T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİTOFUSİN 2 (*MFN2*) GENİ İLE İLİŞKİLİ YOLAKLARIN PRİMER İNFERTİLİTE VE TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MOL. BİO. CEREN GEZİK

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BİLGE ŞADAN ÖZSAİT-SELÇUK

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ceren GEZİK

İTHAF

Sevgili aileme ve bilim sevgimi borçlu olduğum değerli ilkokul öğretmenim Sn. Umut Kulkıra'ya ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini hissettiğim, bilgisi, tecrübesi, nezaketi ile bana rehberlik eden ve sağladığı özgürlük ortamını her zaman hissettiren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Bilge Özsait-Selçuk'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitemde bulunan, değerli yorumlarıyla yol gösteren ve rehberliklerini her zaman hissettiğim Prof. Dr. Evrim Bayrak, Doç. Dr. Çağrı Güleç ve Prof. Dr. Özden Hatırnaz Ng'ye,

Yüksek lisans eğitimim süresinde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Birsen Karaman, Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner ve Doç. Dr. Güven Toksoy'a,

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yaptığım çalışmalar sırasında bilgi, deneyimini benimle paylaşan ve yakınlıklarını her zaman hissettiğim bütün çalışanlara ve öğrenci arkadaşlarıma,

Bilgisini ve desteğini esirgemeyen Sevgili Dr. Durmuş Durmaz'a,

Her zaman yanımda olan ve eğitim hayatım boyunca desteklerini hissettiren sevgili aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 39278 - TYL-2022-39278) ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) A Grubu Acil Ar-Ge Proje Destek Programı kapsamında (Proje No: 28416) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN....2
İTHAF....3
TEŞEKKÜR....4
İÇİNDEKİLER....5
TABLOLAR LİSTESİ....8
ŞEKİLLER LİSTESİ....11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ....14
ÖZET....16
ABSTRACT....17
1. GİRİŞ VE AMAÇ....18
2. GENEL BİLGİLER....21
2.1. Mitokondri....21
2.1.1. Mitokondrinin Fonksiyonu ve Yapısı....21
2.1.2. Mitokondrinin Evrimi....26
2.2. Mitokondriyal Dinamik....27
2.2.1. Mitokondriyal Dinamik ile İlişkili Genler....29
2.2.2. Mitokondriyal Dinamik Genleri....31
2.3. Fertilite ve İnfertilite....31
2.3.1. Fertilite....31
2.3.2. İnfertilite....32
2.3.3. Kadın İnfertilitesi....32
2.3.4. Erkek İnfertilitesi....34
2.3.5. Tekrarlayan Gebelik Kaybı....36
2.4. Oosit ve Mitokondriler....37
2.4.1. Plasenta Gelişimi, Mitokondriler ve Oksidatif Stres....38
2.5. Biyoinformatik Kavramı ve Dizileme Teknolojileri....40
2.5.1. Biyoinformatik....40
2.5.2. Dizileme Teknolojileri....41
2.5.3. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi....41
2.5.4. Yeni Nesil Dizileme Yönteminin Prensileri....42
2.5.4.1. Kütüphane Hazırlığı....43

2.5.4.2. Küme Oluşturulması 43
2.5.4.3. Dizileme 43
2.5.4.4. Veri Analizi 43
3. GEREÇ VE YÖNTEM 44
3.1. Araştırma Grubunun Seçimi ve Özellikleri 44
3.2. Biyoinformatik Analizler: Varyant Analizi 44
3.2.1. Veri Ön İşleme Süreci ve Ham Verilerin İşlenmesi 45
3.2.2. Genomik Dizilerin Hizalanması ve Haritalanması 46
3.2.3. Varyant Çağırma 46
3.2.4. Varyantların Filtrelenmesi ve Anotasyon 48
3.2.5. Varyantların Önceliklendirilmesi ve Filtrelenmesi 50
3.3. Biyoinformatik Analizler: *Burden* Analizi 54
3.4. Sanger Dizileme ile Varyantların Konfirmasyonu 55
3.4.1. Sanger Dizileme Yöntemi için Primerlerin Tasarlanması 55
3.4.2. Sanger Konfirmasyonu için PZR Yönteminin Kullanılması 56
3.4.3. PZR Ürününün Saflaştırılması 58
3.4.4. Sanger Dizileme Sonrası Analiz 58
4. BULGULAR 59
4.1. Olgulara İlişkin Bilgiler ve Tüm Ekzom Dizileme Analiz Sonuçları 59
4.1.1. Olgu-1-TGK Kadın Olgu 59
4.1.2. Olgu-2-TGK Kadın Olgu 65
4.1.3. Olgu-3-TGK Kadın Olgu 70
4.1.4. Olgu-4-TGK Kadın Olgu 73
4.1.5. Olgu-5-TGK Kadın Olgu 77
4.1.6. Olgu-6-TGK Kadın Olgu 80
4.1.7. Olgu-7-TGK Kadın Olgu 83
4.1.8. Olgu-8-TGK Kadın Olgu 85
4.1.9. Olgu-9-TGK Kadın Olgu 89
4.1.10. Olgu-10-TGK Çifti 93
4.1.11. Olgu-11-TGK Çifti 96
4.1.12. Olgu-12-TGK Kadın Olgu 99
4.1.13. Olgu-13-TGK Kadın Olgu 102
4.1.14. Olgu-14-TGK Kadın Olgu 105

4.1.15. Olgu-15-TGK Kadın Olgu 107
4.1.16. Olgu-16-TGK Çifti 110
4.1.17. Olgu-17-TGK Kadın Olgu 113
4.1.18. Olgu-18-TGK Çifti 116
4.1.19. Olgu-19-Pİ Kadın Olgu 119
4.1.20. Olgu-20-TGK Çifti 121
4.1.21. Olgu-21-TGK Çifti 124
4.1.22. Olgu-22-TGK Kadın Olgu 127
4.1.23. Olgu-23-TGK Çifti 132
4.1.24. Olgu-24-TGK Kadın Olgu 136
4.1.25. Olgu-25-TGK Çifti 139
4.1.26. Olgu-26-TGK Kadın Olgu 141
4.1.27. Olgu-27-TGK Çifti 144
4.1.28. Olgu-28-TGK Kadın Olgu 148
4.1.29. Olgu-29-Pİ Kadın Olgu 150
4.1.30. Olgu-30-TGK Çifti 153
4.1.31. Olgu-31-Pİ Kadın Olgu 156
4.1.32. Olgu-32-TGK Kadın Olgu 159
4.1.33. Olgu-33-TGK Kadın Olgu 162
4.1.34. Olgu-34-TGK Kadın Olgu 164
4.1.35. Olgu-35-TGK Kadın Olgu 166
4.2. Varyant Analizinde Tespit Edilen Gen Varyantlarının Sınıflandırılması 170
5. TARTIŞMA 171
6. KAYNAKLAR 177
HAM VERİLER 192
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 2
ETİK KURUL RAPORU 3

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Mitokondriyal dinamikte rol oynayan proteinler

Tablo 3-1: TED yöntemi ile elde edilen verilerin özellikleri

Tablo 3-2: Primer bilgileri

Tablo 3-4: PZR bileşenleri

Tablo 3-5: PZR koşulları

Tablo 4-1: Olgu-1-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-2: Olgu-2-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-3: Olgu-3-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-4: Olgu-4-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-5: Olgu-5-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-6: Olgu-6-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-7: Olgu-7-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-8: Olgu-8-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-9: Olgu-9-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-10: Olgu-10-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-11: Olgu-11-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-12: Olgu-12-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-13: Olgu-13-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-14: Olgu-14-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-15: Olgu-15-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-16: Olgu-16-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-17: Olgu-17-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-18: Olgu-18-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-19: Olgu-19-Pİ kadın olgunun TED analizinde saptanan ve Pİ ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-20: Olgu-20-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-21: Olgu-21-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-22: Olgu-22-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-23: Olgu-23-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-24: Olgu-24-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-25: Olgu-25-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-26: Olgu-26-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-27: Olgu-27-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-28: Olgu-28-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-29: Olgu-29-Pİ kadın olgunun TED analizinde saptanan ve Pİ ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-30: Olgu-30-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-31: Olgu-31-Pİ kadın olgunun TED analizinde saptanan ve Pİ ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-32: Olgu-32-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-33: Olgu-33-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-34: Olgu-34-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Tablo 4-35: Olgu-35-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Makromoleküllerin mitokondride enerjiye dönüşüm yolakları

Şekil 2-2: Mitokondrinin yapısı

Şekil 2-3: Mitokondriyal füzyon ve fisyon dinamiği

Şekil 2-4: Kadın üreme sistemi ve gebeliğin oluşma süreci

Şekil 2-5: Erkek üreme sistemi ve spermatogenez

Şekil 3-1: Biyoinformatik analiz iş akış şeması

Şekil 3-2: FASTQC kalite raporu örneği

Şekil 3-3: TED ve TGD verisinde varyant çağırma aşamasında kullanılan iş akışları

Şekil 3-4: Varyant çağırma ve filtreleme metotlarının performans karşılaştırmaları

Şekil 3-5: ACMG kılavuzu varyant sınıflandırma kriterleri

Şekil 3-6: Gen listesinin oluşturulması

Şekil 4-1-1: Olgu-1-TGK kadın olgu aile ağacı

Şekil 4-1-2: *ABCA4* geni *burden* analiz sonucu

Şekil 4-2-1: Olgu-2-TGK kadın olgu aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-2-2: Olgu-3-TGK TED analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritası

Şekil 4-3-1: Olgu-3-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-3-2: *GATA1* geni *burden* analizi sonucu

Şekil 4-4-1: Olgu-4-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-4-2: *ABCA4* geni *burden* analiz sonucu

Şekil 4-5-1: Olgu-5-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-5-2: *ABCA4* geni *burden* analiz sonucu

Şekil 4-6: Olgu-6-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-7-1: Olgu-7-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-7-2: *MUC3A* geni *burden* analiz sonucu

Şekil 4-8: Olgu-8-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-9: Olgu-9-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-10: Olgu-10-TGK çiftinin ağacı görüntüsü

Şekil 4-11-1: Olgu-11-TGK çiftinin ağacı görüntüsü

Şekil 4-11-2: *TTC21B* geninin *burden* analizi sonucu

Şekil 4-12: Olgu-12-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-13-1: Olgu-13-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-13-2: TGK-13 olgusunda bulunan genlerin yolak etkileşim haritası

Şekil 4-14: Olgu-14-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-15: Olgu-15-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-16-1: Olgu-16-TGK çiftinin ağacı görüntüsü

Şekil 4-16-2: *CCDC141* geni *burden* analizi sonucu

Şekil 4-17-1: Olgu-17-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-17-2: *ABCA4* geni *burden* analiz sonucu

Şekil 4-18: Olgu-18-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-19: Olgu-19-Pİ kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-20: Olgu-20-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-21: Olgu-21-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-22-1: Olgu-22-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-22-2: Olgu-22-TGK *MUTYH*:c.461G>A varyantı Sanger konfirmasyonu görüntüsü

Şekil 4-22-3: Olgu-22-TGK TED analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritası

Şekil 4-23-1: Olgu-23-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-23-2: Olgu-23-TGK *MUTYH*:c.800C>T varyantı Sanger konfirmasyonu görüntüsü

Şekil 4-23-3: Olgu-23-TGK TED analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritası

Şekil 4-24: Olgu-24-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-25: Olgu-25-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-26-1: Olgu-26-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-26-2: Olgu-26-TGK olgu *WNT10A*:c.682T>A varyantı Sanger konfirmasyonu görüntüsü

Şekil 4-26-3: *MUC4* geni burden analiz sonucu

Şekil 4-27: Olgu-27-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-28: Olgu-28-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-29: Olgu-29-Pİ kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-30-1: Olgu-30-TGK çiftinin aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-30-2: *ABCA4* geni *burden* analiz sonucu

Şekil 4-31: Olgu-31-Pİ kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-32: Olgu-32-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-33: Olgu-33-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-34: Olgu-34-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

Şekil 4-35: Olgu-35-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG: Amerikan Tıbbi Genetik Derneği

AFLAS: Antifosfolipit Antikor Sendromu

ASRM: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği

dNTP: Deoksiribonükleotid Trifosfat

DRP: Dynamin - İlişkili GTPaz Proteini

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FHA: Fonksiyonel Hipotalamik Amenore

FSH: Follikül Stimülan Hormon

ER: Endoplazmik Retikulum

ETS: Elektron Taşıma Sistemi

GH: Gebelik Haftası

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

HSG: Histerosalpingografi

IUMF: Intrauterin Mort Fetus

LH: Luteinizan Hormon

mtDNA: Mitokondriyal DNA

NF-κB: NF-κB, Nuclear Faktör Kappa B Sinyal Yolağı

NOA: Non Obstrüktif Azoospermi

OA: Obstrüktif Azoospermi

OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon Sistemi

Pİ: Primer İnfertilite

POY: Prematür Ovaryen Yetmezlik

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rh: Rhesus Faktörü

PKOS: Polikistik Over Sendromu

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

Sİ: Sekonder İnfertilite

TED: Tüm Ekzom Dizileme

TGD: Tüm Genom Dizileme

TGK: Tekrarlayan Gebelik Kaybı

VUS: Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant (*Variant of Uncertain Significance*)

YND: Yeni Nesil Dizileme

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZPBP: Zona Pellusida Bağlayıcı Protein

ÖZET

Gezik, C. (2024). Mitofusin 2 (*MFN2*) Geni ile İlişkili Yolakların Primer İnfertilite ve Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Üzerine Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

İnfertilite, tüm dünyada üreme çağındaki çiftlerin %12,6'sını etkileyen yaygın bir sorundur. Olguların yaklaşık %50'sinde genetik etiyolojinin rol oynadığı düşünülmektedir ancak, ilişkili moleküler mekanizmalar henüz net olarak tanımlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda mitokondriyal dinamiğin düzenlenme kusurlarının primer ve sekonder infertilite ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır. Daha önce laboratuvarımızda yürütülen çalışmalarda primer veya sekonder infertilite tanısı konulan kadın ve erkek vakalara tüm ekzom dizileme (TED) analizi yapılmış ve infertilite ile ilişkisi olduğu düşünülen genlerin varyantları analiz edilmiştir. Bu tez çalışmasında amacımız, TED datasında mitokondriyal füzyon ile ilişkili Mitofusin 2 (*MFN2*) geni ve aynı yolakta yer alan gen varyantlarının infertilite ile ilişkisinin araştırılmasıdır. Tez kapsamında, mitokondriyal dinamik ile ilişkili olan 389 gene ait varyantlar analiz edilmiştir. *MFN2* geni ile ilişkili yolakların yanı sıra hastalık ile ilişkili diğer gen varyantlarının incelenmesi için HPO, ClinVar, *in silico* tahmin araçlarında patojenik, muhtemelen patojenik ve önemi belirsiz olarak bildirilen gen varyantları araştırma kapsamına dahil edilerek yeniden analiz edilmiştir. Bu tez sonucunda, 12 olguda *MFN2* yolağı ile ilişkili genlerde, 17 olguda mitokondri ile ilişkili genlerde ve 21 olguda infertilite ile ilişkili diğer genlerde patojenik varyant saptanmıştır. Elde edilen bulgular, özellikle tekrarlayan düşüklerde *MFN2* ilişkili mitokondriyel dinamiğin önemli rolü olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mitofusin 2, İnfertilite ve Tekrarlayan Gebelik Kaybı, Mitokondriyal Dinamik, Tüm Ekzom Dizileme, Oksidatif Stres

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 39278-TYL-2022-39278) ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) A Grubu Acil Ar-Ge Proje Destek Programı kapsamında (Proje No: 28416) desteklenmiştir. Tez araştırmasında yer alan veri ön-işleme adımları ve deneme süreçleri kısmi olarak TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir

ABSTRACT

Gezik, C. (2024). Investigation of the Effect of Mitofusin 2 (*MFN2*) Gene-Associated Pathways on Primary Infertility and Recurrent Pregnancy Loss. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master's Thesis. Istanbul.

Infertility is a condition affecting 12,6% of couples of reproductive age worldwide and approximately 50% of the cases are considered to have an underlying genetic etiology. However, the associated molecular mechanisms have not been defined clearly yet. Recent studies have highlighted that regulation defects of mitochondrial dynamics may be associated with primary and secondary infertility. In the previous studies conducted in our laboratory, whole exome sequencing (WES) analysis was performed in female and male cases who were diagnosed with primary or secondary infertility and the variants of genes considered to be associated with infertility were analyzed. The aim of this thesis study is to investigate the Mitofusin 2 (*MFN2*) and related mitochondrial fusion genes involved in the mitochondrial fusion pathway associated with infertility in this WES data. In this thesis, variants of 389 genes associated with mitochondrial dynamics were analyzed. In order to examine the pathways associated with the *MFN2* gene as well as other gene variants that may may contribute the clinical phenotype, gene variants reported as pathogenic, possibly pathogenic and of uncertain significance in HPO, ClinVar, in silico prediction tools were re-analyzed in the scope of the study. After bioinformatics analysis, selected significant variants was confirmed by the Sanger sequencing method. As a result of this thesis, pathogenic variants were found in genes related to MFN2 pathway in 12 cases, in genes related to mitochondria in 17 cases and in other genes related to infertility and recurrent pregnancy loss in 21 cases. The findings emphasize the important role of *MFN2*-related mitochondrial dynamics, especially in recurrent miscarriages.

Key Words: Mitofusin 2, Infertility and Recurrent Pregnancy Loss, Mitochondrial Dynamics, Whole Exome Sequencing, Oxidative Stress

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (Project No: 39278 — TYL-2022-39278) and Turkish Health Institutes Presidency (TUSEB) Group A Emergency R&D Project Support Program (Project No: 28416). The data pre-processing steps and testing processes reported in this thesis research were partially performed at TUBITAK ULAKBIM, High Performance and Grid Computing Center (TRUBA resources).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, tüm dünyada üreme çağındaki çiftlerin %12,6'sını etkileyen yaygın bir sorundur (WHO, 2023) ve olguların yaklaşık %50'sinde genetik etiyolojinin rol oynadığı düşünülmektedir (Zorrilla and Yatsenko, 2013, Demain et al., 2017). İnfertilite, primer ve sekonder infertilite olarak iki ayrı grup altında değerlendirilmektedir. Primer infertilite, bir yıldan uzun süre içerisinde gebeliğin hiç oluşmaması olarak tanımlanmakta ve çiftlerin yaklaşık %5-10'unda gözlenmektedir (Boivin et al., 2007, WHO, 2023). Sekonder infertilite içerisinde değerlendirilen tekrarlayan (iki veya üzeri) gebelik kaybı (TGK) ise dünya genelinde çiftlerin yaklaşık %5-7'sini etkileyen bir üreme sağlığı sorunudur (WHO, 2023). Tekrarlayan gebelik kaybının etiyolojisinde kromozomal anomaliler, tek gen mutasyonları, anatomik uterin kusurlar, otoimmün hastalıklar ve endometrial disfonksiyonlar yer almaktadır (Dimitriadis et al., 2020). TGK'nın yaklaşık %50'si bu risk faktörleri ile açıklanabilse de %50'sinde neden olan ilişkili moleküler mekanizmalar henüz tanımlanamamıştır (van Dijk et al., 2020, Alijotas-Reig and Garrido-Gimenez, 2013). Güncel çalışmalarda mitokondriyal homeostazı düzenleyen füzyon ve fisyon süreçleri ile ilişkili mitokondriyal dinamiğin düzenlenme kusurlarının ve oksidatif stresin primer infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkisi vurgulanmaktadır.

Mitokondriler, solunum ve enerji üretimi gibi hücresel fonksiyonlarının yanı sıra steroid ve yağ asidi sentezi, aminoasit, karbonhidrat ve protein metabolizması, kalsiyum homeostazı ve apoptozda rol oynamaktadırlar. Mitokondriler, hücresel enerji ihtiyacına göre ve metabolik uyaranlara yanıt olarak füzyon ve fisyon yoluyla boyutunu ve şeklini uyarlama yeteneğine sahiptir (Mishra and Chan, 2014b). Bu dinamik döngü, hücresel ve mitokondriyal homeostazın korunmasını sağlamaktadır. Hücrenin enerji santrali olarak oksijen üretiminin %90'ından sorumlu olan mitokondriler, reaktif oksijen türlerinin de kaynağıdır. Mitokondriler, üreme ve gelişim süreçlerinde de kritik rol oynamaktadır. Olası bir hasarının tamir edilememesi mitokondriyal disfonksiyona ve üreme yaşlanmasına ile neden olmaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon, oositin folliküler gelişiminin ve kalitesinin olumsuz yönde etkilenmesine yol açmaktadır (Demain et al., 2017, Zhang et al., 2019). Ayrıca, erken gebelik kaybı (Cai et al., 2018), preeklampsi (Hu and Zhang, 2022), intrauterin gelişme geriliği (Xu et al., 2021) gibi durumlarda plasental mitokondriyal disfonksiyonun rol oynadığı gösterilmiştir.

Mitofusin 2 geni türler arasında yüksek oranda korunmuştur ve mitokondriyal dinamikte füzyon ve kümelenme süreçlerinde rolü olan transmembran yerleşimli bir GTPaz kodlamaktadır (Franco et al., 2016, Zou et al., 2021). Bu gen, mitokondri dinamiğinin düzenlenmesinde, mitokondri-endoplazmik retikulum membran etkileşiminde ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonun düzenlenmesinde de rol almaktadır (Zou et al., 2021). *MFN2* proteininin oosit gelişiminde ve ovarian folikül rezervinin korunmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Zhang et al., 2016, Zhang et al., 2019).

Tüm ekzom dizileme (TED), genomun protein kodlayan tüm bölgelerinin dizilendiği bir yeni nesil dizileme (YND) yöntemidir. YND, araştırma ve tanıda klinik bulgularla ilişkili patojenik varyantların tespit edilebilmesi açısından önem taşımaktadır (Jelin and Vora, 2018, Quintero-Ronderos and Laissue, 2019). TED yönteminin, tekrarlayan gebelik kayıplarının araştırılmasında altta yatan genetik faktörlerin analiz edilmesine, varyant profillerinin belirlenmesine, önemi bilinmeyen varyantlar ile patolojik ve patolojik olmayan varyantların sınıflandırılmasına ve hastalığın etiyolojisinin aydınlatılmasına fayda sağladığı gösterilmiştir (Najafi et al., 2021).

Üreme ve gelişim süreçlerinde mitokondriyal genlerin öneminin ve *MFN2* geninin oosit maturasyonundaki rolünün araştırıldığı çalışmalar mevcut olsa da bu araştırmalar gen ekspresyonu profillerinin belirlenmesi ve protein seviyelerinin değerlendirilmesi ile sınırlıdır (Liu et al., 2002, Wang et al., 2020, Zhang et al., 2016, Zhang et al., 2019, Zou et al., 2021). Literatürde, bu hasta grubunda primer infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı olan kadın hastalarda, altta yatan moleküler nedenlerin yeni nesil dizileme yaklaşımı kullanılarak araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır ve daha çok olgu çalışmaları ile kısıtlı kalmaktadır (Maddirevula et al., 2020, Qiao et al., 2016, Quintero-Ronderos et al., 2017). Diğer yandan, bilgimiz dahilinde, tekrarlayan gebelik kaybının etiyolojisinin araştırıldığı TED çalışmalarında mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili genlere yönelik araştırma yapılmamıştır (Najafi et al., 2021, Quintero-Ronderos et al., 2017).

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda daha önce yürütülmüş olan araştırmalar kapsamında, primer infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı olan 25 kadın olgu ve ayrıca 10 çiftin dahil olduğu toplam 45 bireye ait TED verisi analiz edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ise, olgulara ait TED verisi

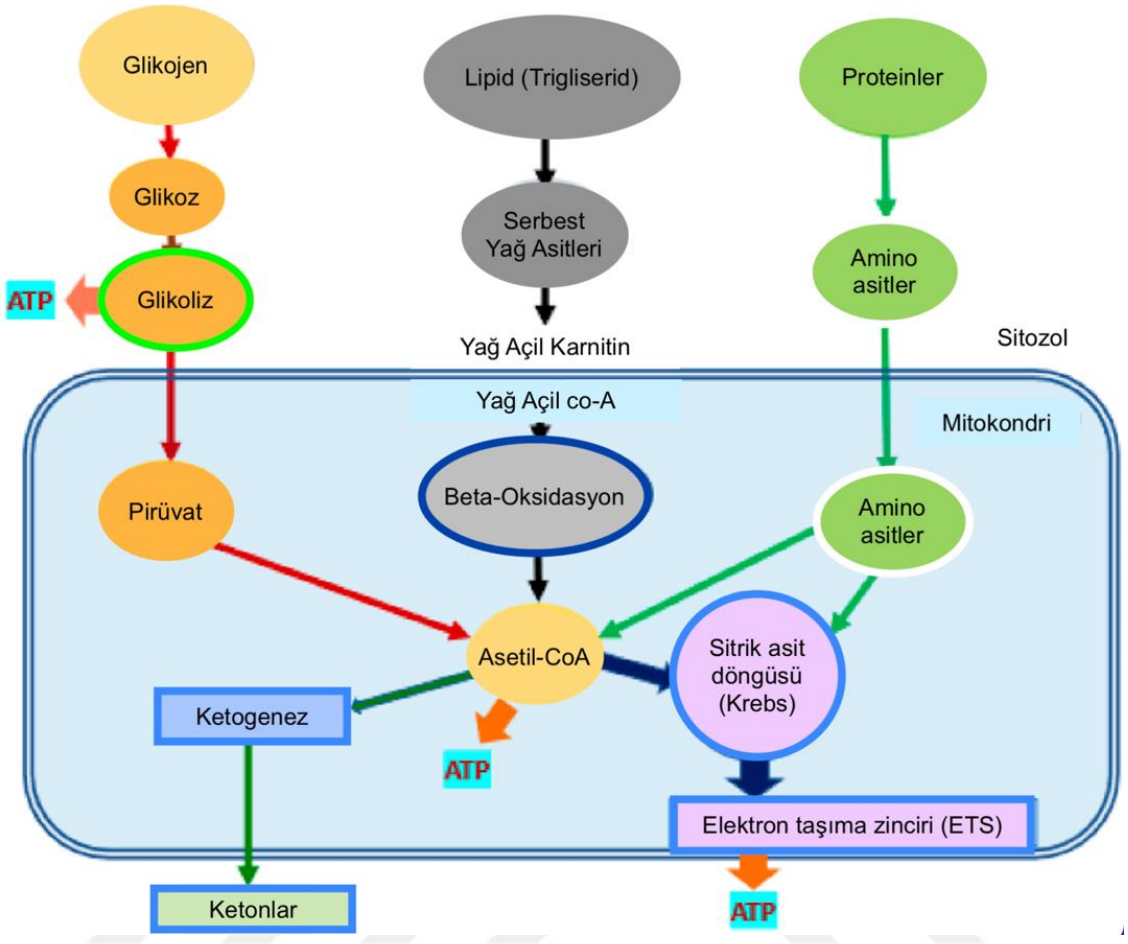
MFN2 ile ilişkili genler açısından literatür bilgisi, yolak haritaları ve gen - gen etkileşimleri içeren veritabanları aracılığıyla yeniden analiz edilerek değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, mitokondriyal dinamik ilişkili *MFN2* ve *MFN1* genleri ile aynı yolakta bulunan 389 genin varyantları analiz edilmiştir. HPO (Human Phenotype Ontology, https://hpo.jax.org/app/)'da mevcut infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı ilişkili genler ve patojenite tahminlemesinde kullanılan *in silico* tahmin araçları ve ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) verileri kullanılmıştır. Verilerin yeniden analizi sonucunda, kadın olguların %2,8'inde (n=1) *MFN2* geninde, %34,28'inde (n=12) ise mitokondriyal dinamik ilişkili genlerde kliniği açıklayabilecek varyant tespit edilmiştir. Ancak, genotip-fenotip korelasyonunun kurulabilmesi için daha geniş olgu sayısı ile ileri araştırmaların ve fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondri

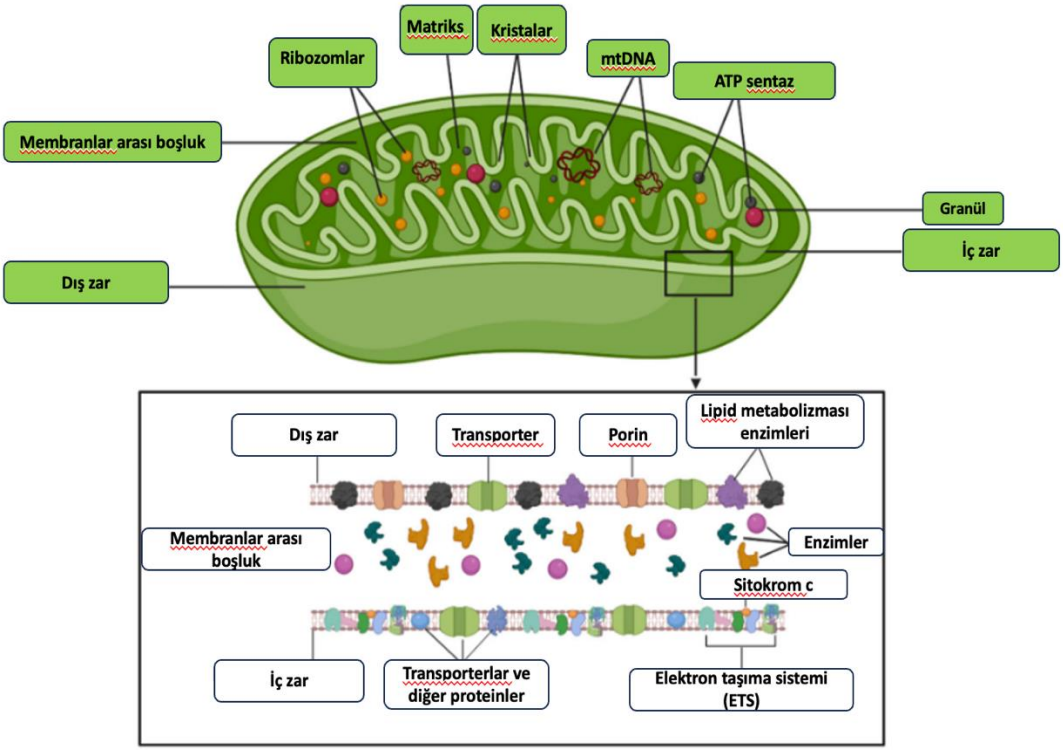
2.1.1. Mitokondrinin Fonksiyonu ve Yapısı

Hücrenin enerji santrali olarak adlandırılan mitokondri, neredeyse tüm ökaryotlarda bulunan çift zincirli ve halkasal DNA'ya sahip bir organeldir. İnsan mitokondri genomu 16.569 baz çiftlik DNA'dan oluşur ve 37 geni kodlar (Clark et al., 2019). Canların temel ortak özelleri arasında yer alan metabolik faaliyetlerin ve homeostazın sürdürülmesinde önemlidir. Mitokondri, canlılık için gerekli bu süreçlerin temel yapı taşıdır ve hücrenin iç işleyişini yönlendiren mikroskobik dünyada enerji üretimi ve hücresel solunum, apoptoz, hücre kaderinin belirlenmesi, stres yanıtı, immünite ve hücresel yaşlanma, kalsiyum homeostazı, metabolizma (karbonhidrat, aminoasit ve yağ metabolizması, steroid ve yağ sentezi) gibi bir dizi biyosentez yolağında öncü role sahiptir. Mitokondride enerji üretimi Şekil 2-1'de gösterilmiştir. Mitokondri, çeşitli mekanizmalarla hücre kaderinin kontrolünü sağlar. Hücresel enerji üretiminin büyük bölümü temel işlevi ATP sentezi olan mitokondri yoluyla gerçekleştirilir. Organizma karbonhidrat, lipid ve proteinleri yapıtaşları olan glikoz, yağ asitleri ve aminoasitlerine dönüştürür ve ATP üretimi için ana substratlar olarak kullanır (Virmani and Cirulli, 2022). Bu substratlardan gelen enerjinin büyük kısmı mitokondride üretilir (Şekil 2-1). Bunun dışında hücre detoksifikasyonu, ketogenez, glikogenez ve hücresel stabilizasyonunda da mitokondri rol oynar (Virmani and Cirulli, 2022). Hücre için temel fonksiyonlara sahip olması nedeniyle mitokondriyal fonksiyon bozukluğu durumunda pek çok hastalık meydana gelebilmektedir.



Şekil 2-1: Makromoleküllerin mitokondride enerjiye dönüşüm yolakları. Şekil (Virmani and Cirulli, 2022)'den yeniden uyarlanmıştır.

Mitokondrinin yapısı, bir iç zar ve iç zarı çevreleyen dış zardan oluşan çift katlı bir yapıdadır. İç ve dış zarlar arasında membranlar arası boşluk bulunur ve yüzey alanı arttığında iç zar katlanarak krista adı verilen kıvrımları oluşturur. Solunum zinciri komplekslerinin yoğun olarak bulunduğu kristalar, mitokondriye gelişmiş bağlantılar sağlar, hücre içi ve hücre dışı ile iletişim kurmasına yardımcı olur (Shen, 2022). Hücre içinde iyonların, metabolitlerin ve diğer hücre içi sinyal moleküllerinin taşınmasını sağlarken hücre dışında mitokondriyal sitokin (mitokin) salgılayarak stres yanıtına etki edebilmektedir (Shen, 2022). I-V enzim kompleksleri ile koenzim Q ve sitokrom C adı verilen elektron taşıyıcılarından oluşan oksidatif fosforilasyon sistemi (OXPHOS), mitokondrinin iç zarındaki çift katlı lipid katmanına entegre durumdadır (Yildirim, 2024). Mitokondrinin yapısı Şekil 2-2'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2-2: Mitokondrinin yapısı (Zhang et al., 2021)'dan uyarlanmıştır.

Elektron taşıma zinciri (ETS) kompleksleri mitokondri iç zarının proton gradiyentini oluşturmada hücresel solunum sistemi ile birlikte çalışır. OXPHOS sistemi çeşitli redoks reaksiyonları, protein kompleksleri arasındaki elektron transferini ve elektronların oksijene (O_2) aktarılması sürecini içerir. Bu süreçte serbest elektronlar yanlış veya erken şekilde moleküler oksijen ile etkileşime girdiğinde solunum zinciri etkilenir ve reaktif oksijen türleri (ROT) olarak isimlendirilen serbest radikaller oluşur. Reaktif oksijen türleri, protein ve lipidlerin yapısını bozalabilen tehlikeli yan ürünler olarak veya tersine, hücresel fizyolojinin temel sinyal bileşenleri olarak faaliyet gösterebilir. Ancak ROT üretimi sonucunda hasarlı mitokondri bileşenleri meydana gelebilir. Oksidatif strese yanıt olarak ROT'un zararlı etkilerinin detoksifikasyonunda sağlayan mekanizmalar mevcuttur.

Her hücrede mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın çok sayıda kopyası bulunur ve hücrenin enerji ihtiyacına göre farklı organizmalarda mitokondri sayısı (1-10.000) ve büyüklüğü (0,5-10 µm) değişiklik gösterir (Yildirim, 2024). Mitokondriyal genom hızlı replike olarak metabolik ihtiyaçlara dinamik halde uyum sağlarken hatalar da meydana gelir. Bu hataların bazıları mitokondriyal replikasyon mekanizması kusularından kaynaklanırken bazıları ise ROT aracılı hasarlar ile indüklenir (Li et al., 2019). Bunun sonucunda oluşan yabani tip mtDNA kopyaları ile mutant tip mtDNA kopyaları hücre içerisinde bir arada bulunur. Heteroplazmi olarak adlandırılan bu durum, çeşitli hastalıkların ortaya çıkışında rol oynar. Mitokondri, kendi DNA'sına sahip olmakla birlikte temel mitokondriyal fonksiyonlar için gerekli proteinlerin çoğu nükleer DNA tarafından kodlanmaktadır (Yildirim, 2024). Mitokondriyal süreçlerin devamlılığının sürdürülmesinde nüklear genom tarafından kontrol edilen kalite kontrol süreçleri ve nükleus-mitokondri etkileşimleri önemlidir. Mitokondriyal kalite kontrol süreçlerinde mitokondrinin homeostazını sağlamasında önemli olan ve ROT ile uyarılan sinyallemeyi düzenleyen antioksidan savunma mekanizmaları yer alır. ROT'leri aşırı düzeylerde zarar verici etki gösterirken düşük seviyelerde düzenleyici sinyaller olarak işlev gösterirler. Bu mekanizmalar proteinin taşınma, katlanma ve parçalanma süreçlerini kontrol eder. Mitofaji yoluyla mitokondrinin yıkımı için otofaji süreci tetiklenir. Mitokondrinin kendisi tarafından düzenlenen kalite kontrol süreçlerinin yanında, mitokondri - çekirdek etkileşiminde retrograd sinyal yolakları aracılığıyla gerçekleşen süreçler önemlidir. Ayrıca, transkripsiyon faktörleri aracılığla nükleer ve mitokondriyal genlerin ekspresyonu regüle edilir (Kotiadis et al., 2014). Mitokondride genetik veya çevresel nedenlerle hasar meydana geldiğinde, protein bileşenlerinin aktivitesindeki kusurlar, yanlış katlanmalar veya birikimler sonucunda mitokondri doğru şekilde işlev gösterememeye başlar. Mitokondriyal proteinlerin yenilenmesinde nükleer genom ve mitokondriyal genomun koordine bir şekilde etkileşimi gerekir. İnsan mitokondriyal genomu, solunum zinciri komplekslerinin kritik bileşenleri olan 13 proteini ve iki ribozomal alt birimi ve protein translasyonu için gereken tRNA'ları kodlar ve diğer tüm mitokondriyal proteinler nükleer genom tarafından kodlanır (Peralta et al., 2012, Kotiadis et al., 2014). Bunun yanı sıra nükleer genom, mitokondriyal genomun işlevsel ve yapısal düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Mitokondriyal DNA tarafından kodlanan gen ifadesinin ve replikasyonun düzelenmesinden sorumlu olan mitokondri hedefli proteinler de nükleer genom tarafından kodlanır.

Mitokondri ve nükleer genomlar arasındaki iletişim, hücresel stres yanıtını kontrol edilmesi, onarım, hayatta kalma sinyalleri ve hücre ölümü süreçleri için ATP üretiminin artırılması için önemlidir. *p53*, hem mitokondride hem de nükleusta bulunur ve onarım, apoptoz, hücre döngüsü regülatörleri ve hayatta kalma sinyallerinin düzenlenmesindeki en önemli faktördür. *MFN2*'nin transkripsiyonunun da doğrudan düzenleyicisidir. mtDNA hasarına yanıtta Pol gama ile etkileşime girerek mtDNA transkripsiyonunu düzenleyebilmektedir ve *p53* kaybı mtDNA hasar duyarlılığında artış ile ilişkilendirilmektedir. Nükleer *p53*, otofaji ile ilişkili genlerin transkripsiyonu ile otofajiyi artırır.

Mitokondri genel olarak boyut ve şekil bakımından bakterilere benzer ve ökaryotik hücrelerin ilkel atasında bulunan bakterilerden evrimleştiği düşünülmektedir. Mitokondriyal genom nükleer genoma kıyasla çok daha küçük boyuttadır ve bakterilere benzer şeklilde halkasal DNA molekülü içerir. Ayrıca, mitokondrilerin yapısal olarak tipik prokaryotik ribozomlara benzeyen ribozomları bulunur. Mitokondri, solunum yoluyla enerji üretimi için özelleşmiştir ve tüm ökaryotlarda bulunmaktadır. Mitokondrisi olmayan ve solunum yapmayan birkaç ökaryot olduğu bilinmekle birlikte bu organizmalar da mitokondriyal organelin kalıntıları bulunmaktadır. Mitokondri içermediği için solunum zincirinin sitoplazma membranında gerçekleştiği bakterilerden farklı olarak ökaryotlarda, solunum enzimleri daha fazla katlanma alanı oluşturmak için çok sayıda kıvrıma sahip olan iç mitokondriyal zar üzerinde bulunur (Clark et al., 2019).

Ökaryotik canlıların hücresel fonksiyonlarında, hücrenin enerji metabolizmasında, apoptozda ve birçok hastalığının mekanizmasında mitokondriler önemli rol oynamaktadır. Bu süreçlerde benzer olarak enerji ihtiyacı ve ayrıca hücre ölümü ve otofaji süreçleri vardır ve bu nedenle mitokondri ile ilişkilendirilebilmektedir. Aynı zamanda korunmuşluk oranının yüksek oluşu ve oksijenli solunum yapan tüm ökaryotik hücrelerde bulunması sebebiyle de canlıların sınıflandırılmasında barkod denilen ve mitokondriyal DNA'nın standart bir bölgesinin PZR ile çoğaltılması yoluyla tür tayininde, adli bilimlerde, genetik çeşitlilik çalışmalarında ve birçok alanda kullanılmaktadır. Evrimsel ve hücresel süreçlerde ise nükleusu ön plana alan yaklaşımın daha yaygın olduğu bilinmektedir (Deonath, 2021).

2.1.2. Mitokondrinin Evrimi

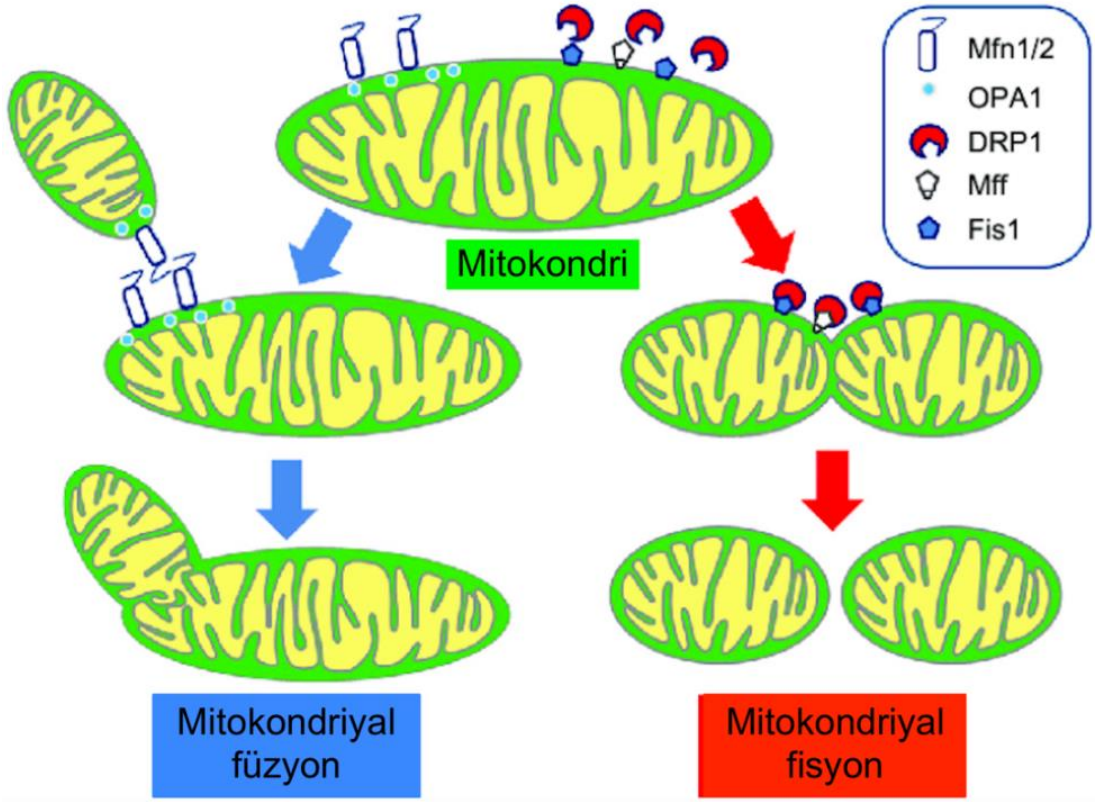
Mitokondri, bakterilerdekine benzer şekilde sirküler ve çift sarmallı yapıda kendi DNA'sına sahip olan ve hücre içerisinde serbest halde kendini kopyalabilen bir organeldir. Ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde bulunan evrensel genetik koddan farklı bir genetik koda sahiptir ve bu özelliği ile prokaryotik genoma nükleer genomdan daha yakındır (Habbane et al., 2021). Mitokondrinin (ve benzer şekilde kloroplastın) bu özel yapısı bağımsız bir bakteri olarak yaşadığı evrimsel geçmişini yansıtmaktadır. Mitokondrilerin mor bakterilerden ve kloroplastların siyanobakterilerden evrimleşmesi, endosimbiyozun (Yunanca; iç-ortak yaşam, bir organizmanın diğer organizma içinde yaşaması ve etkileşmesi) iyi bilinen örneklerinden biridir.

Endosimbiyoz teorisi, 1981 yılında Lynn Margulis tarafından yayınlanan *Hücre Evriminde Ortak Yaşam (Symbiosis in Cell Evolution)* isimli makalede ortaya koyulmuştur. Margulis, ökaryotik hücrelerin belirli bir düzende bir araya gelen ve etkileşen canlılardan oluşan topluluklar olarak ortaya çıktığını, prokaryotik canlıların ise besin kaynağı olarak bir av veya parazit olarak konak hücreye girmiş olduğunu öne sürmüştür (Margulis, 1981). Simbiyotik teoriye göre mitokondri, modern ökaryotik hücrelerin ataları tarafından uzun zaman önce yutularak hücre içine alınan alfaproteobakterilerden köken almaktadır (Clark et al., 2019) ve ökaryot hücrelerde bulunan mitokondri ve kloroplast gibi zarlı organellerin kökeni, birlikte yaşadığı ilkel prokaryotik canlı topluluklarına dayanmaktadır. Evrimsel süreçte bu bakteriler, yer ve besin karşılığında solunum yoluyla enerji üretmeye başlayarak sınırlı bir alanda özelleşmiş ve kendi başlarına hayatta kalma yeteneklerini kaybederek mitokondriye dönüşmüştür. Simbiyoz sonucunda bileşik bir organizma meydana geldiğinde her iki genomun evrimi de etkilenmektedir. Örneğin kloroplastlar, serbest yaşayan siyanobakterilerin gen sayısının %10'undan daha azına sahiptir ancak orijinal siyanobakteriyel genlerin çoğu, bitkinin nükleer genomuna aktarılmıştır. Bu genler *Arabidopsis thaliana* bitkisinin protein kodlayan genlerinin yaklaşık %18'ini oluşturmaktadır (Martin et al., 2002). Organel genomları ve kodladıkları genler bakterilerinkine çok benzediğinden, bu organellerin simbiyoz yoluyla ortaya çıktığı yönündeki teori hakimdir (Clark et al., 2019). Simbiyotik teori, karmaşık ökaryotik hücrenin, farklı soylardan organizmaların birleştiği bir dizi simbiyotik olayla ortaya çıktığını öne sürer. Simbiyontlar (ortakyaşarlar), zaman içerinde kendi başına hayatta

kalma yeteneğini kaybederek konak organizmaya belirli işlevler sağlamak konusunda özelleşmiştir.

2.2. Mitokondriyal Dinamik

Mitokondriler sayı, morfoloji ve büyüklüklerini birleşme (füzyon), bölünme (fisyon) ve mitofaji yoluyla dinamik olarak değiştirerek stres ve fizyolojik değişimlere yanıt verirler. Ayrıca, hücrenin enerji ihtiyacının verimli bir şekilde karşılanması için hücre içerisinde yer değiştirebilen hareketli yapılardır (Green et al., 2022). İnsanda hücrenin işlevine göre mitokondri sayısı birkaç yüzden binlere kadar değişebilmekte ve her mitokondride 2-19 mitokondriyal DNA kopyası bulunmaktadır (Samiec and Skrzyszowska, 2021, Mishra and Chan, 2014a, Chen and Chan, 2017, Miao et al., 2021). Mitokondrinin morfolojik olarak dinamik yapısı ilk kez Lewis ve Lewis'ın 1914 yılında ışık mikroskobu ile incelemesi sırasında tespit edilmiştir (Lewis and Lewis, 1914). Mitokondrinin dinamik füzyon ve fisyon mekanizmalarının kontrolü, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olan dynamin-ilişkili GTPaz proteinleri (DRP'ler) tarafından gerçekleştirilir (Praefcke and McMahon, 2004, Green et al., 2022). DRP'ler aracılığıyla GTP'ler hidrolize edilir ve membranın yeniden modellenmesi sağlanır. Dynamin, DRP ailesinin ilk tanımlanan üyesidir ve clathrin aracılı endositozda clathrin kaplı veziküllerin plazma zarından ayrılmasına aracılık etmektedir (Faelber et al., 2013, Green et al., 2022). Mitokondriyal füzyon ve fisyon dinamiği Şekil 2-3'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Mitokondriyal füzyon ve fisyon dinamiği. Şekil (Saotome et al., 2014)'dan uyarlanmıştır.

Mitokondriyal fisyon, mitokondrinin iki yavru organele bölünme sürecidir. Mitokondrinin fisyonu memelilerde DRP1 ve DRP1'in mitokondri ile ilişki kurmasını sağlayan dört adaptör (mitokondriyal fisyon faktörü (MFF), mitokondriyal dinamik proteini 49 (MID49), mitokondriyal dinamik proteini 51 (MID51) ve mitokondriyal fisyon 1 proteini (FIS1)) tarafından katalize edilir (Chan, 2012). Bu proteinin mayadaki homologu olan Dynamin-1 (Dnm1) de mitokondriyal fisyon süreçlerinde rol almaktadır.

Mitokondriyal füzyon, iki mitokondrinin birleşerek daha büyük bir mitokondri oluşturma sürecidir. Memelilerde mitokondriyal füzyon GTPaz'lar aracılığıyla gerçekleştirilir ve dış zarda mitofusinler (*MFN1* ve *MFN2*) aracılığıyla, iç zarda ise yine bir GTPazı kodlayan optik atrofi proteini 1 (*OPA1*) tarafından düzenlenir. MFN1 ve MFN2, Drosophila'daki Fzo (Fuzzy onion) proteinin insandaki homologudur (Santel and Fuller, 2001, Green et al., 2022). Halles ve Fuller 1997 yılındaki çalışmalarında, *Fzo1* geninin mitokondriyal füzyonda rol oynadığını ve mutasyonlarının erkek meyve

sineklerinde (*Drosophila melanogaster)* kısırlığa sebep olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra 1998 yılında Rapaport ve arkadaşları mayalarla yaptıkları çalışmada Fzo1 ve onun memeli ortologları olan *MFN1* ve *MFN2*'nin mitokondriyal füzyonda görevli olduğunu ortaya koymuştur (Rapaport, 1998, Green et al., 2022). Bunun yanı sıra, *MFN2* oksidatif metabolizma, mitofaji, apoptoz ve endoplazmik retikulum (ER) – mitokondri etkileşiminde spesik rol oynarken, *MFN1'e* göre daha düşük GTPaz aktivitesi göstermektedir (Green et al., 2022).

Mitokondriyal füzyon, mitokondriyal membran potansiyeli gibi biyoenerjetik özelliklerin dengesi, matriks bileşenlerinin ve hasarlı mitokondriyal DNA içeriğinin değişimi için önemlidir. Kalite kontrol süreçlerinin devamlılığı için gerekli olan mitofaji (hasarlı mitokondrinin uzaklaştırılması) de fisyon ve füzyon süreçlerinin bir parçasıdır. Evrimsel olarak korunmuş bir mekanizma olan mitofaji ile otofagozom-lizozom aracılığıyla hasarlı mitokondriler uzaklaştırılır (Di Rita et al., 2018). Mitokondri hücresel stres nedeniyle hasar gördüğünde, iç zarlarında sürekli depolarizasyon nedeniyle membran potansiyeli bozulur, dış membranda PINK1 stabilizasyonu kaybolur ve mitofaji tetiklenir. Hücrelerde artan ROT yükü sonucunda, füzyon ve fisyon dengesi bozulur ve mitofajide hatalar meydana gelir.

Fisyon ve füzyon süreçleri, mitokondriyal DNA'nın devamlılığı için kritik öneme sahiptir. Örneğin, mitokondriyal füsyon süreci için gerekli genlerin susturulması veya proteinlerin uzaklaştırılması hücrenin içerdiği mitokondri miktarının önemli oranda azalması ile sonuçlanır (Green et al., 2022). Memeli hücrelerinde mitokondriyal füzyonda meydana gelen hatalar OXPHOS aktivitesinde azalmaya neden olur. Mitokondriyal fisyon gerçekleşmediğinde ise mtDNA birikerek mitokondriyal tübülleri bozan kümeleşmiş büyük yapılar oluşur. Meydana gelen kümelenme ve birikim sonucunda mtDNA'nın dağılımı bozulur (Green et al., 2022).

2.2.1. Mitokondriyal Dinamik ile İlişkili Genler

Mitokondri, görevli olduğu biyolojik fonksiyonları ve kalite kontrol süreçlerini sürdürebilmek için dinamik olarak şekil, boyut, sayı ve hücre içi konumu açısından değişim gösterir. Dış membranda mitokondriyal fisyonu kontrol eden *DRP1, MFF, FIS1, MiD49* ve *MiD51* tarafından sürece dahil edilir. Mitokondriyal füzyon ise *MFN1* ve

MFN2 ve *OPA1* tarafından düzenlenmektedir. Mitokondriyal dinamik ile ilişkili proteinler Tablo 2-1'de gösterilmektedir.

Tablo 2-1: Mitokondriyal dinamikte rol oynayan proteinler

Mitokondriyal dinamik ile ilişkili proteinler	**Mitokondriyal dinamikteki rolü**
MFN2	Mitokondriyal füzyonda, yağ, kalsiyum homeostazı ve mitokondri fisyonu için önemli olan ER-mitokondri bağlanmasında görevlidir.
MFN1	Mitokondriyal füzyonda, ER-mitokondri bağlanmasında görevlidir.
OPA1	Mitokondrinin iç zarında lokalize olup ve iç zarın füzyonunu sağlar. Ayrıca OXPHOS komplekslerinin ve krista membran yapısının korunması için gereklidir.
DRP1	Füzyon ve fisyon proteinleri posttranslasyonel modifikasyona uğrar. Bu mekanizmalardan biri olan sumolasyon DRP1 proteinin stabilizasyonunda önem taşır.
PINK1	PINK1 / Parkin yolağı yaygın olarak Parkinson hastalığı ile ilişkilidir. Mitofaji sürecinde hasarlı mitokondrinin selektif biçimde parçalanmasından sorumludur.
PARKIN	DRP1'in ubikitinasyonuna aracılık ederek fisyon süreçlerinde ve MFN1'in ubikitinasyonunda görev alır.
MARCH5	DRP1'in ubikitinasyonuna aracılık ederek fisyon süreçlerinde yer alır.
HUWE1	Mitokondriyal kalite kontrolü ve hücresel homeostazın korunması için gerekli olan mitofajide rol oynar. Mitofajide mitokondriyal

	parçalanmayı teşvik etmek için LC3 ile etkileşen AMBRA1 ile ilişki kurar.
AMBRA1	Mitokondrinin fisyon yolu ile parçalanmasının ardından mitofaji yoluyla uzaklaştırılmasında görev alır.
FIS1	Mitokondri dış zarında bulunur, fisyon sürecinde görev alır.

2.2.2. Mitokondriyal Dinamik Genleri

MFN1 ve *MFN2* genleri %81'in üzerinde homolojiye ve benzer protein topolojisine sahiptir (Miao et al., 2021). *MFN1* ve *MFN2* genlerinin aşırı ekspresyonunun mitokondriyal ağın artışına ve karşıt bir etki ile mitokondriyal ROT'nin yıkılarak azalmasına neden olduğu görülmüştür. *DRP1* ve *FIS1*'in fazla ekspresyonunun ise mitokondriyal ağları azalttığı ve mitokondriyal ROT'yi arttığı tespit edilmiştir (Hung-Yu Lin, 2018).

2.3. Fertilite ve İnfertilite

2.3.1. Fertilite

Doğurganlık, yavru üretme kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Gebe kalma olasılığı bireyler arasında döngüden döngüye nispeten sabit kalırken, genellikle korunmasız ilişkinin ilk aylarında en yüksek seviyededir ve daha sonra bir bütün olarak popülasyonda kademeli olarak azalır. Doğurganlık popülasyonlar arasında farklılık gösterir ve hem erkeklerde hem de kadınlarda yaşla birlikte azalır, ancak yaşın etkileri kadınlarda çok daha belirgindir. İlerleyen yaşlardaki kadınlar ile erken 20'li yaşlarındaki kadınlarla karşılaştırıldığında, doğurganlık oranları yaklaşık yarı yarıya azalmaktadır (Dunson et al., 2004, Howe et al., 1985). Erkeklerde semen parametrelerinde 35 yaşından sonra tespit edilebilir şekilde düşüş gözlensede, erkek üreme potansiyeli yaklaşık 50 yaşından önce kayda değer bir azalma göstermemektedir (Dunson et al., 2004). Çiftlerde üreme açısından 'verimli aralık' (*fertile window*), en iyi şekilde ovülasyon günü ile sona eren altı günlük bir zaman aralığı olarak tanımlanır. En azından teoride, hem oositlerin hem de spermlerin canlılığının ve dayanıklılığı bu zaman aralığında en yüksek olması

beklenir (Wilcox et al., 1995, Brosens et al., 2006). Klinik amaçlar için, maksimum verimlilik aralığı, menstrüasyon arası sürelerin analizi, bazal vücut sıcaklığı kayıtları veya servikal mukus skorlarıyla tahmin edilebilir. Cinsel ilişkinin gebelikle sonuçlanma olasılığı en fazla ovulasyon gününde sona eren üç günlük aralıkta gerçekleşir. Doğurgan olduğu varsayılan 221 kadını kapsayan çalışmada, ovulasyonu takiben iki gün içinde cinsel ilişkiye girildiğinde en yüksek doğurganlık gözlemlenmiştir (Wilcox et al., 1995).

2.3.2. İnfertilite

İnfertilite, bir yıl boyunca düzenli ve korunmasız cinsel ilişki sonucunda gebelik oluşmaması durumu olarak tanımlanır. İnfertilite gebelik öyküsüne göre ikiye ayrılır. Eğer çiftlerin daha önce bir gebelik öyküsü var ise sekonder infertilite (Sİ), hiç gebeliğin oluşmaması ise primer infetilite (Pİ) olarak tanımlanır. 1990-2021 yılları arasındaki üreme sağlığı ve demografik çalışma verilerinin değerlendirildiği Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporuna göre dünya genelinde yaşam boyunca altı insandan birinde infertilite görülmesi beklenmektedir. Aynı çalışmaya göre yaşam boyu infertilite prevalansı %17,5, dönem prevalansı %12,6 olarak saptanmıştır. Yaşam boyu Pİ prevalansı %9,6, Sİ prevalansı %6,5 olarak raporlanmıştır (WHO, 2023). 2010 yılı verilerine göre Türkiye'de üreme çağındaki kadın popülasyonunda Pİ prevalansı %2,4, Sİ prevalansı %8 olarak saptanmıştır (Mascarenhas et al., 2012). DSÖ tarafından geniş çaplı ve çok uluslu yürütülen bir çalışmanın sonucuna göre infertilitenin nedeni çiftlerin %37'sinde kadın infertilitesi, %35'inde hem kadın hem erkek infertilitesi, %8'sinde ise erkek infertilitesidir (WHO, 2023).

2.3.3. Kadın İnfertilitesi

Kadın infertilitesinin en sık nedenleri, ovulasyon bozuklukları (%25), endometriyozis (%15), pelvik adezyonlar (%12), tubal oklüzyon (%11), diğer tubal/uterin anomaliler (%11), hiperprolaktinemi (%7) olarak sınıflandırılabilir. Ovulasyon bozuklukları kadın infertilitesinin en sık nedenidir. Oligoovulasyon/anovulasyon döllenecek yumurta yokluğu nedeniyle infertiliteye neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü ovulasyon kusurlarını dört gruba ayırmıştır:

1. Hipogonadotropik hipogonadal anovulasyon (örn. hipotalamik amenore)

2. Normogonadotropik normoöstrojenik anovulasyon (örn. polikistik over sendromu (PKOS))

3. Hipergonadotropik hipoöstrojenik anovulasyon (örn. prematür ovaryen yetmezlik)

4. Hiperprolaktinemik anovulasyon (örn: pitüiter adenom)

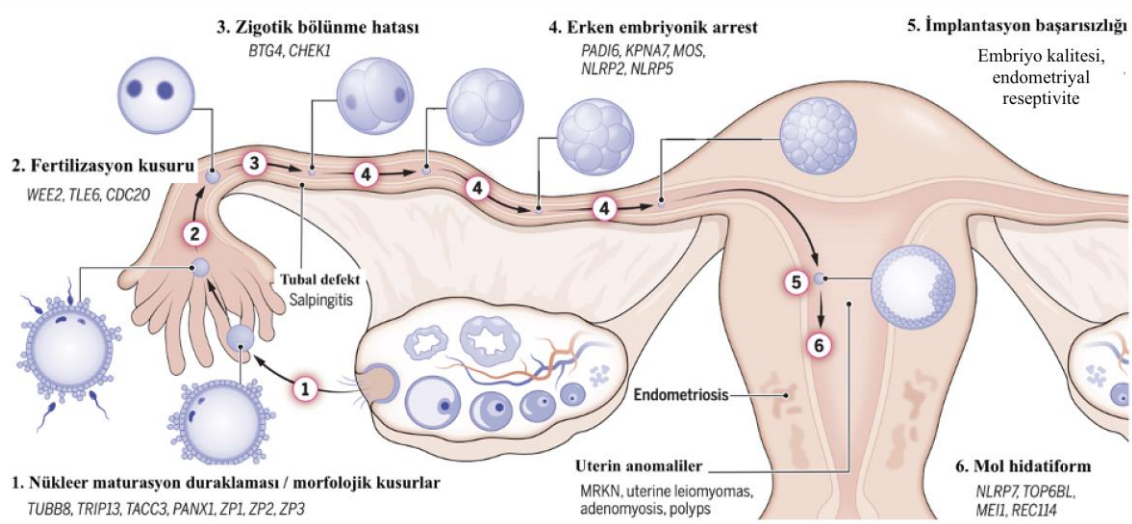
Hipotalamik amenore veya fonksiyonel hipotalamik amenore (FHA), hipotalamik GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) salınımında azalmaya neden olan yeme bozuklukları veya aşırı egzersizle ilişkilidir (Santoro et al., 1986). Azalmış kalori alımı, ilişkili kilo kaybı veya aşırı egzersiz, kortizol seviyelerinin yükselmesine ve bunun sonucunda GnRH'nin bastırılmasına yol açar (Ackerman et al., 2013). GnRH pulsatil salınımının azalma veya olmaması sonucu gonadotropin (FSH, LH) seviyelerinde azalma gerçekleşir ve anormal folikül gelişimi, anovulasyon ve düşük östojen düzeylerine neden olur (Perkins et al., 1999).

Normogonadotropik normoöstrojenik anovulasyonun en sık nedeni PKOS'tur (Hull, 1987). PKOS'da folikül gelişimindeki bir işlev bozuklukları nedenin ile anovülasyonun geliştiği düşünülmektedir. FSH (folikül stimülan hormon) ve östrojen değerleri normal sınırda, LH (luteinizan hormon) normal ya da yüksek izlenir (Fauser and Van Heusden, 1997).

Hipergonadotropik hipoöstrojenik anovulasyon, kadın yaşı ile ilişkili prematür ovaryen yetmezlik ve ovaryen direncin yer aldığı bir gruptur. Yukarıda da bahsedildiği gibi kadın yaşı ve fertilite arasında ilişki vardır. Yaşla beraber oosit kalite ve sayısında belirgin azalma izlenmektedir. Buna örnek olarak, 20. gebelik haftasında 6 milyon oosit folikülü var iken yeni doğanda bu sayı 1 milyona, puberte başlangıcında 300 bine düşmektedir (Baker, 1971). Yaşın yanında başka dış faktörler de folikül sayısında azalma ile ilişkilendirilmiştir. Bunun en belirgin örneği sigaradır. Doğurganlık ve folikül sayısı, sigara içme miktarıyla ters orantılı olduğu saptanmıştır. Ayrıca, sigara içenler arasında erken menopoz (40 yaşından önce) görülme oranında %30'dan fazla bir artış olduğu gösterilmiştir (Westhoff et al., 2000). Ovaryen kalite de fertiliteyi önemli ölçüde etkiyen bir faktördür. İlerleyen kadın yaşı ile mayotik hatalarda artış olması anöploidiye ve oosit kalitesinde düşüşe neden olmaktadır (Broekmans et al., 2009).

Prematür ovaryen yetmezlik (POY), 40 yaşından önce gözlenen hipergonadotropik hipogonadizm türüdür. Bu hastalık folikülogenez eksikliği, östrojen azalması, oosit kaybı ve infertilite ile karakterizedir (Nelson et al., 1994).

Prolaktin yüksekliği de Amerika Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) tarafından infertilite nedenleri arasında gösterilmektedir. Hipotalamik GnRH salgısının baskılanmasına neden olarak LH düşüklüğüne yol açar ve bunun sonucunda anovülasyon, oligomenore veya amenore meydana gelir. Prolaktin serum değerlerinin 20 ila 50 ng/mL olması, korpus luteumdan yetersiz progesteron salınımına neden olarak luteal fazı kısaltır. Tartışmalı olmakla birlikte, prolaktinemi infertiliteye yol açan luteal faz defektlerinin bir etiyolojisi olarak tanımlanmaktadır. Şekil 2-4'te kadın üreme sistemi ve gebelik oluşma sürecine görsel olarak yer verilmiştir.



Şekil 2-4: Kadın üreme sistemi ve gebeliğin oluşma süreci. Şekil, (Sang et al., 2023)'dan uyarlanmıştır.

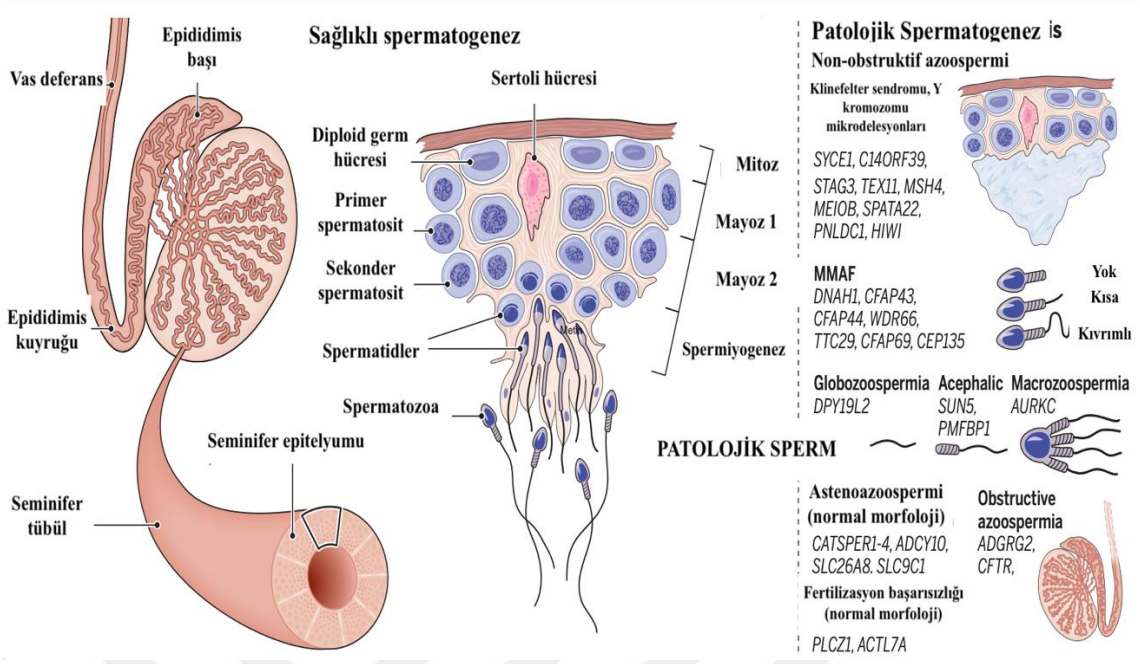
2.3.4. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesinin nedenleri arasında yaklaşık %65 ila %80 oranında primer testiküler kusurlar, %5 oranında sperm taşınım bozuklukları (oklüzyon), %2 ila %5 oranında endokrin bozukluklar (genellikle hipogonadizm) ve %10 ila %20 oranında

idiyopatik infertilite (normal sperm ve semen parametreleri olan ve açıklanamayan) yer almaktadır.

Ağır erkek infertilitesinde azoospermi (semende sperm gözlenmemesi), testistlerde spermatogenez kusurları (non-obstüktif azoospermi, NOA) ya da obstrüktif nedenlerle (obstrüktif azoospermi, OA) gözlenebilir. Spermatogenez kusurlarında genetik nedenler (örneğin Y kromozomonda AZF bölgesi delesyonları) önemli bir yer tutar. OA, genital sistem yollarındaki (ejakülatör kanallar ve seminal veziküller gibi) oklüzyon nedeni ile semenin dışarı atılması sonucunda gözlenir. Genellikle, genital sistemdeki yaralanmalar, enfeksiyonlar ya da gen mutasyonları sonucunda (örneğin, kistik fibroz transmembran reseptör geni, *CFTR*) ortaya çıkar.

Hipofiz bezi, hipotalamus ve testisler tarafından üretilen hormonlarda anormalliklere yol açan endokrin bozukluklar erkek infertilitesinin başka bir nedenidir. Testosteron gibi hormonlar sperm üretimini düzenler. Hormonal dengesizlikle sonuçlanan bozukluklara örnek olarak hipofiz veya testis kanserleri verilebilir. Testislerde spermatogonyum sürecine zarar veren örneğin varikosel veya tıbbi tedaviler (kemoterapi gibi) başka bir erkek infertilite nedenidir. Erkeklerde en yaygın infertilite nedeni olan primer testis defektelerinde sperm sayısı, şekli, kalitesi ve hareketliliğinde anomaliler mevcuttur. Şekil 2-5'te erkek üreme sistemi ve spermatogenez görseline yer verilmiştir.



Şekil 2-5: Erkek üreme sistemi ve spermatogenez (Sang et al., 2023)'dan uyarlanmıştır.

2.3.5. Tekrarlayan Gebelik Kaybı

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), ASRM'ye göre ultrason veya histopatoloji ile tanımlanmış ardışık iki ve üstü gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır. Olguların %50'sinde altta yatan neden bilinmemektedir (Stephenson, 1996). TGK annenin daha önceki doğum öyküsüne göre primer ya da sekonder olarak sınıflandırılır. Genetik nedenleri arasında anöploidiler ve translokasyonlar önemli yer tutamaktadır. Anatomik anomaliler, uterus anomalileri yapısal kusurlar da TGK'na neden olmaktadır. Bir metaanaliz çalışmasında TGK olan hastaların yaklaşık yüzde 12,6'sında konjenital uterus defektlerinin mevcut olduğu saptanmıştır (Grimbizis et al., 2001). Diyabet ve tiroid disfonksiyonları gibi endokrin problemler TGK'na neden olabilir. Yeterli kanıt olmasa da hiperprolaktinemi de TGK ile ilişkilendirilebilir. TGK yaşayan olguların yaklaşık %8-42'inde antifosfolipit antikor sendromu (AFLAS) görülmektedir. AFLAS tromboz riskinde artış ve plasental yetmezlik sonucu düşüklere sebep olmaktadır (Yetman and Kutteh, 1996). Çevresel etmenler de TGK'na neden olmaktadır. Sigara içmenin trofoblastik fonksiyonu etkilediği ve artmış TGK riskiyle bağlantılı olduğu öne sürülmektedir. Obezite, doğal yollarla gebe kalan kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı riskinin artmasıyla bağımsız olarak ilişkilidir. Alkol tüketimi (haftada 3 ila 5), kokain

kullanımı ve artan kafein tüketimi (günde 3 fincandan fazla kahve) gibi diğer yaşam tarzı alışkanlıkları da spontan düşük riskinde artış ile ilişkilidir.

2.4. Oosit ve Mitokondriler

Mitokondrilerin tüm hücresel süreçlerde kritik görevleri olduğu iyi bilinmekle birlikte güncel araştırmalar oositlerde ve embriyolarda gamet oluşumu ve implantasyon öncesi embriyonik gelişimde mitokondriyal dinamiğin önemini vurgulamaktadır (Yildirim, 2024). Mitokondrilerde meydana gelen dinamik değişimler ile gelişimin ve gametogenezin farklı evrelerinde oositlerin ve embriyoların değişen enerji ihtiyaçlarına uyum sağlanması, gerekli miktarda enerjinin üretilmesi sağlanır. Mitokondriler otofaji, mitofaji, onarım, biyogenez, hasarlı proteinlerin katlanması ve protein degredasyonu yoluyla hücrede kalite kontrolü sağlar. Literatürde mitokondriyal dinamik ile ilişkili genlerin üreme sağlığına etkisinin araştırıldığı çalışmalarda hayvan modelleri yoluyla gen ekspresyonu profilleri ve protein seviyeleri değerlendirilerek mitokondriyal dinamikte görev alan genlerin kadınlarda oosit kalitesini, döllenmeyi ve embriyo gelişimini etkilediği gösterilmiştir (Liu et al., 2002, Wang et al., 2020, Zhang et al., 2016, Zhang et al., 2019, Zou et al., 2021). Yaşlanma ile birlikte ovaryumda fonksiyon bozuklukları meydana gelir ve hem follikül sayısı hem de kaliteli yumurta sayısı azalmaktadır.

Mitokondriler, otofaji ve apoptoz yoluyla hücre kaderinin belirlenmesinde anahtar role sahiptir ve aynı zamanda plasenta ve diğer dokularda steroidlerin biyosentezinde önemlidir (Martinez et al., 2015, Miller, 2013, Cai et al., 2018). Otofaji, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre ölümü için kritiktir (Mizushima and Komatsu, 2011). Otofaji, gebeliğin erken aşamalarında trofobast hücrelerindeki oksijen ve glikoz konsantrasyonundaki değişimler ile meydana gelmekte ve hipoksi veya yetersiz beslenmeden kaynaklanan trofoblastik apoptozu önlemektedir (Nakashima et al., 2013, Chen et al., 2012, Cai et al., 2018). Bu mekanizmadaki herhangi bir hata plasental disfonksiyona ve sonucunda preklempsi, fetal büyüme kısıtlılığı ve doğum ile ilgili komplikasyonlara sebep olabilmektedir. ATG5, BECLIN1 ve LC3 en bilinen otofaji-ilişkili proteinlerdir ve otofagozomun oluşumunda, uyarılmasında ve otofaji aktivasyon belirteci olarak görev almaktadır. Cai ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada, normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, erken gebelik kaybı olan hastaların plasental villus dokuları ile trofoblast hücrelerinde otofaji-ilişkili proteinlerin belirgin bir şekilde

arttığı gösterilmektedir. *MFN2'nin* düşük ekspresyonu trofoblast hücrelerinde mitokondrinin yapısal ve fonksiyonel hasarına sebep olmaktadır (Cai et al., 2018)

Üreme yolu enfeksiyonları, immünolojik ve implantasyon bozuklukları, uterin malformasyonlar, endokrin hastalıklar ve yaşam şeklinden kaynaklanan faktörler gibi diğer faktörlerin de etkili olduğu bilinmekle birlikte altta yatan sebepler büyük ölçüde bilinmemektedir.

2.4.1. Plasenta Gelişimi, Mitokondriler ve Oksidatif Stres

Embriyo gelişiminde blastokist oluşumuna kadarki süreçte birçok moleküler ve hücresel sürecin gerçekleşmesi gerekir ve gen ekspresyonunun doğru şekilde düzenlenmesi önemlidir (Gasca et al., 2007, Kimber et al., 2008) Döllenmiş yumurtanın gelişim süreçleri olan bölünme, blastokist oluşumu ve implantasyon sırasında spesifik genlerin expresyonu ve organel aktivitesi gereklidir (Acton et al., 2004). Maternal kaynaklı normal mitokondri fonksiyonun sürdürülmesi de erken embriyo için oldukça önemlidir. Hücrenin enerji kaynağı olan mitokondri hücresel stres yanıtının düzenlenmesi, hücre metabolizması ve hücre ölümü gibi birçok süreçte önemli rol oynamaktadır (Galluzzi et al., 2012). Hücrede redoks (oksidasyon – indirgenme) reaksiyonları ve kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde, ara metabolitlerin oluşumu ve embriyonik gelişimde proapoptotik faktörlerin depolanmasında önemlidir. Mitokondrinin normal fonksiyonunu gösterememesi sonucunda embriyonik gelişimin bozulduğu, trofoblast oluşumunda kusurlar meydana geldiği ve otofaji yoluyla apoptozun tetiklendiği tespit edilmiştir (Zhao, 2015).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, erken gebelik kayıpları, preeklempsi, intrauterin büyüme duraksaması, maternal diyabet ve obesite gibi gebelik ile ilişkili süreçlerde plasental mitokondriyal disfonksiyonunun önemli rol oynadığını göstermiştir (Hempstock et al., 2003, Holland et al., 2017, Cai et al., 2018). Abortus, gebelikte gözlenen en yaygın komplikasyon ve gebeliklerin %12-24'ünde gözlenebilmektedir. Tekrarlayan gebelik kaybı ise %1-2 oranında görülmektedir (Garrido-Gimenez and Alijotas-Reig, 2015, Jurkovic et al., 2013, Cai et al., 2018). Erken gebelik kayıplarının en yaygın nedeni olan kromozomal anomalilerin sıklığı yaklaşık %50 oranındadır ve anne yaşı ile birlikte risk artışı olmaktadır (Nybo Andersen et al., 2000, van den Berg et al., 2012, Cai et al., 2018).

Ramirez-Coronel ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı araştırmada, mitokondriyal hasar sonucunda artan reaksif oksijen türlerinin koryon villuslarda mitokondriyal dinamiğin bozulmasına ve TGK'ya neden olduğu belirtilmiştir (Ramirez-Coronel et al., 2023). Araştırmada TGK'da villus dokusunda *Fis1* ve *Drp1* ekspresyonunun arttığı, *Mfn2*, *Mfn1* ve *Opa1* ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. *Fis1* ve *Drp1* ekspresyonlarındaki artış ile mitokondriyal fisyon aktif hale gelmekte ancak füzyon yeterli şekilde gerçekleşemediğinden mitokondriyal dinamik bozulmaktadır. Mitokondri dinamiğinin etkilenmesi ile apoptoz süreci tetiklenmekte ve sitozole sitokrom c salınmaktadır (Borutaite, 2010, Kalpage et al., 2019, Ramirez-Coronel et al., 2023, Vranas et al., 2022). Bcl2 (B-cell lymphoma gene-2) ailesi, sitokrom c salınımına aracılık ederek sitokrom c apoptotik proteaz faktör 1'e (APAF-1) bağlanır ve apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozom kompleksinin oluşumu, kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olur ve apoptotik sinyaller ile birlikte DNA parçalanması ve kromatin yoğunlaşması meydana gelir (Shakeri et al., 2017, Ramirez-Coronel et al., 2023). Hücre boyutundaki küçülmenin ardından hücre apoptotik cisimcikler denilen küçük parçalara bölünür. Reaktif oksijen türlerinin birikimi sonucunda, enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunda önemli olan nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyal yolağı aktivasyonunun artmasına yol açabilir (Shakeri et al., 2017, Ramirez-Coronel et al., 2023, Lawrence, 2009). Araştırma sonucunda, NF-κB yolağının farmakolojik inhibisyonunun fisyon (Drp1 ve Fis1) ve füzyon (OPA1, Mfn1 ve Mfn2) proteinlerinde meydana gelen değişiklikleri düzelttiğini ve TGK sırasında koryonik villuslarda bozulan mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiğini göstermiştir (Ramirez-Coronel et al., 2023).

Oksidatif stresin mitokondriyal disfonksiyona ve oosit kalitesinde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres yoluyla yaşlandırılmış oositler ile genç oositlerin karşılaştırılmış ve oksidatif strese maruz kalan genç oositlerde fosforile-PRKN ekspresyonunun azaldığı, mitokondriyal DNA kopya sayısının artığı görülmüştür (Khan et al., 2023). Parkin geni, Mitofusin genleri ile doğrudan etkileşim göstermesi açısından önemlidir.

Sekonder infertilite kapsamındaki tekrarlayan gebelik kayıplarında, erkek eşlerin araştırıldığı çalışmalarda, yaş, seminal hacim, sıvılaşma süresi (*liquefaction*), pH ve sperm konsantrasyonu açısından anlamlı bir fark gözlenmezken sperm morfoloji ile

motilitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, ROT seviyelerinin kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Imam et al., 2011). ROT seviyelerinin yüksekliği, bu tezin ana hipotezi olan mitokondriyal fonksiyonla ilişkili olması nedeniyle önemlidir. Sperm DNA'sının bütünlüğünün korunması embriyonik gelişimde ve sağlıklı yavruların ortaya çıkmasında önemlidir. Serbest radikal seviyelerinin yüksekliği ve toplam antioksidan kapasitesinin düşük olmasından kaynaklanan dengesizlik nedeniyle oksidatif stres meydana gelir. DNA hasarına sebep olan oksidatif stres, gebeliği etkileyen önemli bir parametredir. Tez kapsamında 35 kadın olgu ile başlayan çalışmamızda, bu bilgilerden de hareketle TED verisi olan 10 erkek partner de analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda oksidatif stres ile ilişkili genler tespit edilmiştir.

2.5. Biyoinformatik Kavramı ve Dizileme Teknolojileri

2.5.1. Biyoinformatik

Bilişim teknolojilerinin biyolojiye uygulanması ve biyolojik verilerin bilgisayar destekli olarak analiz edilmesi ile biyoinformatik kavramı ortaya çıkmıştır. Biyoinformatik alanındaki ilk çalışmalar 1965 yılında Margaret Dayhoff tarafından Protein Dizi ve Yapı Atlası'nın oluşturulması (Dayhoff, 1965) ile başlatılmıştır. Dayhoff bu çalışma ile bilinen bütün proteinlerin dizi koleksiyonlarını içeren atlası oluşturmuştur. Oluşturduğu protein atlası, internet öncesi dönemde oluşturulan bir veritabanı niteliği taşımasının yanı sıra atlasın ortaya çıkış sürecinde meydana gelen biyolojik problemlere çözüm bulmada matematiksel ve hesaplamalı tekniklerin kullanılması ve dönemin son bilgisayar teknolojilerinin uygulanması, günümüzde biyoinformatik olarak adlandırdığımız yeni araştırma alanının ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur.

1970 yılında Hollandalı biyologlar Hogeweg ve Hesper, biyoinformatik kavramını "biyolojik sistemlerde bilişim süreçlerinin çalışılması ve genomik verilerin karşılaştırmalı analizi için hesaplamalı yöntemlerin uygulanması" olarak tanımlamıştır (Hesper and Hogeweg, 1970).

Günümüzde biyoinformatik moleküler antropoloji, evrimsel biyoloji, biyokimya ve biyofizik, matematik ve istatistik, farmasötik teknolojiler ve OMİK çalışmalar gibi pek çok alan ile etkileşim halindedir.

2.5.2. Dizileme Teknolojileri

DNA'nın dizilenmesine yönelik ilk çalışmalar 1970'li yıllarda iki boyutlu kromatografiye dayalı yöntemlerle başlamıştır. 1977 yılında Sanger zincir sonlandırma yönteminin (Sanger, 1988) geliştirilmesi ile birlikte DNA güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde dizilenebilmiştir. Sanger dizileme, gene özgü primerler ve problar yoluyla hedefe yönelik amplikasyon ile DNA'nın belirli bir segmentindeki nükleotitlerin dizilenmesinde kullanılan yöntemdir. Bu yöntem, başka metodlarla tespit edilen mutasyonların konfirmasyonunda, araştırmacılar tarafından oluşturulan sentetik biyoloji plazmid yapılarının dizi konfirmasyonunda, gendeki insersiyonların ve delesyonların konfirmasyonunda kullanılabilmektedir (Clark et al., 2019). Daha uzun okumalar elde edilmesi ve güvenilirliğinin yüksek olması yöntemin avantajlarındandır ancak, büyük genomik bölgelerin dizilenmesinde zaman ve maliyet açısından uygun bir yöntem değildir. Sanger dizileme, "birinci nesil" bir DNA dizileme yöntemidir. Yeni nesil dizileme (NGS) tekniklerinde verimin çok daha yüksek olmasına, NGS testlerinin konfirmasyonunda ve kapsanmayan bölgelerin dizilenmesinde Sanger dizileme önemli bir araçtır (Hagemann, 2015).

2.5.3. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi

Teknolojideki ilerlemeler ile birlikte veri toplama ve analiz adımlarını daha iyi birleştiren, hem iş gücü hem de zaman açısından Sanger dizilemeye kıyasla daha verimli çalışan sistemler geliştirilmiştir. Kısa okuma teknolojileri olarak bilinen ikinci nesil dizileme yaklaşımları ile milyonlarca dizileme reaksiyonunu (150-400 baz çiftlik kısa okumalar) aynı anda paralel olarak gerçekleştirilebilmektedir (Roumpeka et al., 2017). Yöntem genellikle DNA fragmantasyonu, DNA uç-tamiri, adaptör ligasyonu, yüzeye bağlanma ve in-situ amplifikasyon ile başlamaktadır. Bu yöntem genomun 150-400 baz çifti boyutundaki kısa parçalarının paralel olarak milyonlarca kez dizilenmesi, bu dizilerin okunarak bir araya getirilmesi ve analiz edilmesi aşamalarını içermektedir.

Dizilemede kısa okuma teknolojileri ile elde edilen kısa parçaların yeniden birleştirilmesinde ve genoma hizalanmasında zorluklar ve GC oranının yüksek olduğu

bölgelerin yanlış dizilenebilmesi gibi yapısal farklılıklardan ve karmaşıklığından kaynaklanan zorluklar bu teknolojinin dezavantajlarıdır. Kısa okuma uzunlukları, baz doğruluğundan bağımsız olarak, büyük ardışık tekrarlar ve segmental duplikasyonlar gibi benzerliğin yüksek olduğu bölgelerde ve HLA (insan lökosit antijeni) gen bölgeleri gibi çeşitli immun sistem bileşenlerini kodlayan değişkenliği yüksek gen bölgelerinde varyant çağrılmasını engeller (Olson et al., 2023).

Üçüncü nesil dizileme teknolojileri, 10 kilobaza kadar (6-20 kb) okuma uzunluklarına ulaşabilen uzun okuma teknolojileridir (Goodwin et al., 2016, Roumpeka et al., 2017). Uzun okuma teknolojileri sayesinde genomdaki tekrar bölgeleri ve yapısal değişkenlerin tespiti gibi kısa okuma teknolojileri ile dizilenmesinde zorluk yaşanan bölgeler dizilenebilmektedir. İkinci nesil dizileme teknolojilerinden kütüphane hazırlama adımları ve fragmante edilmeyen DNA moleküllerinin gerçek zamanlı olarak hedeflenmesi gibi bazı konularda farklılık gösterir. Ancak bu teknoloji ile dizileme yapabilemek için yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın üretilmesi gerekir (Hu et al., 2021). Bu yöntemin kısıtlılığı ise ikinci nesil dizileme teknolojileri ile kıyaslandığında doğruluk oranının düşük olmasıydı. İlk uzun okumalar %15-30 arasında değişen yüksek hata oranlarına sahipti ve bu yönteme ek olarak kısa okumaların kullanımı gerekiyordu (Morisse et al., 2021). Bu şekilde farklı yöntemlerin hibrit kullanımı ile doğruluk oranının düzeltilmesi yaygındı. Ancak üçüncü nesil dizileme teknolojilerinde gelişim ile birlikte hata oranları da azaltılmıştır. Daha düşük maliyet ile daha yüksek veri üretimi açısından da bu teknolojinin gelişimi önemlidir ve hibrit düzeltme yerine kendi kendini düzeltme verimli olarak kullanılabilir hale gelmiştir (Morisse et al., 2021).

Her yöntemin çeşitli avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte yöntem tercihi araştırmaya veya klinik uygulamaya göre değişiklik göstermektedir. Yöntemler geliştikçe mevcut kısıtlılıkların azalması ve farklı uygulamaların yaygınlaşması mümkün olacaktır.

2.5.4. Yeni Nesil Dizileme Yönteminin Prensileri

Temelde NGS teknolojilerinin altında yatan teknikler kapiller elektroforez dizilemesine benzer. Sıralı döngüler gerçekleşirken DNA polimerazi DNA kalıp zincirine floresan işaretli dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfatı (dNTP) ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirir. Her döngüde nükleotidler yaydığı floresan ışıma ile tanımlanır.Yeni nesil dizilemede milyonlarca nükleotidin yaydığı floresan ışıma paralel olarak

tanımlanmaktadır. Yeni nesil dizileme temel olarak kütüphane hazırlığı, kümeleme, dizileme ve veri analizini içeren dört adımdan oluşur.

2.5.4.1. Kütüphane Hazırlığı

DNA ve cDNA örneğinin rastgele parçaları ayrılmasının ardından 5've 3' uçlarına adaptörlerin eklenmesi ile kütüphane hazırlanır. Bu aşama yeni nesil dizilemenin kalitesi için çok önemlidir. Dizileme için ilgilenilen moleküllere karşılık gelen şablonların elde edilmesi ve daha sonra fragmentlerin kullanılan dizileme platformu ile uyumlu olacak şekilde hazırlanması adımlarını içerir. Etiketleme, parçalama ve ligasyon reaksiyonlarını birleştirerek kütüphane hazırlama sürecinin verimliliğini artırır. Adaptörler bağlanan fragmentler daha sonra PZR ile amplifiye edilir.

2.5.4.2. Küme Oluşturulması

Küme oluşturma için kütüphane, fragment adaptörlerini tamamlayan yüzeye bağlı oligolardan oluşan bir *flow cell*'e (ölçüm kamarası) yüklenir. Her fragment daha sonra köprü amplifikasyonu yoluyla farklı klonal kümelere amplifiye edilir.

2.5.4.3. Dizileme

Farklı teknolojilerde yöntemler değişiklik göstermektedir. Örneğin, Illumina SBS teknolojisi, DNA kalıp ipliklerine katılan tekli bazları tespit eden tersinir sonlandırıcı tabanlı yöntem kullanır. Her dizileme döngüsü sırasında dört tersinir sonlandırıcıya bağlı dNTP'nin tümü mevcut olduğundan, yarışmalı olarak (A, C, G, T olmak üzere dört farklı nükleotidin DNA ipliğine eş zamanlı bağlanma yeteneği) DNA polimeraz enziminin yanlış nükleotidi eklemesinden kaynaklanan hatalı eşleşmeleri azaltır ve hatalı baz ekleme olasılığını düşürür. Yüksek verimli dizileme yöntemlerinde bu şekilde hata oranlarını azaltmaya yönelik mekanizmalar mevcuttur.

2.5.4.4. Veri Analizi

Veri analizi ve hizalama sırasında, yeni tanımlanan dizi okumaları bir referans genoma hizalanır. Hizalamayı takiben, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) veya ekleme-silme (indel) tanımlaması, RNA yöntemleri için okuma sayımı, filogenetik veya metagenomik analiz ve daha fazlası yapılabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Grubunun Seçimi ve Özellikleri

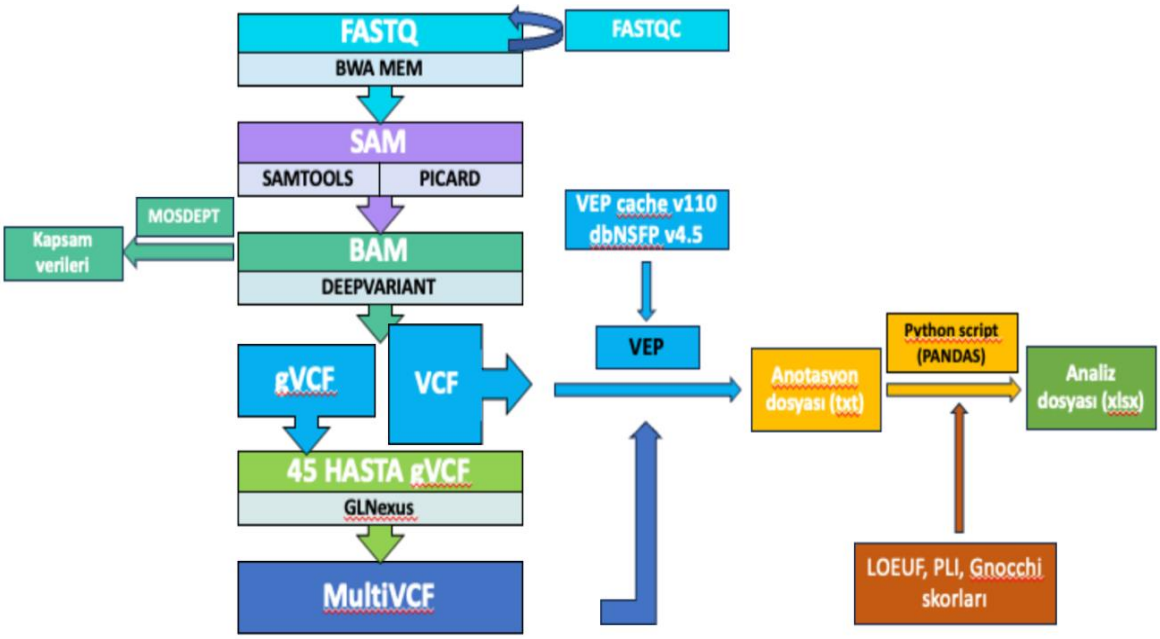
İstanbul Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda daha önce yürütülen "Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde İlişkili Tek Gen Mutasyonlarının Araştırılması (Berkay, 2020)" ve "Sebebi Açıklanamayan Erkek İnfertilitesinin Açıklanmasına Tüm Ekzom Analizlerinin Katkısı (Kale, 2021)" isimli tez çalışmaları kapsamında 25 kadın olgu ve 10 çifte tüm ekzom dizilemesi yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında kadın olguların 10'u (Olgu 1-10) TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla, 25'i ise (Olgu-11-35) Engin Tıbbi Ürünler, Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Erkek hastalar Engin Tıp (Berry Genomics) aracılığıyla Next Genetic Center'da (NGC) TWIST Core Exome kiti ve MGI DNBSEQ-G400 cihazı kullanılarak dizilenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında primer infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olgular retrospektif olarak incelenerek FASTQ formatındaki ham TED dataları toplanmıştır. Elde edilen veriler, *in-house* akış şemasına (Durmaz, 2024) göre oluşturulan veri ön-işleme (*data pre-processing*) ve anotasyon işlemlerinin ardından yeniden analiz edilmiştir. Belirlenen varyantlar arasından klinkle olası ilişkisi gözetilerek seçilenler Sanger dizileme yöntemi ile konfirme edilmiştir. Etik kurul onayı İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 11/02/2022 Sayı: 03).

3.2. Biyoinformatik Analizler: Varyant Analizi

Tüm ekzom dizileme verisinin analizi birçok aşamadan oluşmakta ve biyoinformatik araçların kullanımını gerektirmektedir. Bu araçların kullanımı ve biyoinformatik analizler için yüksek hacimli verileri yüksek performanslı olarak işleyen ve analiz eden sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi TRUBA kaynakları kullanılarak analizlere başlanmıştır. TRUBA altyapısı araştırmacılara, verilerin depolanabilmesi ve yüksek başarımlı hesaplamalar yapılabilmesi konusunda kaynak sunmaktadır. Tez verilerinin ön-işleme aşamaları ve iş akışlarının deneme süreci TRUBA üzerinde gerçekleştirilmeye başlanmıştır ancak yaşanan teknik sorunlar sebebiyle kurum içi kaynaklar ile devam

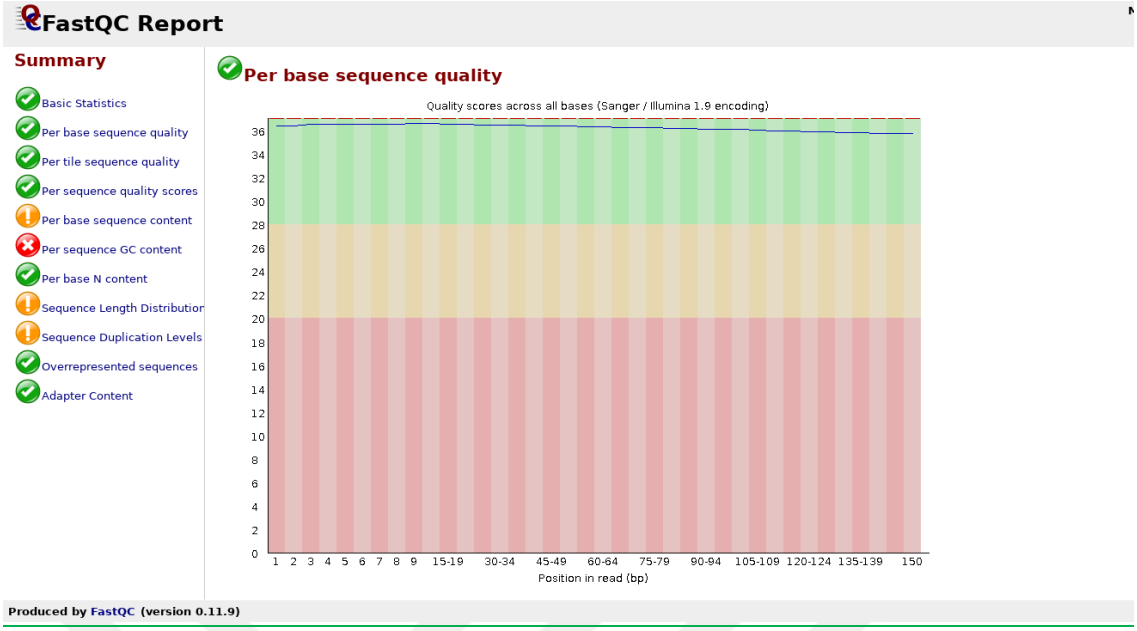
edilmiştir. TED veri setinin biyoinformatik analizinde kullanılan iş akışı Şekil 3-1'de gösterilmektedir.



Şekil 3-1: Tez çalışmasında kullanılan biyoinformatik analiz iş akış şeması

3.2.1. Veri Ön İşleme Süreci ve Ham Verilerin İşlenmesi

İnfertilite çalışmaları için İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda belirtilen platformlar ile dizilenen hastaların ham dataları FASTQ formatında elde edilmiştir. Veri ön işleme aşamasında FASTQC (v0.11.9) (Andrews, 2010) (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) yazılım aracı kullanılarak FASTQ dosyalarının kalite kontrolü yapılmıştır. FASTQC aracı, TED yöntemi kullanılarak elde edilen ham verilerin dizi bilgilerinin kalite kontrolü için kullanılmıştır. Bu kalite kontrol aracı ile her olguda baz başına kalite skoru, GC (Guanin/Sitozin) baz okumaları, okumalarda baz dağılımları, dizi okuma uzunluklarının dağılımı, adaptor içeriğini gösterecek şekilde kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir. Örnek bir FASTQC kalite kontrol raporu Şekil 3-2'de gösterilmektedir.



Şekil 3-2: FASTQC kalite raporu örneği

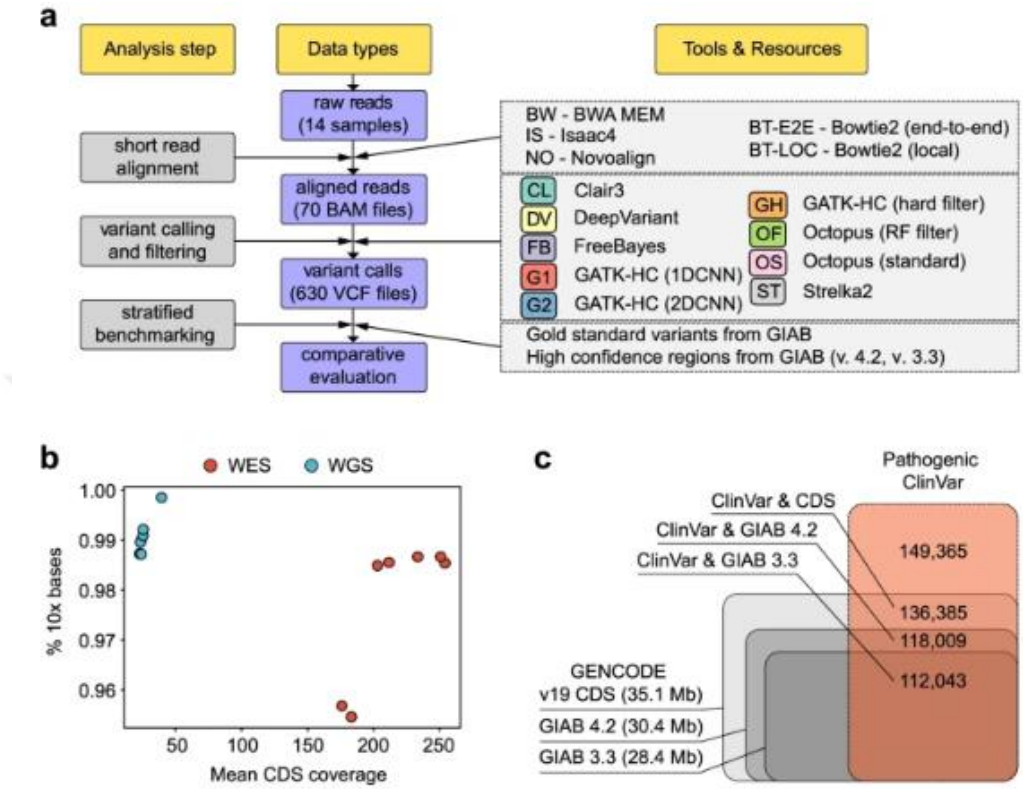
3.2.2. Genomik Dizilerin Hizalanması ve Haritalanması

FASTQ dosya formatındaki genomik dizilerin insan genomunda karşılık gelen bölgelerinin bulunmasında Burrows-Wheeler algoritması temelli BWA MEM (*Burrow-Wheeler Aligner Maximal Exact Match*) hizalama aracı kullanılmıştır. FASTQ formatındaki 150 baz çifti uzunluğundaki DNA parçaları GRCh38.p14 — hg38 (Karolchik et al., 2012) referans insan genomuna hizalanmıştır. Hizalama sonucunda haritalanan diziler SAM (Sequence Aligment Map, Dizi Hizalama Haritası) dosya formatında elde edilmiştir. Samtools v1.11 yazılım paketi (Danecek et al., 2021) kullanılarak SAM dosyası BAM (Binary Aligment Map, İkili Hizalama Haritası) dosyasına dönüştürülmüş ve lokal hizalama yapılmıştır (indeksleme).

3.2.3. Varyant Çağırma

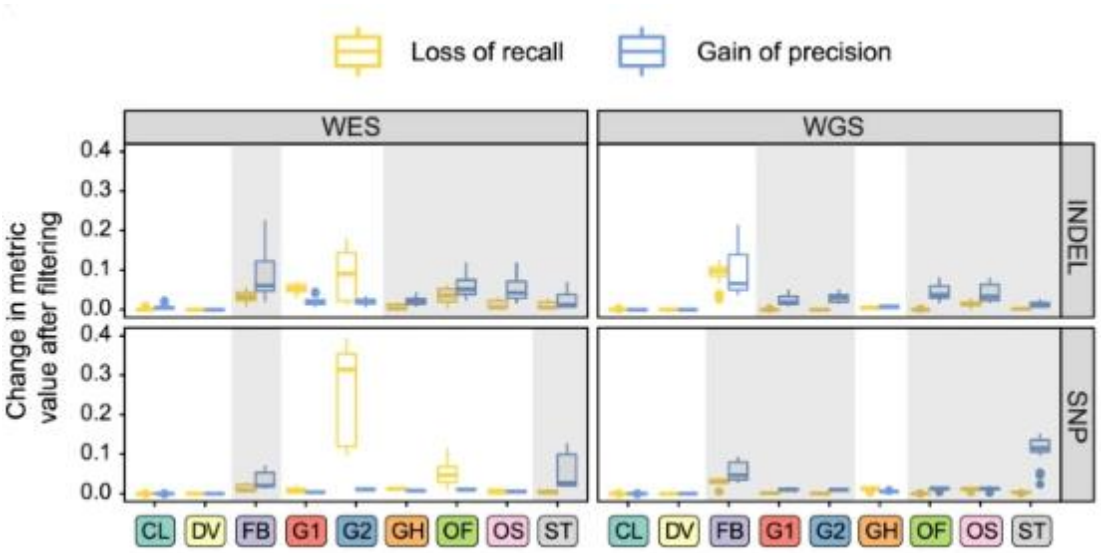
Hizalanan dizilerde genetik varyantların tanımlanabilmesi için referans dizi baz alınarak değişimlerin belirlenmesi amacıyla, sıklıkla kullanılan GATK, FreeBayes, Octopus, Clair3, Samtools ve DeepVariant varyant çağırma iş akışlarından (*pipeline*) derin öğrenme tabanlı DeepVariant tercih edildi. DeepVariant biyoinformatik iş akışının tercih edilmesinde Barbitoff ve arkadaşlarının (Barbitoff et al., 2022) varyant çağırmada

kullanılan mevcut biyoinformatik iş akışlarının performanslarını karşılaştırmalı olarak ele aldığı çalışmadan faydalanılmıştır.



Şekil 3-3: TED ve TGD verisinde varyant çağırma aşamasında kullanılan iş akışları (Barbitoff et al., 2022)

Şekil 3-3'te varyant çağırmada kullanılan iş akışları sistematik olarak karşılaştırılmıştır. Şekil 3-3-a'da iş akışının analizi, Şekil 3-3-b'de güvenilirliği yüksek kodlayan dizi bölgelerinin ortalama kapsamı ve TED-TGD veri kümelerindeki toplam okuma derinliğinin en az 10 katını kaplayan bölgelerin baz fraksiyonunun dağılım grafiği, Şekil 3-3-c'de örneklerin hepsinde ortak olan GENCODE v19 kodlayan dizi aralıkları, GIAB genom konsorsiyumu güvenilirliliği yüksek verileri ve ClinVar'da patojenik ve olası patojenik olarak raporlanan varyantların kullanıldığı gösterilmektedir (Barbitoff et al., 2022).



Şekil 3-4: Varyant çağırma ve filtreleme metotlarının performans karşılaştırmaları (Barbitoff et al., 2022)

Varyant çağırma ve filtreleme metotlarının performans karşılaştırmaları Şekil 3-4'te gösterilmiştir. TED ve TGD verilerinde SNP ve INDEL'lerdeki pozitif değişimler mavi kutularda, varyant çağırmadaki negatif değiklikler sarı kutularda gösterilmiştir. Filtrelemenin faydalı olduğu durumlar gri renkle işaretlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda DeepVariant (DV), verilerin değişken filtrelemesinden etkilenmeyerek varyant bulmada en yüksek performansı göstermiştir ve bu nedenle tez kapsamında kullanılmıştır. Bowtie2 ve FreeBayes ise diğerleri ile kıyaslandığında düşük performans göstermektedir (Barbitoff et al., 2022).

Amplifikasyon tabanlı kütüphane hazırlanması sebebiyle varyant çağırma adımında duplike okumaların işaretlenmesi ve silinmesi Picard — MarkDuplicates aracı (Institute, 2019) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Varyant çağırma işlemi yukarıda özellikleri verilen derin öğrenme tabanlı DeepVariant v1.6 aracı (Poplin et al., 2018) ile gerçekleştirilmiştir. Sıralı işlemler sonucunda VCF *(variant call format)* ve gVCF *(genomic variant call format)* dosya formatlarında veriler elde edilmiştir.

3.2.4. Varyantların Filtrelenmesi ve Anotasyon

VCF ve gVCF dosyaları elde edildikten sonra potansiyel olarak ilişkili varyantları tutmak ve yanlış pozitif varyantları uzaklaştırmak için filtre kalite ve kapsam (*coverage)* kriterlerine göre filtre uygulanmıştır. Bcftools aracı ile decompozisyon ve normalizasyon

işlemleri yapılan varyantlar okuma derinliği (Depth>5), okuma kalitesi (Q>20) ve genotip kalitesi (GQ>20) olarak şekilde filtrelenmiştir. Elde edilen g.VCF dosyaları, geniş kohort dizileri için ortak varyant çağırmadan gelen verilerin birleştirilmesinde kullanılan açık kaynaklı ve ölçeklenebilir kohort birleştirme sistemi olan GLNexus (GL, Genotype Likelihood) (Lin et al., 2018) kullanılarak MultiVCF formatı haline getirilmiştir ve kohort içerisindeki her bir varyant için allel sıklığı hesaplanmıştır. Varyantlar Ensembl VEP aracı *cache* v110 ve dbNSFP v4.5 veritabanı ile anote edilmiştir.

Varyant anotasyonunda, varyant türü (missense, stop kodon, kırpılma varyantı, çerçeve kayması) American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kriterlerine göre (Richards et al., 2015) varyantların klinik sınıflandırması (benign, olası benign, klinik önemi belirsiz (VUS), olası patojenik ve patojenik), değişimlerin populasyon veritabanlarındaki (GnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/), dnSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/) gibi) allel frekansları, kohort içerisindeki allel frekansları, *in silico* tahmin araçlarındaki patojenite skorları, phyloway, phastCons4way gibi omurgalı, primat ve memelilerdeki filogenetik hesaplamaları içeren tahmin araçlarındaki korunmuşluk skorları, loss-of-function (LoF), LOEUF (*loss-of-function observed / expected upper bound fraction), pLI (probability of being loss-of-function intolerant*), Z skoru gibi (Karczewski et al., 2020) constraint metrikleri dahil edilerek anote edilmiştir. Anotasyon için Ensembl VEP *cache* v110 ve dbNSFP v4.5 anotasyon araçları kullanılmıştır.

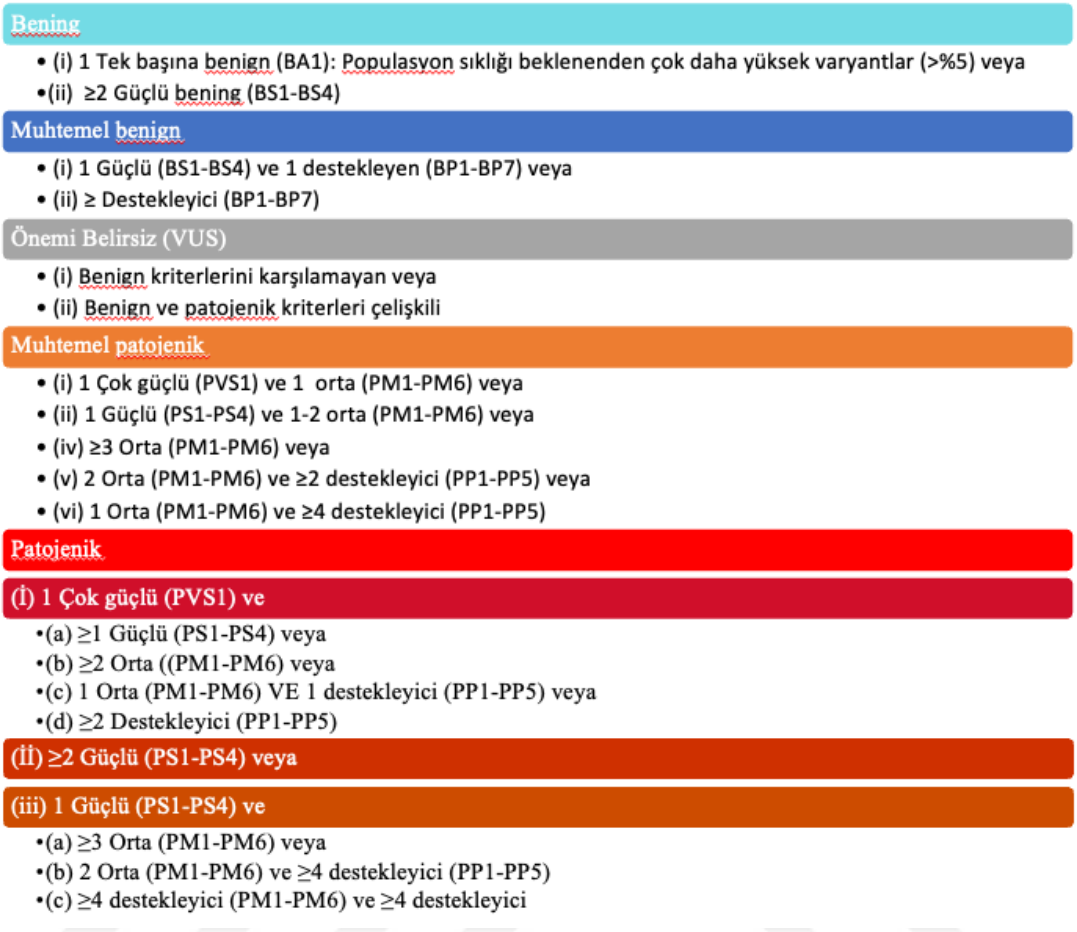
Tablo 3-1: TED yöntemi ile elde edilen verilerin özellikleri

Kurum	**Cihaz**	**Olgu No**	**Kit**	**Referans Genoma Haritalama**	**Duplike Varyantların Belirlenmesi**	**Lokal Hizalama**	**Varyant Çağırma**	**Anotasyon**
TÜBİTAK MAM	Illumina HiSeq 2500	1-10 (Kadın)	-	BWA MEM	Picard	Samtools	DeepVariant	Ensembl VEP
Berry Genomics/	Illumina NextSeq	11-35 (Kadın)	xGen Exome	BWA MEM	Picard	Samtools	DeepVariant	Ensembl VEP

Engin Tıp			Research Panel (IDT)					
Berry Genomics/ Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC)	MGI DNBSEQ-G400	Erkek olgular	Twist Core Exome	BWA MEM	Picard	Samtools	DeepVariant	Ensembl VEP

3.2.5. Varyantların Önceliklendirilmesi ve Filtrelenmesi

TED yöntemi ile edilen dizi verilerinin işlenmesinin ardından kadın ve erkek 45 olgudan (25 kadın ve 10 çift) oluşan veri setinde her olgunun ham veri dosyaları .fastq, .bam, .bai elde edilmiştir. Varyant anotasyonları .vcf ve .xlsx formatlarında elde edilmiştir. Gnomad v3 allel frekansı (AF≤0.005), ClinVar benign olmayan varyantlar, kohort AF > 0,9 ve intronik olmayan varyantlar öncelikli olarak filtrelenerek ACMG (Richards et al., 2015) kriterlerine göre analiz edilmiştir. Tek Başına Benign (*Benign Stand-Alone* (BA), Güçlü Benign (*Benign Strong,* (BS)), Benign Destekleyici (*Benign Supporting* (BP)), Patojeniteyi Destekleyen (*Pathogenic Supporting* (PP)), Ilımlı Patojenik (*Pathogenic Moderate* (PM)), Güçlü Patojenik (*Pathogenic Strong* (PS)) ve Çok Güçlü Patojenik (*Pathogenic Very Strong* (PVS)), olarak kısaltılan bu kriterlere Şekil 3-5'te yer verilmiştir.



Şekil 3-5: ACMG kılavuzu varyant sınıflandırma kriterleri (Richards et al., 2015)' dan uyarlanmıştır.

Analizlerde hastalığın kalıtım şekli, tahmin edilen fonksiyonel etkisi, varyantların populasyon veritabanlarındaki ve in-house veritabanındaki sıklığı ile literatür araştırmaları değerlendirilerek önceliklendirilmiş ve analiz edilmiştir. Eşlerin analizinde ortak genler ve varyantlar karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Varyantların analiz algoritması gen ve varyant bazlı analizi içerecek şekilde tasarlanmıştır.

Gen temelli analiz kapsamında; 1. *MFN2* ve *MFN1* genleri ile aynı yolakta bulunan ve etkileşim gösteren genlerden oluşan bir gen listesi ve 2. Human Phenotype Ontology (HPO) veritabanında infertilite ve gebelik kaybı ile ilişkili olduğu bildirilen genlerin listesi olmak üzere iki ayrı liste oluşturulmuştur (HPO erişim tarihi: 01.10.2023).

Gen listesinin oluşturulmasında StringDB (https://string-db.org/), KEGG (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html), Reactome (https://reactome.org/), UCSC (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGeneGraph), ZS Revelen (https://zs-revelen.com/), BioGrid (https://thebiogrid.org/) ve Harvard BioPlex Interactome (https://bioplex.hms.harvard.edu/) gibi gen — gen etkileşim ağlarının ve yolak haritalarının analiz edilebildiği veritabanlarından yararlanılmıştır. Gen listesi hazırlanırken yukarıda belirtilen yedi yolak haritalama veritabanında *MFN2* ve *MFN1* genleri ile etkileşen genlerin listesi oluşturulmuştur. Listelenen genler farklı kaynaklarda ortak olarak bulunmalarına ve literatür analizi ile desteklenme durumuna göre birincil, ikincil, üçüncül ve diğer olmak üzere dört sınıfa ayrılarak segmentasyon yapılmıştır. Önem derecesi birincil olarak sınıflandırılan genler, üç ve üzeri veritabanında ortak olarak görülen ve literatür analizi sonucunda ilişkili yayınları bulunan genlerden oluşmaktadır. Önem derecesine göre birincil olarak sınıflandırılan genler, oluşturulan gen listesinde mor renk ile işaretlenmiştir. İkincil olarak sınıflandırılan genler, en az iki veritabanında ortak olarak bulunan ve literatür analizi ile *MFN2* ve *MFN1* genleri ilişkili olduğu tespit edilen genlerden oluşmaktadır. Önem derecesi ikincil olanlar yeşil renk ile işaretlenmiştir. Üçüncül olarak sınıflandırılan genler en az bir yolak haritalama veritabanında tespit edilen ve literatür ile desteklenebilen genlerden oluşmaktadır ve listede turuncu renk ile işaretlenmiştir. Diğer genler ise yalnız bir veritabanında yer verilen veya birden fazla veritabanında yer verilse de doğrudan yayınlarla desteklenmeyen genlerden oluşmaktadır. Diğer olarak sınıflandırılan genler listede gri renk ile işaretlenmiştir. Oluşturulan gen listesi Şekil 3-6'da örneklenmektedir.

BİRİNCİL MOR	İKİNCİ LYEŞİL	ÜÇÜNCÜL TURUNCU	DİĞER GRİ		
Gene_ID (Sembol)	**Gene Name**	**Genin Diğer İsimleri**	**Kromozom**	**Tanım ve Protein Fonksiyonu**	**Yolak Veritabanları**
MFN2	mitofusin 2	CMT2A2, CPRP1, KIAA0214, MARF	1	Mitokondri organizasyonunun pozitif düzenlenmesi, mitokondri otofajisi, mitokondri dış zarı, mitokondriyal taşınma, mitokondri parçalanması, mitofaji, mitokondriyal depolarizasyona yanıt olarak mitokondrinin otofajisinin düzenlenmesi, mitokondriyal depolarizasyona yanıt, ubikuitin benzeri protein ligaz bağlanması	InBioDiscover, UCSC, StringDB, Reactome, KEGG, BioGRID
MFN1	mitofusin 1	HFZO1, HFZO2, FLJ20693	3	Guanozin içeren bileşik metabolik süreç, mitokondriyal membranın tamamlayıcı bileşeni, mitokondriyal dış zarın içsel bileşeni, mitokondriyal membran organizasyonu, pürin nükleosid trifosfat metabolik süreci, ribonükleosit trifosfat metabolik süreci	InBioDiscover, UCSC, StringDB, Reactome, KEGG,
OPA1	optic atrophy 1	FLJ12460, KIAA0567, MGM1, NPG, NTG	3	Mitokondri lokalizasyonunun kurulması, mikrotübül aracılı, guanozin içeren bileşik metabolik süreç, mitokondriyal membran organizasyonu, nükleozit trifosfat metabolik süreç, fosfatidilgliserol bağlanması, protein polimerizasyonu, pürin ribonükleosit trifosfat metabolik süreci, endoplazmik retikulum stresinin indüklediği içsel apoptotik sinyal yolunun düzenlenmesi, mitokondri organizasyonunun düzenlenmesi, mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi, tübülin bağlanması	StringDB, UCSC, BioGRID
FIS1	fission protein 1	TTC11; CGI-135	7	Mitokondriyal ve peroksizomal bölünmeye aracılık eder ve gelişimsel olarak düzenlenen apoptoz ve programlanmış nekrozda rol oynar. Bu genin işlevsizliği Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarla ve kusurlu mitokondriyal ve peroksizomal fisyona (EMPF) bağlı ölümcül olan otozomal dominant bozukluk olan ensefalopati ile ilişkilidir.	KEGG, StringDB, UCSC
PRKN	PARK2	AR-JP, PARK2, PDJ, PARKIN	6	Mitokondri organizasyonunun pozitif düzenlenmesi, proteolizin pozitif düzenlenmesi, endoplazmik retikulum stresine yanıt olarak içsel apoptotik sinyal yolu, mitokondriyal fisyon, mitokondriyal füzyon, mitokondriyal taşınma, mitofaji, protein polimerizasyonu, mitokondriyal depolarizasyona yanıt olarak mitokondrinin otofajisinin pozitif düzenlenmesi, mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi, viral genom replikasyonunun düzenlenmesi, sinaptik vezikül lokalizasyonu, sinaptik vezikül taşınması, ubikuitin benzeri protein ligaz bağlanması, membrandan vezikül tomurcuklanması, vezikül lokalizasyonu	StringDB, KEGG, InBio, Reactome, BioGRID
VPS13D	vacuolar protein sorting 13	BLTP5D, FLJ10619, KIAA0453	1	Vmp1, Vps13D ve Marf/Mfn2, gelişim ve hastalıkta mitokondri ve ER temasını düzenlemek için korunmuş bir yolda işlev görür. VPS13D, VCP/p97 ile etkileşime girer ve endoplazmik retikulum-mitokondri etkileşimlerini negatif olarak düzenler.	InBioDiscover, StringDB
SLC25A3	solute carrier family 25 member	PHC, PIC, PTP	12	Fosfat taşıyıcı protein, mitokondriyal insanlarda SLC25A3 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Kodlanmış protein, mitokondriyal iç zarda yer alan bir transmembran proteindir ve oksidatif fosforilasyon amacıyla fosfat iyonlarının bu zar boyunca taşınmasını katalize eder.	UCSC
SLC25A5	solute carrier family 25	2F1, ANT2, T2, T3	X	ADP/ATP translokaz 2, insanlarda X kromozomu üzerindeki SLC25A5 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu protein, mitokondriyal matris ve sitoplazma arasındaki ADP/ATP değişimi için bir antiporter olarak işlev görür.	UCSC

Şekil 3-6: Tez kapsamında oluşturulan gen listesinde yer alan gen örnekleri

MFN2 ile ilişkili yolak analizinde oluşturulan gen listesi ve HPO'da hastalık fenotipi ile ilişkili gen listesinden oluşan iki ayrı liste, analiz filtresi olarak kullanılmak üzere düşe-yara (*vlookup*) formülü ile .xlsx formatındaki final olgu dosyalarına eklenmiştir. Gen bazlı analiz yaklaşımında önce yolak ilişkili genler standart filtre (Gnomad v3 allel frekansı (AF≤0.005), ClinVar benign olmayan varyantlar, kohort AF > 0,9 ve intronik olmayan varyantlar) analiz edilmiştir. Daha sonra HPO genleri standart filtre de uygulanarak analiz edilmiştir.

Varyant temelli analiz kapsamında; 1.ClinVar'da patojenik ve olası patojenik olarak bildirilen tüm varyantlar, 2. *In silico* tahmin araçlarında patojenik ve olası patojenik olarak bildirilen varyantlar ve ilişkili oldukları genler analiz edilmiştir. *In silico*

analizlerde en optimal analizi gerçekleştirebilmek için BayesDel (Feng, 2017), CADD (Rentzsch et al., 2019) DANN (Quang et al., 2015), DEOGEN (Raimondi et al., 2017), FATHMM (Rogers et al., 2018), MetaLR (Dong et al., 2015), MetaRNN (Li et al., 2022), MetaSVM (Dong et al., 2015), MutPred (Pejaver et al., 2020), MutationAssessor (Reva et al., 2007), MutationTaster (Schwarz et al., 2014), PROVEAN (Choi and Chan, 2015), Polyphen (Adzhubei et al., 2013), PrimateAI (Sundaram et al., 2018), REVEL (Ioannidis et al., 2016), SIFT (Kumar et al., 2009) tahmin araçları farklı kombinasyonlarla denenmiştir. Yapılan analiz sırasında patojenite tahminlemesinde BayesDel in silico tahmin aracının (eşik değer>0.29) en iyi perfomans gösterdiği görülmüştür. Ardından yapılan literatür araştırmasında, in silico tahmin araçlarındaki patojenik ve benign varyantlara denk gelen tahmini eşik değerlerinin karşılaştırıldığı araştırmada, BayesDel eşik değerinin 0,29'un üstünde olduğu patojenite skorlarının tahminlemede güçlü kanıtlar sağlayabileceği bildirilmiştir (Pejaver et al., 2022). Ayrıca bu çalışmada BayesDel ve VEST4 araçlarının patojenik varyantlarının tahminlenmesinde, CADD ve MutPred2/REVEL kombinasyonunun benign varyant tahminlenmesinde en iyi performansı gösterdiği belirtilmiştir (Pejaver et al., 2022). Güncel verilerden yararlanarak belirlenen eşik değerler ile varyant bazlı *in silico* patojenite tahminlemeleri gerçekleştirilmiştir. Eşik değerlerin üstünde olan varyantlar Franklin (https://franklin.genoox.com/clinical-db/home), Varsome (https://varsome.com/), NCBI-dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/) klinik veritabanlarında araştırılmıştır. Patojenik ve olası patojenik olarak sınıflandırılan varyantlar infertilite, tekrarlayan gebelik kaybı ve mitokondriyal dinamiğe etkileri ve doku spesifik gen anlatım profilleri açısından değerlendirilmiştir. Bu kapsamda literatürdeki çalışmalardan yoğun olarak faydalanılmıştır.

3.3. Biyoinformatik Analizler: *Burden* Analizi

Burden (yük) analizi yaklaşımında, belirli bir gendeki varyantları taşıyan bireylerin sayısı, hastalık ve kontrol kohortları arasında karşılaştırma yapılmaktadır. Analiz sonucu elde edilen veriler nadir görülen, proteini değiştiren varyantlar için filtrelenebilmektedir. Bu analiz kapsamında, *in-house* veritabanındaki n=367 olgu ile tez olgu grubu karşılaştırılmıştır. Genlerdeki homozigot ve heterozigot varyant sayısını içeren zigozite bilgisi, gen adı ve lokasyon içeren çalışma dosyası oluşturularak p

değerine göre anlamlı genler ($p<0.05$) sıralanmıştır. Ayrıca MAF<0.05 olacak şekilde filtreme yapılmıştır.

3.4. Sanger Dizileme ile Varyantların Konfirmasyonu

Potansiyel gen varyantları tanımlandıktan sonra hedef gen bölgelerine özgü primer tasarımı yapılmış ve Sanger dizileme ile dizilenerek konfirme edilmiştir. Varyantların konfirmasyonunda olgu ve tespit edilen varyanların sayısının yüksek olması nedeniyle önceliklendirme yapılmıştır. TED analizleri sonucunda olgularda ortak olarak tespit edilen, mitokondriyal dinamik ve *MFN2* geni ile ilişkili olan ve klinik olarak anlamlı olduğu değerlendirilen varyantların indeks olgularda doğrulanması sağlanmıştır.

3.4.1. Sanger Dizileme Yöntemi için Primerlerin Tasarlanması

Primerlerin tasarlanmasında öncelikli olarak hedef bölgenin belirlenmesi için Ensembl veritabanından (Ensembl Genom Browser, Release 111, Jan. 2024, https://www.ensembl.org/index.html) yararlanılmıştır. GRCh38.p14 — hg38 referans insan genomunda hedef gen bölgesi ve değişim tespit edilmiştir. Hedeflenen bölgeye spesifik primerlerin tasarlarımında, polimorfik bölgelerin çoğaltılmasından kaçınmak amacıyla nadir varyantlar (MAF<%0.01) haricindeki varyantları içerecek şekilde filtrelenmiştir.

Polimorfik değişimleri ve tekrar dizileri içermeyen yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda primerler tasarlanmıştır. İleri ve geri primerlerin GC içeriği (yaklaşık %40-60 oranında olmalı) erime sıcaklıları (TM, *melting temperature*) (en fazla 2-5 °C fark olmalı), self-dimer, heterodimer ve saç tokası oluşumları OligoAnalyzer programı Integrated DNA Technologies (IDT, https://www.idtdna.com/pages) kullanılarak kontrol edilmiştir.

Tasarlanan primerlerin hedeflenen genomik bölgeye spesifikliğinin doğrulanması için NBCI Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) aracı kullanılarak analiz yapılmıştır.

Tez kapsamında tasarlanan primerlerin dizileri Tablo 3-2'de gösterilmektedir.

Tablo 3-2: Primer bilgileri

Gen Adı	Primer dizisi	Tm	Amplikon boyutu
MUTYH-7F	5’- TAC CAC CTT CAC CCT TGA CC -3’	59	504 bç
MUTYH-7R	5’- AAG AGT TAG CCT GGG CTG G -3’	59	
MUTYH-10F	5’- GTG GAT GGC AAC GTA GCA C -3’	59	475 bç
MUTYH-10R	5’- GAG AGG CAC AGG GTT GAG T -3’	59	
WNT10A-3F	5’- CTC TCC TGC ATA CTG GGC T -3’	59	600 bç
WNT10A-3R	5’- AGG TGT GAC ATG TGG GAG C -3’	59	

3.4.2. Sanger Konfirmasyonu için PZR Yönteminin Kullanılması

PZR aşamasında 100 µM hacimdeki primer stok primer dilusyonu 2,5 µM olacak şekilde sulandırılmıştır. PZR reaksiyonunda kullanılarak solüsyonlar istenilen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Her örnek için 0,2 mL’lik PZR tüpleri hazırlanarak etiketlenmiştir. Final hacim 25 µM olacak şekilde PZR bileşenleri tüpe eklenmiştir.

Tablo 3-4: PZR bileşenleri

PZR Bileşeni	**Hacim (µL)**
dH_2O	13,25
10X $(NH4)_2SO4$ tampon solüsyonu	2,5
25 mM MgCl2	2
25 µM dNTP	2
2 µM İleri primer	2
2 µM Geri primer	2
0,25 Taq polimeraz enzimi	0,25
Örneğe ait DNA	1
Toplam Hacim	25

BIORAD-T100 termal döngü cihazında Tablo 3-5'te verilen çalışma koşullarında PZR gerçekleştirilmiştir.

Tablo: 3-5: PZR koşulları

Denatürasyon	98 °C	3 dakika	
Denatürasyon	95 °C	45 sn	35 siklus
Bağlanma	Primere özgü bağlanma ısısı	45 sn	
Uzama	72 °C	60 sn	
Uzama	72 °C	7-10 dakika	

PZR sonrasında her amplifikasyon ürününden 5 µL örnek %1,2'lik agaroz jele yüklenmiştir. Tampon çözelti olarak 1X TBE kullanılmıştır. Örnekler, jel elektroforez sisteminde 120 voltta, 20 dakika boyunca yürütülmüştür. Ardından, jel görüntülemesi UV ışığı altında yapılarak, PZR çalışmasının kalitesi ile elde edilen ürün değerlendirilmiştir.

3.4.3. PZR Ürününün Saflaştırılması

Sanger yöntemi ile dizilenecek olgulara ait PZR ürünlerin saflaştırılma adımında enzimatik yöntem kullanılmıştır. PZR amplifikasyonuna göre ayarlanan miktarda, PZR ürününe ekzonükleaz (Exonuclease-I, Thermo Scientific) enzimi 1 µl ve alkalen fosfataz (Rapid Alkaline Phosphatase, Roche) enzimi 1 µl eklenmiştir. Distile su eklenerek total hacim 5 µl'ye tamamlanmıştır. Saflaştırma için termal döngü cihazının programı 37 °C'de 30 dk, 85 °C 15 dk ve 4 °C'de ∞ olarak belirlenmiştir. Termal döngü cihazına yerleştirildikten sonra önceden belirlenmiş olan program başlatıldı.

3.4.4. Sanger Dizileme Sonrası Analiz

Sanger yöntemi ile elde edilen veriler SeqScape™ Software v3.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Olgulara İlişkin Bilgiler ve Tüm Ekzom Dizileme Analiz Sonuçları

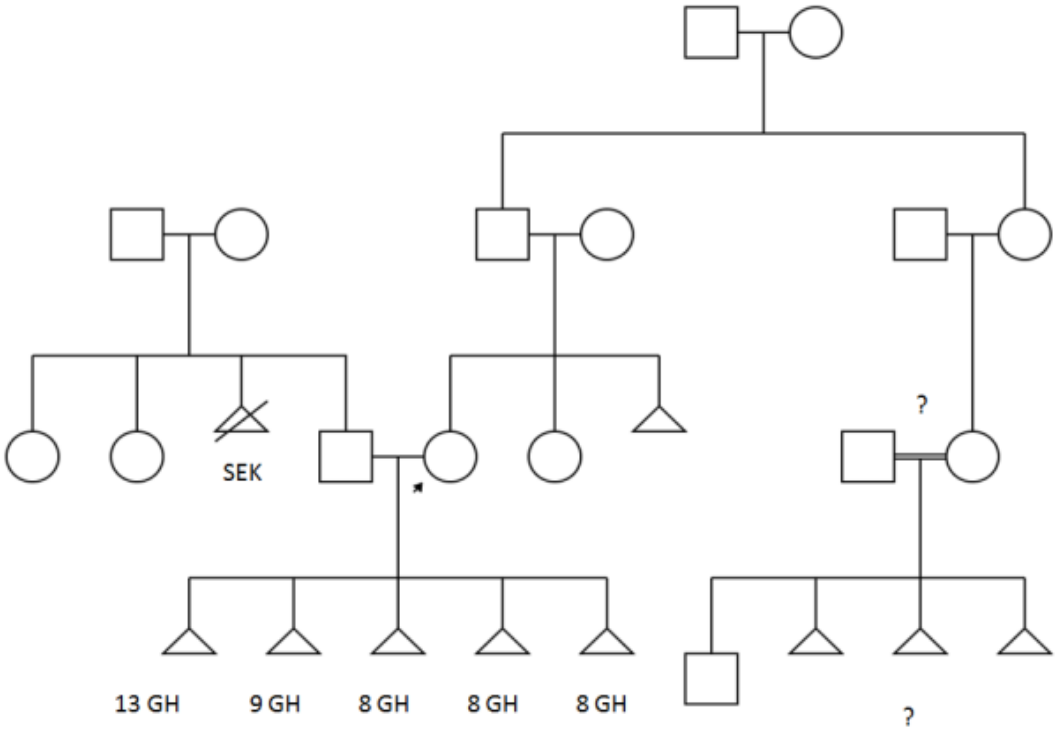
Daha önceki iki tez çalışması kapsamında TED yapılmış olan 25 kadın olgu ve 10 çiftin verilerinin yeniden analizinde mitokondriyal füzyon-fisyon yolağı ile ilişkili olan 389 gen araştırılmıştır. Bu analiz sonucunda tespit edilen ilişkili varyantlara bulgu tablolarında yer verilmiştir.

Burden analizi sonucunda TED analizinde de tespit edilen *GATA1, CCDC141, ABCA4, TTC21B, MUC4* ve *MUC3A* genlerindeki varyant yükünün referans olgu grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu verilere olgular içerisinde yer verilmiştir.

4.1.1. Olgu-1-TGK Kadın Olgu

Olgu-1, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 31 yaşında, G5A5 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebeliği 20 yaşında olmuştur. Akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır. Bütün gebelikleri spontan olarak oluşmuştur ve gebelik kaybı haftaları A1: 13.GH, A2: 9.GH, A3-5: 8.GH şeklindedir. Fetuslardan A3'ün karyotipi 46,XX olarak saptanmıştır. G4 ve G5 gebelikleri sırasında asetil salisilik asit ve düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanmıştır. Ailesinde annesi (G3P2A1) ve hala kızı (G4P1A3) olmak üzere 2 olguda benzer şekilde tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü bildirilmiştir.

Olgu 1, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-1-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-1'de sunulmuştur.



Şekil 4-1-1: Olgu-1-TGK kadın olgu aile ağacı (Berkay, 2020).

Tablo 4-1: Olgu-1-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	**Zigosite**	**Kalıtım modeli**	**Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)**	**dbSNP rs no**	**Varyant sınıfı**
KPNA7 (NM_001145715.3)	Het	OR	KPNA7:c.607C>T (p.Leu203Phe) yanlış anlamlı phyloP100: 2.62	rs146752157	VUS: ACMG/PM2 Patojenik: MetaLR, FATHMM, SIFT, Polyphen, DANN, MutationTaster

CDC20 (NM_001255.3)	Het	OR	CDC20:c.1434G>A (p.Ala478=) sinonim phyloP100: -3.27	rs149511787	VUS: ACMG/PM2,BP7
*HFM1** (NM_001017975.6)	Het	OR	HFM1:c.2521C>T (p.Arg841Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 2.45	rs775049733	VUS: ACMG/PM2
ABCB8 (NM_007188.5)	Het	Bilinmiyor	ABCB8:c.944G>A (p.Gly315Asp) yanlış anlamlı phyloP100: 3.79	rs373829198	VUS: ACMG/PM2,PP3 Patojenik: BayesDel, Revel, DANN, MutationTaster
ABCA4 (NM_000350.3)	Het	OR	ABCA4:c.5882G>A (p.Gly1961Glu) yanlış anlamlı phyloP100: 5.88	rs1800553	Olası Patojenik: ACMG/PM2,PM5,PP3, PP2,PP5 Patojenik: BayesDel, Revel, AlphaMissense, SIFT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, MutationTaster

DNAH14 (NM_001367479.1)	Het	Bilinmiyor	DNAH14:c.2438C>G (p.Ser813*) stop kodon phyloP100: 2.39	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PVS1,PM2 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster
CELSR2 (NM_001408.3)	Het	Bilinmiyor	CELSR2:c.3830C>T (p.Pro1277Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 6.11	rs561330579	Olası Patojenik: ACMG/PVS1,PM2 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster
ACOX3 (NM_003501.3)	Het	Bilinmiyor	ACOX3:c.1579C>T (p.Arg527*) stop kodon phyloP100: 4.657	rs146945288	VUS: ACMG/PM2 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster
ANAPC2 (NM_013366.4)	Het	Bilinmiyor	ANAPC2:c.1609C>T (p.Arg537Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 2.647	rs1489107893	VUS: ACMG/PM2,PP3 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster, Revel, MutationAssessor, PrimatAI
*WNT4** (NM_030761.5)	Het	AR	WNT4:c.896C>T (p.Thr299Met) yanlış anlamlı	rs1264065222	VUS: ACMG/PM2,PP3 Patojenik: Revel, Eve, MutationAssessor,

			phyloP100: 9.98		SIFT, MutationTaster, DANN, Primate AI
CDC42BPB (NM_006035.4)	Het	Bilinmiyor	CDC42BPB:c.4610C>G (p.Pro1537Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 9.90	*rs752024361*	VUS: ACMG/PM2,PP2 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster
WRAP53 (NM_001143992.2)	Het	Bilinmiyor	WRAP53:c.655C>T (p.Arg219*) stop kodon phyloP100: 2.22	rs773908331	Olası Patojenik: ACMG/PVS1,PM2 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster
MED12 (NM_005120.3)	Het	X'e bağlı dominant, X'e bağlı	MED12:c.2425G>T (p.Gly809Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 7.799	rs:-	VUS: ACMG/PM2,PP3 Patojenik: BayesDel, DANN, MutationTaster, Revel, SIFT, PrimateAI

* İşaretli gen varyantları önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Olgu 1'de ATP bağlı kaset taşıyıcıları ailesinden *ABCB8* ve *ABCA4* genlerinde varyant saptanmıştır. *ABCB8* geni, organik ve inorganik moleküllerin mitokondriden geçişine aracılık etmektedir. ACMG sınıflandırmasına göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici varyant saptanan bu genin farelerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları sonucunda mitokondri ve sitozol arasında demir homeostazının bozulduğu ve oksidatif streste artış tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıplarında da rol oynayabileceği vurgulanan (Srivastava et al., 2023, Gourhant et al., 2021, Cao et al.,

2022) *ABCA4* geninde ACMG sınıflandırmasına göre olası patojenik bir varyant saptanmıştır. *ABCA4* geni *burden* analizinde istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ve analiz verilerine Şekil 4-1-2'de yer verilmiştir.

Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
ABCA4	163	285	384	366	8,5922509314209 6E-07	1	24,2202854490924	[[204.5542571243.4457429] [342.4457429407.5542571]]

Şekil 4-1-2: ABCA4 geni *burden* analiz sonucu

Literatürde WES analizlerinde saptanan ve TGK için aday gen olarak araştırılan mikrotübül ilişkili motor protein kompleksini kodlayan *DNAH14* geninde ACMG sınflandırmasına göre olası patojenik bir varyant tespit edilmiştir.

Yağ asitlerinin peroksizomal β-oksidasyonunda görevli olan ve mitokondri ile ilişkili oksidatif stres ve karnitin metabolizmasında görevli *ACOX3* geninde (Szrok-Jurga et al., 2023) ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant tespit edilmiştir.

Hücre döngüsünde metafazdan anafaza ubikitin aracılı geçişte işlev gören ve TGK ile ilişkili yapılan araştırmalarda tespit edilen (Karim et al., 2017) *ANAPC2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant tespit edilmiştir.

Tekrarlayan gebelik kayıplarında da rol oynayan müllerian kanal gelişimi ile ilişkili *WNT4* (Philibert et al., 2011) ve *CDC42BPB* (Santana Gonzalez et al., 2021) genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

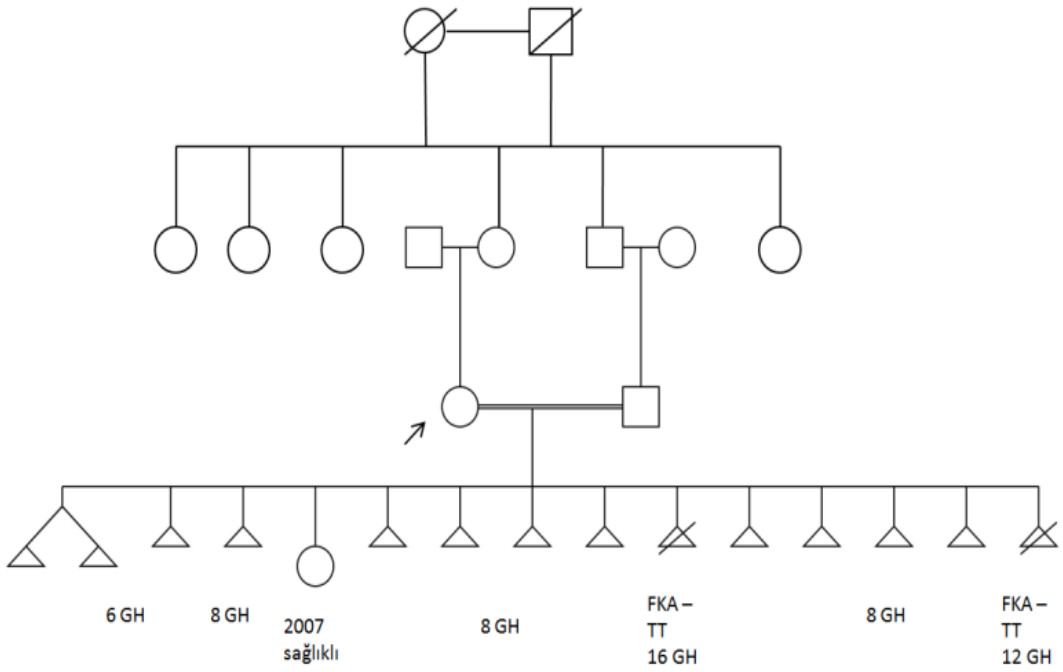
Memelilerde yumurtalık steroidogenezini, uterus gelişimini ve maternal etkileri düzenleyen *MED12* geninde (Wang et al., 2017) ve telomer homeostazı ile DNA hasar tamirinde görevli WRAP53 geninde (Bergstrand et al., 2020) ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

Erken embriyonik duraklaması ve implantasyon kaybı ile ilişkili *KPNA7* (Wang et al., 2023) ve *CDC20* genlerinde (Huang et al., 2021), tekrarlayan implantasyon kaybı ve primer overyan yetmezlik ilişkili *HFM1* (Yu et al., 2022) ve *MCM8* genlerinde VUS varyantlar tespit edilmiştir.

4.1.2. Olgu-2-TGK Kadın Olgu

Olgu 2, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 37 yaşında, G14P1A13 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 22'dir. Eşiyle arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttur. Bütün gebelikleri spontan olarak oluşmuştur ve gebelik kaybı haftaları A1-2: 6. GH, A3-7,9-12:8.GH, A3-5:8.GH şeklindedir. Fetuslardan A13'ün fetus muayenesinde posterior fossada kistik genişleme (8,9x7 mm) mevcut olup array analizi 46,XY;arr(1-22)x2,(X,Y)x1 olarak sonuçlanmıştır. Olgunun ek hastalık öyküsünde aritmi ve Diltiazem HCI ilaç kullanımı mevcuttur.

Olgu 2, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-2-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-2'de sunulmuştur.



Şekil 4-2-1: Olgu-2-TGK kadın olgu aile ağacı (Berkay, 2020).

Tablo 4-2: Olgu-2-TGK kadın olgu TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigo site	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
MFN2 (NM_014874.4)	Het	Bilinmiyor	MFN2:c.1637C>G (p.Ser546Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 7.57	rs:-	VUS:ACMG/PM2,PP3,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, Eve, SIFT, MutationTaster, DANN, PrimateAI
MFN1 (NM_033540.3)	Het	Bilinmiyor	MFN1:c.1387G>A (p.Asp463Asn) yanlış anlamlı phyloP100: 2.87	rs200358054	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: DANN, MutationTaster
VPS13C (NM_020821.3)	Het	Bilinmiyor	VPS13C:c.8443A>G (p.Lys2815Glu) yanlış anlamlı phyloP100: 5.84	rs766062581	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: SIFT, DANN, MutationTaster, Eve
AMBRA1 (NM_001387011.1)	Het	Bilinmiyor	AMBRA1:c.2854A>G (p.Met952Val)	rs143074080	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici:

			yanlış anlamlı phyloP100: 7.88		DANN, MutationTaster
UBB (NM_001281716.2)	Het	Bilinmiyor	UBB:c.-7+10del (p.?) upstream varyant phyloP100: -5.63	rs571349439	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: Aggregated Prediction Deleterious (0.71, SpliceAI:Splice-altering
MSH4 (NM_002440.4)	Het	OR	MSH4:c.205_207dup (p.Ser69dup) inframe insersiyon phyloP100: 4.52	rs760951616	VUS: ACMG/PM2,PM4
LMNB1 (NM_005573.4)	Het	OD	LMNB1:c.1361T>C (p.Ile454Thr) yanlış anlamlı phyloP100: 7.67	rs748388376	Olası patojenik: ACMG: PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationAssessor, MutationTaster, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
PEX6 (NM_000287.4)	Het	OR, OD	PEX6:c.1136G>A (p.Arg379Gln) yanlış anlamlı phyloP100: 0.76	rs774086639	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: DANN

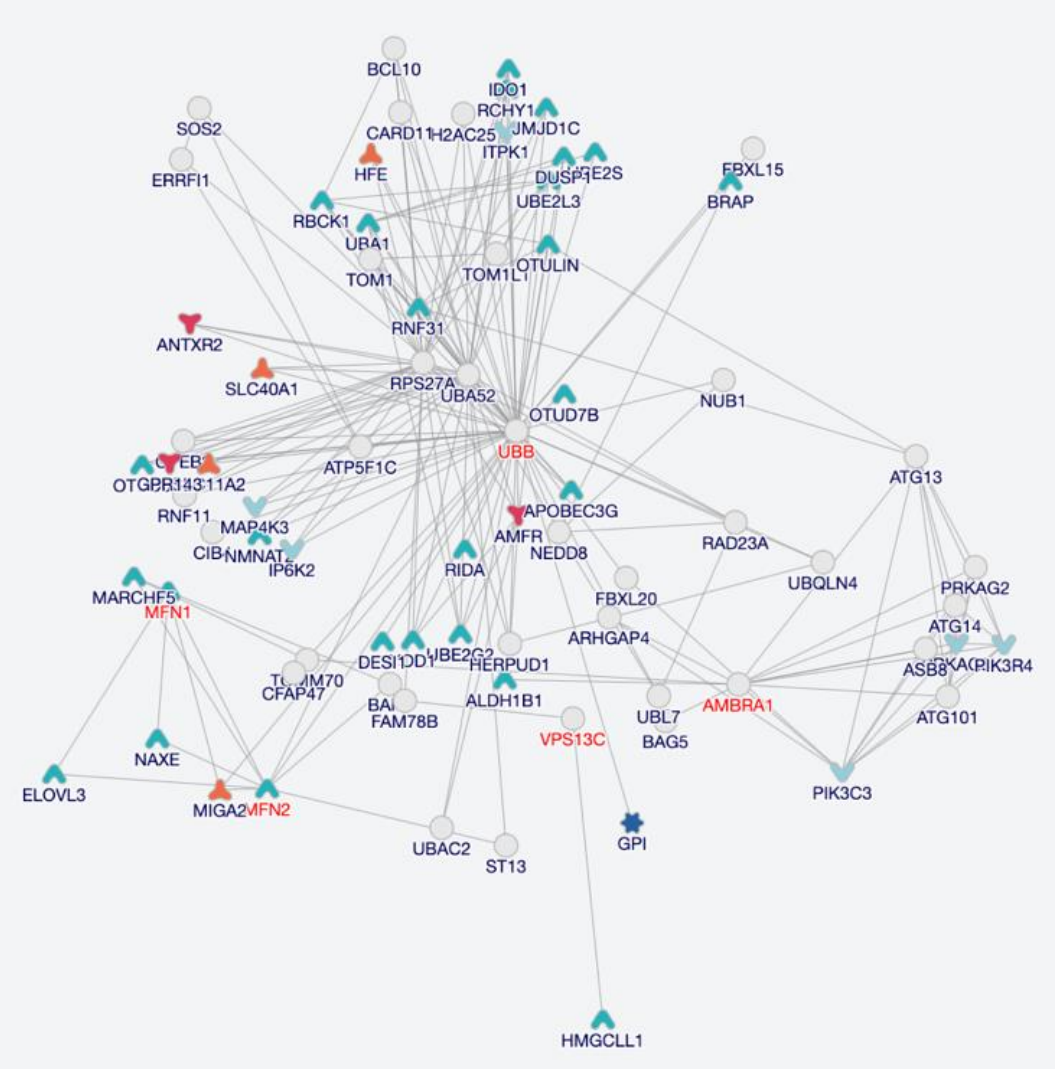
Olgu-2'de *MFN2* geni ile aynı yolakta yer alan, gen-gen etkileşimi gösteren ve mitokondriyal dinamikte görevli olan *MFN1*, *AMBRA1*, *VPS13C* ve *UBB* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyantlar saptanmıştır. Ayrıca mayotik rekombinasyon, DNA hasar tamiri ve oksidatif stres ilişkili *MSH4, LMNB1, PEX6* genlerinde de varyant tespit edilmiştir.

MFN2 geni oksidatif metabolizma, mitofaji, apoptoz ve ER - mitokondri etkileşiminde, mitokondriyal füzyonda, yağ, kalsiyum homeostazında görevlidir. *MFN1* geni, mitokondriyal füzyonda, ER-mitokondri bağlanmasında görevlidir. Yapılan deneysel araştırmalar kapsamında mitokondri dış membranında yer alarak füzyonda rol oynayan *Mfn2* ve *Mfn1* genlerinin farelerde oosit spesifik delesyonu sonucunda kusurlu folikülogenez ve oogenez, reprodüktif yaşlanma ve mitokondriyal disfonksiyon ilişkili infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı meydana geldiği tespit edilmiştir (Zhang et al., 2019, Zhao et al., 2022). *Mfn1* ve *Mfn2'nin* fare oositlerinde aşırı ekspresyonu, özellikle mayoz bölünme sırasında mitokondrilerin birikmesine neden olmuştur. *Mfn1* veya *Mfn2'nin* ya da her ikisinin birden knock-out edilmesi embriyonik lethalite ile sonuçlanmıştır. *VPS13C* otozomal resesif Parkinson hastalığı ile ilişkili olsa da, *VPS13C* geninin susturulması sonucunda mitokondri membran potansiyelinin değiştiği, mitokondriyal fisyonun arttığı ve PINK1/Parkin bağımlı mitofaji yolağının uyarıldığı saptanmıştır (Lesage et al., 2016).

AMBRA1 geni, hasarlı veya çeşitli nedenlerle yok edilmesi gereken mitokondrinin seçici bir otofaji şekli olan mitofaji yoluyla uzaklaştırılmasında rol almaktadır. Hücre homeostazı, yaşlanma, tümör gelişimi, nörodejenerasyonda önemlidir. *AMBRA1* prootofajik bir molekül olarak hem PINK1/PARKIN bağımlı ve hem de PINK1/PARKIN bağımsız yolaklarda mitofaji düzenleyicisidir. Farelerde normal gelişim için gerekli otofaji aktive edici genlerden *AMBRA1'in* delesyonu sonucunda embriyonik letalite meydana geldiği bildirilmiştir (Nakashima et al., 2023).

UBB geni, ubikitini kodlayan korunmuş genlerden biridir ve hücre ölümü ve mitokondriyal dinamikte görevlidir.

Olguda tespit edilen genlerin etkileşim haritasına Şekil 4-2-2'de yer verilmiştir.



Şekil 4-2-2: Olgu-3-TGK TED analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritası *(ZS Revelen yolak haritalama aracı kullanılarak oluşturulmuştur, cut-off:0.4)*

Mayotik rekombinasyonda DNA çift zincir kırıklarının onarımında ve mayoz bölünmede DNA yanlış eşleşme tamir sisteminde görevli olan *MSH4* geninde (Wyrwoll et al., 2021) ACMG kriterlerine göre VUS bir varyant saptanmıştır. *MSH4* geni OR prematür ovaryen yetmezlik ile ilişkilendirilmiştir. DNA hasar tamirinde meydana gelen kusurlar sonucunda meydana gelen genomik instabilite tekrarlayan gebelik kayıpları ve infertiliteye sebep olabilmektedir (Mukherjee et al., 2010).

Mutasyonları kromozomal instabilite ve DNA hasarı ile ilişkilendirilmiş olan *LMNB1* geni, *RAD51* geni ile etkileşerek homolog rekombinasyon tamir sisteminde görev alır (Evangelisti et al., 2022). Embriyonik gelişimde, organogenezde ve özellikle beyin

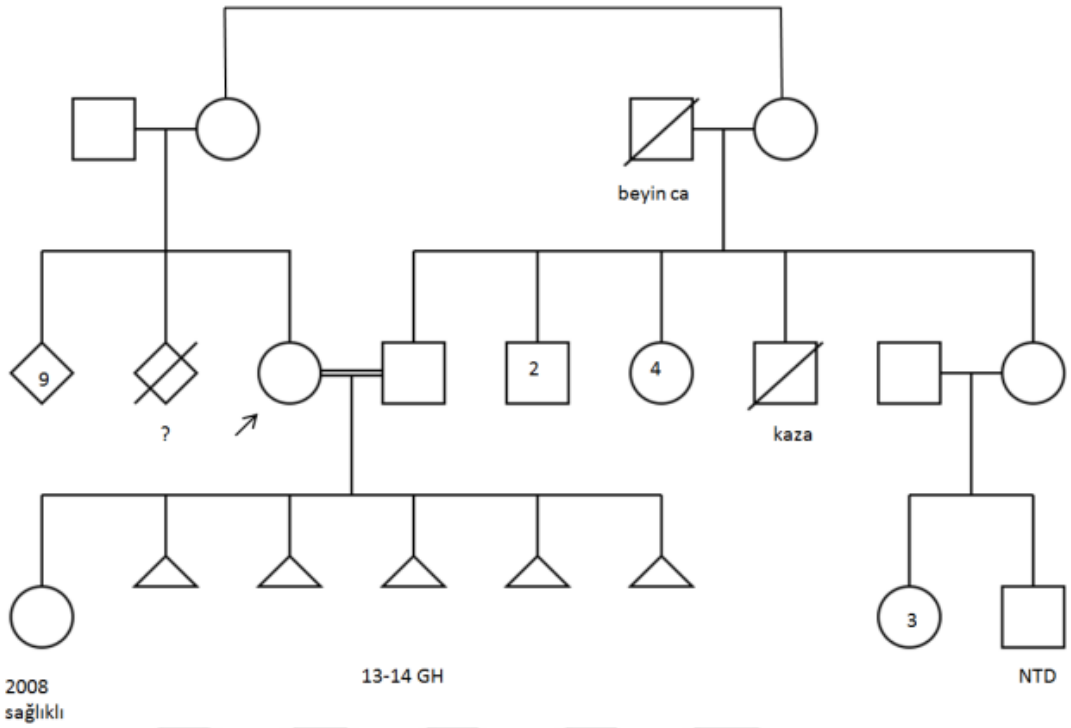
gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Evangelisti et al., 2022). Varyant analizinde *LMNB1* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır.

Peroksizom biyogenezinde görevli olan ve oksidatif hasar ilişkili *PEX6* geninde (Li et al., 2021) ACMG kriterlerine göre VUS ve DANN in silico tahmin aracında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır.

4.1.3. Olgu-3-TGK Kadın Olgu

Olgu 3, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 36 yaşında, G6P1A5 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 24'dür. Eşiyle arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttur. Bütün gebelikleri spontan olarak oluşmuştur ve gebelik kaybı haftaları A1-4: < 13.GH, A5: 13. GH şeklindedir. Fetuslardan A5'in fetal USG bulgularında kistik higroma (14,1 mm), generalize cilt ödemi, hipoplazik nazal kemik mevcut olup kromozom ve array analizi 46,XY.arr(1-22)x2,(X,Y)x1 olarak sonuçlanmıştır. Olgunun ek hastalık öyküsünde aritmi ve Diltiazem HCI ilaç kullanımı belirtilmiştir. Ek klinik bulgu olarak histerosalpinografi (HSG) görüntülemesinde gebelik kayıplarına sekonder uterin sineşiler, tuba uterina açık bulguları yer almaktadır.

Olgu 3, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-3-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-3'de sunulmuştur.



Şekil 4-3-1: Olgu-3-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü (Berkay, 2020)

Tablo 4-3: Olgu-3-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
RAD54L (NM_003579.4)	Het	Bilinmiyor	RAD54L:c.2044C>T (p.Arg682*) stop kodon phyloP100: 2.04	rs368105178	VUS: ACMG/PM2,PVS1
SERPINA1 (M_000295.5)	Het	Bilinmiyor	SERPINA1:c.839A>T (p.Asp280Val) yanlış anlamlı phyloP100: 1.16	rs121912714	Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PP3,PS3,PP1,PP5 Zarar Verici: BayesDel, Revel, SIFT,

					MutationTaster, DANN, MetaLR
GATA1 (NM_002049.4)	Het	Bilinmiyor	GATA1:c.337C>T (p.Arg113Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 1.41	rs782263736	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: FATHMM, DANN, MetaLR
ABCG2 (NM_004827.3)	Het	Bilinmiyor	ABCG2:c.884T>C (p.Leu295Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 8.85	rs1345454334	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: BayelDel, Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, SIFT, MutationTaster, DANN
C1QL1 (NM_006688.5)	Het	Bilinmiyor	C1QL1:c.429C>A (p.Tyr143*) stop kodon phyloP100: 1.49	rs: -	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: BayesDel, DANN, MutationTaster

Olguda oksidatif stres ve otofaji ilişkili *GATA1*, *RAD54L* ve *ABCG2* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS varyantlar tespit edilmiştir.

SERPINA1, proteaz inhibitörü (PI) olarak da bilinen alfa-1-antitripsini (AAT) kodlar. AAT proteininde uzun süreli artışlar sağlayarak gebelik streslerine karşı koyulmasına ve/veya fetüse karşı maternal immün toleransın başarılı gebelik için sürdürülmesine olanak tanıyan ve ATT artışının sağlanmaması sonucunda gebelik kaybı ve erken membran rüptürü gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkilendirilmiş olan

SERPINA1 geninde ACMG kriterlerine göre patojenik, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak tahminlenen bir varyant saptanmıştır.

GATA1 geni, hematopoetik hücrelerin normal gelişiminde kritik rol oynamaktadır. X kromozomu üzerinde bulunan genin mutasyonları trombosit ve kırmızı kan hücresi anormalkleri ile ilişkilendirilmiştir. Önceki çalışmalarda *GATA1* genindeki heterozigot mutasyonlarının kadınlarda sık düşüklere sebep olduğu ayrıca erkek hemizigotlarda fetal ölüm riskini artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca *burden* analizinde *GATA1* geninin istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) ve *burden* analizi sonuçlarına Şekil 4-3-2'de yer verilmiştir.

Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
GATA1	31	4	87	0	0,008188003952450 39	1	6,991885836742 64	[[33.852459021.14754098] [84.147540982.85245902]]

Şekil 4-3-2: *GATA1* geni *burden* analizi sonucu

RAD54L geni, DNA çift zicir kırıklarının homolog rekombinasyonla ilgili onarımında rol almaktadır. Daha önceki çalışmalarda, farelerde yaşlı Germinal Vesikül ve MII oositlerinde azalmış Rad51 ekspresyonu, görülmüştür ve yaşlı farelere kıyasla genç farelerin primordial foliküllerinde daha yüksek Rad51 seviyeleri tespit edilmiştir.

ABCG2 geni, biyolojik moleküllerin hücre zarları boyunca taşınmasında rol oynayan ATP-bağlayıcı kaset (ABC) süper ailesine ait bir membran taşıyıcısını kodlamaktadır. Otofaji ve oksidatif stres mekanizmalarfı üzerinden tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkilendirilmiştir.

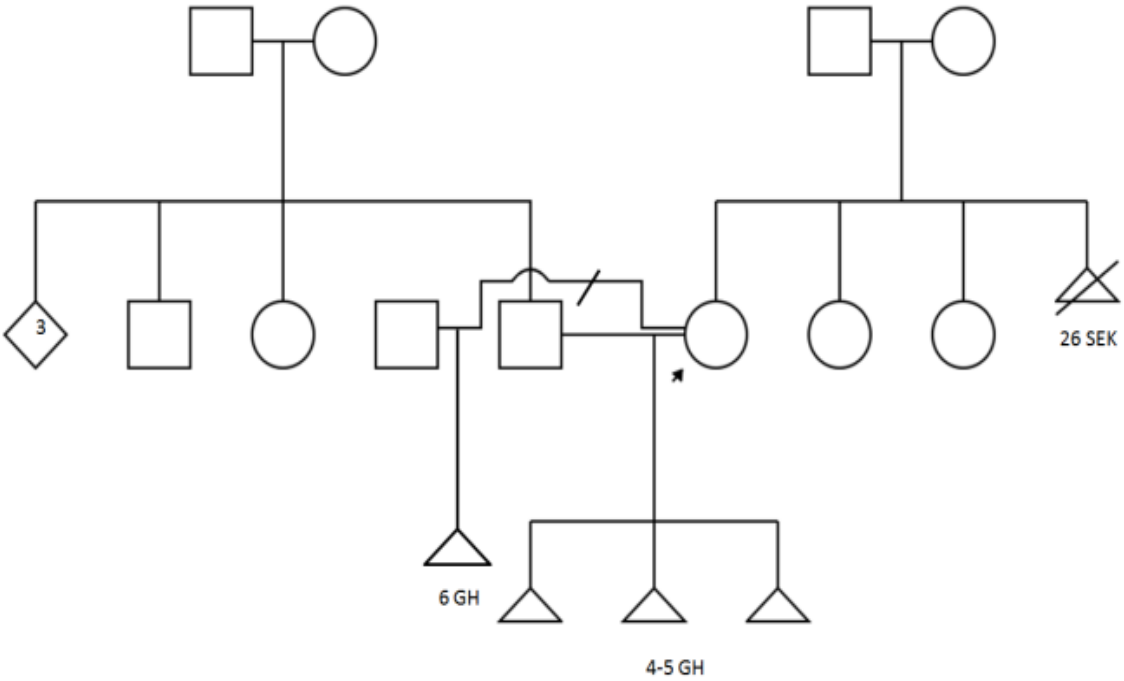
Önceki çalışmalarda follikül tükenmesi ile ilişkilendirilen *C1QL1* geninde ACMG'ye göre VUS, in silico tahmin araçlarına göre zarar verici bir varyant tespit edilmiştir.

4.1.4. Olgu-4-TGK Kadın Olgu

Olgu 4, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 39 yaşında, G4A4 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 29'dur. Akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır. Bütün gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Olgunun ilk eşi ile olan gebeliğinden

gebelik kaybı haftası A1: 6.GH olan bir gebelik kaybı; ikinci eşinden ise A2-4: 4-5. GH olan 3 gebelik kaybı öyküsü mevcuttur. Trombofili panel testinde Faktör 5 G1691A heterozigot değişimi saptanmış, *F2* geninde G2021A ise mutasyon saptanmamıştır. Ek klinik bulgu olarak sağ tubal oklüzyon bulgusu mevcuttur.

Dördüncü olgu TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-4-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-4-2'te sunulmuştur.



Şekil 4-4-1: Olgu-4-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-4: Olgu-4-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı

F2 (NM_000506.5)	Het	AD	F2:c.379A>G (p.Ile127Val) yanlış anlamlı phyloP100: 8.18	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: MutationtTaster, DANN
F5 (NM_000130.5)	Het	AD	F5:c.1601G>T (p.Arg534Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 3.49	rs6025	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: Eve
FER1L6 (NM_001039112.2)	Het	Bilinmiyor	FER1L6:c.2761C>T (p.Pro921Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 5.97	rs: -	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: BayesDel, DANN, AlphaMissense, MutationAssesor, MutationTaster
CD86 (NM_175862.5)	Het	Bilinmiyor	CD86:c.112C>G (p.Leu38Val) yanlış anlamlı phyloP100: 0.84	rs1047493821	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, SIFT, MutationTaster, DANN, BayesDel
SLC29A3 (NM_018344.6)	Het	AR	SLC29A3:c.303_320dup (p.Tyr102_Leu107dup) çerçeve içi insersiyon, kırpılma varyantı phyloP100:8.90	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PM2,PM4,PP5

ABCA4 (NM_000 350.3)	Het	Bilinmiy or	ABCA4:c.5882G> A (p.Gly1961Glu) yanlış anlamlı phyloP100: 5.89	rs18005 53	Olası Patojenik: PM2,PM5,PP3,PP2, PP5 Zarar Verici: Revel, SIFT, MT, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel

G4A4 gebelik kaybı olan Olgu 4'de *F2* geninde trombofili paneli kapsamında tespit edilemeyen ve rutin taramalarda yer almayan *novel* bir varyant tespit edilmiştir. *F2* geni, otozomal dominant tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkilendirilmiştir. Bu varyant, toplumda sık görülen gen varyantlarının rutin olarak tarandığı trombofili panelinde yer almadığından önceki analizler kapsamında tespit edilemediği belirlenmiştir. Tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkisi bilinen ancak trombofili panelinde tespit edilemeyen bu nadir varyantın olgudaki TGK etiyolojisinin açıklanmasına katkı sağladığı görülmüştür.

Trombofili panel testinde saptanan Faktör V G1691A heterozigot değişimi WES analizinde de tespit edilmiştir. *F5* geni otozomal dominant tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkilendirilmiştir. *F5* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, Eve in silico tahmin aracında zarar verici bir varyant tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalarda prematür ovaryen yetmezlik ile ilişkilendirilen *FER1L* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarına göre zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant tespit edilmiştir.

TGK olgularında Fas ligand aracılı apoptozu indükleyen makrofajlarda desidual CD86 + artışı tespit edilmiştir. *CD86* M1 marker geninde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarına göre zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant tespit edilmiştir.

Hipergonadotropik hipogonadizm etiyolojisinde yer alan *SLC29A3* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik olarak sınıflandırılan *novel* heterozigot varyant saptanmıştır.

Önceki çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıplarında da rol oynayabileceği vurgulanan (Srivastava et al., 2023, Gourhant et al., 2021, Cao et al., 2022) *ABCA4* geninde ACMG sınıflandırmasına göre olası patojenik ve heterozigot bir varyant saptanmıştır. Bu gen burden analizinde de istatistiki olarak anlamlı olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$) ve *burden* analiz sonuçlarına Şekil 4-4-2'de yer verilmiştir.

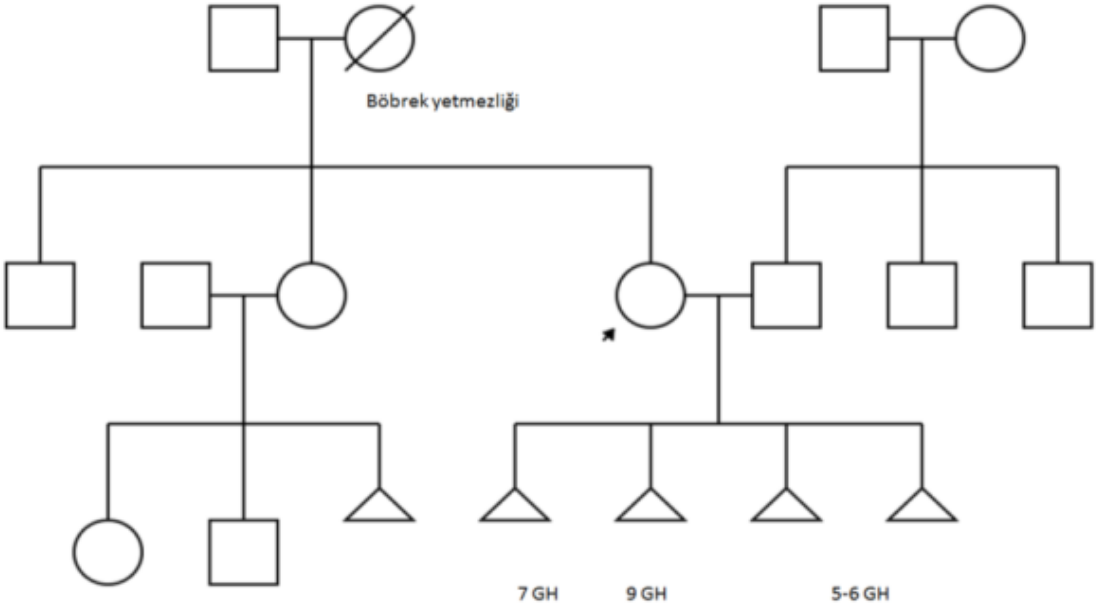
Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
ABCA4	163	285	384	366	8,5922509314209 6E-07	1	24,2202854490924	[[204.554257124 3.4457429] [342.4457429 407.5542571]]

Şekil 4-5-2: *ABCA4* geni burden analiz sonucu

4.1.5. Olgu-5-TGK Kadın Olgu

Olgu 5, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 34 yaşında, G4A4 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 25'dir. Akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır. Bütün gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebeliğinden gebelik kaybı haftaları A1: 7. GH, A2: 9. GH, A3-4: 5-6. GH şeklindedir. Eşiyle Rh (Rhesus faktörü) uyumsuzluğu mevcuttur. Fetal bulgu olarak A4: 46,XY mevcuttur. Ailesinde benzer öykü ve ek klinik bulgu tanımlanmamıştır.

Olgu 5, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-5-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-5'te sunulmuştur.



Şekil 4-5-1: TGK-5 kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-5: TGK-5 kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	**Zigosite**	**Kalıtım Modeli**	**Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)**	**dbSNP rs no**	**Varyant Sınıfı**
DOCK2 (NM_004946.3)	Het	AR	DOCK2:c.3682C>T (p.Arg1228Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 0.85	rs753671821	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, PrimateAI

DOCK2 (NM_004946 .3)	Het	AR	DOCK2:c.4804A>G yanlış anlamlı phyloP100:5.16	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN
ABCA4 (NM_000350.3)	Het	Bilinmiyor	ABCA4:c.5881G>A (p.Gly1961Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 7.64	rs142253670	Patojenik: ACMG/PM3,PP3,PM2,PM5,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
RARS2 (NM_020320.5)	Het	AR mito disease	RARS2:c.215T>C (p.Leu72Pro) yanlış anlamlı phyloP100: 5.52	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, MutationTaster, DANN
PNPLA6 (NM_001166114.2)	Het	AR	PNPLA6:c.1775A>G p.Asp592Gly yanlış anlamlı phyloP100: 9.28	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, MutationTaster, DANN, MetaLR

Bir guanin-nükleotid değişim faktörü olan *DOCK2,* ağırlıklı olarak hematopoetik hücrelerde ifade edilir ve bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve göçünü düzenler. *DOCK2* geninin immun sistem ilişkili doğal öldürücü (NK hücrelerini) düzenleyerek

tekrarlayan gebelik kaybı patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen WES analizi sonucunda *DOCK2* geninde biri *novel olan* 2 farklı missense varyant tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıplarında da rol oynayabileceği vurgulanan (Srivastava et al., 2023, Gourhant et al., 2021, Cao et al., 2022) *ABCA4* geninde ACMG sınıflandırmasına göre olası patojenik ve heterozigot bir varyant saptanmıştır. *Burden* analizinde de istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Burden analizinde istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) olduğu tespit edilen *ABCA4* geninin verilerine Şekil 4-5-2'de yer verilmiştir.

Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
ABCA4	163	285	384	366	8,5922509314209 6E-07	1	24,2202854490924	[[204.5542571243.4457429] [342.4457429407.5542571]]

Şekil 4-5-2: *ABCA4* geni *burden* analiz sonucu

Mitokondri ilişkili *RARS2* geni, tekrarlayan gebelik kayıplarının biyoinformatik olarak araştırıldığı önceki çalışmalarda aday gen olarak tespit edilmiştir. *RARS2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan *novel* varyant saptanmıştır.

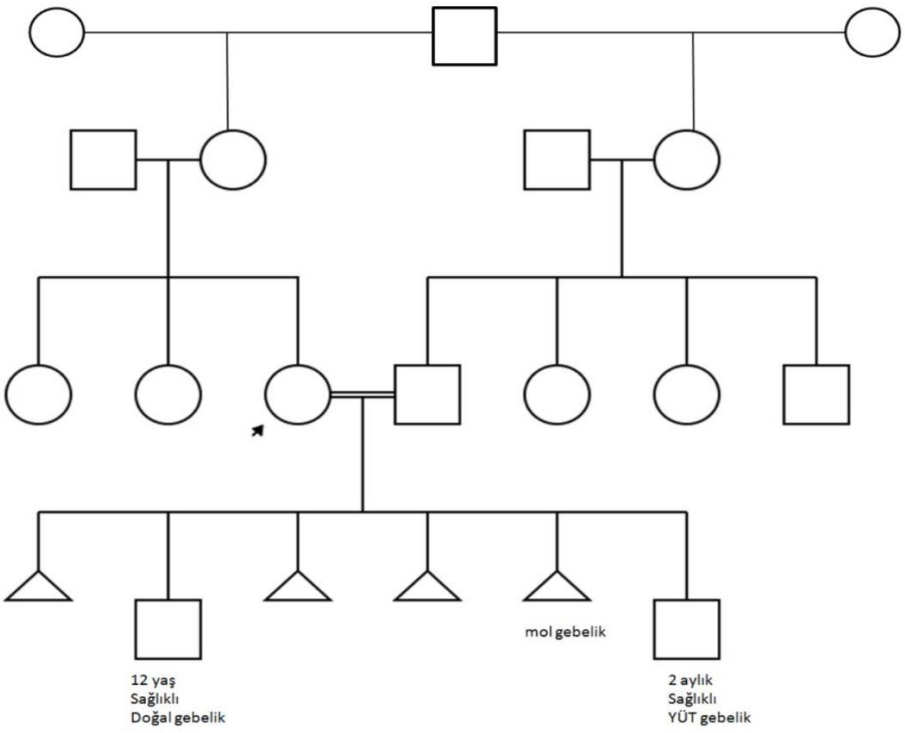
Hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkili *PNPLA6* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır.

4.1.6. Olgu-6-TGK Kadın Olgu

Olgu 6, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 33 yaşında, G6P2A4 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 16'dır. Eşiyle arasında 1,5 derece kuzen evliliği mevcuttur. Gebelikleri spontan ve yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile (bir başarılı ve bir başarısız) oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1: 4. GH, A2-3: 6-7. GH, A4: Parsiyel

mol gebeliktir. Dördüncü aborta ait (A4) fetal karyotip analizinde 69,XXY sonucu mevcuttur. Ailesinde benzer öykü ve ek klinik bulgu tanımlanmamıştır.

Olgu 6, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-6'da ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-6'da sunulmuştur.



Şekil 4-6: Olgu-6-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-6: Olgu-6-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı

CD163 (NM_203416.4)	Het	Bilinmiyor	CD163:c.1639T>C (p.Cys547Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 9.22	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, DANN, PrimateAI
SGO1 (NM_001199251.3)	Het	Bilinmiyor	SGO1:c.67A>G (p.Lys23Glu) yanlış anlamlı phyloP100: 6.24	rs199815268	Olası Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PP3,PS3,PP5 Zarar Verici: Revel, Eve, MutationTaster, DANN
ABCC10 (NM_001198934.2)	Het	Bilinmiyor	ABCC10:c.1696G>A (p.Val566Met) yanlış anlamlı phyloP100: 8.16	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, MutationAssesor, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR

CD163, monositlerde ve makrofajlarda eksprese edilen sistein açısından zengin bir transmembran reseptörüdür. İnflamasyon sonucunda oluşan hemoglobin (Hb) – haptoglobin (Hp) komplekslerinin makrofajlar tarafından yok edilmesinde ve endositozda görev alarak akut fazın düzenlenmesinde önemlidir. Hemoliz sonucunda açığa çıkan hemoglobinin haptoglobuline bağlanarak uzaklaştırılmasında görev alarak

serbest hemoglobin kaynaklı oksidatif doku hasarının önlenmesinde rol oynar. *CD163* geni, TGK'nın immunolojik nedenlerinden olan desidual makrofajların işlev bozukluğu ile ilişkilidir. IL-4, IL-10 ile aktive edilen M2 makrofajları, maternal-fetal arayüzde hamileliğin devamlılığında, fetus için immun toleransın sağlanmasında ve *CD163* gen ekspresyonunda görevlidir. *CD163* gen ekspresyonundaki azalma sonucunda, kaspaz aktivitesinin tetiklendiği, M2 makrofajlarında apoptotik yolakların indüksiyonu sonucunda düşüklere neden olduğu ve TGK etiyopatogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Yao et al., 2020, Zhao et al., 2022). TED analizinde CD163 geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan *novel* varyant saptanmıştır.

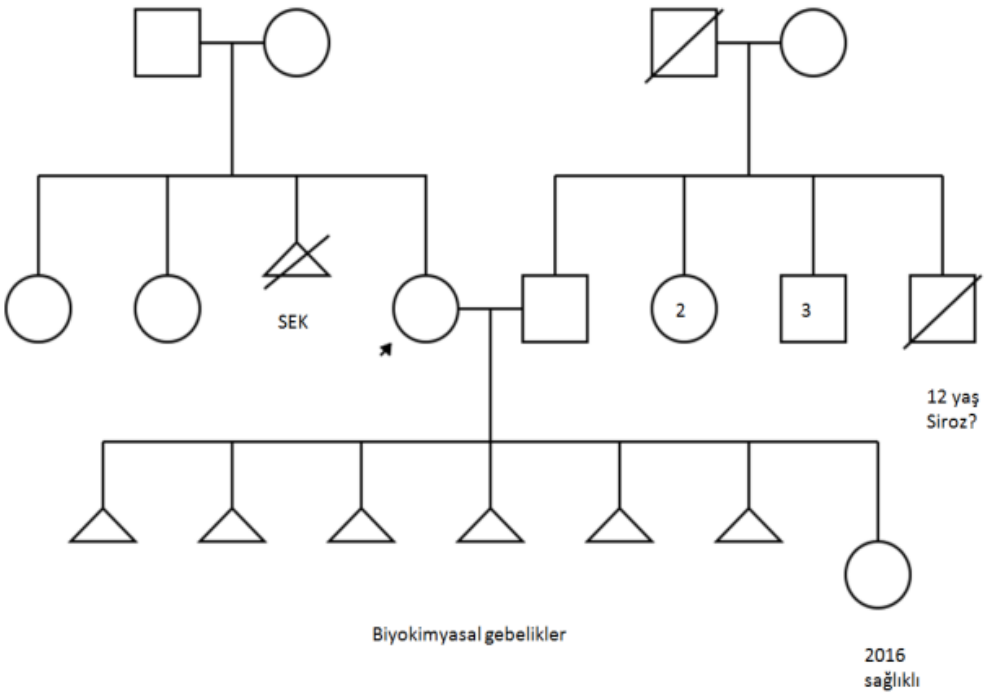
SGO1 geni, hücre bölünmesinde kromatin yoğunlaşması esnasında kardeş kromatitlerin arasını doldurarak kromatitlerin birbirine yapışmasını engelleyen kohezin proteinin fosforilasyonunda görevlidir. *SGO1* gen ekspresyonunun azalması sentromerik kohezyonun erken kaybı, kardeş kromatidlerin yanlış ayrılması ve mitotik arrest ile ilişkilendirilmiştir. Analiz sonucunda *SGO1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır.

İnsan plasentasında fetusun ilaçlar gibi toksik ajanlardan korunmasında önemli rol oynayan ABC taşıyıcılarından *ABCC10 geninde* ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan *novel* varyant saptanmıştır.

4.1.7. Olgu-7-TGK Kadın Olgu

Olgu 7, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 41 yaşında, G7P1A6 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları bilinmemektedir (biyokimyasal gebelikler). Ek hastalık öyküsü olarak Hashimoto tiroidi nedeniyle tiroid hormon tedavisi uygulanmaktadır.

Olgu 7, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-7-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-7'de sunulmuştur.



Şekil 4-7-1: TGK-7 kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-7: TGK-7 kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dnSNP rs no	Varyant sınıfı
MUC3A (NM_005960.2)	Bilinmiyor	Het	MUC3A:c.8806C>T (p.Arg2936Cys) yanlış anlamlı phyloP100: -0.67	rs35212402	VUS: ACMG/PM2, BP4 Zarar Verici: DANN
MICALL1	Bilinmiyor	Het	MICALL1:c.565T>A (p.Phe189Ile)	rs1295275252	Olası Patojenik:

			yanlış anlamlı phyloP100: 8.01		ACMG/PP3/PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutAssesor, SIFT, MT, DANN, MetaLR, BayesDel

Önceki çalışmalarda tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği saptanan *MUC3A* geninde ACMG kriterlerine göre VUS varyant tespit edilmiş olup burden analizinde istatistiki olarak anlamlı genler arasındadır (p<0,05). Ayrıca endozom biyogenezi ve siliyogenezde rol oynayan *MICALL1* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik bir varyant tespit edilmiştir.

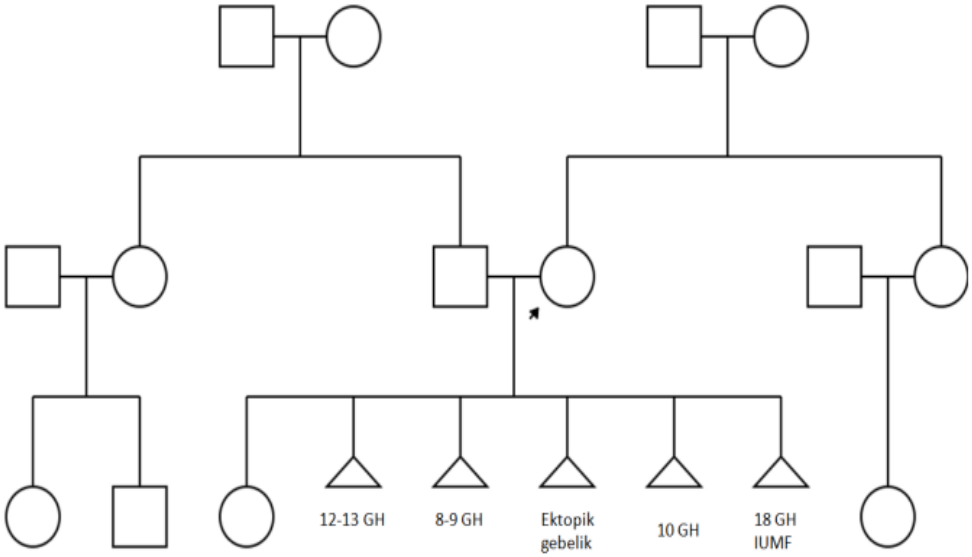
Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
MUC3A	205	3643	218	15448	1,34E-50	1	223,8093	[[83.41211438 3764.58788562] [339.58788562 15326.41211438]]

Şekil 4-7-2: *MUC3A* geni burden analiz sonucu

4.1.8. Olgu-8-TGK Kadın Olgu

Olgu 8, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 44 yaşında, G6P1A4Ektopik1 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebeliği 24 yaşında olmuştur. Akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1: 12-13. GH, A2: 8-9. GH, A3:10. GH, A4: 18. GH (IUMF) şeklindedir. Ek hastalık öyküsü ve ek klinik bulgu bulunmamaktadır.

Olgu 8, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-8'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-8'de sunulmuştur.



Şekil 4-8: TGK-8 kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-8: TGK-8 kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
ERCC8 (NM_000082.4)	Het	OR	ERCC8:c.1070A>G (p.Asn357Ser) yanlış anlamlı	rs199590588	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN

			phyloP100: 4.50		
GFM2 (NM_032380.5)	Het	OR	GFM2:c.767_768del (p.Phe256*) çerçeve kayması phyloP100: 8.77	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PVS1,PM2
GDAP1 (NM_018972.4)	Het	OR OD	GDAP1:c.715C>T (p.Leu239Phe) yanlış anlamlı phyloP100: 3.69	rs104894080	Patojenik ACMG/PM3,PM2,PM5,PP3,PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MutationTaster, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
CTC1 (NM_025099.6)	Het	Bilinmiyor	CTC1:c.275A>G (p.Tyr92Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 2.56	rs753289258	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: Eve, SIFT, DANN, MetaLR, BayesDel
PSMC4 (NM_006503.4)	Het	Bilinmiyor	PSMC4:c.391G>T (p.Ala131Ser) missense phyloP100:	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP3,PP2 Zarar Verici: Revel, MutationTaster, DANN, MetaLR, PrimateAI

ZNF341 (NM_001282933.2)	Het	Bilinmiyor	ZNF341:c.2138G>A (p.Cys713Tyr) yanlış anlamlı phyloP100: 9.26	rs1298985196	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, SIFT, MuttaionTaster, PrimateAI
HSF2BP (NM_007031.2)	Het	OR	HSF2BP:c.693-2A>T (p.?) kırpılma varyantı phyloP100: 5.35	rs754003014	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, SpliceAI

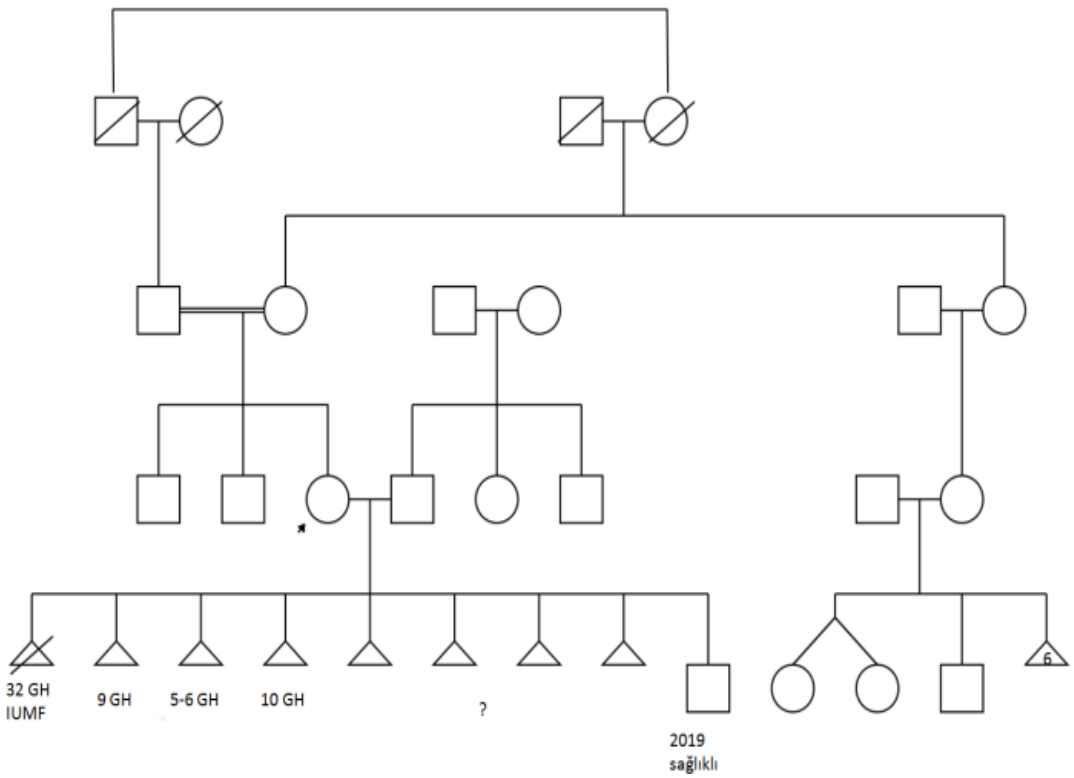
Olgu 8'de mitokondriyal fonksiyonun devamlılığı için gerekli oksidatif fosforilasyon sistemi ve oksidatif stres ile ilişkili *GDAP1* ve *GFM2* genlerinde ACMG kriterlerine göre sırasıyla patojenik ve olası patojenik varyant tespit edilmiştir.

DNA hasar tamirinde görevli *ERCC8* geninde, erken embriyonik gelişimde görevli *PSMC4* geninde, oksidatif stres ilişkili telomer kısalması ve erken yaşlanmada görevli olan ve önceki çalışmalarda prematür ovaryen yetmezlik ile ilişkilendirilen *CTC1* geninde, *STAT3* genini aşağı yönlü regüle ederek plasentada trofoblast hücre proliferasyonun azalması sonucunda implantasyon başarısızlığı ve erken düşüklere neden olan *ZNF341* geninde, mayotik rekombinasyon hataları ve DNA replikasyonundan kaynakların hasarlarının tamirinde görevli alan prematür ovaryen yetmezlik ilişkili *HSF2BP* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyantlar tespit edilmiştir.

4.1.9. Olgu-9-TGK Kadın Olgu

Olgu 9, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 35 yaşında, G9P1A7Ektopik1 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı bilinmemektedir. Olgunun kendisi 1. derece kuzen evliliği sonucunda meydana gelmiştir. Olgu ile eşi arasında akrabalık bulunmamaktadır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1: 32. GH (İUMF) A2: 9. GH, A3: 5. GH, A4:10. GH, A5-7 gebelik haftaları bilinmemektedir. Kuzeninde G8P3A6 öyküsü mevcuttur.

Olgu 9, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-9'da ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-9'da sunulmuştur.



Şekil 4-9: Olgu-9-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü (Berkay, 2020)

Tablo 4-9: Olgu-9-TGK olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	**Zigosite**	**Kalıtım modeli**	**Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)**	**dbSNP rs no**	**Varyant sınıfı**
HERC2 (NM_004667.6)	Hom	Bilinmiyor	HERC2:c.11954T>G (p.Leu3985Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 8.94	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR, PrimateAI
VPS13D (NM_015378.4)	Het	Bilinmiyor	VPS13D:c.8458A>G (p.Met2820Val) yanlış anlamlı phyloP100: 1.71	rs141217404	VUS: ACMG/PM2,PP2,BP4
NOTCH2 (NM_024408.4)	Het	Bilinmiyor	NOTCH2:c.5423C>T (p.Thr1808Ile) yanlış anlamlı phyloP100: 9.92	rs144085962	VUS: ACMG/PM2,PP3,PP2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationTaster, DANN, MetaLR, PrimateAI

ULK4 (NM_017886.4)	Het	Bilinmiyor	ULK4:c.338A>G (p.His113Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 7.31	rs1160918713	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR
ABCC10 (NM_001198934.2)	Het	Bilinmiyor	ABCC10:c.4G>A (p.Glu2Lys) yanlış anlamlı phyloP100: 5.61	rs1006418422	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: SIFT, DANN, BayesDel, MutationTaster
CHD7 (NM_017780.4)	Het	AD	CHD7:c.838C>G (p.Pro280Ala) yanlış anlamlı phyloP100: 2.25	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2,BP4
OTX2 (NM_021728.4)	Het	Bilinmiyor	OTX2:c.424C>A (p.Pro142Thr) yanlış anlamlı phyloP100: 8.05	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PM5,PM1 Zarar Verici: DANN, MutationTaster
PIEZO1 (NM_001142864.4)	Het	OR	PIEZO1:c.5389C>T (p.Arg1797Cys) yanlış anlamlı	rs561936787	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2,PP2

			phyloP100: 3.98		Zarar Verici: BayesDel, Revel, Eve, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR
TAOK1 (NM_020791.4)	Het	Bilinmiyor	TAOK1:c.854G>T (p.Arg285Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 9.85	rs143989572	VUS: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR, PrimateAI
ZP1 (NM_207341.4)	Het	OR	ZP1:c.*206C>T (.p?) downstream gen varyantı, phyloP100:	rs: -	VUS: ACMG/PM2,BP7

Hücre döngüsü regülasyonu, mitokondriyal fonksiyon, DNA hasar yanıtında ve oksidatif streste rol oynayan *HERC2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan homozigot novel varyant tespit edilmiştir.

Mitokondriyal dinamik ilişkili *VPS13D, ULK4* genlerinde ve gebeliğin maternal olarak tanınması, korpus luteumun devamlılığı ve progesteron üretimini ile gebeliğin sürdürülmesinde görevli *NOTCH2* geninde varyant tespit edilmiştir.

İnsan plasentasında fetusun toksik ajanlardan korunmasında önemli rol oynayan ABC taşıyıcılarından *ABCC10* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

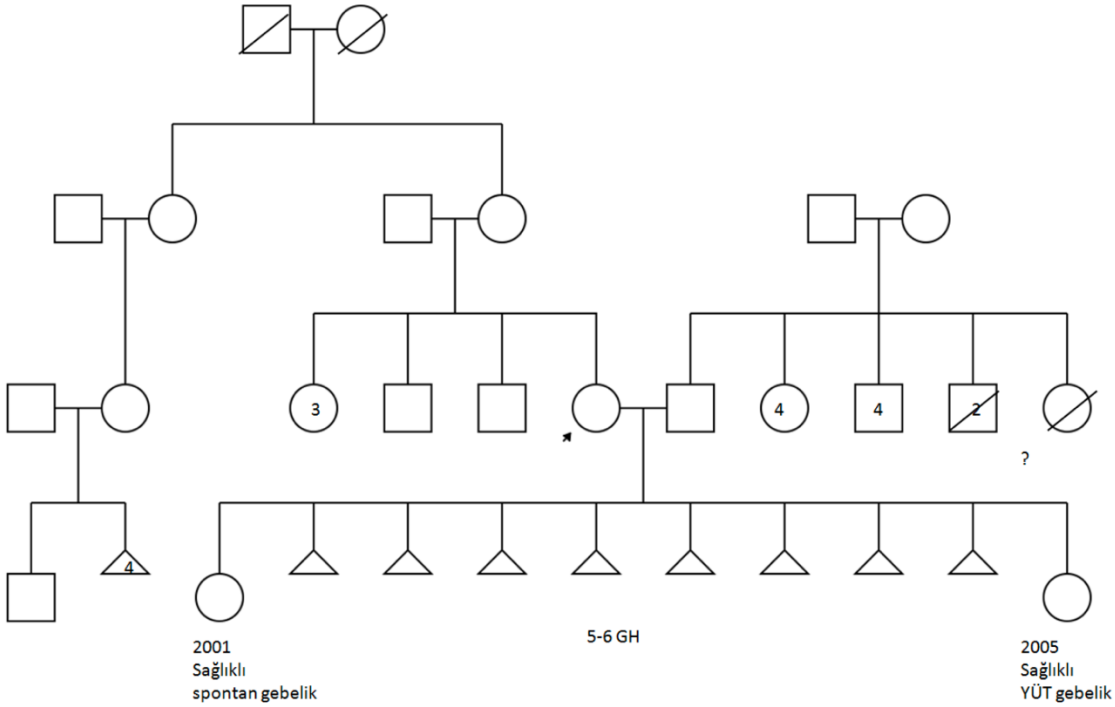
Hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkili *CHD7* ve *OTX2* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS varyant saptanmıştır.

Embriyonik gelişimde vaskülerizasyon, lenfatik sistem ile ilişkili *PIEZO1* geninde olası patojenik bir varyant saptanmıştır. Embiyo, fetus gelişimi ve gebelik kayıpları ile ilişkili *TAOK1* geninde ve kadın infertilitesi ile ilişkili *ZP1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarına göre zarar verici varyant tespit edilmiştir.

4.1.10. Olgu-10-TGK Çifti

45 yaşındaki kadın ve 45 yaşındaki erkek olgu, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G10P2A8 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Çift 18 yıllık evlidir. Kadın olgunun ilk gebelik yaşı 26'dır. Aile ağacında akraba evliliği öyküsü bulunmamaktadır. Gebeliklerinden G10 başarılı YÜT, diğerleri ise spontandır. Gebelik kaybı haftaları A1: 32. GH (İUFÖ) A2: 9. GH, A3: 5. GH, A4:10. GH, A5-7 gebelik haftaları bilinmemektedir. Kadın olgunun kuzeninde G8P3A6 TGK öyküsü mevcuttur.

Olgu 10 çiftinde eşlerden kadın olgu TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde Illumina HiSeq 2500 cihazıyla; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-10'da ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-10'da sunulmuştur.



Şekil 4-10: Olgu-10-TGK çifti aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-10: Olgu-10-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
ASPM (NM_018136.5)	Het	Bilinmiyor	ASPM:c.4563C>G (p.Tyr1521*) stop kodon	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PVS1,PM2 Zarar Verici: BayesDel,

			phyloP100: 0.99		MutationTaster, DANN
SLC6A19 (NM_001003841.3)	Het	Bilinmiyor	SLC6A19:c.517G>A (p.Asp173Asn) yanlış anlamlı phyloP100: 4.03	rs121434346	Olası Patojenik: PP1,PM2,PS3,PP5 Zarar Verici: MutationTaster, DANN
SYNE1 (NM_182961.4)	Het	Bilinmiyor	SYNE1:c.9443C>T (p.Thr3148Ile) yanlış anlamlı phyloP100: 0.019	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2,BP4 Zarar Verici: DANN
MUC17 (NM_001040105.2)	Het	Bilinmiyor	MUC17:c.13405C>T (p.Gln4469*) stop kodon phyloP100: 0.45	rs142829628	VUS: ACMG/PM2,BS2 Zarar Verici: BayesDel, MutationTaster, DANN, SpliceAI
Erkek Olgunun Varyantları					
PEX13 (NM_002618.4)	Het	OR mitokondriyal disfonksiyon	PEX13:c.880C>T (p.Arg294Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 5.65	rs373118250	Olası Patojenik: ACMG PM3,PM2,PS3, PP1, PP5 Zarar Verici:

					MutationTaster, DANN
SLC25A1 (NM_005984.5)	Het	Bilinmiyor	SLC25A1:c.527G>C (p.Gly176Ala) yanlış anlamlı phyloP100: 7.86	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR, PrimateAI

Kadın olguda; follikülogenezde ve ostrus siklusunda görevli *ASPM* geninde olası patojenik, farelerde fetal dönemde metabolik bozukluk ve NAD eksikliğine bağlı gebelik kayıpları ile ilişkili *SLC6A19* geninde olası patojenik, önceki TED çalışmalarında gebelik kayıpları ile ilişkilendirilmiş *SYNE1* geninde ve endometriozis ilişkili MUC17 geninde ACMG kriterlerine göre VUS varyant saptanmıştır.

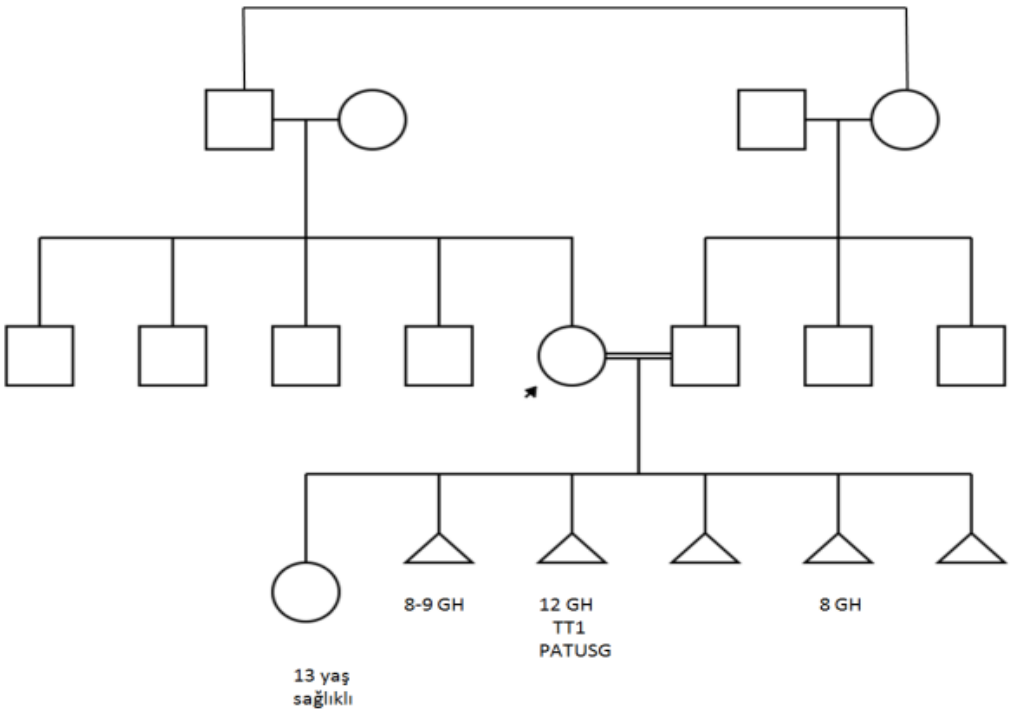
Erkek olguda; Önceki çalışmalarda otofaji, intrauterin büyüme gelişme geriliği ve düşükler ile ilişkilendirilmiş olan peroksizom biyogenezi ve mitokondriyal fonksiyonda görevli *PEX13* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik varyant saptanmıştır. Ayrıca işlev kaybı mutasyonları mitokondriyal solunum zinciri ve metabolik bozukluklarla ilişkili olarak embriyogenezde bozulmalara neden olan *SLC25A1 geninde* ACMG kriterlerine göre olası patojenik varyant saptanmıştır.

4.1.11. Olgu-11-TGK Çifti

Olgu 11 TGK çifti İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G10P2A8 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın yaşı 39**,** erkek yaşı 43 ve evlilik süresi beş yıldır. Kadın olgunun

ilk gebelik yaşı bilinmemektedir. Eşler arasında 1. derece kuzen evliliği vardır. Gebeliklerinden G10 başarılı YÜT, diğerleri ise spontandır. Gebelik kaybı haftaları A1,3-5: 8-9. GH, A2: 13.GH'dır. G3 (TT1)'ün fetal muayenesinde, üst ve alt ekstremitelerde distal kemiklerin yokluğu, akrania, tek umbilikal arter, omfalosel, polidaktili, nazal kemik yokluğu bulguları mevcuttur ve karyotip analizi 46,-- olarak sonuçlanmıştır. A4(G6)'ün fetal muayene bulgusu bulunmamakla birlikte fetal karyotip analizi 46,-- olarak sonuçlanmıştır.

Olgu 11 çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-11-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-11'de sunulmuştur.



Şekil 4-11-1: Olgu-11-TGK-11 çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-11: Olgu-11-TGK-11 çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	**Zigosite**	**Kalıtım modeli**	**Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)**	**dbSNP rs no**	**Varyant sınıfı**
Kadın Olgunun Varyantları					
*TTC21B** (NM_024753.5)	Het	OR	TTC21B:c.1546C>T (p.Gln516*) stop kodon phyloP100: 4.00	rs779134983	Patojenik: ACMG/PVS1,PM2,PP5 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, BayesDel
PTCH2 (NM_003738.5)	Het	Bilinmiyor	PTCH2:c.563C>A (p.Pro188His) yanlış anlamlı phyloP100: 9.54	rs372784104	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MutationTaster, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
*NEK4** (NM_003157.6)	Het	Bilinmiyor	NEK4:c.1972C>T (p.Arg658*) stop kodon phyloP100: 0.32	rs765561559	Olası patojenik: ACMG/PVS1, PM2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, BayesDel
Erkek Olgunun Varyantları					

*TTC21B** (NM_024753.5)	Het	OR	TTC21B:c.1546C>T (p.Gln516*) stop kodon phyloP100: 4.00	rs779134983	Patojenik: ACMG/PVS1,PM2,PP5 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, BayesDel

* İşaretli gen varyantları önceki tez araştırması (Berkay, 2020 ve Kale, 2021) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Eşlerde primer siliyer diskinezi ile ilişkili *TTC21B* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik olan ortak bir varyant saptanmıştır. Bu gen, *burden* analizinde de istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu gen, asfikte edici torasik displazi tip-4 (MIM #613091) ile ilişkili olup benzer siliyopati bulguları taşıyan gebelik kaybı öyküsünü açıklayabileceği düşünülmüştür.

Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
TTC21B	161	100	274	106	0,007162146858230888	1	7,2318473847169393	[[177.1216848783.87831513] [257.87831513122.12168487]]

Şekil 4-11-2: TTC21B geninin burden analizi sonucu

Embriyonik gelişimi düzenlenleyicisi hedgehog (Hh) sinyal proteini ligandı *PTCH2* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik bir varyant saptanmıştır.

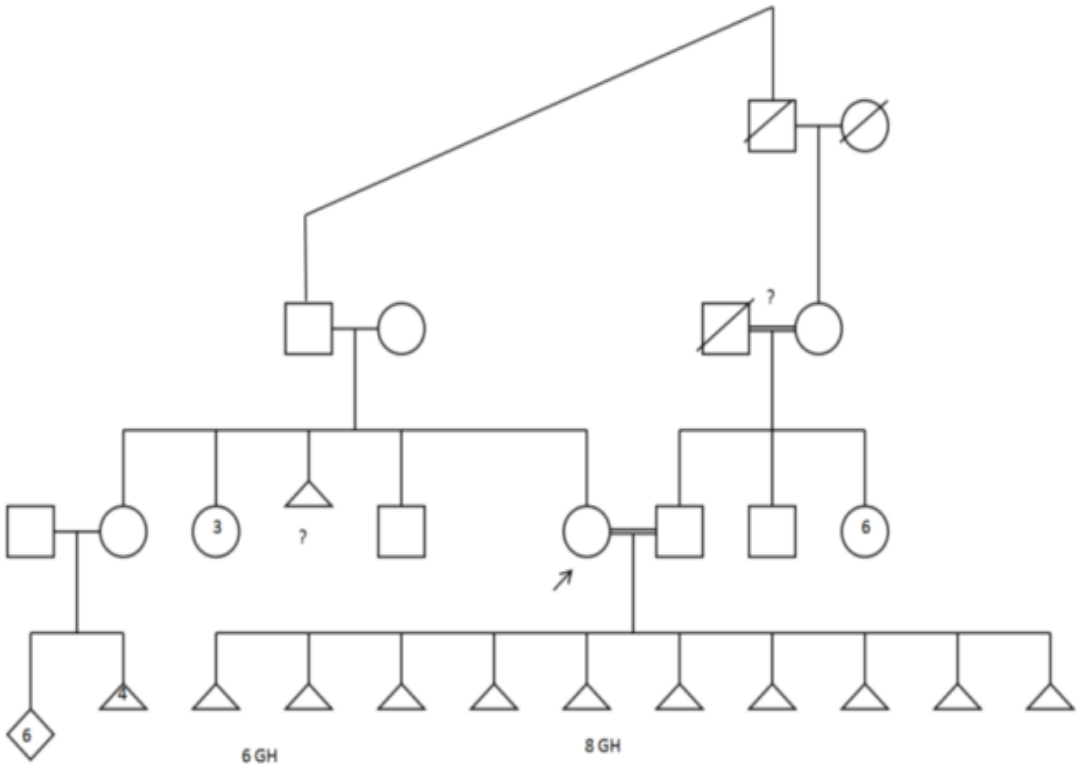
DNA hasarına yanıt olarak hücre bölünmesinin durdurulması ile hasar yanıtınınn düzenlenmesinde görevli olan aynı zamanda siliyopatilerle ilişkili NEK4 geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik bir varyant saptanmıştır.

4.1.12. Olgu-12-TGK Kadın Olgu

Olgu 12, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 30 yaşında, G10A10 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 20'dir. Eşiyle arasında 1,5 derece kuzen evliliği bulunmaktadır ve 10 yıllık evlidir. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı

haftaları A1-2: 6. GH A3-10: 8. GH şeklindedir. Aile öyküsünde kız kardeşinde G10P6A4 TGK öyküsü ve erkek kardeşinde azospermi ve YÜT ile sonrasında iki sağlıklı çocuk hikayesi mevcuttur. Olgunun ek klinik bulgularında uterus arkuatus, parsiyel septat uteri vardır ve gebeliklerinin yarısı septoplasti operasyonundan sonrası meydana gelmiştir.

Olgu 12 Engin Tıbbi Ürünler, Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-12'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-12'da sunulmuştur.



Şekil 4-12: Olgu-12-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-12: Olgu-12-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk	dbSNP rs no	Varyant sınıfı

			Skoru (phyloP100)		
CD36 (NM_001001548.3)	Het	Bilinmiyor	CD36:c.1079T>G (p.Leu360*) stop kodon phyloP100:	rs56381858	Patojenik: ACMG/PVS1,PM3,PM2,PP5 Zarar Verici: DANN, BayesDel
ANO5 (NM_213599.3)	Het	Bilinmiyor	ANO5:c.1733T>C (p.Phe578Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 8.00	rs137854526	Patojenik: ACMG/PM3,PP3,PM2,PP1,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, DANN, BayesDel, PrimateAI, Eve
ACADS (NM_000017.4)	Het	AR	ACADS:c.1147C>T (p.Arg383Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 4.50	rs28940872	Patojenik: ACMG/PM3,PP3,PM2,PP2,PS3,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, DANN, BayesDel, PrimateAI, Eve
BCHE (NM_000055.4)	Het	Bilinmiyor	BCHE:c.1253G>T (p.Gly418Val) yanlış anlamlı phyloP100: 1.34	rs28933390	Olası patojenik: ACMG/PP5,PM2,PP2,BP4 Zarar Verici: SIFT, MutationTaster, DANN
*ZMPSTE2** (NM_005857.5)	Het	AR	ZMPSTE24:c.1105C>T (p.Arg369)	rs281875373	Patojenik: ACMG/PVS1,PM3,PM

			stop kodon phyloP100: 7.38		2,PP5 Zarar Verici: BayesDel, DANN, MT
NLRP3 (NM_001243133.2)	Het	Bilinmiyor	NLRP3:c.3059A>T (p.Gln1020Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 0.26	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2

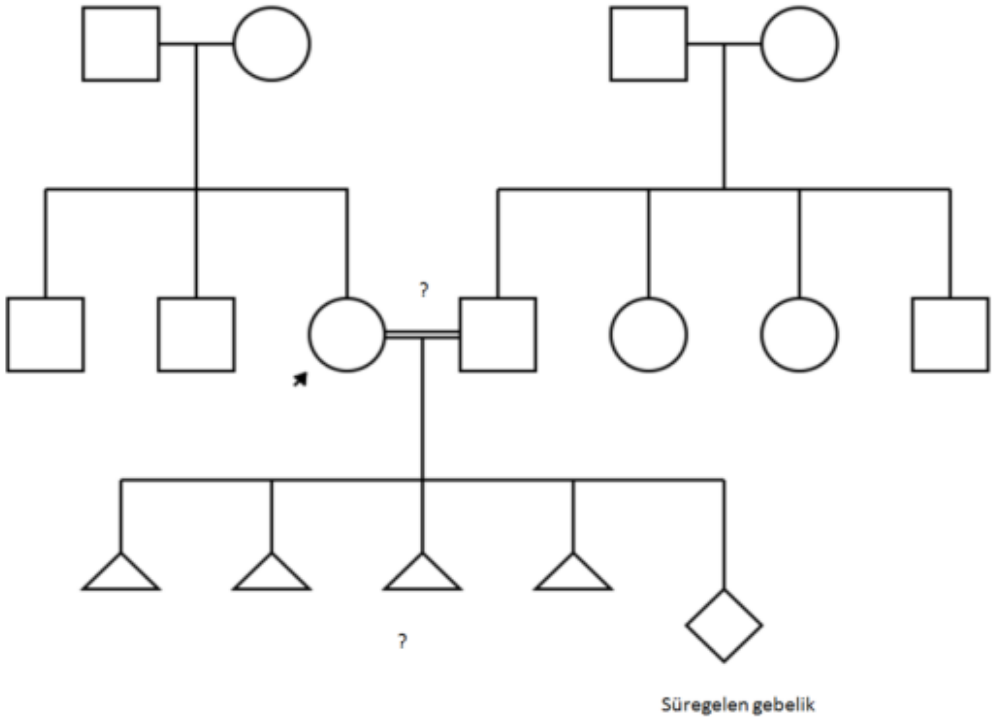
* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Tekrarlayan düşüklerle ilişkilendirilmiş *CD36* geninde, mitokondri ilişkili *ACO5* ve *ACADS* genlerinde ve letal restriktif dermopati ile ilişkilendirilmiş *ZMPSTE24* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırılan varyantlar saptanmıştır. Endometriyozis ilişkili *BCHE* geninde olası patojenik varyant saptanmıştır. Trofoblastik inflamazom aktivasyonuna aracılık ederek gebelik sırasında T hücre aracılı yanıtta ve immunitede rol oynayan, inflamazom yolağının anormal aktivasyonu sonucunda TGK'ya neden olduğu saptanan *NLRP3* geninde VUS varyant saptanmıştır.

4.1.13. Olgu-13-TGK Kadın Olgu

Olgu 13, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 22 yaşında, G5P1A4 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 17'dir. Eşi ile arasında uzak akrabalık bildirilmiştir. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1-4: 8-9. GH'dır. Olgunun ailesinde benzer gebelik öyküsü bulunmamaktadır. Ek klinik bulgusu bulunmamaktadır.

Olgu 13 Engin Tıbbi Ürünler, Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-13-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-13'de sunulmuştur.



Şekil 4-13-1: Olgu-13-TGK aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-13: Olgu-13-TGK TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

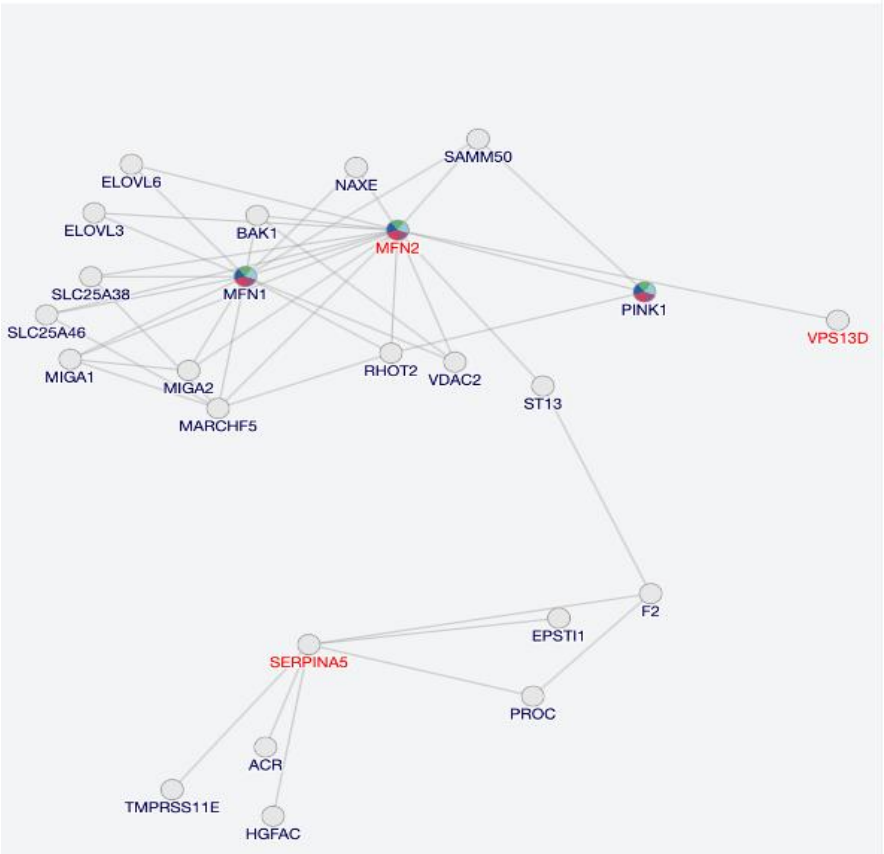
Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
VPS13D (NM_015378.4)	Het	Bilinmiyor	VPS13D:c.6464G>A (p.Cys2155Tyr) yanlış anlamlı phyloP100: 9.36	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: Eve, MT, DANN, BayesDel

VPS13D (NM_015378.4)	Het	Bilinmiyor	VPS13D:c.10288G>A (p.Glu3430Lys) yanlış anlamlı phyloP100: 7.72	rs368255830	VUS: ACMG/PM2,PP2,BP4 Zarar Verici: MT, DANN
ETFDH (NM_004453.4)	Het	OR	ETFDH:c.1130T>C (p.Leu377Pro) yanlış anlamlı phyloP100: 8.01	rs387907170	Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PP3,PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, MT, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
SERPINA5 (NM_000624.6)	Het	Bilinmiyor	SERPINA5:c.1058T>A (p.Val353Glu) yanlış anlamlı phyloP100: 6.51	rs: -	VUS: PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, SIFT, DANN, MetaLR, BayesDel

Olguda mitokondri boyutu, şekli, mitokondri-ER etkileşimi ve otofajide görevli mitokondriyal dinamik ilişkili *VPS13D* geninde birleşik heterozigot varyant saptanmıştır.

Mitokondriyal matriste yer alan ve mitokondriyal elektron transfer sistemi bileşenlerini kodlayan *ETFDH* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır.

Önceki çalışmalarda plasental anomaliler ve gebelik kayıpları ile ilişkilendirilen *SERPINA5* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır.

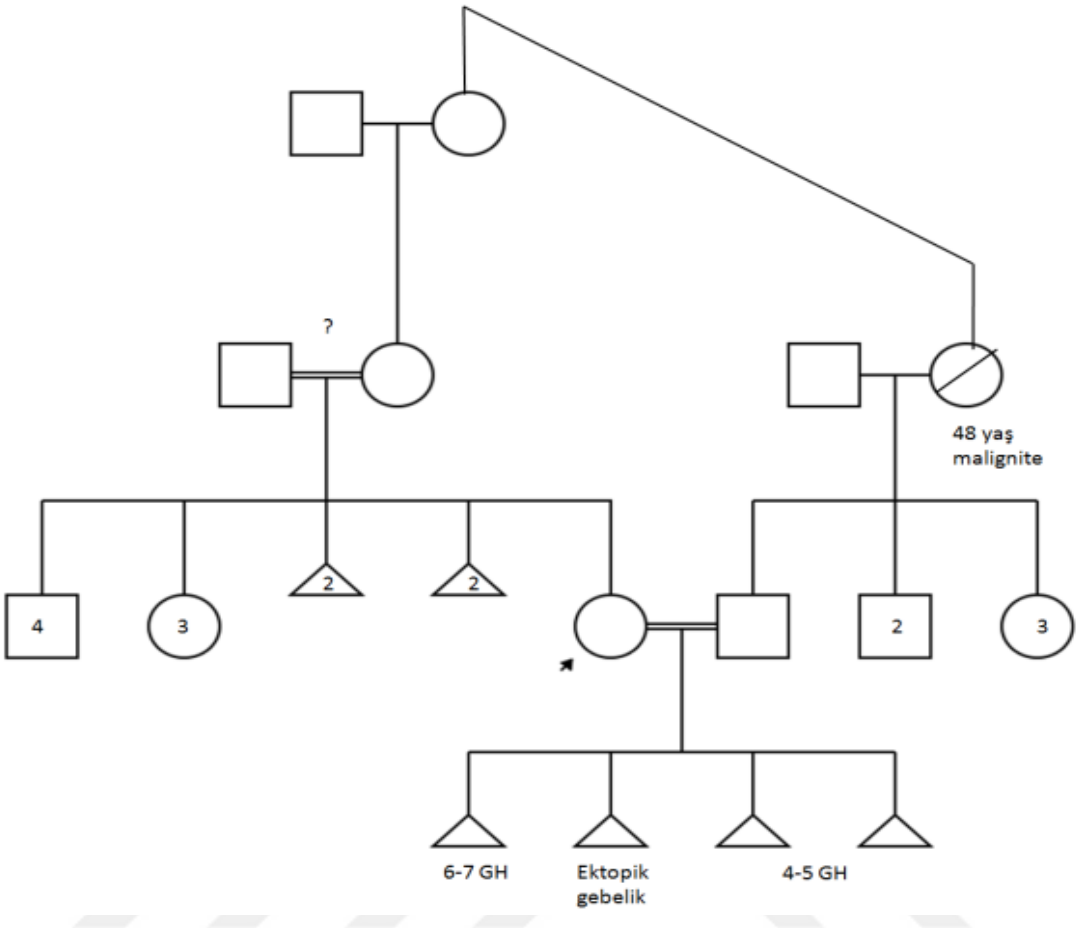


Şekil 4-13-2: TGK-13 olgusunda bulunan genlerin yolak etkileşim haritası *(ZS Revelen yolak haritalama aracı kullanılarak oluşturulmuştur)*

4.1.14. Olgu-14-TGK Kadın Olgu

Olgu 14, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 24 yaşında, G4A3Ektopik1 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 20'dir. Olgunun anne ve babası 1. derece kuzendir ve ayrıca olgu ile eşi ile arasında 1,5. derece akrabalık ilişkisi bulunmaktadır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1: 6-7. GH, A2-3: 4-5. GH'dır. Olgunun ailesinde benzer gebelik öyküsü bulunmamaktadır.

Olgu 14, Engin Tıbbi Ürünler, Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-14'te ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-14'te sunulmuştur.



Şekil 4-14-1: Olgu-14-TGK aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-14-2: Olgu-14-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dnSNP rs no	Varyant sınıfı
BCHE (NM_000055.4)	Het	AR/Bilinmiyor	BCHE:c.293A>G (p.Asp98Gly) yanlış anlamlı	rs1799807	Patojenik: ACMG/PP5,PM5,PP2 Zarar Verici: BayesDel, Eve,

			phyloP100: 7.23		SIFT, MT, DANN
VSP4B (NM_004869.4)	Het	Bilinmiyor	VPS4B:c.1156C>T (p.Pro386Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 9.89	rs1447548931	VUS: PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, MutAssessor, DANN, MetaLR, BayesDel
SDHB (NM_003000.3)	Het	AR,AD	SDHB:c.530G>A (p.Arg177His) yanlış anlamlı phyloP100: 7.37	rs150437793	VUS: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutAssesor, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel

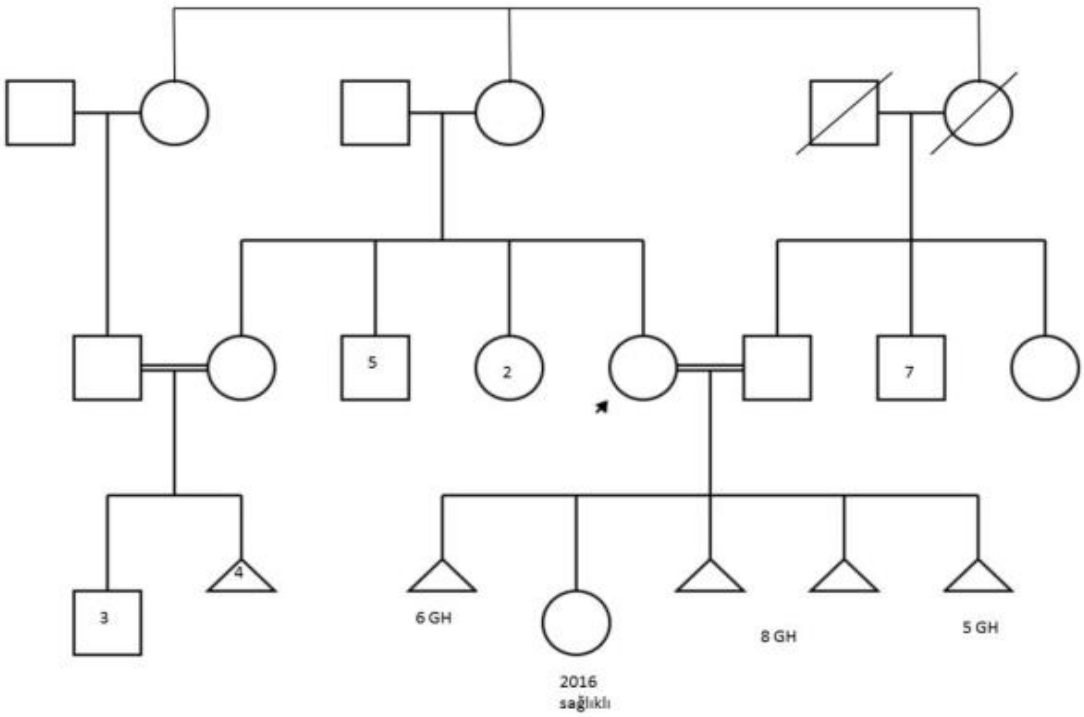
Endometriyozis ilişkili *BCHE* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik varyant saptanmıştır. Protein degradasyonunda ve hücre zarı füzyonunda görevli olan ve embriyonik letaliteye neden olduğu bildirilen *VPS4B* geninde ve ilk trimesterda embriyo implantasyonunun devamlılığı için gerekli yüksek süksinat seviyelerinin sağlanmasında rol oynayan *SDHB* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır.

4.1.15. Olgu-15-TGK Kadın Olgu

Olgu 15, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 36 yaşında, G5P1A4 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 30'dur. Eşi ile arasında 1. derece kuzen evliliği

bulunmaktadır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1: 6. GH, A2-3: 8. GH, A4: 5. GH'dır. Olgunun kız kardeşinde G8P3A5 TGK öyküsü mevcuttur. Ek klinik bulgu olarak 2011 ve 2016 yıllarında miyomektomi nedeni ile operasyon geçirdiği bildirilmiştir.

Olgu 15 Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-15'te ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-15'te sunulmuştur.



Şekil 4-15-1: Olgu-15-TGK kadın olgunun aile ağacı görüntüsü (Berkay, 2020)

Tablo 4-15-2: Olgu-15-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNPrs no	Varyant sınıfı

*PATL2** (NM_001387263.1)	Het	OR	PATL2:c.839G>A (p.Arg280Gln) yanlış anlamlı phyloP100: 6.59	rs569729547	VUS: ACMG/PM2, PP5 Zarar Verici: DANN, MutationTaster, Eve
RAD51D (NM_002878.4)	Het	Bilinmiyor	RAD51D:c.620C>T (p.Ser207Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 5.07	rs370228071	Patojenik: PS4,PP3,PM2,PM5,PS3,PP1,PP5 Zarar Verici: Revel, Eve, SIFT, MT, DANN, BayesDel

* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

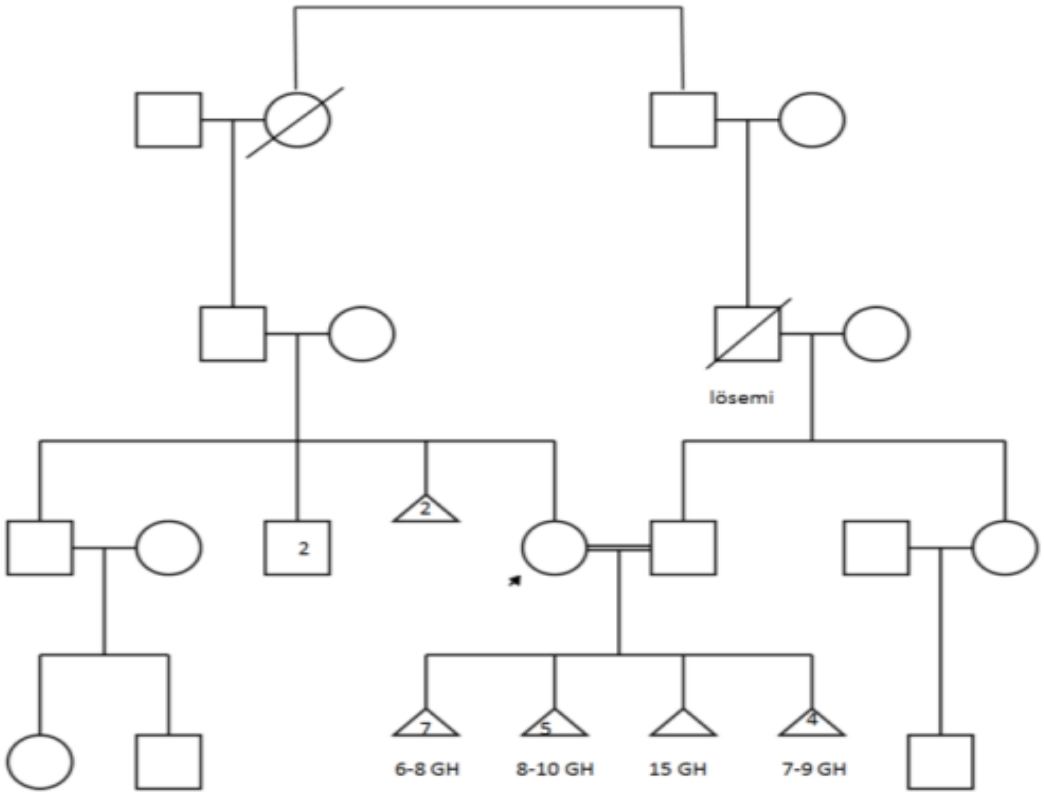
Erken embriyonik gelişimin gastrulasyon evresinde embriyo DNA hasarına oldukça hassastır ve meydana gelen çift iplik kırığı hasarları sonucunda apoptoz ve embriyo ölümü uyarılır. DNA hasarı durumunda çift zincir kırığı bölgesinde homolog rekombinasyonu başlatarak DNA onarımında görev alan *RAD51D* geninin inhibisyonu sonucunda reaktif oksijen türlerinde artış olduğu, ve oksidatif stres sonucunda anormal mitokondri dağılımı meydana geldiği saptanmıştır. *RAD51D* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik bir varyant saptanmıştır.

Oosit maturasyon defekti ile ilişkili *PATL2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan bir varyant saptanmıştır. *PATL2* geninin insanlardaki fonksiyon kaybı mutasyonları, oositlerin germinal veziküllerinde duraklamaya yol açtığı gösterilmiştir. Olgunun 1.derece kuzeni olan eşinde ve TGK öyküsü bulunan kızkardeşinde de *PATL2* gen varyantının araştırılması planlamıştır.

4.1.16. Olgu-16-TGK Çifti

Olgu 16 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G17P17 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 40 yaşında, erkek olgu 39 yaşındadır. Kadın olgunun ilk gebelik yaşı 24'dür. Eşler arasında 2. derece kuzen evliliği bulunmaktadır. Gebeliklerin oluşma şekli iki gebeliğinde YÜT ile, diğer gebeliklerde ise spontandır. Gebelik kaybı haftaları A1-12: 6-10. GH, A13: 15. GH, A14-17: 7-9. GH'dır. Fetal karyotip analiz sonuçları; A12: 46,XX, A13:46,XX, A14: 46,XX şeklindedir. Ek klinik bulgu olarak kadın olguda gebeliklerinin yarısında düşük molekül ağırlıklı heparin kullanımı mevcuttur.

Olgu 16 çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-16-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-16'da sunulmuştur.



Şekil 4-16-1: Olgu-16-TGK çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-16-2: Olgu-16-TGK çiftinin TED varyant analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
G6PD (NM_001360016.2)	Het	X'e bağlı	G6PD:c.563C>T (p.Ser188Phe) yanlış anlamlı phyloP100: 5.54	rs5030868	Olası patojenik: PM2,PP3,PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
ACADM (NM_000016.6)	Het	OR	ACADM:c.127G>A (p.Glu43Lys) yanlış anlamlı phyloP100: 7.34	rs147559466	Olası patojenik: ACMG/PP5,PP3,PP2,BS2 Zarar Verici: Revel, MT, BayesDel, FATHMM, DANN, MetaLR

ATP4A (NM_000704.3)	Het	Bilinmiyor	ATP4A:c.1886G>A (p.Gly629Asp) phyloP100: 7.91	rs: -	Olası patojenik: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
WNT10A (NM_025216.3)	Het	Bilinmiyor	WNT10A:c.487C>T (p.Arg163Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 1.93	rs368280129	VUS: ACMG/PM2,PP5,PP3,BP6 Zarar Verici: Revel, MT, DANN, BayesDel
*CCDC141**	Het	Bilinmiyor	CCDC141:c.2611C>T (p.Gln871*) stop kodon phyloP100: 2.17	rs764893847	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: BayesDel, DANN, MT
Erkek Olgunun Varyantları					
TGK etiyolojisi ile ilişkili varyant saptanmamıştır.					

* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Kadın olguda, oksidatif stres ilişkili *G6PD* geninde, mitokondri ilişkili açil-CoA'ların beta-oksidasyonunda görevli *ACADM* geninde ve elektrolit taşımasını

düzenleyerek uterus sıvısı kompozisyonunu, embriyo gelişimini ve implantasyonu etkilen *ATP4A* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır. Erken embriyonik gelişimde görevli WNT10A geninde ve hipogonadotropik hipogonadizm ilişkili *CCDC141* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır. *CCDC141* geni burden analizinde de istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Erkek olguda TGK etiyolojisi ile ilişkili olabilecek varyant saptanmamıştır.

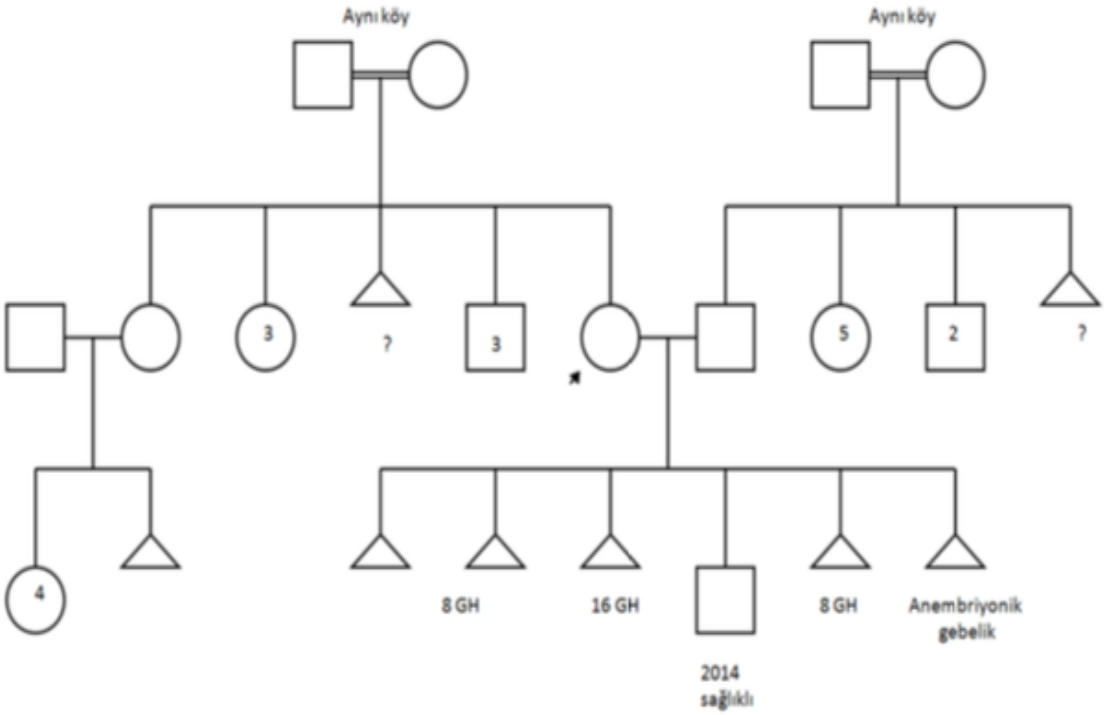
Gen	Olgu_ Hom	Olgu _Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
CCDC141	282	150	377	412	6,44208313838802E-09	1	33,6963687040985	[[233.15970516198.84029484] [425.84029484363.15970516]]

Şekil 4-16-3: *CCDC141* geni burden analizi sonucu

4.1.17. Olgu-17-TGK Kadın Olgu

Olgu 17, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 31 yaşında, G6P1A5 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. İlk gebelik yaşı 23'dür ve 8 yıllık evlidir. Olgunun anne ve babası arasında akrabalık mevcuttur. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1-3, 5: 8. GH, A4: 16. GH'dır. Ailesinde benzer bir öykü bulunmamaktadır. Ek klinik öyküsü bulunmamaktadır.

Olgu 17, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-17-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-17'de sunulmuştur.



Şekil 4-17-1: Olgu-17-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-17: Olgu-17-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
NDUFB10 (NM_004548.3)	Het	OR	NDUFB10:c.356G>T (p.Cys119Phe) yanlış anlamlı phyloP100: 9.63	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, DANN, BayesDel

*CPT1B** (NM_152246.3)	Het	Bilinmiyor	CPT1B:c.1237G>A (p.Glu413Lys) yanlış anlamlı phyloP100: 7.87	rs745702877	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, SIFT, MT, DANN, MetaLR, BayesDel
DOCK4 (NM_001363540.2)	Het		DOCK4:c.3890A>C (p.Asp1297Ala) yanlış anlamlı phyloP100: 8.02	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, SIFT, MutationTaster, DANN, PrimateAI
ABCA4 (NM_000350.3)	Het	Bilinmiyor	ABCA4:c.3482G>A (p.Arg1161His) yanlış anlamlı phyloP100: 5.75	rs768278935	Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PM5, PP3,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, MT, DANN, MetaLR, BayesDel

* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Olgu-17'de saptanan *NDUFB10* (NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B10) geni, oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının neden olduğu üreme sorunları ile ilişkilendirilmiştir (Pizarro et al., 2020; Wang et al.,2020). İnsan yumurtalıklarında, foliküler sıvıda, granüloza ve kümülüs hücrelerinde yüksek oksidatif stres seviyelerinin oosit kalitesinde, oosit döllenmesinde, embriyo gelişiminde ve doğurganlıkta azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir (Zhu et al., 2022). *NDUFB10* geninin down regülasyonunun tekrarlayan erken gebelik kaybı ile ilişkilendirildiği çalışmalar da literatürde mevcuttur (Li et al., 2020).

Oksidatif stres ve infertilite ile ilişkili *CPT1B* geninde heterozigot bir varyant saptanmıştır. *CPT1B* (carnitine palmitoyltransferase 1B) geni tarafından kodlanan protein, karnitin/kolin asetiltransferaz ailesinin üyesidir ve uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonunda ve açil-CoA'nın sitoplazmadan mitokondriye taşınması için gereklidir. Olgu 17'de bulunan *CPT1B* missense varyantı heterozigot formdadır ve korunmuşluk skoru yüksektir (7.8, PyhloP100way).

Literatürde *DOCK1* geni, anormal trofoblast fonksiyonu ve buna bağlı tekrarlayan spontan gebelik kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Olgu, *DOCK1* geni ile primer etkileşimde olan *DOCK4* genini heterozigot olarak taşımaktadır (Xu et al., 2024) Plasentada gen ekspresyonunun araştırıldığı çalışmalarda uterin hasar sonucunda, trofoblast invazyonunun ve plasenta vaskülarizasyonunun arttığı, desidualarda T ve NK (Natural Killer) hücrelerinin azalması ile bağışıklık hücrelerinin profilinde değişimler olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *DOCK4* geninin ekspresyonun anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Bu durumun uterusta meydana gelen hasarlar sonucunda immun sistemdeki değişimler yoluyla anormal trofoblast invazyonuna ve plasentada vaskülerizasyonun artmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Önceki çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıplarında da rol oynayabileceği vurgulanan (Srivastava et al., 2023, Gourhant et al., 2021, Cao et al., 2022) *ABCA4* geninde ACMG sınıflandırmasına göre patojenik olan heterozigot varyant saptanmıştır. *Burden* analizinde istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) olan *ABCA4* geninin verilerine Şekil 4-17-2'de yer verilmiştir.

Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
ABCA4	163	285	384	366	8,5922509314209 6E-07	1	24,2202854490924	[[204.5542571 243.4457429] [342.4457429 407.5542571]]

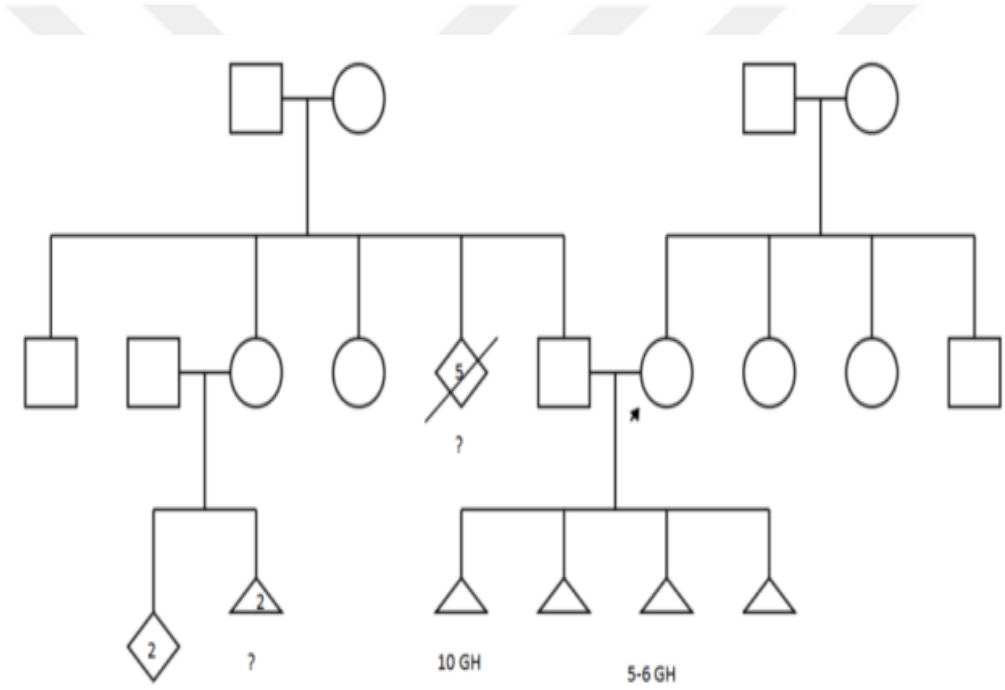
Şekil 4-17-2: *ABCA4* geni burden analiz sonucu

4.1.18. Olgu-18-TGK Çifti

Olgu 18 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G4P4 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 26 yaşında, erkek olgu 28 yaşındadır. Erkek olgunun kız

kardeşinin iki sağlıklı çocuğu ve iki abortusu vardır. Kadın olgunun ilk gebelik yaşı 24'dür. Eşler arasında akraba evliliği bildirilmemiştir. Gebelikler spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1: 10. GH, A2-4: 5-6. GH'dır. Ek klinik bulgu bulunmamaktadır.

Olgu 18 TGK çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-18'da ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-18'da sunulmuştur.



Şekil 4-18: Olgu-18-TGK çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-18: Olgu-18-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı

Kadın Olgunun Varyantları					
HTRA2 (NM_013247.5)	Het	Bilinmiyor	HTRA2:c.346dup (p.Ala116Glyfs*22) çerçeve kayması phyloP100: 5.29	rs779457274	Patojenik: ACMG/PVS1,PM3,PM2,PP5
BCHE (NM_000055.4)	Het	Bilinmiyor	BCHE:c.293A>G (p.Asp98Gly) yanlış anlamlı phyloP100: 7.22	rs1799807	Patojenik: ACMG/PP5,PM5,PP2 Zarar Verici: BayesDel, SIFT, Eve, DANN
ATP7B (NM_000053.4)	Het	Bilinmiyor	ATP7B:c.3008C>T (p.Ala1003Val) yanlış anlamlı phyloP100: 9.93	rs775055397	Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PM5,PM1,PP3,PP2,PP5 Zarar Verici: BayesDel, Revel, AlphaMissense, Eve, SIFT, DANN, MetaLR
Erkek Olgunun Varyantları					
TGK etiyolojisi ile ilişkili variant saptanmamıştır.					

Kadın olguda, oosit olgunlaşmasının temel düzenleyicisi olan dişilerde üreme başarısızlığı ile ilişkiendirilmiş *HTRA2* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak olarak sınıflandırılan bir varyant tespit

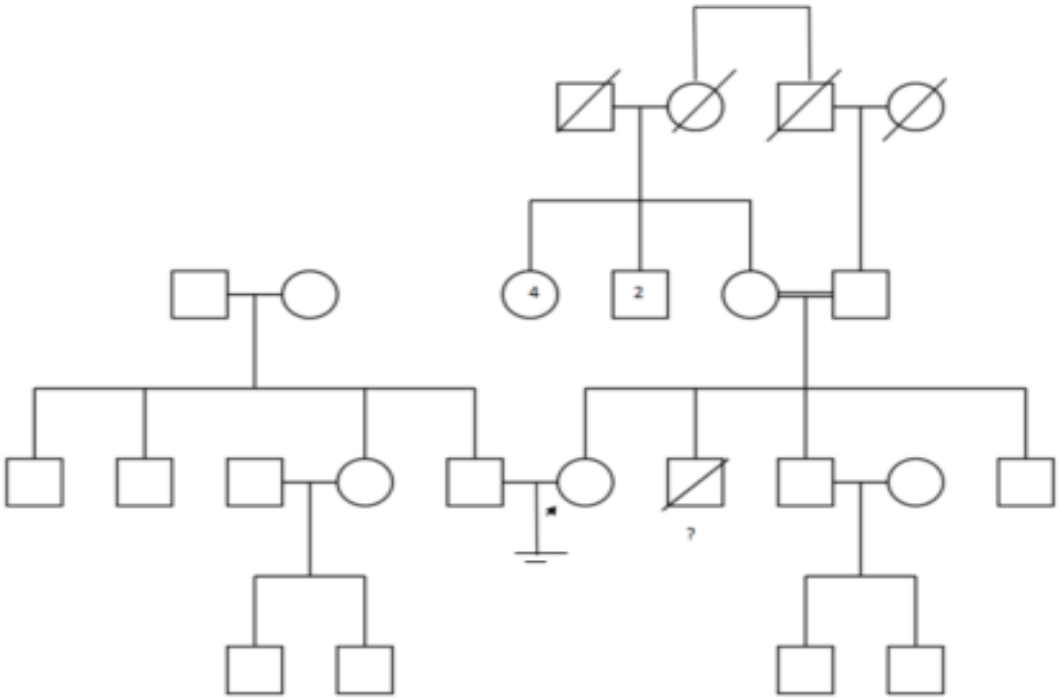
edilmiştir. *HTRA2* geni mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimini düzenlemektedir ve oksidatif stres ilişkili olarak tekrarlayan gebelik kaybında rol alabileceği düşünülmektedir. Endometriyozis ilişkili *BCHE* geninde ve bakır metabolizmasında rol oynayarak biriken bakırın neden olduğu serbest radikal oluşumu sonucu oksidatif hasar ilişkili fetal kayba neden olduğu bildirilen *ATP7B* geninde ACMG kriterlerine patojenik, *in silico* tahmin araçlarına göre zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır.

Erkek olguda, TGK ilişkili varyant saptanmamıştır.

4.1.19. Olgu-19-Pİ Kadın Olgu

Olgu 19, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 31 yaşında, G0 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Eşi ile dokuz yıllık evlidir ve yakın yerleşim yerinden köken almaktadır. Olgunun anne ve babası kuzenlerdir. Olgunun 4 başarısız YÜT denemesi olmuştur. YÜT denemelerinde boş folikül sendromu şüphesi oluşmuştur. Grafisinde bilateral proksimal radioulnar sinostoz, hafif kısa ulna ve boş kısalığı (-3,08 SD) bulunmaktadır. Anabilim dalımızda daha önce yürütülen tez araştırması kapsamında *ZP1* geninde bir varyant bulunarak aile segregasyonu yapılmıştır (Berkay, 2020).

Olgu 19, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-19'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-19'de sunulmuştur.



Şekil 4-19: Olgu-19-Pİ kadın olgunun aile ağacı görüntüsü (Berkay, 2020)

Tablo 4-19: Olgu-19-Pİ kadın olgunun TED varyant analizinde saptanan ve PI ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
*ZP1** (NM_207341.4)	Hom	AR	ZP1:c.628C>T (p.Gln210*) stop kodon phyloP100: -0.66	rs776515172	Patojenik: ACMG/PVS1, PM2,PP5 Zarar Verici: BayesDel, DANN,

					MutationTaster

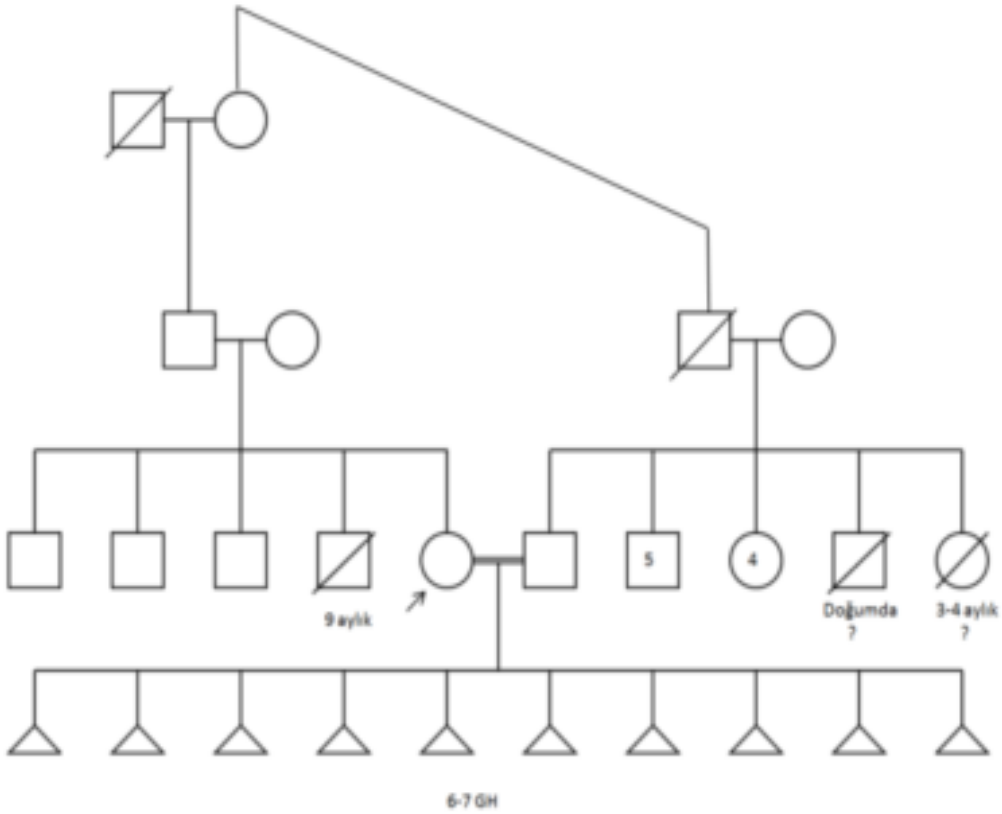
* İşaretli gen varyantı önceki araştırmalar (Berkay 2020, Berkay 2023) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Olguda, oosit maturasyon defekti ile ilişkili *ZP1* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir. Olgunun daha önce yapılan aile segregasyonu sonucunda anne ve babanın varyantı heterozigot olarak taşıdığı tespit edilmiştir (Berkay 2020, Berkay 2023).

4.1.20. Olgu-20-TGK Çifti

Olgu 20 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G10P10 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 44 yaşındadır ve ilk gebelik yaşı 19'dur. Erkek olgu 50 yaşındadır. Eşler arasında 1,5. derece kuzen evliliği bulunmamaktadır. Gebeliklerden ikisi YÜT, diğerleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1-10: 6-7. GH'dır. Ek klinik bulgu belirtilmemiştir.

Olgu 20 çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-20'da ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-20'da sunulmuştur.



Şekil 4-20: Olgu-20-TGK çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-20: Olgu-20-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
COQ5 (NM_032314.4)	Het	AR	COQ5:c.332T>A (p.Leu111His) yanlış anlamlı phyloP100: 9.32	rs: -	Olası patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense,

					MutationAssesor, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR, BayesDel
TOGARAM2 (NM_199280.4)	Het	Bilinmiyor	TOGARAM2:c.1543C>T (p.Gln515*) stop kodon phyloP100: 1.07	rs929758807	Patojenik: ACMG/PVS1,PM2,PS4,PP5 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, BayesDel, SliceAI
XRCC2 (NM_005431.2)	Het	OR	XRCC2:c.450C>A (p.Ser150Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 2.50	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MT, DANN, BayesDel
Erkek Olgunun Varyantları					
NOTCH2 (NM_024408.4)	Het	OR	NOTCH2:c.7120C>G (p.His2374Asp) yanlış anlamlı phyloP100: 1.51	rs1374498324	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: MutationAssesor, DANN, BayesDel
TOGARAM1 (NM_001308120.2)	Het	OR	TOGARAM1:c.110G>A (p.Arg37Gln)	rs: -	VUS: ACMG/PM2,BP4 Zarar Verici: DANN – diğer in

			yanlış anlamlı phyloP100: 1.83		silico tahmin araçları benign
DNAH1 (NM_015512 .5)	Het	OR	DNAH1:c.3796C >T (p.Arg1266Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 1.68	rs755852 298	VUS: PM2 Zarar Verici: SIFT, MutationTaster, DANN

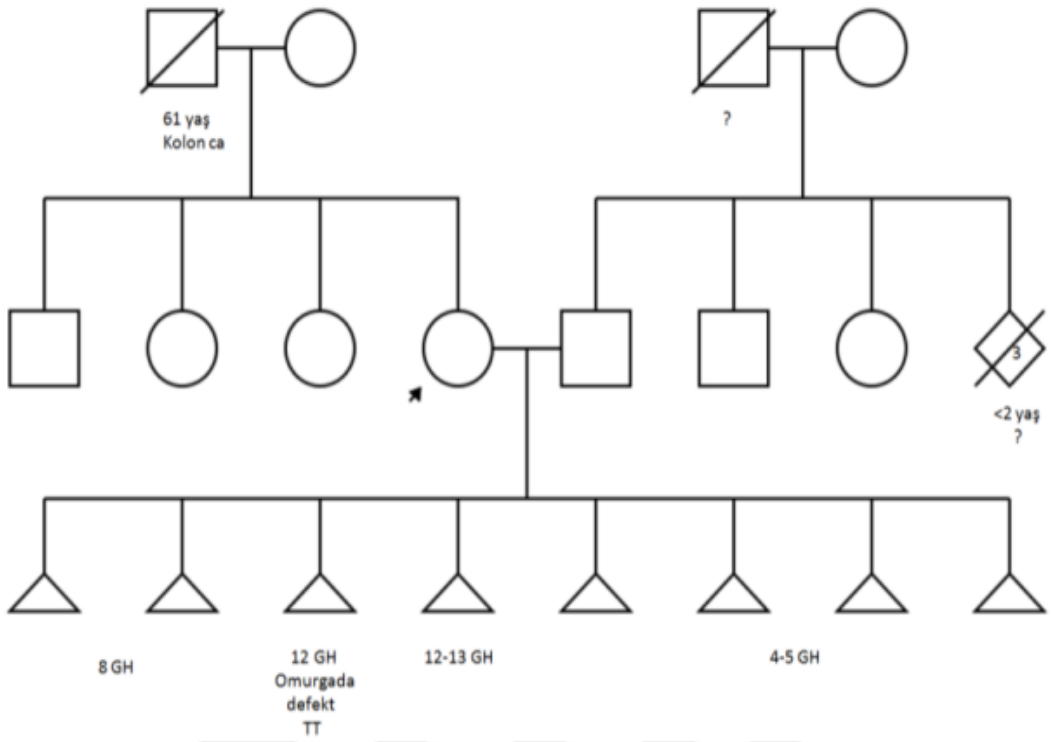
Kadın olguda, mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili *COQ5* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik *novel* bir varyant tespit edilmiştir. Ayrıca primer siliyer diskinesi ilişkili *TOGARAM2* geninde ve otozomal resesif prematür ovaryen yetmezlik ile ilişkili XRCC2 geninde ACMG kriterlerine göre patojenik, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır.

Erkek olguda, erken gelişimde görevli *NOTCH2* geninde ve primer siliyer diskinezi ilişkili *TOGARAM1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır.

4.1.21. Olgu-21-TGK Çifti

Olgu 21 çifti, ITF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G8P8 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 36, eşi 40 yaşındadır. Eşler arasında akrabalık bulunmamaktadır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları A1-2: 8. GH, A3-4: 12-13. GH'dır, A5-8: 4-5. GH'dır. Fetuslardan A3 (G3-TT1)'ün lomber spina bifida ve kifolyoz bulgusu vardır ve fetal kromozom analizi sonucu 46,-- bulunmuştur. A8'in kromozom analizi de 46,-- olarak sonuçlanmıştır.

Olgu 21 TGK çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-21'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-21'de sunulmuştur.



Şekil 4-21: Olgu-21-TGK çifti aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-21: Olgu-21-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
DCT (NM_001922.5)	Het	Bilinmiyor	DCT:c.864-2A>G (.p?) kırpılma varyantı phyloP100: 7.73	rs756314626	Olası patojenik: ACMG/PVS1,PM2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN, BayesDel

PAH (NM_000277.3)	Het	AR	PAH:c.1066-11G>A (.p?) kırpılma varyantı phyloP100: 0.95	rs5030855	Olası patojenik: ACMG/PM3,PM2,PS3, PP5 Zarar Verici: SpliceAI
RDH5 (NM_002905.5)	Het	Bilinmiyor	RDH5:c.712G>T (p.Gly238Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 9.96	rs62638191A	Patojenik: ACMG/PS4,PP3,PM2,PS3,PP1,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutationAsssesor, SIFT, MutationTaster, DANN, MetaLR, BayesDel
LRP1B (NM_018557.3)	Het	Bilinmiyor	LRP1B:c.7981G>A (p.Gly2661Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 7.61	rs767452254	Olası patojenik: PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: Revel, MutationTaster, MetaLR, BayesDel
Erkek Olgunun Varyantları					
TRIM67 (NM_001004342.5)	Het	Bilinmiyor	TRIM67:c.2275C>T (p.Arg759Cys) phyloP100: 1.71	rs767002959	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationTaster, DANN, PrimateAI, BayesDel

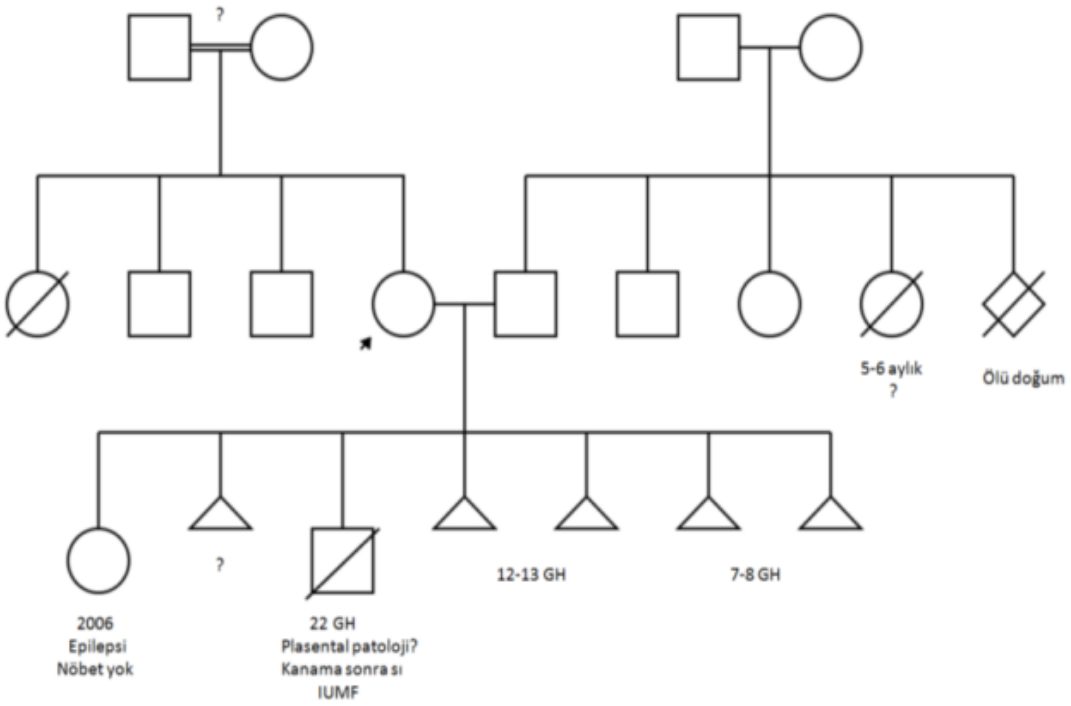
ABCA12 (NM_173076.3)	Het	Bilinmiyor	ABCA12:c.3938T>C (p.Phe1313Ser) yanlış anlamlı phylop100: 5.94	rs763503708	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationTaster, DANN, MetaLR, BayesDel

Olgu çiftinde doğrudan tekrarlayan gebelik kaybı ilişkili varyant tespit edilmemiş olup tespit edilen diğer patojenik, olası patojenik ve VUS varyantlara yer verilmiştir.

4.1.22. Olgu-22-TGK Kadın Olgu

Olgu 22, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G7P1A5IUMF1 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 37 yaşındadır ve ilk gebeliği 23 yaşındadır. Eşi 38 yaşındadır. Eşler arasında akrabalık bulunmamaktadır ve evlilik süreleri 4 yıldır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları; A1: bilinmemektir, A2-4: 12-13. GH, A5-6: 7-8. GH ve A3: 22.GH abortus olması nedeniyle geç fetal kayıp olarak tanımlanmıştır.

Olgu 22, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-22-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-22'de sunulmuştur.



Şekil 4-22-1: Olgu-22-TGK aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-22: Olgu-22-TGK TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
MUTYH (NM_001048174.2)	Het	Bilinmiyor	MUTYH:c.461G>A (p.Arg154His) yanlış anlamlı phyloP100: 7.15	rs143353451	Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PM5,PM1,PP3,PS3,PP5 Zarar Verici: Revel, MutationAssesor, MutationTaster, DANN, MetaLR, BayesDel

*CXCL8** (NM_000584.4)	Het	Bilinmiyor	CXCL8:c.231T>A (p.Cys77*p.Cys77*) stop kodon phyloP100: 0.25	rs536774132	VUS: ACMG/PM2,BS2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
PAX7 (NM_001135254.2)	Het	Bilinmiyor	PAX7:c.400C>T (p.Arg134Trp) yanlış anlamlı phyloP100:4.98	rs775727650	Olası patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
*ALPL** (NM_000478.6)	Het	OR	ALPL:c.931G>A (p.Glu311Lys) yanlış anlamlı phyloP100: 7.57		Patojenik: PM3,PP3,PM2,PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
HGD (NM_000187.4)	Het	OR	HGD:c.157C>T (p.Arg53Trp) yanlış anlamlı	rs759435977	Patojenik: PM3,PP3,PM2,PM5,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutAssesor, SIFT, MT,

			phyloP100: 1.2		FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
MAN2B1 (NM_000528.4)			MAN2B1:c.23C>A (p.Ser8*) stop kodon phyloP100: 0.07	rs: -	Olası patojenik: ACMG/PVS1, PM2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
IFT80 (NM_020800.3)	Hom	OR	IFT80:c.869A>G (p.Asn290Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 7.31	rs138081429	VUS: ACMG/PM2 Patojenik: MT, DANN
MVK (NM_000431.4)	Het	Bilinmiyor	MVK:c.1129G>A (p.Val377Ile) yanlış anlamlı phyloP100: 5.07	rs28934897	Patojenik: ACMG/PM3,PP3,PM2,PM5,PP2,PP5 Patojenik: MutationTaster, DANN, BayesDel

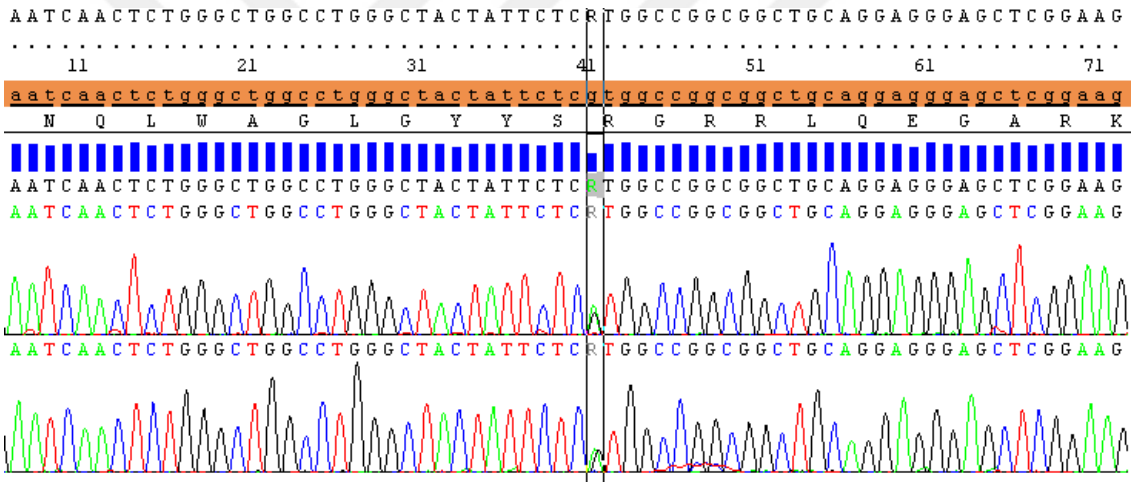
* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Mitokondriyal dinamik, oksidatif stres ve DNA tamiri ile ilişkili yolaklarda yer alan *MUTYH* geninde ACMG kriterlerine göre patojenik ve *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır. *MUTYH* geni oksidatif stres kaynaklı

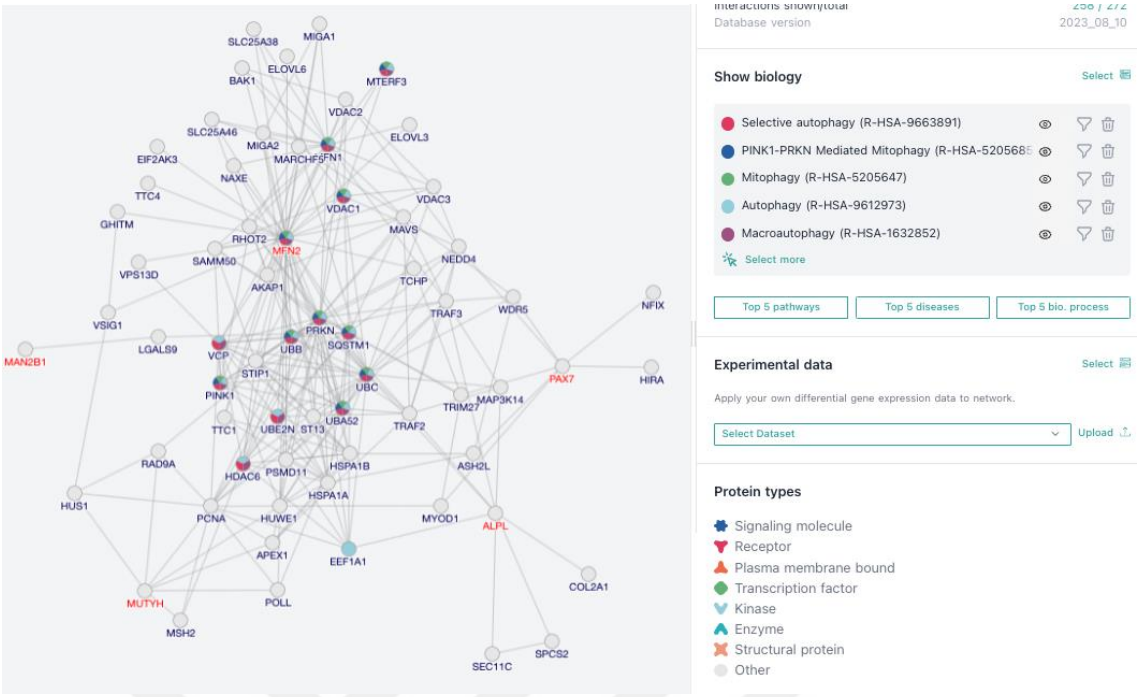
DNA hasarının önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. *MUTYH* geni ekzon 7'de saptananan c.461G>A varyantının Sanger konfirmasyonu görüntüsüne Şekil 4-22-2'de yer verilmiştir.

Olguda *PAX7 ve MAN2B1 genlerinde olası patojenik, ALPL, HGD, MVK, genlerinde* ACMG kriterlerine göre patojenik ve in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır. Ayrıca *CXCL8* ve *IFT80* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır.

Olgunun TED varyant analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritasına Şekil 4-22-3'te yer verilmiştir.



Şekil 4-22-2: Olgu-22 TGK kadın olgu *MUTYH* geninde ekzon 7'deki c.461G>A varyantının Sanger konfirmasyonu görüntüsü

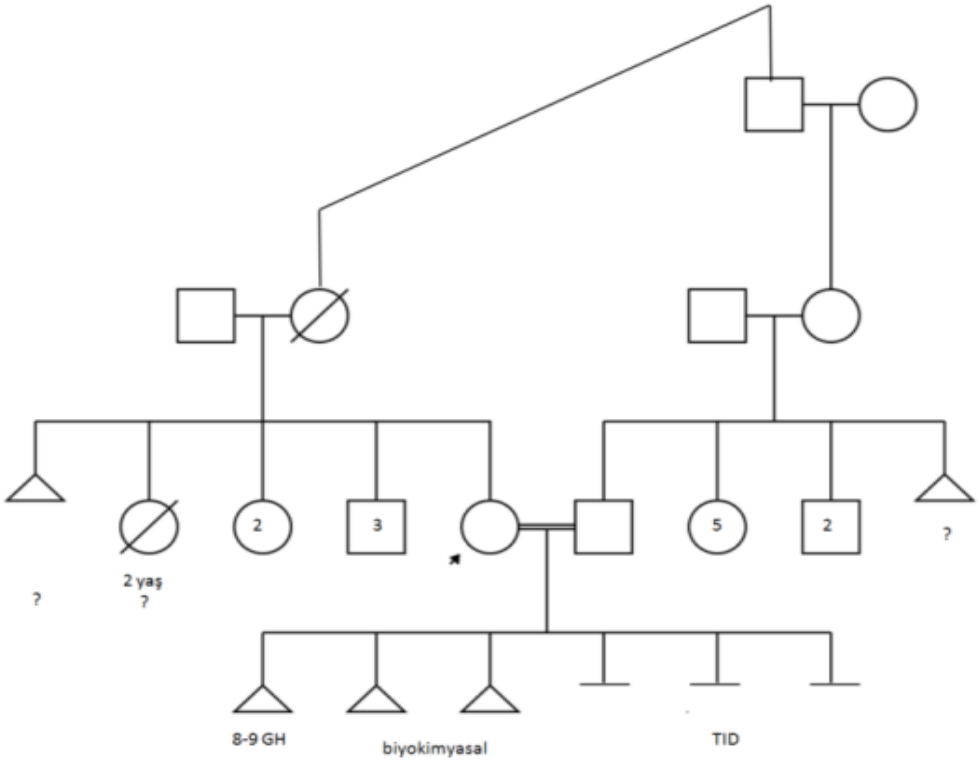


Şekil 4-22-3: Olgu-22-TGK TED analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritası
(ZS Revelen yolak haritalama aracı kullanılarak oluşturulmuştur)

4.1.23. Olgu-23-TGK Çifti

Olgu 23 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G3P3 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 43 ve eşi 43 yaşındadır. Eşler 25 yıllık evlidir ve aralarında 1,5. kuzen evliliği bulunmaktadır. Spontan olarak oluşan gebelikleri ve 3 başarısız YÜT denemesi mevcuttur. Gebelik kaybı haftaları A1: 8-9. GH, A2-3: Biyokimyasal (TİK x3) şeklindedir. Ek bulgu tanımlanmamıştır.

Olgu 23 çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-23-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-23'de sunulmuştur.



Şekil 4-23-1: Olgu-23-TGK çifti aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-23: Olgu-23-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

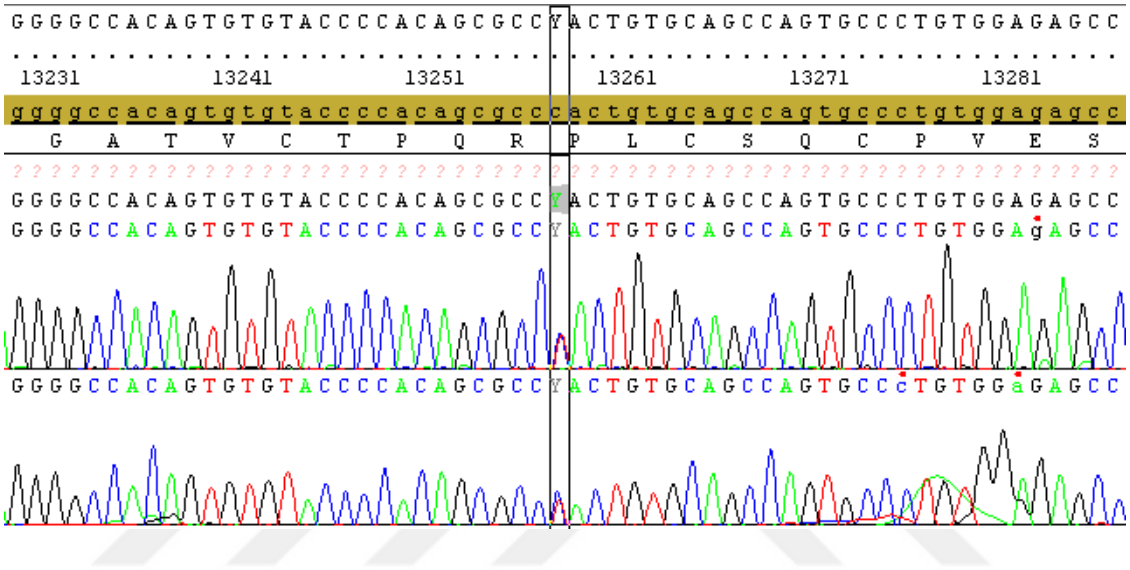
Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
MUTYH (NM_001048174.2)	Het	Bilinmiyor	MUTYH:c.800C>T (p.Pro267Leu) yanlış anlamlı	rs374950566	Patojenik: ACMG/PM3,PP3,PM2,PS3,PP5 Zarar Verici: Revel, MutAssesor, SIFT,

			phyloP100: 7.74		MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
DHX34 (NM_014681.6)	Het	Bilinmiyor	DHX34:c.1216C>T (p.Gln406*) stop kodon phyloP100: 1.73	rs: -	Olasılık Patojenik: PVS1, PM2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
ZAN (NM_003386.3)	Het	Bilinmiyor	ZAN:c.4504G>T (p.Glu1502*) stop kodon phyloP100: -0.58	rs: -	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: MT, BayesDel, DANN
Erkek Olgu					
SETMAR (NM_006515.4)	Het	Bilinmiyor	SETMAR:c.860G>A (p.Cys287Tyr) yanlış anlamlı phyloP100: 9.40	rs: -	Olası patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, FATHMM, DANN, BayesDel, MetaLR

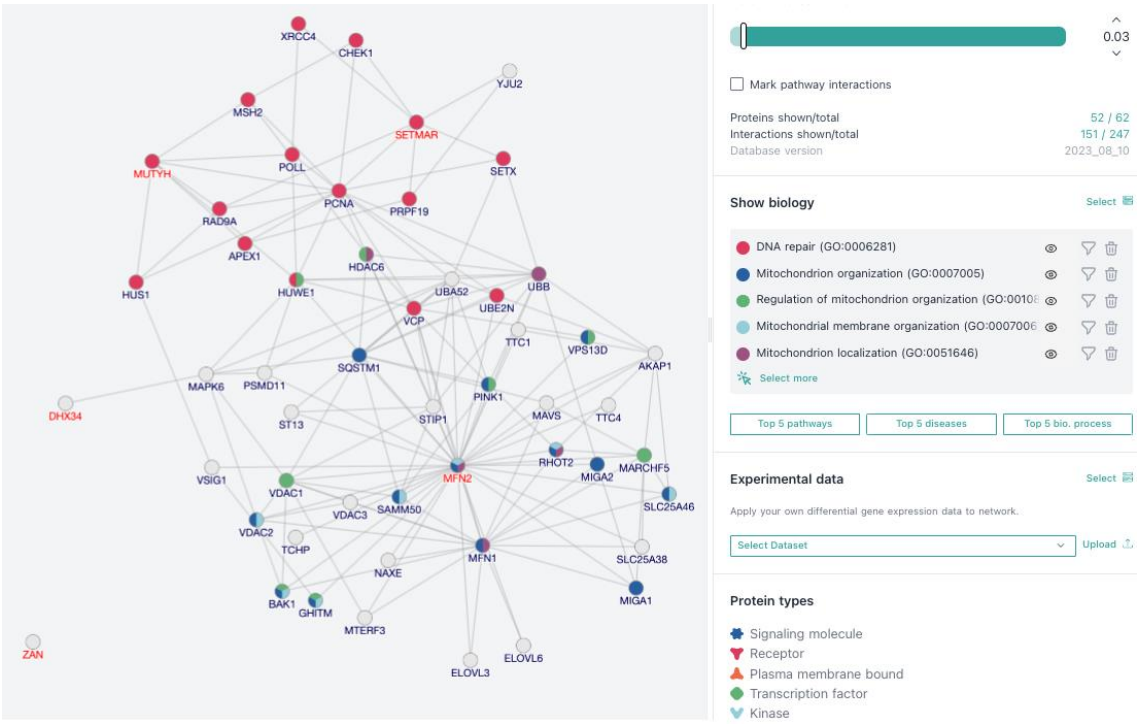
Kadın olguda, oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının önlenmesinde önemli rol oynamayan MUTYH geninde ACMG kriterlerine göre patojenik ve in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır. *MUTYH* geni ekzon 10'da saptananan c.800C>T varyantının Sanger konfirmasyonu görüntüsüne Şekil 4-23-2'de yer verilmiştir. Ayrıca DHX34 geninde olası patojenik, ZAN geninde VUS novel varyantlar saptanmıştır.

Olgunun eşinde, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görevli SETMAR geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, in silico tahmin araçlarına göre zarar verici novel varyant saptanmıştır.

Olgunun TED varyant analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritasına Şekil 4-23-3'te yer verilmiştir.



Şekil 4-23-2: Olgu-23-TGK kadın olgu *MUTYH* geninde ekzon 10'daki c.800C>T varyantının Sanger konfirmasyonu görüntüsü



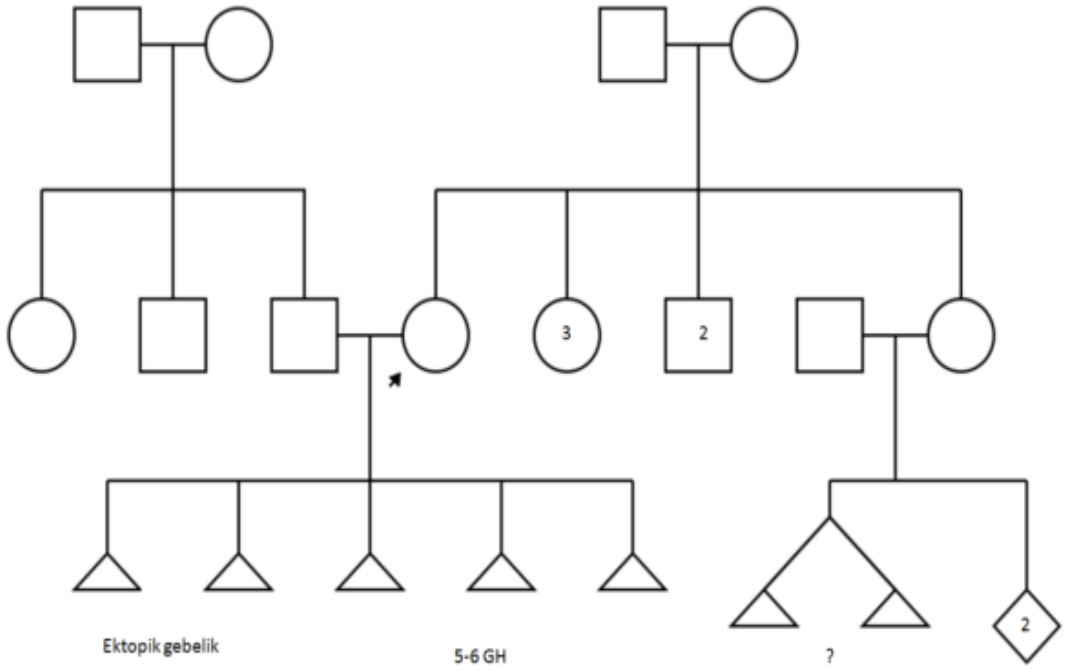
Şekil 4-23-3: Olgu-23-TGK TED analizinde saptanan genlerin yolak ve etkileşim haritası

(ZS Revelen yolak haritalama aracı kullanılarak oluşturulmuştur)

4.1.24. Olgu-24-TGK Kadın Olgu

Olgu 24, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G5A3Ektopik2 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 34 yaşındadır ve ilk gebeliği 30 yaşında olmuştur. Eşi 42 yaşındadır. Eşler arasında akrabalık bulunmamaktadır ve evlilik süreleri 4 yıldır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları; A1-5: 5-6.GH'dır.

Olgu 24, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-24'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-24'de sunulmuştur.



Şekil 4-24: Olgu-24-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-24: Olgu-24-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
TLE6 (NM_001143986.2)	Het	OR	TLE6:c.1105C>A (p.Leu369Met) yanlış anlamlı phyloP100: 6.15	rs: -	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: MutationTaster, DANN

SOHLH1 (NM_001101677.2)	Het	Bilinmiyor	SOHLH1:c.346-1G>A phyloP100: 0.45	rs140132974	VUS: ACMG/PVS1,PP5, BS2 Zarar Verici: MutationTaster
*CPT1B** (NM_152246.3)	Het	Bilinmiyor	CPT1B:c.167C>T (p.Pro56Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 9.85	rs374480938	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetLR, BayesDel
BRWD1 NM_033656.4	Het	Bilinmiyor	BRWD1:c.656G>A (p.Arg219His) yanlış anlamlı phyloP100: 7.81	rs372595428	Olası patojenik: ACMG/PS4,PM2,PP2,PP5 Zarar Verici: MT, DANN, PrimateAI

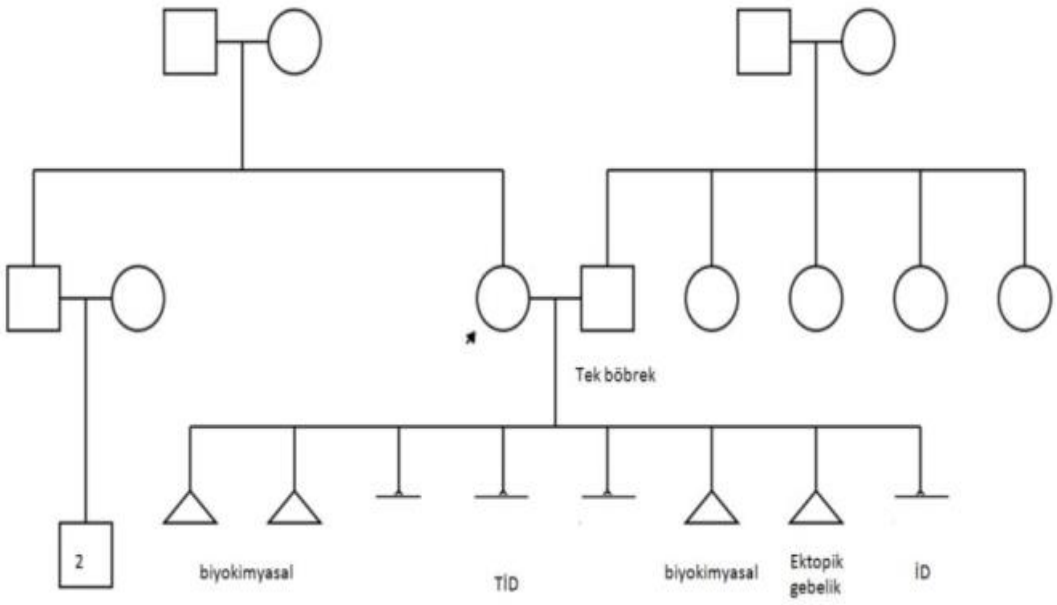
* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Olguda, erken embriyonik letalite ilişkili ve otozomal resesif oosit/zigot/embriyo maturasyon defekti ilişkili *TLE6* geninde (*novel*) ve ovaryen yetmezlik ilişkili *SOHLH1* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarına göre zarar verici varyant saptanmıştır. Mitokondriyal ilişkili karnitin biyogenezinde görevli ve artmış spontan abortus ilişkili *CPT1B* geninde ve mayotik kromozom stabilitesinde rol oynayan *BRWD1* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, *in silico* tahmin araçlarına göre zarar verici novel varyant saptanmıştır.

4.1.25. Olgu-25-TGK Çifti

Olgu 25 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G5A4Ektopik1 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 38 ve eşi 32 yaşındadır. Eşler 3 yıllık evlidir ve aralarında akrabalık bulunmamaktadır. Spontan olarak oluşan gebelikleri ve 4 başarısız YÜT denemesi mevcuttur. Gebelik kaybı haftaları A1-4: Biyokimyasal, 4 gebelikte tekrarlayan implantasyon kusuru meydana gelmiştir. Gebelikler sırasında düşük moleküler ağırlıklı hepatin kullanılmıştır. Erkek olguda tek böbrek ve oligospermi öyküsü mevcuttur.

Olgu 25 çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-25'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-25'de sunulmuştur.



Şekil 4-25: Olgu-25-TGK çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-25: Olgu-25-TGK çiftinin TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
TP73 (NM_005427.4)	Het	OR	TP73:c.1085G>A (p.Arg362Gln) yanlış anlamlı phyloP100: 9.78	rs200330726	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
ZSCAN4 (NM_152677.4)	Het	Bilinmiyor	ZSCAN4:c.412C>T (p.Gln138*) stop kodon pyhloP100: 0.16	rs: -	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
TLR3 (NM_003265.3)	Het	Bilinmiyor	TLR3:c.1660C>T (.Pro554Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 6.15	rs121434431	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: MT, DANN
Erkek Olgunun Varyantları					

TBX18 (NM_001080508.3)	Het	OR	TBX18:c.779T>G (p.Leu260Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 9.33	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutAssesor, SIFT, MT, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel

Kadın olguda, hücresel stres yanıtı, apoptoz ve onarımda görevli *TP73* geninde, erken gelişim sırasında implantasyon başarısızlığına, telomer kusurlarına ve kromozomal yeniden düzenlemelere yol açan *ZSCAN4* geninde, açıklanamayan tekrarlayan spontan gebelik kaybı ilişkili *TLE3* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarına göre zarar verici varyant saptanmıştır.

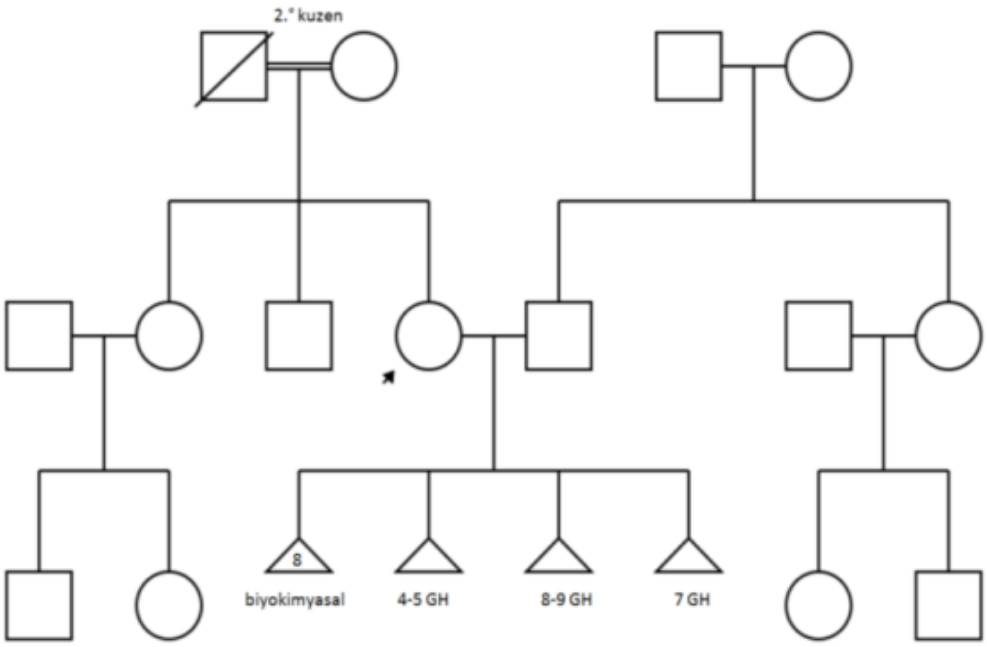
Tek böbrek bulgusu olan erkek olguda, konjenital böbrek ve üriner kanal anomalisi etiyolojisinde yer alan *TBX18* geninde olası patojenik *novel* varyant saptanmıştır. Erkek olguda tekrarlayan gebelik kaybı etiyolojisini açıklabilecek bir varyant tespit edilmemiştir.

4.1.26. Olgu-26-TGK Kadın Olgu

Olgu 26, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G11A11 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 43 yaşındadır ve ilk gebeliği 40 yaşında olmuştur. Eşi 41 yaşındadır. Olgunun anne ve babası 2. derece kuzendir. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları; A1-8: Biyokimyasal, A9: 4-5. GH, A10-11: 7-9.

GH'dır. Fetuslara yapılan karyotip analizlerinde; A9: 46,XY ve A11: 47,XX,+15. Ek hastalık öyküsünde memede fibrokistik hastalık, tiroid sağ lobda 5x3,5 mm nodül tespit edilmiştir. İlaç kullanımı: Gebelikler esnasında düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanımı, tiroid hormon replasmanı yapılmaktadır.

Olgu 26, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-26-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-26'de sunulmuştur.

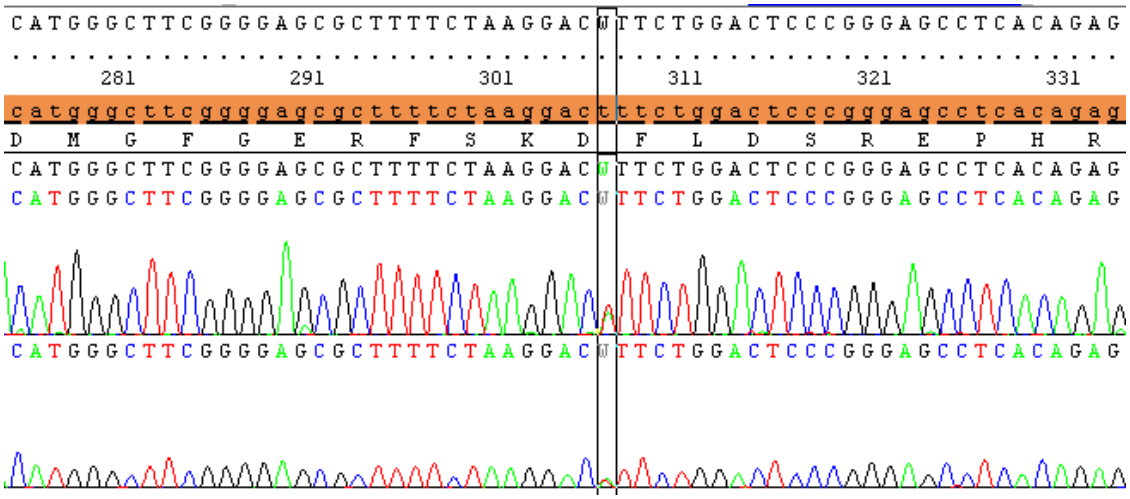


Şekil 4-26-1: Olgu 26-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-26: Olgu-26-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
WNT10A (NM_025216.3)	Het	Bilinmiyor	WNT10A:c.682T>A (p.Phe228Ile) Yanlış anlamlı phyloP100: 7.94	rs121908120	VUS, Patojenik (2023): ACMG/PP5,PP3,BS2,BA1 Zarar Verici: Revel, BayesDel, AlphaMissense, Eve, MutationTaster, DANN, PrimateAI
MUC4 (NM_018406.7)	Hom	Bilinmiyor	MUC4:c.11705C>T phyloP100:2.11	rs192522651	VUS: ACMG/PM2,BP4 Zarar Verici: DANN

Olguda erken embriyonik gelişimde görevli *WNT10A* geninde ACMG'ye göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında patojenik olan heterozigot bir varyant saptanmıştır. *WNT10A* geni ekzon 3'te saptananan c c.682T>A varyantının Sanger konfirmasyonu görüntüsüne Şekil 4-26-2'de yer verilmiştir.



Şekil 4-26-2: TGK-26 kadın olgu *WNT10A* geninde ekzon 3'deki c.682T>A varyantının Sanger konfirmasyonu görüntüsü

Tekrarlayan gebelik kaybı ilişkili *MUC4* geninde ACMG kriterlerine göre VUS ve DANN *in silico* tahmin aracında zarar verici olarak sınıflandırılan homozigot bir varyant saptanmıştır. *MUC4* geni burden analiz sonucunda istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$). Burden analizi verilerine Şekil 4-26-3'te yer verilmiştir.

Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
MUC4	573	2197	2252	7692	0,030033	1	4.707393	[[615.4829322 2154.5170678] [2209.5170678 7734.4829322]]

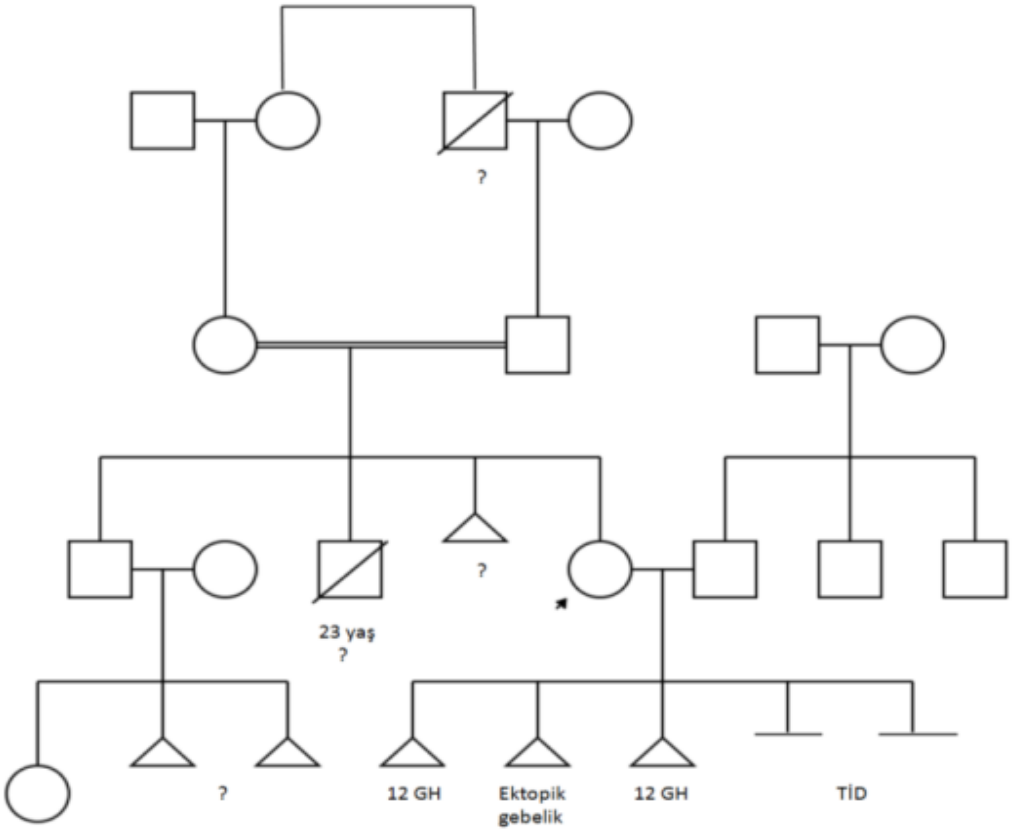
Şekil 4-26-3: *MUC4* geni burden analiz sonucu

4.1.27. Olgu-27-TGK Çifti

Olgu 27 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G5A4Ektopik1 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 41 yaşındadır, ilk gebelik yaşı 35'tir. Anne ve babası arasında 1.derece kuzen evliliği bulunmaktadır. Eşi ile 7 yıllık evlidir ve erkek olgu 34 yaşındadır. Spontan olarak oluşan gebelikleri ve 2 defa başarısız YÜT denemesi mevcuttur. Gebelik kaybı haftaları A1-3: 12. GH, A2: 8-9. GH, 2 defa tekrarlayan gebelik

kusuru (TİK) meydana gelmiştir. Ek klinik öyküsünde Hashimoto tiroidi, 2019 yılında submukoz miyemektomi mevcuttur. İlaç kullanımında tiroid hormon replasmanı altında olduğu belirtilmiştir.

Olgu 27 TGK çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda; erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-27'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-27'de sunulmuştur.



Şekil 4-27: Olgu-27-TGK çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-27: Olgu-27-TGK çifti kadın olgu TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
MUTYH NM_001048174.2	Het	Bilinmiyor	MUTYH:c.228C>A (p.Tyr76*) stop kodon phyloP100: -0.36	rs121908380	Patojenik: ACMG/PVS1,PM2,PP5,PS3 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
PPIF (NM_005729.4)	Het	Bilinmiyor	PPIF:c.357dup (p.Ile120Hisfs*8) çerçeve kayması phyloP100: 9.33	rs745341136	VUS: ACMG/PM2,BS2
PPIF (NM_005729.4)	Het	Bilinmiyor	PPIF:c.609_610del (p.Cys203Trpfs*34) çerçeve kayması phyloP100: 9.95	rs770785858	VUS: ACMG/PM2,BS2
SLC2A7 (NM_207420.3)	Het	Bilinmiyor	SLC2A7:c.307G>A (p.Gly103Ser)	rs773308377	VUS: ACMG/PM2,PP3 Patojenik: Revel,

			yanlış anlamlı phyloP100: 3.54		MT, DANN, MetaLR, BayesDel
TTC12 (NM_017868.4)	Het	Bilinmiyor	TTC12:c.500T>C (p.Leu167Pro) yanlış anlamlı phyloP100: 6.43	rs1431526602	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MUTAssesor, FATHMM, DANN, BayesDel
SETMAR (NM_006515.4)	Het	Bilinmiyor	SETMAR:c.860G>A (p.Cys287Tyr) yanlış anlamlı phyloP100: 9.40	rs769001939	Olası patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
Erkek Olgunun Varyantları					
TGK etiyolojisi ile ilişkili varyant saptanmamıştır.					

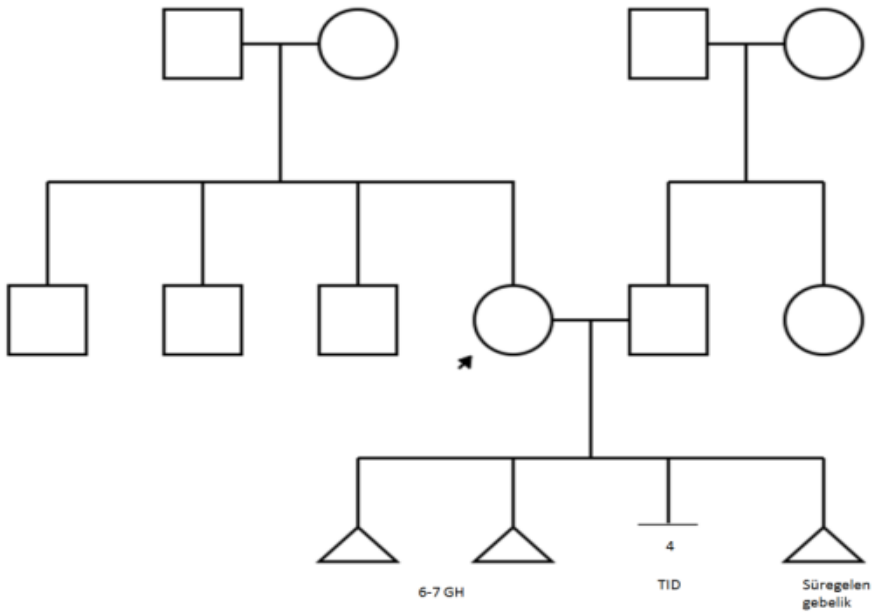
Kadın olguda, oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının önlenmesinde önemli rol oynayan *MUTYH* ve *SETMAR* genlerinde ACMG kriterlerine göre patojenik ve *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant saptanmıştır. Ayrıca oksidatif stres ilişkili nekrozda görevli *PPIF* geninde, maternal dolaşımdan gelen glikozun ve farklı enerji kaynaklarından gelen besinlerin transplasental olarak taşınmasında, hücreye alımının katalize edilmesinde ve uygun fetal gelişimin sürdürülmesinde önemli olan *SLC2A7* geninde ve primer siliyer diskinezi ilişkili *TTC21* geninde VUS varyant saptanmıştır.

Olgunun eşinde, TED varyant analizinde TGK ile ilişkili olabilecek anlamlı varyant saptanmamıştır.

4.1.28. Olgu-28-TGK Kadın Olgu

Olgu 28, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G3A3 ve 7 IVF denemesi öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 32 yaşında ve eşi 39 yaşındadır. Akrabalık öyküsü yoktur. Gebelikleri YÜT ile oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları; A1-2: 6-7. GH'dır ve 4 defa TİK meydana gelmiştir. Ek hastalık öyküsünde PKOS vardır. İlaç kullanımı olarak tiroid replasmanı yapılmaktadır. Anti-TPO ve anti-TG'si yüksektir. Fetal USG bulgularında ense kalınlığında artış gözlenmiştir ve fetusa ait DNA örneği ile yapılan array analizinde; A3:46,--.arr[GRCh37Xp22.11(23755758_24259891)x0 sonucu vardır. Ek hastalık öyküsünde memede fibrokistik hastalık bulgusu, tiroid sağ lobda 5x3,5 mm nodül tespit edilmiştir. İlaç kullanımı: Gebelikler esnasında düşük moleküler ağırlıklı heparin kullanımı, tiroid hormon replasmanı yapılmaktadır.

Olgu 28, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-28'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-28'de sunulmuştur.



Şekil 4-28: Olgu-28-TGK aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-28: Olgu-28-TGK TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
ACAD9 (NM_014049.5)	Het	AR	ACAD9:c.1024 A>T (p.Ile342Phe) yanlış anlamlı phyloP100: 8.32	rs: -	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, Eve, MutationAssessor, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
ROS1 (NM_001378902.1)	Het	Bilinmiyor	ROS1:c.191G>A (.Trp64*) stop kodon phyloP100: 2.76	rs1219188453	Olası Patojenik: ACMG/PVS1, PM2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
TRAP1 (NM_016292.3)	Het	Bilinmiyor	TRAP1:c.341G>A (p.Arg114Gln)	rs537354825	Olası Patojenik: PP3, PM2

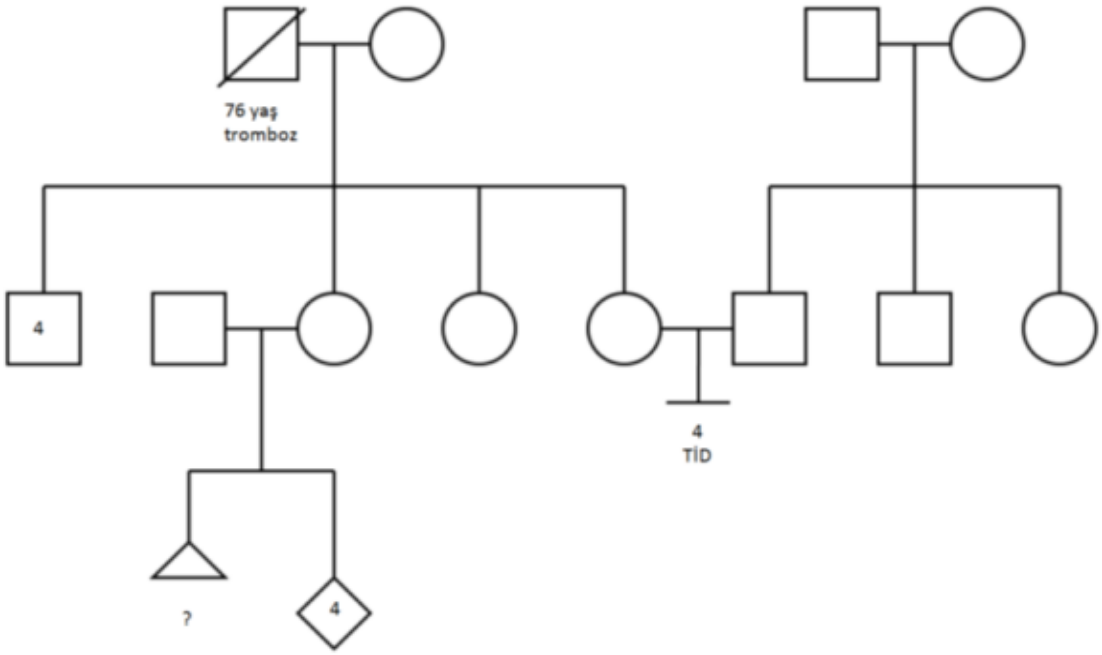
			yanlış anlamlı phyloP100: 7.36		Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutationAssessor, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel

Mitokondri ilişkili açil-CoA'ların beta-oksidasyonunda görevli *ACAD9* geninde, serbest radikallere karşı antioksidan savunmasında görevli *ROS1* geninde ve mitokondriyal homeostaz ve antiapoptotik işlevler için önemli bir mitokondriyal şaperon olan *TRAP1* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik ve *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyantlar saptanmıştır.

4.1.29. Olgu-29-Pİ Kadın Olgu

Olgu 29, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G0 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 43 yaşındadır. 4 defa başarısız YÜT denemesi olmuştur. Erkek olgu (eşi) 45 yaşındadır ve nonobstrüktif azoospermi (maturasyon arresti) tespit edilmiştir. Eşler arasında akrabalık yoktur ve evlilik süresi 17 yıldır.

Olgu 29, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-29'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-29'de sunulmuştur.



Şekil 4-29: Olgu-29-Pİ kadın olgu aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-29: Olgu-29-Pİ kadın olgunun TED analizinde saptanan ve Pİ ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
*CYP17A1** (NM_000102.4)	Het	AR	CYP17A1:c.1487G>A (p.Arg496His) yanlış anlamlı phyloP100: 4.08	rs763398879	Olası Patojenik: ACMG/PM2,PM5,PP3, PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel

SQSTM1 (NM_003900.5)	Het	Bilinmiyor	SQSTM1:c.1316C>T (p.Pro439Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 2.89	rs199854262	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: SIFT, MT, DANN
OR51G1 (NM_001005237.1)	Hom	Bilinmiyor	OR51G1:c.337G>T (p.Glu113*)	rs35264256	VUS: ACMG/PM2, BS2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel
ACLY (NM_001096.3)	Het	Bilinmiyor	ACLY:c.2078C>T (p.Pro693Leu) yanlış anlamlı phyloP100: 9.85	rs532952188	VUS: ACMG/PM2,PP3,PP2,BS2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
HABP2 (NM_004132.5)	Het	AD	HABP2:c.1484G>A (p.Gly495Glu) yanlış anlamlı phyloP100: 9.07	rs: -	VUS: ACMG/PP3, PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
ABCC2 (NM_000392.5)	Het	Bilinmiyor	ABCC2:c.3236G>A (p.Arg1079Gln) yanlış anlamlı phyloP100: 6.25	rs145672804	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, MT, DANN, MetaLR, BayesDel

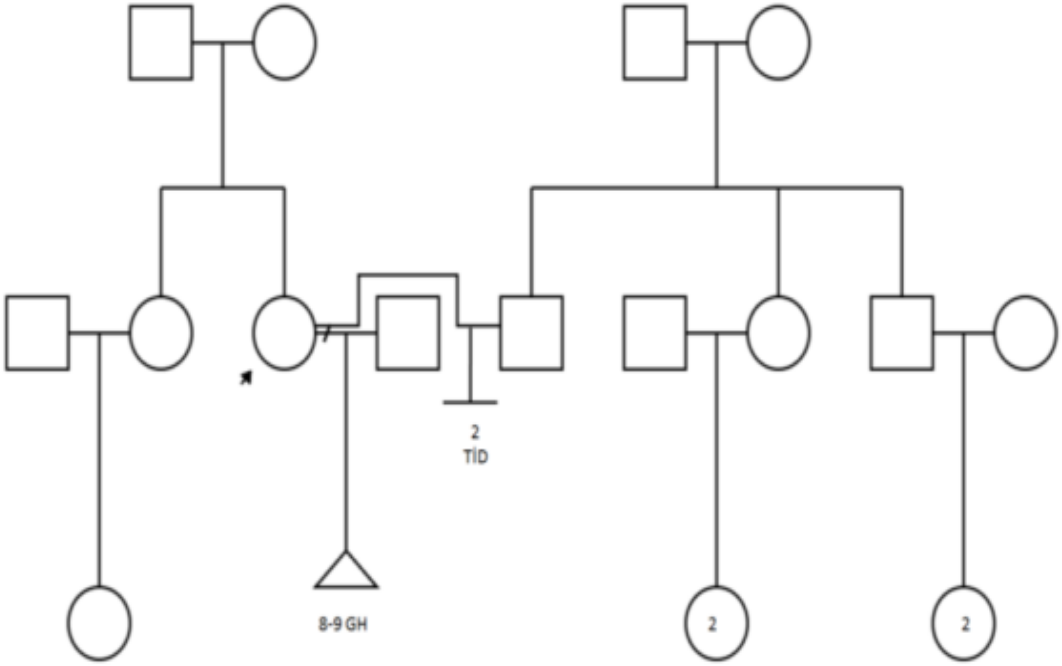
* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

17α-hidroksilaz eksikliği ile ilişkili *CYP17A1* geni, kortizol ve gonadal steroid eksikliği ile ilişkili olarak kadınlarda oligomenore, amenore ve infertiliteyi içeren geniş bir klinik spektruma neden olmaktadır. TED analizinde *CYP17A1* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik bir varyant tespit edilmiştir. Otofaji ilişkili tekrarlayan gebelik kaybında rol oynayan *SQSTM1* geni, seçici otofaji yoluyla *ACLY* degredasyonunu indükleyerek oosit olgunlaşmasında rol almaktadır. *SQSTM* ve *ACLY* genlerinde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir. Embriyo implantasyonunda önemli olan endometriyal fonksiyonlarda rol alan *HABP2* geninde ve maternal-fetal etkileşimde rol oynayan ABC taşıyıcılarından *ABCC2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

4.1.30. Olgu-30-TGK Çifti

TGK-30 çifti, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G1A1 gebelik ve 5 defa başarısız YÜT öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 42 yaşındadır, ilk gebelik yaşı 30'dur. Eşi ile 7 yıllık evlidir ve erkek olgu 43 yaşındadır. Spontan olarak ve YÜT ile olarak oluşan gebeliklerinde iki defa TİK gözlenmiştir. Gebelik kaybı haftaları A1:8-9.GH'dır. Eşinin klinik bulgusunda spermiyogramda astenozoospermi mevcuttur.

Olgu-30 çiftinde, kadın olgu Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda, erkek olgu ise Berry Genomics / Engin Tıp & Next Genetic Center (NGC) MGI DNBSEQ-G400 cihazıyla dizilenmiştir. Olgu çiftinin aile ağacı Şekil 4-30-1'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-30'da sunulmuştur.



Şekil 4-30-1: Olgu-30-TGK çiftinin aile ağacı (Berkay, 2020, Kale, 2021)

Tablo 4-30: Olgu-30-TGK çiftinin TED varyant analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
Kadın Olgunun Varyantları					
VPS13D (NM_015378.4)	Het	Bilinmiyor	VPS13D:c.3283A>T (p.Asn1095Ty) yanlış anlamlı phyloP100: 5.91	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP2 Zarar Verici: Eve, DANN, MT

ABCA4 (NM_000350.3)	Het	Bilinmiyor	ABCA4:c.3149G>A (p.Gly1050Asp) yanlış anlamlı phyloP100: 4.00	rs61750062	Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PM5,PM1,PP3,PP2,PP1,PP4 Zarar Verici: Revel, DANN, MetaLR, BayesDel
ABCC8 (NM_000352.6)	Het	Bilinmiyor	ABCC8:c.3326T>G (p.Met1109Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 9.32	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2,PP2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, MutationAssesor, SIFT, MT, DANN, BayesDel
Erkek Olgunun Varyantları					
ABCB5 (NM_001163941.2)	Het	Bilinmiyor	ABCB5:c.1646A>G (p.Asp549Gly) phyloP100: 9.27	rs763820363	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, MutationAssesor, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
ABCA7 (NM_019112.4)	Het	Bilinmiyor	ABCA7:c.1985T>G (p.Leu662Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 7.86	rs749784272	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, SIFT, MT, DANN, MetaLR, BayesDel

Olguda mitokondri boyutu, şekli, mitokondri-ER etkileşimi ve otofajide görevli mitokondriyal dinamik ilişkili *VPS13D* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan *novel* varyant saptanmıştır.

ABCB5 geni, hücre füzyonu, yeni kan damarlarının oluşturulması ve ilaç dışa atımında (efflüx) önemli bir aracıdır. Hamilelik sürecinde, plasenta gelişiminde ve gelişen fetusta artan oksijen ve metabolik talepleri destekleyebilecek karmaşık bir maternal-fetal vasküler ağa ihtiyaç vardır. Bu gende meydana gelen mutasyonların tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi olabileceği belirlenmiştir.

Bu olguda eşlerden her ikisinde de saptanan ve membranlar arası taşımada görevli ABC-bağlayıcı kaset taşıyıcı membran proteinlerinin birleşik etkisinin tekrarlayan gebelik kaybına yol açabileceği üzerinde düşünülmüştür. *Burden* analizinde istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) olan *ABCA4* geninin *burden* analizi sonuçlarına Şekil 4-30-2'de yer verilmiştir.

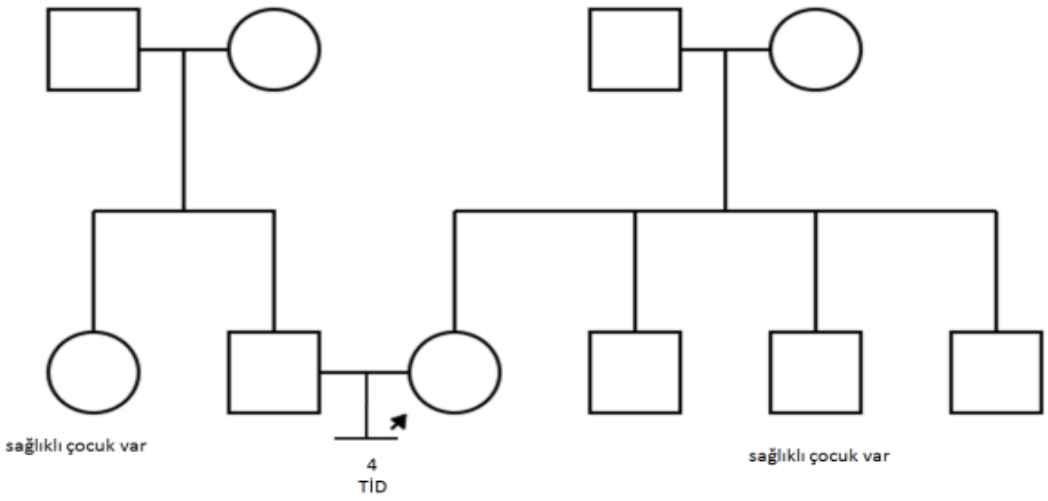
Gen	Olgu_Hom	Olgu_Het	VT_Hom	VT_Het	p	Beklenen	sd	İstatistik
ABCA4	163	285	384	366	8,59225093142096E-07	1	24,2202854490924	[[204.554257124 3.4457429] [342.4457429 407.5542571]]

Şekil 4-30-2: *ABCA4* geni burden analiz sonucu

4.1.31. Olgu-31-Pİ Kadın Olgu

Olgu 31, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G0 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Eşlerin her ikisi de 43 yaşındadır. Dört YÜT denemesi başarısız olmuştur. Aralarında akrabalık yoktur.

Olgu 31, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-31'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-31'de sunulmuştur.



Şekil 4-31: Olgu-31-Pİ kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-31: Olgu-31-Pİ kadın olgunun TED analizinde saptanan ve PI ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
NOBOX (NM_001080413.3)*	Het	OD	NOBOX:c.1067G>A (p.Arg356Gln) yanlış anlamlı phyloP100: 5.68	rs749172175	VUS: ACMG/PP3,PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
ABCC2 (NM_000392.5)	Het	Bilinmiyor	ABCC2:c.2303G>A (p.Arg768Gln) yanlış anlamlı	rs536840524	Olası Patojenik: ACMG/PP3,PM2,PM5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve,

			phyloP100: 8.15		MutationAssesor, MT, DANN, BayesDel
ACAD8 (NM_014384 .3)	Het	AR	ACAD8:c.112 9G>A (p.Gly377Ser) yanlış anlamlı phyloP100: 9.75	rs12190 8419	Patojenik: ACMG/PM3, PP3, PM2, PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutationAssesor, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel
SERPIN1A (NM_000295 .5)	Het	Bilinmi yor	SERPINA1:c.1 87C>T (p.Arg63Cys) yanlış anlamlı phyloP100: 2.87	rs28931 570	Patojenik: ACMG/PP5,PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, SIFT, MT, DANN, MetaLR, BayesDel
*DUOX2** NM_001363 711.2	Het	AR	DUOX2:c.112 6C>T (p.Arg376Trp) yanlış anlamlı phyloP100: 2.85	rs11947 2029	Olası Patojenik: ACMG/PM3,PM2,PS 3,PP1,PP5 Zarar Verici: Eve, SIFT, MT, DANN, BayesDel
*MTOR** (NM_004958 .4)	Het	Bilinmi yor	MTOR:c.307C >T (p.Arg103*) stop kodon phyloP100: 3.91	rs76837 4086	Olası Patojenik: ACMG/PVS1,PM2 Zarar Verici: MT, DANN, BayesDel

TP73 (NM_005427 .4)	Het	AR	TP73:c.1747A >G (p.Met583Val) yanlış anlamlı phyloP100: 8.78	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP3 Zarar Verici: Revel, MT, DANN, BayesDel

* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

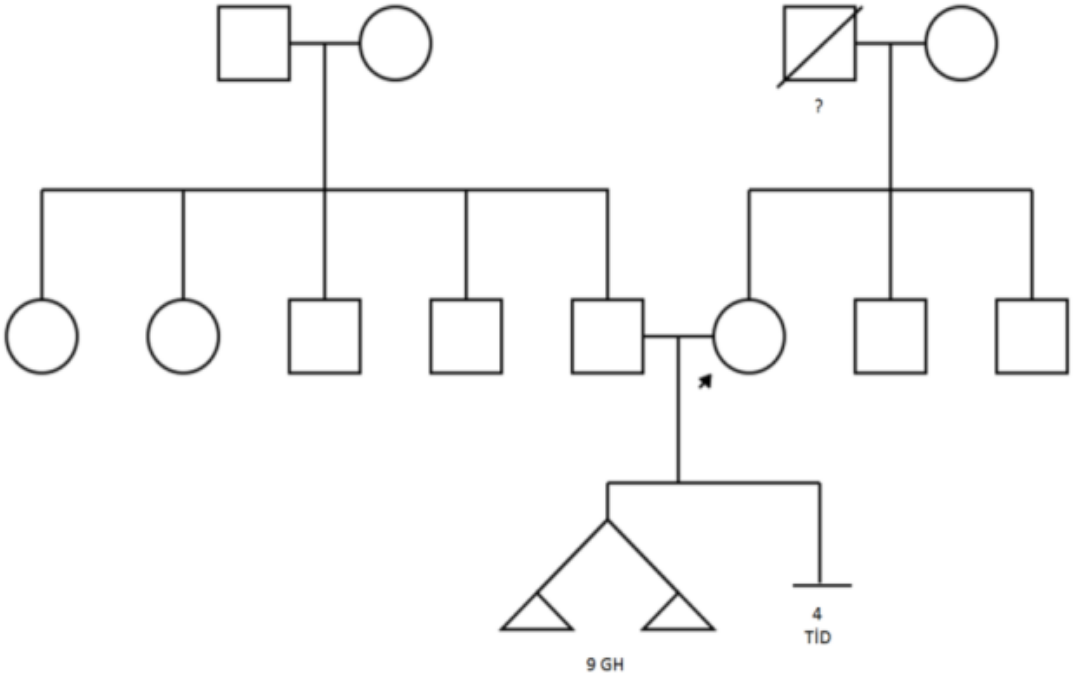
Prematür overyan yetmezlik etiyolojisinde rol oynayan otozomal dominant kalıtımlı *NOBOX* geninde ve hücresel onarım, hücre döngüsü, follikül rezervi, ovulasyon oranı ve genomik stabilitede önemli *TP73* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

Maternal-fetal etkileşimde rol oynayan ABC taşıyıcılarından *ABCC2* geninde, hücresel stres yanıtını kontrol edilmesi, onarım, hayatta kalma sinyalleri ve hücre ölümü süreçlerinde önemli olan *MTOR* geninde ve tiroid dishormonogenezi ile ilişkili *DUOX2* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir. Endometriyozis ilişkili *SERPINA1* geninde patojenik varyant tespit edilmiştir.

4.1.32. Olgu-32-TGK Kadın Olgu

Olgu 32, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G1A2 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Kadın olgu 61 yaşındadır ve ilk gebelik yaşı 31'dir. Erkek olgu 63 yaşındadır. Beş defa başarısız YÜT denemesi olmuştur. Gebelik kaybı haftaları; A1-2: 9.GH ve 4 defa TİK şeklindedir. Eşler arasında akrabalık yoktur ve evlilik süresi 30 yıldır.

Olgu 32, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-32'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-32'de sunulmuştur.



Şekil 4-32: Olgu-32-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-32: Olgu-32-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	**Zigosite**	**Kalıtım modeli**	**Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)**	**dbSNP rs no**	**Varyant sınıfı**
MSH5 (NM_172166.4)	Het	OR	MSH5:c.868G>A (p.Val290Ile) yanlış anlamlı phyloP100: 6.40	rs145519200	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: DANN
NOBOX (NM_001080413.3)	Het	OD	NOBOX:c.1418C>T (p.Ala473Val) yanlış anlamlı phyloP100: 1.27	rs: -	VUS: ACMG/PM2,BP4 Zarar Verici: DANN

ZPBP (NM_007009.3)	Het	Bilinmiyor	ZPBP:c.810del (p.Phe270Leufs*5) çerçeve kayması phyloP100: 5.85	rs: -	Olası Zarar Verici: ACMG/PVS1, PM2
HEXA	Het	OR	HEXA:c.1496G>A (p.Arg499His) yanlış anlamlı phyloP100: 7.56	rs121907956	Patojenik: ACMG/PM3,PM2, PM5,PP3,PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutationAssesor, SIFT, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel

Mayoz bölünme ve DNA tamirinde rol oynayan otozomal resesif prematür ovaryen yetmezlik ilişkili *MSH5* geninde ve erken folikülogenezde kritik bir rol oynayan oosit spesifik homeobox geni olan ve otozomal dominant primer overyan yetmezlik etiyolojisinde rol oynayan *NOBOX* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

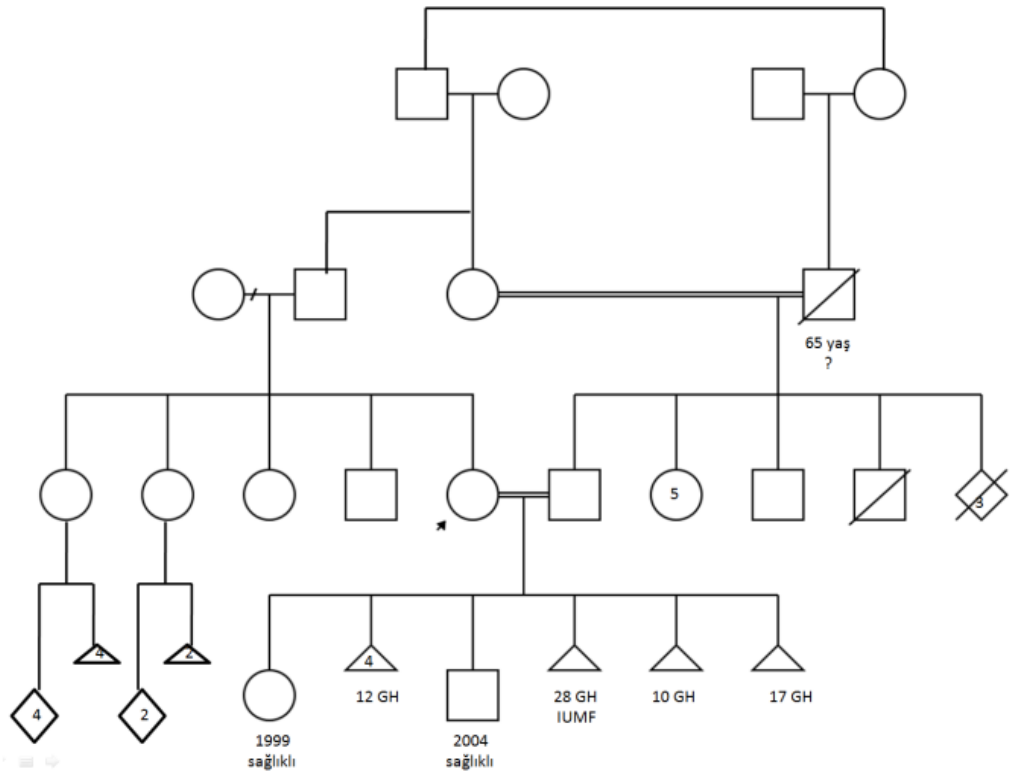
Oositi çevreleyen ve glikoproteinlerden oluşan yapı olan Zona Pellucida (ZP), oosit seçiminde görev alır. *ZPBP* (*Zona Pellucida Binding Protein*), sperm akrozomal membranına lokalize olarak akrozom reaksiyonunun ardından oositin ZP proteinine bağlanmasında görevlidir. *ZBBP* geninin otozomal resesif erkek infertilitesine neden olduğu bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan araştırmalarda serin proteaz olan *ZPBP* proteininin implantasyon süreci için gerekli uterin luminal epitelyuma bağlanarak

desidualizasyonun sağlanmasında görev alarak kadın infertilitesinde ve implantasyonda ve desidualizasyonda görev alabileceğini bildirmiştir (An et al., 2019). *ZPBP* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

4.1.33. Olgu-33-TGK Kadın Olgu

Olgu 33, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G9P2A7 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Olgu 46 yaşındadır, ilk gebelik yaşı 25'tir. Olgunun eşi 45 yaşındadır ve aralarında 1. derece kuzen evliliği vardır. Evlilik süreleri 21+ yıldır. Gebelikleri spontan olarak oluşmuştur. Gebelik kaybı haftaları; A1-4: 12.GH, A5:28. GH (geç fetal kayıp), A6: 10.GH ve A7: 17.GH'dır. G9'a ait fetal ultrasonografide 17. GH erkek fetus, major anomali ve sendromik bulgu saptanmamıştır. İki kız kardeşinde G8P4A4 ve G4P2A2 tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü mevcuttur.

Olgu 33, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-33'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-33'de sunulmuştur.



Şekil 4-33: Olgu-33-TGK kadın olgu aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-33: Olgu-33-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
TMLHE (NM_018196.4)	Het	XR	TMLHE:c.730G>C (p.Asp244His) yanlış anlamlı phyloP100: 6.78	rs869320708	Olası Patojenik: PP3, PM2 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MutationAsses

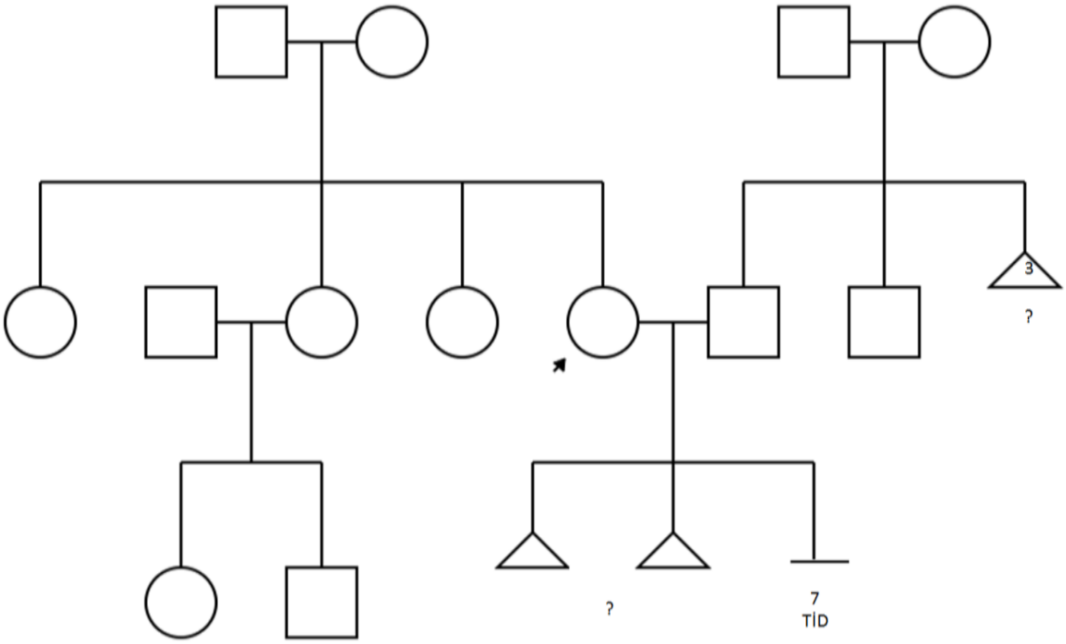
					or, SIFT, MT, DANN, MetaLR, PrimateAI, BayesDel

Olguda, mitokondri ilişkili karnitin biyosentezinde görevli *TMLHE* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, in silico tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir.

4.1.34. Olgu-34-TGK Kadın Olgu

Olgu 34, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G9A9 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Olgu 40 yaşındadır, ilk gebelik yaşı bilinmemektedir. Olgunun eşi 39 yaşındadır ve aralarında akrabalık bulunmamaktadır. Spontan olarak oluşan gebelikleri ve yedi adet başarısız YÜT denemesi bulunmaktadır. Gebelik kaybı haftaları bilinmemektedir (TİK x7).

Olgu 34, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-34'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-34'de sunulmuştur.



Şekil 4-34: Olgu 34-TGK kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-34: Olgu-34-TGK kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
*GNRHR** NM_000406.3	Het	OR	GNRHR:c.317 A>G (p.Gln106Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 7.95	rs104893836	Olası Patojenik: ACMG/PM2,PM1,PP2,PP5 Zarar Verici: SIFT, MT, DANN, BayesDel
BMP15	Het	OD, X'e bağlı	BMP15:c.538G >A (p.Ala180Thr)	rs104894767	VUS: ACMG/PP5,BP1,BP2

			yanlış anlamlı phyloP100: 0.02		
DUOX2 (NM_001363711.2)	Het	OR	DUOX2:c.3319A>G (p.Thr1107Ala) yanlış anlamlı phyloP100: 7.90	rs: -	VUS: ACMG/PM2, PP3 Zarar Verici: Revel, AlphaMissense, Eve, MT, DANN, BayesDel
*EGFR** (NM_005228.5)	Het	OR,OD	EGFR:c.2884C>T phyloP100: 3.70	rs17337451	VUS: ACMG/PM2 Zarar Verici: SIFT, DANN, MetaLR, PrimateAI

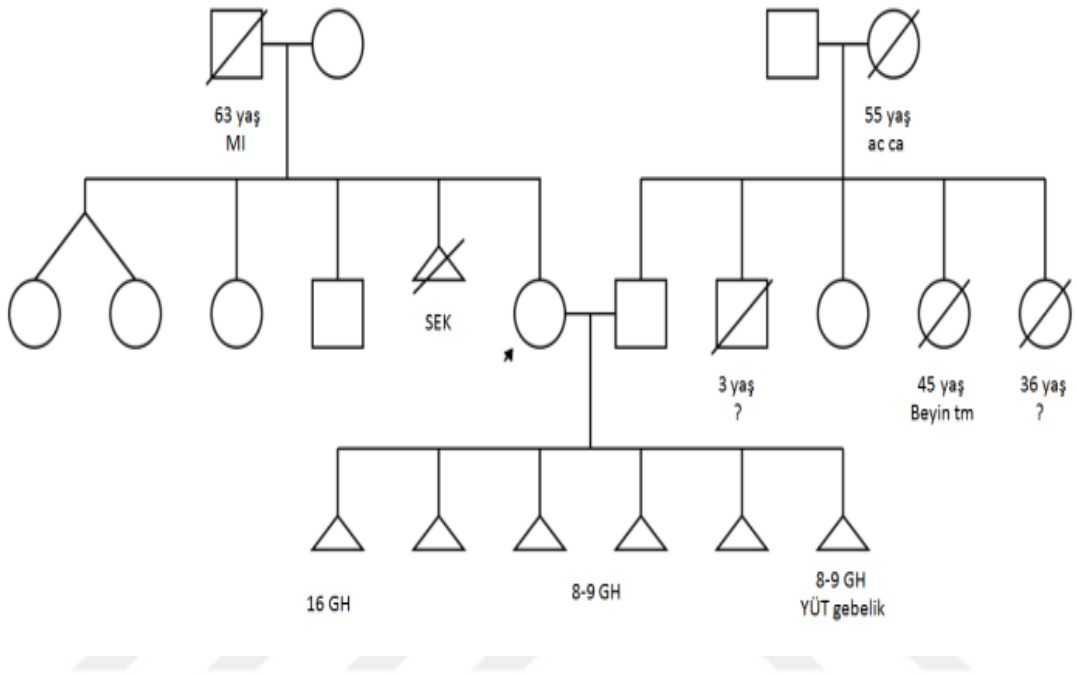
* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

Hipodonadotropik hipogonadizm etiyolojisinde rol oynayan *GNRHR* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmiştir. Follikül gelişimi ve mitokondriyal dinamik ile ilişkili *BMP15*, tiroid dishormonogenezi ile ilişkili *DUOX2*, plasentasyon ve anjiyogenezde rol alan embriyonik gelişimde önemli *EGFR* genlerinde VUS varyantlar saptanmıştır.

4.1.35. Olgu-35-TGK Kadın Olgu

Olgu 35, İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na G6A6 gebelik öyküsü ile başvurmuştur. Olgu 46 yaşındadır, ilk gebelik yaşı 24'dür. Olgunun eşi 55 yaşındadır ve aralarında akrabalık bulunmamaktadır. Spontan olarak oluşan gebelikleri ve bir adet başarısız YÜT denemesi bulunmaktadır. Gebelik kaybı haftaları A1: 16. GH, A2-6: 8-9. GH'dır.

Olgu 35, Engin Tıbbi Ürünler / Berry Genomics tarafından Illumina NextSeq platformunda dizilenmiştir. Olgunun aile ağacı Şekil 4-35'de ve TED analizi sonucunda tespit edilen varyantlar Tablo 4-35'de sunulmuştur.



Şekil 4-35: TGK-35 kadın olgunun aile ağacı (Berkay, 2020)

Tablo 4-35: TGK-35 kadın olgunun TED analizinde saptanan ve TGK ile ilişkili olabilecek varyantlar

Gen (Transkript)	Zigosite	Kalıtım modeli	Varyant, Korunmuşluk Skoru (phyloP100)	dbSNP rs no	Varyant sınıfı
VPS13B (NM_152564.5)	Het	Bilinmiyor	VPS13B:c.11158G>T (p.Glu3720*) stop kodon phyloP100: 7.47	rs: -	Patojenik: ACMG/PVS1,PM2, PP5 Patojenik: MT, DANN, BayesDel

ATPAF2 (NM_145691.4)	Het	AR	ATPAF2:c.281G>A (p.Trp94*) stop kodon pyhloP100: 7.86	rs969905724	Olası Patojenik: ACMG/PVS1, PM2 Patojenik: MT, DANN, BayesDel
CRYBB2 (NM_000496.3)	Het	Bilinmiyor	CRYBB2:c.22C>T (p.Gln8*) stop kodon phyloP100: 4.38	rs: -	Olası Patojenik: PVS1, PM2
SETMAR (NM_006515.4)	Het	Bilinmiyor	SETMAR:c.869G>C (p.Gly290Ala) yanlış anlamlı phyloP100: 6.36	rs: -	VUS: ACMG/PP3,PM2 Patojenik: Revel, MT, FATHMM, DANN, MetaLR, BayesDel
*MCM2** (NM_004526.4)	Het	Bilinmiyor	MCM2:c.1670C>G (p.Thr557Arg) yanlış anlamlı phyloP100: 7.81	rs: -	VUS: ACMG/PM2,PP3 Patojenik: Revel, AlphaMissense, Eve, MutationAssesor, SIFT, MT, DANN, PrimateAI, BayesDel
RASGEF1B (NM_152545.3)	Het	Bilinmiyor	RASGEF1B:c.613G>T (p.Asp205Tyr) yanlış anlamlı phyloP100: 7.57	rs: -	VUS: ACMG/PM2 Patojenik: MutationAssesor, DANN, PrimateAI, BayesDel

* İşaretli gen varyantı önceki tez araştırması (Berkay, 2020) kapsamında saptanmış olup bu tez ile gerçekleştirilen yeniden analizde de tespit edilmiştir.

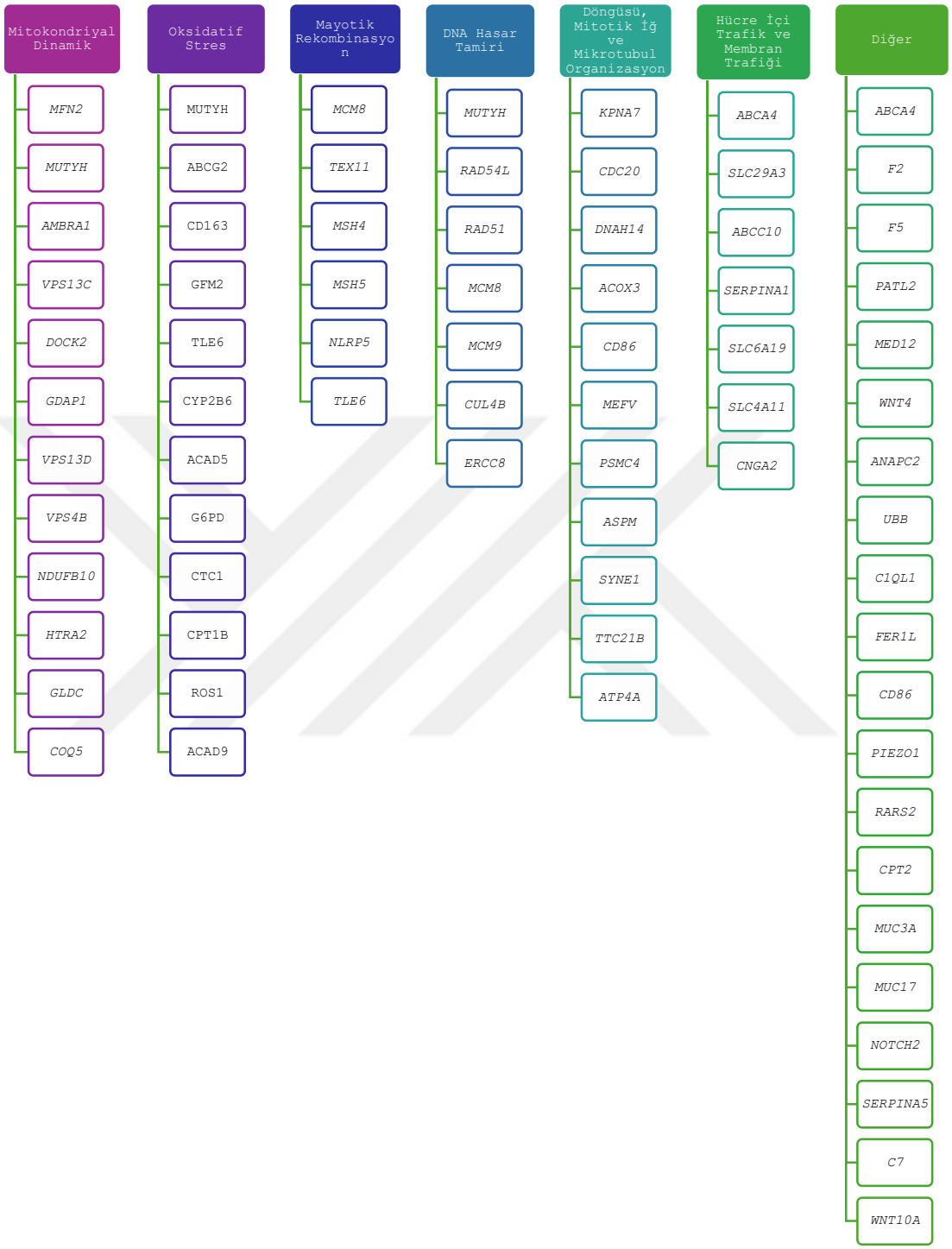
Antifosfolipid sendromu ile ilişkili tekrarlayan gebelik kaybı ve trombositopeniye sebep olabilen *VPS13B* geninde ACMG kriterlerine göre *novel* patojenik varyant saptanmıştır.

Mitokondriyal ATP sentezi ile ilişkili *ATPAF2* geninde ve farelerde yumurtalık ve follikül yapısını etkileyen *CRYBB2* geninde ACMG kriterlerine göre olası patojenik *novel* varyant saptanmıştır.

DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görevli *SETMAR* geninde, desidualizasyonda ve progesteron salınımında görevli *MCM2* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan *novel* varyant tespit edilmiştir.

Pan ve ark. tarafından, tekrarlayan gebelik kayıplarında desidual doğal öldürücü hücrelerin (dNK) polarizasyon bozukluklarının incelendiği araştırmada (Pan et al., 2022), maternal-fetal arayüzde immun toleransı sağlayan desidual natural killer hücrelerin (dNK) dağılımının TGK'da önemli olduğu ve *RASGEF1B* geninin doğal öldürücü hücrelerin immun toleransında rol alarak TGK'yı etkileyebileceği tespit edilmiştir. *RASGEF1B* geninde ACMG kriterlerine göre VUS, *in silico* tahmin araçlarında zarar verici olarak sınıflandırılan *novel* varyant tespit edilmiştir.

4.2. Varyant Analizinde Tespit Edilen Gen Varyantlarının Sınıflandırılması



5. TARTIŞMA

İnfertilite, tüm dünyada üreme çağındaki çiftlerin %12,6'sını etkileyen yaygın bir sorundur ve %50'si genetik nedenlerden kaynaklanmaktadır. Bununla beraber ilişkili moleküler mekanizmalar henüz kesin olarak tanımlanmış değildir. Primer infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarının (sekonder infertilite) altında yatan genetik etiyolojinin açıklanmasının tanı ve tedavi sürecine sağlayacağı katkının yanı sıra toplumsal ve sosyolojik açıdan aileler ve anne adayı üzerine etkileri önemlidir

MFN2 geni, mitkondriyal füzyon sürecine aracılık ederek mitokondriyal dinamiğin düzenlenmesinde önemli rol oymaktadır. Tekrarlayan gebelik kayıplarında ve primer infertilitede çeşitli mekanizmalar üzerinden etki etmektedir. *MFN2'nin* primer infertilitedeki rolü incelendiğinde, farelerde *MFN2* gen mutasyonlarının telomer kısalmasına ve apoptoza rol açarak üreme yaşlanmasına neden olduğu ve oosit kalitesindeki bozulma sonucunda folliküler deplesyonun hızlandığı anlaşılmıştır. *MFN2* geninin işlevindeki bozulma sonucunda mitokondrilerin ooplazma içerisinde kümelendiği, iğ ipliklerinin oluşumunda ve kromozomal hizalanmada düzenlensizlikler olduğu saptanmıştır. *MFN2* geninin artan ekspresyonunda ise iğ ipliklerini çevreleyen mitokondrilerde artış olduğu ve kromozom segregasyonunun olumsuz etkilenmesi sonucunda mayoz gelişimde duraklamaya neden olduğu anlaşılmıştır. *MFN2* geninin tekrarlayan gebelik kayıplarındaki rolü incelendiğinde insan trofoblastik hücrelerinde MFN2 protein seviyelerindeki azalma sonucunda otofajinin tetiklendiği, embriyo kalitesinin bozulduğu ve erken gebelik kayıplarının meydana geldiği tespit edilmiştir.

Tez kapsamında ele alınan olgu grubundaki her birey ve çift için primer infertilite veya tekrarlayan gebelik kaybına neden olan faktörlerin değişkenlik gösterdiği ve çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkili kompleks bir yapıda olduğu görülmüştür. Faktörler her birey için son derece çeşitli ve kişiye özel olmakla birlikte, üreme sistemi dışında immünolojik, endokrin, hemotolojik ve nörolojik süreçlerle ilişkili genlerde de patojenik varyantlar tespit edilmiştir. Tespit edilen gen varyantları dahil oldukları yolaklar ve biyolojik süreçler açısından incelendiğinde mitokondriyal dinamik, oksidatif stres, mayotik rekombinasyon, DNA tamiri, mitotik hücre döngüsü, hücre trafiği ile ilgili olan yedi ana grupta sınıflandığı belirlenmiştir. Olgu grubu içerisinde primer infertilitesi olan bireylerin sayısı az olduğundan (n=3) tez kapsamında tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili

varyantlar daha detaylı yorumlanabilmiştir. Ancak, her iki olgu grubunun analizlerinde saptanan varyantların farklı hücresel süreçlerle ilişkili ve oldukça heterojen yapıda olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde kadın infertilitesi konusunda *MFN2* geni ve ilişkili yolaktaki diğer gen varyantlarının araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Tez kapsamında gerçekleştirilen varyant analizlerinde TGK-2 olarak adlandırılan olguda, *MFN2* gen yolağı ile ilişkili olarak belirlenen birincil gen listesinde yer alan *MFN2*'ye ek olarak, *MFN1, VPS13C, AMBRA1, UBB* gibi MFN2 ile gen-gen etkileşimi olan mitokondriyal dinamik ilişkili yolak genlerinde VUS ve patojenik olarak sınıflandırılan birden çok gen varyantı tespit edilmiştir. Olguda G14P1A13 tekrarlayan gebelik kaybı fenotipinin oluşumunda mitokondriyal dinamik ilişkili yolakta yer alan bu dört gendeki heterozigot varyantların birleşik etkisinin rol oynayabileceği olabileceği düşünülmüştür.

Belirlenen sınıflandırma içerisinde *MUTYH* geni, birden fazla yolak ve süreçlerle ilişkisi olan genlerden biridir ve bu genin farklı patojenik varyantları üç hastada heterozigot formda saptanmıştır. Patojenik MUTYH gen varyantı için taşıyıcı olan olguların hepsi sekonder infertilite sınıfında değerlendirilen tekrarlayan gebelik kaybı endikasyonu olan kişilerdir. *MUTYH* geni, bakterilerden memelilere kadar farklı organizma sınıflarında evrimsel olarak korunmuş bir gendir ve genom stabilitesinin korunmasında temel işlevlere sahiptir. *MUTYH* geni oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu genin patojenik varyantlarının insanlık tarihinin yakın dönemlerinde ortaya çıktığını ve bir bölümünün Neandertallerden miras kaldığını gösteren araştırmalara rastlanmıştır (Xiao et al., 2023). *MUTYH* geni oksidatif stres ile ilişkili olmakla birlikte guanin oksidasyonundan kaynaklanan oksidatif stres sonucunda hasar gören DNA'da baz eksizyon tamir (BER) mekanizmasında ve replikasyon hatalarının tamirinde önemli rol oynamaktadır. Bu gende meydana gelen fonksiyon bozuklukları sonucunda oksidatif stres birikimi veya hasarın tamir edilememesi nedeniyle mitokondri yapısının değiştiği ve mitokondriyal füzyonda görevli *MFN2*'nin azalacak şekilde düzenlenmesi (*down-regulation*) sonucunda mitokondriyal fonksiyonun bozulduğu gösterilmiştir (Chen et al., 2022). *MUTYH* geni, 7,8-dihidro-8-oksoguanin (8-oksoG) çiftlerinde yanlış eşleşen adenin nükleotidinin ortadan kaldırılmasını ve Guanin → Sitozin ve Timin → Adenin baz dönüşümlerinin indüklenmesinde görevli bir adenin DNA glikosilazıdır ve kolorektal kanserlerle

ilişkilendirilmiş olsa da oksidatif stres sonucunda meydana gelen DNA hasarıyla ilişkili kanser ve kanser dışı patolojilerde rol alabileceği üzerinde durulmuştur (Curia et al., 2020). Sistemik ve plasental oksidatif stresin TGK etiyopatogenezinde de rol oynadığı bilinmektedir (Davies et al., 2023, Zejnullahu et al., 2021). *MUTYH* geninin; oksidatif stres, DNA tamir sistemi ve mitokondriyal dinamik süreçlerinde birbiri ile bağlantılı olarak rol oynaması ve kadın olguların %8.57'sinde (n=3) patojenik, olası patojenik formda tespit edilmesi, aynı zamanda yüksek oranda korunmuş bir gen olması nedeniyle tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisinde önemli bir aday gen olabileceği düşünülmüştür. *MUTYH* dışında oksidatif stres ile ilişkili olan *G6PD, GFM2, TLE6, CYP2B6, CD163, ABCG2, CTC1, CPT1B, ROS1, ACAD5* ve *ACAD9* genlerinde de VUS / patojenik varyantlar tespit edilmiştir.

Mitokondriyal disfonksiyon enerji üretiminde kayıplara, yağ asidi birikimine ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine, membran stabilitesinde bozulmalara ve glikoz metabolizmasında bozukluklara yol açmaktadır. Mitokondriyal fonksiyonda önemli rolü olan bileşenlerden biri de L-karnitindir. L-karnitin, yağ asitlerinin oksidasyonu yoluyla enerji üretimini sağlar. Ayrıca, toksik matabolitlerin ortadan kaldırılmasında rol oynar ve antioksidan aktivite gösterir. Karnitin, lizin ve metiyonin aminoasitlerinin birleşiminden oluşan esansiyel olmayan bir aminoasittir. Karninin, D-karnitin formunda toksik etki gösterir ve L-karnitini inhibe eder. L-karnitin ise vücutta aktif olarak depolanan ve üretilen formudur. Karnitin mitokondriyel süreçlerde, yağ asidi metabolizmasında ve ATP üretimi için kritik öneme sahiptir. Kan şekeri homeostazı, böbrek hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve mitokondriyal bozukluklarla ilişkili olan karnitinin tekrarlayan gebelik kayıplarında ve infertilitede rol oynadığı öne sürülmüştür. Tez araştırması kapsamında karnitin ile ilişkili *CPT2, TMLHE, ACOX3, CPT1B* genlerinde VUS/patojenik varyantlar tespit edilmesinin karnitin biyogenezi ve oksidasyonu kusurlarının mitokondriyal disfonksiyona neden olarak tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisinde rol oynayabileceğini göstermiştir.

Sınıflandırmada altı ana grubun dışında kalan ve diğer başlığı altında yer alan *ABCA4* genindeki varyantlar, tekrarlayan gebelik kaybı olan 5 olguda (Olgu 1-TGK, Olgu 4-TGK, Olgu 5-TGK, Olgu 17-TGK ve Olgu 30-TGK) heterozigot olarak tespit edilmiştir. *ABCA4* geni, retinaya özgü ışık reseptörü hücrelerinde ekspresyonu olan ABC taşıyıcısını kodlamaktadır. Bu genin makula denejerasyonu ile ilişkili Stargardt

hastalığında ve retinopatilerde rolü olduğu bilinmektedir. Ayrıca dudak-damak yarığı ve kraniyofasiyal gelişimde rolü olduğu belirtilmektedir (Gourhant et al., 2021). Intrauterin adezyonlar ve folik asit tüketimi mekanizmaları üzerinden tekrarlayan gebelik kayıplarında da rol oynayabileceğine değinilmiştir (Gourhant et al., 2021). *ABCA4* geninin tekrarlayan gebelik kaybına etkisi konusunda mevcut literatürdeki çalışmalar sınırlı olmakla birlikte (Srivastava et al., 2023, Gourhant et al., 2021, Cao et al., 2022) kendi olgu grubumuzdaki kadın hastaların %14.28'inde tespit edilmiştir. İleride gerçekleştirilecek çalışmalarla birlikte TGK etiyolojisinde rolü daha iyi anlaşılabilecektir.

Mitokondriyal dinamik ile ilişkili yolaklar ve genler bu tezin ana hipotezinde yer alsa da analizlerde tespit edilen ve belirlenen sınıflandırma içerisinde birden fazla yolak ve süreçle ilişkisi olan genler de mevcuttur. Özellikle bazı olgularda, yolaklarına ve işlevlerine göre sınıflandırılan genler iç içe geçmiş durumdadır ve yolak içi genlere ait heterozigot varyantların bir olguda daha yoğun olarak yığılım gösterdiği saptanmıştır. Olgularda benzer fenotip ile ilişkili birden fazla patojenik, olası patojenik ve VUS gen varyantının heterozigot formda birlikteliğinin potansiyel hastalık ilişkilerini açıklamada önemli olabileceği düşünülmektedir. Genel olarak, resesif kalıtıma sahip hastalıklarda heterozigot varyant taşıyıcılarının klinik bulgu göstermediği varsayılmaktadır (Kalyta et al., 2023). Ancak, nadir olarak bazı hastalıklar için heterozigot olarak da klinik bulgulara etki gösterebildiği belirtilmektedir (Kalyta et al., 2023). Tez kapsamında tespit edilen ve benzer yolaklarda bulunan veya benzer fonksiyonlarla ilişkili VUS, patojenik ve olası patojenik formdaki birden fazla heterozigot gen varyantının fenotip üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

İnfertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarında olduğu gibi klinik bulgu ile ilişkili olan nadir varyantların araştırıldığı çalışmalarda WES verilerini analiz etmek ve yorumlamak için özel filtrelerin uygulanması önemlidir. Tez kapsamında nadir varyantların tespiti için Gnomad populasyon veritabanında allel frekansı 0,005'ten küçük olan varyantlar filtrelenmiştir. Benign ve olası benign varyantlar filtrelemelerde dışlanmıştır. Ayrıca okuma hatasından kaynaklı olarak kendi kohortumuz içinde sık görülen varyantları dışlamak için kohort filtresi eklenmiştir. Araştırılan genlerin bir kısmında kalıtım şekli bilinmediğinden hem homozigot hem de heterozigot varyantların incelenemesi için filtre uygulanmamıştır. Bu filtreler sonucunda G4A4 gebelik kaybı olan Olgu-4-TGK'da *F2* (coagulation factor II, thrombin) geninde trombofili paneli

kapsamında tespit edilemeyen ve rutin taramalarda yer almayan novel bir varyant tespit edilmiştir. Bu gendeki varyantların tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili ve otozomal dominat kalıtım biçimine sahip olduğu ancak trombofili panelinde, hastanın ilk değerlendirmesinde toplumda sık görülen gen varyantlarının rutin olarak taranması nedeniyle tespit edilemediği belirlenmiştir. Tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkisi bilinen ancak trombofili panelinde tespit edilemeyen bu nadir varyantın olgudaki TGK etiyolojisinin açıklanmasına katkı sağladığı görülmüştür. Bu bulgu, analiz ve yorumlama için olgu grubuna özel olarak uygun filtrelemenin önemini vurgulamaktadır.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular sonucunda dikkati çeken noktalardan birisi de verilerin yeniden analizinin önemi olmuştur. Genomik dizilemeler sonucunda saptanan varyantların yeniden analizinin hastanın kliniğini aydınlatmada önemli olduğu bilinmektedir. Genetik alanındaki ilerlemeler ve veri artış hızı düşünüldüğünde yeniden analizin belirli aralıklarla ve standart yöntemlerle tekrar edilen bir süreç haline getirilmesi tanı koyulamamış hastaların tanı almasında ve daha önce saptanan gen varyantlarının yeniden değerlendirilmesi konusunda önemli sonuçlar sağlama potansiyeline sahiptir. Bu araştırmadaki yeniden analiz kapsamında, önceki doktora ve uzmanlık tezlerinde kadın ve erkek olgularda WES analizi yapılarak infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı açısından ele alınan olgular hem bireysel hem de birlikte karşılaştırmalı olarak analiz edilerek ele alınmıştır. Geçen sürede primer infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı ilişkili yeni genler ve varyantların patojenite sınıflaması açısından güncel statüsü dikkate alınarak veriler incelendiğinde olgularda daha önce tespit edilmiş olan VUS/patojenik varyantların bir kısmının benign veya olası benign olarak güncellendiği görülmüştür. Yeniden analizlerde, üreme ile ilişkili gen varyantlarının genel bir yaklaşımla analizinin yanı sıra spesifik olarak mitokondriyal dinamiği etkileyen genlerin de analiz edilmesi önemli olmuştur. Bu yönüyle hem mitokondriye spesifik analiz edilmesi hem de çiftlerin birlikte de değerlendirilmesi ile daha önceki çalışmalarda yapılan analizleri tamamlayan bir araştırma olmuştur. Bu analizlerin sonucunda olguların %37,77'sinde mitokondriyal dinamiği etkileyen gen varyantları tespit edilmiştir. Kadın infertilitesine yönelik olarak bir kadın olguda (%2,85) *MFN2* geni ve ilişkili diğer yolak genlerinde VUS/patojenik varyant tespit edilmiştir. Gelişen veri analizi yöntemleri ve güncel verilerden yararlanılarak çözümsüz kalan olguların yeni yaklaşımlarla tekrar analiz edilmesi kliniğin açıklanması açısından önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması sonucunda mitokondriyal dinamik ile ilişkili genlerin özellikle tekrarlayan düşük olgularındaki potansiyel rolünün açılanmasında önemli bulgular elde edilmiştir. Ancak, tespit edilen varyantların aile içi segregasyonlarının yapılması, daha büyük bir populasyonda karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi ve fonksiyonel çalışmalar ile ilişkilerinin daha detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

ACKERMAN, K. E., PATEL, K. T., GUERECA, G., PIERCE, L., HERZOG, D. B. & MISRA, M. 2013. Cortisol secretory parameters in young exercisers in relation to LH secretion and bone parameters. *Clin Endocrinol (Oxf),* 78**,** 114-9.

ACTON, B. M., JURISICOVA, A., JURISICA, I. & CASPER, R. F. 2004. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod,* 10**,** 23-32.

ADZHUBEI, I., JORDAN, D. M. & SUNYAEV, S. R. 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current protocols in human genetics,* 76**,** 7.20. 1-7.20. 41.

ALIJOTAS-REIG, J. & GARRIDO-GIMENEZ, C. 2013. Current concepts and new trends in the diagnosis and management of recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Surv,* 68**,** 445-66.

AN, S. M., KWON, S., HWANG, J. H., YU, G. E., KANG, D. G., PARK, D. H., KIM, T. W., PARK, H. C., HA, J. & KIM, C. W. 2019. Hypomethylation in the promoter region of ZPBP as a potential litter size indicator in Berkshire pigs. *Arch Anim Breed,* 62**,** 69-76.

ANDREWS, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Cambridge, United Kingdom.

BAKER, T. G. 1971. Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female. *Am J Obstet Gynecol,* 110**,** 746-61.

BARBITOFF, Y. A., ABASOV, R., TVOROGOVA, V. E., GLOTOV, A. S. & PREDEUS, A. V. 2022. Systematic benchmark of state-of-the-art variant calling pipelines identifies major factors affecting accuracy of coding sequence variant discovery. *BMC Genomics,* 23**,** 155.

BERKAY, E. G. 2020. *Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde İlişkili Tek Gen Mutasyonlarının Araştırılması.* Doktora Tezi, İstanbul Universitesi.

BERKAY, E. G., KARAMAN, B., UYGUNER, Z.O., BASARAN, S. 2023. A case report of a rare nonsense *ZP1* variant in a patient with oocyte maturation defect. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine,* 86-3,264.

BOIVIN, J., BUNTING, L., COLLINS, J. A. & NYGREN, K. G. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod,* 22**,** 1506-12.

BORUTAITE, V. 2010. Mitochondria as decision-makers in cell death. *Environ Mol Mutagen,* 51**,** 406-16.

BROEKMANS, F. J., SOULES, M. R. & FAUSER, B. C. 2009. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev,* 30**,** 465-93.

BROSENS, I., GORDTS, S., PUTTEMANS, P., CAMPO, R., GORDTS, S. & BROSENS, J. 2006. Managing infertility with fertility-awareness methods. *Sexuality, Reproduction and Menopause,* 4**,** 13-16.

CAI, H., CHEN, L., ZHANG, M., XIANG, W. & SU, P. 2018. Low expression of MFN2 is associated with early unexplained miscarriage by regulating autophagy of trophoblast cells. *Placenta,* 70**,** 34-40.

CAO, C., BAI, S., ZHANG, J., SUN, X., MENG, A. & CHEN, H. 2022. Understanding recurrent pregnancy loss: recent advances on its etiology, clinical diagnosis, and management. *Med Rev (2021),* 2**,** 570-589.

CHAN, D. C. 2012. Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annual Review of Genetics, Vol 46,* 46**,** 265-287.

CHEN, B., LONGTINE, M. S. & NELSON, D. M. 2012. Hypoxia induces autophagy in primary human trophoblasts. *Endocrinology,* 153**,** 4946-54.

CHEN, H. C. & CHAN, D. C. 2017. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metabolism,* 26**,** 39-48.

CHEN, J., WU, X., WANG, Y., PAN, Y., REN, Y., NAKABEPPU, Y., FAN, Y. & WANG, Y. 2022. Mutyh deficiency downregulates mitochondrial fusion proteins and causes cardiac dysfunction via alpha-ketoglutaric acid reduction with oxidative stress. *Free Radic Res,* 56**,** 129-142.

CHOI, Y. & CHAN, A. P. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics,* 31**,** 2745-7.

CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J. & MCGEHEE, M. R. 2019. *Molecular biology,* London, United Kingdom, Academic Press, an imprint of Elsevier.

CURIA, M. C., CATALANO, T. & ACETO, G. M. 2020. MUTYH: Not just polyposis. *World J Clin Oncol,* 11**,** 428-449.

DANECEK, P., BONFIELD, J. K., LIDDLE, J., MARSHALL, J., OHAN, V., POLLARD, M. O., WHITWHAM, A., KEANE, T., MCCARTHY, S. A., DAVIES, R. M. & LI, H. 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience,* 10.

DAVIES, R., JAYASENA, C. N., RAI, R. & MINHAS, S. 2023. The Role of Seminal Oxidative Stress in Recurrent Pregnancy Loss. *Antioxidants (Basel),* 12.

DAYHOFF, M. O. 1965. *Atlas of protein sequence and structure,* Silver Spring Md., National Biomedical Research Foundation.

DEMAIN, L. A., CONWAY, G. S. & NEWMAN, W. G. 2017. Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility. *Clin Genet,* 91**,** 199-207.

DEONATH, A. 2021. Evolution of eukaryotes as a story of survival and growth of mitochondrial DNA over two billion years. *Biosystems,* 206.

DI RITA, A., PESCHIAROLI, A., P, D. A., STROBBE, D., HU, Z., GRUBER, J., NYGAARD, M., LAMBRUGHI, M., MELINO, G., PAPALEO, E., DENGJEL, J., EL ALAOUI, S., CAMPANELLA, M., DOTSCH, V., ROGOV, V. V., STRAPPAZZON, F. & CECCONI, F. 2018. HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKKalpha. *Nat Commun,* 9**,** 3755.

DIMITRIADIS, E., MENKHORST, E., SAITO, S., KUTTEH, W. H. & BROSENS, J. J. 2020. Recurrent pregnancy loss. *Nat Rev Dis Primers,* 6**,** 98.

DONG, C., WEI, P., JIAN, X., GIBBS, R., BOERWINKLE, E., WANG, K. & LIU, X. 2015. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet,* 24**,** 2125-37.

DUNSON, D. B., BAIRD, D. D. & COLOMBO, B. 2004. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol,* 103**,** 51-6.

DURMAZ, D. 2024. *Konjenital Böbrek ve Üriner Sistem Anomalilerinde Genetik Etiyolojinin Araştırılması.* Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi.

FAELBER, K., GAO, S., HELD, M., POSOR, Y., HAUCKE, V., NOE, F. & DAUMKE, O. 2013. Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci,* 117**,** 411-43.

FAUSER, B. C. & VAN HEUSDEN, A. M. 1997. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev,* 18**,** 71-106.

FENG, B. J. 2017. PERCH: A Unified Framework for Disease Gene Prioritization. *Hum Mutat,* 38**,** 243-251.

FRANCO, A., KITSIS, R. N., FLEISCHER, J. A., GAVATHIOTIS, E., KORNFELD, O. S., GONG, G., BIRIS, N., BENZ, A., QVIT, N., DONNELLY, S. K., CHEN, Y., MENNERICK, S., HODGSON, L., MOCHLY-ROSEN, D. & DORN, G. W., II 2016. Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature,* 540**,** 74-79.

GALLUZZI, L., KEPP, O., TROJEL-HANSEN, C. & KROEMER, G. 2012. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res,* 111**,** 1198-207.

GARRIDO-GIMENEZ, C. & ALIJOTAS-REIG, J. 2015. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. *Postgrad Med J,* 91**,** 151-62.

GASCA, S., PELLESTOR, F., ASSOU, S., LOUP, V., ANAHORY, T., DECHAUD, H., DE VOS, J. & HAMAMAH, S. 2007. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online,* 14**,** 175-83.

GOODWIN, S., MCPHERSON, J. D. & MCCOMBIE, W. R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet,* 17**,** 333-51.

GOURHANT, L., BOCHER, O., DE SAINT MARTIN, L., LUDWIG, T. E., BOLAND, A., DELEUZE, J. F., MERVIEL, P., DUPRÉ, P. F., LEMARIÉ, C. A., COUTURAUD, F., LE MARÉCHAL, C., GÉNIN, E. & PASQUIER, E. 2021. Whole exome sequencing, a hypothesis-free approach to investigate recurrent early miscarriage. *Reproductive BioMedicine Online,* 42**,** 789-798.

GREEN, A., HOSSAIN, T. & ECKMANN, D. M. 2022. Mitochondrial dynamics involves molecular and mechanical events in motility, fusion and fission. *Front Cell Dev Biol,* 10**,** 1010232.

GRIMBIZIS, G. F., CAMUS, M., TARLATZIS, B. C., BONTIS, J. N. & DEVROEY, P. 2001. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update,* 7**,** 161-74.

HABBANE, M., MONTOYA, J., RHOUDA, T., SBAOUI, Y., RADALLAH, D. & EMPERADOR, S. 2021. Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicines,* 9.

HAGEMANN, I. S. 2015. Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. *Clinical Genomics.*

HEMPSTOCK, J., JAUNIAUX, E., GREENWOLD, N. & BURTON, G. J. 2003. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol,* 34**,** 1265-75.

HESPER, B. & HOGEWEG, P. 1970. Bioinformatica: een werkconcept. *Kameleon,* 1**,** 28-29.

HOLLAND, O., DEKKER NITERT, M., GALLO, L. A., VEJZOVIC, M., FISHER, J. J. & PERKINS, A. V. 2017. Review: Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. *Placenta,* 54**,** 2-9.

HOWE, G., WESTHOFF, C., VESSEY, M. & YEATES, D. 1985. Effects of age, cigarette smoking, and other factors on fertility: findings in a large prospective study. *Br Med J (Clin Res Ed),* 290**,** 1697-700.

HU, T. S., CHITNIS, N., MONOS, D. & DINH, A. 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology,* 82**,** 801-811.

HU, X. Q. & ZHANG, L. 2022. Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep,* 24**,** 157-172.

HULL, M. G. 1987. Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol Endocrinol,* 1**,** 235-45.

HUNG-YU LIN, S.-W. W., YEN-HSIANG CHANG, YU-JIH SU, CHIH-MIN CHANG, CHIA-JEN TSAI, FENG-CHIH SHEN, JIIN-HAUR CHUANG, TSU-KUNG LIN, CHIA-WEI LIOU, CHING-YI LIN, PEI-WEN WANG 2018. The Causal Role of Mitochondrial Dynamics in Regulating Insulin Resistance in Diabetes: Link through Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

IMAM, S. N., SHAMSI, M. B., KUMAR, K., DEKA, D. & DADA, R. 2011. Idiopathic recurrent pregnancy loss: role of paternal factors; a pilot study. *J Reprod Infertil,* 12**,** 267-76.

INSTITUTE, B. 2019. Picard Toolkit. 3.1.0 ed. Broad Institute, Github Repository: Broad Institute.

IOANNIDIS, N. M., ROTHSTEIN, J. H., PEJAVER, V., MIDDHA, S., MCDONNELL, S. K., BAHETI, S., MUSOLF, A., LI, Q., HOLZINGER, E., KARYADI, D., CANNON-ALBRIGHT, L. A., TEERLINK, C. C., STANFORD, J. L., ISAACS,

W. B., XU, J., COONEY, K. A., LANGE, E. M., SCHLEUTKER, J., CARPTEN, J. D., POWELL, I. J., CUSSENOT, O., CANCEL-TASSIN, G., GILES, G. G., MACINNIS, R. J., MAIER, C., HSIEH, C. L., WIKLUND, F., CATALONA, W. J., FOULKES, W. D., MANDAL, D., EELES, R. A., KOTE-JARAI, Z., BUSTAMANTE, C. D., SCHAID, D. J., HASTIE, T., OSTRANDER, E. A., BAILEY-WILSON, J. E., RADIVOJAC, P., THIBODEAU, S. N., WHITTEMORE, A. S. & SIEH, W. 2016. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet,* 99**,** 877-885.

JELIN, A. C. & VORA, N. 2018. Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics. *Obstet Gynecol Clin North Am,* 45**,** 69-81.

JURKOVIC, D., OVERTON, C. & BENDER-ATIK, R. 2013. Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *BMJ,* 346**,** f3676.

KALE, H. 2021. *Sebebi Açıklanamayan Erkek İnfertilitesinin Açıklanmasına Tüm Ekzom Analizlerinin Katkısı.* Tıpta Uzmanlık Tezi, Istanbul Üniversitesi.

KALPAGE, H. A., BAZYLIANSKA, V., RECANATI, M. A., FITE, A., LIU, J., WAN, J., MANTENA, N., MALEK, M. H., PODGORSKI, I., HEATH, E. I., VAISHNAV, A., EDWARDS, B. F., GROSSMAN, L. I., SANDERSON, T. H., LEE, I. & HUTTEMANN, M. 2019. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB J,* 33**,** 1540-1553.

KALYTA, K., STELMASZCZYK, W., SZCZESNIAK, D., KOTULA, L., DOBOSZ, P. & MROCZEK, M. 2023. The Spectrum of the Heterozygous Effect in Biallelic Mendelian Diseases-The Symptomatic Heterozygote Issue. *Genes (Basel),* 14.

KARCZEWSKI, K. J., FRANCIOLI, L. C., TIAO, G., CUMMINGS, B. B., ALFÖLDI, J., WANG, Q., COLLINS, R. L., LARICCHIA, K. M., GANNA, A., BIRNBAUM, D. P., GAUTHIER, L. D., BRAND, H., SOLOMONSON, M., WATTS, N. A., RHODES, D., SINGER-BERK, M., ENGLAND, E. M., SEABY, E. G., KOSMICKI, J. A., WALTERS, R. K., TASHMAN, K., FARJOUN, Y., BANKS, E., POTERBA, T., WANG, A., SEED, C., WHIFFIN, N., CHONG, J. X., SAMOCHA, K. E., PIERCE-HOFFMAN, E., ZAPPALA, Z., O'DONNELL-LURIA, A. H., MINIKEL, E. V., WEISBURD, B., LEK, M., WARE, J. S., VITTAL, C., ARMEAN, I. M., BERGELSON, L., CIBULSKIS, K.,

CONNOLLY, K. M., COVARRUBIAS, M., DONNELLY, S., FERRIERA, S., GABRIEL, S., GENTRY, J., GUPTA, N., JEANDET, T., KAPLAN, D., LLANWARNE, C., MUNSHI, R., NOVOD, S., PETRILLO, N., ROAZEN, D., RUANO-RUBIO, V., SALTZMAN, A., SCHLEICHER, M., SOTO, J., TIBBETTS, K., TOLONEN, C., WADE, G., TALKOWSKI, M. E., AGUILAR SALINAS, C. A., AHMAD, T., ALBERT, C. M., ARDISSINO, D., ATZMON, G., BARNARD, J., BEAUGERIE, L., BENJAMIN, E. J., BOEHNKE, M., BONNYCASTLE, L. L., BOTTINGER, E. P., BOWDEN, D. W., BOWN, M. J., CHAMBERS, J. C., CHAN, J. C., CHASMAN, D., CHO, J., CHUNG, M. K., COHEN, B., CORREA, A., DABELEA, D., DALY, M. J., DARBAR, D., DUGGIRALA, R., DUPUIS, J., ELLINOR, P. T., ELOSUA, R., ERDMANN, J., ESKO, T., FÄRKKILÄ, M., FLOREZ, J., FRANKE, A., GETZ, G., GLASER, B., GLATT, S. J., GOLDSTEIN, D., GONZALEZ, C., GROOP, L., et al. 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature,* 581**,** 434-443.

KAROLCHIK, D., HINRICHS, A. S. & KENT, W. J. 2012. The UCSC Genome Browser. *Curr Protoc Bioinformatics,* Chapter 1**,** 1 4 1-1 4 33.

KHAN, S. A., REED, L., SCHOOLCRAFT, W. B., YUAN, Y. & KRISHER, R. L. 2023. Control of mitochondrial integrity influences oocyte quality during reproductive aging. *Mol Hum Reprod,* 29.

KIMBER, S. J., SNEDDON, S. F., BLOOR, D. J., EL-BAREG, A. M., HAWKHEAD, J. A., METCALFE, A. D., HOUGHTON, F. D., LEESE, H. J., RUTHERFORD, A., LIEBERMAN, B. A. & BRISON, D. R. 2008. Expression of genes involved in early cell fate decisions in human embryos and their regulation by growth factors. *Reproduction,* 135**,** 635-47.

KOTIADIS, V. N., DUCHEN, M. R. & OSELLAME, L. D. 2014. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim Biophys Acta,* 1840**,** 1254-65.

KUMAR, P., HENIKOFF, S. & NG, P. C. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc,* 4**,** 1073-81.

LAWRENCE, T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 1**,** a001651.

LEWIS, M. R. & LEWIS, W. H. 1914. Mitochondria in Tissue Culture. *Science,* 39**,** 330-3.

LI, C., CHEN, X., LIU, X., LIU, X., HE, J., DING, Y., TONG, C., PENG, C., WANG, Y. & GAO, R. 2020. CircRNA expression profiles in decidual tissue of patients with early recurrent miscarriage. *Genes Dis,* 7**,** 414-423.

LI, C., ZHI, D., WANG, K. & LIU, X. 2022. MetaRNN: differentiating rare pathogenic and rare benign missense SNVs and InDels using deep learning. *Genome Med,* 14**,** 115.

LI, H., SLONE, J., FEI, L. & HUANG, T. 2019. Mitochondrial DNA Variants and Common Diseases: A Mathematical Model for the Diversity of Age-Related mtDNA Mutations. *Cells,* 8.

LIN, M., RODEH, O., PENN, J., BAI, X., KRASHENININA, O., SALERNO, W. & REID, J. 2018. *GLnexus: Joint variant calling for large cohort sequencing*.

LIU, L., TRIMARCHI, J. R., SMITH, P. J. & KEEFE, D. L. 2002. Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell,* 1**,** 40-6.

MADDIREVULA, S., AWARTANI, K., COSKUN, S., ALNAIM, L. F., IBRAHIM, N., ABDULWAHAB, F., HASHEM, M., ALHASSAN, S. & ALKURAYA, F. S. 2020. A genomics approach to females with infertility and recurrent pregnancy loss. *Hum Genet,* 139**,** 605-613.

MARGULIS, L. 1981. *Symbiosis in cell evolution : life and its environment on the early Earth*, San Francisco, W.H. Freeman.

MARTIN, W., RUJAN, T., RICHLY, E., HANSEN, A., CORNELSEN, S., LINS, T., LEISTER, D., STOEBE, B., HASEGAWA, M. & PENNY, D. 2002. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 99**,** 12246-51.

MARTINEZ, F., OLVERA-SANCHEZ, S., ESPARZA-PERUSQUIA, M., GOMEZ-CHANG, E. & FLORES-HERRERA, O. 2015. Multiple functions of syncytiotrophoblast mitochondria. *Steroids,* 103**,** 11-22.

MASCARENHAS, M. N., FLAXMAN, S. R., BOERMA, T., VANDERPOEL, S. & STEVENS, G. A. 2012. National, regional, and global trends in infertility

prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med,* 9**,** e1001356.

MIAO, J., CHEN, W., WANG, P., ZHANG, X., WANG, L., WANG, S. & WANG, Y. 2021. MFN1 and MFN2 Are Dispensable for Sperm Development and Functions in Mice. *Int J Mol Sci,* 22.

MILLER, W. L. 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol,* 379**,** 62-73.

MISHRA, P. & CHAN, D. C. 2014a. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 15**,** 634-646.

MISHRA, P. & CHAN, D. C. 2014b. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 15**,** 634-46.

MIZUSHIMA, N. & KOMATSU, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell,* 147**,** 728-41.

MORISSE, P., MARCHET, C., LIMASSET, A., LECROQ, T. & LEFEBVRE, A. 2021. Scalable long read self-correction and assembly polishing with multiple sequence alignment. *Scientific Reports,* 11.

NAJAFI, K., MEHRJOO, Z., ARDALANI, F., GHADERI-SOHI, S., KARIMINEJAD, A., KARIMINEJAD, R. & NAJMABADI, H. 2021. Identifying the causes of recurrent pregnancy loss in consanguineous couples using whole exome sequencing on the products of miscarriage with no chromosomal abnormalities. *Sci Rep,* 11**,** 6952.

NAKASHIMA, A., YAMANAKA-TATEMATSU, M., FUJITA, N., KOIZUMI, K., SHIMA, T., YOSHIDA, T., NIKAIDO, T., OKAMOTO, A., YOSHIMORI, T. & SAITO, S. 2013. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy,* 9**,** 303-16.

NELSON, L. M., ANASTI, J. N., KIMZEY, L. M., DEFENSOR, R. A., LIPETZ, K. J., WHITE, B. J., SHAWKER, T. H. & MERINO, M. J. 1994. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab,* 79**,** 1470-5.

NYBO ANDERSEN, A. M., WOHLFAHRT, J., CHRISTENS, P., OLSEN, J. & MELBYE, M. 2000. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ,* 320**,** 1708-12.

OLSON, N. D., WAGNER, J., DWARSHUIS, N., MIGA, K. H., SEDLAZECK, F. J., SALIT, M. & ZOOK, J. M. 2023. Variant calling and benchmarking in an era of complete human genome sequences. *Nature Reviews Genetics,* 24**,** 464-483.

PAN, D., LIU, Q., DU, L., YANG, Y. & JIANG, G. 2022. Polarization disorder of decidual NK cells in unexplained recurrent spontaneous abortion revealed by single-cell transcriptome analysis. *Reprod Biol Endocrinol,* 20**,** 108.

PEJAVER, V., BYRNE, A. B., FENG, B. J., PAGEL, K. A., MOONEY, S. D., KARCHIN, R., O'DONNELL-LURIA, A., HARRISON, S. M., TAVTIGIAN, S. V., GREENBLATT, M. S., BIESECKER, L. G., RADIVOJAC, P., BRENNER, S. E. & CLINGEN SEQUENCE VARIANT INTERPRETATION WORKING, G. 2022. Calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for PP3/BP4 criteria. *Am J Hum Genet,* 109**,** 2163-2177.

PEJAVER, V., URRESTI, J., LUGO-MARTINEZ, J., PAGEL, K. A., LIN, G. N., NAM, H.-J., MORT, M., COOPER, D. N., SEBAT, J., IAKOUCHEVA, L. M., MOONEY, S. D. & RADIVOJAC, P. 2020. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nature Communications,* 11**,** 5918.

PERALTA, S., WANG, X. & MORAES, C. T. 2012. Mitochondrial transcription: lessons from mouse models. *Biochim Biophys Acta,* 1819**,** 961-9.

PERKINS, R. B., HALL, J. E. & MARTIN, K. A. 1999. Neuroendocrine Abnormalities in Hypothalamic Amenorrhea: Spectrum, Stability, and Response to Neurotransmitter Modulation1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 84**,** 1905-1911.

POPLIN, R., CHANG, P. C., ALEXANDER, D., SCHWARTZ, S., COLTHURST, T., KU, A., NEWBURGER, D., DIJAMCO, J., NGUYEN, N., AFSHAR, P. T., GROSS, S. S., DORFMAN, L., MCLEAN, C. Y. & DEPRISTO, M. A. 2018. A universal SNP and small-indel variant caller using deep neural networks. *Nat Biotechnol,* 36**,** 983-987.

PRAEFCKE, G. J. & MCMAHON, H. T. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol,* 5**,** 133-47.

QIAO, Y., WEN, J., TANG, F., MARTELL, S., SHOMER, N., LEUNG, P. C., STEPHENSON, M. D. & RAJCAN-SEPAROVIC, E. 2016. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod,* 22**,** 364-72.

QUANG, D., CHEN, Y. & XIE, X. 2015. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics,* 31**,** 761-3.

QUINTERO-RONDEROS, P. & LAISSUE, P. 2019. Genetic Variants Contributing to Early Recurrent Pregnancy Loss Etiology Identified by Sequencing Approaches. *Reprod Sci***,** 1933719119831769.

QUINTERO-RONDEROS, P., MERCIER, E., FUKUDA, M., GONZALEZ, R., SUAREZ, C. F., PATARROYO, M. A., VAIMAN, D., GRIS, J. C. & LAISSUE, P. 2017. Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PLoS One,* 12**,** e0186149.

RAIMONDI, D., TANYALCIN, I., FERTE, J., GAZZO, A., ORLANDO, G., LENAERTS, T., ROOMAN, M. & VRANKEN, W. 2017. DEOGEN2: prediction and interactive visualization of single amino acid variant deleteriousness in human proteins. *Nucleic Acids Res,* 45**,** W201-W206.

RAMIREZ-CORONEL, A. A., ROSTAMI, A., YOUNUS, L. A., ARIAS GONZALES, J. L., LAFTA, M. H., AMIN, A. H., SAADOON, M. A., SALMAN, H. M., BAHRAMI, A., FEILEI, R. & AKHAVAN-SIGARI, R. 2023. Designing Effective Multi-Target Drugs and Identifying Biomarkers in Recurrent Pregnancy Loss (RPL) Using In Vivo, In Vitro, and In Silico Approaches. *Biomedicines,* 11.

RAPAPORT, D., BRUNNER, M., NEUPERT W., WESTERMANN B. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem,* 273**,** 20150-5.

RENTZSCH, P., WITTEN, D., COOPER, G. M., SHENDURE, J. & KIRCHER, M. 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res,* 47**,** D886-D894.

REVA, B., ANTIPIN, Y. & SANDER, C. 2007. Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. *Genome Biol,* 8**,** R232.

RICHARDS, S., AZIZ, N., BALE, S., BICK, D., DAS, S., GASTIER-FOSTER, J., GRODY, W. W., HEGDE, M., LYON, E., SPECTOR, E., VOELKERDING, K.,

REHM, H. L. & COMMITTEE, A. L. Q. A. 2015. 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,* 17**,** 405-24.

ROGERS, M. F., SHIHAB, H. A., MORT, M., COOPER, D. N., GAUNT, T. R. & CAMPBELL, C. 2018. FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics,* 34**,** 511-513.

ROUMPEKA, D. D., WALLACE, R. J., ESCALETTES, F., FOTHERINGHAM, I. & WATSON, M. 2017. A Review of Bioinformatics Tools for Bio-Prospecting from Metagenomic Sequence Data. *Front Genet,* 8**,** 23.

SAMIEC, M. & SKRZYSZOWSKA, M. 2021. Extranuclear Inheritance of Mitochondrial Genome and Epigenetic Reprogrammability of Chromosomal Telomeres in Somatic Cell Cloning of Mammals. *International Journal of Molecular Sciences,* 22.

SANG, Q., RAY, P. F. & WANG, L. 2023. Understanding the genetics of human infertility. *Science,* 380**,** 158-163.

SANGER, F. 1988. Citation Classic - DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Current Contents/Life Sciences***,** 23-23.

SANTEL, A. & FULLER, M. T. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci,* 114**,** 867-74.

SANTORO, N., FILICORI, M. & CROWLEY, W. F., JR. 1986. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev,* 7**,** 11-23.

SAOTOME, M., KATOH, H., SATOH, H., HAYASHI, H. & HAJNOCZKY, G. 2014. "Mitochondrial remodeling" in coronary heart disease. *Research Reports in Clinical Cardiology,* 2014**,** 111.

SCHWARZ, J. M., COOPER, D. N., SCHUELKE, M. & SEELOW, D. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods,* 11**,** 361-2.

SHAKERI, R., KHEIROLLAHI, A. & DAVOODI, J. 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie,* 135**,** 111-125.

SRIVASTAVA, P., BAMBA, C., CHOPRA, S., ROHILLA, M., CHAUDHRY, C., KAUR, A., PANIGRAHI, I. & MANDAL, K. 2023. Identification of genetic

alterations in couples and their products of conceptions from recurrent pregnancy loss in North Indian population. *Front Genet,* 14**,** 1155211.

STEPHENSON, M. D. 1996. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril,* 66**,** 24-9.

SUNDARAM, L., GAO, H., PADIGEPATI, S. R., MCRAE, J. F., LI, Y., KOSMICKI, J. A., FRITZILAS, N., HAKENBERG, J., DUTTA, A., SHON, J., XU, J., BATZOGLOU, S., LI, X. & FARH, K. K. 2018. Predicting the clinical impact of human mutation with deep neural networks. *Nat Genet,* 50**,** 1161-1170.

VAN DEN BERG, M. M., VAN MAARLE, M. C., VAN WELY, M. & GODDIJN, M. 2012. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta,* 1822**,** 1951-9.

VAN DIJK, M. M., KOLTE, A. M., LIMPENS, J., KIRK, E., QUENBY, S., VAN WELY, M. & GODDIJN, M. 2020. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Hum Reprod Update,* 26**,** 356-367.

VIRMANI, M. A. & CIRULLI, M. 2022. The Role of l-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. *Int J Mol Sci,* 23.

VRANAS, M., LU, Y., RASOOL, S., CROTEAU, N., KRETT, J. D., SAUVE, V., GEHRING, K., FON, E. A., DURCAN, T. M. & TREMPE, J. F. 2022. Selective localization of Mfn2 near PINK1 enables its preferential ubiquitination by Parkin on mitochondria. *Open Biol,* 12**,** 210255.

WANG, X. H., YIN, S., OU, X. H. & LUO, S. M. 2020. Increase of mitochondria surrounding spindle causes mouse oocytes arrested at metaphase I stage. *Biochem Biophys Res Commun,* 527**,** 1043-1049.

WESTHOFF, C., MURPHY, P. & HELLER, D. 2000. Predictors of ovarian follicle number. *Fertil Steril,* 74**,** 624-8.

WHO, W. H. O. 2023. Infertility prevalence estimates: 1990–2021.

WILCOX, A. J., WEINBERG, C. R. & BAIRD, D. D. 1995. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med,* 333**,** 1517-21.

XIAO, F., LI, J., LAGNITON, P. N. P., KOU, S. H., LEI, H., TAM, B. & WANG, S. M. 2023. Evolutionary Origin of MUTYH Germline Pathogenic Variations in Modern Humans. *Biomolecules,* 13.

XU, Y., LIU, X., ZENG, W., ZHU, Y., DONG, J., WU, F., CHEN, C., SHARMA, S. & LIN, Y. 2024. DOCK1 insufficiency disrupts trophoblast function and pregnancy outcomes via DUSP4-ERK pathway. *Life Sci Alliance,* 7.

XU, Y. Y., LIU, Y., CUI, L., WU, W. B., QUINN, M. J., MENON, R. & ZHANG, H. J. 2021. Hypoxic effects on the mitochondrial content and functions of the placenta in fetal growth restriction. *Placenta,* 114**,** 100-107.

YAO, Y., HAO, F., TANG, L. C., XU, X. H. & JIN, L. 2020. Downregulation of HDAC8 expression decreases CD163 levels and promotes the apoptosis of macrophages by activating the ERK signaling pathway in recurrent spontaneous miscarriage. *Mol Hum Reprod,* 26**,** 521-531.

YETMAN, D. L. & KUTTEH, W. H. 1996. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril,* 66**,** 540-6.

YILDIRIM, R. M. S., E. 2024. The role of mitochondrial dynamics in oocyte and early embryo development. *Seminars in Cell and Development Biology*.

ZEJNULLAHU, V. A., ZEJNULLAHU, V. A. & KOSUMI, E. 2021. The role of oxidative stress in patients with recurrent pregnancy loss: a review. *Reprod Health,* 18**,** 207.

ZHANG, J. H., ZHANG, T., GAO, S. H., WANG, K., YANG, X. Y., MO, F. F., NA, Y., AN, T., LI, Y. F., HU, J. W. & JIANG, G. J. 2016. Mitofusin-2 is required for mouse oocyte meiotic maturation. *Sci Rep,* 6**,** 30970.

ZHANG, M., BENER, M. B., JIANG, Z., WANG, T., ESENCAN, E., SCOTT, R., HORVATH, T. & SELI, E. 2019. Mitofusin 2 plays a role in oocyte and follicle development, and is required to maintain ovarian follicular reserve during reproductive aging. *Aging (Albany NY),* 11**,** 3919-3938.

ZHANG, X., AGBORBESONG, E. & LI, X. 2021. The Role of Mitochondria in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease and Its Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci,* 22.

ZHAO, Q. Y., LI, Q. H., FU, Y. Y., REN, C. E., JIANG, A. F. & MENG, Y. H. 2022. Decidual macrophages in recurrent spontaneous abortion. *Front Immunol,* 13**,** 994888.

ZHU, Z., XU, W. & LIU, L. 2022. Ovarian aging: mechanisms and intervention strategies. *Med Rev (Berl),* 2**,** 590-610.

ZORRILLA, M. & YATSENKO, A. N. 2013. The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Curr Genet Med Rep,* 1.

ZOU, W., JI, D., ZHANG, Z., YANG, L. & CAO, Y. 2021. Players in Mitochondrial Dynamics and Female Reproduction. *Front Mol Biosci,* 8**,** 717328.

HAM VERİLER

MFN2	FAF2	THY1
MFN1	MIEF1	C3ORF18
MARCHF5	PPP4R1L	GYPA
TCHP	FUNDC1	TRAK2
MAVS	FUNDC2	ANXA5
BAK1	MTERF3	CAPZB
NLRP3	BCL2	ATG9
SLC25A38	BCL2L1	SRC1
SLC25A46	ATG5	MICAL1
SLC25A3	ATG12	KRAS
SLC25A5	BECN1	ITPK1
OPA1	MAP1LC3A	ULK1
FIS1	MFF	ULK2
PRKN	MMP2	ILF2
PINK1	MMP9	AK3
RHOT1	TRAF3	HSPA1B
RHOT2	LRRK2	HSPA1A
AKAP1	PGAM5	ELOVL3
MARCH5	PGAM6	ELOVL6
VDAC1	PGAM7	HCST
VDAC2	PGAM8	GPR17
VDAC3	EGFR	KLK15
SAMM50	SIRT3	MAGEA8
VSIG1	SIRT1	TMBIM4
DNM1L	NLRP3	TSC22D1
UBC	RAC1	CCNB1
UBA52	CDC42	ANLN
UBB	STOML2	ITGB1
STIP1	TBC1D2B	CYCS
HUWE1	PLK2	MT-CO1
VCP	SRL	MT-CO2
SQSTM1	NUGGC	MT-CO3
HDAC6	LRPPRC	PGC
UBE2N	MX2	RGAG4
ST13	MX1	CAD
TTC1	ARIH1	DOCK1
TTC4	DNM1	DOCK10
PSMD11	NAXE	DOCK11
GHITM	VPS13D	DOCK2
REEP5	MIGA1	DOCK3
MAPK9	MIGA2	DOCK4
EIF2AK3	TOMM22	DOCK5
NPTN	TOMM40	DOCK6

DOCK7	DCAF7	JNK
DOCK8	RIN1	ATF4
DOCK9	BUB3	USP8
PYCARD	DHX8	USP15
LRRC16A	TMBIM4	UB
TOMM7	TSC22D1	USP30
TOMM8	BIK	AMBRA1
TOMM41	PPIF	MITF
TOMM20	EIF2S1	TFEB
CAD	RPS27A	TFE3
YY1	RPL8	TAXIBP1
SMAD2	RPS16	P62
SMAD4	RPL35	NDP52
DOCK9	RPL18A	OPTN
CPSF7	RPS12	NBR1
SNW1	RPL19	TBK1
LEMD3	PSMB4	IBCID517
SIK3	PSMF1	RAB7
U2AF2	RBX1	AMBRA1
ERBB2IP	SKP1	MITF
DNAJA2	CUL1	TFEB
CSNK1D	ATP13A2	TFE3
ASPG	EIF4G1	PGAM5
SQRDL	CHCHD2	SRC1
Clorf116	PARK7	SH2B1
WRNIP1	SNCA	SH2B2
WWP2	ETFDH	SH2B3
FAM83G	FA2H	AKAP
PSPC1	CHCHD3	CAPZA1
PGC	TYRP1	CABZA2
ZFYVE9	PMEL	AKAP
MTCH1	DCT	CAPZA1
RGAG4	GRP143	CABZA2
SMAD3	MRPL49	AKAP
DGKA	ESD	CAPZA1
INS	TSPAN10	CABZA2
SMURF2	GRP37	AKAP
ITGB4	SEPT5	CAPZA1
SKIL	SNCAIP	CABZA2
CCT6A	UBE2L3	CDC43
SLC25A6	PARK7	RAC2
EPB41L5	HSP90AA1	SH2B1
KLF5	MARCH6	SH2B2
PCID2	USP8	SH2B3
SKIL	PERK	ITPK2

AKAP
CAPZA2
CABZA3
LRRC16A
MICAL2
FAD
VPS46
RAB5A
ZFYVE21
EHD1
EHD2
EHD3
RIT1
SREBF2
APOA1BP
ACTBL2
ADSL
AIP
ALDH3A2
ASB14
ATXN3
BAG2
C11ORF49
C22ORF15
C3ORF58
C9ORF72
CACYBP
CDC34
CDC37
CFAP36
CLTC
CRYBG3
CYP2C19
DIP2A
EDEM1
EGLN3
EXD2
FKBP4
FKBP8
GBAS
GLMN
GOLGA3
HSCB
HSPA5
IBTK
IPO5
KDF1
KIAA1279
MTCH1
KIAA1524
KIF14
LARP4
MYH10
MYO19
NAA15
NBR1
NIPSNAP1
NSFL1C
NTRK1
NUDC
NUDCD3
NXF1
OCIAD1
OCRL
ORF9B
PIH1D1
PLEKHA4
PRKAR2A
PRKAR2B
PRKCI
PSMA1
PSMA2
PSMA3
PSMA4
PSMA5
PSMA6
PSMA7
PSMB1
PSMB3
PSMB4
PSMB5
PSMB6
PSMB7
PSMC1
PSMC2
PSMC3
PSMC4
PSMC5
PSMC6
PSMD1
PSMD13
PSMD2
PSMD4
PSMD6
PSMD7
RNF4
SMCR8
SNAP47
TDRKH
TER94
TMEM160
TOP3B
TPGS1
TPM3
TPM4
TRIM67
TXNL1
UBR4
UBXN4
VCPIP1
VPS13D
WDR41
YKT6
ZRANB1
TBC1D2B
ZZEF1
PLK2
SRL
NUGGC
TBC1D2B
PLK2
SRL
NUGGC
STOML2
HTRA2

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİTOFUSİN 2 (MFN2) GENİ İLE İLİŞKİLİ YOLAKLARIN PRİMER İNFERTİLİTE VE TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

10%	9%	5%	3%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	9lib.net Internet Source	3%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	1%
3	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet Source	1%
4	www.medchemexpress.cn Internet Source	<1%
5	openaccess.ogu.edu.tr:8080 Internet Source	<1%
6	www.repository.cam.ac.uk Internet Source	<1%
7	geneglobe.qiagen.com Internet Source	<1%
8	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	<1%
	hdl.handle.net	

ETİK KURUL RAPORU

Tarih ve Sayı: 01.03.2022-783593

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı :E-29624016-050.99-783593
Konu :Doç. Dr. Bilge Şadan ÖZSAİT SELÇUK hk.

Sayın Doç. Dr. Bilge Şadan ÖZSAİT SELÇUK
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi : Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 19/01/2022 tarihli 713664 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Mol. Bio. Ceren GEZİK' in yürüteceği 2022/286 dosya numaralı "Mitofusin 2 (MFN2) Geni ile İlişkili Yolakların Primer İnfertilite ve Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı çalışma, kurulumuzun 11/02/2022 tarih ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ali Yağız ÜRESİN
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSFPYNPFY3 Pin Kodu :06292 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-ebys
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Çapa/Fatih/İSTANBUL
Tel : 0 212 414 21 38/414 20 00-31561 Faks : 0 212 414 21 38 / 635 11 93
e-posta : itf-dekanlik@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : http://istanbultip.istanbul.edu.tr
Kep Adresi: istanbuluniversitesi@hs01.kep.tr
Bilgi için : Cihan KILIÇ
Dahili : 31346

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

BERGSTRAND, S., BOHM, S., MALMGREN, H., NORBERG, A., SUNDIN, M., NORDGREN, A. & FARNEBO, M. 2020. Biallelic mutations in WRAP53 result in dysfunctional telomeres, Cajal bodies and DNA repair, thereby causing Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Cell Death Dis,* 11**,** 238.

EVANGELISTI, C., RUSCIANO, I., MONGIORGI, S., RAMAZZOTTI, G., LATTANZI, G., MANZOLI, L., COCCO, L. & RATTI, S. 2022. The wide and growing range of lamin B-related diseases: from laminopathies to cancer. *Cell Mol Life Sci,* 79**,** 126.

HUANG, L., WANG, F., KONG, S., WANG, Y., SONG, G., LU, F., JI, J., LUO, L. & TONG, X. 2021. Novel Mutations in CDC20 Are Associated with Female Infertility Due to Oocyte Maturation Abnormality and Early Embryonic Arrest. *Reprod Sci,* 28**,** 1930-1938.

JEONG, D. E., LEE, H. S., KU, B., KIM, C. H., KIM, S. J. & SHIN, H. C. 2023. Insights into the recognition mechanism in the UBR box of UBR4 for its specific substrates. *Commun Biol,* 6**,** 1214.

KARIM, S., JAMAL, H. S., ROUZI, A., ARDAWI, M. S. M., SCHULTEN, H. J., MIRZA, Z., ALANSARI, N. A., AL-QUAITI, M. M., ABUSAMRA, H., NASEER, M. I., TURKI, R., CHAUDHARY, A. G., GARI, M., ABUZENADAH, A. M. & AL-QHATANI, M. H. 2017. Genomic answers for recurrent spontaneous abortion in Saudi Arabia: An array comparative genomic hybridization approach. *Reprod Biol,* 17**,** 133-143.

LESAGE, S., DROUET, V., MAJOUNIE, E., DERAMECOURT, V., JACOUPY, M., NICOLAS, A., CORMIER-DEQUAIRE, F., HASSOUN, S. M., PUJOL, C., CIURA, S., ERPAPAZOGLOU, Z., USENKO, T., MAURAGE, C. A., SAHBATOU, M., LIEBAU, S., DING, J., BILGIC, B., EMRE, M., ERGINEL-UNALTUNA, N., GUVEN, G., TISON, F., TRANCHANT, C., VIDAILHET, M., CORVOL, J. C., KRACK, P., LEUTENEGGER, A. L., NALLS, M. A., HERNANDEZ, D. G., HEUTINK, P., GIBBS, J. R., HARDY, J., WOOD, N. W., GASSER, T., DURR, A., DELEUZE, J. F., TAZIR, M., DESTEE, A., LOHMANN, E., KABASHI, E., SINGLETON, A., CORTI, O., BRICE, A., FRENCH PARKINSON'S DISEASE GENETICS, S. & INTERNATIONAL PARKINSON'S DISEASE GENOMICS, C. 2016. Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet,* 98**,** 500-513.

LI, H., LISMONT, C., REVENCO, I., HUSSEIN, M. A. F., COSTA, C. F. & FRANSEN, M. 2021. The Peroxisome-Autophagy Redox Connection: A Double-Edged Sword? *Front Cell Dev Biol,* 9**,** 814047.

MUKHERJEE, S., RIDGEWAY, A. D. & LAMB, D. J. 2010. DNA mismatch repair and infertility. *Curr Opin Urol,* 20**,** 525-32.

NAKASHIMA, A., FURUTA, A., YAMADA, K., YOSHIDA-KAWAGUCHI, M., YAMAKI-USHIJIMA, A., YASUDA, I., ITO, M., YAMASHITA, S., TSUDA, S., YONEDA, S., CHENG, S., SHARMA, S. & SHIMA, T. 2023. The Role of Autophagy in the Female Reproduction System: For Beginners to Experts in This Field. *Biology (Basel),* 12.

PHILIBERT, P., BIASON-LAUBER, A., GUEORGUIEVA, I., STUCKENS, C., PIENKOWSKI, C., LEBON-LABICH, B., PARIS, F. & SULTAN, C. 2011. Molecular analysis of WNT4 gene in four adolescent girls with mullerian duct

abnormality and hyperandrogenism (atypical Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome). *Fertil Steril,* 95**,** 2683-6.

SANTANA GONZALEZ, L., ARTIBANI, M. & AHMED, A. A. 2021. Studying Mullerian duct anomalies - from cataloguing phenotypes to discovering causation. *Dis Model Mech,* 14.

SZROK-JURGA, S., CZUMAJ, A., TURYN, J., HEBANOWSKA, A., SWIERCZYNSKI, J., SLEDZINSKI, T. & STELMANSKA, E. 2023. The Physiological and Pathological Role of Acyl-CoA Oxidation. *Int J Mol Sci,* 24.

WANG, W., MIYAMOTO, Y., CHEN, B., SHI, J., DIAO, F., ZHENG, W., LI, Q., YU, L., LI, L., XU, Y., WU, L., MAO, X., FU, J., LI, B., YAN, Z., SHI, R., XUE, X., MU, J., ZHANG, Z., WU, T., ZHAO, L., WANG, W., ZHOU, Z., DONG, J., LI, Q., JIN, L., HE, L., SUN, X., LIN, G., KUANG, Y., WANG, L. & SANG, Q. 2023. Karyopherin alpha deficiency contributes to human preimplantation embryo arrest. *J Clin Invest,* 133.

WANG, X., MITTAL, P., CASTRO, C. A., RAJKOVIC, G. & RAJKOVIC, A. 2017. Med12 regulates ovarian steroidogenesis, uterine development and maternal effects in the mammalian egg. *Biol Reprod,* 97**,** 822-834.

WYRWOLL, M. J., VAN WALREE, E. S., HAMER, G., ROTTE, N., MOTAZACKER, M. M., MEIJERS-HEIJBOER, H., ALDERS, M., MEISSNER, A., KAMINSKY, E., WOSTE, M., KRALLMANN, C., KLIESCH, S., HUNT, T. J., CLARK, A. T., SILBER, S., STALLMEYER, B., FRIEDRICH, C., VAN PELT, A. M. M., MATHIJSSEN, I. B. & TUTTELMANN, F. 2021. Bi-allelic variants in DNA mismatch repair proteins MutS Homolog MSH4 and MSH5 cause infertility in both sexes. *Hum Reprod,* 37**,** 178-189.

YU, L., LI, M., ZHANG, H., HE, Q., WAN, F., ZHANG, C. & WANG, F. 2022. Novel pathogenic splicing variants in helicase for meiosis 1 (HFM1) are associated with diminished ovarian reserve and poor pregnancy outcomes. *J Assist Reprod Genet,* 39**,** 2135-2141.

ZHANG, M., BENER, M. B., JIANG, Z., WANG, T., ESENCAN, E., SCOTT, R., HORVATH, T. & SELI, E. 2019. Mitofusin 2 plays a role in oocyte and follicle development, and is required to maintain ovarian follicular reserve during reproductive aging. *Aging (Albany NY),* 11**,** 3919-3938.

ZHAO, S., HENG, N., WANG, H., WANG, H., ZHANG, H., GONG, J., HU, Z. & ZHU, H. 2022. Mitofusins: from mitochondria to fertility. *Cell Mol Life Sci,* 79**,** 370.