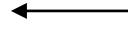


BÜŞRA TAN

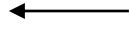
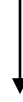
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ



Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TÜM GENOM YAKLAŞIMLARIYLA EPİLEPSİ
GENLERİNİN İNCELENMESİ**

BÜŞRA TAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL AYLİN UĞUR İŞERİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN



İTHAF

Hayatım boyunca maddi manevi destekçim olan annem Zeynep DEMİRÖRS'e ve en zor anlarımda yanımda olan değerli eşim Ahmet TAN'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başından itibaren değerli bilgileriyle bilgime bilgi katan, yönlendiren, akademik eğitim sürecini öğreten ve nazik tavırları ile bu sürecin bana verdiği tedirginliği azaltan danışmanım Prof. Dr. Sibel Aylin UĞUR İŞERİ'ye,

Tez kapsamında incelenen aile bireylerini hassasiyetle inceleyip, ailenin klinik bilgilerini tarafımıza ileten, klinik açıdan bizi yönlendiren Prof. Dr. Betül BAYKAN'a,

Hem enerji hem de destek veren Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU'na

Tezimi ve laboratuvar aşamalarını benim için daha anlaşılır hale getiren, özellikle laboratuvar sürecinde bilgilerini benden esirgemeyen ve çalışma sonrasında her aşamamızı detaylarıyla istişare ederek kafamdaki eksik tuğlaları bir bir yerine koymamı sağlayan Arş. Gör. Dr. Sevcan TÜRKER'e,

Laboratuvarda ne zaman bir konuda takılsam yardım eden Arş. Gör. Seda SÜSGÜN, Uzm. Mol. Bio. Khusan KHODZHAEV, Uzm. Bio. Didem ALTINDİREK, Arş. Gör. Merve SARITAŞ, MSc. Merve ORDU, Arş. Gör. Hazal Banu ÇELEBİOĞLU'na,

Yüksek Lisans eğitim sürecim boyunca bilimsel katkıları ve vermiş oldukları güncel bilgiler için İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Genetik AD Tezli Yüksek Lisans programında görevli bütün hocalarıma,

Özellikle tez yazım aşamasında gerginliğimi ve huysuzluğumu sabırla çeken, her daraldığımda sakinleştiren, tembellik yaptığımda beni tekrar çalışmaya sevk eden, elinden gelen her türlü desteği benden esirgemeyen kıymetli eşim Ahmet TAN'a,

Hayatım boyunca bana olan inancını hiç kaybetmeyen, hep yanımda olmaya çalışan, maddi manevi destekleriyle beni güçlü kılan annem Zeynep DEMİRÖRS'e, değerli DEMİRÖRS ailesine ve değerli TAN ailesine teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, Prof. Dr. Sibel Aylin UĞUR İŞERİ adına verilmiş olan TÜBA-Üstün Başarılı Genç Bilim İnsanı Ödülleri (TÜBA-GEBİP) 2019 Desteği ve Türk Nöroloji Derneği'nin katkılarıyla desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Epilepsi	2
2.1.1. Epilepsinin Tanımı, İnsidansı ve Prevalansı	3
2.1.2. Epilepsinin Sınıflandırılması.....	3
2.1.3. Epilepsi Nöbetlerinin Sınıflandırılması	5
2.1.4. Epilepsi Sendromları.....	5
2.2. Ailesel Erişkin Myoklonik Epilepsi (FAME)	6
2.3. Epilepsinin Etiyolojisi ve Epileptogenez	6
2.4. Epilepsi Genetiği.....	8
2.5. Epilepside Güncel Moleküler Genetik Yaklaşımlar	10
2.5.1. Sanger Dizileme	10
2.5.2. Yeni Nesil Dizileme (NGS)	12
2.5.2.1. Ekzom Dizileme (WES).....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. GEREÇ	15
3.1.1. Çalışmada İncelenen Bireyler ve Aile Ağacı	15
3.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Maddeler	16
3.1.3. Kullanılan Ekipmanlar ve Hizmet Alınan Firmalar	17
3.1.4. Kullanılan Çevrimiçi Veritabanları, Araçlar ve Analiz Programları	19

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Gen Listesi.....	21
3.2. YÖNTEM	23
3.2.1. DNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü	23
3.2.2. Tüm Ekzom Dizileme (WES) Çalışması	27
3.2.3. WES Datasından Biyoinformatik Analiz Stratejisi.....	27
3.2.4. Tespit Edilen Varyantların Çalışması	28
3.2.4.1. Varyantlara Primer Dizaynı	28
3.2.4.2. Primerlerin Optimizasyon Çalışması	35
3.2.4.3. PCR ve Agaroz Jelde Görüntüleme	38
3.2.5. Sanger Dizileme ile Varyantların Konfirmasyonu.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Tespit Edilen Varyantların Bulunduğu Aday Genler.....	43
4.2. Varyantların IGV Görüntüleri.....	44
4.3. Varyantların Sanger Dizileme ile Validasyonu	48
4.4. Varyantların Ailesel Segregasyonu.....	54
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	65
HAM VERİLER	79
FORMLAR	80
ETİK KURUL KARARI	81
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	82
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Etkilenmiş 3 kardeşe ait klinik bilgiler	16
Tablo 3-2: Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
Tablo 3-3: Kullanılan Kitler	17
Tablo 3-4: Kullanılan Cihazlar	17
Tablo 3-5: Hizmet Alınan Firmalar ve Alınan Hizmet İçeriği	18
Tablo 3-6: Çalışma Kapsamında Kullanılan Elektronik Veritabanları ve Analiz Programları	19
Tablo 3-7: Çalışmada Tespit Edilen Varyantlar, Varyantlara Ait Bilgiler ve Dizilenen Primerler Listesi.....	21
Tablo 3-8: Epilepsi Gen Listesi	22
Tablo 4-1: Ekzom dizileme analizi sonucu tespit edilen varyantlar	43
Tablo 4-2: Tespit edilen varyantların ailesel segregasyon bilgisi.....	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Epilepsi Tanı Aşamaları	4
Şekil 2-2: İlk keşfedilen yöntemle yapılan Sanger Dizileme tekniği	11
Şekil 2-3: Günümüzde kullanılan geliştirilmiş Sanger Dizileme yöntemi	12
Şekil 2-4: Genomik DNA'dan NGS tekniklerinden gerçek zamanlı dizileme yöntemi. 13	
Şekil 3-1: Çalışılan aileye ait aile ağacı.....	16
Şekil 3-2: QIAamp® DNA Blood Maxi Kit ile DNA İzolasyon Şeması.....	25
Şekil 3-3: QIAamp DNA Blood Mini Kit ile DNA İzolasyon Şeması.....	26
Şekil 3-4: <i>SLC6A19</i> Geni NM_001003841:c.1270C>G Varyantı (Novel) Primer ve Amplikon Dizisi.....	30
Şekil 3-5: <i>SCN3A</i> Geni NM_006922.3:c.1687C>T Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi	30
Şekil 3-6: <i>ADAMTS2</i> Geni NM_014244:c.548G>A Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi	31
Şekil 3-7: <i>LAD1</i> Geni NM_005558:c.458C>G Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi ...	32
Şekil 3-8: <i>CPO</i> Geni NM_173077:c.434A>G Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi	33
Şekil 3-9: <i>CSF1R</i> Geni NM_005211.3:c.2239G>A Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi	34
Şekil 3-10: <i>RNF44</i> Geni NM_014901.5: c.985G>A Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi.....	35
Şekil 3-11: Primerlerin PCR Optimizasyon Çalışması.....	36
Şekil 3-12: <i>SLC6A19</i> ve <i>SCN3A</i> Primeri PCR Optimizasyon Jel Görüntüsü.....	36
Şekil 3-13: <i>ADAMTS2</i> , <i>LAD1</i> , <i>CPO</i> ve <i>RNF44</i> Primerleri PCR Optimizasyon Jel Görüntüsü.....	37
Şekil 3-14: <i>CSF1R</i> Primeri PCR Optimizasyon Jel Görüntüsü	37
Şekil 3-15: Touchdown PCR Protokolü	38
Şekil 3-16: PCR Çalışması Şablonu	38
Şekil 3-17: <i>SLC6A19</i> ve <i>SCN3A</i> PCR Sonucu Jel Görüntüsü	39
Şekil 3-18: <i>ADAMTS2</i> PCR Sonucu Jel Görüntüsü.....	40
Şekil 3-19: <i>LAD1</i> PCR Sonucu Jel Görüntüsü	40
Şekil 3-20: <i>CPO</i> PCR Sonucu Jel Görüntüsü	41
Şekil 3-21: <i>CSF1R</i> PCR Sonucu Jel Görüntüsü	41

Şekil 3-22: RNF44 PCR Sonucu Jel Görüntüsü	42
Şekil 4-1: <i>SLC6A19</i> genindeki c.1270C>G varyantın IGV görüntüsü	45
Şekil 4-2: <i>SCN3A</i> genindeki c.1687C>T (G>A) varyantın IGV görüntüsü	45
Şekil 4-3: <i>ADAMTS2</i> genindeki c.548G>A (C>T) varyantın IGV görüntüsü.....	46
Şekil 4-4: <i>LAD1</i> genindeki c.458C>G (G>C) varyantın IGV görüntüsü	46
Şekil 4-5: <i>CPO</i> genindeki c.434A>G varyantın IGV görüntüsü	47
Şekil 4-6: <i>RNF44</i> genindeki c.985G>A (C>T) varyantın IGV görüntüsü	47
Şekil 4-7: <i>SLC6A19</i> genindeki c.1270C>G varyantının Sanger Dizileme sonucu.....	48
Şekil 4-8: <i>SCN3A</i> genindeki c.1687C>T varyantının Sanger Dizileme sonucu.....	49
Şekil 4-9: <i>ADAMTS2</i> genindeki c.548G>A varyantının Sanger Dizileme sonucu.....	50
Şekil 4-10: <i>LAD1</i> genindeki c.458C>G varyantının Sanger Dizileme sonucu.....	50
Şekil 4-11: <i>LAD1</i> genindeki varyantın Chromas Programından alınmış Sanger dizileme görüntüleri.....	51
Şekil 4-12: <i>CPO</i> genindeki c.434A>G varyantının Sanger Dizileme sonucu.....	51
Şekil 4-13: <i>CSF1R</i> genindeki c.2239G>A varyantının Sanger Dizileme sonucu	52
Şekil 4-14: <i>CSF1R</i> genindeki varyantın Chromas Programından alınmış Sanger dizileme görüntüleri.....	52
Şekil 4-15: <i>RNF44</i> genindeki c.985G>A varyantının Sanger Dizileme sonucu	53
Şekil 4-16: <i>RNF44</i> genindeki varyantın Chromas Programından alınmış Sanger dizileme görüntüleri.....	53
Şekil 4-17: <i>SLC6A19</i> genindeki c.1270C>G varyantının ailesel segregasyonu.....	54
Şekil 4-18: <i>SCN3A</i> genindeki c.1687C>T varyantının ailesel segregasyonu	55
Şekil 4-19: <i>ADAMTS2</i> genindeki c.548G>A varyantının ailesel segregasyonu	55
Şekil 4-20: <i>LAD1</i> genindeki c.458C>G varyantının ailesel segregasyonu.....	56
Şekil 4-21: <i>CPO</i> genindeki c.434A>G varyantının ailesel segregasyonu	56
Şekil 4-22: <i>CSF1R</i> genindeki c.2239G>A varyantının ailesel segregasyonu	57
Şekil 4-23: <i>RNF44</i> genindeki c.985G>A varyantının ailesel segregasyonu	57

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NGS: Next Generation Sequencing, Yeni Nesil Dizileme

WES: Whole Exome Sequencing, Tüm Ekzom Dizileme

FAME: Familial Adult Myoclonic Epilepsy, Ailesel Yetişkin Miyoklonik Epilepsi

GJE: Genetik Jeneralize Epilepsi

İJE: İdiyopatik Jeneralize Epilepsi

GWAS: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

ILAE: International League Against Epilepsy, Uluslararası Epilepsi Birliği

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ADCME: Otozomal Dominant Kortikal Tremor, Miyoklonus Ve Epilepsi

BAFME: Benign Erişkin Ailesel Miyoklonik Epilepsi

CNV: Copy Number Variation, Kopya Sayısı Değişiklikleri

dNTP: Deoksinükleotid

ddNTP: Dideoksinükleotid

SNP: Single Nucleotide Polymorphism, Tek Nükleotit Polimorfizmleri

UCSC: University of California Santa Cruz

NCBI: National Center for Biotechnology

gnomAD: Genome Aggregation Database

ExAC: Exome Aggregation Consortium

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

HGMD: The Human Gene Mutation Database

VEP: Variant Effect Predictor

IGV: Integrative Genomics Viewer

MAF: Minör Alel Frekansı

VF: Varyant Frekansı

ACMG-AMP: American College of Medical Genetics and Genomics-Association for Molecular Pathology

VUS: Variant of Uncertain Significance, Önemi Belirlenememiş Varyant

ÖZET

Tan, B. (2022). Tüm Genom Yaklaşımlarıyla Epilepsi Genlerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Nadir görülen nörolojik bir hastalık olan Epilepsi, günümüzde bile tam olarak aydınlatılamamış kompleks bir etiyolojiye sahiptir. Bu durum tıp alanında son yıllarda yaşanan gelişmelere rağmen hala bazı hastaların tedavi görememesine neden olmaktadır. Bu sebeple epilepsi ile ilgili yapılacak yeni çalışmalar, özellikle bu hastaların tedavi görmesi ve tedavi gören hastaların tedavisine katkı sağlanması için hala çok büyük önem arz etmektedir. Yeni Nesil Dizileme'deki (NGS) son gelişmeler bu ihtiyacı karşılayabilecek yeni bir bakış açısını ortaya çıkarmıştır. Tüm genom perspektifinde NGS yöntemlerinden biri olan Tüm Ekzom Dizileme (WES) ile elde edilen yüksek çıktılı verilerin analizi, kompleks hastalıklarda bile patojenik varyantların keşfedilmesine olanak sağlamıştır.

Bu tez çalışmasında, bir ailedeki Ailesel Yetişkin Miyoklonik Epilepsi'den (FAME) etkilenmiş 3 çocuk, anne, baba, teyze ve dayının bulunduğu 7 birey incelenmiştir. Etkilenmiş 3 çocuğa yapılan WES çalışması datasının analizi ile elde edilen varyantların tüm ailedeki segregasyonu ve epilepsiyle ilişkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, 3 kardeşin WES verisinde de ortak olarak *SLC6A19*, *SCN3A*, *ADAMTS2*, *CPO*, *LAD1*, *CSF1R* ve *RNF44* genlerinde tahmin araçları tarafından patojenik olarak nitelendirilen yanlış anlamlı (missense) bazı varyantlar saptanmıştır. Bu varyantlar geniş ailenin diğer bireylerinde de Sanger dizileme yöntemiyle taranmış ve varyantların segregasyonu belirlenmiştir. Ek olarak, bu varyantların bulundukları genlerin epilepsi patogenezi açısından nöronlarda elektriksel uyarıların üretimi ve yayılımı, nörotransmitter taşıma, hücrel bölünme, büyüme veya farklılaşma vb. temel hücrel süreçlerin düzenlenmesi gibi rollerinin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgularla, NGS yöntemlerinin tüm genom ve ekzom perspektifi ile farklı segregasyon modelleriyle kalıtılan kompleks hastalıklarda, hastalıkla ilişkili genlerin tespit edilebileceği ortaya konmuştur. Bu çalışmayı, pentamer ekspansiyonu ile öne çıkan FAME kliniğinde intronik tekrar dizilerinin inceleneceği devam çalışmaları takip edecektir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, FAME, WES, *SLC6A19*, *SCN3A*

Bu çalışma, Prof. Dr. Sibel Aylin UĞUR İŞERİ adına verilmiş olan TÜBA-Üstün Başarılı Genç Bilim İnsanı Ödülleri (TÜBA-GEBİP) 2019 Desteği ve Türk Nöroloji Derneğinin katkılarıyla desteklenmiştir.

ABSTRACT

Tan, B. (2022). Investigation of Epilepsy Genes by Whole Genome Approaches. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Genetics. Master Thesis. Istanbul.

Epilepsy, a rare neurological disease, has a complex etiology that has not been fully elucidated even today. This situation still causes some patients not to be treated despite the developments in the field of medicine in recent years. For this reason, new studies on epilepsy are still of great importance, especially in terms of treating these patients and contributing to the treatment of patients receiving treatment. Recent developments in Next Generation Sequencing (NGS) have revealed a new perspective that can meet this need. Analysis of high-throughput data obtained with Whole Exome Sequencing (WES), one of the NGS methods in the whole genome perspective, has enabled the discovery of pathogenic variants even in complex diseases.

In this thesis, 7 individuals in a family, including 3 children, mother, father, aunt and uncle, affected by Familial Adult Myoclonic Epilepsy (FAME) were examined. The segregation of the variants obtained by analyzing the data of the WES study on 3 affected children and their association with epilepsy in the whole family were examined. As a result of the study, some missense variants, which were defined as pathogenic by prediction tools, were detected in the *SLC6A19*, *SCN3A*, *ADAMTS2*, *CPO*, *LAD1*, *CSF1R* and *RNF44* genes in the WES data of the 3 siblings. These variants were also screened in other members of the extended family using the Sanger sequencing method and the segregation of the variants was determined. In addition, in terms of the pathogenesis of epilepsy, the genes in which these variants are found are involved in the production and propagation of electrical impulses in neurons, neurotransmitter transport, cellular division, growth or differentiation, etc. It has been determined that they have roles such as the regulation of basic cellular processes. With the findings obtained, it has been revealed that disease-related genes can be detected in complex diseases inherited with different segregation models with the whole genome and exome perspective of NGS methods. This study will be followed by follow-up studies that will examine intronic repeat sequences in the FAME clinic, which stands out with pentamer expansion.

Keywords: Epilepsy, FAME, WES, *SLC6A19*, *SCN3A*

This study was supported by the Turkish Academy of Sciences-Outstanding Young Scientist Awards (TÜBA-GEBIP) 2019 Support, given on behalf of Prof. Dr. Sibel Aylin UGUR ISERI and the contributions of the Turkish Neurological Society.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, beyindeki aşırı elektrik boşalması sonucu ortaya çıkan nöbetlerin eşlik ettiği nörolojik bir bozukluktur (Fisher ve ark. 2014). Dünya üzerindeki her 1000 kişiden 7'sini etkileyen epilepsi, monogenetik, oligogenik ve kompleks olarak farklı formlara sahip olup, nöbet türleri açısından Fokal, Jeneralize ve bilinmeyen olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Epilepsinin %15-20 sini genetik jeneralize epilepsiler (GJE) eski adıyla idiyopatik jeneralize epilepsiler (İJE) oluşturur. Absans, miyoklonik tonik-klonik vb. nöbet türleri ile karakterize olabilir. Epilepsinin alt türlerinden biri miyoklonus, kortikal tremor ve jeneralize tonik-klonik nöbetlerin görüldüğü Ailesel Yetişkin Miyoklonik Epilepsi yani FAME'dir (Crompton ve ark. 2012).

Günümüze kadar kompleks hastalıklara yaklaşımda genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılarak, kompleks hastalık yaygın varyant incelemesi yapılmıştır. Epilepsinin çok faktörlü durumundan dolayı ikiz ve GWAS çalışmalarındaki GJE ile ilişkili riskli genleri belirleme çabaları büyük ölçüde başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Myers ve ark. 2015; Epi4K consortium, 2017; May ve ark. 2018). Bu durum epilepsinin farklı türlerinin genetik altyapısını çözmek adına her bir birey için spesifik genetik riskleri belirlemeyi temel bir zorunluluk haline getirmiştir. Bu zorunlulukla birlikte son 5 yıldır, epilepsi gibi kompleks nörolojik hastalıklar için Yeni Nesil Dizileme (NGS) ile beraber kompleks hastalık nadir varyant incelemesi gibi bir yaklaşım ön plana çıktı (Epi25 Collaborative 2019). NGS'nin bir türü olan ekzom dizileme ile yapılan çalışmalarda, genetik açıklamasının basit olduğu düşünülen bireysel hastaların tanısal yorumuna odaklanarak yapılan biyoinformatik analizlerde daha başarılı sonuçlar elde edildi (Povysil ve ark. 2019). Nadir varyantların karmaşık özelliklere etkisini sorgulamak, kompleks hastalık nadir varyant analitik yaklaşımlarını ortaya çıkardı. Bu yaklaşımla, GWAS çalışmalarındaki kadar çok sayıda sonuç çıkmasa da aşırı derecede nadir ve daha anlamlı sonuçlar çıkmaktadır (Epi25 Collaborative 2019).

Bu bağlamda, FAME tanısı almış 3 kardeşin bulunduğu bir ailede anne, baba, teyze ve dayı dahil olmak üzere 7 kişilik bir aile grubunda tüm ekzom dizileme yöntemiyle hastalıkla ilişkili olabilecek aday nadir varyantların araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Uluslararası Epilepsi Birliği'ne (ILAE) göre epilepsi, kişinin baş ağrısı, ateş, uykusuzluk veya ilaç kullanımına bağlı olmadan, 24 saat arayla en az iki kere nöbet geçirmesi olarak tanımlanmış nörolojik bir hastalıktır (Kaculini ve ark. 2021).

Epilepsinin antik tarihi, Mezopotamya'da bulunmuş olan üzerinde epilepsi nöbeti geçiren bir kişinin tasvirlerinin olduğu 4 asırlık bir Akad tabletine kadar uzanır (Labat 1951). Bu tabletlerden yaklaşık bin yıl sonra yazılmış, "Bütün hastalıklar" anlamına gelen Sakikku isimli, birkaç epilepsi nöbet tipinin tanımlandığı, sınıflandırıldığı ve epilepsi semptomlarının anlatıldığı teşhis kılavuzları mevcuttur. O dönemde nöbetler, bedenin kötü ruhlar tarafından ele geçirilmesi olarak açıklandığı için hastalık tedavi edilmiyordu. Bu konuda Mezopotamyalılardan ayrılan Mısırlılar, kafasında açık yaraya sahip bir hasta ile MÖ 1700 lü yıllarda yaptıkları çalışmada nöbetlerin kortikal bozulmadan kaynaklanabileceğini kanıtladılar (Magiorkinis ve ark. 2010). MÖ 7. yüzyıla ait Çin metinlerinde ise bir grup doktor, genelleştirilmiş nöbetleri özetleyen bir eser yayınlanmıştır. Çinliler, epilepsiyi tedavi etmek için masaj, şifalı otlar ve akupunktur kullanırlardı (Lai, C. W., & Lai, Y. H. 1991).

Hipokrat, epilepsiyi beyne bağlayan, bulaşıcı olmaktan çok kalıtsal olduğunu öne süren ve travma sonrası epilepsi kavramını ortaya atanlar ilk kişilerdendi. MÖ 4. yüzyılda Aristoteles, epilepsi ve uyku arasında benzer mekanizmalar olabileceğini öne sürdü ve bu fikirleri yüzyıllarca bilim dünyasını etkiledi. Epilepsinin bir beyin hastalığı olması fikri 17. yüzyıl Avrupa'sında daha çok önem kazanmaya başladı. Bu durum epilepsi ile ilgili yeni yayınlar yazılmasını sağladı. 19. yy. başlarında epilepside farmakolojik tedavi düşünceleri ön plana çıktı. Yine aynı yüzyılda Dr. Robert Bentley Todd tarafından, epilepsi nöbetlerinin nedeninin beyindeki elektrik boşalmaları olabileceği öne sürüldü (Binder ve ark. 2011) ve daha sonra, Faraday'ın manyetoelektrik döndürme makinesini kullanarak hipotezini kanıtlandı (Todd 2005).

20. yy'da, epilepsinin bilimsel ve sosyal farkındalığını arttırmak ve bilgi kirliliğini engellemek, tedavi geliştirmek için uluslararası dernekler kuruldu. Aynı yüzyılın başında epilepsinin kalıtsal bir hastalık olduğu aile çalışmaları ile

kanıtlanmıştır (Prasad ve ark. 1999). Epileptik model organizmaların üretilmesi ve bu organizmalarla yapılan çalışmalar (Lehesjoki ve ark. 1991), ikiz çalışmaları (Berkovic ve ark. 1998), İnsan Genom Projesi ile genomumuz hakkında daha kapsamlı bilgilerin ortaya çıkması ve bunlara ek olarak teknolojik alt yapının da gelişmesi, hastalığın genetik özelliklerinin ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

Şeytani mülkiyet algısının hakim olduğu antik çağdan, bilimsel keşiflerin hızla ortaya çıktığı son birkaç yüzyıla kadar epilepsi hastalığının kendisi ve nedeni anlaşılamadığından, hastalar çok çeşitli zorbalığa, işkenceye ya da ötekileştirmeye maruz kalmıştır. Tüm bilimsel keşiflere ve atılan adımlara rağmen, epilepsi ile ilgili küresel olarak hala birçok yanlış algı ve uygulama mevcuttur. Epilepsi tedavisindeki modern gelişmeler ve tedaviyi daha da ileri götürecek yeni keşifler, şüphesiz epilepsi hastalarının daha normal bir yaşam sürmelerine yardımcı olacaktır (Kaculini ve ark. 2021).

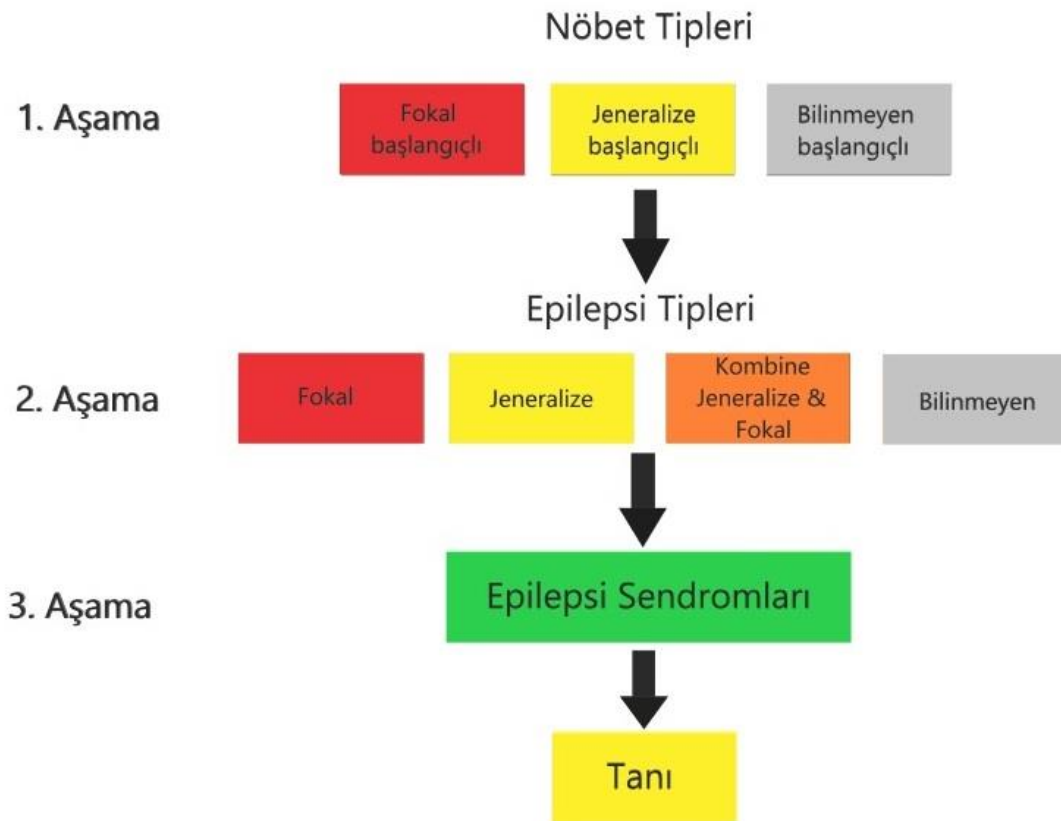
2.1.1. Epilepsinin Tanımı, İnsidansı ve Prevalansı

Epilepsi, tekrarlayan nöbetlere yol açan beyindeki artmış nöronal ve elektriksel aktivite ile karakterize nörolojik bir bozukluktur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) güncel verilerine göre, her yıl yaklaşık 5 milyon kişi ilk defa epilepsi tanısı almaktadır (WHO, Epilepsy). Dünyanın en sık görülen dördüncü nörolojik hastalığı olan bu hastalık, toplamda 50 milyondan fazla bireyi etkiler (Perucca 2020; What Is Epilepsy? | Epilepsy Foundation, (n.d.)). Dünya popülasyonunun yaklaşık %4-10 kadarı ise aktif nöbetleri olan veya tedavi ihtiyacı olan aktif epilepsili bireylerden oluşmaktadır. Epilepsi muhtemelen bazı endemik salgınların varlığı ve sağlık sisteminin yetersizliğinden dolayı, düşük ve orta gelirli ülkelerde yüksek gelirli ülkelere oranla daha çok görülmektedir. Öyle ki, tüm epilepsi hastalarının %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (WHO, Epilepsy).

2.1.2. Epilepsinin Sınıflandırılması

Epilepsi ile ilgili ilk sınıflandırma Uluslararası Epilepsi Birliği (ILAE) tarafından 1985 yılında yapılan "Epilepsilerin ve Epileptik Sendromların Sınıflandırılması"dır. Bu versiyon 1989'da güncellenerek yayınlandı. 1989 ILAE sınıflandırmasında birçok kavram ana hatlarıyla açıklandı. Bu versiyon günümüze kadar çok işe yaradı, fakat son birkaç on yılda epilepsi ile ilgili yapılan bilimsel keşiflerle epilepsili bireylerin tanı ve tedavisine yönelik anlayışı ve yaklaşımı temelden

değiştirecek bir revizyona ihtiyaç duyuldu (Scheffer ve ark. 2017). 2017 yılında yine ILAE tarafından yapılan Epilepsi Sınıflandırması'nda, teshiş için nöbet tipi, epilepsi tipi ve epilepsi sendromu olmak üzere 3 temel tanı aşaması tanımlanmıştır. Yani bir bireye epilepsi tanısı koymak için önce hangi tip nöbet görüldüğüne, sonra hangi tip epilepsi sınıfına girdiğine, en son epilepsi sendromlarından olup olmadığına bakılır. Bu sınıflandırmaya göre epilepsi çeşitleri fokal epilepsiler, jeneralize epilepsiler, kombine jeneralize & fokal epilepsiler ve bilinmeyen olarak dörde ayrılır (Şekil 2-1). Buna ek olarak, daha önce birkaç sendromu içeren İdiyopatik Jeneralize Epilepsi kavramı oluşturulmuştur (Classification and Definition of Epilepsy Syndromes, ILAE 2017). Daha sonra İJE ifadesi, genetik temelinin olduğu keşfedildiği için genetik etiyojolojiyi yansıtmaması amacıyla GJE olarak değiştirilmiştir. GJE, iyi bilinen dört epilepsi sendromunu içerir: Çocukluk Absans Epilepsisi, Juvenil Absans Epilepsisi, Juvenil Miyoklonik Epilepsi ve Tek Başına Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetler (Hirsch ve ark. 2022).



Şekil 2-1: Epilepsi Tanı Aşamaları

2.1.3. Epilepsi Nöbetlerinin Sınıflandırılması

WHO, nöbeti beyin hücrelerindeki anlık ve aşırı düzeyde elektrik boşalması olarak tanımlamıştır (WHO, Epilepsy). 2017 ILAE Epilepsi Nöbet Sınıflandırması'na göre nöbetler, fokal başlangıçlı, jeneralize başlangıçlı ve bilinmeyen başlangıçlı nöbetler olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Bunlar da kendi içlerinde motor ve motor olmayan nöbetlere ayrılır (Şekil 2-1). Buna ek olarak sınıflandırılmayan epilepsi nöbet türleri vardır (Fisher ve ark. 2014). 2017 ILAE Epilepsi nöbet sınıflandırmasında tanımlanan Kombine Jeneralize ve Fokal Epilepsi grubunda veya Dravet Sendromu gibi bazı epilepsi sendromlarında hem jeneralize hem de fokal nöbet birlikte görülür (Scheffer ve ark., 2017). Kısa süreli kasılmalar veya dikkat gecikmelerinden, uzun süreli ve şiddetli kasılmalara kadar değişebilen nöbetler, vücudun bir kısmını (fokal) veya tamamını (jeneralize) etkileyebilir. Hasta nöbet sırasında bazen istemsiz epizodlar yaşama, farkındalık veya bilinç kaybı, görme/işitme/tat duyularında veya diğer bilişsel işlevlerde geçici semptomlar, mesane veya bağırsak fonksiyonu kontrolünün etkilenmesi gibi durumlar yaşayabilir ve bu durum günde birkaç defa veya yılda birden az sayıda ortaya çıkabilir (WHO, Epilepsy). Stres, uyku yoksunluğu veya hastalık nöbet geçirmeyi tetikleyebilir (Scheffer ve ark. 2017). Epilepsili kişilerde nöbetlere bağlı yaralanmalar, anksiyete ve depresyon gibi daha yüksek oranda fiziksel ve psikolojik rahatsızlık görülmektedir. Bu kişiler, genel nüfusa göre üç kat daha fazla erken ölüm riskine sahip olup, erken ölüm oranları düşük ve orta gelirli ülkelerde veya kırsal alanlarda diğer yerlere göre daha yüksektir (WHO, Epilepsy).

2.1.4. Epilepsi Sendromları

Epilepsi Sendromu, EEG, nöbet tipleri ve birlikte ortaya çıkan karakteristik görüntüleme özelliklerinin bir arada olduğu bir durumdur. West Sendromu, Dravet Sendromu, GJE sendromlarından Çocukluk absans epilepsisi, juvenil miyoklonik epilepsi gibi bilinen birçok epilepsi sendromu vardır (Scheffer ve ark. 2017). Buna rağmen, ILAE bu sendromlar için hiçbir zaman resmi bir sınıflandırması yapmamıştır (Berg ve ark. 2010). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla birlikte epilepsi ve epilepsi sendromlarının daha önce bilinmeyen genetik altyapıları aydınlanmıştır. Buna en iyi örnek, Dravet sendromudur. Bu sendromda hastaların %80'den fazlası *SCN1A* geninde bulunan patojenik bir varyant taşır (Scheffer ve ark. 2017).

2.2. Ailesel Erişkin Miyoklonik Epilepsi (FAME)

Ailesel Erişkin Miyoklonik Epilepsi, otozomal dominant kalıtımla aktarılan kortikal tremor, miyoklonus ve jeneralize tonik-klonik nöbetler ile karakterize nadir görülen bir epilepsi türüdür (“Familial Adult Myoclonic Epilepsy//ILAE” n.d.). İlk olarak 1990 yılında Japonya'da tanımlanmış (Ikeda ve ark. 1990) olan FAME, ILAE'nin 2017 yılında yaptığı yeni sınıflandırma ile bu isimle ifade edilmeden önce, Otozomal dominant kortikal tremor, miyoklonus ve epilepsi (ADCME) veya benign erişkin ailesel miyoklonik epilepsi (BAFME) gibi farklı isimlerle ifade edilmiştir. FAME'nin genetik nedeni kesin olarak bilinmemektedir. İlk klinik tanımını takip eden 20 yılda, farklı kromozomlar üzerinde birkaç genetik lokus haritalanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, birbiri ile ilişkili olmayan genlerin intronlarında benzer pentamerik ekspansiyonların önemli olduğu, FAME ekspansiyonlarının gerçekleştiği farklı lokusların olduğu ve bu lokuslardaki genlerin fonksiyonlarının tamamen farklı olduğu görülmüştür (Peters ve ark. 2022).

FAME'nin semptomları, genellikle birkaç on yılda yavaş yavaş ve ilerleyici bir şekilde, oldukça değişken bir başlangıç yaşında (3-70 yaş arası) ortaya çıkmaktadır (van den Ende ve ark. 2018). Kortikal tremor, miyoklonusa ek olarak kognitif bozukluk, gece körlüğü ve migren gibi ek bulgular görülebilir (Elia ve ark. 1998; Saka ve Saygı 2000). Günümüze kadar FAME'li yaklaşık 150 aile bildirilmiş olmasına rağmen penetrasyonla ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (Ishiura ve ark. 2020). Hafif ve gözden kaçan semptomlardan dolayı henüz teşhis konulamayan veya JME gibi daha sık görülen bozukluklarla karıştırılarak yanlış teşhis konulan birçok ailenin olduğu varsayılmaktadır (Aydın Özemir ve ark. 2016; Florian ve ark. 2019; Bennett ve ark. 2020). Bu yetersiz teşhisten dolayı FAME'nin prevalansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, 1/35.000'den de az olduğu tahmin edilmektedir (Lagorio ve ark. 2019). FAME'de nöbet başlangıç yaşı 12 ile 67 arasında değişmekle birlikte ve ortalama başlangıç yaşı 30'dur (Striano ve ark. 2016). FAME1 ve FAME2'de nöbetler miyoklonus başlangıcından birkaç yıl sonra, FAME3'te de kortikal miyoklonustan önce veya ikisi aynı zamanda ortaya çıkabilir (Florian ve ark. 2019).

2.3. Epilepsinin Etiyolojisi ve Epileptogenez

2017 ILAE Epilepsi sınıflandırmasında epilepsiye neden olabilecek 6 farklı etiyolojik grup tanımlanmıştır (Classification and Definition of Epilepsy Syndromes,

ILAE 2017). Yapısal, genetik, enfeksiyöz, metabolik, immünolojik ve bilinmeyen şeklinde tanımlanan bu gruplar, farklı mekanizmalarla epileptogenezi tetikleyerek epilepsiye yol açabilir (Scheffer ve ark. 2017). Epileptogenez, bazı moleküler yolların patofizyolojik olarak etkilenmesi ve hücrel değişikliklerin tetiklenmesiyle beyin hasar görmesi sonucu epilepsi geliştirme sürecidir (Aksöz 2018). Beyindeki ilk patolojik hasar sonucunda, beyin “epileptojenik odak” olarak isimlendirilen bölgelerindeki hücrelerin uyarılabilirliği artar ve bu hücreler çevre hücrelerin de uyarılabilirliğini artırır (Baykan 2004 pp. 279-308). Bu ilk hasarın ardından hasta, epileptogenez sürecinin başladığı ancak nöbet aktivitesinin olmadığı ve kritik beyin bölgelerinde patofizyolojik hücrel değişikliklerin olduğu latent dönem olarak adlandırılan bir döneme girer (Aroniadou-Anderjaska ve ark. 2008; Aksöz 2018). Bu dönemde görülen hücrel değişiklikler; nörojenez, nörodejenerasyon, anjiyogenez, aksonal hasar ya da filizlenme, gliosis, dendritlerin şekillerinin değişmesi, bazı inflamatuvar hücrelerin aşırı artması, edinilmiş kanalopatiler ve ekstraselüler matristeki değişiklikler olabilir (Pitkänen ve ark. 2009). Başlangıç hasarından spontan nöbetlerin görülmesi anına kadar, bu tür patofizyolojik değişikliklerle epileptogenez süreci epilepsiyi ortaya çıkarır (Bertram 2007; Conboy ve ark. 2021).

Epilepsinin nöbetlerinin hepsinde senkronite ya da artmış nöronal uyarılabilirlik gibi durumlar ortak olsa da, nöbetlerin ortaya çıkmasına neden olan mekanizmalar farklılık taşımaktadır (Bambal ve ark. 2011). Şu ana kadar epilepsilerin ortaya çıkmasında rol oynayan kalsiyum, potasyum, sodyum ve klor kanalları, asetilkolin, nikotinik, glutamat ve GABA reseptörü gibi bazı hücre zarı elemanlarının yapısını ya da işleyişini değiştiren genetik faktörlerden bazıları tespit edilmiştir. Epilepsilerin çoğunda kompleks veya poligenik kalıtım görülür. Tek gen kalıtımı görülen epilepsilerin çoğuna, iyon kanallarını kodlayan genlerdeki varyasyonlar sebep olur (Sánchez-Carpintero Abad ve ark. 2007). Bu genlerdeki varyasyonlar, nörotransmisyonun artması veya azalmasına neden olmaktadır. Bunun dışında, GABAerjik sistemde de genetik bozukluklar keşfedilmiştir. γ -aminobütirik asit yani GABA, primer jeneralize epilepsilerle ilişkilendirilmiş GABA reseptörlerinin aracılığıyla beyinde nöronal uyarılabilirliği ve uyarının iletilebilirliğini baskılar (Kang ve ark. 2009). GABA molekülü, GABAA reseptörüne bağlandığında kanalın açılması ve klor iyonlarının hücre içine girmesiyle nöronal aktivitenin inhibisyonuna neden olurken, GABAB reseptörüne bağlandığında potasyum geçişini artırır, kalsiyum girişini azaltır ve sinaps

öncesi diğer nörotransmitterlerin salınımını baskılar (Dibbens ve ark. 2009; Wallace 2002).

Tüm bu çalışmalara rağmen, epilepsilerin karmaşık patofizyolojisi ve epileptogeneze neden olan hücrel mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Bambal ve ark. 2011). Bu mekanizmaları tam anlamıyla anlamak, epilepsiyi engelleyecek veya epilepsinin şiddetini azaltacak tedavilerin geliştirilmesi için çok önemlidir (Aroniadou-Anderjaska ve ark. 2008).

2.4. Epilepsi Genetiği

Epilepsilerin ortaya çıkmasındaki genetik özellikler GJE'ler (eski adıyla İJE), Genomik/Kromozomal ve Sendromik Bozukluklar, Gelişimsel ve Epileptik Ensefalopatiler ve Fokal Epilepsiler olmak üzere 4 başlıkta incelenebilir. Görülen bu genetik bozukluklar kromozomal, tek gen anomalileri veya multifaktöriyel nedenli olabilir (Perucca ve ark. 2020; "Klinik Nörogenetik." n.d. Accessed August 22, 2022).

Çoğu ailesel epilepsi türlerinin görüldüğü olgularda poligenik kalıtım söz konusudur. Buna çevresel faktörler de dahil olduğu için özünde multifaktöriyel kalıtım görülür. Farklı genlerin aynı epilepsiye yol açması yani genetik heterojenite ve tek bir genin farklı epilepsi türlerini ortaya çıkarması yani klinik heterojenitenin varlığı epilepsi hastalığındaki karmaşık durumları meydana getirir. Bu karmaşa epilepsi türünün kalıtım paternini tanımlamayı zorlaştırır (Helbig ve ark. 2016; 2018). Tüm epilepsilerin yaklaşık %20'sini oluşturan GJE'ler de genelde bu gruptaki epilepsilerdendir. Büyük ölçüde poligenik bir kalıtım modeli gösteren GJE'ler, bazen Mendel kalıtım modeli de gösterebilir. Ateşli nöbetlerle birlikte çocukluk çağı absans epilepsisinin görüldüğü Avustralyalı bir ailede yapılan çalışmalarda tespit edilen GABAA reseptörünün $\gamma 2$ alt birimini kodlayan *GABRG2* geni, Juvenil miyoklonik epilepsinin görüldüğü Fransız Kanadalı bir ailede yapılan başka bir çalışmada tespit edilen alfa1 alt birimini kodlayan *GABRA1* geni ya da infantil metabolik ensefalopatide glikoz taşıyıcı protein 1'i (GLUT1) kodlayan *SLC2A1* geni epilepside görülen mendel kalıtıma örnektir (Perucca, P., & Perucca, E. 2019).

Epilepsiye neden olan keşfedilen en önemli gen anomalileri kalsiyum, potasyum, sodyum ve klor gibi iyon kanalları ile glutamat ve GABA reseptörü gibi epilepsi mekanizmalarında görev alan reseptörlerle ilişkilidir (Mantegazza ve ark. 2010). Angelman sendromu, Down sendromu (trizomi 21), Ring 20 sendromu,

Klinefelter sendromu (XXY) gibi hastalıklar da epilepside görülen kromozom anomalilerindendir (Şahin & Bebek 2017).

SCN1A Dravet sendromu, *ARS* varyantı, *PCDH19* varyantı, kopya sayısı değişiklikleri (CNV), mTOR yolağının aydınlatılması gibi gelişmeler, son yıllardaki genetik ilerlemelerin en çok etkilediği epileptik ensefalopatiler grubundaki genetik gelişmelere örnektir (Minardi ve ark. 2020; Myers & Mefford 2016)

1990’da keşfedilen nikotinik asetilkolin reseptörünün $\alpha 4$ alt birimini kodlayan *CHRNA4* geni, Voltaj kapılı potasyum kanalı geni olan *KCNQ2* ve *KCNQ3* geni, voltaj kapılı sodyum kanalı $\alpha 2$ alt birim geni *SCN2A* fokal epilepsiye neden olan mendelyen kalıtım gösteren genlerdendir (Avanzini ve ark. 2007). Yeni nesil dizileme tekniği (NGS) ortaya çıkınca çok daha fazla gen ve yolak keşfi olmuştur (Niestroj ve ark. 2020). mTOR sinyal yolağında görev alan GATOR1 kompleksinin alt birimlerini kodlayan *NPRL2*, *NPRL3* ve *DEPDC5* genleri ve bunların epileptogenezdeki rollerinin keşfi buna örnektir. GABA reseptörünü kodlayan *GABRG2* geni, Na kanalı alt birimlerini kodlayan *SCN1A* ve *SCN1B* genleri, sinapsta görevli olan *STX1B* geni Febril nöbetlere neden olan keşfedilmiş genlerdendir. İnterferon ile uyarılan *IFI44L* geni ve kızamık virüsü reseptörü kodlayan *CD46* geni bağışıklıkla ilgili bulunan genlerdir. Ateşli nöbet geçiren 3.000 çocuğun katıldığı Danimarka’da yapılan bir çalışmada, Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS) ile dört lokus ve *TMEM16* ailesi geni (*ANO3*) tespit edilmiştir. Son yıllarda, mikrodelsiyonlar ve CNV görülen *AKT*, *ARX*, *CDKL5*, *DCX* ve Frajil X sendromu ile ilişkilendirilmiş olan *FMR1* geni saptanmıştır (Myers ve ark. 2015; Hebbar ve ark. 2020).

Epilepsinin genetik temelini aydınlatmaya yönelik araştırmalarda, kliniği netleştirilmiş ailelerden alınan DNA örnekleri ile GWAS, bağlantı analizi, gen haritalaması, Tüm Genom Dizileme (WGS), WES gibi yöntemlerden uygun olanı çalışılarak gen ve varyasyon saptanır. Bulunan genlerin ürünleri ve hücredeki görevleri tanımlanır (Bebek 2021 pp. 35-44; Perucca ve ark. 2020). Bu araştırmalarda, temel amaç etiyopatogenezi aydınlatmak, daha etkin tedavi ve genetik danışmanlık verilmesini sağlamaktır (Ellis ve ark. 2020). Bu amaçla geçmişten bugüne birçok küçük veya büyük çaplı çalışmalar yapılmıştır. 12 ülke ve 29 merkezi katıldığı EPICURE çalışması bunlardan biriydi (ILAE Consortium on Complex Epilepsies 2014). Bu çalışma geniş ölçekli olmasına rağmen umut verici sonuçlar ortaya koymuşsa da

yeterince yüz güldürememiştir (Menzler ve ark. 2014; Walker ve ark. 2015). Kompleks hastalık yaygın varyant bakış açısını benimseyen çalışmalarından da hala yeterince sonuç alınamayınca kompleks hastalık nadir varyant bakış açısında araştırma yapan Epi25 gibi büyük çaplı başka çalışmalar yapılmıştır (Epi25 Collaborative, 2019).

2.5. Epilepside Güncel Moleküler Genetik Yaklaşımlar

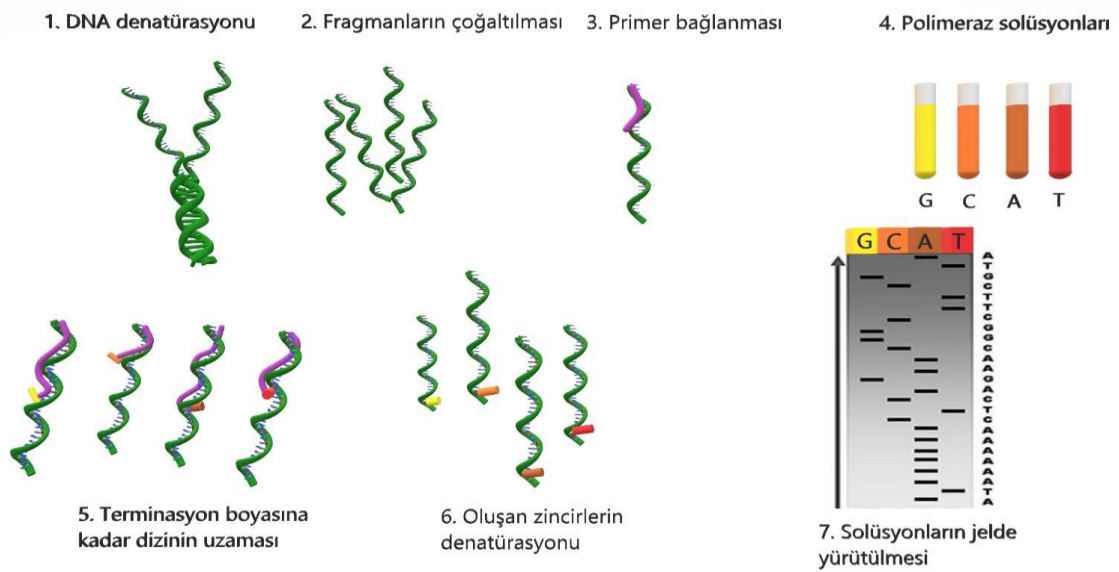
Epilepsiye yol açan genetik bozukluklar kromozomal anomali, tek gen anomali veya multifaktöriyel poligenik anomali kaynaklı olabilir (Perucca ve ark. 2020). Kromozomal anomali kaynaklı bozuklukları tespit etmek için kromozom analizi ve FISH gibi mikroskopi yöntemleri kullanılabilir (Sorge ve ark. 2010). Bunun dışındaki bozuklukları tespit etmek için RT-PCR, RFLP ve tekrar özgü STR analizi gibi genetik varyanta özgü yöntemler kullanılabilir. Ya da genom çapında varyant tespiti için WGS, WES, yeni nesil panel dizileme, RNA dizileme ve tek gene yönelik dizileme gibi NGS ve sanger dizileme yöntemleri kullanılabilir (Koch ve ark. 2021; Hunt-Jones ve ark. 2015). Bu yöntemlerle bulunan sonuçlar hedefe yönelik kantifikasyon imkanı sunan MLPA, qPCR, dijital droplet PCR ya da tüm genom moleküler sitogenetik yöntemlerinden aCGH, aSNP gibi kantitatif yaklaşımlarla desteklenebilir ve kanıtlanabilir (Maradei-Anaya ve ark. 2013; Mulley & Mefford 2011).

2.5.1. Sanger Dizileme

Sanger dizileme, *in vivo* ortamda DNA replike olurken zincirin sonuna deoksिनükleotidler (dNTP) yerine dideoksिनükleotidler (ddNTP) bağlanarak zincirin sonlanması ve bu sayede oluşan farklı uzunluklardaki DNA'ların jelde yürütme yoluyla hizalanarak DNA dizisine ulaşılmasıdır (Sanger ve ark. 1975; 1977). Keşfedildiği günden bugüne en yaygın dizileme yöntemi olsa da, günümüzde daha çok düşük bütçeli projeler için ya da NGS datasının validasyonu için kullanılmaktadır. Yüksek bütçeli çalışmalarda daha çok daha yeni bir teknoloji olan NGS kullanılmaktadır.

Sanger dizileme tekniği için, tek zincirli bir DNA kalıbı, bu diziye uygun primer, dNTP ve ddNTP'ler ve DNA polimeraz kullanılır. ddNTP'ler, dNTP'lerdeki serbest 3' OH grubuna sahip değildirler, bu da yapıştığı bölgede serbest 3'OH olmadığı için zincirin devamına yeni bazların eklenememesine neden olur. Böylece zincir sonlandırılarak farklı uzunlukta fragmanlar elde edilmiş olur. 95°C ve 60 °C arasında ısıнын ard arda arttırılması ve azaltması işleminin yaklaşık 35 döngüde tekrar edilmesi ile dizi çoğaltılır. Ardından farklı uzunluktaki bu fragmanlar elektrik akımı ile

kapiler düzeyde bir jelde yürütülerek sıraya konur ve sırayla yürüyen fragmanların işaretlenmiş moleküllerinin ışıması lazer kamera aracılığıyla çekilerek dizi verisine ulaşılır. İşaretlenen molekül, radyoaktif fosfor veya floresan bir boya ile işaretlenen ddNTP'ler veya primerler olabilir. Bu sayede işaretlenmiş zincirler, bazın türüne göre farklı renkte ışıma yapar. dNTP'lerin her biri için farklı bir tüp hazırlanır. Yeterli miktarda ve istenilen şekilde fragman sentezlenebilmesi için ddNTP'ler dNTP'lerin %1'i kadar eklenir. Toplam dNTP ve ddNTP miktarı ise dizilenecek dizinin uzunluğuna bağlıdır.

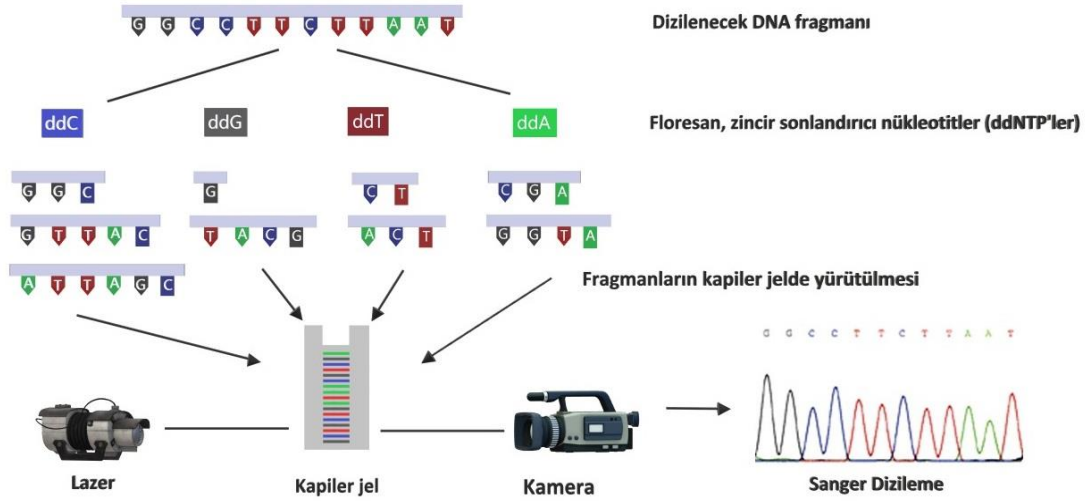


Şekil 2-2: İlk keşfedilen yöntemle yapılan Sanger Dizileme tekniği

("DNA Dizileme Yöntemleri." N.d. Accessed August 23, 2022.)

İlk keşfedilen teknikte, dört farklı dNTP için hazırlanmış dört ayrı karışım farklı kuyucuklara yüklenip agaroz jelde yürütülür, daha sonra bantlar UV ışığı veya otoradyografi ile X-ışını filmine aktarılır ve burdan dizi okunurdu (Şekil 2-2). Daha sonra geliştirilen yöntemle, her biri farklı dalga boylarında ışık yayan floresan boya ile işaretlenmiş dört farklı ddNTP'leri aynı tüpe koyarak Şekil 2-3'teki gibi tek bir reaksiyonda işlem yapılmaya başlandı. Bu yöntem hem daha uygun hem daha hızlı işlem yapılmasını sağlamıştır. Sanger dizilemenin dezavantajı ise, dizilenen bölgenin ilk 15-40 bazlık bir bölgesini düşük kalitede okuması ve 700-900 bazdan sonra dizi

okumasının bozulmasıdır. Bunun nedeni dizi uzadıkça bir bazlık farkla sıralanacak DNA fragmanlarını ayırmakta yetersiz kalmasıdır.



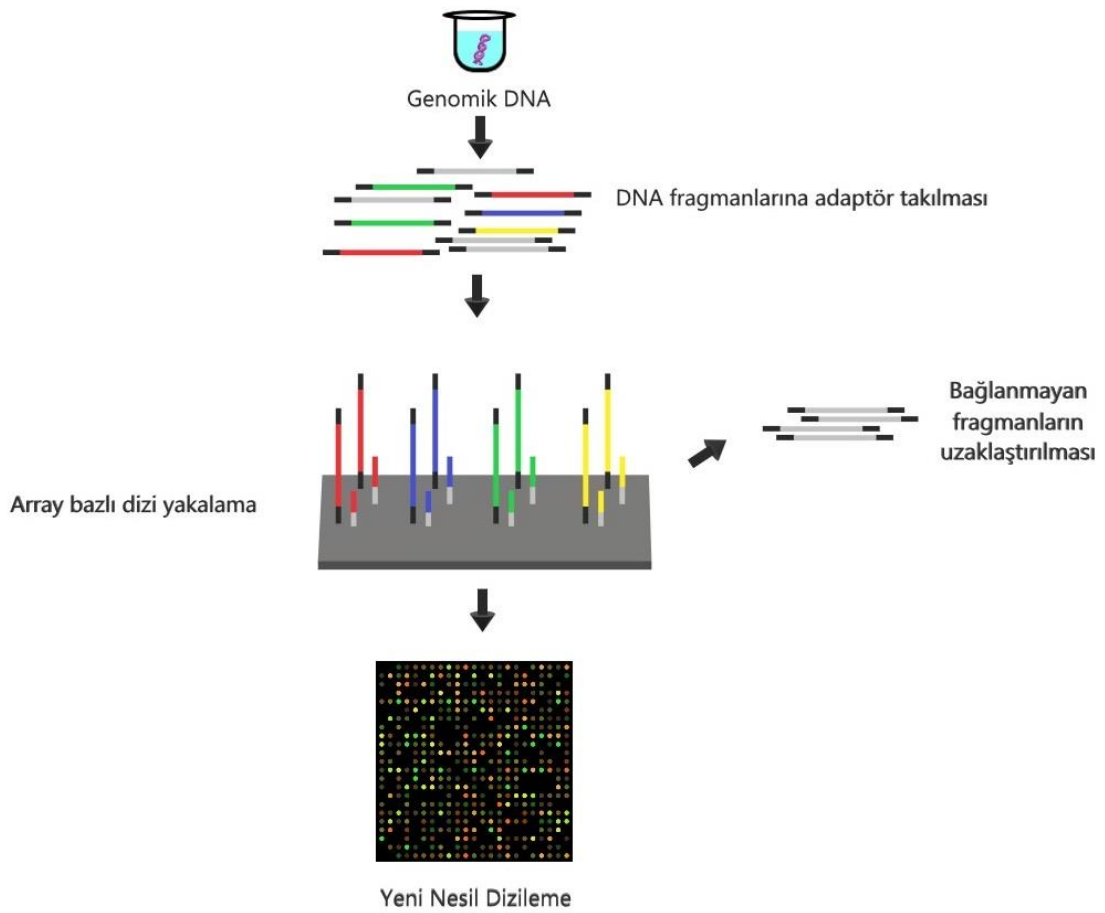
Şekil 2-3: Günümüzde kullanılan geliştirilmiş Sanger Dizileme yöntemi

2.5.2. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

NGS, DNA'yı fragmanlara ayırıp milyarlarca fragmanı aynı anda paralel olarak dizileme yöntemidir. Masif paralel dizileme olarak da bilinen bu yöntem DNA, RNA moleküllerini dizileme ve varyant tespiti için kullanılan yeni nesil bir teknolojidir. Bu yöntem sanger dizilemedeki gibi maksimum baz sınırı yoktur, gigabazlarca dizilik okumaları birkaç gün veya saatte tamamlayabilir. Bu boyutlardaki dizileri tek parça halinde değil birden fazla parçaya ayırarak, adaptörler ekleyerek, kitaplık oluşturup bunları sıralayarak ve sonra bu parçaları birleştirip genomik diziyi tamamlama tekniğiyle okur. Bu teknik maliyeti düşürür, verimi ve doğruluk oranını artırır.

NGS, teknik olarak 3 aşamada yapılır: kütüphane oluşturma, klonal amplifikasyon, döngüsel dizi sekanslama. Kütüphane oluşturma, ultrasonik yöntemle 200-500 baz uzunluğundaki fragmanlara ayrılmış genomik DNA parçalarının uçlarına 5' ve 3' adaptörlerin bağlanmasıdır. Adaptörler bağlandıktan sonra ya array-bazlı yakalama ya da solüsyon içinde yakalama yöntemlerinden biri ile kütüphane oluşturulur. Daha sonra emülsiyon PCR veya köprü amplifikasyonu yöntemi ile klonal amplifikasyon işlemi yapılır. Bundan sonra pyrosequencing, ligasyonla dizileme veya

sentez sırasında gerçek zamanlı dizileme yöntemlerinden herhangi biri ile sekanslama yapılır (Şekil 2-4). Tüm bu işlemler sırasında genomik DNA, primerler, DNA polimeraz ve her bazın ayrı renkte ışması için o baza özel floresanla işaretlenmiş 4 farklı baz kullanılır. Bu bazların 3' OH grupları, tek seferde yalnızca bir baz eklenebilecek şekilde kimyasal olarak korunur ve kalan tüm moleküller uzaklaştırılır. Bağlanan tek bir bazın floresan ışması lazerle tetiklenir ve ortaya çıkan sinyal kaydedilir. Sıradaki baz eklenmesi için 3' OH grubu koruyucusu çıkarılır ve eklenen yeni baz için yine aynı işlem uygulanır ve bu olaylar döngü halinde dizi tamamlanana kadar devam eder. Ardından sinyaller sayesinde tanımlanan dizi okumaları referans genoma göre hizalanır. Bu teknikle indel varyasyonlar, yapısal varyasyonlar, tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) ve CNV gibi farklı varyasyon tipleri tespit edilebilir.



Şekil 2-4: Genomik DNA'dan NGS tekniklerinden gerçek zamanlı dizileme yöntemi

2.5.2.1. Ekzom Dizileme (WES)

Ekzom dizileme, genomun kodlayan bölgelerinin dizilendiği genomik dizileme yaklaşımlarından biridir. Ekzom dizilemede iki yol vardır, ya DNA'nın ekzon bölgelerini yüksek verimli bir DNA dizileme teknolojisi kullanarak dizilemek, ya da DNA'nın protein kodlayan alt birimini seçmektir. Bu dizileme türünde temel amaç, WGS daha düşük bir maliyetle genomun tamamını değil yalnızca proteine dönüşecek olan dizideki protein oluşumunu etkileyebilecek varyantları tespit etmektir.

WES yöntemi, özellikle Mendel kalıtmı nadir hastalıkların çalışmaları için çok önemlidir. Bu hastalıklar genelde çok nadir görülen varyantlardan dolayı ortaya çıkar. Bir hastalığa yol açan varyantın protein kodlayan bölgede olması ihtimali daha yüksek olduğu göz önünde bulundurulursa, genomun %1'ini oluşturan ekzonlara odaklanmak hem daha hedefe yönelik hem de daha uygun maliyetli bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, hem bir hastalığı ortaya çıkaran genlerde yer alan varyantları bulmak, hem de aynı klinik gösteren hastaların ekzomlarını kıyaslayarak o klinikle ilişkili yeni genleri keşfetmek için kullanılabilir.

Ekzom dizileme tekniğinde hedef zenginleştirme yöntemi ve sekanslama olmak üzere 2 temel adım vardır. Hedef zenginleştirme yönteminde sekansla aşamasına geçmeden DNA'nın istenilen bölgelerinin yakalanması sağlanır. Bu bölgeleri yakalamak için array bazlı yakalama veya solüsyonda yakalama yöntemleri kullanılabilir. Array bazlı yakalamada, DNA'nın istenilen bölgelerini içeren tek sarmallı fragmanlarla hazırlanmış mikroarrayler kullanılır. DNA fragmanlara ayrılır ve uçlarına adaptörler eklenir. Ardından bu fragmanlar mikroarray kuyucuklarındaki oligonükleotitlerle hibritleştirilir. Yıkama ile artıklar uzaklaştırılır ve hibrit DNA fragmanları PCR ile çoğaltılır. Solüsyonda yakalamada ise, ilgili DNA bölgelerini yakalamak için özel bilyelerle işaretlenmiş probler kullanılır. Bu probler fragmanlara ayrılmış DNA ile hibridize edilir. Yıkama sırasında DNA fragmanları bilyeler sayesinde diğer atık materyallerden ayrıştırılır. Ardından bilyeler çıkarılır DNA fragmanları sekanslanır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

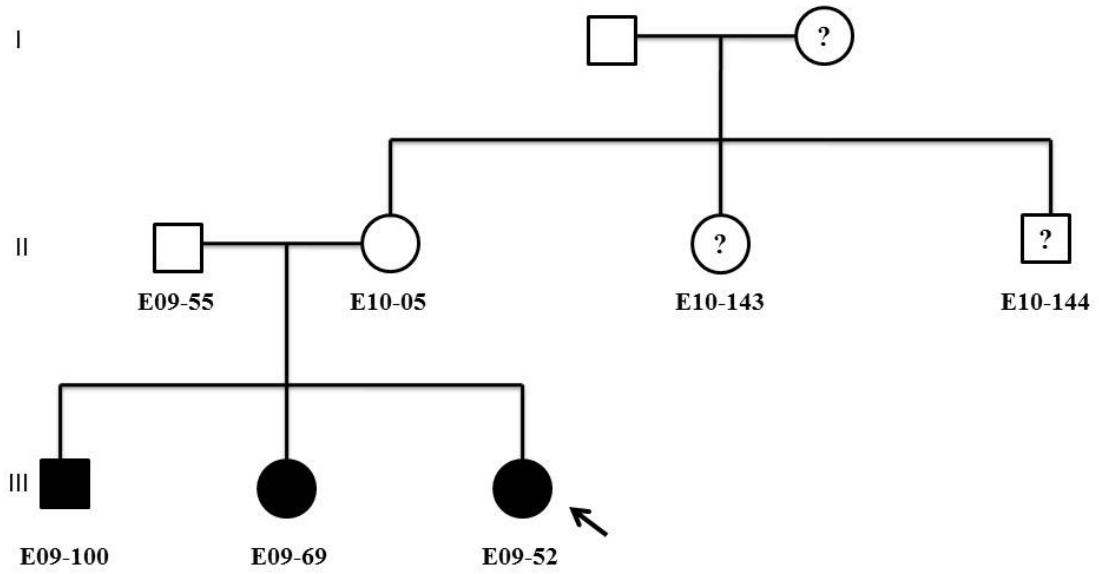
3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada İncelenen Bireyler ve Aile Ağacı

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Betül Baykan tarafından klinik değerlendirmesi yapılmış, epilepsi tanılı 3 kardeş, anne, baba, teyze ve dayı olmak üzere akraba olmayan ama aynı köyden olan bir ailenin üyesi olan toplam 7 birey incelenmiş olup, aileye ait aile ağacı Şekil 3-1' de gösterilmiş ve etkilenmiş 3 kardeşin klinik bilgileri Tablo 3-1'de listelenmiştir.

3 etkilenmiş kardeş klinik açıdan detaylı olarak incelenmiş ve kardeşlere FAME tanısı konmuştur. Annede hafif tremor belirtisi bulunmuş fakat anne ve babaya FAME tanısı konmamıştır. Teyze ve dayı, hatta çalışmamızda yer almayan ölmüş anneannenin yıllar önce başka bir klinik tarafından incelenmesi sonucu epilepsinin başka bir alt türünde öyküsü bulunmaktadır ama birimimizce klinik açıdan incelenememiştir. Aynı klinik tarafından çocuklara da aynı tanı konmuş fakat birimimizce incelenmesi sonucu farkındalık eksikliği nedeniyle eski tanının hatalı olduğu kanısına varılmış ve yapılan tüm incelemeler sonucunda tanıları FAME olarak düzeltilmiştir (Aydın Özemir ve ark. 2016). Aile üyelerinden Bilgilendirilmiş Onam Formu dahilinde EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan alınmıştır. Alınan kanlardan aynı gün içerisinde DNA izolasyonu yapılmış olup, izolatlara kayıt dizin sırasına göre kodlar verilmiştir. Kodlamaları yapılmış DNA örnekleri 2 tüpe ayrılarak, tüplerden biri (A stoğu) -20 °C, diğeri (B stoğu) -80 °C dondurucuda saklanmıştır. Çalışma süresince elde edilen tüm sonuçlar şifre korumalı bilgisayarlarda muhafaza edilmiştir.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2021/594 dosya numarası ile numaralandırılmış olup, 02/04/2021 tarihli 08 sayılı etik kurul kararı çerçevesinde yapılmıştır.



Şekil 3-1: Çalışılan aileye ait aile ağacı

Tablo 3-1: Etkilenmiş 3 kardeşe ait klinik bilgiler

Hasta/Mevcut Yaş/Cinsiyet	Nöbet başlangıç yaşı	Nöbet tipi ve başlangıç yaşı	Ek bulgu
E09-100/38 y/E	17 yaşında	MYO 17y, FS 3y, GTC 26y	Aurasız Migren+ Depresyon +
E09-69/34 y/K	16 yaşında	MYO 16y, ABS 16y	Aurasız Migren+ Anksiyete +
E09-52/33 y/K	14 yaşında	MYO 14y, GTC 14y, ABS 15y	Aurasız Migren+ Depresyon + Anksiyete +

MYO: Miyoklonus; GTC: Jeneralize Tonik-Klonik; ABS: Absance; FS: Febril Nöbet (Aydın-Özemir ve ark. 2016)

3.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Maddeler

Çalışma boyunca kullanılan tüm kimyasal maddeler Tablo 3-2’de yer almaktadır.

Tablo 3-2: Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firma, Menşei
2X DreamTaq Green Buffer (20mM MgCl ₂)	Thermo Scientific, Amerika
C ₂ H ₅ OH (% 99 Etil alkol)	Merck, Almanya
Agaroz	Invitrogen, İsviçre
50X TAE(Tris-Asetat-EDTA)	Sigma, Almanya
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma, Almanya
Betain (5M)	Promega, Amerika
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma, Almanya
Tris	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
50bp-DNA ladder /100bp-DNA Ladder	Biotechrabbit, Almanya

Çalışmada kullanılan kitlerin listesi Tablo 3-3'te sunulmuştur.

Tablo 3-3: Kullanılan Kitler

Kimyasal Madde	Ticari Firma/Menşei Ülke
QIAamp Blood Maxi Kit	Qiagen, Amerika
QIAamp Blood Mini Kit	Qiagen, Amerika

3.1.3. Kullanılan Ekipmanlar ve Hizmet Alınan Firmalar

Çalışmada tüm aşamalarda kullanılan cihazlar Tablo 3-4'te listelenmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan Cihazlar

Cihazın İsmi	Firma ismi
---------------------	-------------------

Santrifüjler	Eppendorf Centrifuge (5415C), Labofuge, Thermo Scientific Megafuge 40R
Masa üstü mini santrifüj	Hettich, Eppendorf
Inkübator	Hibrigene Techne
Vorteks	Yellowline (TTS2) , Biosan Vortex V-1 Plus
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf, Gilson
Spektrofotometre	NanoDrop ND-2000/Thermoscientific
Steril Kabin	Thermo Scientific, HERA (51022515)
Hassas terazi	Shimadzu
Distile su cihazı	Millipore
Elektroforez aleti	Thermo
Jel görüntüleme sistemi	UVP Imaging System
Bilgisayarlar	HP(W2072A),NOC(207LM00001),LG 22MP57HQ-P
PZR cihazı	Biorad Thermal Cyclers T100
Buzdolabı +4°C	Sanyo
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Heraeus Sepatech
Etüv	Techne Hybrigen
Güç kaynağı	Stratagene

Hizmet alınan firmalar Tablo 3-5 'te gösterilmiştir.

Tablo 3-5: Hizmet Alınan Firmalar ve Alınan Hizmet İçeriği

Firma / Kurum Adı	Hizmet Alım Gerekçesi
Macrogen Europe, Hollanda	Tüm Ekzom Dizileme (WES)
Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye	Primer Dizaynı
Macrogen Europe, Hollanda	Sanger Dizileme

3.1.4. Kullanılan Çevrimiçi Veritabanları, Araçlar ve Analiz Programları

Çalışmamız sırasında yararlanılan bilgi çekilen tüm veritabanları ve programlar Tablo 3-6’da listelenmiştir.

Tablo 3-6: Çalışma Kapsamında Kullanılan Elektronik Veritabanları ve Analiz Programları

Genomik Dizi Veritabanları				Açıklama
Ensembl	Genome	Browser	106	Ökaryotik bazı türlerdeki genlere ait bilgileri, genin transkriptleri dizileri ve dizideki varyantları vs. gösteren bir genom veritabanıdır
https://www.ensembl.org				
UCSC (University of California Santa Cruz)				Referans dizi ve genoma dair çeşitli bilgiler içeren bir veritabanıdır
https://genome.ucsc.edu/index.html				
GRCh37/hg19				
NCBI (National Center for Biotechnology)				Referans dizi ve genom bilgilerini içeren başka bir veritabanıdır
Annotation Release 105				
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/				
Popülasyon Genetiği Veritabanları				Açıklama
gnomAD (Genome Aggregation Database)				Çok çeşitli büyük ölçekli dizileme projelerinden, hem ekzom hem de genom dizileme verilerini toplamak ve uyumlu hale getirmek, özet veriyi kullanılabilir hale getirmek amacıyla geliştirilmiş bir kaynaktır.
https://gnomad.broadinstitute.org/				
ExAC (Exome Aggregation Consortium)				gnomAD ile aynı amaçta kullanılan ama tüm genom değil tüm ekzom baz alınarak hazırlanmış bir kaynaktır
http://exac.broadinstitute.org/				
Fenotip-Genotip İlişkisi Veritabanları				Açıklama
ClinVar				Genomik varyasyon ve bu varyasyonların insan sağlığı ile ilişkisi hakkında bilgi toplayan bir veritabanıdır.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/				
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)				İnsandaki kalıtsal hastalıklar ve hastalıkların fenotipleri, bu konudaki özet literatür bilgisi ile anlatan bir veritabanıdır.
https://www.omim.org/				
HGMD (The Human Gene Mutation Database)				İnsanda kalıtsal hastalıklardan sorumlu olan tüm yayınlanmış gen lezyonlarını derlemeye yönelik bir girişimdir.
http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php				
InterVar				Genetik varyantların klinik olarak yorumlanması için bir biyoinformatik yazılım aracıdır.
https://wintervar.wglab.org/				

Varyantların Özellikleri ve Etkilerini Açıklama Gösteren Çevrimiçi Araçlar

VEP (Variant Effect Predictor)
<https://www.ensembl.org/Tools/VEP>

Farklı gereksinimlere uygun çeşitli arabirimler ve genomik varyantların analizini yapılandırmak ve genişletmek için kapsamlı bir genomik açıklama koleksiyonuna erişim sağlayan ENSEMBL tabanlı çevrimiçi bir araçtır.

Varsome
<https://varsome.com/>

İnsan varyantları konusunda küresel uzmanlığı paylaşmayı amaçlayan, varyasyonlar için toplayıcı ve etki analizi aracıdır.

Mutalyzer
<https://mutalyzer.nl/>

Bir gende tanımlanan varyantların standart insan sekansı varyant adlandırma kuralları ile yazılmasını ve açıklamasını kontrol etmek için geliştirilmiş web tabanlı bir yazılım aracıdır.

SIFT
<http://provean.jcvi.org/index.php>

Bir amino asit değişiminin , dizi homolojisine ve amino asitlerin fiziksel özelliklerine dayalı olarak protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin eder.

Polyphen 2
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

İnsan SNP'lerinin, bir insan proteininin yapısı ve işlevi üzerindeki olası etkisini doğrudan fiziksel ve karşılaştırmalı değerlendirmeleri kullanarak tahmin eden bir araçtır.

Primer Dizaynında Kullanılan Çevrimiçi Araçlar Açıklama

UCSC In-Silico PCR
<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

Sentezlenecek primerlerle In Silico ortamda PCR yapıldığında PCR da çoğalacak ampikon bölgesini ve bu bölgenin genom üzerindeki yerini ve birçok özelliğini özel haritalama ile gösteren bir veritabanıdır.

UCSC BLAT
<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>

Uzunluğu 25 veya daha fazla baz olan, %95 ve daha fazla benzerliğe sahip dizileri hızlı bir şekilde bulmak için tasarlanmış UCSC tabanlı bir araçtır.

Primer Dizaynında Kullanılan Diğer Veritabanları Açıklama

OligoCalculator
<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
 Primer3Plus
<https://www.primer3plus.com/index.html>

Primerlerin % GC oranı, sıcaklığı gibi temel özelliklerini tespit etmeyi sağlayan bir veritabanıdır.

Referans diziden alınan herhangi bir dizi parçasına uygun sentezlenebilecek muhtemel Forward ve Reverse Primer çiftleri bu primerlere ait bazı bilgileri

gösteren bir veritabanıdır.

Biyoinformatik Analiz Programları	Açıklama
Sophia DDM	Tüm Ekzom Dizileme sonrası data ile, farklı veritabanlarından aldığı bilgiler dahilinde varyant analizi yapmayı sağlayan bir program
Integrative Genomics Viewer (IGV)	Ham ekzom datasındaki varyantların BAM dosyasından referans diziye hizalandığı, varyantın kromozom üzerindeki konumunu çevresindeki baz dizisini ve bu dizinin karşılık geldiği amino asit dizisini gösterebilen bir program
Chromas	Kişisel bilgisayarda ücretsiz kullanılabilen, Sanger dizileme sonrası veriyi analiz etmeyi sağlayan bir program
CLC Main Workbench v5.02	Sanger dizileme verisini, referans diziye hizalayarak analiz etmeyi sağlayan ve görsel olarak incelenmesine yarayan bir program

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Gen Listesi

Ekzom dizileme datasından yapılan analiz sonucu tespit edilen varyantların bulunduğu gen, NM kodu, ENST kodu, rs kodu, varyant bilgisi, bu varyantlarla yapılan çalışmalar için dizayn edilen primerler, bu primerlerle yapılan okuma yönleri, ampikon uzunluğu ve % GC içeriği bilgileri Tablo 3-7’de listelenmiştir. Bazı varyantlar için sanger sonuçları anlaşılır olmadığı için diğer yöndeki primer ile tekrar dizilemeye gönderilmiştir. Bu varyantlar tabloda üst numaralandırma ile belirtilmiştir.

Tablo 3-7: Çalışmada Tespit Edilen Varyantlar, Varyantlara Ait Bilgiler ve Dizilenen Primerler Listesi

Gen Adı	NM/ENST/rs Kodu	Varyant	Primer Dizisi (F/R)	Okuma Yönü	%GC Oranı	Ampikon Uzunluğu
SLC6A19	NM_001003841	c.1270C>G	TGGTGACTGTGTGTCATCCG ACCATTGCCATGGGGACC	F	%60	268bp
SCN3A	NM_006922.3	c.1687C>T (G>A)	GCATTATGATAACCCAATCCACC CTTTGCCCGACCTCTGAAAC	F	%34	370bp
ADAMTS2	NM_014244	c.548G>A (C>T)	ACATGTTTCATACCCTCCGGC AGTAGCCTCACCTGTGTCCA	F ¹	%62	330bp

<i>LAD1</i>	NM_005558	c.458C>G (G>C)	CCCCATCCAGGAGAGGCT GCCAGCACCTTCTCAGAGAT	R ²	%59	303bp
<i>CPO</i>	NM_173077	c.434A>G	ATAAGACACGGAGGAGGGCT CCAAATGGGGTTCCTTTCTTTACA	F ³	%38	383bp
<i>CSF1R</i>	NM_005211.3	c.2239G>A	CCTTCTCTGAGCAAGGTGAGG CCCCATCGTCACTCATCCAG	F	%63	307bp
<i>RNF44</i>	NM_014901	c.985G>A (C>T)	CTTAACCTGACAGGCACGCC TGTCCGGGTAAAGCGGTAC	R	%63	417bp

1 E09-100 nolu birey R Primer ile tekrar çalışıldı

2 E09-69/52/100/55 nolu bireyler F Primer ile tekrar çalışıldı

3 Ailenin tamamı R Primer ile tekrar çalışıldı

WES datasından elde edilen varyantlar “3.2.3. WES Datasından Biyoinformatik Analiz Stratejisi” başlığında detaylı anlatıldığı gibi belirli bir gen listesi ile filtrelenmiştir. Bu gen listesi, daha önce epilepsi panellerinde kullanılmış olan epilepsi ile ilişkisi olabilecek genlerle oluşturulmuştur. Oluşturulan epilepsi gen listemiz Tablo 3-8’deki gibidir.

Tablo 3-8: Epilepsi Gen Listesi

EPILEPSİ GEN LİSTESİ										
1	AARS	BCKDK	CPT2	FAM126A	GPR56	KCNMA1	NEU1	PRODH	SLC12A5	SYNGAP1
2	ABAT	BRAT1	CRH	FARS2	GPR98	KCNQ2	NHLRC1	PRRT2	SLC13A5	SYNJ1
3	ABCB1	BTD	CSF1R	FASN	GRIA3	KCNQ3	NODAL	PSAP	SLC16A2	SYN
4	ABCD1	CACNA1A	CSTB	FH	GRIN1	KCNT1	NOL3	PSAT1	SLC19A3	SZT2
5	ACY1	CACNA1D	CTSD	FLNA	GRIN2A	KCTD7	NOTCH3	PSPH	SLC1A2	TBC1D24
6	ADAR	CACNA1H	CTSF	FLVCR2	GRIN2B	KDM5C	NPRL2	PTCH1	SLC25A12	TBCE
7	ADGRG1	CACNA2D1	CUL4B	FOLR1	GRIN2D	KIAA2022	NPRL3	PTEN	SLC25A15	TBL1XR1
8	ADGRV1	CACNA2D2	CYFIP1	FOXP1	GRN	KIF1A	NR2F1	PTS	SLC25A19	TCF4
9	ADSL	CACNB4	CYP27A1	FOXH1	HACE1	KIF1BP	NRXN1	PURA	SLC25A22	TGIF1
10	AFG3L2	CASK	DARS2	FOXRED1	HCN1	KIF5C	OFD1	QARS	SLC2A1	TNK2
11	AGA	CASR	DCX	FRRS1L	HCN2	KPNA7	OPHN1	QDPR	SLC35A2	TPP1
12	AIMP1	CBL	DEPDC5	GABBR1	HCN4	L2HGDH	PAFAH1B1	RAB39B	SLC35A3	TREX1
13	ALDH5A1	CCL2	DHCR7	GABBR2	HDAC4	LGI1	PCBD1	RBFOX1	SLC46A1	TSC1
14	ALDH7A1	CDK5RAP2	DNAJC5	GABRA1	HEPACAM	LIAS	PCDH19	RBFOX3	SLC6A1	TSC2
15	ALG13	CDKL5	DNM1	GABRB2	HNRNPU	LMNB2	PCNT	RELN	SLC6A8	TSEN2
16	ALG3	CDON	DOCK7	GABRB3	HSD17B10	MAGI2	PGK1	RNASEH2A	SLC9A6	TSEN34
17	AMACR	CENPJ	DPYD	GABRD	HSPD1	MAPK10	PHF6	RNASEH2B	SMARCA2	TSEN54
18	AMT	CEP152	DRD2	GABRG2	HUWE1	MARS2	PHGDH	RNASEH2C	SMC1A	TUBA1A
19	ARF	CERS1	DYNC1H1	GALC	IER3IP1	MBD5	PIGA	RNASET2	SMS	TUBB2A
20	ARFGEF2	CHD2	DYRK1A	GAMT	IFIH1	MCCC1	PIGN	ROGDI	SNAP25	TUBB2B

21	ARG1	CHRNA2	EARS2	GATAD2B	IQSEC2	MECP2	PIGO	RYR3	SNIP1	TUBB3
22	ARHGEF15	CHRNA4	EEF1A2	GATM	ITPA	MEF2C	PIGQ	SAMHD1	SOX10	TUBB4A
23	ARHGEF9	CHRNA7	EFHC1	GCDH	JRK	MFSD8	PIGT	SCARB2	SPATA5	UBE2A
24	ARSA	CHRNA2	EHMT1	GCH1	KANSL1	MLC1	PIGV	SCN1A	SPTAN1	UBE3A
25	ARX	CLCN2	EIF2B1	GCSH	KAT6B	MMACHC	PIK3R2	SCN1B	SRGAP2	VANGL1
26	ASAH1	CLCN4	EIF2B2	GEF2	KCNA1	MOCS1	PLCB1	SCN2A	SRPX2	WDR45
27	ASPA	CLN3	EIF2B3	GFAP	KCNA2	MOCS2	PLP1	SCN3A	ST3GAL3	WDR62
28	ASPM	CLN5	EIF2B4	GJC2	KCNAB1	MTHFR	PNKP	SCN5A	ST3GAL5	WWOX
29	ATP13A2	CLN6	EIF2B5	GLDC	KCNB1	MTOR	PNPO	SCN8A	STIL	ZDHHC9
30	ATP1A2	CLN8	EMX2	GLI2	KCNC1	NALCN	POLG	SCN9A	STRADA	ZEB2
31	ATP1A3	CNNM2	EPM2A	GNAO1	KCNH1	NDE1	POLR3A	SERPINI1	STX1B	ZIC2
32	ATP6AP2	CNTNAP2	ETFA	GNB1	KCNH2	NDUFA1	POLR3B	SGCE	STXBP1	
33	ATR	COL4A1	ETFB	GNE	KCNH5	NDUFAF5	PPT1	SHH	SUMF1	
34	ATRX	COX15	ETFDH	GOSR2	KCNJ10	NECAP1	PRICKLE1	SIK1	SUOX	
35	AUH	CPA6	ETHE1	GPHN	KCNJ11	NEDD4L	PRICKLE2	SIX3	SYN1	

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü

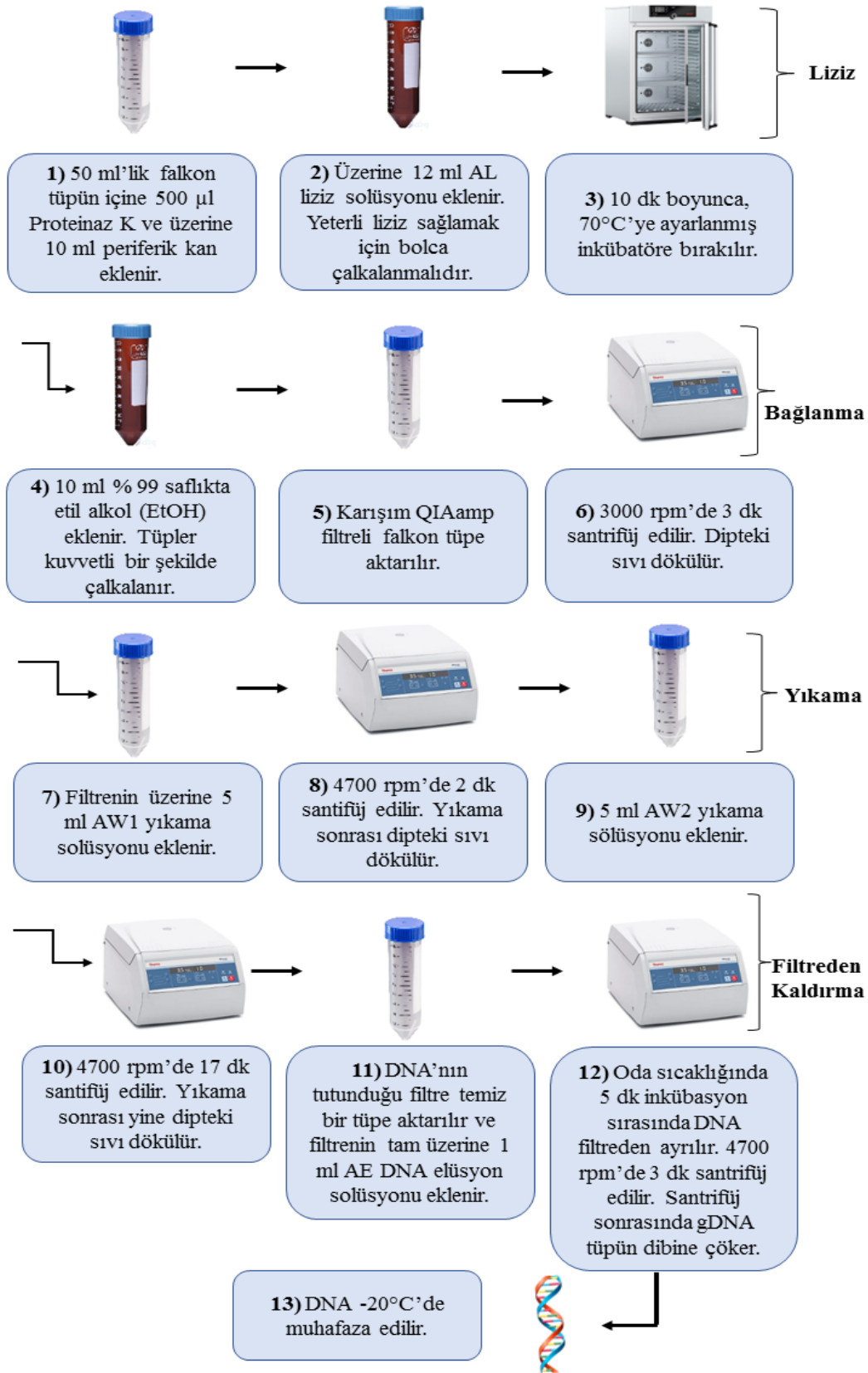
Çalışmada yer alan aile bireylerinden elde edilecek DNA örneği için, tüm bireylerden EDTA'lı tüpe 10 ml periferik kan alınmıştır. Numunelerden Qiagen firmasına ait QIAamp DNA Blood Maxi kit ile bu kitin spin protokolüne uyarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA örneği istediğimiz kalitede çıkmayan bireyler için aynı numuneden yine aynı firmaya ait Qiagen firmasının QIAamp DNA Blood Mini kit ile Spin Protokol uygulanarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Maxi ve Mini kit için DNA izolasyon şemaları Şekil 3-2 ve Şekil 3-3'te gösterilmiştir.

QIAamp DNA Blood Maxi kit ile elde edilen 1 ml gDNA 2 tüpe ayrılmıştır. Biri (500 µl) A stoğu olarak, diğeri (500 µl) ise B stoğu olarak isimlendirilmiştir. A stoğu -20 °C'de, B stoğu ise -80 °C'de muhafaza edilip, çalışmalarda öncelikle A stoğu kullanılmıştır.

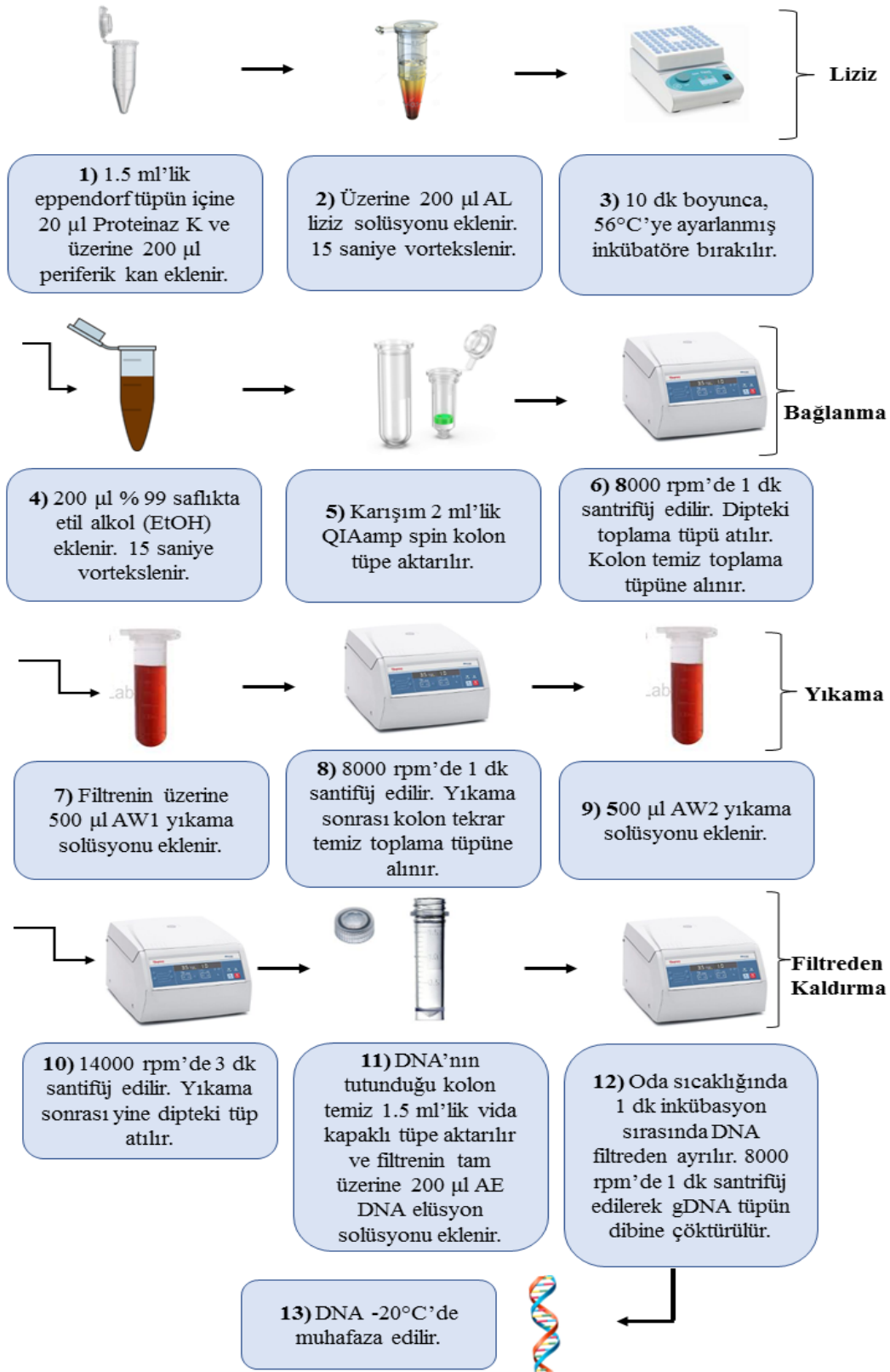
NanoDrop 2000 Spektrofotometre cihazı ile 230, 260 ve 280 nm dalgaboylarında optik yoğunluk ölçülerek, 2 µl DNA numunesi ile kalite ve konsantrasyon tespiti yapılmıştır. Materyalin konsantrasyonu, $1=50 \mu\text{g/ml}$ OD okuma ile hesaplanmıştır. 260 nm/280 nm oranı 1,8-2,0 arasında, 260 nm/230 nm oranı ise 2,0-2,2 arasında tespit edilen DNA'lar saf olarak değerlendirilmiştir. Degradasyon olmadığı

tespit edilen DNA örnekleri, Primer Optimizasyonu ve diğer deneysel işlemlere uygun görülmüştür.





Şekil 3-2: QIAamp® DNA Blood Maxi Kit ile DNA İzolasyon Şeması



Şekil 3-3: QIAamp DNA Blood Mini Kit ile DNA İzolasyon Şeması

3.2.2. Tüm Ekzom Dizileme (WES) Çalışması

Etkilenmiş 3 kardeşin izole edilen DNA'larıyla Macrogen Europe, Hollanda kurumundan hizmet alımı ile WES çalışması yapılmıştır. Çalışma Türk Nöroloji Derneği'nin katkılarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen data belirlediğimiz biyoinformatik analiz stratejisi ile analiz edilmiştir.

3.2.3. WES Datasından Biyoinformatik Analiz Stratejisi

E09-100, E09-69 ve E09-52 kodlu kardeşlerin farklı zamanlarda WES çalışmaları yapıldı. Kardeşlerden biri seçilerek WES verisinden excel filtrelemesi ile duplikasyonlar çıkarıldı. Biotype türü psödogen olanlar çıkarıldı, transcript consequence çeşitlerinden 3' UTR ve 5' UTR bölgelerindeki varyantlar, 3' downstream gen varyantları, 5' upstream gen varyantları, intronik varyantlar, kodlamayan bölge varyantları ve sinonim varyantlar çıkarıldı. Transkript değişimi çeşitlerinden missense, splice, nonsense ve frameshift varyantlar seçildi. Literatürdeki epilepsi panellerinde çalışılan tüm genlerin listesi çıkarıldı. Bu listeye daha önce şüpheli gördüğümüz *SCN3A* ve *SLC6A19* genleri de eklendi. Liste ENSEMBL ve OMIM'deki güncel isimlerle tekrar düzenlendi. Oluşturduğumuz son epilepsi genleri listesi ile gen filtrelemesi yapıldı. Kalan varyant listesindeki binlerce varyantı daha da daraltmak için Minör Alel Frekansı (MAF) değeri önce 0.05'in altında kalanlar seçildi. Elimizdeki varyant sayısı hala binlerce sayıda olduğu için OMIM ve Human Phenotype Ontology (HPO) üzerinde epilepsi ile ilişkili varyantlar seçildi. Kalan varyantları yine azaltmak için $MAF < 0.01$ değerinin altında kalan varyantlar seçildi. Kalan tüm varyant listesinden diğer iki kardeşte de ortak olanlar seçilerek, istediğimiz filtrelemeler sonucunda 3 kardeşte de ortak olan varyantlar listesi oluşturularak bu liste analiz edildi.

İkinci bir yöntem olarak, GRCh37 insan genomu referansından kaynak alan SOPHIA DDM Programında analiz yapıldı. Manuel analiz sırasında kullanılan filtrelemeler bu programda da yapıldı. İki farklı analiz yöntemi verisinin birbirleri ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Tüm filtrelemelere ek olarak SOPHIA DDM programında iki kardeşte de Varyant Frekansı (VF) değeri %25 ve üzeri olanlar, SOPHIA DDM programına göre $0,9 < PolyPhen < 1$ ve/veya $0,9 < SIFT < 1$ olanlar değerlendirilmeye alındı. Kardeşlerden birinin verisi eski bir versiyonda olduğu için programa eklenemediğinden dolayı, kalan iki kardeşin verisinden analiz yapıp en son ikisinde de ortak bulunan varyantlardan üçüncü kardeşte de ortak olanlar filtrelenip bu varyantlar

üzerinden deneysel çalışmalara devam edildi. İki analiz yönteminden de ortak olarak *SLC6A19*, *SCN3A* ve *CSF1R* genleri elde edildi. Bunlara ek olarak gen listesi kullanılmadan SOPHIA DDM programında aynı filtrelemeler tekrar yapıldı. Aynı kriterlere göre üç kardeşle de ortak olan *ADAMTS2*, *LAD1*, *CPO* ve *RNF44* genleri de seçildi. Etkilenmiş tüm kardeşlerde ortak olan varyantlar üzerinden en kayda değer olandan başlayarak ilgili varyantlara primer dizayn edilip diğer deneysel çalışmalar yapıldı.

3.2.4. Tespit Edilen Varyantların Çalışması

Tespit edilen varyantların bulunduğu gen, transkript, ekzon bilgileri, sekans dizileri ve American College of Medical Genetics and Genomics-Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP) sınıflandırması vb. bilgiler ENSEMBL, ENSEMBL VEP, InterVar ve Varsome veritabanlarından temin edildi. Sekans dizilerinden ilgili varyantları da içerecek şekilde dizi kopyalandı. Bu dizilere, uygun ve spesifik olacak şekilde primer dizayn edildi. Dizayn edilen primerler hizmet alımı ile sentezlendi. Primerler firmanın belirttiği oranda sulandırıldı. Kullanıma hazır primerler ile sağlıklı bir bireye ait DNA kullanılarak PCR optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışması sonucunda her bir primere ayrı ayrı olacak şekilde, o primer için en uygun PCR koşuluna karar verildi. Uygun koşulda sırayla ilgili primerler ile tüm aile bireyleri Touchdown PCR yöntemiyle çalışıldı. Sonrasında Agaroze jel elektroforezi yapılarak hastalara ait DNAların ilgili primerlerle çalışıp çalışmadığı gözlemlendi. Ardından çalışan primerlerle, aile bireylerinin PCR ürünleri Sanger dizilemeye gönderildi. Sanger dizileme sonucunda gelen veri ile tüm bireyler tüm primerler için analiz edildi.

3.2.4.1. Varyantlara Primer Dizaynı

Primer dizaynı için ihtiyaç duyulan varyantın bulunduğu gen ismi, gendeki transkriptlerin bilgileri, gen dizisi gibi bilgiler Ensembl Genome Browser 106 veritabanından temin edildi. Varyantın Ensembl isimlendirmesi olan ENST transkript kodu, MANE Select'te karşılık gelen NM kodu, rs kodu, ekzon ve cDNA pozisyon bilgisi, varyantın neden olduğu değişim türü, aminoasit ve kodon değişimi, Ensembl veritabanına göre SIFT ve Polyphen skoru bilgileri Ensembl'a ait VEP aracından temin edildi. Gene ait bilgiler ve dizi için Ensembl veritabanının GRCh38.p13 versiyonundaki insan genom referansı seçildi. Gen ismi taratıldı, ilgili gene ait transkript tablosundan

VEP tablosundaki ENST kodlu transkript seçildi. MANE Select'te bu transkript karşılık gelen NM kodu Ekzom dizileme verimizdeki NM kodu ile kıyaslanıp doğrulandı. Transkript tablosunda ilgili transkriptte tıkladığımızda karşımıza çıkan sayfadaki “cDNA” aracındaki dizi üzerinden VEP'ten edindiğimiz cDNA pozisyonundaki alele bakılıp rs kodu kontrolü yapıldı. “Exons” aracından ise varyantımızın bulunduğu ekzon/intron aralığı öğrenilip ve uygun aralıktaki varyantımızı da içeren bir dizi parçası kopyalandı. Kopyalanan dizi Primer3 Plus veritabanında taratılarak, elde edilen muhtemel primerler listesinden en uygun primer çifti seçildi. Seçilen primer çifti ile in silico ortamda PCR yapmak için UCSC veritabanının “In silico PCR” aracı kullanıldı. PCR sonucu primerlerle birlikte ampikon dizisi ve bu ampikonun genom üzerindeki lokasyon bilgisi elde edildi. UCSC üzerinden bu lokasyonda özellikle de primerler üzerinde bulunan herhangi bir ‘Common SNP’ tespit edildiği takdirde başka bir primer çifti seçilerek işlemler baştan yapıldı. Common SNP tespit edilemediği takdirde ampikon dizisi UCSC veritabanının BLAT aracında taratıldı. Tarama sonucundaki tablo incelenerek ampikonun genomda bağlanabileceği tüm bölgeler ve bu bölgelerle ortak kısımlar tespit edildi. İstenmeyen bağlanmaları olan primer çiftleri iptal edilerek başka primer çifti seçildi. Bu tür bağlanmaları olmayan primerler Sentromer DNA Teknolojileri firmasından hizmet alımı ile sipariş edildi. 3 kardeşle ortak olduğu tespit edilen varyantlar için o bölgelere uygun şekilde dizayn edilen primerlerin UCSC in silico PCR sonuçları Şekil 3-4 ile Şekil 3-10 arasında verilmiştir.

SLC6A19 Primer ve Amplikon			
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Oligocalculator GC Yüzdesi
NM_001003841.3:c.1270C>G	ENST00000304460	rs776944825	% 60

>chr5:1218878+1219145 268bp TGGTGACTGTGTGTCATCCG ACCATTGCCATGGGGACC
 TGGTGACTGTGTGTCATCCG tgcaggccgtggagggcacaggcctggcct
 tcatcgctcttcaccgaggccatcaccaagatgccgttgtccccactgtgg
 tctgtgctcttcttcattatg tcttctgcctggggctgtcatctatggt
 tgggaacatggagggcgctggttggtgccctgcaggacctcagagtcattcc
 cccgaagtggcccaaggaggtgctcacagggtacgtgtgcagtcgggagg
 GGTCCCCATGGCAATGGT

Varyasyon: 122. baz c.1270C>G
Mavi: Forward Primer
Sarı: Reverse Primer
 Dizi intron 8/9 - exon 9 – intron 9/10 bölgelerinden kopyalandı

Şekil 3-4: SLC6A19 Geni NM_001003841:c.1270C>G Varyantı (Novel) Primer ve Amplikon Dizisi

SCN3A Primer ve Amplikon			
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Oligocalculator GC Content:
NM_006922.3:c.1687C>T	ENST00000283254.12	rs202004044	%34

>chr2:165140915-165141284 370bp GCATTATGATAACCCAATCCACC
 CTTTGCCCGACCTCTGAAAC
 GCATTATGATAACCCAATCCACC taaagtgaagactaaatgaagtgggtg
 tatacttagtaaaattgcaaactcagatattgtagtcagaaaaacactcttt
 gtacttaaatttgctttaataaaaaatatcaaaatatatgtgtcctctata
 aatttgattatccatgtttaagagcaagagtataactaaagaaaa
 cagatcctttaataattaataatttattaaataattgcgttcttcccctacc
 cccatcccattcctttcctttttgtcttctctgcagtcctctcttgagtat
 ggtggctccctgttttcccaagacgcaatagcaaaacaagcattttca
 GTTTCAGAGGTCGGGCAAAG

Varyasyon: 302. baz c.1687C>T
Mavi: Forward Primer
Sarı: Reverse Primer
 Dizi intron 12/13 - exon 13 – intron 13/14 bölgelerinden kopyalandı.

Şekil 3-5: SCN3A Geni NM_006922.3:c.1687C>T Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi

ADAMTS2 Primer ve Amplikon				
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Değişim Türü	Oligocalculator GC Content:
NM_014244:c.548G>A	ENST00000251582.12	rs763905470 COSV51083557	missense	% 62
>chr5:179272900-179273229 330bp ACATGTTTCATACCCTCCGGC AGTAGCCTCACCTGTGTCCA ACATGTTTCATACCCTCCGGC cagcccagggttcaagctgagcaccagctg gggtgctgggcagggtcttcaggtgggaggtactccctgagggggtctcc tcgctgttcccccttccttggtcttttgtgtgctggaaatctgatcctggt gtctttgtcccgcaggctggtctgatccg gatggaggaggaggaggtctt catcgaacccttggagaaggggctggcggcgagaggctgagcaaggcc gtgtgcatgtggtgtatcgccggccaccacgtcccctcctctcgggggg ccacaggcccTGGACACAGGTGAGGCTACT Varyasyon: 179. baz c.548G>A Mavi: Forward Primer Sarı: Reverse Primer Dizi intron 2/3 - exon 3 – intron 3/4 bölgelerinden kopyalandı.				

Şekil 3-6: ADAMTS2 Geni NM_014244:c.548G>A Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi

LAD1 Primer				
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Değişim Türü	Oligocalculator GC Yüzdesi
NM_005558:c.458C>G	ENST00000391967.7	rs200727328	missense	% 59
>chr1:201386738-201387040 303bp CCCCATCCAGGAGAGGCT GCCAGCACCTTCTCAGAGAT CCCCATCCAGGAGAGGCTggaggcagaggaggggaggaacagcttgagcc ctgtgcaggccacacagaaacccctagtctccaagaaggaaactggaaatc ccacctcgccggagactgagtcgggaacagcggggccctgggcccctgga ggaggagagcttggtgggcaggagccagaagagaggaagaaaggggttc cagaaaagtccccagtcttgagaagtcctccatgccaagaagacggca cctgaaaagagcctggtctccgataaaacctccATCTCTGAGAAGGTGCT GGC Varyasyon: 138. baz c.458C>G Mavi: Forward Primer Sarı: Reverse Primer Dizi exon 3 bölgesinden kopyalandı.				

Şekil 3-7: LAD1 Geni NM_005558:c.458C>G Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi

CPO Primer ve Amplikon				
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Değişim Türü	Oligocalculator GC Yüzdesi
NM_173077:c.434A>G	ENST00000272852.4	rs1462106311	missense	% 38
>chr2:206959489+206959871 383bp ATAAGACACGGAGGAGGGCT CCAAATGGGGTTCCTTTCTTTACA ATAAGACACGGAGGAGGGCTtggggactggaggggtggaggtgtgatgtac agtcacctcttataattaagttgaaattggtagaaaattaagagagaaaa gatctcaaaataattctgaacatttctttcttaaatttccagattctaca aaaccataaagacaactcaagtatacgcaagctccttaggaacctggact tctatgtccttccagttcttaacatagatggttatatctacacttggaca actgtgagtacaccatgtttggtcctgggatgagttcatgaactaaagct caattcaggttaatttttccaatggtatccattccggctctaaaaatatt tcatacctaTGTAAGAAAGGAACCCCATTTGG Varyasyon: 204. baz c.434A>G Mavi: Forward Primer Sarı: Reverse Primer Dizi intron 4/5- exon 5 – intron 5/6 bölgelerinden kopyalandı.				

Şekil 3-8: CPO Geni NM_173077:c.434A>G Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi

CSF1R Primer ve Amplikon				
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Değişim Türü	Oligocalculator GC Yüzdesi
NM_005211.3:c.2239G>A	ENST00000286301.7	rs41355444 COSV53841644	Missense	% 63
>chr5:150057212-150057518 307bp CCTTCTCTGAGCAAGGTGAGG CCCCATCGTCACTCATCCAG CCTTCTCTGAGCAAGGTGAGG aggtcccagggccaggccccatttgcttg ataacaagggaaaaggagaaggggctgctggggtgaggggtggggagtgt ggcagggctgccctgacgcctcttcccaccctagacctggacaaggagga tgacggccccctggagctccgggacctgcttcaacttctccagccaagtag ccagggcatggccttcctcgttccaagaatgtgagtaggaacctggcc ctggctcatagccaccaggtctgtgctccggggaggCTGGATGAGTGAC GATGGGG Varyasyon: 152. baz c.2239G>A Mavi: Forward Primer Sarı: Reverse Primer Dizi ekzon 16 - intron 16/17 - ekzon 17 - intron 17/18 bölgelerinden kopyalandı.				

Şekil 3-9: CSF1R Geni NM_005211.3:c.2239G>A Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi

RNF44 Primer ve Amplikon				
NM Kodu	ENST Kodu	rs Kodu	Değişim Türü	Oligocalculator GC Yüzdesi
NM_014901:c.985G>A	ENST00000274811.9	rs114764573 COSV51269173	missense	% 63
>chr5:176529545-176529961 417bp CTTAACCTGACAGGCACGCC TGTCCGGGTTAAAGCGGTAC CTTAACCTGACAGGCACGCCagctgggctcccttccccgctgcaacgttc tgggctctgtttgcaaggaggagtcaggagagcggtctgtgtgcccc ctcctgaccttgacctgggccccccacacttgtctctctctagctcgatg ctgccaatgtcaccaacagcaatggggcccaccatcagcctggacctgga ctgggatgatgtggagatggagaactatgaggtcccatggagccccatgc tgggaggtggggtttgggagacctgcagccctggggcgccgctgacccgt ctcctgcccgcgatgcaggccctcctgaacctggccgagcggtgggagat gccaaagccccgggtctcaccaaagcagacatagagcagctcccgtcGTA CCGCTTTAACCCGGACA Varyasyon: 202. baz c.985G>A Mavi: Forward Primer Sarı: Reverse Primer Dizi intron 7/8 - exon 8 – intron 8/9 – ekzon 9 bölgelerinden kopyalandı.				

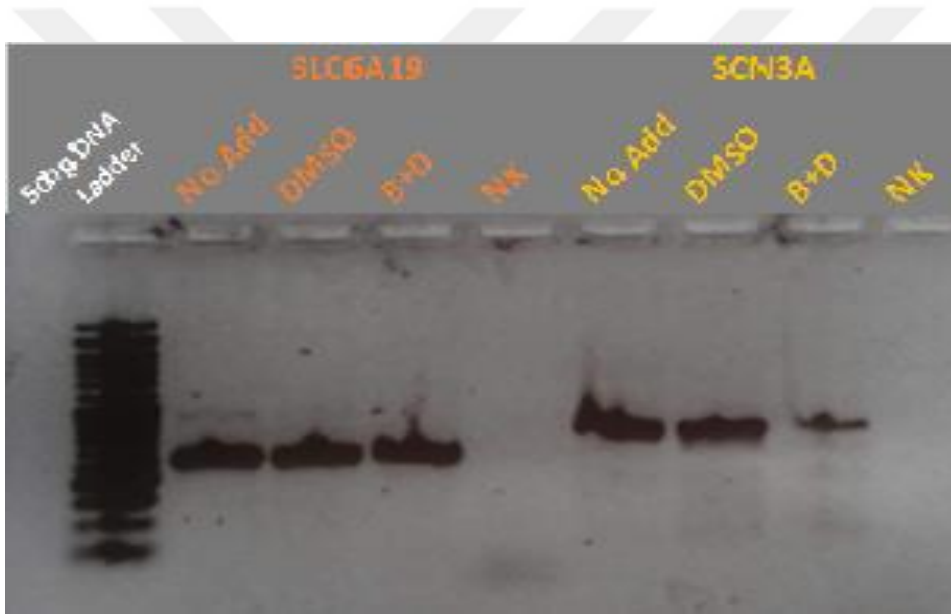
Şekil 3-10: RNF44 Geni NM_014901.5: c.985G>A Varyantı Primer ve Amplikon Dizisi

3.2.4.2. Primerlerin Optimizasyon Çalışması

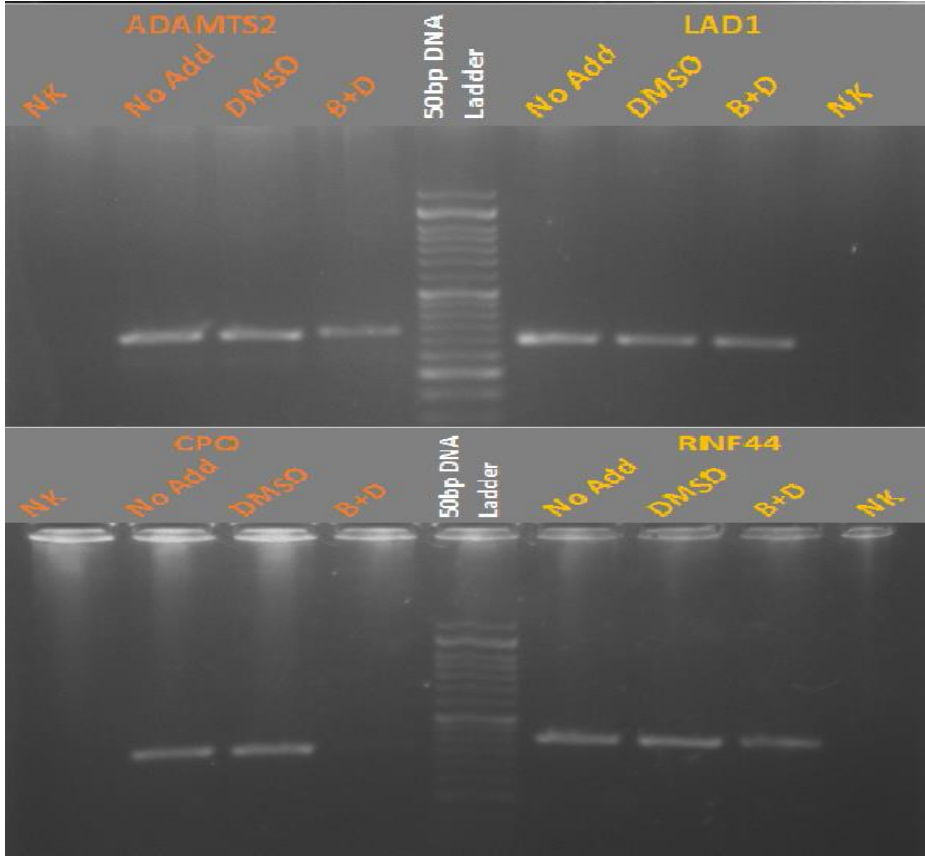
Dizayn edilen primerler 50 nmol skalada 100 µM konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Daha sonra stok primerler 2.5 µM 100 µl ve 10 µM 100 µl olacak şekilde 2 ayrı konsantrasyona sulandırıldı. PCR optimizasyonu sırasında 2.5 µM konsantrasyonlu primerler kullanıldı. Optimizasyon aşamasında sağlıklı bir bireye ait 50 ng/µl konsantrasyonlu DNA ile DMSO ve Betaine + DMSO ve hiçbir maddenin eklenmediği No Add kondisyonunda çalışıldı. Çalışma detayı Şekil 3-11 'de gösterilmiştir. Optimizasyon sonrası PCR ürünleri hazırlanan agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntüleri Şekil 3-12 ile Şekil 3-14 arasında gösterilmiştir.

Primer Optimizasyon Çalışması								BioRad SST PCR Cihazı	
		x1	x5					PCR Koşulu	
Red Taq	Mastermix	13,18	65,9					95°C	5 dk
2,5 µM	Pf	2	10					Touchdown (16 cy)	
2,5 µM	Pr	2	10					94°C	45 sn
50 ng/µl	DNA	1	5		No Add	DMSO	B + D	61 (-0.5°C/cycle)	45 sn
			Alq	18,18 µl	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	72°C	1 dk
				dH ₂ O	6,82	5,82	0	Normal PCR (20 cy)	
				5M Betaine	0	0	6,5	94°C	45 sn
				DMSO %100	0	1	0,32	52°C	45 sn
								72°C	1 dk
								Son Elong. (1 cy)	
								72°C	15 dk
								10°C	∞

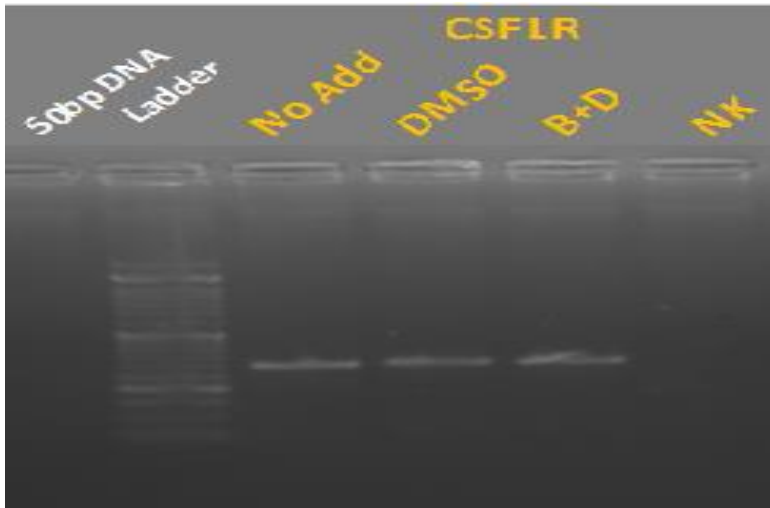
Şekil 3-11: Primerlerin PCR Optimizasyon Çalışması



Şekil 3-12: *SLC6A19* ve *SCN3A* Primeri PCR Optimizasyon Jel Görüntüsü



Şekil 3-13: *ADAMTS2*, *LAD1*, *CPO* ve *RNF44* Primerleri PCR Optimizasyon Jel Görüntüsü



Şekil 3-14: *CSF1R* Primeri PCR Optimizasyon Jel Görüntüsü

Optimizasyon sonucunda tüm primerler için No Add kondisyonu uygun bulunmuş olup, tüm PCR çalışmaları bu koşulda yapılmıştır.

3.2.4.3. PCR ve Agaroz Jelde Görüntüleme

Tüm primerler Şekil 3-15'te detaylandırılmış Touchdown PCR protokolü ile No Add kondisyonunda çalışılmıştır. Çalışmada primerler 2,5 µM, çalışılan tüm bireylerin DNA'sı ise 50 ng/µl konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırılmıştır. PCR çalışmasının şablonu Şekil 3-16'da şematize edilmiştir.

BioRad SST PCR Cihazı	
PCR Koşulu	
95°C	5 dk
Touchdown (16 cy)	
94°C	45 sn
61 (-0.5°C/cycle)	45 sn
72°C	1 dk
Normal PCR (20 cy)	
94°C	45 sn
52°C	45 sn
72°C	1 dk
Son Elong. (1 cy)	
72°C	15 dk
10°C	∞

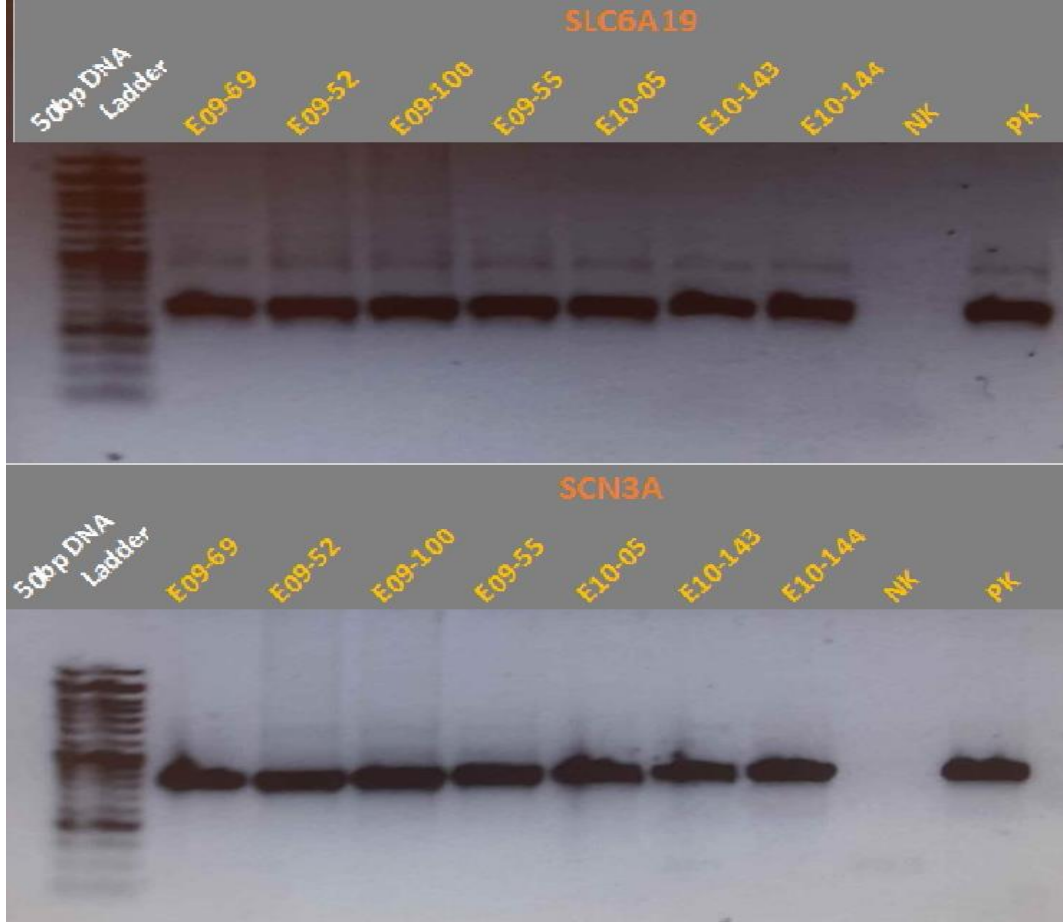
Şekil 3-15: Touchdown PCR Protokolü

Primer PCR Çalışması													
			x1	x10									
PCR Mastermix	RedTaq	MasterMix	13,18	131,8									
	2,5 µM	P.Forward	2	20									
	2,5 µM	P.Reverse	2	20									
		dH ₂ O	6,82	68,2									
		Alq	24										
	50 ng/µl	DNA	1		TÜP 1	TÜP 2	TÜP 3	TÜP 4	TÜP 5	TÜP 6	TÜP 7	TÜP 8	TÜP 9
		Toplam	25		E09-69	E09-52	E09-100	E09-55	E10-05	E10-143	E10-144	NK	PK
				PCR Mastermix	24	24	24	24	24	24	24	24	24
				DNA	1	1	1	1	1	1	1	0	1

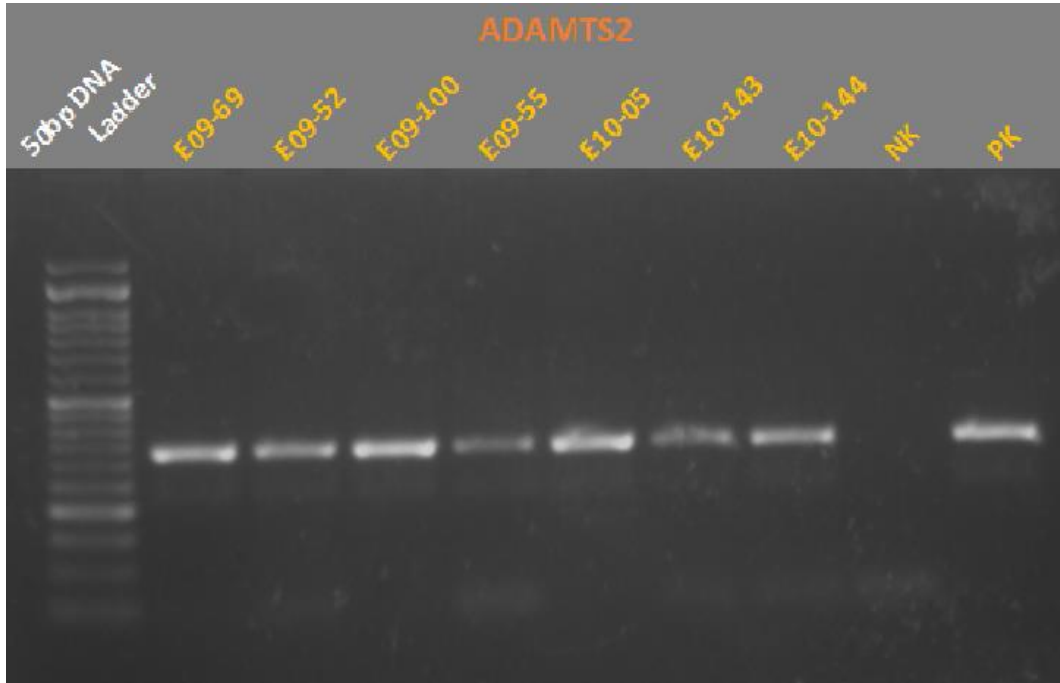
NOT: Pozitif Kontrol (PK) tüpüne 50ng/µl'lık sağlıklı bir bireye ait DNA eklendi. NK=Negatif Kontrol

Şekil 3-16: PCR Çalışması Şablonu

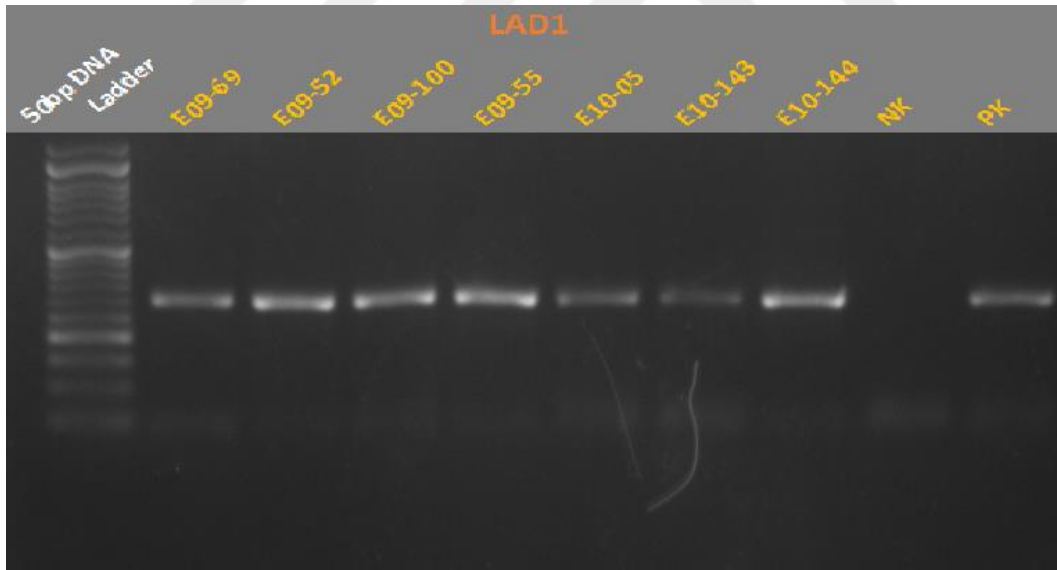
Elde edilen PCR ürünleri, 50 ml jel için 2,5 µl EtBr eklenerek hazırlanan %2'lik agaroz jelde 95 voltta 25 dk yürütüldü. Daha sonra Jel görüntüleme cihazında bantlar incelendi. Jel görüntüleri Şekil 3-17 ile Şekil 3-22 arasında verilmiştir.



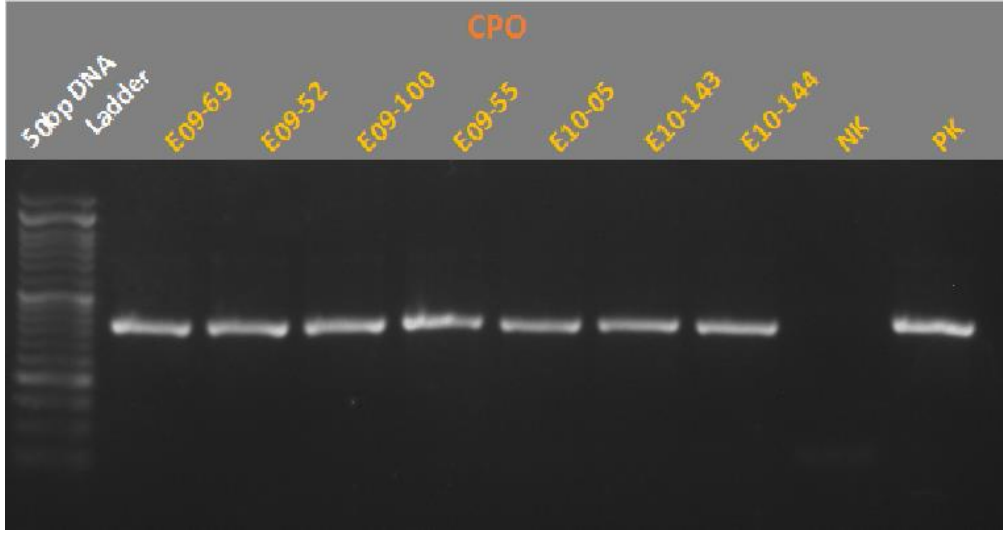
Şekil 3-17: *SLC6A19* ve *SCN3A* PCR Sonucu Jel Görüntüsü



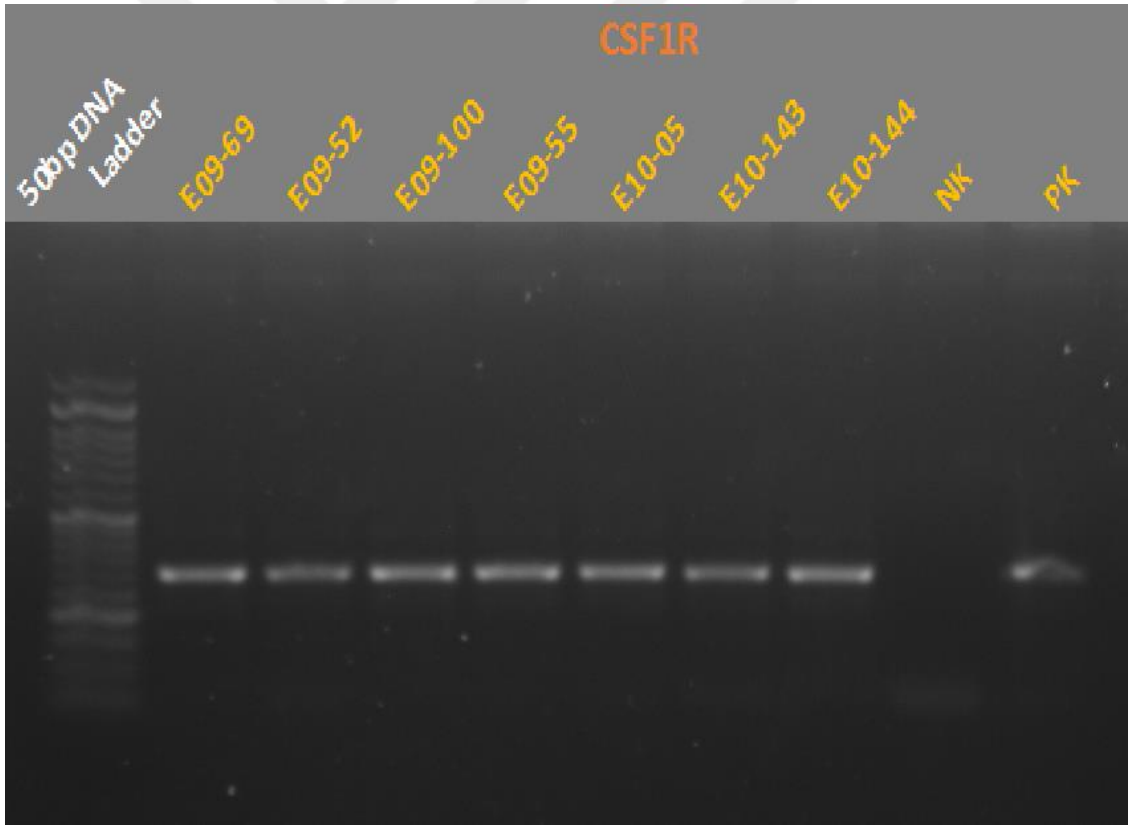
Şekil 3-18: ADAMTS2 PCR Sonucu Jel Görüntüsü



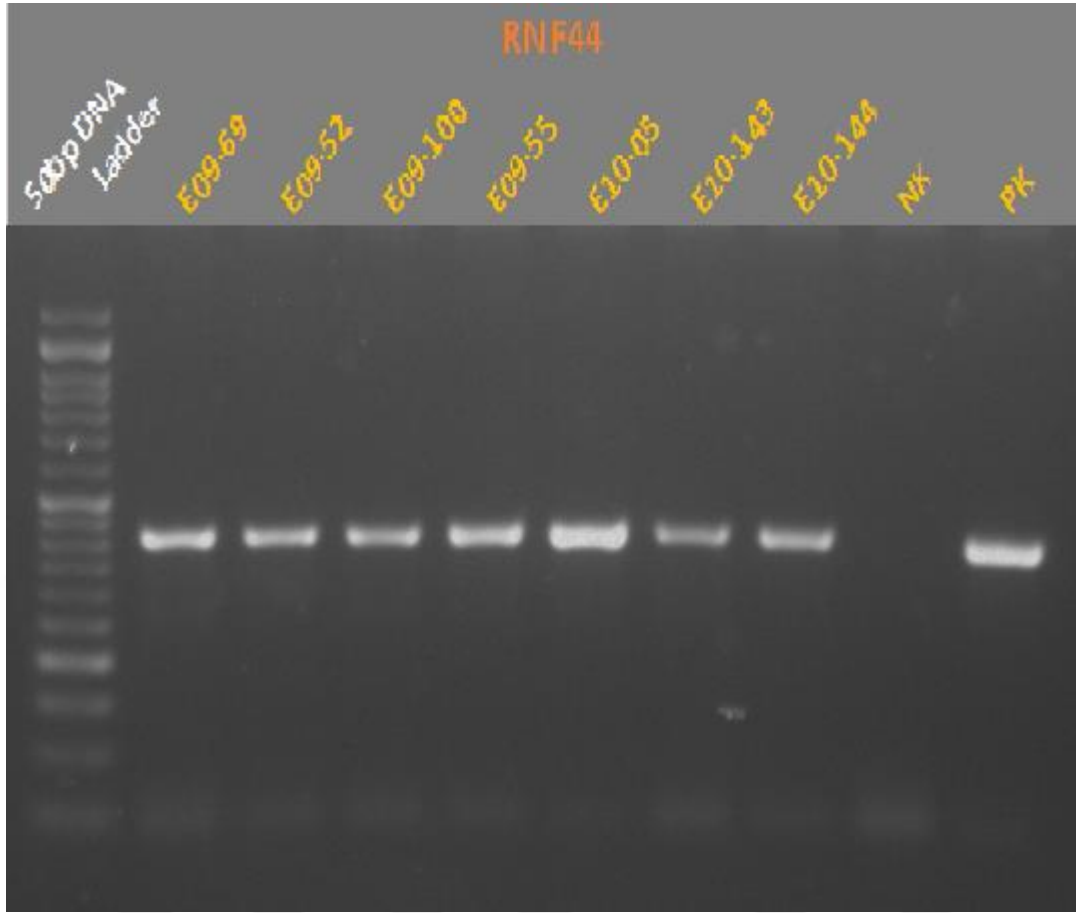
Şekil 3-19: LAD1 PCR Sonucu Jel Görüntüsü



Şekil 3-20: *CPO* PCR Sonucu Jel Görüntüsü



Şekil 3-21: *CSF1R* PCR Sonucu Jel Görüntüsü



Şekil 3-22: RNF44 PCR Sonucu Jel Görüntüsü

Tüm bantların dizayn edilen ampikon aralığına uygun bant aralığında ve temiz bir görüntüde çıktığı, Nonspesifik bağlanmaların olmadığı ve tüm bireylerin örneklerinin çalıştığı tespit edilen PCR örnekleri 10 μ M konsantrasyondaki primerler ile birlikte Sanger dizilemeye gönderildi.

3.2.5. Sanger Dizileme ile Varyantların Konfirmasyonu

Varyantların ailesel segregasyonunu görmek ve konfirmasyon için sırasıyla tüm primerler ile çalışılmış olan PCR ürünleri ile Sanger dizileme yapılmıştır. Sanger dizileme Macrogen Europe, Hollanda firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Tespit Edilen Varyantların Bulunduğu Aday Genler

Ekzom dizileme datasından yapılan analiz sonucunda tespit edilen %25'in üzerinde varyant fraksiyonuna sahip, 3 hasta kardeşinde de ortak olan varyantlar ve bu varyantlara ait bilgiler Tablo 4-1'de, çalışılan tüm bireylere ait ailesel segregasyon bilgisi Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Ekzom dizileme analizi sonucu tespit edilen varyantlar

Gen	hg19/hg38 pozisyonu	cDNA	Protein	Ekzon	Varyant Kodu (Frekans)	CADD Skoru	ClinVar	ACMG Yorumu	Sınıf
<i>SLC6A19</i> (NM_001003841.3; ENST00000304460.11)	5: 1219114-C-G 5:1218999-C-G	c.1270C>G	p.(Leu424Val)	9/12	rs776944825 Novel(C>G)	-	NA	PM2-Mod, PP3-Sup, BP1-sup	VUS
<i>SCN3A</i> (NM_006922.3; ENST00000283254.12)	2:165997493-G-A 2:165140983-G-A	c.1687C>T	p.(Arg563Cys)	13/28	rs202004044	33	LB(2)	PM1-Mod, PP3-Sup, BP6-Sup	Ben
<i>ADAMTS2</i> (NM_014244.5; ENST00000251582.12)	5:178700052-C-T 5:179273051-C-T	c.548G>A	p.(Arg183Gln)	3/22	rs763905470	25.2	NA	PM1-Mod, PM2-Mod	VUS
<i>LAD1</i> (NM_005558.4; ENST00000391967.7)	1:201356031-G-C 1:201386903-G-C	c.458C>G	p.(Pro153Arg)	3/10	rs200727328	21.4	NA	PM1-Mod	Ben
<i>CPO</i> (NM_173077.3; ENST00000272852.4)	2:207824416-A-G 2:206959692-A-G	c.434A>G	p.(Tyr145Cys)	5/9	rs146210631 1	24.3	NA	PM1-Mod, PM2-Mod	VUS
<i>CSF1R</i> (NM_005211.3; ENST00000286301.7)	5:149436930-C-T 5:150057367-C-T	c.2239G>A	p.(Gly747Arg)	17/22	rs41355444	5.303	Ben(1); LB(5)	PM1-Mod, BP4-Sup, BP6-Sup	Ben
<i>RNF44</i> (NM_014901.5; ENST00000274811.9)	5:175956761-C-T 5:176529760-C-T	c.985G>A	p.(Val329Met)	8/11	rs114764573	25.9	NA	NA	VUS

Ben: İyi huylu/Benign, LB: Muhtemelen iyi huylu/Likely Benign, VUS: Önemi belirlenemeyen/Varyant of Uncertain Significance, NA: Not available, Mod: moderate, Sup: supported. Tablodaki bilgiler Ensembl VEP, InterVar ve Varsome veritabanlarından elde edilmiştir.

Tablo 4-2: Tespit edilen varyantların ailesel segregasyon bilgisi

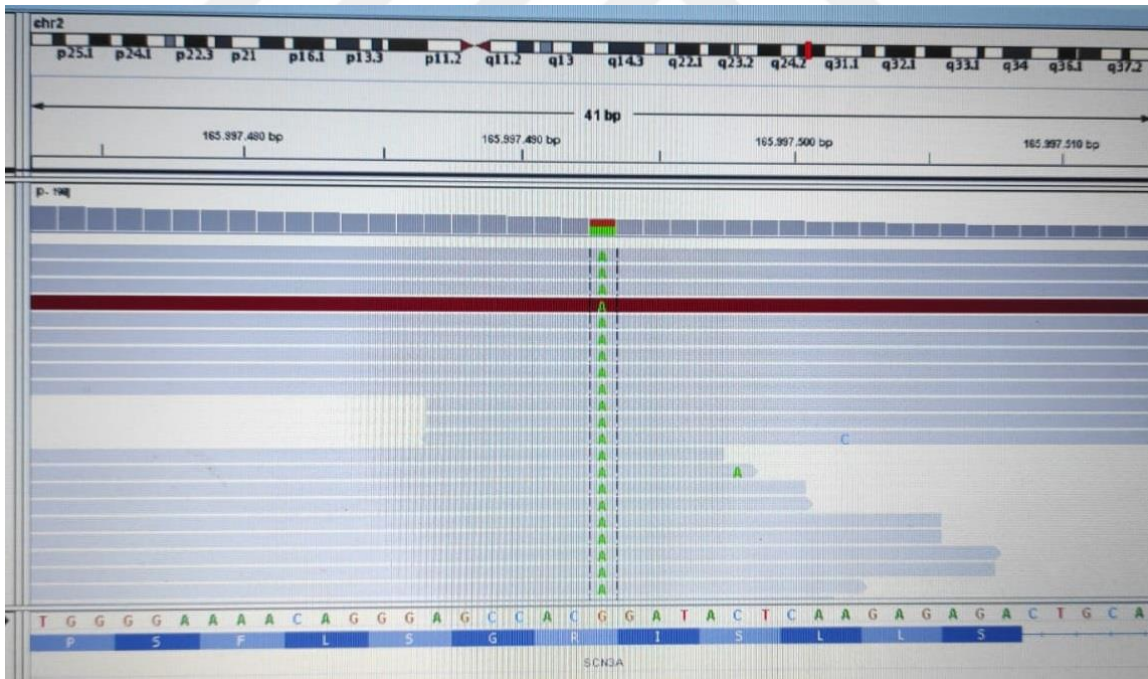
Gen	<i>SLC6A19</i>	<i>SCN3A</i>	<i>ADAMTS2</i>	<i>LAD1</i>	<i>CPO</i>	<i>CSF1R</i>	<i>RNF44</i>
Birey							
E09-69	het	het	homo	het	het	het	het
E09-52	het	het	homo	het	het	het	het
E09-100	het	het	homo	het	het	het	het
E09-55	het	het	het	het	het	het	WT
E10-05	WT	WT	het	WT	WT	WT	het
E10-143	WT	WT	het	WT	WT	WT	het
E10-144	WT	WT	het	WT	WT	WT	het

4.2. Varyantların IGV Görüntüleri

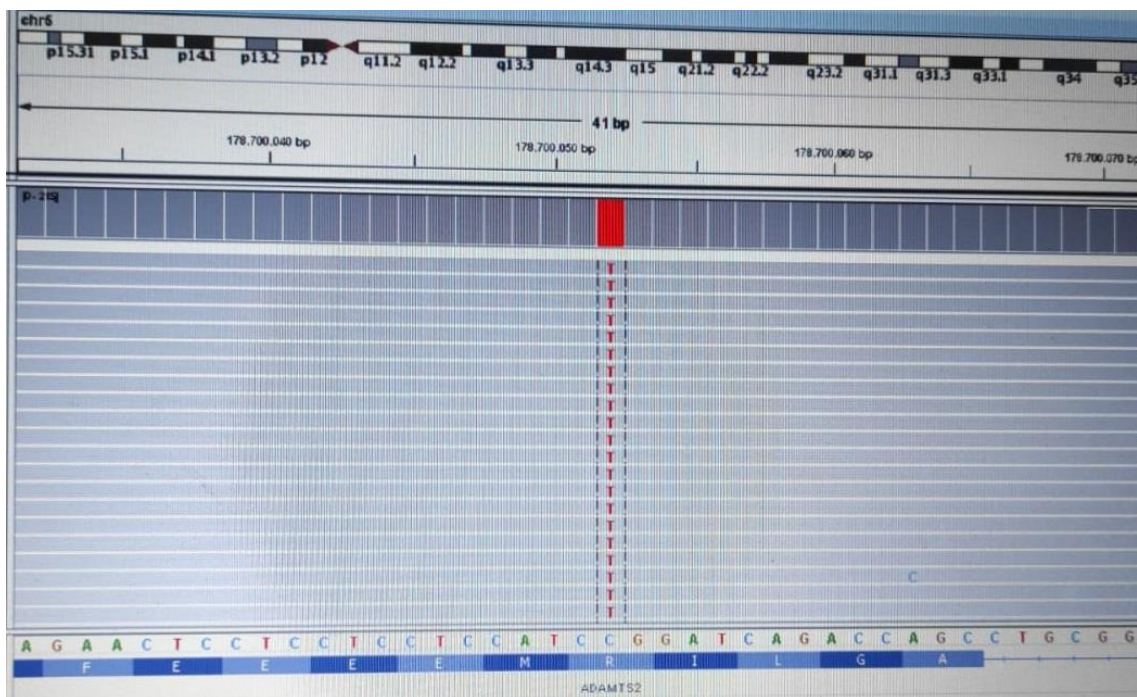
3 kardeşin ekzom dizileme datası analiz edildiğinde, hepsinde ortak olduğu tespit edilen varyantların SOPHIA DDM programı üzerinden temin edilen IGV görüntüsü Şekil 4-1 ile Şekil 4-6 arasında verilmiştir.



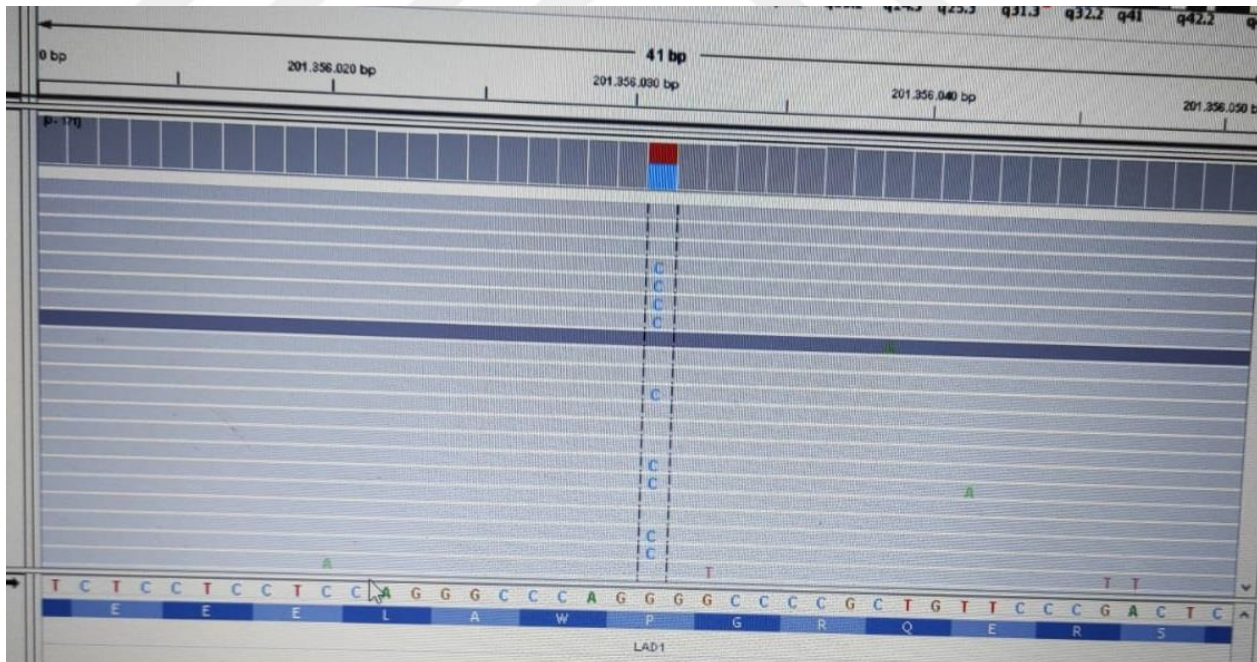
Şekil 4-1: *SLC6A19* genindeki c.1270C>G varyantın IGV görüntüsü



Şekil 4-2: *SCN3A* genindeki c.1687C>T (G>A) varyantın IGV görüntüsü



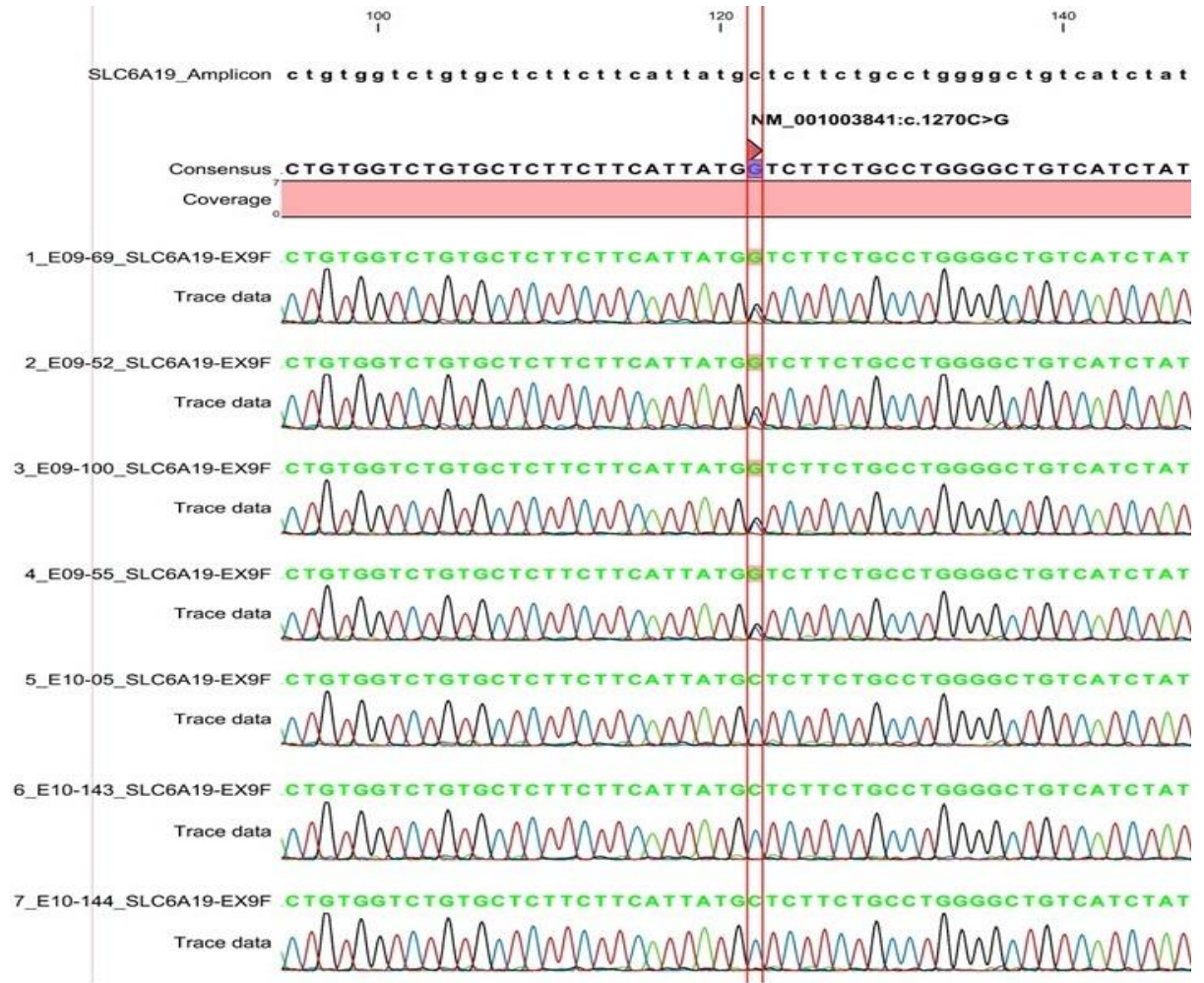
Şekil 4-3: ADAMTS2 genindeki c.548G>A (C>T) varyantın IGV görüntüsü



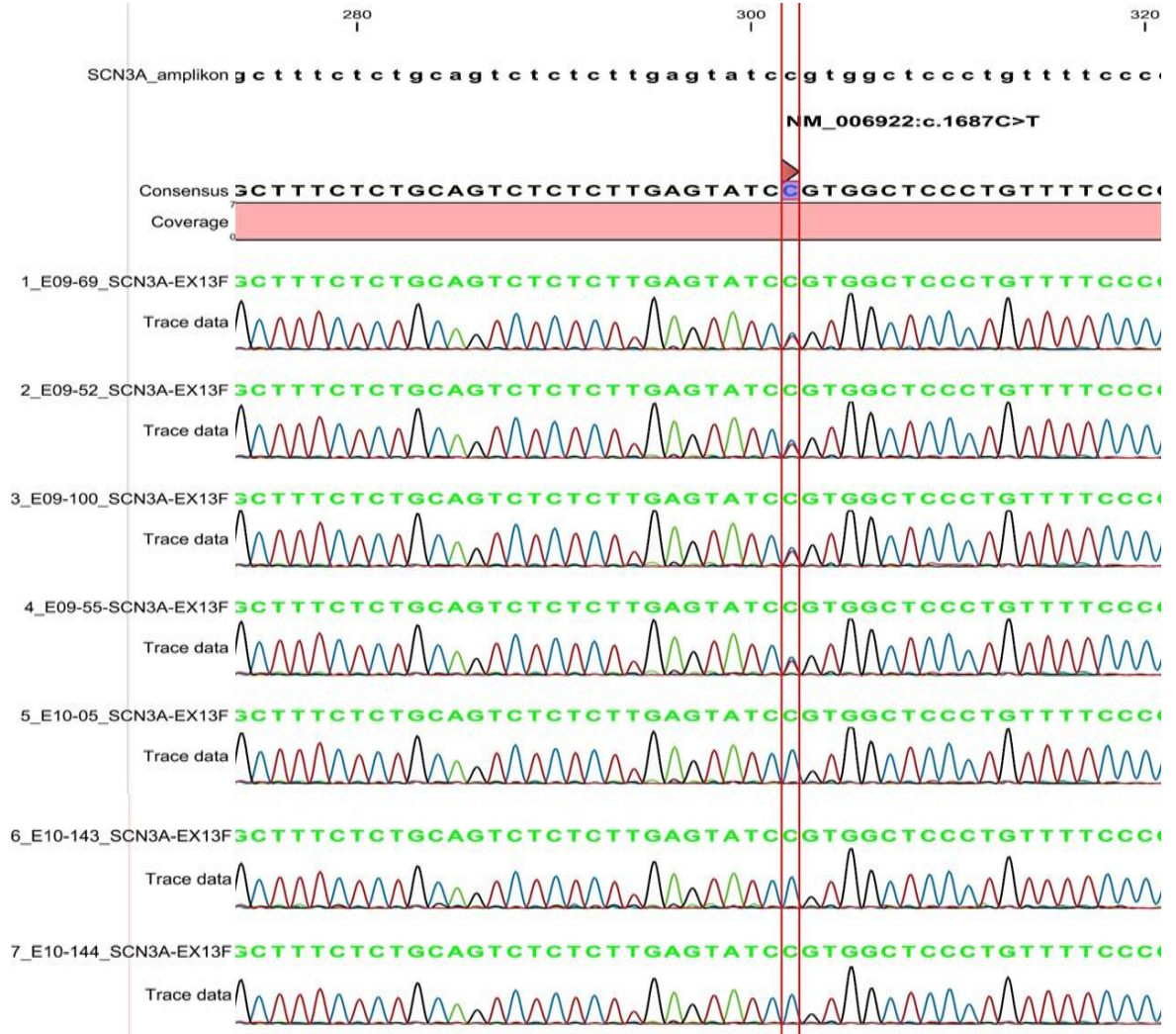
Şekil 4-4: *LAD1* genindeki c.458C>G (G>C) varyantın IGV görüntüsü

4.3. Varyantların Sanger Dizileme ile Validasyonu

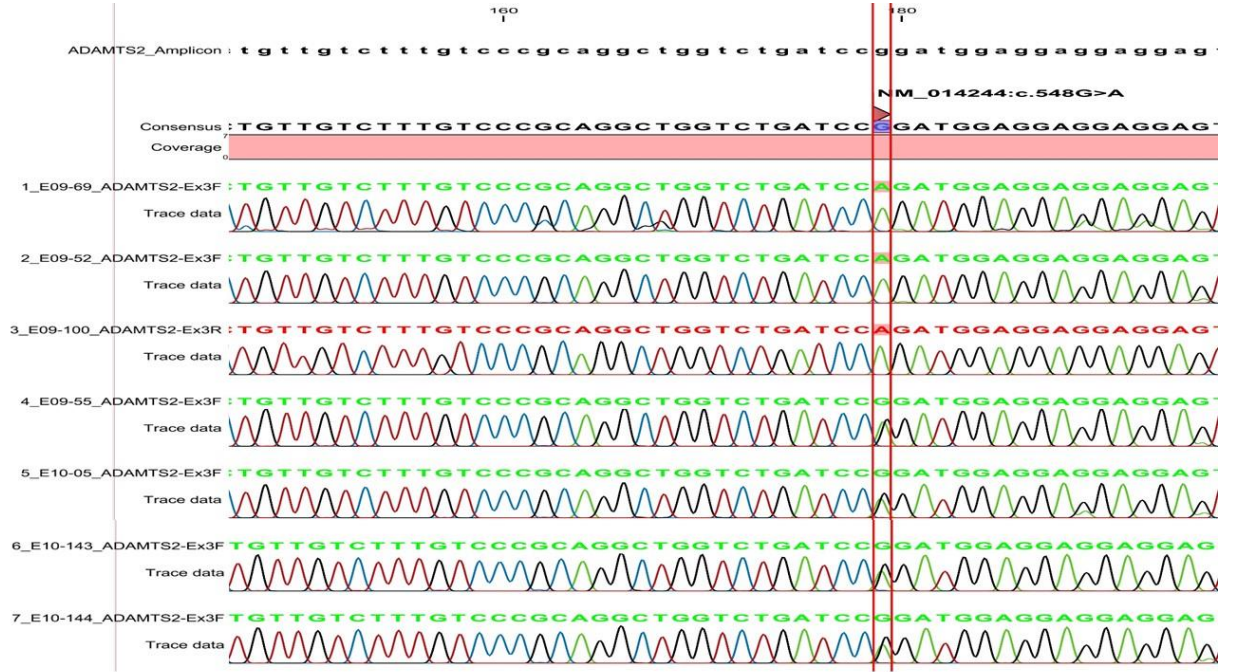
İlgili varyanta dizayn edilen primerlerle yapılan optimizasyon ve PCR çalışmaları sonucunda istenilen nitelikte olduğu tespit edilip, tüm aile üyelerinin DNA'ları ilgili primerler ile okutulmak üzere sanger dizilemeye gönderildi. Sanger dizileme sonucu Şekil 4-7 ile Şekil 4-13-b arasında gösterilmiştir.



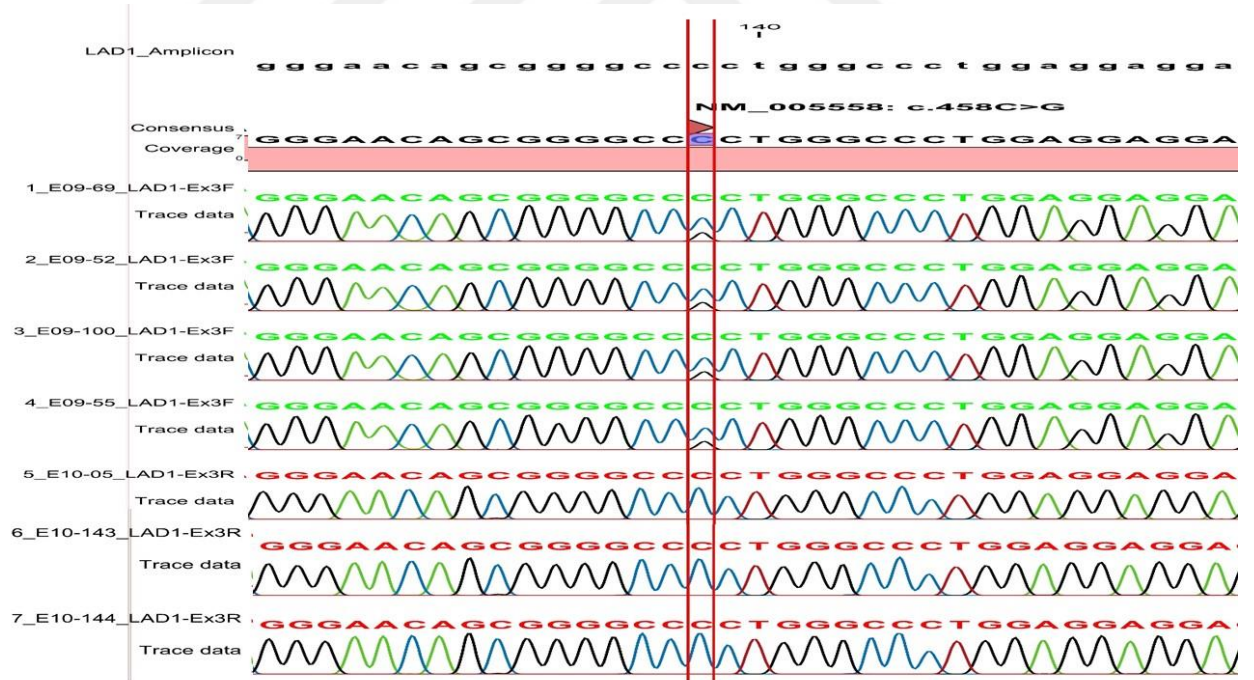
Şekil 4-7: SLC6A19 genindeki c.1270C>G varyantının Sanger Dizileme sonucu



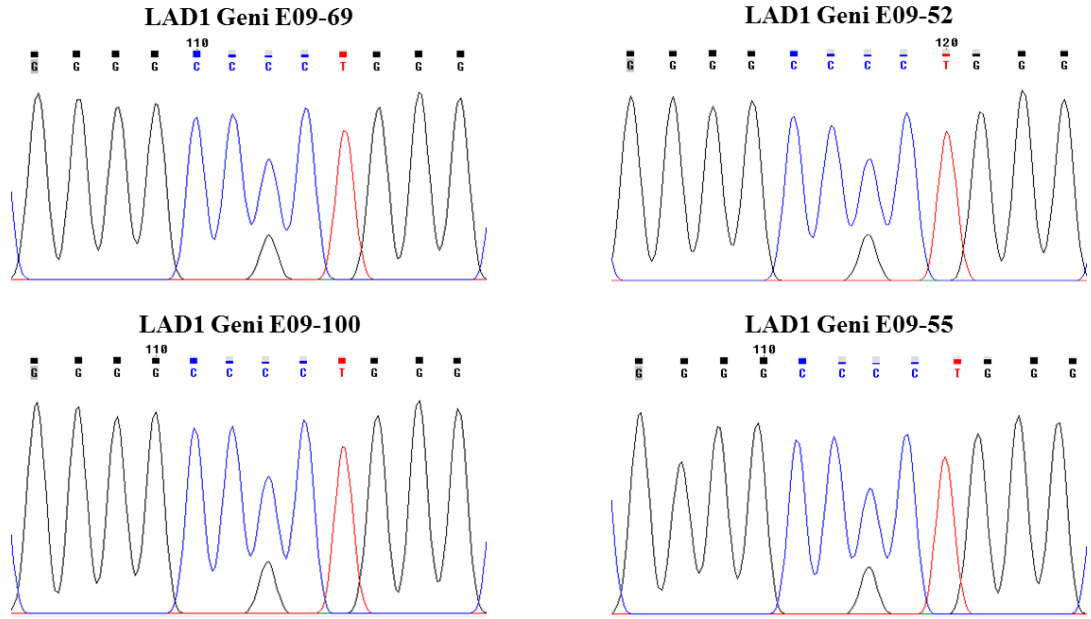
Şekil 4-8: SCN3A genindeki c.1687C>T varyantının Sanger Dizileme sonucu



Şekil 4-9: ADAMTS2 genindeki c.548G>A varyantının Sanger Dizileme sonucu

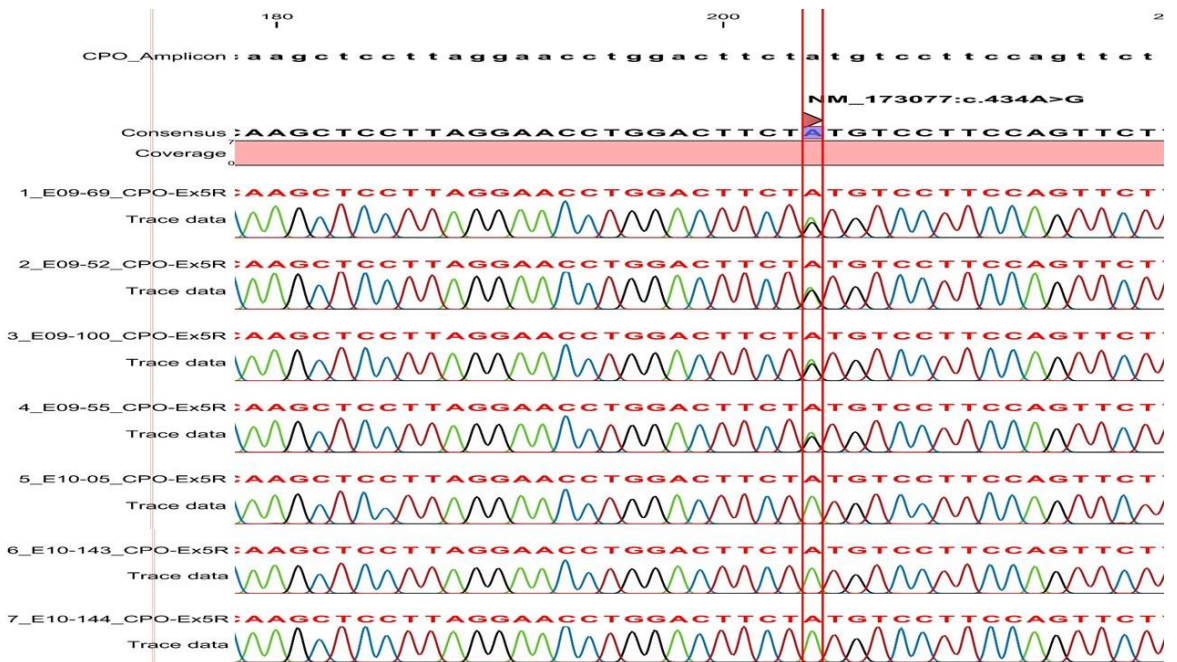


Şekil 4-10: LAD1 genindeki c.458C>G varyantının Sanger Dizileme sonucu



Şekil 4-11: LAD1 genindeki varyantın Chromas Programından alınmış Sanger dizileme görüntüleri

(LAD1 geni için sanger dizileme sonuçlarında heterozigot bireylerin o konumdaki görüntüsünün heterozigotluk mu yoksa kirlilik mi olduğuna emin olmak için ters primerle tekrar edilen Sanger dizileme sonucu ile Chromas programından oluşturulmuş Sanger dizileme görüntüleri)



Şekil 4-12: CPO genindeki c.434A>G varyantının Sanger Dizileme sonucu

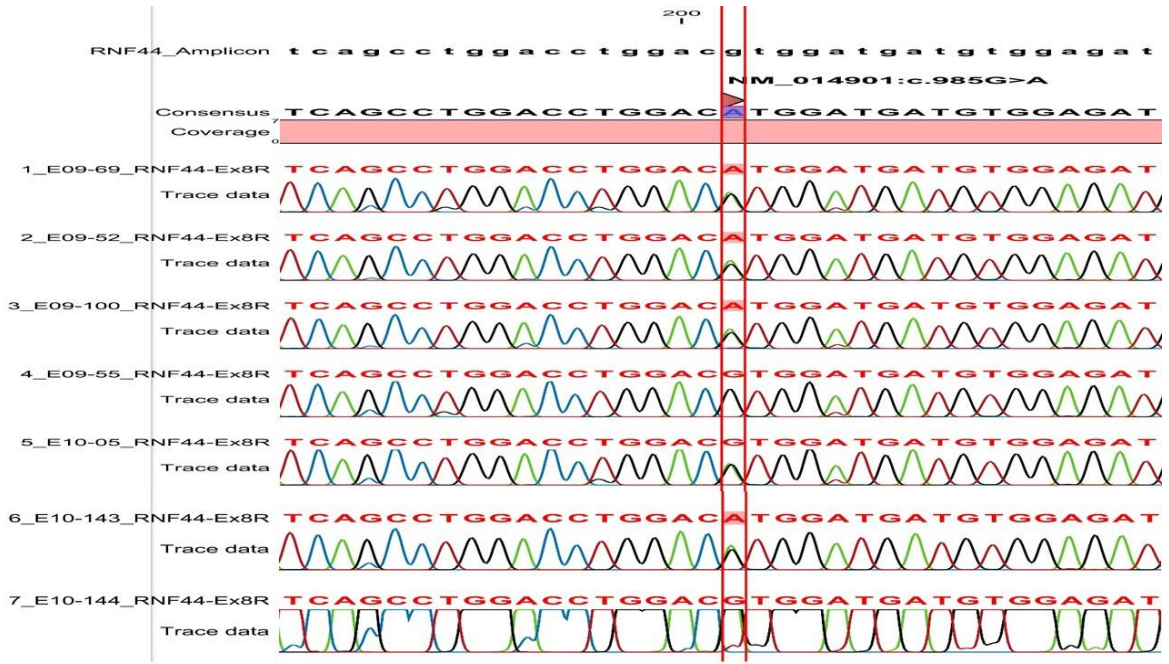


Şekil 4-13: CSF1R genindeki c.2239G>A varyantının Sanger Dizileme sonucu

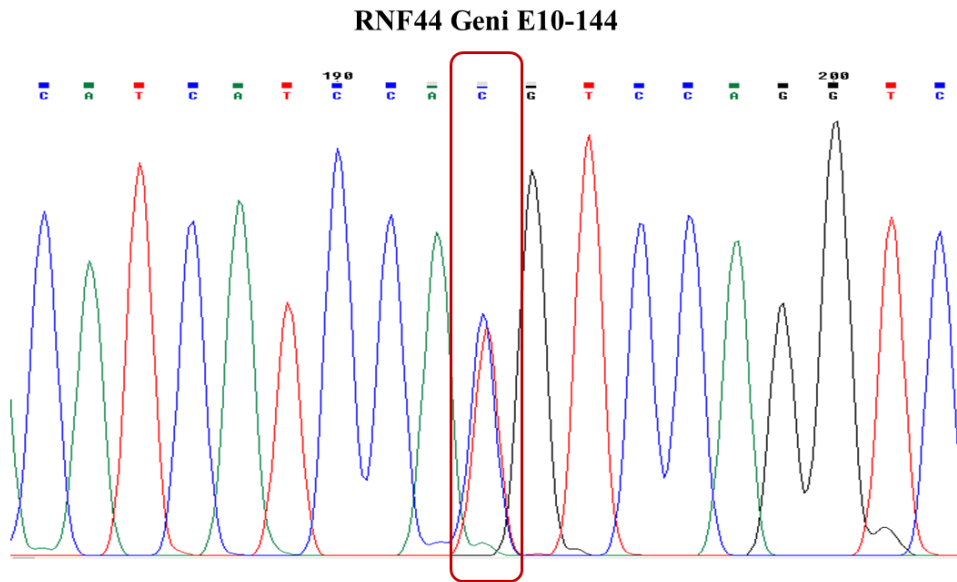


Şekil 4-14: CSF1R genindeki varyantın Chromas Programından alınmış Sanger dizileme görüntüleri

(CSF1R geni için sanger dizileme sonuçlarında E10-05 kodlu bireye ait ışımanın yüksek düzeyde olması nedeniyle CLC programındaki görüntüsü net olmadığı için aynı bireyin Chromas programından alınan Sanger dizileme görüntüsü)



Şekil 4-15: *RNF44* genindeki c.985G>A varyantının Sanger Dizileme sonucu

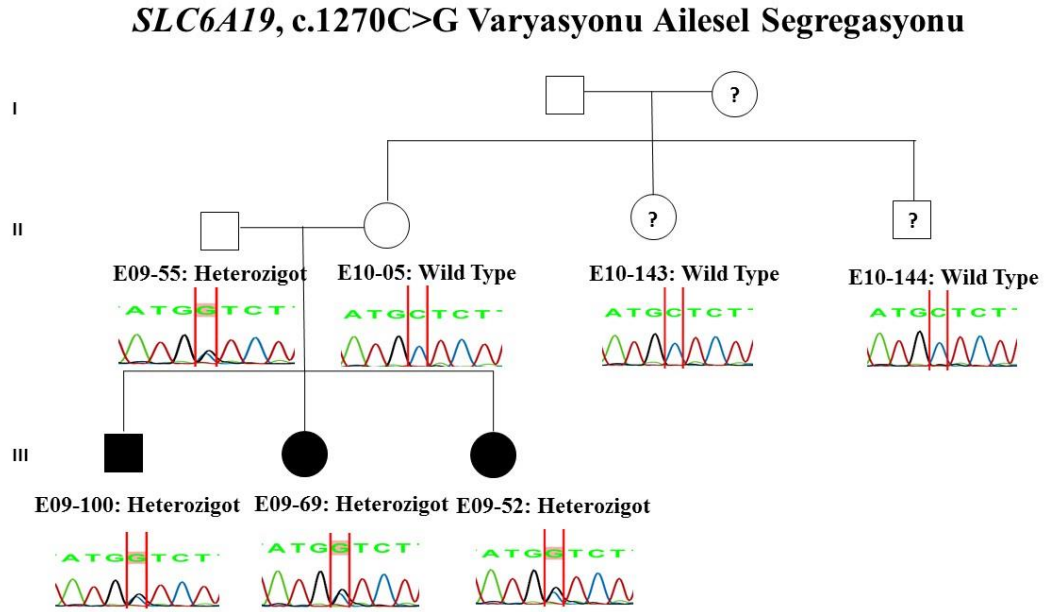


Şekil 4-16: *RNF44* genindeki varyantın Chromas Programından alınmış Sanger dizileme görüntüleri

(*RNF44* geni için sanger dizileme sonuçlarında E10-144 kodlu bireye ait ışıma yüksek düzeyde olmasından kaynaklı CLC programındaki görüntüsü net olmadığı için aynı bireyin Chromas programından alınan sanger dizileme görüntüsü)

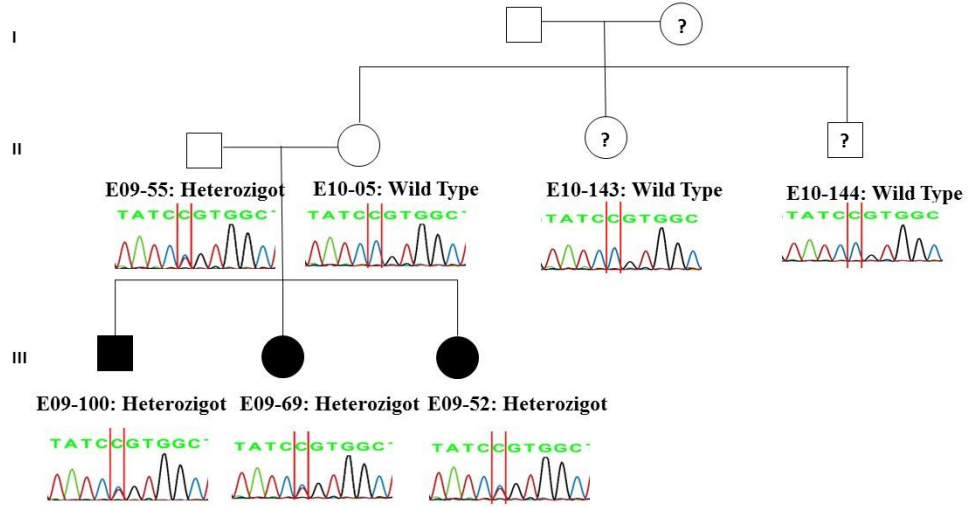
4.4. Varyantların Ailesel Segregasyonu

Primerler ve hastaların örnekleri ile çalışılmış Sanger dizileme datasının analizi Şekil 4-14 ile Şekil 4-20 arasındaki görsellerde aile ağacı üzerinde gösterilmiştir.



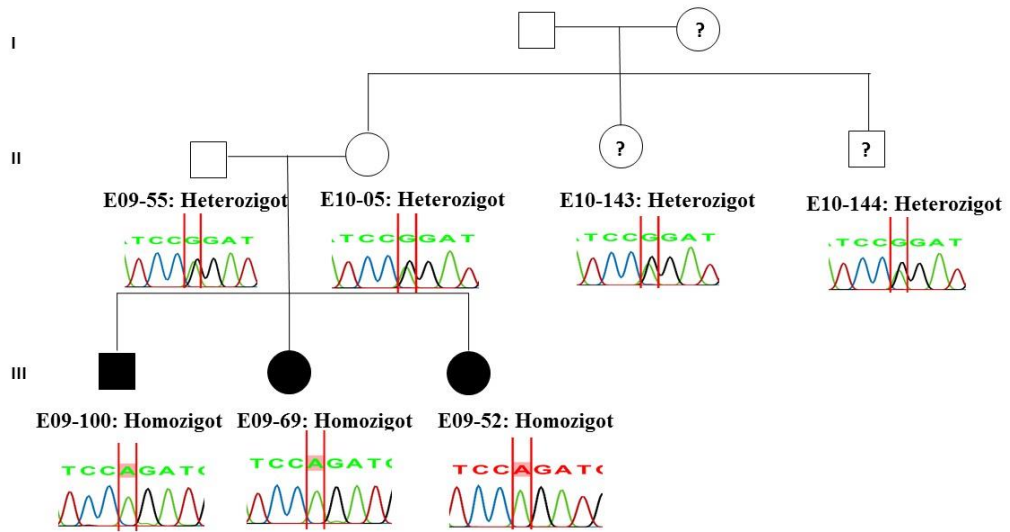
Şekil 4-17: *SLC6A19* genindeki c.1270C>G varyantının ailesel segregasyonu

SCN3A, c.1687C>T Varyasyonu Ailesel Segregasyonu



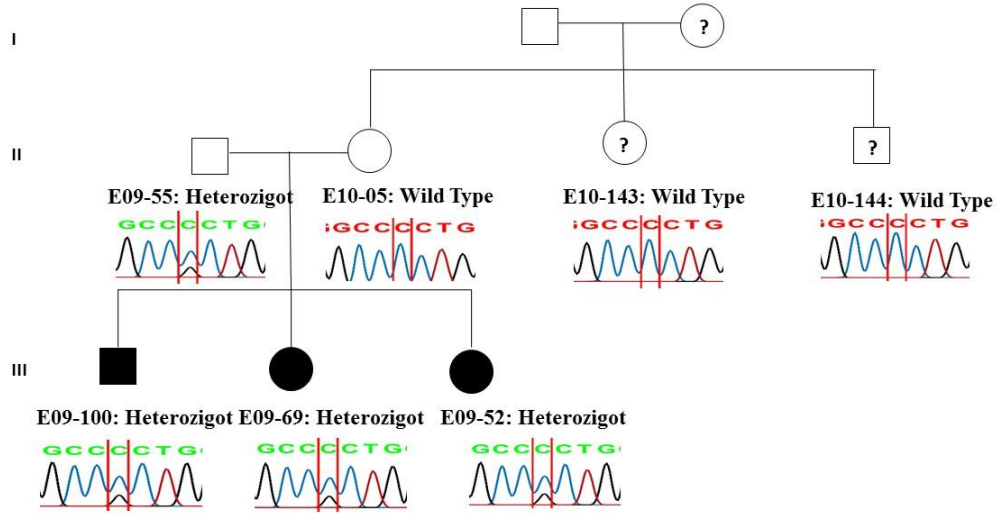
Şekil 4-18: SCN3A genindeki c.1687C>T varyantının ailesel segregasyonu

ADAMTS2, c.548G>A Varyasyonu Ailesel Segregasyonu



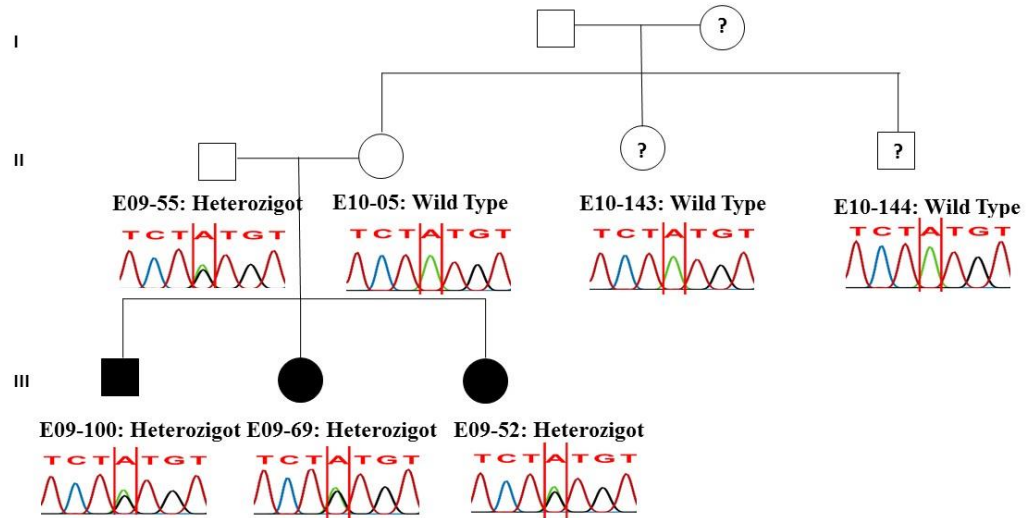
Şekil 4-19: ADAMTS2 genindeki c.548G>A varyantının ailesel segregasyonu

***LAD1* , c.458C>G Varyasyonu Ailesel Segregasyonu**



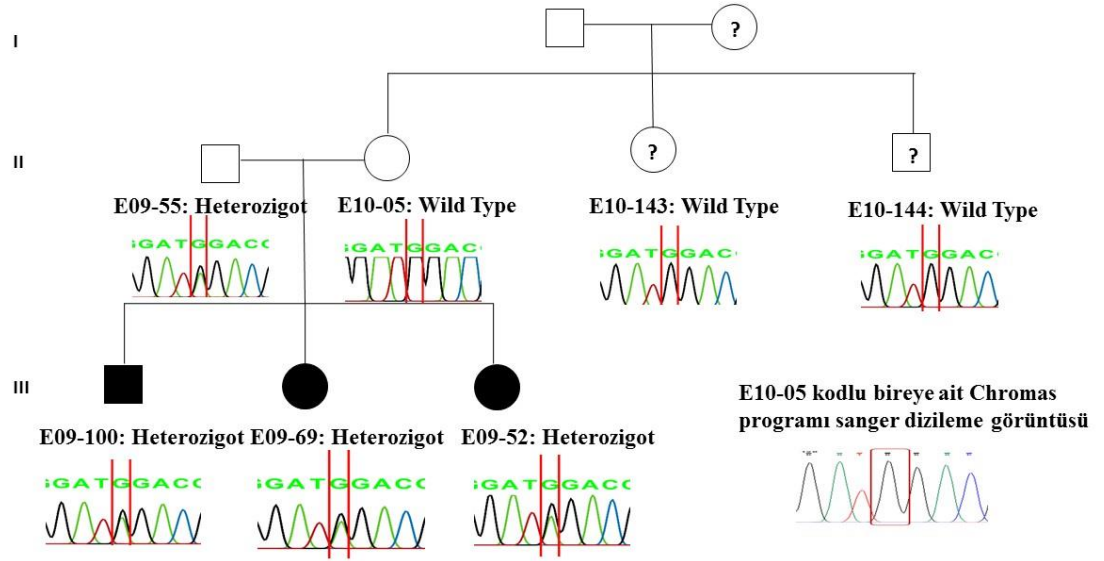
Şekil 4-20: *LAD1* genindeki c.458C>G varyantının ailesel segregasyonu

***CPO* , c.434A>G Varyasyonu Ailesel Segregasyonu**



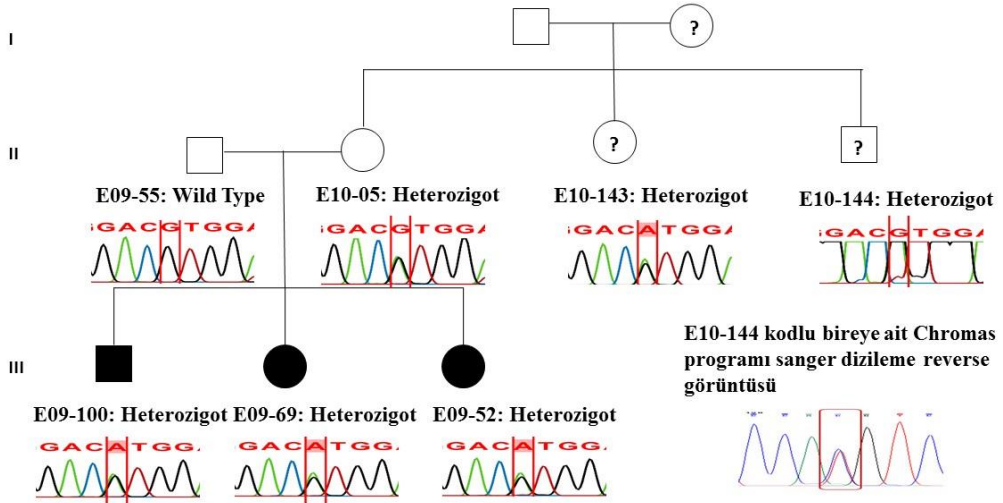
Şekil 4-21: *CPO* genindeki c.434A>G varyantının ailesel segregasyonu

CSF1R , c.2239G>A Varyasyonu Ailesel Segregasyonu



Şekil 4-22: CSF1R genindeki c.2239G>A varyantının ailesel segregasyonu

RNF44 , c.985G>A Varyasyonu Ailesel Segregasyonu



Şekil 4-23: RNF44 genindeki c.985G>A varyantının ailesel segregasyonu

5. TARTIŞMA

WES datasından yapılan analiz sonucunda E09-69, E09-52 ve E09-100 kodlu üç etkilenmiş kardeşin verisinde ortak olduğu saptanan genlerin Sanger Dizileme ile tüm ailede taranması sonucunda elde edilen veriler, *SLC6A19*, *SCN3A*, *CPO*, *LAD1* ve *CSF1R* genleri paternal, *RNF44* geni ise maternal geçiş göstermiştir. *ADAMTS2* geni ise resesif geçişli bir kliniğe yol açabilecek şekilde ebeveynlerden homozigot olarak aktarılmıştır. *ADAMTS2* geninde ise resesif modele uygun bir şekilde ebeveynlerin taşıyıcı olduğu, varyasyonun çocuklara homozigot olarak aktarıldığı bir tablo görülmüştür.

Sonuçlar kısmında da detaylı anlatıldığı gibi tespit edilen bütün genlerde çocuklar etkilenmişken ailenin diğer bireyleri etkilenmemiştir. Bu durum, ilk bakışta tespit edilen varyasyonların epilepsi ile ilişkisi olmama ihtimalini düşündürse de, epilepsi gibi kompleks bir hastalığı incelediğimiz çalışmamızda söz konusu genleri eleme sebebi olamaz. Bu genlerde görülen durumlar, epilepside yaygın olarak görülen penetrans yokluğu, penetrans düşüklüğü, ekspresivite değişkenliği gibi durumlar veya antisipasyon ile açıklanabilir. Bunun dışında kliniğin ortaya çıkmasında etkili olabilecek ve çocuklarda olan ama saptadığımız varyasyonları aktaran ebeveynde olmayan modifier genlerdeki varyasyonların varlığı da sadece çocuklarda kliniğin ortaya çıkmasını açıklayabilecek bir diğer faktör olabilir. Ayrıca klinisyenin muayene ve takibi sırasında fenotipin her zaman görülemeyebileceği, bazı belirtileri yakalamanın zor olduğu ve ancak ileri akselerometrik analizle saptanabileceği fakat etkilenmemiş bireylere bu ileri tetkiklerin yapılmadığı yani etkilenmemiş olarak nitelendirilen bireylerin yalnızca yapılan tetkik ve incelemeler dahilinde kliniğe sahip olmadığı gibi durumlar da göz ardı edilmemesi gereken önemli detaylardır.

***SLC6A19*:** WES analizimiz sonucunda tespit edilen en önemli gen *SLC6A19* genidir. Bu gende yer alan NM_001003841.3:c.1270C>G (ENST00000304460.11), p.(Leu424Val) varyantı, VEP'e göre SIFT ve PolyPhen araçlarında zararlı bir varyasyon olarak, ACMG-AMP sınıflandırmasına göre de önemi belirlenememiş varyant yani Variant of Uncertain Significance (VUS) olarak sınıflandırılmıştır. Literatürde bu konum için rs776944825 kodu atanmış olsa da, C>G varyasyon daha önce hiç bildirilmemiş olup, novel olan bu varyasyon ilk defa çalışmamızdaki

hastalarda tespit edilmiştir. Tanımlanmış FAME3 lokasyonunun (chr5p15.31-p15) hemen üstünde bulunan chr5p15.33 konumunda yer alan *SLC6A19* geni, 12 ekzonluk ENST00000304460.11 transkriptini kodlamaktadır. Bu transkript 634 aminoasitlik ve 71 kDa'luk 6 nolu nörotransmitter taşıyıcı ailesinin 19 nolu üyesini (Solute Carrier Family 6, Member 19) yani *SLC6A19* proteinini kodlamaktadır ("SLC6A19 - OMIM" n.d.). Bu gen daha önce otozomal resesif Hartnup hastalığı, otozomal dominant Hiperglisinüri ve otozomal resesif veya digenik resesif İminoglisinüri ile ilişkilendirilmiş olsa da daha önce epilepsi ile ilişkilendirilmemiştir. Fakat bu gen olmasa da aynı gen ailesinin bir başka üyesi olan *SLC6A1* geni myoklonik-atonik epilepsi ile ilişkilendirilmiştir (Carvill et al, 2015). 2018'de yapılan bir çalışmada, *SLC6A1* genindeki missense varyantların, GABA taşıma aktivitesini azalttığı ve çocukluk çağı epilepsisinin ortaya çıkmasında önemli bir etkisinin olduğu ortaya konmuştur (Mattison et al, 2018).

SLC6A19 proteini bağırsak ve böbrekte apikal membranda nörotransmitter taşıyıcısı olarak görev yapar. Broer ve ark. 2004'te fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada, *SLC6A19*'un nötr aminoasitlerin aktif taşınmasını desteklerken nötr olmayanların taşınmasını desteklemediği gözlemlenmiştir. Diğer nörotransmitter taşıyıcı aile üyelerinde taşıma işlemi kloro bağlıyken, *SLC6A19*'da sodyuma ve PH'a bağlı ve elektrojenik olduğu görülmüştür (Bröer et al, 2011). Nörotransmitter taşınmasında rol oynayan membran proteini olarak görev yapan *SLC6A19* her ne kadar daha önce epilepsi ile ilişkilendirilmemiş olsa da, genin epilepsi için kritik olabilecek bir işleve sahip olması, üç etkilenmiş kardeşte de bu varyantın ortak olması, aynı gen ailesinin benzer görev yapan ve epilepsi gen listemizde de olan diğer üyelerinden *SLC6A1* (Carvill et al, 2015) ve *SLC6A8* (Mercimek-Mahmutoğlu et al, 2010) genlerinin epilepsi ile ilişkili olması gibi durumlar *SLC6A19* genindeki varyasyonun kuvvetle muhtemel epilepsi ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. *SLC6A19* geninin farklı fenotipler için otozomal dominant ve resesif, hatta digenik resesif geçişli modelleri bulunmaktadır ("SLC6A19 - OMIM" n.d.). FAME'de otozomal dominant geçişli olduğu düşünüldüğünde ailesel segregasyon klinikle uyumaktadır.

SCN3A: Üç etkilenmiş kardeşte de ortak görülen bir diğer varyant *SCN3A* geninin NM_006922.4:c.1687C>T (ENST00000283254.12) transkriptinde, p.(Arg563Cys) kodlayan, rs202004044 kodlu varyanttır. Bu varyant, Ensembl VEP

aracına göre SIFT ve PolyPhen tahmin araçlarına göre zararlı (deleterious) ve muhtemelen zarar verici (probably damaging) olarak, ACMG-AMP kriterlerine göre iyi huylu yani bening olarak sınıflandırılmıştır. Bu tez çalışması sırasında, Clinvarda 2 farklı bildiride muhtemelen iyi huylu yani likely bening olarak değerlendirilmiştir. GnomAD veritabanına göre Dünya genelinde yaklaşık 1/6300 oranında gözlenlenmiştir (“rs202004044 (SNP) - Population Genetics - Ensembl Genome Browser 107” n.d.). Kromozom 2q24.3 konumunda yer alan *SCN3A* geninin 28 ekzonluk bu transkripti, 2000 aminoasitlik ve 226 kDa’luk bir protein olan “voltaj kapılı sodyum kanalın tip III alfa alt birimini” kodlar (“*SCN3A* - OMIM” n.d.). Voltaj kapılı sodyum kanalı, farklı tip beta ve alfa alt birimlerden oluşan transmembran özellikli bir glikoprotein kompleksidir. Tip III alfa alt birim (*SCN3A* proteini), bu kompleksi oluşturan farklı tip alfa alt birimlerinden sadece bir tanesidir (“Sodium Channel - Wikipedia” n.d.). Voltaj kapılı sodyum kanalları, nöronal elektriksel uyarıların nöron ve kas dokularında üretimi ve yayılımını sağlar (Nagase et al, 2000). *SCN3A* ise “gyrifikasyon” olarak isimlendirilen serebral korteks katlanmasında yer alır ve beynin konuşma üreten alanlarını etkiler (Gotthardt et al, 2000; “Gyrifikasyon” n.d.). Literatürdeki bazı çalışmalarda, *SCN3A* genindeki birbirinden farklı varyantlar farklı epilepsiler türleri ile ilişkilendirilmiştir (Vanoye et al, 2014; Lamar et al, 2017; Zaman et al, 2018). Otozomal dominant geçişli olan *SCN3A* geni, FAME kliniğinde de görülen ailesel segregasyon modeli ile örtüşmektedir. Tüm kardeşlerde heterozigot formda bulunmaktayken, aynı heterozigot varyanta sahip olduğu halde babanın hastalık belirtisi göstermemesi en başında da belirttiğimiz gibi penetrans yokluğunu akla getirmektedir. Bu duruma bir örnek olarak 2009 yılında Holland ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *SCN3A* genindeki başka bir varyantın yine baba tarafından aktarılıp babanın etkilenmemiş olduğu bildirilmiş ve bu durum ilişkili fenotipin penetransının azalması şeklinde yorumlanmıştır (Holland et al, 2009). Hem *SCN3A* geninde başka varyasyonların, hem de bu genle aynı aileden olan epilepsi genleri listemizdeki *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN5A*, *SCN8A* ve *SCN9A* genlerinin epilepsi ile ilişkisi olması ve varyantın etkilenmiş üç kardeşte de bulunması nedeniyle bu varyantın da epilepsi ile büyük bir ihtimalle ilişkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

ADAMTS2 geni ENST00000251582.12 transkriptini kodlamaktadır. Bu transkriptte saptanan NM_014244.5:c.548G>A, p.(Arg183Gln), rs763905470 varyantının SIFT tahmin aracı tarafından tolere edilebilir (tolerated), PolyPhen tahmin

aracı tarafından muhtemelen zararlı (possibly damaging) olduğu, ACMG-AMP sınıflandırmasında ise VUS olduğu belirtilmiştir. Clinvar'da daha önce rapor edilmemiş ve GnomAD'a göre Dünya genelinde 1/50000 oranında gözlemlenmiştir ("rs763905470 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107" n.d.). Kromozom 5q35.3 konumunda yer alan "A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Tip 1 Motifs 2" yani *ADAMTS2* geninin 22 ekzonluk transkripti, 1211 aminoasitlik ve 134 kDa'luk NPI enzimini (prokollajen I N-proteinaz) kodlar ("ENST00000251582.12 (ADAMTS2-201) - Protein Summary - Ensembl Genome Browser 107" n.d.). 2005 yılında sığır enzimi kullanılarak Colige ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre, sığır *ADAMTS2* geninin 17 farklı rekombinant formu oluşturulmuş ve bu formların işlenmesi, aktiviteleri, bölünme özgüllüğü araştırılmıştır (Colige et al, 2005). NPI enziminin tip I prokollajenlerin N terminal-propeptidini kestiği ve tip II ve III prokollajenleri parçaladığı tespit edilmiştir. Söz konusu genin ait olduğu ailenin (ADAMTS) üyesi olan enzimlerin, kompleks olarak salgılandığı ve çeşitli patolojik ve fizyolojik süreçlerde görev yaptığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *ADAMTS2* zimojeni C terminal işleme ve proprotein konvertazları aracılığıyla bikaç bölünmede aktif görev almaktadır. Enzimin C terminal domaini enzim aktivitesini baskımlarken, iki trombospondin tip I tekrarı ise aktiviteyi arttırmaktadır. Çalışmada *ADAMTS2*'nin fibriler prokollajenleri işlemenin dışındaki işlevlerde de görev alabileceğini düşünmüşlerdir.

OMIM veritabanında *ADAMTS2* geni otozomal resesif Ehlers-Danlos Sendromu ile ilişkilendirilmiş fakat herhangi bir epilepsi çeşidiyle ilişkilendirilmemiştir. Çalışmamızdaki ailede baba, anne, teyze ve dayı heterozigot, çocuklar ise homozigottur. Bu durumda genin ailesel segregasyonu ebeveynlerden resesif geçiş şeklindedir. Resesif kalıtım modeli, tespit ettiğimiz varyantın ailesel segregasyonuna uymaktadır. Bu kalıtım modeli baba ve anne tarafının etkilenmemiş olması ile çocukların etkilenmiş olmasını açıklayabilir.

CPO: Tespit edilen bir diğer geni *CPO* genidir. Bu gendeki ENST00000272852.4 transkriptinde bulunan p.(Tyr145Cys) değişimine neden olan NM_173077.3:c.434A>G, rs1462106311 varyantı VEP aracındaki verilere göre SIFT tahmin aracı tarafından zararlı (deleterious), PolyPhen tahmin aracı tarafından muhtemelen zarar verici (probably damaging), ACMG-AMP'ye göre VUS olarak

değerlendirilmiştir. Varyant Clinvar veritabanında daha önce herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. GnomAD verilerine göre dünya genelinde 1/10000 oranında gözlemlenmiştir (“rs1462106311 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107” n.d.) . Kromozom 2q33.3 konumunda yer alan *CPO* geni, 9 ekzonluk bir transkripti kodlar. Bu transkript ise 374 aminoasitlik ve 42 kDa’luk karboksipeptidazların bir çeşidi olan *CPO* proteinine dönüşür (“ENST00000272852.4-Protein Summary-Ensembl Genome Browser 107” n.d.). Karboksipeptidazlar, proteinlerin karboksiterminal yani C-terminal uçlarındaki peptit bağına hidrolize ederler. Bu enzimler, gıda sindirimi, translasyon sonrası modifikasyon, insülin biyosentezi gibi bazı biyolojik süreçleri düzenleme, kan pıhtılaşması, yara iyileşmesi, büyüme faktörü üretimi ve üreme gibi birçok alanda görev alır. OMIM’de bu gene ait kalıtım paterni belirtilmemektedir fakat çalışmamızda ailesel segregasyon babadan çocuklara geçiş şeklinde görülmüştür. Bununla birlikte babanın hasta olmaması ve çocukların hepsinin hasta olması, FAME kliniğinin kalıtım paterni ve epilepsinin kompleks bir hastalık olduğu düşünüldüğünde genin kalıtım paternine dair soru net olarak cevaplanamamaktadır.

LAD1: Ekzom dizileme verisinde ortak olan bir diğer gen *LAD1* genidir. Bu gende tespit edilen NM_005558.4: c.458C>G (ENST00000391967.7), p.(Pro153Arg), rs200727328 varyantı, VEP aracında analiz edildiğinde SIFT tarafından tolere edilebilir (tolerated), PolyPhen tarafından muhtemelen zararlı (possibly damaging) olarak, ACMG verilerine göre iyi huylu yani benign olarak değerlendirilmiştir. Clinvar’da rs200727328 varyantı hiçbir hastalıkla henüz ilişkilendirilmemiştir. GnomAD verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 1/5000 oranında görülmektedir (“rs200727328 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107” n.d.). Kromozom 1q32.1 konumunda yer alan LINEAR IgA DISEASE ANTIGEN yani *LAD1* geninin 10 ekzona sahip ENST00000391967.7 transkripti, 517 aminoasitlik ve 57 kDa’luk proteini olan Ladinin-1 proteinini kodlar (“LAD1-OMIM” n.d.);(“ENST00000391967.7-Protein Summary-Ensembl Genome Browser 107” n.d.). Bu proteini, dermal tabaka ile epidermal tabaka arasında bazal membran sabitleyicisi olarak görev yapar. 1997 yılında Motoki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bu proteinin otoantijen olarak görev yaptığı ve Lineer IgA hastalığı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Motoki et al,1997). O zamandan günümüze kadar başka bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Literatürde *LAD1* geninin ailesel segregasyonu bildirilmemiştir.

“Bu genin kalıtım paterni nedir?” sorusu CPO geninde olduğu gibi cevapsız kalmaktadır.

CSF1R: Tespit edilen 3. gen *CSF1R* genidir. Bu gendeki NM_005211.3: c.2239G>A (ENST00000286301.7), p.(Gly747Arg), rs41355444 varyantı, VEP’e göre tahmin araçlarında tolere edilebilir ya da iyi huylu ACMG-AMP’ye göre iyi huylu yani bening olarak nitelendirilmiştir. Fakat bu varyant, literatürde epilepsi ile direkt olarak ilişkilendirilmese de beyin anormallikleri ve nörodejenerasyonla ilişkilendirildiği ve SOPHIA programı kullanmadan önceki manuel analizimizde dikkatimizi çektiği için değerlendirmeye alındı. Bu noktada literatürde G>C değişim ve G>A değişim olmak üzere iki farklı varyant rapor edilmiştir. Çalışmamızda da görülen G>A değişim GnomAD genom verilerine göre dünya genelinde 1/500 oranında görülmektedir (“rs41355444 (SNP) - Population Genetics ” n.d.). Kromozom 5q32 konumunda yer alan *CSF1R* geninin kodladığı 22 ekzonluk ENST00000286301.7 transkripti, 972 aminoasitlik ve 107 kDa’luk Koloni Uyarıcı Faktör 1 Reseptörü’nü kodlar (“CSF1R - OMIM” n.d.). Koloni uyarıcı faktör 1 olarak adlandırılan bir proteinin bu reseptöre bağlanmasıyla, hücre içinde çoklu sinyal yolları aktifleşir. Bu durum hücre bölünmesi, büyümesi ve farklılaşması gibi temel hücresel süreçleri düzenler. CSF-1 reseptörü, beyindeki nöronları koruyup muhafaza eden glial hücrelerin zarında yüksek miktarda bulunur (“CSF1R Gene: MedlinePlus Genetics” n.d.). Bu gen otozomal resesif geçişli beyin anormallikleri, nörodejenerasyon ve disosteoskleroz ile otozomal dominant geçişli lökoensefalopati ile ilişkilendirilmiştir.

RNF44 geni kardeşlerin hepsinde ortak olduğu tespit edilen 7. gendi. Bu genin kodladığı ENST00000274811.9 transkriptinde tespit edilen NM_014901.5:c.985G>A, p.(Val329Met), rs114764573 varyantı VEP verilerine göre SIFT tahmin aracı tarafından zararlı (deleterious) ve PolyPhen aracı tarafından ise muhtemelen zarar verici (probably damaging) olarak, ACMG-AMP kriterlerine göre de VUS olarak tanımlanmıştır. Clinvar’da ne epilepsi ne de başka bir hastalıkla alakalı rapor edilmemiştir. GnomAD genome projesi verilerine göre dünya genelinde 1/1600 oranında görülmüştür (“rs114764573 (SNP) - Population Genetics - Ensembl Genome Browser 107” n.d.). Kromozom 5q35.2 lokasyonunda yer alan *RNF44* geninin ifade ettiği 11 ekzonluk bu transkripti, 432 aminoasitlik ve 47 kDa’luk “Ring Finger Protein 44” yani RNF44 proteinini kodlamaktadır (“ENST00000274811.9 (RNF44-201) - Protein Summary -

Ensembl Genome Browser 107” n.d.). *RNF44* geninin kalıtım modeline dair literatürde bir bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmanın Limitasyonları

Epilepsi poligenik ve kompleks yapıda olan bir hastalıktır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz genlerin epilepsiye kaydadeğer bir katkısı olsa da epilepsinin bu yapısı nedeniyle genel bakış açısını anlamaya yetmeyebilir. Günümüzdeki majör yaklaşım kompleks hastalıklarda nadir varyantları incelemektir. Bu nadir varyasyonlar nadir de görülse klinik açıdan etkisi büyüktür. Bu yaklaşıma en son örnek, 2022’nin geçtiğimiz ayında Karczewski ve arkadaşlarının büyük çaplı hasta kitlesi ile ekzom dizileme tekniği kullanılarak yapmış olduğu çalışmadır. Söz konusu çalışmada, çeşitli fenotiplerde nadir ekzonik varyasyonların etkisi sistematik olarak değerlendirilmiş, nadir varyasyonları gözardı etmemenin önemi ortaya konmuştur. Bu bakış açısının bir örneği olan çalışmamızda, kısa okumalı ekzom dizileme tekniği kullanılmıştır. Kullanılan tekniğin dizileme öncesi PCR’a bağlı bir teknik olması sebebiyle PCR’dan kaynaklanabilecek hatalar veya dizilemede GC’den zengin bölgelerin çok iyi cover edilememiş olma ihtimali nedeniyle herhangi bir varyasyon kaçırılmış olabilir. Bununla birlikte, kullandığımız tekniğin kısıtlayıcı bir yönü de, FAME kliniğinde son zamanlarda intronik pentamer ekspansiyonunun gündeme gelmesi ve ekzom dizileme tekniğinin intronik bölgelerdeki varyasyonları ya da yapısal varyasyonları tespit edememesidir. FAME kliniği için kaydadeğer bir önem arz eden intronik bölgelerin de incelenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasının kapsamı WES ve WES analizidir. Sıradaki çalışmanın kapsamı ise intronik tekrarlayan bölgelerinin analizi olacaktır. Bu tez çalışması ve devamı niteliğinde olacak intronik bölgeleri incelemeyi amaçlayan bu çalışmalar, birlikte bir bütün oluşturarak FAME gibi çok nadir bir epilepsiden etkilenmiş 3 kardeşin genomundaki hem ekzonik hem de intronik varyasyonları incelemiş olacaktır.

KAYNAKLAR

“CSF1R Gene: MedlinePlus Genetics.” n.d. Accessed August 24, 2022.
<https://medlineplus.gov/genetics/gene/csf1r/>.

“CSF1R-OMIM.” n.d. Accessed August 23, 2022.
<https://omim.org/entry/164770?search=CSF1R&highlight=csf1r>.

“DNA Dizileme Yöntemleri.” n.d. Accessed August 23, 2022.
<http://biyoinformatikdunyasi.blogspot.com/2019/04/dna-dizileme-yontemleri.html>.

“ENST00000251582.12 (ADAMTS2-201) - Protein Summary - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000087116;r=5:179110853-179345461;t=ENST00000251582.

“ENST00000272852.4-Protein Summary-Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000144410;r=2:206939518-206969474;t=ENST00000272852.

“ENST00000274811.9 (RNF44-201) - Protein Summary - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000146083;r=5:176526712-176537402;t=ENST00000274811.

“ENST00000391967.7-Protein Summary-Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000159166;r=1:201380833-201399324;t=ENST00000391967.

“Familial Adult Myoclonic Epilepsy (FAME)/ILAE.” n.d. Accessed September 1, 2022. <https://www.ilae.org/congresses/1st-workshop-on-familial-adult-myoclonic-epilepsy-fame>.

“Gyrifikasyon.” n.d. Accessed August 23, 2022. <https://stringfixer.com/tr/Gyrification>.

“Klinik Nörojenetik.” n.d. Accessed August 22, 2022. <http://www.itfnoroloji.org/norogenetik/norogenetik.htm>

“LAD1 - OMIM.” n.d. Accessed August 24, 2022. <https://omim.org/entry/602314?search=LAD1&highlight=lad1>.

“rs114764573 (SNP) - Population Genetics - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=5:176529260-176530260;v=rs114764573;vdb=variation;vf=193970798.

“rs1462106311 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:206959192-206960192;v=rs1462106311;vdb=variation;vf=708100356.

“rs200727328 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:201386403-201387403;v=rs200727328;vdb=variation;vf=37507584.

“rs202004044 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 23, 2022. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000153253;r=2:165087526-165204050;t=ENST00000283254;v=rs202004044;vdb=variation;vf=287105201.

“rs41355444 (SNP) - Population Genetics .” n.d. Accessed August 23, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=5:150056867-150057867;v=rs41355444;vdb=variation;vf=170721629.

“rs763905470 (SNP) - Population Genetics - Homo_sapiens - Ensembl Genome Browser 107.” n.d. Accessed August 24, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=5:179272551-179273551;v=rs763905470;vdb=variation;vf=315081331.

“SCN3A - OMIM.” n.d. Accessed August 23, 2022.
<https://omim.org/entry/182391?search=SCN3A&highlight=scn3a>.

“SLC6A19 - OMIM.” n.d. Accessed August 23, 2022.
<https://omim.org/entry/608893?search=SLC6A19&highlight=slc6a19>.

“Sodium Channel - Wikipedia.” n.d. Accessed August 23, 2022.
https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_channel#Alpha_subunits.

Aksöz, E. (2018). Nöroinflamasyonun Epileptogenezdeki Rolü ve Antiepileptojenik Tedavide Nöroinflamasyona Yönelik Hedefler. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 9(2), 130-135.

Aroniadou-Anderjaska, V., Fritsch, B., Qashu, F., & Braga, M. F. (2008). Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy research*, 78(2-3), 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.11.011>

Avanzini, G., Franceschetti, S., & Mantegazza, M. (2007). Epileptogenic channelopathies: experimental models of human pathologies. *Epilepsia*, 48 Suppl 2, 51–64. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01067.x>

Aydin Özemir, Z., Oğuz Akarsu, E., Matur, Z., Öge, A. E., & Baykan, B. (2016). Autosomal Dominant Cortical Tremor, Myoclonus, and Epilepsy Syndrome

mimicking Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Noro psikiyatri arsivi*, 53(3), 272–275.
<https://doi.org/10.5152/npa.2016.14841>

Bambal G.(2011).Epilepsi Oluşum Mekanizmaları. *Konuralp Tıp Dergisi*, 3(3), 42-45

Baykan B, Gürses C, & Gökyiğit A. (2004). *Nöroloji*. Ed: Öge EA, Epilepsi, 2.Basım, 279-308, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

Bebek N., Şirin G., İşeri S.U. (2021). Epilepsiye Genetik Açıdan Bakış. İçinde İ. Öztura, G. Kutlu, İ. Tezer, K. Ağan, Ö. Çokar (Ed.) *Epilepsi Tanı ve Tedavi Rehberi*. Türk Nöroloji Derneği Yayınları; 35-44.

Bennett, M. F., Oliver, K. L., Regan, B. M., Bellows, S. T., Schneider, A. L., Rafehi, H., Sikta, N., Crompton, D. E., Coleman, M., Hildebrand, M. S., Corbett, M. A., Kroes, T., Gecz, J., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., & Bahlo, M. (2020). Familial adult myoclonic epilepsy type 1 SAMD12 TTTCA repeat expansion arose 17,000 years ago and is present in Sri Lankan and Indian families. *European journal of human genetics: EJHG*, 28(7), 973–978. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0606-z>

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., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P., & Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x>

Berkovic, S. F., Howell, R. A., Hay, D. A., & Hopper, J. L. (1998). Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Annals of neurology*, 43(4), 435–445. <https://doi.org/10.1002/ana.410430405>

Bertram E. (2007). The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*, 48 Suppl 2, 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01068.x>

Binder, D. K., Rajneesh, K. F., Lee, D. J., & Reynolds, E. H. (2011). Robert Bentley Todd's contribution to cell theory and the neuron doctrine. *Journal of the history of the neurosciences*, 20(2), 123–134. <https://doi.org/10.1080/0964704X.2010.496611>

Bröer, A., Juelich, T., Vanslambrouck, J. M., Tietze, N., Solomon, P. S., Holst, J., Bailey, C. G., Rasko, J. E., & Bröer, S. (2011). Impaired nutrient signaling and body weight control in a Na⁺ neutral amino acid cotransporter (Slc6a19)-deficient mouse. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), 26638–26651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241323>

Carvill, G. L., McMahon, J. M., Schneider, A., Zemel, M., Myers, C. T., Saykally, J., Nguyen, J., Robbiano, A., Zara, F., Specchio, N., Mecarelli, O., Smith, R. L., Leventer, R. J., Møller, R. S., Nikanorova, M., Dimova, P., Jordanova, A., Petrou, S., EuroEPINOMICS Rare Epilepsy Syndrome Myoclonic-Astatic Epilepsy & Dravet working group, Helbig, I., ... Mefford, H. C. (2015). Mutations in the GABA Transporter SLC6A1 Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures. *American journal of human genetics*, 96(5), 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.02.016>

Classification and Definition of Epilepsy Syndromes // International League Against Epilepsy, (n.d.). <https://www.ilae.org/guidelines/definition-and-classification/classification-and-definition-of-epilepsy-syndromes> (accessed August 22, 2022).

Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapière, C. M., & Nusgens, B. (2005). Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *The Journal of biological chemistry*, 280(41), 34397–34408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506458200>

Conboy, K., Henshall, D. C., & Brennan, G. P. (2021). Epigenetic principles underlying epileptogenesis and epilepsy syndromes. *Neurobiology of disease*, 148, 105179. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105179>

Crompton, D. E., Sadleir, L. G., Bromhead, C. J., Bahlo, M., Bellows, S. T., Arsov, T., Harty, R., Lawrence, K. M., Dunne, J. W., Berkovic, S. F., & Scheffer, I. E. (2012). Familial adult myoclonic epilepsy: recognition of mild phenotypes and refinement of the 2q locus. *Archives of neurology*, 69(4), 474–481. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.584>

Dibbens, L. M., Harkin, L. A., Richards, M., Hodgson, B. L., Clarke, A. L., Petrou, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., & Mulley, J. C. (2009). The role of neuronal GABA(A) receptor subunit mutations in idiopathic generalized epilepsies. *Neuroscience letters*, 453(3), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.038>

Elia, M., Musumeci, S. A., Ferri, R., Scuderi, C., Del Gracco, S., Bottitta, M., Michelucci, R., & Tassinari, C. A. (1998). Familial cortical tremor, epilepsy, and mental retardation: a distinct clinical entity?. *Archives of neurology*, 55(12), 1569–1573. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.12.1569>

Ellis, C. A., Petrovski, S., & Berkovic, S. F. (2020). Epilepsy genetics: clinical impacts and biological insights. *The Lancet. Neurology*, 19(1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30269-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30269-8)

Epi25 Collaborative. Electronic address: s.berkovic@unimelb.edu.au, & Epi25 Collaborative (2019). Ultra-Rare Genetic Variation in the Epilepsies: A Whole-Exome Sequencing Study of 17,606 Individuals. *American journal of human genetics*, 105(2), 267–282. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.05.020>

Epi4K consortium, & Epilepsy Phenome/Genome Project (2017). Ultra-rare genetic variation in common epilepsies: a case-control sequencing study. *The Lancet. Neurology*, 16(2), 135–143. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30359-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30359-3)

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr, Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>

Florian, R. T., Kraft, F., Leitão, E., Kaya, S., Klebe, S., Magnin, E., van Rootselaar, A. F., Buratti, J., Kühnel, T., Schröder, C., Giesselmann, S., Tschernoster, N., Altmueller, J., Lamiral, A., Keren, B., Nava, C., Bouteiller, D., Forlani, S., Jornea, L., Kubica, R., ... Depienne, C. (2019). Unstable TTTTA/TTTCA expansions in MARCH6 are associated with Familial Adult Myoclonic Epilepsy type 3. *Nature communications*, 10(1), 4919. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12763-9>

Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M. F., Shelton, J., Richardson, J. A., Stockinger, W., Nimpf, J., & Herz, J. (2000). Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *The Journal of biological chemistry*, 275(33), 25616–25624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000955200>

Hebbar, M., & Mefford, H. C. (2020). Recent advances in epilepsy genomics and genetic testing. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-185. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21366.1>

Helbig, I., Heinzen, E. L., Mefford, H. C., & ILAE Genetics Commission (2016). Primer Part 1-The building blocks of epilepsy genetics. *Epilepsia*, 57(6), 861–868. <https://doi.org/10.1111/epi.13381>

Helbig, I., Heinzen, E. L., Mefford, H. C., & International League Against Epilepsy Genetics Commission (2018). Genetic literacy series: Primer part 2-Paradigm shifts in epilepsy genetics. *Epilepsia*, 59(6), 1138–1147. <https://doi.org/10.1111/epi.14193>

Hirsch, E., French, J., Scheffer, I. E., Bogacz, A., Alsaadi, T., Sperling, M. R., Abdulla, F., Zuberi, S. M., Trinka, E., Specchio, N., Somerville, E., Samia, P., Riney, K., Nabbout, R., Jain, S., Wilmshurst, J. M., Auvin, S., Wiebe, S., Perucca, E., Moshé, S. L., ... Wirrell, E. C. (2022). ILAE definition of the Idiopathic Generalized Epilepsy Syndromes: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*, 63(6), 1475–1499. <https://doi.org/10.1111/epi.17236>

Holland, K. D., Kearney, J. A., Glauser, T. A., Buck, G., Keddache, M., Blankston, J. R., Glaaser, I. W., Kass, R. S., & Meisler, M. H. (2008). Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. *Neuroscience letters*, 433(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.064>

Hunt-Jones, C. A. (2015). Mutation analysis of GABAergic neuroinhibitory genes in childhood genetic generalised epilepsies.

Ikeda, A., Kakigi, R., Funai, N., Neshige, R., Kuroda, Y., & Shibasaki, H. (1990). Cortical tremor: a variant of cortical reflex myoclonus. *Neurology*, 40(10), 1561–1565. <https://doi.org/10.1212/wnl.40.10.1561>

International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. Electronic address: epilepsy-austin@unimelb.edu.au (2014). Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet. Neurology*, 13(9), 893–903. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70171-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70171-1)

Ishiura, H., & Tsuji, S. (2020). Advances in repeat expansion diseases and a new concept of repeat motif-phenotype correlation. *Current opinion in genetics & development*, 65, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.05.029>

Kaculini, C. M., Tate-Looney, A. J., & Seifi, A. (2021). The History of Epilepsy: From Ancient Mystery to Modern Misconception. *Cureus*, 13(3), e13953. <https://doi.org/10.7759/cureus.13953>

Kang, J. Q., & Macdonald, R. L. (2009). Making sense of nonsense GABA(A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends in molecular medicine*, 15(9), 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.07.003>

Koch L. (2021). The power of large-scale exome sequencing. *Nature reviews. Genetics*, 22(9), 549. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00397-x>

Labat, R. (1951). *Traité akkadien de diagnostics et pronostics médicaux*. Paris: Académie internationale d'histoire de sciences.

Lagorio, I., Zara, F., Striano, S., & Striano, P. (2019). Familial adult myoclonic epilepsy: A new expansion repeats disorder. *Seizure*, 67, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.03.009>

Lai, C. W., & Lai, Y. H. (1991). History of epilepsy in Chinese traditional medicine. *Epilepsia*, 32(3), 299–302. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1991.tb04655.x>

Lamar, T., Vanoye, C. G., Calhoun, J., Wong, J. C., Dutton, S., Jorge, B. S., Velinov, M., Escayg, A., & Kearney, J. A. (2017). SCN3A deficiency associated with increased seizure susceptibility. *Neurobiology of disease*, 102, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.02.006>

Lehesjoki, A. E., Koskiniemi, M., Sistonen, P., Miao, J., Hästbacka, J., Norio, R., & de la Chapelle, A. (1991). Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3696–3699. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3696>

Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., & Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & behavior : E&B*, 17(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.10.023>

Mantegazza, M., Rusconi, R., Scalmani, P., Avanzini, G., & Franceschetti, S. (2010). Epileptogenic ion channel mutations: from bedside to bench and, hopefully,

back again. *Epilepsy research*, 92(1), 1–29.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.08.003>

Maradei-Anaya, S. J., Espinosa, E., Izquierdo, Á., & Velasco-Parra, H. M. (2013). Detección de rearreglos subteloméricos por MLPA en pacientes pediátricos con epilepsia refractaria en Colombia: papel del gen CHL1 en la farmacoresistencia [Detection of subtelomeric rearrangements due to MLPA in paediatric patients with refractory epilepsy in Colombia: the role of the CHL1 gene in pharmacoresistance]. *Revista de neurologia*, 57(10), 444–450.

Mattison, K. A., Butler, K. M., Inglis, G., Dayan, O., Boussidan, H., Bhambhani, V., Philbrook, B., da Silva, C., Alexander, J. J., Kanner, B. I., & Escayg, A. (2018). SLC6A1 variants identified in epilepsy patients reduce γ -aminobutyric acid transport. *Epilepsia*, 59(9), e135–e141. <https://doi.org/10.1111/epi.14531>

May, P., Girard, S., Harrer, M., Bobbili, D. R., Schubert, J., Wolking, S., Becker, F., Lachance-Touchette, P., Meloche, C., Gravel, M., Niturad, C. E., Knaus, J., De Kovel, C., Toliat, M., Polvi, A., Iacomino, M., Guerrero-López, R., Baulac, S., Marini, C., Thiele, H., ... EpiPGX Consortium (2018). Rare coding variants in genes encoding GABAA receptors in genetic generalised epilepsies: an exome-based case-control study. *The Lancet. Neurology*, 17(8), 699–708. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30215-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30215-1)

Menzler, K., Hermsen, A., Balkenhol, K., Duddek, C., Bugiel, H., Bauer, S., Schorge, S., Reif, P. S., Klein, K. M., Haag, A., Oertel, W. H., Hamer, H. M., Knake, S., Trucks, H., Sander, T., Rosenow, F., & EPICURE-Consortium (2014). A common SCN1A splice-site polymorphism modifies the effect of carbamazepine on cortical excitability--a pharmacogenetic transcranial magnetic stimulation study. *Epilepsia*, 55(2), 362–369. <https://doi.org/10.1111/epi.12515>

Mercimek-Mahmutoglu, S., Connolly, M. B., Poskitt, K. J., Horvath, G. A., Lowry, N., Salomons, G. S., Casey, B., Sinclair, G., Davis, C., Jakobs, C., & Stockler-Ipsiroglu, S. (2010). Treatment of intractable epilepsy in a female with SLC6A8

deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 101(4), 409–412.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.016>

Minardi, R., Licchetta, L., Baroni, M. C., Pippucci, T., Stipa, C., Mostacci, B., Severi, G., Toni, F., Bergonzini, L., Carelli, V., Seri, M., Tinuper, P., & Bisulli, F. (2020). Whole-exome sequencing in adult patients with developmental and epileptic encephalopathy: It is never too late. *Clinical genetics*, 98(5), 477–485.
<https://doi.org/10.1111/cge.13823>

Motoki, K., Megahed, M., LaForgia, S., & Uitto, J. (1997). Cloning and chromosomal mapping of mouse laminin, a novel basement membrane zone component. *Genomics*, 39(3), 323–330. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4507>

Mulley, J. C., & Mefford, H. C. (2011). Epilepsy and the new cytogenetics. *Epilepsia*, 52(3), 423–432. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02932.x>

Myers, C. T., & Mefford, H. C. (2015). Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome medicine*, 7(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0214-7>

Myers, C. T., & Mefford, H. C. (2016). Genetic investigations of the epileptic encephalopathies: Recent advances. *Progress in brain research*, 226, 35–60.
<https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.006>

Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K. I., Hirosawa, M., & Ohara, O. (2000). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 7(1), 65–73. <https://doi.org/10.1093/dnares/7.1.65>

Niestroj, L. M., Perez-Palma, E., Howrigan, D. P., Zhou, Y., Cheng, F., Saarentaus, E., Nürnberg, P., Stevelink, R., Daly, M. J., Palotie, A., Lal, D., & Epi25 Collaborative (2020). Epilepsy subtype-specific copy number burden observed in a

genome-wide study of 17 458 subjects. *Brain : a journal of neurology*, 143(7), 2106–2118. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa171>

Perucca, P., & Perucca, E. (2019). Identifying mutations in epilepsy genes: Impact on treatment selection. *Epilepsy research*, 152, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.03.001>

Perucca, P., Bahlo, M., & Berkovic, S. F. (2020). The Genetics of Epilepsy. *Annual review of genomics and human genetics*, 21, 205–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120219-074937>

Peters, L., Depienne, C. & Klebe, S. (2021). Familial adult myoclonic epilepsy (FAME): clinical features, molecular characteristics, pathophysiological aspects and diagnostic work-up. *Medizinische Genetik*, 33(4), 311-318. <https://doi.org/10.1515/medgen-2021-2100>

Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2009). Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*, 14 Suppl 1, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.09.023>

Povysil, G., Petrovski, S., Hostyk, J., Aggarwal, V., Allen, A. S., & Goldstein, D. B. (2019). Rare-variant collapsing analyses for complex traits: guidelines and applications. *Nature reviews. Genetics*, 20(12), 747–759. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0177-4>

Prasad, A. N., Prasad, C., & Stafstrom, C. E. (1999). Recent advances in the genetics of epilepsy: insights from human and animal studies. *Epilepsia*, 40(10), 1329–1352. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb02004.x>

Şahin, E, & Bebek, N. (2017). “Epilepside Genetik.” *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 10 (1): 11–16.

Saka, E., & Saygi, S. (2000). Familial adult onset myoclonic epilepsy associated with migraine. *Seizure*, 9(5), 344–346. <https://doi.org/10.1053/seiz.2000.0402>

Sánchez-Carpintero Abad, R., Sanmartí Vilaplana, F. X., & Serratosa Fernandez, J. M. (2007). Genetic Causes of Epilepsy. *The Neurologist*, 13(6), 47-51. doi: 10.1097/NRL.0b013e31815bb07d

Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>

Sorge, G., & Sorge, A. (2010). Epilepsy and chromosomal abnormalities. *Italian journal of pediatrics*, 36, 36. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-36-36>

Striano, P., & Zara, F. (2016). Autosomal dominant cortical tremor, myoclonus and epilepsy. *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape*, 18(S2), 139–144. <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0860>

Todd R. B. (2005). The Lumleian Lectures for 1849. On the pathology and treatment of convulsive diseases. *Epilepsia*, 46(7), 995–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.10205.x>

van den Ende, T., Sharifi, S., van der Salm, S., & van Rootselaar, A. F. (2018). Familial Cortical Myoclonic Tremor and Epilepsy, an Enigmatic Disorder: From Phenotypes to Pathophysiology and Genetics. A Systematic Review. *Tremor and other hyperkinetic movements* (New York, N.Y.), 8, 503. <https://doi.org/10.7916/D85155WJ>

Vanoye, C. G., Gurnett, C. A., Holland, K. D., George, A. L., Jr, & Kearney, J. A. (2014). Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiology of disease*, 62, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.015>

Walker, L. E., Mirza, N., Yip, V., Marson, A. G., & Pirmohamed, M. (2015). Personalized medicine approaches in epilepsy. *Journal of internal medicine*, 277(2), 218–234. <https://doi.org/10.1111/joim.12322>

Wallace R. (2002). Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. *Lancet Neurology* 1(4):212.

What Is Epilepsy? | Epilepsy Foundation, (n.d.). <https://www.epilepsy.com/what-is-epilepsy> (accessed August 22, 2022).

WHO, Epilepsy, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy> (accessed August 22, 2022).

Zaman, T., Helbig, I., Božović, I. B., DeBrosse, S. D., Bergqvist, A. C., Wallis, K., Medne, L., Maver, A., Peterlin, B., Helbig, K. L., Zhang, X., & Goldberg, E. M. (2018). Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. *Annals of neurology*, 83(4), 703–717. <https://doi.org/10.1002/ana.25188>

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TÜM GENOM YAKLAŞIMLARIYLA EPİLEPSİ GENLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNAL RAPORU

% 10	% 9	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	www.medigenome.ch İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	Www.Noroloji.Org.Tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.questdiagnostics.com.mx İnternet Kaynağı	<% 1
7	Abdullah Uzumcu, Sukru Candan, Guven Toksoy, Z. Oya Uyguner et al. "Mutational screening of BASP1 and transcribed processed pseudogene TPΨg-BASP1 in patients with Möbius syndrome", Journal of Genetics and Genomics, 2009	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

