

Kardiyovasküler Hastalıkların Tanısında Yeni Nesil Dizi Analizi Yöntemi ile Genetik Varyasyonların Tespitinin Önemi

The Importance of Detecting Genetic Variations with the New Generation Sequencing Method for the Diagnosis of Cardiovascular Diseases

Sinem Yalçıntepe¹, Hakan Gürkan¹, Sezgi Sarıkaya Solak², Selma Demir¹, Emine İkbal Atlı¹, Engin Atlı¹, Servet Altay³

1 Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

2 Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

3 Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) geniş bir hastalık grubu olup, etiopatogenezinde farklı risk faktörleri olmakla birlikte, genetik faktörler ayrı bir öneme sahiptir. Çalışmamızda, hedefli genlerin moleküler genetik analizinin KVH'da klinik tanıya hangi oranda katkı sağladığını belirlemeyi amaçladık.

YÖNTEM ve GEREÇLER: KVH klinik tanısı ile takip edilen 38 hastada, periferik kandan DNA izolasyonu sonrasında 54 OMIM genini kapsayan hedefli panel kullanılarak, Illumina NextSeq550 sisteminde bu 54 genin analizi gerçekleştirildi.

BULGULAR: Çalışmaya 23 erkek, 15 kadın olmak üzere dahil edilen hastaların yaş ortalaması kadınlarda 33.6, erkeklerde 32.8 olmak üzere tüm olgularda ortalama 33.1'di. 11 olguda (%28.9) 13 patojenik/olası patojenik varyasyon, 13 (%34.2) olguda 16 klinik önemi bilinmeyen varyasyon (VUS) saptadık. 6'sı patojenik/olası patojenik, 3'ü VUS olmak üzere toplam 9 varyasyon açık erişimli veri tabanlarında bugüne kadar rapor edilmemiş yeni varyasyondur.

TARTIŞMA ve SONUÇ: KVH grubunda yeni nesil dizi analizi (NGS), çalışmamızda tanıya % 28.9 oranında bir katkı sağladı. NGS ile, nedeni belirlenemeyen kardiyovasküler hastalık bulgusu olan olgularda, çoklu gen analizi tanı oranlarını arttırmakta, tanı koyma süresini kısaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hedefli Gen Analizi, Kardiyovasküler Hastalık, Yeni Nesil Dizi Analizi

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cardiovascular diseases (CVD) are a large group of diseases and although there are different risk factors in their etiopathogenesis, genetic factors have a special importance. In our study, we aimed to determine the importance of contribution of molecular genetic analysis of targeted genes in clinical diagnosis of CVD.

METHODS: Analysis was performed in the Illumina NextSeq550 system using a targeted panel consisting of 54 OMIM genes after DNA isolation from peripheral blood in 38 patients followed up with a clinical diagnosis of CVD.

RESULTS: The average age of the patients included in the study, including 23 men and 15 women, was 33.6 in women, 32.8 in men, and 33.1 in all cases. We detected 13 pathogenic/likely pathogenic variations in 11 cases (28.9%), and 16 variations of unknown clinical significance (VUS) in 13 (34.2%) cases. A total of 9 variations, 6 of which were pathogenic/likely pathogenic, 3 of which were VUS, were the novel variations which were not reported in open access databases up to date.

DISCUSSION AND CONCLUSION: The diagnosis rate was 28.9% with next generation sequencing (NGS) method in our study in the CVD group. With NGS, in cases with unidentified cardiovascular disease findings, multiple gene analysis increases the diagnosis rates and shortens the diagnosis time.

Keywords: targeted gene analysis, cardiovascular disease, next generation sequencing analysis

İletişim / Correspondence:

Sinem Yalçıntepe

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

E-mail: sinemyalcintepe@gmail.com

Başvuru Tarihi: 14.05.2020

Kabul Tarihi: 23.11.2020

GİRİŞ

Yirminci yüzyılda, çok sayıda epidemiyolojik gözlem ve müdahale çalışmasına dayanarak, dünya çapında kardiyovasküler hastalık (KVH) yükünü azaltmak amacıyla kardiyovasküler risk faktörleri tanımlanmış ve hedeflenmiştir. Yüzyıllar boyunca, insanların yeme alışkanlıklarındaki değişiklikler, fiziksel aktivitede ilerleyici bir azalma diyabet, hipertansiyon ve hiperkolesterolemi oranlarının artışına katkıda bulunmuş, yüksek bir obezite prevalansına sebep olmuş, ateroskleroz ile ilişkili bozuklukların (miyokard enfarktüsü, iskemik kardiyomiyopati, inme ve periferik arter hastalığı) sıklığını arttırmıştır (1). Yine son yıllarda, birçok kardiyovasküler hastalık türü için genetik etiyojolojiyi belirleme oranları artmıştır ve spesifik genetik sebeplerin saptanmasına bağlı olarak hasta yönetimi için önemli etkileri olduğu ortaya çıkmıştır. Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık ile poligenetik ilişkilendirmeler uzun zamandır bilinmesine rağmen, klinik olarak açıklanamayan kardiyovasküler fenotiplere yol açan bir dizi kalıtsal tek gen varyasyonu daha yakın zamanda tanınmıştır. Yakın bir zaman kadar, hastalıkların genetik tanısını koymak, testlerin yüksek maliyeti ve ulaşılabilir olmaması nedeni ile oldukça zordu. Günümüzde Sanger dizileme halen altın standart kabul edilmekle birlikte, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi, aynı anda birden fazla genin paneller şeklinde analizine imkân sağlamıştır. Hatta KVH'nin genetik etiyojisini aydınlatmak amacı ile tüm ekzom (WES) ve tüm genom (WGS) dizilemesine bile imkân sağlamıştır (2). NGS teknolojisinin gelişmesi, son zamanlarda klinik uygulamada genetik tanı, aile genetiği danışmanlığı ve doğum öncesi tanı testleri de dahil olmak üzere geleneksel yöntemlere alternatif bir yaklaşım olarak kullanıma sunulmuştur. NGS teknolojisi, sadece paralel olarak büyük miktarlarda veri üretmekle kalmayıp, aynı zamanda her baz çiftini benzeri görülmemiş bir derinliğe kadar ölçebilen birçok avantaja sahiptir. Aynı zamanda NGS teknolojisi, her bir numunenin dizileme süresini ve maliyetini büyük ölçüde azaltmıştır (3).

NGS teknolojisi ile hastalıklarla ilişkilendirilen yüzlerce gen, on yıl öncesine göre, aynı anda, çok daha hızlı ve daha düşük maliyetle dizilenebilir hale

gelmiş ve bu da moleküler genetik testleri her zamankinden daha erişilebilir hale getirmiştir.

Birçok kardiyoloji uygulama kılavuzu, teşhis ve kişisel klinik yönetim önerilerinde genetik verileri içermektedir (4). Bu nedenle, klinik kardiyologlar kardiyovasküler genetiğin temel prensiplerini anlamalı, hangi KVH'ların altta yatan bir genetik duruma sahip olabileceğini tanımalı ve gerektiğinde hastaları genetik test için Tıbbi Genetik uzmanına yönlendirmelidir. Kalıtsal kardiyovasküler hastalığı olan hastalar ve aileler de doktorlarının klinik yönetim hakkında bilinçli kararlar vermesini bekler. Çalışmamızda, KVH klinik ön tanısı ile takip edilen hastalarda, yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak 54 geni içeren hedefli gen paneli analizinin klinik tanıya katkısını belirlemeyi amaçladık.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Olgular

KVH ve/veya KVH aile öyküsü olan 38 hastanın dosyası retrospektif (10.2017-03.2020) olarak değerlendirildi. Çalışmaya Kardiyoloji ve/veya Dermatoloji polikliniğinde KVH ön tanısı düşünülerek Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezine yönlendirilen hastalardan, polikliniğimizde öyküleri alınan, fizik muayeneleri yapılan ve endikasyon dahilinde KVH hedefli gen paneli çalışılan hastalar dahil edildi. Çalışmamızda hastalardan poliklinik başvuruları sırasında bilgilendirilmiş yazılı onam formu alındı.

Hedefli NGS Paneli

Hastalardan EDTA tüpe alınan 2 ml periferik venöz kan örneğinden kullanılan kitin protokolüne göre genomik DNA'ları (EZ1 DNA Investigator Kit, Qiagen, Hilden, Germany) izole edildi. İzole edilmiş olan DNA örneklerinin kalite kontrolü NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) kullanılarak belirlendi. A260/280 değeri 1.8-2.0 arasında olan numuneler çalışmaya dahil edildi.

QIaseq Targeted DNA Panel (Qiagen, Hilden, Germany) kiti üreticinin NGS talimatlarına göre kullanıldı. Tüm hastalarda KVH panel içeriğinde olan 54 genin (ABCA1, ABCC6, ABCG5, ABCG8, ACTA2, ACTC1, ANGPTL3, APOA1, APOB, APOE, BMPR2, CFC1, COL3A1, COL4A1, CYP7A1, EFEMP2, ELN, ENPP1, FBLN5, FBN1, FBN2, G6PC3, GATA4, GATA6, GDF1, GJA1,

GLMN, JAG1, LDLR, LDLRAP1, LPL, LRP6, MEF2A, MYH11, MYH6, MYLK, NKX2-3, NKX2-5, NKX2-6, NOTCH1, PCSK9, PLOD3, RASA1, RBM10, SLC2A10, SMAD3, TBX1, TBX20, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TLL1, ZFPM2, ZNF469) tüm ekzonları (intron bölgelerini 5 bp kapsayacak şekilde), kütüphane oluşturma ve barkodlama işlemlerinden sonra Illumina NextSeq550 (Illumina Inc., San Diego, CA, ABD) teknolojisi kullanılarak dizilendi. Hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrolü Qubit dsDNA BR Assay system (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile yapıldı.

NGS Data Analizi

Verilerin analizinde Illumina NextSeq550 Software, kalite parametrelerinin değerlendirilmesinde Qiagen QCI Analysis, varyantların filtrelenmesinde Qiagen Clinical Insight ve Qiagen Ingenuity yazılımları, verilerin görsel olarak değerlendirilmesinde ise IGV 2.8.2 programı kullanıldı. Açık erişimli veri tabanlarında tanımlanmamış, yeni (novel) varyantları tanımlamak için Human Genome Variation Society (5) önerileri dikkate alınarak, ACMG-2015 (6) kriterlerine göre varyantlar sınıflandırıldı. ACMG-2015 kılavuzuna göre varyasyonlar, patojenik/olası patojenik, klinik önemi bilinmeyen varyasyon (VUS) ve olası benign/benign olarak sınıflandırılmıştır.

Varyant Veri tabanları ve Patojenite Sınıflandırması

Variant veritabanları: 1000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org/index.html>), NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), Genome Aggregation Database (gnomAD; <http://gnomad.broadinstitute.org>), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Human Genome Mutation Database (HGMD Professional 2020; <http://www.biobase-international.com/>).

Patojenite skorlama programları: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT ve Provean (http://provean.jcvi.org/protein_batch_submit.php?species=human), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>).

BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 38 hastadan, 15 kadının yaş ortalaması 33.6, 23 erkeğin yaş ortalaması 32.8, toplam 38 olgunun yaş ortalaması ise 33.1 olarak saptandı. Olguların yaşları 2 ve 61 arasında değişmekteydi.

Çalışmamızda, 54 geni kapsayan KVH'lar gen paneli analizi sonrasında 11 (% 28.9) hastada 13 patojenik varyasyon, 13 (%34.2) hastada 16 klinik önemi bilinmeyen varyasyon (VUS) saptandı. Patojenik varyasyon veya VUS saptanmayan hasta sayısı 14 (% 36.8)'dü. En sık patojenik varyasyon ABCC6 geninde saptandı. Açık erişimli veri tabanlarında tanımlanmamış 6 patojenik, 3 VUS olmak üzere toplam 9 yeni (novel) varyasyon saptadık (Tablo 1 ve 2). Hastaların başvuru endikasyonları Tablo 1 ve 2'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Patojenik varyasyon saptanan olgulara ait endikasyon, gen ve varyasyon bilgileri

Olgu	Cinsiyet / Yaş	Endikasyon	Gen	Mutasyon Tipi	Nükleotid Değişimi	Aminoasit Değişimi	Dbsnp	OMIM Fenotipleri
1-GÖ	E/53	Loeys-Dietz Sendromu?	ABCC6	Missense Heterozigot	NM_001171.5:c.1540G>A	p.(Val514Ile)	rs59157279 ClinVar:Patojenik	Arterial calcification, generalized, of infancy, 2 (OR) Pseudoxanthoma elasticum (OR) Pseudoxanthoma elasticum, forme fruste (OD)
2-RK	E/56	Hiper kolesterollemi	LDLR	Missense Heterozigot	NM_000527.5:c.846C>A	p.(Phe282Leu)	rs730882090 ACMG:Olası patojenik	Hypercholesterolemia, familial, 1 (OD) LDL cholesterol level QTL2 (OD)
3-BE	E/47	Aort yetmezliği	COL3A1	Missense Heterozigot	NM_000090.4:c.3530C>T	p.(Ser1177Phe)	Novel ACMG:Patojenik	Ehlers-Danlos syndrome, vascular type (OD) Polymicrogyria with or without vascular-type EDS (OR)
4-TY	K/33	Aort kapak operasyonu, Miyopi	FBN1	Splice varyant Heterozigot	NM_000138.5:c.165-2A>G	-	Novel ACMG:Patojenik	Acromicric dysplasia (OD) Acromicric dysplasia (OD) Geleophysic dysplasia 2 (OD) Marfan lipodystrophy syndrome (OD) Marfan syndrome (OD) MASS syndrome (OD) Stiff skin syndrome (OD) Weill-Marchesani syndrome 2, dominant (OD)
5-KA	K/7	Marfan Sendromu?	GIA1	Frameshift Heterozigot	NM_000165.5:c.932delC	p.(Ala311ValfsTer37)	rs778110855 ACMG:Patojenik	Atrioventricular septal defect 3 (OD) Craniometaphyseal dysplasia, autosomal recessive (OR) Erythrokeratoderma variabilis et progressiva 3 (OD) Hypoplastic left heart syndrome 1 (OR) Oculodentodigital dysplasia (OD) Oculodentodigital dysplasia, autosomal recessive (OR) Palmoplantar keratoderma with congenital alopecia (OD) Syndactyly, type III (OD)
			ABCC6	Missense Heterozigot	NM_001171.5:c.4330C>T	p.(Leu1444Phe)	rs1228655033 ACMG:Olası patojenik	Arterial calcification, generalized, of infancy, 2 (OR) Pseudoxanthoma elasticum (OR) Pseudoxanthoma elasticum, forme fruste(OD)
			ABCC6	Missense Heterozigot	NM_001171.5:c.1774G>A	p.(Val592Ile)	rs190761354 ACMG:VUS	Arterial calcification, generalized, of infancy, 2 (OR) Pseudoxanthoma elasticum (OR) Pseudoxanthoma elasticum, forme fruste(OD)
6-İG	K/27	Psödoksantom a Elastikum	ABCC6	Missense Homozigot	NM_001171.5:c.1987G>C	p.(Gly663Arg)	Novel ACMG:Olası patojenik	Arterial calcification, generalized, of infancy, 2 (OR) Pseudoxanthoma elasticum (OR) Pseudoxanthoma elasticum, forme fruste(OD)
			GATA4	Missense Heterozigot	NM_002052.5:c.487C>T	p.(Pro163Ser)	rs387906769 ACMG: Olası patojenik	?Testicular anomalies with or without congenital heart disease (OD) Atrial septal defect 2 (OD) Atrioventricular septal defect 4 (OD) Tetralogy of Fallot (OD) Ventricular septal defect 1 (OD)
7-RK	K/58	Ailesel kardiyovasküler hastalık öyküsü	LDLR	Missense Heterozigot	NM_000527.5:c.542C>G	p.(Pro181Arg)	rs557344672 ACMG:Olası patojenik	Hypercholesterolemia, familial, 1 (OD) LDL cholesterol level QTL2 (OD)
8-SB	E/54	Dirençli hipertansiyon, aort anevrizması	PCSK9	Missense Heterozigot	NM_174936.4:c.1120G>A	p.(Asp374Asn)	rs137852912 ClinVar:Patojenik /Olası patojenik	{Low density lipoprotein cholesterol level QTL 1} (OD) Hypercholesterolemia, familial, 3 (OD)
9-ÖSS	E/4	Babası aort anevrizması nedeniyle ex	FBN1	Frameshift Heterozigot	NM_000138.5:c.923_926delTCAG	p.(Val308AlafsTer21)	Novel ACMG:Patojenik	Acromicric dysplasia (OD) Acromicric dysplasia (OD) Geleophysic dysplasia 2 (OD) Marfan lipodystrophy syndrome (OD) Marfan syndrome (OD) MASS syndrome (OD) Stiff skin syndrome (OD) Weill-Marchesani syndrome 2, dominant (OD)
10-İK	K/10	Pulmoner stenoz	JAG1	Missense Heterozigot	NM_000214.3:c.811T>C	p.(Cys271Arg)	Novel ACMG:Patojenik	?Deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon Alagille syndrome 1 (OD) Tetralogy of Fallot (OD)
11-İÖP	E/16	Marfanoid habitus, araknodaktili	ABCC6	Missense Heterozigot	NM_001171.5:c.3194C>G	p.(Ser1065Cys)	Novel ACMG:Olası patojenik	Arterial calcification, generalized, of infancy, 2 (OR) Pseudoxanthoma elasticum (OR) Pseudoxanthoma elasticum, forme fruste(OD)

OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif, ACMG:American College of Medical Genetics, VUS: Variant of unknown clinical significance

Tablo 2. Klinik önemi bilinmeyen varyasyon saptanan olgulara ait endikasyon, gen ve varyasyon bilgileri

Olgu	Cinsiyet /Yaş	Endikasyon	Gen	Mutasyon Tipi	Nükleotid değişimi	Aminoasit değişimi	dbSNP	OMIM fenotipleri
1-TI	E/2	ASD Tip 6	MYH7	Missense Heterozigot	ENST00000355349.3:c.4985G>A	p.(Arg1662His)	rs370328209 ACMG: VUS	Cardiomyopathy, dilated, 1S (OD) Cardiomyopathy, hypertrophic, 1 (OD) Laing distal myopathy (OD) Left ventricular noncompaction 5 (OD) Myopathy, myosin storage, autosomal dominant(OD) Myopathy, myosin storage, autosomal recessive(OR) Scapuloperoneal syndrome, myopathic type (OD)
2-AK	K/2	Beals-Hecht Sendromu?	ABCA1	Missense Homozigot	NM_005502.4:c.2134T>C	p.(Tyr712His)	rs772192750 ACMG: VUS	HDL deficiency, familial, 1 Tangier disease (OR)
3-IDG	K/9	Uzun QT Sendromu	PCSK9	Missense Heterozigot	NM_174936.4:c.433G>A	p.(Glu145Lys)	rs1413865935 ACMG: VUS	{Low density lipoprotein cholesterol level QTL 1}(OD) Hypercholesterolemia, familial, 3 (OD)
4-MAŞ	E/12	Psödoksantoma Elastikum?	COL3A1	Missense Heterozigot	NM_000090.4:c.2498A>G	p.(Lys833Arg)	rs371344739 ClinVar:VUS	Ehlers-Danlos syndrome, vascular type (OD) Polymicrogyria with or without vascular-type EDS (OR)
5-NT	K/57	Aort anevrizması	COL4A1	Missense Heterozigot	NM_001845.6:c.4967G>A	p.(Arg1656His)	rs756403856 ACMG: VUS	?Retinal arteries, tortuosity of (OD) Angiopathy, hereditary, with nephropathy, aneurysms, and muscle cramps (OD) Brain small vessel disease with or without ocular anomalies (OD) Microangiopathy and leukoencephalopathy, pontine, autosomal dominant (OD)
			TLL1	Splice variant Heterozigot	NM_012464.5:c.1159-2A>C	-	Novel ACMG: VUS	Atrial septal defect 6 (OD)
6-SM	K/46	Aort anevrizması	ABCG5	Missense Heterozigot	NM_022436.3:c.1216C>T	p.(Arg406Trp)	rs752962014 ACMG: VUS	Sitosterolemia 2
7-BB	E/58	Aort anevrizması, Pulmoner arter anevrizması	LDLR	Missense Heterozigot	NM_000527.5:c.1876G>A	p.(Glu626Lys)	rs139791325 ACMG: VUS	Hypercholesterolemia, familial, 1 (OD) LDL cholesterol level QTL2 (OD)
8-MG	E/35	Ailesel koroner arter hastalığı öyküsü	BMPR2	Missense Heterozigot	NM_001204.7:c.2677C>T	p.(Arg893Trp)	rs764248124 ACMG: VUS	Pulmonary hypertension, familial primary, 1, with or without HHT (OD) Pulmonary hypertension, primary, fenfluramine or dexfenfluramine-associated (OD) Pulmonary venoocclusive disease 1 (OD)
			CYP7A1	Missense Heterozigot	NM_000780.4:c.1192C>G	p.(Pro398Ala)	rs142708991 ACMG: VUS	-
9-ÜÇ	E/23	Aort anevrizması	ABCA1	Missense Heterozigot	NM_005502.4:c.5608A>T	p.(Ile1870Phe)	Novel ACMG: VUS	HDL deficiency, familial, 1 Tangier disease (OR)
10-GÖ	E/30	Ailesel kalp hastalığı öyküsü	MYH6	Missense Heterozigot	NM_002471.3:c.1007C>G	p.(Ala336Gly)	rs138572790 ClinVar:VUS	{Sick sinus syndrome 3} Atrial septal defect 3 Cardiomyopathy, dilated, 1EE Cardiomyopathy, hypertrophic, 14 (OD)
11-EP	E/29	Ventriküler septal defekt, aort yetmezliği	GATA6	Missense Heterozigot	NM_005257.5:c.995A>C	p.(His332Pro)	Novel ACMG: VUS	Atrial septal defect 9 (OD) Atrioventricular septal defect 5 (OD) Pancreatic agenesis and congenital heart defects (OD) Persistent truncus arteriosus Tetralogy of Fallot (OD)
12-ZS	K/59	Asendan aort anevrizması	ABCG8	Missense Heterozigot	NM_022437.3:c.593G>T	p.(Arg198Met)	rs777258651	{Gallbladder disease 4} Sitosterolemia 1 (OR)
13-HÇ	K/59	Düşük ejeksiyon fraksiyonu, miyokard enfarktüsü	MYLK	Missense Heterozigot	NM_053025.4:c.3127C>G	p.(Pro1043Ala)	rs777200220 ClinVar:VUS	Aortic aneurysm, familial thoracic 7 (OD) Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome (OR)

OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif, ACMG: American College of Medical Genetics, VUS: Variant of unknown clinical significance

TARTIŞMA

KVH'lar, dünyanın önde gelen hastalık ve ölüm nedenlerinden birisidir. Yaygınlığının önümüzdeki yıllarda artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir. KVH'lar, geniş bir başlık olup, konjenital kalp hastalıkları, periferik damar hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar, konjestif kalp yetmezliği, koroner kalp hastalıkları, romatizmal kalp hastalıkları, hipertansif hastalıklar ve aritmiler gibi kalbin ve damarların tüm hastalıklarını kapsamaktadır. En yaygın KVH'lar, iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, hipertansiyon, enflamatuvar kalp hastalığı ve bu yaygınlık sırasına göre romatizmal kalp hastalığını içerir (7). Bu beş büyük KVH birlikte yılda 17 milyondan fazla ölüme bağlantılıdır, tüm ölümlerin % 31.5'una sebep olduğu bildirilmektedir (8).

KVH'ların pek çok farklı risk faktörü olduğu bilinmektedir. Hipertansiyon, sigara, yüksek kolesterol düzeyi, diabet, sedanter yaşam tarzı, obezite, KVH aile öyküsü, yaş, alkol, beslenme tarzı bu risk faktörleri arasında sayılabilir (9). KVH'ların her grubu için kalıtsal faktörler etkilidir. Son zamanlarda, genetik etkenler, etiolojide ve tedavi yanıtında ilişkilendirildikçe, genetiğin KVH gelişimindeki rolünün anlaşılması çok daha önemli hale gelmiştir. Bazı bireyler genetik yapısının doğrudan bir sonucu olarak KVH gelişimi için daha yüksek risk altındadır (10). Genetik yatkınlık, bireyi çevresel faktörlere veya sağlıklı yaşam tarzı seçimlerine bakılmaksızın daha yüksek hastalık riskine dahil etmektedir. KVH öyküsü olan bireyler, günümüzde genetik testlere daha kolay ulaşabilmekle birlikte, her geçen gün yeni genlerin ve varyasyonların tanımlanması, genotip-fenotip ilişkisinin tanımlanmasını giderek zorlaştırmaktadır.

Sanger dizileme teknolojisi, DNA dizilemesi için hala altın standart kabul edilmektedir. Bununla birlikte, NGS analizinin gelişimiyle, bir insan genomundaki tüm kodlayan bölgelerin (tüm ekzom, WES) dizileme, tüm genom dizileme (WGS) veya büyük gen panelleri ile hedefli genlerin dizilenmesi mümkün hale gelmiştir. Hastalıkları moleküler temelde yeniden sınıflandırma yönündeki mevcut çabalar, varyant sınıflandırması ile yeni standartlar oluşturulmaya çalışılmaktadır. KVH'larla ilişkisi bildirilmiş 54 hedefli geni analiz ettiğimiz çalışmamızda, 11 olguda patojenik varyasyon, 13

olguda VUS saptayarak, çalışmaya dahil edilen olguların %63'ünde en az bir varyasyon tespit etmiş olduk. Çalışmamızda, en sık patojenik varyasyon ABCC6 geninde saptandı. Diğer patojenik varyasyon saptanan genler: LDLR, FBN1, COL3A1, GJA1, GATA4, PCSK9 ve JAG1'di. VUS varyasyon saptanan genler ise, MYH7, ABCA1, PCSK9, COL3A1, COL4A1, TLL1, ABCG5, LDLR, BMPR2, CYP7A1, ABCA1, MYH6, GATA6, ABCG8, MYLK ve ABCC6'di. NGS teknolojisinin gelişmesi ile birlikte tanı oranları artarken, hastalarda saptanan VUS oranları da artmaktadır. VUS olarak sınıflandırılan varyasyonların zaman içerisinde patojenik, olası patojenik, olası benign veya benign olarak değişebilme potansiyeli olması nedeni ile hem tanı hem de genetik danışmanlık süreci giderek zorlaşmaktadır. Özellikle KVH'lar gibi kompleks hastalık gruplarında bu durum daha da karmaşık hale gelmektedir. Yapılan genetik analiz sonucunda VUS saptanan hastalarımıza genetik danışma sırasında aile çalışması (segregasyon) ve bir yıl sonra VUS olarak tanımlanmış olan varyasyonun sınıflandırmasının tekrar değerlendirilmesi amacı ile kontrole gelmesini önermekteyiz.

Hastaların başvuru nedenleri arasında, kalp kapak hastalıkları, Psödoksantoma Elastikum, Marfan sendromu, konjenital kalp hastalıkları, hipertansiyon, aort anevrizması, koroner arter hastalıkları gibi çok çeşitli endikasyonlar bulunmaktaydı. Patojenik varyasyon saptadığımız 11 hasta ayrıntılı olarak değerlendirildiğinde; Loeys-Dietz Sendromu ön tanısı ile takip edilen hastamızda (tablo 1-olgu 1) ABCC6 geni ile ilişkili Psödoksantoma Elastikum, aort yetmezliği ile başvuran hastamızda (tablo 1-olgu 3) Vasküler tip Ehlers-Danlos Sendromu, babası aort anevrizması nedeni ile ölen bir hastamızda (tablo1-olgu 9) Marfan Sendromu tanısı konuldu. VUS saptadığımız hastalarımızda, klinik ön tanı sıklıkla aort anevrizmasıydı. Bu durumun, özgün endikasyonlarda patojenik varyasyon saptama ihtimali daha yüksektir şeklinde yorumlanabilir. Birden fazla genin analizini tek çalışmada ve kısa sürede yapabilmek hem tanı oranlarını arttırmakta hem de olguların doğru tanıya ulaşmasını sağlamaktadır. Torasik aort anevrizması/aort diseksiyonu olan 1025 olguda 15 hedefli genlerin

analiz edildiği çalışmada, 47 olguda (% 4.5), 49 patojenik/olası patojenik varyasyon saptanmıştır (11).

Aort diseksiyonu ile ilişkili 152 geni, 702 olguda analiz eden bir diğer çalışmada ise, olguların %34'ünde patojenik/olası patojenik bir varyant saptandığı bildirilmiştir (12). Psödoksantoma Elastikum tanısı olan 16 olguda, tüm ekzom analizi ile ABCC6 genini analiz eden bir çalışmada, bu gene ait 30 patojenik varyasyon saptandığı bildirilmiştir (13). Yapılan bir derleme çalışmasında, ailesel hiperkolesterolemi tanılı 1000 olguda sanger dizileme yöntemi ile LDLR geninde 260 patojenik varyasyon saptandığı, APOB ve PCSK9 genlerinde de varyasyonlar tespit edildiği bildirilmiştir (14). Literatürde tek bir hastalığın etiyolojisini araştırmaya yönelik genetik araştırmaların daha sık yapıldığı görülmektedir. Bu bağlamda çalışmamızın literatürden farklı olarak, KVH'lar grubuna dahil edilen farklı semptomlara sahip hastalarda aynı anda birden fazla genin analizi yapılarak tanı olasılığı artırılmış ve hastalara daha bilgilendirici genetik danışmanlık imkanı sunulmuştur.

Analizi yapılan genler, sadece hot-spot noktalar açısından değil, tüm kodlayıcı bölgeleri kapsayacak şekilde tarandığı için yeni varyasyonların saptanma olasılığı artmaktadır. Çalışmamızda COL3A1, FBN1, ABCC6, JAG1 genlerinde toplam altı adet yeni patojenik varyasyon, TLL1, ABCA1, GATA6 genlerinde ise üç adet yeni VUS saptadık. Çalışmamızda tespit edilen 29 varyasyonun 9'u (%31) yeni varyasyondur. Saptamış olduğumuz yeni varyasyonlar ile ilişkili yeni çalışma sonuçları literatürde rapor edildikçe, bu varyasyonlar ile ilişkili genotip-fenotip korelasyonları daha netlik kazanacaktır.

Tablo 1'deki 6. olgunun anne ve babası arasında 1. derece kuzen evliliği vardı. ABCC6 genine ait fenotipler daha çok otozomal resesif kalıttır. Psödoksantoma Elastikum, elastik fibrillerde yoğun kalsifikasyon sonucu özellikle deri, göz ve kardiyovasküler sistemde hasarla seyreden multisistemik, genetik bir konnektif doku hastalığıdır. Fleksural bölgelerde, özellikle boyun ve aksillada, küçük, asemptomatik, sarı renkli veya deri renginde papüller şeklindeki kutanöz bulgular sıklıkla hastalığın ilk bulgusudur (15). Boyun

bölgesinde ve bilateral aksillar bölgede kutanöz şikâyetleri ile Dermatoloji polikliniğine başvuran hasta, yapılan fizik muayene ve tetkikler sonucunda Psödoksantoma Elastikum ön tanı konularak, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi ile Kardiyoloji ve Göz Hastalıkları polikliniklerine yönlendirilmiştir. Hastanın alınan öyküsünde iki kardeşinden birisinin de Psödoksantoma Elastikum açısından şüpheli lezyonlara sahip olduğunu saptadık. Tanı koyulan olgulara genetik danışma sonrası aile taraması yapmak, ailedeki olası olguları erken tanımak açısından faydalıdır.

Tıbbi Genetik alanında teknolojinin hızlı gelişimi hastalara çok daha kısa sürede tanı koyabilme imkanı sunmaktadır. Yeni hastalık genleri veya yeni varyasyonlar tanımlandıkça, hastalıklarla ilgili bilgimiz de artmaktadır. Çalışmamızda birden fazla hastalığı kalp damar hastalığını kapsayan KVH'a yönelik 54 geni NGS teknolojisini kullanarak değerlendirdik. 38 hastanın 24'ünde (% 63.1) en az bir patojenik/olası patojenik varyant veya VUS saptadık. Güncel literatürde, birden fazla geni kapsayarak, geniş bir KVH grubunda yapılan NGS analizi çalışması rapor edilmemiştir. Bu bağlamda çalışma sonucumuzun literatüre önemli katkı sağlayacağı öngörüsündeyiz. Tüm ekzom analizi veya tüm genom analizi ile yapılacak olan aile çalışmaları, bilinmeyen genlerin ve/veya varyasyonların tanımlanması açısından literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Genovesi S, Giussani M, Orlando A, Battagliano MG, Nava E, Parati G. Prevention of Cardiovascular Diseases in Children and Adolescents. High Blood Press Cardiovasc Prev 2019 Jun;26(3):191-197. doi: 10.1007/s40292-019-00316-6.
2. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet 2014 Sep;30(9):418-26. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.001.
3. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. Arch Pathol Lab Med 2017 Nov;141(11):1544-1557. doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.

4. Nicora G, Limongelli I, Gambelli P, Memmi M, Malovini A, Mazzanti A, et al. CardioVAI: An automatic implementation of ACMG-AMP variant interpretation guidelines in the diagnosis of cardiovascular diseases. *Hum Mutat* 2018 Dec;39(12):1835-1846. doi: 10.1002/humu.23665.
5. Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016;37(6): 564-9. doi: 10.1002/humu.22981.
6. 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. *Genet Med* 2015;17(5): 405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
7. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014 Jun 24;129(25 Suppl 2):S49-73. doi: 10.1161/01.cir.0000437741.48606.98.
8. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 2016 Nov 7;37(42):3232-3245. Epub 2016 Aug 14.
9. Schrage B, Geelhoed B, Niiranen TJ, Gianfagna F, Vishram-Nielsen JKK, Costanzo S, et al. Comparison of Cardiovascular Risk Factors in European Population Cohorts for Predicting Atrial Fibrillation and Heart Failure, Their Subsequent Onset, and Death. *J Am Heart Assoc* 2020 May 5;9(9):e015218. doi: 10.1161/JAHA.119.015218. Epub 2020 Apr 30.
10. Mohammed WJ, Al-Musawi BMS, Oberkanins C, Pühringer H. Molecular assessment of some cardiovascular genetic risk factors among Iraqi patients with ischemic heart diseases. *Int J Health Sci (Qassim)* 2018 May-Jun;12(3):44-50.
11. Weerakkody R, Ross D, Parry DA, Ziganshin B, Vandrovцова J, Gampawar P, et al. Targeted genetic analysis in a large cohort of familial and sporadic cases of aneurysm or dissection of the thoracic aorta. *Genet Med* 2018 Nov;20(11):1414-1422. doi: 10.1038/gim.2018.27.
12. Li Z, Zhou C, Tan L, Chen P, Cao Y, Li X, et al. A targeted sequencing approach to find novel pathogenic genes associated with sporadic aortic dissection. *Sci China Life Sci* 2018 Dec;61(12):1545-1553. doi: 10.1007/s11427-018-9382-0.
13. Hosen MJ, Van Nieuwerburgh F, Steyaert W, Deforce D, Martin L, Leftheriotis G, et al. Efficiency of exome sequencing for the molecular diagnosis of pseudoxanthoma elasticum. *J Invest Dermatol* 2015 Apr;135(4):992-998. doi: 10.1038/jid.2014.421.
14. Bertolini S, Pisciotta L, Fasano T, Rabacchi C, Calandra S. The study of familial hypercholesterolemia in Italy: A narrative review. *Atheroscler Suppl* 2017 Oct;29:1-10. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2017.07.003.
15. Andrés-Ramos I, Alegría-Landa V, Gimeno I, Pérez-Plaza A, Rütten A, Kutzner H, et al. Cutaneous Elastic Tissue Anomalies. *Am J Dermatopathol* 2019;41:85-117.