

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ PROGRAMI**

**JENERALİZE TONİK KLONİK NÖBETLİ EPİLEPSİ İLE
SCN1A, SCN2A VE KCNQ2 GENLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Zeynep AYTAÇ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL**



MANİSA-2015

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ PROGRAMI**

**JENERALİZE TONİK KLONİK NÖBETLİ EPİLEPSİ İLE
SCN1A, SCN2A VE KCNQ2 GENLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Zeynep AYTAÇ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL**



MANİSA-2015

**Zeynep
AYTAÇ**

**JENERALİZE TONİK KLONİK NÖBETLİ EPİLEPSİ İLE SCN1A,
SCN2A VE KCNQ2 GENLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

2015

TEZ ONAYI

Zeynep AYTAÇ tarafından hazırlanan "JENERALİZE TONİK KLONİK NÖBETLİ EPİLEPSİ İLE SCN1A, SCN2A ve KCNQ2 GENLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ" adlı tez çalışması 08.02.2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL**

Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Remziye DEVECİ**

Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Erdal BALCAN**

Celal Bayar Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Prof.Dr. Kenan DOST**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Zeynep AYTAÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epilepsinin Oluşum Mekanizmaları	3
2.2. Epilepsi Sınıflandırılması	6
2.2.1. Epilepsi Sendrom Sınıflandırılması	6
2.2.2. Epilepsi Nöbet Tiplerinin Sınıflandırılması.....	8
2.2.3. İdiyopatik Jeneralize Epilepsi	9
2.2.3.1. Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetli Epilepsi.....	9
2.3. İyon Kanalları ve İdiyopatik Jeneralize Epilepsi	9
2.3.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalları	10
2.3.1.1. Voltaj-Kapılı Sodyum İyon Kanalları	11
2.3.1.2. Voltaj-Kapılı Potasyum İyon Kanalları.....	12
2.3.2. İyon Kanalı Mutasyonları ve Jeneralize Tonik Klonik Nöbetli Epilepsi ile İlişkisi	13
2.3.2.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalı Mutasyonları.....	13
2.3.2.1.1. Voltaj-Kapılı Sodyum İyon Kanalı Mutasyonları.....	13
2.3.2.1.1.1. SCN1A (Voltaj-kapılı Sodyum İyon Kanalı, Tip 1 Alfa Altbirimi) Geni	13
2.3.2.1.1.2. SCN2A (Voltaj-kapılı Sodyum İyon Kanalı Tip 2 Alfa Altbirimi) Geni	14
2.3.2.1.2. Voltaj-Kapılı Potasyum İyon Kanalı Mutasyonları	14
2.3.2.1.2.1. KCNQ2 (Voltaj-Kapılı Potasyum, KQT-Benzeri Tip 2 Altbirimi) Geni	14
2.4. Tezin Amacı	15
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu	16
3.1.2. Kullanılan Kitler	16
3.1.3. Kullanılan Aletler.....	16
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.1.4.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu için Kullanılan GeneMATRIX Quick Blood DNA İzolasyon Kit'inde Bulunan Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.4.2. DNA İzolasyon Kitine İlave Edilen Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Kimyasal Maddelere İlave Edilen Maddeler	17
3.1.4.5. Agaroz Jel Elektroforez için Kullanılan Maddeler.....	18

3.2. Yöntem	18
3.2.1. DNA İzolasyonu	18
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
3.2.2.1. SCN1A Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	20
3.2.2.2. SCN2A Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	21
3.2.2.3. KCNQ2 Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
3.2.3. Agaroz Jel Elektropherez	23
3.2.4. DNA Dizi Analizi	24
3.2.5. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	25
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	27
4.1. Bulgular	27
4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu Bulguları	27
4.1.1.1. Hasta Grubu Bulguları	27
4.1.2. DNA Analizi ile İlgili Sonuçlar	28
4.1.2.1. DNA Miktar Tayini	28
4.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
4.1.4. DNA Dizi Analizi Bulguları	29
4.1.4.1. SCN1A Geni Bulguları	29
4.1.4.2. SCN2A Geni Bulguları	31
4.1.4.3. KCNQ2 Geni Bulguları.....	33
4.2. Tartışma.....	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
EKLER.....	42
EK 1. (Hasta grubundaki kişilerin DNA'larının nanodrop sonuçları)	42
EK 2. (Kontrol grubundaki kişilerin DNA'larının nanodrop sonuçları).....	43
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arjinin
ATL	Ailesel temporal lop
BNFN	Benign neonatal febril nöbet
ÇÇAE	Çocukluk çağı absans epilepsisi
DS	Dravet sendromu
EA	Epizodik ataksi
FN	Febril Nöbet
Glu (Q)	Glutamin
Gly (G)	Glisin
His (H)	Histidin
IJE	İdiyopatik jeneralize epilepsi
ILAE	Uluslararası Epilepsi ile Savaş Komisyonu
JAE	Juvenil absans epilepsi
JEFK+	Ateş nöbetleri olan jeneralize epilepsi
JEFK+ Tip1	Ateş nöbetleri olan jeneralize epilepsi, tip 1
JEFK+ Tip3	Ateş nöbetleri olan jeneralize epilepsi, tip 3
JME	Juvenil miyoklonik epilepsi
JTKN	Jeneralize tonik-klonik nöbetli epilepsi
K⁺	Potasyum iyonu
KCNQ2	M-tip potasyum kanalı geni
K_v	Voltaj-kapılı potasyum iyon kanalı
Leu (L)	Lösin
MES	Migren epilepsi sendromu
Met (M)	Metionin
Na⁺	Sodyum iyonu
Na_v	Voltaj-kapılı sodyum iyon kanalı
NFLE	Noktürnal frontal lob epilepsisi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCN1A	Sodyum kanalı α alt ünitesi geni
SCN2A	Sodyum kanalı α alt ünitesi geni
Val (V)	Valin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Epilepsinin etiyolojik sebeplerinin dağılımı	3
Şekil 2.2. Aksiyon potansiyelinin evreleri	5
Şekil 2.3. Voltaj-kapılı iyon kanalının genel yapısı	11
Şekil 3.1. MEGA program dizi analiz sonuç görüntüsü	25
Şekil 4.1. KCNQ2 geni, SCN1A geni ve SCN2A geni için hasta grubundan 5 kişinin DNA'ları ile yapılan PZR sonuçlarının jel görüntüsü.....	29
Şekil 4.2. SCN1A geninde 134436. nükleotidin G'ninden C'ine değişimini gösteren dizi analizi bulgusu	29
Şekil 4.3. SCN1A geninde 134272. nükleotidin A'den G'ne değişimini gösteren dizi analizi bulgusu	30
Şekil 4.4. SCN1A geninde 134347. nükleotidin G'ninden A'ne değişimini gösteren dizi analizi bulgusu	31
Şekil 4.5. SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizminin görülmesi beklenen bölgenin dizi analizi bulgusu	32
Şekil 4.6. SCN2A geninde 105649. nükleotidin A'den G'ne değişimini gösteren dizi analizi bulgusu	33
Şekil 4.7. KCNQ2 geninde 28704. nükleotidin T'den G'ne değişimini gösteren dizi analizi bulgusu	34

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. SCN1A geni için uygun bulunan primer çiftleri.....	20
Tablo 3.2. SCN1A geni için PZR yönteminde kullanılan analiz aşamaları.....	21
Tablo 3.3. SCN1A geni için uygun bulunan primer çiftleri.....	21
Tablo 3.4. SCN2A geni için PZR yönteminde kullanılan analiz aşamaları.....	22
Tablo 3.5. KCNQ2 geni için uygun bulunan primer çiftleri	22
Tablo 3.6. KCNQ2 geni için PZR yönteminde kullanılan analiz aşamaları	23
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubundaki kişilere ilişkin yaş ve cinsiyet dağılımı	27
Tablo 4.2. Hasta grubu verileri	28
Tablo 4.3. SCN1A geninde 134436. nükleotitte belirlenen yeni polimorfizm için genotipleme	30
Tablo 4.4. SCN1A geni rs765485870 polimorfizmi genotip sıklıkları.....	30
Tablo 4.5. SCN1A geni rs200263247 polimorfizmi genotip sıklıkları.....	31
Tablo 4.6. SCN2A geni rs188078595 polimorfizmi genotip sıklıkları.....	33
Tablo 4.7. KCNQ2 geni rs374252672 polimorfizmi genotip sıklıkları.....	34

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL'a,

Tezimle ilgili çalıőmamın laboratuvar aőamalarında bana yardımcı olan Arő. Gör. M.Burak BATIR'a,

Çalıőmamda gerekli finansal desteği Fen-2014-114 nolu projeyle sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP),

Çalıőmalarım sırasında manevi desteğini esirgemeyen, beni her zaman cesaretlendiren değerli arkadaőım Arő. Gör. Ayhan ŐEN'e,

Öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan canım annem Meyrem AYTAÇ ve babam Yaőar AYTAÇ'a yürekten teşekkür ederim.

Zeynep AYTAÇ
Manisa, 2016

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Jeneralize Tonik Klonik Nöbetli Epilepsi ile SCN1A, SCN2A ve KCNQ2 Genleri Arasındaki İlişki

Zeynep AYTAÇ

Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Programı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL

Jeneralize tonik-klonik nöbet (JTKN) tipli epilepsi idiyopatik jeneralize epilepsiler (IJE) arasında %14 civarında görülen bir hastalıktır. Yapılmış bazı *in vivo* çalışmalarda iyon kanal genlerinden SCN1A, SCN2A ve KCNQ2'deki polimorfizmlerin ve bu polimorfizmlerle ilgili genetik etkileşimin JTKN ile ilişki olduğu belirtilmektedir.

Bu çalışmada IJE'nin alt tiplerinden, JTKN nöbet tipli epilepsi hastalarında SCN1A (R1648H), SCN2A (GAL879-881QQQ) ve KCNQ2 (V182M) genlerindeki polimorfizmler ve bu polimorfizmler arasındaki genetik etkileşimin epilepsi nöbet tipi ile ilişkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza JTKN nöbet tipi epilepsili 75 hasta ve 75 sağlıklı kişi dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin kanlarından izole edilen DNA'lardan SCN1A geninin 26. eksonu, SCN2A geninin 19. eksonu, KCNQ2 geninin 9. eksonu polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PZR ürünlerine DNA dizi analizi yapıldı. Dizi analiz sonuçları MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programında analiz edildi. MEGA dizi analiz sonuçları istatistiksel olarak SHEsis programı ile değerlendirildi.

SCN1A geninde R1648H, SCN2A geninde GAL879-881QQQ, KCNQ2 geninde V182M polimorfizmlerini ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda taşıyan kişiye rastlanılmadı. SCN1A geninde yeni bir polimorfizm olan R1648P polimorfizmini hasta grubunda 1, kontrol grubunda 3 kişinin heterozigot olarak taşıdığı belirlendi. Ayrıca kontrol grubunda, SCN1A geninde 134272. nükleotide A>G polimorfizmini 1 kişinin ve 134347. nükleotide G>A polimorfizmini 1 kişinin heterozigot taşıdığı, hasta grubunda bu polimorfizmlerin olmadığı belirlendi.

SCN2A geninde kontrol grubunda 105649. nükleotide G>A polimorfizminin 1 kişide ve KCNQ2 geninde 28704. nükleotide T>G polimorfizminin 1 kişide olduğu, hasta grubunda bu polimorfizmlerin olmadığı belirlendi.

SCN1A geninde R1648H, SCN2A geninde GAL879-881QQQ, KCNQ2 geninde V182M polimorfizmlerinin ve çalışmamızda bulunmuş diğer polimorfizmlerin JTKN ile ilişkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: JTKN, Epilepsi, SCN1A, SCN2A, KCNQ2

2016, 61 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

The Association between Generalized Tonic-Clonic Seizures and SCN1A, SCN2A and KCNQ2 Genes

Zeynep AYTAÇ

**Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology
Molecular Biology Division**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin TUĞRUL

Generalized tonic clonic seizure (GTCS) epilepsy is a type of disease that constitute 14 % of idiopathic generalized epilepsy (IGE). Previous in vivo studies with generalized tonic clonic seizure (GTCS) epilepsy showed that there is relation between GTCS type of epilepsy and polymorphisms of SCN1A, SCN2A, KCNQ2 ion channel genes.

In this study it was aimed to investigate the relation between the genetic mutations of ion channel genes, SCN1A (R1648H), SCN2A (GAL879-881QQQ), KCNQ2 (V182M), and GTCS epilepsy the subtype of IGE. Besides, the relation in between these genes were also investigated.

In this study, 75 GTCN epilepsy patients and 75 healthy people as control were included. DNA's of patients and controls were isolated and 26. exon of SCN1A, 19. exon of SCN2A, 9. exon of KCNQ2 genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). PCR products were sequenced and results were analyzed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program. These analysis were statistically evaluated by SHEsis software program.

SCN1A (R1648H), SCN2A (GAL879-881QQQ) and KCNQ2 (V182M) polymorphisms were not determined neither in patient nor in control group. R1648P was determined as a new polymorphism of SCN1A gene that found at 1 person in patient group and 3 people in control group as heterozygous. Also in SCN1A gene 134272 A>G polymorphism was determined at 1 person and 134347 G>A polymorphism was determined at another person as heterozygous in control group.

Also 105649 G>A polymorphism of SCN2A gene was determined at 1 person in control group and 28704 T>G polymorphism of KCNQ2 gene was determined at 1 person in control group

According to our findings, there was no any relationship of GTCS epilepsy with SCN1A (R1648H), SCN2A (GAL879-881QQQ) and KCNQ2 (V182M) polymorphisms and polymorphisms determined in this study.

Keywords: GTCS, Epilepsy, SCN1A, SCN2A, KCNQ2

2016, 61 pages

1. GİRİŞ

Epilepsi genel popülasyonun yaklaşık %1'ini etkileyen ve en sık rastlanılan nörolojik hastalıklardan biridir [1]. Epileptik sendromların ortaya çıkış nedenlerinin yaklaşık %65'i idiyopatikdir [2]. Jeneralize tonik-klonik nöbetler (JTKN) uyku ile ilişkili olmayan, gün içinde herhangi bir zamanda görülebilen bir idiyopatik jeneralize epilepsi formudur. JTKN idiyopatik jeneralize epilepsiler arasında %14 civarında görülmektedir [3].

Epileptogenez sürecinin kanal patolojilerine bağlı olduğu yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur. IJE sendromlarıyla ilişkili farklı iyon kanal alt birimleri vardır. İyon kanallarından voltaj-kapılı kanallar ve ligand-kapılı kanallardan sorumlu genlerin bir kısmı epilepsinin farklı formlarıyla ilişkilendirilmiştir [1,4].

Voltaj-kapılı sodyum iyon kanalları nöron içi sinyal iletimini sağlayan aksiyon potansiyelinin başlaması ve ilerlemesi için önemlidir. Kanalı oluşturan kısımlardan birinde görülen anormallik aksiyon potansiyelinin ilerlemesinde sorunlara neden olmaktadır. Alt birimlerle ilişkili özellikle SCN1A, SCN2A ve SCN8A genlerindeki anomalilerin IJE ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [5].

Voltaj-kapılı potasyum iyon kanalı ile ilişkili mutasyonlar, kanal oluşumunda ve protein kararlılığında bozukluğa, depolarizasyon aralığının kaymasına, kanal aktivasyonunun ve inaktivasyonunun yavaşlamasına neden olmaktadır. Bugüne dek yapılan çalışmalarda voltaj kapılı potasyum iyon kanal geni KCNQ2'de epilepsiye neden olan mutasyonlar bulunmuştur [6,7].

Hawkins ve arkadaşları SCN1A geninde R1648H polimorfizmini, SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmini, KCNQ2 geninde V182M polimorfizminin JTKN ile ilişkisini araştırmış ve SCN1A ve SCN2A genindeki polimorfizimleri birlikte taşıyan farelerde JTKN ile genetik etkileşim arasında bağlantı olabileceğini göstermişlerdir [8]. Kearney ve arkadaşları tarafından SCN2A geninde GAL879-881QQQ ve KCNQ2 geninde V182M polimorfizimleri incelenmiş, bu 2 polimorfizmi birlikte taşıyan farelerde, bu polimorfizmler arasındaki genetik

etkileşimin JTKN ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir [1].

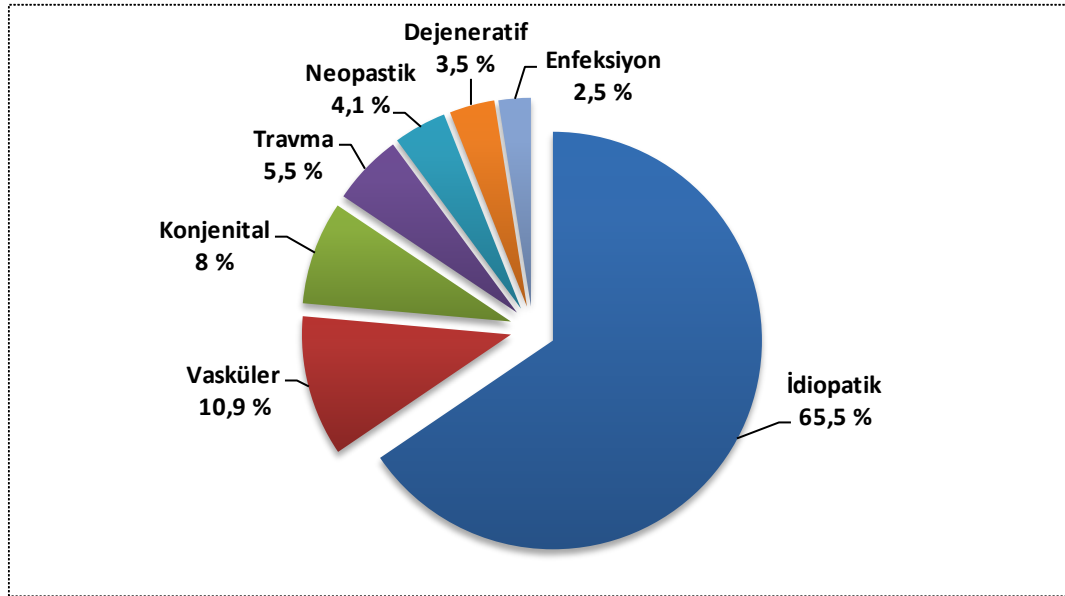
Yaptığımız literatür araştırmasında, JTKN tipi epilepsi ile SCN1A ile SCN2A gen polimorfizm etkileşimi ve SCN2A ile KCNQ2 gen polimorfizmi etkileşiminin hastalıkla ilişkisi olduğunu belirten, fareler üzerinde yapılmış bu iki *in vivo* çalışmanın insanlar üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda IJE alt tiplerinden JTKN nöbetli 75 kişide SCN1A geninde R1648H polimorfizmi, SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmi, KCNQ2 geninde V182M polimorfizminin ve bu genler arasındaki genetik etkileşim belirlenebilirse JTKN nöbet tipli epilepsinin ortaya çıkmasında etkisinin olup olmadığı, ayrıca çalışma grubumuzda incelenen genlerde hastalıkla ilişkili yeni polimorfizmlerin belirlenip belirlenemeyeceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsinin Oluşum Mekanizmaları

Epilepsi tekrarlayan nöbetlerle karakterize olan merkezi sinir sistemi hasarıdır [9]. Epileptik nöbet ise beyinde aşırı nöron deşarjları sonucunda ortaya çıkmaktadır. Uzun yıllardır bilinen bir hastalık olması nedeniyle çok sayıda araştırma yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda epilepsiye neden olan etkenler belirlenmiştir (Şekil 2.1). Epilepsiye neden olan etken klinik veya laboratuvar bulgularıyla saptanabiliyorsa bu epilepsiler semptomatik epilepsi olarak sınıflandırılmaktadır [10]. Semptomatik epilepsi sınıfında yer alan epilepsilere travma, enfeksiyon, doğuştan kaynaklanan bozukluklar neden olabilmektedir [5,2]. Epilepsinin etiyolojik sebeplerinin yaklaşık %35'ini semptomatik epilepsiye neden olan etkenler, etiyolojik sebeplerinin kalan %65'lik kısmı idiyopatik epilepsi oluşturmaktadır [2]. İdiyopatik epilepsilerin temelinde yatan etmenler tam olarak bilinmemektedir ancak bu epilepsilerde birden fazla genin rol aldığı ve epilepsinin kompleks kalıtımla nesiller arası aktarıldığı düşünülmektedir [10].



Şekil 2.1. Epilepsinin etiyolojik sebeplerinin dağılımı

Epileptik nöbet sırasında aşırı deşarj olan nöronlar, sinir sisteminin yapı taşıdır. Nöronlar, aksiyon potansiyelleri aracılığı ile bilgiyi hücrenin bir kısmından

diğer kısmına iletmektedir. Aksiyon potansiyeli, bir hücre zarının fiziksel, kimyasal veya elektriksel bir uyarı ile uyarılması, zarın iki tarafındaki iyon dağılımının değışmesi ve ortaya çıkan elektriksel potansiyelin akson boyunca iletilmesidir. Aksonun en uç noktasına kadar iletilen elektriksel ileti (sinir uyarısı), sinapslarda nörotransmitterler aracılığı ile kimyasal iletiye çevrilmektedir [11]. Bu kimyasal ileti, diğer sinir hücresinde elektriksel iletiyi başlatmaktadır. Diğer sinir hücreleri boyunca da bu döngüye uygun şekilde bilgi iletimi sağlanmaktadır.

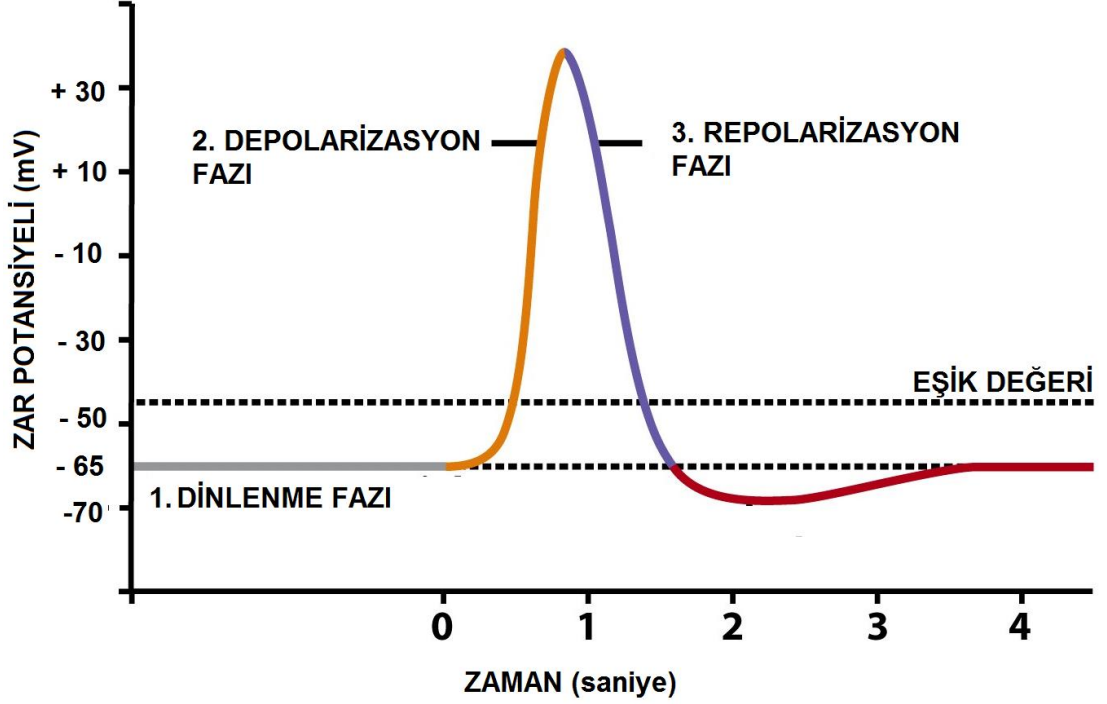
Elektriksel potansiyelin akson boyunca iletilmesinde iyon kanalları görev almaktadır. İyonlar, iyon kanalları aracılığıyla hücre içine veya hücre dışına akarak büyük voltaj değışikliklerinin oluşmasına neden olmaktadır. İyon geçişlerinde kapısız iyon kanalları, voltaj-kapılı iyon kanalları ve ligand-kapılı iyon kanalları rol oynamaktadır. Kapısız iyon kanalları hücre zarı dinlenme fazındayken sodyum iyonlarının (Na^+) hücre içine, potasyum iyonlarının (K^+) hücre dışına çıkmasını sağlamaktadır. Ligand-kapılı iyon kanalı ve voltaj-kapılı iyon kanalları belirli durumlarda açılarak iyon geçişine izin vermektedir [11].

Elektriksel potansiyel akson boyunca iletilirken birbirini izleyen üç faz görülmektedir:

1) Dinlenme Fazı: Bu fazda zar potansiyeli yaklaşık -65 milivolt değerindedir [12]. Zar potansiyelinin sabit kalabilmesi için kapısız iyon kanallarından sürekli Na^+ ve K^+ iyon geçişi olmaktadır [11]. Sinir hücresi zarı ‘polarize’ durumdadır ve sinyal iletimi gerçekleşmez (Şekil 2.2).

2) Depolarizasyon Fazı: Sinir hücresi bir uyarı tarafından uyarıldığında, uyarının alındığı bölgedeki zar potansiyeli ani değışiklik gösterir. Bu değışikliğe bağlı olarak hücre içi pozitif, hücre dışı negatif duruma geçer. Bu değışikliğin gerçekleşmesinde Na^+ iyonları görev alır. Hücre dışında, hücre içine kıyasla fazla olan Na^+ iyonları, Na^+ kanallarının açılmasıyla hücre içine girmeye başlar ve milisaniyeler kadar kısa sürede zar potansiyeli +35 milivolt değerine yükselir (Şekil 2.2) [13]. Bu olay ‘depolarizasyon’ olarak adlandırılır. Depolarize olan bölge, depolarize olmamış komşu bölgeleri uyararak uyarının iletimini sağlar. Depolarize olan bölge daha sonra ‘repolarizasyon’ fazına geçer.

3) Repolarizasyon Fazı: Na^+ iyon geçişinden sonra sodyum kanalları kapanmaya başlar ve potasyum kanalları normaldeki haline göre daha fazla açılarak K^+ iyonunun hücre dışına çıkmasını sağlar. Böylece dinlenme fazındaki -65 milivolt zar potansiyeli elde edilmiş olur (Şekil 2.2) [12].



Şekil 2.2. Aksiyon Potansiyelinin Evreleri

Nöron boyunca ve nöronlar arasında sinyal iletiminin gerçekleşmesinin temelinde iyon kanalları görev aldığı için, bu kanallarda olabilecek bir mutasyon iyon kanalların işlevini doğru olarak yerine getirememesine neden olmaktadır. Bu nedenle nöronlar arasındaki denge bozulmakta ve anormal nöron deşarjları sonucunda epileptik nöbetler ortaya çıkmaktadır [14].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda epilepsiyle ilişkili birçok gen bulunmuştur. Bu genlerin birçoğu nöronlarda sinyal iletiminde rol oynayan sodyum ve potasyum kanallarından sorumlu genlerdir. Sodyum ve potasyum kanallarından sorumlu bir gende görülen mutasyon veya birden fazla gende görülen mutasyonlar farklı epilepsi sendromlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır [1].

2.2. Epilepsinin Sınıflandırılması

Bugüne dek yapılan çalışmalar sonucunda epilepsinin birçok formu bulunmuştur. Bir düzen sağlayabilmek, bilimsel araştırma sonuçlarının karşılaştırılmasına ve değerlendirilmesine yardımcı olmak için ortak bir sınıflandırma sistemi oluşturulmaya çalışılmıştır [2]. Epilepsi uzmanları bir araya gelerek ILAE (International League Against Epilepsy, Uluslararası Epilepsi İle Savaş Komisyonu) isminde bir topluluk oluşturmuş ve epilepsi sendrom sınıflandırmasıyla ilgili çalışmalar yapmışlardır.

2.2.1. Epilepsi Sendrom Sınıflandırılması

Epilepsi sendromları için sınıflandırma yapılırken nöbet tipi, ilk nöbetin görüldüğü yaş, nöbeti ortaya çıkarıcı etmenler, nöbetlerin tekrarlama sıklığı, nöbetin şiddeti, elektroensefalogram (EEG) gibi özellikler dikkate alınmıştır [15, 2, 16].

ILAE'nin yaptığı sınıflandırmaya göre epilepsiler aşağıdaki şekilde gruplanmıştır [17].

A. Lokalizasyona bağlı epilepsiler ve sendromlar

1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- a) Sentrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- b) Oksipital paroksizmlili çocukluk çağı epilepsisi
- c) Primer okuma epilepsisi

2. Semptomatik

- a) Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsialis kontinuası
- b) Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar
- c) Temporal lob epilepsi
- d) Frontal lob epilepsi
- e) Parietal lob epilepsi
- f) Oksipital lob epilepsi

3. Kriptojenik

B. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır)

- a) Selim ailesel yenidoğan konvülsiyonları
- b) Selim yenidoğan konvülsiyonları

- c) Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi
 - d) Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)
 - e) Jüvenil absans epilepsisi
 - f) Jüvenil miyoklonik epilepsisi (impulsif petit mal)
 - g) Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsisi
 - h) Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler
 - i) Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler
2. Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)
- a) West sendromu
 - b) Lennox-Gastaut sendromu
 - c) Miyoklonik astatik nöbetli epilepsisi
 - d) Miyoklonik absanslı epilepsisi
3. Semptomatik
- a) Nonspesifik etyoloji
 - Erken miyoklonik ensefalopati
 - (Supression-burst)'lu erken infantil epileptik ensefalopati
 - Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler
 - b) Spesifik sendromlar
- C. Fokal veya jeneralize oldukları belirlenemeyen epilepsiler
1. Hem jeneralize hem fokal konvülsiyonlu epilepsiler
- a) Yenidoğan konvülsiyonları
 - b) Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi
 - c) Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsisi
 - d) Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
 - e) Diğer belirlenemeyen epilepsiler
2. Jeneralize veya fokal konvülsiyon özelliği olmayanlar
- D. Özel sendromlar
1. Duruma bağlı nöbetler (Gelegenheitsanfaelle)
- a) Febril konvülsiyonlar
 - b) İzole nöbet veya izole status epileptikus
 - c) Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler(alkol, ilaçlar, nonketotik hperglisemi)

2.2.2. Epilepsi Nöbet Tiplerinin Sınıflandırılması

Uluslararası Epilepsi İle Savaş Komisyonu epileptik nöbet tiplerini sınıflandırarak 1993 yılında yayınladığı sınıflandırma sistemine göre nöbetleri parsiyel ve jeneralize olmak üzere iki gruba ayırmıştır.

ILAE'nin yaptığı sınıflandırmaya göre epileptik nöbetler:

A. Parsiyel nöbetler (fokal başlangıçlı nöbetler): Beyinde anormal elektriksel boşalma sonucunda beynin sağ veya sol bölgesi etkilenmekte, bu da vücudun bir bölgesinin etkilenmesine neden olmaktadır [18].

1. Basit parsiyel nöbetler: Bilinç kaybı görülmemektedir.

a) Motor belirtilerle

b) Duyumsal ya da özel duyumsal semptomlarla

c) Otonomik belirti ve bulgularla

d) Psikik bulgularla

2. Kompleks parsiyel nöbetler: Bilinç kaybı görülmektedir.

a) Basit parsiyel olarak başlayan nöbetler

b) Başlangıçtan itibaren bilinç bozulması ile birlikte olan nöbetler

3. Parsiyel başlayıp sekonder jeneralize olan nöbetler

B. Jeneralize nöbetler: Beyinde anormal elektriksel boşalma sonucunda beynin sağ ve sol bölgeleri etkilenmekte, dolayısıyla nöbet tüm vücutta etkili olmaktadır [18].

1. Absans nöbetler: En sık görülen jeneralize epilepsi nöbetidir. Bu nöbet aurasızdır, aniden başlar ve biter, yaklaşık 5-20 saniye kadar sürmektedir. Nöbetten sonra kişi yapmakta olduğu işe devam edebilmektedir. Özellikle kişi heyecanlandığında daha sık görülmektedir [19].

2. Myoklonik nöbetler: Özellikle kol kaslarında refleks gibi ani kasılmalar gözlemlenmektedir. Bazen bacaklarda da aynı kasılmalar gözlemlenebilir. Eğer miyokloniler şiddetli olursa hasta dengesini kaybederek yere düşebilir [18,19].

3. Klonik nöbetler: Vücudun bir yarısında titremeler görülür [18].

4. Tonik nöbetler: Hastanın tüm kasları kaskatı olur ve hasta yere düşer [18].

5. Tonik - klonik nöbetler: Bu nöbet tipinde tonik ve klonik olarak 2 faz bulunmaktadır. Tonik fazda hasta ani şuur kaybı ile yere düşer, kol ve bacaklarında kasılmalar görülür. Yaklaşık bir dakika süren tonik fazdan sonra, klonik faza geçiş

görülür. Şuur kaybının devam ettiği klonik fazda hasta bulunduğu yerde titremeye başlar. Nöbetten sonra hastanın bilincinin açılması ve kendine gelmesi en fazla 1 saat sürer. Nöbetin etkisiyle hastada yorgunluk ve kas ağrısı görülmektedir [19].

6. Atonik nöbetler: Bu nöbet tipinde kaslarda gevşeme olur ve hasta yere yığılır. Kısa sürede hasta kendini toparlar ve yerinden kalkabilir [18].

C. Sınıflandırılmayan nöbetler

2.2.3. İdiyopatik Jeneralize Epilepsi

Epileptik sendromların ortaya çıkış nedenlerinin yaklaşık %65'i idiyopattır [2]. İdiyopatik epilepsilerde beyin travması, enfeksiyon gibi nedenler olmadan her yaşta epileptik nöbetler görülmektedir [20,21]. İdiyopatik epilepsilerin temelini genetik bozukluklar oluşturmaktadır [20]. Kromozomal bozukluklar, tek gen defektleri idiyopatik epilepsilerin temelindeki genetik bozukluklardan bir kaçıdır [22].

2.2.3.1. Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetli Epilepsi

Jeneralize tonik-klonik nöbetler (JTKN) uyku ile ilişkili olmayan, gün içinde herhangi bir zamanda görülebilen bir idiyopatik jeneralize epilepsi formudur. İdiyopatik jeneralize epilepsiler arasında %14 civarında görülmektedir [3]. Miyoklonik nöbetler gibi diğer nöbetlerle birlikte olabilir ya da bunları takiben görülebilir [23]. Diğer nöbetlerle birlikte görüldüğünde JTKN diğer nöbetten daha belirgin olabilmektedir [3].

JTKN'in tonik ve klonik olmak üzere iki evresi vardır. Nöbet geçiren kişi tonik fazda bilinci kapalı bir şekilde yere düşer, kasları kasılı bir şekilde, yerde 10-30 saniye arasında kalır. Tonik fazın sonrasında başlayan klonik fazda hastada şiddetli titremeler görülür. 30-60 saniye süren bu fazdan sonra hastanın kasları gevşer ve bilinci kapalı şekilde bir süre yatar. JTKN'lerin bazılarında nöbet başlangıcında parlayan ışıklar, görsel şekiller görülebilir; bazı sesler duyulabilir [23].

2.3. İyon Kanalları ve İdiyopatik Jeneralize Epilepsi

İyon kanalları sinir sisteminde, iskelet ve kalp kası gibi uyarılabilir dokularda, uyarılabilirliği kontrol eden temel yapılardır [24]. İyon kanalları membranın lipid çift

tabakasını keserek, sodyum, potasyum, kalsiyum gibi iyonların membran boyunca geçişini seçici geçirgen özelliğiyle sağlar. Kanallardaki bu seçici geçirgen özellik aksiyon potansiyeli sırasında değişen membran voltajı ile kontrol edilmektedir [14].

Epileptogenez sürecinin kanal patolojilerine bağlı olduğu yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur. IJE sendromlarıyla ilişkili olduğu bulunmuş fazla sayıda iyon kanal alt birimi vardır. Ayrıca son yıllarda non-iyon kanallarındaki mutasyonların da epilepsiye neden olabileceği bulunmuştur. İyon kanallarından voltaj-kapılı kanallar ve ligand-kapılı kanallardan sorumlu genlerin bir kısmı ve non-iyon kanallarında görev alan genlerin bir kısmı epilepsinin farklı formlarıyla ilişkilendirilmiştir [1, 4].

Bugüne dek yapılan çalışmalarda epilepsiyle ilişkili olduğu bulunan çok sayıda gen tespit edilmiştir. Bu genlerin, voltaj - kapılı iyon kanallarını ve ligand - kapılı iyon kanallarını oluşturan proteinlerin alt birimlerini kodlayan genler olduğu bulunmuştur [9, 25]. Epilepsi iyon kanalları ile ilişkilendirilmiş olduğu için bir kanalopati hastalığı olarak bilinmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar çeşitli yollarda nöronların uyarılabilirliğini değiştirmektedir. Bu mutasyonların çoğu sinaps bölgelerinde postsinaptik duyarlılığı ve nörotransmitter madde salınımını değiştirir. Ayrıca nöronlarda aksiyon potansiyelinin iletimi sırasında görülen depolarizasyon süresini uzatır [26].

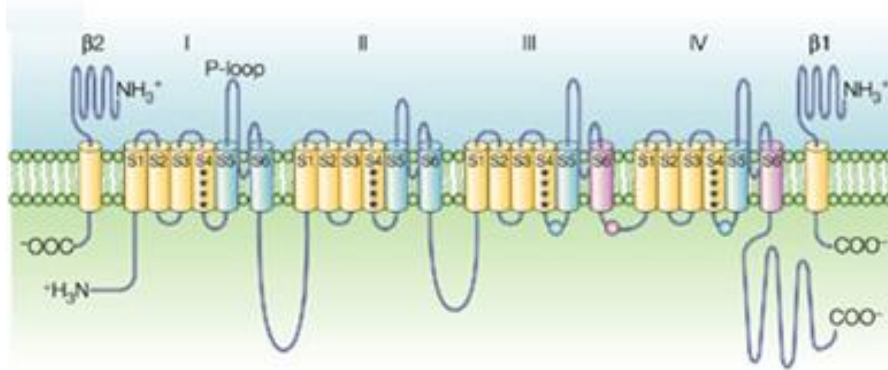
İyon kanalları sodyum (Na^+), potasyum (K^+), klorid (Cl^-) ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının seçici olarak geçişine izin veren membrandaki porlardır. Temel olarak voltaj kapılı ve ligand kapılı iyon kanalları olmak üzere iki tiptedirler [9].

Çalışmamız voltaj kapılı iyon kanallarından sodyum ve potasyum kanalları ile ilgili olduğu için, bu kanallara ilişkin bilgiler verilmektedir.

2.3.1. Voltaj-Kapılı İyon Kanalları

Voltaj-kapılı iyon kanalları nöronların aksonları boyunca ve akson uçlarında bulunur. Bu kanallar aksiyon potansiyelinin başlamasını ve çoğalmasını sağlarlar. Ayrıca nörotransmitter madde salınımında da görev alırlar [27].

Voltaj-kapılı iyon kanalları birden fazla alt üniteden oluşurlar. Temel alt birim olan α -alt ünitesi, küçük eklenti alt üniteler olan β , γ , δ alt üniteler birleşerek iyon kanalını oluşturur [28]. α -alt ünitesi kanalın por kısmını oluştururken, eklenti üniteler ise kanalın işlevini değiştirirler. α -alt ünitesi birbirinin homoloğu olan 4 yapıdan oluşmaktadır. Bu 4 yapının her biri 6 segmentten (S1-S6) oluşmaktadır. Bütün voltaj-kapılı iyon kanallarının 4. segmentleri (S4) voltaja duyarlıdır, 5. ve 6. segmentler (S5, S6) ise kanalda filtre görevi görerek kanal içinden geçen iyonların seçimini sağlamaktadırlar (Şekil 2.3) [29].



Şekil 2.3. Voltaj-kapılı iyon kanalının genel yapısı [30]

Voltaj-kapılı iyon kanalları 3 farklı fazda bulunurlar: kapıların açık olduğu faz, kapıların kapalı olduğu faz ve inaktif olduğu faz. Hücre dinlenme halindeyken, hücre membranının dış yüzeyi pozitif, iç yüzeyi ise negatiftir. Bu durumda iyon kanal kapıları kapalıdır ve iyon geçişi olmamaktadır. Hücre membranının potansiyelinde değişiklik olması kanalda yapısal değişikliğe neden olur ve iyon kanalı kapıları açılır. Kanal kapılarının açılmasıyla iyon geçişleri görülür. Bu olaydan sonra kapılar geçici olarak inaktif faza geçerler. Bu sırada membran potansiyeli iyon kanal kapılarının kapalı olduğu zamanki değere geldiğinde hücre dinlenme haline geçer [24].

2.3.1.1. Voltaj-Kapılı Sodyum İyon Kanalları

Voltaj-kapılı sodyum iyon kanallarının en önemli görevi nöronların uyarılabilirliği için aksiyon potansiyelinin başlamasını ve devam etmesini

sağlamaktır [25]. Voltaj-kapılı sodyum iyon kanalları, membran potansiyeline duyarlı yapıları sayesinde dışarıdan bir uyarın geldiğinde gerçekleşen voltaj değişikliklerine anında cevap vermektedir. Voltaj değişikliği nedeniyle kanalın kapıları açılır ve Na⁺ iyon geçişi görülür. Kanal kapılarının açılmasıyla aksiyon potansiyeli oluşumu başlamış olur. Na⁺ iyon geçişi görülen yerde membran depolarize olur ve komşu bölgelerdeki Na⁺ kanal kapıları da membran potansiyelinden etkilenerak açılır ve Na⁺ iyon geçişi görülür. Bu şekilde aksiyon potansiyelinin devamlılığı sağlanır [31].

Voltaj-kapılı sodyum iyon kanalları üç alt birimden oluşmaktadır. α alt birimler birleşerek kanalın por kısmını oluşturmakta, iki tane β alt birim de kanalın kinetiğini kontrol etmektedir [32]. Voltaj-kapılı iyon kanallarının α ve β alt birimlerinin her ikisinin de epilepsiyle bağlantılı olduğu bulunmuştur [25]. α alt birimler birbirinin homoloğu olan dokuz gen tarafından kodlanan 4 transmembran yapıdan oluşmaktadır [25, 5]. Her bir transmembrane yapı 6 adet segment içermektedir. β alt birimler 4 gen tarafından kodlanmaktadır. Bu alt birimler kanal kapılarının açılıp kapanmasını ve kanal içinden geçecek iyonların kontrolünü yapmaktadırlar [32].

Kanalın α alt birimleri dokulara özel olarak eksprese edilmektedir. Sodyum kanallarının α alt birimlerinden sorumlu genlerden SCN4A çizgili kaslarda eksprese edilirken, SCN5A kalp kasında eksprese edilmektedir. Ayrıca SCN1A, SCN2A, SCN3A ve SCN8A genleri de beyinde ekspres edilmektedir ve yapılan çalışmalarda epilepsiyle ilişkili olduğu bulunmuştur [5]. Ayrıca β alt birimlerde sorumlu olan SCN1B geninin de epilepsiyle ilişkili olduğu bulunmuştur [33].

2.3.1.2. Voltaj-Kapılı Potasyum İyon Kanalları

Voltaj-kapılı potasyum iyon kanalları (K_v), KCNQ olarak isimlendirilen genler tarafından kodlanmaktadır [34]. Bu kanallardaki iyon akışı aksiyon potansiyelinin başlamasını ve nöron boyunca ilerlemesini sağlamaktadır [35]. K_v kanalları özellikle beyin ve kalpte yoğun şekilde eksprese edilmektedir [34].

K_v kanalları α ve β alt birimlerinden oluşur. α alt birimleri kanalın por kısmını oluşturmaktadır ve bu α alt birimler, β alt birimler ile bağlantı kurarak K_v kanalını oluşturmaktadır. Birbirinden farklı 9 α alt birim vardır. Bu α alt birimlerin her biri 6 transmembran segment (S1-S6) içermekte ve 4 tane α alt birim, K_v kanalı oluşturmak için bir araya gelmektedir. Sodyum iyon kanallarında olduğu gibi potasyum iyon kanallarının da dördüncü segmenti (S4) voltaja duyarlıdır [36]. K_v kanalı seçici geçirgen özelliği sayesinde membran potansiyelinde değişime duyarlılık göstererek potasyum iyonlarının kanal içerisinden hücre içine veya hücre dışına geçmesine izin vermektedir [35].

2.3.2. İyon Kanalı Mutasyonları ve Jeneralize Tonik Klonik Nöbetli Epilepsi ile İlişkisi

Bugüne dek yapılan çalışmalarda epilepsi nöbetlerinin iyon ve non-iyon kanallarındaki anormallikler sonucu ortaya çıktığı bulunmuş ve iyon kanallarında çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

2.3.2.1. Voltaj Kapılı İyon Kanal Mutasyonları

2.3.2.1.1. Sodyum İyon Kanalı Mutasyonları

Voltaj-kapılı sodyum iyon kanalları nöron içi sinyal iletimini sağlayan aksiyon potansiyelinin başlaması ve ilerlemesi için önemlidir. Kanalı oluşturan kısımlardan birinde görülen anormallik aksiyon potansiyelinin ilerlemesinde sorunlara neden olmaktadır. Özellikle SCN1A, SCN2A ve SCN8A genlerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır [5].

2.3.2.1.1.1. SCN1A (Voltaj-kapılı Sodyum İyon Kanalı, Tip 1 Alfa Altbirimi) Geni

SCN1A geni 2q24 bölgesinde yer almaktadır. SCN1A gen ürünü olarak Nav1.1 proteini oluşmaktadır [37]. Nav1.1 proteini voltaj-bağımlı sodyum iyon kanalının uygun koşullarda hızlı inaktive olmasını sağlamaktadır [25]. SCN1A geni merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde yoğun olarak eksprese edilirken, kalp kas hücrelerinde ekspresyon seviyesi düşüktür [37].

Yapılan çalışmalarda kalıtsal ve sporadik olarak aktarılan epilepside rol aldığı bulunmuş en önemli genlerden biridir [4]. Epilepsinin farklı formlarının ortaya çıkmasına neden olan 150'ye yakın mutasyon bulunmuştur [37]. Bu mutasyonların bir kısmı budanmış protein oluşumuna neden olmaktadır. Diğer bir kısmı yanlış baz eşleşmesi mutasyonlarıdır. Yanlış baz eşleşme mutasyonları nedeniyle fonksiyon kaybına uğramış proteinler oluşmaktadır. Mutasyonların ortaya çıktığı gen bölgesine göre ve mutasyon çeşidine göre kişilerde farklı epilepsi sendromları görülmektedir [5]. Bu güne dek yapılan çalışmalarda SCN1A genindeki mutasyonların DS, JEFK+, FN epilepsi sendromlarının ortaya çıkmasında etkili olduğu görülmektedir [7].

2.3.2.1.1.2. SCN2A (Voltaj-kapılı Sodyum İyon Kanalı, Tip 2 Alfa Altbirimi) Geni

SCN2A geni 2q24 kromozomal bölgesinde bulunmaktadır. SCN2A gen ürünü olarak Nav 1.2 proteinini oluşturmaktadır [37].

SCN2A geninde yapılan çalışmalarda epilepsinin farklı formlarına neden olan birçok mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyonların bir kısmı yanlış baz eşleşmesi mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar sonucunda nöronlarda sinyal iletimi sırasındaki hiperpolarizasyon aralığında kayma görülmekte, bu durum da iyon kanalının kapılarının erken açılmasına neden olmaktadır. Her bir mutasyonun kanalın işlevini değiştiren farklı etkileri vardır, bu nedenle de ortaya farklı nöbet tipleri çıkmaktadır [4].

2.3.2.1.2. Voltaj-Kapılı Potasyum İyon Kanalı Mutasyonları

2.3.2.1.2.1. KCNQ2 (Voltaj-Kapılı Potasyum, KQT-Benzeri Tip 2 Altbirimi) Geni

KCNQ2 geni 20q13.3 bölgesinde bulunmaktadır. Gen 18 ekzondan oluşmaktadır ve 50kb uzunluğundadır. KCNQ2 geni Kv7.2 olarak isimlendirilen proteini kodlamaktadır [38].

Bugüne dek yapılan çalışmalarda KCNQ2 geninde epilepsiye neden olan mutasyonlar bulunmuştur. Bu mutasyonlar kanal oluşumunda ve protein kararlılığında bozukluğa, depolarizasyon aralığının kaymasına, kanal aktivasyonunun ve inaktivasyonunun yavaşlamasına neden olmaktadır. Bu mutasyonlar sonucu kanalın içinden geçen iyon miktarı olması gerekenden farklı olmaktadır ve nöronlarda sinyal iletiminde sorunlar görülmektedir [6,7]. KCNQ2 genindeki mutasyonlar Selim ailesel yenidoğan konvülsyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır [7].

2.4. Tezin Amacı

Çalışmamızda IJE alt tiplerinden JTKN nöbetli 75 kişide SCN1A geninde R1648H polimorfizmi, SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmi, KCNQ2 geninde V182M polimorfizminin ve bu genler arasındaki genetik etkileşim belirlenebilirse JTKN nöbet tipli epilepsinin ortaya çıkmasında etkisinin olup olmadığı, ayrıca çalışma grubumuzda incelenen genlerde hastalıkla ilişkili yeni polimorfizmlerin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışmamızda SCN1A geninde R1648H polimorfizmi, SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmi ve KCNQ2 geninde V182M polimorfizmi idiyopatik jeneralize epilepsili 75 hasta ve 75 kişilik sağlıklı kontrol gurubunda karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda bulunan her bireye çalışmaya kendi rızalarıyla katıldıklarını belgelemek amacıyla gönüllü onam formu doldurulmuş, imzalatılmış ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınarak çalışma tamamlanmıştır.

Hasta Grubu: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvurmuş, JTKN tipi epilepsi tanısı konmuş 24 ile 75 yaş arasındaki 75 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir hastadan 3 ml kan örneği EDTA'lı tüplere alınmıştır.

Kontrol Grubu: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvurmuş, epilepsi ve migren tanısı olmayan 24 ile 75 yaş arasındaki 75 sağlıklı kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir sağlıklı kişiden 3 ml kan örneği EDTA'lı tüplere alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kitler

Kandan genomik DNA izolasyonu için GeneMATRIX QUICK BLOOD DNA İzolasyon Kiti (Polonya) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Aletler

Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)

Elektroforez Güç Kaynağı (Nyx Teknik, Tayvan)

Hassas terazi (Kern, Almanya)

Jel Görüntüleme Cihazı (Ave Ene, Tayvan)

Mikrodalga fırın (Premier, Çin)

Mikropipet Seti (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl ölçüm aralığında) (Ergo One, Almanya)

Mikrosantrifüj Cihazı (Biosan-combi spin, Letonya)

Nanodrop ölçüm cihazı (Maestro Gen, Amerika)

PCR cihazı (Techne, İngiltere)

PCR cihazı (Nyx Teknik, Amerika)

Soğutucu (Arçelik, Türkiye)

Vorteks (Vortex IR, İtalya)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.4.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu için Kullanılan GeneMATRIX Quick Blood DNA İzolasyon Kit'inde Bulunan Kimyasal Maddeler

QB tampon (buffer)

Proteinaz K

QBX1 yıkama (wash) tamponu (buffer)

QBX2 yıkama (wash) tamponu (buffer)

3.1.4.2. DNA İzolasyon Kitine İlave Edilen Kimyasal Maddeler

Absolute ethanol (Qiagen, Almanya)

Nukleaz-free bidistile su (Qiagen, Almanya)

3.1.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Kimyasal Maddeler

10X Reaksiyon Tamponu (0,8M Tris-HCl, 0,2M (NH₄)₂SO₄)

MgCl₂ solüsyonu, 25 mM

dNTP karışımı,

HotStart Taq DNA Polimeraz Enzimi

3.1.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Kimyasal Maddelere İlave Edilen Maddeler

Nukleazsız bidistile su (Qiagen, Almanya)

3.1.4.5. Agaroz Jel Elektroforez için Kullanılan Maddeler

50X TAE Tampon, (0,04M Tris, 0,04 M Asetat, 0,001 M EDTA) (BM Laboratuvar Sistemleri, Türkiye)

Agaroz (Bioshop, Kanada)

Nukleaz-free bidistile su (Qiagen, Almanya)

Floresan Nükleik Asit Boyası (Tibogold, Türkiye)

Belirteç DNA (Tibo gold, Türkiye)

SimplySafe (EURX, Polonya)

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu

Hasta ve Kontrol Grubunda bulunan 75 IJE hastası ve 75 sağlıklı bireylerden alınan kanlar, çalışma anına kadar -20⁰ C’de muhafaza edilmiş, DNA izolasyonu için aşağıda sıralanan aşamalar uygulanmıştır.

1. 200 mikrolitre kan 2 mililitrelik ependorf tüpüne alındı.
2. 10 mikrolitre proteinaz K ve 200 mikrolitre Sol QB buffer sırayla kanın bulunduğu ependorf tüpüne eklendi.
3. Ependorf tüpünün içerisindeki sıvılar vorteks cihazı ile homojenize edildi ve tüp 70⁰C de 10 dakika inkübe edildi.
4. %96 saflıkta ethanolden 200 mikrolitre tüpteki karışıma ilave edildi ve vorteks cihazı ile homojenize edildi.
5. DNA’ların çökmesini sağlamak için ependorf tüpü 12000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Hasta sayısı kadar toplama tüpü çıkartıldı ve her bir toplama tüpünün içerisine filtreli toplama tüpü (spin-column) kondu. Her bir hastanın kanını içeren karışım filtreli toplama tüpü üzerine transfer edildi.
7. İçerisinde karışım bulunan toplama tüpleri 12000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.
8. Toplama tüpleri atıldı ve her bir filtreli toplama tüpü yeni bir toplama tüpüne kondu.

9. Herbir filtreli toplama tüpü üzerine 500 mikrolitre QBX1 yıkama tamponu (Wash QBX1 buffer) eklendi ve toplama tüpleri 12000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Toplama tüpleri atıldı ve her bir filtreli toplama tüpü yeni bir toplama tüpüne kondu.
11. Filtreli toplama tüpü üzerine 500 mikrolitre QBX2 yıkama tamponu (Wash QBX2 buffer) eklendi ve toplama tüpü 12000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Son olarak 100 mikrolitre elüsyon tamponu her bir filtreli toplama tüpü üzerine kondu ve oda sıcaklığında 3 dakika beklendi.
13. Sonrasında toplama tüpleri 12000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Son 2 basamak sırasıyla bir defa tekrarlandı.

Toplama tüpleri içerisindeki her bir filtreli toplama tüpü atıldı ve toplama tüpü içerisinde elde edilen DNA'lar daha sonra çalışılmak üzere -20° C'de derin dondurucuda saklandı.

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop ölçüm cihazı ile 260nm ve 280nm dalga boylarında yapılan spektrofotometrik ölçümlerle hesaplandı. DNA konsantrasyon miktarları 25 ng/ μ l'den az olanların DNA izolasyon işlemi tekrarlandı.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) hedef nükleik asit zincirleri, primerler ile ısıya dayanıklı enzimler kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılır. Çalışma yapılacak DNA miktarı çok az sayıda olsa bile PZR sayesinde DNA miktarı arttırılabilir. PZR için temel olarak gerekli olan malzemeler kalıp DNA, primerler, polimeraz enzimleri, deoksinükleotit-Trifosfat (dNTP) karışımı ve tampondur [39].

Bir PZR reaksiyonu zaman, sıcaklık ve döngü sayısı düzenlenerek sırasıyla denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamalarıyla gerçekleşir. Denatürasyon aşamasında çift iplikli kalıp DNA 94° C'da denatüre edilir. Bağlanma aşamasında, tek iplikli DNA zincirlerinin her birinin 3' uçlarındaki nükleotitlere primerler bağlanır.

Bu işlem için sıcaklık 50⁰C ile 60⁰C arasında olmalıdır. Son aşamada yüksek sıcaklığa dayanabilen polimeraz enzimi 72⁰C'da, tek zincirli DNA'dan primerler yardımıyla yapay ortamda DNA sentezler. Bu 3 aşama bir PZR döngüsünü oluşturur ve döngü 35-40 defa tekrarlanır. Herbir döngü sonunda DNA miktarı 2 katına çıkmaktadır [39].

3.2.2.1. SCN1A Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SCN1A geni 26. eksonun tamamı ve 26. intronun bir kısmının oluşturduğu 947bp'lik bölgenin PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi için uygun primer çiftleri bulundu. Uygun bulunan primer çiftlerine ait diziler Tablo 3.1 gösterilmiştir. PZR için gerekli olan malzemelerin uygun miktarları, uygun PZR siklusu belirlendi.

Tablo 3.1. SCN1A geni için uygun bulunan primer çiftleri

Gen Adı	Primer Çeşidi	Primer Dizisi
SCN1A	İleri Primer	TGTTGCATACCTCTGGAAGAAG
SCN1A	Geri Primer	AAGCAATTTTCGTGAGTACC

SCN1A geni çalışmasında hem hasta hem kontrol grubundaki her kişi için son hacmi 25 µl olan PZR karışımı hazırlandı. Bu karışımın içeriğinde; 2,5 µl tampon, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTP karışımı, 0,5 µl ileri primer, 0,5 µl geri primer, 0,2 µl Taq polimeraz, 15,3 µl distile su, 3 µl kalıp DNA bulunmaktadır.

PZR karışım bileşenlerinin her biri önce vorteks cihazı ile homojenize edildi, sonrasında mikrosantrifüj cihazıyla tüp çeperlerine bulaşan solüsyonlar çöktürüldü. PZR karışım bileşenlerinin her birinin hasta sayısı ile çarpılmış miktarı rezervuarda karıştırılarak, 0,2 ml'lik PZR tüplerine 22 µl olacak şekilde dağıtıldı. 0,2 ml'lik tüplerdeki PZR karışımının üzerine hasta ve kontrol grubundaki her kişinin 3 µl DNA örneği eklendi. Her PZR tüpünde son hacmi 25 µl olan PZR karışımları elde edildi.

Her PZR tüpü PZR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.2.'deki aşamalar kullanılarak ilgili alan çoğaltıldı.

Tablo 3.2. SCN1A geni için PZR yönteminde kullanılan analiz aşamaları

Analiz Aşamaları	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre		
Ön İnkübasyon	1	95 °C	15 dk.		
PZR Döngüsü	35	Ayrılma	94 °C	45 sn.	Her döngüde bağlanma sıcaklığı 0,5 °C düşürülmüştür.
		Bağlanma	64 °C	45 sn.	
		Sentez	72 °C	60 sn.	
Son Uzama	1	72 °C	5 dk.		

SCN1A geninde ilgili alanın uygun bir şekilde çoğaltılması için Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR (Touchdown PCR) tekniği kullanıldı. Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR reaksiyonunda primer bağlanma sıcaklığı çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziyeye bağlanması amaçlanmaktadır. Böylece spesifik olmayan bölgelerin çoğalması engellenmiş olmaktadır. Bağlanma ısı döngü sayısı ilerledikçe düşürülür. Yüksek sıcaklıkta hedef bölgenin kalıp DNA'ya olan oranı arttığı için sıcaklık düştükçe primerler hedef bölgeye rahatlıkla bağlanabilmektedir [40].

3.2.2.2. SCN2A Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SCN2A geni 19. eksonun tamamı ve 19. intronun bir kısmınının oluşturduğu 989bp'lik bölgenin PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi için uygun primer çiftleri bulundu. Uygun bulunan primer çiftlerine ait diziler Tablo 3.3'de gösterilmiştir. PZR için gerekli olan malzemelerin uygun miktarları, uygun PZR siklusu belirlendi.

Tablo 3.3. SCN2A geni için uygun bulunan primer çiftleri

Gen Adı	Primer Çeşidi	Primer Dizisi
SCN2A	İleri Primer	ACCTGTACATTTGCCCTGTAAAT
SCN2A	Geri Primer	CTAGGCACCGAAAACCCCAT

SCN2A geni çalışmasında hem hasta hem kontrol grubundaki her kişi için son hacmi 25 µl olan PZR karışımı hazırlandı. Bu karışımın içeriğinde; 2,5 µl S Solüsyon, 2,5 µl tampon, 3 µl MgCl₂, 0,8 µl dNTP karışımı, 0,4 µl ileri primer, 0,4

µl geri primer, 0,33 µl Taq polimeraz, 9,07 µl distile su, 6 µl kalıp DNA bulunmaktadır.

PZR karışım bileşenlerinin her birinin hasta sayısı ile çarpılmış miktarı rezervuarda karıştırılarak, 0,2 ml'lik PZR tüplerine 19 µl olacak şekilde dağıtıldı. PZR karışımının üzerine hasta ve kontrol grubundaki her kişinin 6 µl DNA'sı eklendi. Böylece her PZR tüpünde son hacmi 25 µl olan PZR karışımları elde edilmiş oldu.

Her PZR tüpü PZR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.4.'deki aşamalar kullanılarak ilgili alan çoğaltıldı. İlgili alanın uygun bir şekilde çoğaltılması için Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR (Touchdown PCR) tekniği kullanıldı.

Tablo 3.4. SCN2A geni için PZR yönteminde kullanılan analiz aşamaları

Analiz Aşamaları	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre		
Ön İnkübasyon	1	95 °C	15 dk.		
PZR Döngüsü	35	Ayrılma	95 °C	45 sn.	Her döngüde bağlanma sıcaklığı 0,5 °C düşürülmüştür.
		Bağlanma	66 °C	45 sn.	
		Sentez	72 °C	60 sn.	
Son Uzama	1	72 °C	5 dk.		

3.2.2.3. KCNQ2 Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

KCNQ2 geni 9. ekson ve 10. intronun bir kısmınının oluşturduğu 684bp'lik bölgenin PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi için uygun primer çiftleri bulundu. Uygun bulunan primer çiftlerine ait diziler Tablo 3.5'de gösterilmiştir. PZR için gerekli olan malzemelerin uygun miktarları, uygun PZR siklusu belirlendi.

Tablo 3.5. KCNQ2 geni için uygun bulunan primer çiftleri

Gen Adı	Primer Çeşidi	Primer Dizisi
KCNQ2	İleri Primer	TGGGCATACACCTTCCCG
KCNQ2	Geri Primer	CCGCAGCTTAAACAACCA

KCNQ2 geni çalışmasında hem hasta hem kontrol grubundaki her kişi için son hacmi 35 µl olan PZR karışımı hazırlandı. Bu karışımın içeriğinde; 3,5 µl tampon, 2,8 µl MgCl₂, 1,4 µl dNTP karışımı, 0,7 µl ileri primer olan, 0,7 µl geri primer, 0,3 µl Taq polimeraz, 18,6 µl distile su, 7 µl kalıp DNA bulunmaktadır.

PZR karışım bileşenlerinin her biri önce vorteks cihazı ile homojenize edildi, sonrasında mikrosantrifüj cihazıyla tüp çeperlerine bulaşan solüsyonlar çöktürüldü. PZR karışım bileşenlerinin her birinin hasta sayısı ile çarpılmış miktarı rezervuarda karıştırılarak, 0,2 ml'lik PZR tüplerine 28 µl olacak şekilde dağıtıldı. 0,2 ml'lik tüplerdeki PZR karışımının üzerine hasta ve kontrol grubundaki her kişinin 7 µl DNA örneği eklendi. Her PZR tüpünde son hacmi 35 µl olan PZR karışımları elde edildi.

Her PZR tüpü PZR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.6.'daki aşamalar kullanılarak ilgili alan çoğaltıldı.

Tablo 3.6. KCNQ2 geni için PZR yönteminde kullanılan analiz aşamaları

Analiz Aşamaları	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Ön İnkübasyon	1	95 °C	15 dakika
PZR Döngüsü	35	Denatürasyon	94 °C
		Bağlanma	59 °C
		Sentez	72 °C
Son Uzama	1	72 °C	5 dk.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez

Elde edilen PZR ürünlerinin analizi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz lineer bir polimer olup D-galaktoz ile L-galaktoz moleküllerinin glikosidik bağlarla birleşmesi sonucu oluşmuştur. Agaroz jel elektroforez yöntemi boyları farklı olan DNA fragmentlerini ayırmak için kullanılan en etkili yöntemdir. Agaroz jel, içerisinde seyreltilmiş Tris-Asetat-EDTA (TAE) tampon bulunan tankın içine yerleştirilmektedir. Bu tankın bir ucuna artı yüklü elektrot, diğer ucuna eksi yüklü elektrot takılmaktadır ve elektrotların diğer uçları da güç kaynağını bağlanmaktadır. Elektroforez güç kaynağından verilen elektriksel akım sayesinde eksi yüklü DNA parçaları, artı yüklü kutuba doğru hareket eder. Kısa DNA parçaları, uzun DNA

parçalarına göre daha hızlı hareket ederler. DNA parçalarının uzunluklarının hesaplanması için belirteç DNA kullanılmaktadır. Belirteç DNA içerisinde uzunlukları bilinen DNA parçaları bulunmaktadır. Bu parçalar elektrik akımı yardımıyla uzunluklarına göre sıralanır ve çoğaltılması hedeflenen bölge uzunluğu da belirteç DNA uzunluklarına bakılarak hesaplanabilmektedir [41].

Bu çalışmada %1,5'lük agar içeren agaroz jel hazırlandı. Ön hazırlık olarak 50X konsantrasyonundaki TAE tampon seyreltilti. 4000mL tampon elde etmek için 80mL TAE steril bir kaba alındı ve 3200mL distile su üzerine ilave edildi. İyice çalkalanarak TAE ve distile suyun karışması sağlandı. 400 mL agaroz jel için 6 gr agaroz hassas terazi yardımıyla ölçüldü ve 500 mL'lik erlenmayere alındı. Üzerine son hacim 400 mL olana kadar hazırlanmış tampon ilave edildi. Mikrodalga fırında erlenmayer, içindeki agaroz eriyene kadar bekletildi. Erlenmayer içerisindeki sıvı saydam görünüm aldığı anda mikrodalga fırından çıkartıldı ve içerisine her 100 ml'ye 5µl boya eklenmesine uygun olacak şekilde 20µl etidyum bromür alternatifi olan simplysafe boyasından eklendi ve boyanın dağılması için çalkalandı. Agaroz jel elektroforez tankının tepsisinin uygun yerlerine taraklar takıldı ve hazırlanmış jel tepsiye dökülerek donmaya bırakıldı. Daha önce hazırlanmış olan TAE içeren tampon agaroz jel tankına boşaltıldı. Agaroz jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkartıldı ve elektroforez tankına tepsiyle yerleştirildi. Her sıranın ilk kuyucuğuna 100bp'lık belirteç DNA, diğer kuyucuklara PZR ürünleri yüklendi. Herbir kuyucuğa yükleme belirteç DNA ya da PZR ürününden 5 µl, Floresan Nükleik Asit boyasından 2 µl karıştırılarak son hacim 7 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. DNA'ların jelde yürütülmesi 250 voltta gerçekleştirildi. Yarım saat sonunda jel dikkatlice tepsisinden alınarak jel görüntüleme cihazına kondu ve ultraviyole ışığı yardımıyla DNA'lar görüntülendi. Belirteç DNA uzunluklarına göre PZR ürünlerinin boyları karşılaştırılarak hedeflenen bölgeye ait olup olmadığı doğrulanmış oldu.

3.2.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi hizmet alımı ile yaptırıldı.

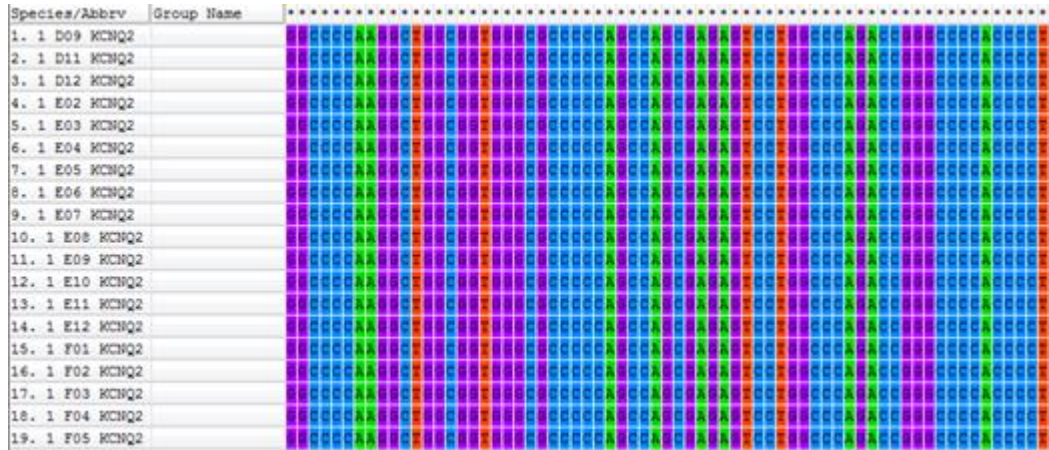
DNA dizilemesinde, DNA molekülündeki adenin, guanin, sitozin, timin nükleotit bazlarının sırasının belirlenmesidir. DNA molekülünün dizisinin bilinmesi

biyolojik araştırmalara katkı sağlamaktadır. 1977 tarihinde Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ve Sanger - Coulson'un zincir sonlanma yöntemi DNA dizilemesinde kullanılan tekniklerdendir [42].

Sanger-Caulson yöntemi, manuel sekans yöntemi ve otomatik sekans yöntemi olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Bu çalışmada otomatik dizi analiz yöntemi kullanılmıştır. PZR reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgesine ait ürün saflaştırıldıktan sonra floresan işaretli dideoksinükleotidlerin kullanıldığı sekanslama reaksiyonuna tabi tutulur. Saflaştırma sonrasında örnekler sekans cihazına yüklenir ve otomatik olarak örnekler lazer ışığı altında optik sensör tarafından okunur ve bu bilgiler bilgisayar programına aktarılır [42].

3.2.5. DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DNA dizi sonuçları MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak değerlendirildi. MEGA programı sayesinde DNA dizileri veya protein dizileri karşılaştırılarak analiz yapılmaktadır (Şekil 3.1). Program yardımıyla dizi hizalama, filogenetik ağaçlar oluşturma, dizi analizi yapılan türlerin ataları hakkında bilgi edinme gibi çalışmalar da yapılabilir.



Şekil 3.1. MEGA program dizi analiz sonuç görüntüsü

Her bir gen için hasta ve kontrol grubundaki kişilerin DNA'larından ilgili bölgenin çoğatıldığı PZR ürünlerinin dizi analizi sonuçları kendi içlerinde sırasıyla MEGA programı sayesinde hizalandı. Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin dizi

analiz sonuçları hizalandıktan sonra araştırdığımız polimorfizmlerin bulunup bulunmadığı kontrol edildi.

Ayrıca hasta grubundaki kişilerin dizi analiz sonuçları, kontrol grubundaki kişilerin dizi analiz sonuçlarıyla karşılaştırılarak araştırılan polimorfizmlerin dışında herhangi bir baz değişiminin olup olmadığı kontrol edildi. Bulunan farklı polimorfizmler için literatür araştırması yapıldı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde verilerin alındığı grup ya da topluluk incelenerek tüm popülasyon hakkında genelleme ve tahminleme yapılmaktadır [43].

Çalışmamızda elde edilen bulgular SHEsis programı ile değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin dizi analiz sonuçları tek tek incelenerek nükleotit değişimi olan kişi sayıları bulundu. Bu değişimlerin homozigot veya heterozigot olma durumları incelenerek genotip dağılımları ki-kare testi ile belirlendi. Bu verilere bağlı olarak hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirleyebilmek için genotip frekansı (p değeri) her bir gen için hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu Bulguları

Çalışmamızda SCN1A geninde R1648H polimorfizmi, SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmi ve KCNQ2 geninde V182M polimorfizmi jeneralize tonik-klonik epilepsili 75 hasta ve 75 kişilik sağlıklı kontrol grubunda karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Yaş ortalaması 35,25 olan 75 kişilik hasta grubunu 36 erkek, 39 kadın hasta oluşturmaktadır. Yaş ortalaması 39,89 olan 75 kişilik sağlıklı kontrol grubunu 39 erkek, 36 kadın oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol grubundaki kişilere ilişkin yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubundaki kişilere ilişkin yaş ve cinsiyet dağılımı

	Hasta grubu (n=75)	Kontrol grubu (n= 75)	Toplam (n=150)
Yaş Ortalaması	35,25	39,89	37,57
Erkek	36	39	75
Kadın	39	36	75

4.1.1.1. Hasta Grubu Bulguları

75 kişilik hasta grubundaki 36 erkekten 7’sinin ailesinde epilepsi olgusu görülürken, 29’unun ailesinde epilepsi olgusuna rastlanmamıştır. 36 erkekten 19’u ilk nöbetini 16 yaşında veya öncesinde geçirirken, 17’si ilk nöbetini 16 yaşından sonra geçirmiştir. 75 kişilik hasta grubunda bulunan 39 kadın hastanın 6’sının ailesinde epilepsi olgusu görülürken, 33’ünün ailesinde epilepsi olgusu görülmemektedir. 39 kadın hastadan 14’ünün ilk nöbet yaşı 16 veya 16’dan küçükken, 25’inin ilk nöbet yaşı 16’dan büyüktür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta grubu verileri

		Erkek	Kadın	Toplam
Ailede Epilepsi Olgusu	Var	7	6	13
	Yok	29	33	62
İlk Nöbet Yaşı	≤16	19	14	33
	> 16	17	25	42

4.1.2. DNA Analizi ile İlgili Sonuçlar

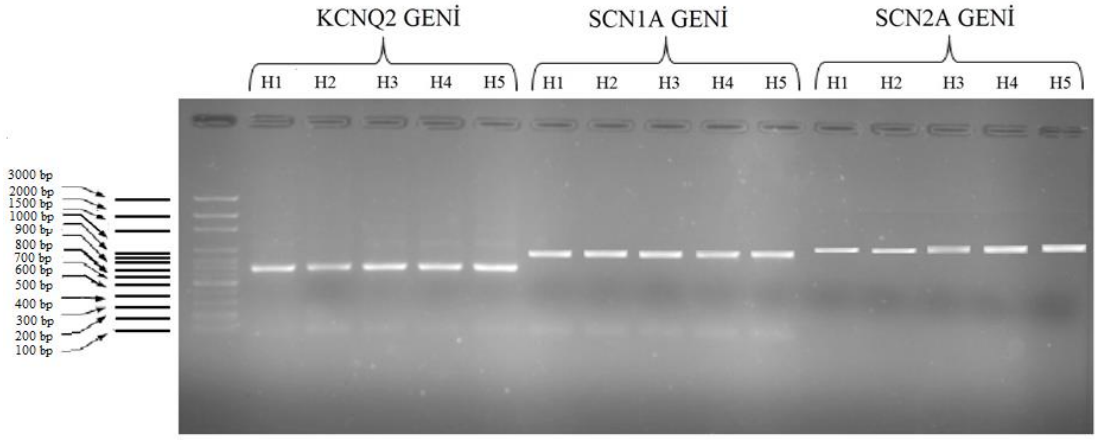
4.1.2.1. DNA miktar Tayini

DNA izolasyonu ile elde edilen kontrol grubundaki 75 kişinin ve hasta grubundaki 75 kişinin DNA'larının konsantrasyonu ve saflığı nanodrop ölçüm cihazında, 260nm ve 280nm dalga boylarında yapılan spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Hasta grubundaki kişilerin DNA'larının nanodrop sonuçları Ek 1'de, kontrol grubundaki kişilerin DNA'larının nanodrop sonuçları Ek 2'de gösterilmektedir.

4.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SCN1A, SCN2A ve KCNQ2 genleri için hem kontrol hem hasta grubundaki kişilerin DNA'ları ile yapılan PZR sonuçları agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme cihazı bulguları Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

SCN1A, SCN2A ve KCNQ2 genleri için, hasta ve kontrol grubundan elde edilen PZR ürünlerinin uzunluğu belirteç DNA ile karşılaştırılarak çoğaltılması hedeflenen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığı belirlendi. SCN1A geninde çoğaltılması hedeflenen bölge 947bp uzunluğunda, SCN2A geninde çoğaltılması hedeflenen bölge 989bp uzunluğundadır ve bu iki genin PZR ürünlerinin uzunlukları belirteç DNA ile karşılaştırıldığında 900bp-1000bp seviyelerine denk geldiği görülmektedir. KCNQ2 geni için çoğaltılması hedeflenen bölge 684bp uzunluğundadır, hasta ve kontrol grubundan elde edilen PZR ürünlerinin uzunluğu belirteç DNA ile karşılaştırıldığında 600bp-700bp seviyelerine denk geldiği görülmektedir (Şekil 4.1).

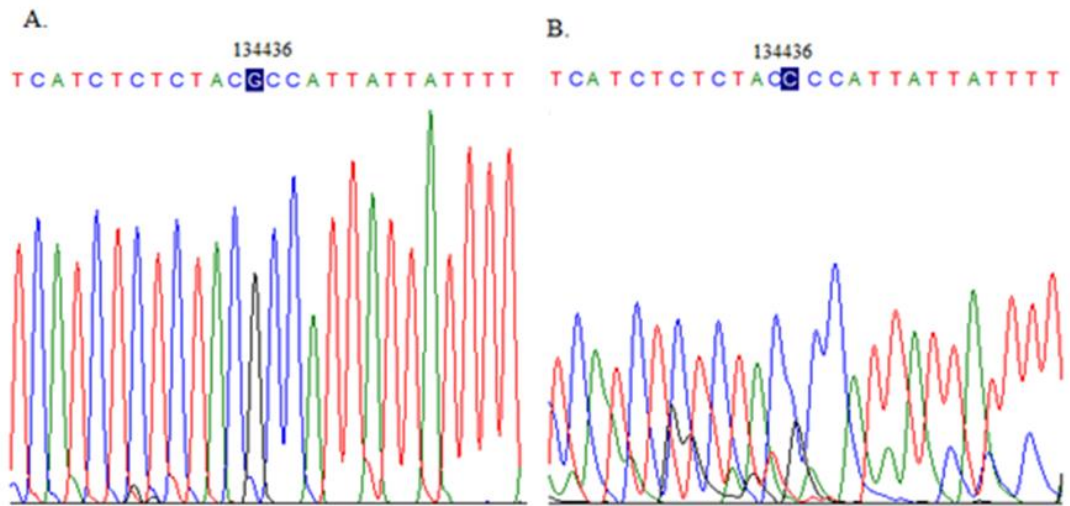


Şekil 4.1. KCNQ2 geni, SCN1A geni ve SCN2A geni için hasta grubundan 5 kişinin DNA'ları ile yapılan PZR sonuçlarının jel görüntüsü

4.1.4. DNA Dizi Analizi Bulguları

4.1.4.1. SCN1A Geni Bulguları

Yapılan çalışmada SCN1A geninde R1648H polimorfizmi araştırılmış, hasta ve kontrol grubunda bu değişime rastlanmamıştır. Ancak aynı bölgede 134436. nükleotitte G'ninden C'ine değişim, hasta grubunda 1, kontrol grubunda 3 kişide heterozigot (Şekil 4.2B) olarak tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu GG ve GC genotipleri bakımından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.3).



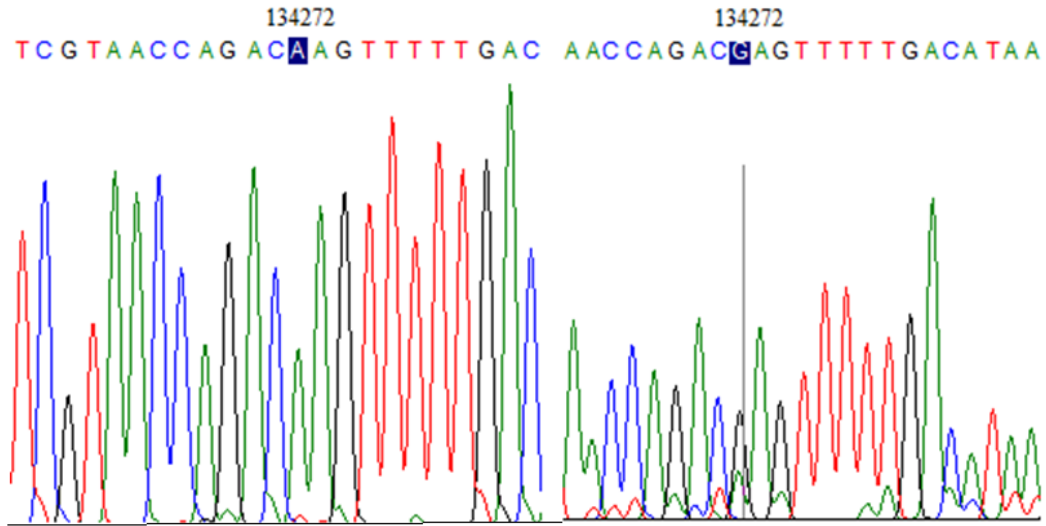
Şekil 4.2. SCN1A geninde 134436. nükleotidin G'ninden (A) C'ine (B) değişimini gösteren dizi analizi bulgusu

Tablo 4.3. SCN1A geninde 134436. nükleotitte belirlenen yeni polimorfizm için genotipleme

	Genotip dağılımı ve sıklığı		
	Normal (G/G)	Heterozigot (G/C)	Toplam
Hasta Grubu	74 (%98,7)	1 (% 1,3)	75 (% 100)
Kontrol Grubu	72 (%96)	3 (%4)	75 (% 100)

*p=0,314, p>0,05

SCN1A geninin 26. eksonundaki 134272. nükleotitte Adenin'den Guanin'e dönüşümün (rs765485870) olduğu tek nükleotid polimorfizmini (Şekil 4.3) kontrol grubundaki bir kişi heterozigot (Şekil 4.3B) olarak taşımaktadır. Hasta ve kontrol grubu AA ve AG genotipleri bakımından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0,05) (Tablo 4.4).



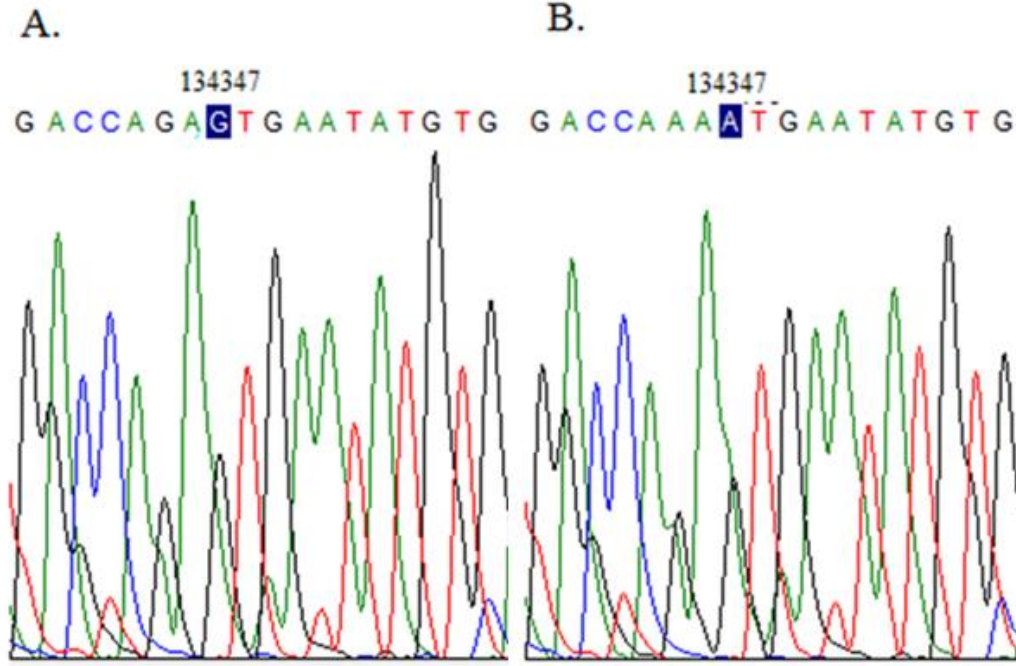
Şekil 4.3. SCN1A geninde 134272. nükleotidin A'den (A) G'ne (B) değişimi gösteren dizi analizi bulgusu

Tablo 4.4. SCN1A geni rs765485870 polimorfizmi genotip sıklıkları

	Genotip dağılımı ve sıklığı		
	Normal (A/A)	Heterozigot (A/G)	Toplam
Hasta Grubu	75 (%100)	0 (%0)	75 (% 100)
Kontrol Grubu	74 (%98,7)	1 (% 1,3)	75 (% 100)

*p=0,315, p>0,05

SCN1A geninin 26. eksonunda 134347. nükleotitte G nükleotidi görülürken, değişimin olduğu kişide A nükleotidi (Şekil 4.4) görülmektedir (rs200263247). Bu polimorfizmi taşıyan kişide, bu değişim heterozigot (Şekil 4.4B) olarak görülmüştür. Hasta ve kontrol grubu GG ve GA genotipi bakımından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.5).



Şekil 4.4. SCN1A geninde 134347. nükleotidin G'den (A) A'ne (B) değişimi gösteren dizi analizi bulgusu

Tablo 4.5. SCN1A geni rs200263247 polimorfizmi genotip sıklıkları

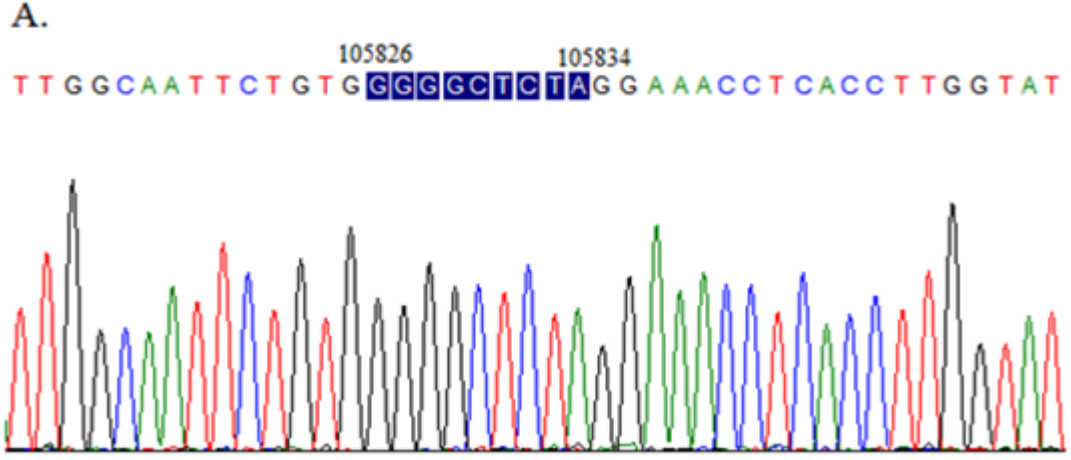
	Genotip dağılımı ve sıklığı		
	Normal (G/G)	Heterozigot (G/A)	Toplam
Hasta Grubu	75 (%100)	0 (%0)	75 (%100)
Kontrol Grubu	74 (%98,7)	1 (%1,3)	75 (%100)

* $p=0,315$, $p>0,05$

4.1.4.2. SCN2A Geni Bulguları

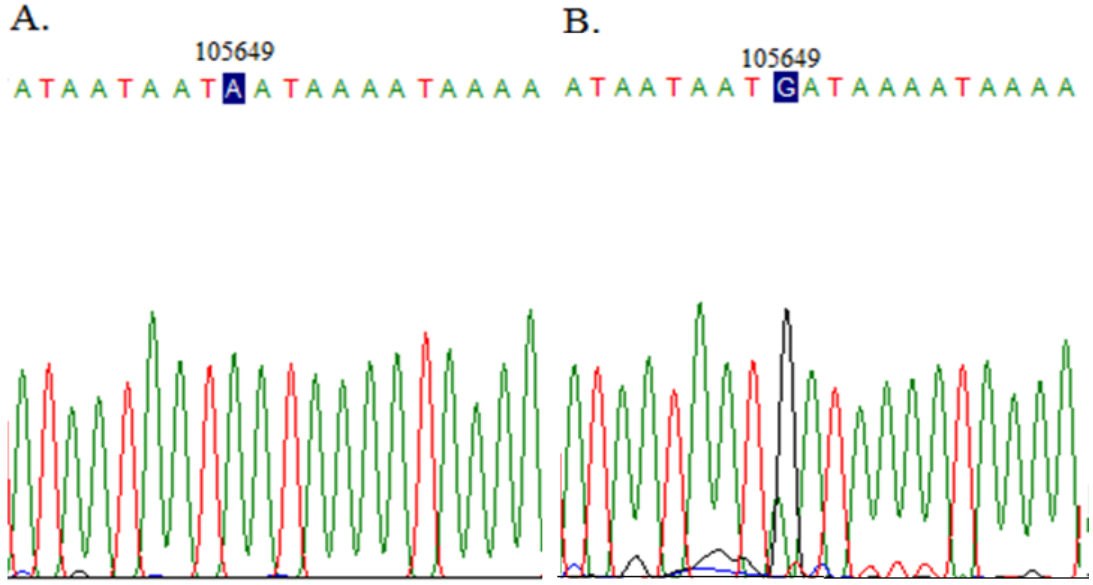
SCN2A geninde 19.eksonda GAL879-881QQQ polimorfizmi araştırılmıştır. 105826. nükleotit ile 105834. nükleotit arasında bulunan bu bölgede araştırılan

polimorfizme ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda rastlanılmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizminin görülmesi beklenen bölgenin dizi analizi bulgusu

SCN2A geninin 19. intronunda 105649. nükleotide A nükleotidi görülürken kontrol grubundaki bir kişide G nükleotidinin (Şekil 4.6) olduğu görülmektedir (rs188078595). Bu polimorfizm kontrol grubundaki bir kişide heterozigot (Şekil 4.6B) olarak görülmüştür. Hasta ve kontrol grubu AA ve AG genotipi bakımından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.6).



Şekil 4.6. SCN2A geninde 105649. nükleotidin A'dan (A) G'ne (B) değişimi gösteren dizi analizi bulgusu

Tablo 4.6. SCN2A geni rs188078595 polimorfizmi genotip sıklıkları

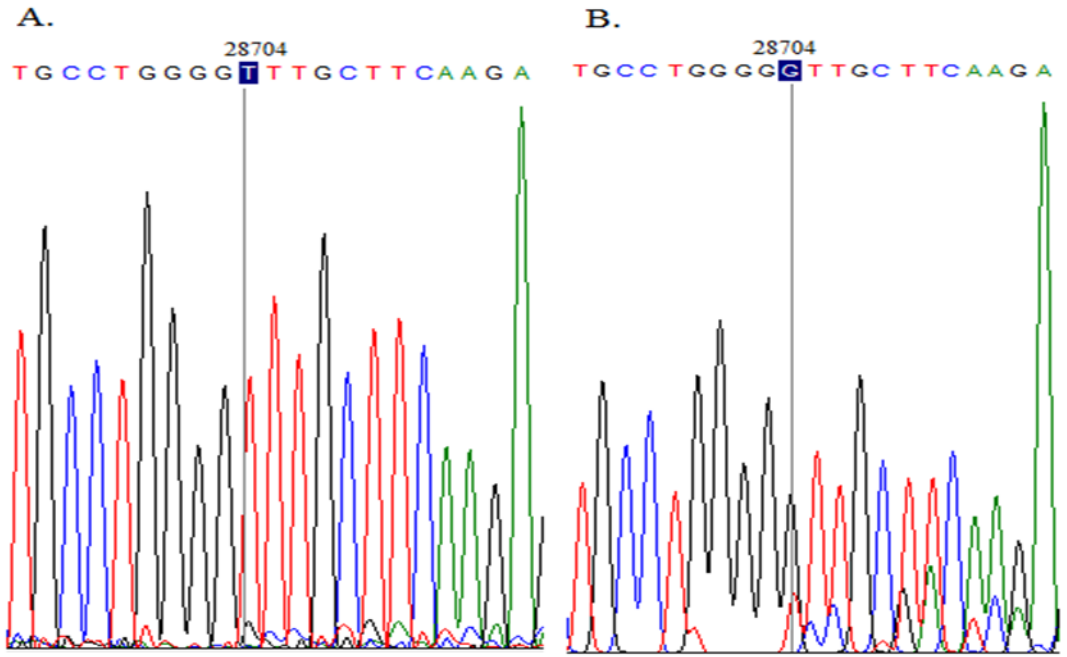
	Genotip dağılımı ve sıklığı		
	Normal (A/A)	Heterozigot (A/G)	Toplam
Hasta Grubu	75 (%100)	0 (%0)	75 (%100)
Kontrol Grubu	74 (%98,7)	1 (%1,3)	75 (%100)

*p=0,315, p>0,05

4.1.4.3. KCNQ2 Geni Bulguları

KCNQ2 geninin 9. eksonunda V182M (rs201130603) polimorfizmi araştırılmıştır. Bu polimorfizme ne hasta ne de kontrol grubunda rastlanılmamıştır.

KCNQ2 geninin 10. intronunda yapılan dizi analizinde kontrol grubunda 1 kişide 28704. nükleotitte T'den G'ye değişimi (Şekil 4.7) heterozigot (Şekil 4.7B) taşıdığı bulunmuştur (rs374252672). Hasta ve kontrol grubu TT ve TG genotipleri bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0,05) (Tablo 4.7).



Şekil 4.7. KCNQ2 geninde 28704. nükleotidin T'den (A) G'ne (B) değişimi gösteren dizi analizi bulgusu

Tablo 4.7. KCNQ2 geni rs374252672 polimorfizmi genotip sıklıkları

	Genotip dağılımı ve sıklığı		
	Normal (T/T)	Heterozigot (T/G)	Toplam
Hasta Grubu	75 (%100)	0 (%0)	75 (%100)
Kontrol Grubu	74 (%98,7)	1 (%1,3)	75 (%100)

*p=0,315, p>0,05

4.2. Tartışma

Çalışmamızda JTKN epilepsi tanısı almış 75 hasta grubunda ve 75 sağlıklı kontrol grubunda SCN1A geninde R1648H polimorfizmi, SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmi, KCNQ2 geninde V182M polimorfizmi araştırılmıştır. Belirtilen polimorfizmleri ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda taşıyan kişinin olmadığı belirlenmiştir. İstatistiksel olarak hasta grubu ve kontrol grubu sonuçları karşılaştırıldığında SCN1A, SCN2A ve KCNQ2 genlerinde incelenen polimorfizmler ile JTKN tipli epilepsi arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda SCN1A geninin 26. eksonundaki R1648H polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda bulunmadığı, aynı bölgede R1648P polimorfizmini

kontrol grubunda 3, hasta grubunda 1 kişinin heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir. Her iki gruptan elde edilen bulgunun istatistiksel değerlendirmesi sonucunda farkın anlamlı olmaması ($p>0,05$) bu değişimle JTKN arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. SCN1A geni ile ilgili veri tabanı araştırmamızda [44] R1648P polimorfizminin olmadığını belirledik. R1648P polimorfizmi ilk kez yaptığımız bu çalışma ile rapor edilmektedir. Söz konusu bölgede her iki grupta da polar bazik bir amino asit olan arjininin apolar bir amino asit olan proline dönüşmesi, voltaj-kapılı sodyum iyon kanallarını oluşturan proteinlerin post translasyonel modifikasyonlarla ilişkisi açısından değerlendirilebilir.

SCN1A geninde, gen veri tabanında rs765485870 polimorfizmi olarak belirtilen 134272. nükleotitteki A'den G'ye değişim bu çalışmamızda, kontrol grubundaki 1 kişide (%1,3) belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu verilerimiz arasındaki fark bu polimorfizm açısından anlamlı bulunmadığından polimorfizmin JTKN ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

SCN1A geninde, gen veri tabanında rs200263247 polimorfizmi olarak belirtilen 134347. nükleotitteki G'den A'ye değişim bu çalışmamızda, kontrol grubundaki 1 kişide (%1,3) belirlenmiştir. İstatistiksel olarak JTKN ile ilişkisi belirlenememişse de polimorfizm görülme sıklığı (Tablo 4.5) diğer toplumlarla karşılaştırma olanağı vermektedir. 1000 Genom Projesine göre G allelinin Afrika, Amerika, Doğu Asya, Güney Asya ve Avrupa topluluklarında görülme sıklığı %100 olarak verilmektedir [45]. Bizim elde ettiğimiz bulgu ile 1000 Genom Projesi sonuçları birbirleriyle uyumludur.

Çalışmamızda SCN2A geninin 19. eksonunda araştırılan GAL879-881QQQ polimorfizmine ne kontrol ne de hasta grubundaki kişilerde rastlanılmamıştır. Ayrıca SCN2A geninde dizi analizi yapılan bölgede herhangi bir değişim bulunmamıştır. Bu bölge voltaj-kapılı sodyum iyon kanalının ikinci transmembran yapısının 4. segmentini ve 5. segmentini birbirine bağlayan sitoplazmik bölgeye denk gelmektedir. Kanalın por yapısının oluşmasında önemli bir bölgeyi oluşturmaktadır. Çalışmamıza göre Türk toplumunda SCN2A geninin 19. eksonunda JTKN tipli epilepsi ile ilişkili herhangi bir mutasyon olmadığı söylenebilir, ancak sayısı daha

fazla olan hasta grubuyla yapılacak olan bir araştırma ile bu sonucun desteklenmesi önerilebilir.

SCN2A geninin 19. intronunda kontrol grubundaki bir kişide gen veri tabanında rs188078595 polimorfizmi olarak belirtilen 105649. nükleotitteki A'dan G'e değişim kontrol grubundaki 1 kişide (%1,3) belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu verilerimiz arasındaki fark bu polimorfizm açısından anlamlı bulunmadığından polimorfizmin JTKN ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda KCNQ2 geninin 9. eksonunda V182M polimorfizmi incelenmiş ancak kontrol ve hasta grubundaki kişilerde bu polimorfizme rastlanılmamıştır. KCNQ2 geninin çoğaltılan 10. intronik bölgesinde gen veri tabanında rs374252672 polimorfizmi olarak belirtilen 28704. nükleotitteki T'den G'e değişim kontrol grubundaki 1 kişide (%1,3) görülmüştür. Bu polimorfizmin istatistiksel olarak JTKN ile ilişkisi belirlenememiştir.

Hawkins ve ark. SCN1A geninde R1648H, SCN2A geninde GAL879-881QQQ ve KCNQ2 geninde V182M polimorfizmlerinin JTKN ile ilişkisini araştırdıkları *in vivo* fare araştırmasında ilgili polimorfizmler arasındaki genetik etkileşimin nöbet tipi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. SCN1A geninde R1648H polimorfizmi ile SCN2A geninde GAL879-881QQQ polimorfizmlerini birlikte taşıyan, ayrıca SCN1A geninde R1648H polimorfizmi ile KCNQ2 geninde V182M polimorfizmlerini birlikte taşıyan farelerde JTKN tipi epilepsi ile belirtilen genlerdeki genetik etkileşimin ilişkisi olduğunu bulmuşlardır [8]. Ancak bizim çalışmamızda SCN1A geninde R1648H, SCN2A geninde GAL879-881QQQ ve KCNQ2 geninde V182M polimorfizmlerinin ne hasta ne de kontrol grubunda bulunmaması, JTKN ile bu polimorfizmlerin ilişkisinin olmadığını göstermektedir. İnsana yönelik yapılmış bu konudaki ilk çalışma olan araştırma bulgularımıza göre, JTKN ile bu polimorfizmlerdeki genetik etkileşim ilişkisi olmadığını belirtebiliriz.

Kearney ve arkadaşları yaptıkları *in vivo* fare çalışmasında, SCN2A geninde GAL879-881QQQ ve KCNQ2 geninde V182M polimorfizmleri incelenmiş, bu polimorfizmleri birlikte taşıyan farelerde JTKN tipli epilepsinin ortaya çıktığı

belirtilmiştir. Bu iki polimorfizmdeki genetik etkileşimin JTKN üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir [1]. Ancak bizim çalışmamızda hasta grubundaki kişilerde SCN2A ve KCNQ2 genlerinde belirtilen polimorfizmlere rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda bulunan sonuçlar Kearney ve arkadaşları çalışmasını destekler nitelikte değildir. Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulgu, JTKN tipi epilepsisi olan grupta bu polimorfizmler açısından yapılmış ilk insana yönelik çalışma olması açısından önemlidir.

İdiyopatik epilepsilerde çoğunlukla kompleks kalıtım rol oynamaktadır [45,46]. Kompleks kalıtımda genler ile çevresel faktörlerin etkileşimi görülmektedir. Ayrıca idiyopatik epilepsinin alt gruplarını oluşturan epilepsi sendromlarının hepsinde genetik heterojenite görülmektedir [47]. Bu nedenle bir epilepsi fenotipinin genetik temelini aydınlatılması zor olmaktadır. Ayrıca bir epilepsi sendromuna birden fazla genin neden olması veya bir genin farklı epileptik sendromlara neden olması da epilepsi fenotiplerinin genetik temelini aydınlatılmasını güçleştirmektedir [22,21]. İdiyopatik jeneralize epilepsi alt tipi olan çalışma grubumuzu oluşturan JTKN tipi epilepside de genetik heterojenite söz konusu olduğu için altta yatan genetik etkenin belirlenmesini güçleştiren sebeplerden biri bu olabilir.

Çalışmamızın dayanağını oluşturan Hawkins ve arkadaşları ve Kearney ve arkadaşları çalışmalarında *in vivo* olarak elde ettikleri bulgular, bu polimorfizmler arasındaki genetik etkileşimle ilişkili insana yönelik yapılmış bizim çalışmamızdaki bulgularla desteklenmemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

SCN1A'da R1648H polimorfizmine, SCN2A'da GAL879-881QQQ polimorfizmine ve KCNQ2'de V182M polimorfizmine ne JTKN hasta grubunda ne de kontrol grubunda rastlanmadığı için bu polimorfizmlerin insanlarda JTKN ile ilişkisi olmadığı sonucuna vardık. Hasta ve kontrol grubunda araştırdığımız polimorfizmler bulunmadığı için elde ettiğimiz verilere göre bu polimorfizmler arasında genetik etkileşimin JTKN ile ilişkisi söz konusu değildir.

SCN1A geninde 134436. nükleotitte G'ninden C'ine değişimin olduğu R1648P polimorfizmi hasta grubunda 1, kontrol grubunda 3 kişide bulunmuş, ancak JTKN ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu polimorfizm ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir.

SCN1A geninde 134272. nükleotitte A>G ve 134347nci nükleotitte G>A değişim, SCN2A geninde 105649. nükleotitte G>A değişim, KCNQ2 geninde 28704. nükleotitte T>G değişimin JTKN epilepsi tipi ile ilişkisi saptanmamıştır.

JTKN hastaları ve kontrol grubu bireylerinde araştırılan polimorfizmlere ilişkin yaptığımız çalışmadan elde edilen genotipleme bulgularının, Türk toplumundaki ilk veriler olmasının önemli bir katkısının olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] Kearney, J.A., Yang, Y., Beyler, B., Bergren, S.K., Claes, L., DeJonghe, P., Frankel, W.N. Severe epilepsy resulting from genetic interaction between Scn2a and Kcnq2. *Human Molecular Genetics*. 2006, 15(6), 1043-1048
- [2] Çelik, S. İdiopatik Jeneralize Epilepsili Hastalarda Talamik Volumetri ve MR Spektroskopik İncelemeler. Bakırköy Prof.Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Nöroloji Kliniği, İstanbul, 2008, 87 (Uzmanlık Tezi).
- [4] Dervent, A., Gökyiğit, A. Çocukluk ve Ergenlikte Başlayan İdiopatik Jeneralize Epilepsiler. *Epilepsi*. 2014, 20, 13-22.
- [5] Meisler, M.H., O'Brien, J.E., Sharkey, L.M. Sodium Channel Gene Family: Epilepsy Mutations, Gene Interaction and Modifier Effects. *The Journal of Physiology*. 2010, 588, 1841-1848.
- [6] Heron, S.E., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Mulley, J.C. Channelopathies in Idiopathic Epilepsy, *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc.* 2007, 4, 295-304.
- [7] Richards, M.C., Heron, S.E., Spendlove, H.E. Scheffer, I.E., Grinton, B., Berkovic, S.F., Mulley, J.C., Davy, A. Novel Mutations in the KCNQ2 Gene Link Epilepsy to a Dysfunction of the KCNQ2-Calmodulin Interaction. *Journal of Medical Genetics*. 2004, 41.
- [8] Hirose, S., Mitsudome, A., Okada, M., Kaneko, S. Genetics of Idiopathic Epilepsies. *Epilepsia*. 2005, 46, 38-43.
- [9] Hawkins, N.A., Martin, M.S., Frankel, W.N., Kearney, J.A., Escayg, A. Neuronal voltage-gated ion channels are genetic modifiers of generalized epilepsy with febrile seizure plus. *Neurobiology of Disease*. 2011, 41(3), 655-660.
- [10] Berkovic, S.F., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Petrou, S. Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *TRENDS in Neurosciences*. 2006, 7, 391-397.
- [11] Shorvon, S.D. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 2011, 52(6), 1052-1057.
- [12] Bell, D.R., *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine*. Ed: Rodney A. Rhoades, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Amerika, 2013, 819
- [13] Oja, S.S., Saransaari P., *Physiology and Maintenance*. Ed: Osmo Otto Päiviö Hänninen, Mustafa Atalay, Finlandiya, 2009, 450.
- [14] Hall, J.E., *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Saunders, Mississippi, Amerika, 2011, 1120
- [15] Akay, A., Sümer, N.C., Uyanıkgil, Y. İyon Kanalları ve Epilepsi Patojenezindeki Rollerini. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2010, 19, 72-83.
- [16] Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997, 120, 479-490.
- [17] Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010, 51(4), 676-685.

- [18] Choueiri, R.N., Fayad M.N., Farah A., Mikati A.M., Classification of Epilepsy Syndromes and Role of Genetic Factors. *Pediatric Neurology*. 2001, 24 (1), 37-43.
- [19] Holmes, G.L. Classification of seizures and the epilepsies. Ed: Schachter, S.C., Schomer, D.L. Academic Press, New York, Amerika, 1997, 136
- [20] Yalçınkaya, C. İdyopatik Jeneralize Epilepsiler ve Epileptik Sendromlar. Epilepsilerde Tanı ve Tedavi Sempozyumu, 9 Ekim, 1998, İstanbul.
- [21] Treiman, L.J., Treiman, D.M. The Epilepsies: Etiologies and Prevention. Ed: Kotagal, P., Lüders, H.O. Academic Press, California, Amerika, 1999, 587.
- [22] Duncon, J.S., Sander, J.W., Sisodiya, S.M., Walker, M.C. Adult Epilepsy. *Lancet*. 2006, 367, 1087-1100.
- [23] Bebek, N., Baykan, B. Epilepsilerin Genetik Yönü ve İdyopatik Epilepsi Genetiğinde Son Gelişmeler. *Journal of Neurological Sciences [Turkish]*. 2006, 23(2), 70-83.
- [24] Erbey, F. Kompleks Parsiyel Epilepsili Hastalarda Klinik ve Psikososyal Prognoz. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana, 2005 (Uzmanlık Tezi).
- [25] Lerche, H., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. Ion channels and Epilepsy. *American Journal of Medical Genetics*. 2001, 106, 146-159
- [26] Reid, C.A., Berkovic, S.F., Petrou, S. Mechanism of Human Inherited Epilepsies. *Progress in Neurobiology*. 2009, 87, 41-57.
- [27] Seğmen, H. İdyopatik Jeneralize Epilepsilerde Genetiğin Yeri ve SCN1A Geninde D188V Mutasyonu. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, 2005 (Uzmanlık Tezi).
- [28] Waxman, S.G., Zamponi G.W. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*. 2014, 17, 153-163.
- [29] Lai, H.C, Jan, L.Y. The Distribution and Targeting of Neuronal Voltage-Gated Ion Channels. *Neuroscience*. 2006, 7, 548-562
- [30] Sands, Z., Grottesi, A., Sansom, M.S.P. Voltage-gated Ion Channels. *Current Biology*. 2005, 15(2), 44-4
- [31] Lossin, C., A catalog of SCN1A variants, *Brain & Development*, 31, 114-130. 2009
- [32] Benarroch, E.E. Sodium Channels and Pain. *Neurology*. 2007, 68(3) 233-236.
- [33] Catterall, W.A. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, 2000, 26 (1), 13-25
- [34] Volkers, L., Rook, M.B., Das, J.H.G., Verbeek, N.E., Groenewegen, W.A., van Kempen, M.J.A., Lindhout, D., Koeleman, B.P.C. Functional Analysis of Novel KCNQ2 Mutations Found in Patients with Benign Familial Neonatal Convulsion. *Neuroscience Letters*. 2009, 462, 24-29.
- [35] Robbins, C.A., Tempel, B.L. Kv1.1 and Kv1.2: Similar Channels, Different Seizure Models. *Epilepsia*. 2012, 53, 134-141.
- [36] Sanson, M.S.P., Shrivastava, I.H., Bright, J.N., Tate, J., Capener, C.E., Biggin, P.C. Potassium Channels: Structures, Models, Simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002, 1565, 294-307.
- [37] Meisler, M.H., Kearney, J.A. Sodium Channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005, 115(8), 2010-2017.

- [38] Biervert, C., Steinlein, O.K. Structural and Mutational Analysis of KCNQ2, The Major Gene Locus for Benign Familial Neonatal Convulsion. *Human Genetics*. 1999, 104, 234-240.
- [39] Çetinkaya, E., Ayhan, K. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*. 2012, 2(1), 53-62
- [40] Yılmaz S., Devran Z. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. *Tagem Yayınları*. 2003, 31-42
- [41] Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012 (62), 9400-9405.
- [42] Zimmermann J., Voss H., Schwager C., Stegemann J., Ansorge W. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *Federation of European Biochemical Societies*. 1988, 432-436.
- [43] Efe, E., Bek, Y., Şahin, M. SPSS'te Çözümleri ile İstatistik Yönremler II. Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi Rektörlüğü, Bilgisayar Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kahramanmaraş, 2000
- [44] http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000144285;r=2:165989160-166128047
- [45] http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000144285;r=2:165989160-166128047;v=rs200263247;vdb=variation;vf=2882186
- [46] Walsh, L.E., McCandless, D. Inherited Epilepsies. *Seminars in Pediatric Neurology*. 2001, 8(3), 165-176.
- [47] Lucarini, N., Verrotti, A., Napolioni, V., Bosco, G. Curatolo, P. Genetic Polymorphism and Idiopathic Generalized Epilepsies. *Pediatr Neurol*. 2007, 37, 157-164.

EK 1. Hasta grubundaki kişilerin DNA'larının nanodrop sonuçları

Hasta no	DNA kons.	260/280	260/230	Hasta no	DNA kons.	260/280	260/230
H1	13,640	1,865	1,906	H39	36,990	1,401	1,515
H2	31,380	1,094	1,290	H40	50,060	1,250	1,590
H3	33,710	1,131	1,028	H41	26,710	1,327	1,510
H4	30,590	1,123	1,101	H42	55,490	1,169	1,445
H5	49,540	1,100	1,298	H43	19,620	1,449	1,669
H6	24,810	1,492	1,653	H44	46,590	1,207	1,486
H7	22,770	1,307	1,425	H45	37,700	1,285	1,472
H8	58,070	1,136	1,352	H46	19,160	1,583	1,937
H9	15,820	1,362	1,584	H47	32,010	1,406	1,621
H10	47,480	1,018	1,343	H48	64,880	1,112	1,387
H11	26,160	1,188	1,297	H49	139,94	1,106	1,407
H12	19,680	1,250	1,427	H50	37,390	1,087	1,356
H13	26,050	1,328	1,422	H51	18,540	1,381	1,747
H14	44,700	1,118	1,360	H52	29,950	1,449	1,625
H15	130,45	1,059	1,308	H53	32,630	1,158	1,385
H16	21,850	1,228	0,967	H54	22,980	1,424	1,554
H17	40,090	1,146	1,301	H55	299,84	0,989	1,326
H18	41,600	1,101	1,307	H56	62,700	0,668	1,976
H19	82,940	1,141	1,288	H57	24,410	1,340	1,614
H20	47,510	1,093	1,332	H58	825,91	0,972	1,298
H21	52,850	1,055	1,312	H59	36,680	1,243	1,423
H22	102,08	1,056	1,279	H60	104,87	1,119	1,411
H23	38,300	0,991	1,219	H61	307,68	0,994	1,334
H24	29,630	1,199	1,242	H62	135,14	1,038	1,381
H25	29,690	1,165	1,293	H63	49,930	1,161	1,532
H26	13,080	1,177	1,345	H64	113,63	1,068	1,393
H27	64,180	1,096	1,302	H65	53,610	1,125	1,520
H28	50,410	1,097	1,275	H66	104,15	1,133	1,400
H29	53,900	1,116	1,428	H67	39,930	1,222	1,527
H30	41,240	1,129	1,434	H68	38,770	1,345	1,781
H31	30,290	1,357	1,598	H69	59,430	1,151	1,506
H32	41,470	1,140	1,503	H70	28,890	1,243	1,598
H33	24,690	1,279	1,479	H71	53,760	1,209	1,532
H34	50,550	1,093	1,388	H72	47,790	1,101	1,463
H35	47,370	1,140	1,435	H73	42,270	1,135	1,921
H36	84,180	1,100	1,364	H74	79,260	1,105	1,406
H37	26,260	1,278	1,522	H75	130,33	1,255	1,613
H38	29,690	1,443	1,750				

EK 2. Kontrol grubundaki kişilerin DNA'larının nanodrop sonuçları

Kontrol No	DNA Kon.	260/280	260/230	Kontrol No	DNA Kon.	260/280	260/230
K1	37,070	1,380	1,620	K39	63,840	2,673	2,029
K2	51,690	1,069	1,362	K40	42,020	1,147	1,566
K3	28,000	1,176	1,384	K41	25,780	1,182	1,650
K4	66,830	1,125	1,400	K42	47,670	1,085	1,517
K5	53,040	1,175	1,387	K43	39,950	1,123	1,462
K6	81,000	1,077	1,126	K44	38,020	1,093	1,414
K7	49,250	1,123	1,339	K45	34,470	1,169	1,534
K8	35,960	1,164	1,439	K46	44,230	1,196	1,530
K9	52,610	1,190	1,507	K47	43,380	1,135	1,455
K10	55,730	1,231	1,525	K48	32,930	1,181	1,488
K11	48,890	1,242	1,529	K49	38,850	1,101	1,378
K12	65,100	1,120	1,386	K50	44,520	1,142	1,558
K13	46,540	1,194	1,470	K51	51,940	1,152	1,401
K14	73,440	1,158	1,406	K52	124,85	1,056	1,389
K15	79,390	1,135	1,325	K53	50,780	1,148	1,468
K16	50,700	1,248	1,511	K54	28,790	1,068	1,178
K17	29,830	1,249	1,467	K55	26,010	1,240	1,539
K18	72,750	1,118	1,393	K56	21,510	1,135	1,446
K19	51,290	1,122	1,487	K57	25,150	1,072	1,352
K20	36,020	1,233	1,476	K58	34,970	1,106	1,473
K21	29,390	1,375	1,537	K59	50,560	1,121	1,417
K22	81,430	1,173	1,397	K60	29,930	1,099	1,408
K23	48,890	1,100	1,350	K61	26,030	1,173	1,531
K24	49,160	1,160	1,404	K62	23,690	1,213	1,512
K25	24,300	1,441	1,619	K63	36,870	1,161	1,476
K26	39,050	1,468	1,640	K64	21,800	1,138	1,542
K27	41,140	1,143	1,354	K65	30,800	1,322	1,724
K28	66,220	1,105	1,265	K66	43,580	1,223	1,561
K29	32,370	1,098	1,457	K67	36,530	1,130	1,494
K30	30,570	1,346	1,740	K68	59,020	1,155	1,467
K31	32,100	1,184	1,509	K69	65,230	1,104	1,391
K32	29,230	1,087	1,409	K70	41,470	1,103	1,420
K33	36,930	1,181	1,541	K71	65,740	1,279	1,590
K34	118,88	1,152	1,457	K72	30,670	1,201	1,497
K35	73,050	1,083	1,360	K73	44,140	1,177	1,503
K36	104,97	1,037	1,403	K74	52,950	1,170	1,485
K37	39,300	1,073	1,425	K75	48,890	1,197	1,556
K38	42,470	1,083	1,399				

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep AYTAÇ

Doğum Yeri ve Yılı : Kocaeli, 1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : zeynepaytac59@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : 24 Kasım Anadolu Lisesi, 2004

Lisans : İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2012

Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı, 2016

Mesleki Deneyim

Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı 2015 - halen

Ulusal Bildiriler

Zeynep AYTAÇ, M.Burak BATIR, Berrin TUĞRUL, Ece ONUR, Hikmet YILMAZ. Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetli Epilepsi ile SCN1A ve SCN2A Genleri Arasındaki İlişki. 11. Uludağ Nöroloji Günleri, 10-13 Mart 2016.