

CEMRE ÖRNEK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GLUT1 EKSİKLİĞİ SENDROMUNDA GENETİK
ANALİZLER**

CEMRE ÖRNEK

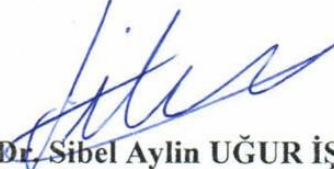
**DANIŞMAN
DOÇ.DR. SİBEL AYLİN UĞUR İŞERİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

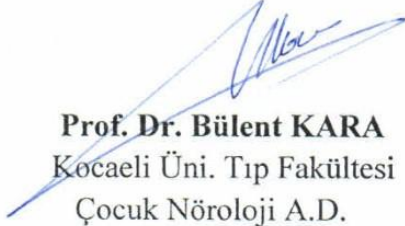
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Cemre ÖRNEK tarafından Doç. Dr. Sibel Aylin UĞUR İŞERİ'nin danışmanlığında hazırlanan “**GLUT1 Eksikliği Sendromunda Genetik Analizler**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11.07.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Sibel Aylin UĞUR İŞERİ

İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK

İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Prof. Dr. Bülent KARA

Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi
Çocuk Nöroloji A.D.

BEYAN

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

Cemre ÖRNEK



ÍTHAF

AÍLEME..

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim döneminde ve tez çalışmamda sağladığı imkanlar, gösterdiği ilgi, alaka ve sabır için, bilgi ve deneyimleri ile katkısını esirgemeyerek bana her zaman örnek olan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sibel Aylin Uğur İşeri'ye,

Her zaman desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım değerli çalışma arkadaşım Uzm. Bio. Fatma Yeşim Kesim'e,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, Dr. Özkan Özdemir'e, Biyolog Garen Hayranyan'a, Moleküler Biyolog Barış Salman'a ve Sevcan Mercan'a.

Eğitimimde bana her türlü desteği veren, bana inanan ve beni bu günlere getiren değerli aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26212

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN	İİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET.....	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. GLUT1 Eksikliği Sendromu (GLUT1-ES).....	2
2.1.1. Klinik Fenotipleri.....	3
2.1.2. SLC2A1 Geni	3
2.1.3. Kalıtım Şekli.....	4
2.2. Paroksimal Hareket Bozukluğu	4
2.2.1. PRRT2 Geni.....	5
2.3. Tek Nükleotid Değişiklikleri (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)	7
2.4. Kopya Sayısı Değişiklikleri (Copy Number Variations, CNV's)	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. GEREÇ.....	10
3.1.1. Çalışma Kapsamında Oluşturulan Hasta Grubu	10
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	10
3.2. YÖNTEM.....	14
3.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	14
3.2.2. Primer Dizaynı ve Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar.....	20
3.2.3. Touchdown PZR ile Genomik DNA Amplifikasyonu.....	25
3.2.4. Sanger Dizilemesi ve Sonuçların <i>in siliko</i> Analizi	28
3.2.5. SNP Array Yöntemi ile <i>de novo</i> Varyantların Konfirmasyonu.....	30

3.2.6. Gradient PZR Yöntemi ile Optimal Primer Dizisi, Konsantrasyonu ve Primer Bağlanma Sıcaklıklarının Tespiti	34
3.2.7. Kantitatif Eş-Zamanlı PZR (q-RT PZR) ile CNV Tespiti.....	35
4. BULGULAR.....	42
4.1. Sanger Dizi Analizi Sonucu Tespit Edilen Varyasyonlar	42
4.1.1. c.680-1G>T.....	46
4.1.2. c.542delG.....	48
4.1.3. c.399C>T	50
4.1.4. c.588G>A	52
4.1.5. c.45C>T	54
4.1.6. c.-197A>C	55
4.1.7. c.312C>T	56
4.1.8. c.384C>T	58
4.2. SNP Array Sonuçları	59
4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q RT PZR)	61
Sonuçları	61
4.3.1. X-XX Kantitasyon Analizi Sonuçları	61
4.3.2. Gradient PZR Sonuçları	62
4.3.3. PZR Verimi Hesap Sonuçları	65
4.3.4. Hasta Bireylerin q RT PZR Analiz Sonuçları	69
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	80
FORMLAR	85
ETİK KURUL KARARI	93
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	96
ÖZGEÇMİŞ	97

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3-1: Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kitler, kullanım alanları ve sağlayıcı firmaları.....	10
Tablo 3-2: Bu tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve sağlayıcı firmaları	11
Tablo 3-3. Bu tez kapsamında kullanılan biyoinformatik veritabanları ve analiz programları.....	12
Tablo 3-4: QIAamp DNA Blood Midi Kit içeriği ve hacimleri	14
Tablo 3-5: QIAamp DNA Blood Maxi Kit içeriği ve hacimleri.	17
Tablo 3-6. <i>PRRT2</i> gen analizi için tasarlanan primer çifti ve baz dizisi	20
Tablo 3-7: <i>SLC2A1</i> geninin ekzonik bölgeleri için dizayn edilen fragmanların uzunlukları , GC kontentleri ve kapsadıkları bölgeler	21
Tablo 3-8: Touch-down pcr mix reaktifleri ve konsantrasyonları	26
Tablo 3-9: Touch-down pcr protokolü	26
Tablo 3-10: Gradient PCR hazırlık aşamasında bir reaksiyonluk reaktifler ve miktarları.....	34
Tablo 3-11: Primer bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için uygulanan gradient pcr protokolü.....	35
Tablo 3-12: qRT-PCR içeriği ve konsantrasyonları.....	38
Tablo 3-13: qRT-PCR protokolü.....	38
Tablo 4-1. Sanger dizileme analizi sonucunda bulunan varyantlar ve bilgileri.....	43
Tablo 4-2: Annenin AA , babanın BB ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1 üzerindeki 7914 tek nükleotid değişimi varyantının ilk 10 tanesinin gösterilmesi.	59
Tablo 4-3: Annenin BB , babanın AA ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1 üzerindeki 8148 tek nükleotid değişimi varyantının ilk 10 tanesinin gösterilmesi.	59
Tablo 4-4: Anne (AA), baba (BB) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması	60
Tablo 4-5: Anne (BB), baba (AA) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması	61
Tablo 4-6: q RT PCR Fr 6 ve 7 için yeniden tasarlanan primer çiftleri	63
Tablo 4-7: q RT PCR ile çoğaltılan fragman bölgeleri	64
Tablo 4-8: Gradient pcr ile belirlenen optimum primer konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıkları.....	64
Tablo 4-9: Referans gen için q RT PCR da farklı DNA konsantrasyonlarındaki Ct değerleri.....	65

Tablo 4-10: Fragman-8 için q RT PZR da farklı DNA konsantrasyonlarındaki Ct değerleri.....	66
Tablo 4-11: Her bir fragman için yüzde hesabıyla referans ve hedef gen pqr verimleri	68
Tablo 5-1: Çalışılan hastalar ve bilgileri	75



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Beyin içine glikoz girişi (5)	2
Şekil 2-2. GLUT1-ES Klinik Fenotipleri (6).....	3
Şekil 2-3. <i>SLC2A1</i> geninin ENSEMBL veritabanı görüntüsü (8)	4
Şekil 2-4. <i>PRRT2</i> proteininin yapısı (13)	6
Şekil 2-5. <i>PRRT2</i> geninin ENSEMBL veritabanı görüntüsü (8)	7
Şekil 3-1. Fragman-1 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	21
Şekil 3-2. Fragman-2 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	22
Şekil 3-3. Fragman-3 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	22
Şekil 3-4 Fragman-4 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	23
Şekil 3-5. Fragman-5 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	23
Şekil 3-6. Fragman-6 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	24
Şekil 3-7. Fragman-7 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	24
Şekil 3-8. Fragman-8 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	24
Şekil 3-9. Fragman-9 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	25
Şekil 3-10. Fragman-10 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü	25
Şekil 3-11. TD pır sonrası oluşan örnek pcr ürünlerinin agaroz jelde konfirmasyonu	27
Şekil 3-12. 50 baz çiftlik (bp) DNA ladder (DNA merdiveni)	27
Şekil 3-13. Sanger dizileme aşamaları	29
Şekil 3-14. Referans dizisi ve örnek DNA dizisinin Sanger sonucunun CLC main workbench üzerinde karşılaştırmalı analizi	30
Şekil 3-15. Bu çalışmada genotipleme amacıyla filtrelenen SNP Array verisi (Anne:AA, Baba:BB, Çocuk:AB - Anne:BB, Baba:AA, Çocuk:AB olduğu durumlar)	32
Şekil 3-16. Illumina HumanCytoSNP-12 BeadChip görseli (33).....	32
Şekil 3-17. Sinyal yoğunluğu (norm R) ve Allel Frekansı (Norm Theta) (35)	33
Şekil 3-18. Normalleştirilmiş ve özetlenmiş alel yoğunlukları (35)	34
Şekil 3-19. SYBR Green boyasının bağlanması ve çalışma prensibi (36)	37
Şekil 4-1. 11-169 kodlu hastanın fr-5 de bulunan novel varyantının CLC görüntüsü.	46
Şekil 4-2. 11-169 kodlu hastanın aile pedigrisi	47
Şekil 4-3. 11-169 kodlu hastanın intron 5 bölgesindeki novel varyantın Human Splicing Finder (HSF) veritabanı fenotip tahmini	47

Şekil 4-4. 11-169 kodlu hastanın intron 5 bölgesindeki varyantın Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini ve novel olduğunun gösterimi	48
Şekil 4-5. 13-83 kodlu hastanın fr-5 de bulunan novel varyantının CLC görüntüsü ...	49
Şekil 4-6. 13-83 kodlu hastanın aile pedigrisi	49
Şekil 4-7 13-83 kodlu hastanın intron 5 bölgesindeki novel varyantın PolyPhen veritabanı fenotip tahmini.....	50
Şekil 4-8. rs11537641 numaralı fragman 4 de bulunan varyantının CLC görüntüsü .	50
Şekil 4-9. rs11537641 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini.....	51
Şekil 4-10. rs11537641 numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini.....	51
Şekil 4-11. rs2229682 numaralı fragman 5 de bulunan varyantının CLC görüntüsü ..	52
Şekil 4-12. rs2229682 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini.....	53
Şekil 4-13. rs2229682 numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini.....	53
Şekil 4-14. rs1385129 numaralı fragman 2 de bulunan varyantının CLC görüntüsü .	54
Şekil 4-15. rs1385129 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini.....	55
Şekil 4-16. . rs1385129 numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini.....	55
Şekil 4-17. rs11537640 numaralı fragman 1’de bulunan varyantının CLC görüntüsü	56
Şekil 4-18. rs11537640 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini.....	56
Şekil 4-19. rs76672402 kodlu Fragman 3’de bulunan varyantın CLC görüntüsü	57
Şekil 4-20. . rs755559487 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini.....	57
Şekil 4-21. rs755559487 kodlu fragman 4 de bulunan varyantın CLC görüntüsü	58
Şekil 4-22. rs755559487 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini.....	58
Şekil 4-23. rs755559487 numaralı varyantının VEP veritabanı görüntüsü ve fenotip tahmini.....	59
Şekil 4-24. 3 erkek ve 3 kadın sağlıklı kontrollerin birbirleri ile karşılaştırmalı 3’lü tekrarlar halindeki X-XX kantitasyon ve kat farkı değişimleri	62
Şekil 4-25. Fragman-5 için sağlıklı kontrol örneği ile yapılan gradient pqr sonuçlarının agaroz jel görüntüsü	63

Şekil 4-26. Referans genin orta ve ortalama değ�erleri ile oluşturulan grafik ve verim hesaplaması	66
Şekil 4-27. Hedef genin Fr8 bölgesinin orta ve ortalama değ�erleri ile oluşturulan grafik ve verim hesaplaması	67
Şekil 4-28. 15-16 kodlu hastaya ait fragman 2-10 katsayı değ�işimlerinin grafiği	69
Şekil 4-29. Sağlıklı kontroller ile hasta bireylerin , her biri farklı bir renk ile temsil edilen referans gen ve fragman 2-3-4-5-6-7-8-9-10 bölgeleri için q RT PR sonuçlarının grafiği ve standart sapmaları	71
Şekil 5-1. Kan-beyin bariyeri boyunca besin taşıma (51)	76
Şekil 5-2. Nöronlarda ve astrositlerde glukoz kullanımının metabolik yolları (51)	78



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

GLUT1ES: GLUT1 Eksikliği Sendromu

SLC2A1: Solute Carrier Family 2A1

PRRT2: Proline Rich Transmembrane Protein 2

QRT-PCR: Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SNP: Single Nücleotide Polymorphism

CNV: Copy Number Variation

SNP Array: Single Nücleotide Polymorphism Array

arrayCGH : array Comparative Genomic Hibridization

MLPA : Multipl Ligation Prob Analysis

TD-PCR: Touchdown Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ACMG : American College and Medical Genetics

Fr: Fragman

Ekz: Ekzon

İnt : İtron

OMIM : Online Mendelian Inheritance Man

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

HSF : Human Splice Finder

MutTaster: Mutation Taster

PROVEAN: Protein Variation Effect Analyzer

SIFT: Scale-invariant Feature Transform

VEP: Variant Effect Predictor

VCF: Variant Call Frequency

KBB: Kan Beyin Bariyeri

PKD: Paroxymal Kinetic Disorders

BFIC: Benign Familial Infantile Convulsions

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribo Nükleik Asit

LCR: Low Copy Repeat

BAF: B Allele Frequency

LOH: Loss Of Heterozygosity

LRR: Low Repeat Ratio

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

AL: Lysis Buffer

AW: Wash Buffer

AE: Eluation Buffer

Tm: Temperature Melting

Ct: Cycle Threshold

GC: Guanin Cytosine

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

PCBP3: Poly(rC)-binding protein 3

MAF: Minor Allele Frequency

F6P:Fructose-6-Phosphate

PKF1: Phosphofructokinase 1

F16P:früktoz-1,6-difosfat

G3P: gliseraldehyd-3-fosfat

Mit: mitokondri

PEP: Phosphoenolpyruvat

PKM1: Pyruvate kinase M1

PKM2: Pyruvate kinase M2

G1P: Glycose-1-Phosphate

GP: glikojen fosforilaz

APC / C-Cdh1: anafaz destekleyici kompleks C / sitoz-Cdh1

MCT: monokarboksilik asit taşıyıcı

LCR: Low Copy Repeat



ÖZET

Örnek, C. (2018). GLUT-1 Eksikliği Sendromunda Genetik Analizlerin araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

GLUT1 eksikliği sendromu (GLUT-1ES) bebeklik çağında başlayan metabolik bir ensefalopati olarak tanımlanmıştır. GLUT1 eksikliği sendromu, kolaylaştırılmış bir glikoz taşıyıcısı olan GLUT1'i kodlayan *SLC2A1* genindeki patojenik varyasyonlardan kaynaklanır. Çalışmanın amacı, gen anlatımının sağlandığı bölgelerde tek nükleotid ve kopya sayısı değişimlerinin varlığının tespit edilmesidir. Bu çalışma kapsamında, 12 GLUT1 ES hastada 10 ekzonun tamamı Sanger dizileme methodu ile taranmıştır. Bu yöntemle bilinen ve bilinmeyen (novel) *de novo* değişimler tespit edilmiş, sonuçlar çeşitli biyoinformatik araçlarla *in-siliko* analiz edilmiştir, fenotip-genotip korelasyonları çıkartılmıştır. Sanger dizileme yöntemiyle analiz edilen GLUT1 eksikliği sendromuna sahip 7 hastada, 8 farklı varyant saptanmıştır. Bunlardan 2 tanesi novel ve *de novo* varyant olup, diğer 6 tanesi bilinen varyantlardır. Varyantların biri kırılma varyantı, diğeri çerçeve kayması varyanttır, fenotip etkileri *in-siliko* araçlar aracılığıyla patojenik olarak değerlendirilmiştir. 2015 yılında yayınlanan ACMG Standartları Klavuzuna göre, *de novo* olduğu düşünülen varyantlara sahip bireylerin aile bireyleriyle kan bağlarının olduğunun konfirmasyonu için, 2 hasta ve ailesinin SNP Array analizi yapılmıştır. Sanger sonuçlarında herhangi bir varyasyon tespit edilemeyen 7 hastada kantitatif gerçek zamanlı pcr işlemiyle kopya sayısı değişiklikleri incelenmiştir. İleri moleküler çalışma olan kantitatif gerçek zamanlı PZR sonuçlarında ise, tek hastada anlamlı derecede genomik kopya sayısı farklılığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın hedefi GLUT1 eksikliği sendromu mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olmak, gen düzeyindeki olası değişimlerin klinik açıdan tanı ve tespitinin belirlenebilmesine katkı sağlamak ve hastalığın doğru teşhisini kolaylaştırmaktır. Bu sayede nadir nörolojik hastalıkların ayırıcı tanısında-tedavisinde kullanılabilecek yeni bir belirtecin ortaya çıkması, hastalıkla ilişkili mekanizmaların olabildiğince aydınlatılması, olası tedavi seçeneklerinin de geliştirilmesi ve erken teşhis adına önemli bir basamak olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : GLUT1 Eksikliği Sendromu, *SLC2A1*, varyasyon, novel, *de novo*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26212



ABSTRACT

Ornek, C. (2018). Genetic Analysis in GLUT Deficiency Syndrome. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. Istanbul.

GLUT1 deficiency syndrome (GLUT1-DS) is defined as a metabolic encephalopathy . GLUT1DS is usually caused by pathogenic variations in the *SLC2A1* gene encoding GLUT1, an facilitated glucose transporter. The aim of the study is to determine the presence of single nucleotide and copy number changes in *SLC2A1* gene. In of this study, all of the 10 exons in 12 patients with GLUT1 deficiency syndrome were sequenced by the Sanger method. Results were analyzed as *in-silico* phenotype-genotype correlations were revealed. According to the ACMG Standards Guidelines published in 2015, it is necessary to demonstrate that family members have blood connections with the patient for the confirmation of *de novo* variants . SNP Array analysis was performed for 2 patients and their family members. In 7 patients who did not have any variation in Sanger analysis, quantitative real-time PCR was applied to each of the 10 exons of gene to determine the presence of copy number variations. In 7 patients, 8 different variants were identified. 2 of them are novel and *de novo* variants and the other 6 are known variants. One of the novel and *de novo* variants is splice-side variant, the other is frame shift variant, and the phenotype effects were assessed as pathogenic. qRT-PCR results shown that, just one patient has significant genomic copy number changes. The goal of this study is to assist in understanding mechanisms of GLUT1-DS contribute to clinical diagnosis and determination of possible changes at gene level and facilitate correct diagnosis of disease.

Key Words: GLUT1 Deficiency Syndrome, *SLC2A1*, variation, novel, *de novo*

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 26212

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüze kadar insan genom analizlerinden elde edilen ilk bilgilerden çıkarılan sonuçlara göre, tek nükleotid değişimlerinin (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) genetik ve fenotipik olarak insan varyasyonlarının temelini oluşturduğu kabul edilmiştir. Bununla birlikte, genom tarama teknolojilerinin ortaya çıkışı, insan genomundaki 'yapısal değişim' teriminin beklenmedik oranda gelişmesine katkı sağlamıştır. Büyük ölçekli eklenmeler, ters çevrimler ve translokasyonlar gibi mikroskopik ve aynı zamanda daha yaygın görülen silinme, çoğaltılma gibi submikroskopik varyantlar, genel olarak kopya sayısı varyantları (Copy Number Variation: CNV) veya kopya sayısı polimorfizmleri olarak adlandırılır. Hızla biriken kanıtlar, her genom içerisinde milyonlarca nükleotid yapısal değişimlerinin, o genom içerisinde bir heterojenite oluşturduğuna, bunun da, insan çeşitliliği ve hastalık duyarlılığı gibi faktörlerin oluşumlarında önemli etkisi olduğuna işaret etmektedir(1).

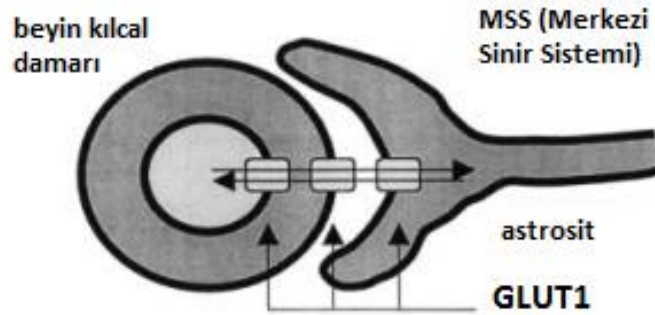
GLUT1 eksikliği sendromu, genellikle kolaylaştırılmış bir glikoz taşıyıcı protein olan GLUT1 kodlayan *SLC2A1* (çözünen taşıyıcı aile 2 üyesi 1) geninin dominant mutasyonlarından kaynaklanır. GLUT1 proteini, kan-beyin bariyeri boyunca birincil glikoz taşıyıcısı olarak görev yapar. Bu proteinin eksikliği ya da yokluğu serebral metabolizma için gerekli olan glikozun yetersiz kalmasına yol açar. Klasik GLUT1 ensefalopatisi, infantil başlangıçlı nöbetleri, gelişimsel yetersizlik, kompleks motor bozukluklar ve değişken mikrosefaliler ile karakterizedir. Son gelişmeler GLUT1 eksikliği spektrumunun bunun ötesinde olduğunu göstermektedir(2).

Bu tez çalışması kapsamında hedeflenen, *SLC2A1* genindeki GLUT1-ES ile ilişkili olası varyasyonları tespit etmektir. Bu süreç boyunca Sanger dizileme, SNP array analizi, kantitatif real-time PCR gibi çeşitli moleküler teknikler kullanılmıştır. Çalışma kohortu olarak Türk toplumundan bireyler tercih edilmiştir. Bu çalışmanın bilimsel amacı ve önemi, toplumlarda görülebilen nadir nörolojik bir hastalık olan GLUT1 eksikliği sendromunun genetik nedenlerinin aydınlatılmasına ve olası fenotip-genotip korelasyonlarının belirlenmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

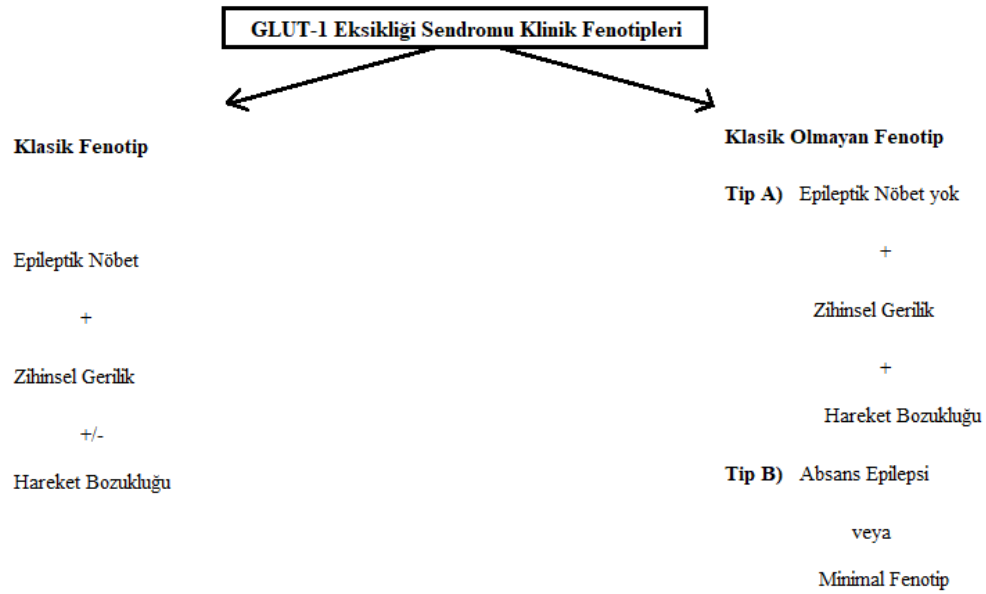
2.1. GLUT1 Eksikliği Sendromu (GLUT1-ES)

GLUT1-ES ilk olarak bebeklik çağı metabolik ensefalopatisi olarak tanımlanmıştır (2). İnfantil nöbetler, gelişimsel gecikme, edinilmiş mikrosefali, spastisite, ataksi ve hipoglisoray ile karakterize olmuş GLUT-1 eksikliği sendromuna (GLUT1-ES, OMIM 606777), kan-beyin bariyeri boyunca bozulmuş glikoz taşınımı neden olur (3). Hipotonik, ataksik ve distonik özellikler en belirgindir. Konuşma yetisi sıklıkla etkilenir. Bazı hastalarda spastisite ve sekonder mikrosefali gelişir. Fenotip, şiddetli bozukluk gösteren çocuklardan nöbetsiz çocuklara kadar değişir. Temel bir biyokimyasal bulgu olarak, beyin omurilik sıvısındaki (BOS) normoglisemi seviyesinde düşük glikoz konsantrasyonu gösterilebilir (BOS; hipoglisakir; ortalama 1,7 [SD 0,3mmol / L]) (3,4).



Şekil 2-1: Beyin içine glikoz girişi. GLUT1 proteinin aracı olduğu kan-beyin bariyeri (KBB) boyunca glikoz taşınması, lümen membranda glikoz alımını ve kılcal endotel hücresinin abluminal membranında glikoz alımını, beyin parenkimasına glikoz difüzyonunu ve beyin hücrelerine glikoz alımını kapsayan çok aşamalı bir süreçtir (5)

2.1.1.Klinik Fenotipleri



Şekil 2-2. GLUT1-ES Klinik Fenotipleri (6)

2.1.2.SLC2A1 Geni

SLC2A1 geni, kromozom 1p34.2’de yer alan 35 kb uzunluğunda bir gen olup, 10 ekzon ve 9 intron içermektedir. *SLC2A1* geni, GLUT1 (taşıyıcı protein tipi 1) adı verilen bir proteinin üretilmesi için talimatlar sağlar. GLUT1 proteini, glikoz olarak adlandırılan basit şekeri kandan veya başka hücrelerden yakıt olarak kullanmak üzere taşıyan dış zar üzerine gömülü transmembran bir proteindir (7).

SLC2A1 geni güncel bilgileri (sinonimleri, lokasyonu, transkript kodu ve sayısı, CCDS ve Uniprot kodları, kodlama yapan ve protein referans dizi numaraları, gendeki baz ve aminoasit sayısı, vb.) ENSEMBL veritabanında bulunmaktadır (Şekil.3). Aynı zamanda bu veritabanında gen haritası, ekzonik ve intronik bölgelerdeki kayıtlı varyantlar gibi birçok bilgi kayıtlıdır. *SLC2A1* geni araştırmaları için kullanılan en son ve güncel sıra SLC2A1-203 ve transkript numarası ENST00000426263.8 dir ve Şekil.3’de kırmızı çerçeve ile belirtilmiştir (8).

Gene: SLC2A1 ENSG00000117394

Description	solute carrier family 2 member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11005]
Synonyms	CSE, DYT18, DYT9, GLUT, GLUT1, HTLVR
Location	Chromosome 1: 42,925,375-42,959,176 reverse strand. GRCh38:CM000663.2
About this gene	This gene has 9 transcripts (splice variants), 100 orthologues , 8 paralogues , is a member of 1 Ensembl protein family and is associated with 8 phenotypes .
Transcripts	Hide transcript table

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags
SLC2A1-203	ENST00000426263.8	3670	492aa	Protein coding	CCDS477	P11166	NM_006516 NP_006507	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1
SLC2A1-205	ENST00000475162.3	598	142aa	Protein coding	-	A0A0D9SG74	-	CDS 5' incomplete TSL:5
SLC2A1-204	ENST00000460369.3	541	43aa	Protein coding	-	A0A1W2PQ59	-	TSL:2 GENCODE basic
SLC2A1-201	ENST00000372500.4	533	116aa	Protein coding	-	A6NL68	-	CDS 3' incomplete TSL:3
SLC2A1-208	ENST00000630287.2	2398	173aa	Nonsense mediated decay	-	A0A0D9SFK9	-	TSL:5
SLC2A1-206	ENST00000625233.2	1031	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:2
SLC2A1-209	ENST00000630821.1	591	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:2
SLC2A1-202	ENST00000415851.6	578	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:2
SLC2A1-207	ENST00000629908.1	401	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:NA

Şekil 2-3. SLC2A1 geninin ENSEMBL veritabanı görüntüsü (Nisan 2018) (8)**2.1.3. Kalıtım Şekli**

Günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalar sonucu, SLC2A1 geninde GLUT-1 eksikliği sendromundan sorumlu bazı otozomal dominant geçişli mutasyonel sıcak noktalar tespit edilmiştir, ancak fenotip-genotip korelasyonları henüz belirlenmemiştir (9). Çoğu hasta SLC2A1 geninde heterozigot *de novo* mutasyon taşır. Ailevi olgularda ise genellikle tam penetrans ile otozomal dominant (OD) kalıtım görülürken, otozomal resesif geçiş nadiren bildirilmiştir (10).

2.2. Paroksimal Hareket Bozukluğu

Erişkinlerde uyanıklık sırasında ortaya çıkan hiperkinetik paroksizmal hareket bozuklukları (PKD), heterojen bir grup olan nadir hastalıklar kategorisindedir. Bu bozukluklar, paroksizmal diskinezi, epizodik ataksiler, miyoklonus, okülogirik kriz, açık sendromlar ve fonksiyonel sendromları kapsar. Epilepsi, titreme ve distoni, tikler, stereotipler ve hemifasiyal spazmdan ayırt edilmelidir (11). Klinik pratikte, 20 yaşından önce aile öyküsü ve başlangıç yaşı olan hastalarda, genetik çalışmalar haricinde araştırma yapılmasına gerek yoktur. Bu nadir bozukluklar ve ataklar arasındaki normal nörolojik muayenenin bilinmemesi, sıklıkla tanısız gecikmelere neden olmakta ve ayrıca prevalansı düşürmeye de sebep olabilmektedir. 20 yaşından büyük ve aile öyküsü olmayan hastalarda ikincil nedenlerin takip edilmesi gerekir.

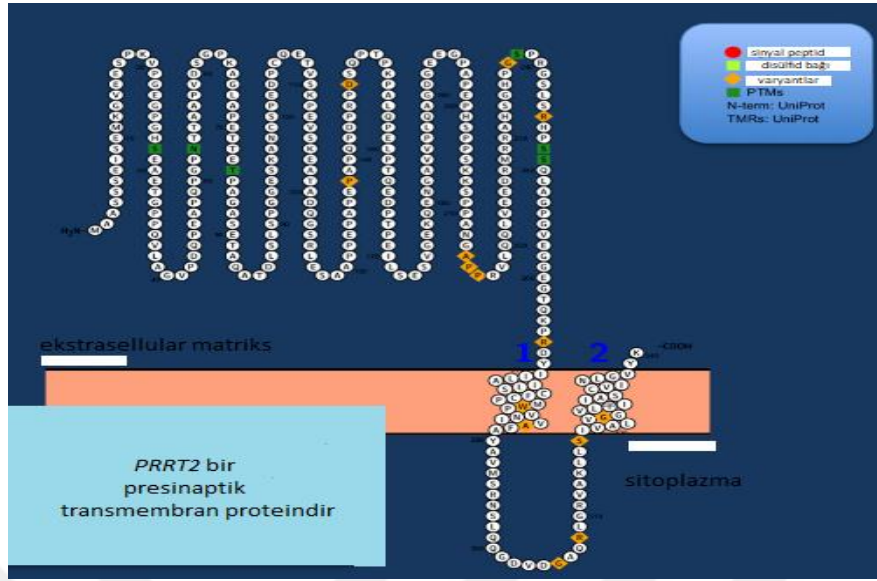
Antiepileptik ilaçlar PKD ve epizodik ataksia tip 1 için tercih edilen tedavi yöntemidir, benzodiazepinler genellikle PKD için yararlıdır ve epikodik ataksi tip 2, genetik etiyojolojiye bakılmaksızın asetazolamidden yararlanır (12)

Benign ailesel infantil konvülsiyon (BFIC) ayrıca epileptik nöbet kümeleriyle karakterize nörolojik bir hastalıktır. Geçtiğimiz yıllarda, PKD ve diğer paroksizmal bozukluklardan BFIC olan hastalarda PRRT2 geninde bir takım mutasyonlar tanımlanmıştır. Hem PKD hem de BFICnin bir alt tipi olan BFIC2, kalıtsal paroksizmal bozukluklardır ve kromozom 16 üzerinde aynı bölgede yer alan *PRRT2* geni heterozigot mutasyonlarından kaynaklanırlar (13).

Genomik evrimin bir sonucu olarak, son birkaç yıl içinde, paroksizmal hareket bozukluklarını tanımlayan çok sayıda yayın, hastalığın moleküler patolojisine ışık tutmaktadır. Hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması, atipik veya kompleks vakaların yönetiminde yardımcı olabilir. Özellikle genetik danışmanlık, tedavi stratejileri ve preimplantasyon genetik tanı için önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir (14).

2.2.1.PRRT2 Geni

PRRT2 geni, paroksizmal kinesijenik diskinezi lokusuna bağlı kromozom 16p11.2 bölgesi içinde yer alır . Bir tanesi protein kodlamayan olmak üzere toplam 4 ekzon içerir. 340-amino asitlik bir protein dizisini (*PRRT2* proteini) kodlar. *PRRT2* proteini, 2 transmembran domeninde; N terminali yarısında ve C-terminali yarısında prolin açısından zengin bir alana sahiptir (7).



Şekil 2-4. PRRT2 proteininin yapısı (13) PRRT2, kesecik füzyonunda yer alan presinaptik bir proteindir.

PRRT2 geni güncel bilgileri (sinonimleri, lokasyonu, transkript kodu ve sayısı, CCDS ve Uniprot kodları, kodlama yapan ve protein referans dizi numaraları, gendeki baz ve aminoasit sayısı, vb.) ENSEMBL veritabanında bulunmaktadır (Şekil.5). Aynı zamanda bu veritabanında gen haritası, ekzonik ve intronik bölgelerdeki kayıtlı varyantlar gibi birçok bilgi kayıtlıdır. *PRRT2* geni araştırmaları için kullanılan en son ve güncel sıra *PRRT2*-201 ve transkript numarası ENST00000300797.7 dir ve Şekil.2-5’de kırmızı çerçeve ile belirtilmiştir (8).

Bu tez çalışmasında, *PRRT2* geninde hot spot (sıcak nokta) bölge olan *BFIC2* lokusu tek bir hasta örneği (E17-79) için çalışılmıştır. 4 ekzonluk *PRRT2* geninin 944 baz çifti uzunluğundaki 2.ekzonunun belli bir kısmında yer alan bu hot spot lokus, paroksimal kinetik bozukluğu fenotipi ile ilişkili mutasyonların bildirildiği, genin mutasyona en açık bölgesidir. (15)

Gene: PRRT2 ENSG00000167371

Description: proline rich transmembrane protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30500]

Synonyms: DKFZp547J199, DSPB3, DYT10, EKD1, FICCA, FLJ25513, ICCA, IFITMD1, PKC

Location: [Chromosome 16: 29,811,382-29,815,882](#) forward strand.
GRCh38:CM000678.2

About this gene: This gene has 21 transcripts ([splice variants](#)), [75 orthologues](#), [3 paralogues](#), is a member of [1 Ensembl protein family](#) and is associated with [9 phenotypes](#).

Transcripts

[Hide transcript table](#)

Show/hide columns (1 hidden)							
Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq
PRRT2-201	ENST00000300797.7	3002	299aa	Protein coding	CCDS58446	Q7Z6L0	NM_001256443 NP_001243372
PRRT2-202	ENST00000358758.11	2567	340aa	Protein coding	CCDS10654	Q7Z6L0	NM_145239 NP_060282
PRRT2-221	ENST00000645338.1	2414	340aa	Protein coding	CCDS10654	-	-
PRRT2-207	ENST00000572820.2	2403	340aa	Protein coding	CCDS10654	Q7Z6L0	-
PRRT2-214	ENST00000637064.1	2153	340aa	Protein coding	CCDS10654	Q7Z6L0	-
PRRT2-205	ENST000005687659.3	1470	394aa	Protein coding	CCDS58445	Q7Z6L0	NM_001256442 NP_001243371
PRRT2-212	ENST00000636619.1	2085	287aa	Protein coding	-	A0A1B0GTE9	-
PRRT2-216	ENST00000637403.1	2033	286aa	Protein coding	-	A0A1B0GTP1	-
PRRT2-219	ENST00000637565.1	1733	155aa	Protein coding	-	A0A1B0GUR0	-
PRRT2-204	ENST00000567551.2	644	145aa	Protein coding	-	A0A1B0GTS0	-
PRRT2-203	ENST00000562148.2	564	106aa	Protein coding	-	H3BN10	-
PRRT2-220	ENST00000637566.1	520	128aa	Protein coding	-	A0A1B0GTR2	-
PRRT2-211	ENST00000636248.1	517	118aa	Protein coding	-	A0A1B0GU37	-
PRRT2-213	ENST00000636902.1	100	33aa	Protein coding	-	A0A1B0GU25	-
PRRT2-210	ENST00000636131.1	2385	299aa	Nonsense mediated decay	CCDS58446	Q7Z6L0	-
PRRT2-215	ENST00000637290.1	2009	130aa	Nonsense mediated decay	-	A0A1B0GUW9	-
PRRT2-206	ENST00000568519.1	534	No protein	Processed transcript	-	-	-
PRRT2-209	ENST00000636019.1	131	No protein	Processed transcript	-	-	-
PRRT2-208	ENST00000636001.1	100	No protein	Processed transcript	-	-	-
PRRT2-217	ENST00000637425.1	100	No protein	Processed transcript	-	-	-
PRRT2-218	ENST00000637542.1	100	No protein	Processed transcript	-	-	-

Şekil 2-5. PRRT2 geninin ENSEMBL veritabanı görüntüsü (Nisan 2018) (8)

2.3. Tek Nükleotid Değişiklikleri (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)

İnsan genomunun kompleks yapısı, yaklaşık 3.2 milyar baz çifti, 24.000 protein ürünü kodlayan gen ve 2.9 milyon regülatör (düzenleyici) bölge içerir. Son yıllarda, yüksek yoğunluklu tek nükleotid polimorfizm (SNP) mikrodizilerinin bulunmasının, hastalıklardaki genetik anomalilerin global analizi bağlamında ileriye doğru atılmış büyük bir adım olduğu kanıtlanmıştır. İnsan genomundaki genetik varyasyonun en yaygın kaynağı, SNP olarak tanımlanan tekli baz polimorfizmlerinin varlığıdır. Bu tek nokta değişimlerinin polimorfizm olarak tanımlanabilmesi için, belirli bir popülasyonda en az % 1'lik allel sıklığında gerçekleşmelidir (1).

İnsan genomu boyunca yaklaşık 15 milyon SNP dağılmıştır. Büyük çoğunlukla, SNP'ler iki allelde oluşur ve eğer genin kodlama bölgesinin içinde yer alıyorsa amino asit dizisinde değişim yapıp yapmamalarına bağlı olarak sessiz, eş anlamlı ya da yanlış

anlamlı olarak tanımlanırlar. Ayrıca, genomun kodlamayan bölgelerinde bulunan SNP'ler, kırılma sürecini veya transkripsiyon faktörü bağlama noktalarını etkileyerek fenotipi etkileyebilmektedir. Çoğu genomik varyasyon, hastalıklarla ilişkili genleri ve popülasyon öykülerini izlemek için en yüksek genomik değişim yüzdesine sahip tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP'ler) atfedilebilmektedir (17).

DNA polimorfizmleri, genetik analizlerde önemli belirteçlerdir ve genom yeniden dizileme yöntemi kullanılarak giderek daha fazla saptanmaktadır. Bununla birlikte, tekrarlayıcı dizilerin ve yapısal değişkenlerin varlığı, polimorfik allellerin tanımlanmasında yanlış pozitiflere yol açabilmektedir. Bu nedenle seçilen yöntem ve analizi, çalışılan gen ve gen bölgesine özgü bir şekilde tasarlanmalıdır. Sık görülen hastalıklarla bağlantılı haplotipler için insan genomunu taramak amacıyla 30.000 ± 500.000 SNP yoğunluğu içeren bir genomik haritanın kullanılması önerilmektedir (18).

2.4.Kopya Sayısı Değişiklikleri (Copy Number Variations, CNV's)

Referans genoma kıyaslandığında, farklı sayıda bulunan, boyutu 1 kb veya daha fazla olan DNA segmentlerine Kopya Sayı değişkenlikleri (CNV) denir. Kopya sayısı değişimi (CNV), genomda DNA kaybı veya kazancı oluşturan çok çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkarlar ve insan genomunun en az % 12'sini etkiledikleri düşünülmektedir(18). Birbiri ile tıpatıp aynı ya da çok benzeyen DNA dizileri bazı kromozomlarda tekrarlar şeklinde bulunmaktadır (1 kb-~birkaç Mb). Normal şartlarda insan genomundaki diploid yapıda, her biri bir otozomdan gelen bir çift kopya bulunmaktadır. Ancak günümüzde, genomda bazı segmentlerin birden fazla kopya sayısında olabildiği ortaya çıkmıştır. CNV ler kalıtım yolu ile ya da duplikasyon, delesyon, inversiyon, ve translokasyon gibi genomik yeniden düzenlenmeler yolu ile *de novo* olarak oluşabilmektedirler. Özellikle düşük kopya sayılı tekrar dizi (Low Copy Repeat, LCR) bölgeleri CNV oluşumuna müsait bölgelerdir (19).

CNV tespit yöntemleri olarak; SNP Array, arrayCGH, Multipl Bağlanma Prob Analizi (MLPA) ve kantitatif gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q RT-PZR) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Array yöntemleri büyük alanlarda (tüm genom) varyasyon taraması yapılabilmesi için uygun bir yöntemdir.

Bu çalışma kapsamında kopya sayısı değişimi taranacak hedef gen bölgesi için maliyet ve esneklik sağlaması açısından laboratuvarımızda uygulanan gelen gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi seçilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇ

3.1.1.Çalışma Kapsamında Oluşturulan Hasta Grubu

Bu tez kapsamında çalışılan hastalık grubu nadir hastalıklar sınıfında yer aldığı için klinik teşhis şansı ve prevalansı düşük olmaktadır. Bu sebeple, İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi birimlerinde klinik muayenesi yapılmış ve teşhisinden yüksek oranda emin olunan 12 hasta bu çalışmaya dahil edilmiştir. İ.Ü. AS DETAE Genetik ABD’da herhangi bir nörolojik hastalığı bulunmayan ve kontrol grubu olarak kullanılabilicek bir kohort bulunmaktadır. Bu kohorttan rastgele seçilen 3 kişi, q RT-PZR deneysel aşamasında referans sağlıklı kontrol olarak kullanılmıştır.

Özet olarak, gönüllü onamı alınmış GLUT1 eksikliği sendromu teşhisi olan hastalar ve bu hastalık bakımından sağlıklı olduğu bilinen kontroller, DNA bankasındaki klinik takip altında gönüllülerden seçilmiştir.

3.1.2.Kullanılan Malzemeler

3.1.2.1.Çözeltiler

Merkezimizde alınan kan örnekleri, mor kapaklı EDTA (etilendiamin tetra asetik asit) solüsyonu içeren tüpler içerisinde -20°C veya +4°C derecelik buzdolaplarında saklanır.

3.1.2.2.Kitler

Tablo 3-1: Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kitler, kullanım alanları ve sağlayıcı firmaları

Adı	Kullanım Alanı	Firma
QIAamp DNA Blood Midi ve Maxi Kits	Kandan DNA İzolasyonu	QIAGEN, Turkey
Zymo Research Genomic DNA Clean&Concentration	Genomik DNA Saflaştırması	ZymoResearch Corporation, USA

Light Cycler 480 SYBR Green I Master	Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	Roche Diagnostics, Turkey
Illumina Human CytoSNP 12v2.1 BeadChip Kit 300K	SNP Array	Illumina, San Diego, CA.

QIAamp DNA Blood Midi ve Maxi Kitleri, vericinin orta hacimdeki kanından büyük hacimdeki kanına kadar olan toplam DNA'nın (örneğin; Genomik, viral, mitokondriyal) hızlı ve etkili bir şekilde arındırılması için tasarlanmıştır (20).

3.1.2.3.Cihazlar

Tablo 3-2: Bu tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve sağlayıcı firmaları

Cihazlar	Firma
Jel Görüntüleme Sistemi	UVP Imaging System
Steril Kabin	Thermo Scientific, HERA (51022515)
NanoDrop Spektrofotometre	Thermo Scientific (ND-1000)
Bilgisayarlar	HP (WM434EA II AB8) Acer Incorporated (IV 1670G)
Derin Dondurucular	SANYO LABCOOL +4°C Uğur Soğutma Makinaları Sanayi Tic. A.Ş. (UFR 370 GD)
Inkübator	Hibrigene Techne
Santrifüjler	Eppendorf Centrifuge, (5415C) Labofuge

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (q RT PCR)	Light Cycler 480 II , Roche
Vorteks	Yellowline (TTS2)
Otoklav	Sümer A.Ş.
Jel Dökümantasyon Sistemi	GelDoc-It
Thermomixer	ThermoScientific

3.1.2.4. Biyoinformatik Veritabanları ve Analiz Programları

Tablo 3-3. Bu tez kapsamında kullanılan biyoinformatik veritabanları ve analiz programları

UCSC (University of California Santa Cruz) http://genome.ucsc.edu hg38/GRCh38	Referans sekans ve genom ile ilgili bilgiler içeren ve kullanıcıya çalışma alanı sağlayan veritabanı
ENSEMBL http://www.ensembl.org Release 92 / GRCh38	Ökaryotik türler için genom veritabanı
SIFT/PROVEAN (Ensembl 66)	Genomdaki SNP ve indel değişimler için Ensembl kökenli tahmin aracı
The Ensembl Variant Effect Predictor (VEP)	Varyantların (SNP'ler, indel değişimler CNV'ler veya yapısal varyantları) genler, transkriptler, protein dizileri ve düzenleyici bölgeler üzerindeki etkisini belirleyen tahmin aracı
NCBI (National Center for Biotechnology) Annotation Release 109 / GRCh38	Referans sekans ve genom bilgilerini sağlayan veritabanı

MutationTaster NCBI 37 / Ensembl 69	Genomda meydana gelen varyasyon ve mutasyonların fenotip üzerindeki etkisini tahmin eden araç
HGVS (Human Genome Variation Society)	Hastalığa yatkınlığa yol açan genomdaki değişikliklerin tanımlanmasına yardımcı olan veritabanı
LUMC Mutalyzer Version 2.0.26	HGVS klavuzuna uygun varyant sekans isimlendirmesi aracı
Orphanet	Nadir hastalıklar portalı
The Exome Aggregation Consortium (ExAC)	Ekzom dizileme veritabanı
Primer3	Primer dizaynının sağlandığı veritabanı
OligoCalculator http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	Dizayn edilen primerlerin özelliklerini tespit etmeyi sağlayan veritabanı
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim	Kalıtsal hastalıklar ve fenotipleri ile ilgili bilgi sağlayan veritabanı
SDSC Biology Workbench http://workbench.sdsc.edu/	Birden fazla programı bir araya getiren, primer- prob dizaynı gibi içerikleri olan veritabanı
Human Splicing Finder (HSF) Version 3.1.	Genlerin kırılma noktalarında meydana gelen intronik ve ekzonik varyant tespiti hakkında bilgi veren veritabanı

PolyPhen	Bir amino asit süstitüsyonunun, bir insan proteininin yapısı ve işlevi üzerindeki olası etkisini, doğrudan fiziksel ve karşılaştırmalı değerdendirmeler kullanarak tahmin eden araç
GenomeStudio	SNP-Array verisinin incelenmesini sağlayan ve Illumina'ya ait yazılım
Homozygosity Detector	Genomdaki homozigot bölgelerin tespit edilmesini sağlayan ek yazılım

3.2.YÖNTEM

3.2.1.Kandan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu amacı ile birden fazla değışik yöntem ve ticari kitler bulunmaktadır. DNA izolasyonu için kan alındıktan sonra bekleme süresi ve miktarı göz önüne alınarak manuel, midi veya maxi kit yöntemleri uygulanabilir.

Bu çalışmada, klinisyen tarafından merkezimize yönlendirilen, fenotipi onaylanmış hasta bireylerden kan alınmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu protokolünde Midi ve Maxi Kitler kullanılmıştır.

3.2.1.1.QIAamp DNA Blood Midi Kit Protokolü

QIAamp DNA Blood Midi Kitin içeriğı ve hacimleri tablodaki gibidir (Tablo.3-4).

Tablo 3-4: QIAamp DNA Blood Midi Kit içeriğı ve hacimleri . *Ağartıcı içeren dezenfekte edici maddelerle uyumlu değildir. Bir kaotropik tuz içerir *Süspansiyon hacmi 4.4 ml

QIAamp DNA Blood Midi Kit	20	100
Katalog no.	51183	51185
Reaksiyon sayısı	20	100

QIAamp Midi Spin Tüpleri	20	100
Toplama Tüpleri (15 ml)	20	100
Buffer AL*	2 x 33 ml	330 ml
Buffer AW1* (konsantre)	19 ml	98 ml
Buffer AW2 (konsantre)	17 ml	81 ml
Buffer AE	15 ml	60 ml
QIAGEN® Proteaz	1 vial	4 vial
El Kitabı	1	1

Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Başlamadan önce örnekler oda sıcaklığına (15–25°C) dengelenir.
- Protokolün 4. adımında kullanılmak üzere 70°C su banyosu hazırlanır.
- Buffer AW1, Buffer AW2 ve QIAGEN Proteaz'ın hazırlandığından emin olunur.
- Tampon AL'de bir çökelti oluştuğunda, yeniden 56°C'de inkübe ederek çözülür.

Protokol

1. ■ 100 µl veya ▲ 200 µl QIAGEN Proteaz 15 ml'lik bir tüpe alınır.
2. ■ 0,3–1 ml veya ▲ 1–2 ml kan eklenip ve kısaca karıştırılır, gerekirse örnek hacmi PBS ile 1 ml veya ▲ 2 ml'ye kadar getirilir.
3. ■ 1,2 ml veya ▲ 2,4 ml Tampon AL eklenir ve tüp ters yüz çevirerek iyice karıştırılır.

Not: QIAGEN Proteazı doğrudan Tampon AL'ye eklemeyin.

4. 10 dakika 70°C'de inkübe edilir.

Not: DNA verimi 70°C'de 10 dakika süreyle lizizden sonra maksimum seviyeye ulaşır,

ancak daha uzun inkübasyon süresi verimi olumsuz etkilemez.

5. Numuneye 1 ml veya ▲ 2 ml etanol (%96-100) eklenir ve ters yüz çevirerek karıştırılır.

6. Çözeltilinin ■ tümü veya ▲ yarısı , 15 ml santrifüj tüpüne dikkatlice aktarılır.

7. QIAamp Midi kolonunu çıkarılır, filtratı atılır ve 15 ml'lik yeni tüpe yerleştirilir 3 dakika boyunca 1850 x g (3000 rpm) santrifüj edilir.

(■ Bu adım ≤ 1 ml kan ile başlarken gerekli değildir, 8. Adım ile doğrudan devam edilir)

8. QIAamp Midi kolonunu çıkarılır, filtratı atılır ve 15 ml'lik yeni tüpe yerleştirilir.

9. Dikkatlice, tüpe 2 ml Buffer AW1 eklenir, kapağı kapatılır ve 1 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüj edilir.

Not: Bu aşamada supernatant atılmaz, 10. adım ile devam edilir.

10. Dikkatlice kolona 2 ml Buffer AW2 eklenir ve 15 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüjlenir.

11. QIAamp Midi kolonu temiz bir 15 ml santrifüj tüpüne (ürünle birlikte) yerleştirilir ve filtratı içeren toplama tüpü atılır.

12. Odaya sıcaklığında (15–25°C), ■ 200 µl veya ▲ 300 µl Tampon AE veya damıtılmış su doğrudan kolonunun membranına eklenir ve kapağı kapatılır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin sonra ve 4500 x g'de 2 dakika (5000 rpm) santrifüjlenir.

13. Yüksek konsantrasyonlu DNA için, adım 13a ile devam edilir, maksimum DNA verimi için adım 13b ile devam edilir.

13.a. Maksimum konsantrasyon için: QIAamp Midi kolonunun membranına DNA içeren eluat (■ 200 µl veya ▲ 300 µl) tekrar yerleştirilir. Kapağı kapatılır ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüj edilir.

13b. Maksimum verim için QIAamp Midi kolonunun membranına oda sıcaklığında ■200 µl veya ▲ 300 µl taze Tampon AE veya damıtılmış su lave edilir. Kapağı kapatılır ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüj edilir(20).

3.2.1.2.QIAamp DNA Blood Maxi Kit Protokolü

QIAamp DNA Blood Maxi Kitin içeriği ve hacimleri tablodaki gibidir (Tablo.3-5).

Tablo 3-5: QIAamp DNA Blood Maxi Kit içeriği ve hacimleri. *Ağartıcı içeren dezenfekte edici maddelerle uyumlu değildir. Bir kaotropik tuz içerir * Süspansiyon hacmi 5.5 ml

QIAamp DNA Blood Maxi Kit	10	50
Katalog no.	51192	51194
Reaksiyon sayısı	10	50
QIAamp Midi Spin Tüpleri	10	
Toplama Tüpleri (15 ml)	10	50
Buffer AL*	126 ml	2 x 330 ml
Buffer AW1* (konsantre)	27 ml	151 ml
Buffer AW2 (konsantre)	17 ml	81 ml
Buffer AE	2 x 15 ml	128 ml
QIAGEN® Proteaz	1 vial	5 vial
El Kitabı	1	1

Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Başlamadan önce örnekler oda sıcaklığına (15–25°C) dengelenir.
- Protokolün 4. adımında kullanılmak üzere 70°C su banyosu hazırlanır.
- Buffer AW1, Buffer AW2 ve QIAGEN Proteaz'ın hazırlandığından emin olunur.
- Tampon AL'de bir çökelti oluştuğunda, yeniden 56°C'de inkübe ederek çözülür.

Protokol

1. 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne 500 µl QIAGEN Proteaz eklenir.
2. ■ 3–5 ml veya ▲ 5–10 ml kan eklenir ve kısaca karıştırılır.
3. ■ 6 ml veya ▲ 12 ml Tampon AL eklenir ve tüp 15 kez ters yüz çevrilerek iyice karıştırılır, ardından en az 1 dakika daha kuvvetlice çalkalanır.

Not: QIAGEN Proteazı doğrudan Tampon AL'ye eklemeyin.

4. 10 dakika 70°C'de inkübe edilir.
5. Numuneye ■ 5 ml veya ▲ 10 ml etanol (%96-100) eklenir ve ters yüz çevrilerek karıştırılır.
6. Çözeltinin ■ tümü veya ▲ yarısı, kolona dikkatlice aktarılır. 50 ml santrifüj tüpüne yerleştirilen dikkatlice kapağı kapatılarak 3 dakika boyunca 1850 x g'de (3000 rpm) santrifüjlenir.

■ Adım 8 veya ▲ adım 7 ile devam edilir.

7. QIAamp Maxi kolonu çıkarılır, filtratı atılır. Çözeltinin kalanını tekrar yüklenir, kapağı kapatılır ve tekrar 3 dakika boyunca 1850 x g (3000 rpm) de santrifüj edilir.

(Bu adım ■ ≤5 ml kan ile başlarken gerekli değildir. 8. Adım ile doğrudan devam edilir.)

8. QIAamp Maxi kolonunu çıkarılır, filtratı atılır ve 50 ml santrifüj tüpüne tekrar geri yerleştirilir.

9. Dikkatlice 5 ml Buffer AW1 eklenir, kapağı kapatılır ve 1 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüjlenir.

10. Dikkatlice 5 ml Buffer AW2 eklenir, kapağı kapatılır ve 15 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüjlenir.

11. QIAamp Maxi kolonu temiz bir 50 ml'lik santrifüj tüpüne (ürünle birlikte) yerleştirilir ve filtratı içeren toplama tüpü atılır.

12. Oda sıcaklığında (15–25°C), ■ 600 µl veya ▲ 1 ml Tampon AE veya damıtılmış su doğrudan QIAamp Maxi kolonunun membranına eklenir ve kapağı kapatılır. Oda

sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 2 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüjlenir.

13. Yüksek konsantrasyonlu DNA için, adım 13a ile devam edilir. Maksimum DNA verimi için adım 13b ile devam edilir.

13a. Maksimum konsantrasyon için: DNA'yı içeren QIAamp Maxi kolonunun zarı (■ 600 µl veya ▲ 1 ml) tekrar yerleştirilir. Kapağı kapatılır ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 5 dakika boyunca 4500 x g'de (5000 rpm) santrifüjlenir.

13b. Maksimum verim için: ■ 600 µl veya ▲ 1 ml taze Tampon AE veya damıtılmış su, QIAamp Maxi kolonunun zarı üzerine tekrar yerleştirilir, kapağı kapatılır ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4500 x g'de 5 dakika (5000 rpm) santrifüj edilir (20).

3.2.1.3.QIAamp DNA Blood Midi ve Maxi Kitlerinin Saklama Koşulları

QIAamp Midi spin kolonları ve tamponları oda sıcaklığında kuru olarak saklanabilir(15-25°C).

İlk kullanımda QIAamp Maxi spin kolonlarını 2–8°C' de saklayın. Diğer tüm QIAamp Maxi bileşenleri 2–8 °C 'de veya oda sıcaklığında saklanabilir. Kitler, bu koşullar altında performansta herhangi bir azalma göstermeden 1 yıla kadar saklanabilir. Daha uzun süreler için QIAamp DNA Blood Midi ve Maxi Kitlerinin 2–8 °C' de saklanması tavsiye edilir.

Liyofilize QIAGEN Proteaz, performansta herhangi bir azalma olmaksızın 1 yıla kadar oda sıcaklığında saklanabilir. 1 yıldan uzun bir süre saklamak için veya ortam sıcaklıkları sürekli olarak 25°C' yi aşarsa, QIAGEN Proteaz 2–8°C' de kuru olarak saklanmalıdır.

Sulandırılan QIAGEN Proteaz 2–8°C' de saklandığında 2 ay stabildir. QIAGEN Proteaz stok solüsyonunun oda sıcaklığında uzun süre tutulması önlenmelidir. –30 ila -15°C' de depolama ömrü uzar, ancak tekrarlanan dondurma ve çözülmeden kaçınılmalıdır. Bu sebeple çözeltinin -30 ila -15°C' de bölümlere ayırarak kullanılması ve depolanması tavsiye edilir (20).

3.2.2. Primer Dizaynı ve Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

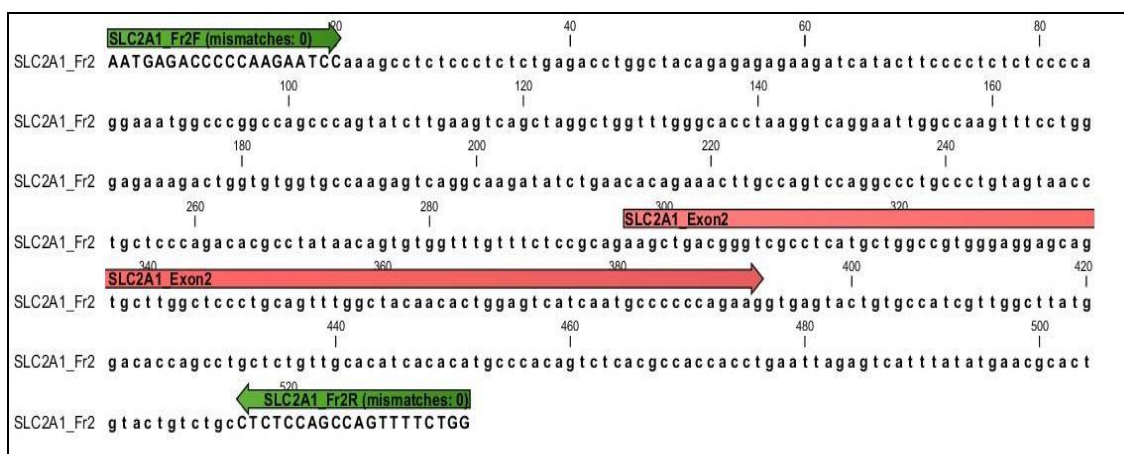
- PCR primerleri genellikle 15-30 nükleotit uzunluğunda olmalıdır.
- Optimal GC içeriği %40-60 olmalıdır. İdeal olanı, C ve G nükleotidlerinin, primerler boyunca muntazam bir şekilde dağılmasıdır.
- Nonspesifik bağlanma riskini azaltmak için primerlerin 3' ucunda bir veya iki G veya C'yi tercih edilmelidir.
- Primerler arasındaki tamamlayıcılıklardan, saç tokası oluşumundan ve primer dimerizasyonunu önlemek için primerlerdeki doğrudan tekrarlardan kaçınılmalıdır.
- Primerler ve şablon DNA arasındaki olası tamamlayıcı alanları kontrol edilmelidir.
- Dejenere primerleri tasarlarken, 3' ucunda en az 3 konservatif nükleotit yerleştirilmelidir.
- İki primerin erime sıcaklıklarındaki (T_m) arasındaki fark, geleneksel PCR için 5°C'yi geçmemelidir (21).

3.2.2.1. *PRRT2* Gen Analizi için Primer Tasarımı

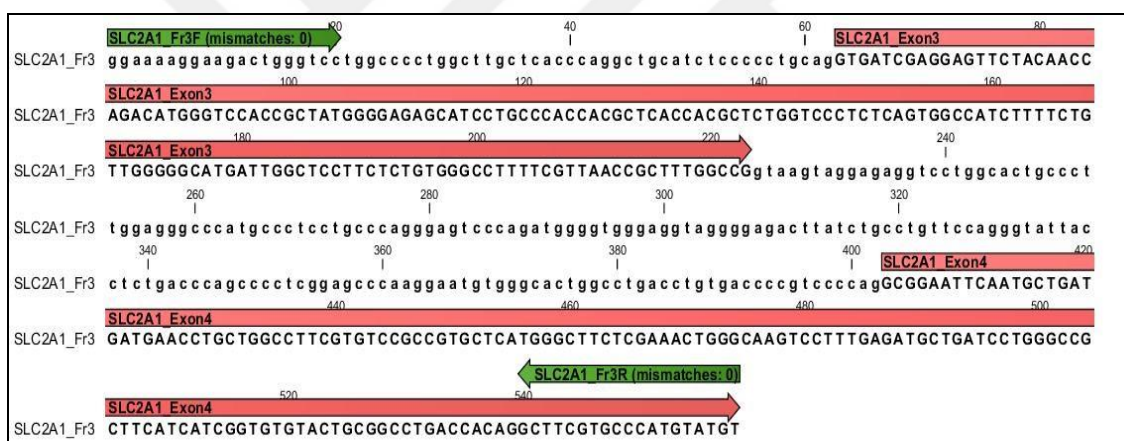
İzole edilen hasta DNA'larını istenilen gen ve bölgede çoğaltabilmek için, o bölgelere özel primerler tasarlanmalıdır. Klinisyen isteği üzerine E17-79 numaralı hastaya özel, *PRRT2* geninde hot spot bölge olan *BFIC2* lokusu çalışılmıştır. 4 ekzonluk *PRRT2* geninin 944 baz çifti uzunluğundaki 2.ekzonunun belli bir kısmında yer alan bu hot spot bölgeyi kapsayacak 565 baz çiftlik bir alana özel bir primer çifti, Primer3 programı kullanılarak tasarlanmıştır (22).

Tablo 3-6. *PRRT2* gen analizi için tasarlanan primer çifti ve baz dizisi

<i>PRRT2</i> Forward Primer	TCTGCAGCCCCACCTGAA
<i>PRRT2</i> Reverse Primer	TCTATTGCAGCGCTGGCG



Şekil 3-2. Fragman-2 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü



Şekil 3-3. Fragman-3 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü



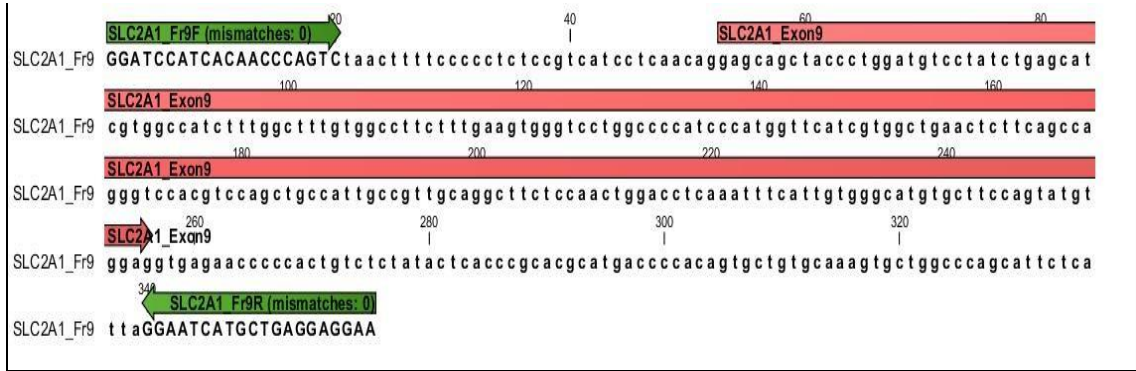
Şekil 3-6. Fragman-6 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü



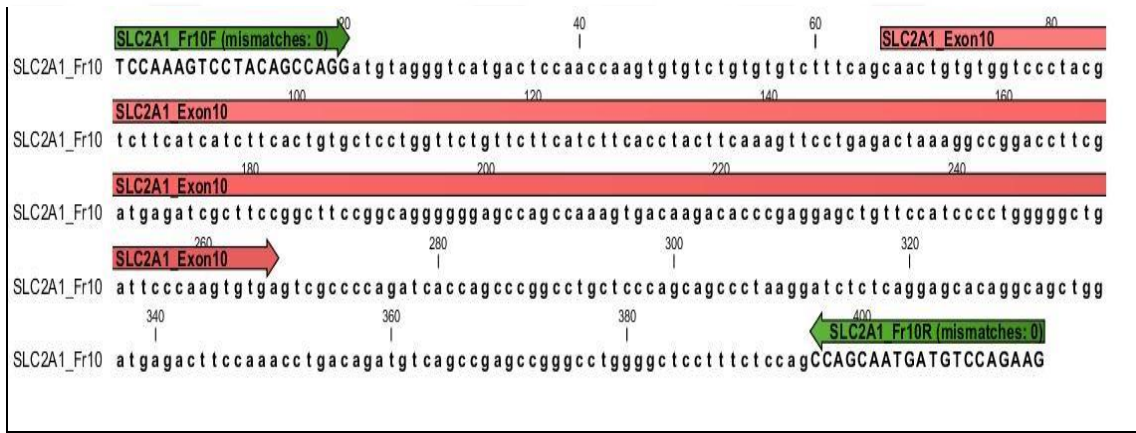
Şekil 3-7. Fragman-7 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü



Şekil 3-8. Fragman-8 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü



Şekil 3-9. Fragman-9 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü



Şekil 3-10. Fragman-10 için tasarlanan primer çiftinin görüntüsü

3.2.3.Touchdown PZR ile Genomik DNA Amplifikasyonu

Touchdown (TD) PZR, uzun optimizasyonlar ve / veya primerlerin yeniden tasarımı gerekmeksizin, PZR'leri optimize etmek, özgünlüğü artırmak, hassasiyeti ve verimliliği artırmak için basit ve hızlı bir yöntem sunmaktadır. TD-PZR, kullanılan primerlerin öngörülen ergime sıcaklığının (T_m) üstünde bir bağlanma sıcaklığı kullanmakta ve daha sonra, ardışık döngüler boyunca daha düşük, daha uygun bir bağlanma sıcaklığına aşamalı olarak geçmektedir. Doğru ve yanlış bağlanma arasındaki T_m 'deki herhangi bir fark, nükleik asitlerin çevrimi başına iki kat üstel avantaj sağlamaktadır (23).

TD-PZR, ters transkriptaz bağımlı PZR da dahil olmak üzere standart PZR protokollerinde yaygın olarak uygulanabilirliği kanıtlanmış, aynı zamanda cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında ve tek nükleotid polimorfizm taramasında elverişli

bir yöntemdir. TD-PZR, amplifikasyonu zor olan nükleik asit kalıpları için özellikle yararlıdır, bunun yanı sıra özgüllüğü ve ürün oluşumunu arttırmak için de standart olarak kullanılabilir. İşlem, nükleik asitin baz uzunluğuna bağlı olarak 90 ila 120 dakika arasında sürmektedir (23). Laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz TD-PZR protokolünde dizayn edilen primerler ile DreamTaq Buffer ve enzimi kullanılmıştır.

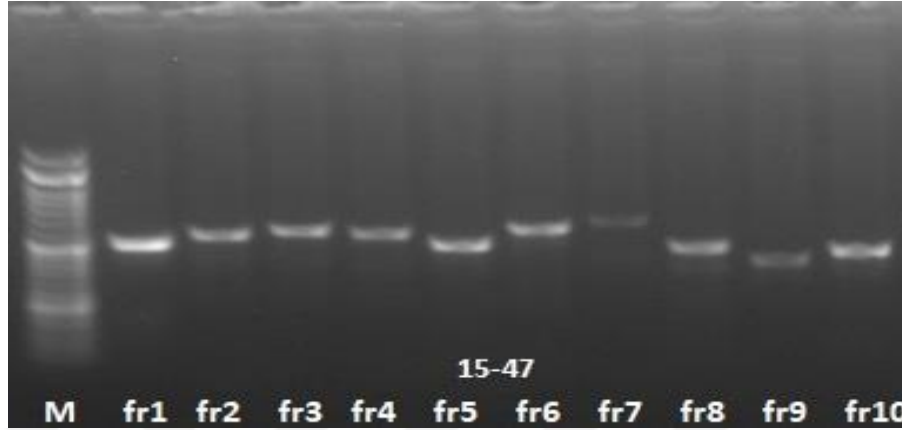
Tablo 3-8: Touch-down pzs mix reaktifleri ve konsantrasyonları

PZR Mix			
Konsantrasyon	Reaktifler	MI	Final Konsantrasyonu
	dH ₂ O	12,86	
DreamTaq Buffer	10X	2,5	1X
25mM	Mg	2	2mM
100 %	DMSO	2	
10mM	Dntp	0,5	0,25 mM
DreamTaq	Taq Polimeraz	0,14	
50 ng/μl	DNA	1	
	Alq	21	
2.5μM	Primer Forward	2	
2.5μM	Primer Reverse	2	

Tablo 3-9: Touch-down pzs protokolü

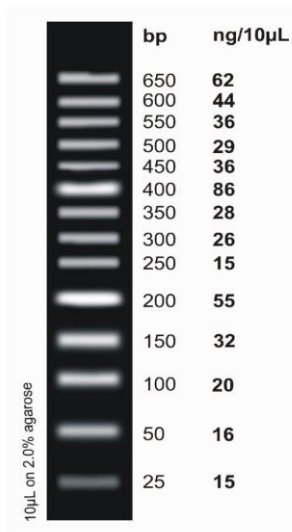
PCR Kosulu, MyCycler	Program: gluttdown
95°C	5 dakika
Touchdown (10 döngü)	
94°C	45 saniye
61-->53°C	45 saniye
72°C	1 dakika
Sabit PZR (35 döngü)	
94°C	45 saniye
52°C	45 saniye

72°C	1 dakika
72°C (final uzama)	15 dakika



Şekil 3-11. TD pzs sonrası oluşan örnek pcr ürünlerinin agaroz jelde konfirmasyonu (M:markır)

Şekil.3-11’de görüldüğü üzere, pzs ile çoğaltılan gen bölgelerinin, istenilen bölge olduğunun validasyonu ve deneyin kontamine olup olmadığı tespit etmek üzere agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Bant görüntülerinin her biri tekli bantlar şeklindedir yani kontaminasyon söz konusu değildir. Bu sonuçlara göre Sanger dizilemesine alınacak pzs ürünleri seçilmiştir.



1.

Şekil 3-12. 50 baz çiftlik (bp) DNA ladder (DNA merdiveni)

Çoğaltılan gen bölgesinin istenilen bölge olup olmadığının konfirmasyonu ise Şekil.3-12’de gösterilen 50 bp DNA ladder ile sağlanır. Bu DNA merdiveni, 50 bp ile 2500 bp aralığında çift iplikli DNA’nın boyutlandırılması ve yaklaşık olarak nicelendirilmesi için tasarlanmıştır.

3.2.4.Sanger Dizilemesi ve Sonuçların *in siliko* Analizi

DNA dizilemesi, bir DNA molekülündeki bazların dizisinin açıklandığı süreci ifade eder. DNA diziliminin en yaygın kullanılan yöntemi, zincir sonlandırıcı dideoksinükleotitlerin kullanılmasını içeren Sanger yöntemidir (24).

Sanger dizilemesinde kalıp olarak TD PZR ile çoğaltılan pcr ürünleri kullanılır.

Sanger dizilimi, genetik hastalıkların teşhisi için iyi bilinen bir moleküler tekniktir. Bu yöntem, *in vitro* DNA replikasyonu sırasında zincir sonlandırıcı dideoksinükleotitlerin, DNA polimeraz tarafından seçici bir şekilde reaksiyona dahil edilmesi ve istenen DNA bölgesinin belirlenip dizilenmesi prensibine dayanan bir methottur (25).

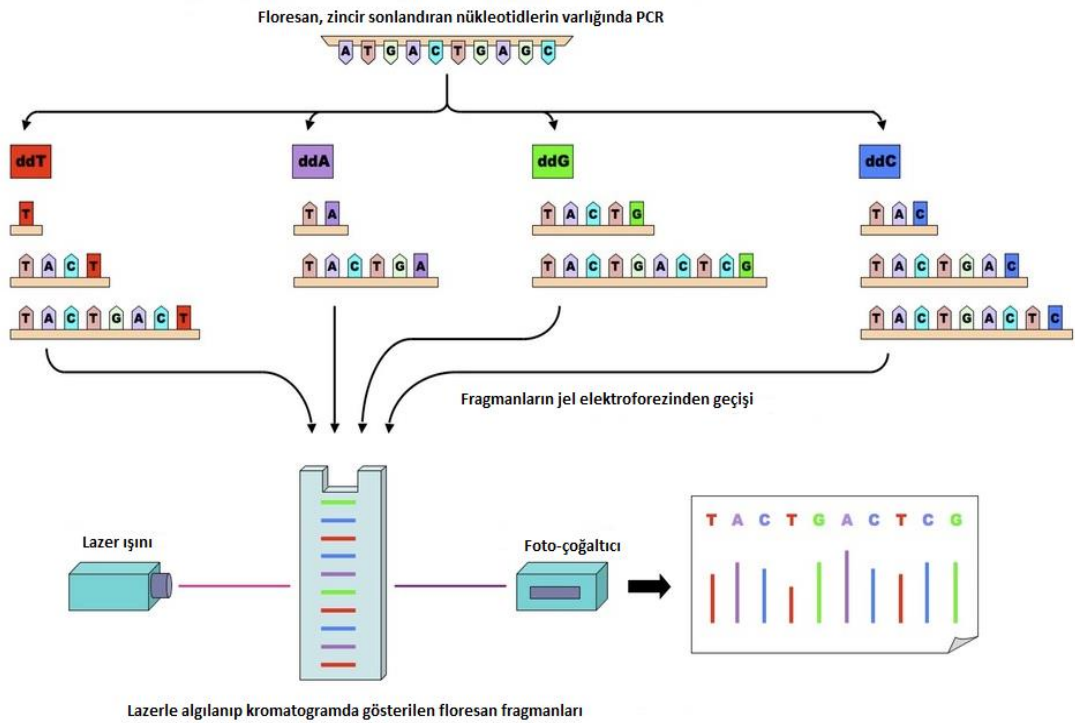
Sanger DNA sekanslama, aşağıda belirtilen araştırma amaçları için yaygın olarak kullanılmaktadır:

- Daha büyük sayıda örnekte daha küçük genomik bölgeleri hedefleme,
- Değişken bölgelerin dizilimi,
- Yeni nesil dizileme (NGS) çalışmalarından elde edilen sonuçların doğrulanması,
- Plazmid dizileri, ekler, mutasyonların doğrulanması,
- HLA tiplleme,
- Mikrosatellit markörlerin genotiplemesi,
- Tek gen kaynaklı hastalığa neden olan genetik varyantları tanımlamak (25).

Bu tez çalışması kapsamında Sanger dizileme yöntemi, tek gen kaynaklı hastalığa neden olan genetik varyantları tanımlamak amacı ile kullanılmıştır.

Sanger yöntemi dört aşamalı PCR reaksiyonunu içerir:

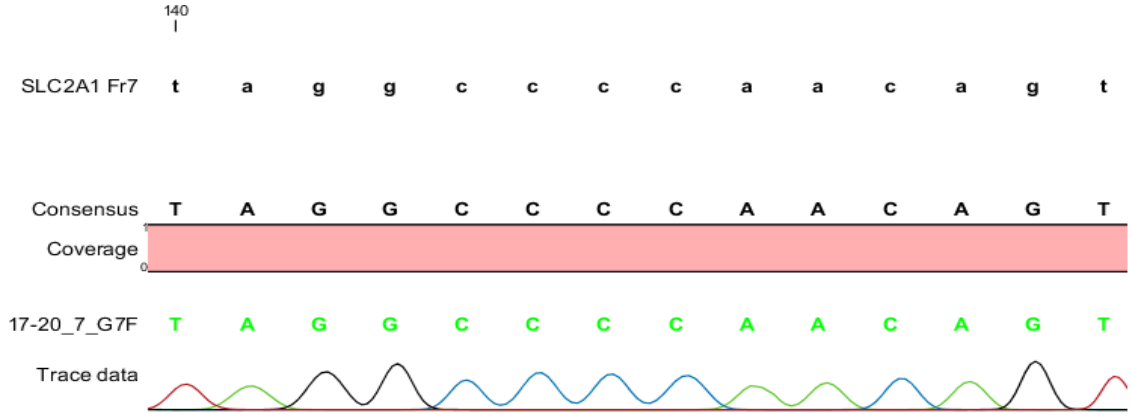
Her reaksiyon, dört normal nükleotid artı bir dideoksinükleotid stok içerir. Dideoksinükleotidler, müteakip nükleotidlerin ilavesini önleyen modifiye edilmiş nükleotidlerdir ve bu suretle nükleotid zincirine dahil edildiğinde uzama sona erer. Dideoksi dizilemesi, bir şablon DNA dizisine tamamlayıcı olan DNA ipliklerinin sentezine dayanır. Sekanslama reaksiyonunda, iplik uzaması için normal deoksinükleosid trifosfatlar (dNTP'ler) ve modifiye dideoksinükleosid trifosfatlar (ddNTP'ler) kullanır. DdNTP'ler, bir floresan etiketi ile kimyasal olarak değiştirilir ve fosfodiester bağ oluşumunu engelleyen bir kimyasal grupla, DNA polimerazın bir ddNTP eklendiğinde DNA uzantısını durdurmasına neden olur. Elde edilen DNA parçaları, parçacıkların boyutlarına göre farklı hızlarda jel benzeri bir matriksten aktığı kılcal elektroforeze tabi tutulur. Modifiye edilmiş ddNTP'lerin her biri, ayrı bir flüoresan etiketi taşır. Her uyarılan floresan boyadan yayılan floresan sinyali, orijinal DNA şablonundaki nükleotitin kimliğini belirler (26).



Şekil 3-13. Sanger dizileme aşamaları

3.2.4.1.Sanger Dizi Analizi

Sanger Yöntemi için laboratuvarımızda dizilenmesi istenilen gen bölgelerine özgü primerler tasarlanmış, klasik pzlrları yapılmış ve pzl ürünleri primerler ile birlikte hazırlanmıştır. Dizileme aşaması için MacroGen firmasından hizmet alınmıştır. Gelen ab.1 uzantılı dizi sonuçları, CLC Main Workbench ile analiz edilmiştir.



Şekil 3-14. Referans dizisi (üstte) ve örnek DNA dizisinin (altta) Sanger sonucunun CLC main workbench üzerinde karşılaştırmalı analizi

3.2.5.SNP Array Yöntemi ile *de novo* Varyantların Konfirmasyonu

Yüksek çözünürlüğe sahip SNP array yöntemi, fenotipi etkileyen ve etkilemeyen çoğu genetik hastalık ile ilgili yapısal varyasyonun (yinelenmeler, delesyonlar, amplifikasyonlar, uniparental dizomi, kopya sayısı değişimleri, heterozigotluk kaybı (LOH) ve mozaizm dahil olmak üzere), yüksek verimli analiz ve tespit için tasarlanmış tüm genom tarama panelidir (27).

Ölçeklenebilir ve verimi kanıtlanmış bir yöntem olan SNP array, floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya karşılaştırmalı genomik hibridizasyona (CGH) nazaran daha küçük bölgeleri tespit etmek için büyük ölçüde daha iyi bir çözünürlük sunar. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, SNP dizileri deneysel araştırmalarda kullanılmış ve spesifik hastalıkların, özellikle kanserin altında yatan genetik lezyonları belirleyerek, birçok alanda yeni keşifler yapılmasına olanak sağlamıştır (28).

Dahası, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları yapmak için kullanılabilir. 2015 ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) standartları ve klavuzuna göre, varyantın *de novo* olduğunun kesinleşmesi

için indeks ile anne ve babası arasında kan bağı olduğu kanıtlanmalıdır (29). Bu çalışma kapsamında bizim geliştirdiğimiz özel bir yaklaşım ile SNP array yöntemi, Sanger dizi analizinde novel ve *de novo* tespit edilen varyantlara sahip bireylerin parental konfirmasyonunu genotipleme yoluyla göstermek için kullanılmıştır. Verilerin non informatif kontenti yüksek olduğundan yapılan analizler informatif sonuçlar seçilerek gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle çalışmanın prensibi, biyolojik anne ve baba olduğu düşünülen bireylerin tüm genom homozigot tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesi ve bu doğrultuda çocuk için mecburi heterozigot değişimlerin tespiti esasına dayanmaktadır. Bu geliştirilen yöntem ile aynı zamanda laboratuvarımız tarafından Adli Tıp Kurumuna destek verilmektedir (30).

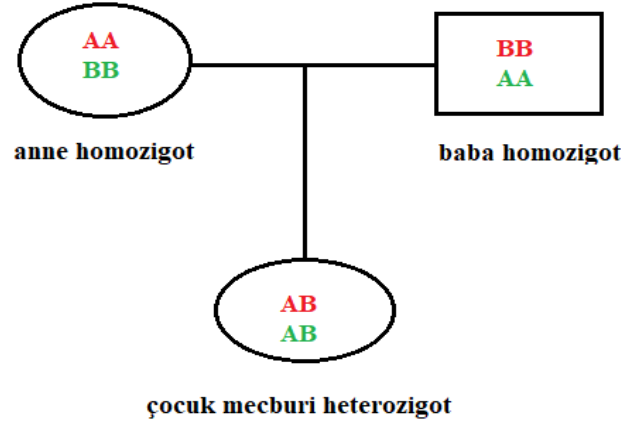
SNP Array yöntemini kullanışlı kılan özellik kullanıcıya 2 basamaklı analiz imkanı sağlamasıdır. Birinci basamak olan allel dağılımında DNA'nın taşıdığı SNP alleli ile uyumlu prob bağlanır ve tek baz uzama prensibi ile genomdaki değişimin tespiti yapılır. Analize yeni bir boyut katan bu parametre B Allel Frekansısıdır (BAF). Her bir SNP'e ait 2 allelin baz yapısı ne olursa olsun A ve/veya B allel frekansı cinsinden ifade edilir. Bu sayede heterozigot olan (AB) ve olmayan (LOH; AA veya BB) bölgeleri belirlenebilir. İkinci basamak ise, hasta bireylerin hedef sinyal yoğunluklarının referans sinyal yoğunlukları ile karşılaştırılarak her bir SNP ile ilişkili bir de CNV değeri elde edilir. Bu değer için kullanılan sinyal yoğunluğu Log R kesri (Log R Ratio: LRR) ile ifade edilir. Bu değerdeki artış ya da azalış, CNV varlığını gösterir. Tespit edilen CNV değerine bakılarak LOH bölgelerinin gerçek homozigotluk mu yoksa delesyon kaynaklı allel kaybı mı olduğu anlaşılabilir (31).

Bu çalışmadaki parental konfirmasyon analizinde B Allel Frekansısı parametresi kullanılmaktadır.

3.2.5.1.B Allel Frekansısı (BAF)

Bir SNP'nin BAF değeri elde edildiğinde, bu SNP için genotipleme yapılan bireyin farklı alellerinin dağılımı ile homozigotluk ve mozaiklik gibi farklı kriterler hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Her bir SNP'e ait 2 allelik baz yapısı ne olursa olsun (A-T, A-C, A-G, T-C, T-G veya C-G değişimleri) her alel A ve B olarak gösterilir. Kontrol veri havuzundaki düşük frekanslı alel B ile gösterilir. Bir bireyde belirli bir SNP'ye ait DNA baz altyapısını grafiksel olarak görebilmek için basit ve tek

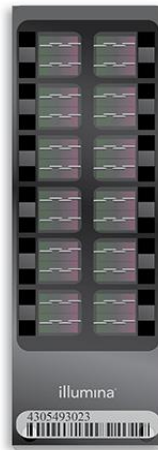
bir parametre kullanılır: B alelinin, A+B alellerine göre miktarı, yani B alel frekansı (BAF). CNV içermeyen bir otozom bölgesinde yer alan iki alelli bir SNP için bir birey ya heterozigottur ya da her iki alelden biri için homozigottur (32).



Şekil 3-15. Bu çalışmada genotipleme amacıyla filtrelenen SNP Array verisi (Anne:AA, Baba:BB, Çocuk:AB - Anne:BB, Baba:AA, Çocuk:AB olduğu durumlar)

3.2.5.2.HumanCytoSNP-12 v2.1 BeadChip

Bu çalışma kapsamında, 12-örneklik Illumina HumanCytoSNP-12 BeadChip kullanılmıştır (Şekil.3-16). 300k belirteç içeren çip, prob aralığı 10 kb genomaya yayılmış yaklaşık 220k belirteci içerir.

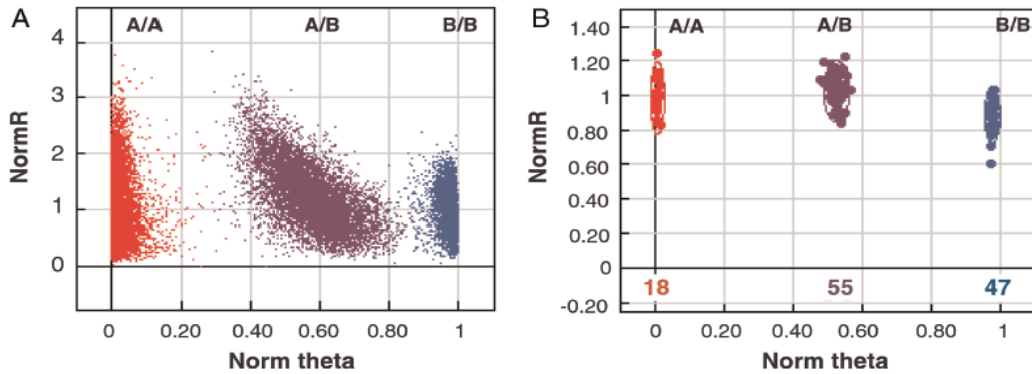


Şekil 3-16. Illumina HumanCytoSNP-12 BeadChip görseli (33)

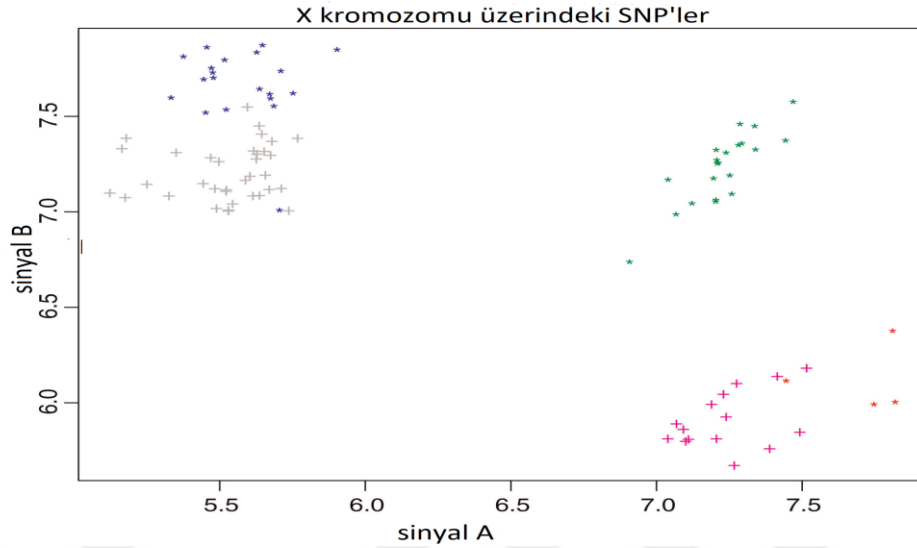
SNP Array analizi aşamasında GenomeStudio Software 2.0 biyoinformatik aracı kullanılmıştır.

3.2.5.3.GenomeStudio Software 2.0

GenomeStudio'daki genotiplerin grafiksel gösterimi, aramaya göre renk kodlu noktalar (kırmızı = AA, mor = AB, mavi = BB) şeklinde sınıflandırılır. Genotipler, her bir örnek için (nokta), belirli bir SNP işaretçisi ile kanonik küme pozisyonlarına (koyu gölgelendirme) göre sinyal yoğunluğu (norm R) ve Allel Frekansı (Norm Theta) ile çağrılır. GenomeStudio Genotipleme (GT) Modülü, Infinium ve GoldenGate genotipleme dizisi verilerinin analizini destekler. Bu modül, etkin genotipleme veri normalizasyonu, genotip arama, kümeleme, veri yoğunluğu analizi, heterozigotluk kaybı (LOH) hesaplama ve kopya sayısı varyasyonu (CNV) analizi sağlar. Infinium LIMS sunucusu ile tamamen entegre olan GT Modülü, verilere doğrudan erişmeyi ve projeleri doğrudan GenomeStudio'dan yönetmeyi sağlar (34).



Şekil 3-17. Sinyal yoğunluğu (norm R) ve Allel Frekansı (Norm Theta)(kırmızı = AA, mor = AB, mavi = BB) (35)



Şekil 3-18. Normalleştirilmiş ve özetlenmiş alel yoğunlukları. Her bir SNP, A ve B allelleri için bir çift yoğunluk değeriyle (A, B) temsil edilir. Farklı genotip kümelerinde ayrımı açıkça gösteren bir X kromozom üzerindeki SNPlerin şeması gösterilmiştir. Bu kümelendirme ayrıca farklı kopya sayılarının ayırt edilebildiğini de gösterir. Erkekler, belirli bir SNP (yani, AY veya BY) için haploiddir ve homozigot olarak fakat azalmış alel yoğunluğu ile ortaya çıkarlar. (Gri: BY; mavi: BB; yeşil: AB; kırmızı: AA; ve pembe: AY) (35)

3.2.6.Gradient PZR Yöntemi ile Optimal Primer Dizisi, Konsantrasyonu ve Primer Bağlanma Sıcaklıklarının Tespiti

qRT-PZR sürecine başlanmadan önce tüm deneysel koşullar optimize edilmelidir (36). Bu sebeple, kullanılacak primer çiftlerinin her biri için en uygun bağlanma sıcaklığı, q RT PZR da kullanılacak olan master mix ile hazırlanmış ve gradient pcr protokolünde uygulanmıştır. Gradient PZR prensibi, aynı pcr reaksiyonunda aynı şekilde hazırlanmış 12 adet tüpün 12 farklı sıcaklık ile muamele görmesi şeklindedir. Daha sonra optimal sıcaklığın görülmesi için pqr ürünlerinin agaroz jelde konfirmasyonu yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda (Tablo.3-10), her bir pqr tüpü için gerekli olan reaktifler ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3-10: Gradient PZR hazırlık aşamasında bir reaksiyonluk reaktifler ve miktarları

Reaktif	Kullanılacak Miktar (x1)	Konsantrasyon
H2O	2 µl	
Primer Forward	0,5 µl	2.5 Um

Primer Reverse	0,5 µl	2.5 Um
SYBR Green Master Mix	5 µl	
DNA	2 µl	50 ng

Gradient PZR protokolünde 56-67°C'lik bir gradyan aralığı belirlenmiştir. Bunun anlamı, yatay olarak sıralanmış tüplerden ilkinе uygulanacak bağlanma sıcaklığının 56°C, en sonuncusuna uygulanacak olan bağlanma sıcaklığının 67°C olduğudur. Her bir tüp için sıcaklık farkı 1°C artacak şekilde ayarlanmıştır. Aşağıdaki tabloda, gradient pqr protokolü verilmiştir (Tablo.3-11)

Tablo 3-11: Primer bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için uygulanan gradient pqr protokolü

Denatürasyon aşaması	94°C	10 saniye
Bağlanma aşaması	56-67°C	15 saniye
Uzama aşaması	72°C	20 saniye
Sonlanma	14°C	5-10 dk

3.2.7.Kantitatif Eş-Zamanlı PZR (q-RT PZR) ile CNV Tespiti

Kantitatif PZR, PZR döngüleri sırasında gerçek zamanlı olarak çalıştığından PZR ürününü algılamak için floresan ya da interkalasyon boyaları ekleyerek hedef DNA miktarını ölçer. qPZR işlemi, kromozomal DNA, mitokondriyal DNA veya RNA'nın ters transkripsiyonu ile üretilen cDNA da dahil olmak üzere, herhangi bir DNA materyalinin mutlak veya göreceli nicelenmesi için kullanılabilir. Sağlam bir qPZR testi, kopya sayısı analizi de dahil birçok analize olanak sağlar; ancak, primerler ve sıcaklık gibi bazı diğer koşullar, deneysel protokole başlanmadan önce optimizasyon gerektirebilmektedir (37). Bu çalışmada, gradient pcr ile her bir primer çifti optimal bağlanma sıcaklıkları belirlendikten sonra, q RT PZR aşamasına geçilmiştir.

qRT-PZR, DNA'dan incelenen genetik bölgenin kopya sayısının nicelleştirilmesi için temel bir protokoldür. DNA kopya sayısını ölçmek için, incelenen amplikonun, o genin benzersiz dizileri olan bir ekzon veya intronun içinde yer alması gerekmektedir. Çalışmaya, iki kopyalı (allel) bir kontrol geni de dahil edilmelidir. Bütün bileşenleri içeren bir ana karışım hazırlanmalı ve 96'lık well-plate halinde dağıtılmalıdır. Her reaksiyon için DNA kalıbı ve istenilen gen bölgesine ait primerler de eklenmelidir (38).

Avantajları

- qPZR, çok sayıda numunenin analizi için uygundur.
- Genomik delesyon ve insersiyonları tespit etmek için PZR tabanlı testlere izin veren basit PZR modifikasyonudur.
- PZR sonrası işlemlere gerek yoktur, böylece el emeği ve malzeme maliyetleri azaltılır.
- Belirli bir gen için teşhis konulduktan kısa bir zaman içinde uygulanabilir.

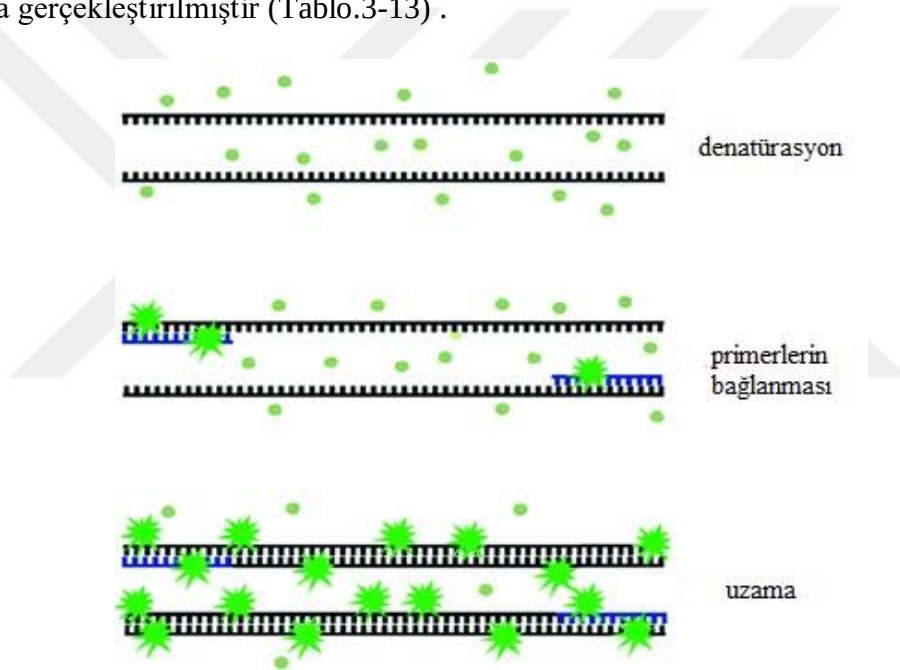
Dezavantajları

- Test, DNA kalitesinden etkilenebilir.
- Analiz yöntemini kullanmak için, normal kontrol geninin veya bölgenin 2 kopyası olmalıdır.
- Sonuçlar, tamsayılar arasında değişebilir (örneğin, 1-3 katlı genomik materyal), yorumu daha zor hale getirir.
- Her çalışma için üçlü çalışma gereklidir ve replikasyon gerekebilir, çünkü DNA'nın analiz gereklilikleri artar.
- CNV boyutu küçükse (örn. 100 bp'den düşük) veya tekrar eden bir bölgede veya genom içinde benzersiz olmayan bir DNA sekansı içerdiğinde, deney için qPZR primerleri tasarlamak zor olabilir.
- Sonuçlar mozaiklerden etkilenebilir (39).

Bu çalışmada, GLUT1-ES fenotipi gösteren ve Sanger dizi analizinde herhangi bir patojenik varyasyon saptanmayan 7 hastada, daha geniş ölçekli (örneğin; allel kaybı)

delesyon ve insersiyonların varlığının incelenmesi için *SLC2A1* genindeki 10 ekzonun her birine ayrı ayrı kantitatif eş-zamanlı pzs işlemi uygulanmıştır.

Primerler, GLUT1-ES için tanımlanan CNV'leri çakıştıracak şekilde Primer3 programıyla tasarlanmıştır. GLUT1 için CNV'lerden yoksun olduğu bilinen kromozom 21 üzerindeki bir bölgeye ait *PCBP3* geni, kopya sayısını belirlemek ve deney etkinliğinin normalizasyonu için bir iç kontrol olarak kullanılmıştır. Sağlıklı erişkinlerden elde edilen DNA örnekleri sağlıklı kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir PZR reaksiyonu, Sybr Green Master Mix ile total reaksiyon 10 ul hacim olacak şekilde Roche LightCycler LC-480 Gerçek Zamanlı PZR Sistemi cihazında aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir (Tablo.3-13) .



Şekil 3-19. Syber Green boyasının bağlanması ve çalışma prensibi (36)

Şekilde görüldüğü üzere SYBR Green boyası, DNA çift iplikli durumdayken bağlanabilmektedir. DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrıldığında serbest hale geçer. Polimerizasyon tamamlandığında ise boya tekrar çift iplikli DNA'ya bağlanır ve floresan ışıma yapar (40).

Tüm reaksiyonlar üçlü olarak yürütülmüştür. Etkilenen bireylerde ve kontrollerde CNV'leri analiz etmek için delta-delta ct yöntemi ve erime eğrisi analizi kullanılmıştır.

Tablo 3-12: qRT-PZR içeriği ve konsantrasyonları

Malzemeler	Kullanılacak Miktar (x1)	Konsantrasyon
H2O	2 µl	
Primer_F	0,5 µl	10 Um
Primer_R	0,5 µl	10 Um
Master Mix	5 µl	2x
DNA	2 µl	20 ng
ALQ	8 µl	

Tablo 3-13: qRT-PZR protokolü

Ön-İnkübasyon(x1)		İvme
95°C	5 dk	4,4
Bağlanma (x45)		
95°C	10 sn	4,4
60°C	7 sn	2,2
72°C	5 sn	4,4
Erime Eğrisi (x1)		
95°C	5 sn	4,4
65°C	1 dk	2,2
97°C	Continuous	
Soğuma		
40°C	10 sn	1,5

3.2.7.1.PZR Verimi Hesaplama

Standart eğrinin eğimi, PZR veriminin bir göstergesidir. Eğim; şablon kalitesi, pipetleme hataları vb. ile etkilenebilir ve bu nedenle, endojen referans geni için standart bir eğri her zaman aynı plaka (plate) üzerinde çalışılmalıdır. Referans gen ile ve hedef gen eğimleri arasındaki fark 0,1'den küçük olmalıdır (41).

Loglineer fazın, PZR reaksiyonunun erken plato fazından aşağı doğru yeniden yapılandırılmasıyla, taban çizgisini tahmin eden bu algoritmanın geliştirilmesi sayesinde çoklu tekrarlanabilir PZR değerlerinin (ikili,üçlü veya daha fazla) log-lineer fazdaki veri noktalarının alt kümesine bir regresyon çizgisi yerleştirilerek, her bir örnek için PZR verimi değerleri hesaplanabilmektedir. Numune başına başlangıç konsantrasyonunun bir tahmininin hesaplanmasında ampirik başına bu PZR verimlerinin ortalaması kullanıldığında, qPZR sonuçlarındaki değişkenlik ve yanlışlık önemli ölçüde azaltılabilmektedir (42).

3.2.7.2.Delta-Delta CT Hesaplama Methodu

2- $\Delta\Delta CT$ yöntemi niceliksel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) veri analizi için göreceli bir kantifikasyon stratejisi olarak kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem, hesaplama için qPZR sistemi tarafından üretilen eşik döngülerini (CT) doğrudan kullanan, farklı örnekler arasındaki göreceli gen miktarı veya ekspresyonu düzeylerini hesaplamak için uygun bir yoldur. Eşik döngüsü (CT), floresan seviyesinin belirli bir miktara ulaştığı döngüdür (43).

qRT-PZR verilerini analiz etmek için, absolut (mutlak) ve rölatif (göreceli) nicelik olmak üzere iki strateji vardır. Mutlak niceleme, standart bir eğriye dayalı reaksiyondaki mevcut genin miktarını tanımlar. Aksine, göreceli kantifikasyon, bir referans numuneye kıyasla gen ekspresyonundaki veya miktarındaki değişiklikleri belirler. Göreceli kantifikasyon mutlak kantifikasyona göre daha kolaydır ve standart bir eğri üretmeye gerek olmadığından daha az reaktif gerektirir. Standart bir eğri oluştururken standart dilüsyonların neden olduğu hatalar da önlenir. Bu nedenle, göreceli niceleme yaygın şekilde uygulanmaktadır (44).

Rölatif kantifikasyon stratejisinde, normalleştirici olarak bir referans geni kullanarak hedef ve referans numunelerindeki göreceli gen ekspresyonunu veya miktarını hesaplamak için qPZR sisteminden üretilen CT bilgisini doğrudan kullanır. Bir hedef örnek, örneğin bir tedavi edilen veya hasta örneği olabilir, bir referans ise tedavi edilmeyen veya sağlıklı bir kontroldür. Hedef ve referans örneklerinden alınan numuneler, farklı zaman noktalarında tedavi edilen örnekler veya diğer farklı gruplardan örnekler olabilir. Her bir numune için eklenen DNA / RNA miktarındaki farklılıkları düzeltmek ve PZR kurulumu ve döngü sürecinin neden olduğu

varyasyonları azaltmak için, PZR'leri normalleştirmek için referans genler veya iç kontrol genleri kullanılmıştır. Glisepitiddehit 3-fosfat dehidrojenaz (*GAPDH*), (P-aktin ve 18S rRNA) gibi genler, yaygın olarak kullanılan referans genlerdir, çünkü ekspresyon seviyeleri herhangi bir tedaviye yanıt olarak nispeten stabil kalır (45). Bu tez çalışması kapsamında rölatif kantifikasyon stratejisi ve *PCBP3* referans geni kullanılmıştır.

$\Delta\Delta CT$ miktarı, ilk ΔCT , hedef ve referans genler arasındaki eşik çevrimindeki farktır:

$$\Delta CT = CT (\text{hedef gen}) - CT (\text{referans gen})$$

$\Delta\Delta CT$, yukarıdaki formülde hedef ve referans örnekleri arasında açıklandığı gibi ΔCT 'deki farktır:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{hedef gen}) - \Delta CT (\text{referans gen})$$

Bu yöntemin nihai sonucu, bir referans genine normalize edilen bir referans numuneye göre hedef bir örnekte hedef gen ekspresyonunun/miktarının kat değişikliği olarak sunulur. Göreceli gen ifadesi genellikle referans numuneler için 1'e ayarlanır, çünkü $\Delta\Delta CT$ 0'a eşittir ve bu nedenle 2^0 1'e eşittir.

2- $\Delta\Delta CT$ yöntemi, tüm örneklerde %100'lük düzgün bir PZR amplifikasyonu verimliliğini varsayar. 2 değeri (%100) bir PZR amplifikasyon verimliliğini temsil eder. Bu varsayım, yöntemin gerçekleştirilmesini kolaylaştırır ve optimal koşullar altında geçerli olabilir. Bununla birlikte, PZR inhibitörleri veya güçlendiricilerin varlığı, DNA/RNA ekstraksiyonu ve problemlerin, primerlerin ve enzimlerin farklı miktar ve koşullarda kullanımları gibi faktörler nedeniyle PZR veriminin %100 olması çok güçtür. Önceki çalışmalar, PZR veriminin %60'dan %110'a , %80'den %100'e ve %65'den %90'a değiştiğini göstermiştir. PZR verimliliğindeki varyasyonlar daha sonraki 2- $\Delta\Delta CT$ sonuçlarının bozulmasına yol açar. Örneğin, verimlilikler, 1,78'den 1,82'ye kadar 0,04 gibi küçük bir aralıkta değiştiğinde, katlama farkında 4 katlık bir hatayla sonuçlanır. Bir hedef gen ile bir referans gen arasındaki %5'lik PZR verimindeki bir fark, ekspresyon oranında yanlış hesaplanan bir farkın %432 oranında artmasına neden olabilir. Bu nedenle, nispi miktar tayini yapmadan önce numuneye özgü PZR verimlerinin değerlendirilmesi gereklidir (44).

Özet olarak, q RT-PZR yöntemi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir:

1. Öncelikle X-XX kantitasyon denemesi yapılmış ve q RT-PZR yönteminin, kopya sayısı değişiminin tespitinde güvenilebilirliği test edilmiştir.
2. q RT-PZR aşamasında kullanılacak olan master mix ve primerler kullanılarak Gradient PZR uygulanmıştır. Bunun sebebi, optimal primer bağlanma sıcaklıklarının tespit edilmesidir.
3. Çalışılabilirliği gösterilen yöntemin verim hesaplaması yapılmıştır.
4. Çalışılan bireylerin pqr sonuçlarının $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplaması yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Sanger Dizi Analizi Sonucu Tespit Edilen Varyasyonlar

Klinikten gelen geri bildirim üzerine önce *PRRT2* gen hot spot bölgesi olan *BFIC2* lokusunun analizi yapılan E17-79 kodlu hastada, bu gen bölgesindeki herhangi bir varyanta rastlanmamış, bu sebeple diğer hastalarla birlikte *SLC2A1* gen analizi çalışmasına dahil edilmiştir.

Sanger dizileme yöntemi ile analiz edilen GLUT1-ES sahip 7 hastada, 8 farklı varyant saptanmıştır. Bunlardan 2 tanesi novel ve *de novo* varyant olup, diğer 6 tanesi bilinen varyantlardır. Bilinen varyantlardan 2 tanesi (rs11537641,rs2229682) 4 hastada (15-30,15-47,17-20,17-79) ve 1 tanesi (rs1385129) 3 hastada (15-40,17-20,17-79) ortak bulunmuştur. *In-siliko* araçlar aracılığıyla incelendiğinde, bilinen varyantların fenotip etkilerinin benign, novel ve *de novo* olan 2 varyantın ise fenotip etkilerinin patojenik olduğu değerlendirilmiştir. Novel varyantlardan biri kırılma (splice acceptor), diğeri çerçeve kayması (frame shift) varyanttır. Bilinen varyantlardan biri (rs11537640) 5' UTR, ve diğer 5 tanesi (rs11537641, rs2229682, rs1385129, rs755559487, rs76672402) sinonim (synonymous) varyanttır.

Bulunan tüm varyasyonlar ve bilgileri Tablo.4-1'de özetlenmiştir.

Tablo 4-1. Sanger dizileme analizi sonucunda bulunan varyantlar ve bilgileri

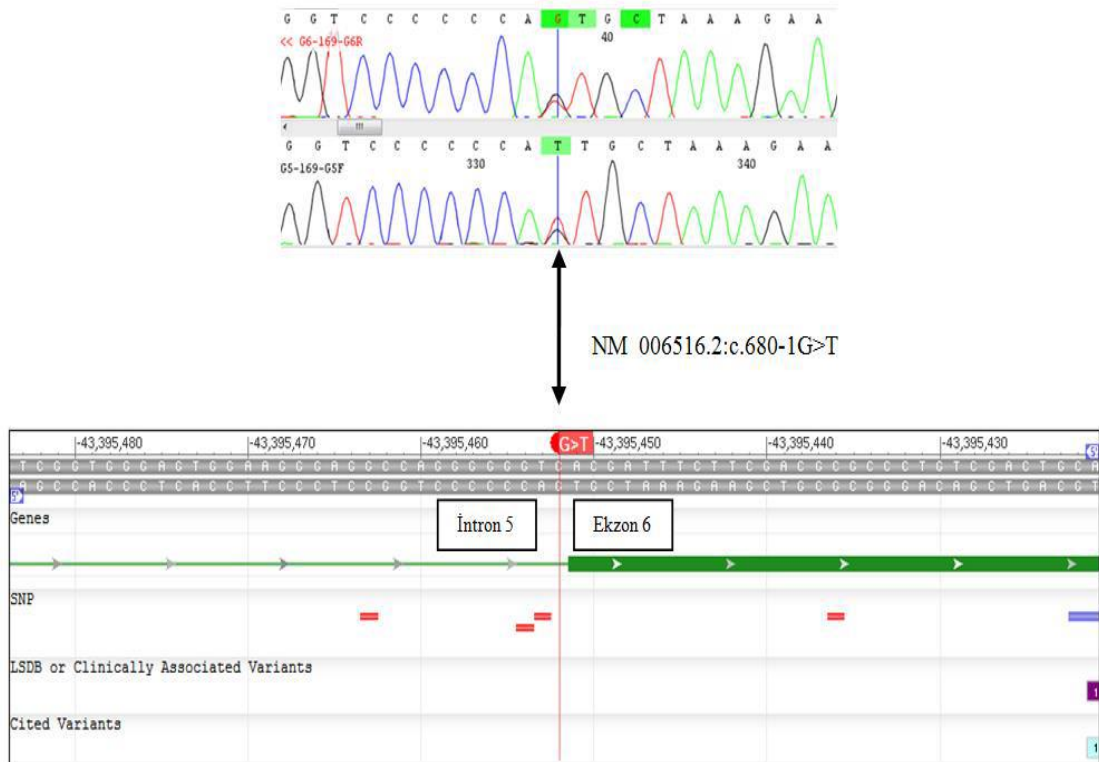
Transkript No	ENST00000426263.8				
Hasta Kodu	11-169	13-83	15-30		15-40
Fragman No	Intr 5	Fr 5	Fr 4	Fr 5	Fr 2
rs kodu	novel	x	rs11537641	rs2229682	rs1385129
genomik poz (NG_008232.1) NC_000001.11	g.42929781C>A	g.42930010delC	g.42930743G>A	g.42929964C>T	g.42943295G>A
cdna poz (NM_006516.2)	c.680-1G>T	c.542delG	c.399C>T	c.588G>A	c.45C>T
protein poz (NP_006507.2)	p.Gly53=	p.(Gly181Alafs*10)	p.Cys133=	p.Pro196=	p.Ala15=
Kodon	-	GGC/GC	TGC/TGT	CCG/CCA	GCC/GCT
zigosite	Het	Het	Het	Het	Het
MAF	yok	x	0.14 (A)	0.12 (T)	0.24 (A)
variant tipi	kırılma noktası varyantı	çerçeve kayması varyantı	sinonim varyant	sinonim varyant	sinonim varyant
VEP	yüksek risk	yüksek risk	düşük etki- benign	düşük etki- benign	düşük etki- benign
SIFT (<0.05:zararlı, >0.05: tolere edilebilir)	-	-	-	-	-
PolyPhen 0 (benign) - 1 (zararlı)	-	1	-	-	-
Mutation taster	patojenik	patojenik	benign	benign	benign
Yorum	patojenik	patojenik	benign	benign	benign

Transkript No	ENST00000426263.8				
Hasta Kodu	15-47		17-20		
Fragman No	Fr 4	Fr 5	Fr 2	Fr 4	Fr 5
rs kodu	rs11537641	rs2229682	rs1385129	rs11537641	rs2229682
genomik poz (NG_008232.1) NC_000001.11	g.42930743G>A	g.42929964C>T	g.42943295G>A	g.42930743G>A	g.42929964C>T
cdna poz (NM_006516.2)	c.399C>T	c.588G>A	c.45C>T	c.399C>T	c.588G>A
protein poz (NP_006507.2)	p.Cys133=	p.Pro196=	p.Alal5=	p.Cys133=	p.Pro196=
Kodon	TGC/TGT	CCG/CCA	GCC/GCT	TGC/TGT	CCG/CCA
zigosite	Het	Het	Het	Het	Het
MAF	0.14 (A)	0.12 (T)	0.24 (A)	0.14 (A)	0.12 (T)
varyant tipi	sinonim varyant	sinonim varyant	sinonim varyant	sinonim varyant	sinonim varyant
VEP	düşük etki- benign	düşük etki- benign	düşük etki- benign	düşük etki- benign	düşük etki- benign
SIFT (<0.05:zararlı, >0.05: tolere edilebilir)	-	-	-	-	-
PolyPhen 0 (benign) - 1 (zararlı)	-	-	-	-	-
Mutation taster	benign	benign	benign	benign	benign
Yorum	benign	benign	benign	benign	benign

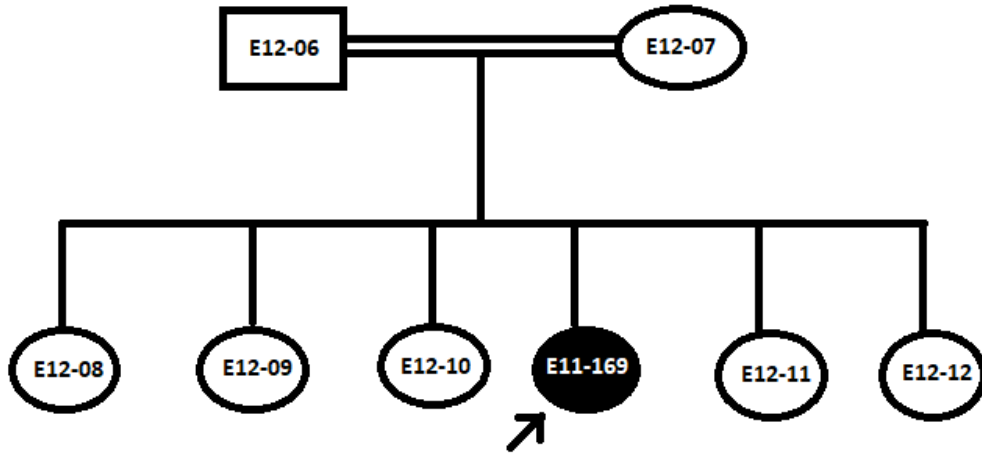
Transkript No	ENST00000426263.8				
Hasta Kodu	17-79				
Fragman No	Fr 1	Fr 2	Fr 4	Fr 4	Fr 5
rs kodu	rs11537640	rs1385129	rs76672402	rs755559487	rs2229682
genomik poz	g.42958848T>G	g.42943295G>A	g.42930830G>C	g.42930758G>A	g.42929964C>T
cdna poz (NM_006516.2)	c.-197A>C	c.45C>T	c.312C>G	c.384C>T	c.588G>A
protein poz (NP_006507.2)	-	p.Ala15=	p.Phe104Leu	p.Ile128=	p.Pro196=
Kodon	-	GCC/GCT	TTC/TTG	ATC/ATT	CCG/CCA
zigosite	Hom	Het	Het	Hom	Het
MAF	0.23 (G)	0.24 (A)	<0.01 (A)	<0.01 (A)	0.12 (T)
variant tipi	5 UTR varyant	sinonim varyant	yanlış anlamlı varyant	sinonim varyant	sinonim varyant
VEP	Orta etki	düşük etki- benign	Orta etki	düşük etki- benign	düşük etki- benign
SIFT (<0.05:zararlı, >0.05: tolere edilebilir)	-	-	0.52	-	-
PolyPhen 0 (benign) - 1 (zararlı)	-	-	0.004	-	-
Mutation taster	benign	benign	benign	benign	benign
Yorum	benign	benign	benign	benign	benign

4.1.1.c.680-1G>T

11-169 kodlu GLUT1 DS hastasında tespit edilen, diğer aile bireylerinin de analizi ile *de novo* olduğu kanıtlanan *SLC2A1* geninin 5/9 intron bölgesinde yer alan bu novel heterozigot varyant aminoasit değişimi yapmamaktadır ancak genin kırılma noktasında yer aldığı için transkript oluşumuna etkisi olabileceği düşünülmektedir. Çeşitli veritabanları aracılığı ile etkisi patojenik olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-1. 11-169 kodlu hastanın fr-5 de bulunan novel varyantının CLC görüntüsü



Şekil 4-2. 11-169 kodlu hastanın aile pedigrisi

SLC2A1 c.680-1G>T

Sequences

Reference sequence

SLC2A1 Gene > ENST00000426263 Transcript > Exon number: 6 (188 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

1gtacgggcat ggccttgccc tctctccccc tccctgagcc ctggccttct tcccactctg agccaccctc accttccctc cggteccccc agTGCTAAAG
 101AAGCTGCGCG GGACAGCTGA CGTGACCCAT GACCTGCAGG AGATGAAGGA AGAGAGTCGG CAGATGATGC GGGAGAAGAA GGTACCATC CTGGAGCTGT
 201TCCGCTCCCC CGCCTACCGC CAGCCCATCC TCATCGCTGT GGTGCTGCAG CTGTCCAGC AGCTGCTTGG CATCAACGCT gtgagtgccc ccaaccaccc
 301tctctgtgccc ccagccaaagc cctctggtca agtgtgcatg gtgaacaagt cccaaacttg aaacaacaga tacgcctctg
 Total sequence length: 380 nucleotides

Mutant sequence

1gtacgggcat ggccttgccc tctctccccc tccctgagcc ctggccttct tcccactctg agccaccctc accttccctc cggteccccc aTGCTAAAG
 101AAGCTGCGCG GGACAGCTGA CGTGACCCAT GACCTGCAGG AGATGAAGGA AGAGAGTCGG CAGATGATGC GGGAGAAGAA GGTACCATC CTGGAGCTGT
 201TCCGCTCCCC CGCCTACCGC CAGCCCATCC TCATCGCTGT GGTGCTGCAG CTGTCCAGC AGCTGCTTGG CATCAACGCT gtgagtgccc ccaaccaccc
 301tctctgtgccc ccagccaaagc cctctggtca agtgtgcatg gtgaacaagt cccaaacttg aaacaacaga tacgcctctg
 Total sequence length: 380 nucleotides

The underlined sequences are analyzed by HSF.

Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context.
 The mutation occurs in the late intronic positions, the following table show results of acceptor splice sites that could be affected by the mutation

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
Broken WT Acceptor Site	1 - HSF Matrices		Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing.
	2 - MaxEnt		

Şekil 4-3. 11-169 kodlu hastanın intron 5 bölgesindeki novel varyantın Human Splicing Finder (HSF) veritabanı fenotip tahmini



mutation t@sting

Prediction

disease causing

Model: *without_aae*, prob: 1 [\(explain\)](#)

Summary

- known disease mutation at this position (HGMD CS057229)
- protein features (might be) affected
- splice site changes

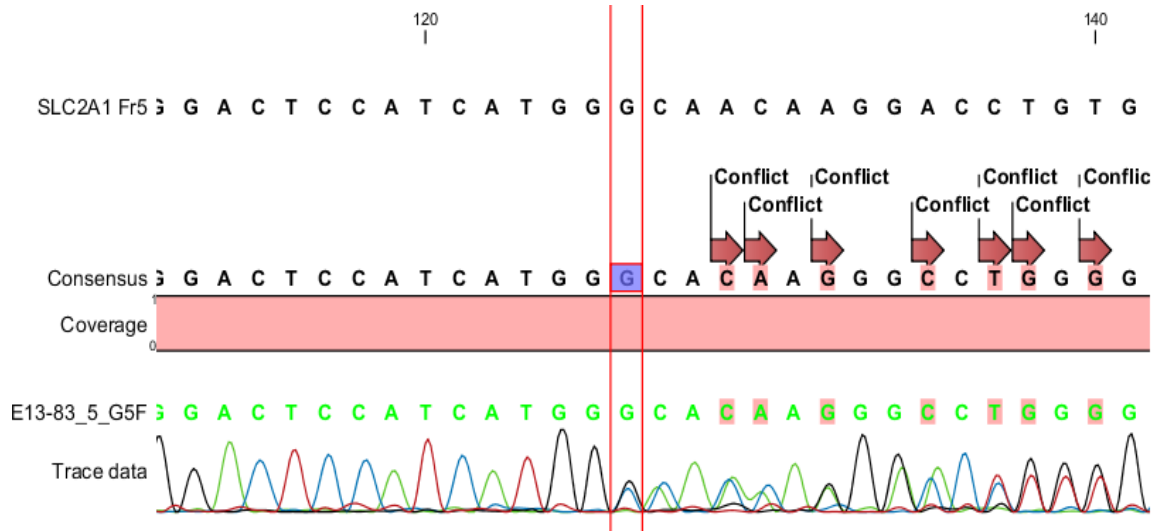
[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr1:43395452C>T show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	SLC2A1
Ensembl transcript ID	ENST00000426263
Genbank transcript ID	NM_006516
UniProt peptide	P11166
alteration type	single base exchange
alteration region	intron
DNA changes	g.29079G>A
AA changes	N/A
position(s) of altered AA (if AA alteration in CDS)	N/A
frameshift	N/A
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC

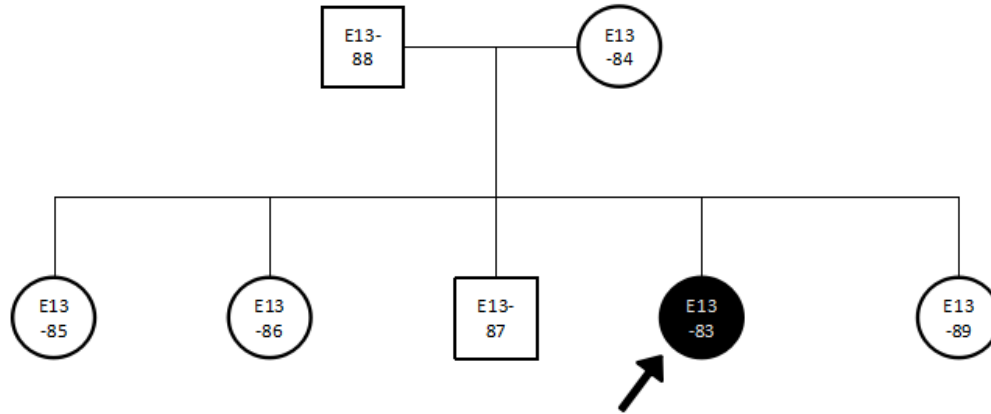
Şekil 4-4. 11-169 kodlu hastanın intron 5 bölgesindeki varyantın Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini ve novel olduğunun gösterimi

4.1.2.c.542delG

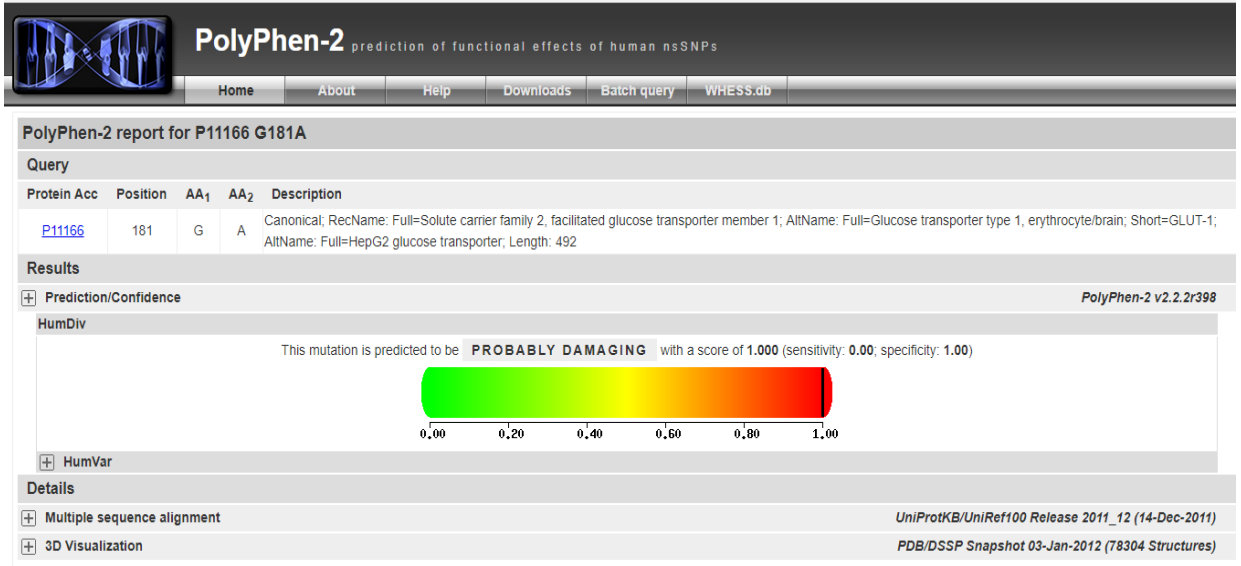
13-83 kodlu GLUT1 DS hastasında tespit edilen, diğer aile bireylerinin de analizi ile *de novo* olduğu kanıtlanan *SLC2A1* geninin 5/10 ekzon bölgesinde yer alan bu novel heterozigot varyant çerçeve kayması varyantıdır ve 181. Glisin aminoasidinin baz dizilimini değiştirerek Alanin aminoasidine çevirmektedir. Çeşitli veritabanları aracılığı ile etkisi patojenik olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-5. 13-83 kodlu hastanın fr-5 de bulunan novel varyantının CLC görüntüsü



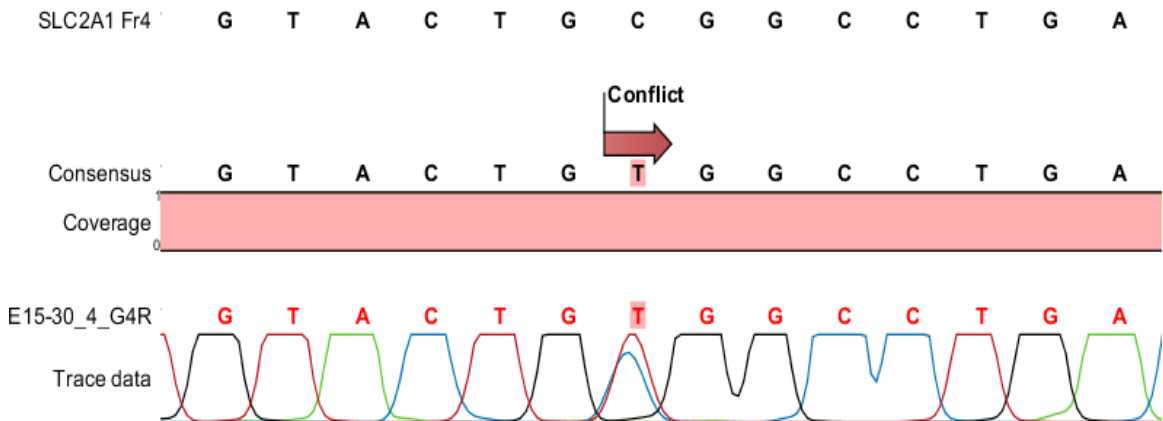
Şekil 4-6. 13-83 kodlu hastanın aile pedigrisi



Şekil 4-7 13-83 kodlu hastanın intron 5 bölgesindeki novel varyantın PolyPhen veritabanı fenotip tahmini

4.1.3.c.399C>T

15-30, 15-47, 17-20 ve 17-79 kodlu GLUT1 DS hastalarında ortak tespit edilen, *SLC2A1* geninin 4/10 ekzon bölgesinde yer alan bu heterozigot varyant sinonim varyanttır ve aminoasit değişimi yapmamaktadır. Bilinen bir varyant olup rs11537641 kodu ile kayıtlıdır. Çeşitli veritabanları aracılığı ile fenotip etkisi benign olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-8. rs11537641 numaralı fragman 4 de bulunan varyantının CLC görüntüsü


[documentation](#)

mutation t@sting

Prediction

polymorphism

 Model: *without_aae*, prob: 5.53383135061625e-19 (classification due to TGP/ExAC, [real probability](#) is shown anyway) ([explain](#))

Summary

- homozygous in TGP or ExAC
- known disease mutation at this position (HGMD CM044065)
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result			
name of alteration	no title			
alteration (phys. location)	chr1:43396414G>A show variant in all transcripts IGV			
HGNC symbol	SLC2A1			
Ensembl transcript ID	ENST00000426263			
Genbank transcript ID	NM_006516			
UniProt peptide	P11166			
alteration type	single base exchange			
alteration region	CDS			
DNA changes	c.399C>T cDNA:578C>T g.28117C>T			
AA changes	no AA changes			
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	N/A			
frameshift	no			
known variant	Reference ID: rs11537641			
	database	homozygous (A/A)	heterozygous	allele carriers
	1000G	55	598	653
	ExAC	2278	18182	20460

Şekil 4-9. rs11537641 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini

SLC2A1 c.399C>T

Sequences

Reference sequence

SLC2A1 Gene > ENST00000426263 Transcript > Exon number: 4 (241 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

```

1 aggggagact tatctgcttg ttccagggtg ttacctctga cccagccctt cggagcccaa ggaatgtggy cactggcctg acctgtgacc cgtccccag
101 GCGGAATTCa ATGCTGATGA TGAACCTGCT GGCCTTCGTG TCCGCCGTGC TCATGGGCTT CTCGAAACTG GGCAAGTCCT TTGAGATGCT GATCCTGGG
201 CGCTTCATCA TCGGTGTGTA CTGGGCCCTG ACCACAGGCT TCGTGCCCAT GTATGTGGGT GAAGTGTCAc CCACAGCCCT TCGTGGGGCC CTGGGCACCC
301 TGCACCAAGCT GGGCATCGTC GTCCGCATCC TCATCGCCCA Ggtaagctgg ggcaggatct acctgcttgg cactggccctt gccacacagt tcagtggctc
401 tcggatctgt gccagcagg gcagagtttc ttttcgccc a
Total sequence length: 441 nucleotides

```

Mutant sequence

```

1 aggggagact tatctgcttg ttccagggtg ttacctctga cccagccctt cggagcccaa ggaatgtggy cactggcctg acctgtgacc cgtccccag
101 GCGGAATTCa ATGCTGATGA TGAACCTGCT GGCCTTCGTG TCCGCCGTGC TCATGGGCTT CTCGAAACTG GGCAAGTCCT TTGAGATGCT GATCCTGGG
201 CGCTTCATCA TCGGTGTGTA CTGTGGGCCCTG ACCACAGGCT TCGTGCCCAT GTATGTGGGT GAAGTGTCAc CCACAGCCCT TCGTGGGGCC CTGGGCACCC
301 TGCACCAAGCT GGGCATCGTC GTCCGCATCC TCATCGCCCA Ggtaagctgg ggcaggatct acctgcttgg cactggccctt gccacacagt tcagtggctc
401 tcggatctgt gccagcagg gcagagtttc ttttcgccc a
Total sequence length: 441 nucleotides

```

The underlined sequences are analyzed by HSF.

Interpreted Data

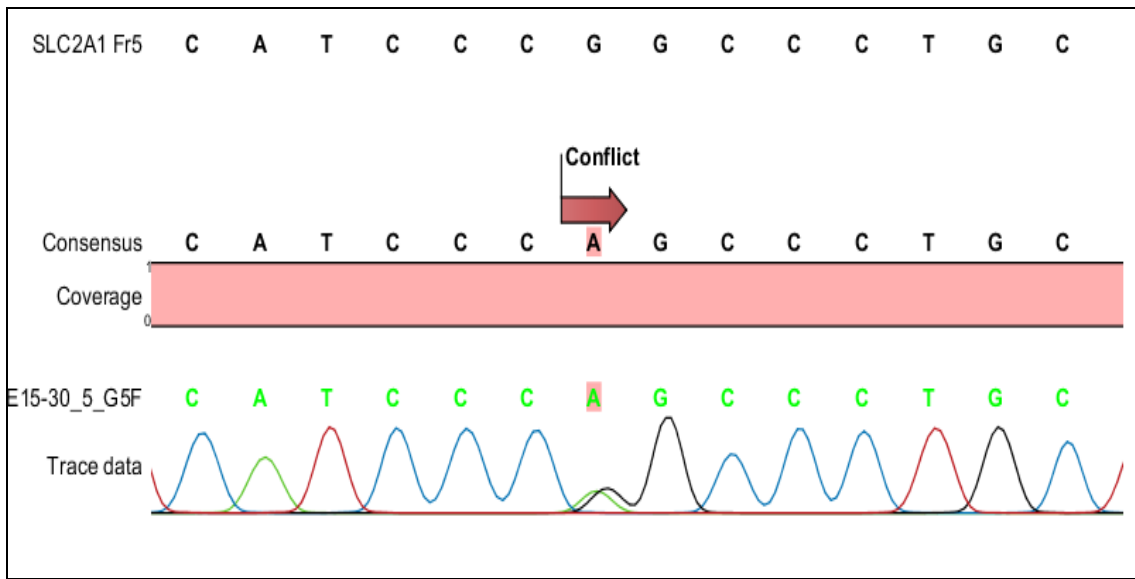
This table shows only relevant results related to the mutation position and context.
The mutation occurs in the late exonic positions, the following table show results of donor splice sites, ESE and ESS that could be affected by the mutation

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New ESS Site	1 - IIEs from Zhang et al.		Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
	2 - ESR Sequences from Goren et al.		
ESE Site Broken	1 - ESR Sequences from Goren et al.		Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
	2 - ESE-Finder - SF2/ASF(Ig)		
	3 - ESE-Finder - SF2/ASF		

Şekil 4-10. rs11537641 numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini

4.1.4.c.588G>A

15-30, 15-47, 17-20 ve 17-79 kodlu GLUT1 DS hastalarında ortak tespit edilen, *SLC2A1* geninin 5/10 ekzon bölgesinde yer alan heterozigot varyant bir sinonim varyanttır ve aminoasit değişimi yapmamaktadır. Bilinen bir varyant olup rs2229682 kodu ile kayıtlıdır. Çeşitli veritabanları aracılığı ile fenotip etkisi benign olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-11. rs2229682 numaralı fragman 5 de bulunan varyantının CLC görüntüsü

Prediction polymorphism

Model: *without_aae*, prob: 1.43557284690227e-15 (classification due to TGP/ExAC, [real probability](#) is shown anyway) ([explain](#))

Summary [hyperlink](#)

- homozygous in TGP or ExAC
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr1:43395635C>T show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	SLC2A1
Ensembl transcript ID	ENST00000426263
Genbank transcript ID	NM_006516
UniProt peptide	P11166
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.588G>A cDNA.767G>A g.28896G>A
AA changes	no AA changes

Şekil 4-12. rs2229682 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini

SLC2A1 c.588G>A

Sequences

Reference sequence

SLC2A1 Gene > ENST00000426263 Transcript > Exon number: 5 (163 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

```

1ctgaagcagc agctgacaca aagtagggaa ggccactctg gcaggacggg gtgggaaagg gggtcagggc agaggcgctc acggcccctg cttccccag
101GTGTCGGCC TGGACTCCAT CATGGGCAAC AAGGACCTGT GGCCCTTGT GCTGAGCATC ATCTTCATCC CGCCCTTGT GCAGTGCAIC GTGCTGCCCT
201TCTGCCCCGA GAGTCCCCGC TTCTGTCTCA TCAACCGCAA CGAGGAGAAC CGGCCAAGA GTGgtacggg catggcccctg cctctctccc cactccctga
301gcccgggctt tcttcccact ctgagccacc ctacaccttc ctccgggtccc cccag
Total sequence length: 355 nucleotides

```

Mutant sequence

```

1ctgaagcagc agctgacaca aagtagggaa ggccactctg gcaggacggg gtgggaaagg gggtcagggc agaggcgctc acggcccctg cttccccag
101GTGTCGGCC TGGACTCCAT CATGGGCAAC AAGGACCTGT GGCCCTTGT GCTGAGCATC ATCTTCATCC CAGCCCTTGT GCAGTGCAIC GTGCTGCCCT
201TCTGCCCCGA GAGTCCCCGC TTCTGTCTCA TCAACCGCAA CGAGGAGAAC CGGCCAAGA GTGgtacggg catggcccctg cctctctccc cactccctga
301gcccgggctt tcttcccact ctgagccacc ctacaccttc ctccgggtccc cccag
Total sequence length: 355 nucleotides

```

The underlined sequences are analyzed by HSF.

Interpreted Data

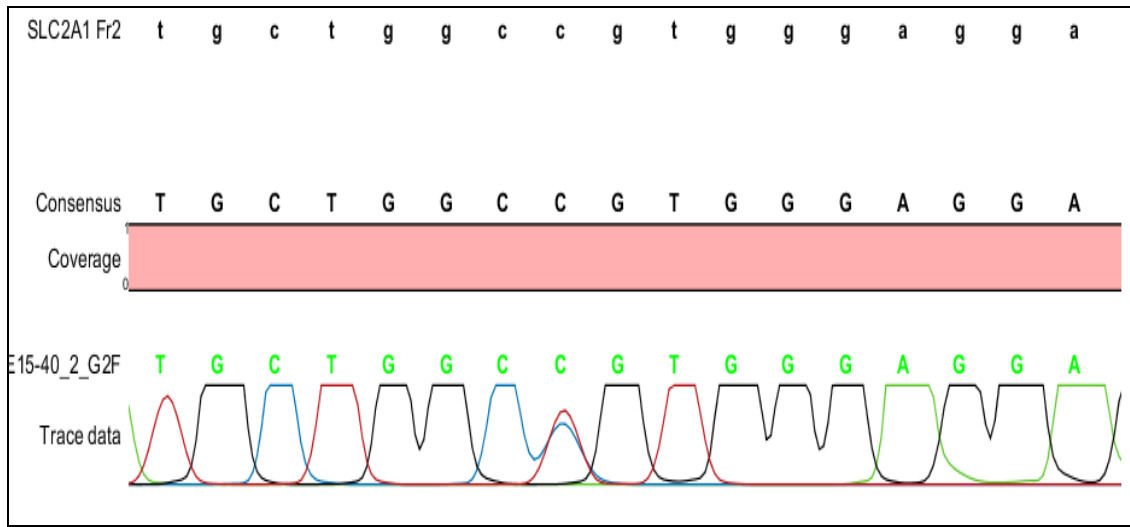
This table shows only relevant results related to the mutation position and context.
The mutation occurs in the late exonic positions, the following table show results of donor splice sites, ESE and ESS that could be affected by the mutation

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New Acceptor Site	1 - HSF Matrices		Activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s). Potential alteration of splicing.
	2 - MaxEnt		
New ESS Site	1 - Sironi et al. - Motif 3		Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
	2 - ESR Sequences from Goren et al.		

Şekil 4-13. rs2229682 numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini

4.1.5.c.45C>T

15-40, 17-20 ve 17-79 kodlu GLUT1 DS hastalarında ortak tespit edilen, *SLC2A1* geninin 2/10 ekzon bölgesinde yer alan bu heterozigot varyant sinonim varyanttır ve aminoasit değişimi yapmamaktadır. Bilinen bir varyant olup rs1385129 kodu ile kayıtlıdır. Çeşitli veritabanları aracılığı ile fenotip etkisi benign olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-14. rs1385129 numaralı fragman 2 de bulunan varyantının CLC görüntüsü

Mutation Taster [documentation](#)

mutation t@sting

Prediction polymorphism Model: without_aae, prob: 7.52170927865261e-14 (classification due to TGP/ExAC, [real probability](#) is shown anyway) [\(explain\)](#)

Summary [hyperlink](#)

- homozygous in TGP or ExAC
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr1:43408966G>A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	SLC2A1
Ensembl transcript ID	ENST00000426263
Genbank transcript ID	NM_006516
UniProt peptide	P11186
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.45C>T cDNA.224C>T g.15565C>T
AA changes	no AA changes
probability of altered AA	NA
frameshift	no
known variant	Reference ID: rs1385129

database	homozygous (A/A)	heterozygous	allele carriers
1000G	159	886	1045
ExAC	3400	21747	25147

Şekil 4-15. rs1385129 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini

SLC2A1 c.45C>T

▼ Sequences

Reference sequence

SLC2A1 Gene > ENST00000426263 Transcript > Exon number: 2 (96 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

1 aggcaagata tctgaacaca gaaacttgcc agtccaggcc ctgccctgta gtaacctgct ccagacacg cctataacag tctggtttgt ttctccgca
101 AAGCTGACGG GTGCGCTCAT GCTGCTGTG GGAGGAGCAG TGCTTGGCTC CTGCAGTIT GGCTACAACA CTGGAGTCAT CAATGCCCCC CAGAAggtga
201 gtactgtgcc atggttggtt tatggacacc agcctgtctt gttgcacatc acacatgccc acagttctcc gccaccacct gaattagagt cattta

Total sequence length: 296 nucleotides

Mutant sequence

1 aggcaagata tctgaacaca gaaacttgcc agtccaggcc ctgccctgta gtaacctgct ccagacacg cctataacag tctggtttgt ttctccgca
101 AAGCTGACGG GTGCGCTCAT GCTGCTGTG GGAGGAGCAG TGCTTGGCTC CTGCAGTIT GGCTACAACA CTGGAGTCAT CAATGCCCCC CAGAAggtga
201 gtactgtgcc atggttggtt tatggacacc agcctgtctt gttgcacatc acacatgccc acagttctcc gccaccacct gaattagagt cattta

Total sequence length: 296 nucleotides

The underlined sequences are analyzed by HSF.

▼ Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context.
The mutation occurs in the late exonic positions, the following table show results of donor splice sites, ESE and ESS that could be affected by the mutation

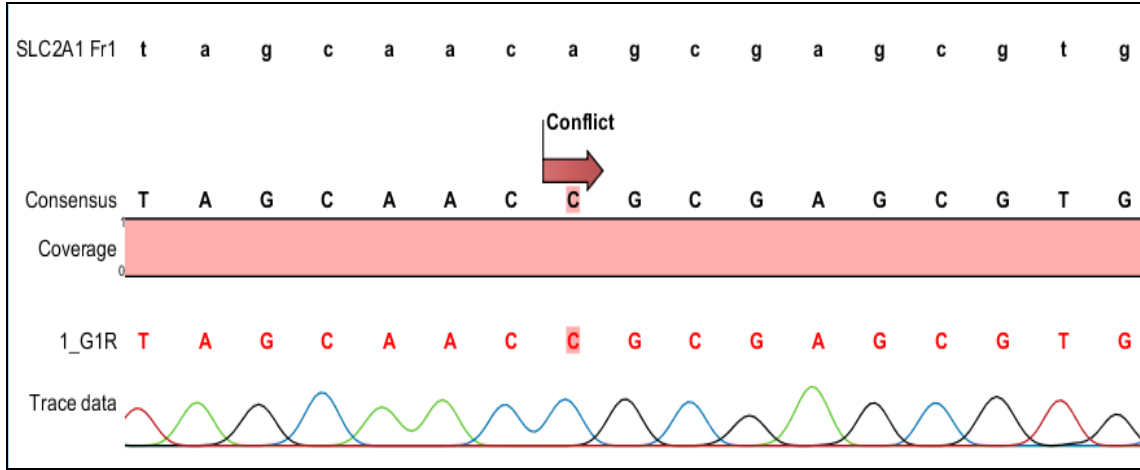
Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New ESS Site	1 - IIEs from Zhang et al.		Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
	2 - ESR Sequences from Goren et al.		
	3 - Sironi et al. - Motif 2		

Şekil 4-16. rs1385129 numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini

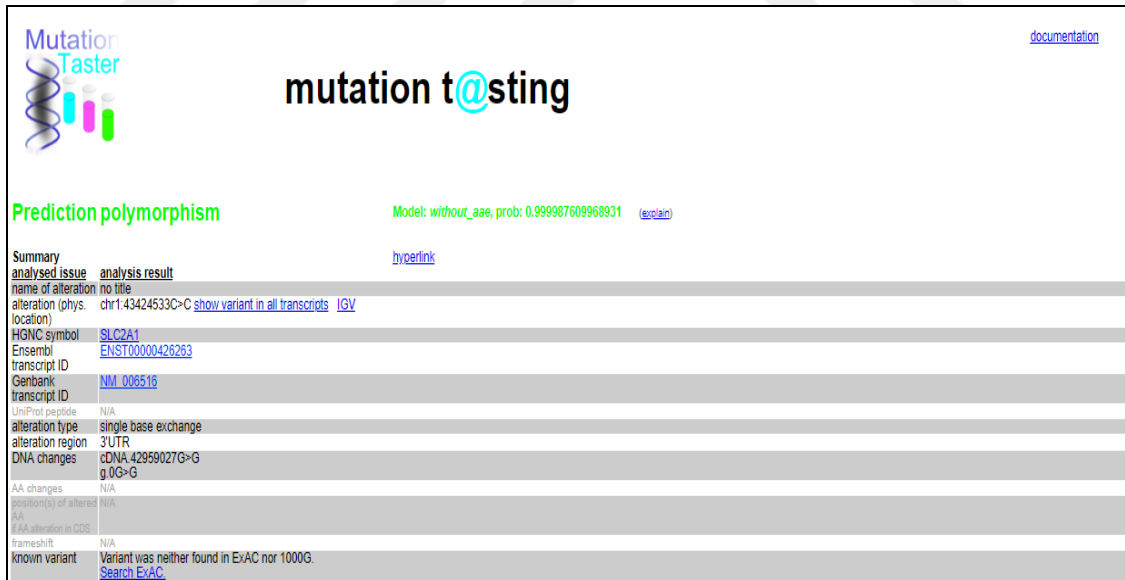
4.1.6.c.-197A>C

17-79 kodlu GLUT1 DS hastada tespit edilen, *SLC2A1* geninin 5'UTR bölgesinde yer alan homozigot varyant aminoasit değişimi yapmamaktadır. Bilinen bir varyant olup

rs11537640 kodu ile kayıtlıdır. Çeşitli veritabanları aracılığı ile fenotip etkisi orta etkili ve benign olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-17. rs11537640 numaralı fragman 1’de bulunan varyantının CLC görüntüsü

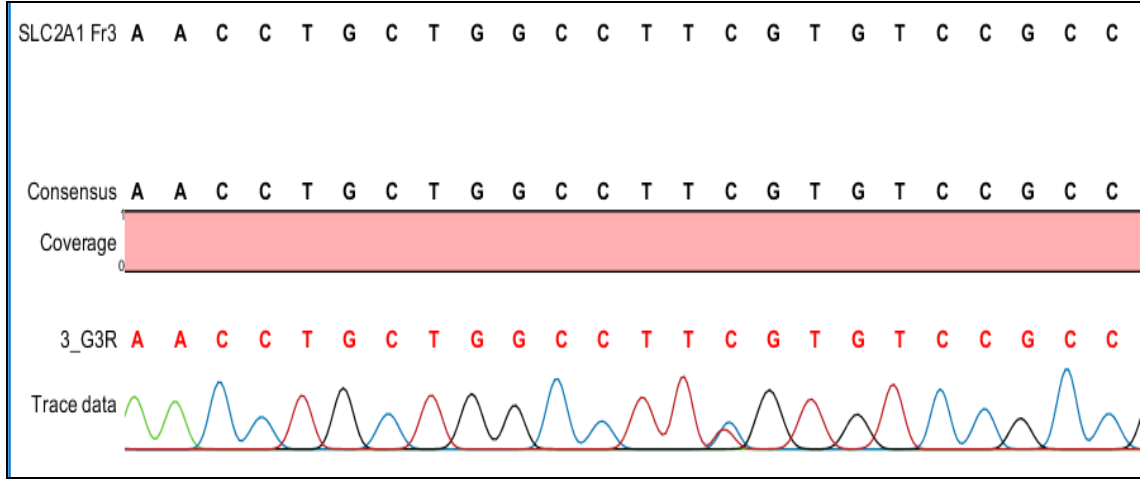


Şekil 4-18. rs11537640 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini

4.1.7.c.312C>T

17-79 kodlu GLUT1 DS hastada tespit edilen, *SLC2A1* geninin 4/10 ekzon bölgesinde yer alan heterozigot bu varyant aminoasit değişikliği yapmamaktadır. Sinonim

varyanttır. Bilinen bir varyant olup rs76672402 kodu ile kayıtlıdır. Çeşitli veritabanları aracılığı ile fenotip etkisi benign olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-19. rs76672402 kodlu Fragman 3'de bulunan varyantın CLC görüntüsü

mutation t@sting

Prediction **disease causing** **Model: without_aae, prob: 0.99999999915424** [\(explain\)](#)

[hyperlink](#)

Summary

- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue

name of alteration: no title

alteration (phys. location): chr1:43396501G>A [show variant in all transcripts](#) [IGV](#)

HGNC symbol: [SLC2A1](#)

Ensembl transcript ID: [ENST00000426263](#)

Genbank transcript ID: [NM_006516](#)

UniProt peptide: [P11156](#)

alteration type: single base exchange

alteration region: CDS

DNA changes: c.312C>T
cDNA.491C>T
g.28030C>T

AA changes: no AA changes

position(s) of altered AA: N/A

frameshift: no

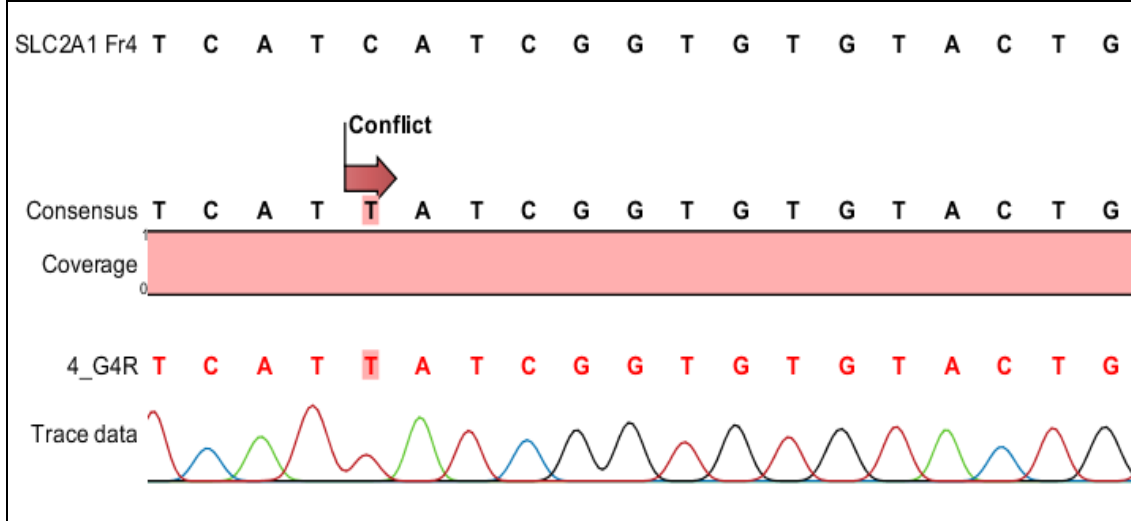
known variant: [Reference ID: rs76672402](#)

database	homozygous (A/A)	heterozygous	allele carriers
1000G	0	1	1
ExAC	0	2	2

Şekil 4-20. . rs755559487 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini

4.1.8.c.384C>T

17-79 kodlu GLUT1 DS hastada tespit edilen, *SLC2A1* geninin 4/10 ekzon bölgesinde yer alan bu homozigot varyant aminoasit değişikliği yapmamaktadır. Sinonim varyanttır. Bilinen bir varyant olup rs755559487 kodu ile kayıtlıdır. Çeşitli veritabanları aracılığı ile fenotip etkisi benign olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4-21. rs755559487 kodlu fragman 4 de bulunan varyantın CLC görüntüsü

		mutation t@sting													
Prediction Summary		disease causing • protein features (might be) affected • splice site changes	Model: <i>without_aae</i> , prob: 1 (explain) hyperlink												
analysed issue		analysis result													
name of alteration		no title													
alteration (phys. location)		chr1:43396429G>A show variant in all transcripts IGV													
HGNC symbol		SLC2A1													
Ensembl transcript ID		ENST00000426263													
Genbank transcript ID		NM_006516													
UniProt peptide		P11166													
alteration type		single base exchange													
alteration region		CDS													
DNA changes		c.384C>T cDNA.563C>T g.28102C>T													
AA changes		no AA changes													
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS		N/A													
frameshift		no													
known variant		<table border="1"> <thead> <tr> <th>database</th> <th>homozygous (A/A)</th> <th>heterozygous</th> <th>allele carriers</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1000G</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>ExAC</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>		database	homozygous (A/A)	heterozygous	allele carriers	1000G	-	-	-	ExAC	0	1	1
database	homozygous (A/A)	heterozygous	allele carriers												
1000G	-	-	-												
ExAC	0	1	1												

Şekil 4-22. rs755559487 numaralı varyantının Mutation Taster veritabanı fenotip tahmini

Location	Allele	Consequence	Impact	Symbol	Gene	Feature type	Feature	Biotype	Exon
1:43396429-43396429	A	synonymous_variant	LOW	SLC2A1	ENSG00000117394	Transcript	ENST00000426263	protein_coding	4/10

Şekil 4-23. rs755559487 numaralı varyantının VEP veritabanı görüntüsü ve fenotip tahmini

4.2.SNP Array Sonuçları

Novel ve *de novo* olduğu düşünülen varyantlara sahip bireylere ve ailelerine SNP Array analizi uygulanmıştır.

Tablo 4-2: Annenin AA , babanın BB ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1 üzerindeki 7914 tek nükleotid değişimi varyantının ilk 10 tanesinin gösterilmesi

rs kodu	Chr	pozisyon	E13-84	E13-88	E13-83
rs12031614	1	2306152	AA	BB	AB
rs871822	1	3312914	AA	BB	AB
rs870171	1	3342804	AA	BB	AB
rs6426402	1	4269491	AA	BB	AB
rs12143782	1	4534350	AA	BB	AB
rs7541288	1	4535148	AA	BB	AB
rs582598	1	4561962	AA	BB	AB
rs1886112	1	4930181	AA	BB	AB
rs12040043	1	4996772	AA	BB	AB
rs6683624	1	5051710	AA	BB	AB

Tablo 4-3: Annenin BB , babanın AA ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1 üzerindeki 8148 tek nükleotid değişimi varyantının ilk 10 tanesinin gösterilmesi

rs kodu	Chr	Position	E13-84	E13-88	E13-83
rs3737728	1	1021415	BB	AA	AB
rs4442317	1	1106784	BB	AA	AB
rs7539775	1	3109151	BB	AA	AB
rs10909930	1	3243017	BB	AA	AB

rs2500286	1	3276138	BB	AA	AB
rs4648485	1	3283528	BB	AA	AB
rs12119711	1	3451005	BB	AA	AB
rs7367066	1	3803755	BB	AA	AB
rs35583447	1	3829614	BB	AA	AB
rs6667065	1	4260418	BB	AA	AB

SNP Array verilerini analizi yapılırken anne ve babanın homozigot (AA/BB) olduğu durumlar her iki koşulda da (anne:AA,baba:BB ve anne:BB,baba:AA) excel üzerinden seçilerek filtrelenmiştir. Anne ve babanın homozigot olmasına rağmen çocuğun da homozigot çıktığı ve informatif olmayan/okuması yapılamayan (NC : non call) durumlar, anne ve babanın homozigot olduğu durumlardan çıkarılmıştır. Sonuç olarak elde; anne ve babanın homozigot, çocuğun heterozigot olduğu tek nükleotid polimorfizm sayısı kalmıştır. Bu sayının belirli bir oranın üzerinde olması, incelenen bireylerin biyolojik olarak kan bağları olduğunun valide eder.

Tablo 4-4: Anne (AA), baba (BB) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması

Anne AA, Baba BB olduğu durum sayısı	7914
Çocuğun AA olduğu durum sayısı	1 tane (rs10233804)
Çocuğun BB olduğu durum sayısı	1 tane (rs502431)
Okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	26 tane
Çocuğun AB olduğu durum sayısı	7886
Durumu bozan SNP yüzdesi	0,0032
Anne-baba-çocuk uyumlu SNP yüzdesi	99,996

Tablo 4-5: Anne (BB), baba (AA) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması

Anne BB, Baba AA olduğu durum sayısı	8148
Çocuğun AA olduğu durum sayısı	5 tane (rs4252, rs9558168, rs7334127, rs7327364, rs2806807)
Çocuğun BB olduğu durum sayısı	4 tane (rs13088742, rs17414932, rs3853607, rs722557)
Okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	21 tane
Çocuğun AB olduğu durum sayısı	8118
Durumu bozan SNP yüzdesi	0,0025
Anne-baba-çocuk uyumlu SNP yüzdesi	99,997

4.3.Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q RT PZR)

Sonuçları

Sanger dizi analizinde patojenik varyanta rastlanmayan 10 hastadan 7 tanesinde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-RT PZR) ile kopya sayısı değişimleri incelenmiştir. Patojenik variant saptanmayan diğer 3 hasta ise klinisyen tarafından fenotipik olarak dışlandığı için ileri moleküler çalışmamıza dahil edilmemiştir.

q RT PZR yöntemi rölatif kantifikasyon analizi ile yapılmıştır. Sağlıklı kontroller ile hasta bireylerin, hedef gen olan *SLC2A1* ve referans gen olan *PCBP3* primerleri kullanılarak genomik materyal miktarları karşılaştırılmıştır.

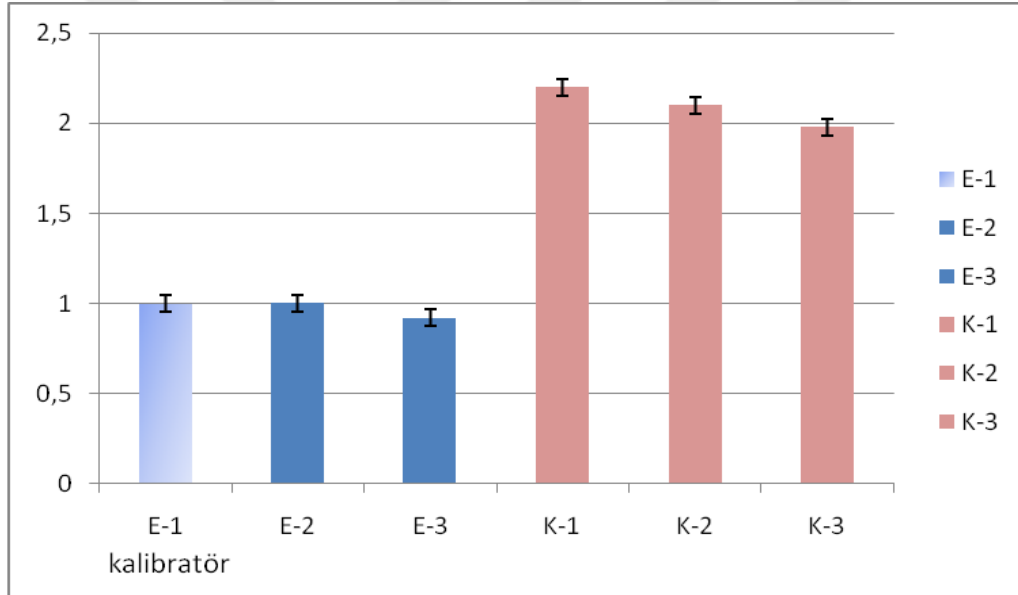
Beklenen sonuç, GLUT1-ES ile bir ilgisi olmayan *PCBP3* geninin, hasta ve sağlıklı kontrollerde ortak olarak 2 sağlam alel taşıması ve qRT PCR informatik analiz sonucunda “1” kat sayısını sağlamasıdır. Sağlıklı bireylerde hedef gen olan *SLC2A1* geni için de aynı sonuç beklenmektedir. Ancak hasta bireylerde, analiz sonucunda “1” kat sayısının tam katlar şeklinde artması (insersiyon) ya da azalması (delesyon) olası bir kopya sayısı değişimini gösterecektir. Her bir deney, 3’lü tekrarlar halinde çalışılmıştır.

4.3.1. X-XX Kantitasyon Analizi Sonuçları

Biyolojik yapıları gereği kadınlarda iki, erkeklerde bir adet X kromozomu bulunması, bu kromozomun otozomlardan farklı olarak cinsiyetlere göre analiz

edilmesini gerektirir. Erkeklerde X kromozomunun CNV değeri 1'dir, yani otozomlardaki 1 kopya kayıpla eşdeğer özelliktedir. X ve Y kromozomlarının kadın ve erkeklerde CNV açısından farklılık göstermesi kantitasyon analizinde kalite kontrol aşamaları esnasında da kullanılır. Biyoinformatik analiz aşamasında X kromozomunun varlığı CNV durumuna göre örneklere cinsiyet yoluyla atanır ve bu cinsiyetler örnek bilgiler ile karşılaştırılır.

Bu çalışma kapsamında CNV tespiti için uygulanması planlanan q RT PCR yönteminin güvenilir sonuç verebilme olasılığı, sağlıklı oldukları bilinen 3 erkek ve 3 kadın kontrollerin birbirleri ile karşılaştırmalı 3'lü tekrarlar halindeki X-XX kantitasyon değerlerini hesaplanmak suretiyle valide edilmiştir.

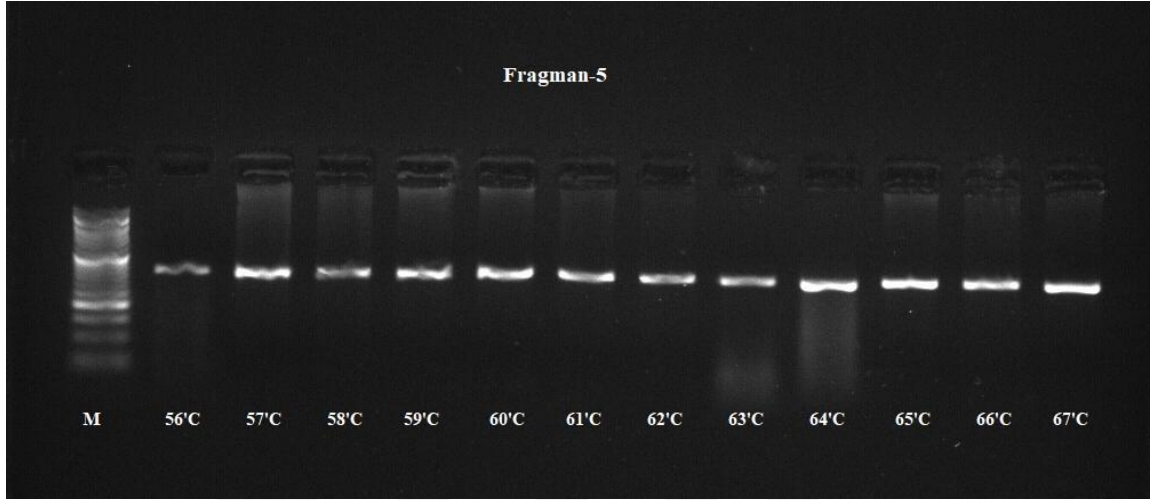


Şekil 4-24. 3 erkek ve 3 kadın sağlıklı kontrollerin birbirleri ile karşılaştırmalı 3'lü tekrarlar halindeki X-XX kantitasyon ve kat farkı değişimleri , K:Kadın, E:Erkek

4.3.2.Gradient PZR Sonuçları

q RT PZR optimizasyonu için gerekli kriterler arasında uygun primer konsantrasyonu ve bağlanma sıcaklığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında uygun primer konsantrasyonu olarak literatürde tavsiye edilen 10U_m ve miktar olarak 0.5 µl seçilmiş ve her bir fragman için deney optimize çalışmıştır.

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için ise q RT PZR da kullanılması planlanan SYBR Green I master mixi ile 1 sağlıklı kontrol örneği kullanılarak gradient pcr yapılmıştır. Sonuç olarak, agaroz jele yüklenen pcr ürünlerinin görüntülerine göre her bir fragman için uygun primer bağlanma sıcaklıkları tespit edilmiştir (Tablo.4-8)



Şekil 4-25. Fragman-5 için sağlıklı kontrol örneği ile yapılan gradient pcr sonuçlarının agaroz jel görüntüsü, optimum primer bağlanma sıcaklığı 66°C olarak tespit edilmiştir

TD PZR için dizayn edilen 7 primer çifti (Fr 2-3-4-5-8-9-10) q RT PZR master mix ve cihazında çalışmış, 3 primer çifti (Fr 1-6-7) farklı koşullar denenmesine rağmen çalışmamıştır. Fr 6 ve 7 için Primer3 programı kullanılarak yeni primer çiftleri dizayn edilmiş ancak fr 1 için bölgenin GC içeriğinin yüksek olmasından dolayı uygun primer çifti dizayn edilememiştir. Bu sebeple q RT PZR 9 fragman ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4-6: q RT PZR Fr 6 ve 7 için yeniden tasarlanan primer çiftleri

Fr 6 Forward Primer (G6F)	ATCAACCGCAACGAGG AG	Fr 6 Reverse Primer (G6R)	ACCATGCACAC TTGACCAGA
Fr 7 Forward Primer (G7F)	CCCACATCCACTGCTAC AGA	Fr 7 Reverse Primer (G7R)	TAGTGCCCTTCT GAACCCAC

Tablo 4-7: q RT PZR ile çoğaltılan fragman bölgeleri

Fragman	Baz çifti uzunluğu	ekzon lokalizasyonu
SLC2A1fr2	535bp	ekz 2
SLC2A1fr3	558bp	ekz 3-4a
SLC2A1fr4	535bp	ekz 3-4b
SLC2A1fr5	466bp	ekz 5-8a
SLC2A1fr6	376bp	ekz 5-8b
SLC2A1fr7	322bp	ekz 5-8c
SLC2A1fr8	442bp	ekz 5-8d
SLC2A1fr9	359bp	ekz 9
SLC2A1fr10	415bp	ekz 10

Tablo 4-8: Gradient pqr ile belirlenen optimum primer konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıkları

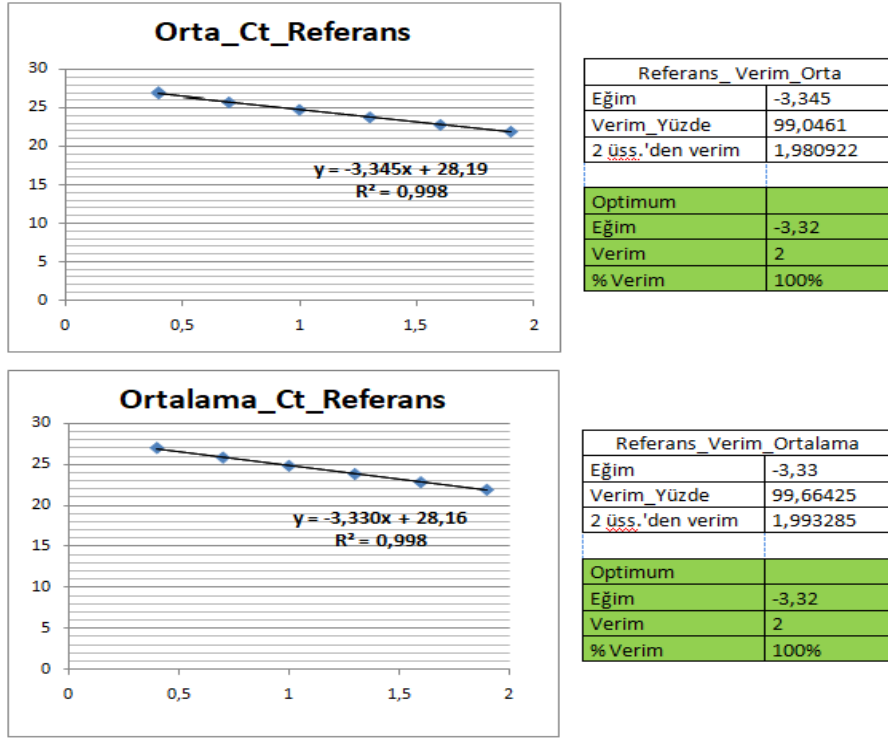
Fragman	Optimum Konsantrasyon	Optimum Sıcaklık
Fr2 (G2F & G2R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr3 (G3F & G3R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr4 (G4F & G4R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr5 (G5F&G5R)	0,5 µl	66 °C
Fr6 (G6F & G6R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr7 (G7F & G7R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr8 (G8F & G8R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr9 (G9F & G9R)	0,5 µl	63,2 °C
Fr10 (G10F & G10R)	0,5 µl	63,2 °C

4.3.3.PZR Verimi Hesap Sonuçları

2- $\Delta\Delta$ CT methodunun hasta numunelerinde uygulanmasından önce, rastgele bir sağlıklı kontrol örneği seçilerek hedef ve referans genler ile tüm fragmanlar için üçlü tekrarlar halinde (triplike) deneme PZRları konularak yöntemin çalışma veriminin kontrolü sağlanmıştır.

Tablo 4-9: Referans gen için q RT PZR da farklı DNA konsantrasyonlarındaki Ct değerleri

Ref	Ref_Gen	Cp_Ref	Konsant.	Log_data	Mean_ct	St_Dev_Mean	Medyan
A4	Ref_80ng	21,78	80	1,90309	21,9	0,025166115	21,90333
A5	Ref_80ng	21,9					
A6	Ref_80ng	22,03					
B4	Ref_40ng	22,79	40	1,60206	22,81	0,015275252	22,80667
B5	Ref_40ng	22,82					
B6	Ref_40ng	22,81					
C4	Ref_20ng	23,73	20	1,30103	23,8	0,015275252	23,79667
C5	Ref_20ng	23,8					
C6	Ref_20ng	23,86					
D4	Ref_10ng	24,76	10	1	24,79	0,03	24,78667
D5	Ref_10ng	24,79					
D6	Ref_10ng	24,81					
E4	Ref_5ng	25,82	5	0,69897	25,78	0,040414519	25,78333
E5	Ref_5ng	25,78					
E6	Ref_5ng	25,75					
F4	Ref_2.5ng	26,81	2,5	0,39794	26,97	0,080829038	26,93667
F5	Ref_2.5ng	27,03					
F6	Ref_2.5ng	26,97					
G4	No dna						
G5	No dna						
G6	No dna						

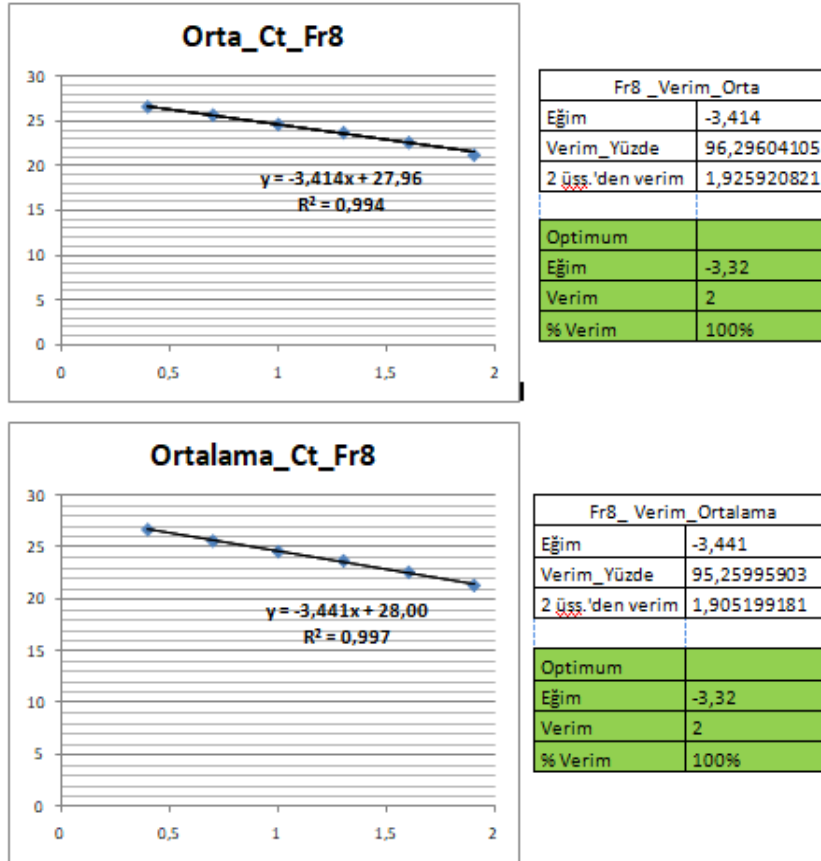


Şekil 4-26. Referans genin orta (üstte) ve ortalama (altta) değerleri ile oluşturulan grafik ve verim hesaplaması

Tablo 4-10: Fragman-8 için q RT PZR da farklı DNA konsantrasyonlarındaki Ct değerleri

ref	Ref_Gen	Cp_Ref	Konsant.	Log_data	Mean_ct	St_Dev_Mean	Medyan
A1	Fr8_80 ng	21,15	80	1,90309	21,26	0,051961524	21,32333
A2	Fr8_80 ng	21,56					
A3	Fr8_80 ng	21,26					
B1	Fr8_40 ng	22,8	40	1,60206	22,61	0,023094011	22,58
B2	Fr8_40 ng	22,33					
B3	Fr8_40 ng	22,61					
C1	Fr8_20 ng	23,69	20	1,30103	23,69	0,030550505	23,66
C2	Fr8_20 ng	23,71					
C3	Fr8_20 ng	23,58					
D1	Fr8_10 ng	24,44	10	1	24,58	0,047258156	24,53667
D2	Fr8_10 ng	24,59					
D3	Fr8_10 ng	24,58					
E1	Fr8_5ng	25,66	5	0,69897	25,59	0,045092498	25,54
E2	Fr8_5ng	25,59					
E3	Fr8_5ng	25,37					
F1	Fr8_2.5 ng	26,38	2,5	0,39794	26,49	0,02081666	26,62333

F2	Fr8_2.5 ng	26,49					
F3	Fr8_2.5 ng	27					
G1	No dna						
G2	No dna						
H3	No dna						



Şekil 4-27. Hedef genin Fr8 bölgesinin orta (üstte) ve ortalama (altta) değerleri ile oluşturulan grafik ve verim hesaplaması

Yukarıda örnek olarak tablo ve grafikleri verilen verimsel hesaplama Fragman-8' e aittir. Diğer fragmanlar için de tek tek aynı protokol uygulanmış, grafikleri çizilmiş ve her birinin p2r verimleri hesaplanmıştır (Tablo.4-11).

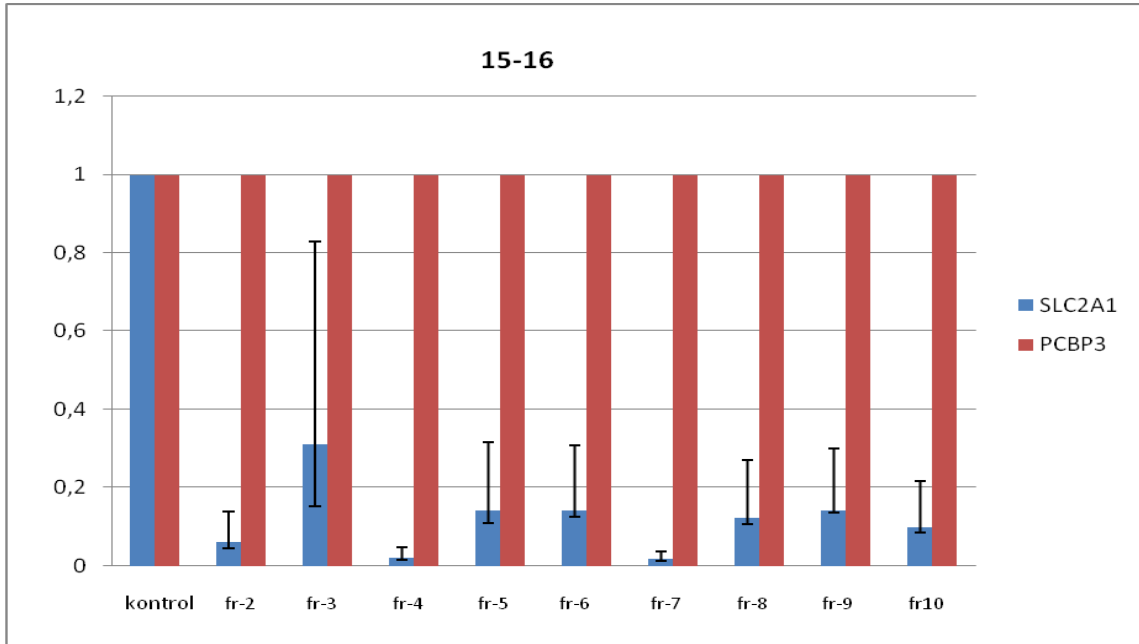
Tablo 4-11: Her bir fragman için yüzde hesabıyla (%100 verim = 2) referans ve hedef gen pır verimleri

Çalışılan Fragman	Orta (Mean) Verim Hesabı		Ortalama (Median) Verim Hesabı	
	Referans GenVerim	Hedef GenVerim	Referans GenVerimi	Hedef GenVerim
Fragman-2	% 102,38	%87,79	%99,66	%88,70
Fragman-3	%102,38	%90,87	%99,66	%90,25
Fragman-4	%94,05	%100,33	%94,95	%101,86
Fragman-5	%103,89	% 103,98	%102,12	%103,89
Fragman-6	%102,91	%110,32	%102,12	%108,19
Fragman-7	%99,04	%90,11	%99,66	%91,18
Fragman-8	%99,04	%96,29	%99,66	%95,25
Fragman-9	%99,04	%94,13	%99,66	%94,24
Fragman-10	%99,04	%92,52	%99,66	%91,21

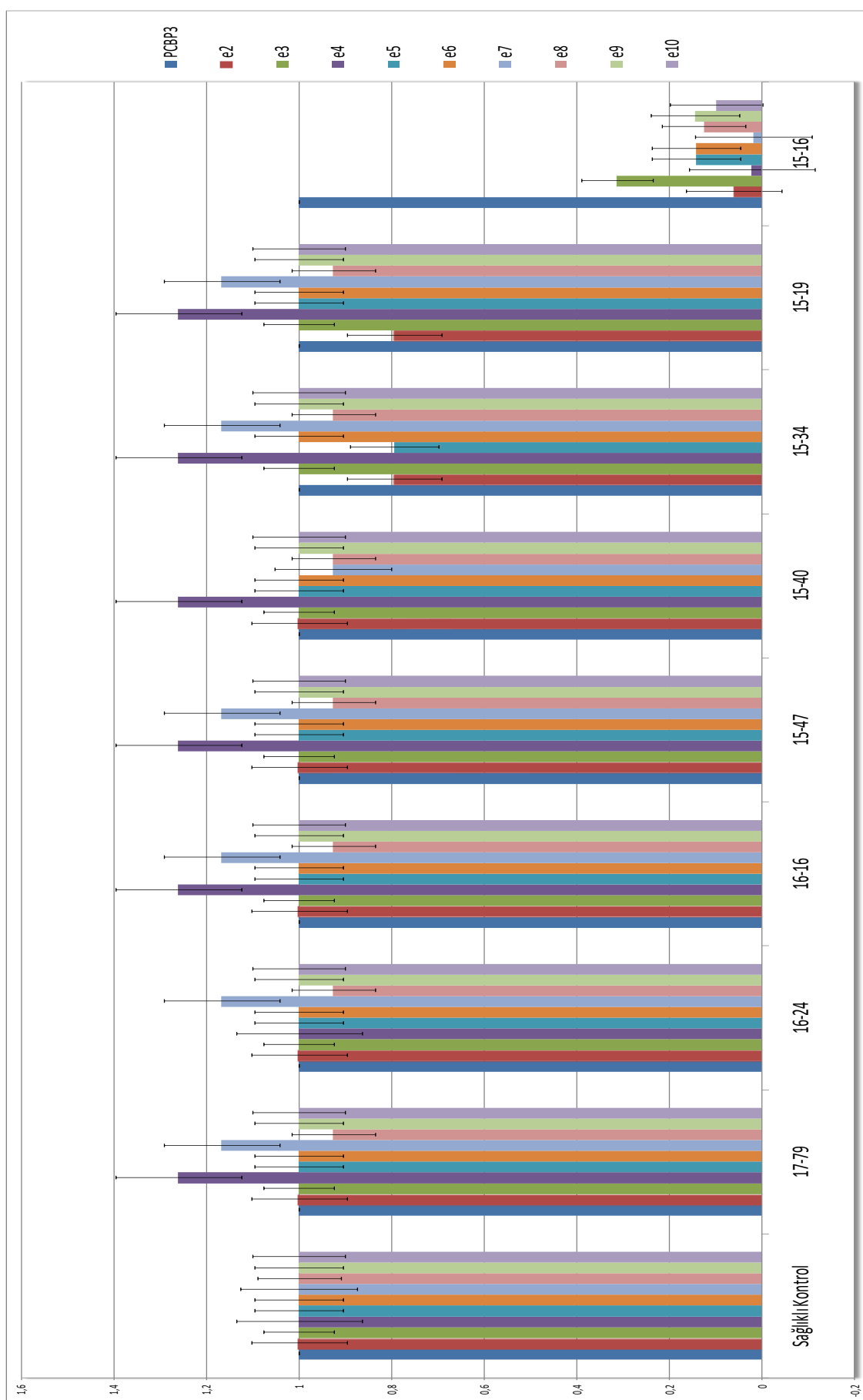
Optimizasyon PZR ı sonucunda, hedef ve referans genler için q RT PZR çalışma veriminin en uygun 20 ng DNA varlığında gerçekleşebileceği tespit edilmiştir.

4.3.4.Hasta Bireylerin q RT PZR Analiz Sonuçları

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan analiz sonuçları incelendiğinde, 7 hastadan 1 tanesinde (15-16) anlamlı derecede *SLC2A1* geni ekzonlarında kayıp (delesyon) tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarının grafik gösterimi aşağıda verilmiştir.



Şekil 4-28. 15-16 kodlu hastaya ait fragman 2-10 katsayı değişimlerinin grafiği (kontrol: 3 farklı sağlıklı örneğin ortalaması alınarak hesaplanmıştır)



Şekil 4-29. Sağlıklı kontroller ile hasta bireylerin , her biri farklı bir renk ile temsil edilen referans gen ve fragman 2-3-4-5-6-7-8-9-10 bölgeleri için q RT PR sonuçlarının grafiği ve standart sapmaları



5. TARTIŞMA

İnsan beyni, işlevi için temel yakıt olarak glikozu kullanır. Yetişkin bir insan beyninin ortalama olarak toplam vücut glikoz rezervinin en az %20-25'ini (bebeklerde %80'e kadar) kullandığı tahmin edilmektedir. Glikoz molekülü, vücutta serbestçe yayılmaz, GLUT1 uniporter glikoz taşıyıcı proteini kan-beyin bariyeri boyunca kolaylaştırılmış glukoz taşınmasına yardımcı olur (46). GLUT-1 eksikliği sendromu, *SLC2A1* genindeki varyasyonlardan kaynaklanır. Bunlar yapısal ve/veya sayısal varyasyonlardır (5). Sanger dizileme yöntemi, genomdaki bir veya birkaç bazlık delesyon/amplifikasyon değişimlerini gösteren, geçmişten günümüze kullanılan altın standart yöntemidir (25). Bu çalışmada, toplam 12 hasta ilk önce Sanger dizileme yöntemi ile incelenmiş ve 7 hastada tek nükleotid değişimleri tespit edilmiştir. Çeşitli tahmin araçları ile bu değişimlerin fenotip etkileri değerlendirilmiştir. Patojenik olduğu tespit edilen 2 varyant için konfirmasyon amaçlı tekrar dizilemeler yapılmıştır. Patojenik olarak tahmin edilen bu varyantlar novel ve *de novo* varyantlardır.

Varyantların *de novo* oldukları, SNP Array methodunun çalışma prensibinden yararlanılarak laboratuvarımızca geliştirilen bir yöntem olan genotipleme ile valide edilmiştir (30). SNP Array verilerini analizi, biyolojik anne ve baba adayının homozigot (AA/BB) olduğu durumlar (anne:AA, baba:BB ve anne:BB, baba:AA) ve çocuğun heterozigot olduğu durumların excel üzerinden seçilerek filtrelenmesi esasına dayanmaktadır. Anne ve babanın homozigot olmasına rağmen çocuğun da homozigot çıktığı ve informatif olmayan/okuması yapılamayan (NC : non call) durumlar, tüm sonuçlardan çıkarılmıştır ve sonuç olarak elde; anne ve babanın homozigot, çocuğun mecburi heterozigot olduğu tek nükleotid polimorfizm sayısı kalmıştır. Bu sayının belirli bir oranın üzerinde olması, bize incelenen bireylerin biyolojik olarak kan bağları olduğunun valide etmektedir.

Patojenik varyanta rastlanmayan 10 hastanın 7'sinde ileri moleküler çalışma olan kantitatif gerçek zamanlı pqr methodu (q RT-PZR) ile CNV taraması yapılmıştır. 10 hastadan 3'ü ise klinik sebeplerden dolayı ileri moleküler analizlere dahil edilmemiştir. Sanger yöntemi, bir veya birkaç bazdan daha büyük ekzonik ve/veya allellik delesyon ve amplifikasyonlar gibi gen düzeyindeki değişimlerin tespitinde

yetersiz kaldığından dolayı q RT PZR yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, çoklu prob ligasyon analizi (Multiplex Ligation Probe Analysis:MLPA) ve array CGH gibi diğer CNV tarama testleri ile kıyaslandığında, prob dizaynı gerektirmeksizin kolay uygulanabilirliği ve maliyetinin düşük oluşu sebebi ile çalışmamızda tercih edilmiş bir yöntemdir.

Tez kapsamında tespit edilen SNP ve CNV'lerin bireylerin fenotipleri ile ilişkileri olan ilişkileri anlaşılmaya çalışılmış ve hastalıkla ilgili olabilecek ya da etiyolojisine katkıda bulunabilecek yeni varyasyonların keşfedilmesi hedeflenmiştir.

Değerlendirilen ilk birey olan 11-169 kodlu hastada *SLC2A1* geninin intron 5 bölgesinin son nükleotidindeki guanin (G) bazının yerinde timin (T) bazı olduğu görülmüştür. Bu varyasyonun veritabanlarında daha önceden kayıtlı olmamasından dolayı novel olduğu tespit edilmiş ve aminoasit asit değişimine sebep olmasa da kırılma noktasında etkili olduğu için etkisi *in siliko* araçlar tarafından patojenik olarak tahmin edilmiştir. Aynı zamanda *de novo* olduğu, indeks ile birlikte tüm aile bireylerine uygulanan SNP Array analizi ile valide edilmiştir.

13-83 kodlu hastada bulunan bir diğer novel ve *de novo* varyant ise genin kodlama yapan fragman 5 bölgesinde guanin bazının delesyonu sonucu meydana gelmiş olup Glisin aminoasidini Alanine dönüştürerek protein dizisinde değişiklik yaratmıştır. Veritabanlarında daha önce kaydı bulunmayan çerçeve kayması değişimi oluşturan bu varyantın etkisi, çeşitli *in siliko* araçlar tarafından patojenik olarak tahmin edilmiş, ailesel segregasyonu SNP array yöntemi ile negatif olarak raporlanmıştır.

Veritabanlarında kayıtlı olan ve fragman 4 bölgesinde bulunan rs11537641 numaralı varyant, C>T baz değişimi sonucu meydana gelmiş olup aminoasit dizisinde bir değişiklik oluşturmamaktadır. Sinonim özellikte olan ve patojenik etkisi olmadığı tahmin edilen bu varyant 15-30, 15-47, 17-20 ve 17-79 kodlu hastalarda ortak olarak tespit edilmiştir, bu da varyantın minör allel frekansı (MAF) açısından nadir hastalıklar arasında yaygın olduğunun göstergesidir (0,14).

Fragman 5 bölgesinde tespit edilen heterozigot rs2229682 numaralı varyant G>A baz değişimi oluşturmakta ancak aminoasit değişimi yapmamaktadır. Sinonim özellikteki bu varyantın veritabanlarınca fenotip üzerine etkisi benign ve MAF değeri 0.12 olup, 15-30, 15-47, 17-20 ve 17-79 kodlu hastalarda ortak bulunmuştur.

17-79 kodlu bireyde, bulunan varyantların yanı sıra 3 farklı noktada 3 farklı sinonim varyant raporlanmıştır (rs11537640, rs76672402, rs755559487). Fragman 1 bölgesinde tespit edilen rs11537640 kodlu homozigot 5' UTR varyant, bulunduğu noktada A>C baz değişimine neden olmaktadır ve MAF değeri 0,23'tür. Fenotip etkisi çeşitli veritabanları tarafından 'orta-hafif şiddette' tanımlanmıştır.

Fragman 4 bölgesindeki rs76672402 heterozigot varyant, C>T baz değişimine sebep olmakta ancak aminoasit değişimi yaratmamaktadır. Fenotip etkisi hafif ve MAF değeri 0,1'in altındadır.

Fragman 4 bölgesinde tespit edilen bir başka homozigot rs755559487 kodlu bir başka sinonim varyant ise C>T baz değişimine sebep olup, aminoasit değiştirmemektedir. Fenotip etkisi hafif ve MAF değeri 0,1'in altındadır.

Varyasyonların heterozigot olması, tek allelin sağlam diğer allelin ise varyasyonu taşıdığını göstermektedir. Homozigot olması durumu ise 2 şekilde olabilmektedir. Bunlardan birincisi, her iki allelin de aynı varyasyonu taşıma ihtimalidir, ikincisi ise bireyde tek bir allelin kayıp veya büyük bir kısmında delesyon olması durumudur (47).

Bu tez çalışmasında bulunan 8 varyasyondan 2 si homozigot varyanttır, kalanlar heterozigot formdadır. Literatürde büyük çoğunlukla GLUT1-ES hastalığı ile ilişkili *SLC2A1* gen varyasyonlarının heterozigot formda ve *de novo* formda olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmada bulunan homozigot formdaki varyantların fenotipik etkisi ise benign olarak bildirilmiştir. Heterozigot varyasyonların 2 tanesi ise novel ve *de novo* olarak bulduğumuz varyantlardır ve *in siliko* araçlar vasıtası ile patojen tahmin edilmiştir. Kopya sayısı kaybına uğrayan varyantın da aile bireylerine ulaşıldığında segregasyon açısından incelenmesi gerekir. Hem *de novo* varyantların hem de tek kopya kaybının otozomal *SLC2A1* geninin bir kopyasını etkisizleştirerek haployetersizliğe yol açtığını öngörmekteyiz.

Aşağıdaki tabloda bu tez çalışması kapsamında kurumumuza gelen ve çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, beyin-omurilik sıvısı (BOS) değerleri, aileleri arasında akraba evliliği olup olmama durumları ve klinik fenotipleri gösterilmiştir.

Tablo 5-1: Çalışılan hastalar ve bilgileri

Hasta Kodu	Cinsiyet	Kuruma Geldiği Yaşı	BOS değeri	Akraba Evliliği	Klinik Fenotip
11-169	Kız çocuk	9 yaş	31mg/ml	Var	Klasik
13-83	Kız çocuk	17 yaş	28 mg/ml	Yok	klasik olmayan tip A
15-16	Kız çocuk	1 yaş	28 mg/ml	Yok	klasik olmayan tip B
15-19	Kız çocuk	1 yaş	30 mg/ml	Yok	Klasik
15-30	Kız çocuk	5 yaş	< 20mg/ml	Yok	Klasik olmayan
15-34	Kız çocuk	10 yaş	35 mg/ml	Yok	Klasik olmayan
15-40	Kız çocuk	5 yaş	32 mg/ml	Yok	Klasik olmayan
15-47	Kız çocuk	7 yaş	< 20mg/ml	Yok	Klasik olmayan
16-16	Erkek çocuk	6 yaş	< 20mg/ml	Yok	Klasik olmayan
16-24	Kız çocuk	10 yaş	< 20mg/ml	Yok	Klasik olmayan
17-20	Kız çocuk	13 yaş	< 20mg/ml	Yok	Klasik olmayan
17-79	Kız çocuk	8,5 yaş	< 20m,g/ml	Yok	Klasik olmayan tip-B

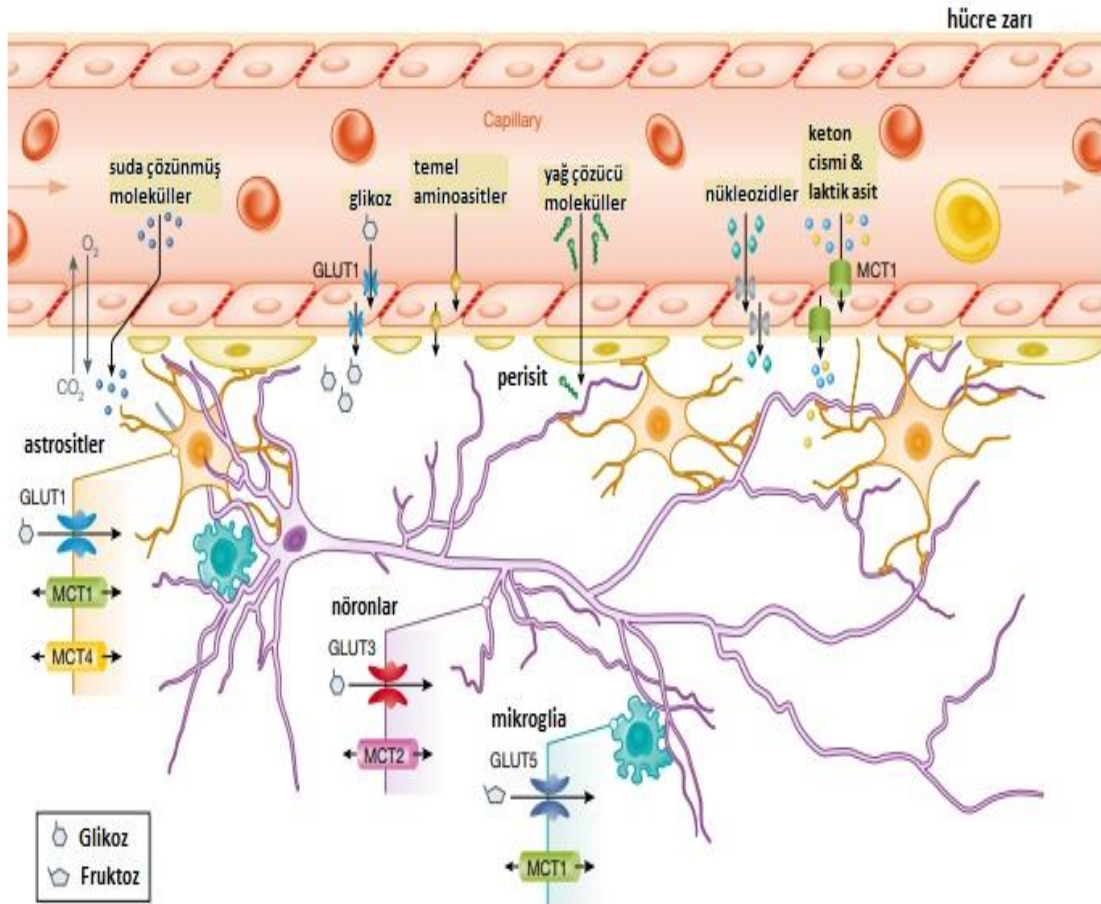
Tanı koymada aşamasında, epileptik nöbetler ve diskinetik hareket bozuklukları gibi durumların göz önüne alındığı bilinmektedir ancak en önemli belirteç sayılabilen BOS değeri (<40mg/ml) hem tanı hem de tedavi aşamasında çok önemli bir belirteç sayılmaktadır (48). Bu sebeple bu çalışmadaki hastalar hem klinik hem de moleküler açıdan incelendiğinde, BOS glikoz düzeyleriyle hastalığın fenotipi arasında güçlü bir ilişki olduğunu söyleyebiliriz.

Hastalığın tedavi sürecinde ketojenik diyet, antiepileptik tedavi, diğer destek tedavilerin etkili olduğu bilinmektedir (49). Bazı çalışmalar, L-karnitin besin takviyesinin de hastalığın diyet aşamasında etkin olabileceğini söylemektedir(50)

Moleküler analiz sonucunda *SLC2A1* gen düzeyinde bir değişime rastlayamadığımız ancak klinik açıdan GLUT1 ES olarak değerlendirilen hastalar için bir takım tahminlerimiz mevcuttur.

Bu tahminlerden bir tanesi, GLUT1 ES ile çok benzer fenotipik özellik gösteren ve *PRRT2* geni mutasyonlarından kaynaklanan hiperkinetik paroksizmal hareket bozuklukları (PKD)'dır. Klinik ile birlikte hastanın fizyolojik ve biyokimyasal durumu değerlendirilerek *PRRT2* gen analizi istenebilir.

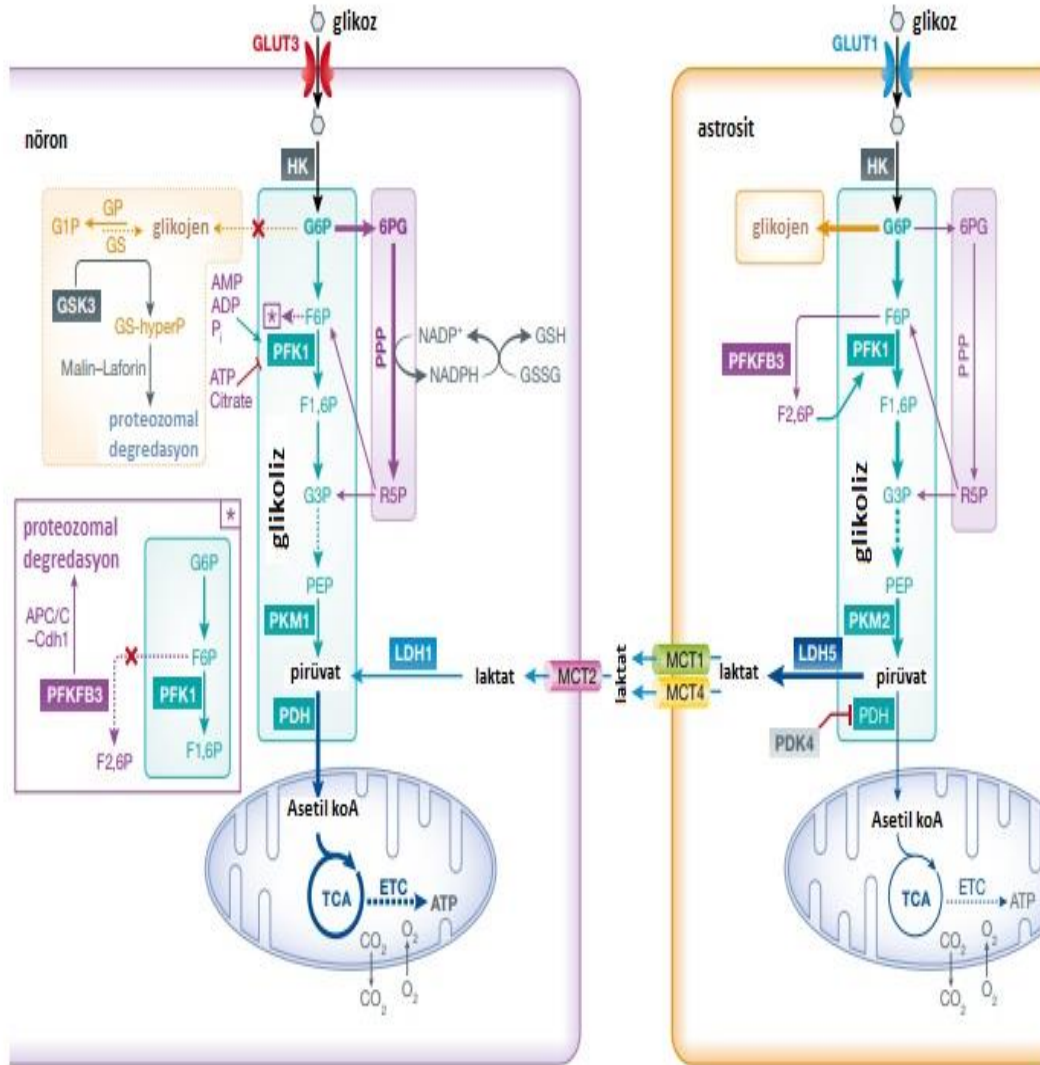
Bir diğer tahmin ise aşağıda görselleri verilen, kan-beyin bariyeri boyunca besin taşınmasını stimüle eden birbiri ile bağlantılı gen ve yollar ile alakalıdır.



Şekil 5-1. Kan-beyin bariyeri boyunca besin taşıma. (GLUT1-5, glikoz taşıyıcısı 1-5; MCT1-4, monokarboksilik asit taşıyıcı 1-4.) (51)

Kan-beyin bariyeri, bazal membran, perisitler ve astrosit perivasküler uç ayaklarıyla çevrelenmiş kılcal endotelyal hücreler tarafından oluşturulur. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların varlığı, suda çözünür moleküllerin penetrasyonunu güçlü bir şekilde önler. Pasif difüzyon, gazlar ve küçük polar olmayan lipidler ile sınırlıdır. Diğer tüm besinler pasif veya aktif aracılı taşıyıcılar gerektirir. (GLUT1-5, glikoz taşıyıcısı 1-5; MCT1-4, monokarboksilik asit taşıyıcı 1-4.) (51)

Monokarboksilat taşıyıcılar (MCT), memeli hücrelerinin plazma zarı boyunca L-laktat, keton cisimcikleri ve pirüvat gibi kısa zincirli monokarboksilatların çift yönlü proton-bağılantılı taşınmasını katalize etmektedir. MCT1-4 birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde anahtardır. Bunlar, tümü korunmuş sekans motiflerini paylaşan toplam 14 üyeye sahip olan MCT ailesi olarak da bilinen daha büyük SLC16 ailesinin bir parçasıdır. Aile, yüksek afiniteli bir tiroid hormon taşıyıcısı (MCT8), bir aromatik amino asit taşıyıcısı (T-tipi amino asit taşıyıcı 1/MCT10) ve henüz karakterize edilmeyi bekleyen sekiz farklı üyeye sahiptir (52).



Şekil 5-2. Nöronlarda ve astrositlerde glukoz kullanımının metabolik yolları (51)

Glikoz taşıyıcı 3 (GLUT3) yoluyla hücreye girdikten sonra nöronlarda glukoz, heksokinaz (HK) ile glikoz-6-fosfata (G6P) fosforile edilir ve daha sonra glikolitik yolakta ve pentoz fosfat yolunda (PPP) yönlendirilir. Glikolizin son ürünü, tirokarboksilik asit (TCA) döngüsü ve elektron taşıma zincirinde (ETC) oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edilerek mitokondriye giren pirüvattır.

Glikolizin son ürünü, oksijen (O₂) tüketilirken adenosin-50-trifosfat (ATP) ve karbon dioksit (CO₂) üreten, elektron taşıma zincirindeki trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edildiği mitokondriye giren

piruvattır. Piruvat ayrıca laktat dehidrogenaz 1 (LDH1) bağımlı laktat dönüşümünden de üretilir.

PPP'de G6P, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ile eşzamanlı üretim ile ribuloz-5-fosfat (R5P) 'de transforme edilen 6-fosfoglukonat'a (6PG) dönüştürülür. NADPH, glutatyon (GSH) ve tioredoksin gibi oksitlenmiş antioksidanları rejenere etmek için kullanılır.

Nöronlar, glikojen sentaz (GS) 'nin glikojen sintaz kinaz 3 (GSK3) fosforilasyonu ve ardından malin-laforin kompleksinin aracılık ettiği ubiquitin bağımlı proteazomal sindirim yoluyla yapısal bozunması nedeniyle glikojen formunda depolayamazlar. Astrositlerde glikoz, glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) içinden ithal edilir ve tercihen glikojen olarak depolanır veya glikoliz yoluyla metabolize edilir.

Üretilen piruvat, laktat dehidrogenaz 5 (LDH5) ve piruvat dehidrogenaz kinaz 4 (PDK4) -piruvat dehidrogenazın (PDH) bağımlı inhibisyonu sayesinde laktata dönüştürülür. 6-fosforutokto-2-kinaz / fruktoz-2,6-bisfosfataz 3'ün (Pfkfb3) mevcudiyeti, astrositlerin PKF1 takviye glikolizinin bir allosterik modülatörü olarak görev yapan fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6P) üretmesine izin verir (51).

Tüm bu bilgiler ışığında, *SLC2A1* geninde herhangi bir varyasyona rastlanmayan hastalarda;

1. GLUT1 ile ilişkili diğer GLUT üyelerinin (GLUT2/3/4/5) taranması
ve/veya

2. MCT1, MCT2, MCT3 ve MCT4 proteinlerinin kodlandığı *SLC16A1*, *SLC16A3*, *SLC16A7* ve *SLC16A8* genlerinin fonksiyonel bölgelerinin taranması ileri moleküler testler adına tarafımızdan önerilebilir.

KAYNAKLAR

- 1.Lars Feuk, Andrew R. Carson & Stephen W. Schere, Structural variation in the human genome. Nature Reviews Genetics 7, 85-97 (February 2006) | doi:10.1038/nrg1767.
- 2.Todor Arsov, Glucose Transporter 1 Deficiency in the Idiopathic Generalized Epilepsies. PhD,2012.
- 3.Juan M Pascual, Dong Wang, Beatriz Lecumberri¹, Hong Yang, Xia Mao, Ru Yang and Darryl C De Vivo , GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. 2004.
- 4.Dong Wang, MD, Juan M. Pascual, MD, PhD, Hong Yang, MD, Kristin Engelstad, BS, Sarah Jhung, BA,Ruo Peng Sun, MD, and Darry C. De Vivo, MD¹. Glut-1 Deficiency Syndrome: Clinical, Genetic, and Therapeutic Aspects .
- 5.Joerg Klepper, Director of Paediatrics and Paediatric Neurology, Children's Hospital, Aschaffenburg, GLUT1 deficiency syndrome. 2007 update.
- 6.Lidia Di Vito, Laura Licchetta, Tommaso Pippucci, Sara Baldassari, Carlotta Stipa, Barbara Mostacci, Lara Alvisi, Paolo Tinuper, Francesca Bisulli, Phenotype variability of GLUT1 deficiency syndrome: Description of a case series with novel SLC2A1 gene mutations. 2017.
- 7.OMIM
- 8.ENSEMBL
9. Knut Brockmann, MD,¹ Dong Wang, MD,² ve ark., Autosomal Dominant Glut-1 Deficiency Syndrome and Familial Epilepsy.
10. J. Klepper, H. Scheffer, M. F. Elsaid , E.-J. Kamsteeg, M. Leferink, T. Ben-Omran, Autosomal Recessive Inheritance of GLUT1 Deficiency Syndrome. 2009.
- 11.Christina L. Vaughan MD, Paroxysmal Movement Disorders. Chapter 13.

- 12.Laura Silveira-Moriyama ve ark., Phenotypes, genotypes, and the management of paroxysmal movement disorder. 30 March 2018
- 13.Omasits ve ark., Bioinformatics. 2013
14. A.Méneret C. Gaudebout, F. Riant M. Vidailhet C. Depienne , *PRRT2* mutations and paroxysmal disorders. 09 February 2013.
- 15.Jennifer Kearney , A Mutation Hot-Spot for Benign Infantile Epilepsy.
- 16.Sachie Nakamur ve ark., Mutational and functional analysis of Glucose transporter I deficiency syndrome. 2015.
17. J.Craig Venter, The Sequence of the Human Genome. 16 FEBRUARY 2001 VOL.
- 18.Ji Qia, Yamao Chena ve ark., Detection of genomic variations and DNA polymorphisms and impact on analysis of meiotic recombination and genetic mapping.
- 19.Nora Fernandez-Jimene, Accuracy in Copy Number Calling by qPCR and PRT: A Matter of DNA.
- 20.QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Handbook, Fourth Edition, February 2015.
- 21.PCR Primer Design Basic Guidelines, Hopkins Lab, Version 1.4.
- 22.Andreas Untergasser ve ark., Primer3—new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 15.
- 23.Darren J Korbie & John S Mattick, Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. 2008.
- 24.Kun Sun, Yuet-Ping Yuen, Online Diagnosis System: A webserver for analysis of Sanger sequencing-based genetic testing data.
- 25.Linnea Baudhuin, Susan A. Lagerstedt, Eric W. Klee , Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing. July 2015.M.
- 26.Sanger sequencing troubleshooting guide , GATC Biotech AG , April, 2017.

- 27.Philippe Lamy, Claus L. Andersen, Friedrik P. Wikman, Carsten Wiuf, Genotyping and annotation of Affymetrix SNP arrays. Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 14.
- 28.Thomas LaFramboise, Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances, Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 13.
- 29.ACMG Standards and Guidelines : Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee 291, 2015.
- 30.Fatma Yeşim Kesim, Feyza Nur Tuncer, Emrah Yücesan, Özkan Özdemir, Mustafa Çalık, Uğur Özbek, Sibel Aylin Uğur, Tüm Genom SNP Genotipleme ile Trizomi 21 ve Ebeveyn Etkisinin Tespiti. İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
- 31.Daniel Nowaka, Wolf-Karsten Hofmann, H. Phillip Koefflera, Genome-Wide Mapping of Copy Number Variations Using SNP Arrays.
- 32.Sibel Aylin Uğur İşeri, Kopya Sayısı Değişikliklerinin SNP Array ile Tespiti.
- 33.DNA Copy Number and Loss of Heterozygosity Analysis Algorithms, Illumina, January 2017
- 34.GS01 0163 Analysis of Microarray Data, Keith Baggerly and Bradley Broom Department of Bioinformatics and Computational Biology UT M. D. Anderson Cancer Center , 24 November 2009.
- 35.Philippe Lamy, Jakob Grove, Carsten Wiuf, A review of software for microarray genotyping, March 2011.
- 36.Current Protocols Essential Laboratory Techniques Chapter · February 2014

37. Lijiang Ma, Wendy K. Chung, Quantitative Analysis of Copy Number Variants Based on RealTime LightCycler PCR.
38. W. Pfaffl*, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Micheal, 2001.
39. David G. Ginzinger, Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream, 2002.
40. LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche, Version 12, April 2011.
41. Angie L. Bookout and David J. Mangelsdorf, Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways.
42. J. M. Ruijter, C. Ramakers, W. M. H. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. B. van den Hoff¹ and A. F. M. Moorman, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data.
43. Xiayu Rao, Xuelin Huang, Zhicheng Zhou, and Xin Lin, An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis.
44. Angie L. Bookout and David J. Mangelsdorf, Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways, 2003.
45. Thomas D Schmittgen & Kenneth J Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. 2008.
46. Arsov Todor, GLUT-1 DEFICIENCY: FROM PATHOPHYSIOLOGY AND GENETICS TO ABROAD CLINICAL SPECTRUM. 2016.
47. Alexander Peeraera ve ark., Evaluation of GLUT1 variation in non-acquired focal epilepsy, 2017.
48. Jörg Klepper, Thomas Voit, Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain – a review 2002

49. Anette Ramm-Pettersen, Karl O. Nakken, Kathrine Cammermeyer Haavardsholm, Kaja Kristine Selmer, Occurrence of GLUT1 deficiency syndrome in patients treated with ketogenic diet, 2014.

50. Knut Brockmann, The expanding phenotype of GLUT1-deficiency syndrome, 2009.

51. Simonetta Camandola,* & Mark P Mattson, Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration April 24, 2017.

52. Charlotte Petersen et al., MCT1 and MCT4 Expression and Lactate Flux Activity Increase During White and Brown Adipogenesis and Impact Adipocyte Metabolism, 2017.



FORMLAR**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU**

Tarih:

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki çalışma kapsamını okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı istediğim zaman araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Bu gönüllü onam formunu imzalayarak benden kan alınmasını ve söz konusu araştırmada kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmasını baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, Soyadı:**İMZA****Gönüllünün Yasal Temsilcisinin Adı, Soyadı (Gerekli ise)****İMZA****Olur alma işlemine tanık olan kişinin Adı, Soyadı (Gerekli ise):****İMZA****Araştırmacının Adı, Soyadı:****İMZA**

GLUT1 eksikliği sendromu ilk olarak bebeklik çağında görülen metabolik bir ensefalopatidir. GLUT1, kan-beyin bariyeri boyunca birincil glikoz taşıyıcıdır ve eksikliği serebral metabolizma için gerekli olan glikozun yetersiz kalmasına neden olur. Kan-beyin bariyeri boyunca bozulmuş glikoz taşınımı sonucu oluşan klasik GLUT1 ensefalopatisi, infantil başlangıçlı nöbetler, gelişimsel yetersizlik, kompleks motor bozukluklar ve değişken mikrosefalileri ile karakterizedir.

GLUT1 eksikliği sendromunun birçok sebebi olabilir ancak genetik nedenler bunların arasında büyük bir yer kaplamaktadır. Özellikle akraba evlilikleri bu sendromun daha sık görülmesinde önemli rol oynamaktadır. GLUT1 eksikliği sendromunun genetik nedenlerinin araştırılması gelecekteki tedavi ve yaklaşımların belirlenebilmesi açısından önemlidir. Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma bir araştırmadır. Yapılacak genetik çalışma için periferik kandan izole edilen DNA materyali yeterli olmaktadır.

Ailenizde GLUT1 eksikliği sendromu olan hasta/hastaların bulunması nedeniyle sizin de araştırmaya katılmanız önerilmektedir. ‘‘GLUT1 Eksikliği Sendromu’nda Genetik Analizler’’ başlıklı çalışmamızda ailenizdeki hasta bireylerin periferik kanından elde edeceğimiz DNA materyalini kullanarak bu sendroma sebep olan genleri ve bu genlerdeki değişimleri araştırmayı hedeflemekteyiz. Yapılacak olan araştırma sonucunda GLUT1 eksikliğinden sorumlu olabilecek bir gen tespit edilmesi halinde sizin de taşıyıcılık açısından değerlendirilmeniz hem araştırmanın kuvveti hem de eğer isterseniz gelecek genetik danışma süreçlerinizin planlanması açısından faydalı olacaktır. Bu araştırma için sizden 1 adet EDTA’ lı tüpe 10 ml kan örneği alınacaktır.

Sizden alınacak olan kandan elde edilecek DNA materyaliniz kişi ismi kullanılmadan numara verilerek -20 °C’ de saklanacaktır. Bilgisayar ortamında ise şifreli olarak korunacaktır.

Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma boyunca sizden bir maddi katkı talebi olmayacak ve size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Çalışmadan istediğinizde ayrılmakta özgür olup, reddetmeniz halinde de herhangi bir engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. Bu çalışma sizin için herhangi bir risk veya rahatsızlık oluşturmayacaktır. Ancak uzun dönemde GLUT1 eksikliğinin nedenlerinin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmesi için önemlidir. Size ait bilgiler araştırma boyunca ve sonrasında gizli kalacak ve 3. şahıslarla paylaşılmayacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve sizin araştırmaya

katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde size veya yasal temsilcinize zamanında bilgi verilecektir. Araştırma kapsamında yapılacak çalışmanın suresi kesin değildir ve tedaviye yonelik bir cevap elde edilemeyebilir.

“GLUT1 EksikliğiSendromu’nda Genetik Analizler” başlıklı çalışma kapsamında alınan biyolojik rneklerimin;

☐

Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐

İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Sayın Mol.Bio. Cemre rnek tarafından İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik AnaBilim Dalı’nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “gönüllü” olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük zen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırmalar sırasında genetik çalışmanın ilerleyişi hakkında bilgi edinmek veya çalışmadan ayrılmak istediğimi beyan etmek ihtiyacım doğarsa Mol. Bio. Cemre Örnek'e Vakıf Gureba Cad. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Kat: 2 Genetik Bölümü, Fatih/İSTANBUL adresinden ve 02124142000/33318 telefon numarasından ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “gönüllü” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Tarih:

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki çalışma kapsamını okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Araştırmaya aşağıda ismi yazılı ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun katılmasını kabul ediyorum ve istediğim zaman araştırmadan ayrılabilceğini biliyorum. Bu gönüllü onam formunu imzalayarak ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuktan kan alınmasını ve söz konusu araştırmada kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmasını baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla kabul ediyorum.

Araştırmaya katılacak bireyin Adı, Soyadı:

Ebeveynin veya Vasinin Adı, Soyadı:

İMZA

Olur alma işlemine tanık olan kişinin Adı, Soyadı (Gerekli ise):

İMZA

Araştırmacının Adı, Soyadı:

İMZA

Sayın Ebeveyn veya Vasi;

GLUT1 eksikliği sendromu ilk olarak bebeklik çağında görülen metabolik bir ensefalopatidir. GLUT1, kan-beyin bariyeri boyunca birincil glikoz taşıyıcıdır ve

eksikliği serebral metabolizma için gerekli olan glikozun yetersiz kalmasına neden olur. Kan-beyin bariyeri boyunca bozulmuş glikoz taşınımı sonucu oluşan klasik GLUT1 ensefalopatisi, infantil başlangıçlı nöbetler, gelişimsel yetersizlik, kompleks motor bozukluklar ve değişken mikrosefalileri ile karakterizedir.

GLUT1 eksikliği sendromunun birçok sebebi olabilir ancak genetik nedenler bunların arasında büyük bir yer kaplamaktadır. Özellikle akraba evlilikleri bu sendromun daha sık görülmesinde önemli rol oynamaktadır. GLUT1 eksikliği sendromunun genetik nedenlerinin araştırılması gelecekteki tedavi ve yaklaşımların belirlenebilmesi açısından önemlidir. Kabul etmeniz halinde ebeveyni/vasisi bulunduğunuz çocuğun katılacağı bu çalışma bir araştırmadır. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde yapılacak olan "GLUT1 Eksikliği Sendromu'nda Genetik Analizler" başlıklı çalışmamızda bu sendroma sebep olan genleri ve bu genlerdeki değişimleri araştırmayı hedeflemekteyiz. Yapılacak genetik çalışma için 10 ml periferik kan yeterli olmaktadır. Bu araştırma için ebeveyni/vasisi olduğunuz çocuktan 1 adet EDTA'lı tüpe 10 ml kan örneği alınacaktır.

Ebeveyni/vasisi bulunduğunuz çocuktan alınacak olan kandan elde edilecek DNA materyali kişi ismi kullanılmadan numara verilerek -20 °C'de saklanacaktır. Bilgisayar ortamında ise şifreli olarak korunacaktır.

Araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma boyunca sizden bir maddi katkı talebi olmayacak ve size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Çalışmadan ebeveyni/vasisi bulunduğunuz çocuğun ayrılmasını istediğinizde, ayrılmakta özgür olup, bu koşulda klinik izlem, tedavi süreçleri ve tıbbi bakımda herhangi bir aksama olmayacaktır. Reddetmeniz halinde herhangi bir engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. Ebeveyni/vasisi bulunduğunuz çocuk için herhangi bir risk veya rahatsızlık oluşturmayacak olan bu çalışma, tedavi süreçlerini yönlendirmeyecektir. Ancak uzun dönemde GLUT1 eksikliği sendromunun nedenlerinin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmesi için önemlidir. Ebeveyni/vasisi bulunduğunuz çocuğa ait bilgiler araştırma boyunca ve sonrasında gizli kalacak ve 3. şahıslarla paylaşılmayacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliği gizli kalacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve

ebeveyni/vasisi bulunduğunuz çocuğun araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde zamanında bilgi verilecektir. Araştırma kapsamında yapılacak çalışmanın süresi kesin değildir ve tedaviye yönelik bir cevap elde edilemeyebilir.

“GLUT1 Eksikliği Sendromu’nda Genetik Analizler” başlıklı çalışma kapsamında ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuktan alınan biyolojik örneğin;

☐ Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐ İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Sayın Mol.Bio. Cemre Örnek tarafından İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik AnaBilim Dalı’nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun katılması önerildi. Eğer ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuk bu araştırmaya katılırsa hekim ile aramda kalması gereken bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun kişisel bilgilerinin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun araştırmadan çekilmesini isteyebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için bunu önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi duruma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırmalar sırasında genetik çalışmanın ilerleyişi hakkında bilgi edinmek veya çalışmadan ayrılmak istediğimi beyan etmek ihtiyacım doğarsa Sayın Mol.Bio. Cemre Örnek' e Vakıf Gureba Cad. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Kat: 2 Genetik Bölümü, Fatih/İSTANBUL adresinden ve 02124142000/33318 telefon numarasından ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğunkatılmasına izin vermek zorunda değilim. Ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun katılmasını reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda bu araştırma projesine ebeveyni/vasisi bulunduğum çocuğun katılmasına karar verdim. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 523

Tarih : 23.05.2017

Konu: Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ hk.

Sayın Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 03/05/2017 gün ve 166388 sayılı yazı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Cemre ÖRNEK' in yürüteceği 2017/493 dosya numaralı "GLUT1 eksikliği sendromunda genetik analizler" başlıklı çalışma kurumumuzun 12/05/2017 gün ve 09 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Ekl: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"GLUT1 eksikliği sendromunda genetik analizler"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCESİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐			
	Yüksek Düzeyli Araştırma	☐			
	Diğer ise belirtiniz :				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLAR ARASI ☐	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"GLUT1 eksikliği sendromunda genetik analizler"
-----------------------	---

Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	■		Türkçe ■ İngilizce □ Diğer □
BELGELENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ■ İngilizce □ Diğer □
OLGU RAPOR FORMU	□		Türkçe □ İngilizce □ Diğer □
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	□		Türkçe □ İngilizce □ Diğer □
Belge Adı	□		Açıklama
TURKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	□		
SKORTA	□		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■		
EVOLÜK MATERYEL TRANSFER FORMU	□		
HASTA KARTI GÖNÜLLÜKLERİ	□		
İLAN	□		
YILLIK BELDİRİM	□		
SONUÇ RAPORU	□		
GÜVENLİLİK BELDİRİMLERİ	□		
Diğer	■		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yürütme ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirilmesine Dair Belge, CV, CD
Kurum No:89	Tarih: 12/05/2017		
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Devlet Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ'nin önerdiği şekilde yürütüleceği yukarıda belirtilen verilerin araştırma bütçesi ile ilgili belgelerin araştırılması, arama, yakalama ve yorumları dikkate alınarak değerlendirilmesinde etik ve bilimsel saldırganlık bakanlığına toplanmaya katılan Etik Kurul üyesi tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU						
ÇALIŞMA EŞAŞI		19.08.2012 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağcı ÖRESİN				
Unvanı/Adı/Soyadı	Unvanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilgili *	Kararı ++	İmza
of. Dr. A. Yağcı ÖRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ■ K □	E □ H ■	E □ H ■	İZİNLE
Prof. Dr. Barrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E □ K ■	E □ H ■	E ■ H □	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoideji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■ K □	E □ H ■	E ■ H □	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■ K □	E □ H ■	E ■ H □	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.T. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E □ K ■	E □ H ■	E ■ H □	

* Araştırma ile ilgili
++ Toplantıda G.A.Ü.Ü.

İ.E. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 13.04.2013 tarih, 28017 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamındaki klinik araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin alınmak zorundadır. Yönetmelik kapsamında yapılan klinik araştırmalar ile Etik Kurul üyelerinin çıkarılmasını 5 yıllık alt komisyon tarafından değerlendirilmiştir olup Sağlık Bakanlığı ile ilgili değildir.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GLUT1 EKSİKLİĞİ SENDROMUNDA GENETİK ANALİZLER

ORIJINALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Cemre	Soyadı	Örnek
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	02.08.1992
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	17309326304
Email	cemreornek@gmail.com	Tel	05425831015

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2018
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014
Lise	İstanbul Fahreddin Kerim Gökay Anadolu Lisesi	2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi		82,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,11	76,26	69,61

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Genetik veri tabanları (NCBI, Ensembl)	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri :

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

