH proteinleri, epidermal büyüme faktörü benzeri ekstrasellüler kısım, membranik kısım ve trasnkripsiyon aktivasyonundan sorumlu intrasellüler kısımdan oluşmaktadır (89) (Şekil 2.13.). Memelilerde bilinen *NOTCH* gen ailesi tarafından kodlanan 4 adet protein bulunmaktadır. Bu NOTCH1,

NOTCH2, NOTCH3 ve NOTCH4 proteinleri Jagged 1, 2 ve Delta 1,2,3 ligandları ile bağlanıp intrasellüler sinyal yolağını aktive etmektedir (90). Anjiyogenez, nörogenez, miyojenik differansiyasyon gibi hücrel yolaklarda rol oynayan *NOTCH1* geninin 1 adet transkripti (ENST00000277541) ve 1 adet *miRNA4673* bulunmaktadır (27).

Embriyonik dönemde kardiyogenezde oldukça önemli rolü olan NOTCH1 geni, atriyoventriküler kanal endokardiyumunda aktive olan Notch1/RBPJK kompleksinin, *Snail1* geni ekspresyonunu arttırıp E-kadherin'i repress ederek, epitel-mezenkimal transizyonunu başlattığı ve primer kapak öncüsü olan endokardiyal yastık gelişimini indüklediği bilinmektedir (91). Miyokardiyum ve endokardiyum dokusunda *NOTCH1* geninin *Hey1*, *Hey2*, *HeyL* genleri aracılı *BMP* geninin ekspresyonunu regüle etmesiyle, kardiyak odacıklarda *TBX* geni transkripsiyon faktörlerinin farklı ekspresyon paternlerini oluşturduğu ve anatomik yapıların differansiyasyonunu etkilediği bilinmektedir (90, 92) (Şekil 2.14.). *NOTCH1* geni fonksiyon kaybettiren varyantlarının genin haployetmezliğine neden olması ile primer olarak KKH'nin ortaya çıkmasında rol oynadığı bilinmekle birlikte, *NOTCH1* geninin yanlış anlamli patojenik varyantlarının, hücre yüzeyinde sayıca az olan mutant reseptör yapısına neden olduğu ve bu mutant reseptörlerin ligand bağlama kapasitesinin az olduğu ve hücre-hücre sinyalizasyonunu azalttığı, böylelikle biküspid aorta, aort koarktasyonu, hipoplastik sol kalp gibi konjenital kalp hastalıkları etiopatogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (93, 94). *NOTCH1* geninin *Hrt1* ve *Hrt2* genleri aracılığı ile *RUNX2* geninin transkripsiyonel aktivasyonunu baskılayarak ostopontin, osteokalsin gibi osteoblastik genlerin aktivasyonunu baskıladığı ve kalp kapakçıklarında  $Ca^{++}$  element birikimine engel olduğu da bilinmektedir. *NOTCH1* geninde fonksiyon kaybettiren patojenik varyantlarının aortik kapak gelişim defektleri dışında erişkin dönemde aortik kapak kalsifikasyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür (5, 95). *NOTCH1* geninde yer alan fonksiyon kaybettirici mutasyonların aortik kapak hastalığı, biküspid aorta, aort kapak kalsifikasyonu dışında Adams-Oliver sendromu tip 5 (OMIM # 616028) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (96)



Şekil 2.14. Notch Reseptörlerinin İntrasellüler ve Ekstrasellüler Kompartmanları – Pompa ve ark. (90)’dan uyarlanmıştır.



Şekil 2.15. Kardiyogenezde NOTCH1 (N1ICD) Sinyal Yolağı ve Etkileri - Pompa ve ark. (90)’dan uyarlanmıştır.



### 2.3.3. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezinde Rol Oynayan Epigenetik Nedenler

Epigenetik mekanizmalar; DNA sekansında herhangi bir değişikliğe yol açmadan genlerin ifadelenmesinde değişikliğe yol açan mekanizmalardır. Bunlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları/varyantları ve uzun kodlamayan RNA'lar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Yeni nesil dizileme teknikleri, tek hücre sekanslama, ekspresyon analizleri ve fonksiyonel çalışmaların gelişmesiyle birlikte epigenetik mekanizmalar aydınlatılmaya başlanmış ve KKH'larında bu mekanizmaların rolleri ortaya çıkmıştır (97).

Epigenetik regülatuar mekanizmaların kardiyogenezin her evresinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. DNA metilasyonu; CpG dinükleotitlerinin yer alan sitozin nükleotidine 5. karbonuna metil grubunun transfer edilmesi ve bu metil grubunu tanıyan histon kompleksleri aracılığı ile transkripsiyonun susturulmasına neden olacak olan inaktif kromatin hale geçmesiyle karakterizedir. DNA metilasyonu DNMT enzimleri aracılığı ile gerçekleşmektedir ve tersine çevrilebilir bir mekanizmasıdır (98). DNA metilasyon düzenlenmelerinin kardiyomyosit proliferasyonu, çıkım yolu septasyonu ve terminal differansiyasyonda önemli rolü olduğu bilinmektedir (73). TOF ve VSD saptanan hastalardan alınan miyokardiyal biyopsi dokusunda sitokrom c oksidaz proteinini kodlayan *SCO2* geninin promoter bölgesinin hipermetile bir halde olduğu ve bu genin susuturulmasının kardiyak hücreleri glikolizilasyona yönlendirdiği ve hücreyel differansiyasyonu geciktirerek kardiyak defektlere yol açtığı sonucuna ulaşılmıştır (99).

Diğer bir epigenetik mekanizma olan histon modifikasyonları, histonların aminoasit rezidülerinde gerçekleşen metilasyon, asetilasyon, ubikutinasyon, glikolizasyon vb. posttranslasyonel modifikasyonlardır. Bunlar arasında histon asetilasyon ve deasetilasyonundan sorumlu olan enzimlerin sağ venrikül gelişiminde ve kardiyak septasyonla ilişkisi iyi bilinmektedir (73). En iyi örneklerden biri histon asetilasyonu enzimi p300'dür. Bu enzimin miyokardiyal hücre proliferasyonu ve kalınlaşmasında görev aldığı asetilasyon fonksiyonunun azalmasına neden olan mutasyonların miyokardiyumun incelmesine neden olduğu gösterilmiştir (100). Bir

histon metiltransferaz olan ve 3. Histonde yer alan 4. lizin rezidüsünün metillenmesinden sorumlu olan *MLL2* geninde yer alan patojenik varyantların septal defektler, aort koarktasyonu gibi KKH'ların sık izlendiği Kabuki sendromuna neden olduğu bilinmektedir (101).

Kodlamayan RNA'lar büyüklüğü yaklaşık 20-200 nükleotit aralığında değişen aktif olarak transkribe olan; ancak translasyona uğramayan RNA dizileridir. miRNA, siRNA, piRNA ve lncRNA olarak görevlerine ve büyüklüklerine göre isimlendirilmektedirler (102).

Tüm miRNA'ların canlı hücreindeki fonksiyonları ve etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsada en iyi bilinen görevlerinin başında mRNA'ların kodlamayan bölgelerindeki spesifik DNA dizilerine bağlanarak genin ekspresyonunun regülasyonunda görev almaları gelmektedir. Bugüne kadar kardiyomiyosit proliferasyonu ve terminal differasyonda rolü olduğu gösterilmiş yaklaşık 40 tane miRNA tanımlanmıştır (73). Doku spesifik olarak transkribe olan *miRNA1-1* ve *miRNA1-2* kardiyomorfogenez ve kontraktıl proteinlerin sentezlenmesi sırasında embriyonik dönemde önemli regülatuar görevi olduğu hayvan modelleme çalışmalarında gösterilen miRNA'lar arasında yer almaktadır (103). Bir başka mikroRNA olan *MYH6* geninin 27. intronundan transkribe olan *miR-208a*'nın insan ve fare modellerinde normal kardiyak iletiminde sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (104).

Uzun kodlamayan RNA'ların ise kardiyak gelişim sırasında oynadığı roller son yıllarda ortaya çıkmaktadır. LncRNA'ların görevleri arasından ilki transkripsiyon faktörlerine yol gösteren ve onları hedef bölgelerine yönlendiren rehber görevi görerek transkripsiyonu aktive/inhibe edici etkileridir. İkinci görevleri, çeşitli fonksiyonel komplekslerin yapısının oluşumunda yer almalarıdır. Üçüncü olarak genomun 3 boyutlu konfigürasyonunun devamlılığında ve transkripsiyonun başlaması için gerekli olan promoter bölgelere erişimden sorumludur. Son olarak ise transkripsiyon faktörleri ile yarış halinde olmaları nedeni ile kromatin düzenlemesinde yer alan düzenleyici etkileridir (105). Bugüne kadar kardiyogenezden sorumlu olduğu düşünülen çok sayıda lncRNA tanımlanmıştır. Bunlara verilebilecek örnekler;

*Braveheart, Fendrr, Carmen, Upperhand, Myheart, Terminator, Alien, Punisher* olarak adlandırılan lncRNA'lardır. *SNHG6* lncRNA'nın fetal kardiyak dokuda over ekspresyonu olması durumunda Wnt/ $\beta$ -catenin yolağının baskılanmasına ve VSD gelişimine neden olduğu, *HAI17*'nin ise TOF'lu bireylerde ekspresyonunun arttığı düşünülmektedir (106).

#### 2.4. Yeni Nesil Dizi Analizi ve Konjenital Kalp Hastalıklarındaki Yeri

Yeni nesil dizileme; genom projesiyle birlikte 2000'li yıllarda genetik alanında bir devrim yaratmış olan massif paralel sekanslama yöntemleri olarak adlandırılan modern dizileme teknolojileridir. Dizileme alanında günümüzde de altın standart olarak sayılan Sanger dizilemeye kıyasla yeni nesil dizileme teknolojileri, düşük maliyet ve hızlı bir yöntem olması nedeni ile rutin kullanım ve araştırma çalışmalarında oldukça tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir.

Illumina, Ion Torrent, Roche 454, Pacific Biosciences gibi üretilmiş farklı platformlarda ortak prensip olarak DNA fragmentasyonunu takiben DNA kütüphanesinin hazırlanması, massif paralel sekanslama, elde edilen datanın analizi ve yorumlanması basamakları aracılığı ile tüm genom, tüm ekzom, hedefe yönelik dizayn edilmiş paneller ve tek gen dizilenmeleri mümkündür (107).

Illumina Miseq platformunda, *flow cell* olarak yüzeyinde gerçekleşen köprü PZR tekniği ile çoğaltılan adaptör eklenmiş DNA bölgelerinin, ortaya çıkan yeni diziyi eklenen her bir yeni nükleotitin farklı floresan ışımalarının algılanması ile senteze dayalı dizilenme tamamlanır ve böylelikle hasta bireye ait DNA nükleotid sekansı ortaya çıkmaktadır.

Yeni nesil dizileme teknolojileri KKH gibi kompleks ve heterojen bir hastalık grubunun nedenlerinin aydınlatılmasında oldukça mesafe kat edilmesine neden olmuştur. Tüm genom ve ekzom dizileme yöntemleri özellikle ailesel geçiş gösteren veya sporadik KKH'larda yeni gen ve varyantların tanımlanmasına, böylelikle gen-gen etkileşimlerinin ve yeni moleküler yolların aydınlatılmasına neden olmuştur; ancak panel analizleri ve tüm gen dizi analizi ile kıyaslandığında hedef genlerin okuma derinliğinin az olması ve kapsamının düşük olması gibi sorunlar izlenmektedir. İlave

olarak tüm genom ve ekzom analizlerinde elde edilen verinin oldukça büyük olması, saptanan varyantların yorumlanması ve depolanmasını güç kılarak, hedefe yönelik dizayn edilmiş paneller ve tüm gen dizi analizlerini tercih edilir kılmaktadır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma grubu

Bu çalışmaya 15.06.2019-15.01.2020 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji polikliniğine başvuran ve kardiyovasküler sistem muayenesi yapıp KKH tanısı nedeniyle Tıbbi Genetik polikliniğine yönlendirilerek dismorfolojik değerlendirilmesi yapılan non-sendromik KKH tanısı konan 40 olgu dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm olgulardan ilk basamakta Tıbbi Genetik poliklinik başvurusu sırasında, alınan periferik kan örneklerinden mikroarray (CGH+SNP Microarray Kit 4x180K, Agilent Inc, USA) analizi çalışılmış ve “olası patojenik/patojenik” herhangi bir KND saptanmamış olan olgular çalışmanın ikinci basamağı olarak *NKX2-5*, *MYH6*, *TBX1*, *NOTCH1*, *GATA4* genleri ayrı ayrı yeni nesil dizi analizi ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak yine Çocuk Kardiyoloji polikliniği tarafından ekokardiyografi ile değerlendirilmiş olup herhangi bir KKH saptanmayan, Tıbbi Genetik polikliniğinde klinik genetik değerlendirmesinde herhangi bir ilave konjenital malformasyonu saptanmayan ve monogenik hastalık veya mikrodelyasyon/duplikasyon sendromundan şüphelenilmeyen olgular arasında benzer yaş grubundaki 40 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edilmişlerdir. Olgulara ve ailelerine çalışma hakkında bilgi verilmiş, ebeveynlere aydınlatılmış onam formu imzalatıldıktan sonra tüm olgular çalışmaya dahil edilmişlerdir.

Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığından 25.06.2019 tarih ve 18 sayı ile onay almıştır. Çalışmanın güç analizi PASS 11 paket programı kullanılarak yapılmıştır. 8. kaynakta görülen %29'luk patojenik varyant saptama oranı göz önünde bulundurulduğunda güven aralığı yaklaşımı ile tek oran testi kullanılarak tip 1 hata  $\alpha=0.05$  olacak şekilde bir hesaplama gerçekleştirilmiştir. %80 güç ile en az grup bazında 40 kişi olmak üzere toplam 80 kişinin çalışmaya dahil edilmesi planlanmıştır (52).

### 3.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler

#### 3.2.1. Kullanılan Aletler

DNA İzolasyon Cihazı (MagPurix®)	MaestroNano Spektrofotometre
Isıtıcı blok (BIOSAN, Bio TDB-120)	Qubit™ Florometre
Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Santrifüj (Heraeus®)
High Speed Multiplate Shaker, Vorteks	Miseq cihazı (Illumina, Inc.)
Zaman ayarlayıcı (TFA Dostmann, 08/2010)	
Hassas terazi (SETRA, 2000L)	
Su banyosu (NÜVE, NB 9, N-Smart™)	
Elektroforez takımı(The GeneGenius, SYNGENE)	

#### 3.2.2 Kullanılan Malzemeler

Mor kapaklı (EDTA'lı) tüp	Pipet
Pipet ucu	Multiwell plate 96
Eppendorf (1,5ml, 0,2ml, 0,5ml)	Rack
Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit	Ethanol
Hibriyen Kandan DNA İzolasyon Kiti	İzopropanol
Periferik Kan DNA Ekstraksiyon Kiti (MagPurix®)	NaOH
GENEJET PZR Purification Kit	SERA-MAG Select (60 ml)
Qubit dsDNA HS Assay Kit (500 Assays)	Phix Control V3
Miseq Reagent Kit V2 (300 Cycles)	Jel elektroforez (CLEAVER Scientific)
Miseq Reagent Nano Kit V2 (300 Cycles)	
NEXTERA XT DNA Library Preparation Kit (96 Samples)	
NEXTERA XT Index Kit V2 Set A (96 indexes, 384 Samples)	

### 3.3. Yöntem

#### 3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi

Hasta ve kontrollerden EDTA'lı tüpler içerisinde alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu Moleküler Genetik Laboratuvarında MagPurix® robotik sistem aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu üretici firma tarafından sunulan MagPurix® Blood DNA Ekstraksiyon kiti protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. İzolasyon cihazı için proteinaz K, yıkama solüsyonları, manyetik boncuklar ve pipetaj için boş kuyucukları içeren kartuş sistemi bulunmaktadır. Pipet uçları, kartuş, örnekler ve elüsyon tüpleri konulduktan sonra DNA izolasyon basamakları otomatik olarak yapılmıştır. Toplam 400 µl periferik kan örneğinden 100 µl (µl 'sinde 30-100 ng) DNA elde edilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

NGS için izole edilmiş DNA örneklerinin konsantrasyonları MaestroNano Spektrofotometre ve Qubit™ dsDNA HS Assay Kiti ile ölçülmüştür. Ölçüm sonucu yoğunlukları bilinen DNA örnekleri 10 ng/µl olacak şekilde distile su ile dilue edilmiştir.

#### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Amplikon Basamağı

Polimeraz zincir reaksiyonu basamağında;

Taq DNA Polymerase, rekombinan (5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific Inc.) protokolü kullanılarak üretici firmanın aşağıda yer alan PZR Talimatlarına uygun olarak Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc.) cihazı aracılığı ile amplifikasyon işlemi tamamlanmıştır.

94°	3 dk
94°	45sn
55°	30sn
72°	90 sn
72°	10dk
4°	bekleme

Jel elektroforez kullanılarak PZR'ların çalışıp çalışmadığı ve bantlarının yerinde olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Amplikon basamağında;

1. Her poolda bir hasta ve hasta başına 51 amplikon olacak şekilde havuzlar hazırlanmıştır.
2. Aynı pooldaki PZR ürünleri her bir PZR tüpünden 10 µl alınarak tek bir santrifüj tüpünde birleştirilip, vortekslenmiştir.
3. 200 µl alınarak PZR ürünleri GeneJET PZR Purification Kit Talimatına göre pürifiye edilip, pürifiye PZR ürünlerinin Qubit florometre ile konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır.
4. Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Inc) protokolüne göre başlangıç miktarının 1 ng örnek olmasından dolayı pürifiye PZR ürünleri final konsantrasyonu 0,2 ng/µl olacak şekilde dilüe edilmiştir.

### 3.3.3. Kütüphane hazırlama

#### Genomik DNA tagmentasyonu

Genomik DNA tagmentasyonu aşamasında;

1. 0,2 µl PZR tüplerine TD (10 µl) + pürifiye PZR ürünü (0,2 ng/µl'ye dilüe edilmiş) (5 µl)
2. Her kuyucuğa 5 µl ATM eklenip 280×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Thermal cyler cihazı 100°C'ye ayarlanıp 55°C 'de 5 dakika ve 10°C 'de bekleme yapılmıştır.
4. Örnek 10°C 'ye ulaştığında hemen her kuyucuğa 5 µl NT eklenip, pipetaj yapıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

#### Tagmente DNA Amplifikasyonu

1. Her örneğe özgü bir indeks olacak şekilde 5 µl indeks 1 (i7) adaptör tüplere eklenip, i7 adaptör tüplerinin kapakları yeni turuncu kapaklar ile değiştirildikten sonra 5 µl indeks 2 (i5) adaptöründen tüplere eklenmiştir.
2. Her tüpe 15 µl NPM eklenip pipetaj yapıldıktan sonra 280×g 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. 100°C 'deki thermal cyler cihazına yerleştirilen tüplerde yer alan örnekler;  
72°C 'de 3 dk



95°C 'de 30 sn 12 döngü:

95°C 'de 10 sn 55°C 'de 30 sn 72°C 'de 30 sn

72°C 'de 5 dk ve 10°C 'de bekleme olacak şekilde cihaza konulmuştur.

### **Amplifiye DNA'nın Temizlenmesi**

Primerler, nükleotidler, polimerazlar ve tuzlar artıklarının amplifiye edilmiş DNA'dan temizlenmesi için;

1. Tüplere 280×g 'de 1 dakika santrifüj yapıp her tüpe 90 µl Sera-Mag Select eklenip 1800 rpm'de 2 dakika High Speed Multi Plate Shaker Kullanım ve Bakım Talimatı'na göre karıştırılmıştır.
2. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon için bekletilen tüpler manyetik standda yerleştirilip, sıvı berraklaşmaya kadar 2 dk süreyle beklenmiştir.
3. Supernatant her tüpten atılıp, her tüpe 200 µl yeni hazırlanmış etanol eklenip manyetik standın üstünde 30 sn inkübe edilip tüplerden supernatant atılarak 2 kez yıkanmıştır.
4. Tüpler 15 dk süreyle hava ile kurumaya bırakıldıktan sonra 52.5 µl RSB eklenip 1800 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiş, manyetik standda yerleştirilip sıvı berraklaştırıldıktan sonra 50 µl supernatant yeni tüplere transfer edilmiştir.

### **Hazırlanan Kütüphanenin Denatürasyonu ve Cihaza Yükleme**

1. Phix kontrol dilüsyon için 0,2'lik tüp içine 10nM Phix (2 µl) ve RSB (3 µl) eklenip vorteks ve santrifüj yapılmıştır.
2. Phix kontrol denatürasyonu için 0,2'lik tüp içine 4nM Phix (5 µl) üzerine 0,2N NaOH (5µl) eklenip, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiş, çözünmüş HT1 (990 µl), denatüre Phix (10 µl) 'in üzerine eklenip karıştırmak için alt-üst edilmiştir.
3. Elde edilen 1ml 20Pm Phix kütüphanesi 12,5 Pm'a dilüe edilmek için, 20pM denatüre Phix kütüphanesi (375 µl) ve HT1 (225 µl) birleştirilerek, 600 µl 12,5 pM Phix kütüphanesi elde edilmiştir.

4. Protokolün bitiminde 50 µl'ye elüsyonu yapılmış poollarin konsantrasyonları Qubit florometre ile ölçülmüştür. Her pool dan 100 ng (veya aynı miktarda olacak şekilde) olacak şekilde hacimler hesaplanıp, tek bir tüpte tüm poollar birleştirilip konsantrasyonlar ölçülmüş ve ölçülen konsantrasyon 4,329 katsayısı ile çarpılarak nM cinsinden değeri bulunup 4 nM'a su kullanılarak dilüe edilmiştir.

5. 4 nM'a dilüe edilmiş kütüphane 0,2N NaOH kullanılarak 2 nM'a dilüe edilmiş, vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. 990 µl HT1 üzerine 10 µl 2 nM kütüphane eklenmiştir. 225 µl HT1 üzerinde 375 µl 20 pM kütüphane eklenerek 12,5 pM'e denatüre edilmiş kütüphane elde edilip, 594 µl 12,5 pM kütüphane üzerine 6 µl 12,5 pM hazırlanmış Phix kontrol eklenip 600 µl örnek 96°'de 2 dakika inkübe edilmiştir.

6. Daha sonra buzlu su üzerine alınıp ve 5 dakika inkübe edilmiş, kartuşa yüklenip cihaza yükleme işlemi tamamlanmıştır.

### 3.3.5. Verilerin Analizi

MiSeq cihazında yürütme başlatılırken her bir pool için çıktı datası olarak FastQ ve ardından hizalanıp, haritalanmış datayı içeren BAM datası oluşturulacak şekilde gerekli seçimler yapılmıştır. Dizileme sonucunda elde edilen FASTQ dosyalarındaki dizi okumaları, BWA (Burrows Wheeler Aligner) aracı MiSeq cihazındaki dahili yazılım kullanılarak referans genomu (GRCh37/hg19) hizalanmış ve BAM dosyası haline çevrilmiştir. BAM dosyasındaki PZR duplikasyonları Picard paketi dahilindeki MarkDuplicates aracı ile işaretlenmiş ve analizin yanlış ya da eksik bilgi vermesini engellenmek üzere gerekiyorsa bu PZR duplikasyon sekansları BAM dosyasından silinmiştir. Son halini almış BAM dosyasında referans genomu hizalanmış ve kayıt altına alınmış her nükleotidin Kalite (Q) skoru bulunup, GATK paketi içerisinde bulunan BaseRecalibrator aracı ile kalite skorları rekaliibrasyona tabi tutulmuş ve yine GATK 4.0'da dahil edilmiş olan ApplyBQSR aracı ile gerekli düzenlemeler işlendikten sonra dosya elde edilmiştir. Ardından bu BAM dosyası kullanılarak GATK dahilinde bulunan HaplotypeCaller aracı ile ham ve son halini

almamış varyant listesi dosyası (VCF) elde edilmiştir. Elde edilen bu VCF dosyasındaki varyantlar, Varyasyon türüne göre SelectVariants aracı ile tek nokta mutasyonları (SNP) ve insersiyon-delesyon (Indel) mutasyonları olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Bu iki dosya VariantFiltration aracı kullanılarak tutarlı varyant filtrelemesi yapılmış ve bu işlemler sonucunda oluşan iki ayrı dosya birleştirilerek son ve toplu VCF oluşturulmuştur. VCF dosyası DNAnalyzer Annotation Pipeline'nın anotasyon basamaklarında kullanılmak üzere açılıp ve Annovar, SnpEFF, VEP anotasyon araçları kullanılarak varyantlar anlamlandırıldıktan sonra gerekli filtrelerden geçilerek ilgili hastanın klasörüne incelenmek üzere kaydedilmiştir. Oluşan sonuç excelindeki hedef genler ve ekzonlar filtreledikten sonra ilgili ve anlamlı varyantlar nihai listesine erişilmiştir. Tüm hasta ve kontrollerin örnekleri için kapsam (coverage) dosyaları ve amplikonları kontrol edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen genlere ait kapsama bilgilerine Tablo 3.1'de yer verilmiştir. In house filtreleme basamakları sonucunda, kapsama derinliği x30'un üstünde olan varyantlar değerlendirilmeye alınmış, şüpheli varyantlara denk geldiği takdirde BAM dosyası ve .bai uzantılı index dosyası *The Integrative Genomics Viewer* (IGV, V 2.8.0) programında açılıp, VCF de saptanan varyant, IGV ile doğrulanmıştır. Korunmuş bölgelerdeki (conserved regions) varyantlar bulunmuş, varyantın bölgesel tekrar (segmental duplications) kısımlarında yer alıp almadığı belirlenmiştir.

Tablo 3.1.'de Çalışmaya Dahil Edilen Genlere Ait Kapsama Bilgileri

Gen	Transcript No	Exon Sayısı	Mean Coverage	Kapsanan Alan
NOTCH1	NM_017617.3	34	X152	98,10%
MYH6	NM_002471.3	39	X134	98,40%
GATA4	NM_001308093.1	6	X171	99,30%
NKX2-5	NM_004387.3	2	X117	99,70%
TBX1	NM_080647.1	9	X105	99,10%

Tespit edilen varyasyonların daha önce tanımlanıp tanımlanmadığı “dbSNP” ve ClinVar veritabanında değerlendirilmiş, allel frekans değerleri GnomAD veritabanlarından alınmıştır. Varyant incelenmesinde “Varsome” ve “Franklin” gibi

veritabanları kullanılmıştır. *In silico* tahmin programları olarak MutationTaster, PolyPhen-2, GENOMNIS - Human splicing factor, Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) ve DANN, Mutation assesor, DEOGEN2 programları kullanılmıştır (108). Saptanan varyantların bulunduğu gen bölgesinin evrimsel süreçte korunmuş bir bölgede yer alıp almadığı Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) skorları göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Posttranslasyonel modifikasyon hedef bölgelerinde yer alan varyantların analizleri ActiveDriverDB aracılığı ile yapılmıştır. Tespit edilen tüm varyantlar ACMG kriterlerine göre sınıflandırılmıştır. ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması yapılan varyantlar Tablo 3.2. , Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.' de yer alan yer alan kriterlere göre "patojenik", "olası patojenik", "klinik önemi bilinmeyen", "olası benign" ve "benign" olarak gruplandırılmıştır (108). Kontrol bireyler hasta bireylerde saptanan tüm varyantlar açısından değerlendirilmiş ve hasta bireylerde saptanan varyantların kontrollerde izlenme sıklığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.2. Varyantların Patojenik Olarak Sınıflandırılmasında Kullanılan Kriterler

<b>Patojenite kanıtı</b>	<b>Kategori</b>
<b>Çok güçlü</b>	PVS1 fonksiyonel olmayan variantyanlı fonksiyon kaybettirici mekanizma ile hastalığın ortaya çıktığı bilinmektedir (Çerçeve kayması, kırılma bölgesi, başlangıç kodonu, tek/çoklu ekzon delesyonu)
<b>Güçlü</b>	PS1 Nükleotid değişikliğine bakılmaksızın patojenik olarak tanımlanmış aynı aminoasit değişimine neden olmak PS2 De novo olarak ortaya çıkmış olmak PS3 Fonksiyonel çalışmalarla (in vivo/in vitro) ortaya çıkan zararlı etkinin desteklenmesi PS4 Varyantın hasta bireylerde görülme sıklığı sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak artmış
<b>Orta</b>	PM1 (Genin sık mutasyon izlenen ve benign varyantların bulunmadığı bir bölgede, proteinin fonksiyonel olarak aktif bölgesinde ortaya çıkması) PM2 Kontrollerde izlenmemiş veya çok düşük bir frekansta izlenmiş olması (Ekzom sekanslama projesi, 1000 genom projesi vb.) PM3 Resesif kalıtım gösteren hastalıklarda patojenik bir varyantla trans konumda bulunmak PM4 Çerçeve içinde yer alan in/del değişimler sonucu veya dur kodonunun kaybolmasına neden değişimler sonucu protein uzunluğunda değişiklik yaratmak PM5 Daha önce farklı bir yanlış anlamlı varyantın patojenik olarak yorumlandığı bir aminoasid bölgesinde ortaya çıkan yeni bir yanlış anlamlı varyant PM6 Parental analizler yapılmadan de novo olarak ortaya çıktığı düşünülen
<b>Destekleyici</b>	PP1 Hastalığa neden olduğu kesin olarak bilinen bir gendeki varyantın aile bireylerindeki segregasyonunun uyumlu olması PP2 Yanlış anlamlı varyantların hastalık mekanizmasında etkili olduğu ve benign yanlış anlamlı varyantların görülme sıklığının az olduğu bilinen bir gende oluşmuş yanlış anlamlı varyant PP3 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün zararlı etkisi olduğununun gösterilmesi (Evrimsel, korunumsal, kırılma etkisi) PP4 Hastanın veya aile bireylerinin tek bir genetic etiyolojie oldukça spesifik olması PP5 Önemli bir kaynak tarafından yakın zamanda varyantın patojenik olarak raporlanması; ancak bireysel olarak değerlendirmenin yapılamıyor olması

Tablo 3.3. : Varyantların Benign Olarak Sınıflandırılmasında Kullanılan Kriterler

<b>Patojenite kanıtı</b>	<b>Kategori</b>
<b>Tek başına destekleyici</b>	BA1 EXAC, 1000 genom projesi vb. platformlarda allel frekansının %5'in üzerinde olarak tanımlanması
<b>Güçlü</b>	BS1 Allel frekansının o hastalık için beklenenden daha yüksek olması BS2 Tam penetrans gösteren resesif, dominant veya X'e bağlı kalıtılan bir hastalıkla ilişkili varyantın sağlıklı bir erişkin bir bireyde saptanmış olması BS3 İn vivo/in vitro fonksiyonel çalışmalarda varyantın protein fonksiyon veya yapısında herhangi bir zararlı etkisinin olmadığını gösterilmesi BS4 Etkilenmiş aile bireylerinde kosegregasyonun olmaması
<b>Destekleyici</b>	BP1 Esas olarak hastalığın ortaya çıkmasında güdük protein oluşumuna neden olan varyantların olduğu bilinen bir gende yanlış anlamlı bir varyantın olması BP2 Patojenik full penetran dominant hastalık/gen ile trans pozisyonda olmak veya herhangi bir kalıtım kalıbıyla kalıtılan bir hastalıkla ilişkili bir gende patojenik bir varyantla cis pozisyonda bulunmak BP3 Tekrar bölgesinde yer alan ve herhangi bir fonksiyonu bilinmeyen çerçeve içinde yer alan in/del varyant BP4 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösterilmesi (Evrimsel, korunumsal, kırılma etkisi) BP5 Farklı bir moleküler mekanizması olduğu gösterilmiş olan bir hastalıkta bulunmak BP6 Önemli bir kaynak tarafından yakın zamanda varyantın benign olarak raporlanması; ancak bireysel olarak değerlendirmenin yapılamıyor olması BP7 Kırılma tahmini algoritmalarında herhangi bir etkisi olmadığı gösterilen, yeni bir kırılma bölgesi yaratmayan veya korunmuş bir bölgede yer almayan bir nükleotide meydana gelen eş anlamlı varyant

Tablo 3.4. : Patojenite Sınıflandırması ve Kullanılan Kriterler

<b>Patojenik</b>	1 çok güçlü (PVS1) ve $\geq 1$ güçlü (PS1-PS4) veya $\geq 2$ orta (PM1-PM6) veya $\geq 1$ orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya $\geq 2$ destekleyici (PP1-PP5)
<b>Olası patojenik</b>	1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya 1 güçlü (PS1-PS4) ve $\geq 2$ destekleyici (PP1-PP5) veya $\geq 3$ orta (PM1-PM6) veya 2 orta (PM1-PM6) ve $\geq 2$ destekleyici (PP1-PP5) veya 1 orta (PM1-PM6) ve $\geq 4$ destekleyici (PP1-PP5)
<b>Olası benign</b>	1 güçlü (BS1-BS4) ve $\geq 1$ destekleyici (BP1-BP7) veya $\geq 2$ destekleyici (BP1-BP7)
<b>Benign</b>	1 tek başına destekleyen (BA1) $\geq 2$ güçlü (BS1-BS4)
<b>Klinik önemi bilinmeyen</b>	Yukarıda belirtilen kriterlere uymaması veya Benign ve patojenik kriterler çelişkili ise

### 3.3.6. Varyantların Doğrulanması ve Segregasyon Çalışması

Çalışmamızda “Klinik Önemi Bilinmeyen Değişiklik” olarak sınıflandırılan varyantların bulunduğu 3 olgu ve bu olguların anne babaları, varyant konfirmasyonu ve segregasyon analizi çalışması için varyant saptanan tek genler açısından, yöntem kısmında detaylı bir şekilde anlatılan mevcut yeni nesil dizileme platformu aracılığı ile dizi analizi ile değerlendirilmiştir.

## 4.BULGULAR

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı Çocuk Kardiyolojisi Bilim dalına başvuran, ekokardiyografi ile değerlendirilip konjenital kalp hastalığı tanısı alan ve yapılan mikroarray (CGH+SNP Microarray Kit 4x180K, Agilent Inc, USA) analizinde herhangi bir patojenik/olası patojenik KND saptanmayan 0-18 yaş arası 40 hasta ve rutin ekokardiyografi sonrasında herhangi bir konjenital kalp hastalığına rastlanmamış olan benzer yaş ve cinsiyet grubundaki 40 kontrol dahil edilmiştir. Olguların detaylı anamnezleri ve dismorfolojik değerlendirilmeleri Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde yapılmış, şekil 4.1’de yer alan takip formu ile raporlanmıştır. Çalışma grubunda yer almaya uygun görülen olguların alınan periferik kan örneğinde ilk olarak Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda mikroarray analizleri yapılmıştır. Yeni nesil dizileme ile aday genlerinin dizilenmesi hizmet alımı kapsamında çalışılmış olup verilerin biyoinformatik analizleri Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilmiştir.

15.06.2019 Versiyon No:1	15.06.2019 Versiyon No:1
<b>ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ</b> <b>TIP FAKÜLTESİ</b> Tıbbi Genetik Anabilim Dalı/ Pediatric Kardiyoloji Bilim Dalı <b>KONJENİTAL KALP HASTALIĞI ÇALIŞMASI HASTA TAKİP FORMU</b>	<u>AİLE AĞACI:</u>
BAŞVURU TARİHİ: DOĞUM TARİHİ:	<u>DİSMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:</u>
CİNSİYET:	
<u>ŞİKAYETİ:</u>	
PRENATAL/POSTNATAL ÖYKÜ:	
<u>ÖZGEÇMİŞ:</u>	<u>EKOKARDİYOĞRAFI SONUCU:</u>
KULLANDIĞI İLAÇLAR/OPERASYON ÖYKÜSÜ:	
<u>SOYGEÇMİŞ:</u>	<u>FORMU DOLDURAN HEKİM</u> <u>SORUMLU ÖĞRETİM ÜYESİ</u>

Şekil 4.1.: Konjenital Kalp Hastalıkları Takip Formu



#### 4.1. Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen hasta bireylerin 21 (%52,5)'i erkek, 19 (%47,5)'u kızdır. Kontrol grubunda yer alan bireylerin 15 (%37,5) 'i erkek, 25 (%62,5)'i kızdır (Tablo 4.1.). Hasta grubunun yaş ortalaması  $6\pm 5.1$ , kontrol grubunun yaş ortalaması  $8\pm 4.6$  olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. Olguların Cinsiyetlere Göre Dağılımı

Olgu	Kontrol	Hasta	Toplam
Kız	25 (%62,5)	19 (%47,5)	41
Erkek	15 (%37,5)	21 (%52,5)	39
<b>Toplam</b>	40 (%100)	40 (%100)	80

#### 4.2. Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen hasta grubunda, izlenen kardiyak defektler; 13 septal defekt (%32.5), 12 sol ventrikül çıkım yolu defekti (%30), 7 konotrunkal anomali (%17.5), 4 kompleks kardiyak anomali (%10) , 2 sağ ventrikül çıkım yolu defekti (%5), 1 atriyoventriküler kanal defekti (%2.5), 1 pulmoner venöz dönüş anomali (%2.5) olarak sınıflandırılmış ve Tablo 4.2'de listelenmiştir.

Tablo 4.2. Hasta Grubunda Saptanan Kardiyak Defektler

Olgu	Konjenital kalp defektleri
1	Sekundum ASD
2	VSD + Sekundum ASD
3	Sekundum ASD
4	Sekundum ASD + Atriyal septal anevrizma
5	Sekundum ASD
6	Multiple ventriküler septal defekt (trabeküler ve apikal)
7	Sekundum ASD
8	Sekundum ASD
9	Perimembranöz VSD
10	Sekundum ASD
11	Multiple ASD
12	Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi

Tablo 4.2. ‘‘Devamı’’ Hasta Grubunda Saptanan Kardiyak Defektler

13	Perimembranöz VSD
14	Sekundum ASD
15	Aort koarktasyonu + PDA
16	Fallot pentalojisi
17	c-TGA + VSD + Pulmoner arter hipoplazisi + Pulmoner stenoz
18	Fallot tetralojisi
19	Triküspid atrezisi + VSD + Pulmoner stenoz
20	Aort koarktasyonu
21	Biküspid aorta
22	c-TGA + VSD + Pulmoner arter hipoplazisi
23	Aort koarktasyonu +PDA+ Biküspid aorta
24	Aort koarktasyonu + PDA + Biküspid aorta
25	Ebstein anomalisi
26	d-TGA
27	d-TGA
28	Fallot tetralojisi
29	Aort koarktasyonu
30	Hipoplastik sol kalp + d-TGA + aort koarktasyonu + VSD
31	Fallot tetralojisi
32	Mezokardi + Komplet AVKD+Sağ arkus aorta+ Sol atriyal izomerizm
33	c-TGA
34	Sekundum ASD + Pulmoner stenoz
35	Biküspid aorta
36	Biküspid aorta + Aort yetmezliği
37	Biküspid aorta + Asendan aort koarktasyonu
38	d-TGA
39	Biküspid aorta
40	Biküspid aorta

### 4.3. Olgularda Saptanan Varyantlar

Çalışma sonunda 40 olgu ve 40 kontrol bireyin *NKX2-5*, *MYH6*, *NOTCH1*, *GATA4*, *TBX1* genleri dizilenmiş, tüm örnekler için *coverage* (kapsama) dosyaları ve amplikonlar kontrol edilerek filtreleme sonucunda toplam varyant sayısı 103 olarak saptanmıştır. *NKX2-5* geninde 3 adet (%2,9), *TBX1* geninde 9 adet (%8,7), *NOTCH1*

geninde 45 adet (%43,6), *GATA4* geninde 10 adet (%9,7) ve *MYH6* geninde 36 adet (%34,9) varyant saptanmıştır. Bunların 35 tanesi ekzonik, 67 tanesi intronik ve 1 tanesi de 5'UTR bölgesinde yer almaktadır. Bu varyantların 101 tanesi tek nükleotid değişimi, iki tanesi ise ins/del tipte varyantlardır. Tek nükleotid değişimlerinin 24 tanesi eşanlımlı değişim, 11 tanesi ise eşanlımlı olmayan değişimlerdir.

#### 4.3.1. *NKX2-5* Geninde Saptanan Varyantlar

Çalışmamızda yeni nesil dizileme analizi yöntemi ile dizilenen *NKX2-5* geninin (NM\_004387.3) intronik, ekzonik, kırpılma, 3'UTR ve 5'UTR bölgeleri değerlendirilmiş ve 3 adet varyant saptanmıştır. Bu varyantların hepsi ekzoniktir. Saptanan varyantların GnomAD veritabanında yer alan frekans bilgileri, varyantların saptandığı olguların klinik bulguları ve ACMG kriterlerine uygun olarak varyantların sınıflandırılmasına ait bilgiler Tablo 4.3.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.3.: *NKX2-5* Geninde Saptanan Varyantlar

Varyant konumu	cDNA rs ID	Protein	Allel frekansı %	ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması	Hasta ve Kontrol gruplarında saptanma oranları
5:172662024 ekzonik	c.63A>G rs2277923	p.Glu21=	0.41	Benign	H: 11/40 K: 14/40
5:172660192 ekzonik	c.355G>T rs137852684	p.Ala119Ser	0.0012	Klinik önemi bilinmeyen değişiklik	H: 1/40 K: -/40
5:172659738 Ekzonik	c.809G>A rs587782931	p.Cys270Tyr	0.0001	Olası Benign	H:1/40 K:1/40

#### 4.3.2. *TBX1* Geninde Saptanan Varyantlar

*TBX1* geninin (NM\_080647.1) intronik, ekzonik, kırpılma, 3'UTR, 5'UTR bölgeleri incelenmiş ve 5'i intronik 4'ü ekzonik olmak üzere 9 adet varyant

saptanmıştır. Saptanan varyantların GnomAD veritabanında yer alan frekans bilgileri, protein düzeyinde yaptığı değişiklikler, varyantların saptandığı olgular ve ACMG kriterlerine uygun olarak varyantların sınıflandırılmasına ait bilgiler Tablo 4.4.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.4. : *TBX1* Geninde Saptanan Varyantlar

Varyant lokalizasyonu	cDNA rs ID	Protein	Allel frekansı %	ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması	Hasta ve kontrol gruplarında saptanma oranları
22:19750773 ekzonik	c.420T>C rs41298814	p.Phe140=	0.24	Benign	H: 19/40 K: 19/40
22:19753449 ekzonik	c.933A>T rs41298840	p.Ala311=	0.23	Benign	H:17/40 K: 19/40
22:19753379 intronik	c.908+31C>T rs41298836	-	0.0094	Benign	H:4/40 K:3/40
22:19751829 Ekzonik	c.664C>T rs2301558	p.Leu222=	0.28	Benign	H:14/40 K:16/40
22:19753961 Ekzonik	c.1059A>G rs13054377	p.Ala353=	0.071	Benign	H:2/40 K:3/40
22:19753848 intronik	c.1010-64A>G rs72646966	-	0.182	Benign	H:4/40 K:19/40
22:19754091 ekzonik	c.1189A>C rs72646967	p.Asn397His	0.31	Benign	H:8/40 K:19/40

Tablo 4.4. ‘‘Devamı’’ *TBX1* Geninde Saptanan Varyantlar

22:19753215 intronik	c.841-64dupC rs398088161	-	0.00942	Benign	H:1/40 K:-/40
22:19747082 5'UTR	c.-85G>C rs737868	-	0.65	Benign	H:9/40 K:11/40

### 4.3.3. *NOTCH1* Geninde Saptanan Varyantlar

*NOTCH1* geninin (NM\_017617.3) intronik, ekzonik, kırılma, 3'UTR, 5'UTR bölgeleri incelenmiş ve 45 adet varyant saptanmıştır. Saptanan c.5949C>G p.(Asn1983Lys) varyantı ise ilk defa çalışmamızda tanımlanmış novel bir varyanttır. Saptanan varyantların GnomAD veritabanında yer alan frekans bilgileri, protein düzeyinde yaptığı değişiklikler, varyantların saptandığı olgular ve ACMG kriterlerine uygun olarak varyantların sınıflandırılmasına ait bilgiler Tablo 4.5. 'de özetlenmiştir.

Tablo 4.5. *NOTCH1* Geninde Saptanan Varyantlar

Varyant lokalizasyonu	cDNA rs ID	Protein	Allel frekansı %	ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması	Hasta ve kontrol gruplarında saptanma oranları
9:139391636 Ekzonik	c.6555C>T rs2229974	p.Asp218 5=	0.62	Benign	H:36/40 K:31/40
9:139395311 Intronik	c.5639-12C>T rs11574908	-	0.097	Benign	H:4/40 K:5/40
9:139396408 intronik	c.5473-43T>C rs3124594	-	0.59	Benign	H:4/40 K:31/40
9:139397707 Ekzonik	c.5094C>T rs10521	p.Asp169 8=	0.44	Benign	H:16/40 K:23/40
9:139400406 İntronik	c.4015-73G>A rs11145764	-	0.47	Benign	H:4/40 K:2/40

Tablo 4.5. “Devamı” *NOTCH1* Geninde Saptanan Varyantlar

9:139402663 İntronik	c.3325+21A>G rs3124597	-	0.64	Benign	H:34/40 K:32/40
9:139403268 İntronik	c.3171+54A>G rs3125000	-	0.6	Benign	H:28/40 K:21/40
9:139405261 İntronik	c.2588-4G>A rs3125001	-	0.47	Benign	H:15/40 K:16/40
9:139405361 İntronik	c.2588-104T>C rs3125002	-	0.67	Benign	H:22/40 K:30/40
9:139405501 İntronik	c.2587+103T>C rs9411206	-	0.68	Benign	H:32/40 K:32/40
9:139407932 Ekzonik	c.2265T>C rs2229971	p.Asn755=	0.4	Benign	H:7/40 K:27/40
9:139410177 İntronik	c.1670-9A>G rs3124603	-	0.44	Benign	H:22/40 K:17/40
9:139410424 İntronik	c.1669+9T>C rs3125006	-	0.87	Benign	H:28/40 K:33/40
9:139412884 İntronik	c.1100-140G>A rs3125009	-	0.4	Benign	H:24/40 K:19/40
9:139418260 Ekzonik	c.312T>C rs4489420	p.Asn104=	0.6	Benign	H:36/40 K:25/40
9:139396690 İntronik	c.5384+34G>A rs75842134	-	0.11	Benign	H:3/40 K:1/40
9:139400219 Ekzonik	c.4129C>T rs61751542	p.Pro1377Ser	0.018	Benign	H:4/40 K:1/40
9:139405350 İntronik	c.2588-93C>T rs117063264	-	0.0144	Benign	H:1/40 K:1/40
9:139405475 İntronik	c.2587+129G>A rs3125003	-	0.1	Benign	H:3/40 K:2/40
9:139405584 İntronik	c.2587+20G>A rs148381982	-	0.016	Benign	H:3/40 K:-/40
9:139399320 Ekzonik	c.4823G>A rs76371972	p.Arg1608His	0.013	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139391441 ekzonik	c.6750G>A rs758285863	p.Ala2250=	0.0000291	Olası benign	H:1/40 K:-/40
9:139401233 Ekzonik	c.3836G>A rs61751543	p.Arg1279His	0.0153	Benign	H:2/40 K:-/40

Tablo 4.5. ‘‘Devami’’ *NOTCH1* Geninde Saptanan Varyantlar

9:139413908 ekzonik	c.852G>A rs2229975	p.Pro284=	0.14	Benign	H:4/40 K:7/40
9:139399070 İntronik	c.5018+55C>T rs11574903	-	0.163	Benign	H:6/40 K:7/40
9:139393307 İntronik	c.6180+44T>C rs9632944	-	0.13	Benign	H:9/40 K:8/40
9:139396983 İntronik	c.5168-43T>C rs12344155	-	0.12	Benign	H:6/40 K:1/40
9:139397557 İntronik	c.5167+77G>C rs34383263	-	0.12	Benign	H:9/40 K:8/40
9:139399641 İntronik	c.4587-85C>T rs13300218	-	0.096	Benign	H:7/40 K:8/40
9:139401899 İntronik	c.3511-10G>A rs139838537	-	0.005	Benign	H:1/40 K:2/40
9:139403280 İntronik	c.3171+42G>A rs11145765	-	0.18	Benign	H:5/40 K:8/40
9:139405093 İntronik	c.2740+12C>T rs36119806	-	0.14	Benign	H:4/40 K:11/40
9:139399445 Ekzonik	c.4698C>T rs200462746	p.Pro1566=	0.0001	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139410467 Ekzonik	c.1635C>T rs11574889	p.Asp545=	0.0075	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139417273 İntronik	c.742+29G>A rs934763653	-	0.0000139	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139393658 ekzonik	c.5988G>A rs186453356	p.Thr1996=	0.0026	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139412760 intronik	c.1100-16G>C rs146815871	-	0.004	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139412806 intronik	c.1100-62C>T rs114525255	-	0.0000558	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139412859 İntronik	c.1100-115C>T rs77655659	-	0.0121	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139417344 ekzonik	c.700C>T c.355G>T	p.Arg234Cys	0.0002	Klinik önemi bilinmeyen değişiklik	H:1/40 K:-/40

Tablo 4.5. ‘‘Devamı’’ *NOTCH1* Geninde Saptanan Varyantlar

9:139411880 İntronik	c.1442-43C>T rs9411254	-	0.43	Benign	H:7/40 K:22/40
9:139412197 İntronik	c.1441+7C>T rs9411208	-	0.58	Benign	H:13/40 K:26/40
9:139412073 İntronik	c.1441+131A>G rs4077029	-	0.636	Benign	H:7/40 K:19/40
9:139405154 ekzonik	c.2691C>T rs11574895	p.Ala897=	0.013	Benign	H:1/40 K:-/40
9:139393697 ekzonik	c.5949C>G novel	p.Asn1983Lys	NA	Olası benign	H:1/40 K:-/40

#### 4.3.4. *GATA4* Geninde Saptanan Varyantlar

*GATA4* geninin (NM\_001308093.1) intronik, ekzonik, kırılma, 3’UTR, 5’UTR bölgeleri incelenmiş ve 11 adet varyant saptanmıştır. Saptanan varyantların GnomAD veritabanında yer alan frekans bilgileri, protein düzeyinde yaptığı değişiklikler, varyantların saptandığı olgular ve ACMG kriterlerine uygun olarak varyantların sınıflandırılmasına ait bilgiler Tablo 4.6.’de özetlenmiştir.

Tablo 4.6. : *GATA4* Geninde Saptanan Varyantlar

Varyant lokalizasyonu	cDNA rs ID	Protein	Allel frekansı %	ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması	Hasta ve Kontrol gruplarında saptanma oranları
8:11607352 İntronik	c.784- 268C>T rs3735817	-	0.591	Benign	H:14/40 K:11/40
8:11607396 İntronik	c. c.784- 224G>A rs3735814	-	0.546	Benign	H:19/40 K:19/40
8:11612698 İntronik	c.997+56C>A rs804280	-	0.618	Benign	H:31/40 K:19/40



Tablo 4.6. ‘‘Devamı’’ *GATA4* Geninde Saptanan Varyantlar

8:11614575 ekzonik	c.1129A>G rs3729856	p.Ser377Gly	0.096	Benign	H:3/40 K:9/40
8:11607048 İntronik	c.783+454G>A rs3779664	-	0.136	Benign	H:6/40 K:15/40
8:11607330 İntronik	c.784-290C>T rs3735818	-	0.137	Benign	H:5/40 K:15/40
8:11565920 Ekzonik	c.99G>T rs56166237	p.Ala33=	0.0045	Benign	H:1/40 K:-/40
8:11606312 İntronik	c.617-116T>C rs3735819	-	0.8	Benign	H:10/40 K:25/40
8:11607372 İntronik	c.784-248T>C rs3735816	-	0.44	Benign	H:10/40 K:17/40
8:11607377 İntronik	c.784-243A>G rs3735815	-	0.05	Benign	H:1/40 K:-/40

#### 4.3.5. *MYH6* Geninde Saptanan Varyantlar

*MYH6* geninin (NM\_002471.3) intronik, ekzonik, kırılma, 3’UTR, 5’UTR bölgeleri incelenmiş ve 36 adet varyant saptanmıştır. Saptanan varyantların GnomAD veritabanında yer alan frekans bilgileri, protein düzeyinde yaptığı değişiklikler, varyantların saptandığı olgular ve ACMG kriterlerine uygun olarak varyantların sınıflandırılmasına ait bilgiler Tablo 4.7.’de özetlenmiştir.

Tablo 4.7. *MYH6* Geninde Saptanan Varyantlar

Varyant lokalizasyonu	cDNA rs ID	Protein	Allel frekan sı %	ACMG kriterlerine göre sınıflandırılması	Hasta ve Kontrol gruplarında saptanma oranları
14:23851874 İntronik	c.5662-103T>C rs178636	-	0.467	Benign	H:33/40 K:14/40
14:23851882 İntronik	c.5662-111G>T rs10135780	-	0.197	Benign	H:25/40 K:14/40
14:23852651 İntronik	c.5566-122A>C rs35182223	-	0.213	Benign	H:20/40 K:12/40
14:23853629 İntronik	c.5565+22A>G rs8006357	-	0.25	Benign	H:27/40 K:14/40
14:23854324 İntronik	c.5164-74T>C rs178638	-	0.509	Benign	H:33/40 K:17/40
14:23855569 ekzonik	c.4914T>C rs178640	p.Ala1638 Ala	0.46	Benign	H:33/40 K:17/40
14:23855849 İntronik	c.4651-17G>A rs2071634	-	0.25	Benign	H:5/40 K:11/40
14:23856896 İntronik	c.4526-34T>C rs178642	-	0.5	Benign	H:25/40 K:18/40
14:23857351 İntronik	c.4359+13C>T rs8022522	-	0.36	Benign	H:24/40 K:12/40
14:23861811 ekzonik	c.3302T>C rs365990	p.Val1101 Ala	0.35	Benign	H:10/40 K:16/40
14:23854272 intronik	c.5164-22A>G rs178637	-	0.082	Benign	H:2/40 K:1/40
14:23869806 intronik	c.1410+112T>C rs28671012	-	0.089 9	Benign	H:9/40 K:6/40
14:23856714 intronik	c.4650+24C>T rs45536340	-	0.031	Benign	H:4/40 K:1/40
14:23868285 intronik	c.1582-39C>T rs439735	-	0.21	Benign	H:17/40 K:14/40
14:23874117 intronik	531-86A>G rs440466	-	0.393	Benign	H:21/40 K:17/40

Tablo 4.7. “Devamı” *MYH6* Geninde Saptanan Varyantlar

14:23874507 ekzonik	c.427C>A rs2277473	p.Arg143Arg	0.09 5	Benign	H:6/40 K:11/40
14:23874523ek zonik	c.411G>A rs2277474	p.Glu137Glu	0.21	Benign	H:14/40 K:12/40
14:23851400 intronik	c.5797- 128G>A rs453361	-	0.14 9	Benign	H:6/40 K:3/40
14:23854029 intronik	c.5289+96A>G rs183605033	-	0.00 022 3	Benign	H:2/40 K:1/40
14:23854155 ekzonik	c.5259C>T rs8004990	p.Ala1753Ala	0.07 5	Benign	H:5/40 K:3/40
14:23855320 ekzonik	c.4980C>T rs382872	p.Asp1660Asp	0.07 5	Benign	H:5/40 K:3/40
14:23855426 intronik	c.4960-86G>A rs45520434	-	0.11 5	Benign	H:5/40 K:3/40
14:23855478 intronik	c.4959+46G>C rs396024	-	0.07 5	Benign	H:5/40 K:3/40
14:23869993 ekzonik	c.1335C>T rs61731179	p.Asn445Asn	0.05 4	Benign	H:1/40 K:4/40
14:23870295 intronik	c.1142- 109T>C rs178644	-	0.07 18	Benign	H:1/40 K:1/40
14:23873786 intronik	c.642+134A>G rs146918376	-	0.01 76	Benign	H:1/40 K:2/40
14:23857258 intronik	c.4359+104_43 59+106delAA G rs566709220	-	0.00 195	Benign	H:1/40 K:2/40
14:23857262 intronik	c.4359+101_43 59+102delGC rs568881717	-	0.00 195	Benign	H:1/40 K:2/40
14:23874541 ekzonik	c.391C>T rs17277970	p.Leu131Leu	0.07	Benign	H:1/40 K:6/40
14:23876267 ekzonik	c.166G>A rs28711516	p.Gly56Arg	0.07	Benign	H:4/40 K:6/40

Tablo 4.7. ‘‘Devamı’’ *MYH6* Geninde Saptanan Varyantlar

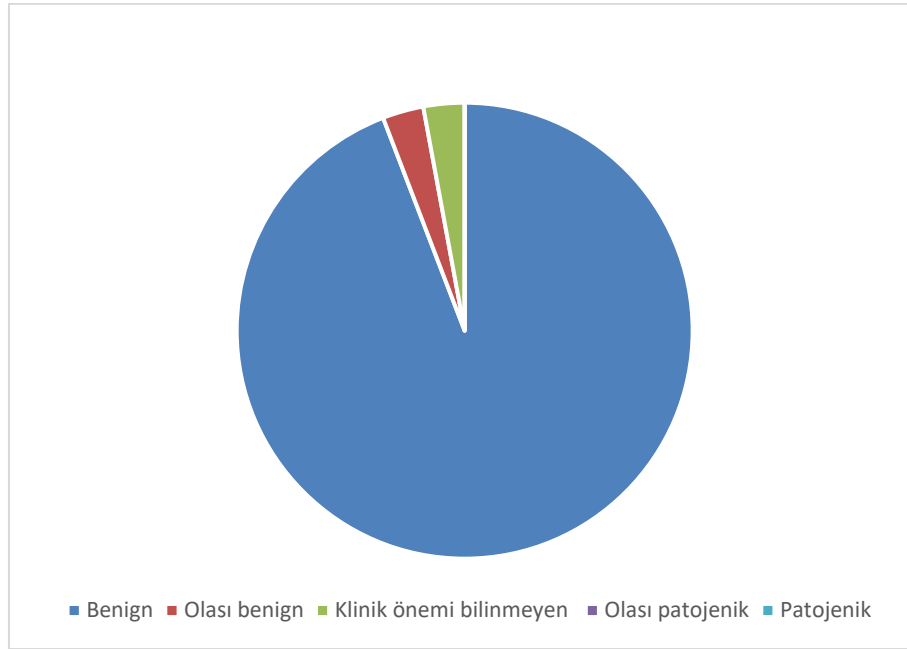
14:23869779 intronik	c.1410+139T> C rs57166503	-	0.02 51	Benign	H:1/40 K:-/40
14:23862049 intronik	c.3251+72G>A rs372656808	-	NA	Klinik önemi bilinmeyen değişiklik	H:1/40 K:-/40
14:23854352 intronik	c.5164- 102T>A rs178639	-	0.45	Benign	H:11/40 K:17/40
14:23862374 intronik	c.3106- 108T>C rs17091453	-	0.03 77	Benign	H:1/40 K:2/40
14:23863152 intronik	c.2686-35T>C rs28730773	-	0.02 7	Benign	H:1/40 K:2/40
14:23855314 ekzonik	c.4986G>A rs77416370	p.Ala1662Ala	0.00 04	Benign	H:1/40 K:1/40

#### 4.4. Olgularda Saptanan Varyantların Özellikleri

Çalışmamızda saptanan tüm eşanlamı olmayan varyantlara Tablo 4.8.’de yer verilmiştir. ACMG kriterlerine göre saptanan tüm varyantların patojenite skorlarının dağılımı Şekil 4.2’de gösterilmiş olup ‘‘Klinik Önemi Bilinmeyen Değişiklik’’ olarak sınıflandırılan varyantlar ve bu varyantların saptandığı olgulardaki klinik özellikler Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.8. Çalışmada Saptanan Eşanlı Olmayan Varyantlar

Genomik lokalizasyon	cDNA Rs ID	Protein	Allel frekansı	ACMG sınıflandırması
5:172660192 ekzonik	c.355G>T rs137852684	p.Ala119Ser	0.0012	Klinik önemi bilinmeyen değişiklik
5:172659738 ekzonik	c.809G>A rs587782931	p.Cys270Tyr	0.0001	Olası Benign
22:19754091 ekzonik	c.1189A>C rs72646967	p.Asn397His	0.31	Benign
9:139400219 Ekzonik	c.4129C>T rs61751542	p.Pro1377Ser	0.018	Benign
9:139399320 Ekzonik	c.4823G>A rs76371972	p.Arg1608His	0.013	Benign
9:139401233 ekzonik	c.3836G>A rs61751543	p.Arg1279His	0.0153	Benign
9:139417344 ekzonik	c.700C>T rs567890045	p.Arg234Cys	0.0002	Klinik önemi bilinmeyen değişiklik
9:139393697 Ekzonik	c.5949C>G novel	p.Asn1983Lys	NA	Olası benign
14:23876267 Ekzonik	c.166G>A rs28711516	p.Gly56Arg	0.07	Benign



Şekil 4.2. : Çalışmada Saptanan Varyantların ACMG Kriterlerine Göre Sınıflandırılmış Patojenite Skorlarının Dağılımı

Tablo 4.9. Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant Saptanan Olgularda Bulunan Konjenital Kalp Hastalıkları

Olgu No	Gen/Transkript	Varyant	Zigosite	KKH
12	NKX2-5 (NM_004387.4)	c.355G>T p.(Ala119Ser)	Heterozigot	Total pulmoner venöz dönüş anomali
34	NOTCH1 (NM_017617.5)	c.700C>T p.(Arg234Cys)	Heterozigot	Pulmoner stenoz + sekundum ASD
22	MYH6 (NM_002471.3)	c.3251+72G>A -	Heterozigot	c-TGA+VSD+Pulmoner arter hipoplazisi

#### 4.4.1. Saptanan Klinik Önemi Bilinmeyen Değişiklikler

*NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde c.355G>T p.(Ala119Ser) varyantı saptanan olgu 12, aynı köyden olan çiftin ilk gebeliğinden 39. haftalıkken normal spontan vajinal yolla doğmuştur. Annenin gebeliği süresince herhangi bir ilaç, sigara/alkol kullanımı,

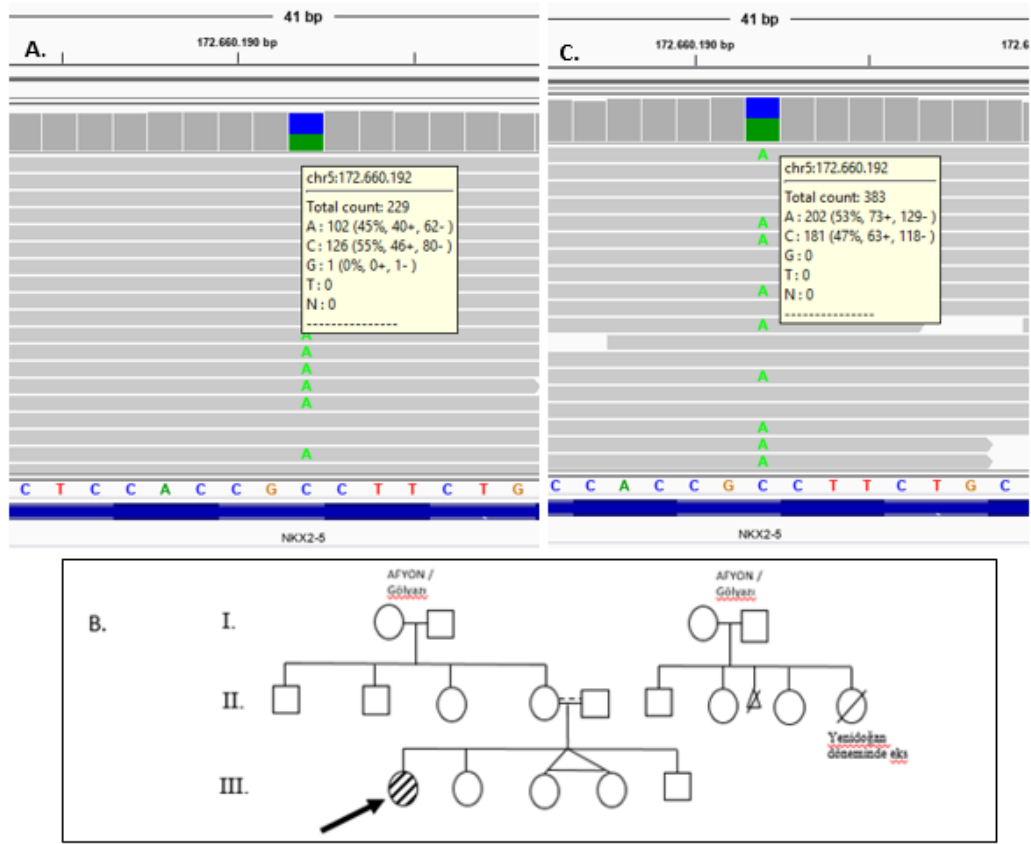
enfeksiyon geçirme, X-ray maruziyeti öyküsü bulunmamaktadır. Prenatal dönemde herhangi bir özellik saptanmamış olmakla birlikte postnatal dönemde yapılan ekokardiyografisinde saptanan total pulmoner venöz dönüş anomalisi nedeni ile olgu opere olmuştur. Hastaya ait varyantın IGV görüntüsü ve pedigrî analizine Şekil 4.3.'de yer verilmiştir

*NKX2-5* geninde saptanan c.355G>T p.(Ala119Ser) varyantına ait sınıflandırma kriterleri ve segregasyon bilgisine Tablo 4.10.' da yer verilmiştir.

Tablo 4.10. *NKX2-5* geninde saptanan c.355G>T p.(Ala119Ser) varyantının

sınıflandırma kriterleri

Gen adı Transkript	Varyant Protein	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon sınıfı
NKX2-5 (NM_004387.4)	c.355G>T p.Ala119Ser	<p>PS1 (Nükleotit değişikliğine bakılmaksızın aynı aminoasit değişimine neden olan ve patojenik olarak sınıflandırılmış varyantın mevcut olması)</p> <p>PM1 (Genin sık mutasyon izlenen ve benign varyantların bulunmadığı bir bölgede, proteinin fonksiyonel olarak aktif bölgesinde ortaya çıkması)</p> <p>PP2 (Yanlış anlamlı varyantların hastalık mekanizmasında etkili olduğu ve benign yanlış anlamlı varyantların görülme sıklığının az olduğu bilinen bir gende oluşmuş yanlış anlamlı varyant)</p> <p>BS1 (Allel frekansının o hastalık için beklenenden daha yüksek olması)</p> <p>BS2 (Tam penetrans gösteren resesif, dominant veya X'e bağlı kalıtılan bir hastalıkla ilişkili varyantın sağlıklı bir erişkin bir bireyde saptanmış olması)</p> <p>BP4 (Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmesi (SIFT:1, PolyPhen-2: 0, DANN: 0.9414, GERP: 0.66))</p>	VUS	Maternal



Şekil 4.3. : A. Olgu 12’de NKX2-5 geninde (NM\_004387.4) saptanan c.355G>T (rs137852684) varyantının IGV görüntüsü B. Olgu 12’ye ait pedigrî analizi C. Olgunun annesinde saptanan varyantın IGV görüntüsü

*NOTCH1* (NM\_017617.5) geninin 4. ekzonunda c.700C>T p.(Arg234Cys) varyantı saptanan olgu 34, aralarında akrabalık bulunmayan çiftin ilk gebeliğinden 38. haftalıkken normal spontan vajinal yolla doğmuştur. Annenin gebeliği süresince herhangi bir ilaç, sigara/alkol kullanımı, enfeksiyon geçirme, X-ray maruziyeti öyküsü bulunmamaktadır. Prenatal dönemde herhangi bir özellik tespit edilmemiş, postnatal dönemde altıncı ayda yapılan ekokardiyografisinde sekundum ASD ve pulmoner stenoz saptanmıştır. Hastaya ait varyantın IGV görüntüsü ve pedigrî analizine Şekil 4.3.’de yer verilmiştir. Saptanan varyantın sınıflandırma kriterleri ve segregasyon bilgisine Tablo 4.11.’de yer verilmiştir.



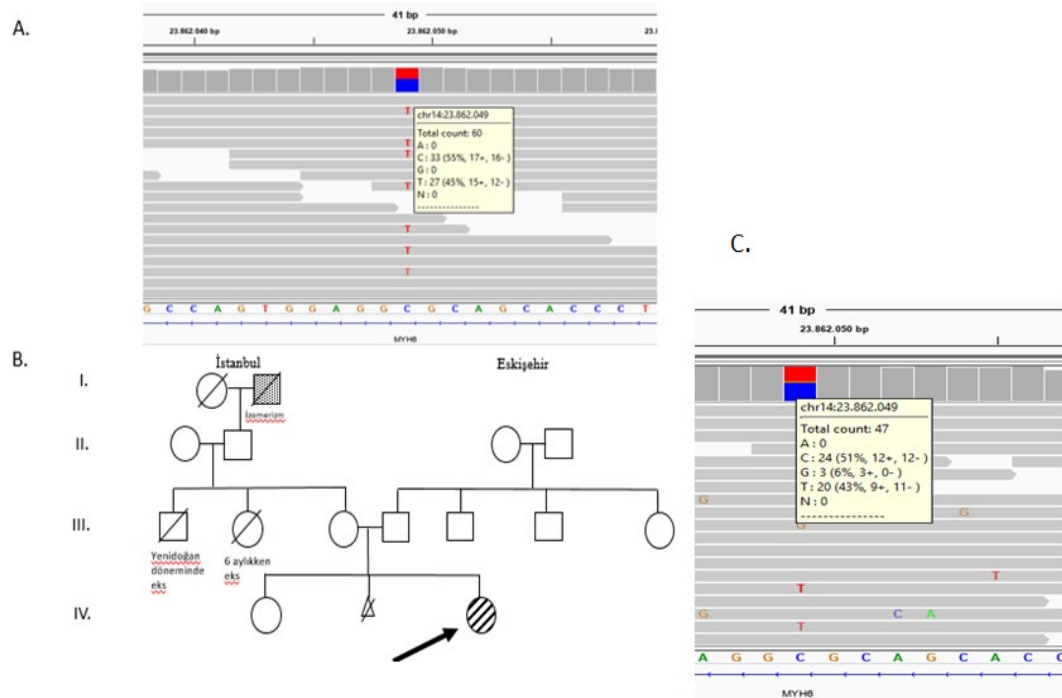
Tablo 4.11. *NOTCH1* geninde saptanan c.700C>T p.(Arg234Cys) varyantının sınıflandırma kriterleri

Gen adı Transkript	Varyant Protein	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon
NOTCH1 (NM_017617.5)	c.700C>T p.Arg234Cys	<p>PM2 Kontrollerde izlenmemiş veya çok düşük bir frekansta izlenmiş olması (Ekzom sekanslama projesi, 1000 genom projesi vb.)</p> <p>PP3 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün zararlı etkisi olduğunun gösterilmesi (PolyPhen-2: 0.953, Mutation taster: Disease causing, DANN: 0.9993, GERP Skoru: 2.17)</p> <p>BP1 Esas olarak hastalığın ortaya çıkmasında güdük protein oluşumuna neden olan varyantların olduğu bilinen bir gende yanlış anlamlı bir varyantın olması</p>	VUS	Yapılamadı  (Anne-baba kan örneğine ulaşamadı)



Tablo 4.12. *MYH6* (NM\_002471.3) geninde saptanan intronik c.3251+72G>A varyantının sınıflandırma kriterleri

Gen adı Transkript	Varyant Protein	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon
MYH6 (NM_002471.3)	c.3251+72G>A -	PM2 Kontrollerde izlenmemiş veya çok düşük bir frekansta izlenmiş olması (Ekzom sekanslama projesi, 1000 genom projesi vb.)  BP7 Kırılma tahmini algoritmalarında herhangi bir etkisi olmadığı gösterilen, yeni bir kırılma bölgesi yaratmayan veya korunmuş bir bölgede yer almayan bir nükleotitte meydana gelen eşanlımlı varyant (HSF: Kırılma üzerine herhangi bir etkisi yok, DANN: 0.5787)	VUS	Paternal



Şekil 4.5. A. Olgu 22’de *MYH6* geninde (NM\_002471.3) saptanan intronik c.3251+72G>A (rs372656808) varyantı IGV görüntüsü B.Olguya Ait Pedigri Analizi C. Olgunun annesinde saptanan varyantın IGV görüntüsü

#### 4.4.2. Saptanan Nadir Benign Varyantlar

*NOTCH1* geninde saptanan c.3836G>A p.(Arg1279His) varyantı, sekundum ASD tanısı olan olgu 5’de saptanmış olup, çalışmamıza dahil edilen herhangi bir kontrol bireyde saptanmamıştır. Saptanan varyantın sınıflandırma kriterleri ve segregasyon bilgisine Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.13. *NOTCH1* (NM\_017617.5) geninde saptanan c.3836G>A p.(Arg1279His) varyantının sınıflandırma kriterleri

Gen adı	Varyant	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon
Transkript	Protein			
NOTCH1 (NM_017617.5)	c.3836G>A p.(Arg1279His)	<p>BS1 Allel frekansının o hastalık için beklenen frekansdan daha yüksek olması</p> <p>BS2 Tam penetrans gösteren resesif, dominant veya X’e bağlı kalıtılan bir hastalıkla ilişkili varyantın sağlıklı bir erişkin bir bireyde saptanmış olması</p> <p>BS3 İn vivo/in vitro fonksiyonel çalışmalarda varyantın protein fonksiyon veya yapısında herhangi bir zararlı etkisinin olmadığını gösterilmesi</p> <p>BP1 Esas olarak hastalığın ortaya çıkmasında güdük protein oluşumuna neden olan varyantların olduğu bilinen bir gende yanlış anlamlı bir varyantın olması</p> <p>BP4 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösterilmesi (SIFT: 0.12, PolyPhen-2: 0.021, CADD: 22, GERP: 4.03)</p>	Benign	Yapılamadı  (Anne-babakan örneklerine ulaşılamadı)

*NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde saptanan c.63A>G (p.Glu21=) varyantı çalışmamızda 11 olguda (%27.5) ve 14 kontrol (%35) bireyde saptanan eş anlamlı bir varyanttır. Saptanan varyantın sınıflandırma kriterleri ve segregasyon bilgilerine Tablo 4.14’de, varyantın saptandığı olgulara ait klinik özelliklere Tablo 4.15.’de yer verilmiştir.

Tablo 4.14. *NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde saptanan c.63A>G (p.Glu21=)

varyantının sınıflandırma kriterleri

Gen adı Transkript	Varyant Protein	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon
<i>NKX2-5</i> (NM_004387.4)	c.63A>G (p.Glu21=)	BA1 EXAC, 1000 genom projesi vb. platformlarda allel frekansının %5’in üzerinde olarak tanımlanması  BP4 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmesi (DANN: 0.8491)  BP7 Kırılma tahmini algoritmalarında herhangi bir etkisi olmadığı gösterilen, yeni bir kırılma bölgesi yaratmayan veya korunmuş bir bölgede yer almayan bir nükleotide meydana gelen eş anlamlı varyant (HSF: Kırılma üzerine herhangi bir etkisi yok)	Benign	Yapılamadı  (Anne-babakan örneklerine ulaşılamadı)

Tablo 4.15. *NKX2-5* (NM\_004387.4) Geninde c.63A>G (p.Glu21=) Varyantı Saptanan

## Olgular ve Bu Olgularda Saptanan Konjenital Kalp Hastalıkları

Olgu No	Konjenital kalp hastalığı
2	VSD+Sekundum ASD
3	Dev ASD
4	Sekundum ASD+Atriyal septal anevrizma
5	ASD
13	Perimembranöz VSD
16	Fallot pentalojisi
17	c-TGA+VSD+Pulmoner arter hipoplazisi+Pulmoner stenoz
22	c-TGA+VSD+Pulmoner arter hipoplazisi
24	Aort koarktasyonu + PDA + Biküspid aorta + Persistan sol SCV
32	Komplet AVKD+ TGA+Sağ - sol AV yetersizlik+ PDA+Sağ arkus aorta+ sol atriyal izomerizm
40	Biküspid aorta

*NKX2-5* geninde (NM\_004387.4) saptanan c.809G>A (p.Cys270Tyr) varyantı çalışmamızda c-TGA+ VSD + Pulmoner arter hipoplazisi mevcut olan bir olgu ve bir kontrol bireyde saptanmıştır. Saptanan varyantın sınıflandırma kriterleri ve segregasyon bilgisine Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16. *NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde saptanan c.809G>A (p.Cys270Tyr)

varyantının sınıflandırma kriterleri

Gen adı Transkript	Varyant Protein	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon
NKX2-5 (NM_004387.4)	c.809G>A p.Cys270Tyr	<p>BS1 Allel frekansının o hastalık için beklenenden daha yüksek olması</p> <p>BS2 Tam penetrans gösteren resesif, dominant veya X'e bağlı kalıtılan bir hastalıkla ilişkili varyantın sağlıklı bir erişkin bir bireyde saptanmış olması</p> <p>PP2 Yanlış anlamlı varyantların hastalık mekanizmasında etkili olduğu ve benign yanlış anlamlı varyantların görülme sıklığının az olduğu bilinen bir gende oluşmuş yanlış anlamlı varyant</p> <p>PP3 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün zararlı etkisi olduğununun gösterilmesi (DANN: 0.99, SIFT: 000.1 Mutation Taster: Disease causing, GERP: 4.15 )</p>	Benign	Yapılamadı  (Anne-baba kan örneklerine ulaşılamadı)

*NOTCH1* geninde (NM\_017617.5) saptanan c.5949C>G p.(Asn1983Lys) varyantı ilk defa çalışmamızda 1 olguda tanımlanmış ve herhangi bir kontrolde saptanmamış olan novel bir varyanttır. Olgu 40, aralarında akrabalık olmayan çiftin ilk gebeliğinden normal spontan vajinal yolla doğmuş olup postnatal 6. ayda rutin pediyatrik muayenesi sırasında üfürüm saptanmış olması nedeni ile yapılan ekokardiyografisinde Biküspid aorta + Aort darlığı + Aort yetmezliği tanısı almıştır. Olguda saptanan varyantın sınıflandırma kriterlerine ve segregasyon bilgisine tablo 4.17'de yer verilmiştir.

Tablo 4.17.: *NOTCH1* geninde (NM\_017617.5) saptanan c.5949C>G p.(Asn1983Lys) varyantının sınıflandırma kriterleri

Gen adı Transkript	Varyant Protein	Sınıflandırma kriterleri	ACMG sınıfı	Segregasyon
NOTCH1 (NM_017617.5)	c.5949C>G p.(Asn1983Lys)	<p>BP1 Esas olarak hastalığın ortaya çıkmasında güdük protein oluşumuna neden olan varyantların olduğu bilinen bir gende yanlış anlamlı bir varyantın olması</p> <p>BP4 Çok sayıda bilgisayar programında gen veya gen ürününün üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösterilmesi (FATHMM: Tolere edilir, Mutation Assesor: 0.77/Nötral, DEOGEN2: Tolere edilir)</p> <p>PM2 Kontrollerde izlenmemiş veya çok düşük bir frekansta izlenmiş olması (Ekzom sekanslama projesi, 1000 genom projesi vb.)</p>	Olası Benign	Yapılamadı (Anne-baba kan örneklerine ulaşılamadı)



## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Çalışmamıza Ait Demografik ve Klinik Verilerinin Literatürle Karşılaştırılması

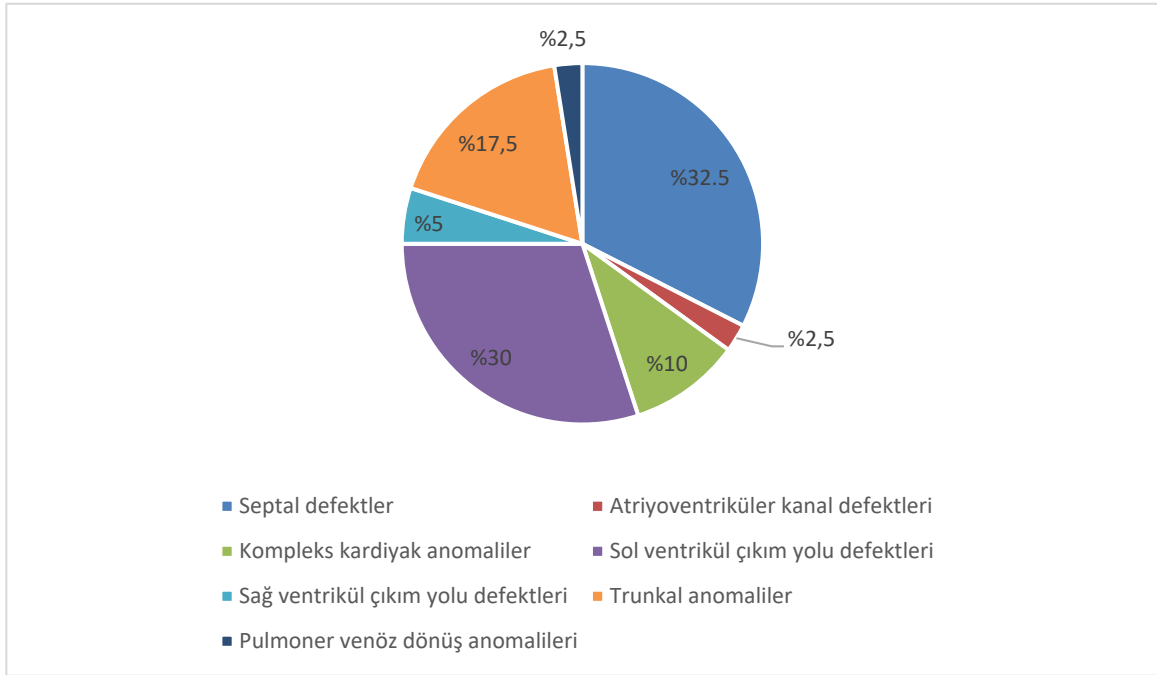
Konjenital kalp hastalıkları toplumdaki prevalansı %1-2 olan ve canlı yenidoğanlarda en sık izlenen doğumsal anomalilerdir. Her yıl yaklaşık 1.35 milyon hastanın hayata gelmesi, hem bireyler üzerinde gerektirdiği operasyon ihtiyacı ve tedavi süreci açısından hem de sağlık sistemleri üzerindeki maliyeti ile hatırı sayılır bir önem teşkil etmektedir (8). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl KKH'lı 35.000 yenidoğanın hayata geldiği ve bunların %25'nin invazif düzeltme cerrahisi ihtiyacı olduğu ve doğumsal anomaliler nedeni ile ölen süt çocuklarının %24'nün KKH'lar nedeni ile kaybedildiği bilinmektedir (36). Gelişen yeni nesil tedavi yöntemleri aracılığı ile hayatta kalan kompleks KKH'lı bireylerin üreme çağına gelmesi ile de bu hastalık grubunun genetik nedenlerinin aydınlatılması ve uygun genetik danışmanlık verilmesini önemli kılmaktadır (62).

Konjenital kalp hastalıkları tanısı alan olguların yaklaşık %80'nine ilave herhangi bir konjenital malformasyon veya nörogelişimsel gerilik eşlik etmemekte ve bu grup non-sendromik konjenital kalp hastalıkları olarak sınıflandırılmaktadır (7).

Multifaktöriyel kalıtım gösteren hastalığın etiyopatogenezinde genetik nedenler ve çevresel etmenlerin rol oynadığı bilinmektedir. Genetik nedenler arasında sırasıyla; kromozomal anöploidiler, patojenik kopya numarası değişiklikleri ilişkili mikrolelesyon sendromları, tek gen ilişkili sendromlar, aday genlerin dahil olduğu kopya numarası değişiklikleri, bu genlerde saptanan mutasyonlar ve epigenetik nedenler yer almaktadır (109). Konjenital kalp hastalıklarının genetik nedenlerinin aydınlatılması, hastalık grubunun oligo/poligenik kalıtım göstermesi, penetrans azlığı, ekspresivite değişkenliği gibi mendeliyen kalıtım kalıbının istisnalarının sık izlenmesi ve nadir epigenetik mekanizmalar nedeni ile hala günümüzde sıklıkla üzerinde çalışmalar yapılan bir konu olarak popülerliğini korumaktadır(73).

Çalışmamızda, non-sendromik KKH tanısı alan 40 olguda mevcut olan kardiyak anomaliler sırasıyla septal defektler (%32.5), sol kalp çıkım yolu defektleri

(%30), trunkal anomaliler (%17.5), kompleks kardiyak anomaliler (%10), sağ ventrikül çıkım yolu defektleri (%5), pulmoner venöz dönüş anomalileri (%2.5) ve atriyoventriküler kanal defektlerinden (%2.5) oluşmaktadır. Çalışmamızda saptanan kardiyak anomalilerin oranlarına Şekil 5.1.'de yer verilmiştir.



Şekil 5.1.: Hastalarda Saptanan Kardiyak Anomali Çeşitleri ve Oranları

Pediyatrik kardiyoloji polikliniğine başvuru yoğunluğuna göre çalışmaya dahil edilen hastalarda saptanan kardiyak anomali oranları, literatürle uyumlu olacak şekilde en sık septal defektler onu takip eden sol kalp çıkım yolu defektleri ve trunkal anomaliler olarak sıralanmaktadır (20, 36, 100).

## 5.2. Çalışmamızda Saptanan Varyant Verilerinin Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

Çalışmamızda saptadığımız toplam varyant sayısı 103'dür. *NKX2-5* geninde 3 adet (%2.9), *TBX1* geninde 9 adet (%8.7), *NOTCH1* geninde 45 adet (%43.6), *GATA4*

geninde 10 adet (%9.7) ve *MYH6* geninde 36 adet (%34.9) varyant saptanmıştır. Bu varyantların 101 tanesi tek nükleotid değişimi, iki tanesi ise ins/del tipte varyantlardır. Bunlar arasından 35 varyant ekzonik, 67 varyant intronik ve bir varyantta 5'UTR bölgesinde yer almaktadır. Tek nükleotid değişimlerinin 24'ü eş anlamlı değişim, 11'i ise eş anlamlı olmayan değişimdir. Tüm varyantlar arasında GnomAD veritabanlarında allel frekansı nadir olan (<0.01) varyant sayısı 16 adet olarak belirlenmiştir. Bunlar arasından ise eş anlamlı olmayan varyantlar *NKX2-5* geninde yer alan c.355G>T (rs137852684) ve c.809G>A (rs587782931) varyantı, *NOTCH1* geninde yer alan c.700C>T (rs567890045) varyantlarıdır. *NOTCH1* geninde yer alan c.5949C>G p.(Gly56Arg) varyantı ise ilk kez çalışmamızda saptanmıştır.

Değerlendirilen genlerde patojenik veya olası patojenik herhangi bir varyant saptanmamış olup klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak sınıflandırılan varyantların bireylerdeki oranı 3/40 (%7.5)'dir.

Literatürde, çalışmamıza benzer olarak non-sendromik konjenital kalp hastalıklarında hedefe yönelik yeni nesil dizi analizleri ile aday genler çalışılmış olup bunlardan ilki Blue ve ark. tarafından 2014 yılında, 16 konjenital kalp hastalığı tanı proband ve aile bireylerinin dahil edildiği, 57 adet KKH ilişkili aday genin bulunduğu panelin yeni nesil dizi analizi ile değerlendirilmesidir. Bu çalışma sonunda beş ailede (%31) daha önce literatürde tanımlanmış hastalık ile ilişkilendirilmiş patojenik varyant, dört ailede (%25) klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak yorumlanan varyant saptamışlardır. Bu çalışmada saptanan varyantların çalışmamıza kıyasla daha yüksek olması gen sayısının fazla olması ve aile öyküsünde KKH saptanan birey oranlarının yüksek olması ile açıklanabilmektedir (7).

Jia ve ark. 2015 yılında non-sendromik konjenital kalp hastalığı tanısı ile takip edilen 13 aileden 36 hasta bireyi, 57 KKH ilişkili genin dahil olduğu paneli yeni nesil dizi analizi ile değerlendirmişler ve 13 ailenin 6'sında (%46) ilişkili genetik nedeni aydınlattıklarını ileri sürmüşlerdir (110). Bu iki çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak patojenik varyant saptama oranlarının yüksek olmasının ailesel geçiş gösteren olguların dahil edilmesi ve panel içerisine dahil edilen gen sayısının fazla olması ile

açıklanabilir. İlave olarak saptanan varyantların ACMG kriterlerine göre reklasifikasyonu ile patojenite skorlarının değişiklik göstereceği düşünülmektedir.

2018 yılında Pulignani ve ark. , non-sendromik konjenital kalp hastalığı tanısı alan 68 hastada, 16 adet aday genin dahil edildiği paneli yeni nesil dizi analizi ile değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada sadece ailesel olgular değil bizim çalışmamızla benzer şekilde sporadik olgulara da yer verilmiştir ve olgularda patojenik varyant saptanma oranı %29 olarak ifade edilmiştir (52). Bu bizim çalışmamızdaki orandan yüksek olmakla birlikte çalışmada saptanan varyantların önceki çalışmalara benzer şekilde ACMG patojenite kriterlerine göre sınıflandırılmamış olduğu, çalışmaya dahil edilen 200 kontrol bireyde saptanmamış olan ve *in silico* analizlerde hastalık ilişkili olarak tanımlanan varyantların olası patojenik/patojenik olarak gruplandırılmış olduğu görülmüştür.

### **5.2.1. Çalışmamızda *MYH6* Geninde Saptanan Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması**

*MYH6* proteini, özellikle insan embryosunda baskın olarak bulunan kardiyak yapısal proteinlerden biri olarak aktin-miyozin kompleksinin yapısında yer almaktadır. *MYH6* geninde yer alan patojenik varyantlar bugüne kadar sekundum ASD ve hipertrofik kardiyomyopati başta olmak üzere kardiyak anomalilerle ilişkilendirilmiştir (80).

ACMG kriterlerine göre “Klinik Önemi Bilinmeyen Değişiklik” olarak sınıflandırılan *MYH6* geninde (NM\_002471.3) yer alan intronik c.3251+72G>A (rs372656808) varyantı literatürde daha önce bildirilmemiş olan, popülasyon frekans veritabanlarında sıklığı bildirilmemiş nadir intronik bir varyanttır. Bu varyantın alternatif kırılma üzerinde herhangi bir etkisi veya yeni bir kriptik kırılma alanı yaratmadığı *in silico* analizlerde (*Human Splicing Factor-HSF*) gösterilmiştir. Yapılan segregasyon analizinde mevcut varyant, olgunun bilinen herhangi bir kardiyak anomali öyküsü olmayan babasında da saptanmıştır; ancak olgunun annesinin babasının babasında total izomerizm izlenmiş olması, annesinin bir erkek, bir kız kardeşinin yenidoğan döneminde şüpheli kaybı nedeni ile paternal kalıtım gösteren bu varyantın

hastalıkla ilişkisinin olmadığı yönünde kanıt olarak gösterilebilmektedir. Tek başına hastalık ortaya çıkmasında yeterli olmayacak bu varyantın kırılma üzerinde herhangi bir etki yaratması dışında transkripsiyon sürecinde de herhangi bir regülatuar elemanın hedefinde yer alıp almadığının saptanmasının gerekliliği dikkat çekmektedir. Olgumuzda bu varyanta ilave olarak nadir benign varyantlardan *NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde yer alan c.809G>A (p.Cys270Tyr) varyantının da saptanmış olması bu iki varyantın sinerjik bir etki yaratıp yaratmadığının aydınlatılmasının önemli olduğunu düşündürmektedir.

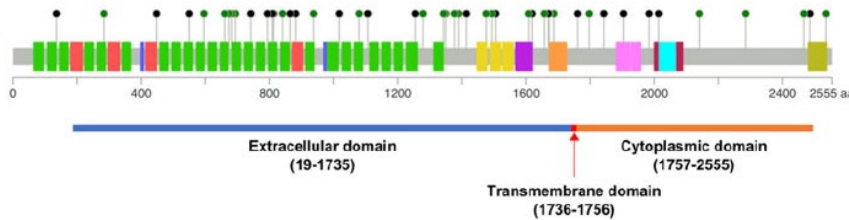
### 5.2.2. Çalışmamızda *NOTCH1* Geninde Saptanan Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

*NOTCH1* geni tarafından kodlanan NOTCH1 proteininin ekstrasellüler, transmembranik ve intrasellüler kısımları mevcut olup N-terminusunda yer alan 36 adet EGF benzeri kısımlarının primer olarak ligand bağlanmasında görev aldığı bilinmektedir. *NOTCH1* geninde bugüne kadar çok sayıda hastalık ilişkili yanlış anlamlı ve anlamsız varyant tanımlanmıştır. (Şekil 5.2.) *NOTCH1* geni sıklıkla sol kardiyak çıkım yolu defekleri ile ilişkilendirilmiş olsa da nadir olarak trunkal anomaliler, septal defektleri mevcut olan hastalarda da bu genin patojenik varyantları bildirilmiştir (93, 96). *NOTCH1* (NM\_017617.5) geninin 4. ekzonunda saptanan c.700C>T (p.Arg234Cys) varyantı proteinin EGF-like 6 domaininde yer almakta olup daha önce bu varyantın literatürde hastalık ile ilişkisi bildirilmemiştir. Reseptörün EGF-benzeri 6 domaininin postranslasyonel olarak O-fukoz rezidülerinin modifikasyonları açısından bir hedef bölge olduğu, bu bölgenin saçak (*Fringe*) protein olarak adlandırılan  $\beta$ 3-N-asetilglukozaminiltransferazlar aracılığı ile glikolizasyonu sonucunda JAG1 aracılığı reseptör aktivasyonunun inhibe edildiği bilinmektedir (111). Hastada saptanan c.700C>T varyantı ile aynı kodonda değişime neden olan c.701G>A varyantı 234. pozisyonadaki arjinin aminoasidinin histidine dönüşümüne neden olmuş ve bu varyant ACMG kriterlerine göre allel frekansının hastalık için belirlenen frekansın eşik değerinden yüksek olması nedeni ile benign olarak sınıflandırılmıştır; ancak ClinVar veritabanında Adams-Oliver sendromu ile ilişkilendirilmiş ve çelişkili

patojenik verilerin mevcut olduğu belirtilmiş olmasına rağmen ilgili literatür verilerine ulaşamamıştır.

NOTCH1 proteininin EGF benzeri kısımlarını kodlayan tekrar bölgelerinde tanımlanan yanlış anlamlı varyantların genellikle NOTCH sinyal yolağında, embriyonik dönemde epitel – mezenkim transizyonunda bir azalmaya neden olduğu ancak bu yolağı tamamen kesintiye uğratmadığı, embriyonik dönemde diğer çeşitli çevresel faktörlere maruziyet veya diğer modifiye edici genetik varyantların varlığında tam penetrans gösteren hastalık bulgularını ortaya çıkardığı düşünülmektedir (112). EGF-like 6 bölgesinde yer alan c.700C>T varyantının posttranslasyonel o-glikolizasyonu için hedef noktası olarak bilinen 232. Pozisyonun proksimalinde ( $\pm 2$ ) yer alarak proteinin hücre içi fonksiyonel etkileşiminde bir değişikliğe yol açabileceği ihtimalini öne çıkarmaktadır (27).

Pulmoner stenoz ve sekundum ASD tanısı ile izlenen olgumuzda, sıklıkla sol ventrikül çıkım yolu defektleri ile ilişkilendirilmiş olan *NOTCH1* geninde bu varyantın saptanması hastalığın kliniğini açıklamak için yeterli olmamaktadır; ancak segregasyon analizinin tamamlanması ile daha aydınlatıcı bir sonuca ulaşılabileceği düşünülmektedir.

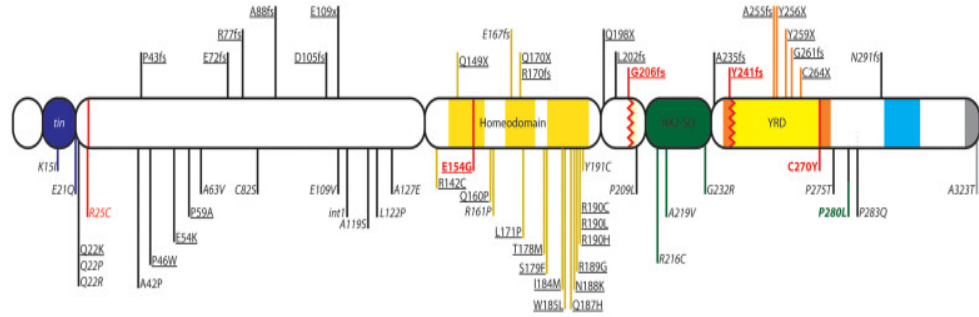


Şekil 5.2. *NOTCH1* Geninde Yer Alan Yanlış anlamlı ve Fonksiyon Kaybına Neden Olan Varyantlar - Helle ve ark. (95)'dan uyarlanmıştır.

### 5.2.3. Çalışmamızda *NKX2-5* Geninde Saptanan Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

*NKX2-5* geni KKH'larla ilişkilendirilmiş ilk genlerden biridir ve ilişkili varyantlar bu genin sıklıkla DNA bağlanması ve affinitesinden sorumlu olan

homeodomain bölgesinde izlenmektedir (76). *NKX2-5* geninin homozigot olarak susturulduğu hayvan modellerinde ağır kardiyak anomaliler nedeni ile bu embriyoların yaşama bağdaşmadığı gösterilmiştir (10). *NKX2-5* geninde bildirilen varyantların arasında en sık yanlış anlamlı varyantlar, daha nadir olarak anlamsız ve çerçeve kaymasına neden olan varyantlar izlenmektedir. Bu gene ait varyantlar literatürde sıklıkla atriyal septal defektler ve iletim defektleri ile ilişkilendirilmiştir; ancak çalışmamızda yer alan diğer genlerle karşılaştırıldığında kardiyak fenotip açısından *NKX2-5* geninin klinik heterojenitesi oldukça yüksektir (113) (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3. *NKX2-5* Geninde saptanan varyantların lokalizasyonu – Abou Hassan ve ark. (114)'larından uyarlanmıştır.

Hastamızda, *NKX2-5* (NM\_004387.4) geninin birinci ekzonunda saptanan c.355G>T p.(Ala119Ser) varyantı daha önce literatürde tiroid disgenezisi, hipoplastik sol kalp, aort koarktasyonuna eşlik eden biküspid aorta ve septal defektler saptanmış olan çok sayıda olguda izlenmiştir (115-117).

Dentice ve ark. 2006 yılında, ektopik tiroid dokusu ve ağır hipotiroidisi mevcut olan; ancak KKH saptanmayan bir hastada tespit ettikleri p.(Ala119Ser) dönüşümünün fonksiyonel etkisini aydınlatabilmek için yaptıkları çalışmada bu dönüşümün *NKX2-5* geninin promotor aktivasyonundan sorumlu olduğu *DIO2* ve *Tg* genlerinin ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dimer halinde transkripsiyonu aktifleştirdiği bilinen *NKX2-5* proteinindeki bu varyantın dominant-negatif etkiye neden olarak DNA bağlanma kapasitesinde azalma ortaya çıktığını ileri sürmüşlerdir (115, 117). Bizim olgumuzda tiroid fonksiyon testleri normal sınırlar

içerisinde saptanmış olup (TSH: 1.74 (ND: 0.7-5.97), sT4: 1.53 (ND: 0.96-1.77)) tiroid disgenezisini düşündürecek herhangi bir bulguya rastlanılmamış olması nedeni ile tiroid ultrasonografisi ile değerlendirilmemiştir.

Engelen ve ark. 2012 yılında, p.(Ala119Ser) dönüşümünü biküspid aorta ve aort koarktasyonu olan bir olgu ile primum ASD ve mitral kapakta yarık olan iki farklı olguda saptamışlardır. Tiroid ultrasonografileri ve tiroid fonksiyon testleri normal olan olgulardaki varyantın klinik üzerine etkisini aydınlatılabilmek için elektroforetik mobilite çalışması, lusiferaz enzim çalışması yapmışlar ve proteinin nükleer lokalizasyonu western blot ile değerlendirmişlerdir. Bu varyantın *wild* tip allel ile fonksiyonel anlamda herhangi bir farkı olmadığını öne sürmüşlerdir. Engelen ve ark. bu çalışmalara dayanarak *NKX2-5* geninde yer alan ve nadir bir varyant olan 119. pozisyondaki arjinin serin dönüşümünün KKH ve tiroid disgenezisi gelişiminde herhangi bir etkisi olmadığı yönünde yorumlamışlardır (117).

Reamon-Buettner ve ark. opere olan KKH tanılı hastaların kardiyak dokularından elde edilen biyopsi materyalinden *NKX2-5* geninin de dahil olduğu KKH'larla ilişkili genlerin sekanslanması sonucunda hipoplastik sol kalp hastalığı nedeni ile eks olan bir hastanın doku ve periferik kan örneğinde p.(Ala119Ser) dönüşümünü saptamışlardır. Saptanan varyantın klinik üzerindeki öneminin aydınlatılabilmesi için *Saccharomyces cerevisiae* kültüründe yapılan lusiferaz enzim aktivasyonu çalışması ve western blot analizlerinde bu varyantın sekans-spesifik transaktivasyon üzerinde negative etkisi olduğu sonucuna ulaşılmış ve bu varyantı patojenik olarak yorumlamışlardır (116).

Costa ve ark. 2013 yılında familial dilate kardiyomyopati olgularında yaptıkları *NKX2-5* geni dizi analizinde ve olgulardan birinde p.(Ala119Ser) dönüşümünü saptamışlar ve bu dönüşümü hastalık ilişkili polimorfizm olarak yorumlamışlardır (78).

*NKX2-5* geninde saptanan varyantlar sıklıkla genin evrimsel süreçte korunmuş bölgelerinde bulunmaktadırlar. Olgumuzda saptanan varyantın bilinen herhangi bir kardiyak anomali olmayan annesinde de saptanmış olması bu varyantın patojenite lehine kanıtını düzeyini düşürmektedir; ancak *NKX2-5* geninde allelik heterojenitenin



ve eksik penetransın sık izlenmesi, bu genin kardiyogenez için oldukça önemli olduğunu; ancak hastalığın ortaya çıkmasında diğer genlerle yüksek etkileşim içinde olduğunu düşündürmektedir (62). Literatürde bildirilen çelişkili sınıflandırmalar ise fonksiyonel çalışmaların eksik ve yetersiz olmasından kaynaklı olarak yorumlanmıştır (76).

#### **5.2.4. Çalışmamızda *NOTCH1* Geninde Saptanan Nadir Benign Varyantın Literatür Verileri ile Karşılaştırılması**

*NOTCH1* geninde (NM\_017617.5) saptanan p.(Arg1279His) varyantı pozisyon olarak *NOTCH1* geninin 23. Ekzonu tarafından kodlanan EGF-like 33 domaininde, evrimsel olarak oldukça korunmuş bir bölgesinde yer almaktadır.

McBride ve ark. 2008 yılında, aort koarktasyonu, hipoplastik sol kalp sendromu, konjenital aort kapak stenozu gibi sol ventrikül çıkım yolu defektleri olan 91 hasta ve 207 kontrol bireyde *NOTCH1* genini dizilemişler ve aort stenozu olan üç olguda ve dört kontrolde p.(Arg1279His) varyantını saptamışlardır. Fare fibroblast dokusunda yaptıkları vektör aracılı lusiferaz enzim çalışmasında ve protein ekspresyon çalışmasında p.(Arg1279His) varyantının ligand aracılı indüksiyonunda bir azalma saptamışlar ancak patojenik varyantlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmaması nedeni ile bu varyantı polimorfizm olarak yorumlamışlardır (118).

Iascone ve ark. 2012 yılında, izole hipoplastik sol kalp hastalarının yer aldığı 53 kişilik hasta grubunda 3 olguda ve 10 kontrol bireyde p.(Arg1279His) varyantını saptamışlardır. Kontrol ve hasta bireylerde benzer sıklıkta izlenmiş olması ve sağlıklı ebeveynlerde de bu varyantın saptanmış olması nedeni ile bu varyant hastalık ilişkili olarak yorumlanmamıştır (119).

Freylikhman ve ark. 2014 yılında, aort koarktasyonu ve biküspid aorta saptanan 51 bireyde ve 200 kontrol bireyde *NOTCH1* genini dizilemişler ve hasta bireylerde p.(Arg1279His) varyantı saptanma oranını (7/51), kontrol bireylerde bu varyantın saptanma oranından (4/200) istatistiksel olarak anlamlı olarak daha sık bulmuşlardır ( $p<0,05$ ). Klinik ve ekokardiyografik değerlendirme sonucunda bu varyantın saptandığı bireylerde varyantın olmadığı bireylere göre arkus aorta ve desendan

aortanın daha hipoplazik olduğunu ifade etmişler ve bu varyantın hastalık ilişkili olabileceğini, daha geniş araştırma grubunda kapsamlı fonksiyonel çalışmaların yapılması gerektiğini öne sürmüşlerdir(120).

Helle ve ark. 2018 yılında 49 hipoplastik sol kalp hastası bireyde *NOTCH1* genini dizilemişler, 5 olguda ve 1 etkilenmiş aile bireyinde p.(Arg1279His) varyantını saptamışlardır. Kendi çalışmalarını da dahil ettikleri geniş ölçekli bir genom çapında ilişkilendirme çalışmasında, p.(Arg1279His) varyantının geniş kontrol grubunda (Finlandiya SISU popülasyonunda) saptanma oranına göre KKH tanılı grupta istatistiksel olarak anlamlı (p=0.0073) düzeyde daha sık bulunduğunu bildirmişlerdir.

Literatürde farklı örneklem gruplarında saptanan p.(Arg1279His) varyantının KKH ile ilişkisine yönelik sonuçların değişkenlik göstermesi nedeniyle mevcut klasifikasyon algoritmalarına göre benign olarak raporlanmaktadır. Sol kardiyak çıkım yolu defektleri arasında en sık izlenen biküspid aortanın herhangi bir fonksiyonel sonuca yol açmaması ve bireylerin tanı almadan hayatlarına devam etmesi nedeniyle KKH olguları arasındaki varyant sıklığı kesin olarak bilinmemektedir.

*NOTCH1* geninde (NM\_017617.5) saptanan c.5949C>G p.(Asn1983Lys) varyantı ilk kez çalışmamızda saptanmış olan novel bir varyanttır. Bu varyant çalışmada herhangi bir kontrol bireyde saptanmamış olup olgunun ebeveynlerinin periferik kan örneğine ulaşılamaması nedeni ile segregasyon analizi yapılamamıştır. Saptanan varyant *NOTCH1* geninin intrasellüler kısmında yer alan ankyrin tekrar dizilerinden ANK-3'ü kodlayan 32. ekzonda yer almaktadır. Ankyrin tekrar dizileri protein-protein etkileşiminden sorumlu olan bağlanma bölgelerine sahip evrimsel süreçte korunmuş tekrar bölgelerdir. Literatürde daha önce ANK-2 bölgesinde yer alan yanlış anlamlı varyantların proteinin bu bölgesinin yanlış katlanmasına neden olarak fonksiyon kaybına neden olduğu bildirilmiştir; ancak çalışmamızda saptanan varyantla benzer olarak ANK-3 bölgesinde yer alan hastalıkla ilişkili yanlış anlamlı varyantlara rastlanmamıştır (121). Olgumuzda saptanan biküspid aortanın anomalisinin, *NOTCH1* geni patojenik varyantlarında sık izlenmesi nedeni ile olgunun sağlıklı anne-babasından çalışılması planlanan segregasyon analizi ve fonksiyonel çalışmaların bu varyantın patojenite üzerine etkisinin aydınlatılmasına neden olacağı düşünülmektedir.

### 5.2.5. Çalışmamızda *NKX2-5* Geninde Saptanan Nadir Benign Varyantların Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

*NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde saptanan c.63A>G (p.Glu21=) varyantı ACMG kriterlerine göre “Benign” varyant olarak sınıflandırılmış olup çalışmamızda 11 hasta birey (%27.5) ve 14 kontrol bireyde (%35) tespit edilmiş ve literatürde bildirilen sıklıklarla benzerlik göstermektedir (122, 123). Kolomenski ve ark. proteinin baskılayıcı aktivitesinden sorumlu olan *Tinman* domaininde lokalize olan p.(Glu21=) varyantının p.(Ala119Glu) ve p.(Glu181=) varyantları ile sinerjik bir etki gösterip *NPPA* geni promoter bölgesinin transaktivasyonu azalttığını öne sürmüşlerdir (76). Bu varyantın tespit edildiği olguların klinik özellikleri daha önce tablo 4.15’de detaylı bir şekilde verilmiş olmakla birlikte mevcut varyantın hücre düzeyindeki etkisi göz önüne alındığında bu varyant hastalık ilişkili yaygın varyant olarak yorumlanabilmektedir.

*NKX2-5* (NM\_004387.4) geninde saptanan bir diğer varyant olan c.809G>A p.(Cys270Tyr) varyantı proteinin tirozinden zengin bölgesinde yer almakta olup literatürde daha önce bildirilmiş ve ACMG kriterlerine göre “Benign” olarak sınıflandırılmış nadir bir varyanttır. Mevcut varyant *MYH6* geninde (NM\_002471.3) intronik “Klinik Önemi Bilinmeyen” değişiklik olarak sınıflandırılmış c.3251+72G>A varyantı saptanan c-TGA+VSD+Pulmoner arter hipoplazisi ile takipli olan olgu 22’de saptanmıştır.

Hassan ve ark., sekundum ASD tanısı olan iki kardeşte bu varyantı saptamışlar ve etkilenmemiş aile bireylerinde de mevcut olduğunu göstererek bu varyantın tek başına hastalık ortaya çıkmasında yeterli olmadığını öne sürmüşlerdir (114).

Rauch ve ark., 230 tane TOF tanılı hastada yaptıkları çalışmada hastalardan birinde *NKX2-5* geninde p.(Cys270Tyr) varyantını saptamışlar ve yaptıkları ileri fonksiyonel çalışmada bu varyantın *wild* tip alleli ile karşılaştırdıklarında transkripsiyon düzeyinde ve gen fonksiyonunda herhangi bir azalmaya neden olmadığını öne sürmüşlerdir (124). Olgumuzda, *MYH6* geninde (NM\_002471.3) yer alan c.3251+72G>A varyantına ilave olarak, *NKX2-5* geninde (NM\_004387.4) “Benign” olarak sınıflandırılmış c.809G>A p.(Cys270Tyr) varyantının da saptanmış olması nedeni ile bu iki varyantın sinerjik etkisinin tam olarak aydınlatılabilmesi için

aile bireylerinde segregasyon analizinin tamamlanmasının ve fonksiyonel çalışmaların gerekliliğinin ön plana çıktığı tüm bu çalışmalar neticesinde, ilk defa çalışmamızda saptanmış bu varyantın patojenite klasifikasyonunun tamamlanacağını düşünmekteyiz.

*NKX2-5* geninde olan benign varyantların tek başına hastalık ortaya çıkarmak için yeterli olmadığı; ancak bu *homeobox* özellikte olan genin kardiyogenez için oldukça önemli olması nedeni ile oligogenik kalıtım temelinde diğer genlerde yer alan varyantlarla birlikte “çoklu vuruş” fenomeni aracılığı ile hastalığın etiopatogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Konjenital kalp hastalıkları toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlardır. Multifaktöriyel kalıtım gösterdiği bilinen bu hastalık grubunun büyük bir kısmı izole olarak izlenmektedir ve çok sık izlenen bu malformasyonların izlem ve tedavi süreçleri gerek hastalar üzerinde, gerekse sağlık sistemleri üzerine büyük bir yük oluşturmaktadır.

*NKX2-5*, *NOTCH1*, *GATA4*, *TBX1*, *MYH6* genleri izole konjenital kalp hastalıkları gelişiminde oynadığı rol iyi bilinen genler olmakla birlikte, bildiğimiz kadarı ile daha önce Türk toplumunda non-sendromik KKH tanısı almış pediatrik popülasyonda yeni nesil dizi analizi ile değerlendirilmemişlerdir. Çalışmamız bu anlamda literatüre özgün bir değer katmakla birlikte, saptadığımız “Klinik Önemi Bilinmeyen” olarak sınıflandırılan 3 varyant ile ilk kez çalışmamızda saptanmış olan “Olası Benign” olarak sınıflandırılan novel varyantın olgularda hastalık gelişiminde rol oynadığını düşünmekteyiz. Bu varyantların düşük penetrans gösteren genlerde saptanmış olmasının çalışmada yer verilmemiş olan diğer aday genlerin de yeni nesil dizileme yöntemleri ile değerlendirilmesinin gerekliliğini öne çıkarmakta, saptadığımız varyantların insan pluripotent kök hücrelerinde yapılacak olan güncel fonksiyonel çalışmalar aracılığı ile hücre düzeyindeki etkilerinin araştırılmasının yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Non-sendromik KKH’ların genetik nedenleri arasında da Mendelian kalıtımın istisnalarının sık izlenmesi hastalığın genetik etiyopatogenezinin aydınlatılmasını güçleştirse de bu alanda çalışmamız benzeri diğer çalışmaların sıklaştırılması ile ailelere uygun genetik danışmanlık verilmesinin sağlanacağı ve bu hastalık grubunun yeni nesil tedavilerin hedefi olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Zaidi S, Brueckner MJCr. Genetics and genomics of congenital heart disease. 2017;120(6):923-40.
2. Fahed AC, Gelb BD, Seidman J, Seidman CEJCr. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. 2013;112(4):707-20.
3. Van Der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJJNRC. The changing epidemiology of congenital heart disease. 2011;8(1):50.
4. Chung WK. Genetic Basis of Congenital Heart Disease. Genomic and Precision Medicine: Elsevier; 2018. p. 221-34.
5. A Richards A, Garg VJCr. Genetics of congenital heart disease. 2010;6(2):91-7.
6. Lalani SR, Belmont JWJEjomg. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. 2014;57(8):402-13.
7. Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Sholler GF, Dunwoodie SL, Harvey RP, et al. Advances in the genetics of congenital heart disease: a clinician's guide. 2017;69(7):859-70.
8. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al. Genetic basis for congenital heart disease: revisited: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2018;138(21):e653-e711.
9. Nees SN, Chung WK, editors. The genetics of isolated congenital heart disease. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics; 2020: Wiley Online Library.
10. Zakariyah AF, Rajgara RF, Horner E, Cattin ME, Blais A, Skerjanc IS, et al. In Vitro Modeling of Congenital Heart Defects Associated with an NKX2-5 Mutation Revealed a Dysregulation in BMP/Notch-Mediated Signaling. Stem Cells. 2018;36(4):514-26.

11. Su W, Zhu P, Wang R, Wu Q, Wang M, Zhang X, et al. Congenital heart diseases and their association with the variant distribution features on susceptibility genes. *Clinical genetics*. 2017;91(3):349-54.
12. Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR, et al. Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nature genetics*. 2017;49(11):1593.
13. Marelli AJ, Ionescu-Ittu R, Mackie AS, Guo L, Dendukuri N, Kaouache M. Lifetime prevalence of congenital heart disease in the general population from 2000 to 2010. *Circulation*. 2014;130(9):749-56.
14. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human-E-Book: Clinically Oriented Embryology*: Elsevier Health Sciences; 2018.
15. Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H. *Etiology and morphogenesis of congenital heart disease: from gene function and cellular interaction to morphology*: Springer Nature; 2016.
16. Chien KR, Domian IJ, Parker KK. *Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine*. *Science*. 2008;322(5907):1494-7.
17. Sadler TW. *Langman's medical embryology*: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia; 2006.
18. Botto LD, Lin AE, Riehle-Colarusso T, Malik S, Correa A. Seeking causes: classifying and evaluating congenital heart defects in etiologic studies. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2007;79(10):714-27.
19. Lopez L, Houyel L, Colan SD, Anderson RH, Béland MJ, Aiello VD, et al. Classification of ventricular septal defects for the eleventh iteration of the International Classification of Diseases—striving for consensus: a report from the International Society for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease. *The Annals of thoracic surgery*. 2018;106(5):1578-89.

20. Rickert-Sperling S, Kelly R, Driscoll DJ. *Congenital Heart Diseases: the broken heart*: Springer; 2015.
21. Hirayama-Yamada K, Kamisago M, Akimoto K, Aotsuka H, Nakamura Y, Tomita H, et al. Phenotypes with GATA4 or NKX2. 5 mutations in familial atrial septal defect. 2005;135(1):47-52.
22. Theodoropoulos KC, Papachristidis A, Masoero G, Papitsas M, Cospite V, Demir FA, et al. Superior sinus venosus atrial septal defect. *Journal of geriatric cardiology: JGC*. 2018;15(10):649.
23. Menillo AM, Lee L, Pearson-Shaver AL. *Atrial Septal Defect (ASD)*. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2019.
24. Ikeda Y, Hiroi Y, Hosoda T, Utsunomiya T, Matsuo S, Ito T, et al. Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2. 5 associated with congenital heart disease. 2002;66(6):561-3.
25. Xiang R, Fan L-L, Huang H, Cao B-B, Li X-P, Peng D-Q, et al. A novel mutation of GATA4 (K319E) is responsible for familial atrial septal defect and pulmonary valve stenosis. 2014;534(2):320-3.
26. Posch MG, Waldmuller S, Müller M, Scheffold T, Fournier D, Andrade-Navarro MA, et al. Cardiac alpha-myosin (MYH6) is the predominant sarcomeric disease gene for familial atrial septal defects. *PloS one*. 2011;6(12):e28872.
27. [Available from:  
[https://www.active-driverdb.org/mutation/show/NM\\_017617/234/H/](https://www.active-driverdb.org/mutation/show/NM_017617/234/H/).
28. Pugnali F, Digilio MC, Putotto C, De Luca E, Marino B, Versacci P. Genetics of atrioventricular canal defects. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020;46:1-13.
29. Chauhan S. Atrioventricular septal defects. *Annals of cardiac anaesthesia*. 2018;21(1):1.



30. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, et al. Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *2003;72(4):1047-52.*
31. Calkoen EE, Hazekamp MG, Blom NA, Elders BB, Gittenberger-de Groot AC, Haak MC, et al. Atrioventricular septal defect: From embryonic development to long-term follow-up. *International journal of cardiology. 2016;202:784-95.*
32. Vaidyanathan B, Kumar S, Sudhakar A, Kumar RK. Conotruncal anomalies in the fetus: referral patterns and pregnancy outcomes in a dedicated fetal cardiology unit in South India. *Annals of pediatric cardiology. 2013;6(1):15.*
33. Rauch A, Devriendt K, Koch A, Rauch R, Gewillig M, Kraus C, et al. Assessment of association between variants and haplotypes of the remaining TBX1 gene and manifestations of congenital heart defects in 22q11. 2 deletion patients. *2004;41(4):e40-e.*
34. Lacour-Gayet F, Bove E, Hraška V, Morell V, Spray TL. *Surgery of Conotruncal Anomalies: Springer; 2016.*
35. Page DJ, Miossec MJ, Williams SG, Monaghan RM, Fotiou E, Cordell HJ, et al. Whole exome sequencing reveals the major genetic contributors to nonsyndromic tetralogy of Fallot. *Circulation research. 2019;124(4):553-63.*
36. Wernovsky G. *Anderson's Pediatric Cardiology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2019.*
37. Lin AE, Krikov S, Riehle-Colarusso T, Frías JL, Belmont J, Anderka M, et al. Laterality defects in the national birth defects prevention study (1998–2007): birth prevalence and descriptive epidemiology. *American journal of medical genetics Part A. 2014;164(10):2581-91.*
38. Prakash SK, Bossé Y, Muehlschlegel JD, Michelena HI, Limongelli G, Della Corte A, et al. A roadmap to investigate the genetic basis of bicuspid aortic valve and its complications: insights from the International BAVCon (Bicuspid Aortic

- Valve Consortium). *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64(8):832-9.
39. Sticchi E, De Cario R, Magi A, Giglio S, Provenzano A, Nistri S, et al. Bicuspid aortic valve: role of multiple gene variants in influencing the clinical phenotype. *BioMed research international*. 2018;2018.
  40. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. 2005;437(7056):270.
  41. Ashraf H, Pradhan L, Chang EI, Terada R, Ryan NJ, Briggs LE, et al. A mouse model of human congenital heart disease: high incidence of diverse cardiac anomalies and ventricular noncompaction produced by heterozygous Nkx2-5 homeodomain missense mutation. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2014;7(4):423-33.
  42. Hirono K, Hata Y, Ibuki K, Yoshimura N. Familial Ebstein's anomaly, left ventricular noncompaction, and ventricular septal defect associated with an MYH7 mutation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2014;148(5):e223.
  43. Downing KF, Riehle-Colarusso T, Gilboa SM, Lin AE, Oster ME, Tinker SC, et al. Potential risk factors for Ebstein anomaly, National Birth Defects Prevention Study, 1997–2011. *Cardiology in the young*. 2019;29(6):819.
  44. Poelmann RE, Jongbloed MR, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC. Human Genetics of Total Anomalous Pulmonary Venous Return. *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart*: Springer; 2016. p. 373-8.
  45. Calcagni G, Unolt M, Digilio MC, Baban A, Versacci P, Tartaglia M, et al. Congenital heart disease and genetic syndromes: new insights into molecular mechanisms. *Expert review of molecular diagnostics*. 2017;17(9):861-70.
  46. Williams K, Carson J, Lo C. Genetics of Congenital Heart Disease. *Biomolecules*. 2019;9(12):879.

47. Al Mamun MA, Hussain M, Hasan MNA, Rima R. Noninherited Risk Factors of Congenital Heart Defects in Offspring: A Revi. *Bangladesh Journal of Child Health*. 2017;41(1):40-52.
48. Mahler GJ, Butcher JT. Cardiac developmental toxicity. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2011;93(4):291-7.
49. Patel SS, Burns TL. Nongenetic risk factors and congenital heart defects. *Pediatric cardiology*. 2013;34(7):1535-55.
50. Lynch TA, Abel DE. Teratogens and congenital heart disease. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*. 2015;31(5):301-5.
51. Feng Y, Yu D, Yang L, Da M, Wang Z, Lin Y, et al. Maternal lifestyle factors in pregnancy and congenital heart defects in offspring: review of the current evidence. *Italian journal of pediatrics*. 2014;40(1):85.
52. Pulignani S, Vecoli C, Borghini A, Foffa I, Ait-Ali L, Andreassi MGJPC. Targeted Next-Generation Sequencing in Patients with Non-syndromic Congenital Heart Disease. 2018;39(4):682-9.
53. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen X-N, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(29):12031-6.
54. Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2012;7(1):81.
55. Polli JB, Groff Dde P, Petry P, Mattos VF, Rosa R, Zen P, et al. Trisomy 13 (Patau syndrome) and congenital heart defects. *Am J Med Genet A*. 2014;164(1):272-5.
56. Bondy CA. Congenital cardiovascular disease in Turner syndrome. *Congenital heart disease*. 2008;3(1):2-15.

57. Lander J, Ware SM. Copy number variation in congenital heart defects. *Current Genetic Medicine Reports*. 2014;2(3):168-78.
58. Collins RT. Cardiovascular disease in Williams syndrome. *Circulation*. 2013;127(21):2125-34.
59. Pober BR, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(5):1606-15.
60. Goldmuntz E, editor 22q11. 2 deletion syndrome and congenital heart disease. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2020: Wiley Online Library.
61. Hopkins MK, Dugoff L, Kuller JA. Congenital Heart Disease: Prenatal Diagnosis and Genetic Associations. *Obstetrical & gynecological survey*. 2019;74(8):497-503.
62. Prendiville T, Jay PY, Pu WT. Insights into the genetic structure of congenital heart disease from human and murine studies on monogenic disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(10):a013946.
63. Tretter JT, McElhinney DB. Cardiac, aortic, and pulmonary vascular involvement in Alagille syndrome. *Alagille Syndrome*: Springer; 2018. p. 77-90.
64. Spiridon MR, Petris AO, Gorduza EV, Petras AS, Popescu R, Caba L. Holt-Oram syndrome with multiple cardiac abnormalities. *Cardiology research*. 2018;9(5):324.
65. Yuan S-M. Congenital heart defects in Kabuki syndrome. *Cardiology Journal*. 2013;20(2):121-4.
66. Digilio MC, Marino B, Giannotti A, Dallapiccola B, Opitz JM. Specific congenital heart defects in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: postulated involvement of the sonic hedgehog pathway in syndromes with postaxial

- polydactyly or heterotaxia. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2003;67(3):149-53.
67. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine*. 2020;22(2):245-57.
68. Hitz M-P, Lemieux-Perreault L-P, Marshall C, Feroz-Zada Y, Davies R, Yang SW, et al. Rare copy number variants contribute to congenital left-sided heart disease. *PLoS Genet*. 2012;8(9):e1002903.
69. Silversides CK, Lionel AC, Costain G, Merico D, Migita O, Liu B, et al. Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS genetics*. 2012;8(8):e1002843.
70. Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Struble CA, Tuffnell ME, Stamm KD, Hidestrand M, et al. Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations. *Physiological genomics*. 2012;44(9):518-41.
71. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tümer Z, Tommerup N, Chen W, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *Journal of medical genetics*. 2008;45(11):704-9.
72. Bachman KK, DeWard SJ, Chrysostomou C, Munoz R, Madan-Khetarpal S. Array CGH as a first-tier test for neonates with congenital heart disease. *Cardiology in the Young*. 2015;25(1):115-22.
73. Shabana N, Shahid SU, Irfan U. Genetic Contribution to Congenital Heart Disease (CHD). *Pediatric Cardiology*. 2019:1-12.
74. Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circulation research*. 2002;90(5):509-19.

75. Kasahara H, Lee B, Schott J-J, Benson DW, Seidman J, Seidman CE, et al. Loss of function and inhibitory effects of human CSX/NKX2. 5 homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(2):299-308.
76. Kolomenski JE, Delea M, Simonetti L, Fabbro MC, Espeche LD, Taboas M, et al. Update of genetic variants in the NKX2-5 gene. *Human Mutation*. 2020.
77. Zhang L, Nomura-Kitabayashi A, Sultana N, Cai W, Cai X, Moon AM, et al. Mesodermal Nkx2. 5 is necessary and sufficient for early second heart field development. *Developmental biology*. 2014;390(1):68-79.
78. Costa MW, Guo G, Wolstein O, Vale M, Castro ML, Wang L, et al. Functional characterization of a novel mutation in NKX2-5 associated with congenital heart disease and adult-onset cardiomyopathy. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2013;6(3):238-47.
79. Edwards JJ, Gelb BD. Genetics of congenital heart disease. *Current opinion in cardiology*. 2016;31(3):235.
80. Theis JL, Zimmermann MT, Evans JM, Eckloff BW, Wieben ED, Qureshi MY, et al. Recessive MYH6 mutations in hypoplastic left heart with reduced ejection fraction. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2015;8(4):564-71.
81. Granados-Riveron JT, Ghosh TK, Pope M, Bu'Lock F, Thornborough C, Eason J, et al.  $\alpha$ -Cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. 2010;19(20):4007-16.
82. Sanders P, Lau DH, Kalman JM. Sinus node abnormalities. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Sixth Edition: Elsevier Inc.*; 2014. p. 691-7.
83. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Current topics in developmental biology*. 100: Elsevier; 2012. p. 253-77.

84. Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagül I, Campbell CE, Rauch A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11. 2 deletions. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;80(3):510-7.
85. Takagaki Y, Yamagishi H, Matsuoka R. Factors involved in signal transduction during vertebrate myogenesis. *International review of cell and molecular biology*. 296: Elsevier; 2012. p. 187-272.
86. Reamon-Buettner S, Borlak J. GATA4 zinc finger mutations as a molecular rationale for septation defects of the human heart. *Journal of medical genetics*. 2005;42(5):e32-e.
87. Yilbas A, Hamilton A, Wang Y, Mach H, Lacroix N, Davis DR, et al. Activation of GATA4 gene expression at the early stage of cardiac specification. *Frontiers in chemistry*. 2014;2:12.
88. Moskowitz IP, Wang J, Peterson MA, Pu WT, Mackinnon AC, Oxburgh L, et al. Transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. 2011;108(10):4006-11.
89. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB, editors. *Notch signaling in human development and disease*. *Seminars in cell & developmental biology*; 2012: Elsevier.
90. de la Pompa JL, Epstein JA. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Developmental cell*. 2012;22(2):244-54.
91. MacGrogan D, D'Amato G, Travisano S, Martinez-Poveda B, Luxán G, del Monte-Nieto G, et al. Sequential ligand-dependent notch signaling activation regulates valve primordium formation and morphogenesis. *Circulation research*. 2016;118(10):1480-97.
92. Preuss C, Capredon M, Wünnemann F, Chetaille P, Prince A, Godard B, et al. Family based whole exome sequencing reveals the multifaceted role of notch signaling in congenital heart disease. *PLoS genetics*. 2016;12(10):e1006335.

93. Meester J, Verstraeten A, Alaerts M, Schepers D, Van Laer L, Loeys B. Overlapping but distinct roles for NOTCH receptors in human cardiovascular disease. *Clinical genetics*. 2019;95(1):85-94.
94. Kerstjens-Frederikse WS, Van De Laar IM, Vos YJ, Verhagen JM, Berger RM, Lichtenbelt KD, et al. Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families. *Genetics in Medicine*. 2016;18(9):914-23.
95. Wolf M, Basson CT. The molecular genetics of congenital heart disease: a review of recent developments. *Current opinion in cardiology*. 2010;25(3):192.
96. Helle E, Córdova-Palomera A, Ojala T, Saha P, Potiny P, Gustafsson S, et al. Loss of function, missense, and intronic variants in NOTCH1 confer different risks for left ventricular outflow tract obstructive heart defects in two European cohorts. *Genetic epidemiology*. 2019;43(2):215-26.
97. Serra-Juhé C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez-Jurado LA. DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenetics*. 2015;10(2):167-77.
98. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine e-book*: Elsevier Health Sciences; 2015.
99. Jarrell DK, Lennon ML, Jacot JG. *Epigenetics and Mechanobiology in Heart Development and Congenital Heart Disease*. *Diseases*. 2019;7(3):52.
100. Huang S, Litt MD, Blakey CA. *Epigenetic gene expression and regulation*: Academic Press; 2015.
101. Digilio MC, Marino B, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Congenital heart defects in Kabuki syndrome. *American journal of medical genetics*. 2001;100(4):269-74.
102. Al About NM, Basit H, Al-Jindan FA. *Genetics, DNA Damage and Repair*. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2020.



103. Kagohara LT, Stein-O'Brien GL, Kelley D, Flam E, Wick HC, Danilova LV, et al. Epigenetic regulation of gene expression in cancer: techniques, resources and analysis. *Briefings in functional genomics*. 2018;17(1):49-63.
104. Holm H, Gudbjartsson DF, Sulem P, Masson G, Helgadóttir HT, Zanon C, et al. A rare variant in MYH6 is associated with high risk of sick sinus syndrome. *Nature genetics*. 2011;43(4):316.
105. Moskalev A, Vaiserman AM. *Epigenetics of Aging and Longevity: Translational Epigenetics vol 4*: Academic Press; 2017.
106. Dueñas A, Expósito A, Aranega A, Franco D. The role of non-coding RNA in congenital heart diseases. *Journal of cardiovascular development and disease*. 2019;6(2):15.
107. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology & medicine*. 2019;16(1):4.
108. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. 2015;17(5):405.
109. Geddes GC, Earing MG. Genetic evaluation of patients with congenital heart disease. *Current Opinion in Pediatrics*. 2018;30(6):707.
110. Jia Y, Louw JJ, Breckpot J, Callewaert B, Barrea C, Sznajer Y, et al. The diagnostic value of next generation sequencing in familial nonsyndromic congenital heart defects. 2015;167(8):1822-9.
111. Kakuda S, Haltiwanger RS. Deciphering the fringe-mediated notch code: identification of activating and inhibiting sites allowing discrimination between ligands. *Developmental cell*. 2017;40(2):193-201.
112. Riley MF, McBride KL, Cole SE. NOTCH1 missense alleles associated with left ventricular outflow tract defects exhibit impaired receptor processing and

- defective EMT. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(1):121-9.
113. Kalayinia S, Serwa Ghasemi NM. A comprehensive in silico analysis, distribution and frequency of human Nkx2-5 mutations; A critical gene in congenital heart disease. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*. 2019;11(4):287.
  114. Abou Hassan OK, Fahed AC, Batrawi M, Arabi M, Refaat MM, DePalma SR, et al. NKX2-5 mutations in an inbred consanguineous population: genetic and phenotypic diversity. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-8.
  115. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, et al. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(4):1428-33.
  116. Reamon-Buettner SM, Sattlegger E, Ciribilli Y, Inga A, Wessel A, Borlak J. Transcriptional defect of an inherited NKX2-5 haplotype comprising a SNP, a nonsynonymous and a synonymous mutation, associated with human congenital heart disease. *PLoS One*. 2013;8(12):e83295.
  117. van Engelen K, Mommersteeg MT, Baars MJ, Lam J, Ilgun A, van Trotsenburg AP, et al. The ambiguous role of NKX2-5 mutations in thyroid dysgenesis. *PLoS One*. 2012;7(12):e52685.
  118. McBride KL, Riley MF, Zender GA, Fitzgerald-Butt SM, Towbin JA, Belmont JW, et al. NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Human molecular genetics*. 2008;17(18):2886-93.
  119. Iascone M, Ciccone R, Galletti L, Marchetti D, Seddio F, Lincesso A, et al. Identification of de novo mutations and rare variants in hypoplastic left heart syndrome. *Clinical genetics*. 2012;81(6):542-54.

120. Freylikhman O, Tatarinova T, Smolina N, Zhuk S, Klyushina A, Kiselev A, et al. Variants in the NOTCH1 gene in patients with aortic coarctation. *Congenital heart disease*. 2014;9(5):391-6.
121. Ehebauer MT, Chirgadze DY, Hayward P, Martinez Arias A, Blundell TL. High-resolution crystal structure of the human Notch 1 ankyrin domain. *Biochemical Journal*. 2005;392(1):13-20.
122. Posch MG, Perrot A, Schmitt K, Mittelhaus S, Esenwein EM, Stiller B, et al. Mutations in GATA4, NKX2. 5, CRELD1, and BMP4 are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146(2):251-3.
123. El Bouchikhi I, Bouguenouch L, Moufid FZ, Houssaini MI, Belhassan K, Samri I, et al. NKX2-5 molecular screening and assessment of variant rate and risk factors of secundum atrial septal defect in a Moroccan population. *Anatolian journal of cardiology*. 2017;17(3):217.
124. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, Koch A, Zink S, Trautmann U, et al. Comprehensive genotype–phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *Journal of medical genetics*. 2010;47(5):321-31.

