

## BÖLÜM 12

### KROMOZOMAL MİKROARRAY VE TIPTA KULLANIMI

Durkadın DEMİR EKŞİ<sup>1</sup>

#### KROMOZOMAL MİKROARRAY

Kromozomal mikroarray (KMA) tekniği bir moleküler karyotipleme metodudur (1). KMA'da, kromozomal delesyon, duplikasyon ve DNA'nın dengesiz yeniden düzenlenmeleri, heterozigosite kaybı veya uniparental dizomiye belirlemek için, bütün kromozomlar boyunca dağılmış moleküler markırlar (belirteç) kullanılır. Markırlar klinik önemi bilinen DNA bölgelerinde daha yoğun olarak bulunur. Böylelikle bu bölgelerdeki oldukça küçük delesyon ve duplikasyonlar tespit edilebilir (2). KMA ile saptanan DNA kopya sayısındaki değişiklikler, kopya sayısı varyasyonları (Copy Number Variations-CNV) olarak ifade edilir. Mikrodelesyonlar (submikroskobik DNA kaybı) ve mikroduplikasyonlar (submikroskobik DNA artışı) olarak ikiye ayrılan CNV'ler, konvansiyonel karyotipleme metodu ile tespit edilemezler (3).

CNV'ler sağlıklı bireylerde de bulunabilirler ve bunlar klinik olarak önemsizdir. Bu 'benign' CNV'lerin çoğu oldukça küçük boyutludur (<50 Kb) ve klinik önemi olan kodlayıcı DNA bölgesi içermezler. CNV, kritik bir gen ya da önemli bir regülatör diziyi içeriyor ise büyük olasılıkla fenotipik etki doğurur ve tıbbi açıdan önem arzeder (3). KMA platformlarının çoğu, klinik önemi bilinmeyen DNA bölgelerini de kapsar ve bu bölgelerdeki 100-500 Kb aralığındaki delesyon ve duplikasyonları saptamaya olanak sağlar. Konvansiyonel G bantlama ile ancak 5-10 Mb büyüklüğündeki delesyon ve duplikasyonlar saptanabilmektedir (2).

Dünyada özellikle son 10 yıldır KMA, klinik bir test olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Zamanla gelişen bu teknik aracılığıyla, ekzon spesifik prob dizaynları ile tek bir gendeki CNV'ler tespit edilerek monogenik hastalıkların tanısı yapılabilmektedir. Diğer taraftan, yeni nesil dizileme (next generation sequencing, NGS) temelli CNV analizinin diagnostik amaçlı uygulanması da giderek yaygınlaşmaktadır. NGS ve KMA'nın birlikte uygulanması, tek bir ekzondan bütün bir kromozoma kadar genom boyu CNV'lerin tanımlanması mümkün kılmaktadır (1).

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.,  
durkadin.eksi@alanya.edu.tr

## **GENOMİK KOPYA SAYISI VARYASYONLARI**

Son 20 yıldır dünyada, hastalıkların moleküler tanısı ve bilinmeyen etiyojisini belirlemek için genomik CNV çalışmaları yaygınlaşmıştır. Genomik alanında gelişen bu gibi teknolojiler, bilim insanlarına kapsamlı ve informatif veri elde etme yolunu açmıştır. CNV; iki kopya halinde bulunan bir DNA bölgesinin delesyonu ya da amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. CNV'ler, büyüklüğü 1 Kb'den, 1 Mb'ye kadar olan dengesiz genomik varyasyonlardır. Yapılan çalışmalar ile, genomun %10'unda yaygın olarak saptanan CNV'ler olduğu gösterilmiştir (4). Konvansiyonel (geleneksel) sitogenetik analiz (G bantlama, karyotipleme) ile saptanamayan submikroskobik CNV'ler, mikroarray gibi gelişmiş teknolojiler aracılığıyla belirlenebilmektedir. CNV verileri, tüm genoma komplementer oligonükleotit ya da tek nükleotit polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) problemlerinin kullanıldığı mikroarray platformları aracılığıyla elde edilir. CNV'ler, genomun herhangi bir lokalizasyonunda saptanabilir (5).

Kodlama yapmayan DNA dizilerindeki kopya sayısı değişimleri, gen ürününün fonksiyonundan çok, dozajını etkilemektedir. Patojenik CNV'ler olabildiği gibi, bireyler arası çeşitliliğe sebep olan heteromorfizm olarak tanımlanan benign CNV'ler de vardır. Herhangi bir hastalığa yol açmayıp, bir sonraki kuşağa aktarılan ve bireyler arasında farklılık gösteren CNV'ler, gen haritalama çalışmalarında SNP'ler gibi kullanılabilir (5).

Yaygın olarak saptanan CNV'lerin klinik etkileri daha iyi tanımlanmışken, nadir ya da tek bir organda saptanan CNV'lerin fenotipik etkilerini anlamak için ileri araştırmalar gerekmektedir. Bu CNV'lerin klinik önemini anlamanın önünde bazı engeller vardır. Bunlardan biri literatürde ve genom veritabanlarında yeterli veri olmaması ya da çelişkili veriler olmasıdır. Laboratuvarlar arasındaki tutarsızlık, klinisyenler ve hastalar için kafa karışıklığı yaratarak, sağlık kararlarını yönetmek için genetik bilgiyi güvenle kullanamaz hale getirebilir. CNV verilerini yorumlamak için oluşturulmuş standartlar, klinik sınıflandırmalardaki uyumsuzluğun azaltılmasına yardımcı olmaktadır (1).

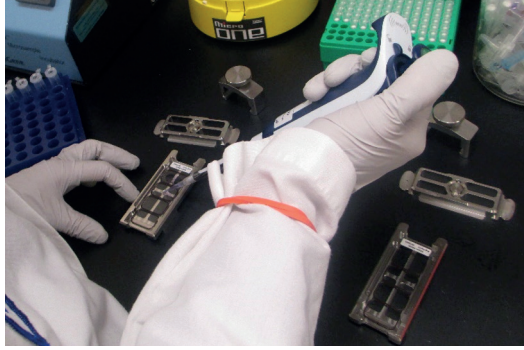
Amerikan Tıbbi Genetik ve Genom Koleji'nin (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) yayınladığı klavuzdaki puanlama sistemi kullanılarak, bir hastada saptanan herhangi bir CNV, beş ana kategoriden birine dahil edilebilmektedir. Bu beş kategori 'patojenik', 'muhtemel patojenik', 'önemi bilinmeyen varyant (variants of uncertain significance, VUS/VOUS)', 'muhtemel benign' ve 'benign'dir. Bu kategorilerin klinik raporlamada kullanılması, tutarlı bir terminoloji için özellikle tavsiye edilir (1).

## KMA TEKNİKLERİ

Submikroskopik DNA kopya değişimlerini belirlemek için iki KMA tekniği bulunmaktadır. Bunlar karşılaştırmalı genomik hibridizasyon temelli mikroarray (comparative genomic hybridization array - aCGH) ve tek nükleotid polimorfizm temelli mikroarraylerdir (single nucleotide polymorphism array - SNP array).

### CGH Temelli Array

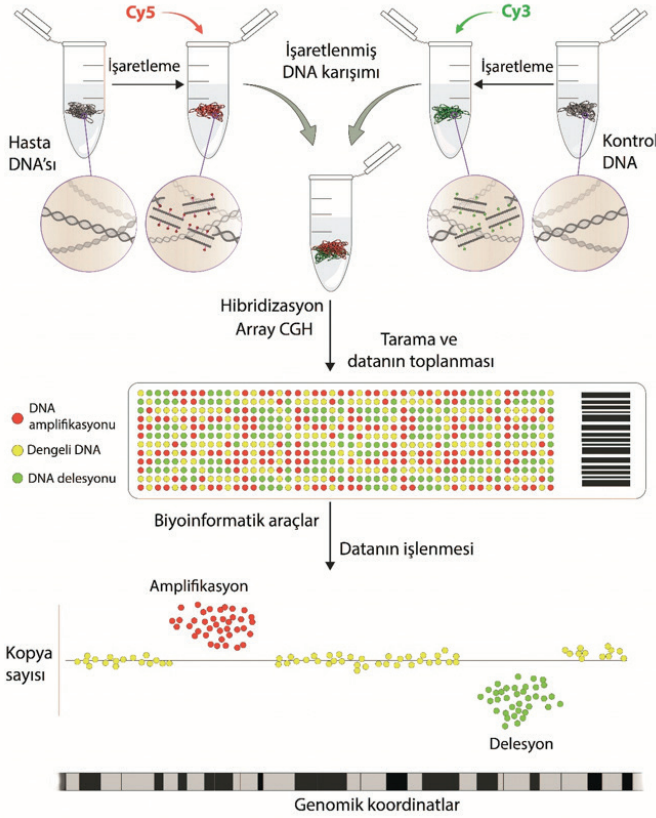
CGH temelli array'de (aCGH), hasta örneğinde fazla veya eksik temsil edilen alanları belirlemek için hastanın DNA'sı, normal kontrol DNA örneğiyle karşılaştırılır. Hasta ve kontrol DNA örnekleri fragmente edilir ve genellikle yeşil ve kırmızı floresan boyalarla işaretlenirler. İşaretli DNA örnekleri eşit oranda karıştırılır ve Şekil 1'de gösterildiği gibi slide şeklinde bir cam yüzeye (array) aktarılır.



Şekil 1. aCGH'de DNA örneklerinin mikroarray üzerine aktarımı

Cam yüzey ya da array üzerinde insan genomu boyunca belirli DNA dizilerini temsil eden birçok prob DNA bulunmaktadır. DNA karışımı yarışmalı olarak array üzerindeki problara hibridize olur. Her probun floresan yoğunluğu dijital görüntüleme yazılımlarıyla ölçülür. Normalizasyon aşamasından sonra hasta ve kontrol örneğinin floresan yoğunlukları arasındaki oran hesaplanır. Oranın '1' olması hasta ve kontrol örneğinin aynı miktarda proba bağlandığını ve hasta DNA'sının ilgili lokustaki kopya sayısının normal olduğunu gösterir. 1'den anlamlı olarak yüksek olan bir oran ise hasta DNA'sının belirli problara daha çok hibridize olduğunu gösterir. Bu da ilgili kromozomal bölgenin hastada duplikasyon ya da trizomi şeklinde bulunduğunu gösterir. Tam tersi, oran 1'in altında ise hastada ilgili lokusun kaybolduğu (delesyon veya monozomi) anlamına gelir. Kontrol DNA örneği, belirli problara hasta örneğine göre daha çok hibridize olmuştur (Şekil

2). Delesyon ya da duplikasyonun lokalizasyonu ve büyüklüğü ardışık problemlerin sayısı ile belirlenir. Klinik tanı amaçlı kullanılan tipik bir aCGH yüzbinlerce prob içerirken, araştırma amaçlı kullanılan aCGH platformlarında bu sayı milyonlara çıkmaktadır. aCGH'nin çözünürlüğü ve diagnostik kapasitesi, bütün genomu boylu boyunca temsil eden problemlerin tipi ve sayısına bağlıdır. Rutin tanı laboratuvarlarının birçoğu, postnatal tanıda 50-100 Kb arasındaki kromozomal düzensizlikleri rapor edebilmektedir (3).



Şekil 2. aCGH çalışma prensibi

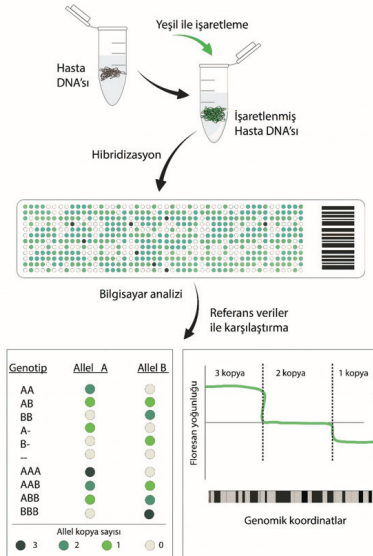
### SNP Temelli Mikroarray

SNP temelli mikroarray'ler (SNP array), bireyler arasında tek bir baz çiftiyle değişiklik gösterdiği bilinen DNA bölgelerinin (SNP) hedeflendiği yüksek yoğunluklu oligonükleotit problemler kullanır. SNP array'de sadece hasta DNA'sı işaretlenir ve Şekil 3'de bir örneği gösterilen array düzeneğine aktarılır.



Şekil 3. Hibrid mikroarray çipi

CNV'ler, bağımsız olarak hibridize edilmiş normal kontrol DNA'ların floresan yoğunlukları ile hasta örneğinin mutlak floresan prob yoğunluğu ile karşılaştırılarak bulunur. İn siliko karşılaştırma yapılır (Şekil 4). Rutin tanı amaçlı kullanılan SNP arrayler, hem SNP hem de kopya sayısı problemleri içeren hibrid array'dirler. Bu hibrid platformlardaki prob yoğunluğu 2.7 milyona kadar ulaşmıştır. Rutin genetik laboratuvarları, 50-100 Kb ve üstü büyüklükteki CNV'leri belirlemek için SNP array kullanabilmektedir. SNP array'in avantajlarından biri homozigosite analizinin yapılabilmesidir. SNP array ile, CNV'lerin yanısıra klinik olarak önemli başka veriler de elde edilebilmektedir. Bu veriler; uniparental dizomi, mozaizm, zigosite, maternal DNA kontaminasyonu, parental orjin ve akrabalık derecesidir. Ayrıca aCGH ile saptanamayan triploidi, SNP array ile kolaylıkla belirlenebilmektedir (3). Bazı laboratuvarlar, akrabalık derecesini belirlemek için SNP temelli array'ler kullanmaktadır (2).



Şekil 4. SNP array çalışma prensibi

KMA, günümüzde prenatal ya da postnatal dönemde birçok hastalığın/malformasyonun genetik tanısında rutin test ya da araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Özellikle, CNV'lerle ilişkisinin daha iyi tanımlandığı hastalıklar için, KMA daha önemli hale gelmektedir. Bu hastalıklar ve malformasyonlar arasında, çoklu konjenital anomaliler, gelişme geriliği, entelektüel gerilik ya da bozukluk, dismorfizm, epilepsi, otizm spektrum bozukluğu, psikiyatrik hastalıklar (özellikle şizofreni), dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, kısa boy uzunluğu, serebral palsi, konjenital göz malformasyonu, konjenital kalp hastalığı, konjenital renal malformasyon bulunmaktadır. Epilepsinin özellikle genetik geçişli olan formunda CNV saptanan hastaların oranı %28'i bulmaktadır. Entelektüel gerilik bazı hastalık ve malformasyonlara eşlik ettiği zaman CNV saptanma olasılığı artmaktadır. Örneğin entelektüel geriliğin, gelişme geriliği, epilepsi ve otizme eşlik ettiği hastalarda CNV saptanma oranları artış göstermektedir (6).

## **KMA İLE PRENATAL GENETİK TANI**

Kromozomal abnormalitelerin prenatal tanısı 1960'ların ortalarından bu yana önerilmektedir. Son 50 yılın büyük bir bölümünde, fetusun sitogenetik analizi, standart G-bantlama (karyotipleme) ile gerçekleştirilmiştir. Karyotipleme ile konvansiyonel sitogenetik analizin diagnostik başarısı, endikasyona bağlıdır. En yaygın endikasyonlar arasında, ileri anne yaşı, yüksek risk olduğunu gösteren biyokimyasal parametreler yer almaktadır. Bu durumlarda genetik tanı olasılığı, koryon villus biyopsisi (CVS) ile %6, amniyosentez (AS) ile %3'tür. Morfolojik anomalisi olan fetuslarda bu oran artmakla beraber, birinci trimesterde %60, ikinci trimesterde %17'dir. KMA gibi yeni moleküler sitogenetik teknolojilerin ortaya çıkışı, daha büyük diagnostik çözünürlük imkanını beraberinde getirmiştir. Kilobaz aralığındaki kromozomal dengesizlikleri saptamaya yarayan KMA, 7-10 milyon bazdan daha büyük anomalilerin saptanabildiği standart karyotiplemeye göre üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Konjenital anomalili, gelişme geriliği ve entelektüel bozukluğu olan çocuklarda, postnatal tanıda KMA, %12-15 oranında ilave submikroskobik patojenik varyasyon tespitine olanak sağlamaktadır (3).

## **ULTRASONOGRAFİDE ANOMALİ GÖRÜLEN FETUSLAR İÇİN KMA KULLANIMI**

Genomik aberasyonlar ve fetal anomaliler arasındaki ilişki onlarca yıldır bilinmektedir. Klinik olarak anlamlı genomik bölgeleri içeren mikrodelesyon ve mikroduplikasyonların da spesifik genetik sendromlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu sendromlardan birçoğunun fenotipinde konjenital abnormaliteler vardır. Örneğin 22q11.2 mikrodelesyonu ile karakterize olan DiGeorge Sendromu'na sahip

fetusların yaklaşık %77'sinde kardiyak defektler bulunmaktadır. 17p13.3 mikrodelsiyonu ile ortaya çıkan Miller-Dieker Sendromu'nda da, konjenital olarak serebral kortekste gri maddenin yokluğu ya da az gelişmesi olarak tanımlanan lisensefali görülmektedir. Uniparental dizomiye bağlı olarak ortaya çıkabilen Beckwith-Wideman ve Russell-Silver sendromlarından etkilenmiş fetuslarda spesifik ultrasonografi (USG) bulguları vardır ve bu sendromların tanısının yapılması SNP array ile mümkün olabilmektedir (3).

USG'de anomali görülen fetuslarda KMA verimliliğini gösteren, birçok geniş kapsamlı çalışma yapılmıştır. ABD Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü'nün (National Institute of Child Health and Human Development – NICHD) 2012 yılında yaptığı çalışmada, USG'de anomali görülen ve normal karyotipe sahip fetusların %6'sında klinik olarak anlamlı CNV'ler bulunmuştur (7). Srebniak ve arkadaşlarının USG'de anomali görülen 1033 fetusun %5,5'inde, SNP array kullanarak patojenik CNV'ler belirlemişlerdir (8). 5000 fetusun dahil edildiği daha büyük bir çalışmada, 2462 USG anomali olan fetusun %6,6'sında CNV saptanmıştır (9). 2013'te yayınlanan iki meta-analiz çalışmasına göre, yapısal fetal abnormalitelerin prenatal dönemde genetik tanısı için, konvansiyonel sitogenetik analize ilaveten KMA teknikleri ile %7-10 daha fazla patojenik bulgu elde edildiği rapor edilmiştir (10, 11). Literatür verileri kesin olarak, USG'de anomali görülen ve konvansiyonel karyotipleme ile herhangi bir kromozomal abnormalite belirlemeyen fetusların %6-7'sinde KMA ile patojenik genetik bulgular saptandığını göstermektedir. Bu nedenle Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Kongresi (ACOG), fetal yapısal anomali görülen olgularda KMA'yı ilk aşama test olarak önermektedir (12).

KMA ile genetik abnormalite belirlenen fetuslarda, kardiyak, renal, ürogenital anomaliler, merkezi sinir sistemi ve iskelet anomalileri başta olmak üzere çeşitli organ sistemlerini etkileyen bozukluklar görülmektedir. İzole renal ve kardiyak anomaliye sahip fetuslarda KMA'nın, karyotiplemeye ilaveten sırasıyla %15 ve %10,6 diagnostik verim sağladığı belirlenmiştir. Hatta bu oran kardiyak çıkış kanalı abnormaliteleri olan fetuslarda %30'a çıkmaktadır (13). En yaygın konjenital kalp defekti olan ventrikular septal defekt (VSD) olan olguların %7,3'ünde patojenik CNV'ler saptanmıştır (14). Donnelly ve arkadaşlarının çalışmasından elde edilen önemli bir veri de, kalp defektleri olan hastaların %66,7'sinin 22q11.2 delesyonu dışında CNV'lere sahip olmasıdır (13). Prenatal dönemde USG'de kardiyak anomali görülen fetuslar için 22q11.2 delesyonu (DiGeorge Sendromu) olasılığını değerlendirmek üzere FISH istemi yapılması önceleri oldukça yaygındı. Ancak bu şekilde genomik abnormalitelerin 2/3'ünden fazlası kaçırılmaktaydı. KMA gibi yeni teknolojiler bu durumun önüne geçilmesine önemli katkı sağlamıştır (3).

USG'de görülen çoklu organ sistemi anomalileri arasından nukal anomaliler çıkarıldığı zaman non-benign CNV'lerin tespit edilme oran %13,6'ya çıkmaktadır. Tablo 1 ve 2'de USG incelemesi sonucu yapısal anomaliye sahip olan ve olmayan fetuslarda en sıklıkla saptanan CNV'ler verilmiştir (3). 22q11.2 bölgesindeki varyasyonlar, USG'de fetal anomalisi olan veya olmayan fetuslarda en sık saptananlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bölgedeki varyasyonların fenotipik etkileri oldukça heterojendir. Bu klinik heterojeniteyi açıklamak için CNV analizinin yapılması yarar sağlayabilecektir (3).

<b>Tablo 1. USG'de anomali gözlenen fetuslarda en sık saptanan CNV'ler</b>	
<b>Kromozomal Bölge</b>	<b>Sıklık (Mikrodelesyon+Mikroduplikasyon)</b>
10q21.1	%3,3
15q13.3	%3,3
1q21.1	%4,9
16p13.11	%9,8
17q12	%9,8
22q11.21	%18
Tek görülen CNV'ler	%50,8

<b>Tablo 2. USG'de anomali gözlenmeyen fetuslarda en sık saptanan CNV'ler</b>	
<b>Kromozomal Bölge</b>	<b>Sıklık (Mikrodelesyon+Mikroduplikasyon)</b>
15q11.2	%5,8
Xp22.3	%7,7
Xp21.1	%7,7
16p11.2	%7,7
1q21.1	%9,6
17p12	%9,6
16p13.11	%13,5
22q11.21	%15,4
Tek görülen CNV'ler	%23,1

## **KMA VE MENTAL RETARDASYON, EPİLEPSİ VE NÖROPSİKİYATRİK HASTALIKLARIN MOLEKÜLER TANISI**

Mental Retardasyon (MR), genel popülasyonun %2-3'ünde görülen majör bir sosyo-ekonomik sağlık problemidir. Aynı zamanda gelişme geriliği, entelektüel bozukluk ve öğrenme güçlüğü olarak da ifade edilir (15). MR'li hastaların yaklaşık



%10'unda ışık mikroskobu ile kromozomal abnormaliteler saptanabilir iken %60-80'inin etyolojisi bilinmemektedir (16). İlk kez 2003 yılında Vissers ve arkadaşları konjenital anomalilerin eşlik ettiği idiyopatik MR'li olgularda submikroskopik kromozomal varyasyonları saptamak için mikroarray temelli tüm genom analizi yapmıştır. O günden bu yana KMA tekniklerinin çözünürlüğü artmış, ticari olarak hizmete sunulmuş ve konjenital anomalili, MR'li olguların moleküler tanısında kullanılır olmuştur. Nitekim, mikroarray temelli bu teknikler konjenital anomalili ve MR olgularında birincil test olarak önerilmektedir (16). Çeşitli çalışmalar ile MR'li olgularda, çeşitli KMA platformları ile %14 ile %18 arasında patojenik CNV'ler saptandığı gösterilmiştir. Bu oldukça yüksek bir orandır (16).

Otizm spektrum bozuklukları (OSB'ler), stereotipik, tekrarlayan davranışlar, iletişim ve sosyal etkileşimdeki kusurlarla karakterize gelişimsel bozukluklardır. Tüm bunlar yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkar ve beyin anatomisi, gelişimi ve işlevi üzerinde belirli etkilerle birlikte görülür (17). Mevcut prevalansı, tüm spektrum için 1/150-200 ve çekirdek sendrom için 1/500'dür (16). OSB'nin artan prevalansı ile ilişkili olduğu kabul edilen ilk genetik bozukluklar; spesifik Mendelyan hastalıklar (Frajil-X sendromu, tüberoskleroz, nörofibromatoz, Joubert sendromu ve Rett sendromu), yapısal kromozomal yeniden düzenlemeler (maternal kalıtılan 15q11-q13 duplikasyonları ve diğerleri) ve önemli etkiye sahip gen mutasyonlardır (16). OSB hastalarının yaklaşık %10-15'inde bu genetik anomaliler, karyotipleme ve FISH kullanılarak saptanabilir, ancak bunlar tüm OSB'li çocukların %1'inden çok daha azında mevcuttur (16). Mikroarray platformlarının çözünürlüğünün de artmasıyla genetik etiyolojisi tanımlanan OSB hastalarının sayıları artmıştır. Bu oranın %7-15 olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca bu oran, sendromik olmayan ve sendromik olan vakalar arasında %4'ten %25'e kadar değişmektedir. Sendromik olmayan sporadik vakaların %5-10'unda de-novo CNV'ler saptanmıştır (16, 18). KMA kullanılarak, OSB'li hastalarda en sık 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 17q12 ve 22q11.2 kromozomal bölgelerinde mikrodelesyon ve mikroduplikasyonlar saptanmıştır (16).

Nöropsikiyatrik hastalıklardan biri olan şizofreni genel olarak toplumun %0,5-1'ini etkilemektedir. Aile ve ikiz çalışmaları şizofreninin %85 oranında genetik faktörlerin etkisi altında geliştiğini göstermektedir. Karyotipleme ile şizofrenili hastalarda kromozomal abnormaliteler saptanmıştır. Şizofreninin bazı delesyon sendromlarına eşlik edebildiği de bilinmektedir. Genetik etiyolojisi tanımlanamayan şizofrenili olguların çeşitli KMA platformları ile analizi sonucunda yaklaşık %5'inde hastalıkla ilişkili CNV saptanmıştır (16). Bu yüzden KMA, gerek de novo gerekse familial şizofreninin genetik nedenlerinin belirlenmesinde yararlı bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır.

OSB, şizofreni ve MR'li olgularda saptanan 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3 ve 16p13.11 bölgelerindeki mikrodelsiyonlar, epilepsi hastalarında da saptanmıştır. Genel olarak çalışmalara bakıldığında idiyopatik epilepsili olguların %3-4'ünde CNV'lerin saptandığı görülmektedir. Bir diğer nöropsikiyatrik hastalık olan dik-kat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu hastalarında KMA platformları ile CNV saptanma oranının %8-17 olduğu bildirilmektedir (16). Ek olarak, belirli tekrarlayan CNV'ler, nörogelişimsel hastalıklara yatkınlık oluşturmaktadır. Bu durumlarda genetik penetrans tam olmamakla beraber, tipik olarak %10 ile %60 penetrans göstermektedir (19).

## **BİLİMSEL ARAŞTIRMALARDA KMA KULLANIMI**

Moleküler karyotipleme ile ilişkili bilimsel araştırmaların genelinde, konvansiyonel sitogenetik analiz ile belirlenemeyen submikroskopik CNV'lerin analizinin, etyopatogenezi tam olarak tanımlanamamış hastalıkların aydınlatılması açısından oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bazı CNV analiz platformları esnek olup, sipariş usulü prob sayısının genomun belli bölgesinde artırılmasıyla, hedef genomik bölge daha detaylı ve doğru olarak incelenebilmektedir. Elde edilen veriler, en yaygın olarak Database of Genomic Variants (DGV) veritabanını ile karşılaştırılmaktadır. Bu veritabanında yer alan HapMap projesi verilerini de içeren binlerce sağlıklı bireye ait CNV verisi, patojenik CNV'leri belirlemek için kullanılmaktadır. 'Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER)' ve 'European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA)' veritabanları ise fenotipik abnormalitelere sahip bireylerin CNV'lerini içerir (6). Herhangi bir patolojik CNV, belli fenotipteki hasta grubunda artış gösteriyor ise o bölge hastalık için potansiyel aday bölge olarak düşünülmektedir. CNV saptanmayan aynı fenotipe sahip diğer hastalarda o bölgedeki genlerin dizi analizi, CNV çalışmalarından sonraki basamağı oluşturmaktadır. Genlerden birinde mutasyon saptanması, aday gen olasılığını arttırmakta ve fonksiyonel çalışmaların öncüsü olabilmektedir. Bu yolla hastalıkların bilinmeyen patofizyolojisi aydınlatılabilir.

Hastalıklardan sorumlu aday genleri belirlemek için en sıklıkla kullanılan teknik, linkaj analizidir. Ancak bazı hastalıklarla ilişkili aday genleri belirlemek üzere, tüm genomu kapsayan linkaj analizi henüz yapılmamıştır. Bu durumun başlıca nedeni ilgili hastalık açısından ailesel olguların oldukça nadir olması, ailesel vakalarda da hastalıktan etkilenmiş bireylerin yalnızca iki jenerasyonda gözlenmesidir. Böyle durumlarda, aCGH, malformasyon sendromları ile ilişkili yeni aday genleri araştırmak için oldukça etkin kullanılan bir tekniktir. Türkiye'de, Demir Eksi ve arkadaşları, konjenital gelişim anomalileri olan Mülleryan Aplazi (Ma-

yer-Rokitansky-Küster-Hauser Sendromu) ve Konjenital Bilateral Vas Deferens Yokluğunun bilinmeyen genetik etiyojisini tanımlamak üzere çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, ilgili hastalıklarla ilişkili olabilecek olası aday genomik bölgeler ve genler tanımlanmıştır (20, 21).

Tüm genoma belli aralıklarla dağılmış problemlerle elde edilen CNV bulguları, genoma ait kapsamlı veri sunmaktadır. Bu yaklaşım ile sebebi bilinmeyen mental retardasyonlu olguların %15-20'sinin etiyojisi açıklanmıştır. Dolayısıyla, KMA sistemleri, malformasyon sendromları ile ilişkili yeni genlerin bulunması için oldukça elverişli tekniklerdir (22).

## **KMA'NIN KONVANSİYONEL SİTOGENETİK ANALİZE GÖRE ÜSTÜNLÜKLERİ**

KMA'nın en önemli yararlarından birisi genomik aberasyonun kesin olarak tanımlanmasına olanak sağlamasıdır. Kesin olarak tanımlar çünkü, kromozomal varyasyonun sınırları (koordinatlar) daha doğru belirlenebilir ve sonraki çalışmalarda o kromozomal bölge detaylı incelenebilir. Bu sadece submikroskopik varyasyonlar için değil aynı zamanda mikroskopta belirlenmiş ancak orijini bilinmeyen sitogenetik abnormaliteler için de önemlidir. Marker kromozomlar ve dengesiz kromozomal aberasyonlar bunlara örnek verilebilir. Böyle varyasyonlarda fenotip ile ilişkilendirebilmek için, ilgili kromozomal bölgeyi ve içerdiği genleri ya da regülatör dizileri iyi bilmek gerekir. Çünkü ortaya çıkacak klinik fenotip ve prognoz, o DNA bölgelerine ve kopya sayısı artış ve azalış miktarına göre şekillenir. KMA, varyant bölgenin tanımlanması ve klinik ile ilişkisinin hızlı ve etkin bir şekilde kurulmasına olanak sağlar. Bu yapılırken de, genom ve insan hastalıkları ilişkili veritabanlarından yararlanılır (3).

CNV patojenesini belirlemede, yalnızca büyüklüğünün bilinmesi tek başına yeterli değildir. Örneğin CNV gen açısından fakir büyük bir alanı içine kapsıyorsa fenotipe etkisi çok olmayacaktır. Diğer taraftan küçük ama gen açısından zengin bir bölgenin fenotipik etkisi daha belirgin olacaktır. KMA aynı zamanda, dengeli gibi görünen ancak anormal fenotipe sebep olma açısından %6,7 oranında ampirik risk taşıyan de-dovo kromozomal düzenlenmelerin belirlenmesinde de yardımcı olmaktadır. KMA ile kromozomal kırık bölgelerindeki olası küçük delesyon ve duplikasyonlar belirlenebilir ve klinik tablo genetik olarak daha net açıklanabilir. Konvansiyonel sitogenetik analiz yapılmadan KMA yapılırsa, dengeli kromozomal düzenlenmeler saptanamaz. Bu durum da ileri moleküler tetkiklerin önünde bir engel teşkil eder. Ek olarak, KMA'dan önce bir hücre kültürü aşamasına ihtiyaç duyulmadığından, kan, mikrovillus, amniyotik sıvı gibi dokulardan doğrudan DNA izole edilerek analiz edilir. Dolayısıyla, kısa sürede veri elde edilebilir (3).

## **KMA'NIN KISITLILIKLARI**

KMA, hasta ve kontrol DNA'yı karşılaştırarak genetik dengesizlikleri ortaya çıkarır. Bu sebeple dengeli kromozomal aberasyonlar KMA ile saptanamamaktadır. Her ne kadar dengeli kromozom aberasyonları, taşıyan birey için fenotipik bir etki oluşturmada da, o kişinin gebeliği açısından risk teşkil edebilmektedir (3).

Farklı laboratuvarlar, farklı tipte ve rezolüsyonda KMA testleri önermektedir. Hastaya uygun KMA testi istendiğinden emin olunmalıdır. Diğer taraftan, KMA ile düşük seviye mozaizm, inversiyonlar, dengeli kromozomal translokasyonlar ve nokta mutasyonları tespit edilememektedir. Bu sebeple, tekrarlayan spontan düşükleri olan çiftler ve otizmliler, gelişme geriliği ve/veya çoklu konjenital anomalisi olan çocuklar için G bantlama yapılarak karyotipi belirlemek gerekebilmektedir. Günümüzde, KMA, epilepsi ve nöropsikiyatrik hastalıklar için birincil önerilen test konumunda değildir. Ayrıca, yaygın görülen küçük CNV'lerin henüz klinik önemi tam olarak tanımlanmamıştır (2).

## **SONUÇ**

KMA testinde, heterozigosite kaybı, uniparental dizomi gibi nötral kopya sayısı değişimlerini veya DNA segmentlerinin kaybı ve artışı belirlemek üzere mikroarrayin tipine bağlı olarak moleküler problemler kullanılır (2).

KMA, konvansiyonel kromozom analiz yöntemlerinde belirlenemeyen klinik olarak anlamlı kromozomal delesyon ve duplikasyonları saptamak için oldukça önemli bir gelişme olarak karşımıza çıkmaktadır (23, 24).

KMA, rehber ve yayınlarda, otizm spektrum bozukluğu, gelişme geriliği/entellektüel bozukluk ve/veya çoklu konjenital anomalisi olan çocuklar ve USG'de anomali göslenen fetuslar için birinci basamak test olarak önerilmektedir (1, 25, 26).

KMA istemi yapmadan önce, KMA ile ailelere nasıl bir veri verileceği genetik danışma kapsamında iletilmelidir. Eğer bir çocukta Down sendromu gibi bilinen bir genetik hastalığın semptomları varsa önce bu hastalık için gereken moleküler test yapılmalıdır (2).

Laboratuvara hastanın klinik bilgileri de verilirse spesifik CNV'lerin tespit edilme olasılığı artacaktır (2).

Klinisyenler ve hastalar, 'önemi bilinmeyen varyantlar (variant of unknown significance-VOUS)' tespit edilebileceği konusunda bilgi sahibi olmalıdır (27).

Genel olarak, patojenik varyantlar, bilinen mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromlarını, 'haploinsufficiency' sonucu ortaya çıkan hastalıklarda belirle-

nen gen delesyonlarını ve birçok geni kapsayan büyük delesyon ve duplikasyonları içermektedir (2).

KMA ile nokta mutasyonları ve intragenik küçük delesyon ve duplikasyonlar saptanamamaktadır. KMA ile otizm spektrum bozukluğu, gelişme geriliği/entelektüel bozukluk ve/veya konjenital anomalilere sahip çocukların %15 ila %20'sinde delesyon ya da duplikasyonlar saptanabilmektedir. Aynı hastalık grubuna sahip çocuklarda, G bantlama ile kromozomal aberasyon belirlenme olasılığı ise %3-5'te kalmaktadır (23, 24).

Laboratuvarlar, bir CNV'nin patojenitesini belirlemek için, delesyon veya duplikasyonun büyüklüğüne, ilgili bölgedeki genlere, delesyon veya duplikasyonun parental geçişine, literatür verilerine ve hastadaki semptomlara bakmaktadırlar (2).

KMA testi için EDTA'lı ya da sodyum heparinli bir tüpte kan örneği gerekmektedir. Kan örneğinin, laboratuvara oda sıcaklığında transferi önerilir ve buzdolabında ya da dondurucuda tutulması önerilmez (2). Parental kan örnekleri de, hastaya ait genetik bulguların klinik önemini belirlemek için çoğu zaman talep edilir (2).

## KAYNAKLAR

1. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*; 2020;22(2):245-57. doi:10.1038/s41436-019-0686-8.
2. Faucett WA, Savage M. Chromosomal microarray testing. *JAAPA*; 2012;25(1):65-6. doi:10.1097/01720610-201201000-00016.
3. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil Steril*; 2018;109(2):201-12. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.01.005.
4. Marcinkowska-Swojak M, Uszczynska B, Figlerowicz M, et al. An MLPA-based strategy for discrete CNV genotyping: CNV-miRNAs as an example. *Human mutation*; 2013;34(5):763-73. doi:10.1002/humu.22288.
5. McCarroll SA, Altshuler DM. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nature genetics*; 2007;39(7 Suppl):S37-42. doi:10.1038/ng2080.
6. Kharbanda M, Tolmie J, Joss S. How to use... microarray comparative genomic hybridisation to investigate developmental disorders. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*; 2015;100(1):24-9. doi:10.1136/archdischild-2014-306022.
7. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*; 2012;367(23):2175-84. doi:10.1056/NEJMoa1203382.
8. Srebnik MI, Diderich KE, Joosten M, et al. Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: causative, unexpected and susceptibility CNVs. *Eur J Hum Genet*; 2016;24(5):645-51. doi:10.1038/ejhg.2015.193.
9. Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn*; 2012;32(10):976-85. doi:10.1002/pd.3945.
10. Callaway JL, Shaffer LG, Chitty LS, et al. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature. *Prenat Diagn*; 2013;33(12):1119-23. doi:10.1002/pd.4209.

11. Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 2013;41(6):610-20. doi:10.1002/uog.12464.
12. Committee on G, the Society for Maternal-Fetal M. Committee Opinion No.682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol*; 2016;128(6):e262-e8. doi:10.1097/AOG.0000000000001817.
13. Donnelly JC, Platt LD, Rebarber A, et al. Association of copy number variants with specific ultrasonographically detected fetal anomalies. *Obstet Gynecol*; 2014;124(1):83-90. doi:10.1097/AOG.0000000000000336.
14. Sukenik-Halevy R, Sukenik S, Koifman A, et al. Clinical aspects of prenatally detected congenital heart malformations and the yield of chromosomal microarray analysis. *Prenat Diagn*; 2016;36(13):1185-91. doi:10.1002/pd.4954.
15. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*; 2010;11:161-87. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141640.
16. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, et al. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res*; 2011;135(3-4):174-202. doi:10.1159/000332928.
17. Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet Med*; 2011;13(4):278-94. doi:10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba.
18. Itsara A, Wu H, Smith JD, et al. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res*; 2010;20(11):1469-81. doi:10.1101/gr.107680.110.
19. Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, et al. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med*; 2013;15(6):478-81. doi:10.1038/gim.2012.164.
20. Demir Eksi D, Shen Y, Erman M, et al. Copy number variation and regions of homozygosity analysis in patients with MULLERIAN aplasia. *Mol Cytogenet*; 2018;11:13. doi:10.1186/s13039-018-0359-3.
21. Demir Eksi D YE, Akin Y, Usta MF, Basar MM, Kahraman S, Erman M, Alper OM. Copy Number Variation Analysis in Turkish Patients with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *Acta Medica Alanya*; 2021;5(2):181-9.
22. Cheroke C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K, et al. Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. *J Med Genet*; 2008;45(4):228-32. doi:10.1136/jmg.2007.051839.
23. Coulter ME, Miller DT, Harris DJ, et al. Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genet Med*; 2011;13(9):770-6. doi:10.1097/GIM.0b013e31821dd54a.
24. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*; 2010;86(5):749-64. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
25. Manning M, Hudgins L, Professional P, et al. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*; 2010;12(11):742-5. doi:10.1097/GIM.0b013e3181f8baad.
26. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med*; 2011;13(9):777-84. doi:10.1097/GIM.0b013e31822c79f9.
27. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*; 2011;13(7):680-5. doi:10.1097/GIM.0b013e3182217a3a.