

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**CNTNAP2 VE SETBP1 VARYANTLARININ GELİŞİMSEL DİL
BOZUKLUĞUNA OLASI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Betül TURAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Emine GÖKTAŞ

KONYA, 2023

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**CNTNAP2 VE SETBP1 VARYANTLARININ GELİŞİMSEL DİL
BOZUKLUĞUNA OLASI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. Betül TURAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Emine GÖKTAŞ

İkinci Danışman

Prof. Dr. Ayşe Gül ZAMAN

KONYA, 2023

ÖNSÖZ

Tıbbi Genetik uzmanlık eğitimi sürecinde, sağladıkları tüm fırsatlar için değerli hocalarım Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM, Prof. Dr. Ayşe Gül ZAMAN ve Dr. Öğretim Üyesi Emine GÖKTAŞ'a; tezime sundukları katkılarından dolayı Doç. Dr. Necati UZUN'a, destekleri için sevgili aileme, ekip arkadaşlarıma ve laboratuvar emekçilerine teşekkür ederim.

Alvin Toffler'ın dediği gibi "Yirmi birinci yüzyılın cahilleri, okuma ve yazma bilmeyenler olmayacak, öğrenemeyen, öğrenilmiş bilgilerden vazgeçemeyen ve yeniden öğrenemeyenler olacak". Yaşam boyu öğrenme hali içinde olmak dileğiyle...

Kasım, 2023

Betül TURAN

Bu araştırma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 221518044

ÖZET

***CNTNAP2* ve *SETBP1* VARYANTLARININ GELİMSSEL DİL BOZUKLUĞUNA OLASI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. BETÜL TURAN, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2023

Amaç: Gelişimsel dil bozukluğu (GDB), çocukların iletişim kurmalarını zorlaştıran en yaygın gelişimsel engellilik olup, normal dil gelişimindeki bozulmanın, iletişim kaybı, nörolojik/psikiyatrik hastalıklar ve çevresel uyaranlardan yoksunluk ile açıklanamaması ile karakterizedir. GDB patogeneğinde çevrenin yanı sıra, güçlü genetik faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada *SETBP1* ve *CNTNAP2* genlerindeki dizi varyasyonları ve suçlanan çevresel etkenlerin GDB etiyojisindeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Eylül 2022-Mart 2023 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi (NEUTFH) Çocuk Ruh Sağlığı polikliniklerine başvuran, DSM-V ölçütlerine göre dil bozukluğu tanısı konulan, gelişim düzeyleri AGTE ile değerlendirilmiş olan, 2 - 7 yaş arasındaki otuz çocuk, etiyojiden sorumlu olabilecek aday genler ve çevresel etmenler açısından incelenmiştir. NEUTFH Tıbbi Genetik polikliniklerine başvuran, vaka grubundakiler ile yaş ve cinsiyet bakımından benzer, altta yatan bir hastalığı olmayan otuz sağlıklı çocuk kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Her iki grubun periferik kanından izole edilen DNA örneklerinde *SETBP1* ve *CNTNAP2* genleri yeni nesil dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir. Saptanan varyantların klinik önemini de değerlendirilmiş ve gerekli vakalarda varyant doğrulama ve segregasyon analizleri Sanger dizileme ile yapılmıştır. Elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

Bulgular: En sık varyant türü, *CNTNAP2* geninde intronik (%75), *SETBP1* geninde missense varyantlar (%60) olmuştur. 29 SNV vaka ve kontrol gruplarında ortak izlenirken üç SNV (rs186624619, rs17170742, rs373599564) ve iki önemi bilinmeyen (*CNTNAP2*: c.973C>G:p.P325A ve *CNTNAP2*: c.2236G>A:p.D746N) varyant yalnızca vaka grubunda izlenmiştir. Nadir varyantlardan biri novel olup, her ikisinin in silico analizleri çelişkili sonuçlar vermiştir. Yapılan segregasyon çalışmasında etkilenmemiş ebeveynlerden paternal kalıtıldıkları gösterilmiştir. Polimorfizmlerin vaka ve kontrol gruplarındaki sıklıkları kıyaslanmıştır. *SETBP1* rs11082414 (G/C) varyantı için homozigot CC genotip sıklığı hastalarda kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0,024). Nongenetik faktörler incelendiğinde ise vaka grubunda ortalama doğum kilosu daha yüksek (p=0,043), ortalama laktasyon süresi daha düşük (p=0,044) bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda aile öyküsü, erkek cinsiyet, 15 aydan az laktasyon süresi ve *SETBP1* rs11082414-CC varyantının GDB için risk faktörü olabileceği sonucuna varılmıştır. Risk faktörlerini belirlemek, yüksek riskli aileler için önleyici ve tedavi stratejileri oluşturmaya yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Çevre, Dil, Ekspresif, Genetik, Konuşma

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL IMPACT OF *CNTNAP2* AND *SETBP1* VARIANTS ON DEVELOPMENTAL LANGUAGE DISORDER

Objective: Developmental Language Disorder (DLD) is the most common developmental disability that hinders children's ability to communicate. It is characterized by a disruption in normal language development that cannot be explained by factors such as hearing loss, neurological/psychiatric disorders, or environmental deprivation. In addition to environmental factors, strong genetic factors are known to be involved in the pathomechanism of DLD. This study aimed to determine the role of sequence variations in the *SETBP1* and *CNTNAP2* genes, as well as the suspected environmental variables, in the etiology of DLD.

Methods: Between September 2022 and March 2023, thirty children aged 2-7 years who presented to the Pediatric Psychiatry Clinics of the Necmettin Erbakan University Faculty of Medicine (NEUFM) and were diagnosed with language disorders according to DSM-V criteria, and whose developmental levels were assessed using the AGTE, were examined for genetic and environmental factors that could be responsible for etiology. Thirty healthy children with no underlying diseases, matched for age and gender with the case group, who presented to the Medical Genetics Clinics of NEUFM, were included as a control group. DNA samples isolated from peripheral blood of both groups were analyzed for *SETBP1* and *CNTNAP2* genes (custom design panel) using next-generation sequencing. The clinical significance of the identified variants was evaluated, and variant verification and segregation analyses were performed by Sanger sequencing. The obtained data were compared using appropriate statistical methods.

Results: The most common type of variant was deep intronic in the *CNTNAP2* gene (75%), and missense variants in the *SETBP1* gene (60%). 29 SNVs were observed in both case and control groups, whereas three SNVs (rs186624619, rs17170742, rs373599564) and two variants of unknown significance (*CNTNAP2*: c.973C>G:p.P325A and *CNTNAP2*: c.2236G>A:p.D746N) were observed only in the case group. One of the rare variants was novel, and in silico analyses of both yielded conflicting results. The segregation study showed that they were paternally inherited from unaffected parents. The frequencies of polymorphisms were compared between the case and control groups. The *SETBP1* rs11082414-CC genotype frequency was significantly higher in patients compared to the controls. ($p=0.024$). Among non-genetic factors, the case group had a higher average birth weight ($p=0.043$), and a lower average lactation duration ($p=0.044$).

Conclusion: The family history, male gender, lactation duration of less than 15 months, and the *SETBP1* rs11082414-CC variant may be risk factors for DLD. Identifying risk factors can help create preventive and treatment strategies for high-risk families.

Keywords: Environment, Expressive, Genetic, Language, Speech

Ç NDEK LER

Sayfa

Ç KAPAK	
ÖNSÖZ	iii
Ç NDEK LER	vi
TABLolar	ix
EK LLER.....	x
KISALTMA ve S MGELER	xii
1 Giri	1
1.1 AMAÇ.....	1
2 GENEL B LG LER	2
2.1 Dil Edinim Kuramları	2
2.2 Dili Olu turan Unsurlar.....	2
2.3 Dilin Nöroanatomik Organizasyonu	3
2.4 Normal Dil Geli im Evreleri.....	5
2.5 Geli imsel Dil Bozuklu u	9
2.5.1 Tanım ve Tanı Kriterleri.....	9
2.5.2 Epidemiyoloji.....	11
2.5.3 Etiyoloji.....	11
2.5.4 Klinik Özellikler ve Komorbiditeler.....	12
2.5.5 Klinik De erlendirme	14
2.5.6 Müdahale	16
2.6 Geli imsel Dil Bozuklu u'nun Genetik Temeli.....	17
2.6.1 Geli imsel Dil Bozuklu u'nda aile temelli genetik ara tırmalar	20
2.6.2 Ara tırılan Genler.....	21

2.6.3	<i>GDB Genetik Etiyolojisinde Epigenetik Faktörlerin Rolü</i>	26
2.7	Genetik Kavramsal Çerçeve.....	26
2.7.1	<i>Genetik Varyant Türleri</i>	26
2.7.2	<i>Yeni Nesil Dizileme</i>	28
3	GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1	Ara tırmanın Tipi	30
3.2	Ara tırma Bölgesi ve Zamanı.....	30
3.3	Ara tırma Evreni ve Yeri	30
3.4	Çalışma Planı ve Sınırlılıklar	30
3.5	Ara tırmanın Etik ve Etik Durum.....	31
3.6	Ara tırma Öncesi Bilgilendirme	31
3.7	Katılımcıların Seçimi	31
3.8	Kullanılan Yöntemler.....	32
3.8.1	<i>Veri Toplama Araçları</i>	33
3.8.2	<i>Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler</i>	33
3.9	Çalışma Basamakları.....	34
3.9.1	<i>Örneklerinin Alınması ve Saklanması</i>	34
3.9.2	<i>DNA Dizilemede Kullanılan Primerlerinin Tasarlanması</i>	34
3.9.3	<i>DNA kütüphanesi</i>	36
3.9.4	<i>Yeni Nesil Dizileme</i>	39
3.9.5	<i>Biyoinformatik Analiz</i>	48
3.9.6	<i>Varyantların Sınıflandırılması</i>	48
3.9.7	<i>Segregasyon Analizi ve Varyant Doğrulama: Sanger Dizileme</i>	52
3.10	statistiksel Analizler.....	54

3.10.1	<i>Verilerin De erlendirmesinde Kullanılan statiksel Yöntemler</i>	54
4	BULGULAR	55
4.1	Sosyodemografik Özelliklerin De erlendirilmesi	55
4.2	Geli imsel Dil Bozuklu u Olası Risk Faktörlerinin De erlendirilmesi	57
4.3	Genetik Bulgular	66
4.3.1	<i>CNTNAP2 ve SETBP1 genlerinde tespit edilen varyant türleri</i>	66
4.3.2	<i>CNTNAP2 ve SETBP1 varyantlarının sınıflandırılması</i>	66
4.3.3	<i>Pedigri Örnekleri</i>	77
4.3.4	<i>Önemi Bilinmeyen Nadir Varyantların Segregasyon Analizi</i>	80
5	TARTI MA	81
6	KAYNAKLAR	93

TABLULAR

Tablo 1: Dilin bile enleri	2
Tablo 2. Alıcı ve fade Edici Dil Geli im Basamakları	8
Tablo 3. Vaka ve Kontrol Grublarının Sosyodemografik Özellikler ve Çevresel Faktörler Açısından Kar ıla tırılması	65
Tablo 4. <i>CNTNAP2</i> Geninde Tespit Edilen Nonsinonim Yaygın Varyantlar ve Allel Frekansları	69
Tablo 5. <i>CNTNAP2</i> Geninde Tespit Edilen Nadir Varyantlar Ve Allel Frekansları ..	69
Tablo 6. <i>CNTNAP2</i> Allellerinin Vaka ve Kontrol Gruplarında Kar ıla tırılması	70
Tablo 7. <i>SETBP1</i> Geninde Tespit Edilen Yaygın Nonsinonim Varyantlar ve Allel Frekansları	72
Tablo 8. <i>SETBP1</i> Allellerinin Vaka Ve Kontrol Gruplarında Kar ıla tırılması.....	73
Tablo 9. <i>CNTNAP2</i> Ve <i>SETBP1</i> 'de Varyant/ Homozigot Varyant Bulundurma Oranlarının Kar ıla tırılması.....	74

EK LLER

ekil 2-1: kili Akı Hipotezi.....	5
ekil 2-2: Multifaktöriyel Bir Hastalıda Yatkinlığın Dağılımı.....	19
ekil 2-3: <i>CNTNAP2</i> Domainleri ve Kodlayan Genomik Bölgelerin Gösterimi.	22
ekil 2-4: <i>SETBP1</i> Domainleri.....	24
ekil 2-5: <i>SETBP1</i> Proteini.....	24
ekil 2-6: Tek Nükleotid Varyasyonlarının Gösterimi.....	27
ekil 2-7: Çerçeve Kayması Varyasyonu Oluşum Mekanizması.....	27
ekil 3-1: Örnek Primer Dizilerinin Belirlenme Bölgeleri	36
ekil 3-2: Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması.....	37
ekil 3-3: Manuel DNA izolasyonu Akıncılığı	37
ekil 3-4: DNA izolasyon Cihazı (Maelstrom 4800).....	38
ekil 3-5: PZR Cihazında Bir Döngü	40
ekil 3-6: NEXTFlex™ Universal Amplicon Prep Kit v2 Kullanımı Akıncılığı.....	41
ekil 3-7: Köprü PZR Tabanlı Yeni Nesil Dizileme	47
ekil 3-8: MiniSeq cihazı (Illumina, Inc.)	48
ekil 3-9: Varyant Analizi Akıncılığı	52
ekil 4-1: Vaka ve Kontrol Gruplarında Cinsiyet Dağılımı.	55
ekil 4-2: Hasta Yaş Dağılımı Grafiği.....	56
ekil 4-3: Hasta ve Kontrol Gruplarının Aylık Gelir Düzeylerine Göre Dağılımları	56
ekil 4-4: Hasta ve Kontrol Gruplarının Maternal Eritim Düzeyine Göre Dağılımları. 57	
ekil 4-5: Hasta ve Kontrol Gruplarının Paternal Eritim Düzeyine Göre Dağılımları ..	57
ekil 4-6: Akraba Evliliği ve/veya Endogami Oranları.....	58
ekil 4-7: Hastalar ve Kontrol Grubunun, Doğum Sıralarına Göre Karşılaştırılması. ...	58
ekil 4-8: Grupların Hanehalkı Büyüklüğüne Göre Karşılaştırılması.....	60
ekil 4-9: Prenatal Dönemde Maternal Nikotin Maruziyeti ve Maternal Kronik Sistemik Hastalık Öyküsü Pozitif Olanların Gruplara Dağılımı	60
ekil 4-10: Hasta ve Kontrol Gruplarının Doğum öykülerine Göre Karşılaştırılması...60	
ekil 4-11: Hasta ve Kontrol gruplarında istatistiksel anlamlı farklılık gösteren çevresel değişkenler.....	62
ekil 4-12: ROC eğrileri.....	62
ekil 4-13: Vaka ve Kontrol Gruplarında Neonatal Sarılık Öyküsünün Kıyaslanması . 62	
ekil 4-14: Vaka ve Kontrol Gruplarında Okul Öncesi Eritime Katılım Oranları	63
ekil 4-15: Grupların Ekran Maruziyet Sürelerinin Kıyaslanması.....	63

ekil 4-16: Kız - Erkek Vakaların Ortalama Ya - Dil Geli im Ya ları Açısından Kıyaslanması.....	64
ekil 4-17: <i>CNTNAP2</i> Geninde Tespit Edilen Nonsinonim Varyant Türleri.....	67
ekil 4-18: <i>SETBP1</i> Geninde Tespit Edilen Nonsinonim Varyant Türleri	67
ekil 4-19: Çalı mamızda Tespit Edilen <i>CNTNAP2</i> Nonsinonim Kodlayan ve ntronik Bölge Varyantlarının Gen Üzerindeki ematik Gösterimi.	68
ekil 4-20: Nadir Varyantların IGV Görüntüleri.....	72
ekil 4-21: Çalı mamızda Tespit Edilen <i>SETBP1</i> Varyantlarının Gen Üzerindeki ematik Gösterimi	72
ekil 4-22: Pedigri Örnekleri.....	78
ekil 4-23: Segregasyon Analizi Sonuçları.....	81



KISALTMA ve S MGELER

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AGTE	Ankara Geli im Tarama Envanteri
APA	American Psychological Association
CES	Clinical Exome Sequencing
GDB	Geli imsel Dil Bozuklu u
GOF	Gain of Function
gnomAD	Genome Aggregation Database
DEHB	Dikkat Eksikli Hiperaktivite Bozuklu u
DSM	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders
GWAS	Genome Wide Association Study
HGVS	Human Genome Variation Society
ICD	International Classification of Diseases
LOF	Loss of Function
LOVD	Leiden Open Variation Database
MAF	Minör Allele Frequency
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SLI	Spesific Language Impairment
SNV	Single Nucleotide Variant
OKB	Obsesif Kompulsif Bozukluk
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OSB	Otizm Spektrum Bozuklu u
WES	Whole Exome Sequencing
YND	Yeni Nesil Dizileme

1 G R

Bilginin sözel ve/veya sözel olmayan ifadeler ile bireyler arası aktarılma süreci anlamına gelen 'iletim' kavramı ve dil olmak üzere iki ana başlıkta incelenir. Dil, anlamı iletmek amacıyla insanlar tarafından üzerinde anlaşılabilir semboller (sesler, kelimeler, yazı, işaret, jest vb) ve bu sembollerin nasıl kullanılacağını gösteren kurallar bütünü; kavram ise dil sembollerinin respiratuar, laringeal ve oral yapılar arasındaki etkileşimlerin sonucunda seslendirme aracılığıyla sözel ifadeler biçiminde somutlaştırılmasıdır(Türkbay, 2021). Diğer bir ifadeyle kavram, dilin verbal çıktısını; dil ise kavramın, yazılan, okunan, işaret edilen veya anlaşılabilir bir içeriğini ifade eder (William B. Carey, 2009).

Kavram ve dile özgü gelişimsel bozukluklar yüksek prevalansına rağmen genetik, nöroanatomik ve nörofonksiyonel etiyojisi en az çalışılan nörolojik gelişimsel bozukluklardan biridir(Rakhlin ve ark., 2020). Ülkemizde gelişimsel dil bozukluğu etiyojisini genetik ve çevresel faktörler açısından inceleyen kapsamlı bir araştırma bulunmamaktadır.

1.1 AMAÇ

Bu tez çalışmasında '*SETBP1* ve *CNTNAP2* genlerindeki dizi varyasyonları, gelişimsel dil bozukluğu etiyojisinde risk faktörü olabilir' hipotezi öne sürülmektedir. Bu hipotez çalışmanın amacı *SETBP1* ve *CNTNAP2* genlerinde patojenik, muhtemel patojenik, nadir (populasyon veritabanlarında <0.5%) ve yeni varyantları belirlemektir. Bu amaca ulaşmak için hedeflerimiz Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Ruhsal Bozukluklar için Tanısal ve Sayımsal El Kitabı 5. Basımı (DSM-5:Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5, APA, 2013) kriterlerine göre klinik olarak dil bozukluğu tanısı alan hastalar ve etkilenen aile üyelerini belirlemek, hastalara gelişim testi uygulamak, çevresel etmenleri sorgulamak, vaka ve kontrol gruplarında seçilen genlere yönelik yeni nesil dizileme analizi yapmak, saptanan varyantların klinik önemini değerlendirmek ve elde edilen sonuçları uygun istatistiksel yöntemler ile karşılaştırmaktır.

2 GENEL B LG LER

2.1 Dil Edinim Kuramları

Çocuklardaki dil kazanımına katkıda bulunan etkenleri açıklayan çe itli görü ler bulunmaktadır.

Skinner'ın Davranı çı Kuramına göre, dil geli im sürecinde temel etkenler, model alma, taklit ve peki tirmedir. Bu yakla ıma göre insano lu anadilini ko ullanma sayesinde ö renir, biyolojik yapının rolü minimum düzeydedir.

Psiko-Linguistik Kuramcılardan Chomsky ve Lenneberg; insanların biyolojik bir alt yapı ile dile yetenekli do du unu, çevresinde konu anlar oldu u sürece çocukların konu mayı ö renilebilece ini savunur.

Piaget, dili ö renmenin bili sel geli ime dayalı oldu unu ve dilin kalıtım ve çevre etkile imiyle edinildi ini ileri sürer (Etkile imci Görü). Piaget'in genetik yönelimli bakı açısına kar ın Vygotsky, dil geli iminde toplumsal çevrenin ve sosyo-kültürel etmenlerin rolünü ön plana çıkarmı tır (Çakır, 2013).

2.2 Dili Olu turan Unsurlar

Dilde yeterlilik kazanmak için be tür bilgiye (fonoloji, morfoloji, semantik, sentaks ve pragmatik) ihtiyaç vardır (Da abakan & Da abakan, 2007). Fonoloji (ses bilgisi), morfoloji (biçimbirim) ve sentaks (sözdizimi) bilgisi, dilin biçim/form bile enini ; semantik (anlam) bilgisi, dilin içerik bile enini ; pragmatik (sosyal kullanım) bilgisi ise dilin i levsel bile enini olu turmaktadır. Dilin bile enlerini tanımlayan terimler Tablo 1 ile açıklanmı tır.

Tanımlamaları ve ara tırmaları kolayla tırmak için dil; alıcı (reseptif) ve ifade edici (ekspresif) olmak üzere iki temel alanda incelenmektedir. Alıcı dil; sembolleri, kelimeleri, konu ulan dili i leme, anlama ve kavram olu turma yetene ini; ifade edici dil ise dili kullanarak (konu ma, i aret, eylem, resim, yazı vb yoluyla) ba kalarıyla ileti im kurma yetene ini ifade eder.

Tablo 1: Dilin Bile enleri

Biçim	Fonoloji	Bir dilin temel ses yapıları (fonemler) ve bu seslerin birle tirilmesine ili kin kuralları kapsayan sistemdir. Fonemler anlamlı ekilde bir araya getirilerek morfemler olu turulur.
	Morfoloji	Sözlükte (leksikon) dilin anlam içeren en küçük birimlerine morfem adı verilir. Morfoloji hece, ek, sözcük gibi morfemlerin biçimsel düzenlemelerine ili kin kuralları inceleyen sistemdir.
	Sentaks	Kelimeleri cümle içinde belirli kurallarla sıralama becerisi ve özne, nesne, yüklem arasındaki fonksiyonel ili kileri inceleyen sistemdir.
çerik	Semantik	Dili anlam yönünden ele alan sistemdir. Kelimeleri, cümleleri anlama becerisidir.
lev	Pragmatik	Sözel ve sözsüz ileti im için ba lam ipuçlarını kullanma yetene idir. Konu ma sırasına uyma, göz teması kurma, tonlamayı de i tirme dilin pragmatik ö elerine örnektir.

2.3 Dilin Nöroanatomik Organizasyonu

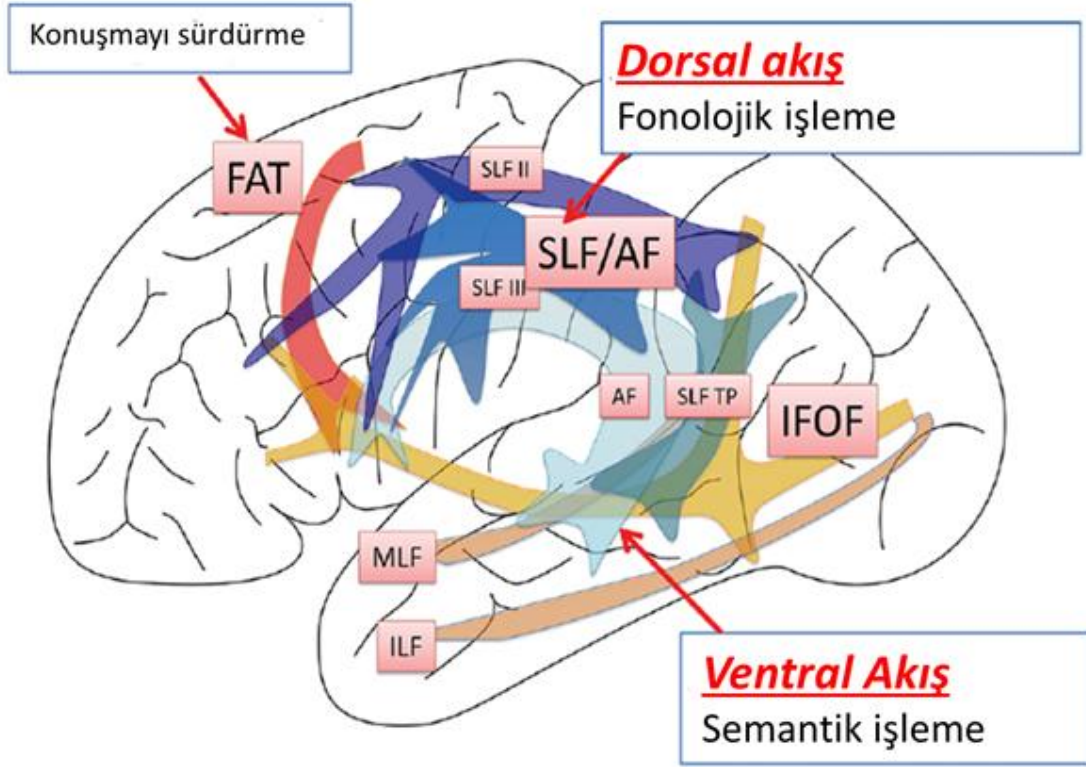
Son yüzyılda konu ma ve dile ait bile enlerin beyinde hangi yapıların fonksiyonlarıyla ili kili oldu una dair bilgimiz, geli imsel bozukluklar hakkında yapılan ara tırmalardan elde edilen verilerle artmı tır(Van der Lely & Pinker, 2014).

Geli imsel yapılanma; ya amı sürdürmeye yönelik otonom i levlerle ilgili beyin sapı ve orta beyinden ba layarak, kognitif süreçleri yürüten yönetici katmana do ru bir sıralanma gösterir. Bu nedenle yenido anlarda üst kortikal bölgelerdeki nöronlar, ba lantısal organizasyonunu henüz tamamlamamı durumdadır(Torun, 2018). Dil geli imi ile ilgili nöral yolaklar, ya amın ilk yıllarında genetik olarak programlanmı nöroplastisite mekanizmaları ve çevresel girdilerin etkisi altında olu ur. Dili anlama ve üretme süreçlerinde çok çe itli beyin alanlarında gerçekte en ve birle tirilen i lemler özelle erek bir çe it otomasyon kazanır.

nsan ileti iminin benzersiz niteli i nedeniyle, dilin serebral organizasyonu hakkındaki ilk bilgiler afazili hastalar üzerinde yapılan çalı malardan elde edilmi tir. Paul Broca'nın (1861) konu ma üretiminde bozukluk ile sol posterior inferior frontal girus lezyonunu ili kilendirdi i rapordan sonra, Carl Wernicke (1874) sol inferior parietal ve/veya posterior superior temporal bölgeyi i itsel kelime i lemeye ayrılmı bir alan olarak tanımladı(Catani, Jones, & Ffytche, 2005). 19. yüzyıldan itibaren afazilerin

ço unlukla sol hemisfer, özellikle de perisilvian hasarlarda ortaya çıktı ı kabul edilmi tir. Bu duruma paralel olarak tarihsel süreçte Broca alanı (Brodmann 44, 45, 47) ifade edici dil ile, Wernicke alanı (Brodmann 22) alıcı dil ile özde le mi tir. Broca, Wernicke ve iki merkez üssünü birbirine ba ladı ı dü ünülen arkuat fasikülün olu turdu u Klasik Dil Beyin Modeli 150 yılı a kın süredir tıp ders kitaplarında anlatılmaktadır.

Son dekatta ileri nörogörüntüleme tekniklerinin (intraoperatif elektrofizyolojik stimülasyon çalı maları, difüzyon tensör görüntüleme, fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi, elektroensefalografi, magnetoensefalografi, tek foton emisyon tomografisi, fonksiyonel near-infrared spectrografi vs) ortaya çıkmasıyla beyinde dil organizasyonu yo un bir incelemeye tabi tutulmu tur. Yeni ara tırmalar ‘ kili Akı ’ (dual stream) hipotezini öne çıkarmı tir. İlk olarak görme fonksiyonuna ili kin nöral i lemleri açıklamak için öne sürülen ve geni kabul gören bu hipotez, Klasik Dil Beyin Modelinin (Broca–Wernicke–Lichtheim–Geschwind model ailesi) zayıf yönlerini de açıklayıcı özellikler ta ımaktadır. Gregory Hickok ve David Poeppel (2007) tarafından önerilen ikili akı modeline göre beyinde birbiriyle fiber yolaklar aracılı ıyla a lar olu turacak ekilde ba lantı kuran nöronal birimler (modüller) vardır (Hickok & Poeppel, 2016). Bununla birlikte dil sisteminin farklı yönleri ile ilgili i lemler için çok sayıda fiber yolak (aksonal ba lantı) özelle mi tir. Arcuate fasciculus (AF), superior longitudinal fasciculus (SLF), middle longitudinal fasciculus (MLF), inferior fronto-occipital fasciculus (IFOF), uncinate fasciculus (UF) gibi fiber yolaklar etkile im içinde çalı arak kompleks bir ba lantı eması (The Language Connectome) meydana getirir (ekil 2-1). Modern tıpta sistemleri açıklamak için a kavramı giderek daha fazla kullanılmaktadır. kili akı modeli de beyin-dil i lemlerini modül-a anlayı ı ile açıklamaktadır. Her iki hemisferde bulunan modüller belirli beyin-dil i lemlerini desteklemek üzere a sisteminde birlikte hareket eder.



ekil 2-1: kili Akı Hipotezi. Dili anlama ve ifade etme i levleri; beyinde ‘ventral ve dorsal akı lar’ olarak isimlendirilen paralel iki i lem akı ı içinde gerçekle tirilmektedir. Dorsal akı (SLF/AF aracılı ıyla) fonolojik i lemler ile; ventral akı (UF, MLF, IFOF) semantik i lemler ile ba lantılıdır.

Ventral akı i lemleri her iki hemisferin temporal ve inferior parietal lobunu ilgilendiren bir organizasyon gösterirken; dorsal akı i lemleri sol frontal lobu (prefrontal korteks), sol superior temporal lobu (parietal-temporal birle im bölgesi) ve ikisini birle tiren longitudinal fasikül kompleksine haritalanır. Dorsal akı içinde posterior silvian fissür çevresindeki bölge, artikülasyon kontrolünü sa layan ‘duysal-motor birle tirme alanı’ olarak nitelendirilmektedir.

2.4 Normal Dil Geli im Evreleri

Dil geli imi, bili sel, duygusal ve sosyal geli imle paralel olarak ya am boyu devam eden ve kompleks etkile imler içeren bir süreçtir. Bu süreç genetik ve çevresel etmenler ile ekillenir. İnsanlar konu mayı algılama mekanizmalarına do u tan sahiptir. Yenido an döneminde bebekler, di er i itsel uyaranlara kıyasla insan sesini dinlemeyi daha çok tercih ederler. Normal dil geli imi için her eyden önce çocukların -ideal olarak stressiz bir ortamda- yanıt veren yeti kinlerle etkile ime girmesi ve dili bolca duymaları gerekir. Ayrıca sestten anlam çıkarmak, kuralları ö renmek, motor planlama-

programlama yapmak için bilişsel ve nöral süreçleri kullanabilmelidirler (William B. Carey, 2009).

Temel gerekliliklerin varlığında, dil edinimi diğer gelişimsel fenomenlere benzer şekilde öngörülebilir bir sıralıdır. Bebeğin, ilk kelimelerini söylemeden önce, sesler ve hareketler aracılığıyla iletişim kurduğu döneme **prelinguistik dönem** denir. Bu dönemin erken aşamalarında alıcı dil becerileri, ifade edici dil becerilerinden daha iyi düzeyde olsa da iki beceri tipik olarak senkronize gelişir. İfade edici dil gelişimi, ilk birkaç ayda vokalizasyonla başlar, 3-4 aylıkken, infantlar tüm sesli harfleri ve “b, m, p” gibi dudak ünsüzlerini çıkarabilir. Ses oyunları ile hoşnutluğunu belirttiği, gülümsemenin ortaya çıktığı sonraki safha ağulama safhası olarak adlandırılır. Prelinguistik iletişim kusuru olan bebeklerde de ağulama olmaktadır. İtilme kusuru olmayan bebekler 5-6 aylıkken ana dillerinin fonemlerini ve prozodisini tanıma ve diğer dillerden ayırt etme yeteneğini gösterirler. Bu dönemde primitif sesler babıldamalara dönüşmüştür. İlk yılın ikinci yarısından itibaren babıldama olgunlaştıkça infantlar mama ve dada gibi evrensel özelliklere sahip tekrarlayan iki heceli kombinasyonlar üretirler, ancak bu kombinasyonların sembolik bir referansı yoktur. Morfemlerin anlaşılması 8. ay dolaylarına rastlamaktadır, bebek artık duyduğu sesleri taklit etmeye çalışmaktadır. 10 aylık bir infant çeşitlenmiş babıldama evresindedir. Alıcı sözcük dağarcığı 150-200’e ulaşmasına rağmen henüz yeni yeni farklı heceleri bir araya getirerek babıldama yapabilmektedir. Aynı zamanda beden dili ile iletişim kurabilmektedir (hayır anlamında baş sallama, kucağına alınmak için kollarını kaldırma gibi). 1 yaşında basit komutlara (topu at, oyuncakı ver gibi) tepki verebilir, sorulduğunda vücudun en az bir bölümüne işaret edebilir (Michelle M. Macias, 2018). Gerçek sözcüklerin veya sembol olarak kullanılan seslerin ortaya çıkması, infantın nesne sürekliliği kavramını kazanmasına bağlıdır. Bir kişinin veya nesnenin adlandırılabilmesi için infantın zihninde sabit bir varlığı olması gerekir. Bu nedenle infantlar 10 ila 15 aylıkken (çoğunlukla ilk yaş günlerinde) ilk gerçek kelimelerini söyleyebilmektedirler. İlk kelimeler genellikle tanıdıkları kişileri veya nesnelere etiketlemek için kullanılan isimlerdir (Michelle M. Macias, 2018). Sembolik oyun oynama becerisi de gerçek kelimelerin ortaya çıkmasına paralel olarak; 1 yaşından itibaren (**linguistik dönem**) kademeli olarak gelişmektedir. Bir çocuk ortalama 10-20 kelimelik bir ifade edici kelime dağarcığına sahip olduğunda, yaklaşık 18 aylıkken kelimeleri birleştirilmeye (sentaks) başlar. İsimlerin birbirini izlemesi şeklinde iki kelimelik bu immatür kombinasyonlar telgraf cümleleri olarak bilinmektedir. 24-36 ay arası çocuklar için dil

gelişiminin en ayırt edici özelliği duyduğu sözcükleri taklit etmeye ve sözcük anlamlarını kavramaya başlamasıdır. Yaşamın ikinci ve üçüncü yıllarında, kelime dağarcığı ve kombinasyonları istikrarlı bir şekilde katlanarak genişler (William B. Carey, 2009). 2 yaşına kadar ortalama 50 kelime, 2.5 yaşına kadar ortalama 400 kelime edinilir. Bununla birlikte 2 ila 3 yaşları arasında zamirler, bağlaçlar, olumsuz yapılar, çoğul ekleri basit düzeyde kullanılabilen ve çok sözcüklü kombinasyonlar üretilmektedir. 3 yaşında bazı karşıt anlamlı sıfatları bilir, nesnelere nitelendirir, sözcük dağarcığı 1000 kelimeye kadar ulaşmaktadır. 2 yaşında konuşmasının %50'si, 3 yaşında ise %75-90'ını aileden gelen yabancılar tarafından anlaşılabilir. 3-4 yaş arasında sözcük ve cümle yapısındaki karmaşıklık artar. 4 yaşında çocuklar pragmatik bilgiyi kazanmıştır, geçmiş zaman çekimli fiilleri doğru şekilde kullanabilir, "ne", "neden", "nasıl", "nerede", "ne zaman", "kim" sorularına cevap verebilir, adını, soyadını, yaşını ve cinsiyetini bilir. Kabaca, çocukların %90'ı 2 yaşında 2 kelimelik cümleler, 3 yaşında 3 kelimelik cümleler ve 4 yaşında 4 kelimelik cümleler kurabilmeleri beklenir (Çiyiltepe & Türkbay, 2004; Leung & Kao, 1999; Michelle M. Macias, 2018).

Dil gelişim amaçlarının sırası değişmez ancak gelişimin hızı, genetik ve çevresel etmenlerden etkilenebilmektedir. Sözlü etkileşimler ve iyi duygusal ilişkiler ile iletişimi pekiştirilen çocuklarda dil gelişimi daha hızlı iken bilingual çocukların dil gelişimi daha yavaştır. Aynı anda iki dil öğrenen bilingual çocuklar, tek dil öğrenenler ile aynı dil gelişim modelini takip eder ve genellikle 5 yaşından önce her iki dili de ustaca konuşabilirler (Leung & Kao, 1999; Michelle M. Macias, 2018). Tablo 2 dil ediniminde kritik dönüm noktalarını, dil becerilerinin edinildiği ortalama zaman aralığını, gelişimin geciktirilmesi ve deşerlendirilmesi gerektiğini gösteren dönüm noktalarını açıklamaktadır.

Tablo 2. Alıcı ve ifade Edici Dil Gelişim Basamakları (Zimmerman ve ark)

Alıcı Dil Becerileri Gelişim Basamakları	Ortalama Edinme Yaşı	Kırmızı Bayraklar*
Ses ile uyarılır	0-1 ay	2. ay
Kendi adına döner	6-8 ay	10. ay
Sözel oyunları takip eder (bay bay yapma)	8-10 ay	12. ay
Basit soruları anlar (anne nerede)	9-11 ay	15. ay
“Hayır” denildiğinde durur	9-10 ay	15. ay
En az 3 farklı kelimeyi anlar	10-13 ay	15. ay
3 farklı vücut bölümünü işaret eder	12-16 ay	18. ay
Basit komutları takip eder (topu göster)	12. ay	18. ay
2 amaçlı (sıralı) komutları yerine getirebilir (Örn: Ayakkabıları al, babaya ver)	24. ay	30. ay
Basit sorulara yanıt verir (bu nedir)	24-30 ay	36. ay
İfade Edici Dil Becerileri Gelişim Basamakları		
Vokalizasyon (Cıvıldaama veya Gıvıldaama)	2-3 ay	6. ay
Babıldaama (Ağulama)	3-6 ay	8 ay
Heceleme (Çağuldaama)		
Babıldaamanın tekrarı (Reduplicated babbling)	6-8 ay	14. ay
Çeşitlenmiş babıldaama (Varied babbling)	8-12 ay	
İstediği nesneyi işaret etme (Amaçlı sözsüz mesajlar)	9-11 ay	14. ay
3 farklı kelime söyler	12-15 ay	16. ay
Kelime dağarcığı en az 35-50 kelime	18-22 ay	24. ay
iki kelimelik ifadeler (anne, su)	18-22 ay	24. ay
Basit cümle üretimi (su istiyorum)	24-30 ay	36. ay
Ebeveynin soruları ile geçmiş bir olayı anlatabilme (3-5 kelimelik cümleler)	24-30 ay	36. ay
Tanıdık olmayan yeti kinler tarafından %50'nin üzerinde anlaşılabilirlik	30-36 ay	42. ay
Tanıdık olmayan bir yeti kin tarafından tamamen anlaşılabilirlik	48-54 ay	60. ay
Tamamen matür konuşma sesleri, hikâye anlatabilme		>72. Ay

* Belirgin gecikmeyi gösteren yaş, kırmızı bayrak olarak adlandırıldı.

2.5 Gelişimsel Dil Bozukluğu

2.5.1 Tanım ve Tanı Kriterleri

GDB; dili hem sözlü hem de sözlü olmayan bağlamda anlama ve kullanma yeteneğinde çeşitli iddetlerde bozulma olarak tanımlanmaktadır. Literatürde ‘Özgül Dil Bozukluğu’ (Specific language impairment - SLI) terminolojisi ile de yer almaktadır. Bu teşhis, normal dil gelişimindeki bozulmanın, altında yatan sendromlar, bilişsel yetersizlik, otizm, epilepsi gibi nörolojik hastalıklar, iletişim kaybı, artikulatuar yapılar da anomaliler ya da bilingualism ve çevresel uyaranlardan yoksunluk ile açıklanamadığı durumlarda konulmaktadır (D. V. Bishop ve ark., 2017; Courtenay Frazier Norbury, 2015).

Dil edinimi, bir çocuğun gelişimsel gelişiminin en temel yapı taşlarıdır. Dil bozukluğu olan çocukları olabildiğince erken dönemde tanımak ve müdahale etmek oldukça önemlidir. Ancak belirtilerin geniş bir yelpazede olması klinik tanıda zorluklara neden olabilmektedir. GDB; psikiyatrik tanı sınıflandırma sistemi DSM-V’te (Amerikan Psikiyatri Birliği, 2013)’te “Nörogelişimsel Bozukluklar” başlığı altında gruplandırılan ‘iletişim bozuklukları’ arasında aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır;

1-Özgül Dil Bozukluğu (Gelişimsel Dil Bozukluğu)

2-Konuşma Sesi Bozukluğu

3-Akıcı Konuşma Bozukluğu (Kekemelik)

4-Toplumsal İletişim Bozukluğu (Sosyal Pragmatik İletişim Bozukluğu)

5-Tanımlanmamış İletişim Bozukluğu

DSM-V’te Özgül Dil Bozukluğu tanı kriterleri şunlardır:

A. Dilin çeşitli kanallar yoluyla (sözlü, yazılı, işaret dili ve/veya diğer semboller sistemleri) edinilmesi ve üretilmesinde sorun alanları(*) kapsayan kalıcı zorluklar;

* Azalmış sözcük dağarcığı (sözcük bilgisi ve kullanımı)

* Sınırlı cümle yapısı (sözcükleri birbiri ardına dizerek gramer ve morfoloji kurallarına uygun cümle kurma becerisi)

* Anlatı bozukluğu (sohbet etmek veya bir konuyu veya olay serisini açıklamak veya betimlemek amacıyla sözcükleri kullanabilme ve cümleleri bağlayabilme)

B. Beklenen dil becerilerinin akranlarından önemli ve ölçülebilir derecede düşük olması sonucu; etkili iletişim, sosyal katılım, akademik başarı veya mesleki performans alanlarının bir veya daha fazlasında fonksiyonel sınırlılık

C. Belirtilerin erken gelişimsel dönemde başlaması

D. Bu zorlukların, duyuşal bozukluklar (itme kaybı gibi), motor disfonksiyon veya di er medikal durumlara ba lanamaması, bili sel yetersizlik veya yaygın geli imsel bozukluk ile daha iyi açıklanamaması

DSM-5'te 'Özgöl Dil Bozuklu u' ile ifade edilen grup Dünya Sa lık Örgütü tarafından 2019'da yayınlanan Uluslararası Hastalıklar ve Sa lık Problemlerinin statiksel Sınıflandırması'nda (ICD 11/International Classification of Diseases) 'Konu ma veya Dile Özgü Geli imsel Bozukluklar' ana ba lı ı altında Geli imsel Dil Bozuklukları (GDB) terimiyle yer almı tır. GDB; geli imsel dönemde ortaya çıkan, dili anlamada, üretmede veya ileti m amacıyla ba lam içinde kullanmada süregiden güçlükler ile karakterize edilmi tir. ICD 11 içerisinde konu ma veya dile özgü geli imsel bozuklukların sınıflandırılması u ekildedir:

- 1-Geli imsel dil bozuklu u
- 2-Geli imsel konu ma sesi bozuklu u
- 3-Geli imsel konu ma akıcılı ı bozuklu u
- 4- Konu ma ve dile özgü tanımlanmı di er geli imsel bozukluklar

ICD 11'de Geli imsel dil bozuklu u tanıs al özellikler arasında; dil becerilerinin, ya ve entelektüel i levsellik düzeyine göre beklenen normal varyasyon sınırlarının belirgin ekilde altında olması, bu durumun anatomik veya nörolojik anormallikler ile tam olarak açıklanamaması ve ki isel, ailevi, sosyal, akademik, mesleki veya di er i levsellik alanlarında önemli ölçüde bozulmaya neden olması sayılmı tır.

Özgöl dil bozuklu u, geli imsel dil bozuklu u ve ekspresif dil bozuklu u haricinde bu durum için literatürde geç konu ma, dil gecikmesi, dil yetersizli i, dil ö renme güçlü ü, primer dil bozuklu u, idiopatik dil bozuklu u, yava ifade edici dil geli imi, konjenital/geli imsel disfazi gibi farklı isimlendirmeler yer almı tır. Bu alanda çalı an profesyoneller (tıp doktorları, özel e itimciler, psikologlar, dil terapistleri, dilbilimciler gibi) arasında tutarlı bir terminolojinin bulunmaması tanı ve müdahalede gecikmelere neden olabildi i gibi yapılan ara tırmaları da olumsuz etkileyebilmektedir. Dile ili kin problemler hakkında ortak bir dile ihtiyaç duyulması üzerine 2017 yılında Bishop ve arkada ları öncülü ünde çok uluslu, multidisipliner bir panel düzenlenmi tir(Bishop ve ark., 2017). CATALISE isimli bu toplantıda ço unlu u dil ve konu ma terapisi uzmanlarından olu an 57 panel üyesi, terminoloji hakkında bir dizi ifadeyi 1 (kesinlikle katılmıyorum) ile 5 (kesinlikle katılıyorum) arasında 5 puanlık bir ölçekte puanlamı tır. Yanıtlar anonimle tirilerek tüm panel üyelerine da ıtılmı , ikinci turda terminoloji hakkındaki ifadeler, geri bildirimlere göre revize edilmi ve tekrar

puanlanmı tır. Tartı malar sonucunda uzmanlar ‘Geli imsel Dil Bozuklu u - Developmental Language Disorder’ teriminin, geli im sırasında ortaya çıkan ve bilinen biyomedikal bir duruma ba lı olmayan dil bozuklukları için kullanılması üzerinde görü birli ine varmı tır. Yanıltıcı ve kafa karı tırıcı ça rı ımlara sahip olması nedeniyle ‘Özgül Dil Bozuklu u – Spesific Language Impairment’ teriminin ortadan kaldırılması önerilmi tır. CATALISE çalı ması sonucunda uzla ılan bu terim ICD-11 kullanımı ile de uyumludur. Bu verilere dayanarak ara tırmamızda ‘Geli imsel Dil Bozuklu u’ terimi tercih edilmi tır.

2.5.2 Epidemiyoloji

Okulöncesi çocuklarda yapılan ara tırmalarda alıcı ve/veya ifade edici dilde gecikmenin prevalansı; terminolojideki karma aya, kullanılan tanı kriterleri ve ara tırma yapılan ya gruplarına ba lı olarak önemli ölçüde (%3- 17.5) de i mektedir(Horwitz ve ark., 2003; Rescorla & Achenbach, 2002; Rescorla & Alley, 2001). En yaygın olarak belirtilen GDB prevalansı, Tomblin ve arkadaş ları (1997) tarafından Iowa’daki 7218 anaokulu çocu u üzerinde yapılan bir ara tırmada elde edilen %7.4 tahminidir(Tomblin ve ark., 1997). Pek çok nörogeli imsel bozuklukta oldu u gibi geli imsel dil bozukluklu undan da erkek çocuklar önemli ölçüde daha yüksek bir oranda etkilenir. GDB için de durum farklı de ildir. Robinson ve arkadaş ları (1991) tarafından, ya ortalaması 12 olan 82 özgül dil bozuklu u tanılı çocuk arasında yapılan bir ara tırmada erkek ve kız cinsiyet oranı 3,8/1 olarak bildirilmi tir(Robinson, 1991).

2.5.3 Etiyoloji

Sa lıklı bir dil geli imi için temel gereksinimler: yeterli sözel girdi, normal i itme, kognitif-nöral süreçler, konu ma donanımları ve sosyal etkile imler ekinde özetlenebilir. Bu temel gereksinimlerdeki eksiklikler; dil ve konu ma geli imindeki bozulmadan sorumlu tutulmu tur.

Entellektüel yetersizlik ve otizm spektrum bozuklu u dil-konu ma gecikmesinin en sık organik nedenlerini olu turur(Yasin, Aksu, Özgür, & Özgür, 2017). Bununla birlikte i itme kaybı, psikososyal uyaran eksikli i, verbal dispraksi, kas hastalıkları ve anatomik problemlere (ankiloglossi, yarı damak, velofarengal yetmezlik) sekonder olarak dil ve konu ma geli iminde bozulma ortaya çıkabilir.

Fonksiyonel nörogörüntüleme tekniklerinin ilerlemesi ile geli imsel dil bozuklu u olan bireylerin beyinlerinde dil i lemlerinin yürütüldü ü a larda i levsel farklılıklar tespit edilmi tir. Elektrofizyolojik çalı malardan elde edilen kanıtlar GDB’de ya amın

ilk yılında linguistik ve işitsel öğrenme süreçlerinin belirli bir derecede bozulduğunu göstermektedir (Luyster, Seery, Talbott, & Tager Flusberg, 2011). Leonard (2014); algı, dikkat, işitsel öğrenme, bilgiyi depolama, zihinsel temsil becerileri gibi kognitif süreçlerdeki farklılıkların dil edinimini zorlaştırıyor savunmaktadır. Bu bilgiler ışığında beyinde yürütücü işlevleri etkileyen herhangi bir durumun (nörodejenatif hastalıklar, psikiyatrik bozukluklar) dil edinimini de etkileyebileceği çıkarımı yapılabilir.

Erkek cinsiyette olmanın yanı sıra birinci derece aile bireylerinde dil güçlüklerinin olması, GDB riskini belirgin artırmaktadır (Roulstone, Loader, Northstone, & Beveridge, 2002; Zubrick, Taylor, Rice, & Slegers, 2007). Aile bireyleri arasındaki benzerlikler, hem genotipin sonucu, hem de aile bireyleri tarafından paylaşılan ve genetik olmayan etkenlerle temas etmenin ortak sonucu olabilmektedir. Dil gelişim özellikleri ile ilişkilendirilen sosyal ve çevresel faktörler bunlardır: Prenatal dönemde nikotin, alkol, radyasyon, teratojen maruziyeti, annenin gebelik sırasındaki hastalıkları (depresyon, hipotiroidi, diyabet, hipertansiyon vb), prematüre doğum, sezaryen doğum, düşük doğum ağırlığı, perinatal asfiksi-enfeksiyon-travma gibi doğum komplikasyonları, hiperbilirubinemi, motor gelişim geriliği, ebeveynlerin sosyoekonomik ve sosyokültürel düzeyinin düşük olması, düşük ebeveyn eğitim düzeyi, ev içi karmaşa, ebeveynlik becerileri-deneyimleri ve tutumları, ev okuryazarlık ortamı, kötü fiziksel koşullar, yetersiz beslenme, anne sütü alamama/yetersiz alma, dilsel uyaran eksikliği, karıllıklı olmayan sosyal etkileşim, uzun ekran maruziyeti, emosyonel stres (boşanma, kardeş doğumu, ihmal, istismar vb) ve bilingualizm bunlar arasındadır (Fisher, 2017; Klee ve ark., 1998; Zimmerman ve ark., 2007; Zubrick ve ark., 2007).

Aynı düzeyde çevresel riske maruz kalan çocukların dil fenotipleri arasında gözle görülür belirgin bir çeşitlilik olması, genetik heterojenliğin göstergesi olabilir. Dil gelişimine etki eden genetik etmenler bir sonraki bölümde detaylandırılacaktır.

2.5.4 Klinik Özellikler ve Komorbiditeler

Çocuğun gelişim evresine paralel olarak akranlarına göre dil gelişim evrelerini gösterememesi durumunda dil gecikmesinden söz edilir. 24 aylıkken iki kelime kombinasyonu olmaması ve ifade edici kelime dağarcığının 50'den az olması gecikmiş dil ve konuşma için tanı ölçütü olarak kullanılmaktadır.

Bazı yazarlar; konuşması geciken ve doğalgidi sonrasında yetliklerini kendiliğinden yakalayan çocukların ("late bloomers") durumunu 'maturasyonel dil gecikmesi' olarak nitelendirilmiştir. Ancak maturasyonel dil gecikmesi DSM-5

sınıflandırmasında ayrıca ele alınmamakta, dil bozuklukları ile birlikte de erlendirilmektedir.

Dil gelişiminin bozulma ekle çok yönlüdür. Sadece fonolojik, leksikal (sözlük), semantik, pragmatik, gramer bilgisi edinememe, okuyamama veya bakalarını anlamayamama ile karımıza çıkabilmektedir. Ancak sadece alıcı dil becerilerinde gecikme olması çok nadirdir. Bir çocuğun izole alıcı dil bozukluğuna sahip gibi görünebilece i durumlar vardır. Örneğin, otizmli bir çocuk, yonun ekolali kullanımı nedeniyle normal veya ileri düzeyde ifade edici dil becerilerine sahip gibi görünebilir ancak dikkatli bir de erlendirme ile her iki dil alanında da bozukluk mevcut oldu u anlaşılabılır. Dil testleri spesifik olarak alıcı veya ifade edici dil bozukluğunu desteklemedikçe, "konu ma gecikmesi" öyküsü olan bir çocuğun, dili anlama ve ifade bozukluklarının bir kombinasyonuna sahip oldu u varsayılmalıdır (Michelle M. Macias, 2018).

GDB tanısı alan çocuklar, semantik, pragmatik, fonolojik veya sözdizimsel (gramer) bilgilerin i lenmesini gerektiren dil görevlerinde kronolojik yaşlarının önemli ölçüde altında performans gösterirler. Semantik bilgi yetersizlikleri nedeniyle ilk sözcüklerin üretiminde gecikme, bu çocukların en erken tipik özelliği olarak gösterilmektedir (Seyhun Topbas, 2010). Yanı sıra yeni sözcüklerin kazanılmasında güçlük sergilerler, sözel ifadeleri kısa (azalmı ortalama sözce uzunluğu) ve sözcük da arıcıları dü üktür.

Gramer bilgilerinde eksiklik nedeniyle ço ul eki, zaman kipi gibi morfeplerde ustala amazlar. Fonemleri i leme, saklama ve manipüle etme becerisinde (duydu u sesi tekrarlayabilme gibi) zayıflık vardır. Fiilleri kullanmakta zorlanmaları ayırt edici bir özelliktir. Konu ma üretimi sırasında sözcük arama davranışı gösterirler, spesifik bir sözcüğü dolambaçlı ifade ederler. Nonspesifik kelime (" ey vb") ve ileti imsel jest kullanımında artış vardır. Efor harcayarak ve yardım alarak kısa cümleler kurabilirler. Cümle çe itliliği sınırlıdır. Bir konuyu anlatmak veya sohbet etmek amacıyla cümleleri birbirine ba lamakta zorlanırlar. Artikülasyon becerilerinin normal olması beklenir ancak seslerde yer de i tirme-ekleme-atlama-tekrarlama gibi kelimeyi basitle tirmeye hizmet eden sesletim hataları yapabilirler. Sonuç olarak konu manın anlaşılabilirliğinde ve akıcılığında azalma beklenen bir bulgudur. Alıcı ve ifade edici dil yeteneklerindeki zayıflığın beraber seyrettiği olgular, dili do ru ve yeterli hızda yorumlamakta, yönergeleri ve açıklamaları takip etmekte de zorluk çekerler.

Motor konu ma bozuklukları (dizartri ve konu ma apraksisi) ile konu ma sesi bozuklukları (fonolojik/sesbilgisel bozukluk ve artikulasyon/sesletim bozuklu u) kliniklerinin bazı özellikleri GDB ile benzerlikler gösterdi i için mutlaka ayırıcı tanıda akılda bulundurulmalıdır. Bununla birlikte GDB ile konu ma apraksisi, disleksi ve DEHB gibi di er geli imsel bozukluklar arasında komorbiditeler bildirilmi tir. McArthur, Pennington, Bishop ve arkadaşları sözlü (konu ma) ve yazılı dil bozuklukları (okuma, yazma) arasında süreklilik oldu unu öne sürmü tür. Yapılan bir sistematik literatür derlemesinde 5 ya altında GDB tanısı alan çocukların ortalama %25'i okul yıllarında disleksi kriterlerini kar ıladı ı belirtilmi tir(Michelle M. Macias, 2018). Fonoloji, semantik, gramer gibi sözlü dil becerilerinin okumanın temeli oldu u, okumayı ö renmek için konu ulan dilin sesleri (fonemler) ile yazılan dilin sembolleri (harfler) arasında ili ki kuruldu u göz önüne alındı ında bu durum a ırtıcı de ildir.

Dil bozuklu u olan okulöncesi çocuklar, dile dayalı ö renme bozuklukları, duygusal, sosyal ve davranı sal sorunlar açısından daha yüksek risk altındadır (Michelle M. Macias, 2018). Cohen ve ark. (1998) çe itli psikiyatrik sorunlar nedeniyle ruh sa lı ı merkezlerine sevk edilen 380 çocu u kapsayan ara tırmalarında çocukların %40'ında öncesinde üphelenilmeyen dil bozuklu u tespit edildi ini ve önemli bir kısmının DEHB ve dil bozuklu u tanı kriterlerini e zamanlı kar ıladı ını bulmu lardır(Cohen, Barwick, Horodezky, Vallance, & Im, 1998).

Bir ba ka çalı mada (Avon Longitudinal Study of Parents and Children); genetik ve çevresel etmenlerin, ruhsal sa lık problemlerinin geli imine katkısı ara tırılmı tir. %8.7'si GDB olan 6,387 genç ile yapılan bu ara tırmanın sonuçlarına göre; yaygın psikiyatrik bozukluklar (major depresif bozukluk, anksiyete bozuklu u, dikkat eksikli i hiperaktivite bozuklu u) için yüksek genetik risk (poligenik skor) ta ıyan ki ilerde GDB varlı ı; psikiyatrik problemleri arttıran bir faktör olarak kar ımıza çıkmaktadır (Toseeb ve ark., 2023).

2.5.5 Klinik De erlendirme

Geli imin di er yönleri gibi dilin ortaya çıkı ı da kabul edilebilir ölçüde bireysel farklılıklar ile karakterizedir. Normal aralıklar, populasyonun %95'inin i levi ba ardı ı ya da ılımını ifade eden -2 ile +2 standart sapma terminolojisi ile belirtilir.

Klinisyenler konu ma (ses üretimi) ile ilgili sorunları; dil ile ilgili (sembollerin kullanımı) sorunlardan ayırt etmeli ve müdahaleye gereksinim duyan olguları belirlemelidir. Bu sebeple konu ma veya dil gecikmesinden endi e edilen bir çocu un

de erlendirilmesi kapsamlı bir öykü, fizik muayene yanı sıra standardize testler içermelidir. Elde edilen tüm verilerin kombinasyonu ile karar verilmelidir.

Öykü

Prenatal öyküde annenin gebelik sırasındaki hastalıkları, teratojenler, plasental yetersizlik, intrauterin enfeksiyonlar; perinatal öyküde travma, asfiksi, sarılık, do um ekli, do um haftası, do um kilosu; postnatal öyküde di er geli im alanlarında gecikme olup olmadı ı, yenido an i itme tarama sonuçları, e lik eden hastalıklar, ototoksik ilaç kullanımı, artikülasyonda (anla ılırlık) zorluk, a ırı salya akması, beslenme güçlü ü, multipl kulak enfeksiyonları hakkında soru sormak konu ma gecikmesinin nedenlerini ortaya çıkarabilir. Sosyal çevre ile birlikte dil ve ö renme güçlüklerini sorgulayan ayrıntılı bir aile öyküsü önemlidir.

Fizik muayene ve geli im tarama testleri

Büyüme parametreleri (boy, kilo, ba çevresi) ölçülmeli, tam bir nörolojik muayene (özellikle de beslenme güçlükleri veya konu ma apraksisi varsa) yapılmalıdır. Oral kavitenin yapısal bütünlü ü ve oromotor beceriler (her yöne dil hareketleri, fonasyonda palatal elevasyonun gözlenmesi, hipernazalite) de erlendirilmelidir. Oromotor tonus a ız pozisyonuna (açık-kapalı), salya akmasına, pipetten içme zorlu una veya üflemede zorlanmaya bakılarak de erlendirilebilir. Dismorfik özellik var ise not edilmelidir. Ayrıncı tanı için geli im tarama testleri ve gerekti inde bili sel testler uygulanmalıdır.

Dil geli imi, genel bir geli im testi veya bölgesel ve kültürel dil farklılıkları göz önünde bulundurularak dile özgü tasarlanan formal testler ile de erlendirilebilir. Türkiye’de geli im de erlendirmesinde sık kullanılan ve standardize edilmi araçlardan bazıları unlardır: Ankara Geli im Tarama Envanteri (AGTE), Denver-II Geli imsel Tarama Testi, Geli imi zleme ve Destekleme Rehberi (G DR), Erken Geli im Evreleri Envanteri (EGE), Gazi Erken Çocukluk Geli imi De erlendirme Aracı (GEÇDA) (Demirci & Kartal, 2012; Tunçeli & Zembat, 2017). Tarama testlerinde bazı dil becerilerinin de erlendirilmesi ebeveyn beyanına dayanırken bazıları (jestler, mimikler, göz teması, ortak dikkatin varlı ı, postür) vizit sırasında çocuk tarafından gösterilebilir. Geli im alanlarının her birinde gecikme söz konusu ise bili sel yetersizlik yönünde ara tırma yapılmalı, çocu un nonverbal problem çözme ve sosyal uyum sa lama becerileri de erlendirilmelidir.

Çocukların dil performansının de erlendirilmesinde do al dil örneklerinden alınan ölçümler (kelime da arcı mın geni li i, ortalama sözce uzunlu u gibi) dil bile enlerinin özellikleri hakkında nicel bilgi sa laması açısından önemlidir. Konu ma ve dile özgü

gelişimi ölçmeyi amaçlayan, Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik analizleri tamamlanmış tarama testlerinden bazıları şunlardır: Türkçe ifade Edici ve Alıcı Dil Testi (T FALD), Türkçe Erken Dil Gelişimi Testi (TED L), Peabody Resim Kelime Testi, Ankara Artikülasyon Testi (AAT), Türkçe İletişim Davranışları Gelişimi Envanteri (T GE), Türkçe Okul Çağında Dil Gelişimi Testi (TOD L), Türkçe Sesletim ve Sesbilgisi Testi, Okul Öncesi Dil Ölçeği, Dil Gelişimi Tarama Envanteri (D LTAR).

Ankara Gelişim Tarama Envanteri-AGTE:

Envanter ilk olarak 1992 yılında İlk Savaşır, Nilhan Sezgin ve Neşe Erol tarafından geliştirilmiştir, 2006 yılında Savaşır ve arkadaşları tarafından yeniden gözden geçirilerek sunulmuştur. Geçerlilik ve güvenilirlik çalışmaları arasında başarı oranları yüksektir. Test-tekrar test güvenilirliği üç farklı yaş grubu (0-12 ay, 13-44 ay ve 45-72 ay) için sırasıyla %99, %98 ve %88 olarak, iç tutarlılığı ise sırasıyla %98, %97 ve %88 olarak bildirilmiştir.

AGTE bakım veren ile görüşme yoluyla 0-72 ay arası çocukların gelişimini objektif olarak değerlendiren norm referanslı bir tarama aracıdır. Dil-bilişsel (65 madde), ince motor (26 madde), kaba motor (24 madde) ve sosyal beceri-öz bakım (39 madde) olmak üzere dört bölümde toplanmış 154 maddeden oluşmaktadır. Dil-Bilişsel alt ölçeği dili anlama-ifade etme, kavramları bilme ve basit problem çözümü gibi becerileri temsil edebilecek biçimde düzenlenmiş sorular içermektedir. Testin uygulanmasına çocuğun takvim yaşına uygun noktadan, örnek olarak çocuk 33 aylık ise "30 Aydan 35 Ay Sonuna Kadar" başlıklı yaş diliminden başlanmaktadır. Bu yaş diliminde geçemediği maddeler var ise bir alt yaş dilimine geçilmektedir. Bakım verene yöneltilen sorulara verilen cevaplar (evet, hayır, bilmiyorum şeklinde) çocuk gözlemlenerek teyit edilmektedir. Alınan cevaplar doğrultusunda puanlama yapılmakta ve sonuçta 5 ayrı puan elde edilmektedir. Elde edilen ham puanlar, bir çizelge yardımıyla çocuğun ait olduğu gelişim yaş aralığına çevrilmektedir. Alt ölçek puanları dört ana gelişim alanını, toplam puan ise genel gelişim düzeyini yansıtmaktadır. (Demirci & Kartal, 2012).

2.5.6 Müdahale

Tüm gelişim ve davranış alanlarında olduğu gibi, dil gelişiminin desteklenmesi sosyal pediatri hizmetlerinin temel seviyelerinden biridir. Dil edinimindeki gecikme, çocuğun bir süre sonra akranlarına yetiyeceği güvencesiyle beklenerek göz ardı edilmemelidir(Michelle M. Macias, 2018). Geç konuşanların %25 ila %50'si GDB tanısı almaktadır(McCauley, 2013). İleride karışılacak güçlükler ve erken tanının

katkıları göz önüne alındığında özellikle 3 ya öncesinde dil ve konuşma terapistlerine yönlendirilmeleri faydalı olacaktır. Dil ve konuşma terapistleri terapi hedefine yönelik faaliyetleri planlama yanı sıra aileye danışmanlık yapabilmektedir.

Çocuk özel hizmet programlarından yararlanamayacak olsa dahi, bir gecikme olduunun farkına varılması, daha yakından izlem yapılmasını ve ailelerin dil becerilerini geliştirme yolları hakkında bilgi edinmelerini sağlayabilir.

Çocuklar, birbir sözlü ve duygusal etkileşimlerden aldıkları dil uyarısının aynısını televizyondan alamazlar. Literatürde bebeklerin 12. Aydan önce günde 2 saatten fazla TV izlemesinin dil gecikmesi riskini 6 kat arttırdığı iddia edilmiştir (Chonchaiya & Pruksananonda, 2008). Amerikan Pediatri Akademisi 18 aydan küçük çocuklar için elektronik medya maruziyetinden sakınılması gerektiğini vurgulamıştır (Pediatrics, 2016). Ebeveynlere televizyonun dilin yerini tutmadığı ve ya da amin ilk yıllarında TV'den uzak durulması gerektiği hatırlatılmalıdır.

Sıcak ve duyarlı anne davranışı çocukların bilişsel ve dil yeterliliğiyle pozitif olarak ilişkilendirilmiştir. Amerikan Konuşma Dili- İşitme Derneği iletilim bozukluğu olan çocuklarda; düzenli etkileşimli kitap okuma, motor aktivite gerektiren kurallı oyunlar oynama, masal dinleme, tekerleme- arkı söyleme gibi dil stimülasyon faaliyetlerini arttırmayı önermektedir. Ebeveynlerin günlük rutinler boyunca -aktivite ne kadar sıradan olursa olsun- çocuklarıyla konuşması teşvik edilmelidir. Okul öncesi eğitim tavsiye edilebilir. Eğitim kurumları eğitimciye ve fiziksel koşulların zenginliğine bağlı olarak ev ortamından daha yoğun uyarıcı etkiye sahip olabilmektedir.

2.6 Gelişimsel Dil Bozukluğu'nun Genetik Temeli

Mendeliyen hastalıklar, tek bir lokusta etki gösteren bir ya da iki allelin neden olduğu, belirgin klinik semptomlarla ilişkilendirilen ve açık bir kalıtım paterniyle geçen pür genetik bozukluklardır. Gelişimsel Dil Bozukluğu'nun ise genetik temeli oldukça kompleksdir. Tek bir mutasyonun neden olduğu GDB vakalarının keşfine rağmen, çoklukla bir dizi genetik lokus ve bir dizi çevresel faktörün katkısı ve etkileşimi söz konusudur. Kalıtım paterni sıklıkla belirgin değildir. Mevcut kanıtlar GDB'nin kompleks kalıtım modeli gösteren multifaktöriyel bir durum olduğunu göstermektedir.

Moleküler genetik araştırmalar sayesinde multifaktöriyel bozuklukların patogenezi katkıda bulunan Mendel genlerinin ve nadir varyantların tanımlanması mümkün hale gelmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ve bağlantı analizi yöntemleri kullanılarak yapılan araştırmalarda GDB için bir dizi spesifik

kromozomal lokus(bölge) ve gen öne sürülmü tür. İnsan genleri ve ili kili oldu u genetik bozukluklara dair sürekli güncellenen bir veri tabanı olan OMIM' e (Online Mendelian Inheritance in Man) geli msel dil bozukluklu u ile ilgili 16q, 19q, 13q21, 7q35-q36 ve 2q36.3 olmak üzere be ba lantı bölgesi kayıt edilmi tir. GDB ba lantı bölgeleri olan 7q35-q36'da bulunan *CNTNAP2*, 16q23.2'de bulunan *CMIP*, 16q24.1'de bulunan *ATP2C2* ve 2q36.3 yakınında yer alan *TM4SF20* genleri ili kilendirme çalı maları ve vaka raporlarına dayanılarak aday gen olarak önerilmi tir(Andres ve ark., 2019).

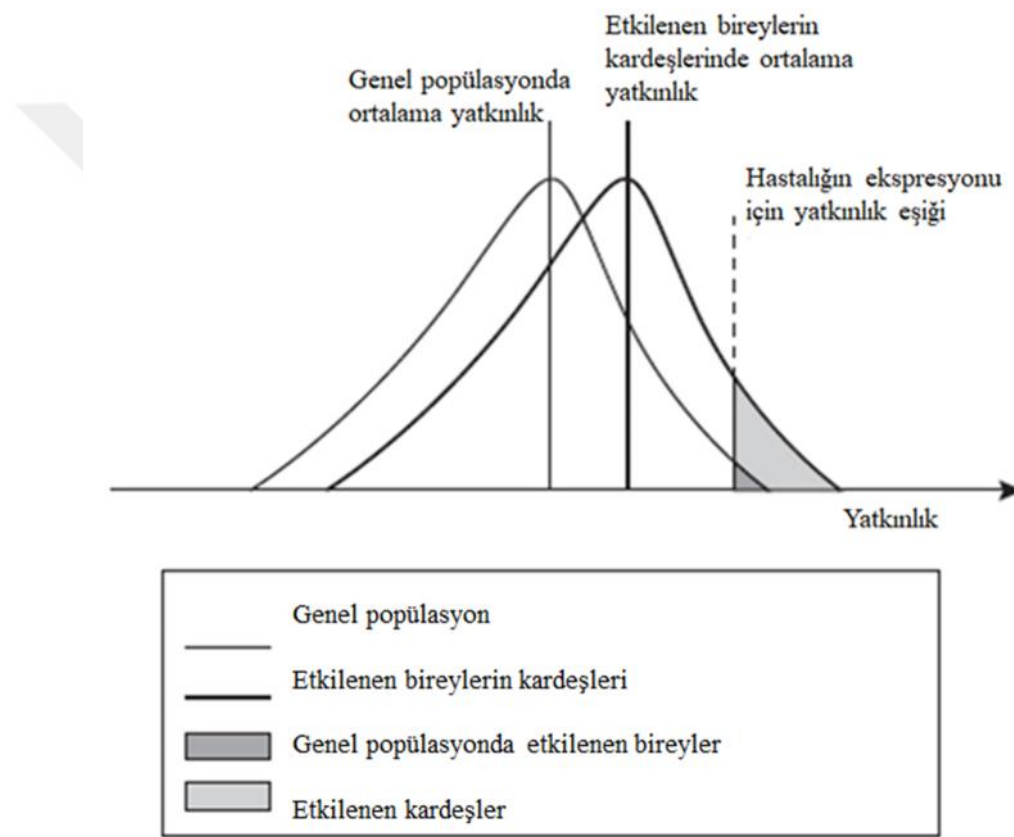
Öte yandan konu ma/dil patolojisi ve normal zeka/ hafif derecede zihinsel geli im bozuklu u ile ili kili çok sayıda kromozomal bozukluk tanımlanmı tır; 1p21.3 mikrolelesyonu, 7q11.23 mikroduplikasyonu (OMIM 609757), 10q22q23 mikrolelesyonu, 12p12.1 mikrolelesyonu (OMIM 604975), 12p13.33 mikrolelesyonu, 15q11.2 mikrolelesyonu (OMIM 615656), 15q11.2q13 mikroduplikasyonu (OMIM 608636), Proksimal 16p11.2 mikrolelesyonu (OMIM 611913), 17p11.2p11.2 mikroduplikasyonu (OMIM 610883), 22q11.2 mikrolelesyonu (OMIM 192430), 22q11.2 distal mikrolelesyonu (OMIM 611867), sex kromozomu anöploidileri ve kadınlarda Frajil X sendromu (OMIM309550) bunlar arasında sayılabilir (Barnett & van Bon, 2015). Ancak kromozomal yeniden düzenlemeler ve kopya sayısı varyantları GDB vakalarının sadece küçük bir kısmını açıklayabilmektedir.

GDB vakalarında dizileme teknolojilerini (Sanger, hedefe yönelik yeni nesil dizileme, tüm ekzom dizileme, tüm genom dizileme) kullanan çalı malar, gen haritalama stratejileri ile belirlenen aday genlerin etiyolojik önemini güçlendirmi tir(Andres ve ark., 2021; Chen ve ark., 2017). Literatürde GDB için aday gösterilen genler arasında *ABCC13*, *ARHGEF39*, *ATP2C2*, *CMIP*, *CNTNAP2*, *COL4A2*, *FOXP1*, *KIAA0319*, *NDST4*, *NFXL1*, *NOP9*, *RBFOX2*, *ROBO2*, *SEMA6D*, *SETBP1*, *SRPX2*, *TM4SF20*, *ZNF385D* ve *ZNF277* genleri, en az iki farklı yayında tanımlanmaları ile dikkat çekmektedir (Andres, Earnest, Zhong, Rice, & Raza, 2021; Andres, Neely, ve ark., 2021; Bakkaloglu ve ark., 2008; Chen ve ark., 2017; Eising ve ark., 2019; Guerra & Cacabelos, 2019; Kang & Drayna, 2011; Mountford, Braden, Newbury, & Morgan, 2022; Mountford & Newbury, 2018; D. Newbury ve ark., 2011; D. F. Newbury & Monaco, 2010; D. F. Newbury ve ark., 2009; Vernes ve ark., 2008; Wiszniewski ve ark., 2013).

Bir genin yaygın görülen bir hastalı ın etiyolojisinde yer aldı mının gösterilmesi, bu hastalı ı Mendeliyen bir hastalı a dönü türmemektedir. Bir lokustaki varyantlar, bir

hastalığa doğrudan 'neden' olmaksızın yatkınlığa katkıda bulunabilmekte; hastalığın gelişimi için tek başına yeterli olmasa da, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerle etkileşime girerek hastalık riskini artırabilmektedir.

Falconer'ın poligenik etki teorisi, multifaktöriyel hastalıkların genetik temelini açıklamak için bir model sunar (ekil 2-2). Teoriye göre, bir bireyin hastalığa yatkınlığını belirleyen bir etki seviyesi vardır ve hastalığın gelişimi için benzer fizyolojik fonksiyon gösteren birden fazla genin aynı yönde etkisi gereklidir. Genler ve çevresel faktörlerin etkileşime girmesi ile bu genetik yatkınlık eşiği geçildiğinde, bireyler hastalık gelişme riski taşırlar.



ekil 2-2: Multifaktöriyel Bir Hastalığa Yatkınlığın Dağılımı (Firth ve ark., 2017)

Özetle aile içinde kümelenme eğilimi gösteren multifaktöriyel bozuklukların ortaya çıkması, genler ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimlere bağlıdır (Michael J. Meaney, 2015). Çevresel faktörler epigenetik mekanizmalar üzerinden genlerin ekspresyonunu etkileyebilmekte ve hastalığı tetikleyici, seyirini değiştiren veya hastalıktan koruyucu etkiler gösterebilmektedir.

2.6.1 Geliimsel Dil Bozuklu u'nda aile temelli genetik ara tırmalar

Dil bozuklu undan etkilenen çocukların ailelerinde dil güçlüklerinin ortalama görülme sıklı ının 3 kattan fazla arttı ı bulunmu tur (Feldman, 2019). Ailesel kümelenme göstermesi hastalı ın genetik temellere sahip olabilece ini dü ündürmü ve çok sayıda çalı ma ile genetik faktörlerin dil bozuklu una yatkınlık yarattı ı belgelenmi tir. Özellikle de dil bozuklu u olan ikizler ile yapılan çalı malarda monozigotik ikizlerin dizigotik ikizlere göre daha yüksek konkordans göstermesi, aday genler ve genetik mekanizmaların bir ara tırma alanı olarak ilgi çekmesini sa lamı tır(D. Bishop & Hayiou Thomas, 2008).

Hollanda popülasyonunda yapılan bir ara tırmada birbiri ile akraba olmayan, GDB'den etkilenmi 43 ki ide tüm ekzom dizileme (WES) analizi kullanılarak *SRPX2*, *ROBO1*, *AUTS2*, *ATP2C2*, *CNTNAP5*, *CNTNAP2*, *SEMA6D*, *GRIN2B*, *GRIN2A*, *ERC1* genlerinde 5'i yeni, 6'sı nadir olmak üzere 11 etiyolojik varyant gösterilmi tir (Chen ve ark., 2017). Bu çalı mada fenotipe katkıda bulunan varyantları belirleme ansını en üst düzeye çıkarmak için WES analizinde a amalı bir yakla ım kullanılmı tır. İlk a amada daha önce primer konuma, dil ve/veya okuma bozukluklarında yatkınlık faktörü olarak öne sürülmü bilinen 19 aday gendeki (*CMIP*, *ATP2C2*, *CNTNAP2*, *NFXL1*; *FOXP2*, *FOXP1*; *DYX1C1*, *KIAA0319*, *DCDC2*, *ROBO1*; *SRPX2*, *GRIN2A*, *GRIN2B*; *ERC1*, *SETBP1*, *CNTNAP5*, *DOCK4*, *SEMA6D*, *AUTS2*) tüm varyantlar incelenmi tir. Daha sonra ekzomun ba ka yerlerindeki potansiyel yüksek riskli (stop-gain/nonsense, nadir veya yeni) varyantlar karakterize edilmi tir. Son olarak, "çoklu vuru " (multiple-hit) hipotezine yönelik olarak farklı genler arasında birden fazla potansiyel öneme sahip varyant olup olmadı ı ara tırılmı tır. Patojenik veya klinik önemi bilinmeyen varyantlar, çekirdek aile bireylerinde ara tırılarak segregasyon analizi yapılmı tır. Bu çalı mada ula ılan sonuçlar tek bir varyasyonun GDB fenotipi için yeterli olmayabilece i yönündedir.

Bir ba ka ara tırmada, aralarında akrabalık olmayan, GDB öyküsü olan ailelerden seçilen 6 – 18 ya arasındaki 38 Pakistan'lı probandda *TM4SF20*, *NFXL1*, *CNTNAP2*, *ATP2C2* genlerinin kodlayıcı dizileri Sanger metodu ile incelenmi , biri yeni (*CNTNAP2*) olmak üzere 16 nadir varyant (13 nonsinonim, 1 nonsense, bir 3'UTR ve bir 5'UTR varyantı) tanımlanmı tır. Bunlar arasında in-silico tahminleri patojenite lehine bulunan altı varyanttan dördü (1 nonsense, 3 nonsinonim) *ATP2C2*'de, ikisi *CNTNAP2*'de bulunmu tur. Ayrıca bu kohortta, ili kilendirme çalı maları ile otizm, dil

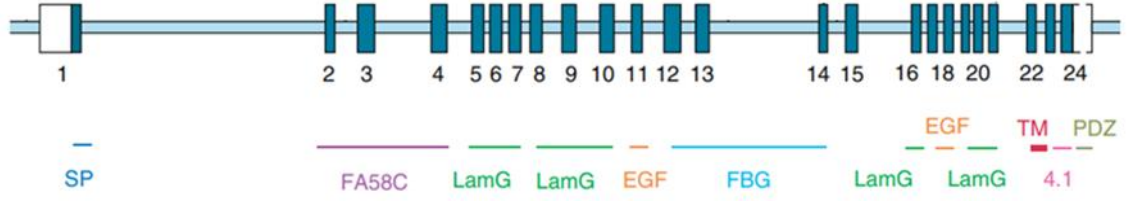
ve okuma problemleri için risk alelleri olarak rapor edilen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP- single nucleotide polymorphism) de bulunmu tur (Andres, Neely, ve ark, 2018).

GDB'ye yatkınlık için birçok aday gen önerilmi olsa da bulguların farklı çalı malarda tekrarlanması göz önüne alındı ında *CNTNAP2* ve *SETBP1* genleri öne çıkmaktadır. Konu ma ve dil geli imi için önemli moleküler yollar içinde yer aldıkları varsayımı ile *CNTNAP2* ve *SETBP1* genleri tez çalı mamızın oda mı olu turmu tur.

2.6.2 Ara tırılan Genler

GDB Genetik Etiyolojisinde *CNTNAP2* Geninin Rolü

Yedinci kromozom üzerinde haritalanan *CNTNAP2* geni 24 ekzona sahip olup insan genomunun en büyük genlerinden biridir (Peñagarikano & Geschwind, 2012). *CNTNAP2* merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunur ve özellikle beyin geli imi sırasında frontotemporal-subkortikal devrelerde ve dil için önemli olan perisilvian kortekste yo un olarak eksprese edilir. Sinir sisteminde hücre adezyon molekülleri ve reseptörleri olarak i lev gören neurexin ailesine ait bir transmembran protein olan 'contactin associated protein like 2'yi (CASPR2) kodlar (Abrahams ve ark., 2007; Poliak & Peles, 2003). Nöronal doku geli imi ve bellek gibi yüksek düzeyde koordineli beyin fonksiyonları için bu gibi adezyon molekülleri önemlidir. CASPR2, ranvier dü ümlerinde, inhibitor presinaptik kompartmanda ve daha az ölçüde eksitator postsinaptik kısımda bulunur (Horresh ve ark., 2008). Bu protein insanlarda kortikal geli im, nöroblast migrasyonu, hücreler arası adezyon ve laminer organizasyonda yer alır (Poliak ve ark., 1999; Strauss ve ark., 2006). Ayrıca, miyelinli aksonların juxtapanodal bölgelerine yerle erek nöron-glia (Schwann hücreleri ve oligodendrositler) etkile imlerinde rol alır. Akson-glia temas noktalarında, *CNTNAP2* ektodomani (ekstrasellüler bölgesi) ile; bir ba ka adezyon molekülü olan kontaktin 2'ye (CNTN2) ba lanır ve moleküler bir köprü olu turulur (Lu ve ark., 2016). *CNTNAP2*'nin sitoplazmik kuyru u ise ranvier dü ümlerinde voltaj kapılı potasyum (K⁺) kanallarının kümelenmesini sa lar (Sampath ve ark., 2013). Bu özellikleriyle *CNTNAP2*; nöral ba lantı, nöral migrasyon, sinaps geli imi ve sinaptik ileti im üzerinden nöral devrelerin (neural circuits) olu umunda önemli bir rol oynar.



ekil 2-3: *CNTNAP2* Domainleri ve Kodlayan Genomik Bölgelerin Temsili Gösterimi. *CNTNAP2*'nin ekstraselüler bölgesinde bir FA58C, dört LamG, iki EGF, bir FBG olmak üzere sekiz domain tanımlanmıştır; SP, signal peptid; FA58C, koagülasyon faktör 5/8 C terminal (discoidin) domain; LamG, laminin G; EGF, epidermal büyüme faktör-benzeri domain; FBG, fibrinojen-benzeri domain; TM, transmembran domain; 4.1, protein 4.1B bağlayıcı domain; PDZ, PSD95/DlgA/ZO-1 homoloji protein-protein interaksiyon domain (O Peñarikano ve ark., 2012).

Aksogliyal ve nöronal temas noktalarında organizatör ve adezyon molekülü olarak i lev görmesi özelliğiyle *CNTNAP2* geni bir protein aına entegre olmuş durumdadır. *CNTNAP2*'nin dil gelişiminde rolü olduğu destekleyen kanıtlar mevcuttur. Farelerde knock-down metoduyla *CNTNAP2* ekspresyonunun azaltılması; piramidal nöronlardaki dendritik dallanmada azalmaya, sinaptik iletimde bozulmaya, nöronal migrasyon defektlerine ve anormal nöronal aktivitelerine neden olmuştur (D'Onofrio ve ark., 2023). İnsanlarda *CNTNAP2* genindeki biallelik varyasyonlar; fokal kortikal displazi, bilişsel yetersizlik ve epilepsi karakterize otozomal resesif Pitt Hopkins Benzeri Sendrom 1'e (OMIM # 610042) neden olur. Bu hastalıkta predominant problemin dil alanında olması, *CNTNAP2*'nin GDB ile de ilişkili olabileceği hipotezini doğrultmuştur ve birbirinden bağımsız, çok sayıda replikasyon çalışması *CNTNAP2*'nin dil gelişimi üzerinde etkili olduğunu da güçlü kanıtlar sunmuştur. *CNTNAP2* (7q35-q36), *FOXP2* (7q31) geni tarafından negatif regüle edilmektedir (Vernes ve ark., 2008). *FOXP2* genindeki monoallelik patojenik varyasyonlar çocukluk çağı konuşma apraksisi ile birlikte dili anlama ve ifade etmede ciddi yetersizliğe yol açan Konuşma-Dil Bozukluğu 1 (OMIM # 602081) Sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Alcock, Passingham, Watkins, & Vargha-Khadem, 2000). Bunun yanı sıra otizmlili bir hastada *CNTNAP2* geninin *FOXP2* bağlanma domainini içeren promotör bölgesinde de novo delesyon bulunmuştur bu da *CNTNAP2*'nin düşük ekspresyonunun temel etiyoloji olabileceğini açıkla getirmektedir (Poot ve ark., 2010).

Petrin ve arkadaşları (2010), kekemelik de dahil olmak üzere karmaşık bir dil konuşma ve dil zorluğu olan bir vakada *CHRM2*, *HIPK2*, *DGKI*, *EPHB6*, *PTN* genleri ve *CNTNAP2*'nin bir bölümünü kapsayan 10 MB büyüklüğünde bir delesyon bildirmiştir. Bu vakada fenotipten sorumlu olarak *CNTNAP2* geni aday gösterilmiştir (Petrin ve ark., 2010). Vernes ve arkadaşları (2008) GDB ailelerinde, fonolojik

farkındalı ı ölçen bir dil testindeki (anlamsız kelime tekrar testi) dü ük performans ile *CNTNAP2*'nin 13 ve 15 eksonları arasında (fibrinojen-benzeri domainde) bulunan dokuz intronik SNV (rs851715, rs10246256, rs2710102, rs759178, rs1922892, rs2538991, rs17236239, rs2538976 ve rs2710117) arasında istatiksels olarak önemli ölçüde ili ki bulmu tur (D. F. Newbury, Bishop, & Monaco, 2005). Benzer ekilde Whitehouse ve arkadaşları (2011) *CNTNAP2*'deki bazı SNV'lerin genel popülasyonda erken dönem dil geli imi ile ili kili oldu unu bildirmi tir (Whitehouse, Bishop, Ang, Pennell, & Fisher, 2011).

Brezilya'da rs7794745 ve rs2710102 SNV'leri üzerine yapılan bir ara tırmada (2016); rs7794745 T alleli ve rs2710102 G alleli otistik veya otizmli olmayan bireylerde daha dü ük dil becerileri ile ili kilendirilmi tir (Nascimento ve ark., 2016; Shiota ve ark., 2021; Uddin ve ark., 2021). Yine yakın bir tarihte Centanni ve arkadaşları (2015) *CNTNAP2* intronik delesyonlarının, e lik eden okuma, dil ve bili sel bozukluklar olmaksızın çocukluk ça ı konu ma apraksisi ile ili kili olabilece ini öne sürmü tür (Martinelli ve ark., 2021).

CNTNAP2 geninin tek nükleotid ve kopya sayısı varyantları daha önce kortikal displazi-fokal epilepsi sendromu, Pitt-Hopkins sendromu, otizm spektrumu, Gilles de la Tourette sendromu, izofreni/psikoz, bili sel bozukluk, disleksi, ö renme güçlükleri, DEHB ve OKB gibi di er di er nöropsikiyatrik ve geli imsel bozukluklarla ilgili çalı malarda da yer almı tır (Rodenas-Cuadrado, Ho, & Vernes, 2014). Bili sel ve sosyal geli iminde gerilik olan ancak otizm tanı kriterleri tam olarak kar ılamayan bir çocukta *CNTNAP2*'yi etkileyen bir inversiyon tespit edilmi tir (Bakkaloglu ve ark., 2008).

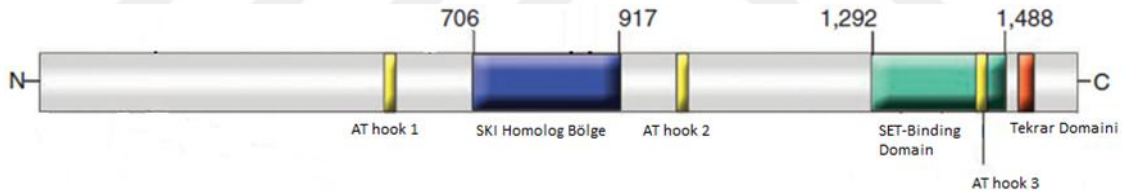
CNTNAP2 polimorfizmlerinin sosyal davranı üzerindeki etkisi de ara tırma konusu olmu tur. Örne in rs2710102'nin A allelinin genel popülasyonda otistik özelliklerle ili kili oldu u ortaya konulmu tur (Li ve ark., 2021). Otizm spektrum bozuklukları (OSB) ile ilgili bir ekzom dizileme çalı masında, *CNTNAP2*'de patojenik oldu u tahmin edilen bir missense varyant tanımlanmı tır (O'Roak ve ark., 2011). Ayrıca *CNTNAP2* intron 13'teki rs2710102 ve rs17236239 varyantları otizm endofenotiplerinden biri olan ilk kelime ya ı ile ili kilendirilmi tir (Alarcón ve ark., 2008; Sampath ve ark., 2013).

CNTNAP2'nin yakından ili kili oldu u durumlara bir ba ka örnek Dikkat Eksikli i ve Hiperaktivite Bozuklu u (DEHB)'dir. Genomun yapısal varyasyonları ile DEHB arasındaki ili kiyi ara tıran bir çalı mada DEHB'li bir vakada *CNTNAP2*'de

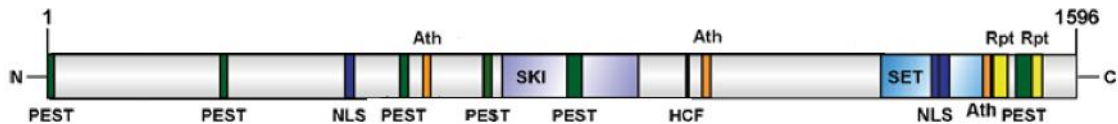
homozigot delesyon tespit edilmiştir (Elia ve ark., 2010). Bu gibi erken çalımların birçoğu sınırlı örneklem büyüklükleriyle yapılmış veya kontrol bireylerle karşılaştırılmamış bireysel olgu raporlarıydı. Ancak tüm bu kanıtlar, *CNTNAP2* varyasyonlarının dil ile ilgili fenotipler üzerinde etkisi olduğunu desteklemektedir.

GDB Genetik Etiyolojisinde *SETBP1* Geninin Rolü

Kromozom 18q12.3 üzerinde yer alan ve 6 ekzondan oluşan *SETBP1* (SET bağımlı protein 1) geni prenatal gelişim sırasında beyinde yüksek oranda ekspresyon edilir. Ayrıntılı olarak beyinde olsa da *SETBP1* proteininin çok sayıda dokuda aktif olduğunu gösterilmiştir. Fonksiyonları büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, nöronal hücrelerde büyüme, bölünme ve migrasyon ile ilgili genleri kontrol ettiğinden bilinmektedir. *SETBP1* proteini, *SET* nükleer protoonkogenine bağımlı bir domaine sahiptir. *SET* geni multifonksiyoneldir, DNA replikasyonu, kromatin yeniden eklenmesi ve gen transkripsiyonunda yer alır. *SETBP1* proteininin SET'in promotör bölgelerine bağımlı olarak ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Rakhlin ve ark., 2020). *SETBP1*'in epigenetik bir merkez (kontrol mekanizması) olarak işlev gördüğünü gösteren gelişim süreçlerinde yer alan genlerin oluşumunu düzenlediği bilinmektedir (Piazza ve ark., 2018).



ekil 2-4: *SETBP1* Domainleri. AT hook domain 1 (584.–596. amino asitler); SKI homolog bölgesi (706.–917. amino asitler); AT hook domain 2 (1,016.–1,028. amino asitler); SET-binding domain (1,292.–1,488. amino asitler); AT hook domain 3 (1,451.–1,463. amino asitler); Tekrar domaini (1,520.–1,543. amino asitler) (Piazza ve ark., 2013).



ekil 2-5: *SETBP1* Proteini. SKI onkoproteinine homolog bir bölge; altı PEST dizisi; üç AT-hook DNA bağımlı domain (Ath); bir SET bağımlı domain ve üç nükleer lokalizasyon sinyali (NLS; sırasıyla 462–477; 1370–1384; 1383–1399. amino asitler) içermektedir. PEST dizileri, hücresel yarı ömrü kısa proteinlerde bulunabilen ; prolin (P), glutamik asit (E), serin (S) ve treonin (T) açısından zengin olan peptid dizileridir. PEST domainlerinin (sırasıyla 1–13 ; 269–280 ; 548–561 ; 678–689 ; 806–830 ; 1502–1526. amino asitler) protein parçalanması için sinyal peptidi olarak işlev gördüğünü bilinmektedir (Nadieh A. Jansen ve ark., 2021).

SETBP1, hipotoni, ekspresif dil bozukluğu, kısa boy ve davranış problemleri ile karakterize del(18)(q12.2q21.1) sendromu için kritik bölgede bulunan genlerden biridir. Bu lokusta gerçekte en mutasyonun mekanizmasına bağlı olarak farklı fenotipik sonuçlar görülmektedir. *SETBP1* genindeki monoallelik patojenik varyasyonlar; tıbbi literatürde *SETBP1* haployetmezliği ile ilgili nörogelişimsel bozukluk (*SETBP1*-HD) ve Schinzel-Giedion Sendromu (SDS) isminde iki farklı genetik durum ile ilişkilendirilmiştir. '*SETBP1* haployetmezliği ile ilgili nörogelişimsel bozukluk' OMIM veri tabanında 'Bilişsel Gelişim Bozukluğu Otozomal Dominant 29' (OMIM* 611060) olarak listelenmektedir. *SETBP1* haployetmezliği orta ila şiddetli konuşma bozukluğu, hafif motor gelişim geriliği, normal zekadan şiddetli bilişsel gelişim bozukluğuna kadar geni spektrumunda entelektüel yeti, otistik özellikler, dikkat eksikliği ve davranış problemlerinden oluşan bir nörogelişimsel bozukluktur.

Schinzel-Giedion (OMIM#269150) ise tanınabilir yüz özellikleri, çeşitli nörolojik problemler (şiddetli gelişimsel gerilik, dirençli epilepsi, ventriküler dilatasyon, koroid pleksus kistleri, corpus callosum disgenezisi) ve konjenital hidronefroz, iskelet bulguları gibi multisistemik konjenital anomaliler ile karakterize ultra nadir bir sendromdur. SDS ile ilgili kili missense varyantların genin ekson 4'ün küçük bir bölgesinde (868 ila 871. rezidüleri; D868, S869, G870 ve I871) kümelenmesi anlaşılmıştır. Spesifik (hot spot) bölgedeki varyantlar daha hafif, atipik bir SGS formuna yol açmaktadır. Genel olarak Schinzel-Giedion sendromunun *SETBP1* proteini birikimine neden olan de novo fonksiyon kazandırıcı (GoF) varyantlar ile oluştuğu kabul edilmektedir. *SETBP1* ekspresyon artımının, tümör supresör protein fosfataz 2A (PP2A)'nın fosfataz aktivitesini bozarak, *SETBP1*-SET-PP2A kompleksi oluşumu yoluyla onkogenezi tetiklediği ve SGS'de embriyonal tümörler görülebildiği bilinmektedir.

İnsanlarda en az 20 farklı *SETBP1* fonksiyon kaybı (LoF- Loss of Function) varyantı (nonsense, frameshift, büyük delesyonlar) bildirilmiştir. *SETBP1* haployetmezliği olan vakaların %92'sinde iletişim bozukluğu fenotipinin örtülmesi, bu genin konuşma ve dil bozuklukları için güçlü bir aday olabileceğini göstermiştir (Morgan ve ark., 2021). Vaka serilerinde *SETBP1* geni fonksiyon kaybettirici varyantları ifade edici dilde 'gecikme' veya 'bozulma' ile ilişkilendirilse de konuşma ve dil bozukluklarının doğası yeterince açık tanımlanmamıştır. Yakın zamanda çocukluk çağı konuşma apraksisi olan iki küçük (n:19, n:34) kohortta yapılan ekzom/genom dizileme çalışmasında heterozigot patojenik *SETBP1* LoF varyantı olan iki bireyin tanımlanması *SETBP1*'in konuşma ve ifade edici dil gelişiminde önemli bir rol

oyunadına dair önermeyi güçlendirmektedir (Eising ve ark., 2019; Hildebrand ve ark., 2020). Özetle; *SETBP1*, konulan dili ilme sürecinde yer alan kortikal alanların gelişimini düzenlemesi ile GDB etyolojisinde yeni bir aday gen olabilir.

2.6.3 GDB Genetik Etiyolojisinde Epigenetik Faktörlerin Rolü

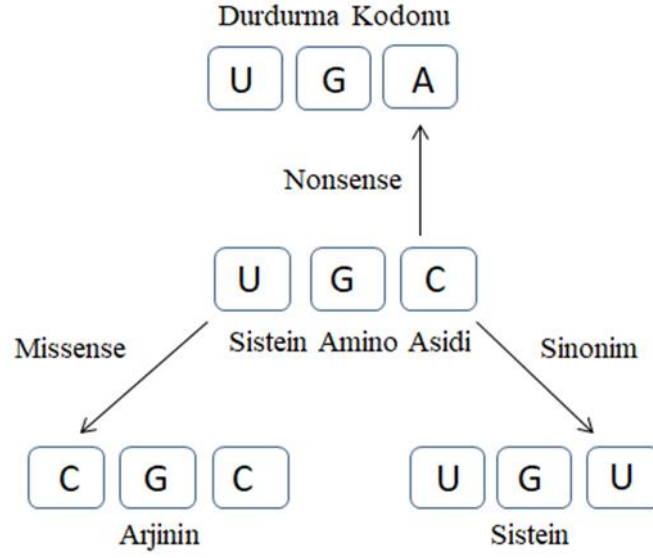
Ku kusuz epigenetik faktörlerin de GDB fenotipine katkısı da incelenmelidir. Bugün pek çok yönüyle aydınlatıldı gibi çevresel ajanların ço u, etkilerini epigenetik yeniden düzenleme aracılığıyla göstermektedir. Ku larda arkı gelişimini inceleyen çalışmalar insan iletişim sürecini daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır. Ötücü ku lar ile yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlara göre mikroRNA'lar nörogeliimde Arc, *FOXP2* gibi bazı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesine ve dolayısıyla konuşma ve dil öğreniminin temelini oluşturan beyin yapılarının organizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Dil gelişiminde rol oynayan miRNA'lar hakkında yapılan in silico tahminlerde miR-1207-5p, miR-188-3p, miR-1225-3p ve miR-299-3p'nin konuşma ve dil bozukluklarının patogeneziine katkıda bulunabilece i belirtilmiştir.

2.7 Genetik Kavramsal Çerçeve

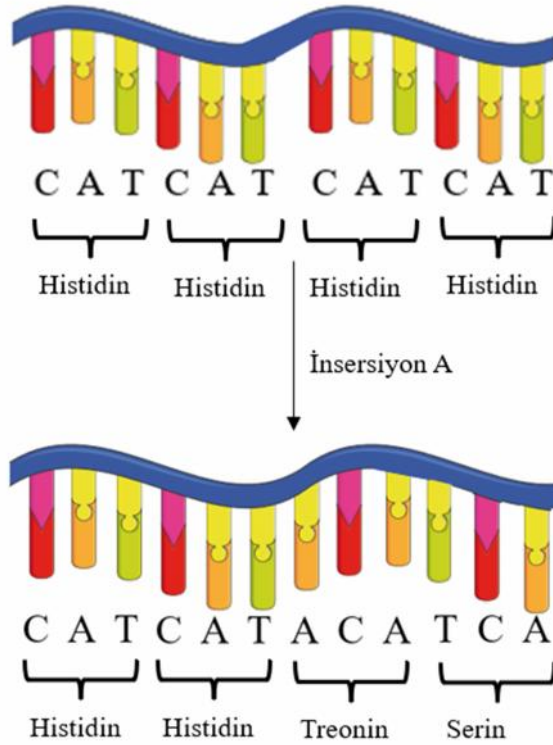
Çalışmamız, önceki bulgularımızda GDB etyolojisine katkıda bulunma potansiyeline sahip iki aday gendeki (*CNTNAP2* ve *SETBP1*) dizi varyantlarına odaklanmıştır. Bu nedenle bazı genetik kavramlardan bahsetmekte yarar vardır.

2.7.1 Genetik Varyant Türleri

Genetik bilginin yapısında oluşan ve yeni allellerin ortaya çıkmasına neden olan kalıcı de i ikliklere 'varyasyon' adı verilir. Bireyler arasındaki DNA dizisi farklılıklarını belirlemede doğru metodu seçmek için öncelikle insan genomunun do asını ve varyant tiplerini anlamak önemlidir. İnsan genomunun yaklaşık üçte ikisi tekrar dizilerinden oluşurken sadece % 1.5'u protein kodlayan genlerden oluşur. Varyasyonların ço u kodlamayan geni genom bölgelerinde yer alsa da gen ürünlerini etkileyen varyasyonların büyük kısmı, genomun protein kodlayan bölgelerinde bulunmaktadır.



ekil 2-6: Tek Nükleotid Varyasyonlarının Gösterimi. Tek bir DNA nükleotidin de i mesi kodonun anlamını de i tirebilmektedir.



ekil 2-7: Çerçeve Kayması Varyasyonu Olu um Mekanizması. Tek nükleotit insersiyonu çerçeve kaymasına yol açabilir.

nsan genom dizisinin dengeli ve dengesiz yapısal varyasyonları; uluslararası bir akademik kurulu olan nsan Genomu Varyasyon Toplulu u (HGVS - Human Genome Variation Society) tarafından belirlenen kurallara göre adlandırılmaktadır. Buna göre;

yanlı anlamlı (missense) varyantlar; kodon anlamının de i mesine neden olarak yeni bir amino asit kodlanmasına yol açan tek nükleotit de i iklikleridir (SNV –single nucleotide variant). Sinonim varyantlar; amino asit de i ikli ine yol açmaksızın kodonu de i tiren sessiz tek nükleotit varyantlarıdır. Nonsense varyantlar; nükleotit de i imi sonucu durdurucu kodon olu turarak protein sentezini sonlandıran tek nükleotit varyantlarıdır. ‘Splice’ veya ‘ekzon-intron kesim bölgesi’ varyantları ise ekzon-intron sınırlarının yakınında bulunan ve transkripsiyon sonrası intronların çıkartılıp ekzonların uç uca birle tirilmesini etkileyen genomik varyantlardır. ‘Splicing’ mekanizmalarının bozulması, matür mRNA transkriptine intron dizisinin dahil edilmesine veya transkriptten ekzon dizisinin kaybına yol açabilir. İnsersiyon/Delesyon (Indel), DNA dizisine 1 ila 50 nükleotidin eklendi i ya da çıkarıldı ı varyantlardır. Indel olan baz çifti sayısı üç ve katları de il ise okuma çerçevesi korunamaz ve çerçeve kayması (frameshift) varyantı olu ur. Bu durumda ilgili varyanttan sonraki kodonlar "çerçeve di ı" olur ve hem kodlanan amino asitler hem de protein uzunlu u de i ir.

Yukarıda açıklanan varyant tipleri dizileme temelli yakla ımlar ile tespit edilebilmektedir.

2.7.2 Yeni Nesil Dizileme

nsan Genom Projesi'nin 13 yılda tamamlanmasının ardından, daha kolay uygulanabilir, daha hızlı, daha az maliyetli ve daha verimli dizileme teknolojileri geli tirmek için yapılan çalı malar hız kazanmı tır. Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojisinin kullanıma sunulması (2005) genetik tarihinde önemli bir dönüm noktası olmu tur. YND yöntemleri ile çok sayıda hasta örne ine ait milyonlarca DNA fragmanı kitlesel olarak tek seferde dizilenebilmektedir. Hedef bölgede her bir baz çok kez okunabilmekte, bu sayede ekzonlarda veya ekzon-intron birle me bölgelerinde bulunan dizi varyantları yüksek do rulukla tespit edilebilmektedir. OMIM istatistik verilerine göre günümüzde 6259 tek gen hastalı ının moleküler temeli 4385 gen ile açıklanmı tır ve 507 OM M geni, yüzlerce kompleks hastalı a yatkınlık ile ili kilendirilmi tir (<https://www.omim.org/statistics/geneMap>, updated February 3rd, 2023). Bu verilerden de anla ılaca ı gibi hastalıkların ço u genotipik heterojenite göstermektedir. YND, genotipik heterojenite gösteren hastalıkların tanısında oldu u gibi; benzer fenotipler sergileyen hastalıkların ayırıcı tanısında da sıklıkla tercih edilmektedir. YND ile tespit edilen varyantlarının sınıflandırılması klinik bakı açısıyla yapılmaktadır: hastalı a neden oldu u bilinen varyantlar "patojenik" olarak, hastalı a yol açmadı ı bilinen varyantlar “benign” olarak sınıflandırılmaktadır. Varyantların sınıflandırılması için bir

çerçeve sağlamak üzere Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği (American College of Medical Genetics and Genomics - ACMG) tarafından beş kategorili bir sistem önerilmiştir: bu beş kategori; "patojenik", "muhtemel patojenik", "önemi bilinmeyen varyant", "muhtemel benign" ve "benign" dir (Richards ve ark., 2015).

YND tabanlı yöntemler, tıp alanında tüm ekzom dizileme (WES – whole exome sequencing), klinik ekzom dizileme (CES – clinical exome sequencing), hedeflenmiş genom dizileme, transkriptomik (RNA dizileme) ve epigenomik (Metilasyon seq, ChIP-seq) gibi çeşitli uygulama alanlarına sahiptir.

İnsanlarda patojenik varyantların %80'den fazlası genlerin protein kodlayan ekzonlarında ve kesim bölgelerinde (splice) yer almaktadır. Tüm ekzonlardaki dizi varyantlarını eş zamanlı değerlendirilmesini sağlamak amacıyla WES güçlü ancak pahalı bir tanı aracıdır. Hedeflenmiş genom dizileme ise, klinikle ilişkili belirli bir gen grubunun panel halinde ve daha uygun maliyetle dizilenmesini sağlayan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. *CNTNAP2* ve *SETBP1* genlerinin GDB etiolojisindeki olası rollerini aydınlatmak amacıyla, çalışmamızda hedeflenmiş genom dizilemenin kullanıldığı bir panel tasarımı yapılmıştır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Ara tırmanın Tipi

Ara tırma analitik ve prospektif bir vaka-kontrol çalışmasıdır.

3.2 Ara tırma Bölgesi ve Zamanı

Ara tırmanın çalışma grubu (vaka grubu ve kontrol grubu) 2022-2023 yıllarında Konya ve çevre illerden Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi (NEÜTF) Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniklerine başvuran hastalardan oluşmaktadır.

3.3 Ara tırma Evreni ve Yeri

NEÜTF Hastanesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Tıbbi Genetik Polikliniklerine başvuran kronolojik yaşı 2-7 yaş arasında olan çocuklar ara tırma evrenini oluşturmaktadır. Ara tırma sürecinde yer alan uygulamalar ve analizler NEÜTF Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.4 Çalışma Planı ve Sınırlılıklar

Çalışmanın planlanmasına 2022 yılı Ağustos ayında başlanmıştır. İlk olarak gelişimsel dil bozukluğu etiyojisi hakkında literatür taraması, genetik analiz metodlarını kullanan ara tırmalar ve ara tırmalarda adı geçen 20 aday genin özellikleri incelenmiştir. Çalışmada analitik ara tırma türlerinden vaka-kontrol metodu kullanılması, vaka ve kontrol gruplarının ise en az 30 kişiden oluşması kararı alınmıştır. Ardından 60 kişi için 10 ila 15 aday genden oluşan hedefe yönelik bir yeni nesil dizileme paneli tasarlanmasının maliyeti araştırılmıştır. Maliyetin, ön görülen çalışma bütçesinin iki katını aşmaması ile birlikte panel boyutunu küçültme ve ampikon dizileme metodunu kullanma kararı alınmıştır. Metodolojimizdeki kısıtlayıcı koşulların sonuçların kapsayıcılığı üzerine olumsuz etkileri öngörülerek; geniş bir literatür taraması sonucunda, birden fazla güçlü çalışmada GDB olan bireylerde mutant olduğu belirlenen iki aday gen (*CNTNAP2*, *SETBP1*) seçilmiştir.

Çalışmada kullanılacak gelişim değerlendirme aracını belirlemek amacıyla çocuk psikiyatri uzmanlarından görüş alınmıştır. Türk kültürüne uygun olarak geliştirilmesi, yoğun poliklinik ortamında uygulanabilmesi, maliyet etkin olması, değerlendirme sürecinde anne-babanın uzun süreli gözlemlerinden daha çok faydalanmayı sağlaması, literatürde geçerlilik ve güvenilirliği kabul gören bir araç

olması nedeniyle, GDB olan çocukların gelişim düzeylerini belirlemek amacıyla Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE) kullanılmıdır.

3.5 Ara tırmanın zni ve Etik Durum

Ara tırmanın etik açıdan uygunlu u NEU laç ve Tıbbi Cihaz Dı ı Ara tırmalar Etik Kurulu'nun 07.10.2022 tarihli 2022/3990 sayılı kararı ile onaylanmıdır (Ek-8). Ara tırma 11.11.2022 tarihinde NEU Bilimsel Ara tırma Projeleri Koordinatörlü ü tarafından Tıpta Uzmanlık Tez Projesi olarak kabul edilmi dir (Proje No: 221518044).

3.6 Ara tırma Öncesi Bilgilendirme

Hasta ve kontrol gruplarına ara tırma ile ilgili detaylı bilgi verilmi dir. Ara tırmanın tıpta uzmanlık tezi kapsamında yapıldı ı, çalı maya dahil edilme kriterlerini kar ılayan ki ilerden 5 ml periferik kan örne i alınaca ı, kandan izole edilen DNA'dan yeni nesil dizi analizi testi yapılaca ı, katılımcıların kimlik bilgilerinin gizli tutulaca ı, ara tırmaya katılmanın tedavi sürecini etkilemeyece i ve ara tırma için yapılacak harcamalarla ilgili katılımcıya maliyet yüklenmeyece i anlatılmıdır. Sözlü bilgilendirme sonrası dahil edilme kriterlerini sa layan ve ara tırmaya katılmaya gönüllü olan ki ilere (vesayet altında bulunan çocukların veli/vasilerine) bilgilendirilmi gönüllü onam formu okutulmu ve çalı maya katılmayı onayladıklarına dair imza alınmıdır (Bkz. Ek-3, Ek-4).

3.7 Katılımcıların Seçimi

Katılımcıların vaka grubuna dahil edilmesinde dikkate alınan ölçütler unlardır:

- a) 2-7 ya arasında olmak
- b) Konu manın gecikmesi ikayeti ile NEUTF Hastanesi Çocuk ve Ergen Ruh Sa lı ı Polikliniklerine ba vurmak ve geli imsel dil bozuklu u tanısı almak
- c) Geli imsel dil bozuklu u tanısı ile izlenmekte olmak
- d) AGTE ile yapılan de erlendirmede dil haricinde di er geli im basamaklarında belirgin gecikmemi olmak
- e) Velisi tarafından çalı maya katılmasına sözlü ve yazılı olarak izin verilmek
- f) Dı lanma ölçütlerine sahip olmamak

Katılımcıların vaka grubundan dışlanma ölçütleri şunlardır:

- a) Konu madde gecikmesini açıklayabilecek; konjenital yapısal anomali, bilişsel yetersizlik, nörolojik hastalık, bilingualizm veya iletişim kaybına sahip olmak
- b) Gecikmiş dil ve konu madde dışında ek psikiyatrik tanıya sahip olmak

Kontrol grubu ise NEUTF Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniklerine başvuru ile ön tanı ile başvuran ancak yapılan testlerde ön tanı ile uyumlu bulunmayan, ayrıca nörolojik-psikiyatrik bir problemi olmayan birbiri ile ilişkili kısıtlı olgular arasından benzer yaş grubu ve cinsiyet dağılımındaki bireylerden seçilmiştir. Hasta ve kontrol grubu aynı etnik kökenli bireylerden oluşturulmuştur. Ön analizlerde iki grup demografik özellikler bakımından istatistiksel anlamda özdeş bulunmuştur.

Katılımcıların kontrol grubuna dahil edilmesinde dikkate alınan ölçütler şunlardır:

- a) Çalışma tarihi itibarıyla 2-7 yaş arasında olmak
- b) DSM-V tanı ölçütlerine göre iletişim bozukluğu dahil herhangi bir psikiyatrik bozukluk tanısı almamış olmak
- d) Başvuru hikayetine yönelik yapılan testlerde herhangi bir tanı almamak ve ileri araştırmaya gereksinim duyulmamak
- e) Velisi tarafından çalışmaya katılmasına sözlü ve yazılı olarak izin verilmek

Katılımcıların kontrol grubundan dışlanma ölçütleri şunlardır:

- a) Genel gelişimi etkileyebilecek kronik bir hastalığa sahip olmak
- b) Herhangi bir tanı konulmasa da kronik şikayetler nedeniyle klinik izlemde olmak

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygunluğu saptanan hastalar ve ebeveynlerine çalışmaya ilgili bilgi verilmiştir. Tüm uygulamalarda çocuğun ve ailenin gönüllülüğü esas alınmıştır.

3.8 Kullanılan Yöntemler

Çalışmaya Eylül 2022 ile Mart 2023 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Ruh Sağlığı Polikliniklerine konu madde gecikme ile başvuran 2 - 7 yaş arasındaki, altta yatan bir hastalığı olmayan, DSM-V tanı ölçütlerine göre dil bozukluğu tanısı konulan ve ek psikiyatrik komorbiditesi olmayan 30 çocuk (23 erkek, 7 kız) dâhil edilmiştir. Vaka grubunu oluşturan çocuklara AGTE

uygulanmı tır. Bu i lem çocuktan çocu a de i mekle birlikte ortalama 30 dakika sürmü tür.

3.8.1 Veri Toplama Araçları

Katılımcı de erlendirme formu (Ek 1), Sosyo-demografik veri formu (Ek 2) ve AGTE (Ek-7) aracılı ıyla veri elde edilmi tir. Vaka ve kontrol grubuna dahil edilen çocuklardan; demografik bilgiler, ebeveynlerin sosyo-ekonomik özellikleri yanı sıra aile öyküsü gibi etkisinden üphelenilen faktörleri sorgulayan bir öykü alınmı tır. Bitirilen e itim düzeyleri ilkö retim (ilkokul ve ortaokul), ortaö retim (lise) yüksek ö retim ve lisans üstü (5 veya 6 yıllık fakülteler dahil) kategorilerine ayrılmı tır. Enflasyon nedeniyle gelir durumu asgari ücret baz alınarak u ekilde sorulmu tur;

1-düzenli geliri yok

2-asgari ücret ve altı

3-asgari ücret ile asgari ücretin iki katı arası 4-asgari ücretin iki katının üstü

Vaka ve kontrol gruplarında boy, kilo, ba çevresi kayıt edilmi tir. Vakaların pedigrri sorgulamaları üç ku ak yapılmı tır ve ileti im bozuklukları yanı sıra ailedeki nörolojik, psikiyatrik hastalıklar sorgulanmı tır. Ebeveynlerin aynı köyden olması (endogami) durumu; akraba evlili i ve/veya endogami ba lı ı altında belirtilmi tir. Vakaların fizik muayenesinde artikülatörlerin (a ız, dil, dudak, damak, farinks, çene) ve solunum organlarının yapısal-fonksiyonel bütünlü üne özellikle dikkat edilmi tir.

3.8.2 Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

DNA zolasyon Kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit Cat # 11 796 828 001)

Taq Polimeraz (HelixAmp™)

360 GC enhancer (Applied Biosystems™)

Yeni nesil dizileme için örnek hazırlama kiti (Bioo Scientific-PerkinElmer NEXTflex™)

Universal Amplicon Prep Kit v2)

ExoSAP-IT Express PCR Product Clean Up Kit (Applied Biosystems™)

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™)

Zymo Research DNA Sequencing Clean Up Kit

%80 Etanol

Distile su

Nükleik asit ekstraksiyon platformu (Maelstrom 4800 Nucleic Acid Extractor)

PZR Plakaları için Yapı kan Sızdırmazlık Bandı (Bio-Rad, Cat # MSB1001)

Termal Döngü Cihazları: Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler, AGS

Thermal Cycler AGT9601, Bio-Gener Thermal Cycler GE4852T

Vortex/ Mikrosantrifüj Cihazı (Biosan FVL-2400N Combi-Spin, DLABMX-F Model)
Santrifüj cihazı: Microfuge 16 (Beckman Coulter)
96 Kuyucuklu PZR Plakası (Roche, LightCycler®)
96 Derin Kuyucuklu Kütüphane Saklama ve Havuzlama Plakası (Thermo Fisher)
Yeni Nesil Dizileme Cihazı: MiSeq (Illumina®)
Kapiller Elektroferez (Applied Biosystems 3130x Genetic Analyzer)
Nükleaz içermeyen 1,5 mL mikrosantrifüj tüpleri
Otomatik pipet: Brand 705884 Transferpette® S
Çok kanallı pipet: Axypet® 8 kanallı pipet
Steril, nükleaz içermeyen aerosol bariyerli pipet uçları (Medpoint®)
Eppendorf DNA LoBind® Tüpleri (M.Plastic MCTB020® 1.5 mL)
Kapaklı- eritli PZR Tüpleri (0.2 mL)
Spin Kolonlar ve Toplama Tüpleri (Roche®)
Manyetik Ayırıcı Stand -96 (Thermo Fisher Scientific®, Cat # AM10027)
Spektrofotometre (Thermo Scientific Nano-Drop 2000)
Qubit 3 Fluorometer® (Thermo Scientific)
Laminar Akı Kabini/Çeker Ocak: (NÜVE 120)
-80 °C So utucu (New Brunswick U570)
Pudrasız eldivenler ve Dekontaminasyon Mendilleri
Buzdolabı: Regal (-20°C), Beko (+4°C)
Buz kovaı
Kronometre
Bilgisayar
Yazıcı

3.9 Çalışma Basamakları

3.9.1 Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Periferik kan örnekleri mor kapaklı EDTA'lı plastik tüplere alınarak çalışmanın gerçekte tirilece i güne kadar NEÜTF Genetik Hastalıklar De erlendirme Merkezi bünyesinde +4°C buzdolabında saklandı.

3.9.2 DNA Dizilemede Kullanılan Primerlerinin Tasarlanması

Hedef gen sayısının az olması sebebiyle Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli amplikon dizileme metodu tercih edilmi tir. Amplifikasyona dayalı yöntemler, diziyeye özgü primerler kullanılarak ilgilenilen genomik bölgelerin multiplex PZR ile

eksponansiyel amplifikasyonuna dayanır. PZR, denatüre tek sarmallı DNA hedeflerine ba lanan bir ileri (F) ve bir geri (R) primer çifti ile gerçekleştirilir. Yüksek verimli bir amplifikasyon için primer tasarım parametreleri kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda primerler servis sağlayıcı firma tarafından hedef genlerin tüm ekzonları ile 5'UTR (UnTranslated Region- kodlamayan bölgeler), 3'UTR, promotör bölgelerini kapsayacak şekilde ve aşağıdaki özelliklere uygun olarak Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) uygulaması üzerinden dizayn edilmiştir. Primer tasarımında uyulan kurallar aşağıda özetlenebilir;

- Primer bağlanma bölgeleri ile hedef bölge arasında 50-180 nükleotit olmalıdır.
- PZR primerlerinin optimal uzunluğunun 18-22 baz çifti olduğu kabul edilmektedir. Bu uzunluk, özgüllük için yeterince uzun, bağlanma sıcaklığında primerlerin kalıp DNA zincirine kolayca bağlanması için yeterince kısadır.
- F ve R primerlerin veya primer çiftlerinin (dörtten fazla baz yaparak) hibritleşmesine izin verebilecek bir tasarımdan kaçınılmalıdır.
- PZR primerlerinin tahmini GC içeriğinin %40-60 ; erime sıcaklığının (Tm) 50-60°C aralığında olması idealdir. $Tm = [4 \times (G + C)] + [2 \times (A + T)]$ formülü ile hesaplanabilmektedir.
- Primer çiftlerinin erime sıcaklıkları arasında 5°C'den fazla fark olmamalıdır.
- G ve C bazlarının komplementer oldukları bölgeye daha güçlü bağlanması nedeniyle primerlerin 3' ucundan son be baz içinde G veya C bazlarının varlığı, 3' uç stabilitesini sağlayarak spesifik bağlanmayı destekler (GC "clamp"). Ancak primerin 3' tarafında son be bazda üçten fazla G veya C bazı bulunmasından kaçınılmalıdır.
- Primer içinde fazla tekrarlayan diziler yanlış eşleşme yol açacağından bir primer oligonükleotidinde art arda tekrar etmesi kabul edilebilir maksimum nükleotit veya dinükleotid sayısı 4'tür.

Primer tasarımında hg19/GRCh37 referans genom dizisi kullanılmıştır. *CNTNAP2* geni için ENST00000361727.3 transkripti, *SETBP1* geni için ENST00000282030.5 transkriptinin dizisi esas alınmıştır. Tasarlanan primer dizileri Ekler bölümünde verilmiştir. Primer dizilerinin genomdaki lokasyonu ve sekonder yapıları oluşturulabilir özellikleri, internet üzerinden serbest paylaşımlı olan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ve 'UCSC In-Silico PCR' programları ile kontrol edilerek genomda sadece tek bir bölgeyi özgül olarak çözen primer çiftleri seçilmiştir. Sentezlenen primerlerin PZR için uygun olup olmadıkları iki farklı DNA ile PZR yapılarak test edilmiştir.

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
2	ENSE00001389105	146.471.363	146.471.473	1	1	111	<pre> aagtctttggagtaagtgtgctttgctatggtttccattgaaatcagggttatataa acagctctctgtgttatatatatttaggataacagaattgcctaaatcctttgctaaat attgttcaagatacataaaagacatacagattcaatgatttttaaccaacacatac caatogttattogaatogtgttgagtgctctctctctctctctctctctctctctctcag </pre>
	Intron 2-3	146.471.474	146.536.802			65,329	<pre> gtaagccaaatttggattctttatcaataaacatgtaataaagaacatgttatatta tagccatatatatataataacacacaanagatgttggagacacagaatcactctgpc cacttctataaaagatccaatgccaatcaaacctctctctctctctctctctctctctctctcag aacataggaaaacttaggctggaagttagagatagtaagtcacaaaggaagcattttga atttcttggatataaactcaaatcacaatcacaatcacaatcacaatcacaatcacaatcacaat </pre>

ekil 3-1: Örnek (*CNTNAP2* Ekzon 2) Primer Dizilerinin Ba lanma Bölgeleri (turuncu ile i aretlenmi tir). <https://grch37.ensembl.org/>

CNTNAP2 Primerlerinin Tasarımı

CNTNAP2 geninin 24 ekzonu bulunmaktadır. Bunlardan 2. ile 23. arasındaki ekzonların tamamı protein dizisinin kodlanmasında görev alırken 1. ve 24. ekzonun bir kısmı protein dizisinin kodlanmasında; bir kısmı ise *CNTNAP2* mRNA'sının 5' ve 3' ucunun sentezine katılmaktadır. *CNTNAP2* geni için; 24 ekzon ve ekzonların çevresindeki en az 20 bp uzunlu undaki intron bölgelerini ço altacak ekilde 24'ü ileri yönde, 24'ü geri yönde olmak üzere 48 primer dizisi tasarlanmı tır (Ek-5). 24 çift primer dizisi ile ortalama 426 nükleotit uzunlu unda 24 ampikon elde edilmi ve ço altılmı tır.

SETBP1 Primerlerinin Tasarımı

SETBP1 geninin 6 ekzonu bulunmaktadır. Bunlardan 3, 4 ve 5. ekzonların tamamı protein dizisinin kodlanmasında görev alırken, 1. ekzonun tamamı *SETBP1* mRNA'sının 5' ucunun sentezinde; 2 ve 6. ekzon ise hem protein dizisinin kodlanmasında hem de *SETBP1* mRNA'sının sırasıyla 5' ve 3' ucunun sentezinde yer almaktadır. *SETBP1* geninin protein kodlayan tüm ekzonlarına yönelik 12 çift (24 adet) primer tasarlanmı tır (Ek-6). 2. ve 6. ekzonlar iki parçaya, genin en büyük ekzonu olan 4. ekzon (3,460 bp) ise altı parçaya bölünerek incelenmi tir. 24 primer dizisi ile ortalama 538 nükleotit uzunlu unda 12 ampikon elde edilmi ve ço altılmı tır.

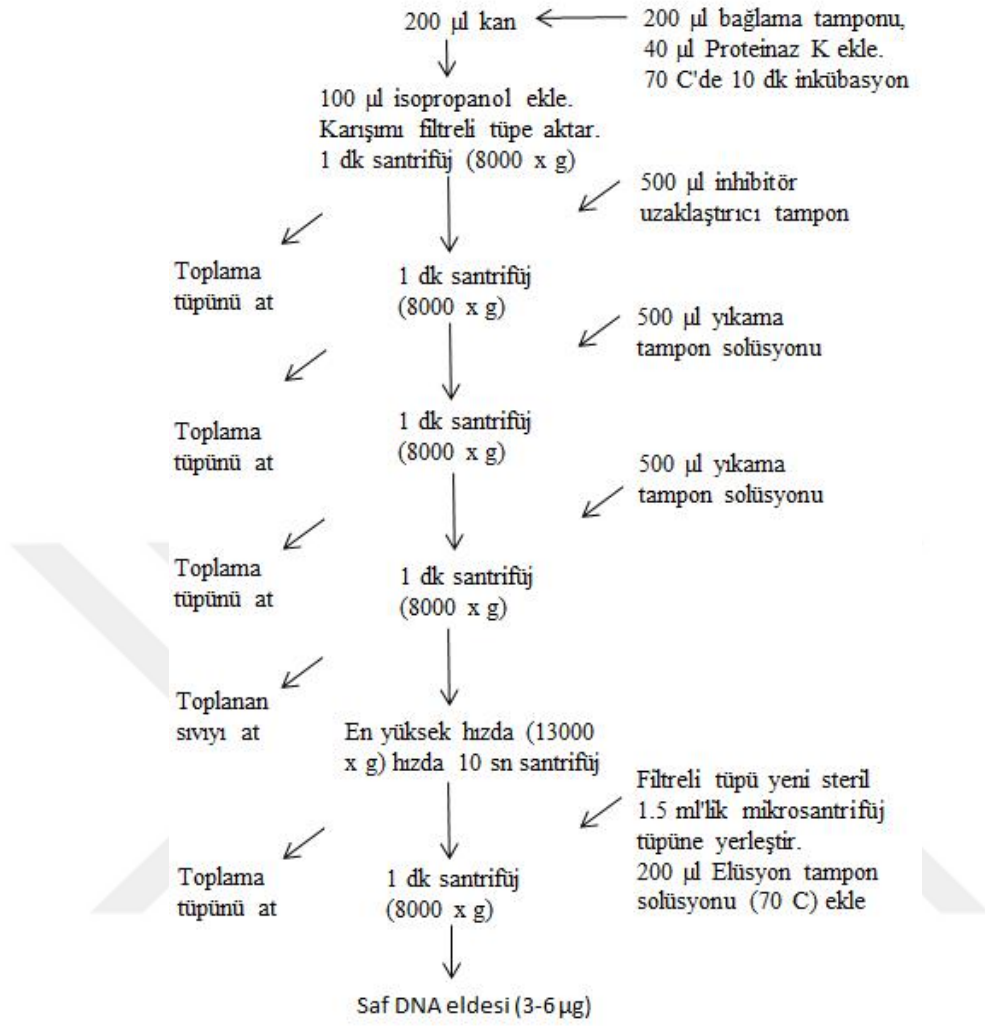
3.9.3 DNA zolasyonu

Laboratuvar verimlili i açısından DNA izolasyonu otomatize cihaz (Maelstrom 4800) ile gerçekleştirildi. Gerekli i durumlarda DNA izolasyon kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit) kullanılarak ve üretici talimatları (ekil 3-3) takip edilerek manuel izolasyon gerçekleştirildi. Her örnekten elde edilen gDNA'nın saflılı ve konsantrasyonu spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. A260/280 de eri 1.8-2.0 arasında olan ve konsantrasyonu minimum 30 ng/µl olan gDNA'lar ile laboratuvar çalışmasına devam edildi.

DNA zolasyon Kit içeri i	Kullanılan Miktar (μ l/numune)
20 ml Lizis Tampon Solüsyonu (AL)	200
20 ml Ba lama Tampon Solüsyonu	200
Liyofilize Proteinaz K	40
20 ml Yıkama Tampon Solüsyonu (AW)	1000 (500 x 2)
33 ml nhibitör Uzakla tırma Tampon Solüsyonu	500
40 ml Elüsyon Tampon Solüsyonu (AE)	200
Safla tırma tüpleri (spin kolonlu)	-
2 ml'lik Toplama tüpleri	-



ekil 3-2: Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması



ekil 3-3: Manuel DNA zolasyonu Akı eması



ekil 3-4: DNA zolasyon Cihazı (Maelstrom 4800)

3.9.4 Yeni Nesil Dizileme

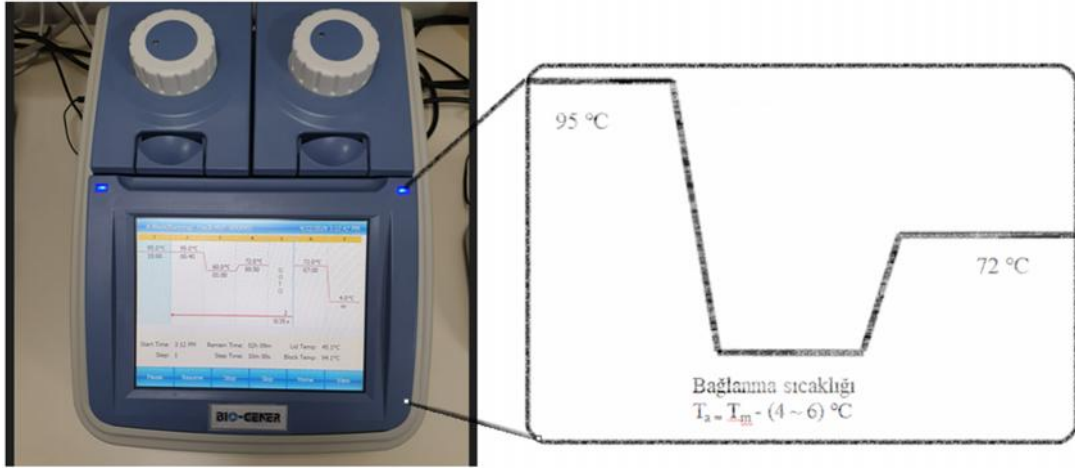
Hedef Genomik Bölgelerin Amplifikasyonu

Örneklerden izole edilen gDNA'lar ile PZR 1 gerçekleştirildi. Kullanılan kiti (HelixAmp™ T2500N) dahil olan protokol takip edilerek; 10 ~ 100 ng kalıp DNA (X µl) a a ıdaki bile enler ile bir PZR tüpünde karı tırıldı.

Bile enler	Hacimler
10x Taq Tampon	5 µl
dNTP Karı ımı (her biri 10mM)	1 µl
eri (F) Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Geri (R) Primer (10 pmol/µl)	2 µl
TuneUp™ Solüsyonu	0~20µl (0,5x'ten 2x'e kadar eklenebilir.)
Taq Polimeraz (5 ünite/µl)	1.25 ünite
Ribonükleazsız (Rnaz'sız) Su	50µl'ye tamamlanır.

PZR Ko ulları

Sıcaklık & Süre	Döngü
95 , 2 dk	x1
95 , 20 sn	
Ba lanma sıcaklı ı, 40 sn	x 25~ 40
72 1 dk	
72 , 5 dakika	x 1



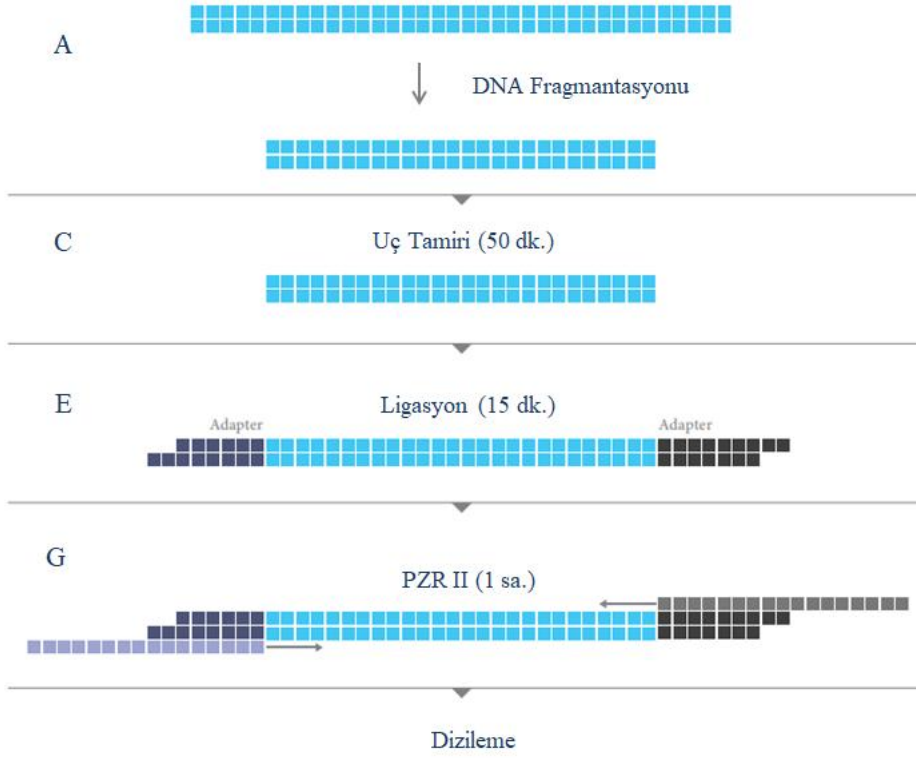
ekil 3-5:PZR Cihazında Bir Döngü

Kütüphane Hazırlığı

Illumina® platformuyla uyumlu barkodlu amplikon kütüphaneleri üretmek amacıyla içeriğinde verilen NEXTflex™ Universal Amplicon Prep Kit v2 kullanıldı.

Kit içeriği	Miktar
Kırmızı Kutu	
NEXTflex™ Uç Onarımı Tampon Karışımı	336 µL
NEXTflex™ Uç Onarımı Enzim Karışımı	144 µL
NEXTflex™ DNA Fragmentasyon Enzimi	48 µL
Mavi Kutu	
5x Fragmentasyon Tampon Karışımı	192 µL
Sarı Kutu	
NEXTflex™ PZR II Barkodlu Primer Karışımı 1-48	her biri 4 µL
Yeşil Kutu	
NEXTflex™ PZR II Master Mix	480 µL
Mor Kutu	
NEXTflex™ Amplikon DNA Adaptör	96 µL
NEXTflex™ Ligasyon Karışımı	1512 µL
Beyaz Kutu	
Nükleaz içermeyen Su	1.5 mL
effaf Kapaklı tüp	
Resüpsansiyon Tamponu (oda sıcaklığında)	9 mL
NEXTflex™ Safleştirme Boncukları	15 mL

Kit içeriğinden çıkan tüm kimyasallar buz üzerinde tutuldu. Her bir bileşen kullanımdan hemen önce, malzemenin tüp kapağına veya duvarına yapılmadan önce emin olmak için kısaca vortekslendi. Kullanımdan önce NEXTflex™ Saflaştırma Boncukları 4°C'den çıkarıldı, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve sıvı homojen görünümüne kadar vortekslendi.



ekil 3-6: NEXTflex™ Universal Amplicon Prep Kit v2 Kullanımı Akıllıması

ADIM - A: Fragmentasyon

1. DNA örneğini iyice vorteksledi.
2. Enzim Bazlı DNA Fragmentasyon Reaksiyon Karışımını PZR Plakasında aşağıdaki protokole hazırlandı. Pipetle iyice karıştırıldı.

– µL	14 µL'ye kadar nükleaz içermeyen suda seyreltilmiş 20-100 ng amplifiye DNA
– µL	Nükleaz içermeyen Su
4 µL	5x Fragmentasyon Tampon Karışımı
1 µL	NEXTflex™ DNA Fragmentasyon Enzimi
20 µL	TOPLAM

3. DNA Fragmentasyon Enzimi vorteks ve kısa spin işlemi ile döndürüldükten sonra DNA örneğini içeren reaksiyon karışımına eklendi. Pipetle iyice karıştırıldı.

4. PZR Plakası yapı kan sızdırmazlık bandı ile kapatıldı. Termal döngü cihazında 42°C'de 20 dakika, ardından 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.

5. Elde edilen fragmente DNA'nın hemen Uç Onarım reaksiyonuna girmesi sağlandı.

ADIM - B: Safla tırma

1. Adım A ile elde edilen 20 µL hacmindeki reaksiyon karışımına 30 µL Resüspanسیون tamponu eklendi. Homojenize olana kadar iyice karıştırıldı.

2. Süpernatanta 90 µL Safla tırma boncucu eklendi. Homojenize edildi.

3. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. PZR plakası oda sıcaklığında 5 dakika süre ile (veya süpernatant tamamen berrak görünene kadar) manyetik stand üzerine yerleştirildi.

5. Oluşan süpernatant pipetle alınarak atıldı. Bu esnada boncuklara dokunmamaya dikkat edildi.

6. Plaka manyetik standda iken, her bir manyetik boncuk pelletine 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol eklendi ve plaka oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildi. Ardından etanol pipetlenerek atıldı.

7. %80 etanol yıkaması tekrarlandı.

8. Etanol atıldıktan sonra PZR plakası manyetik standdan çıkarıldı. Tüpler, kalan etanol tamamen buharla ana kadar oda sıcaklığında 5 dakika (veya boncuk peleti gözle görülür şekilde kuruyana kadar) kurumaya bırakıldı.

9. Kurutulmuş boncuk pelleti 42 µL Resüspanسیون tamponu ile yeniden süspanse edildi. Pipetleme ile iyice karıştırıldı.

10. Yeniden süspanse edilen safla tırma boncukları oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.

11. PZR plakası oda sıcaklığında 5 dakika (veya numune berrak görünene kadar) manyetik stand üzerine yerleştirildi.

12. Elde edilen 40 µL berrak süpernatant (safla tırılmış reaksiyon) yeni plakaya aktarıldı.

ADIM - C: Uç Onarımı

1. Her numune için, aşağıdaki reaktifler buz üzerinde nükleaz içermeyen 96 kuyucuklu bir PZR Plakasında birleştirildi.

40 µL	Adım B ile elde edilen safila tırılmı reaksiyon
2 µL	NEXTflex™ Nükleaz çermeyen Su
7 µL	NEXTflex™ Uç Onarımı Tampon Karı ımı
3 µL	NEXTflex™ Uç Onarımı Enzim Karı ımı
50 µL	TOPLAM

2. Pipetle iyice karı tırıldı.
3. PZR Plakası yapı kan sızdırmazlık bandı ile kapatıldı. Termal döngü cihazında 22°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
4. Uç Onarımı gerçekte tirilmi 50 µL numune elde edildi.

ADIM - D: Safila tırma

1. Her numuneye 90 µL Safila tırma boncu u eklendi. Homojenize olana kadar iyice karı tırıldı.
2. Oda sıcaklı ında 5 dakika inkübe edildi.
3. Ardından PZR plakası manyetik stand üzerine yerle tirilerek 5 dakika (veya süpernatant tamamen berrak görünene kadar) bekletildi.
4. Olu an süpernatant pipetle alınarak atıldı. Bu esnada boncuklara dokunmamaya dikkat edildi.
5. Plaka manyetik standda iken, her bir manyetik boncuk pelletine 200 µL taze hazırlanımı %80 etanol eklendi ve plaka oda sıcaklı ında 30 saniye inkübe edildi. Ardından etanol pipetlenerek atıldı.
6. %80 etanol yıkaması toplamda 2 kez olacak ekilde tekrarlandı.
7. Etanol atıldıktan sonra PZR plakası manyetik standdan çıkarıldı. Tüpler, kalan etanol tamamen buharla ana kadar oda sıcaklı ında 5 dakika (veya boncuk peleti gözle görülür ekilde kuruyana kadar) kurumaya bırakıldı.
8. Kurutulmuş boncuk pelleti 23 µL Resüspansiyon tamponu ile yeniden süspansiyon edildi. Pipetleme ile tüp cidarında kalmadı ından emin olana de in iyice karı tırıldı.
9. Yeniden süspansiyon edilen safila tırma boncukları oda sıcaklı ında 3 dk inkübe edildi.
10. PZR plakası oda sıcaklı ında manyetik stand üzerine yerle tirilerek 5 dakika (veya numune berrak görünene kadar) bekletildi.

11. 21 µL safla tırılmı ve uç onarımı yapılmı örnek elde edildi, yeni plakaya aktarıldı.

ADIM - E: Adaptör Ligasyonu

1. Her numune için, a a ıdaki reaktifler buz üzerinde nükleaz içermeyen 96 kuyucuklu bir PZR Plakasında birleştirildi. Ligasyon karışımı kullanımdan hemen önce -20°C'den çıkarıldı.

21 µL Adım D ile elde edilen safla tırılmı ve uç onarımı yapılmı reaksiyon

2 µL NEXTflex™ Amplikon DNA Adaptör

31.5 µL NEXTflex™ Ligasyon Karışımı

54.5 µL TOPLAM

2. Pipetle iyice karıştırıldı.

3. PZR Plakası yapışkan sızdırmazlık bandı ile kapatıldı. Termal döngü cihazında 22°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi.

4. 54.5 µL adaptör ligasyonu tamamlanmış örnek elde edildi. Vakit kaybedilmeden Adım F'ye geçildi.

ADIM - F: Safla tırma

1. Her numuneye 43 µL Safla tırma boncucu eklendi. Homojenize olana kadar karıştırıldı.

2. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

3. Sonrasında PZR plakası manyetik stand üzerine yerleştirilerek 5 dakika (veya süpernatant tamamen berrak görünene kadar) bekletildi.

4. Oluşan süpernatant pipetle dikkatle alınarak atıldı.

5. Plaka manyetik standda iken, her bir manyetik boncuk pelletine 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol eklendi ve plaka oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildi. Ardından etanol dikkatlice pipetlenerek atıldı.

6. Önceki basamak (%80 etanol yıkaması) toplamda 2 kez olacak şekilde tekrarlandı.

7. Etanol atıldıktan sonra PZR plakası manyetik standdan çıkarıldı. Tüpler, kalan etanol tamamen buharlaşana kadar oda sıcaklığında 5 dakika (veya boncuk peleti gözle görülür şekilde kuruyana kadar) kurumaya bırakıldı.

8. Kurutulmu boncuk pelleti 40 µL Resüspanسیون tamponu ile yeniden süspanse edildi. Pipetleme ile tüpe yapı ık kalmadı ından emin olana de in iyice karı tırıldı.

9. Yeniden süspanse edilen safla tırma boncukları oda sıcaklı ında 3 dk inkübe edildi.

10. PZR plakası oda sıcaklı ında manyetik stand üzerine yerle tirilerek 5 dakika (veya numune berrak görünene kadar) bekletildi.

11. 38 µL saflı ve adaptör ligasyonu yapılmı örnek elde edildi, yeni plakaya aktarıldı.

ADIM - G: PZR II Amplifikasyon (Kütüphane Amplifikasyonu ve Amplifiye Kütüphanenin Safla tırılması)

1. Her numune için, a a ıdaki reaktifler buz üzerinde 96 kuyucuklu bir PZR Plakasında birle tirildi. Ligasyon karı ımı kullanımdan hemen önce -20°C'den çıkarıldı.

38 µL	Adım F ile elde edilen safla tırılmı ve adaptör ligasyonu yapılmı reaksiyon
2 µL	NEXTflex™ PZR II Barkodlu Primer Karı ımı
10 µL	NEXTflex™ PZR II Master Mix
50 µL	TOPLAM

2. Pipetle iyice karı tırıldı.

3. PZR Plakası yapı kan sızdırmazlık bandı ile kapatıldı. Termal döngü cihazında a a ıdaki protokol ile inkübe edildi.

Sıcaklık & Süre	Döngü
65 , 2 dk	x1
98 , 2 dk	
98 , 30 sn	
65 , 30 sn	x 12
72 1 dk	
72 , 3 dakika	x 1

4. PZR plakası Termal döngü cihazından çıkarıldı. Her numuneye 40 µL Safla tırma boncu u eklendi ve homojenle ene kadar iyice karı tırıldı.

5. Oda sıcaklı ında 5 dakika inkübe edildi.

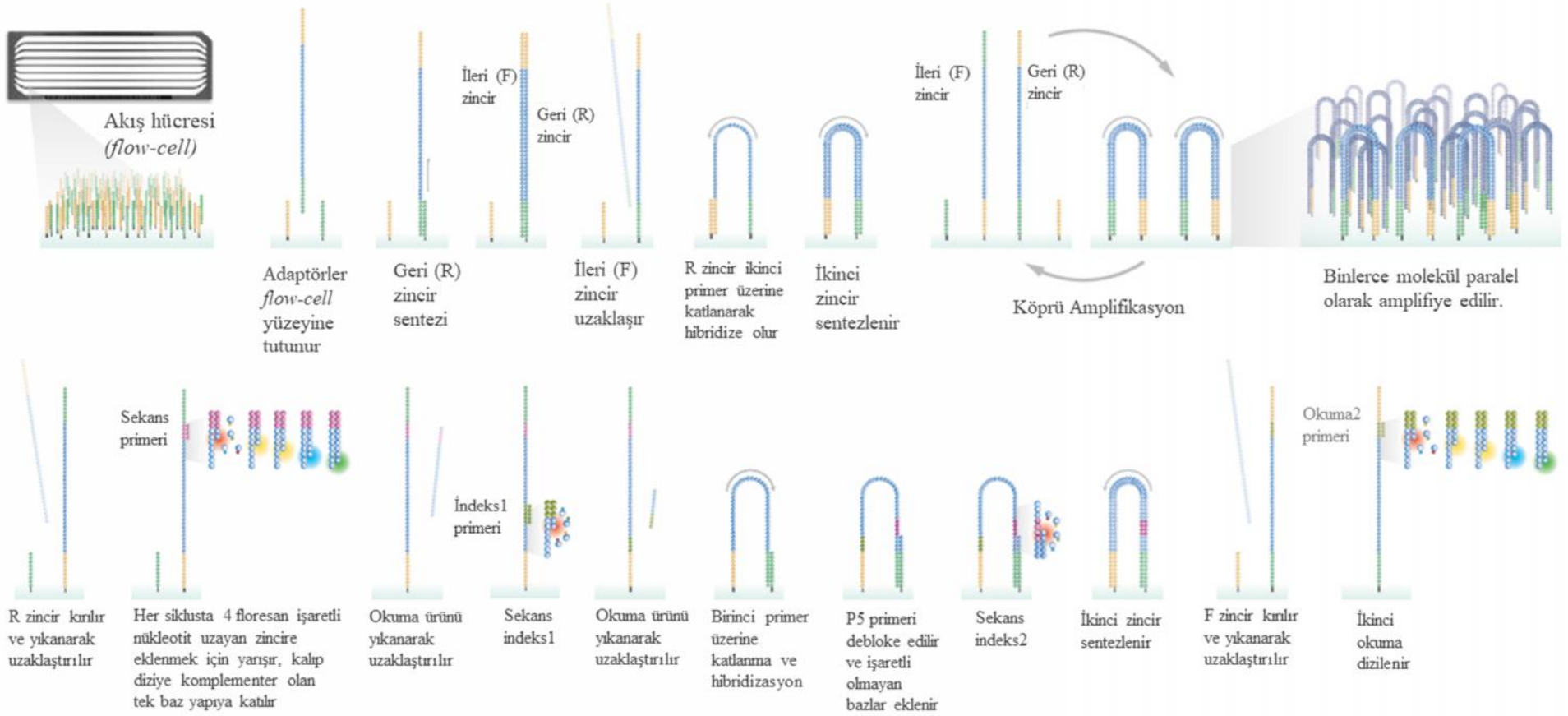
6. Sonrasında PZR plakası manyetik stand üzerine yerle tirilerek 5 dakika (veya süpernatant tamamen berrak görünene kadar) bekletildi.
7. Olu an süpernatant pipetle alınarak atıldı. Bu esnada boncuklara dokunmamaya dikkat edildi.
8. Plaka manyetik standda iken, her bir manyetik boncuk pelletine 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol eklendi ve plaka oda sıcaklığı nda 30 saniye inkübe edildi. Ardından etanol dikkatlice pipetlenerek atıldı.
9. Önceki basamak (%80 etanol yıkaması) toplamda 2 kez olacak şekilde tekrarlandı.
10. Etanol atıldıktan sonra PZR plakası manyetik standdan çıkarıldı. Tüpler, kalan etanol tamamen buharla ana kadar oda sıcaklığı nda 5 dakika (veya boncuk peleti gözle görülür şekilde kuruyana kadar) kurumaya bırakıldı.
11. Kurutulmuş boncuk pelleti 22 µL Resüspanسیون tamponu ile yeniden süspanse edildi. Pipetleme ile tüpe yapı ık ürün kalmadığı ndan emin olana kadar iyice karı tırıldı.
12. Yeniden süspanse edilen safla tırma boncukları oda sıcaklığı nda 3 dk inkübe edildi.
13. PZR plakası oda sıcaklığı nda manyetik stand üzerine yerle tirilerek 5 dakika daha bekletildi.
14. 20 µL berrak numune elde edildi ve yeni bir plakaya aktarıldı.

DNA Kütüphanesinin Kantifikasyonu ve Kalite Analizi

Kütüphane hazırlandıktan sonra, enstrümantasyon (Thermo Fisher Scientific, Qubit®) aracılığıyla kalite ve miktarının uygunluğu kontrol edildi.

Kütüphane Havuzunun Dizilenmesi

Uygun bulunan kütüphane MiniSeq Platformunda (Illumina, San Diego, Kaliforniya, ABD) kartu a yüklendi. Köprü PZR tabanlı yeni nesil dizileme (ekil 3-6) yöntemiyle kitlesel paralel dizileme gerçekleştirildi. Dizileme esnasında oluşturulan optik görüntüler analiz edilebilir veri setlerine dönüştürüldü.



ekil 3-7: Köprü PZR Tabanlı Yeni Nesil Dizileme masası



ekil 3-8: MiniSeq cihazı (Illumina, Inc.)

3.9.5 Biyoinformatik Analiz

Dizileme sonucu cihazın ürettiği FASTQ formatındaki gz uzantılı dosya, SEQ (Genomize, İstanbul, Türkiye) platformu vasıtasıyla incelendi. Standart biyoinformatik akışı ile sırasıyla hizalama, varyant çağırma ve anotasyon işlemleri yapıldı. Okumaların referans genomu (GRCh37/h19) ile karşılaştırılması (hizalama) adımında Burrows-Wheeler Aligner aracı; varyant çağırma adımında FreeBayes aracı, anotasyon adımında Variant Effect Predictor aracı kullanıldı. Haritalanan okumalarda referans dizisinden farklı olarak bulunan varyantlara filtreleme ve önceliklendirme işlemi yapıldı.

Öncelik verilen varyantlar Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.8.6 (Robinson ve ark., 2011) programı ile görsel olarak değerlendirildi. Hedeflenen genomik bölgenin % 80'inden fazlasının minimum 20 kez okunup okunmadığı kontrol edildi. 20X okuma derinliğinde allel fraksiyonu %35-65 arası olan varyantlar germline heterozigot, >%65 olan varyantlar germline homozigot olarak kabul edildi. Tespit edilen varyantlar, İnsan Genom Varyasyon Topluluğu (HGVS) Dizi Varyantı Adlandırma Kuralları'na (den Dunnen ve ark., 2016) uygun olarak isimlendirildi.

3.9.6 Varyantların Sınıflandırılması

Tespit edilen varyantların Clinvar, Franklin ve Varsome veritabanı girdileri incelendi. Varyantların popülasyon frekansları, gnomAD, ExAC, 1000 Genomes, ESP 6500,

Turkish Variome, GenomeAsia, Iranome, TOPMed Bravo, 4.7KJPN, GME Variome popülasyon veritabanları üzerinden; evrimsel korunma düzeyleri UCSC Genom Tarayıcısı üzerinden; fonksiyonel etkileri UNIPROT ve SIFT, PolyPhen2, PROVEAN, FATHMM, DANN, EIGEN, MUT Assesor, PrimateAI, LIST-S2, DEOGEN2, MetaSVM, BayesDel, Varsity, REVEL, CADD, Mutation Taster, MetaLR, MCAP, MetaRNN, MutPred, SpliceAI, dbSNV bilgisayar tahmin algoritmaları üzerinden de erlendirildi. Ayrıca varyantlara özel literatür taraması yapıldı. Nihai sınıflandırma Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu (ACMG) tarafından belirlenen standartlara (Richards ve ark., 2015) uygun şekilde yapıldı. Ayrıca, varyant sınıflandırmada kullanılan kanıt kodları ve kanıtların dayandığı veriler tablolar halinde tanımlanmıştır.

ACMG Kanıt Kodları

	Patojenik lehine	Benign lehine
Çok güçlü	PVS1	BA1
Güçlü	PS1-PS4	<i>BS1-BS4</i>
Orta	PM1-PM6	
Destekleyici	PP1-PP5	<i>BP1-BP7</i>

Varyant sıklığı ve popülasyon verileri

- PS4: Kontrollere kıyasla etkilenmiş kişilerde sıklığı anlamlı derecede daha yüksek olan varyantları ifade eder.
- PM2: Kontrollerde görülmeyen (veya resesif olgularda popülasyonda çok nadir görülen) ancak hastalıktan etkilenen iliştir bireylerde görülen varyantları ifade eder.
- BA1: Allel frekansı %5'in üzerinde olan varyantları ifade eder.
- BS1: Allel sıklığı hastalık için beklenenden yüksek olan varyantları ifade eder.
- BS2: Erken yaşta ortaya çıkması beklenen bir hastalıkla ilgili olmasına rağmen sağlıklı bireylerde gözlenen varyantları ifade eder.

Protein üzerine olan etki

- PVS1: LoF mekanizması ile hastalığa neden olan gende, fonksiyon kaybına yol açan varyantı ifade eder. Nonsense, başlangıç kodon kaybı, çerçeve kayması, kanonik kesim bölgesi varyantları gibi.

- PS1: Patojenik oldu u bilinen missense bir varyantla aynı noktada aynı amino asit de i imine yol açan varyantı ifade eder.
- PM4: Okuma çerçevesi içinde tekrar olmayan bir bölgedeki insesiyon – delesyon tipi varyantları veya durdurma kodonu kaybına neden olarak protein uzunlu unda de i im yapan varyantları ifade eder.
- PM5: Patojenik oldu u bilinen bir missense varyant ile aynı pozisyondaki amino asiti etkileyen bir ba ka missense varyantı ifade eder.
- BP3: Bilinen bir fonksiyonu olmayan tekrar bölgelerindeki in-frame insersiyon – delesyon tipi varyantları ifade eder.

Bilgisayar tahmin algoritmaları

- PP3: Bilgisayar tahmin algoritmalarında zararlı olarak de erlendirilen varyantları ifade eder.
- BP4: Bilgisayar tahmin algoritmalarının ço unda etkisiz olarak de erlendirilen varyantları ifade eder.
- BP7: ‘Splice tahmin algoritmaları’ ile zararsız oldu u gösterilen ve yüksek derecede korunmu bölgelerde bulunmayan sinonim varyantları ifade eder.

Fonksiyonel veriler

- BS3: Fonksiyonel çalı malar ile zararlı etkisi olmadı ı gösterilmi varyantlardır.
- PS3: Fonksiyonel çalı malar ile zararlı etkisi gösterilmi varyantları ifade eder.
- PM1: Fonksiyonel bir protein domaininde veya mutasyon için sıcak bir bölgede bulunan varyantları ifade eder. Varyantın bulundu u domainde tanımlanan tüm varyantlar patojenik ise PM1 kanıt kodu kullanılır.

Güvenilir kaynaklar

- PP5: ClinVar, HGMD gibi güvenilir kaynaklarda patojenik olarak de erlendirilen varyantları ifade eder.
- BP6: ClinVar, HGMD gibi güvenilir kaynaklarda varyantın benign olarak de erlendirilmesini ifade eder.

De-novo varyantlar

- PS2: Hastanın biyolojik ebeveynlerinde olmadı ı gösterilen varyantları ifade eder.

PM6: Hastanın biyolojik ebeveynlerinde olmadığı düşünülen ancak bu durumun testlerle doğrulanmadığı varyantları ifade eder.

Allelik (Cis/Trans) veri

PM3: Resesif hastalıklarda patojenik bir ba ka varyant ile trans pozisyonda tanımlanan varyantı ifade eder.

BP2: Tam penetran dominant bir gen için patojenik bir varyantla trans pozisyonda belirlenen veya herhangi bir kalıtım modelinde patojenik bir varyantla cis olarak gözlenen varyantları ifade eder.

Segregasyon analizi

PP1: Hastalıktan etkilenmiş aile bireylerinde ilgili gende aynı varyantın tespit edilmesini ifade eder.

BS4: Hastalıktan etkilenmiş aile bireylerinde varyantın segregasyonunun olmadığını ifade eder.

Varyant spektrumu

BP1: Sadece budama (truncating) tipi varyantların hastalığa sebep olduğu bilinen bir gende tespit edilen yeni missense varyantları ifade eder.

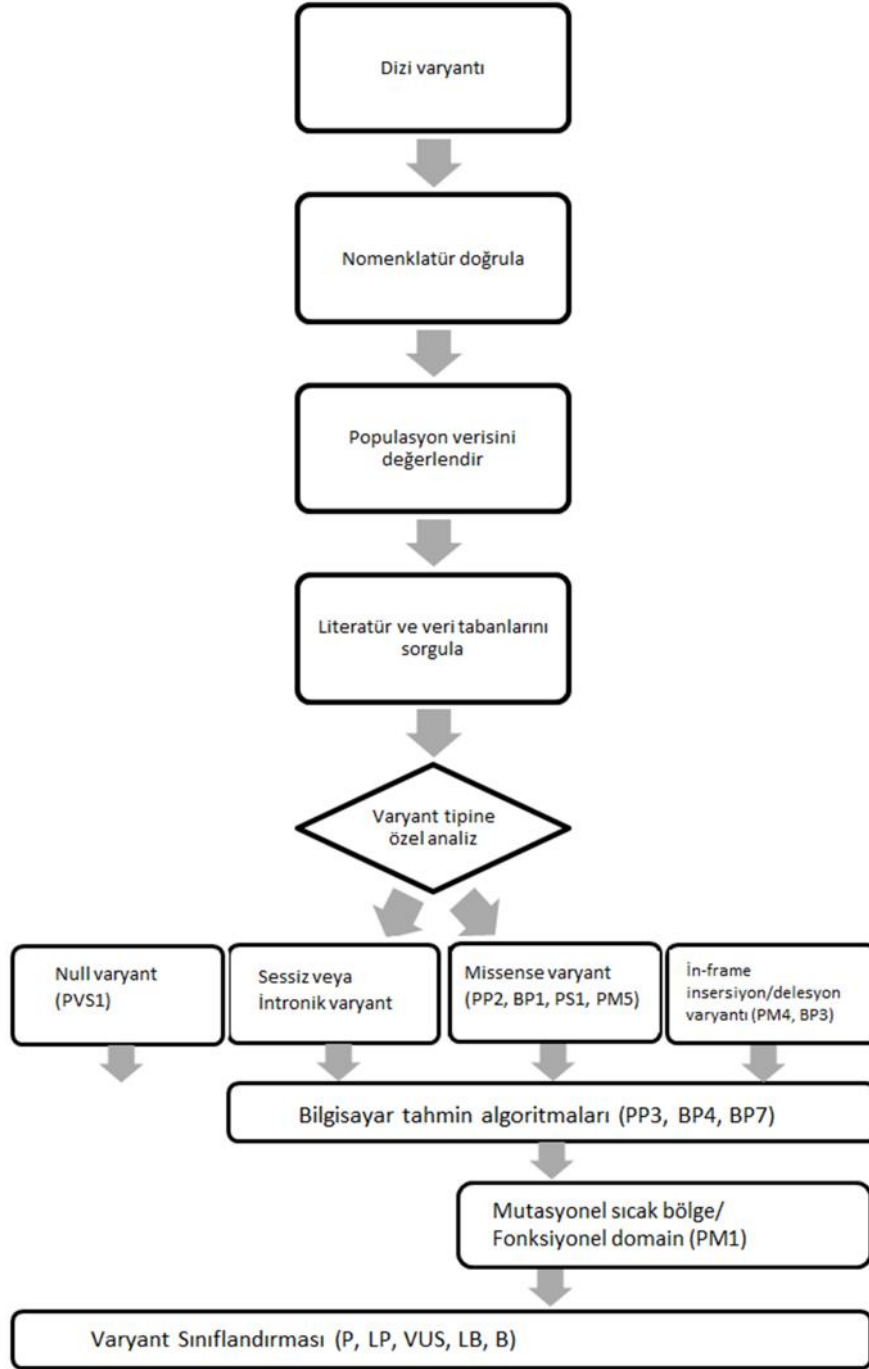
PP2: Benign varyasyonların az olduğu ve missense varyantların yaygın hastalık sebebi olduğu bir gende tespit edilen yeni varyantları ifade eder.

Fenotip verisi

PP4: Hastalığın etiyolojisinde tek bir gen bulunuyorsa ve fenotip ilgili hastalık için çok tipikse varyant bu kanıt kodu ile değerlendirilebilir.

Alternatif lokus gözlemleri

BP5: Moleküler temelli net bilinen hastalıklarda ba ka genlerde bulunan varyantları ifade eder.



ekil 3-9: Varyant Analizi Akı ıeması

3.9.7 Segregasyon Analizi ve Varyant Doğrulama: Sanger Dizileme

İlgilenilen Genomik Bölgenin Amplifikasyonu:

1 μ L DNA, 1 μ L primer (F ve R), 6 μ L Taq polimeraz (AmpliTaq Gold 360 master mix), 1 μ L 360 GC enhancer (Applied Biosystems™) ve 1 μ L distile su birleştirildi, termal döngü cihazında aşağıdaki protokol uygulandı.

Sıcaklık & Süre	Döngü
95 , 10 dk	x1
95 , 40 sn	
60 , 1 dk	x 35
72 50 sn	
72 , 7 dakika	x 1
4 ,	

PZR Ürünü Safla tırma:

Amplifikasyonu takiben reaksiyona katılmayan tek zincirli primerlerin ve nükleotitlerin uzakla tırılması için 2 µL ExoSAP-IT Express PCR Clean Up kit (Applied Biosystems™) ile muamele edildi. PZR Plakası yapı kan sızdırmazlık bandı ile kapatıldı. Üretici firmanın protokolüne göre termal döngü cihazında 30 dakika 37°C ve 15 dakika 80°C’de inkübasyon gerçekleştirildi. Eksonükleaz I ve Shrimp Alkali Fosfataz (SAP) içeren reaktif kullanılarak enzimatik pürifikasyon yapıldı.

Dizileme:

BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix ve 5x dizileme tamponu kullanılarak iki adet tek yönlü primer için iki ayrı reaksiyon hazırlandı. PZR Plakası yapı kan sızdırmazlık bandı ile kapatıldı. Termal döngü cihazında a a ıdaki protokol uygulandı.

Sıcaklık & Süre	Döngü
96 , 1 dk	
95 , 10 sn	x 25
60 5 sn	
72 , 4 dakika	x 1
4 ,	

Pürifikasyon:

Dizileme reaksiyonu sonrası Zymo Research DNA Sequencing Clean Up kit önerileri do rultusunda kontaminantlar (floresan boya, kalıntı tuz, dNTP, primerler ve enzimler) spin kolon yöntemi ile safla tırıldı.

Kapiller Elektroferez ve Analiz:

Son ürün 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazına yüklendi. Elde edilen dizi verisi Sequencig Analysis Software 6® programı kullanılarak analiz edildi.

3.10 statiksel Analizler

Bütün veriler bilgisayar ortamında Sosyal Bilimler için statistik Paket Programı 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanılarak de erlendirildi. statiksel anlamlılık düzeyi $p = 0.05$ olarak kabul edildi. Nitel veriler için sayı (n) ve yüzde (%); nicel veriler için ortalama ve standart sapma olarak tanımlayıcı istatistik de erleri belirlendi. Verilerinin dağılımına göre uygun olan parametrik ya da nonparametrik istatistiksel testler yapıldı. Kategorik de ikenler hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılırken Pearson ki kare (χ^2) testi ve Fischer'in kesin ki kare (exact) testi'nden uygun olan yöntem kullanıldı. Sürekli de ikenlerin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. statiksel olarak anlamlı bulunan risk faktörlerinin de erlendirilmesinde lojistik regresyon analizi yapıldı, ROC (Receiver Operating Characteristics) grafikleri çizildi.

3.10.1 Verilerin De erlendirmesinde Kullanılan statiksel Yöntemler

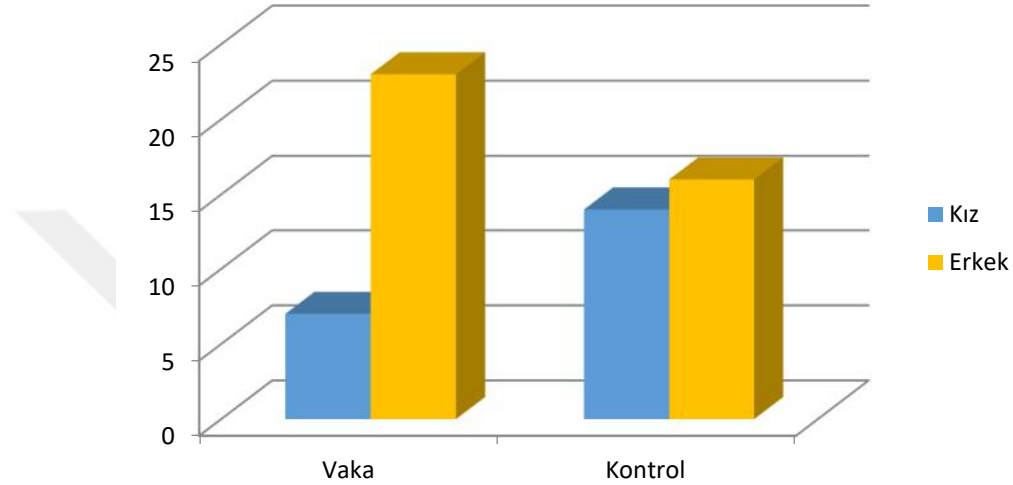
ROC e rileri sürekli bir de iken için olası tüm kesim noktalarını göstermekte olup, her kesim noktasında do ru pozitif, do ru negatif, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların sıklığı hakkında kestirimler yapılmasına imkan sağlamaktadırlar. Bireyleri pozitif/negatif ekinde sınıflayan uygun kesim noktalarının belirlenmesi klinik karar verme sürecine katkı sağlayabilir. Bu nedenle tıbbi çalışmalarda, ROC e rileri, tanısal testlerde pozitif ve negatif test sonuçları arasındaki ayırım için en iyi e iken de erini belirlemede kullanılmaktadır.

Pearson ki kare (χ^2) testi, iki kategorik de iken arasındaki ilişkiyi de erlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Ki kare istatistiği, gözlenen frekanslar ile beklenen frekanslar arasındaki farkı ve bu farkın anlamlılığını de erlendirmek için hesaplanan bir istatistiksel de erdir. Fischer'in kesin ki kare (exact) testi, Pearson ki kare testi ile benzer bir amaca hizmet eder ancak bazı temel farkları vardır; daha küçük örneklem büyüklükleri ve düşük frekanslı veriler için kullanılır ve sadece nominal verilerle çalışır, ordinal verilerde kullanılmaz. Mann-Whitney U testi ise iki bağımsız grup arasındaki merkezi e ilim ölçütlerinin farklarını de erlendirmek için kullanılan non-parametrik istatistiksel araçtır. Örneğin Mann-Whitney U testi sonucunda elde edilen p-de eri, anlamlılık (alfa) düzeyinden daha küçükse iki grup arasında medyanlar açısından anlamlı bir fark olduğunu söylenebilir.

4 BULGULAR

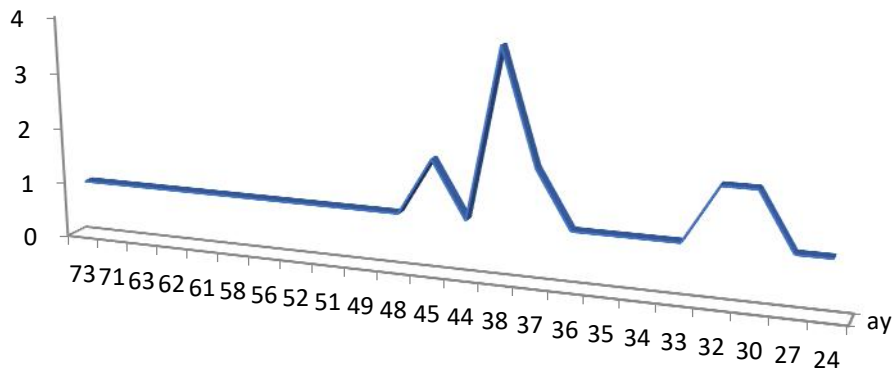
4.1 Sosyodemografik Özelliklerin De erlendirilmesi

Vaka grubu, Geli imsel Dil Bozuklu u nedeniyle tarafımıza yönlendirilen 30 hastadan; kontrol grubu ise nörolojik ve psikiyatrik bir problemi olmayan 30 çocuktan oluştu. Vaka ve kontrol gruplarına dâhil edilen hastaların sosyodemografik özellikleri Tablo 3'te özetlenmiştir.



ekil 4-1: Vaka ve Kontrol Gruplarında Cinsiyet Da ılımı.

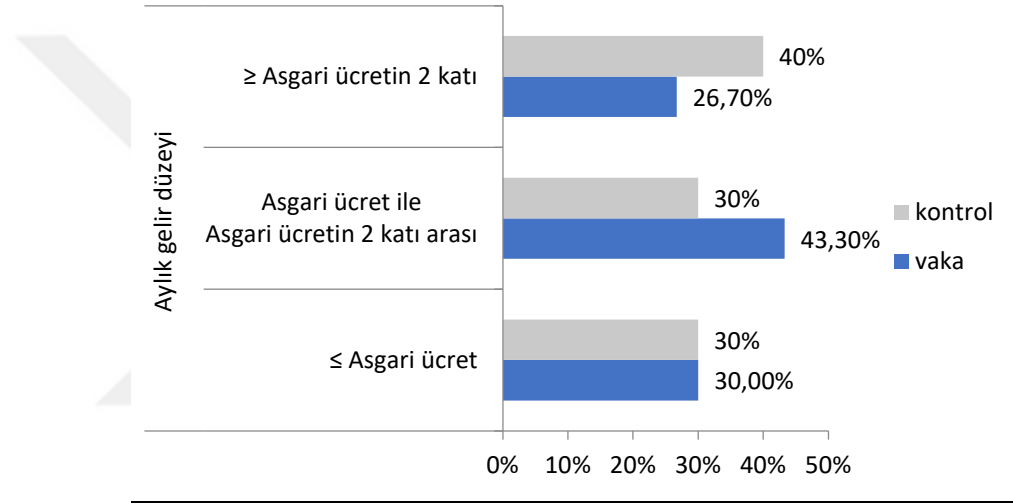
Vaka grubuna 7 (%23,3) kız, 23 (%76,7) erkek ; kontrol grubuna 14 (%46,7) kız, 16 (%53,3) erkek dâhil edildi (ekil 4-1). Erkek/Kız oranı vaka grubunda 3,2 iken, kontrol grubunda 1,1 olarak bulundu.



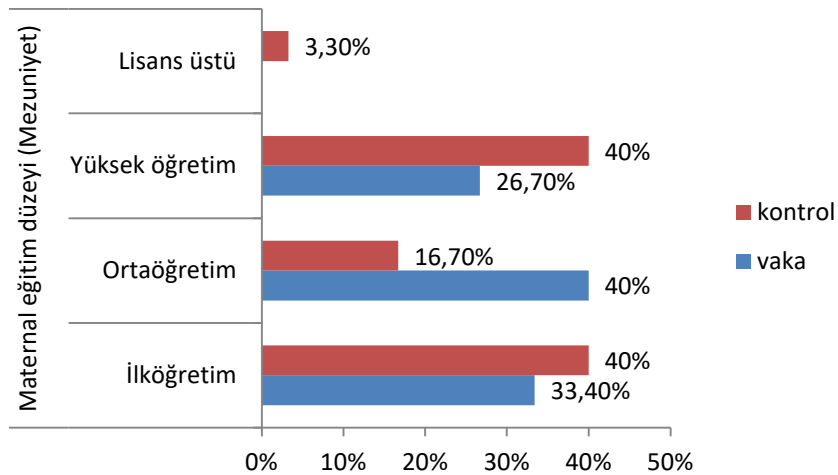
ekil 4-2: Hasta Ya Da ılım Grafi i. X ekseninde hasta yaşlarını, Y ekseninde hasta sayısını göstermektedir. En çok başvurunun 3 yaş 2 aylık iken (38. ay) gerçekleştiği görülmektedir.

Hasta ya ları 2.1 ila 6.4 arasında olup, ortalama ya 3,9 ve standart sapma $\pm 1,1$ olarak hesaplandı. Kontrol grubuna dahil edilen çocukların ya ları 2,3 ila 7 arasında olup, ortalama ya 4,6 ve standart sapma $\pm 1,5$ olarak hesaplandı (ekil 4-2).

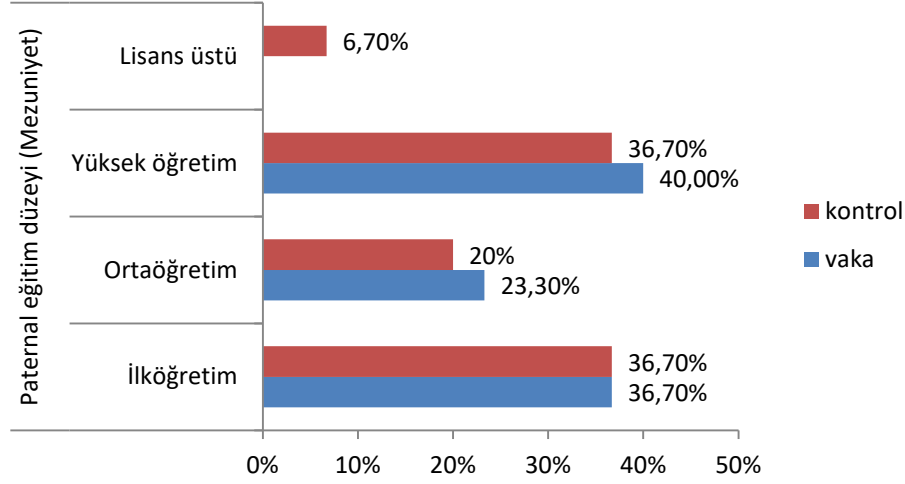
Sosyo-ekonomik durum sorgulamasından elde edilen bulgulara göre; vaka grubundaki ailelerin 9'u (%30) asgari ücret ve altı, 13'ü (%43,3) asgari ücret ile asgari ücretin iki katı arası ve 8'i (%26,7) asgari ücretin iki katından fazla aylık gelire sahipti. Kontrol grubundaki ailelerin ise 9'u (%30) asgari ücret ve altı, 9'u (%30) asgari ücret ile asgari ücretin iki katı arası ve 12'si (%40) asgari ücretin iki katından fazla aylık gelire sahipti (ekil 4-3).



ekil 4-3: Hasta ve Kontrol Gruplarının Aylık Gelir Düzeylerine Göre Da ılımları



ekil 4-4: Hasta ve Kontrol Gruplarının Maternal Eğitim Düzeyine Göre Da ılımları

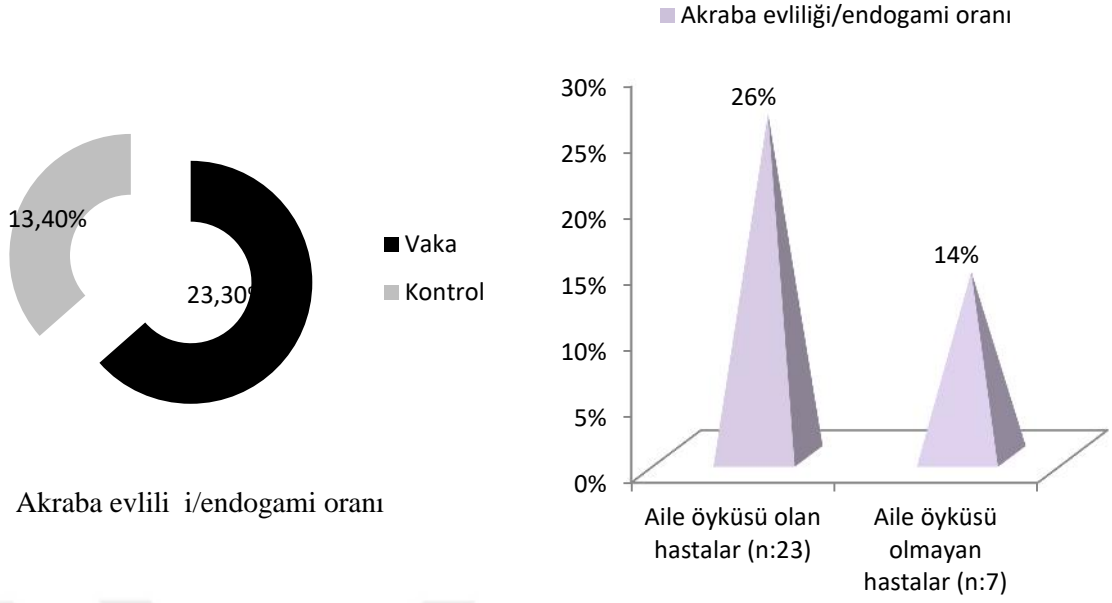


ekil 4-5: Hasta ve Kontrol Gruplarının Paternal Eğitim Düzeyine Göre Dağılımları

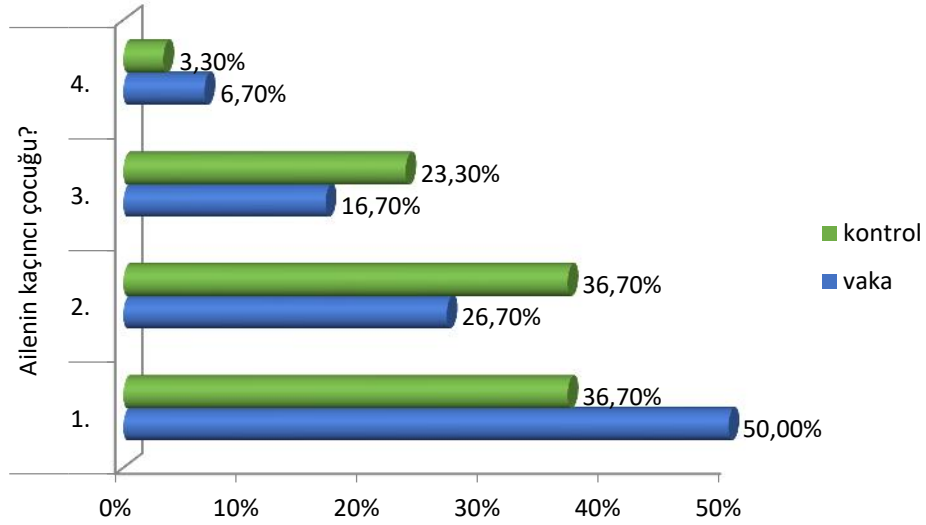
Ba vuru anında vaka grubunda maternal ya ortalaması 28 ± 5 iken kontrol grubunda 29 ± 5 olarak tespit edildi. Bununla birlikte ba vuru anında vaka grubunda ortalama paternal ya 31 ± 5 ve kontrol grubunda 32 ± 5 olarak hesaplandı. Vaka grubunda annelerin 10'u (%33,4) ilköretim, 12'si (%40) ortaöretim ve 8'i (%26,7) yükseköretim mezunuydu (ekil 4-4). Vaka grubunda babaların 11'i (%36,7) ilköretim, 7'si (%23,3) ortaöretim ve 12'si (%40) yükseköretim mezunuydu. Vaka grubunda lisans üstü eğitim bitiren ebeveyn yoktu (ekil 4-5). Kontrol grubunda annelerin 12'si (%40) ilköretim, 5'i (%16,7) ortaöretim, 12'si (%40) yükseköretim mezunuydu ve 1'i lisans üstü eğitime sahipti (ekil 4-4). Kontrol grubunda babaların 11'i (%36,7) ilköretim, 6'sı (%20) ortaöretim, 11'i (%36,7) yükseköretim mezunuydu, 2'si lisans üstü eğitime sahipti (ekil 4-5).

4.2 Gelişimsel Dil Bozukluğu Olası Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dâhil edilen 30 hasta, GDB için predispozan faktörlerin varlığı açısından sorgulandı. Hastaların %76'sının (n:23) ailesinde konuşma gecikmesi, disleksi, okuma-yazmayı öğrenme güçlüğü, sınıf tekrarı, OSB gibi dil ili kili problemleri olan birey(ler) vardı. Ailede dil ili kili problemleri olan 23 hastanın 6'sında (%26) akraba evliliği ve/veya endogami varken, ailede benzer öykü olmayan 7 hastanın 1'inde (%14) akraba evliliği ve/veya endogami vardı. Toplamda vaka grubundaki ailelerin %23,3'ünde (n:7); kontrol grubundaki ailelerin 13,4'ünde (n:4) akraba evliliği ve/veya endogami olduğu gözlemlendi (ekil 4-6).

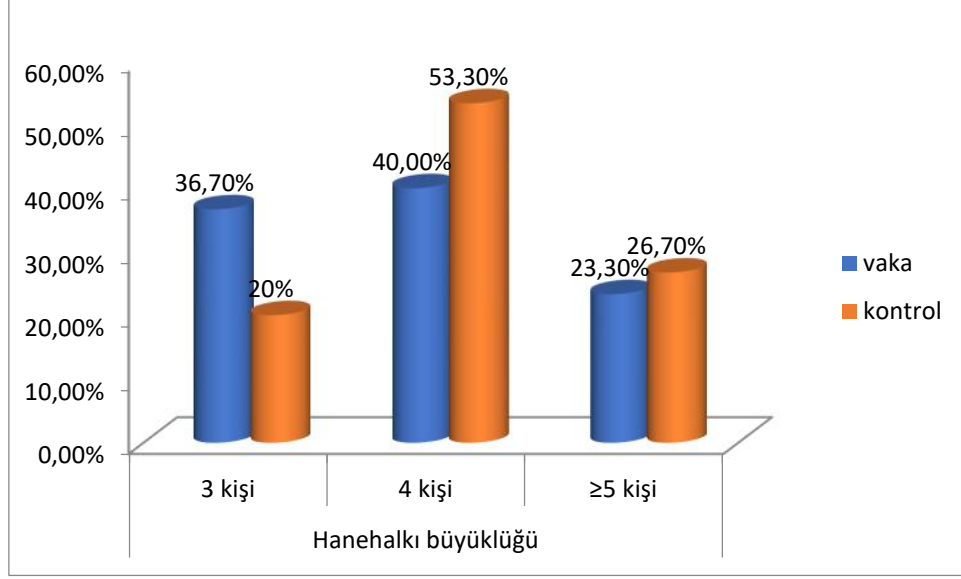


ekil 4-6: Akraba Evliliği ve/veya Endogami Oranları. Vaka grubunda akraba evliliği/ endogami daha yaygın bulundu. Vaka grubu içinde aile öyküsü olanlarda akraba evliliği ve/veya endogami daha sık izlendi.



ekil 4-7: Hastalar ve Kontrol Grubunun, Doğum Sıralarına Göre Karşılaştırılması.

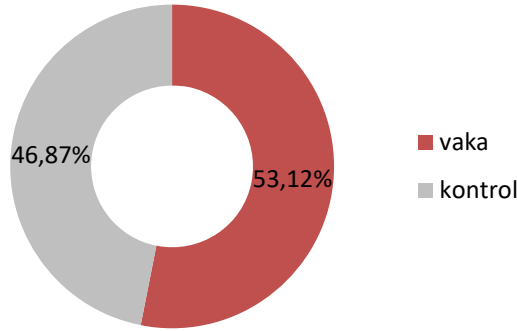
Katılımcıların ailenin kaçınıcı çocuğu oldu u incelendi inde, hastaların 15'inin (%50) birinci çocuk, 8'inin (%26,7) ikinci çocuk, 5'inin (%16,7) üçüncü çocuk, 2'sinin (%6,7) dördüncü çocuk oldu u gözlemlendi. Kontrol grubundaki çocukların 11'i (%36,7) ailenin birinci çocuğu u, 11'i (%36,7) ailenin ikinci çocuğu u, 7'si (%23,3) ailenin üçüncü çocuğu u ve 1'i (%3,3) ailenin dördüncü çocuğu u idi (ekil 4-7).



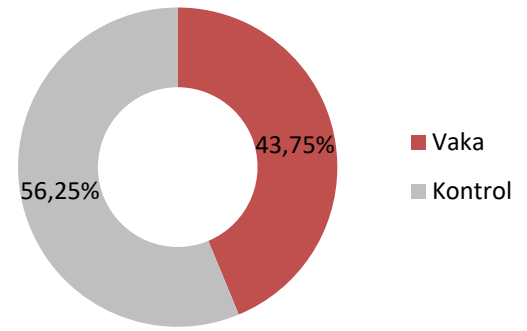
ekil 4-8: Hasta ve Kontrol Gruplarının Hanehalkı Büyüklüğüne Göre Karşılaştırılması

Hanehalkı vaka grubundaki ailelerin 11'inde (%36,7) 3 kişiden, 12'sinde (%40) 4 kişiden, 6'sında (%23,3) 5 ve daha fazla kişiden oluşmaktaydı. Kontrol grubuna ise sırasıyla 3 kişilik 6 aile (%20), 4 kişilik 16 aile (%53,3) ve 5 kişilik 8 aile (%26,7) dahil edilmiştir (ekil 4-8).

Prenatal nikotin maruziyeti var



Prenatal maternal hastalık var

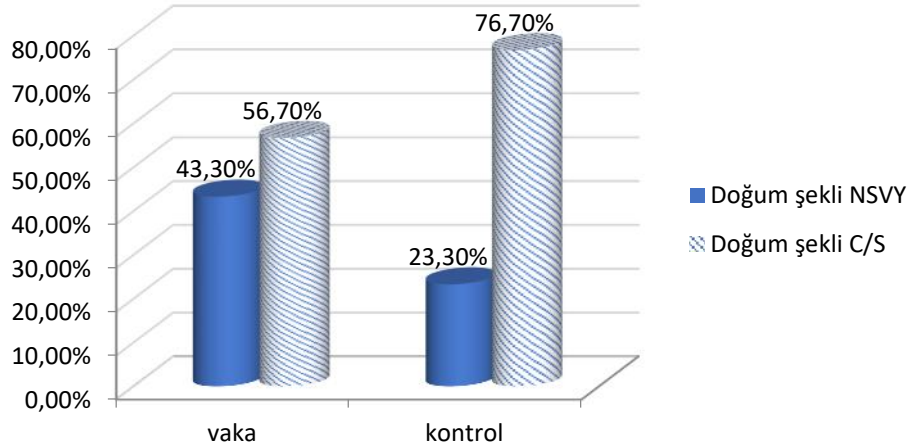


ekil 4-9: Prenatal Dönemde Maternal Nikotin Maruziyeti ve Maternal Kronik Sistemik Hastalık Öyküsü Pozitif Olanların Gruplara Dağılımı

Prenatal dönemde maternal nikotin maruziyeti olanların oranı vaka grubunda %56,7 (n:17), kontrol grubunda %50 (n:15) olarak belirlendi (ekil 4-9). Prenatal nikotin maruziyetinin çoğunlukla pasif maruziyet şeklinde ortaya çıktığı görüldü. Vaka grubunda prenatal nikotin maruziyeti olan 17 kişinin 16'sında (%94,1) aktif sigara içici baba ve/veya diğer hane halkı bireyleri idi.

Kontrol grubunda prenatal nikotin maruziyeti olan 15 kiinin 11'inde (%73,3) aktif sigara içici baba ve/veya di er hane halkı bireyleri idi. Ebeveynlerin (n:32) sigara kullanım miktarı vaka grubunda ortalama $9,3 \pm 7,1$ paket/yıl ve kontrol grubunda $15,6 \pm 11,2$ paket/yıl olup, istatistiksel anlamlı derecede farklı de ildi.

Gebelik esnasında kronik sistemik hastalık öyküsü olan annelerin oranı vaka grubunda %23,3 (n:7); kontrol grubunda %30,0 (n:9) idi (ekil 4-9). Vaka grubundaki maternal kronik hastalıklar gestasyonel diyabetes mellitus (n:2), hipertansiyon (n:1), hipotiroidi (n:3), trombofili (n:1) ; kontrol grubundaki maternal kronik hastalıklar hipotiroidi (n:2), astım (n:1), hipertansiyon (n:2) ve gestasyonel diyabetes mellitus (n:4) olarak belirlendi. Natal öykü alınırken katılımcıların do um haftaları sorgulandı, vaka grubunda minimum 27, maksimum 42 olmak üzere ortalama do um haftası 38 ± 2 iken; kontrol grubunda minimum 24, maksimum 41 olmak üzere ortalama do um haftası 38 ± 3 idi. Prematüre (<36. hafta) do an katılımcı sayısı (n:2) vaka ve kontrol gruplarında farklı de ildi.

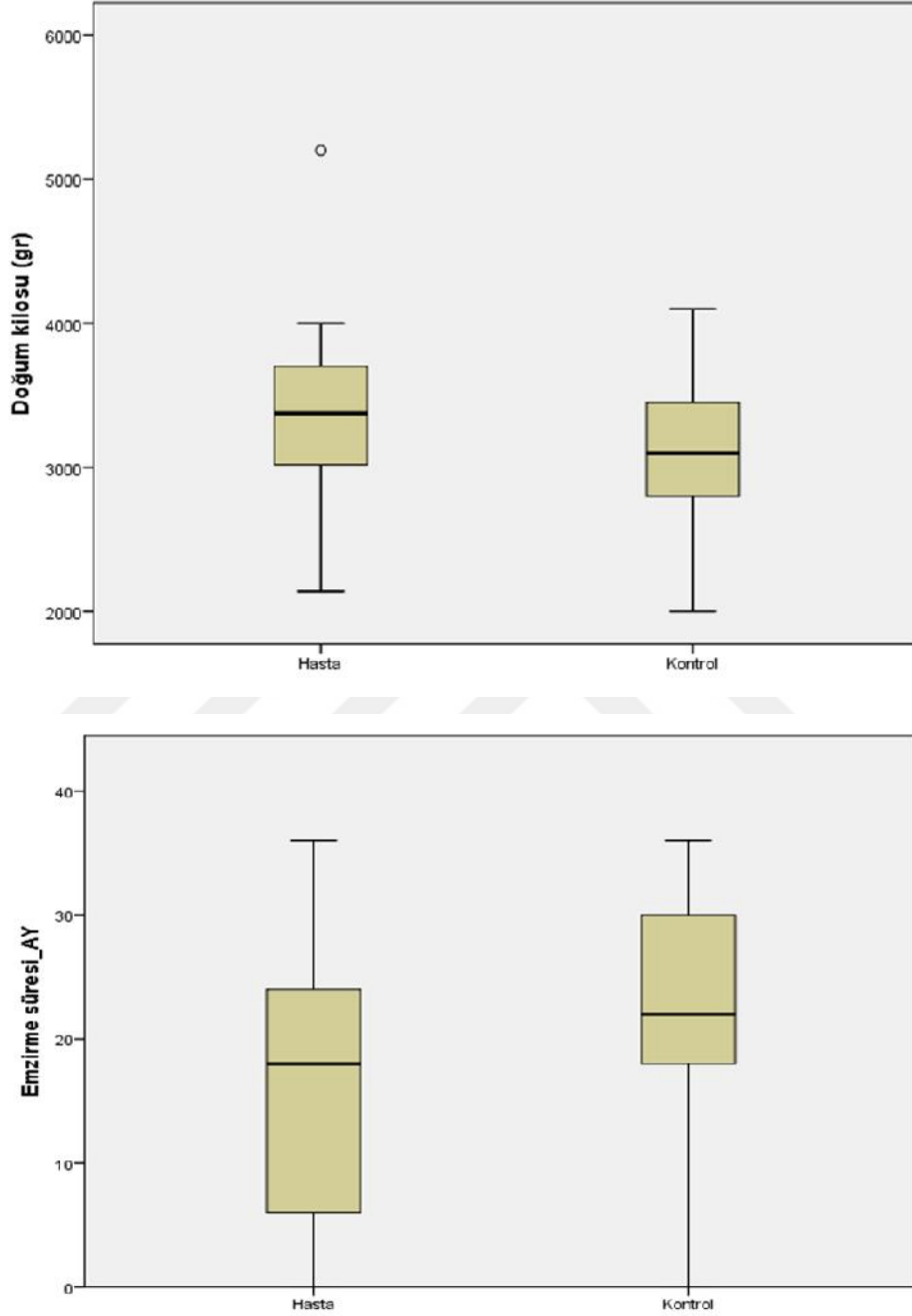


ekil 4-10: Hasta ve Kontrol Gruplarının Do um ekillerine Göre Kar ıla tırılması.

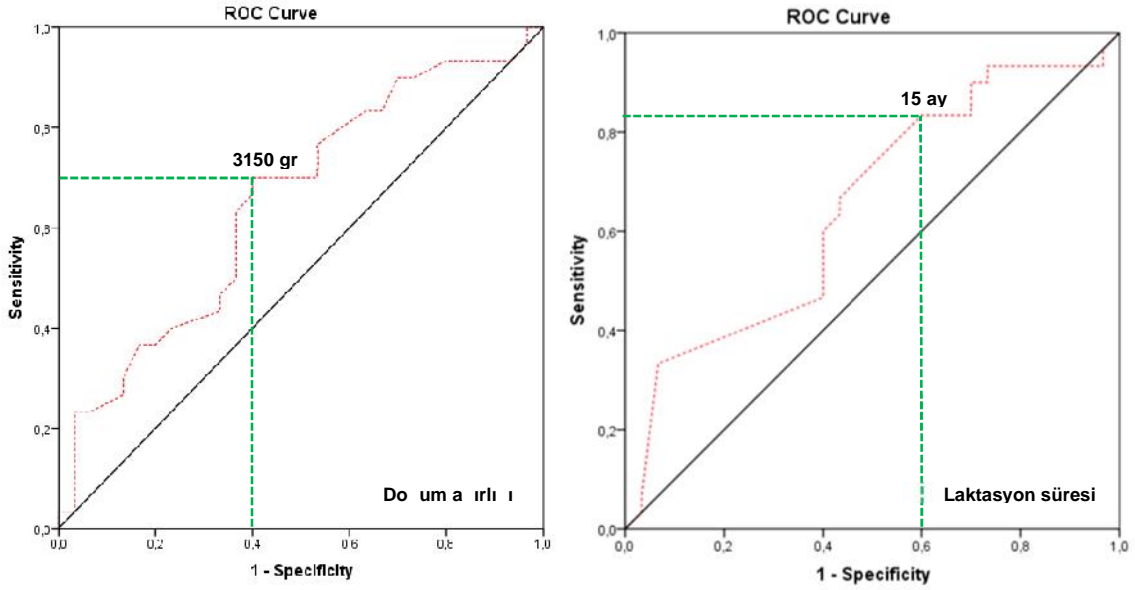
Vaka grubundaki katılımcıların % 56,7'sinde (n:17) do um ekli sezaryen (C/S), %43,4'ünde (n:13) normal spontan vajinal yol (NSVY) idi. Kontrol grubundaki katılımcıların do um ekline bakıldı nda ise NSVY oranı % 23,3 (n:7), C/S oranı %76,7 (n:23) olarak bulundu (ekil 4-10).

Katılımcıların do um kilosunu ortalaması vaka grubunda 3396 ± 585 gram ve kontrol grubunda 3096 ± 493 gram olarak saptanmı olup, kontrol grubunda anlamlı derecede daha dü ük ($p=0,043$) bulundu (ekil 4-11). 2500 gramdan dü ük do um a ırlı ina sahip çocuk sayısı GDB grubunda (n:3) ve kontrol grubunda (n:2) benzer bulundu.

GDB olan çocukların anne sütü alma süresi ortalama 16 ± 9 ay, kontrol grubundaki çocukların anne sütü alma süresi ortalama 22 ± 9 ay olarak saptanm olup vaka grubunda istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha dü k ($p=0,044$) bulundu (ekil 4-11).

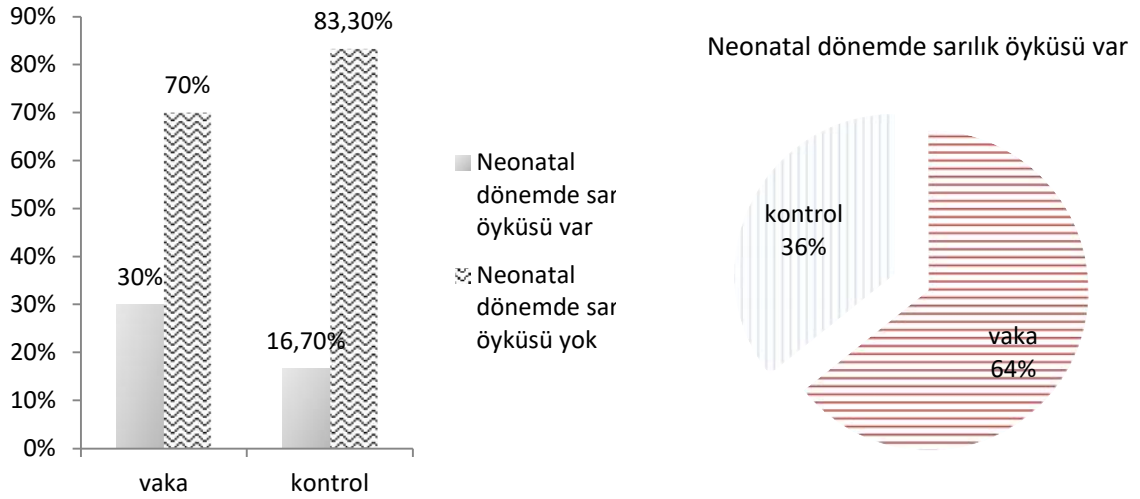


ekil 4-11: Hasta ve Kontrol gruplarında istatistiksel anlamlı farklılık gösteren çevresel de ğişkenler (Emzirme süresi ve Do ğum a ırlılı ğı).



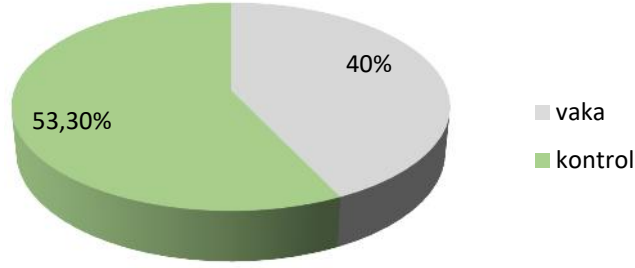
ekil 4-12: ROC e rileri.

ekil 4-12'de do um a ırlı ı ve laktasyon süresinin geli imsel dil bozuklu unu ö ngörme performansı için olu turulan ROC e rileri gösterilmektedir. E rinin, grafi in sol üst kö esine en yakın oldu u nokta kesim noktaları (3150 gram ve 15 ay) olarak belirlenmi tir.

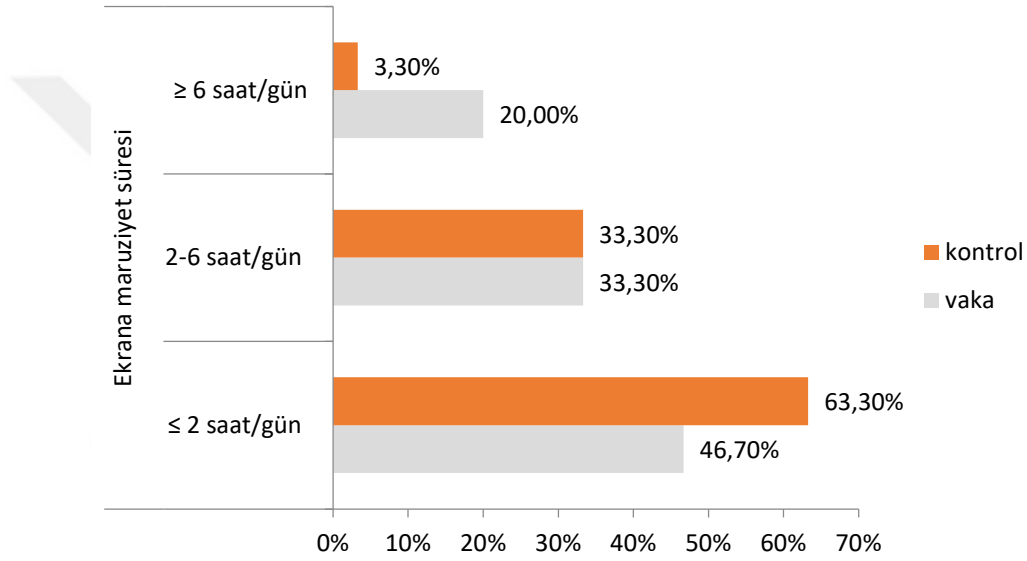


ekil 4-13: Vaka ve Kontrol Gruplarında Neonatal Sarılık Öyküsünün Kıyaslanması

Neonatal dönemde sarılık öyküsü varlı ı vaka grubunda %30 (n:9) oranında iken kontrol grubunda bu oranın %16,7 (n:5) oldu u tespit edildi (ekil 4-13).Vaka grubunda 2 hastada (%6,7), kontrol grubunda ise 1 ki ide (%3,3) febril konvulziyon öyküsü oldu u ö renildi.



ekil 4-14: Vaka ve Kontrol Gruplarında Okul Öncesi Eğitim Katılım Oranları

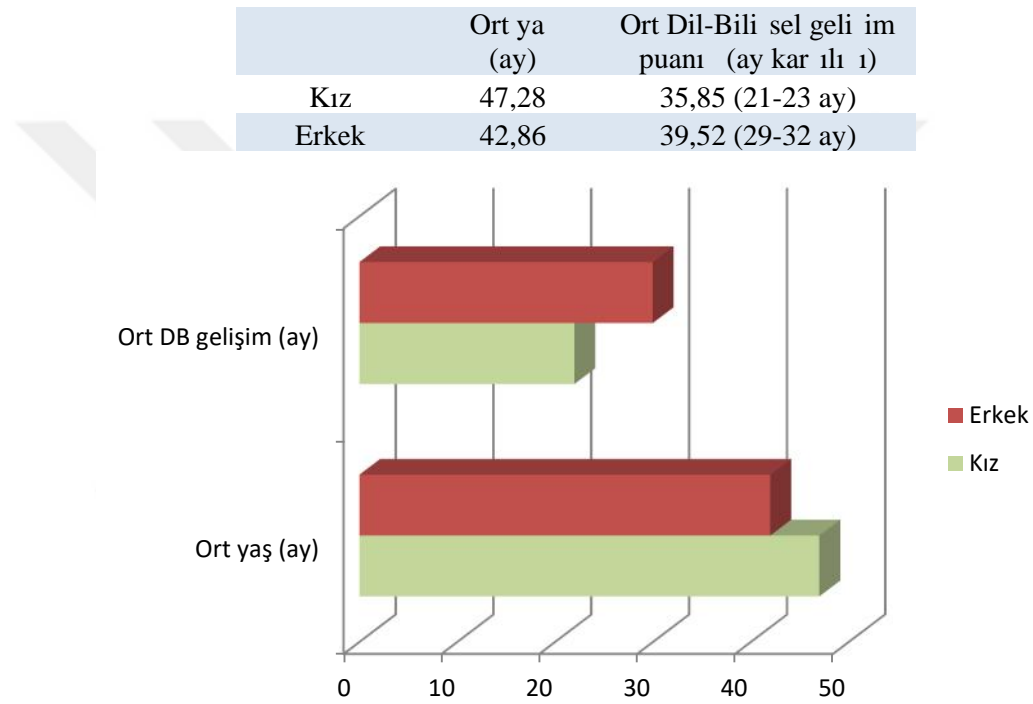


ekil 4-15: Vaka ve Kontrol Gruplarında Ekrana Maruziyet Sürelerinin Kıyaslanması

Okulöncesi eğitim katılımları hasta grubunda 12 (%40), kontrol grubunda 16 (%53,3) idi (ekil 4-14). Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte ekran maruziyet süresi hasta grubunda daha fazla bulundu. Günde 6 saat ve üzeri ekran maruziyeti olan çocuk sayısı hasta grubunda 6 (%20) iken, kontrol grubunda 1 (%3,3) idi. Günde 2 saatten az ekrana maruziyeti olan çocuk sayısı ise hasta grubunda 14 (%46,7), kontrol grubunda 19 (%63,3) idi (ekil 4-15).

Katılımcılarda büyüme geriliği izlenmedi. Kilo, boy ve baş çevresi parametreleri, vaka ve kontrol gruplarında normal dağılım gösteriyordu. Vaka grubunda yer alan bireylerin kilo ortalaması 16 kg, boy ortalaması 103 cm, baş çevresi ortalaması 50,4 olarak ; kontrol grubunda yer alan bireylerin kilo ortalaması 18,5 kg, boy ortalaması 108 cm, baş çevresi ortalaması 50,8 olarak hesaplandı.

GDB hastalarında AGTE genel gelişim ortalama puanı 116 (minimum 93, maksimum 137, standart sapma 13), dil - bilişsel gelişim ortalama puanı 40 (minimum 29, maksimum 52, standart sapma 7), ince motor gelişim ortalama puanı 20 (minimum 16, maksimum 24, standart sapma 2), kaba motor gelişim ortalama puanı 23 (minimum 21, maksimum 24, standart sapma 1), sosyal beceri - öz bakım ortalama puanı 34 (minimum 26, maksimum 39, standart sapma 4) olarak tespit edildi (ekil 4-16). Psikiyatrik ve nörolojik tıbbi geçmişi olmayıp kontrol grubuna alınması uygun bulunan asemptomatik çocuklara AGTE uygulanmadı.



ekil 4-16: Vaka Grubu içindeki Kız ve Erkeklerin Ortalama Ya ve Ortalama Dil Gelişim Ya ları Açısından Kıyaslanması. Kızların ortalama b a vuru ya ının erkeklerden daha ileri olmasına ra men dil gelişimlerinin daha geride oldu u görülmektedir.

Tablo 3. Vaka-Kontrol Gruplarında Sosyodemografik Özellikler-Çevresel Faktörlerin Karşılaştırılması

Parametreler		Vaka (n=30)	Kontrol (n=30)	p-değeri
Yaş (yıl); ortalama ± SD		3,9 ± 1,1	4,6 ± 1,5	0,074
Cinsiyet; n (%)	Erkek	23 (%76,7)	16 (%53,3)	0,056
	Kadın	7 (%23,3)	14 (%46,7)	
Gelir seviyesi (Asgari ücret (x) katları); n (%)	≤ x	9 (%30,0)	9 (%30)	0,510
	x – 2x arası	13 (%43,3)	9 (%30)	
	≥ 2x	8 (%26,7)	12 (%40)	
Kaçınıcı çocuk; n (%)	1	15 (%50,0)	11 (%36,7)	0,440
	2	8 (%26,7)	11 (%36,7)	
	3	5 (%16,7)	7 (%23,3)	
	4	2 (%6,7)	1 (%3,3)	
Doğum haftası		38 ± 2	38 ± 3	0,653
Doğum kilosu (gram); ortalama ± SD		3396 ± 585	3096 ± 493	0,043
Laktasyon süresi (ay); n (%)		16 ± 9	22 ± 9	0,044
Maternal eğitim düzeyi (Mezuniyet); n (%)	İlköğretim	10 (%33,4)	12 (%40,0)	0,616
	Ortaöğretim	12 (%40)	5 (%16,7)	
	Yüksek öğretim	8 (%26,7)	12 (%40)	
	Lisans üstü	0 (%0,0)	1 (%3,3)	
Paternal eğitim düzeyi (Mezuniyet); n (%)	İlköğretim	11 (%36,7)	11 (%36,7)	0,735
	Ortaöğretim	7 (%23,3)	6 (%20)	
	Yüksek öğretim	12 (%40,0)	11 (%36,7)	
	Lisans üstü	0 (%0,0)	2 (%6,7)	
Evde yaşayan birey sayısı (Hanehalkı büyüklüğü); n (%)	3 kişi	11 (%36,7)	6 (%20)	0,318
	4 kişi	12 (%40,0)	16 (%53,3)	
	≥5 kişi	6 (%23,3)	8 (%26,7)	
Okulöncesi eğitime katılan sayısı; n (%)		12 (%40)	16 (%53,3)	0,301*
Ekran maruziyet süresi (saat/gün); n (%)	≤ 2 saat	14 (%46,7)	19 (%63,3)	0,097
	2-6 saat arası	10 (%33,3)	10 (%33,3)	
	≥ 6 saat	6 (%20,0)	1 (%3,3)	
Anne yaş (yıl); n (%)		28 ± 5	29 ± 5	0,517
Baba yaş (yıl); n (%)		31 ± 5	32 ± 5	0,296
Maternal sigara kullanımı; n (%)	var	17 (%56,7)	15 (%50)	0,510
	yok	13 (%43,3)	15 (%50)	
Prenatal sigara maruziyeti (annenin pasif veya aktif maruziyeti)	Evet	17 (%56,7)	15 (%50,0)	0,605*
	Hayır	13 (%43,3)	15 (%50,0)	
Aktif içici: Anne ve/veya anne+baba		1 (%5,9)	4 (%26,7)	0,161**
Aktif içici: Baba ve/veya diğer hane halkı		16 (%94,1)	11 (%73,3)	
Sigara kullananlarda miktarı (paket/yıl) (n=32); ortalama ± SD		9,3 ± 7,1	15,6 ± 11,2	0,188
Akraba evliliği ve/veya endogami; n (%)	var	7 (%23,3)	4 (13,4)	0,591
	yok	23 (76,7)	26 (86,6)	
Doğum şekli; n (%)	NSVY	13 (%43,3)	7 (%23,3)	0,100
	C/S	17 (%56,7)	23 (%76,7)	
Prenatal dönemde maternal kronik hastalık; n (%)	var	7 (%23,3)	9 (%30,0)	0,196
	Gestasyonel DM	2 (%6,7)	4 (%13,3)	
	Gestasyonel HT	1 (%3,3)	1 (%3,3)	
	Hipotiroidi	3 (%10,0)	3 (%10,0)	
	Astım	0 (%0,0)	1 (%3,3)	
	Trombofili	1 (%3,3)	0 (%0,0)	
	yok	23 (%76,7)	21 (%70,0)	
Neonatal dönemde sarılık öyküsü ; n (%)	var	9 (%30)	5 (%16,7)	0,222
	yok	21 (%70)	25 (%83,3)	
Febril konvulziyon öyküsü ; n (%)	var	2 (%6,7)	1 (%3,3)	0,554
	yok	28 (%93,3)	29 (%96,7)	

* Pearson ki-kare testi ve **Fisher'in kesin testi kullanıldı. Diğerlerinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlı p değerleri vurgulu gösterilmiştir. x: Asgari ücret ve altı; SD: standart sapma, n:sayı.

4.3 Genetik Bulgular

CNTNAP2 ve *SETBP1* geninde saptanan nonsinonim dizi varyantları vaka ve kontrol gruplarında karşılaştırılmıştır. Seçilen genler otozomal kromozomlar üzerinde bulunduğu için genetik verilerin analizleri otozomal dominant (OD) ve otozomal resesif (OR) kalıtım modelleri için ayrı ayrı yapılmıştır. OD kalıtım modeline göre; vaka ve kontrol gruplarında en az bir alternatif (minör) allel taşıma durumları karşılaştırılmıştır. OR kalıtım modeline göre ise vaka ve kontrol gruplarında homozigot varyant taşıma durumları karşılaştırılmıştır. *CNTNAP2* geninde tespit edilen nonsinonim yaygın varyantlar ve allel frekansları Tablo 4'te, nadir varyantlar ve allel frekansları Tablo 5'de, *SETBP1* geninde tespit edilen yaygın nonsinonim varyantlar ve allel frekansları Tablo 7'de verilmiştir. *CNTNAP2* allellerinin vaka ve kontrol gruplarında karşılaştırılması sonucunda elde edilen veriler Tablo 6'da, *SETBP1* allellerinin vaka ve kontrol gruplarında karşılaştırılması sonucunda elde edilen veriler Tablo 8'de, *CNTNAP2* ve *SETBP1*'de varyant/ homozigot varyant bulundurma oranlarını karşılaştırması Tablo 9'da gösterilmektedir.

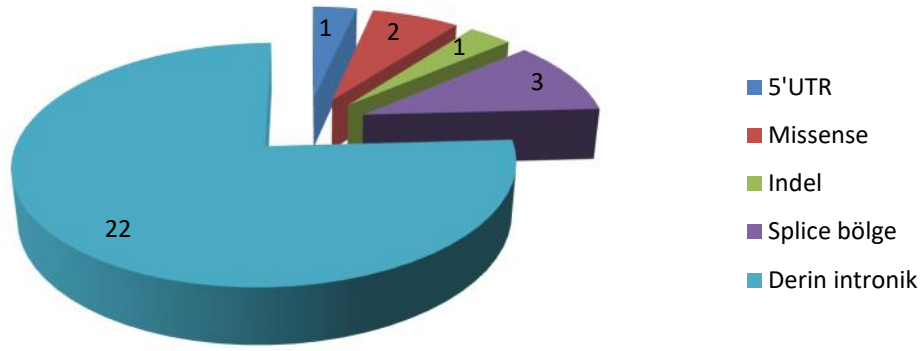
Katılımcılarda; *CNTNAP2* geninde 29, *SETBP1* geninde 5 farklı varyant bulunmuştur (ekil 4-19; ekil 4-21). *CNTNAP2* geninde tespit edilen varyantların 24'ü, *SETBP1* geninde tespit edilen varyantların tümü hem vaka hem kontrol gruplarındaki bireylerde ortak olarak izlenmiştir.

4.3.1 *CNTNAP2* ve *SETBP1* genlerinde tespit edilen varyant türleri

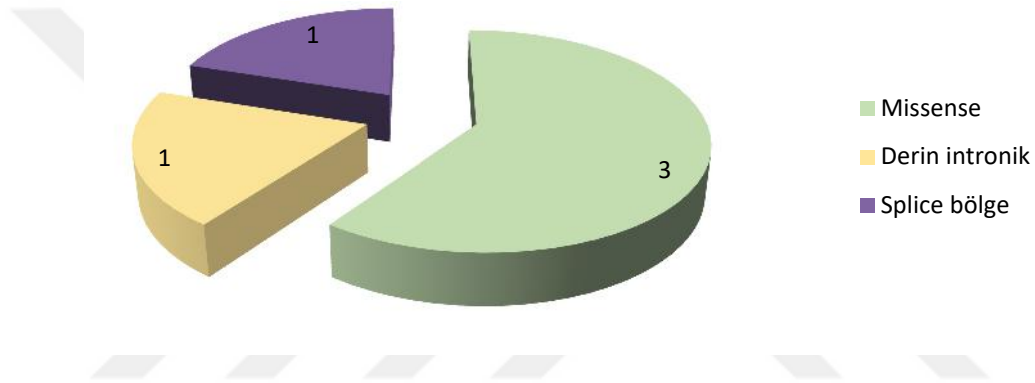
Araştırmamızda nonsinonim varyantlar değerlendirilmeye alındı. Tespit edilen kodlamayan dizi varyantlarından ekzonlara yakın, nispeten korunmuş bölgelerde yerleşimleri tanımlamak için 'splice bölge' varyantı terimi kullanıldı. En yakın kodlayan bölgeden 20 nükleotidten uzakta bulunan varyantlar 'derin intronik' varyant olarak adlandırıldı. *CNTNAP2* geninde varyant türü anlamında en sık derin intronik varyantlar (ekil 4-17), *SETBP1* geninde en sık missense varyantlar tespit edildi (ekil 4-18).

4.3.2 *CNTNAP2* ve *SETBP1* varyantlarının sınıflandırılması

CNTNAP2 (n:27) ve *SETBP1* (n:5) genlerinde bulunan toplamda 32 yaygın nonsinonim varyant; ACMG kriterlerine göre benign lehine güçlü kanıt olan BA1, BS1, BS2 kanıt kodları ve benign lehine destekleyici kanıt olan BP1, BP4, BP6, BP7 kanıt kodlarından en az birini alarak 'benign' olarak sınıflandırılmıştır.

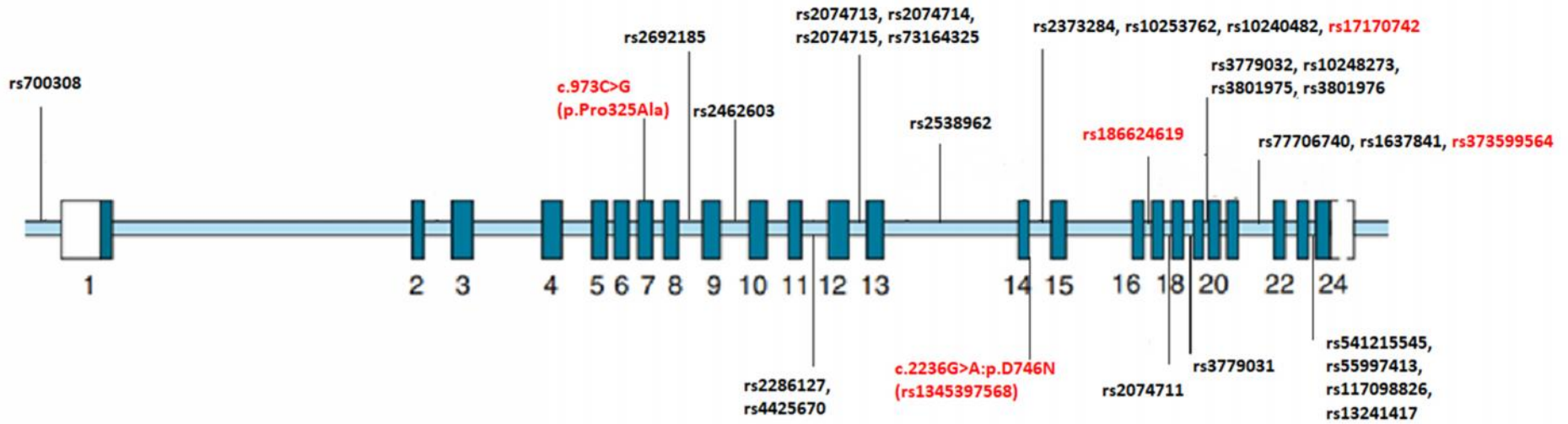


ekil 4-17: *CNTNAP2* Geninde Tespit Edilen Nonsinonim Varyant Türleri



ekil 4-18: *SETBP1* Geninde Tespit Edilen Nonsinonim Varyant Türleri

Franklin veritabanında *CNTNAP2* ve *SETBP1* genleri için PM2 frekans e ik de eri %0.05 olarak önerilmektedir. Bu nedenle çalı mamızda sadece olgu veya sadece kontrol gruplarında özel olarak görülen ve Turkish Variome ve Genome Aggregation Database (gnomAD)'daki tüm populasyonlarda minör allel frekansı (MAF- minör allele frequency) %0.05'ten daha dü ük olan; anlamı bozan (nonsense), yanlış anlamlı (missense), ekzon-intron kesim bölgesi (splice) veya ba langıç/durdurma kodonlarını bozan varyantlar, "nadir varyantlar" olarak tanımlanmıştır. Nadir varyantlardan bu veride özel olarak vaka grubu içinde (bir veya iki kez) görülenler "tek (singleton) varyantlar" olarak kategorize edilmiştir. Her iki gende en sık benign varyantlar tespit edilmiştir. *CNTNAP2* geninde bulunan iki nadir missense varyant; allel frekansı, varyant spektrumu ve in siliko tahmin verileri göz önünde bulundurularak 'Önemi Bilinmeyen Varyant' olarak sınıflandırılmıştır (ekil 4-20). *CNTNAP2*:c.973C>G (p.Pro325Ala) varyantı için PM2, BP1, BP4 kanıt kodları, *CNTNAP2*:c.2236G>A (p.Asp746Asn) varyantı için PM2, BP1, PP3 kanıt kodları kullanılmıştır.



ekil 4-19: Çalı mamızda Tespit Edilen *CNTNAP2* Nonsinonim Kodlayan ve ntronik Bölge Varyantlarının Gen Üzerindeki tematik Gösterimi.

Kırmızı ile i aretli varyantlar yalnızca vaka grubunda izlenmiştir.

Tablo 4. *CNTNAP2* Geninde Tespit Edilen Nonsinonim Yaygın Varyantlar ve Allel Frekansları

Marker ID (dbSNP)	Lokasyon	Ref	Alt	De i im (NM_014141.6)	Turkish Variome	gnomAD	Gruplar	
							Hasta	Kontrol
rs2462603	chr7:145813854	G	A	5'UTR:c.-115G>A	%51,00	%50,98	%50,00	%56,66
rs2692185	chr7:146997203	T	A	Intron 8:c.1349-30T>A	%69,43	%73,58	%58,33	%73,33
rs700308	chr7:147092615	C	T	Intron 9:c.1499-86C>T	%19,60	%12,89	%20,00	%20,00
rs2286127	chr7:147183143	A	G	Intron 11:c.1777+10A>G	%17,60	%22,69	%18,33	%13,33
rs4425670	chr7:147259105	G	A	Intron 11:c.1778-125G>A	%26,00	%23,00	%21,66	%15,00
rs2074713	chr7:147259551	C	T	Intron 12:c.1897+202C>T	%64,42	%69,17	%58,33	%58,33
rs2074714	chr7:147259438	A	G	Intron 12:c.1897+89A>G	%62,74	%66,20	%61,66	%45,00
rs2074715	chr7:147259374	A	G	Intron 12:c.1897+25A>G	%41,67	%46,59	%35,00	%20,00
rs73164325	chr7:147259608	A	T	Intron 12:c.1897+259A>T	%4,40	%3,37	%6,66	%5,00
rs2538962	chr7:147600604	C	A	Intron 13:c.2099-53C>A	NA	%61,59	%61,66	%70,00
rs2373284	chr7:147674912	T	C	Intron 14:c.2256-42T>C	%32,46	%46,20	%20,00	%38,33
rs10240482	chr7:147674948	A	T	Intron 14:c.2256-6A>T	%6,91	%8,08	%5,00	%6,00
rs17170742	chr7:147600913	C	T	Intron 14: c.2255+100C>T	%2,39	%4,21	%1,66	-
rs186624619	chr7:147815485	C	T	Intron 16:c.2554+105C>T	%2,39	%1,01	%3,33	-
rs2074711	chr7:147869670	T	C	Intron 18:c.3010+100T>C	%17,14	%22,24	%18,33	%16,66
rs3779031	chr7:147926734	A	G	Intron 19:c.3248-4A>G	%12,67	%21,52	%21,66	%6,66
rs3779032	chr7:147926888	A	C	Intron 20:c.3381+17A>C	%29,52	%37,17	%33,33	%28,33
rs10248273	chr7:147963983	G	C	Intron 20:c.3382-142G>C	%100	%98,81	%91,66	%96,66
rs3801975	chr7:147964016	A	G	Intron 20:c.3382-109A>G	%83	%76,29	%70,00	%75,00
rs3801976	chr7:147964091	G	A	Intron 20:c.3382-34G>A	%80,91	%77,89	%70,00	%75,00
rs77706740	chr7:148080726	C	A	Intron 21:c.3476-15C>A	%2,56	%2,53	%3,33	%11,66
rs1637841	chr7:148080647	T	G	Intron 21:c.3476-94T>G	%80,98	%71,64	%75,00	%83,33
rs55997413	chr7:148112448	A	T	Intron 23:c.3797-61A>T	%27,36	%28,53	%30,00	%18,33
rs117098826	chr7:148106651	G	A	Intron 23:c.3796+88G>A	%2,78	%5,00	%5,00	%1,66
rs13241417	chr7:148106654	T	C	Intron 23:c.3796+91T>C	%20,44	%30,00	%21,66	%23,33
rs541215545	chr7:148106670	TATTC	T	Intron 23: c.3796+111_3796+114del	%2,00	%0,37	%1,66	%1,66
rs373599564	chr7:147964249	G	A	Intron 21:c.3475+31G>A	%0,07	%0,17	0,016	-

Ref: referans nükleotid, Alt: alternatif nükleotid, gnomAD: Genome Aggregation Database

Tablo 5. *CNTNAP2* Geninde Tespit Edilen Nadir Varyantlar ve Allel Frekansları

Marker ID (dbSNP)	Lokasyon	Ref	Alt	De i im (NM_015559)	Turkish Variome	gnomAD	Gruplar	
							Hasta	Kontrol
-	chr7:146825818	C	G	Ekzon7:c.973C>G;p.P325A	-	-	0,016	-
rs1345397568	chr7:147600794	G	A	Ekzon14:c.2236G>A;p.D746N	-	%000802	0,016	-

Ref: referans nükleotid, Alt: alternatif nükleotid, gnomAD: Genome Aggregation Database

Varyantların vaka ve kontrol gruplarında kar ıla tırılmasında u ekilde bir metod izlendi; örne in rs2462603 G/A varyantı (referans:G, alternatif:A) için muhtemel genotipler GG, GA ve AA olarak belirlendi. rs2462603 GA genotipine sahip bir katılımcıda allel 1 'G'/allel 2 'A' iken; AA genotipine sahip bir katılımcıda her iki allel 'A' ve GG genotipine sahip bir katılımcıda her iki allel 'G' olarak belirlendi. Bu

duruma uygun ekilde olu turulan tabloda katılımcıların olasılıklara da ılımı incelendi. Tablodaki ilk örnek (rs2462603) incelendi inde; genomun bu bölgesinde allel 1'i G tespit edilen katılımcıların %53,8'inin hasta grubunda, %57,1'inin kontrol grubunda bulundu u anla ılmaktadır (p=0,417).

Tablo 6. *CNTNAP2* Allellerinin Vaka ve Kontrol Gruplarında Kar ıla tırılması

Marker ID (dbSNP)	Allel		Hastalar n (%)	Kontroller n (%)	p-de eri
rs2462603	Allel 1	G	21 (%53,8)	18 (%57,1)	0,417
		A	9 (%42,9)	12 (%46,2)	
	Allel 2	G	9 (%52,9)	8 (%47,1)	0,774
		A	21 (%48,8)	22 (%51,2)	
rs2692185	Allel 1	T	15 (%55,6)	12 (%44,4)	0,436
		A	15 (%45,5)	18 (%54,5)	
	Allel 2	T	10 (%71,4)	4 (%28,6)	0,067
		A	20 (%43,5)	26 (%56,5)	
rs700308	Allel 1	C	30 (%51,7)	28 (%48,3)	0,492*
		T	0 (%0,0)	2 (%100)	
	Allel 2	C	18 (%47,4)	20 (%52,6)	0,592
		T	12 (%54,5)	10 (%45,5)	
rs2286127	Allel 1	A	29 (%49,2)	30 (%50,8)	1,000*
		G	1 (%100)	0 (%0,0)	
	Allel 2	A	20 (%47,6)	22 (%52,4)	0,573
		G	10 (%55,6)	8 (%44,4)	
rs4425670	Allel 1	G	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
		A	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
	Allel 2	G	17 (%44,7)	21 (%55,3)	0,284
		A	13 (%59,1)	9 (%40,9)	
rs2074714	Allel 1	A	19 (%47,5)	21 (%52,5)	0,584
		G	11 (%55,0)	9 (%45,0)	
	Allel 2	A	4 (%25,0)	12 (%75,0)	0,020
		G	26 (%59,1)	18 (%40,9)	
rs2074715	Allel 1	A	24 (%47,1)	27 (%52,9)	0,472*
		G	6 (%66,7)	3 (%33,3)	
	Allel 2	A	15 (%41,7)	21 (%58,3)	0,114
		G	15 (%62,5)	9 (%37,5)	
rs3779031	Allel 1	A	28 (%48,3)	30 (%51,7)	0,492*
		G	2 (%100)	0 (%0,0)	
	Allel 2	A	19 (%42,2)	26 (%57,8)	0,037
		G	11 (%73,3)	4 (%26,7)	
rs10248273	Allel 1	G	3 (%75,0)	1 (%25,0)	0,612*
		C	27 (%48,2)	29 (%51,8)	
	Allel 2	G	2 (%66,7)	1 (%33,3)	1,000*
		C	28 (%49,1)	29 (%50,9)	
rs3801975	Allel 1	A	17 (%56,7)	13 (%43,3)	0,302
		G	13 (%43,3)	17 (%56,7)	
	Allel 2	A	1 (%33,3)	2 (%66,7)	1,000*
		G	29 (%50,9)	28 (%49,1)	
rs1637841	Allel 1	T	10 (%52,6)	9 (%47,4)	0,781
		G	20 (%48,8)	21 (%51,2)	
	Allel 2	T	5 (%83,3)	1 (%16,7)	0,195*
		G	25 (%46,3)	29 (%53,7)	
rs55997413	Allel 1	A	25 (%47,2)	28 (%52,8)	0,424*
		T	5 (%71,4)	2 (%28,6)	
	Allel 2	A	17 (%44,7)	21 (%55,3)	0,284
		T	13 (%59,1)	9 (%40,9)	
rs73164325	Allel 1	A	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
		T	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
	Allel 2	A	26 (%49,1)	27 (%50,9)	1,000*
		T	4 (%57,1)	3 (%42,9)	

Tablo 6. CNTNAP2 Allellerinin Vaka ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması (Devamı)

Marker ID (dbSNP)	Allel		Hastalar n (%)	Kontroller n (%)	p değerleri
rs2538962	Allel 1	C	20 (%54,1)	17 (%45,9)	0,426
		A	10 (%43,5)	13 (%56,5)	
	Allel 2	C	3 (%75,0)	1 (%25,0)	0,612*
rs73164325	Allel 1	A	27 (%48,2)	29 (%51,8)	
		T	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0,671*
	Allel 2	A	26 (%49,1)	27 (%50,9)	0,020
rs10240482	Allel 1	T	4 (%57,1)	3 (%42,9)	
		A	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
	Allel 2	A	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
rs2074713	Allel 1	A	27 (%50,9)	26 (%49,1)	1,000*
		T	3 (%42,9)	4 (%57,1)	
	Allel 2	C	20 (%52,6)	18 (%47,4)	0,592
rs186624619	Allel 1	T	10 (%45,5)	12 (%54,5)	
		C	5 (%41,7)	7 (%58,3)	0,519
	Allel 2	T	25 (%52,1)	23 (%47,9)	
rs2074711	Allel 1	C	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
		T	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
	Allel 2	C	28 (%48,3)	30 (%51,7)	0,492*
rs3779032	Allel 1	T	2 (%100)	0 (%0,0)	
		C	28 (%48,3)	30 (%51,7)	0,492*
	Allel 2	T	2 (%100)	0 (%0,0)	
rs3801976	Allel 1	C	21 (%51,2)	20 (%48,8)	0,781
		T	9 (%47,4)	10 (%52,6)	
	Allel 2	A	25 (%46,3)	29 (%53,7)	0,195*
rs77706740	Allel 1	C	5 (%83,3)	1 (%16,7)	
		A	15 (%51,7)	14 (%48,3)	0,796
	Allel 2	C	15 (%48,4)	16 (%51,6)	
rs13241417	Allel 1	G	17 (%56,7)	13 (%43,3)	0,302
		A	13 (%43,3)	17 (%56,7)	
	Allel 2	G	1 (%33,3)	2 (%66,7)	1,000*
rs117098826	Allel 1	A	29 (%50,9)	28 (%49,1)	
		C	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
	Allel 2	A	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
rs13241417	Allel 1	C	28 (%54,9)	23 (%45,1)	0,145*
		A	2 (%22,2)	7 (%77,8)	
	Allel 2	T	29 (%50,0)	29 (%50,0)	1,000*
rs117098826	Allel 1	C	1 (%50,0)	1 (%50,0)	
		T	18 (%51,4)	17 (%48,6)	0,793
	Allel 2	C	12 (%48,0)	13 (%52,0)	
rs117098826	Allel 1	G	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
		A	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
	Allel 2	G	27 (%48,2)	29 (%51,8)	0,612*
		A	3 (%75,0)	1 (%25,0)	

Pearson ki-kare testi ve **Fisher'in kesin testi kullanıldı. Anlamlı p değerleri vurgulu gösterilmiştir. NA: uygulanabilir değildir.

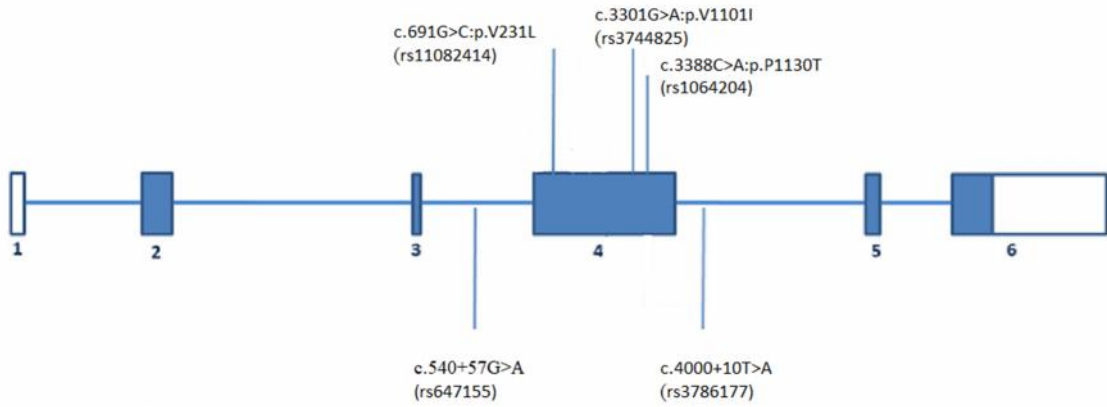
CNTNAP2 geninde saptanan 29 varyanttan beşisi vaka grubuna özeldir (ekil 4-19). Toplamda altı hastada heterozigot izlenen bu varyantlar tabloda yer almamaktadır; c.973C>G:P325A (novel/bir örnek), rs1345397568 (bir örnek), rs17170742 (bir örnek), rs373599564 (bir örnek) ve rs186624619 (iki örnek). c.973C>G:p.P325A (p=1,000*) ve rs1345397568 (p=1,000*) nadir varyantlar iken, rs186624619 (p=0,492*), rs17170742 (p=1,000*) ve rs373599564 (p=1,000*) populasyon veritabanlarına göre %0,05'ten yüksek allel frekansına sahiptir.



CNTNAP2: c.973C>G: p.P325A

CNTNAP2: c.2236G>A: p.D746N

ekil 4-20: Nadir Varyantların IGV Görüntüleri



ekil 4-21: Çalı mamızda Tespit Edilen *SETBP1* Varyantlarının Gen Üzerindeki Yerle imlerinin Gösterimi (Leone ve ark., 2020).

Tablo 7. *SETBP1* Geninde Tespit Edilen Yaygın Nonsinonim Varyantlar ve Allel Frekansları

Marker ID (dbSNP)	Lokasyon	Ref	Alt	De i im (NM_014141.6)	Turkish Variome	gnomAD	Gruplar	
							Hasta	Kontrol
rs647155	chr18:42449305	G	A	Intron3:c.540+57G>A	-	%3.670	%8,33	%3,33
rs3786177	chr18:42533315	T	A	Intron4:c.4000+10T>A	%14	%13.000	%15,00	%25,00
rs1064204	chr18:42532693	C	A	Ekzon4:c.3388C>A:p.P1130T	%14	%13.300	%15,00	%26,66
rs3744825	chr18:42532606	G	A	Ekzon4:c.3301G>A:p.V1101I	%12	%12.140	%16,66	%11,66
rs11082414	chr18:42529996	G	C	Ekzon4:c.691G>C:p.V231L	%22	%19.020	%18	%21

Ref: referans nükleotid, Alt: alternatif nükleotid, gnomAD: Genome Aggregation Database

Tablo 8. SETBP1 Allellerinin Vaka ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması

Marker ID (dbSNP)	Alleller		Hastalar (n)	Kontroller (n)	p değerleri
rs647155	Allel 1	G	30 (%50,0)	30 (%50,0)	NA
		A	0 (%50,0)	0 (%50,0)	
	Allel 2	G	25 (%47,2)	28 (%52,8)	0,424*
		A	5 (%71,4)	2 (%28,6)	
rs3786177	Allel 1	T	29 (%50,0)	29 (%50,0)	1,000*
		A	1 (%50,0)	1 (%50,0)	
	Allel 2	T	22 (%57,9)	16 (%42,1)	0,108
		A	8 (%36,4)	14 (%63,6)	
rs1064204	Allel 1	C	29 (%50,0)	29 (%50,0)	1,000*
		A	1 (%50,0)	1 (%50,0)	
	Allel 2	C	22 (%59,5)	15 (%40,5)	0,063
		A	8 (%34,8)	15 (%65,2)	
rs3744825	Allel 1	G	29 (%49,2)	30 (%50,8)	1,000*
		A	1 (%100,0)	0 (%0,0)	
	Allel 2	G	21 (%47,7)	23 (%52,3)	0,559
		A	9 (%56,3)	7 (%43,8)	
rs11082414	Allel 1	G	24 (%44,4)	30 (%55,6)	0,024
		C	6 (%100,0)	0 (%0,0)	
	Allel 2	G	22 (%56,4)	17 (%43,6)	0,176
		C	8 (%38,1)	13 (%61,9)	

Pearson ki-kare testi ve *Fisher'in kesin testi kullanıldı. Anlamli p de erleri vurgulu gsterilmi tir. NA: uygulanabilir de il

Tablodaki son rnek (rs11082414) incelendi ide; genomun bu b lgesinde allel 1'i C tespit edilen 6 katılımcının %100'ünün hasta grubunda bulundu u anlaşılmaktadır. Pearson ki-kare testi ile de erlendirildi inde rs11082414 (G/C) allel da ılım sıklıkları açısından hastalar ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmu tur (p=0,024).

rs11082414 (G/C) polimorfizmi *SETBP1* geninin 4. ekzonunda yerle en bir missense de i imdir (c.691G>C:p.V231L) ve proteinde tanımlanmı fonksiyonel domainler di nda yerle en valin amino asidinin, benzer fizikokimyasal özellikleri olan lösin amino asidi ile de i imine sebep olur. ClinVar veritabanında Schinzel-Giedion sendromu için benign olarak kayıtlıdır (ACMG kanıt kodları: BA1, BS2, BP4, BP6).

Tablo 9. *CNTNAP2*, *SETBP1*'de Varyant/ Homozigot Varyant Bulundurma Oranlarının Karşılaştırılması

Lokasyon	Genotip	Hastalar n (%)	Kontroller n (%)	p-de eri
chr7:145813854 Ref: G, Alt: A	Varyant/GA&AA	21(48.8%)	22(51.2%)	0,774
	Hom/AA	9(42.9%)	12(57.1%)	0,417
chr7:146997203 Ref: T, Alt: A	Varyant/TA&AA	20(43.5%)	26(56.5%)	0,067
	Hom/AA	15(45.5%)	18(54.5%)	0,436
chr7:147092615 Ref: C, Alt: T	Varyant/CT&TT	12(54.5%)	10(45.5%)	0,592
	Hom/TT	0(0.0%)	2(100.0%)	0,492*
chr7:147183143 Ref:A , Alt:G	Varyant/AG&GG	10(55.6%)	8(44.4%)	0,573
	Hom/GG	1(100.0%)	0(0.0%)	1,000*
chr7:147259105 Ref: G, Alt:A	Varyant/GA&AA	13(59.1%)	9(40.9%)	0,284
	Hom/AA	-	-	NA
chr7:147259551 Ref:C , Alt:T	Varyant/CT&TT	25(52.1%)	23(47.9%)	0,519
	Hom/TT	10(45.5%)	12(54.5%)	0,592
chr7:147259438 Ref: A, Alt:G	Varyant/AG&GG	26(59.1%)	18(40.9%)	0,020
	Hom/GG	11(55.0%)	9(45.0%)	0,584
chr7:147259374 Ref:A , Alt:G	Varyant/AG&GG	15(62.5%)	9(37.5%)	0,114
	Hom/GG	6(66.7%)	3(33.%)	0,472*
chr7:147259608 Ref: A, Alt:T	Varyant/AT&TT	4(57.1%)	3(42.9)	1,000*
	Hom/TT	-	-	NA
chr7:147600604 Ref:C , Alt:A	Varyant/CA&AA	27(48.2%)	29(51.8%)	0,612*
	Hom/AA	10(43.5%)	13(56.5%)	0,426
chr7:147674912 Ref: T, Alt:C	Varyant/TC&CC	10(34.5%)	19(65.5)	0,020
	Hom/CC	2(33.3%)	4(66.7%)	0,671*
chr7:147674880 Ref:G , Alt:A	Varyant/GA&AA	3(42.9%)	4(57.1%)	1,000*
	Hom/AA	-	-	NA
chr7:147674948 Ref: A, Alt:T	Varyant/AT&TT	3(42.9%)	4(57.1%)	1,000*
	Hom/TT	-	-	NA
chr7:147600913 Ref:C , Alt:T	Varyant/CT&TT	1(100.0%)	0(0.0%)	1,000*
	Hom/TT	-	-	NA
chr7:147815485 Ref: C, Alt:T	Varyant/CT&TT	2(100.0%)	0(0.0%)	0,492*
	Hom/TT	-	-	NA
chr7:147869670 Ref: T, Alt:C	Varyant/TC&CC	9(47.4)	10(52.6%)	0,781
	Hom/CC	2(100.0%)	0(0.0%)	0,492*
chr7:147926734 Ref: A, Alt: G	Varyant/AG&GG	11(73.3%)	4(26.7%)	0,037
	Hom/GG	2(100.0%)	0(0.0%)	0,492*
chr7:147926888 Ref: A, Alt: C	Varyant/AC&CC	15(48.4%)	16(51.6%)	0,796
	Hom/CC	5(83.3%)	1(16.7%)	0,195*
chr7:147963983 Ref: G, Alt: C	Varyant/GC&CC	28(49.1%)	29(50.9%)	1,000*
	Hom/CC	27(48.2%)	29(51.8%)	0,612*
chr7:147964016 Ref:A , Alt:G	Varyant/AG&GG	29(50.9%)	28(49.1%)	1,000*
	Hom/GG	13(43.3%)	17(56.7%)	0,302
chr7:147964091 Ref:G , Alt:A	Varyant/GA&AA	29(50.9%)	28(49.1%)	1,000*
	Hom/AA	13(43.3%)	17(56.7%)	0,302
chr7:148080726 Ref:C , Alt:A	Varyant/CA&AA	2(22.2%)	7(77.8%)	0,145*
	Hom/AA	-	-	NA
chr7:148080647 Ref:T , Alt:G	Varyant/TG&GG	25(46.3%)	29(53.7%)	0,195*
	Hom/GG	20(48.8%)	21(51.2%)	0,781

Tablo 10. *CNTNAP2*, *SETBP1*'de Varyant/ Homozigot Varyant Bulundurma Oranlarının Karşılaştırılması (*Devamı*)

Lokasyon	Genotip	Hastalar n (%)	Kontroller n (%)	p-de eri
chr7:147964249 Ref:G , Alt:A	Varyant/GA&AA	1(100.0%)	0(0.0%)	1,000*
	Hom/AA	-	-	NA
chr7:148112448 Ref:A , Alt:T	Varyant/AT&TT	13(59.1%)	9(40.9%)	0,284
	Hom/TT	5(71.4%)	2(28.6%)	0,424*
chr7:148106651 Ref:G , Alt:A	Varyant/GA&AA	3(75.0%)	1(25.0%)	0,612*
	Hom/AA	-	-	NA
chr7:148106654 Ref:T , Alt:C	Varyant/TC&CC	12(48.0%)	13(52.0%)	0,793
	Hom/CC	1(50.0%)	1(50.0%)	1.000*
chr18:42449305 Ref:G , Alt:A	Varyant/GA&AA	5(71.4%)	2(28.6)	0,424*
	Hom/AA	-	-	NA
chr18:42533315 Ref:T , Alt:A	Varyant/TA&AA	8(36.4%)	14(63.6%)	0,108
	Hom/AA	1(50.0%)	1(50.0%)	1.000*
chr18:42532693 Ref:C , Alt:A	Varyant/CA&AA	8(34.8%)	15(65.2)	0,063
	Hom/AA	1(50.0%)	1(50.0%)	1.000*
chr18:42532606 Ref:G , Alt:A	Varyant/GA&AA	9(56.3)	7(43.8)	0,559
	Hom/AA	1(100.0%)	0(0.0%)	1,000*
chr18:42529996 Ref:G , Alt:C	Varyant/GC&CC	8(38.1%)	13(61.9%)	0,176
	Hom/CC	6(100.0%)	0(0.0%)	0.024

Pearson ki-kare testi ve *Fisher'in kesin testi kullanıldı. Anlamli p de erleri vurgulu gösterilmi tir. NA: uygulanabilir de il. Ref: referans nukleotid, Alt: alternatif nukleotid, Hom: homozigot.

SETBP1 geni 231. kodonda birinci alleli alternatif nukleotid (C) olan katılımcıların tamamı hasta grubunda yer almaktadır (Tablo 8). Bu bulguyu destekler nitelikte; ki kare testi *SETBP1* rs11082414 (G/C) polimorfizminin homozigot (CC) varlığı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koymaktadır (p=0,024). Bir başka ifadeyle rs11082414 için heterozigot (GC) ve homozigot (CC) genotipler birlikte değerlendirildiğinde gruplar farklı görünmemektedir (p=0,176) ancak homozigot genotip (CC) sıklığı hasta grubunda kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksektir (p=0,024).

CNTNAP2 rs2074714 (A/G) polimorfizminin heterozigot (AG) ve homozigot (GG) varlığı açısından incelendiğinde rs2074714 (A/G) polimorfizmi hasta grubunda kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yaygın bulunmuştur (p=0,020). rs2074714 (A/G) polimorfizmi *CNTNAP2* geni 12. intronda yerle en derin intronik bir varyanttır (c.1897+89A>G) ve kromozom 7: 147259438 bölgesinde bulunan A nukleotidinin G nukleotidine de i mi ile meydana gelir. Bu genomik pozisyonda ikinci alleli alternatif nukleotid (G) olan katılımcıların %59,1'i hasta grubunda %40,9'u kontrol grubunda yer almaktadır (Tablo 6). Homozigot

rs2074714/GG genotipi her iki grupta benzer sayıda iken; AG ve GG genotipi bulunanlar birlikte de erlendirildi inde AG ve GG varyantı olanların %59,1'inin hasta grubunda, %40,9'unun kontrol grubunda oldu u görülmü tür (Tablo 9).

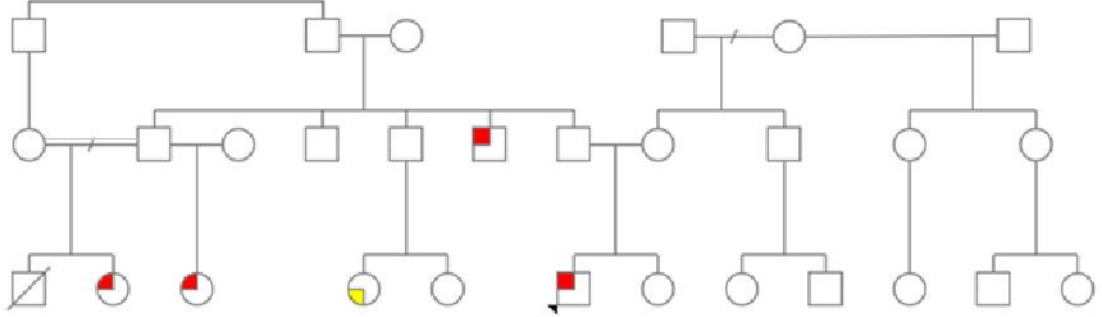
CNTNAP2 rs3779031 (A/G) polimorfizminin heterozigot (AG) ve homozigot (GG) varlı ı açısından incelenmi tir. Bu varyant hasta grubunda kontrollere kıyasla istatikselsel olarak anlamlı derecede daha yaygın bulunmu tur ($p=0,037$). rs3779031 (A/G) polimorfizmi *CNTNAP2* geni 19. intronda yerle en bir splice bölge varyantıdır (c.3248-4A>G) ve kromozom 7:147926734 bölgesinde bulunan A nükleotidinin G nükleotidine de i imi ile meydana gelir. Bu genomik pozisyonda ikinci alleli alternatif nükleotid (G) olan katılımcıların %73,3'ü hasta grubunda %26,7'si kontrol grubunda yer almaktadır (Tablo 6). Homozigot genotip (GG) 2 hastada bulunurken kontrol grubunda bulunmamı tır. AG ve GG genotipi bulunanlar birlikte de erlendirildi inde ise varyantı olanların %73,3'ünün hasta grubunda, %26,7'sinin kontrol grubunda oldu u görülmektedir (Tablo 9).

CNTNAP2 rs2373284 (T/C) polimorfizminin heterozigot (TC) ve homozigot (CC) varlı ı açısından incelendi inde bu varyantın hasta grubunda kontrollere kıyasla istatikselsel olarak anlamlı derecede daha az izlendi i anlaşılmı tır ($p=0,020$). rs2373284 (T/C) polimorfizmi *CNTNAP2* geni intron 14'te yerle en derin intronik bir varyanttır (c.2256-42T>C) ve kromozom 7: 147674912 bölgesinde bulunan T nükleotidinin C nükleotidine de i imi ile meydana gelir. Bu genomik pozisyonda ikinci alleli alternatif nükleotid (C) olan katılımcıların %35,5'i hasta grubunda %64,5'i kontrol grubunda yer almaktadır (Tablo 6). rs2373284 için CC genotipine sahip 6 ki iden 4'ü kontrol, 2'si hasta grubunda yer almaktadır. TC ve CC genotipi bulunanlar birlikte de erlendirildi inde varyantı olanların %35,5'inin hasta grubunda, %65,5'inin kontrol grubunda oldu u gözlenmi tir (Tablo 9). Çalışmamızda tespit edilen di er 30 varyantın allel ve genotip dağılımları vaka ve kontrol gruplarında istatikselsel anlamda farklılık göstermemi tir.

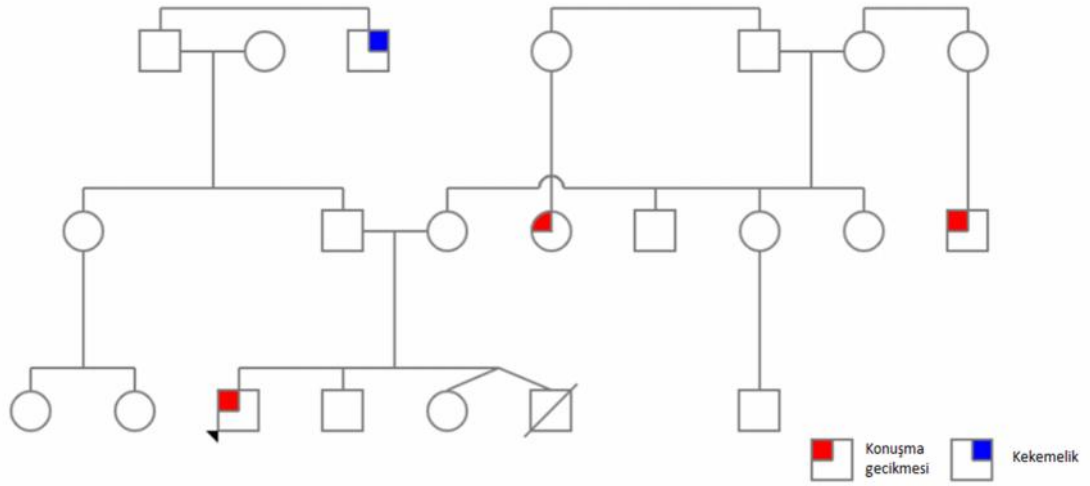
4.3.3 Pedigri Örnekleri

ekil 4-22’de ailesinde birden fazla ki ide dil ile ili kili problemi olan hastaların aile a açları örneklendirilmi tir. Pedigrilerde açık bir Mendeliyen kalıtım modeli tespit edilmemesi, altta yatan genetik temelin "multifaktöriyel" veya "poligenik" olabilece ini dü ündürmektedir.

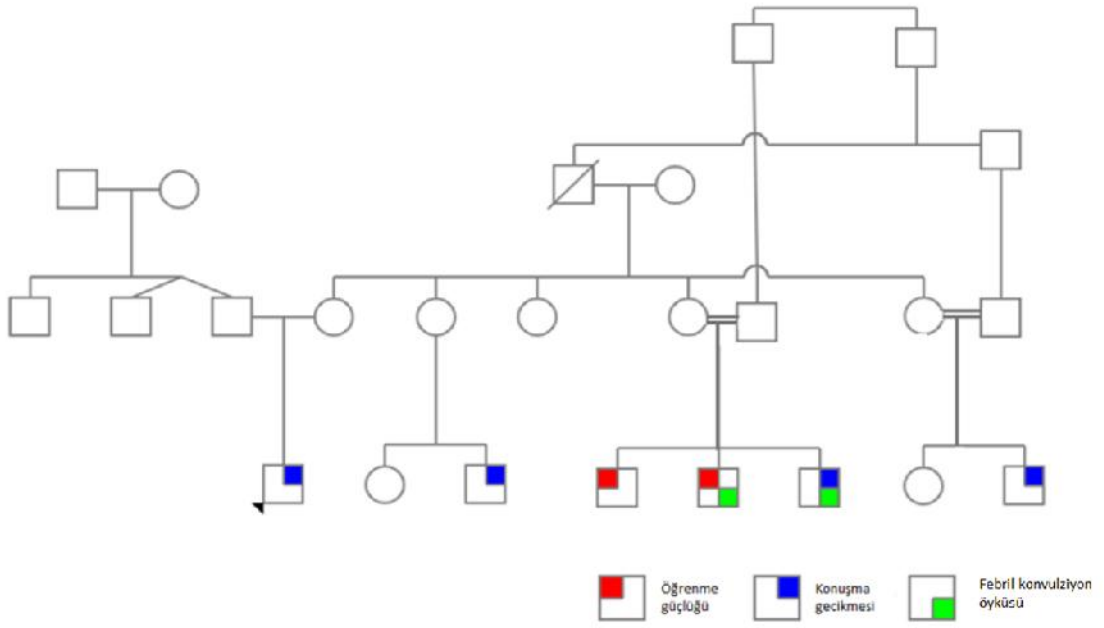
A



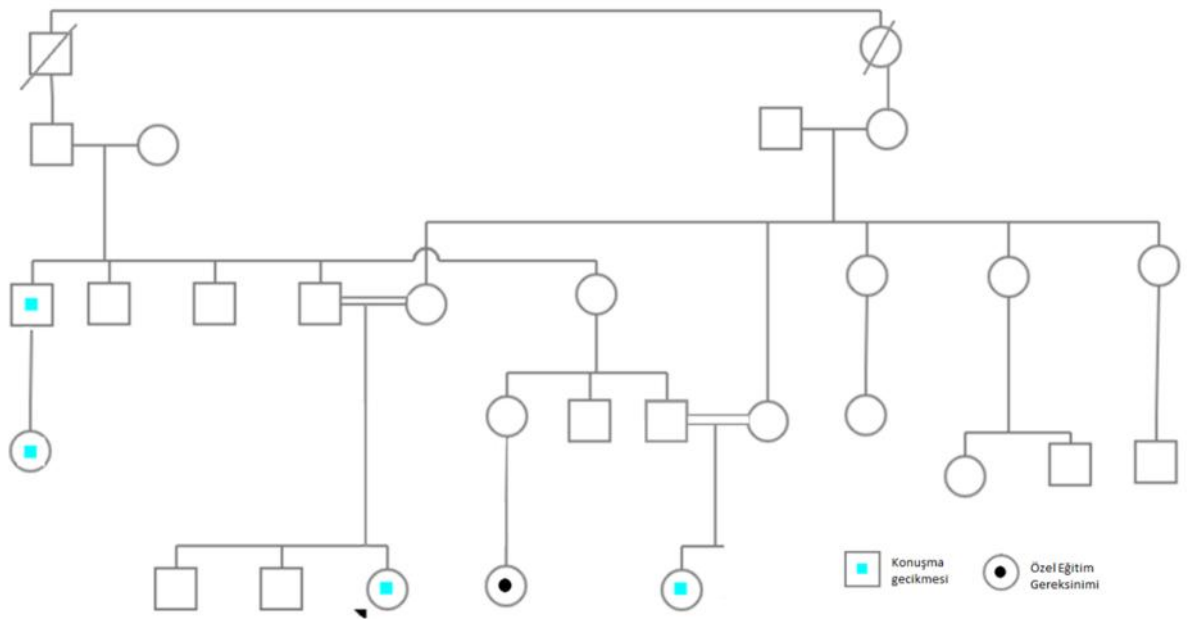
B



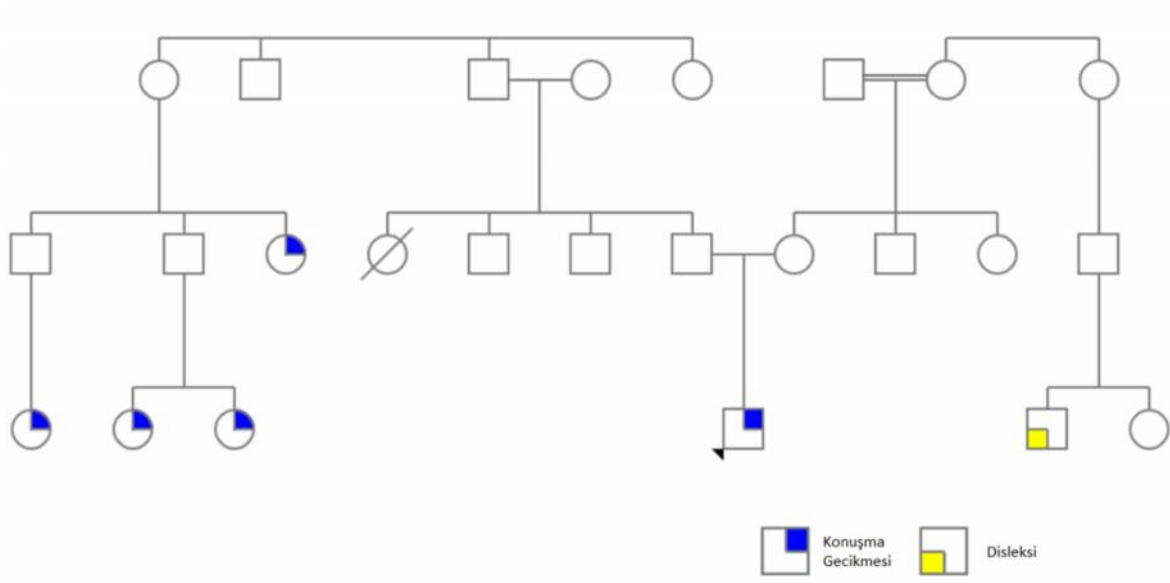
C



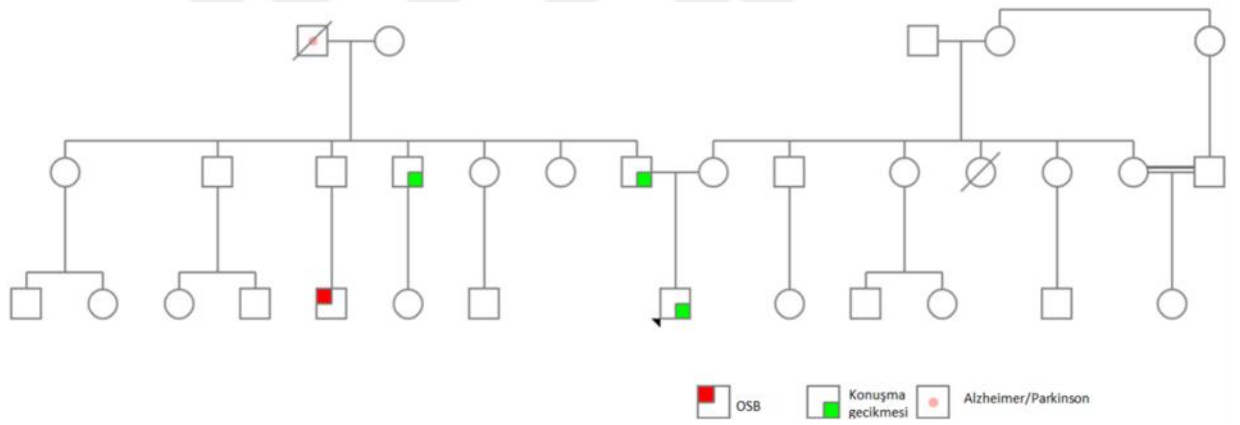
D



E



F

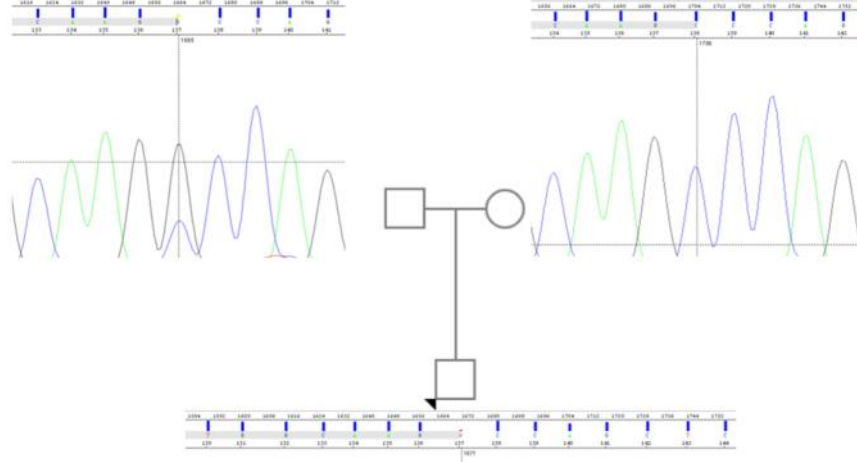


ekil 4-22. Pedigri Örnekleri. Çevrimiçi pedigri aracı (<https://pedigree.progenygenetics.com/>) ile çizilmi tir.

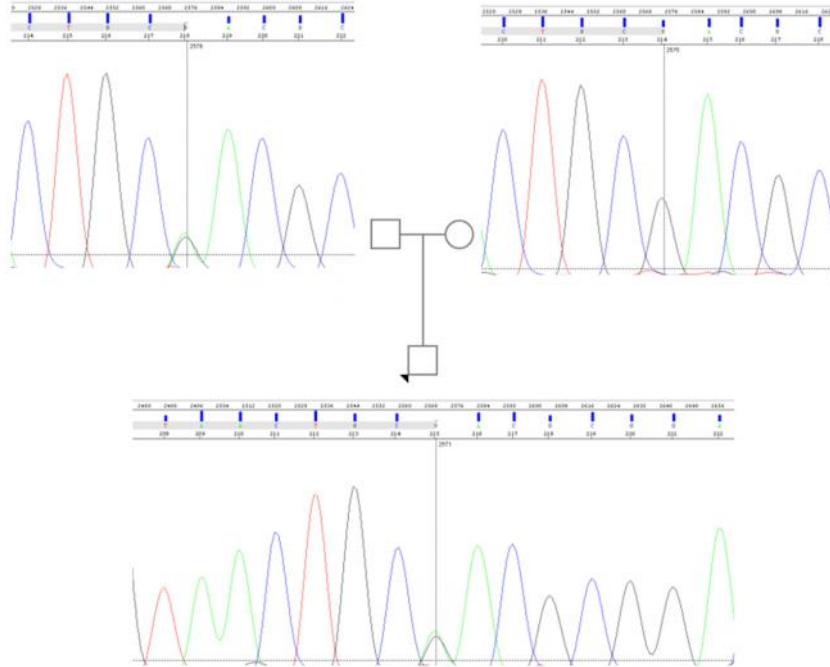
4.3.4 Önemi Bilinmeyen Nadir Varyantların Segregasyon Analizi

Segregasyon çalıması ile *CNTNAP2* geninde tespit edilen nadir varyantların paternal kalıtıldı gösterilmi tir (ekil 4-23).

A



B



ekil 4-23:Segregasyon Analizi Sonuçları. c.2236G>A (p.D746N) varyantının baba, anne ve hastadaki Sanger görüntüsü (A). c.973C>G (p.P325A) varyantının baba, anne ve hastadaki Sanger görüntüsü (B).

5 TARTI MA

OMIM veri tabanında "language abnormalities" anahtar kelimeleri için arama yapıldığında "dil anormallikleri" semptomu olan 200'den fazla sonuç ile karşılaşmaktadır. Sonuçlar çoğunlukla izole dil, bir sendromun komponenti olan dil anormalliklerini ifade etmektedir.

Dile özgü gelişimsel bozukluk, monogenik kalıtılabilen ancak daha yaygın olarak açık bir mendelyen kalıtım olmadan belirli bir derece ailesel yığılım gösteren multifaktöriyel bir durumdur. Bu yönüyle Gelişimsel Dil Bozukluğu (GDB) genetik olarak incelenmesi zor bir konudur. Genetik varyantların birbirleriyle, popülasyonla ve ortak çevresel faktörlerle etkileşim mekanizmaları büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır. Etkileşimlerin karmaşık olduğunu vurgulamak amacıyla bu tür bozukluklar için "kompleks" terimi kullanılmaktadır. Kompleks kalıtım paternini izleyen hastalıkların yaygınlığını, dağılımını ve nedenlerini anlamak, hastalar arasındaki ortak faktörlerin ne ölçüde genetik ya da çevresel olduğunu belirlemek "genetik epidemiyoloji" biliminin ilgi alanıdır. Çalışmamızda gelişimsel dil bozukluğu ele alınırken genetik epidemiyolojinin metodları takip edilmiş olup, iki aday gene ek olarak olası tıbbi, psikolojik, sosyal ve çevresel faktörler incelenmiştir.

Araştırma sonucunda ulaşılan epidemiyolojik veriler incelendiğinde ilk olarak GDB tanısının erkek çocuklara yaklaşık 3 kat daha fazla konulduğu gözlemlenmektedir. Henüz iyi anlamamızı nedenlerle multifaktöriyel bozuklukların çoğunluğu olmayan bir cinsiyet dağılımını göstermektedir. Erkek cinsiyette GDB'nin daha yaygın olmasının arkasında biyolojik ve sosyokültürel faktörlerin etkisi bulunmaktadır. GDB'de iki ila üç yaş arası; konuşma gecikmesi hikayetiyle en sık başvurulan yaş aralığıdır. Hasta grubumuzda ortalama tanı yaşının literatürden farklı olarak daha geç (3,9) olması önemlidir. Bu durum, ebeveynlerin, dil becerilerinin edinildiği ortalama zaman aralıkları hakkında yeterli bilgi sahibi olmaması, gelişimin geciktirilmesi ve değerlendirilmesi gerektiğini gösteren kırmızı bayraklar ortaya çıktığında dahi damgalanma (stigmatizasyon) endişesiyle hekime başvurmadan çekinmeleri veya düzeltilmesiyle problemi dile getirmemelerinden kaynaklanabilir.

GDB'nin ilk semptomlarından biri olan konuşma gecikmesi, en yaygın gelişimsel problemlerden biri olarakımıza çıkmaktadır. Tanımlanmış bir neden olmaksızın GDB, 2-5 yaş arası okul öncesi çocuklarda %2.3-19 oranında gözlenmektedir (Nelson ve ark., 2006). Genetik araştırmalarda bir hastalıktan etkilenen popülasyonun sıklığı %0.05'ten veya 5/10.000'den daha az ise, bu hastalık "nadir"

olarak nitelendirilmektedir (<https://www.eurordis.org/information-support/what-is-a-rare-disease/> ;<https://rarediseases.org/rare-diseases/> 8 Kasım 2023). Bu ba lamda GDB "yaygın" bir durum olarak nitelendirilebilir. Türkiye nüfusunun 85 milyondan fazla olması göz önüne alındı ında, GDB Türkiye'de önemli bir hastalık yükü olu turmaktadır.

Aileler hem genleri hem çevresel temasları, toplumda rastgele seçilmi bireylere kıyasla daha büyük oranda payla ır. Bu gerçeklik, vaka grubunda gözlemlendi imiz ailesel kümelenmeyi açıklayabilir. Ancak bir hastalı ın ailesel kümelenme göstermesi her zaman hastalı ın genetik temeli oldu u anlamına gelmemektedir. Ailesel kümelenme, sadece genetik faktörlere de il, aynı zamanda aile üyelerinin ya adı ı evin fiziksel ko ulları, çevresel maruziyetler veya ailenin sosyoekonomik durumu gibi genetik olmayan birçok ortak etmene de ba lı olabilmektedir. Farklı dönemlerde yapılan birçok çalı mada dü ük sosyoekonomik düzeyin (SED) GDB üzerine olumsuz etkisi vurgulanmı tır (Adhikari & Rao, 2017; Sunderajan & Kanhere, 2019; van Noort-van der Spek, Franken, & Weisglas-Kuperus, 2012). Bizim çalı mamızda ailelerin sosyoekonomik düzeylerine ili kin de i kenler risk etmeni olarak öne çıkmamaktadır. Bu durumun olası sebepleri; SED belirlemek için geçerlilik ve tutarlılık çalı ması yapılmı bir ölçek kullanılmaması, SED'in yalnızca ebeveynlerin e itim düzeyi ve aylık gelir düzeyi sorgulanarak de erlendirilmesi olabilir. Kanada'da 24-30 ay arasında 1023 katılımcının oldu u geni bir toplum temelli kohort çalı masında da aile e itim ve sosyoekonomik durumun geç konu mayı tahmin etmede önemli olmadı ı belirlenmi tir (Collisson ve ark., 2016).

Vaka grubumuzun yakla ık dörtte üçünde (23/30) ailede konu ma gecikmesi öyküsü olması GDB'nin genetik bir komponenti oldu una dair kuvvetli bir göstergedir. Akraba evlili i ve/veya endogami oranı vaka grubunda kontrollere kıyasla daha yüksek olmakla birlikte vaka grubu içinde aile öyküsü olanlarda akraba evlili i ve/veya endogaminin daha sık izlenmesi dikkate de erdir. Ebeveynlerin akraba olması, multifaktöriyel hastalıkların aile içinde tekrarlanma riskini arttıran bir faktördür.

Hanehalkı sayısı çocu un dile maruziyetini etkileyen faktörlerden biridir. Üç ki ilik çekirdek aile olma (%36,7;%20) ve ailenin ilk çocu u olma durumu (%50; %36,7) sıklı ı vaka grubunda daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı de ildir. Bazı çalı malar, karde ler içinde ilk do an çocukların, daha sonradan do anlardan daha geç bir ya ta dil ö rendiklerini gösterse de, bunun aksini iddia eden çalı malar da mevcuttur. İlk do an çocukların kendilerine yönlendirilen yeti kin

kaynaklı dili daha fazla duymaları bir avantaj iken, sonradan do an çocukların büyük karde lerini rol model olarak görmeleri bir avantaj olabilir. Vaka grubumuzun %50'sinin ailenin ilk çocu u olması, birinci sırada do an çocuklarda GDB'nin sıklı ının arttı mını gösteren literatürü desteklemektedir. Bu de i kenlerin GDB üzerindeki klinik etkisinin anla ılabilmesi için daha büyük örneklem grupları ile çalı ılması gereklidir.

Sinir sistemi geli iminin çevreye en duyarlı oldu u zaman intrauterin dönemdir. Prenatal dönemde çevresel stres; di er risk faktörleri (genetik faktörler, hormonlar vb) ile etkile erek nörogeli imsel bozuklukların etiyolojisinde rol oynar. Ya amlarının ilk 6 ayında kan-beyin bariyerinin daha geçirgen olması, bebekleri nörotoksinlere kar ı daha duyarlı hale getirir. Ara tırmacılar, prenatal ve postnatal dönemde nikotin maruziyetinin, bili sel geli im üzerinde olumsuz etkileri oldu unu çok kez bildirmi tir. Bu verilerden yola çıkarak çalı mamızda GDB ve kontrol grubu prenatal dönemde nikotin maruziyeti ve maternal/ gestasyonel problemler açısından kıyaslanmı tir. Prenatal dönemde annenin sigara içmesi ve/veya evde sigara içilmesi yoluyla maternal nikotin maruziyeti hasta grubunda bir miktar daha yüksek olmakla beraber (vaka %56,7; kontrol %50) sigara alı kanlı ının Türk toplumunda sık olması çalı mamızda nikotinin bir risk faktörü olarak öne çıkmasını engelleme i olabilir. Benzer ekilde ekrana maruziyet süresi beklentilere uygun olarak hasta grubunda daha yüksek olmakla birlikte her iki grupta arka planda TV kullanımı yaygın oldu undan, bu durum GDB fenotipinin ortaya çıkmasında belirleyici bir faktör olarak görülmemi tir.

Gruplar arasında do um kilosu (vaka/kontrol; 3396 ± 585 gram ; 3096 ± 493 gram) ve anne sütü alma (vaka/kontrol; 16 ± 9 ay ; 22 ± 9 ay) süresindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur. Vaka grubunda ortalama do um kilosu daha yüksek ($p=0,043$) iken, ortalama laktasyon süresi daha dü ük ($p=0,044$) bulunmu tur. Ara tırmalar dü ük do um a ırlı ı ile do an çocuklarda uzun vadeli duygusal, davranı sal, sosyal, akademik sorunlar ve depresyon, DEHB gibi psikiyatrik bozuklukların riskinin arttı mını göstermektedir (Gale ve ark., 2004; Botting ve ark., 1997). Bu durum nörolojik ve demografik anlamda kümülatif olumsuz etkenlerle ili kilendirilmektedir. Ancak çalı mamızda 2500 gramın altındaki do um a ırlı ının GDB için bir risk faktörü oldu u savının aksine; 3150 gram üzerindeki do um a ırlı ı önemli bir faktör olarak kar ımıza çıkmı tir. Ara tırmamızdaki küçük örneklem boyutu, sonuçların dikkatle yorumlanmasını gerektirir. Katılımcılar arasında dü ük do um a ırlı ı ve/veya makrozomik bebek sayısının oldukça az olması ve kontrol grubundaki

annelerde gestasyonel diyabetin daha sık olması böylesi bir sonuca sebebiyet vermi olabilir. Son yıllarda ABD, Avrupa ve dünya genelinde yapılan çalı malar, ortalama do um a ırlı ının sürekli olarak arttı nı ortaya koymu tur. Bu durum, birçok ülkede iyile en sosyo-ekonomik ko ullarla, yeti kinlerde ya lı diyet ve obezitenin önemli ölçüde artması ile ili kilendirilmektedir. İmdiye kadar yüksek do um a ırlı ının uzun vadeli sonuçları net bir ekilde tanımlanmamı tur. Yakın tarihli bir çalı ma, makrozomik erkek bebeklerin (>4000 g) ilerleyen ya larda anksiyete bozuklu u, DEHB gibi psikiyatrik sorunları ya ama olası lı ının daha yüksek oldu unu göstermi tir (Van Lieshout ve ark., 2020). Makrozomik do um anne obezitesinin bir sonucu olabilir, obezitenin metabolik komplikasyonları fetal beyinde inflamasyon yaratarak serotoninerjik, dopaminerjik ve melanokortinerjik sistemler gibi sinir yollarının geli imini bozabilir. Özetle yüksek do um a ırlı ı ile ili kili olarak intrauterin ortamın suboptimal olması bir takım riskleri arttırabilir. Bu sebeple yüksek do um a ırlı ının GDB üzerindeki kesin etkileri daha fazla çalı mada de erlendirilmelidir.

Öte yandan ortalama laktasyon süresi literatürle uyumlu olarak GDB grubunda daha dü ük saptanmı tur. Laktasyon süresini sorgulamak klinik uygulamada risk altındaki bireyleri net bir ekilde tanımlamak için son derece önemlidir. statiksel analizlere göre 15 aydan az anne sütü alma süresi GDB için prediktif olabilir (sensivite>%80, spesifite:%40). Erken çocukluk döneminde anne sütü ile beslenme, sa lıklı çocuklarda ve özel e itim gereksinimi olan çocuklarda dil ve konu ma geli imini desteklemektedir. Serebral palsili çocuklarda yapılan bir ara tırmada emzirilen çocukların sözel i levlerinin daha iyi oldu u saptanmı tur. Emzirmenin oral kavite anatomisinin do ru ekillenmesini sa lama yoluyla konu ma bozukluklarına kar ı koruyucu etki gösterdi i, ayrıca nöroplastisiteyi indükleyerek nörogeli imsel sonuçları iyile tirdi i öne sürülmü tür(Karatekin ve ark., 2023). Bir ba ka çalı mada, anne sütü ile beslenmenin beyinde beyaz cevher matürasyonu ve myelinizasyonu hızlandırarak dil geli imini olumlu etkiledi i, anne sütü ile beslenme süresi arttıkça ifade edici ve alıcı dil skorlarında lineer bir artı oldu u bildirilmi tir (Deoni ve ark., 2013; Leventakou ve ark., 2015). Bu durum anne sütü içeri indeki (uzun zincirli ya asitleri, DHA, ara idonik asit, kolesterol, kolin, karoten vb) maddelerin dil ile ili kili genlerin transkripsiyonunu etkilemesi ile ba lantılı olabilir(Karatekin ve ark., 2023).

Ara tırma kapsamında sorgulanan bir ba ka nongenetik faktör neonatal sarılık öyküsü idi. Fototerapi alanlarda neonatal sarılık öyküsü pozitif kabul edildi. Hiperbilirubinemiye maruz kalan yenido anların büyüme dönemlerinde nörogeli imsel

bozukluklar geli tirme riski altında oldu u bilinmektedir. Çalı mamızda literatür ile benzer ekilde GDB grubunda neonatal sarılık öyküsü daha sık bulunmu tur.

Genetik varyasyonlar ile çevrenin multifaktöriyel hastalıklar üzerinde kümülatif etkisi oldu u bilinmektedir, bazı bireylerde genetik nedenler baskın olsa da çevresel faktörlerin hastalı ı tetikleyici, seyrini de i tirici veya hastalıktan koruyucu olabilece i üzerinde durulmaktadır. Geçti imiz on yılda yapılan yüksek verimli genomik çalı malar multifaktöriyel bozuklukların nedenlerine katkı sa layan muhtemel genlerin, kromozomal bölgelerin ve fonksiyonel moleküler yolların tanımlanmasında etkili olmu tur. Ancak bunların ço unlukla ara tırma a amasında kaldı ı ve bu tür hastalıkların büyük ço unlu unda; sorumlu genler, varyantlar ve bu varyantlarla etkile en çevresel etkenlerin henüz tam olarak belirlenemedi i vurgulanmalıdır. Daha önce detaylarıyla bahsedildi i üzere çe itli genetik, nörogörüntüleme ve modelleme ara tırmaları *CNTNAP2*'nin dil ile ili kili aday bir gen oldu unu ortaya çıkarmı tır (Petrin ve ark., 2010; Vernes ve ark. 2008). Bununla birlikte *SETBP1* geni ile dil geli imi ili kisi, nispeten yeni ke fedilmekte olan bir alandır (Morgan ve ark., 2021). Çalı mamızda *CNTNAP2* geninde üç SNV ve *SETBP1* geninde bir SNV, vaka ve kontrol grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı derecede farklı sıklıkta bulunmu tur. Öte yandan *CNTNAP2* geninde iki nadir varyant tespit edilmi tir.

Öncelikle bu varyantlar incelenecek olursa; *CNTNAP2* (NM_014141.6):c.973C>G (p.Pro325Ala) varyantı evrimsel olarak orta korunmu luk düzeyine sahip (GERP: 5.84, PhyloP100way: 5.876) bir konumda yerle mektedir. Kodon 325'te meydana gelen tek nükleotid de i imi (CCC>GCC) sonucunda prolin yerine alanin amino asidi gelmektedir. Her iki amino asitin nonpolar/hidrofobik ve yüksüz özellikte olması yönüyle aralarındaki fizikokimyasal fark küçüktür. In siliko öngörü programları çeli kili sonuçlar vermektedir. MutationTaster (1.000), DANN (0.99), DEOGEN-2 (0.5625), MVP (0.8799), FATHMM (-1.08), FATHMM-MKL (0.9682), FATHMM-XF (0.6878), MetaLR (0.59), Polyphen2 (0.9), LIST-S2 (0.8718), MetaRNN (0.7802) algoritmaları ile patojenik skorlar alınırken; Revel (0.44), M-CAP (0.0321), SIFT (0.073), SIFT4G (0.062), BayesDel addAF (0.03565), BayesDel noAF (-0.19), PrimateAI (0.69) ve CADD PHRED-scaled (22.6000) araçları benign skorlar vermektedir. Varyant gnomAD ekzom ve genom dahil populasyon veritabanlarında kayıtlı de ildir. Söz konusu varyant, çalı mamızda cümle kuramama ikayeti ile ba vuran bir erkek çocukta tespit edilmi tir. Ba vurusunda 3 ya 2 aylık iken yapılan geli im testinde, dil bili sel alan 2 ya 5 ay – 2 ya 8 ay ile uyumlu idi (AGTE-DB

puan:42). Pedigrinde benzer öyküye sahip aile bireyi bildirilmemi tir. Segregasyon analizinde varyantın asemptomatik babadan kalıtıldı ı anla ılmı tir. u ana kadar elde edilen kanıtlar itibariyle yeni (novel) olan bu varyantın klinik önemi bilinmemektedir.

CNTNAP2 (NM_014141.6):c.2236G>A (p.Asp746Asn) varyantı populasyon veritabanlarında son derece nadir ($f = 0.00000802$) olup, literatürde daha önce bildirilmemi tir. ClinVar veritabanında bir kez Önemi Bilinmeyen Varyant (kayıt tarihi: 9 Nisan 2022) girdisi mevcuttur. Varyant ekzon 14'te evrimsel olarak korunmuşluk düzeyi yüksek (GERP: 5.69, PhyloP100way: 9.760) bir konumda yerlemektedir. Kodon 746'da meydana getirdi i tek nükleotid de i imi (GAC>AAC) asidik ve polar bir amino asit olan aspartik asitin, nötr ve polar bir amino asit olan asparajin ile de i imine neden olmaktadır. Bilgisayar tahmin algoritmaları tarafından a ırlıklı olarak zarar verici (damaging) veya zararlı (deleterious) olarak de erlendirilmektedir. In silico araçlar söz konusu de i imin potansiyel etkisi konusunda hemfikir de ilse de missense varyasyonlara yönelik geli tirilen; Polyphen2 (1.000), SIFT (0.014), MutationTaster (1.000), MUT Assesor (3.83), DANN (0.99), PrimateAI (0.8) yanısıra; Provean (-4.52), EIGEN (0,89), LIST-S2 (0,94), CADD PHRED-scaled (29.4000), DEOGEN2 (0.67), MetaRNN (0,8), MVP (0,82) araçlarının 'hasar verici' tahmininde bulunması dikkate de erdir. Ancak Revel (0,46), FATHMM (1.17), MetaLR (0.3), MetaSVM (-0,38), BayesDel noAF (-0.42) ve M-CAP (0,07) varyantı 'tolere edilebilir' öngörmekte, Varsity (0.43) ise belirsiz skor vermektedir. Biyoinformatik analiz platformu Genomize'nin sundu u bilgilere göre; probandta saptanan varyant, merkezimizin *in house* veri tabanında daha önce izlenmemi tir.

CNTNAP2 (NM_014141.6):c.2236G>A (p.Asp746Asn) varyantı, ilk sözcük üretimi 4 ya ından sonra gerçekleşen bir erkek hastada saptanmı tir. Babavurusunda 5 ya 3 aylık iken yapılan geli im testinde, dil bili sel alan 3 ya 5 ay – 3 ya 8 ay ile uyumlu olan (AGTE-DB puan:50) hastanın pedigrisinde probandın maternal tarafta 4. dereceden iki akrabasında geç konu ma, paternal tarafta 3. dereceden bir akrabasında kekemelik oldu u kaydedilmemi tir (ekil 4-22B). Ebeveynlere yapılan segregasyon çalı ması varyantın babadan kalıtıldı ını göstermi tir. Babadan alınan anamnezde, konu ma güçlü ü, akademik ya da sosyal problemler gibi subklinik otizm spektrum semptomlarının olmadı ı ö renilmemi tir. Bu bilgiler göz önünde bulundurularak söz konusu de i im Önemi Bilinmeyen Varyant olarak sınıflandırılmı tir.

CNTNAP2 varyant spektrumu açısından Clinvar ve Leiden- Açık Varyasyon Veritabanı (LOVD) incelendi inde bugüne kadar 13'ü patojenik olmak üzere 134 farklı

CNTNAP2 varyantı için küresel yapıldı, bunların yaklaşık %93'ünün yeni nesil dizileme ile tespit edilebilecek substitusyon tipinde varyantlar olduğu görülmektedir (son güncelleme tarihi 23 Ocak 2023). Ancak *CNTNAP2* missense varyantları çoğunlukla patojenik değildir. Özellikle patojenik varyantlar incelendiğinde neredeyse tamamının LoF varyant olduğu, %38'inin delesyon kategorisinde olduğu görülmüştür.

Tanımlanan patojenik varyasyonların hücresel düzeydeki fonksiyonel etkilerini belirlemeye yönelik yapılan deneysel çalışmalar, *CASPR2* proteininin kortikal nöron akson büyümesi sürecinde dozaj bağımlı bir rol oynadığını göstermiştir. Canali ve arkadaşlarının (2018) yürüttüğü çalışmalar; *CNTNAP2* genindeki heterozigot I869T, G731S, R1119H, N407S varyantlarının vahşi tip *CASPR2* ile oligomerleşme aracılığıyla, proteinde adezyon defekti (fonksiyon kaybı) yarattığını, öte yandan proteinde hatalı katlanmaya sebep olarak endoplazmik retikulumda retansiyona ve plazma membranındaki fonksiyonel protein düzeyinde azalmaya neden olduğunu (dominant-negatif etki) kanıtlamıştır.

Araştırmamızda toplam 29 *CNTNAP2* varyantı incelenmiştir ve üç *CNTNAP2* varyantının sıklığı, vaka ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir; rs2074714 (Intron 12) ve rs3779031 (Intron 19) vaka grubunda daha sık, rs2373284 (Intron 14) kontrollerde daha sık saptanmıştır. Vaka grubunda sık bulunan rs2074714 ve rs3779031 literatürde daha önce GDB'den etkilenen bireylerde bildirilmemiştir. Hem vaka hem kontrol gruplarında bu varyantların homozigot bulunma sıklığının istatistiksel anlamda farklılık göstermemesi, GDB için risk alleli olma olasılığından uzaklaştırmaktadır. Ancak rs3779031 için homozigot genotipin (GG) 2 hastada bulunurken kontrol grubunda bulunmaması dikkate değerdir. Populasyonda yaygın ancak çalışmamızda yalnızca vaka grubunda izlenen rs17170742 (bir örnek), rs373599564 (bir örnek) ve rs186624619 (iki örnek) varyasyonları için olduğu gibi; rs3779031-GG genotipinin de istatistiksel önemini ortaya çıkarılabilmeleri için örneklem grubunun sayıca artırılması gereklidir. Kontrol grubunda daha sık saptanan rs2373284 için yapılan literatür taramasında genotip fenotip ilişkisini netleştirecek bir veriye ulaşılamamıştır. Ancak rs2373284 polimorfizminin biallelik bulunma sıklığının gruplar arası farklılık göstermeyi inceleyerek varyantın GDB'de fonksiyonel/koruyucu rolü olmadığı çıkarımı yapılmıştır.

Bilindiği gibi, dil bozuklukları, OSB için karakteristik bir özelliktir. Bazı tutarsız sonuçlara rağmen, birkaç çalışmada *CNTNAP2* genindeki bazı SNV'lerin OSB ve/veya dil bozukluklarına yatkınlık için genetik belirteç (marker) olarak kullanılabileceğini öne

sürülmü tür (Vernes ve ark., 2008). Örne in rs2710102-G ve rs7794745-T minör allellerinin dil gelişimi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir; rs7794745 sıklıkla bireylerde spesifik gri madde bölgelerinin azalan hacmi ile, rs2710102 linguistik görev sırasında sağ temporal ve inferior frontal gyrusun (Broca alanı homologue) anormal aktivasyonu ile (azalmış dil lateralizasyonu) ilişkilendirilmiştir (D'Onofrio ve ark., 2023; Tan ve ark., 2010; Whalley ve ark., 2011). Bu deneyimler çalışmamızda izlenmemiştir.

Tanı kriterlerinin kapsayıcı olması nedeniyle GDB hasta popülasyonu son derece heterojendir. Bu durum genetik ilişkilendirme çalışmalarında istatistiksel gücünü önemli ölçüde azaltır. *CNTNAP2* ekzon 13 ile 15 arasındaki bölgede yerleşen, daha önce reseptif ve ekspresif dil yetenekleri ile ilişkilendirilmiş rs4431523 ve rs17236239 intronik varyasyonlarını (Vernes ve ark., 2008) hasta grubumuzda tespit etmedik. Araştırmamızda ekzon 13 ile 15 arasındaki bölgede rs1345397568 (ekzon14) ve rs17170742 (intron 14) varyantlarına sadece vaka grubunda rastlanılmıştır. Bu SNV'ler ile GDB arasındaki olası ilişkiyi doğrulamak veya çürütmek için daha büyük örneklem boyutu ile yapılacak kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

CNTNAP2'nin ektodomaininin hastalıklarla doğrudan ilişkisi bilinmemektedir. Buradaki heterozigot inframe delesyonlar; entellektüel yeti yitimi, epilepsi ve konuşma bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. Dahası, *CNTNAP2* ektodomainindeki birçok missense varyant otizm ile ilişkilendirilmiştir (Lu ve ark., 2016). İnsanlarda *CNTNAP2*'nin ekstrasellüler domainini hedefleyen otoantikorlar; otoimmün epilepsi, otoimmün ensefalit ve edinilmiş nöropsikiyatrik özelliklerle bağlantılı bulunmuştur (Irani ve ark., 2010). Vaka grubunda bildirdiğimiz klinik önemi bilinmeyen iki missense varyant da *CNTNAP2* ekstrasellüler bölgesinin içinde bulunmuştur; P325A, Laminin G-like 1 domaininde, D746N ise Fibrinogen C-terminal domaininde lokalizedir. Bu varyantlar *CASPR2*'nin partner proteinleri ile etkileşimlerini etkileyebilir.

Araştırmalar, otizm tanısı almış çocukların kardeşlerinde otizm riskinin topluma göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Otizmliler çocukların kardeşleri, otizm tanısı almamış olsalar bile dil becerilerinde eksiklikler gözlemlenebilir (Kardaş, 2023). Literatürde dil problemleri, genellikle (subklinik) otistik özellik olarak nitelendirilmektedir. OSB tanılı 67 çocuk ve normal gelişim gösteren 57 çocuğun dahil edildiği bir çalışmada (Shiota ve ark., 2021) tipik gelişen çocuklarda *CNTNAP2* rs2710102 konumunda A alleli (AA + AG) taşıyanların, GG homozigot olanlara kıyasla

anlamli derecede daha du k sosyal cevaplilik sergiledikleri (otizm benzeri belirti kumesine sahip olduklari) gosterilmistir. Kodominant kalitim modelinin onerildi i bu calı mada rs2710102'nin A alelinin zeka ve otistik ozellikler icin; G alelinin ise genel populasyonda dil becerileri icin risk faktoru oldu u ifade edilmistir.

Igi cekici bir ba ka calı mada, otizm semptomatolojisi iddeti ile, de novo mutasyon sayisi arasında do rusal ili ki gozlemlenmistir (Guo ve ark., 2018). Yazarlar 'Otizm/geli imsel gecikme risk genlerindeki kalitsal ve multipl de novo mutasyonlar, multifaktoriyel bir model onerir' bali kli makalede bahsettikleri multifaktoriyel model ile; nadir veya buyuk etkiye sahip *de novo* varyantların hastalik etiyojisinde ve fenotip iddetinde temel sorumlu oldu u, ancak nihai sonucun polimorfizmler, cevre veya geli im sırasındaki rastlantısal olaylar gibi di er faktorer tarafından etkilenebilece ini spekule etmistir. Bu da karma ık bir tabloya sahip hastalıklarda, genetik faktorerin nasıl etkile ime girdi ini anlamak icin tek bir genin incelenmesinin yeterli olmadı nı gostermektedir.

CNTNAP2 varyantlarının kalitim kalibi tartı malıdır. D'Onofrio ve arkadaları 2023 yılında bugüne kadar *CNTNAP2* varyantlarına sahip hastaların en buyuk kohortunu bildirdi. Mono- (n=2) ve biallelik (n=20) *CNTNAP2* varyantlarına sahip 22 yeni hastayı ve ek olarak literatürde daha önce yayınlanmı 50 hastayı (15 monoallelik ve 35 biallelik varyant) gözden geçirdikleri bu calı mada, tüm hastaların ciddi konu ma bozuklu u ya adı ı raporlandı. Ayrıca *CNTNAP2*'de biallelik varyantlara sahip olmanın monoallelik varyantlara kıyasla dil bozuklu u ($p = 0.020$) ile anlamlı bir ekilde ili kili oldu u vurgulandı. Bu calı mada yedisi yeni ke fedilen (novel) olmak üzere toplamda 12 farklı patojenik/olası patojenik *CNTNAP2* varyantı (3 çerçeve kayması, 4 nonsense, 1 splice bölge, 4 intragenik delesyon), 2 farklı önemi bilinmeyen *CNTNAP2* varyantı (1 çerçeve kayması, 1 splice bölge) saptanmıştır. ki heterozigot varyant hariç, tüm bireylerde biallelik varyant (16 homozigot, 4 bile ik heterozigot) ve tam penetrans bulunmuştur. Genotip-fenotip ili kisinin tartı ldi ı makalede *CNTNAP2* eksikli i ile ilintili nörogeli imsel bozuklu un yalnızca otozomal resesif bir hastalik oldu u; heterozigot varyantların otozomal dominant kalitim kalibini takip etmesinin daha az muhtemel oldu u ileri sürülmü tür (D'Onofrio ve ark., 2023). Gregor ve ark (2011), otozomal resesif Pitt- Hopkins sendromu benzeri bozuklu a (ciddi kognitif gerili e) sahip 99 bireyde yaptıkları ara tırmada, dördü dizi de i ikli i (2 splice bölge, 1 nonsense, 1 çerçeve kayması), üçü intragenik delesyon (ekzon 2-3, ekzon 3-4, ekzon 21-24) olmak üzere 7 hastada *CNTNAP2*'de heterozigot fonksiyon kaybettirici

varyantlar tespit etmi tir. Delesyon saptanan hastalarda di er allel için dizileme de yapılmı tır ancak ikinci bir defekt tespit edilememi tir. 7 hastadan birinde (ekzon 21-24 delesyonu) mutasyon de novo olup, di er test edilen tüm ailelerde ebeveynlerden birinin ilgili mutasyonun sa lıklı ta ıyıcısı oldu u gösterilmi tir. Ciddi etkilenmi hastalarla veya hafif etkilenmi /asemptomatik ta ıyıcı ebeveynler arasındaki büyük fenotipik de i kenlik, aynı gen içinde olmasa da ikinci bir vuru ('second hit') varlı ını, di er ifadeyle oligogenik bir etkinin varlı ını dü üdürebilir.

SETBP1 geni incelendi inde, Clinvar ve LOVD (Leiden Open Variation Database) veritabanlarında bugüne kadar 67'si patojenik olmak üzere 145 farklı varyant için kürasyon yapıldı ı, bunların yakla ık dörtte üçünün yeni nesil dizileme ile tespit edilebilecek tipte varyantlar oldu u görülmektedir (son güncelleme tarihi 16 Nisan 2023). Patojenik varyantların %37.3'ü delesyon, %10.4'ü duplikasyon olmak üzere % 47,7'sinin LoF yaratan kopya sayısı de i iklikleri olması dikkat çekicidir. Çalı mamızda kopya sayısı de i imleri analiz edilmemi tir. Bununla birlikte *SETBP1* geninde tespit etti imiz be varyanttan biri olan rs11082414 (V231L)'nin homozigot bulunma sıklı ı kontrollere kıyasla vaka grubunda anlamlı derecede yüksek idi. In siliko programlarda etkisi tolere edilebilir ekinde öngörülen bu SNV literatürde daha önce de GDB hasta kohortunda dil becerileri ile ili kili bulunmu tur. Kornilov ve arkadaş ları (2016) V231L varyasyonunun beyinde *SETBP1* ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabilece ini raporlamı tır. Bu gözlemler bir araya getirildi inde, *SETBP1* genindeki rs11082414/CC varyasyonunun GDB fenotipine katkıda bulunabilece i dü ünülmektedir. Aynı çalı mada V231L'ye ek olarak rs3744825 ve rs1064204 varyantları bildirilmi tir (Kornilov ve ark., 2016). rs3744825 ve rs1064204 bizim çalı mamızda hem vaka hem kontrol gruplarında tespit edilen ve gruplar arası istatistiksel fark göstermeyen *SETBP1* varyantlarındandır. Belirli varyantların sıklı ı ve etkilerinde popülasyonlar arası önemli farklılıklar olabilmektedir.

Çalı mamızın istatistiksel analizlerinde *SETBP1* geninde öne çıkan rs11082414/CC genotipi, *CNTNAP2* geninde öne çıkan rs186624619-T, rs17170742-T, rs373599564-A allelleri ve P325A, D746N varyantlarının GDB ile ili kili bir yolda mutasyon yükü yaratması olasıdır. Mutasyon yükü, penetran bir patojenik varyanttan kaynaklanan belirli bir özelli in, aynı fonksiyonel ünite içinde hareket eden di er genleri etkileyen ek varyantlar tarafından; ciddiyet, karakter, ba langıç zamanı açısından de i tirilebilece i gözlemini ifade eder. Bahsedilen ek varyantlar tek ba ına penetran olmayabilir veya bir ailedeki hastalıkla mükemmel bir ekinde segregasyon

göstermeyebilir, ancak bazı durumlarda gözlenen aile içi fenotipik de i kenli in gözlemlenmesini açıklayabilir. Daha iddetli fenotiplere sahip bireyler, primer etiyolojik patojenik varyanta ek olarak daha yüksek mutasyon yüküne sahip olabilir.

Bir kez daha ifade etmek gerekirse, tipik dil geli imi, birçok genin karma ık bir ekilde mekansal ve zamansal olarak do ru bir ekilde i birli i yapmasına ba lıdır. Bu sebeple GDB gibi multifaktöriyel bozuklukların genetik etiyoloji açısından homojen olması pek olası de ildir. Birçok farklı genetik lokusta etki gücü zayıf ancak etkile im içinde iken önem arz eden birden fazla varyant GDB riskinin artı ından sorumlu olabilir veya birkaç lokus, belirleyici etki gösterirken ba ka lokuslardaki genler düzenleyici etki gösterebilir. Fenotipik çe itlili e katkı sa layıcı genetik faktörleri ve modifikatörleri belirlemek, gelecekte yapılacak kapsamlı çalı malar ve meta-analizlerle mümkün olacaktır. Alandaki geli melerin ilerleyen zamanlarda GDB'yi altta yatan genetik de i ikliklere göre sınıflandırma ve tedavi yakla ımı geli tirme gibi önemli etkileri olması muhtemeldir.

Literatürde, yaygın multifaktöriyel bozukluklara genetik yatkınlı ı de erlendirmenin klinik yararı tartı malı olmakla birlikte, hastalıklara yatkınlı a katkıda bulunan dizi varyantlarını tanımlamak ve tedavi/önleyici önlemler geli tirmek medikal geneti in önemli bir hedefidir. Nörolojik ve psikiyatrik bozukluklarla ili kili olsun veya olmasın, dil bozukluklarında etiyolojiden sorumlu genleri tanımlamak hastalı ın erken te hisi ile prognozun iyile mesinin yanısıra yüksek riskli aile üyelerinin belirlenmesi ve zamanında müdahalele edilmesi için klinik fayda sa layabilir. Konu ma ve dil bozuklu u olan çocuklar için genetik test kararları, fenotip, semptom iddeti, aile geçmi i gibi faktörlere dayalı olarak bireyselle tirilmelidir.

Bu çalı ma, Türk çocuklarda *CNTNAP2* ve *SETBP1* aday genleri ile geli imsel dil bozuklu u arasındaki ili kiyi inceleyen ilk çalı madır. Çalı mamızın en önemli limitasyonu yalnızca iki aday genin de erlendirilebilmesidir. Aday gen yakla ımı sadece üphelenilen genlerin varyantları hakkında bilgi verirken, klinik ekzom dizileme, tüm ekzom dizileme gibi bütüncül yakla ımlar, klinik öneme sahip birçok gen varyantını ve oligogenik kombinasyonları tanımlamaya olanak sa lar. Buna ilave olarak, hastalı ın etiyolojisinde önemi olmasına ra men, yeni nesil dizileme ile tespit edilemeyecek varyasyonlar (kopya sayısı de i imleri, epigenetik modifiye ediciler) gözden kaçırılabilir.

Çok katmanlı kompleks etkile imler sonucu olu ması sebebiyle, günümüzde Geli imsel (Primer) dil bozuklu u vakalarının %5'inden azında etiyoloji

aydınlatılabilir. Ara tırma kapsamında GDB için aday *CNTNAP2* ve *SETBP1* genlerine tüm gen dizileme yapılmı , saptanan polimorfizmlerin klinik önemini de erlendirmek amacıyla vaka ve kontrol grupları arasında allel ve genotip frekansları karşılaştırılmı tır; nadir varyantların ise aile içindeki segregasyonu araştırılmı tır. Bununla beraber, seçilen çevresel faktörlerin (prenatal dönemde nikotin maruziyeti, maternal hastalıklar, doğum haftası, doğum ağırlığı, ebeveynlerin sosyoekonomik durumu, ebeveyn eğitimi düzeyi, anne sütü alma süresi, ekran maruziyeti gibi) ekspresif dil gelişimi üzerine etkisi de erlendirilmemi tır. GDB grubunda ortalama laktasyon süresi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p=0,044$); *SETBP1* rs11082414/CC genotip sıklığı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,024$). Sonuçlarımız *SETBP1*'in dil üzerindeki rolünü göstermekle birlikte; popülasyonda yaygın *CNTNAP2* varyantlarının GDB yatkınlığına katkıda bulunma olasılığının düşük olduğunu göstermektedir. *CNTNAP2*'de rs186624619, rs17170742, rs373599564 polimorfizmlerin yanı sıra iki nadir varyant (P325A, D746N) sadece vaka grubunda tespit edilmiştir. Bu varyantlar ile diğer aday genlerde tanımlanan varyantlar arasında sinerjistik bir etki olasılığı göz ardı edilemez. *CNTNAP2* varyantlarının dil gelişimini etkileyip etkilemediğini açıkla kavuşturmak için gelecek çalışmalarda örneklem boyutunu artırmayı hedeflemekteyiz.

6 KAYNAKLAR

- Abrahams, B. S., Tentler, D., Perederiy, J. V., Oldham, M. C., Coppola, G., & Geschwind, D. H. Genome-wide analyses of human perisylvian cerebral cortical patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17849-54. (2007).
- Adhikari, S., & Rao, K. S. Neurodevelopmental outcome of term infants with perinatal asphyxia with hypoxic ischemic encephalopathy stage II. *Brain and Development*, 39(2), 107-11. (2017).
- Alarcón, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *The American Journal of Human Genetics*, 82(1), 150-9. (2008).
- Alcock, K. J., Passingham, R. E., Watkins, K. E., & Vargha-Khadem, F. Oral dyspraxia in inherited speech and language impairment and acquired dysphasia. *Brain and language*, 75(1), 17-33. (2000).
- Andres, E. M., Earnest, K. K., Zhong, C., Rice, M. L., & Raza, M. H. Family-based whole-exome analysis of specific language impairment (SLI) identifies rare variants in BUD13, a component of the retention and splicing (RES) complex. *Brain sciences*, 12(1), 47. (2021).
- Andres, E. M., Hafeez, H., Yousaf, A., Riazuddin, S., Rice, M. L., Basra, M. A. R., et al. A genome-wide analysis in consanguineous families reveals new chromosomal loci in specific language impairment (SLI). *European journal of human genetics*, 27(8), 1274-85. (2019).
- Andres, E. M., Neely, H., Hafeez, H., Yasmin, T., Kausar, F., Basra, M. A. R., et al. Study of rare genetic variants in TM4SF20, NFXL1, CNTNAP2, and ATP2C2 in Pakistani probands and families with language impairment. *Meta Gene*, 30, 100966. (2021).
- Bakkaloglu, B., O'Roak, B. J., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., et al. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *The American Journal of Human Genetics*, 82(1), 165-73. (2008).
- Bishop, D., & Hayiou Thomas, M. Heritability of specific language impairment depends on diagnostic criteria. *Genes, Brain and Behavior*, 7(3), 365-72. (2008).
- Bishop, D. V., Snowling, M. J., Thompson, P. A., Greenhalgh, T., Consortium, C., Adams, C., et al. Phase 2 of CATALISE: A multinational and multidisciplinary Delphi consensus study of problems with language development: Terminology. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 58(10), 1068-80. (2017).
- Botting, N., Powls, A., Cooke, R. W., & Marlow, N. Attention deficit hyperactivity disorders and other psychiatric outcomes in very low birthweight children at 12 years. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 38(8), 931-941. (1997).
- Catani, M., Jones, D. K., & Ffytche, D. H. Perisylvian language networks of the human brain. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 57(1), 8-16. (2005).

- Chen, X. S., Reader, R. H., Hoischen, A., Veltman, J. A., Simpson, N. H., Francks, C., et al. Next-generation DNA sequencing identifies novel gene variants and pathways involved in specific language impairment. *Scientific reports*, 7(1), 1-17. (2017).
- Chonchaiya, W., & Pruksananonda, C. Television viewing associates with delayed language development. *Acta Paediatrica*, 97(7), 977-82. (2008).
- Cohen, N. J., Barwick, M. A., Horodezky, N. B., Vallance, D. D., & Im, N. Language, achievement, and cognitive processing in psychiatrically disturbed children with previously identified and unsuspected language impairments. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 39(6), 865-77. (1998).
- Collisson, B. A., Graham, S. A., Preston, J. L., Rose, M. S., McDonald, S., & Tough, S. Risk and protective factors for late talking: An epidemiologic investigation. *The Journal of pediatrics*, 172, 168-174. (2016).
- Courtenay Frazier Norbury, R. P. (2015). Disorders of speech, language, and communication. In D. S. P. AnitaThapar, James F. Leckman, Stephen Scott, Margaret J. Snowling, Eric Taylor (Ed.), *Rutter's Child and Adolescent Psychiatry (Sixth ed., pp. 683-701)*: JohnWiley & Sons, Ltd.
- Çakır, T. (2013). Çocukta Dil Gelişimi Ve Kuramsal Yaklaşımlar. *Sakarya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, (7), 110-134.
- Çiyiltepe, M., & Türkbay, T. Konuşmanın bileşenleri ve konuşma gecikmesi olan çocukların değerlendirilmesi: Gözden geçirme. (2004).
- Dağabakan, F. Ö., & Dağabakan, D. Dil ve çocukta dil gelişim kuramları. (2007).
- Demirci, A., & KARTAL, M. Çocukluk dönemine ait önemli bir sorun: Gelişime geriliği ve erken tanının önemi. *The Journal of Turkish Family Physician*, 3(4), 1-6. (2012).
- Deoni, S. C., Dean III, D. C., Piryatinsky, I., O'Muircheartaigh, J., Waskiewicz, N., Lehman, K. ve ark. Breastfeeding and early white matter development: A cross-sectional study. *Neuroimage*, 82, 77-86. (2013).
- D'Onofrio, G., Accogli, A., Severino, M., Caliskan, H., Kokotović, T., Blazekovic, A. ve ark. Genotype-phenotype correlation in contactin-associated protein-like 2 (CNTNAP-2) developmental disorder. *Human Genetics*, 142(7), 909-925. (2023).
- Eising, E., Carrion-Castillo, A., Vito, A., Strand, E. A., Jakielski, K. J., Scerri, T. S., et al. A set of regulatory genes co-expressed in embryonic human brain is implicated in disrupted speech development. *Molecular psychiatry*, 24(7), 1065-78. (2019).
- Elia, J., Gai, X., Xie, H., Perin, J., Geiger, E., Glessner, J., et al. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Molecular psychiatry*, 15(6), 637-46. (2010).
- Feldman, H. M. (2019). How young children learn language and speech. *Pediatrics in review*, 40(8), 398-411.
- Fisher, E. L. A systematic review and meta-analysis of predictors of expressive-language outcomes among late talkers. *Journal of speech, language, and hearing research*, 60(10), 2935-48. (2017).

- Gale, C. R., & Martyn, C. N. Birth weight and later risk of depression in a national birth cohort. *The British Journal of Psychiatry*, 184(1), 28-33. (2004).
- Gregor, A., Albrecht, B., Bader, I., Bijlsma, E. K., Ekici, A. B., Engels, H. ve ark. Expanding the clinical spectrum associated with defects in CNTNAP2 and NRXN1. *BMC medical genetics*, 12, 1-12. (2011).
- Guerra, J., & Cacabelos, R. Genomics of speech and language disorders. *Journal of Translational Genetics and Genomics*, 3, 9. (2019).
- Guo, H., Wang, T., Wu, H., Long, M., Coe, B. P., Li, H. ve ark. Inherited and multiple de novo mutations in autism/developmental delay risk genes suggest a multifactorial model. *Molecular autism*, 9(1), 1-12. (2018).
- Hickok, G., & Poeppel, D. Neural basis of speech perception. *Neurobiology of language*, 299-310. (2016).
- Hildebrand, M. S., Jackson, V. E., Scerri, T. S., Van Reyk, O., Coleman, M., Braden, R. O., et al. Severe childhood speech disorder: Gene discovery highlights transcriptional dysregulation. *Neurology*, 94(20), e2148-e67. (2020).
- Horresh, I., Poliak, S., Grant, S., Brecht, D., Rasband, M. N., & Peles, E. Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14213-22. (2008).
- Horwitz, S. M., Irwin, J. R., Briggs-Gowan, M. J., Heenan, J. M. B., Mendoza, J., & Carter, A. S. Language delay in a community cohort of young children. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 42(8), 932-40. (2003).
- Irani, S. R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K. A., Pettingill, P., Zuliani, L. ve ark. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*, 133(9), 2734-2748. (2010).
- Kang, C., & Drayna, D. Genetics of speech and language disorders. *Annual review of genomics and human genetics*, 12, 145-64. (2011).
- Karatekin , Karabayır N. Anne sütü ile Beslenmenin Dil ve Konu ma Geli imine Etkisi. Gündo du Z, editör.Çocuklarda Dil ve Konu ma Geli imi ve Sorunlarında Yakla ım. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; p.5-8. 2023.
- Kayıran, S., ahin, S. A., & Sena, C. Pediatri perspektifinden Çocuklarda konu ma ve dil gecikmesine yakla ım. *Marmara Medical Journal*, 25(1), 1-4. (2012).
- Klee, T., Carson, D. K., Gavin, W. J., Hall, L., Kent, A., & Reece, S. Concurrent and predictive validity of an early language screening program. *Journal of speech, language, and hearing research*, 41(3), 627-41. (1998).
- Kornilov, S. A., Rakhlin, N., Kuposov, R., Lee, M., Yrigollen, C., Caglayan, A. O., et al. Genome-wide association and exome sequencing study of language disorder in an isolated population. *Pediatrics*, 137(4). (2016).
- Leung, A. K., & Kao, C. P. Evaluation and management of the child with speech delay. *American family physician*, 59(11), 3121. (1999).

- Leventakou, V., Roumeliotaki, T., Koutra, K., Vassilaki, M., Mantzouranis, E., Bitsios, P. ve ark. Breastfeeding duration and cognitive, language and motor development at 18 months of age: Rhea mother–child cohort in Crete, Greece. *J Epidemiol Community Health*, 69(3), 232-239. (2015).
- Li, D., Zhang, L., Bai, T., Huang, W., Ji, G.-J., Yang, T., et al. Common variants of the autism-associated CNTNAP2 gene contribute to the modulatory effect of social function mediated by temporal cortex. *Behavioural Brain Research*, 409, 113319. (2021).
- Lu, Z., Reddy, M. S., Liu, J., Kalichava, A., Liu, J., Zhang, L. ve ark. Molecular architecture of contactin-associated protein-like 2 (CNTNAP2) and its interaction with contactin 2 (CNTN2). *Journal of Biological Chemistry*, 291(46), 24133-24147. (2016).
- Luyster, R. J., Seery, A., Talbott, M. R., & Tager Flusberg, H. Identifying early risk markers and developmental trajectories for language impairment in neurodevelopmental disorders. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 17(2), 151-9. (2011).
- Martinelli, A., Rice, M. L., Talcott, J. B., Diaz, R., Smith, S., Raza, M. H., et al. A rare missense variant in the ATP2C2 gene is associated with language impairment and related measures. *Human molecular genetics*, 30(12), 1160-71. (2021).
- McCauley, R. J. (2013). *Assessment of language disorders in children*: Psychology Press.
- Michael J. Meaney, K. J. O. D. (2015). Epigenetics and the developmental origins of vulnerability for mental disorders In D. S. P. AnitaThapar, James F. Leckman, Stephen Scott, Margaret J. Snowling, Eric Taylor (Ed.), *Rutter’s Child and Adolescent Psychiatry* (Sixth ed.): JohnWiley & Sons, Ltd.
- Michelle M. Macias, A. C. L., Shruti Mittal. (2018). Speech and Language Development and Disorders. In M. M. M. Robert G. Voigt, Scott M. Myers, Carl D. Tapia (Ed.), *AAP Developmental and Behavioral Pediatrics* (Second ed., pp. 347-66). United States of America: American Academy of Pediatrics
- Morgan, A., Braden, R., Wong, M. M., Colin, E., Amor, D., Liégeois, F., et al. Speech and language deficits are central to SETBP1 haploinsufficiency disorder. *European journal of human genetics*, 29(8), 1216-25. (2021).
- Mountford, H. S., Braden, R., Newbury, D. F., & Morgan, A. T. The Genetic and Molecular Basis of Developmental Language Disorder: A Review. *Children*, 9(5), 586. (2022).
- Mountford, H. S., & Newbury, D. F. The genomic landscape of language: Insights into evolution. *Journal of Language Evolution*, 3(1), 49-58. (2018).
- Nascimento, P., Bossolani-Martins, A., Rosan, D., Mattos, L., Brandão-Mattos, C., & Fett-Conte, A. Single nucleotide polymorphisms in the CNTNAP2 gene in Brazilian patients with autistic spectrum disorder. *Genet Mol Res*, 15(1), 123. (2016).
- Nelson, H. D., Nygren, P., Walker, M., & Panoscha, R. Screening for speech and language delay in preschool children: systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Pediatrics*, 117(2), e298-e319. (2006).
- Newbury, D., Paracchini, S., Scerri, T., Winchester, L., Addis, L., Richardson, A. J., et al. Investigation of dyslexia and SLI risk variants in reading-and language-impaired subjects. *Behavior genetics*, 41(1), 90-104. (2011).

- Newbury, D. F., Bishop, D. V., & Monaco, A. P. Genetic influences on language impairment and phonological short-term memory. *Trends in cognitive sciences*, 9(11), 528-34. (2005).
- Newbury, D. F., & Monaco, A. P. Genetic advances in the study of speech and language disorders. *Neuron*, 68(2), 309-20. (2010).
- Newbury, D. F., Winchester, L., Addis, L., Paracchini, S., Buckingham, L.-L., Clark, A., et al. CMIP and ATP2C2 modulate phonological short-term memory in language impairment. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), 264-72. (2009).
- O'Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature genetics*, 43(6), 585-9. (2011).
- Pediatrics, A. A. o. Media and young minds: Council on communications and media. *Pediatrics*, 138(5), 1-6. (2016).
- Peñagarikano, O., & Geschwind, D. H. What does CNTNAP2 reveal about autism spectrum disorder? *Trends in molecular medicine*, 18(3), 156-63. (2012).
- Petrin, A. L., Giacheti, C. M., Maximino, L. P., Abramides, D. V., Zanchetta, S., Rossi, N. F., et al. Identification of a microdeletion at the 7q33 q35 disrupting the CNTNAP2 gene in a Brazilian stuttering case. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152(12), 3164-72. (2010).
- Piazza, R., Magistroni, V., Redaelli, S., Mauri, M., Massimino, L., Sessa, A., et al. SETBP1 induces transcription of a network of development genes by acting as an epigenetic hub. *Nature communications*, 9(1), 2192. (2018).
- Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J. L., et al. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*, 24(4), 1037-47. (1999).
- Poliak, S., & Peles, E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 968-80. (2003).
- Poot, M., Beyer, V., Schwaab, I., Damatova, N., van't Slot, R., Prothero, J., et al. Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. *neurogenetics*, 11, 81-9. (2010).
- Rakhlin, N., Landi, N., Lee, M., Magnuson, J. S., Naumova, O. Y., Ovchinnikova, I. V., et al. Cohesion of Cortical Language Networks During Word Processing Is Predicted by a Common Polymorphism in the SETBP1 Gene. *New directions for child and adolescent development*, 2020(169), 131-55. (2020).
- Rescorla, L., & Achenbach, T. M. Use of the Language Development Survey (LDS) in a national probability sample of children 18 to 35 months old. (2002).
- Rescorla, L., & Alley, A. Validation of the language development survey (LDS). (2001).
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. 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. *Genetics in medicine*, 17(5), 405-23. (2015).

- Robinson, R. J. Causes and associations of severe and persistent specific speech and language disorders in children. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 33(11), 943-62. (1991).
- Rodenas-Cuadrado, P., Ho, J., & Vernes, S. C. Shining a light on CNTNAP2: complex functions to complex disorders. *European journal of human genetics*, 22(2), 171-8. (2014).
- Roulstone, S., Loader, S., Northstone, K., & Beveridge, M. The speech and language of children aged 25 months: Descriptive data from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Early Child Development and Care*, 172(3), 259-68. (2002).
- Sampath, S., Bhat, S., Gupta, S., O'Connor, A., West, A. B., Arking, D. E., et al. Defining the contribution of CNTNAP2 to autism susceptibility. *PloS one*, 8(10), e77906. (2013).
- Seyhun Topbas, M. Y. (2010). *Communication Disorders in Turkish Canada: Channel View*.
- Shiota, Y., Hirose, T., Yoshimura, Y., Tanaka, S., Hasegawa, C., Iwasaki, S., et al. A common variant of CNTNAP2 is associated with sub-threshold autistic traits and intellectual disability. *PloS one*, 16(12), e0260548. (2021).
- Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Huentelman, M. J., Gottlieb, S., Dobrin, S. E., Parod, J. M., et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *New England Journal of Medicine*, 354(13), 1370-7. (2006).
- Sunderajan, T., & Kanhere, S. V. Speech and language delay in children: Prevalence and risk factors. *Journal of family medicine and primary care*, 8(5), 1642. (2019).
- Tan, G. C., Doke, T. F., Ashburner, J., Wood, N. W., & Frackowiak, R. S. Normal variation in fronto-occipital circuitry and cerebellar structure with an autism-associated polymorphism of CNTNAP2. *Neuroimage*, 53(3), 1030-1042 (2010).
- Tomblin, J. B., Records, N. L., Buckwalter, P., Zhang, X., Smith, E., & O'Brien, M. Prevalence of specific language impairment in kindergarten children. *Journal of speech, language, and hearing research*, 40(6), 1245-60. (1997).
- Torun, . (2018). *Beyin ve Dil, İlevsel Nöroanatomi: Dietary Payne*.
- Tunçeli, H. ., & Zembat, R. Erken çocukluk döneminde gelişimin değerlendirilmesi ve önemi. *Eğitim Kuram ve Uygulama Araştırmaları Dergisi*, 3(3), 1-12. (2017).
- Türkbay, T. (2021). Konu ma ve dile özgü gelişimsel bozukluklar (iletilim bozuklukları). In E. S. E. Aynur Pekcanlar Akay (Ed.), *Çocuk Ve Ergen Ruh Sağlığı Ve Hastalıkları* (kinci ed., pp. 96-113): Türkiye Çocuk ve Genç Psikiyatrisi Derneği.
- Uddin, M. S., Azima, A., Aziz, M. A., Aka, T. D., Jafrin, S., Millat, M. S., et al. CNTNAP2 gene polymorphisms in autism spectrum disorder and language impairment among Bangladeshi children: a case-control study combined with a meta-analysis. *Human Cell*, 34(5), 1410-23. (2021).
- Van der Lely, H. K., & Pinker, S. The biological basis of language: Insight from developmental grammatical impairments. *Trends in cognitive sciences*, 18(11), 586-95. (2014).

- Van Lieshout, R. J., Savoy, C. D., Ferro, M. A., Krzeczkowski, J. E., & Colman, I. Macrosomia and psychiatric risk in adolescence. *European child & adolescent psychiatry*, 29, 1537-1545. (2020).
- Van Noort-van der Spek, I. L., Franken, M.-C. J., & Weisglas-Kuperus, N. Language functions in preterm-born children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, 129(4), 745-54. (2012).
- Vernes, S. C., Newbury, D. F., Abrahams, B. S., Winchester, L., Nicod, J., Groszer, M., et al. A functional genetic link between distinct developmental language disorders. *New England Journal of Medicine*, 359(22), 2337-45. (2008).
- Whalley, H. C., O'Connell, G., Sussmann, J. E., Peel, A., Stanfield, A. C., Hayiou Thomas, M. E. et al. Genetic variation in CNTNAP2 alters brain function during linguistic processing in healthy individuals. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156(8), 941-948. (2011).
- Whitehouse, A. J., Bishop, D. V., Ang, Q., Pennell, C. E., & Fisher, S. E. CNTNAP2 variants affect early language development in the general population. *Genes, Brain and Behavior*, 10(4), 451-6. (2011).
- William B. Carey, A. C. C., Ellen Roy Elias, William L. Coleman. (2009). Language and speech disorders. In H. M. Feldman (Ed.), *Developmental-Behavioral Pediatrics: Expert Consult* (4th ed., pp. 717-29): Saunders.
- Wiszniewski, W., Hunter, J. V., Hanchard, N. A., Willer, J. R., Shaw, C., Tian, Q., et al. TM4SF20 ancestral deletion and susceptibility to a pediatric disorder of early language delay and cerebral white matter hyperintensities. *The American Journal of Human Genetics*, 93(2), 197-210. (2013).
- Yasin, A., Aksu, H., Özgür, E., & Özgür, B. G. Speech and language delay in childhood: a retrospective chart review. *ENT Updates*, 7(1). (2017).
- Zimmerman, F. J., Christakis, D. A., & Meltzoff, A. N. Associations between media viewing and language development in children under age 2 years. *The Journal of pediatrics*, 151(4), 364-8. (2007).
- Zubrick, S. R., Taylor, C. L., Rice, M. L., & Slegers, D. W. Late language emergence at 24 months: An epidemiological study of prevalence, predictors, and covariates. (2007).

EK-1

**N.E.Ü. TIP FAKÜLTES TIBB GENET KANAB L M DALI
PROJE 221518044 KATILIMCI DE ERLEND RME FORMU**

Katılımcı No (Adı, Soyadı ekleyiniz):

Tarih:

Do um tarihi:

Cinsiyeti:

Anne Adı, Soyadı :

Baba Adı, Soyadı:

Etnik köken:

Anne-Baba: 1. Birlikte

2. Ayrı

3. Anne/Baba vefat

Prenatal öykü:

Nikotin maruziyeti

-Sigara kullanan aile üyesi:

-Paket/yıl:

Annenin gebelik sırasındaki hastalıkları ve kullandığı ilaçlar:

Perinatal öykü:

Do um haftası:

Do um kilosu:

Do um ekli (Zor do um, asfiksi, travma vb- varsa belirtin):

Küvöz, sarılık, nöbet öyküsü:

Postnatal öykü:

Anne sütü alma süresi:

Nöromotor gelişim basamakları (ba tutma: desteksiz oturma: yürüme:)

Çevresel faktörler:

Aynı evde yaayan birey sayısı:

Kaçıncı çocuk:

Günün ço unlu unda kiminle etkile im kurar?

Bakıcı (varsa haftada kaç saat/gün belirtiniz):

Kre (varsa haftada kaç saat/gün belirtiniz):

Ekran maruziyeti

-TV, telefon, bilgisayar ile vakit geçirme süresi (toplam saat):

Fizik Muayene

Vücut a ırlı ı:

Boy:

Ba çevresi:

Dismorfik Bulgular (varsa):

Tıbbi testler

Odyometri:

AGTE:

Soygeçmi (pedigri ekleyiniz)

EK-2

SOSYOEKONOMİK VERİ FORMU

Katılımcı No:

Tarih:

Yaş :

Cinsiyet: 1-Erkek 2- Kız

Anne Yaşı:

Anne Eğitim Durumu (mezuniyet):

- 1- Okur Yazar değil
- 2- İlkokul
- 3- Ortaokul
- 4- Lise
- 5- Üniversite
- 6- Yüksek Lisans

Baba Yaşı:

Baba Eğitim Durumu (mezuniyet):

- 1- Okur Yazar değil
- 2- İlkokul
- 3- Ortaokul
- 4- Lise
- 5- Üniversite
- 6- Yüksek Lisans

Ailenin Gelir Durumu:

- 1- Düzenli gelir yok
- 2- Asgari ücret ve altı
- 3- Asgari ücretin iki katından az
- 4- Asgari ücretin iki katından fazla

Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Uzman Görüşü:

EK-3

B LG LEND R LM GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

(Hasta Grubu çocuk rıza formu ile veli/vasi onam formu)

Sayın katılımcı; *CNTNAP2* ve *SETBP1* Gen Varyantlarının Gelişimsel Dil Bozukluğuna Olası Etkisinin Araştırılması başlıklı bu çalışmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yapılan bir araştırmadır. Dünyada ortalama görülme sıklığı %7 olan gelişimsel dil bozukluğu ile ilgili ülkemizde yapılan araştırmalar yeterli düzeyde değildir. Çalışmamız, 3-9 yaş grubunda gelişimsel dil bozukluğu tanımlı 30 hasta ve 30 kontrol grubu çocukta belirli genetik faktörlerin klinik tablo üzerine etkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Araştırmaya katılmanız halinde hastalık öykünüz alınacak, aile ağacınız çizilecek, muayene yapılacak ve ayrıntılı bir psikiyatrik değerlendirme sonucu gelişimsel dil bozukluğu tanısı düşünülen çocuğunuz ve siz ebeveynlerinden kan alınacak ve moleküler genetik analiz yapılacaktır. İfade olarak sosyoekonomik durum göstergeleri hakkında vereceğiniz cevaplar ve çocuğunuzun test (gelişim testi, dil itme testi, genetik test) sonuçları kaydedilecektir. Bu amaçla tanımlanan kriterlere uymadığınızın fark edilmesi halinde çalışmamızı bırakabilirsiniz. Genetik test sonucunda hastayı etkileyebilecek düşünülen bir sonuca ulaşırsa sizinle iletişime geçilerek bilgilendirilme yapılacaktır.

Araştırmamıza katılmanız, genetik test için numune vermeniz, sorularımıza doğru yanıtlar vermeniz durumunda elde edilecek veriler ile gelişimsel dil bozukluklarının ortaya çıkmasını etkileyen faktörler hakkında kanıta dayalı, güvenilir bilgilere ulaşabilmeyi ve bu sayede tanı, takip ve önlemine dair öneriler oluşturularak hastalara katkı sunmayı amaçlamaktayız. Sağlık alanında yapılan akademik çalışmaların ülkemiz sağlık politikalarını yönlendirebildiği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamıza katılmanız bu alanda sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesine de yardımcı olacaktır.

Araştırmaya katılmanız gönüllülük esasına dayalıdır. Bu form aracılığıyla ve genetik test ile elde edilecek bilgiler sadece bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılacaktır ve kimliğiniz gizli tutulacaktır. Çalışmaya katılmanız için sizden veya başlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluğundan bir ücret istenmeyecektir. Formu imzaladıktan sonra vazgeçmeniz halinde araştırmadan çekilebilirsiniz. Çalışma ile ilgili herhangi bir sorunuz olduğunda aşağıdaki bilgileri verilen araştırmacı ile iletişime kurabilirsiniz.

Tıbbi araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama araştırmacı hekim tarafından yapıldı. Bilgilendirilme sonrası kararımı özgürce verebilmem için düşünme zamanı tanındı. Çalışmaya katılmayı kendi rızamla kabul ediyorum.

Katılımcı Adı Soyadı:	Araştırmacı:	Proje yürütücüsü:
Veli/Vasi Adı Soyadı:	mza:	mza:
Adres:		
Telefon:		
mza:		

EK-4

B LG LEND R LM GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

(Kontrol Grubu çocuk rıza formu ile veli/vasi onam formu)

Sayın katılımcı; *CNTNAP2* ve *SETBP1* Gen Varyantlarının Gelişimsel Dil Bozukluğuna Olası Etkisinin Araştırılması başlıklı bu çalışmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yapılan bir araştırmadır. Dünyada ortalama görülme sıklığı %7 olan gelişimsel dil bozukluğu ile ilgili ülkemizde yapılan araştırmalar yeterli düzeyde değildir. Çalışmamız, 3-9 yaş grubunda gelişimsel dil bozukluğu tanıları 30 hasta ve 30 kontrol grubu çocukta belirli genetik faktörlerin klinik tablo üzerine etkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Araştırmaya katılmanız halinde hekim size klinik belirtiler ve sosyoekonomik durum göstergeleri hakkında bir takım sorular soracaktır. Sonrasında yapılacak olan genetik incelemeler için sizden yaklaşık olarak 5 cc kan alınacaktır.

Araştırmamıza katılmanız, genetik test için numune vermeniz, sorularımıza doğru yanıtlar vermeniz durumunda elde edilecek veriler ile gelişimsel dil bozukluklarının ortaya çıkmasını etkileyen faktörler hakkında kanıta dayalı, güvenilir bilgilere ulaşabilmeyi ve bu sayede tanı, takip ve önlemine dair öneriler oluşturularak hastalara katkı sunmayı amaçlamaktayız. Sağlık alanında yapılan akademik çalışmaların ülkemiz sağlık politikalarını yönlendirebildiği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamıza katılmanız bu alanda sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesine de yardımcı olacaktır.

Araştırmaya katılmanız gönüllülük esasına dayalıdır. Bu form aracılığıyla ve genetik test ile elde edilecek bilgiler sadece bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılacaktır ve kimliğinizi gizli tutulacaktır. Çalışmaya katılmanız için sizden veya başlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurulu tarafından bir ücret istenmeyecektir. Formu imzaladıktan sonra vazgeçmeniz halinde araştırmadan çekilebilirsiniz. Çalışma ile ilgili herhangi bir sorunuz olduğunda aşağıdaki bilgileri verilen araştırmacı ile iletişime kurabilirsiniz.

Tıbbi araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama araştırmacı hekim tarafından yapıldı. Bilgilendirilme sonrası kararımı özgürce verebilmem için düşünme zamanı tanındı. Çalışmaya katılmayı kendi rızamla kabul ediyorum.

Katılımcı Adı Soyadı:	Araştırmacı:	Proje yürütücüsü:
Veli/Vasi Adı Soyadı:	mza:	mza:
Adres:		
Telefon:		
mza:		

EK-5

CNTNAP2 geni dizilemesinde kullanılan ileri (F) ve geri (R) primer dizileri

<i>CNTNAP2</i> EKZON-1 F	CCGCACGGAGGGAGAAC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-1 R	GCTGCAAGTGTGTGACAGC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-2 F	ACAGAATTGCCTAAATTCCTTTGCT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-2 R	ACATGAGAGGTTAATGGCATCT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-3 F	ATAGAGCACTGCCAAGACCA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-3 R	AACCATTGGATAGAAATTACAGCCT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-4 F	TCACAAGCCCTACCATTGGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-4 R	AGGTAGTTTATTGTCAGAGAAAGCA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-5 F	ATTCTTTGCAGACACCTGTTGG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-5 R	GCAACATGAACATATTCCTAATGGG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-6 F	AAGTGTCGTTACTTACTGGTATCC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-6 R	TAAATGGCCTGGATAGCATGGTT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-7 F	TGCCATAGATTTTGGAGGCAGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-7 R	ACATCATTTTGCCCAAACACA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-8 F	ATGGTCAGCCTATCACATCAGG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-8 R	AGCATTGGTAAGGAATAGATTTTGC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-9 F	AGAGACATGAGACGTCAGTTTGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-9 R	AGTGGAATTACAGTTTGTTTTGTCA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-10 F	TTGAGTGACAGTAGACCCCAAGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-10 R	TGAATGGTAATTTCCACCTTACCTG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-11 F	TTGGTAAGGCAACCTGGCAT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-11 R	TGGAATCTTGGTTTTTCAGATTCCG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-12 F	AGGAGCTTGCTGTCTTTGGT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-12 R	TTGGGCTGAACTTTGCAACT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-13 F	GAGCAAAGAGCAGGGGGTTT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-13 R	CAGCTTCCTTCCCTACTGAAGACT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-14 F	AGGGTTGAGTGATGTTCCAGACT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-14 R	TCAGTTGGGTTAGTTCCAGACC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-15 F	TGAGACCACCTATGGAAGAGAG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-15 R	CTCTGCTTGGGTTGTGTGATG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-16 F	GTGAGGATTTGGTCCAATGTTGTT

EK-5

CNTNAP2 geni dizilemesinde kullanılan ileri (F) ve geri (R) primer dizileri (*Devamı*)

<i>CNTNAP2</i> EKZON-16 R	GTGTCCACCTCTAGTCCTGCT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-17 F	TGATTTTGCCATCGACCTTTGT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-17 R	GGAGACTACAAGAGGCCAACA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-18 F	GCCTTATAGCCTGCAGGGAG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-18 R	TGATTAGGAAATGATTTTGGTTGGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-19 F	TACTCAGATGCCCTTCCTGGAG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-19 R	CATGGAGAGAAATGGGGTTCAAA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-20 F	GCAGGAATTGAGGGGATGTGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-20 R	CCCTCAAACAAAACCAATGGC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-21 F	CCAGCAAAGGAAGACATGGG
<i>CNTNAP2</i> EKZON-21 R	TCCTGTACAGAGAAGATATTCGTGA
<i>CNTNAP2</i> EKZON-22 F	GCAGCCCTAAATCTTATCGACC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-22 R	CTCACAACGTTTCCTTTGCC
<i>CNTNAP2</i> EKZON-23 F	GAGACAATGGCAAGACGGGT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-23 R	ACTGTGCCCGGCTATATTTACT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-24 F	TATGGGAGAGGGCTGTGTCT
<i>CNTNAP2</i> EKZON-24 R	ATTCCATTATATTCATTGCCTGCC

EK-6

SETBP1 geni dizilemesinde kullanılan ileri (F) ve geri (R) primer dizileri

<i>SETBP1</i> EKZON-2.1 F	CATCGTGTCTCCATCCCTGG
<i>SETBP1</i> EKZON-2.1 R	TTCTTAGCCCGCTTTGTGGT
<i>SETBP1</i> EKZON-2.2 F	GAGGCAAACCTTCACAGAGGGA
<i>SETBP1</i> EKZON-2.2 R	CCCAACCCACGTTGTTCTA
<i>SETBP1</i> EKZON-3 F	CCCCTTCTGTAGCTCTCATCC
<i>SETBP1</i> EKZON-3 R	TCCAAGGTTCTGGGTTTCTGTC
<i>SETBP1</i> EKZON-4.1 F	AAGGTGGCTGTTCATTTCCG
<i>SETBP1</i> EKZON-4.1 R	CTCTTGGGCACTATCTGCGG
<i>SETBP1</i> EKZON-4.2 F	TACGGTGGGCAGCAAGAAAA
<i>SETBP1</i> EKZON-4.2 R	GATGGGATATGCAGACGGGG
<i>SETBP1</i> EKZON-4.3 F	TTGCTGCAAAACGAAGGTGG
<i>SETBP1</i> EKZON-4.3 R	GAAAGTGGGTGCATAGCTGC
<i>SETBP1</i> EKZON-4.4 F	CCCCATCCGAAGAACCCAAA
<i>SETBP1</i> EKZON-4.4 R	GAAGGTGTAACCTCCGGTGGG
<i>SETBP1</i> EKZON-4.5 F	GCCTCAAGAAGCCAAAGCAC
<i>SETBP1</i> EKZON-4.5 R	TCCCTAGGATCCGGTCTTCC
<i>SETBP1</i> EKZON-4.6 F	CCAGTGGTCTGGCTCCATAAG
<i>SETBP1</i> EKZON-4.6 R	AATGTGCAAGGAGACCCATT
<i>SETBP1</i> EKZON-5 F	TTGTTGTACCAGAAGGAGGTGT
<i>SETBP1</i> EKZON-5 R	CTCCCCTTCAAAGAGCCAGT
<i>SETBP1</i> EKZON-6.1 F	CAAGTAGAATGCTAGCTGTCAGTG
<i>SETBP1</i> EKZON-6.1 R	TCCCGGGCCATGTGGAT
<i>SETBP1</i> EKZON-6.2 F	CCACCCAGTTCGATGAGGAC
<i>SETBP1</i> EKZON-6.2 R	TCTGAAGGTGTCTCCCTGCT

EK-7

ANKARA GELİŞİM TARAMA ENVANTERİ

1, 2, 3. Aylar (1, 2, 3 ve 13. Sorular)

Ani ses ya da gürültüden ürüp sızır mı?

Konu uzunca a lama dı ında sesler çıkarır mı? (Cevap evetse nasıl sesler çıkarır?)

Tanıdık bir ses ba nını çevirir mi?

Bebek biberonu, anne memesini görünce hareketlenir, elini kolunu sallar mı?

4, 5. Aylar (14, 15, 16, 20, 21. Sorular)

Bebek sırt üstü yatarken ellerini seyrediyor mu?

Kendi kendine ya da beslenirken a lama dı ında ses çıkarır mı) (Cevap evetse nasıl sesler çıkarır?)

Siz gıdıklamadan, dokunmadan yüksek sesle güler mi?

Biraz uzaktaki oyuncaklara, e yalara uzanır mı?

E yaları eline alıp bakar mı?

6, 7. Aylar (28, 33, 38, 41. Sorular)

Oyuncakları yere atıp dü ü ünü seyrediyor mu?

E ilerek dü en e yaları arar mı?

Elindeki ka ı ı ses çıkarmak için yere vurur mu?

‘Da-da, ba-ba, ma-ma, de-de’ gibi sesler çıkarır mı?

8, 9. Aylar (44, 46. Sorular)

‘Atta’ denildi inde kapıya bakar ya da hareketlenir mi?

Üstüne mendil koydu unuz oyunca ı, mendili çekerek bulur mu?

10, 11. Aylar (54, 58. Sorular)

Babasını görünce ‘baba’, yemek isteyince ‘mama’, su isteyince ‘su’ gibi kelimeler söyler mi?

Bana ver deyince elindeki oyunca ı size uzatır mı?

12, 13. Aylar (61, 66, 67, 70. Sorular)

sted i bir e yayı eliyle gösterir mi?

‘Bana ayakkabını göster’ dersiniz gösterir mi?

Tek tek kelimelerle konu ur mu? (örnek veriniz)

‘Kapıyı kapat’ gibi söylenen basit i leri yapar mı?

EK-7

ANKARA GELİŞİM TARAMA ENVANTERİ (Devamı)

14, 15. Aylar (71. Soru)

Evdeki bazı eşyaların yerlerini bilir mi? Örneğin bardağı mutfakta olduğunu bilir mi?

16, 17. Aylar (80, 81, 82, 83. Sorular)

Arkadaşını söyler ya da mırıldanır mı?

Ki ya da üç kelimeyi açıkça söyler mi? Cevap evetse hangi kelimeleri söyler?

TV’de gördüğü bazı eşyeleri tanır mı? Kedi, araba gibi

‘Topunu/bebeğini kaldır, bardağı içeri götür’ dendiğinde söylenilene yapar mı?

18, 19, 20, 21, 22, 23. Aylar (85, 92, 94, 95, 96, 97, 99. Sorular)

Ki kibrit kutusunu üst üste koyup kule yapar mı?

Ki kelime cümleler kurar mı? Örnek veriniz

Tehlikelerden (ateş, bıçak gibi) kendini korur mu?

Arkadaşının ismini bilir mi? (İsmi yazınız)

Şekillerini basit cümlelerle ifade eder mi?

Bir kutuyu alıp sanki arabaymış gibi yürütür mü, ya da bir sopa parçasını at yerine koyar mı?

‘İlk önce mutfaka git, tabağı al, bana getir’ gibi üç işte işi birden yerine getirir mi?

24, 25, 26, 27, 28, 29. Aylar (102, 103, 105, 106, 107. Sorular)

Elini, ayağını, gözünü, ayağını, burnunu gösterip ‘bu ne’ dersiniz isimlerini doğrudan olarak söyler mi? (Göstererek sorun)

Resimlere ya da TV’ye bakarken tanıdığı eşyaların adını söyler mi?

Basit sorulara ‘evet, hayır’ diye cevap verir mi?

Soru sorar mı? ‘baba nerede’ ‘bu kim’ ‘bu ne’ gibi.

Konuşması kolaylıkla anlaşılır mı?

30, 31, 32, 33, 34, 35. Aylar (111, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 120. Sorular)

Diğer çocukların kız ya da oğlan olduklarını bilir mi?

‘Hangisi büyük’ deyince daha büyük olanı gösterir mi? (Göstererek sorunuz)

Ki-üç gün önceki olayları hatırlayıp anlatır mı? ‘hani çarşıya gitmi tik ya’ gibi.

‘İsmi ne’ diye sorulunca ismini söyler mi?

‘Bayram geliyor’ ‘bir yere gideceğiz’ diye heyecanlanır mı?

‘Ekmeğin yarısını ver’ deyince yarısını verebilir mi? ‘yarım’ın ne demek olduğunu bilir mi?

EK-7

ANKARA GELİŞİM TARAMA ENVANTERİ (Devamı)

Siz konuşurken anlamadığı bir kelime olursa sorar mı? 'ne demek' der mi?

Kutu, makara gibi eşyaları kullanarak oyuncak yapar mı?

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47. Aylar (123, 126, 127, 131, 135.

Sorular)

'Hangisi uzun' diye sorulunca uzun olanı gösterir mi? (Göstererek sorunuz)

Ezbere TV reklamı, şiir, tekerleme söyler mi?

'Nasıl' kelimesini kullanarak soru sorar mı? (Örnek isteyiniz)

Yaşını bilir mi?

'Eğer uslu durursam bana ne verir misin' gibi eşerle başlayan cümleler kurar mı?

48. aydan 72. ayın sonuna kadar (136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 144, 147, 149, 150, 151, 152, 154. Sorular)

Birden ona kadar sayar mı?

Terliklerini doğru giyer mi?

Rüyalarını anlatır mı?

Renkleri bilir mi? (Renk adı verilerek sorulabilir)

Paraları tanır mı? (en az iki)

Bir elde kaç parmak olduğunu bilir mi?

TV'de sevdiği programın zamanını bilir mi?

'Bugün' 'yarın' 'dün' gibi kelimeleri doğru yerinde kullanır mı?

Yediden sonra hangi sayının geldiğini bilir mi?

Ekmek, simit gibi yiyeceklerin kaç para olduğunu bilir mi?

Birer, birer yüze kadar sayar mı?

Haftanın günlerini sırasıyla bilir mi?

Basit toplama işlemleri yapar mı?

Mahallenin, sokakının adını bilir mi?