



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**BİLİŞSEL YETERSİZLİK ETYOLOJİSİNDE
GENETİK TANI YÖNTEMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Murat Hakkı YARAR

UZMANLIK TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Alper Han ÇEBİ

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**BİLİŞSEL YETERSİZLİK ETYOLOJİSİNDE
GENETİK TANI YÖNTEMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Murat Hakkı YARAR

UZMANLIK TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Alper Han ÇEBİ

TRABZON-2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ile tez çalışmam boyunca değerli bilgi, birikim, tecrübe, ilgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan tez danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Alper Han ÇEBİ başta olmak üzere;

Birçok şey paylaştığımız, birlikte çalışmaktan keyif aldığım; değerli asistan arkadaşlarım Dr. Serhat SEYHAN'a, Dr. Hale ÖNDER YILMAZ'a, Dr.Mehmet GÖKCÜ'ye değerli tıbbi laborant arkadaşlarım Günay DİNÇ, Bediha KAYA, Elmaz YAVUZ, Selma KADI YAVUZ, Büşra Nur GÜMRÜKÇÜ ve tıbbi sekreter arkadaşım Aleyna Nisa ÇAKIR'a

Destek ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan sevgili annem, babam, kardeşime...

Varlığıyla hayatıma anlam katan ve desteğiyle her zaman yanımda olan değerli eşim Büşra'ya sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı bilişsel yetersizlik hastalarının en önemli etyolojisi olan genetik nedenlere tanısal yaklaşımı ve kullanılan tanı yöntemlerinin değerlendirilmesidir.

Yöntem: Bilişsel yetersizlik nedeniyle takibi yapılan; hipoksi, travma gibi çevresel etkenlere maruz kalmamış olan, 18 yaşın altındaki 328 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların prenatal-natal-postnatal öyküleri, soyağaçları, hangi durumlarda hangi genetik tanı yönteminin uygulandığı retrospektif olarak incelendi. Elde edilen veriler, güncel literatürdeki veriler ile kıyaslandı.

Bulgular: Takibi yapılan 328 hastanın 179 tanesi erkek (%54.5), 149 tanesi kız (%46.5) hastaydı. Klinik olarak; Williams-Beuren Sendromu düşündüren 7 hastanın 2 tanesinde 7q11.23 delesyonu, Frajil X Sendromu düşündüren 48 hastanın 4 tanesinde FMR1 geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrarı 200'ün üzerinde, Rett Sendromu düşünülen 19 hastanın 5 tanesinde MECP2 geninde mutasyon, Prader Willi-Angelman Sendromu düşünülen 67 hastanın 8 tanesinde 15q11.2 delesyonu tespit edildi. Tanısı bu testlerle konamayan ve kliniği bu hastalıkları düşündürmeyen toplam 309 hastaya yapılan Array CGH çalışmasında 50 hastanın kliniğini açıklayan bir değişiklik tespit edildi. Yapılan diğer testler ile tanısı konamayan ve takibine devam eden 101 hastaya tüm ekzom dizileme(WES) çalışması yapıldı. WES çalışılan hastalardan 34 tanesinde hastanın kliniğini açıklayan mutasyon tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışma bilişsel yetersizlik tanısıyla takibi yapılan hastalara hangi durumda hangi genetik tanı testinin uygulandığı ve uygulanan tanı yöntemlerinin tanı koymadaki başarısının güncel literatür ile kıyasını ortaya koymaktadır. Genotip-fenotip heterojenitesi yüksek olan bilişsel yetersizlik etyolojisini ortaya koymada array CGH, WES gibi genom çapında değerlendirme imkanı sunan yöntemler tanıda yüksek fayda sağlamaktadır. Spesifik kliniği bulunmayan hastalarda bu tanı yöntemlerinin uygulanması; etyolojiyi en kısa sürede ortaya koyarak hastanın tedavisine yön verebilir, ortaya çıkabilecek komplikasyonları azaltma imkanı tanıyabilir, hasta ile çevresine olan maddi-manevi etkisi asgari düzeye indirilebilir ve ailenin sonraki dönemde sağlıklı çocuk sahibi olabilmesinin önünü açılabilir.

Anahtar Kelimeler: Bilişsel yetersizlik, Etiyoloji, Tanı Yöntemleri, Array CGH, WES

SUMMARY

Aim: The aim of this study is to evaluate our diagnostic approach to genetic causes which are the most important etiology of intellectual disability patients and the diagnostic methods used.

Method: Followed up for cognitive deficiency 328 patients under the age of 18 who were not exposed to environmental factors such as hypoxia and trauma were included in the study. The prenatal-natal-postnatal histories, pedigrees, and the genetic diagnosis method used in which situations were analyzed retrospectively. The obtained data were compared with the data in the current literature.

Results: Of the 328 patients followed up, 179 were male (54.5%) and 149 were female (46.5%). Clinically; 7q11.23 deletion in 2 of 7 patients suggestive of Williams-Beuren Syndrome, CGG repeat in 5'UTR region of FMR1 gene in 4 of 48 patients suggesting Fragile X Syndrome, more than 200 CGG repeats in 5'UTR region of FMR1 gene, MECP2 gene mutation in 5 of 19 patients with Rett Syndrome, Prader Willi-Angelman In 8 of 67 patients with suspected syndrome, 15q11.2 deletion was detected. In the Array CGH study conducted on 309 patients who could not be diagnosed with these tests and whose clinic did not suggest these diseases, a change explaining the clinic of 50 patients was found. A whole exome sequencing (WES) study was performed on 101 patients who could not be diagnosed with other tests and who were continuing their follow-up. Mutation explaining the patient's clinic was detected in 34 of the patients studied with WES.

Conclusion: This study demonstrates the comparison of the current literature with which genetic diagnosis test is applied to patients who are followed up with a diagnosis of cognitive deficiency and the success of the diagnostic methods applied. Genome-wide methods such as array CGH and WES provide a high benefit in diagnosis in revealing the etiology of cognitive deficiency with high genotype-phenotype heterogeneity. Application of these diagnostic methods in patients who do not have a specific clinic; By revealing the etiology as soon as possible, it can direct the treatment of the patient, provide the opportunity to reduce the complications that may arise, the material-spiritual impact on the patient and his environment can be minimized, and will pave the way for the family to have healthy children in the next period.

Key words: intellectual disability, Etiology, Diagnostic Methods, array CGH, WES

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Bilişsel Yetersizliğin Tanımı	3
2.2. Bilişsel Yetersizliğin Klinik Özellikleri ve Klinik Sınıfları	6
2.2.1.Hafif Derecede Bilişsel Yetersizlik	7
2.2.2.Orta Derecede Bilişsel Yetersizlik	8
2.2.3. Şiddetli Derecede Bilişsel Yetersizlik	9
2.2.4.Derin Derecede Bilişsel Yetersizlik	9
2.3.Prevalans ve Risk Faktörleri	10
2.4.Komorbidite	12
2.5.BY'nin Çevresel ve Genetik Nedenleri	13
2.5.1. Bilişsel Yetersizliğin Genetik Etiyolojisi	15
2.5.1.1.Kromozomal Değişimler(Sayısal-Yapısal)	15
2.5.1.1.1.Sayısal Kromozomal Anomaliler	16
2.5.1.1.2.Yapısal Kromozomal Anomaliler	17
2.5.1.2.Tek Gen Bozuklukları	20

2.5.1.2.1.Otozomal Dominant Bilişsel Yetersizlik	21
2.5.1.2.2.Otozomal Resesif Bilişsel Yetersizlik	21
2.5.1.2.3.X ile Kalıtılan Bilişsel Yetersizlik	22
2.5.1.3. Epigenetik Bozukluklar	22
2.6.BY Tanısında Sık Kullanılan Genetik Tanı Yöntemleri	23
2.6.1.Karyotipleme	23
2.6.2. Floresan in situ hibridizasyon	23
2.6.3.Array CGH	24
2.6.4.Sanger Dizileme	24
2.6.5.Yeni Nesil Dizileme	25
2.6.6.Nispeten Sık Kullanılan Diğer Yöntemler	26
3.MATERYAL-METOD	28
3.1. Materyal-Metod	28
3.2.İstatistik	37
4.BULGULAR	38
5.TARTIŞMA	69
6.SONUÇ	82
7.KAYNAKLAR	84

KISALTMALAR

1kb	:	1000 baz çifti
1k	:	1000
1Mb	:	1000000 baz çifti
A	:	Arginin
BY	:	Bilişsel Yetersizlik
C	:	Sitozin
CGH	:	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CNV	:	Kopya Sayısı Değişiklikleri
DBY	:	Derin Derecede Bilişsel Yetersizlik
ddNTP	:	dideoksinükleotid trifosfat
DECIPHER	:	DatabasE of genomC varIation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DEHB	:	Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
DNA	:	Deoksiriboz Nükleik Asit
dNTP	:	deoksinükleotid trifosfat
DS	:	Down Sendromu
DSM V	:	Akıl Hastalıkları Tanı ve İstatistik El Kitabı 5. Baskısı
EGH	:	Entelektüel Gelişim Hastalıkları
ES	:	Edwards Sendromu
FISH	:	Floresan in situ hibridizasyon
FXS	:	Frajil X Sendromu
G	:	Guanin
GG	:	Gelişme Geriliği
GRCh37	:	Genom Referans Konsorsiyumu İnsan Yapısı 37
HDBY	:	Hafif Derecede Bilişsel Yetersizlik
hg19	:	İnsan Referans Sekansına
HGMD	:	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
ICD-11	:	Hastalıkların Uluslararası Sınıflandırması 11

IQ	:	Intelligence quotient
TES	:	Klinik Panel; Targeted Exom Sequencing
KS	:	Klinefelter Sendromu
MMR	:	Mental Motor Retarde
MR	:	Mental Retardasyon
OBY	:	Orta Derecede Bilişsel Yetersizlik
OMIM	:	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	:	Otozomal Resesif
P	:	Persentil
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyon
PS	:	Patau Sendromu
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
RS	:	Rett Sendromu
SNP	:	Single Nükleotid Polimorfizm
ŞDBY	:	Şiddetli Bilişsel Yetersizlik
T	:	Timin
TED	:	Tüm Ekzom Dizileme; Whole Exom Sequencing
TGD	:	Tüm Genom Dizileme; Whole Genome Sequencing
TP-PCR	:	Üçlü Tekrarlı Polimeraz Zincir Reaksiyon
TS	:	Turner Sendromu
UCSC	:	Kaliforniya Üniversitesi Santa Cruz Genom Enstitüsü
WBS	:	Williams-Beuren Sendromu
Xb	:	X'e bağlı
NGS	:	Yeni Nesil Dizileme
DHA	:	Doksohegzanoic asit

TABLolar

Tablo 1	: BY'ye eşlik eden klinik durumlar	12
Tablo 2	: Bilişsel Yetersizlik Nedenleri	14
Tablo 3	: Nispeten Sık Görülen CNV Sendromları	19
Tablo 4	: NGS Platformlarından Bazıları ve Kullandığı Temel Mekanizmalar.....	26
Tablo 5	: BY tanısında kullanılan bazı yöntemlerin kıyaslanması	27
Tablo 6	: Hasta-Yaş-Cinsiyet bilgileri	38
Tablo 7	: 7q11.23 delesyonu tespit edilen hastalar ve özellikleri.....	38
Tablo 8	: FXS tanısı konan hastalar ve özellikleri	39
Tablo 9	: Rett Sendromu Tanısı Konan Hastalar ve Özellikleri.....	40
Tablo 10	: 15q11.2 delesyonu tespit edilen hastalar ve özellikleri.....	41
Tablo 11	: Tespit edilen CNV tespit edilen hastalar ve özellikler.....	44
Tablo 12	: WES ile tanı koyduğumuz hastaların özellikleri	59
Tablo 13	: Güncel literatür ile tespit ettiğimiz FXS / tüm BY nedenlerine oranı	72
Tablo 14	: RS'nun kız BY hastalarına oranının kıyası	72
Tablo 15	: Array CGH'in BY hastalarında tanı koyma oranının kıyası	74
Tablo 16	: Hastalarımıza WES ile tanı koyma oranımızın güncel literatür WES tanı koyma oranı ile kıyası	76
Tablo 17	: Batı ülkeleri ile monogenik BY sonuçlarımızın kıyası.....	77
Tablo 18	: Literatürde WGS-WES çalışmalarının başarı oranının kıyası....	80

ŞEKİLLER

Şekil 1	: Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014-2016 Yılları Arasındaki BY Prevalansı-Cinsiyet İlişkisi	11
Şekil 2	: BY'ye sebep olan genetik nedenler	15
Şekil 3	: BY ile İlişkilendirilmiş Genler	21
Şekil 4	: 15q11.2 del/non-del	41
Şekil 5	: Tespit edilen CNV tipleri	42
Şekil 6	: Tespit edilen CNV'nin kalıtım paterni	43
Şekil 7	: Çalışılan hastalarda WES'in kliniği açıklama oranı	57
Şekil 8	: Mutasyon Tespit Edilen Genlerin Kalıtım Paterni	58

1.GİRİŞ

Çoğu zaman Mental Retardasyon(MR) olarak da adlandırılan bilişsel yetersizlik (BY); nörolojik sistemlerin gelişimiyle ilişkili klinik bir durumdur. Fonksiyonel bir beynin gelişimi; nöronal ve glial hücre proliferasyonunun, migrasyonunun, olgunlaşmasını sağlayan sinyal ile moleküllerin sağlıklı ve işler durumda olmasını kapsayan karmaşık bir süreçtir. Bu süreci aksatabilecek problemler BY ile sonuçlanabilirler. BY; 18 yaşından önce ortaya çıkan, farklı seviyelerde entelektüel ve uyarlanabilir işlevlerdeki eksikliklerle karakterize nörogelişimsel bir hastalıktır (1).

Toplumda %1-3 oranında görülür. Her hastada tanımlanamayan BY'nin etyolojisi heterojendir. Bilinen en sık BY nedenleri; genetik ve çevresel etkenlerdir (2). Erkeklerde kızlardan daha sık görülür. Büyük çoğunluğu hafif seviyede olduğu için farkedilmesi gecikebilir.

Her sosyal, ekonomik ve kültürel düzeyde görülebilen BY; klinik olarak sendromik ve non-sendromik olarak ortaya çıkabilir.

BY hastaları genel olarak yaşam kalitesini etkileyebilecek alanlarda işlevsellik sorunu olabileceği için çevresinin desteğine ihtiyaç duyarlar. Bu açıdan düşünüldüğünde BY; etkilenen bireyler, aileleri ve mensubu bulundukları toplum açısından sağlık, sosyokültürel ve ekonomik yönden yıkıcı bir etki oluşturabilir (3).

Toplumda görülme sıklığının nispeten yüksek olması, hasta ile çevresine olumsuz etkilerinin olması nedeniyle BY'nin; erken tanı ve tedavisi hasta ve yakınları için çok önemlidir. BY'nin erken tanı ve tedavisi hastayı takip eden hekimler için de çok önemlidir. Çünkü hastalığın nedeni belirlendiğinde; hastalığın ortaya çıkış yolu, zamanla ortaya çıkabilecek klinik seyri, tedavide izlenebilecek yollar ve ailenin sonraki çocuk sahibi olma düşüncelerinde prenatal tanı seçenekleri değerlendirilebilir (4).

Ülkemizde düzenli bir çalışma olmamasına rağmen hastalarda BY'ye sık rastlanır. Özellikle akraba evliliğinin %24 civarında olduğu ülkemizde nörometabolik hastalıklar ve bunların neden olabileceği BY ile otozomal resesif (OR) kalıtılan diğer

BY genlerine bağlı oluşan durumlar, günümüz teknolojiyiyle engellenebilir bilişsel gerilik nedenlerindendir (5,6) .

Çalışmamız ile BY nedeniyle takip edilen hastalarda; genetik etyolojiyi tespit etmek için uyguladığımız tanı yaklaşımı ortaya koyarak güncel literatüre katkı sunmayı, günümüz teknolojiyiyle belli bir kısmı engellenebilir durumda olan etyolojileri en kısa sürede teşhis etmeye yol göstermeyi amaçlıyoruz. Uzun vadede etkilenen ailelere doğru-kapsamlı genetik danışma verilmesine katkı sağlayarak aile ile toplumun BY'den etkilenme düzeyini azaltmayı hedefliyoruz.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Bilişsel Yetersizliğin Tanımı

Tanımı toplum ve zamana göre farklılık gösterse de zeka; zihnin öğrenme, öğrendiğinden yararlanabilme, farklı koşullara ayak uydurabilme ve yeni çözüm yolları üretebilme yeteneklerini ifade eder. Zihnin algılama, bellek, düşünme, usamlama, öğrenme gibi birçok işlevini içerir. Yani zeka; zihnin birçok yeteneğinin uyumlu çalışması sonucu ortaya çıkan yetenekler birleşimidir (7). Amerikan Zihinsel ve Gelişimsel Engelliler Derneği ise zekayı; akıl yürütme, planlama, problem çözme, soyut düşünme, karmaşık fikirleri anlama, verimli öğrenme ve deneyimden öğrenmeyi içeren genel zihinsel kapasite olarak tanımlamaktadır.

Henüz tam olan adlandırılmayan zekayı değerlendirmek de oldukça güçtür, ancak zaman içinde bilim insanları zekayı ve insan gelişimini belirlemeyi amaç edinen testler oluşturmuşlardır. Zekayı değerlendirebilmek için belirli bir toplumun belli bir yaştaki norm ve standartlarını bilmek gerekir. 1900'lü yılların başında Fransız psikologlar Alfred Binet ve Henri Simon; daha hızlı öğrenen öğrenciler ile daha yavaş öğrenen öğrencileri belirleyerek daha iyi eğitim almalarını amaçlayan Binet-Simon Testi'ni geliştirdiler. Intelligence quotient (IQ) ise Alman Psikolog Wilhelm Stern tarafından ortaya konan ve zekayı değerlendirme yöntemidir. Bu yöntem zekayı, $IQ = (Zeka\ Yaşı / Gerçek\ Yaş) \times 100$ olarak formülize etmiştir. Sonrasında 20. Yüzyılın ortalarında Amerikan Psikolog David Wechsler; toplum içerisindeki bireylerin zeka düzeylerini çan eğrisi modeliyle değerlendiren testleri ortaya koydu. Erişkinler için Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS), çocuklar için Wechsler Intelligence Scale of Children (WISC) olan bu testler belirli zaman aralıklarında güncellenerek kullanımına günümüzde de devam edilmektedir. Günümüzde bu testlerle birlikte; ilki 1967 yılında yayınlanan Denver Gelişim Tarama Testi'nin 1992 yılında güncellenen Denver II Gelişim Tarama Testi, Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE), Stanford-Binet Testi gibi testler de klinik uygulamalarda yer almaktadır (8–13).

Topluma ve zamana göre tanımı değişen BY ile ilgili uluslararası kabul gören kuruluşlar ve kılavuzları;

- Amerikan Zihinsel ve Gelişimsel Engelliler Derneği El Kitabı 11.baskısı
- Amerikan Psikiyatri Derneği 'nin Akıl Hastalıkları Tanı ve İstatistik El Kitabı 5. Baskısı (DSM V) Kılavuzu
- Dünya Sağlık Örgütü Hastalıkların Uluslararası Sınıflandırması 11 (ICD-11)' dir.

Önceleri, BY (daha önce MR olarak kabul ediliyordu); standart bir zeka ve gelişim düzeyi testi ile IQ'nun 70'in altında olması olarak tanımlanırken günümüzde; insanın tüm yaşam aktiviteleri ve işlevlerini kısıtlayabilen bir şemsiye terim olarak tanımlanmaktadır.

Zekayı akıl yürütme, planlama, problem çözme, soyut düşünme, karmaşık fikirleri anlama, verimli öğrenme ve deneyimden öğrenmeyi içeren genel zihinsel kapasite olarak tanımlayan Amerikan Zihinsel ve Gelişimsel Engelliler Derneği'nin 2010 yılında yayınlanan 11.baskı el kitabına göre BY; 18 yaşından önce başlayan, hem bilişsel işleyişte hem de bireyin sosyal yaşamını etkileyen alanlarda ortaya çıkabilecek yetersizlik durumlarını ifade eder. Amerikan Zihinsel ve Gelişimsel Engelliler Derneği'nin bu kitabında BY tanısı için üç ana kriter vardır. Bunlar:

- 1) Öğrenme, akıl yürütme, problem çözme vb. genel zihinsel kapasiteyi kapsayan entelektüel yetersizliklerdir. Bunu ortaya koymaya yarayan en önemli araç normalde 70'in üzerinde olması gereken IQ testidir.
- 2) Kavramsal becerileri (dil,para,zaman, kavramları), sosyal beceriler ve pratik becerileri(kişisel bakım, mesleki beceriler, sağlık, seyahat / ulaşım, programlar / rutinler, güvenlik,telefon kullanımı) kapsayan uyarlanabilir davranışlardaki yetersizlikler
- 3) 18 yaşından önce başlaması

Amerikan Zihinsel ve Gelişimsel Engelliler Derneği BY değerlendirilmesinde bunlara ilaveten hastayı gören doktorun, bireyin akranlarına ve kültürel farklılıklarına da dikkat etmesi gerektiğini belirtmektedir (14).

Amerikan Psikiyatri Derneği'ne göreyse BY; çocukluk çağında başlayan, entelektüel zorluklara kavramsal ve günlük yaşam alanlarındaki zorlukların eşlik ettiği nörogelişimsel bozukluklardır. Amerikan Psikiyatri Derneği'nin 2013 yılında yayımlarak hastalıklara yaklaşımını belirlediği DSM-V'te uyarlanabilir işlevlere ve olağan yaşam becerilerinin performansına önem vermektedir. DSM-V'te BY tanısında 3 farklı alan değerlendirilmektedir:

- 1) Yorumlama, planlama, yargılama, soyut düşünme, akademik ve deneyimden öğrenme gibi kavramları içeren entelektüel işleyiş yetersizlikler;
- 2) Bireyin sosyal ilişkilerini yürütebilme ve kimlik kazanımını etkileyerek sosyokültürel standartlara uymayı kısıtlayan uyumsal işlevlerdeki yetersizlikler
- 3) Çocukluk döneminde ortaya çıkması.

DSM-V kriterlerinde; bir veya daha fazla üst düzey beceri alanında (kavramsal, sosyal, pratik) bozukluk BY olarak değerlendirilir (1).

Bu alandaki bir diğer uluslararası kabul gören kuruluş olan Dünya Sağlık Örgütü; BY'yi Entelektüel Gelişim Hastalıkları (EGH) arasında sınıflandırır. EGH; öğrenme, uyarlanabilir davranış ve becerilerin kısıtlamaları ile ilişkili bilişsel işlevlerin önemli ölçüde bozulması ile karakterize edilen bir grup gelişim durumudur. EGH'nın tanımında temel olan sadece bilgi, akıl yürütme ve sembolik temsil gibi bilişsel gelişim oranı ve seviyesindeki bozukluklar değil, aynı zamanda ilişkili işlevselliktir. İşleyişin bu sınırlamaları; öğrenme, adaptasyon, edinme ve dil kullanımındaki zorluklarla ilgilidir. EGH başlığı altında sınıflandırılan BY; yeni - karmaşık bilgileri anlamada, yeni becerileri öğrenme ve uygulama yeteneğinin önemli derecede azalmasıdır. Kendini çocukluk döneminde sosyal işlevin bozulması ve gelişim üzerinde kalıcı bir gerilemeyle gösterir. Dünya Sağlık Örgütü'ya göre entelektüel gelişim bozuklukları; gelişim dönemi boyunca ortaya çıkan, uygun standartlara sahip testlerle ortaya konan, entelektüel işlevsellik ve uyarlanabilir davranışlarda ortalamanın iki veya daha fazla standart sapmasının bulunduğu durumlar

için kullanılır. EGH 'deki bilişsel işlevlerin bozulması genellikle standartlaştırılmış normlar dikkate alınarak teşhis için kullanılması gereken bir zeka testinden elde edilen bir puan olan IQ skorunun 70 in altında olmasıyla değerlendirilebilir. Ancak tek başına IQ skorunun değerlendirilmesi tanı için yeterli olmayıp, hasta uyum ve yürütme işlevselliğini ortaya koyan testlerle de değerlendirilmeli. Bu değerlendirmelerde EGH 'de görülebilecek bilişsel bozukluk ve uyumsal davranış kısıtlamalarında şunlar dikkate alınmalıdır(15,16):

- 1 Kültür ve toplumundaki akranları seviyesinde bilgi-akıl yürütmedeki bilişsel işlevlerde olabilecek bozukluklar
- 2 Sözel anlama, algısal akıl yürütme, çalışma belleği ile ilgili zorluklar
- 3 Akademik ve pratik bilgiler de dahil olmak üzere farklı öğrenme alanlarındaki zorluklar
- 4 Kültür ve toplumundaki akranları seviyesinde beklenen sosyal, pratik ve kavramsal becerilerdeki günlük yaşam talebini karşılamadaki zorluklar
- 5 Davranış, duygu ve sosyal ilişkileri yönetme ve öğrenme sürecinde motivasyon kaybına bağlı zorluklar.

2.2. Bilişsel Yetersizliğin Klinik Özellikleri ve Klinik Sınıfları

BY’i düşündüren klinik belirti ve bulgular; başvuru yaşına, spesifik nedene ve BY’nin ciddiyetine bağlı olarak değişmektedir. Şiddetli bilişsel yetersizliği olan bebekler ile küçük çocukların altta yatan bir nedeni olması ve altta yatan durumla ilişkili klinik özelliklerin erken ortaya çıkması muhtemeldir. Öte yandan; BY’nin büyük kısmını oluşturan hafif şiddette BY’si olan çocukların, spesifik bir neden yada bulgusu olmayabileceği için 5-9 yaşına kadar gözden kaçması mümkündür. Beraberinde; makrosefali, mikrosefali, dismorfik özellikler, çoklu konjenital anomaliler gibi fizik muayene bulguları ve yenidoğanda beslenme güçlüğü, huzursuzluk gibi durumların olabileceği için göz önünde tutulmalıdır. İnfant dönemde yaygın motor fonksiyon gecikme bulgularıyla klinik ortaya çıkabilirken; okul öncesi

ile okul çağında dil, öğrenme-akademik zorluklar ve davranış bozukluğu ile karşımıza çıkabilir.

2.2.1.Hafif Derecede Bilişsel Yetersizlik

Hafif derecede BY (HDBY); tüm BY hastalarının %85'ini oluşturur ve bulgular silik olduğundan tanı konması 5-6 yaşlarına kadar gecikebilir. HDBY'li hastaların; entelektüel ve uyarlanabilir davranışlarda ortalamanın iki ila üç standart sapması (p:0,1-2,3) vardır. Hastaların IQ değerleri 50-70 arasındadır. HDBY'li hastalar; kavramsal gelişim, sosyal ve günlük yaşam becerilerinin tüm alanlarında sağlıklı bireylere göre daha yavaştır. Hastaların çoğu; barsak ve mesane kontrolünü sağlayabilir, yeme-yıkanma-giyinme gibi faaliyetleri yerine getirebilir. Bununla birlikte, bu becerilerin gelişimi ortalama bir kişiden düşüktür ve uygun destekle sağlanabilir. Bilişsel ve motor gelişim basamaklarında gecikmeler gösterirler. Bu yüzden; karmaşık dil ve akademik becerilerin, anlaşılması ve edinilmesinde zorluk çekerler. Uygun destekle okuma, yazma ve matematik konularında temel beceriler geliştirebilir, 4-5. sınıf düzeyine eşdeğer akademik becerilere ulaşabilirler. Çoğunluğu uygun destekle ilköğrenimini tamamlayabilirler. HDBY'ye sahip ergen ve yetişkinler; planlama, örgütleme, öncelik belirleme, soyut düşünme gibi yürütücü işlevlerde ve kısa süreli hafıza gerektiren becerilerde sınırlamalar gösterirler. Sosyal söylem ve etkileşim normlarını, doğru bir şekilde yargılamak ve anlamak için sınırlı yetenek gösterirler; bu yüzden sıklıkla sosyal durumlarda davranışları başkaları tarafından olgunlaşmamış, uygunsuz olarak nitelendirilirler. Genel olarak; HDBY 'si olan çoğu birey, zihinsel yaşta 9-11 yaşlarındaki yetişkin olarak işlev görürler. Yaşamları boyunca eşlik edebilecek tıbbi rahatsızlıklar normal popülasyona benzerdir. Günlük sosyal ilişkiler, pratik ve kişisel bakım faaliyetleri için gerekli olan çoğu beceriyi uygun destekle kazanabilirler. Temel mesleki beceriler edinebilir, akademik veya kavramsal becerilerin uygulanmasını gerektirmeyen işlerde çalışabilirler (1,14-18).

2.2.2.Orta Derecede Bilişsel Yetersizlik

Orta derecede BY (ODBY)'li hastalar; tüm BY'li hastaların yaklaşık %10'unu oluşturur. Bu hastalar genellikle 3-5 yaşlarına kadar BY tanısını alırlar. Bu hasta grubundan itibaren, standart entelektüel ve gelişim değerlendirme testlerinin birkaçının ortalaması alınır. ODBY'li hastaların; entelektüel ve uyarlanabilir davranışlarda ortalamanın üç ila dört standart sapması ($p:0.003-0.1$) vardır. IQ değerleri 35-55 arasındadır. ODBY'li hastalar; bilişsel, motor, dil ve sosyal becerileri içeren birçok alanda bozukluk gösterirler. Ayrıca kazanılabilen yeteneklerin seviyesi bu grupta değişkendir. Bireylerin temel dil becerilerini edinme oranı düşüktür. Akademik beceriler hakkında bilgi edinme ve yeterlilik kazanma becerisi sınırlıdır. Okuma, yazma, matematik ve temel kavramların anlaşılmasını gerektiren diğer becerilerde önemli sınırlamalar gösterirler. ODBY'si olan bireyler erken ilköğretim okulu düzeyine eşdeğer akademik beceriler edinebilir ve temel sözcük okuma, bilgi kopyalama ve numarayı öge sayısına eşleme gibi bazı temel beceriler geliştirebilirler. Sosyal ilişkilerde ve toplumsal davranış normlarını anlamada zorluk yaşarlar. Sosyal karar alma ve sosyal muhakemede sınırlamaları vardır . Uyumsuz davranışların geliştirmeleri önemli bir sorundur; bu da sosyal etkileşimler ve ilişkilerdeki zorluğa katkıda bulunabilir . Sürekli ve uygun destekle, anlamlı aile ve kişisel ilişkiler geliştirebilir. Genel olarak ODBY'si olan bireylerin; zihinsel yaşı 6-8 yaşlarında olan bir yetişkin olarak işlev görürler. ODBY'si olan bireyler günlük yaşam aktivitelerini sürdürebilmek ve bir iş sahibi olabilmek için sürekli desteğe ihtiyaç duyarlar. Sürekli destek ve öğretim sayesinde, orta düzeyde kimliği olan kişiler temel günlük yaşam ve iş becerileri kazanabilirler. Günlük faaliyetlerde sürekli gözetim ve rehberliğe ihtiyaç duymanın yanı sıra işle ilgili görevleri yerine getirmede desteğe ihtiyaç duyarlar. ODBY'si olan bireyler uygun destekle; öz bakım, yeme, giyinme ve kişisel hijyen gibi günlük yaşam görevlerinde kısmen bağımsızlığa kavuşabilir. ODBY 'si olan bireylere kıyasla; özellikle epilepsi, davranış bozuklukları ve diğer ruh sağlığı ile ilgili sağlık sorunlarını daha çok yaşarlar (1,14-18).

2.2.3. Şiddetli Derecede Bilişsel Yetersizlik

Şiddetli derecede BY (ŞDBY)'li hastalar, tüm BY'li hastaların yaklaşık %4'ünü oluştururlar. Bu hastalar genellikle 3 yaşına kadar BY tanısını alırlar. Bu hasta grubundan itibaren standart entelektüel ve gelişim değerlendirme testlerinin doğruluğu azalmaktadır. Entelektüel ve uyarlanabilir davranışlarda ortalamanın yaklaşık dört veya daha fazla standart sapması olan ($p < 0.003$) vardır. IQ değerleri 20-40 arasındadır. Entelektüel işleyişte ciddi açığa ek olarak; zihinsel ve uyarlanabilir işleyiş daha da sınırlayan motor bozukluklar ve diğer ilişkili durumlar da olabilir. Hastalar; günlük yaşam aktivitelerinde kapsamlı, tutarlı, ömür boyu devam eden desteğe ihtiyaç duyarlar ve bakıma bağımlıdırlar. Ayrıca gelişimde büyük gecikmeler yaşarlar; ancak bireyler genellikle konuşmayı anlama yeteneğine sahip olurlar. ŞDBY'li hastaların dil ve iletişim yetenekleri son derece kısıtlıdır; konuşma dilleri sınırlı, iletişim genelde tek kelime veya kelime öbekleriyle sınırlı kalırlar. Temel ihtiyaçlarını iletmek için bu kelimeleri ya da jest-mimiklerini kullanırlar. Sosyal ilişkileri sınırlı olduğundan çoğu zaman sadece aileleri ile iletişim kurabilirler. Sayı, miktar, zaman, para yönetimi ve problem çözme kavramlarını anlamada oldukça geridirler. Kişisel bakım ve kişisel hijyen dahil yaşamın tüm alanlarında yoğun desteğe ihtiyaç duyarlar. Kendileri ve çevreleri ile ilgili kararlar veremezler. Bu hastalar HDBY- ODBY'si olanlara kıyasla; epilepsi, duyuşsal bozukluk, gastrointestinal bozukluklar ve serebral palsi gibi daha sık sağlık problemleri yaşarlar. Kendine zarar verme dahil davranış problemleri ve diğer ruh sağlığı ile ilgili durumlar bu hastalarda önemli bir sorundur.

2.2.4. Derin Derecede Bilişsel Yetersizlik

Derin derecede BY (DDBY)'li hastalar, tüm BY'li hastaların yaklaşık %1'ini oluştururlar. Bu hastalar genellikle 2 yaşına kadar BY tanısını alırlar. Entelektüel ve uyarlanabilir davranışlarda ortalamaya göre yaklaşık dört veya daha fazla standart sapması ($p < 0.003$) vardır. Standart entelektüel ve gelişim değerlendirme testlerinin doğruluğu azaldığı, tıpkı ŞDBY'de olduğu gibi; zihinsel ve uyarlanabilir işleyiş daha da sınırlayan motor bozukluklar ve diğer ilişkili durumlar da olabilir. DDBY-ŞDBY ayrımı öncelikle uyumsal davranış sınırlamalarındaki farklılıklara dayanarak yapılır. IQ değerleri 20'nin altındadır. Gelişim alanlarının tamamında gerilik olan bu

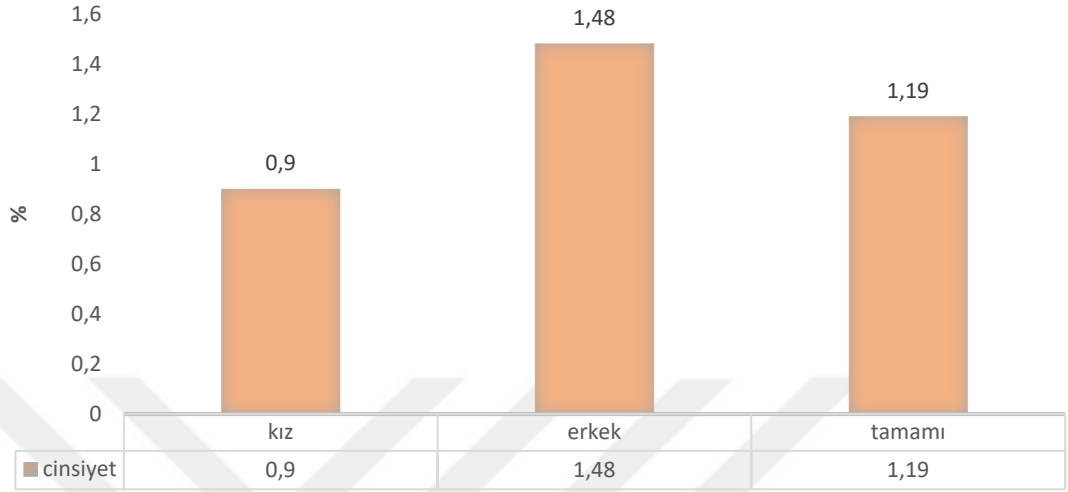
bireylerde, zihin gelişimi genelde 3 yaş ile uyumludur ve yaşamın tüm alanlarında yoğun desteğe ihtiyaç duyarlar. Öz bakım, kontinans, iletişim ve hareketlilik konusunda önemli kısıtlılıkları vardır. Hastaların çoğu; idrarını tutamaz, kendilerine bakma konusunda yetenekleri yoktur ve bu nedenle zamanın her anında yoğun desteğe ihtiyaçları vardır. Akademik veya kavramsal becerilerde önemli eksiklikleri vardır. En basit sözlü istek veya talimatlar dışında çoğu şeyi anlayamaz ve bunlara uyamazlar. Sözel olmayan iletişimin temel formlarını yapabilirler. Yeterince gelişebildiği takdirde ailesi tarafından anlaşılabilircek birkaç kelime ile kelime öbeğini kullanabilirler. Hareket kabiliyetindeki önemli kısıtlılık olasılığı, diğer tip BY'li bireylere göre daha yüksektir. Bu hastalarda diğer tip ID'li bireylere göre; ciddi nörolojik veya diğer lokomotor bozukluklar, görme-işitme bozuklukları ve gastrointestinal problemler oldukça yaygındır (17). Kendine zarar verme gibi davranış problemleri ve diğer ruh sağlığı ile ilgili durumlar bu hastalarda önemli bir sorundur (1,14–18).

2.3.Prevalans ve Risk Faktörleri

Uygun standartlara sahip testlerle ortaya konan, entelektüel işlevsellik ve uyarlanabilir davranışlarda ortalamanın iki veya daha fazla standart sapmasının bulunduğu durumlar olarak kabul edilen BY'nin prevalansı; yaş, cinsiyet, bulunulan ülkenin gelişmişliği ve sosyoekonomik düzeyi etkenlerle değişiklik gösterir. BY ; gelişmiş ülkelerde %1 civarındayken gelişmekte olan ülkelerde %3 civarındadır. HBY prevalansı; popülasyonlar arasında diğer BY tiplerinden daha değişken olup anne eğitiminden, eğitime erişim fırsatlarından ve sağlık hizmetlerine erişim gibi çevresel faktörlerden etkilenir. BY'nin büyük kısmı hafif olgular olduğu için net bir prevalans ortaya koyabilmek zordur; çünkü toplumun sosyoekonomik durum ve eğitiminden de etkilenen BY Hindistan'ın bazı bölgelerinde yapılan çalışmalarda %21'ler düzeyinde olduğu görülmüştür. Genelde okul çağında tanı konabilir. BY; özellikle X kromozomunda kalıtılan bazı ilişkili genlerden dolayı erkeklerde kızlardan daha sık görülmektedir. Ancak BY'nin şiddeti arttıkça erkek ve kızlarda görülme oranı benzerdir (17,19–23).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2016 yılında yapılan Ulusal Sağlık Araştırması'nda BY prevalansı %1-1.3 'tür. Yine bu araştırmada BY; erkek

çocuklarda kız çocuklarına kıyasla daha sık olduğu ve tanının daha çok okul çağında konulduğunu görülmüştür (24) (Şekil 1).



Şekil 1: Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014-2016 Yılları Arasındaki BY Prevalansı-Cinsiyet İlişkisi

BY gelişiminde birçok risk faktörü vardır. Risk faktörlerinin çoğunluğu çevresel ve psikososyal olup; düşük sosyoekonomik statü, düşük gelirli ülkelerde yaşama, düşük anne eğitimi, yetersiz beslenme ve sağlık hizmetlerine erişimin yetersiz oluşu risk faktörlerinin başında gelir. Tüm BY tiplerinde; erkek cinsiyet, düşük doğum ağırlığı olması, siyah ırk, doğumdaki yaşlılık ve daha düşük eğitim seviyelerinde doğan çocuklar için risk artmıştır. Birden fazla doğum, ikinci veya daha sonra doğan çocuklar için de risk artmıştır (17,25). BY gelişimi için anne eğitimi oldukça önemlidir, çünkü anne eğitimi azaldıkça BY riski de artış göstermektedir. Anne yaşı da BY için risk faktörlerinden birisidir. 15 ila 19 yaş arasındaki annelerde doğan çocuklarda hafif BY riski artarken, 40 ila 44 yaş arası annelerde doğanlarda orta-şiddetli BY riski artmıştır. Ancak yapılan bir çalışmada anne eğitim düzeyi, anne yaşına kıyasla BY için daha fazla risk oluşturduğu ortaya konmuştur (26). BY gelişimi-baba yaşı ilişkisini inceleyen bir çalışmada ise; BY riskinin ileri baba yaşı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmada; 40 yaşın üzerindeki baba yaşının, hafif ila orta derecede BY riski artışı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (27).

2.4.Komorbidite

BY'ye yaşam boyunca; serebral palsy, epilepsi gibi nörogelişimsel bozukluklar ile iletişim bozuklukları, öğrenme güçlükleri, davranış problemleri gibi psikiyatrik bozukluklar ve olası genetik bozuklukla ilişkili olabilecek klinikler eşlik edebilir (1). Yapılan araştırmalarda; BY'si olan hastaların en az yüzde 25'inde özellikle şizofreni, depresyon ile Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB) gibi önemli psikiyatrik bozukluk oranları önemli ölçüde artmıştır (18).

BY hastalarına yaşamları süresince; etyoloji, yaşam tarzı, kullanılan ilaçlar gibi etkenlerle farklı klinik durumlar eşlik edebilir. Yapılan bir çalışmada 1047 BY hastası incelenmiş ve hastaların %79.8 'nde disfaji, davranış bozukluğu, işitme kusuru, vs.. gibi durumlar tespit edilmiştir (28) (Tablo 1) .

Tablo 1: BY'ye eşlik eden klinik durumlar

Klinik Durumlar	
Disfaji	Otizm
Kronik Kabızlık	Kardiyovasküler Hastalıklar
Osteoporozis	Depresyon
Davranış Bozukluğu	Anksiyete
İşitme Kusuru	Allerjik Astım
Görme Kusuru	Motor Gerilik
Epilepsi	Diyabet
Periferik Arter Hastalığı	Demans
Gastro-Özefajiyal Reflü	Serebrovasküler Hastalık
Tiroid Disfonksiyonu	Kanser

2.5.BY'nin Çevresel ve Genetik Nedenleri

Doğum öncesi, doğum sırasında ya da doğum sonrasında beyin-sinir gelişimi ve işleyişini olumsuz etkileyebilecek sebeplerin tamamı bilişsel yetersizliğe sebep olabilir. BY; genetik ve genetik olmayan (özellikle çevresel,vs..) nedenlerden

kaynaklanabilir. Bu nedenler birbiriyle ilişkili olabilirse de ana etyolojik neden genetik problemlerdir. Genetik olmayan nedenler; doğum öncesinde, doğum sırasında ve doğum sonrası dönemde beyin-sinir gelişimi ve işleyişine zarar verebilir.

Hamilelik sırasında;

- ✓ maternal enfeksiyonlar (örn; toksoplazmoz, kızamıkçık, sitomegalovirüs),
- ✓ kontrolsüz diyabet, toksik maddeler (örn; doğum öncesi alkol maruziyeti, doğum öncesi veya doğum sonrası kurşun maruziyeti, valproat gibi zararlı ilaçlara doğum öncesi maruz kalma, vs..),
- ✓ beslenme eksiklikleri (örn; iyot eksiklikleri, yetersiz beslenme, vs..),
- ✓ prematürite (neden olabileceği hipoksemi ve periventriküler kanama),
- ✓ perinatal asfiksi,
- ✓ beyin radyasyonu,
- ✓ vasküler problemler,
- ✓ ensefalit ve
- ✓ travmatik beyin yaralanmaları

genel olarak gelişmeye ve özellikle nörogelişimde hasara neden olabilecek faktörlerdir (21) (Tablo 2).

Bazı hastalarda, bu faktörlerden biri veya birkaçı ile BY tanısı arasındaki ilişki açıkken, bazılarında nedenselliği değerlendirmek zordur. Sonraki vakalarda genetik bir etiyoloji de düşünülmelidir (21,29).

Bilişsel yetersizliğe neden olan başlıca genetik nedenler;

- ✓ sayısal kromozomal anomaliler,
- ✓ yapısal kromozomal anomaliler (delesyon-duplikasyon, CNV; kopya sayısı değişiklikleri),
- ✓ monogenik değişiklikler

olarak sıralanabilir (29).

Etyolojik neden ile BY'nin klinik şiddeti arasında anlamlı bir ilişki olmasa da; genetik değişiklikler orta-şiddetli BY ile ilişkiliyken, hafif BY patogenezinde çevresel

faktörler (örneğin yetersiz beslenme, kültürel yoksunluk) daha büyük bir rol oynamaktadır (21,30). Son 25 yılda tanı koymada önemli bir iyileşme olsa da BY hastalarının yaklaşık yarısında etyolojik neden ortaya konamaz ve etyolojik tanıya ulaşma olasılığı BY'nin klinik şiddetine göre değişir. HBY'de neden %24 oranında belirlenebilirken; ağır BY de etyolojik tanıyı koyma oranı %80'dir (29,31,32,).

Tablo 2: Bilişsel Yetersizlik Nedenleri

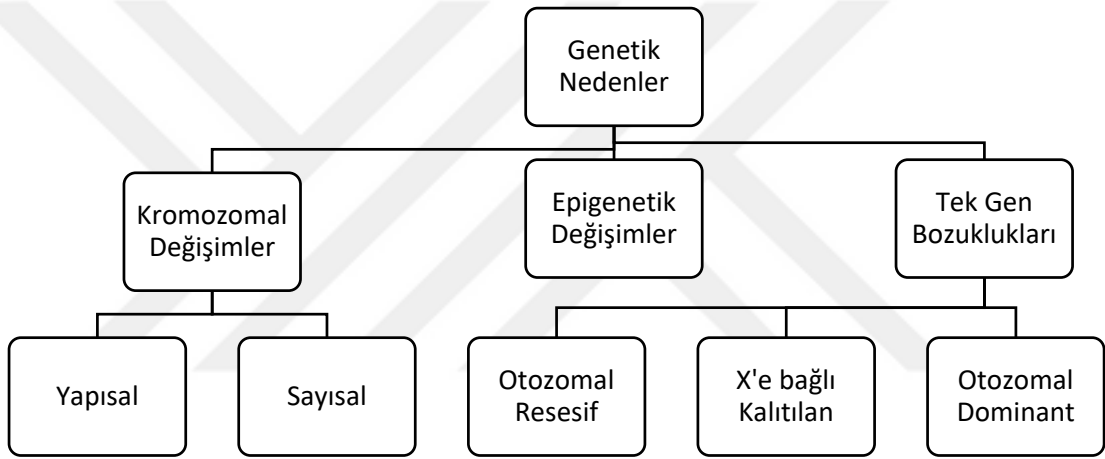
Prenatal	Genetik Anomaliler
	Enfeksiyon (toksoplazmozis, rubella, sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs,vs..)
	Toksin ve Teratojenler (alkol, ilaçlar, radyasyon, vs..)
	Konjenital hipotiroidi
	Metabolik Bozukluklar
Perinatal	Hipoksi
	Prematürite Komplikasyonları
	İntrakraniyal Hemoraji
	Psikososyal çevre
Postnatal	Enfeksiyonlar
	Travma
	Toksinler

BY'nin genetik etyolojisine ulaşmada öncelikle var olan kliniğin, bir sendromun parçası olup olmadığını değerlendirmek gerekir. BY; eşlik eden anomali-malformasyon yada klinik yoksa, yani izoleyse non-sendromik BY olarak adlandırılırken; merkezi sinir sisteminde yada vücudun herhangi bir yerinde eşlik eden anomali-malformasyon varsa sendromik BY olarak adlandırılır (21,34).

BY'nin etyolojisini ortaya koymak; hastalığı yönetme sürecini kolaylaştırır ve hastalığın seyrinde görülebilecek klinik durumların farkında olunarak önlenmesine ve tedavi stratejileri geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Ayrıca hastanın ailesinin; engellilik durumunu kabullenerek duygusal rahatlama sağlamanın yanında, ailenin sonraki çocuk sahibi olma düşüncelerinde prenatal tanı seçeneklerini değerlendirme seçeneği sunar (4,35) .

2.5.1. Bilişsel Yetersizliğin Genetik Etiyolojisi

BY'nin genetik nedenleri; kromozomal değişimler, tek gen bozuklukları ve epigenetik değişimler olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir (Şekil2).



Şekil 2: BY'ye sebep olan genetik nedenler

2.5.1.1.Kromozomal Değişimler(Sayısal-Yapısal)

İsmi Yunanca'nın chromos (renk) ve soma (vücut) kelimelerinden alan kromozom; hücre çekirdeğinde yer alan çift zincir nükleik asiti (DNA) içeren yapılardır. Bu iplikçi yapıları; DNA ve onu paketleyici görevi olan histon proteinlerinden oluşur. Kromozomlar hücre bölünmediğinde (siklusun interfaz evresinde); ince iplikçi şeklinde (kromatin ipliği) olduğundan ışık mikroskopunda görünmezler. Hücre bölünmesi esnasında kromatinleri oluşturan DNA'nın daha yoğun paketlenmesiyle daha sıkı yoğunlaşıp kalınlaşarak ışık mikroskopunda görülebilir duruma gelirler. Siklusun metafaz evresinde kromozomların en iyi yoğunlaştıkları ve

en iyi görünebilir hale geldikleri evredir. Kromozomların sayı ve yapısının değerlendirilmesi mitoz bölünmenin metafaz evresinde mümkün hale gelmiş olur.

Kromozom analizi yapılırken bir hücredeki kromozomların özdeş çift kromozomlar (homolog kromozom) halinde eşlendikten sonra belli bir düzene göre sıralanmasıyla karyotip düzeni ortaya konur. Sağlıklı bir insan somatik hücre karyotipi 22 çift otozom ve bir çift cinsiyet kromozomu olmak üzere toplam 46 kromozom ($2n$) içerir. Bu kromozomların 23 tanesi anneden, 23 tanesi babadan gelir.

Kromozomal anomaliler BY'nin önemli nedenlerindendir. BY'li hastaların yaklaşık %30'unda etyolojik neden kromozomal anomalilerdir. Kromozom anomalileri sayısal ve yapısal olmak üzere iki grupta incelenir ve bu anomaliler vücudun tüm hücrelerinde olabileceği gibi belli bir hücre serisini de etkileyebilir (29)

2.5.1.1.1.Sayısal Kromozomal Anomaliler

Kromozom anormalliklerinin en bilineni kromozom sayısındaki değişikliklerdir. İnsan vücut hücrelerinde 46 tane ($2n$) kromozom bulunur. 46 kromozomun normal diploid ($2n$) yapısından sapması anöploidi olarak adlandırılır; ekstra bir kromozom trizomi ile sonuçlanırken, eksik bir kromozom monozomi ile sonuçlanır. Anöploidi; hücre bölünmesinde, bir kromozomun iki kopyasının mayoz veya mitoz sırasında ayrılmayarak aynı yavru hücreye gittiği bir hatadan kaynaklanır. Homolog kromozomların ayrılmaması (non-disjunction) en sık maternal germ hattı içindeki ilk mayotik bölünmede meydana gelir. Mitotik ayrılmama; bir anöploidili ve bir normal hücre hattının oluşmasına neden olarak , mozaiklik olarak adlandırılan bir durumun varlığına neden olur. Ayrılmama nedenleri bilinmemektedir. Neden olduğu bilinen tek risk faktörü ileri anne yaşıdır (36) . Anormal sayıda otozom (1-22 kromozomu) veya seks kromozomları (X ve Y kromozomları) nı kapsayan anöploidi bozuklukları doğan 250 çocuğun 1'inde görülür (37). BY'lerin yaklaşık %10'nda görülen anöploidilerden büyük çoğunluğu yaşamla bağdaşmaz. Yaşamla bağdaşan anöploidiler ise; 13, 18, 21 ve X kromozomu içeren anöploidilerdir (29,36). Otozomal anöploidi koşulları, cinsiyet kromozom anöploidilerinden daha az görülür, ancak en iyi tanınan kromozom anöploidisi trizomi 21(Down Sendromu[DS]) dur. Diğer yaşamla bağdaşan otozomal trizomiler; trizomi 13 (Patau Sendromu[PS]) ve trizomi

18 (Edwards Sendromu[ES]) dur. Seks kromozomlarının anöploidisi daha yaygındır ve yaklaşık 400 çocuktan 1'inde görülür. Klinefelter Sendromu (KS) (47, XXY), 47, XYY, trizomi X, Turner sendromu (TS) (45, X) bunlara birer örnektir .

İlk tanımlanan anöploidi olan DS (Trizomi 21) ; en sık karşılaşılan otozomal anöploidi ve BY'ye en çok neden olan anöploididir. Birçok konjenital anomalinin eşlik edebildiği DS'nda; standart bilişsel skorlar tipik olarak hafif ila orta derecede zihinsel özürlülük aralığında düşer ve DS'de ortalama IQ 50-55 civarındadır. Diğer yaşamla bağdaşan otozomal trizomiler olan ES ve PS; daha nadir görülürken, konjenital anomalilerin ve nörogelişimsel bozuklukların sıklığı ve şiddeti daha fazla olabilir. En yaygın sex kromozom anöploidileri; trizomi (erkeklerde XXY ve XYY, kadınlarda XXX) ve kadınlarda monozomi X'dir (TS)'dur. Erkeklerin en sık cinsiyet kromozom anöploidisi XXY (KS) dir. KS'lu bireylerin bilişsel profilinde değişkenlik olsa da, genelde IQ değerleri 90-100 arasındadır. Ancak bu hastalar; sözel öğrenme güçlüğü yaşayabilirler ve bazı becerilerde desteğe ihtiyaç duyabilirler. Kadınlarda en sık cinsiyet kromozom anöploidisi 45,X (TS)'dir. Ayrıca TS yaşamla bağdaşan tek monozomidir. Birçok yapısal anomalinin eşlik edebildiği TS'nda bilişsel düzey normaldir ve BY nadir görülür; ancak bu tip hastalarda özellikle sayısal alanlarda olmak üzere öğrenme güçlüğü olabilir (37) .

2.5.1.1.2.Yapısal Kromozomal Anomaliler

Yapısal kromozomal yeniden düzenlemeler; kromozomun bir kısmının kırılması ve sonrasında farklı konfigürasyonlarda birleşmelerden kaynaklanır. Yapısal kromozomal anomaliler arasında; delesyon, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar, insersiyonlar, marker kromozomlar, ring kromozomlar ve izokromozomlar yer almaktadırlar. Kalıtsal varyasyonun bir parçası olan ve genelde kişisel çeşitliliği sağlayan etkenlerden olan kopya sayısı değişikliği (Copy Number Variation_CNV_metin içerisinde sık kullanılan CNV kısaltması tercih edilmiştir)'de BY başta olmak üzere hastalıklara sebebiyet verebilir. CNV genomdaki azalma yada artışları kapsar. CNV'lerin kliniği etkileyip etkilemediği; değişimin tipine, değişimin gen içerip içermemesine, değişimin genin hangi bölgesinde olduğuna göre şekillenir.

BY'lerin yaklaşık %20 'sini oluşturan kromozomun yapısal anomalileri (29); dengeli veya dengesiz olabilirler. Dengeli yeniden düzenlemelerde; genetik materyal kaybı veya kazancı yoktur. Sonuç olarak, dengeli yeniden düzenlemeler, kesme

noktalarından birinin önemli bir fonksiyonel geni bozduğu nadir durumlar hariç, genellikle zararsızdır. Bir kromozom yeniden düzenlemesi dengesiz olduğunda ise; genellikle ciddi klinik etkileri olan yanlış miktarda genetik materyal içerir. Kalıtsal varyasyonun bir parçası olan ve genelde kişisel çeşitliliği sağlayan etkenlerden olan kopya sayısı değişiklikleri (CNV) ndeki değişiklikler de BY başta olmak üzere hastalıklara sebebiyet verebilir (38) .

Delesyon; bir kromozom yada herhangi bir DNA dizisinin bir kısmının kaybını içerir ve kromozomun o segmenti için monozomi ile sonuçlanır. Duplikasyon ise bir kromozom yada herhangi bir DNA dizisinin bir kısmının iki katına çıkmasını temsil eder ve bu segment için trizomi ile sonuçlanır. Sonuç, DNA dizisi ve/veya gen dozajında azalma yada çoğalma meydana gelir. Klinikte nispeten sık görülen CNV sendromları Tablo 3’de özetlenmiştir (39).

İnversiyon; bir kromozomda iki kırılma olduğunda ve kopan bölgenin 180 derece dönmesi ve aynı kromozoma tekrardan yapışması ile meydana gelir. Sentromeri içerisine alan inversiyonlara perisentrik denir. Buna karşılık sentromerin dışında p veya q kolunda meydana gelmiş ise parasentrik inversiyon denir. İnversiyonlar genellikle ilave veya kayıp genetik materyal ile sonuçlanmaz. Kromozomun gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişmiştir. Bu nedenle genellikle nötr değişiklikler olarak görülür. Bununla birlikte, kırılma noktalarından biri bir genin içerisinden geçerse bu durumda ilgili genin işlevini değiştirebilir. Ayrıca, ters sırasının sınırlarında gen düzeninin değiştirilmesi, koordineli olarak düzenlenen gen bloklarının işlevini etkileyebilir (pozisyon etkisi).

İnsersiyon; bir kromozomun bir segmenti başka bir kromozoma eklendiğinde meydana gelir. Bu değişiklikler üç kromozomal kırılma noktası gerektirdiğinden, nispeten nadirdir.

Marker kromozom; genetik kökeni G-bantlı kromozom morfolojisine dayanarak bilinmeyen yeniden düzenlenmiş bir kromozomdur.

Tablo 3: Nispeten Sık Görülen CNV Sendromları

Lokus	Sendrom	OMIM	CNV	Fenotip
15q11-q12	Angelman Sendromu	105830	Maternal delesyon, paternal UPD15	BY, GG, mikrosefali, nöbetler, davranış bozukluğu
22q11.2	Di-George Sendromu	188400/ 192430/ 608363	Delesyon, duplikasyon	BY, GG, kardiyak anomaliler, immün yetmezlik, hipotoni, fasiyal anomali
15q11-q12	Prader-Willi Sendromu	176270	paternal delesyon, Maternal UPD15	BY, GG, hipotoni, yobezite, davranış bozuklukları
17p11.2	Smith-Magenis Sendromu / Potoccki-Lupski Sendromu	182290	Delesyon, duplikasyon	BY, GG, davranış problemleri, obezite, sendromik görünüm, hipotoni, kardiyak anomaliler
7q11.23	Williams-Beuren Sendromu / 7q11.23 Duplikasyon Sendromu	194050 / 609757	Delesyon, duplikasyon	BY, GG, aşırı dostane davranış, kardiyak anomaliler, sendromik görünüm,
8q12.1	CHARGE Sendromu	214800	Delesyon	BY, Koloboma, anal atrezi, kardiyak anomaliler, ürogenital anomaliler, işitme kusurları
5p13.1	Cornelia de Lange Sendromu	608667	Delesyon	BY, GG, sendromik görünüm
17p13.3	Miller-Dieker Sendromu / 17p13.3 Duplikasyon Sendromu	247200 / 613215	Delesyon, duplikasyon	BY, GG, sendromik görünüm, beyin malformasyonları, kardiyak anomaliler, nöbetler,
5p15.2	Cri-du-Chat Sendromu	123450	Delesyon	BY, GG, Yüksek perdeli monoton ağlama, mikrosefali, sendromik görünüm
16p13.3	Rubinstein-Taybi Sendromu	180849	Delesyon	BY, el-ayak anomalileri, glokom, fasiyal anomaliler, kardiyak anomaliler
4p16.3	Wolf-Hirschhorn Sendromu	194190	Delesyon	BY, GG, mikrosefali, sendromik görünüm, fasiyal anomaliler, kolobom

Halka kromozom; bir kromozom iki noktadan kırıldığında ve kırık uçlar bir halka yapısında yeniden birleştğinde oluşur.

İzokromozom; ilgili kromozomun bir kolunun eksik olduğu ve diğerinin ayna görüntüsü şeklinde çoğaltıldığı bir kromozomdur (36).

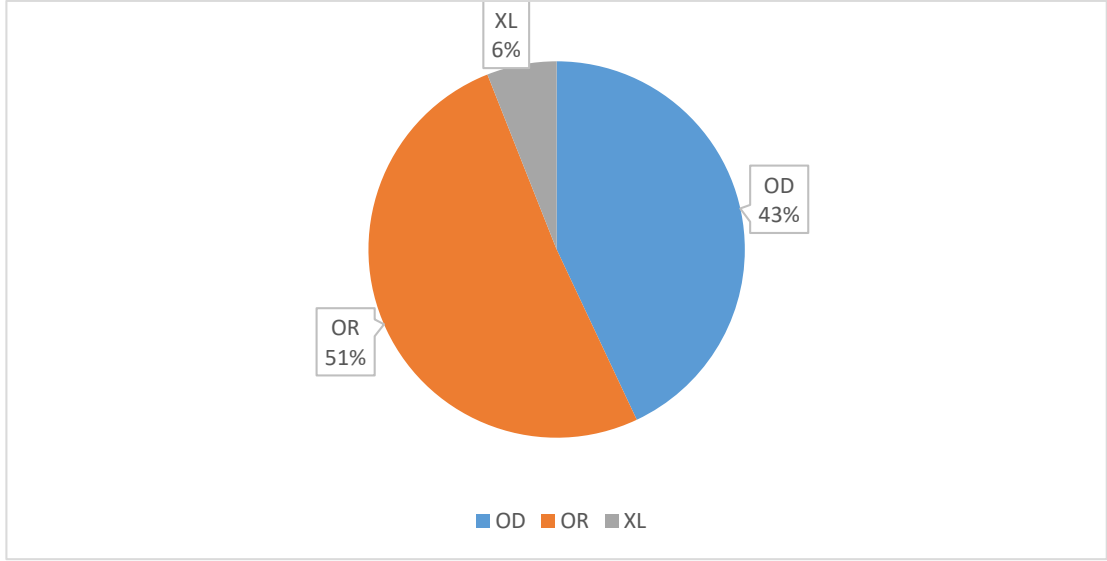
Translokasyonlar, kromozomlar arasında genetik materyal değişimini içerir. Dengeli karşılıklı translokasyonda değişim eşittir, genetik materyalin kaybı veya kazancı yoktur. Bir genin sınır noktalarından birinde kayıp içermediği sürece dengeli bir translokasyon taşıyıcısı klinik belirti ve semptom göstermezler. Dengesiz translokasyonlarda ise; kromozom segmentlerinin kayıp veya kazanç sonuçlarının karmaşık bir karışımından kaynaklanan klinik bir heterojeniteye sahiptir ve spontan abortustan çoklu anomalinin eşlik ettiği bir çocuğa kadar farklı klinikler görülebilir.

2.5.1.2.Tek Gen Bozuklukları

İnsanda 44 otozomal ve 2 seks kromozomu olmak üzere toplam 46 kromozom vardır. Bu kromozomlar üzerinde yaklaşık 20000 gen bölgesi bulunur (40) . Tek gen hastalığı; genellikle Mendelian kalıtıma uyan, tek bir gen bölgesinde meydana gelen değişimlere bağlı hastalık oluşmasıdır. Bu genlerden yaklaşık 4288 tanesi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (41). BY'lerin yaklaşık %40'ını oluştururlar. Günümüzde BY ile ilişkisi ortaya konan gen sayısı 700 civarında olsa da; BY'ye neden olabileceği düşünülen gen sayısı 2000-3000 civarındadır (29,42).

BY 'ye neden olan tek gen hastalıkları genel olarak; X'e bağlı(XL), OD ve OR olarak sınıflandırılır . Sporadik hastalarda, de novo varyantlar etiyolojinin yaklaşık % 60'ını oluşturur. Bu rakamlar, akraba evliliğinin yaygın olduğu gibi spesifik popülasyonlarda farklıdır. Bu popülasyonlarda OR bozukluklar BY vakalarının çok daha büyük bir kısmını oluşturmaktadır.

BY'ye neden olan genlerin yaklaşık %51'i OR, %43'ü OD , yaklaşık %6'sıysa XL kalıtılır (29,32) (Şekil 3).



Şekil 3: BY ile ilişkilendirilmiş Genler

2.5.1.2.1.Otozomal Dominant Bilişsel Yetersizlik

OD BY'nin kalıtım paterni; bir bireyin bir mutant alelin bir kopyasını ve bir genin bir normal alelin taşımasıdır. OD BY; ilgili genlerde bir alleldeki (heterozigot) mutasyonlardan kaynaklanır. OD BY neredeyse her zaman de novo kökenlidir. OD BY genlerinde tahmini mutasyon sıklığını bulmak zordur. *ARID1B*, *SYNGAP1*, *DYRK1A*, *MED13L*, *KCNQ2*, *CTNNB1*, *STXB1*, *KMT2A*, *PACS1*, *FOXP1* ve *SMARCA2* en yaygın mutasyona uğramış OD BY genleridir. Bu genler; nöronal farklılaşma, sinaptik oluşum ve iletimin gelişimi için önemli rol alan genlerdir (29,32,43).

2.5.1.2.2.Otozomal Resesif Bilişsel Yetersizlik

OR BY genetik olarak heterojen bir hastalık grubudur. Sendromik yada nonsendromik olabilir. Hastalığın ortaya çıkabilmesi için her iki alelin de mutant olması gereklidir. OR BY'nin, akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda sıklığı artar. Akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda, olmayan toplumlara göre BY 3-4 kat daha fazladır. OR BY'ye günümüz itibari ile yaklaşık 400 civarında gen neden olsa da, OR BY'ye yaklaşık 3000'e kadar genin neden olabileceği düşünülmektedir (6,29,32,43).

2.5.1.2.3.X ile Kalıtılan Bilişsel Yetersizlik

İnsan X-kromozomu insan genomunun % 5'ini içerir, ancak gittikçe artan sayıda genetik hastalık X kromozomu ile ilişkilidir; X-kromozom genlerinin yaklaşık % 10-12'si BY ile ilişkilendirilmiştir. X kromozomu üzerinde şimdiye kadar BY ile ilişkilendirilen 100'ün üzerinde gen bulunur. X kromozomunun BY ile olan bu ilişkisinin; BY'nin erkeklerde neden sık görüldüğünü açıklamaktadır (29,32,43).

DS'ndan sonra BY'nin en sık nedeni olan Frajl X Sendromu (FXS); Xq27.3 bölgesindeki *FMR1* genindeki 5 'çevrilmemiş bölgede (UTR) CGG trinükleotid tekrarlarının genişlemesi nedeniyle meydana gelir. Etkilenen erkeklerin %2-6'sının kızların ise %1-4'nün nedeni olan FXS; BY, gelişme geriliği, uzun yüz, büyük-çıkıntılı kulaklar ve makroorşidizm gibi belirgin dismorfik özelliklere sahiptir (31,44) .

Kızlarda orta ve şiddetli BY'nin, DS'ndan sonra en sık nedeni olan Rett Sendromu (RS); genellikle Xq28 bölgesinde yer alan *MECP2* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Orta ve şiddetli İD'si olan kızların yaklaşık %1.5'inde görülen RS; normal bir gelişim dönemini takiben dil becerileri kaybı, ince ve kaba motor becerileri, iletişim becerileri, kafa büyümesinin yavaşlaması ve sıkma, yıkama yada alkışlama stereotipik el hareketlerinin gelişimi ile karakterize ciddi bir nörogelişimsel bozukluktur (31,45).

ATRX, CUL4B, IL1RAPL1, PQBP1 diğer sık görülen XL BY genleridir (29).

2.5.3.Epigenetik Bozukluklar

Pek çok kromatin değiştirici enzim ve diğer epigenetik düzenleyiciler, genetik olarak BY bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. Histon değiştiriciler, kromatin yeniden modelleyiciler ve metil-DNA bağlayıcı proteinlerin işlevindeki değişikliklerin nörogelişimsel kusurlara neden olduğu belirlenmiştir. Histon proteinlerinin DNA metilasyonunun ve translasyon sonrası modifikasyonlarının, nöronal ağların aktiviteye bağlı modülasyonuna aktif olarak katkıda bulunduğunu gösterir. Artan teknoloji ile birlikte; histonların posttranslasyonel modifikasyonu, DNA baz modifikasyonları ile

DNA kromatinin kovalent-nonkovalent değişikliklerini düzenleyen epigenetik düzenleyicileri kodlayan genlerin sayı ve mutasyonları gündeştikçe artmaktadır (46).

2.6.BY Tanısında Sık Kullanılan Genetik Tanı Yöntemleri

2.6.1.Karyotipleme

Karyotipleme, bir hücredeki kromozomların; ışık mikroskopunda uzunluk, sentromer konumu, bant gibi özellikleri değerlendirilerek özdeş çift kromozomlar halinde eşlendikten sonra belli bir düzene göre sıralanmasıdır. Karyotipleme; kromozomların en belirgin olduğu mitozun metafaz evresindeki kromozomlarla yapılır. Bu değerlendirmenin yapılabilmesi için bir kromozomlar üzerinde yer alan bazı bölgeler özel boyalarla işaretlenir ve kromozomların farklılıklarının görünmesi sağlanır. Karyotipleme ile 4-6Mb üzerindeki değişiklikler değerlendirilebilir rahatlıkla ortaya konulabilir. Karyotiplemede 4 Mb ın altındaki değişikliklerin tespiti zor veya imkansızdır. Karyotipleme; poliploidi, anöploidi, translokasyonları, inversiyonları, halkaları ve büyük delesyon-duplikasyon gibi kopya sayısı değişikliklerini tespit etmede yardımcı olur(47).

2.6.2. Floresan in situ hibridizasyon

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi; lam üzerinde sabitlenmiş kromozomlardaki çift sarmallı DNA'nın denatüre edilmesiyle gerçekleştirilir. Denatüre edilen DNA'nın belirlenen hedef bölgesini analiz etmek için iki floresan etiketli DNA probu birlikte kullanılır. İlk prob bir kontrol görevi görür ve hedef kromozom üzerinde ancak hedeflenen bölgenin dışındaki DNA ile birleşir. İkinci prob, bireyin DNA dizisindeki hedef olan bölgeyle birleşir. Eğer hedef bölge mevcutsa; prob hibridize olur ve kontrol probundan farklı bir renkle sinyal verir. FISH yöntemini 1kb üzerindeki değişimleri belirleyebilir. Bu özelliğiyle karyotip çözünürlüğünün yetersiz kaldığı; mikrodelsyon-miroduplikasyon, translokasyon gibi kromozomun yapısal değişimlerinde başarıyla kullanılabilir. Hastada bilinen kromozomal etyolojisi olan iyi tanımlanmış bir sendromla tutarlı özellikler göstermesi halinde, klinik olarak ön tanı konulması veya anormal karyotip göstermesi durumlarında FISH yöntemi uygulanabilir. FISH yönteminin kısıtlayıcı yanı FISH problemlerinin sadece sorgulanan

segmentlerin yeniden düzenlemelerini ortaya çıkarması ve genomun geri kalanı hakkında bilgi vermemesidir (47).

2.6.3.Array CGH

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi (Array comparative genomic hybridization_Array CGH_;metin içinde yaygın kullanım dolasıyla array CGH olarak kısaltılacaktır) referans sağlıklı bireye ait DNA ile hasta DNA'sının kıyaslandığı temele dayanan son derece kullanışlı bir yöntemdir. Array CGH yöntemi; hasta DNA'sı ile referans DNA arasında, kıyas yapabilme amacıyla karşılaştırmalı hibridizasyonuna dayanır. Eşit miktarda referans DNA ve hasta DNA'sı florokrom boyalarla işaretlenir. Sonrasında; mikroarray lamininin üzerinde yerleşik olarak bulunan, belli büyüklüklerde tasarlanarak hazırlanan probler ile referans DNA ve hasta DNA'sı hibridize edilir. Bu hibridizasyon aşamasından sonra bağlanmamış DNA yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılır ve özel tarayıcılar kullanılarak her bir probun verdiği sinyal ölçülür. Hasta DNA'sı ile referans DNA'sının floresan sinyal oranı, ilgili bölgeye ait kopya sayılarını ortaya koyar (48). Array CGH; 0,5 kb'den küçük kopya sayısı varyantlarını, dengeli translokasyonları ve düşük orandaki mozaizmleri tanımlayamaz (47).

2.6.4.Sanger Dizileme

Sanger Dizileme, belirli DNA bölgelerini incelemek için oligonükleotit primerlerini kullanan bir dizileme yöntemidir. Sanger Dizileme; yeni çift sarmallı DNA'nın oluşması için gerekli olan arginin (A), sitozin (C), timin (T), guanin (G) nükleotitlerini içeren bir deoksinnükleotid trifosfat (dNTP) karışımı, her bir nükleotit için floresan işaretli zincir sonlandırıcı dideoksinnükleotid trifosfatlar (ddNTP'ler) ve oligonükleotit primerlerinin bulunduğu ortamda yapılır. Çift sarmallı DNA'nın denatürasyonu sonrası oluşan tek iplikçikli DNA'ya oligonükleotit primerlerinin yapışması ve deoksinnükleotid trifosfatların kullanılarak tamamlayıcı zincirin uzaması sağlanır. Ortamda bulunan sonlandırıcı dideoksinnükleotid trifosfatlar eklenene kadar uzama devam eder. Uzama dizisine ddNTP'ler eklendiğinde bazına özgü renkte floresan verirler. Geleneksel olarak A yeşil floresan, T kırmızı, G siyah ve C mavi renkte floresan verir. Dizinin meydana geldiği cihazda; ortamdaki floresan ışımasını algılayan özel kamera vardır. Bir dizide; heterozigot bir varyant oluştuğunda eşit

yoğunlukta iki floresan ışıması algılanır, homozigot bir varyant olduğunda sadece yeni baz çiftinin rengi algılanır (47,49).

2.6.5.Yeni Nesil Dizileme

Yeni Nesil Dizileme (NGS; next generation sequencing); bir hasta örneğinde birden fazla DNA segmentinin eşzamanlı olarak, birbirine paralel olarak dizileyen ve referans bir diziyle kıyaslayan yüksek verimli bir teknolojidir.

NGS; belirli gen bölgelerini içeren klinik uygulama panelleri mevcuttur:

1. Hedef ekzon dizileme (targeted exom sequencing_TES_),
2. Protein kodlayan tüm ekzonları dizileme (whole exom sequencing_WES_)
3. Tüm genom dizileme (whole genome sequencing_WGS)

BY gibi genetik ve fenotip heterojenitenin yüksek olduğu durumlarda NGS ile birden fazla genin aynı anda çalışabilmesi tanıya ulaşma oranını artırır. Bunun yanında zaman ve ekonomik açıdan daha tasarruflu olabilmeyi mümkün kılar (47) Herbirinin farklı üstünlük ve kısıtlılıkları olan farklı NGS platformları geliştirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: NGS Platformlarından Bazıları ve Kullandığı Temel Mekanizmalar

Platform	Amplifikasyon Tekniği	Dizileme Platformu	Dizileme Kimyası
454/Roche	Emülsiyon PCR	Boncuklar sıralama için ayrı kuyucuklara yerleştirilir	Her bir baz çifti eklendiğinde salınan pirofosfatı tespit ederek pirosequencing kullanır
Illumina (MiSeq/HiSeq/NextSeq)	Köprü PCR	Hedeflenen her DNA bölgesi, bir çipin yüzeyine rastgele yerleştirilmiş bir küme içinde sıralanır.	Her bir baz çiftinin floresansı, her amplikona eklendikçe yakalanır
SOLiD	Emülsiyon PCR	Boncuklar rastgele bir çipin yüzeyine yerleştirilir ve her küçük oligonükleotid bu konumda etiketlenir ve dizilir.	Her bir baz çiftinin floresansı, her amplikona eklendiği gibi yakalanır
Ion Torrent	Emülsiyon PCR	Boncuklar, izole sıralama için ayrı kuyucuklara yerleştirilir	Her baz çifti eklendikçe proton salımını algılar

2.6.6.Nispeten Sık Kullanılan Diğer Yöntemler

Bu yöntemlerin dışında PCR, Southern-Blot gibi yöntemlerde BY tanısında kullanılan yöntemlerdi. Özellikle FXS gibi üçlü tekrar hastalıkları tanısında kullanılan PCR yönteminde; üçlü tekrarının komşu bölgeleri ile eşleşen özgü primerlerden oluşan üç primer (ileri ve geri primerler) ve üçlü tekrarları içinde birden fazla hazırlama bölgesine sahip bir primer kullanır. Ters primer, floresan boya ile etiketlenir, böylece amplifiye edilen ürünler, PCR reaksiyonunun ardından bir kapiller elektroforez yoluyla Genetik Analizör ile tespit edilir. CGG genişlemesi olan alellerden bir floresan elektroferogram üzerinde karakteristik görünüm verir. Bir Genetik Analizörde kapiler elektroforezden sonra, tam uzunluktaki PCR fragmanlarının boyutu, önceden

tanımlanmış matematiksel formül kullanılarak CGG tekrarlarının sayısına dönüştürülür (50).

BY tanısında günümüzde birçok yöntem kullanılmaktadır. Konvansiyonel yöntemlerden karyotipleme en sık başvuru yöntemidir. Açıklanamayan vakalarda yeni yaklaşım yöntemleriyle sorunu çözmeye yönelik adımlar atılmaktadır. Ancak her yöntemin kendine ait üstünlükleri olabileceği gibi ve kısıtlayıcı yanları bulunmaktadır (Tablo 5) (2,3).

Tablo 5 : BY tanısında kullanılan bazı yöntemlerin kıyaslanması

	Karyotipleme	FISH	Array CGH	WES
Tanı koyma oranı	%3-5	%3-6	%10-20	%25-42
Hassasiyet	5-10 Mb	1 kb	500 bp	1 p
Kısıtlılıklar	çözünürlüğünün altındaki değişimlerin belirlenememesi	hedefe yönelik olması	Dengeli yeniden düzenlenmeler ve mozaisizmlerin belirlenememesi	Büyük delesyonların belirlenememesi

3.MATERYAL-METOD

3.1. Materyal-Metod

Çalışmamızda Ocak 2016 tarihinden Aralık 2019 tarihine kadar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği (TGP) 'ne başvuran hastalardan alınan anamnez ile yapılan fizik muayene sonrasında BY ön tanısı düşünülen ve Pediatrik Nöroloji Polikliniği tarafından BY tanısıyla Tıbbi Genetik Polikliniği'ne yönlendirilen hastalar değerlendirmeye alındı.

Bu tarihler arasında Tıbbi Genetik Polikliniği'nde BY tanı veya ön tanısıyla takibi yapılan 328 hasta çalışmaya dahil edildi. Değerlendirilen hastaların tamamı 18 yaş altındaydı.

Başvuran hastaların; hastane sistemi ile muayene dosyaları üzerinden prenatal-natal-postnatal dönemi kapsayan detaylı anamnezleri, klinik bulguları, radyolojik görüntüleme değerlendirmeleri, laboratuvar bulguları ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda çalışılan genetik test çalışmaları retrospektif olarak incelendi. Elde edilen veriler kaydedildi. BY ön tanısı yada tanısıyla Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvuran hastalar ile Tıbbi Genetik Polikliniği'nde BY ön tanısı konulan hastalar muayene dosyaları ve hastane sistemi üzerinden belirlendi. Belirlenen hastaların kaydedilen verileri değerlendirilirken öncelikle hastamızın prenatal-natal-postnatal öyküsü retrospektif olarak incelendi. Hastanın fetal yaşamı süresince annesinin gebeliği ile ilgili alınan bilgiler ve gebelik takipleri retrospektif olarak incelendi. Gebelik öncesinde ve gebelik esnasındaki beslenme durumu değerlendirildi. Annenin kalıcı bir hastalığının olup olmadığı ve sürekli ilaç kullanımı olup olmadığı değerlendirildi. Gebelik süresince enfeksiyöz bir hastalık geçirip geçirmediği ve geçirenlerde enfeksiyon tedavisi için kullanılan ilaçların fetüs üzerinde olabilecek etkileri değerlendirildi. Doğumun zamanında olup olmadığı, doğum eyleminin ne kadar sürdüğü ve doğum esnasında hastanın hipoksi ve travma maruziyetinin bulunup bulunmadığı değerlendirildi.

Hastada BY'ye eşlik eden anomali olup olmadığını görebilmek için; hastaya yapılan dismorfolojik muayene ile hastaya takibi esnasında yapılan direk grafi, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntülemelerin raporları muayene dosyaları ve hastane sistemi kullanılarak retrospektif olarak incelendi.

Hastada olması muhtemel genetik hastalığın kalıtımını anlamamızı kolaylaştıran, hastanın ailesindeki hasta ile muhtemel taşıyıcıları aynı anda görmemizi sağlayan, böylece doğru ve kapsayıcı genetik danışma vermeye yardımcı olan, hastadan başlayarak en az 3 kuşağı içine alan soyağacı hasta dosyaları kullanılarak retrospektif olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda bazı BY hastalarını değerlendirmeye almadık. Bu hastalarda uyguladığımız dışlama kriterleri:

- ✓ Fetal yaşamda BY ile ilişkilendirilmiş ilaç-toksin maruziyeti bulunanlar,
- ✓ Prematürünün komplikasyonlarına bağlı olduğu düşünülen BY hastaları,
- ✓ Natal dönemde ağır hipoksi, travma, kanama öyküsü bulunan BY hastaları,
- ✓ Karyotip analizi ile BY'si açıklanan hastalar

Çalışmamızda polikliniğimizde BY ön tanısı ve tanısıyla takibi yapılan hastalardan hangi klinik durumda hangi genetik tanı testinin çalışıldığı ve çalışılan genetik tanı testinin ne kadar başarılı olduğu retrospektif olarak değerlendirildi.

Aşağıda belirtilen tüm genetik testler için periferik kan örnekleri kullanılmıştır.

FISH yönteminin kullanılacağı hastaların periferik kan örneği kullanılarak yapılan standart 72 saatlik lenfosit kültürü ile elde edilen pellet kullanıldı. RPMI-1640, L-glutamin ve fetal bovine serum içeren 5ml'lik kültür ortamına ekimi yapıldı. Kültüre 48 saat sonra kolsemid eklendi ve 37°C 30 dk bekletildi. Sonrasında harvest işlemine geçildi. Kültür santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atıldı, hipotonik solüsyon (KCl) eklendi ve 37°C'de 20 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda fiksatif (metanol/asetik asit:3/1) eklendi ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım alındı, hücre pelletinin rengi açılana kadar fiksatif eklenip, santrifüj edildi, süpernatant kısım atıldı. Pelletin rengi açıldığında üzerine fiksatif eklenerek +4°C de saklandı. Bu aşamaların sonrasında çalışılacak proba yönelik aşağıda yer alan diğer işlemler yapıldı.

William-Beuren Sendromu (WBS) düşünölen hastalarda; Williams-Beuren (7q11.23, kırmızı, Cytocell. Cambridge, UK) bölge ve kontrol (D7Z1, 7p11.1-q11.1, yeşil, Cytocell, Cambridge) probu kullanıldı. FISH problemleri, 75 ° C'de 10 dakika süreyle denatüre edildi. Slaytlar, 37 ° C'de 18 saat süreyle inkübe edildi. Hibridizasyon sonrası yıkamalar, üreticinin talimatlarına (Cytocell, Cambridge, UK) göre yapıldı. Slaytlar, DAPI Antifde ES (Cytocell, Cambridge, UK) ile zıt boyandı. FISH sinyalleri; uygun mikroskop (Olympus BX53, Tokyo, J), uygun filtreler (Olympus U-CBM, Tokyo, J), uygun cihaz kamerası (Olympus DP72, Tokyo, J) ve FISH görüntöleme yazılımı (Cellsense, Olympus, Tokyo, J) kullanılarak değeriendirildi. Prader Willi/Angelman Sendromu (PWS/AS) düşünölen hastalarda; Prader Willi/Angelman (SNRPN, 11q11.2, kırmızı, Cytocell. Cambridge, UK) bölge ve kontrol (15qter, 15q26.3, yeşil, Cytocell, Cambridge) probu kullanıldı. FISH problemleri, 75 ° C'de 10 dakika süreyle denatüre edildi. Slaytlar, 37 ° C'de 18 saat süreyle inkübe edildi. Hibridizasyon sonrası yıkamalar, üreticinin talimatlarına (Cytocell, Cambridge, UK) göre yapıldı. Slaytlar, DAPI Antifde ES (Cytocell, Cambridge, UK) ile zıt boyandı. FISH sinyalleri; uygun mikroskop (Olympus BX53, Tokyo, J), uygun filtreler (Olympus U-CBM, Tokyo, J), uygun cihaz kamerası (Olympus DP72, Tokyo, J) ve FISH görüntöleme yazılımı (Cellsense, Olympus, Tokyo, J) kullanılarak değeriendirildi.

Genomik DNA, MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostic) kullanılarak ekstrakte edildi.

Frafil X Sendromu düşünölen hastaları değeriendirmek için; üçlü tekrarlı PCR (TP-PCR) ve ardından fragman boyutlandırması için bir kapiler elektroforezi temel alan LabGscan™ FRAXA PCR Kiti kullanıldı. Hasta örnekleri çalışılırken “Veriti (Thermo Fisher Scientific)” PCR cihazı ile hedef amplifikasyonu yapıldı ve elde edilen amplikonların boyutu “3730, 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific)” cihazı ile analiz edildi. Elde edilen veriler American College of Medical Genetics (ACMG) ‘in önerdiği sınıflandırmaya göre değeriendirildi (51) .

MECP2 geninin protein kodlayan ekzon ve ekzon-intron bileşkelerini değeriendirmek için; üreticinin protokolüne göre Nextera® XT DNA Library

Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) kullanılarak MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) NGS Sistemi kullanıldı. Elde edilen veriler Clinvar, The *Human Gene Mutation Database (HGMD®)*, Varsome (The Human Genomics Community) kullanılarak analiz edildi.

Array CGH çalışmalarında; Ocak 2016'dan Aralık 2017'ye kadar Affymetrix, CytoScan 315K, Cytoscan 750K (Affymetrix CytoScan Optima®, CA, USA) SNP microarray platformları ve Chromosome Analysis Suite yazılımı kullanıldı. Elden edilen veriler dizi matrisi üzerinde en az 20 oligo-nükleotid probu ile tespit kriterleri ile analiz edildi. Ocak 2018-Aralık 2019 arasında ise HumanCytoSNP-12 Beadchip 300K dizisi, Infinium Global Screening Array-24 V2.0 665K platformları (Illumina) ve Karyostudio yazılımı kullanıldı. Bir segmente 10'dan fazla ardışık araştırma dahil edildiğinde kopya numarası değişikliği çağrıldı. Genomik veriler, Kaliforniya Üniversitesi Santa Cruz Genom Enstitüsü (UCSC)'nün Şubat 2009 insan referans dizisi (hg19) (Genom Referans Konsorsiyumu İnsan Yapısı 37-GRCh37) ile kıyaslandı. CNV'ler fenotipe göre analiz edildi ve değerlendirildi. Yorumlama için DGV (Database of Genomic Variants), DECIPHER (Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) ve Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (Online Mendelian Inheritance in Man 2020) veritabanları kullanılmıştır. Sonrasında CNV'ler; gen içeriği, gen işlevi, kalıtım şekli, birden fazla hakemli yayının bulunmasına göre iyi huylu, klinik önemi belirsiz ve patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Moleküler karyotip sonuçları International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN 2016) ve GRCh37'ye göre yazılmıştır (52–56) .

WES (tüm protein kodlayan ekzon ve ekzon-intron bileşkeleri) çalışması yapılan hastalarda; üreticinin protokolüne göre Nextera™ DNA Exome (Illumina, San Diego, CA, USA) kiti kullanılarak NextSeq® 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) NGS Sistemi kullanıldı. WES çalışmasının aşamaları:

1. Genomik DNA Tagmentasyonu: Bu aşamada, Nextera transpozom adaptör diziler ile eş zamanlı olarak gDNA' yı fragmanlara ayırır ve etiketler. 2 ml PCR tüplerine aşağıda listelenen maddeler sırasıyla eklenir. TD (Tagment DNA Buffer) (25 µl), Normalize gDNA (10 µl), TDE2 (Tagment DNA Enzyme 2) (15 µl). 1800 rpm de 1 dakika karıştırılır. 280×g de 1 dakika santrifüj yapılır. Tüpler thermal cycler cihazına

yerleştirilip 58°C'de 10 dk. çalıştırılır. Her tüpe 15 µl ST (Stop Tegment Buffer) eklenir ve pipetaj yapılır. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirilip 60°C'de 5 dk. çalıştırılır.

2. Tagmente DNA Temizlenmesi: Her tüpe 52 µl SPB (Sample Purification Beads) eklenir. Tüpler 10 kez pipetaj yapılarak karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon için bırakılır. Tüpler manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir (2-5 dk). 98 µl süpernatant yeni 0,2 ml tüplere transfer edilir. Her tüpe 137 µl SPB eklenir. Tüpler 10 kez pipetaj yapılarak karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon için bırakılır. Tüpler manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir (2-5 dk). Süpernatant her tüpten atılır. Her tüpe 200µl yeni hazırlanmış etanol eklenir. Manyetik standın üstünde 30 sn inkübe edilir. Tüplerden süpernatant atılır. 20 µl pipet kullanarak, tüplerde etanol kalmadığından emin olunur. Tüpler 5 dk süreyle hava ile kurumaya bırakılır. Tüplere 22,5 µl RSB (Resuspension Buffer) eklenir. 1800 rpm'de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir. 280×g'de 1 dk santrifüj yapılır. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. 20 µl süpernatant yeni tüplere transfer edilir.

3. Tagmente DNA Amplifikasyonu: Her örneğe özgü bir indeks olacak şekilde 5 µl indeks 1 (i7) adaptör tüplere eklenir. i7 adaptör tüplerinin kapakları yeni turuncu kapaklar ile değiştirilir. Ardından 5 µl indeks 2 (i5) adaptöründen tüplere eklenir. Burada amaç her tüpteki indeks kombinasyonlarının farklı olmasıdır. Her i5 adaptör tüplerinin kapakları da yeni beyaz kapaklar ile değiştirilir. Her tüpe 20 µl Library Amplification Mix (LAM) eklenir. 1200 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 280×g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Tüpler 72°C de 3 dk, 98°C de 30 sn. ve 10 döngü (98°C de 10 sn., 60°C de 30 sn., 72°C de 30 sn) çalıştırılır.

4. Amplifiye DNA Temizlenmesi: Tüplere 280×g'de 1 dk. santrifüj yapılır. Her tüpe 90µl SPB eklenir. 1800 rpm'de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon için bırakılır. 280×g'de 1 dk santrifüj yapılır. Tüpler manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir (2-5 dk). Süpernatant her tüpten atılır. Her tüpe 200µl yeni hazırlanmış etanol eklenir. Manyetik standın üstünde 30 sn inkübe edilir. Tüplerden süpernatant atılır. 20 µl pipet kullanarak, tüplerde etanol kalmadığından emin olunur. Tüpler 5 dk süreyle hava ile kurumaya bırakılır. Tüplere 17 µl RSB eklenir. 1800 rpm'de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir. 280×g'de 1

dk santrifüj yapılır. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. 15µl süpernatant yeni tüplere transfer edilir.

5. Prob Hibridizasyonu: 0,2 ml PCR tüplerine sırasıyla DNA kütüphanesi (30 µl), BLR (Blocker) (10 µl), CEX (Coding Exome Oligos) (10 µl) eklenir. 1200 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. 125 µl SPB eklenir. 1800 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. Süpernatant atılır. 200µl yeni hazırlanmış etanol eklenir. Manyetik standın üstünde 30sn inkübe edilir. Süpernatant atılır. 20µl pipet kullanarak, tüplerde etanol kalmadığından emin olunur. Manyetik stand üstünde 10 dakika kurumaya bırakılır. 7,7 µl EHB1 (Enrichment Hybridization Buffer 1) eklenir. 1800 rpm'de 1 dakika karıştırılır. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. 7,5 µl süpernatant yeni tüpe transfer edilir. Süpernatantın üstüne 2,5 µl EHB2 Enrichment Hybridization Buffer 2) eklenir. 1800 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Tüpler Tüpler 95°C de 10 dk, 58°C de 30 dk. çalıştırılır.

6. Hibridize Probların Yakalanması: Tüp thermal cycler cihazından alındıktan sonra 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. 10µl örnek 0,5 ml tüpe transfer edilir. 250µl SMB (Streptavidin Magnetic Beads) eklenir. 1200 rpm'de 5 dakika karıştırılır. 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. Süpernatant atılır. Manyetik stand üzerinden kaldırılır.

7. İkinci Hibridizasyon: 0,2ml PCR tüplerine DNA kütüphanesi (30µl), BLR (10µl), CEX (10µl) sırasıyla eklenir. 1200 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. 125µl SPB eklenir. 1800 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. Süpernatant atılır. 200µl yeni hazırlanmış etanol eklenir. Manyetik standın üstünde 30sn inkübe edilir. Süpernatant atılır. 20µl pipet kullanarak, tüplerde etanol kalmadığından emin olunur. Manyetik stand üstünde 10 dakika kurumaya bırakılır. 7,7µl EHB1 eklenir. 1800 rpm'de 1 dakika karıştırılır. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. 7,5µl süpernatant

yeni tüpe transfer edilir. Süpernatantın üstüne 2,5µl EHB2 eklenir. 1800 rpm'de 1 dakika karıştırılır. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Tüpler 95°C de 10 dk, 58°C de 30 dk. çalıştırılır.

8. Hibridize Probların Yakalanması: Tüp thermal cyclers cihazından alındıktan sonra 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. 10µl örnek 0,5ml tüpe transfer edilir. 250µl SMB eklenir. 1200 rpm'de 5 dakika karıştırılır. 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 280xg'de 1 dakika santrifüj edilir. Manyetik standı yerleştirilir ve sıvı berraklaşmaya kadar beklenir. Süpernatant atılır. Manyetik standı üzerinden kaldırılır. 200µl EEW (Enhanced Enrichment Wash Solution) eklenir. 1800 rpm'de 4 dakika karıştırılır. Pellet çözünmezse pipetaj yapılarak çözülür. 50°C'ye ayarlanmış ısı bloğuna yerleştirilip, 30 dakika beklenir. Manyetik standı yerleştirilir ve sıvı berraklaşmaya kadar beklenir. Süpernatant atılır. Manyetik standı üzerinden kaldırılır.

9. Yakalanan Kütüphanenin Temizlenmesi: Tüpe 45µl SPB eklenir. 1800 rpm'de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon için bırakılır. 280xg'de 1 dk santrifüj yapılır. Tüp manyetik standı yerleştirilir ve sıvı berraklaşmaya kadar beklenir (2-5 dk). Süpernatant tüpten atılır. Tüpe 200µl yeni hazırlanmış etanol eklenir. Manyetik standın üstünde 30 sn inkübe edilir. Tüpten süpernatant atılır. 20µl pipet kullanarak, tüpte etanol kalmadığından emin olunur. Tüp 5 dk süreyle kurumaya bırakılır. Tüpe 27,5µl RSB eklenir. 1800 rpm'de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir. 280xg'de 1 dk santrifüj yapılır. Manyetik standı yerleştirilir ve sıvı berraklaşmaya kadar beklenir.

10. Zenginleştirilmiş Kütüphanenin Amplifikasyonu: Berraklaşan sıvı alınarak üzerine 5µl PPC (PCR Primer Cocktail) eklenir. 20µl EAM (Enrichment Amplification Mix) eklenir. 1200 rpm'de 1 dk karıştırılır. 280xg'de 1 dk santrifüj yapılır. Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek 72°C de 3 dk, 98°C de 30 sn. ve 10 döngü (98°C de 10 sn., 60°C de 30 sn., 72°C de 30 sn) çalıştırılır.

11. Zenginleştirilmiş Amplifiye Kütüphanenin Temizlenmesi: Thermal Cycler cihazından alınan tüpe 50µl SPB eklenir. 1800 rpm'de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon için bırakılır. 280xg'de 1 dk santrifüj yapılır. Tüp manyetik standı yerleştirilir ve sıvı berraklaşmaya kadar beklenir (2-5 dk). Süpernatant tüpten atılır. Tüpe 200µl yeni hazırlanmış etanol eklenir. Manyetik standın üstünde 30 sn inkübe edilir. Tüpten süpernatant atılır. 20µl pipet kullanarak,

tüplerde etanol kalmadığından emin olunur. Tüp 5 dk süreyle kurumaya bırakılır. Tüpe 32µl RSB eklenir. 1800 rpm’de 1 dk karıştırılır. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir. 280×g’de 1 dk santrifüj yapılır. Manyetik stande yerleştirilir ve sıvı berraklaşınca kadar beklenir. 30µl süpernatant yeni tüpe transfer edilir.

12. Hazırlanan Kütüphanenin Denatürasyonu: Hazırlanan kütüphanenin konsantrasyonu Qubit methodu ile ölçülür. Stok kütüphanenin, konsantrasyonu 5ng/µl olacak şekilde dilüsyonu yapılır. Tekrar Qubit yapılarak ölçülen konsantrasyon, “4.329” ile çarpılır. Çıkan sonuç, kütüphanenin nM cinsinden değerini verir. 50µl total hacim ve 4nM kütüphane alabilmek için “200/nM kütüphane” işlemi yapıp, toplam hacim 50µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklenir. 0,2’lik tüpe 4nM kütüphane (10µl) ve 0.2N NaOH (10µl) eklenir ve kısaca vortekslenir. Böylece, 2nM kütüphane elde edilir. 280xg’de 1 dk santrifüj yapılır. Tüp oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir. 2ml tüp içinde Hybridization Buffer (HT1) (990µl) ve 2nM kütüphane (10µl) eklenir ve kısaca vortekslenir. 280xg’de 1 dk santrifüj yapılır. Bu tüpten alınan 117µl örnek, 1183µl HT1 ile farklı bir 2ml tüpte kısaca vortekslenir. Dilüsyonu yapılmış ve denatüre edilmiş Phix’ten 5µl ilave edilir ve kısaca vortekslenir. Tüpün içindeki miktarın tamamı, Reagent Cartidge’ın 10 numaralı bölümüne aktarılır.

13. Denatüre Kütüphanenin Cihaza Yüklenmesi: NextSeq 500 cihazının yazılım arayüzünde “Sequence” seçilir ve çalışmanın başlaması için kurulum aşamalarına geçilir. İlk aşama olarak Flow Cell, üzeri alkollü mendil ile temizlenerek cihaza yerleştirilir ve “Next” tuşuna basarak bir sonraki aşamaya geçilir. Atık reaksiyon maddesi kabı ve “Buffer Cartidge” cihaza yerleştirilir ve “Next” tuşuna basarak bir sonraki aşamaya geçilir. Hazırlanan kütüphanenin yüklendiği “Reagent Cartidge” cihaza yüklenir ve “Next” tuşuna basarak bir sonraki aşamaya geçilir. Cihazın kendi içindeki kontrollerini yapması beklenir ve “Start” tuşuna basarak çalışma başlatılır. Ekrandan çalışmanın bitişi takip edilir. Sonuçta FASTQ formatında dosya elde edilir.

14. Ön Verilerin Değerlendirilmesi:

- ✓ Okunan FASTQ dosyaların kalitelemleri QC araçları ile sağlanır bunun için FASTQC aracı kullanılacaktır.
- ✓ Trimomatic programıyla düşük kaliteli okuma(read) lar ve adaptör dizileri filtrelenecektir.

- ✓ BWA ile referans genoma haritalanmış kısa okumalar Samtools kullanılarak PCR fazlalıklarından arındırılır.
- ✓ Elde edilen çıktı üzerinde GATK aracılığıyla tekrar hizalama (realignment) yapılır. Bu şekilde varyasyon taramasına hazırlanmış veri üzerinde GATK UnifiedGenotyper kullanılarak tek baz değişiklikleri (SNV) ve küçük boyuttaki insersiyon ve delesyonlar tespit edilebilir.
- ✓ Bu varyasyonların yaklaşık %30 kadarı okuma ve hizalama hatalarından kaynaklıdır ve yalancı varyasyonlardır. GATK FilterVariants ve VQSR araçları kullanılarak veri içindeki yalancı varyasyonlar temizlenir. GATK yazılımı varyasyonları VCF formatında saklamaktadır.
- ✓ Bu varyasyonların olası fonksiyonel etkileri, protein kodu üzerinde oluşturdukları değişimler (missense, frame-shift vb.) ve toplumsal veritabanlarındaki alel frekans bilgileri SnpEff yazılımı aracılığıyla VCF verisine eklenir.
- ✓ VCF verisi Varsifter yazılımı ile görüntülenebilmekte ve çeşitli filtreleme çalışmaları yapılabilmektedir. Toplumda nadir görülen varyasyonlar, mevcut SNP veritabanlarında görülmemiş ve ilk defa çocuklarda görülen de novo mutasyonlar Varsifter yazılımı kullanılarak seçilebilir.

15: Varyantların Anotasyon Analizi:

- ✓ Genomik varyasyonların anlamlandırılmasında anotasyon en önemli aşamadır.
- ✓ Bu aşamanın çıktıları etkilenen genlerin ve transkriptlerin listesinin eldesi, değişimin protein dizisinde oluşturduğu değişimlerin elde edilmesi, değişimlerin bölgelerinin belirlenmesi(kodlayan dizi, intron bölgesi, non coding RNA , regule edici bölge, splice varyant bölgesi gibi), OMIM Clinvar gibi varyant veri bankalarında bulunan varyantların belirlenmesi ve raporlanması aşamalarını içermektedir.
- ✓ Bu varyantların patojenik etkileri AnnoVAr, SNP Eff, Variant Effect Predictor ve GEMINI programlarından oluşturacağımız bu algoritmalarının çoğunluğuna göre karar verilecek patojenite sınıflandırması yapılacaktır.
- ✓ Varyantlar bilişsel yetersizliğe neden olabilecek nörolojik hastalıklar ile psikiyatrik hastalıklar (bipolar bozukluk, şizofreni, vs.), gelişme gerilikleri, intestinal problemler gibi eşlik edebilecek problemler açısından

değerlendirilecek. Patojeniteye neden olduğu düşünölen varyantlarda aile analizleri ile literatür taraması yapılacak

- ✓ Elde edilen veriler CLINVAR, QIAGEN QCI Bioinformatics ve Varsome (The Human Genomics Community) veri tabanları kullanılarak analiz edildi.

3.2.İstatistik

Çalışmamızın verileri Statistical Packed for the Social Sciences (SPSS) 23.0 paket programında analiz edilerek say ve yüzde değerleri kullanılmıştır.



4.BULGULAR

Çalışmamızda Ocak 2016 tarihinden Aralık 2019 tarihine kadar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniği'nde bilişsel yetersizlik tanısıyla takibi yapılan 328 hastanın 179 tanesi erkek, 149 tanesi kız hastaydı. Değerlendirmeye alınan hastaların tamamı 18 yaş altındaydı (Tablo 6) .

Tablo 6 : Hasta-Yaş-Cinsiyet bilgileri

Cinsiyet				
Hasta	n	Yaş	Erkek (n,%)	Kız (n,%)
	328	6,41	179 (54,57)	149 (45,43)

BY tanısıyla polikliniğimize başvuran yada konsülte edilen; elf yüzü (geniş ağız, kepçe kulak, dolgun yanaklar) görünümü, kardiyovasküler anomali, davranış bozukluğu, hiperkalsemi, yıldız şeklinde iris bulgularından bir yada birkaçının eşlik ettiği 4 tanesi kız, 3 tanesi erkek olmak üzere 7 hastaya Williams-Beuren Sendromu'na yönelik 7q11.23 bölgesi FISH yöntemiyle çalışıldı. Çalışılan 2 kız çocukta hastaların kliniğini açıklayacak şekilde delesyon tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7: 7q11.23 delesyonu tespit edilen hastalar ve özellikleri

Hasta	Yaş / Cinsiyet	Sonuç	Klinik
WBS1	1 / K	del 7q11.23	BY, DD, pulmoner kapak darlığı, gastroözefajial reflü, nöbetler, hipotiroidi
WBS2	11 / K	del 7q11.23	BY, DD, aort darlığı, hipotirodizm, olekranon yokluğu

BY ön tanısı düşünülen ve buna ek olarak gelişme geriliği, konuşma problemleri, davranışsal problemleri, uzun yüz, kaba çene-alın, büyük-çıkıntılı kulaklar ve makroorşidizm gibi bulgulardan bir veya birkaçının eşlik ettiği 48 erkek hastada öncelikle FXS çalışıldı. Buna yönelik FMR1 geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrarı TP-PCR yöntemiyle değerlendirildi. Bu hastalardan 4 tanesinde CGG tekrar sayısının 200'ün üzerinde olduğu tespit edildi ve ACMG klavuzunda belirtildiği şekilde mutasyon olarak değerlendirildi.

Tablo 8 : FXS tanısı konan hastalar ve özellikleri

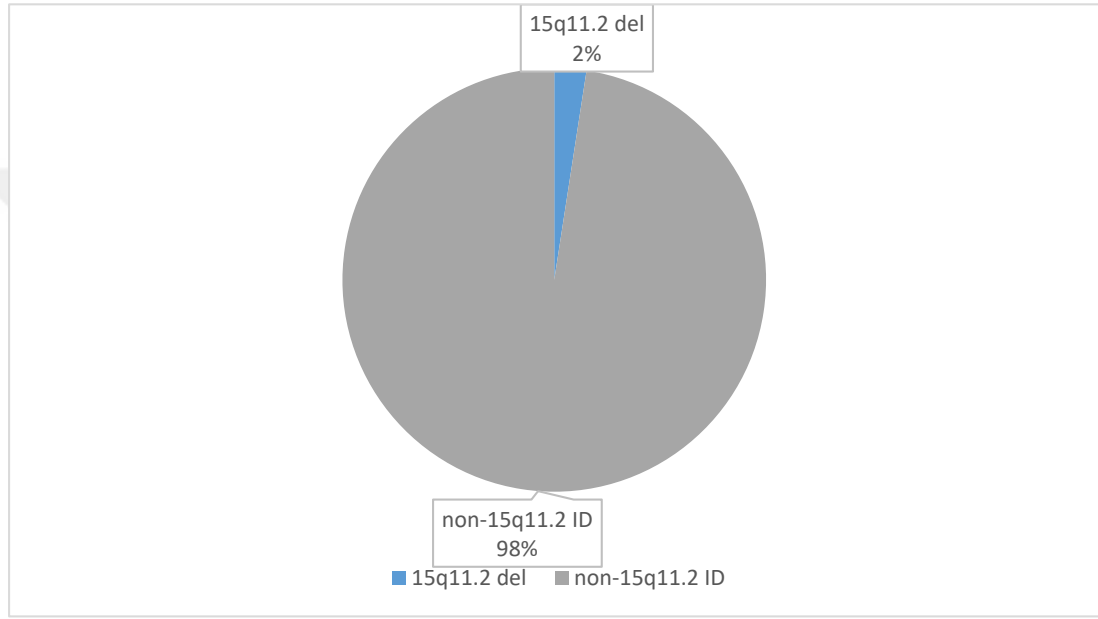
Hasta	Yaş / Cinsiyet	Tekrar Sayısı	Klinik
FXS1	10 / E	FMR1 geni, CAG tekrarı > 200	MMR, makroorşidizm, obezite, kepçe kulaklar
FXS2	15 / E	FMR1 geni, CAG tekrarı > 200	BY, davranış ve yeme problemi
FXS3	5 / E	FMR1 geni, CAG tekrarı > 200	MMR, yeme bozukluğu
FXS4	7 / E	FMR1 geni, CAG tekrarı > 200	MMR, kepçe kulak, yeme problemi

Polikliniğimize başvuran; tipik olarak normal bir gelişimin sonrasında iletişim problemleri yaşayan, dil becerileri, ince-kaba motor becerilerinin kaybı ve stereotipik el hareketlerinin belirgin olduğu 19 kız hastada öncelikle RS düşünüldü. Bu hastalardan; RS'nun %95'inden sorumlu olan MECP2 geninin protein kodlayan tüm ekzon ve ekzon-intron bileşkeleri NGS yöntemiyle değerlendirildi. Bu hastalardan 5 tanesinde hastanın kliniğini açıklayacak mutasyon tespit edildi. Tespit edilen mutasyonlar Sanger dizileme yöntemi ile doğrulandı ve segregasyon analizleri yapıldı (Tablo 9).

Tablo 9 : Rett Sendromu Tanısı Konan Hastalar ve Özellikleri

Hasta	Yaş / Cinsiyet	Tespit Edilen Değişiklik	Klinik Etkisi	Pozisyonu	Türü	Clinvar	Klinik
RS1	4 / K	MECP2(NM_001110792.2):c.799C>T (p.Arg267Ter)	P	exon 3 of 3 position 386 of 9878 (coding)	nonsense	rs61749721	MMR, konuşamama, epilepsi
RS2	1 / K	MECP2(NM_001110792.2):c.136_139dupGATA (p.Lys47ArgfsTer11)	P	exon 2 of 3 before position 78 of 351 (coding, NMD)	frameshift	-	BY, epilepsi
RS3	5 / K	MECP2(NM_004992.3):c.916C>T (p.Arg306Cys)	P	exon 3 of 3 position 539 of 9878 (coding)	missense	rs61751362	BY, DD, yürüyememe, konuşamama, epilepsi
RS4	3 / K	MECP2(NM_004992.3):c.502C>T (p.Arg168Ter)	P	exon 3 of 3 position 125 of 9878 (coding)	nonsense	rs61748421	BY, DD, epilepsi
RS5	2 / K	MECP2(NM_001110792.2):c.1105_1107del (p.Ser369del) / MECP2(NM_001316337.2):c.837_922del (p.His279GlnfsTer4)	LP / P	exon3of3 position 692-694 of 9878 (coding / exon 5 of 5 position 739- 824 of 9878 (coding, NMD))	in frame / frameshift	rs267608564 / rs1557135314	MMR, epilepsi

BY ön tanısı düşünülen; buna ek olarak infantil dönemde hipotoni öyküsü bulunan, hipogonadizm, hiperfajiye bağlı morbid obezite, kısa boy, epilepsi ve davranış bozukluğu gibi bulgulardan birkaçının eşlik ettiği 36'sı kız, 31'i erkek olmak üzere 67 hastaya 36 K PWS/AS açısından 15q11-13 bölgesine FISH çalışması yapıldı. Çalışılanlardan 7 tanesi erkek 1 tanesi kız çocuk olmak üzere 8 tanesinde hastanın kliniğini açıklayacak delesyon tespit edildi. PWS/AS tespit edilen hastaların tüm BY hastalarına oranı Şekil 4 te verilmiştir.



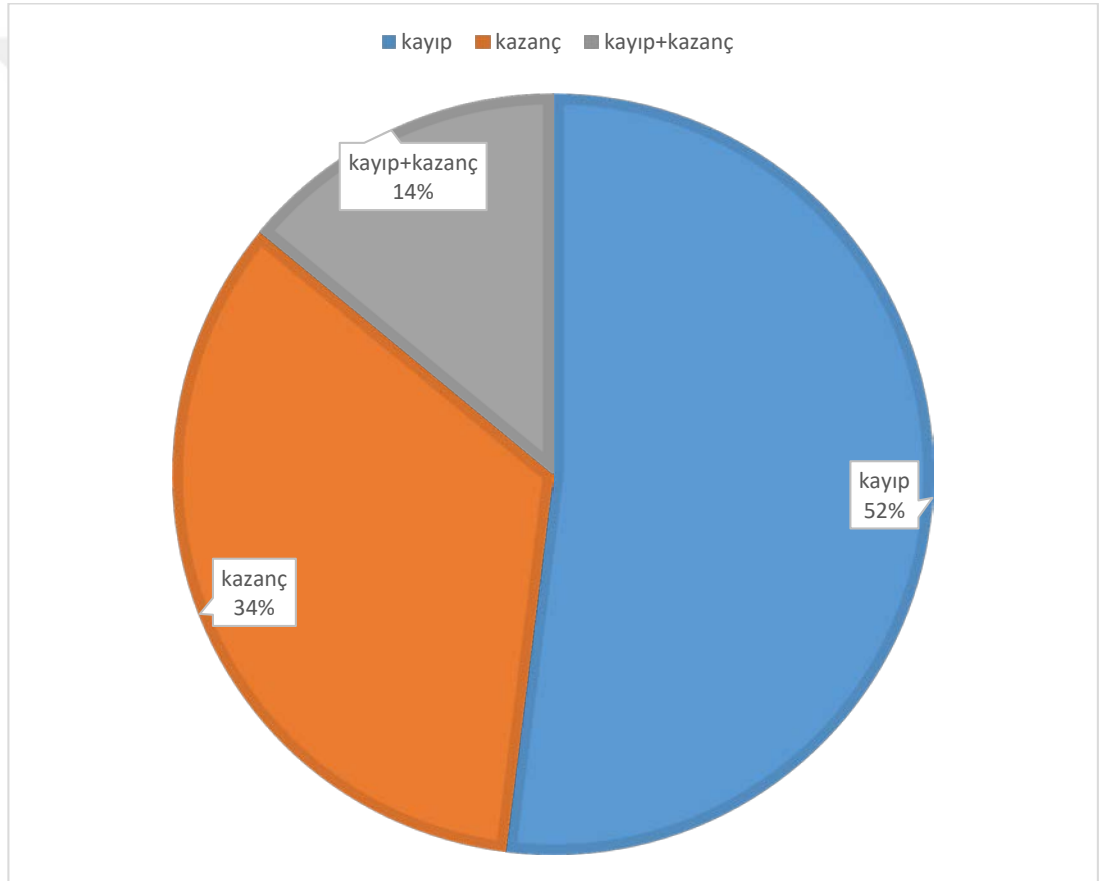
Şekil 4: 15q11.2 del/non-del

Tablo 10 : 15q11.2 delesyonu tespit edilen hastalar ve özellikleri

Hasta	Yaş / Cinsiyet	Sonuç	Klinik
PWA1	12 / E	del 15q11.2	BY, DD, epilepsi
PWA2	8 / K	del 15q11.2	BY, DD, epilepsi
PWA3	6 / E	del 15q11.2	BY, DD, epilepsi
PWA4	3 / E	del 15q11.2	MMR
PWA5	2 / E	del 15q11.2	MMR
PWA6	4 / E	del 15q11.2	BY, DD, obezite
PWA7	7 / E	del 15q11.2	BY, DD, obezite
PWA8	9 / K	del 15q11.2	BY, DD, epilepsi

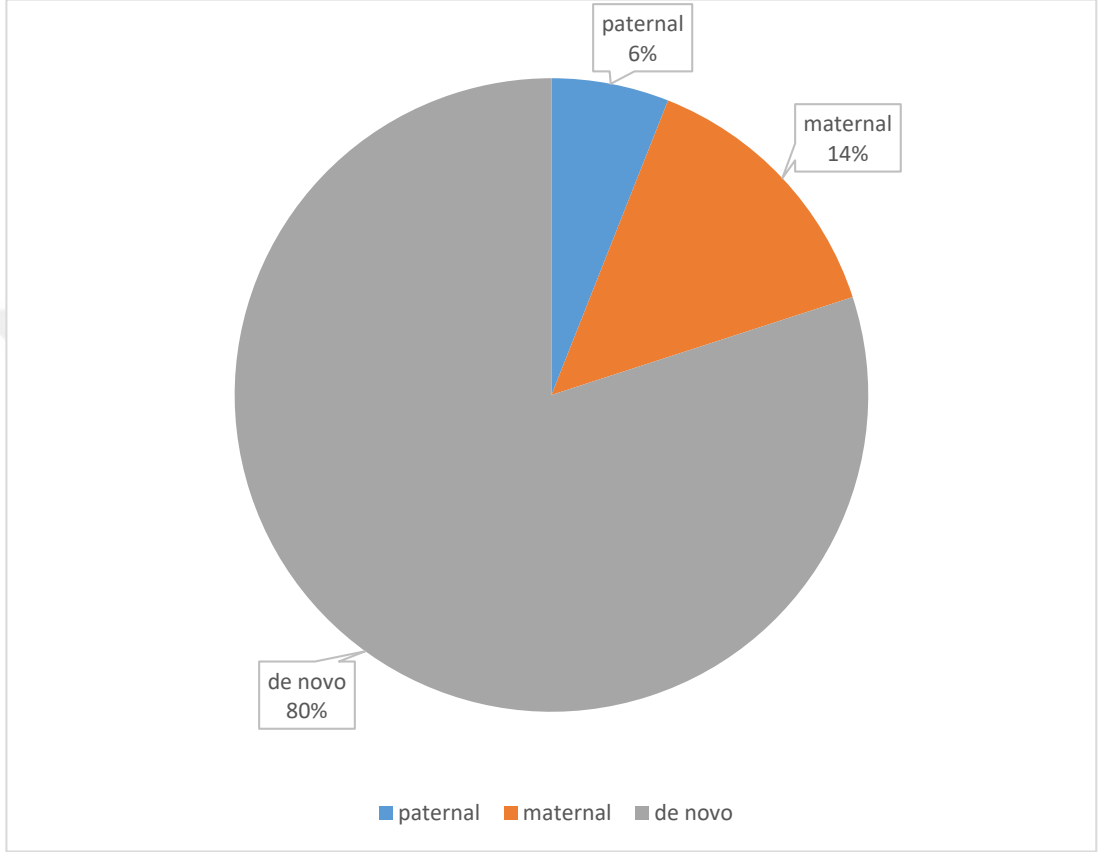
MECP2 geni (kodlayan ekzon ve intron bileşkeleri), FMR1 geni CGG tekrarı sayısı, del 15q11-13 FISH ve del 7q11.23 FISH çalışmalarından hastalarda var olan kliniği açıklayamadığımız 122 hasta ile kliniği RS, FXS, PWS/AS düşündürmeyen 187 hastaya Array CGH çalışması yapıldı. Çalışılan hastalardan 171'i erkek, 138'i kız hastaydı. Yapılan çalışmalar DECIPHER, DGV, CLINVAR veritabanları kullanılarak analiz edildiğinde 28 tanesi kız 22 tanesi erkek 50 hastanın kliniğini açıkladığını düşündüğümüz CNV değişimleri tespit edildi.

Anlamlı CNV tespit ettiğimiz 50 hastanın 26 tanesinde kayıp, 17 tanesinde kazanç ve 7 tanesinde ise hem kayıp hem kazanç vardı (Şekil 5).



Şekil 5: Tespit edilen CNV tipleri

Tespit edilen CNV'lerin 3 tanesi paternal (1 tanesi perisentrik inversiyon, 2 tanesi dengeli translokasyon), 7 tanesi maternal (tamamı dengeli translokasyon) kalıtıma sahipken eriyen kalan 40 hastanın değışikliği de novo ydu (Şekil 6).



Şekil 6: tespit edilen CNV'nin kalıtım paterni

Tablo 11: Tespit edilen CNV tespit edilen hastalar ve özellikler

Hasta	Yaş/Cinsiyet	Array CGH(hg19)	Boyut	Klinik Etkisi	Kalıtım	CNV Sendrom / genler	Bulgular
A1	8 / K	chr1:565433-4418667 x1	3,853	Patojenik	de novo	1p36 delesyon Sendromu / <i>DVLL1, ATAD3A, CDK11A, GNBL1, GABRD, SKI, PEX10, PRDM16</i>	BY, DD, mikrosefali, yarık damak-dudak, arka yerleşimli kulak
A2	5 / K	chr1:145126272-147419078 x1	2,293	Patojenik	de novo	1q21.1 delesyon sendromu / <i>RBM8A, NBPFI10, HYDIN2, NBPFI12, PRKAB2,FMO5, CHDIL, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8, GPR89B</i>	BY, DD, mikrosefali, davranış problemleri
A3	10 / K	chr2:237911082-243029573 x1	5,118	Patojenik	de novo	2q monosomy	BY, MMR, epilepsi
A4	12 / E	chr2:166732527-166963392 x1	0,23	Patojenik	maternal	1q21.1 delesyon sendromu	
A5	2 / E	chr2:55237-10348018 x3	10,292	Patojenik	de novo	<i>PXDN, SOX11, COLEC11, MYTIL, KIDINS220, RPS7, KLF11, TPO ADAM17, RNASEH1</i>	MMR, mikrogati, pitozis, strabismus, ayaklarda spastisite
A6	5 / K	chr3:3545416-24200811 x3	20,655	Patojenik	de novo	<i>VHL, CAV3, PPARG, RAF1, ITPR1, THRB, WNT7A, TMEM43, XPC, SLC6A1, SUMF1, JAGN1, FANCD2, SETD5, CRELD1, TSEN2, BTB, BRPF1, IQSEC1, ATP2B2, CIDEA, CCDC174, MTMR14, DAZL, SGOL1, GHRL, GRM7, SYN2, IL17RC, COLQ, OGG1, RPL15</i>	BY, hipotoni, gelişme geriliği

A7	2 / K	chr4:8355801-52685686	x3	44,329	Patojenik	de novo	<i>HMX1, DRD5, NKX3-2, CC2D2A, TAPT1, SEPSECS, RPBJ, STIM2, CCKAR, LGI2, WDR19, RFC1, SLC30A9, GUF1, GABRA2, GABRB1</i>	BY, mikrosefali, kriptorşidizm, mikropenis, fimozis, çekiş parmak, hipogamaglobinemi
A8	12 / K	chr8:74248449-77927157	x1	3,678	Patojenik	de novo	8q21.11 mikrolezyon sendromu	BY, DD, yarık damak-dudak, işitme kaybı
A9	10 / K	chr8:40995139-85038334	x3	44,043	Patojenik	de novo	<i>KAT6A, POMK, SOX17, IMPAD1, CAA8, CHD7, CSPP1, CPA6, EYA1, TMEM70, JPH1, GDAPI1, PMP2, IMPA1</i>	brakisefali, metopik-sagittal sinostozis, büyük kulaklar, kriptorşidizm, inguinal herni
A10	8 / K	chr10:6077845-21015343	x1	14,937	Patojenik	de novo	DiGeorge Sendromu Velokardiofasial Sendrom Compleksi	geniş burun kökü, hipokalsemi, katarkt, nöbetler, düşük yerleşimli kulaklar
A11	1 / K	chr10:128592872-135430043	x1	6,837	Patojenik	?	<i>SYCE1, EBF3, NKX6-2, ECHS1, TUBGCP2</i>	BY, DD
A12	12 / E	chr10:135708-3986323	x1	3,851	Patojenik	de novo	<i>ZMYND11, DIP2C, LARP4B, GTBP4, WDR37, KLF6</i>	BY, DD, belingün glabella

A13	10 / K	chr11:326718-10786175 x3	10,459	Patojenik	de novo	Beckwith-Wiedemann Sendromu	BY, makroglossi, kriptorşidizm, hipotiroidi, nöbetler
						CRYAB, SDHD, ATM, TIRAP, ALG9, MFRP, CBL, DPAGT1, TECTA, APOA1, SLC37A4, HEPACAM, KCNJ5, APOA5, ZBTB16, EXPH5, JAM3, DLAT, ROBO3, HYL51, PTS, SC5D, CLMP, CDON, ST14, ACAT1, KMT2A, FOXRED1, ARCN1, DDX6, ROBO4, C1QTNF5, CD3E, ALKBH8, NNMT, TREH, HYOU1, TTC12, FXVD2, PUS3, SCN2B, TRAPPC4, CEP164, CD3D, PVRL1, APOC3, NCAPD3, FLI1, SIAE, KCNJ11, HMBS, SIK3, MPZL2, SCN3B, SCN4B, VPS11, CD3G, OPCML, IL10RA, RDX, DCPS, ACAD8, PPP2R1B, STT3A	MMR, mikroftalmi, basık burun, yeke boyun, sakral dimple
A14	1 / E	chr11:107101960-134944006 x3	27,842	Patojenik	de novo		
A15	3 / E	chr11:30436400-34266683 x1	3,83	Patojenik	de novo	Wilms Tumor, Aniridi, Genitouriner Anomaliler ve MR Sendromu	BY, Wilms tm, trigosefali, kriptorşidizm, katarakt,
A16	5 / K	chr11:21795746-43785206 x1	21,989	Patojenik	de novo	Wilms Tumor, Aniridi, Genitouriner Anomaliler ve MR Sendromu	BY, aniridi, glokom, hipospadias,

kriptorşidizm, gastroözefageal reflü								
A17	10 / E	chr12:190980-34344843	x3	34,153	Patojenik	de novo	KRAS, PEX5, ABCC9, CACNA1C, SCNN1A, VWF, GDF3, GRIN2B, GUCY2C, ATN1, DNM1L, ETV6, GNB3, VAMP1, C1S, FGF23, LRP6, WNK1, CLEC7A, TNFRSF1A, C12orf57, PTHLH, CCND2, MGP, PDE6H, SOX5, DDX11, CHD4, EMG1, PYROXD1, YARS2, TPIL, KCNA5, CD27, KCNA1, CLEC1A, FGD4, C1R, PTPRO, NCAPD2, SLCO1B3, NDUFA9, C12orf4, CD4, PKP2, NECAP1, BHLHE41, ITPR2, AICDA, PLCZ1, A2ML1, CACNA2D4, OLR1, PDE3A, EPS3A, EPS8, LDHB, GYS2, ART4, PHC1, SLCO1B1, CDKN1B, MFAP5, A2M	BY, MMR, epilepsi
	9 / E	chr12:11482928-28337382	x1	16,854	Patojenik	de novo	KRAS, ABCC9, GRIN2B, GUCY2C, ETV6, LRP6, PTHLH, MGP, PDE6H, SOX5, PYROXD1, PTPRO, SLCO1B3, BHLHE41, ITPR2, PLCZ1, PDE3A, EPS8, LDHB, GYS2, ART4, SLCO1B1, CDKN1B	BY, MMR

A19	2 / E	chr14:34337947-46435899 x1	12,097	Patojenik	de novo	NKX2-1, FANCM, PPP2R3C, PAX9, CFL2, SRP54, RALGAmerikan Psikiyatri Derneği1, TRAPPC6B, SEC23A, NFKBIA, SLC25A21, PSMA6	MMR, hipotoni, hipotiroidi, tekrarlayan enfeksiyonlar
A20	2 / E	chr14:38814819-43829964 x1	5,015	Patojenik	de novo	SEC23A, TRAPPC6B, LRFN5	BY, makrosefali, nöbetler, atrial septal defekt
A21	3 / E	chr14:89525993-100453010 x1	10,927	Patojenik	de novo	TDP1, CALM1, GPR68, CCDC88C, FBLN5, TRIP11, ATXN3, SLC24A4, SERPINA6, SERPINA1, GSC, DICER1, GLRX5, VRK1, BCL11B, CCNK, EML1	BY, büyük alın, ince üst dudaklar, mikrognati, ASD, pulmoner kapak darlığı, kriptorşidizm, hidrosefali, meningoimiyelozel, gecikmiş konuşma, nöbetler
A22	6 / K	chr14:20511672-35048345 x3	14,536	Patojenik	de novo	MYH7, MYH6, RPGRIP1, TNF2, COCH, NRL, FOXG1, AP4S1, CHD8, NUBPL, PRKD1, OSGEP, PABPN1, SALL2, IRF9, CEBPE, MMP14, ANG, PNP, SLC7A7, PCK2, TRAC, TGM1, ZFHX2	BY, corpus callosum agenezisi, pes ekinovarus, serebellum hipoplazisi, nöbetler, kardiyomegali

A23	3 / K	chr14:78531783-79729394 x1	1,198	Patojenik	de novo	<i>NRXN3</i>	BY, derin gözler, şaşılık, düşük burun köprüsü, dolgun yanaklar, gecikmiş konuşma, subepandimal nodüler heterotopi
A24	8 / E	chr15:22320346-23616115 x3	1,296	Patojenik	paternal?	15q11-q13 Duplikasyon Sendromu / <i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1</i>	BY
A25	2 / K	chr16:29634212-30364712 x1	0,73	Patojenik	de novo	16p11.2-p12.2 mikrodilesyon sendromu	BY, DD, epilepsi
A26	1 / E	chr17:16724136-20462758 x1	3,738	Patojenik	mother balanced translocation carrier	Smith-Magenis Sendromu	MMR, annesinde 5 düşük öyküsü
A27	3 / K	chr17:34815551-36245768 x3	1,43	Patojenik	de novo	17q12 Duplikasyon Sendromu / <i>ZNHIT3, MYO19, PIGW, MRML1, LHX1, ACACA, TADA2A, SYNRG, HNF1B</i>	BY, mikrosefali, şaşılık, büyük kulaklar, mikrognati, baskın ayak parmakları, kasık fitiği, nöbetler, hipotoni, serebral atrofi
A28	4 / E	chr18:48586344-78014582 x1	29,428	Patojenik	de novo	18q Delesyon Sendromu /	BY, mikrosefali, orta yüz hipoplazisi, bozuk

					<i>MBD2, TCF4, TXNL1, WDR7, NETO1, ZNF407, ZADH2, TSHZ1, MBP, GALNR, NFATC1</i>	kulak lobları, büyük kulaklar, geniş burun köprüsü, geniş ağız, yüksek damak, ince üst dudak, proksimal olarak yerleştirilmiş baş parmaklar, üstün parmaklar, minimal parmaklar, minimal mitral kapak yetersizliği, hipotiroidizm, korpus kallozumun kısmi agenezi, gecikmiş miyelinasyon
A29	10 / K	chr18:55090993-56556611 x1	1,466	likely Patojenik	de novo	BY, yüksek alın, miyopi, nöbetler, lateral ventrikülün asimetrik dilatasyonu
A30	10 / K	chr18:55090993-56556611 x1	1,466	likely Patojenik	de novo	BY, yüksek alın, miyopi, nöbetler, lateral ventrikülün

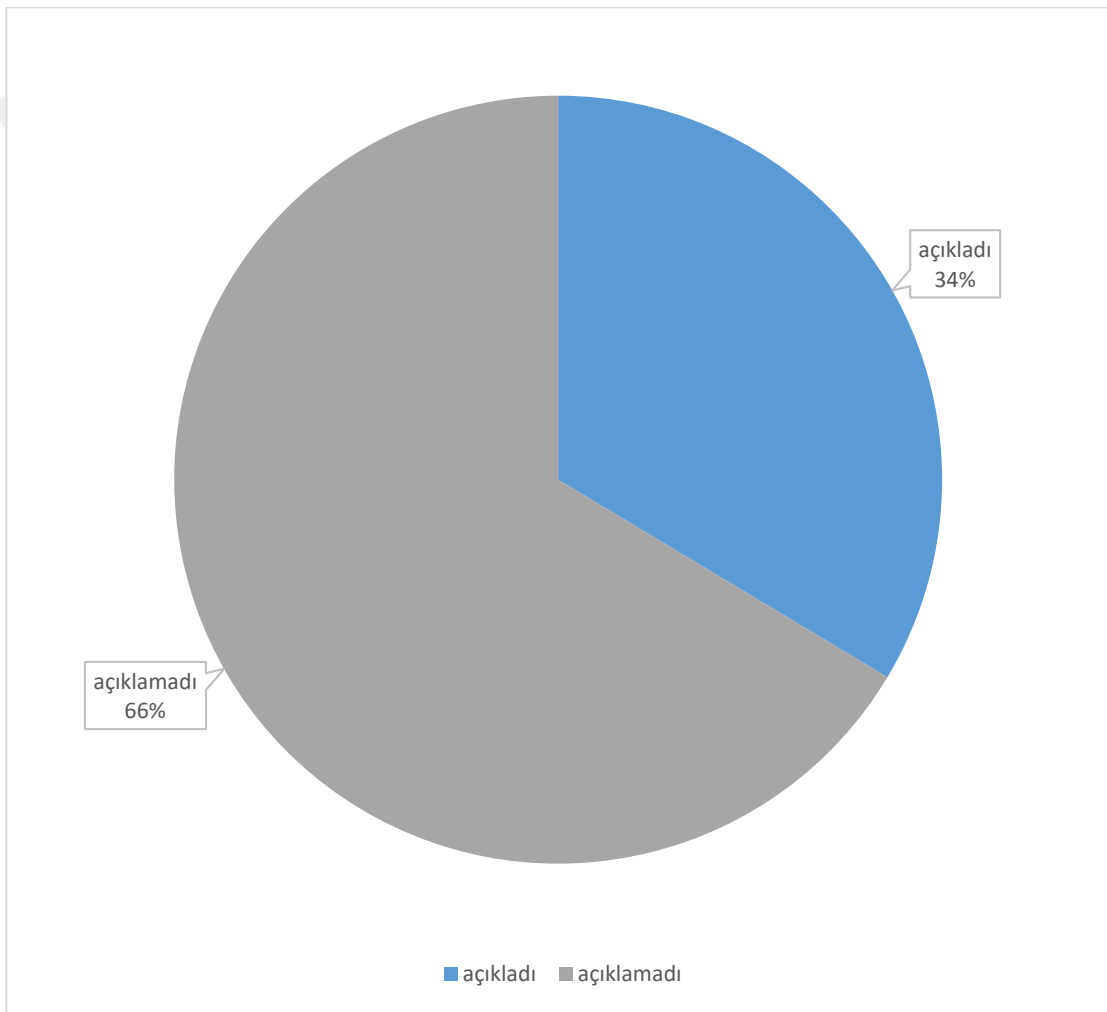
A35	3 / K	chrX:128494500-142000467 x3	13,506	Patojenik	de novo	OCRL, ZDHHC9, AIFM1, RAB33A, IGSF1, GPC4, GPC3, ARHGEF6, PHF6, HPRT1, SLC9A6, SOX3	mikrofalni, büyük kulaklar, uzun filtrum, SGA, brakidaktili
A36	2 / E	X:119145820-131644216 x3	12,498	Patojenik	maternal, mother had BY	Xq25 Duplikasyon Sendromu / GRIA3, THOC2, XIAP, STAG2, OCRL, ZDHHC9, AIFM1, RAB33A, IGSF1	mikrosefali, nistagmus, baskın ayak parmakları, IUGR, zayıf büyüme, mikropenis, hipospadias, kasık fıtığı, gastroözofageal reflü, nöbetler,
A37	9 / E	chrX:153605826-153714301 x2	0,108	Patojenik	de novo	Xq28 Duplikasyon Sendromu / RPL10, ATP6AP1, GDI1	epikantal kıvrımlar, yüksek damak, geniş boyun, halluks valgus, biküspid aort kapak, aort kapak yetersizliği, gecikmiş konuşma
A38	6 / E	chrX:168546-23108187 x2	22,939	Patojenik	de novo	SHOX, NLGN4X, KAL1, API S2, GRPR, NHS, CDKL5, RPS6KA3, MBTPS2, SMS	belirgin glabella, yüksek alın, geniş burun köprüsü, sekundum ASD,

A42	9 / K	chr7:43360-2149736 x1 chr9:203861-34631162 x3	2,106 / 34,427	Patojenik de novo	FAM20C, PDGFA, HEATR2, COX19, MAD1L1 / KANK1, SMARCA2, VLDLR, MPDZ, NFIB, FREMI1, PLAA, IFT74, TEK, C9orf72, DDX58, APTX, UBAP1, KIAA1161, DNAI1	Epikantal kıvrımlar, derin yerleşimli gözler, yüksek köprülü burun, geniş burun köprüsü, alçak kulaklar, frontoparietal lobda fokal gliyoz, pulmoner darlık, mitral ve triküspit kapak yetersizliği, Ebstein anomalisi
A43	10 / K	chr11:116681008-134944006 x3 chr22:16114244-20740778 x3	18,263 / 4,627	Patojenik translocation	mother balanced translocation carrier ARCNI1, DDX6, VPS11, MFRP, PVRL1, HEPACAM, PUS3, NCAPD3 / CECR7, ATP6V1E1, HIRA, TXNRD2, COMT, ARVCF	alçak kulaklar, kalın heliksler, mikrognati, geniş burun ucu, gözyaşı kanalı darlığı, üçüncü ve lateral ventrikül dilatasyonu, duktal ektazi, nöbetler
A44	4 / K	chr22:47632018-51197838 x1 chrX:168546-51963669 x1 chrX:75532540-155233713 x1	3,566 / 51,795 / 79,701	Patojenik de novo	Phelan-McDermid Sendromu / PIM3, MAPK8IP2, SHANK3, ACR / SHOX, NLGN4X, MSL3, FRIMPD4, OFD1, AP1S2, CDKL5,	BY, mikrosefali, maksiller hipoplazi, ince üst dudak, pürüzsüz filtrum,

A45	1 / K	2:55237-10348018 x3 / 14:103617637-107283150 x1	Patojenik mother balanced translocation carrier	10,293 / 3,666	SNTG2, PXDN, MYT1L, TRAPPC12, COLEC11, RNASEH1, SOX11, KIDINS220 / CKB, INF2, AKT1, BRF1, BTBD6, JAG2, PACS2, MTA1, IGHM	BY, belirgin alın, hipertelorizm, malformasyonlu kulaklar, yüksek damak, IUGR, tek enine palmar kırıksıklığı, sakral gamze, işitme kaybı, sekundum ASD, nöbetler
A46	1 / E	chrX:28416960-31131799 x0 chr21:45715386-45973878 x3	Patojenik de novo	2,709 / 0,258	DMD, NR0B1, IL1RAPL1, GK / C21orf2, TSPEAR, AIRE, PFKL	BY, MMR, epilepsi

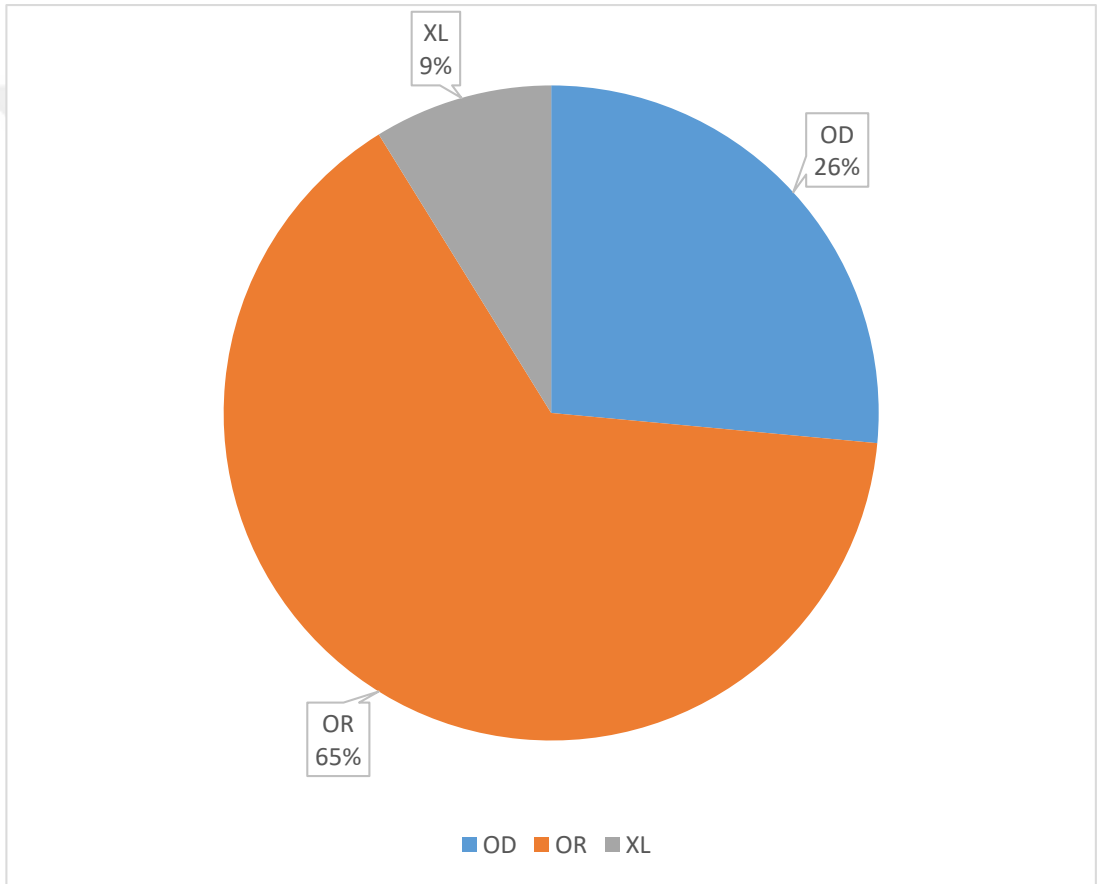
A47	2 / K	chrX:41712458-42419196 x1	0,706	Patojenik	mother balanced translocation carrier	CASK	BY, mikrocefali, serebellar hipoplazi
A48	9 / E	chrX:28703171-29766065 x0	1,062	L.P.	de novo	IL1RAPL1	BY, davranış bozukluğu
A49	8 / E	chr7:73048095-75067967 x3 chr16:21599125-21740231 x1	2,019 / 0,141	L.P.	de novo	7q11.3 duplikasyon sendromu / OTOA	BY, davranış bozukluğu, konuşamama
A50	3 / E	chr1:244001258-244713825 x1	0,712	L.P.	de novo	AKT3, ZBTB18	BY, MMR, epilepsi

Yapılan array CGH çalışmaları sonucunda kliniğini açıklayamadığımız hastalardan; takibine devam eden 52 tanesi kız, 49 tanesi erkek olan 101 hastaya WES (tüm ekzon, ekzon-intron bileşkeleri) çalışıldı. Yapılan çalışmalar QIAGEN Bioinformatics ve Varsome veritabanları kullanılarak analiz edildi. Çalışılan hastalardan 20 tanesi kız 14 tanesi erkek olmak üzere 34 tanesinde kliniğini açıkladığını düşündüğümüz bir değişiklik tespit edildi. WES çalıştığımız hastaların kliniğinin açıklanma oranı Şekil 7’de şematize edilmiştir.



Şekil 7 : Çalışılan hastalarda WES'in kliniği açıklama oranı

WES ile tanı koyduğumuz hastalarda tespit ettiğimiz genlerin 22 tanesi OR, 9 tanesi OD ve 3 tanesi XL idi (Şekil 8).



Şekil 8 :Mutasyon Tespit Edilen Genlerin Kalıtım Paterni

Tablo 12 : WES ile tanı koyduğumuz hastaların özellikleri

Hasta	Yaş / Cinsiyet	Tespit Edilen Değişim	MIM BY	Konu m	Pozisyon	Etki	Kalıtım Pater ni	Kalıtım Duru mu	dbSNP	Mutasyon Tipi	Klinik
W1	1 / E	<i>MECP2(NM_001110792.2):c.353G>A (p.Arg118Gln)</i>	312750	Xq28		P	XLD	Hemi	rs61754457	missense	hipotoni, MMR, epilepsi
W2	7 / K	<i>ETHE1(NM_014297.5):c.3G>T (p.Met1Ile)</i>	602473	19q13.31	exon 1 of 7 position 27 of 105 (coding)	P	OR	homo	rs119103249	start loss	BY, MMR, yürüyeme, diyare
W3	12 / K	<i>SLC35A2(NM_001282651.2):c.821dupG (p.Leu275ProfsTer8)</i>	300896	Xp11.23	exon 4 of 5 before position 312 of 737 (coding, NMD)	P	XLD	hetero	-	frameshift	BY, MMR, epilepsi, serebral-serebellar atrofi
W4	9 / E	<i>GNB1(NM_002074.5):c.57+1G>T</i>	616973	1p36.33	intron 3 of 11 position 1 of 7521 (splicing-	P	OD	hetero	-	splicing, intronic	BY, mikrosefali, inkontinans

W5	1 / K	<i>NDUFS4</i> (NM_002495.4):c.316C>T (p.Arg106Ter)	602694	5q11.2	exon 3 of 5 position 139 of 173 (coding, NMD)	P	OR	homo	rs104893898	nonsens e	MMR, hipotoni, strabism us, dismorfi k görünü m
W6	2 / K	<i>SLC18A2</i> (NM_003054.6):c.976C>T (p.Arg326Ter)	618049	10q25. 3	exon 10 of 16 position 81 of 96 (coding, NMD)	P	OR	homo	-	nonsens e	MMR, hipotoni, dismorfi k görünü m, pektus karinatu s, pes planus
W7	5 / K	<i>FOXG1</i> (NM_005249.5):c.645C>G (p.Phe215Leu)	613454	14q12	exon 1 of 1 position 1138 of	CIOP	OD	hetero	rs105751816 5	missens e	MMR, epilepsi, konuşa mama,

W11	5 / E	ASPM(NM_018136.5):c.646G>T (p.Glu216Ter)	608716	1q31.3	exon 3 of 28 position 205 of 1480 (coding, NMD)	P	OR	homo	-	nonsense	BY, DD, mikrosef ali, epilepsi
W12	2 / K	TBCD(NM_005993.5):c.2693+2T>C - TBCD(NM_005993.5):c.230A>G (p.His77Arg)	617193	17q25.3	intron 30 of 38 position 2 of 1124 (splicing-ACMG, splicing, intronic) - exon 2 of 39 position 46 of 51 (splicing, coding)	P / P	OR	b. Hetero	rs1409600874	splicing, intronic - missense	BY, mikrosef ali, epilepsi, yürüyememe, konuşamama
W13	4 / K	PEX12(NM_000286.3):c.959C>T (p.Ser320Phe)	614859	17q12	exon 3 of 3 position 279 of	CIOP	OR	homo	rs28936697	missense	MMR, konuşamama, yürüyememe

W14	5 / K	ANKLE2(NM_015114.3):c.2483G>T (p.Gly828Val)	616681	12q24.33	1387 (coding) exon 11 of 13 position 592 of 592 (splicing- ACMG, splicing, coding)	LP	OR	homo	-	missense	BY, mikrosefal ali
W15	6 / E	SLC19A3(NM_025243.4):c.623dupA (p.Lys209GlufsTer16)	607483	2q36.3	exon 3 of 6 before position 474 of 829 (coding, NMD)	LP	OR	homo	-	frameshift	MMR, ataksi, nistagmus
W16	9 / K	ALDOB(NM_000035.4):c.448G>C (p.Alal150Pro)	229600	9q31.1	exon 5 of 9 position 69 of 161 (coding)	P	OR	homo	rs1800546	missense	BY, epilepsi
W17	2 / K	PCCA(NM_000282.4):c.802C>T(p.Arg268 Cys) -	232000	13q32.3	exon 10 of 24 position	LP / CIOP	OR	b. Hetero	rs774738181 /	missense	MMR,m ikrosefal i

		<i>PCCA(NM_000282.4):c.812A>T(p.Glu271Val)</i>				86 of 103 (coding) - exon 10 of 24 position 96 of 103 (splicing, coding)				rs1410234456		
W18	5 / E	<i>FOXC1(NM_001453.3):c.1025C>T (p.Ala342Val)</i>	601090	6p25.3	exon 1 of 1 position 1556 of 3980 (coding)	LP	OD	hetero	rs773600190	missense	MMR, epilepsi, işitme kaybı	
W19	2 / E	<i>PTEN(NM_001304717.5):c.644T>G (p.Leu215Arg)</i>	605309	10q23.31	exon 2 of 9 position 46 of 85 (coding)	LP	OD	hetero	-	missense	BY, makrose fali	
W20	11 / K	<i>DNM1L(NM_001278463.1):c.305C>T (p.Thr102Met)</i>	603850	12p11.21	exon 4 of 20 position 8 of 72 (splicing, coding)	LP	OD	hetero	rs201929226	missense	BY, DEHAB, donuk bakma	

W21	2 / K	ASPA(NM_000049.4):c.730C>T (p.His244Tyr)	608034	17p13.2	exon 5 of 6 position 96 of 110 (coding)	LP	OR	homo	-	missense	BY, DD, strabismus
W22	5 / E	PEX12(NM_000286.3):c.959C>T (p.Ser320Phe)	614859	17q12	exon 3 of 3 position 279 of 1387 (coding)	LP / CIOP	OR	homo	rs28936697	missense	BY, konuşma, yürüyeme, işitme kusuru, kronik pankreatit
W23	11 / E	ALG11(NM_001004127.3):c.953A>C (p.Gln318Pro)	613661	13q14.3	exon 3 of 4 position 678 of 932 (coding)	LP / P	OR	homo	rs387907184	missense	MMR, epilepsi, yürüyeme, konuşma
W24	7 / E	ALG11(NM_001004127.3):c.953A>C (p.Gln318Pro)	613661	13q14.3	exon 3 of 4 position 678 of	LP / P	OR	homo	rs387907184	missense	MMR, epilepsi, yürüyeme,

W25	8 / E	MEIS2:c.439-7C>A het OD <i>vis</i> ; NM_170675.5(MEIS2) MEIS2:Lys163Asn	600987	15q14	932 (coding) splicing, intrinsic- exon 5 of 12 position 51 of 51 (splicing- ACMG, splicing, coding)	VUS / P	OD	b. Hetero	-	splicing, intrinsic - missense	MMR, epilepsi, yarık damak dudak, işitme kusuru, astım
W26	4 / K	HUWE1(NM_031407.7):c.5026C>T (p.Arg1676Cys)	309590	Xp11.2 2	exon 41 of 84 position 25 of 160 (coding)	VUS	XL	hetero	-	missense	MMR, epilepsi, hipotoni
W27	1 / K	EARS2(NM_001083614.2):c.1070T>C (p.Leu357Pro)	612799	16p12. 2	exon 6 of 9 position 3 of 154 (splicing, coding)	VUS	OR	homo	-	missense	MMR
W28	5 / K	SYNGAP1(NM_006772.3):c.3963_3964delA G (p.Ala1322ProfsTer40)	612621	6p21.3 2	exon 19 of 19 position	VUS	OD	hetero	rs771389000	frameshift	MMR, konuşa mama,

					78-79 of 1930 (coding, NMD)							pes ekinovarus
W29	11 / K	ASXL3(NM_030632.3):c.2213C>T (p.Ser738Phe)	615115	18q12.1	exon 11 of 12 position 1131 of 1957 (coding)	VUS	OD	hetero	rs952967423	missense	BY	
W30	2 / E	ANK3(NM_020987.5):c.2902G>C (p.Asp968His)	615493	10q21.2	exon 26 of 44 position 61 of 107 (coding)	VUS / VUS	OR	homo	rs730882195	missense	MMR, epilepsi	
W31	4 / E	MFSD2A(NM_001136493.3):c.215T>G (p.Leu72Trp)	614397	1p34.2	exon 2 of 14 position 122 of 135 (coding)	VUS	OR	homo	-	missense	MMR, mikrosef ali,epilepsi	
W32	7 / E	SGSH(NM_000199.5):c.863C>T (p.Pro288Leu)	605270	17q25.3	exon 7 of 8 position 118 of	LP	OR	homo	rs760096011	missense	BY, konuşmama, anksiyete	

					204 (coding)						bozuklu ğu
W33	4 / K	SUCLA2(NM_003850.2):c.985A>G (p.Met329Val)	603921	13q14. 2	exon 8 of 11 position 21 of 143 (coding)	VUS / VUS	OR	homo	rs200167311	missens e	MMR, konuşa mama, yürüyem eme
W34	9 / K	SUCLA2(NM_003850.2):c.985A>G (p.Met329Val)	603921	13q14. 2	exon 8 of 11 position 21 of 143 (coding)	VUS / VUS	OR	homo	rs200167311	missens e	MMR, konuşa mama, yürüyem eme

5.TARTIŞMA

BY; çocuklukta başlayan, hem entelektüel hem de uyarlanabilir (kavramsal, sosyal ve pratik) işlevsellikte eksikliklerle karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. BY, hasta bireylerde; başlangıçta alıcı ve ifade edici dil gecikmeleri, adaptif becerilerde gecikmeler (örneğin, tuvalet, giyinme), ince motor eksiklikler, problem çözme becerilerinde zorluklar, sosyal olgunlaşmamışlık ve davranışsal zorluklarla kendini gösterebilir (33) .

Toplunun %1-3'ünü etkileyen BY; şiddetine göre oranı değişse de genel olarak erkeklerde kızlara oranla daha sık görülen bir durumdur. Her sosyal sınıf ve kültürde görünmekle birlikte; anne eğitiminin yetersiz olduğu, sağlığa erişimin kısıtlılık gösterdiği düşük sosyoekonomik statüye sahip bölgeler ile gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülür. Bu sıklığın nedeni bu bölgelerde akraba evliliklerinin sık olması, özellikle perinatal dönemde sağlık hizmetlerine ulaşmada sıkıntı olması, yenidoğan dönem enfeksiyonları ile anne-çocuk beslenmesinin yetersiz olmasından kaynaklanır (3,33) .

Genel olarak hafif, orta, şiddetli ve derin olarak 4 klinik sınıfı bulunur.

HBY'li bireyler; etkilenme düzeyi düşük olduğundan genellikle okul öncesi dönemde ya da okul çağıının başlarında tanı alabilirler. Akademik, sosyal ve iletişim alanlarında akranlarına göre olgunlaşmamış olabilecekleri için sıkıntı yaşarlar. Uygun eğitimle kişisel bakım konularında uygun şekilde işlev görebilmelerine ve hatta çoğu zaman bağımsız olarak yaşamalarına rağmen, özellikle karmaşık günlük yaşam durumlarında aralıklı olarak desteğe ihtiyaç duyabilirler.

OBY'li bireyler; HBY'li bireylere göre daha fazla etkilendikleri için en geç okul öncesi dönemde tanı alırlar. Akademik gelişimleri oldukça sınırlı olan bu bireyler, sosyal ve iletişim alanlarında da çevreleriyle sorun yaşarlar. Uygun eğitimle bazı temel kişisel bakım becerileri (giyinme, tuvalete gitme, yemek yeme gibi...) kazansa da önemli miktarda desteğe ihtiyaç duyarlar.

ABY'li bireyler; kişisel bakım ile günlük yaşam aktiviteleri için sürekli destek ve gözetime ihtiyaç duyarlar. Yazı, sayı, zaman kavramlarını anlama kapasiteleri kısıtlıdır.

DBY'li bireyler; kişisel bakım ile günlük yaşam aktiviteleri için sürekli ve kapsamlı destek ile gözetime ihtiyaç duyarlar (1,14,33) .

BY hastalarında; genel olarak hastanın yaşam kalitesini etkileyebilecek alanlarda işlevsellik sorunu olabileceği için çevresinin hem maddi hem de manevi desteğine ihtiyaç duyarlar. Bu açıdan düşünüldüğünde BY; etkilenen bireyler, aileleri ve mensubu bulundukları toplum açısından sağlık, sosyokültürel ve ekonomik yönden yıkıcı bir etki oluşturabilir (3,57)

Toplumda görülme sıklığının nispeten yüksek olması, hasta ile çevresine olumsuz etkilerinin olması nedeniyle erken tanısı çok önemlidir. Tanı ortaya konduğunda; hastaya uygun tedavi yolları geliştirilebilir. Hastanın ailesi için de sonraki çocuk sahibi olma düşüncelerinde daha yol gösterici önerilerde bulunulabilir. Böylece kalıtsal olarak gelişen BY hastalarının önüne geçilmiş olunur. Toplumlar açısından da ekonomik açıdan daha uygun, üstesinden gelinebilir bir durum ortaya çıkar. Çünkü toplum açısından olaya baktığımızda manevi yıkımın yanında maddi yıkımları da beraberinde getirdiği gerçeği vardır. Ülkemiz için ortaya konan bir çalışma olmasa da, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılındaki BY hastalarının toplam maliyeti 4.6 milyar dolar olarak gerçekleşmiştir (57).

Tüm yönleriyle ele alındığında BY hastalarında etyolojik tanıya ulaşma oranımız ne kadar hızlı ve iyi olursa, hasta-aile-toplum üçgeninde daha mutlu bir yapı o denli mümkün olabilir. Bu açıdan düşünüldüğünde doğru zamanda doğru tanı testini uygulamanın önemi çok fazladır.

BY'nin etyolojisi heterojendir. Sinir sisteminin gelişimi; nöronların gelişmesi, farklılaşması, hayatta kalmasıyla ilgili gen ekspresyon programlarının hassas şekilde düzenlenmesi ile aynı zamanda alternatif hücre yollarının da bastırılmasını içeren ve hücre tipine özgü gen ekspresyonunun kısıtlanmasını gerektiren oldukça organize bir süreçtir. Beyin gelişiminin bu kompleksliğinden dolayı BY'nin etyolojisi oldukça heterojendir ve halen bu hastaların önemli bir kısmında etyoloji ortaya konamaz.

Bilinen etyolojik nedenler genetik ve genetik olmayan (intrauterin toksik maruziyet, intrauterin enfeksiyonlar, travmatik beyin hasarı, hipoksi, beslenme yetersizlikleri, hipotiroidi, vasküler anomalileri gibi..)nedenler olarak ikiye ayrılırsa da BY'nin ana nedeni genetik nedenlerdir.

Genetik nedenler; sayısal kromozomal anomaliler, yapısal kromozomal anomaliler

(delesyon-duplikasyon, CNV), monogenik değişiklikleri içerir.

Bu çalışmamızı; kliniğimize başvuran 328 BY hastasında uyguladığımız yaklaşımı BY-etyolojik tanı uygulamalarına örnek olması ve yol göstermede fayda sağlaması amacıyla yazıyoruz.

Polikliniğimize Ocak 2016-Aralık 2019 yılları arasında BY tanısıyla yönlendirilen yada bizim BY düşündüğümüz 328 hasta başvurdu. Hastaların hastane sisteminden detaylı anamnezleri, özgeçmişleri, soygeçmişleri, dismorfolojik bulguları, görüntüleme raporları, konsültan doktor notları ve çalışılan genetik tanı yöntemleri değerlendirildi.

Polikliniğimize başvuran hastalara BY etyolojisi-genetik tanı yöntemi ilişkisinde American Academy of Pediatrics (AAP), American Academy of Neurology (AAN), American College of Medical Genetics (ACMG) 'in önerileri doğrultusunda yaklaşıldığını gözlemledik.

AAP, AAN ve ACMG BY'li hastaya yaklaşımda genetik etyolojiyi tanımlamada yapılması gereken ilk genetik tanı testi olarak moleküler karyotipleme (kromozom mikroyarray, comparative genomic hybridization:karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, Array CGH) yöntemini önermektedir. Ancak yapılan hastanın takibini yapan doktoru; muayene, soyağacı, görüntüleme yöntemleri ışığında spesifik bir hastalık düşündüğünde ilk olarak o etyolojiye yönelik genetik tanı testlerini yapmasını önerir. Örneğin; FXS için FMR1 geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrarının TP-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi, RS için MECP geninin dizileme yöntemiyle değerlendirilmesi gibi. (31,33)

BY ön tanısı düşünülen ve buna ek olarak aile öyküsü, gelişme geriliği, konuşma problemleri, davranışsal problemleri, uzun yüz, kaba çene-alın, büyük-

çıkıntılı kulaklar ve makroorşidizm gibi bulgulardan bir veya birkaçının eşlik ettiği 48 hastada FXS'na yönelik FMR1 geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrarı TP-PCR yöntemiyle değerlendirildi. Bu hastalardan 4 tanesinde CGG tekrar sayısının 200'ün üzerinde olduğu tespit edildi. ACMG kılavuzunda belirtildiği şekilde mutasyon olarak değerlendirildi ve bu hastalara FXS tanısı konuldu. Kalıtsal olarak en sık gözlenen ve X'e bağlı BY nedenlerinin %25'ini tek başına oluşturan FXS, tüm BY hastalarının yaklaşık % 0.5-2'sini oluşturur (31,33,58,59) . Bize başvuran tüm BY hastalarına oranladığımızda elde ettiğimiz oran %1.2 'ydi (Tablo 13) (31,33,58,59).

Tablo 13: Güncel literatür ile tespit ettiğimiz FXS / tüm BY nedenlerine oranı

	Literatür	TGP
CGG tekrar sayısı > 200	0,5-2 %	1,2 %

Polikliniğimize başvuran; tipik olarak normal bir gelişimin sonrasında iletişim problemleri yaşayan, dil becerileri, ince-kaba motor becerilerinin kaybı ve stereotipik el hareketlerinin belirgin olduğu 19 kız hastaya RS'nun %95'inden sorumlu olan MECP2 geninin protein kodlayan tüm ekzon ve ekzon-intron bileşkeleri NGS yöntemiyle çalışıldı. Bu hastalardan 5 tanesinde hastanın kliniğini açıklayacak mutasyon tespit edildi ve hastalara RS tanısı konuldu. RS; BY ile ilişkisi ilk ortaya konan klinik durumlardan biridir. RS; kızlarda DS'nun ardından BY'ye neden olan genetik bozukluktur. RS; BY hastası olan kızların yaklaşık % 1,5'nda görülür. AAP ve AAN'e de; bizim burada uyguladığımız gibi sık görülen bu durumdan şüphelenildiğinde Array CGH, WES gibi geniş çaplı çalışmalardan önce RS'na yönelik çalışmaların yapılmasını önermektedir (Tablo 14) (3,31,33,45,59) .

Tablo 14 : RS'nun kız BY hastalarına oranının kıyası

	Literatür	TGP
RS'nın BY'li kızlardaki oranı	1,5 %	3,3 %

Polikliniğimize başvuran; BY'ye ek olarak infantil dönemde hipotoni öyküsü bulunan, hipogonadizm, hiperfajiye bağlı morbid obezite, kısa boy, epilepsi ve davranış bozukluğu gibi bulgulardan birkaçının eşlik ettiği 67 hastaya PWS/AS

açısından 15q11-13 bölgesine FISH alışması yapıldı. Çalışılan hastalardan 8 tanesinde hastanın kliniğini açıklayacak delesyon tespit edildi ve hastalara PWS/AS tanısı kondu. PWS/AS ; BY'ye en sık neden olan 5 genetik bozukluktan biri olduğundan klinik bulgular düşündürdüğünde Array CGH, WES gibi geniş çaplı çalışmalardan önce çalışılması uygun olabilir (60) . Bu şekilde değerdendirdiğimizde BY le başvuran 328 hastanın % 2,4 'ine tanı koymuş olduk.

BY'nin genetik etyolojisinin oldukça heterojendir. BY hastalarında yapılan bir çalışmada BY'ye sebebiyet veren genetik değışimin yaklaşık %60 'ının de-novo olduğuna ortaya konmuştur. Genetik etyolojinin heterojen ve kompleks olması, hastalığa neden olan etkenlerin çoğunun kendiliğinden oluşması genotip-fenotip çeşitliliğini doğurur. Bu çeşitlilikte genom çapında yapılan genetik tanı testlerinin önemini ortaya koyar ve BY hastalarında tanıya giden yolun yapıtaşlarını oluşturur. Array CGH, WES (whole exom sequencing), WGS (whole genom sequencing) genom çapında geniş değerdendirme sunan genetik tanı testleridir. Tüm bu testlerin belli başlı bazı olumsuz yanları olsa da nadir görülen yada yeni varyasyonları ortaya koyabilme becerileri genetik etyolojinin aydınlatılmasında çok önemlidir. Bu bağlamda AAP, AAN ve ACMG BY etyolojisinde sık görülen genetik bozukluklar dışında ilk tanı testi olarak Array CGH genetik tanı yöntemini önermektedir (3,33,61).

Array CGH yöntemi, hasta ile referans DNA'sını kıyaslayarak; mikroddelesyon, mikroduplikasyon başta olmak üzere CNV 'leri ortaya koyan genom çapında bir moleküler karyotipleme yöntemidir (62).

MECP2 geni (kodlayan ekzon ve intron bileşkeleri), FMR1 geni CGG tekrarı sayısı, del 15q11-13 FISH çalışmalarından hastalarda var olan kliniğini açıklayamadığımız 120 hasta ile kliniğini RS, FXS, PWS/AS düşündürmeyen 189 hastaya Array CGH alışması yapıldı. Yapılan alışmalar DECIPHER, DGV, CLINVAR veritabanları kullanılarak analiz edildiğinde 309 hastaya yapılan Array CGH çalışmasında 50 hastanın kliniğini açıkladığını düşündüğümüz CNV değışimleri tespit edildi.

Hastalarımızın fenotipleriyle ilişkili olduğunu düşündüğümüz genomik değışiklik oranı yaklaşık % 16,1 tespit edildi. Mevcut literatürde; hasta sayısı, hastaların seçim kriterleri ve kullanılan moleküler karyotipleme platformunu türünün

etkisine bağılı olarak değıştiğı düşünölen Array CGH'in tanısal değeri %5-%20 arasında değışen geniş bir aralıktadır . Yaptığımız çalışmada Array CGH'in tanısal verimi güncel literatürle benzerdi (Tablo 14) (63,64).

Tablo 15: Array CGH'in BY hastalarında tanı koyma oranının kıyası

	Literatür	TGP
Array CGH'in BY'yi açıklama oranı	5-20 %	16,1 %

Anlamalı CNV tespit ettiğimiz 50 hastanın 26 tanesinde kayıp, 17 tanesinde kazanç ve 7 tanesinde ise hem kayıp hem kazanç vardı (Şekil 5) .

Güncel literatürde 1Mb'ın üzerindeki değışimleri ebeveynlerdeki dengeli değışimlerden kaynaklanabileceğı belirtildiğı için tespit edilen değışikliklerde segregasyon çalışması yapıldı (64). Tespit edilen CNV'lerin 3 tanesi paternal (1 tanesi perisentrik inversiyon, 2 tanesi dengeli translokasyon), 7 tanesi maternal (tamamı dengeli translokasyon) kalıtıma sahipti. Kalan 42 hastanın değışimi de novo ydu (Şekil 6) .

Değerlendirilen A23, A29 ve A30 numaralı hastaların sonuçları Array CGH yönteminin nadir durumları ortaya koymadaki başarısını göstermede önemlidir.

BY, DD, derin gözler, şaşılık, düşük burun köprüsü, dolgun yanaklar, gecikmiş konuşma, subependimal nodüler heterotopi bulguları bulunan A23 nolu hastada tespit ettiğimiz mikrolelesyon hastanın kliniğinden sorumlu olduğunu düşündüğümüz NRXN3 genini içeriyordu. Nöreksinler; sinaptik yolda işlev gören ve sinir sinyal iletimini etkileyen transmembran protein ailesidir. Neurexin 1 (NRXN1), neurexin 2 (NRXN2) ve neurexin 3 (NRXN3), insan nöroksin gen ailesinin üyeleridir. Genlerin her birinin alfa ve beta izoformları vardır 14 . Alfa nöroksinlerin, gerilime bağılı Ca²⁺ kanalları yoluyla nörotransmitter salınımını etkilediğı gösterilmiştir (65,66) . NRXN1, NRXN2 ve NRXN3 mutasyonları ve delesyonları, çok çeşitli nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilidir. Nörogelişimsel bozukluklardan biri olan otizm spektrum bozukluğu (ASD) olan hastalarda her üç genin de mutasyonları tespit edilmiştir (67) . Olgumuza benzeyen genomik bölge 2018'de yayınlanmıştır (68) . NRXN3'ün alfa

izoformunun eksonik delesyonları, bir ailenin 3 neslinde gösterildi. Sadece proband dismorfik yüz görünümü olmasına rağmen, delesyonu taşıyan diğer aile üyelerinde çeşitli nörogelişimsel bozukluklar vardı. Ayrıca, NRXN3'ün kopya numarası varyantları ASD hastalarında gösterilmiştir (69,70). Bu bölgede daha büyük genomik kayıplar da tanımlandı. 2014 yılında dismorfik bulguları, orta derecede gelişme geriliği ve hafif BY'si olan bir hastada 14q24.3q31.3 bölgesinde 13 Mb'lık bir kayıp tespit edildiği yayınlandı (71).

Rolandik epilepsi, gelişme geriliği, BY , beyin MRG'de lateral ventrikülde asimetrik dilatasyon ile periventriküler fokal glioz bulunan A29 ve A30 dosya numaralı 10 yaşındaki tek yumurta ikizi kardeşlerden yapılan Array CGH çalışmasında kromozom 18q21.31q21.32 'de 1,466 Mb'lık kayıp tespit edildi. Bu genomik bölgede; ONECUT2, FECH, NARS, ATP8B1, NEDD4L, ALPK2, MALT1 ve ZNF532 genleri yer almaktadır. Bu genlerden NEDD4L geni nöron işleyişinde görev alan NEDD4L Proteinini kodluyordu. Merkezi sinir sisteminde iyon kanalı içselleştirmesini ve döngüsünü düzenleyen bir ubiquitin protein ligaz olan NEDD4L, beyinde yüksek oranda eksprese edilir. NEDD4L proteini, Ca ++ 'ya bağlanan bir N terminal C2 alanı, iki-dört WW protein-protein etkileşimli alan ve C terminali bir HECT ubiquitin ligaz alanı içerir (72). 2016 yılında bir çalışmada heterozigot NEDD4L mutasyonlu farelerde artmış bazal sinaptik aktivite, inflamatuvar ağrıya duyarlılık ve hiperaktivite tespit edildi. Yine bu çalışmada NEDD4L mutasyonlarının insanlarda nöropsikolojik bozukluklara neden olduğunu öne sürüldü (73). 2020 yılında aynı aileden NEDD4L mutasyonundan etkilenmiş; değişen şiddette nörogelişimsel gecikme, refrakter nöbetler, periventricular nodular heterotopia, perisilvian polimikrogiri ve sindaktili bulunan dört birey tanımlandı (74). Bu bulgular ışığında NEDD4L'yi içine alan 18q21.31q21.32 (55090993_56556611) delesyonunun hastanın fenotipiyle uyumlu olduğunu düşündük. Bu güne kadar yayınlanan olgularda missense mutasyon bulunurken; Array CGH ile tanıya ulaştığımız olgularımız NEDD4L delesyonunun ilk klinik yansımaları olması açısından önemliydi ve benzer olgularda heterozigot NEDD4L delesyonlarının da düşünülmesi gerektiğini ortaya konuldu.

AAP, AAN ve ACMG BY etyolojisinde moleküler karyotiplemede kliniğin açıklanamadığı durumlarda klinik ekzom dizileme, tüm ekzom dizileme yada tüm

genom dizileme gibi NGS temelli genetik tanı çalışmalarına yönelmeyi önermektedir (3,31,33) .

Yeni Nesil Dizileme (NGS; next generation sequencing); bir hasta örneğinde birden fazla DNA segmentinin eşzamanlı olarak, birbirine paralel olarak dizileyen ve referans bir diziyle kıyaslayan yüksek verimli bir teknolojidir. NGS; belirli gen bölgelerini içeren klinik paneller, protein kodlayan tüm ekzonlar (WES; whole exom sequencing) yada tüm genomu dizileme (WGS; whole genom sequencing) fırsatını sunar (62).

AAP, AAN ve ACMG'nin önerdiği şekilde yapılan Array CGH sonucu kliniğini açıklayamadığımız hastalardan; takibine devam eden 101 tanesine WES (tüm ekzon, ekzon-intron bileşkeleri) çalışıldı. Çalışılan hastalardan 34 tanesinde hastanın kliniğini açıkladığını düşündüğümüz bir değişiklik tespit edildi. Güncel literatürde; diğer tanı yöntemleri ile etyolojisi ortaya konamamış BY olgularında WES çalışmasının tanı koyma oranı hasta popülasyonuna göre değişmekle birlikte %16-45 arasında değişmektedir. Şu ana kadar bizim çalıştığımız olgularda WES ile etyolojik tanıyı koyma oranımız %33.6 olarak belirlendi. WES ile tanı koyma oranımız güncel literatürle uyumluydu (Tablo 15).

Tablo 16 : Hastalarımıza WES ile tanı koyma oranımızın güncel literatür WES tanı koyma oranı ile kıyası

Literatür (75)	TGP
27-55 %	33.6 %

WES ile tanı koyduğumuz hastalarda tespit ettiğimiz genlerin 22 tanesi OR, 9 tanesi OD ve 3 tanesi XL idi (Şekil 8).

Günümüz literatüründe BY'nin %40'ının tek gen bozukluğuna bağlı olarak bildirilmektedir. 2017'de yayınlanan bir yayında Batı toplumlarında monogenik BY'nin büyük kısmını OD kalıtım oluşturur. OR kalıtım monogenik hastaların %2-4'ünü oluştururken, XL BY %5-10'unu oluşturur (29). 2018 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada Batı ülkelerinde XL BY %10-12, OR BY %13-24 oranlarında görülür (76). Bu

yayınlarda görüldüğü üzere Batı ülkelerinde monogenik BY'nin anlamlı kısmını OD BY oluştururken, çalışmamızda OR BY'nin ağırlıklı olduğunu görüyoruz (Tablo 17) (29,76). OR BY'nin ağırlıklı olmasının nedenini akraba evliliği oranının yüksek olması ve WES çalıştığımız hasta popülasyonunun genelde ağır kliniğe sahip olmasına bağlıyoruz.

Tablo 17: Batı ülkeleri ile monogenik BY sonuçlarımızın kıyası

	Güncel Literatür	TGP
OD BY	64-93 %	26 %
OR BY	2-24 %	65 %
XL BY	5-12 %	9 %

NGS temelli WES çalışması klinik heterojenitenin yüksek olduğu BY gibi nörogelişimsel bozukluklarda nadir görülen etyolojilerin tanısında başarıyla tanı koyan noninvaziv bir yöntemdir (75). Değerlendirilen hastalardan W1, W6 , W10, W25 , W31 , W33, W34 hastalarında tespit edilen mutasyonlar WES' in nadir hastalıklardaki tanı koyma başarısına birer örnek teşkil eder.

MMR, epilepsi, gelişme geriliği, hipotoni, sendromik görünüm, pes planus, pektus karinatus bulguları olan, anne-baba arasında 2. dereceden akrabalık bulunan ve benzer klinikle vefat etmiş kız kardeşi bulunan 5 yaşındaki kız hastaya yapılan WES çalışması VARSOME veritabanı ile değerlendirildiğinde; daha önce tanımlanmamış ***SLC18A2(NM_003054.6):c.976C>T (p.Arg326Ter)*** mutasyonu tespit edildi (77). *SLC18A2* geni; dopamin, norepinefrin, serotonin ve histamin gibi ATP'ye bağımlı monoamin taşıyıcısı olarak işlev gören bir transmembran proteini (VMAT2) kodlar. Bu protein, amin nörotransmitterlerini sinaptik veziküllere taşır. Veziküler monoamin taşıyıcı, sinaptik veziküler membran boyunca tutulan proton gradyanını kullanarak sitosolik monoaminleri sinaptik veziküller halinde biriktirme görevi görür (78). 2013 yılında; akraba bir ailenin MMR, epilepsi, hipotoni, ataksi, dizatri, konuşma bozukluğu gibi bulguları olan 5 çocuğuna uygulanan WES çalışmasında *SLC18A2* geninde mutasyon tespit edildi (79) . Nadir olarak görülen bu tip genlerde tanı koymadaki başarısı WES'in kullanımını artıran avantajlarından biridir.

Daha önce 15 aylıkken vefat etmiş olan bir erkek kardeşi bulunan, konjenital hipotoni, MMR, epilepsi öyküsü bulunan, 2 yaşındaki erkek hastada

MECP2(NM_001110792.2):c.353G>A (p.Arg118Gln) mutasyonunu tespit ettik. MECP2 beyinde bol miktarda eksprese edilen pleotropik bir proteindir. Metil bağlanma alanı (MBD) ailesinin bir üyesidir ve metillenmiş DNA'ya bağlanarak kromatin mimarisini ve gen ifadesini kontrol eden, beyindeki anahtar epigenetik modülatörüdür. Beyin gelişimi için çok önemli olan bu proteini kodlayan *MECP2 geni* Xq28 bölgesinde yer aldığı için erkek hastalarda çok beklemeyiz. WES yöntemi nadiren görülebilen bu durumu ortaya koyabilmesi açısından önemlidir (45).

MMR, gelişme geriliği, BY, sık enfeksiyon geçiren, geniş alın, basık burun kökü, el-ayakta polidaktili ve beyin MRG'de serebellar vermişte displazi, lateral ventrikülde yarasa kanadı görünümü bulunan 10 yaşındaki kız hastaya yapılan WES çalışması HGMD veritabanı ile değerlendirildiğinde ; daha önce tanımlanmamış ***KIAA0556 (NM_015202.4):c.4084delC (p.Leu1362SerfsTer20)*** mutasyonu tespit edildi . *KIAA0556* geni, mikrotübül stabilitesini düzenlediği görülen bir mikrotübül ile ilişkili siliyer baz proteini olan KATNIP (Katenin İnteracting Protein) i ikodlamaktadır . 2015 yılında MMR, hipotoni, tekrarlayan enfeksiyonları olan ve beyin MRG'de Joubert Sendromu düşündüren bulguları olan 8 yaşındaki kız hasta ve benzer bulgulara ek olarak yarı damak-dudak ile mikropenis olan 5 yaşındaki erkek kardeşine yapılan WES çalışmasında *KIAA0556* geninde mutasyon tespit edildiği yayınlandı (80). Daha önce Joubert Sendromu'na neden olan birçok gen tanımlanmasına karşın JBS bulguları gösteren bu yayındaki hastalar ve bizim hastamızda JBS kliniğine neden olan nadir bir geni WES sayesinde tespit edilmesi mümkün oldu.

Sendromik görünüm, gelişme geriliği, BY, konuşamama, kronik otit, alerjik astım bulguları bulunan 8 yaşındaki erkek hasta yarı damak-dudaktan opere olmuştu. Hastaya yapılan WES çalışması QIAGEN Bioinformatics veritabanı ile değerlendirildiğinde; daha önce tanımlanmamış ***MEIS2(NM_170675.5):c.489G>C(p.Lys163Asn)*** mutasyonu tespit edildi. *MEIS2* geni homeodomain içeren proteinlerin TALE ('üç amino asit döngü uzantısı') ailesine ait bir homeobox proteinini kodlar. TALE homeobox proteinleri; yüksek oranda korunan transkripsiyon düzenleyicileri olup gelişim üzerine önemli katkıları vardır. Aynı gende mutasyona sahip daha önce yayınlanmış olgularda her hastada değişen

oranlarda BY varken, bir kısmında BY'ye ek kardiyak, fasiyal dismorfizm bulguları vardı. Bu açıdan düşünüldüğünde 22q11.2 delesyon sendromu gibi durumların tespit edilmediği durumlarda WES, *MEIS2* geninin bozukluğuna bağlı nadir görülen klinik durumları tanımlayabilme imkanı sağlıyor (81). .

Anne-babası akraba olan, benzer bulgular nedeniyle vefat etmiş kardeşleri bulunan, BY, MMR bulguları olan 2 kız kardeşe yapılan WES çalışması VARSOME veritabanı ile değerlendirildiğinde; ***SUCLA2(NM_003850.2):c.985A>G (p.Met329Val)*** mutasyonu tespit edildi. Anne-babasına yapılan segregasyon analizinde anne-babanın değişiklik açısından taşıyıcı oldukları belirlendi. *SUCLA2* geni, süksinil-CoA ve ADP'den süksinat ve ATP oluşumunu tersine çevrilebilir bir şekilde katalize eden Krebs döngüsü enzimi süksinil-CoA ligazının β alt birimini kodlar. Bu, α alt birimi *SUCLG1*'i başka bir β alt birimi olan GTP oluşturan süksinil-CoA ligaz *SUCLG2* ile paylaşan mitokondriyal matris enzimidir; dolayısıyla β alt birimi substrat özgülüğünü belirler. 2007 yılında aralarında akrabalık ilişkisi bulunan, MMR, hipotoni, kifoskolyoz gibi bulguları olan 10 hastada *SUCLA2* geninde mutasyon tespit edildiği yayınlanmıştır (82). Daha önce yayınlanan ve bizim de hastalarımızdaki kliniğin heterojenitesi düşünüldüğünde bu nadir hastalık etkenine ulaşmada WES çalışması büyük kolaylık sağlamıştır.

Anne-baba arasında akrabalık bulunan, BY, DD, mikrosefali nedeniyle başvuran hastaya yapılan WES çalışması QIAGEN Bioinformatics veritabanı ile değerlendirildiğinde; daha önce tanımlanmamış ***MFSD2A(NM_001136493.3):c.215T>G (p.Leu72Trp)*** mutasyonu tespit edildi. Anne-babasına yapılan segregasyon analizinde anne-babanın değişiklik açısından taşıyıcı oldukları belirlendi. Doksohegzanoic asit (DHA), esansiyel ve beyinde en bol bulunan omega-3 yağ asididir. Esansiyel olmasına rağmen eksikliği şimdiye kadar hastalık olarak bildirilmemiştir. Fosfolipidlerin önemli bir kısmını oluşturan DHA beyinde sentezlenemez. DHA ve diğer yağ asitleri, kan-beyin-bariyerinden *MFSD2A* (major facilitator superfamily domain-containing 2a) proteini aracılığı ile lizofosfatidilkolin şeklinde taşınır. 2015 yılında BY, DD, hipotoni, hiperrefleksi ve nöbet öyküleri olan çocukları bulunan iki farklı ailede çalışılan ekzom dizilemede *MFSD2A* geninde mutasyon tespit edilmesinin ardından yapılan hayvansal modellemelerde *MFSD2A* geni mutasyonlu olan hayvanlarda nöral gelişim ve

vasküleritenin bozulduğu ortaya konarak hastalarının kliniklerini açıkladığı yayınlandı (83). Buradaki yayında görüldüğü gibi klinik etkisi henüz netleşmeyen genlerdeki problemleri ortaya koyarak yeni çalışmaları önünü açması ve nihayetinde genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasına ön ayak olması WES yönteminin önemini göstermektedir.

Burada verdiğimiz örneklerde olduğu gibi diğer yöntemlerle tanı konulamayan BY hastalarında tanı koymada NGS yönteminin temel alan genom çapındaki çalışmalar (TES, WES, WGS) oldukça faydalı olmuştur. Biz kliniğimizde NGS temelli testlerden WES uygulamayı kendimiz için daha uygun gördük. TES-WES ayrımında ise; BY'nin genetik heterojenitesinin yüksek olması, genetik etyolojilerinin henüz tamamen netleşmemesi, maliyetlerinin benzer olması nedeniyle WES uygulamayı uygun gördük. Han ve Lee'nin 2020 yılında yayınladığı bir çalışmada WGS-WES yöntemlerinin BY tanısında bariz bir farkı bulunmasa da eğer WES yerine veya WES sonrasında WGS uygulayabilmiş olsaydık tanı koyma oranımız bir miktar artabilirdi. Çünkü WES yönteminde değerlendiremediğimiz; tek nükleotit varyantları ile mikrodelsiyon-mikroduplikasyonları aynı çalışmada değerlendirebilme imkanı WGS bizlere sunar (Tablo 18) (75) .

Tablo 18 : Literatürde WGS-WES çalışmalarının başarı oranının kıyası

WGS	WES	TGP
22-50 %	27-45 %	33,6 %

Ortaya çıktığı zamanlardaki kadar yüksek olmasa da maliyetinin hala yüksek olması özellikle bizim gibi gelişmekte olan ülkelerde bu testlere ulaşmadaki önemli bir sorundur. NGS temelli genetik testlerin maliyetinin düşmesi, WES / WGS tarafından BY için ikinci kademe testi olarak aile temelli üçlü testin yaygın şekilde kullanılmasını sağlayacak ve daha yüksek bir teşhis veriminin önünü açacaktır (75,84).

BY; gelişim dönemlerinde ortaya çıkan hem entelektüel işlevsellikte hem de uyarlanabilir işlevsellikte yetersizliklerle karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Zihinsel engellilik, hastalarda çeşitli şekillerde ve farklı yaşlarda ortaya çıkabilir. Bozukluk ne kadar şiddetli olursa, kimlik ortaya çıkma ve daha erken teşhis edilme

olasılığı o kadar yüksektir. Buna uygun olarak, bozulma ne kadar hafifse, daha ileri yaşlarda ortaya çıkma olasılığı o kadar yüksektir (33).

BY; gebelik sırasında annenin alkol-madde kullanımı, enfeksiyonlar, doğum komplikasyonları ve aşırı yetersiz beslenme gibi faktörlerden kaynaklanabilirse de genetik faktörler BY'nin oluşmasındaki ana etkindir. Beyin, birbirine bağlı çok sayıda hücre tipinden oluşan oldukça kompleks bir organdır. İntrauterin yaşamdan itibaren başlayan gelişimin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için çok sayıda proteinin doğru yerde ve doğru zamanda doğru miktarda, işlevsel olarak aktif olması gerekir. Bu nedenle, bu proteinleri kodlayan genlerden herhangi birini etkileyen bir mutasyon, delesyon veya yeniden düzenlemenin beyin gelişimi ve bilişsel işlevler üzerinde önemli etkileri olur. Beyin ve biliş düzeyinin sağlıklı gelişebilmesi için kompleks bir süreci gerekmesi BY'nin genetik heterojenliğini gösterir. Genetik heterojenite ise klinik heterojeniteyi beraberinde getirir. Bu denli yüksek heterojeniteyi barındırdığından çoğu BY hastalarında genetik tanı koymada hala yetersiz kalınmaktadır .

Genetik tanının belirlenmesi, BY'nin etyolojisini ortaya koymanın yanında; hastanın prognozunu, yaşamı esnasında oluşabilecek komplikasyonları önceden tahmin edebilmeyi ve onlara engel olabilmeyi mümkün kılar. Ayrıca hastaya farklı ve yeni tedavi seçenekleri sunabilir. Rehabilitasyon hizmetleri ve destekleyici tedavinin zamanında başlanması için tanı çok önemlidir. Hastanın ailesi açısından ise kalıtım hakkında bilgi sahibi olmalarını sağlar. Doğru ve kapsamlı genetik danışmayı mümkün kılarak; bizim gibi akraba evliliklerinin yüksek olduğu toplumlarda ailede kalıtılan BY etkenlerinin sonraki nesillere geçişinin engellenerek aile planlamasına katkıda bulunur (31,61).

Tanının konması kadar doğru zamanda doğru tanı aracını kullanarak en kısa sürede ve en düşük maliyetle tanıya ulaşabiliriz. Yaptığımız çalışmada Ocak 2016 tarihleri arasında Aralık 2019 hastaya olan yaklaşımımızı ve hangi genetik tanı yönteminde ne kadar başarılı olduğumuzu değerlendirdik. Burada elde ettiğimiz verilerin BY etyolojisini tanımlamada kullanılacak genetik tanı yöntemlerini seçimde yol gösterici olmasını umuyoruz.

6.SONUÇ

- ✓ BY heterojenitesi yüksek olan; hastanın kendisi, ailesi ve mensubu olduğu topluma maddi-manevi yıkıcı etkileriyle önemli bir sorundur.
- ✓ Bu çalışma ile BY tanısıyla takibi yapılan hastalara hangi durumda hangi genetik tanı testinin uygulandığı belirledik ve tanı koyma oranımızı güncel literatür verileri ile kıyasladık.
- ✓ Genotip-fenotip heterojenitesi yüksek olan BY'nin etyolojisini belirlemek;
 - hastanın tedavisine yön verebilir,
 - komorbid durumlar için uygun takip oluşturulmasına imkan tanır,
 - BY'nin hasta ile çevresine olan maddi-manevi etkisini asgari düzeye indirilebilir,
 - ailenin sonraki dönemde sağlıklı çocuk sahibi olabilmesinin önünü açabilir.
- ✓ BY gibi tanısı geciktikçe artan komplikasyonlara neden olan durumlarda uygun tanı algoritmasını belirlemek çok önemlidir.
- ✓ Amerikan Psikiyatri Derneği, ANA, ACMG gibi BY tanı ve tedavisinde yer alan branşların derneklerinin önerileri doğrultusunda uyguladığımız algoritmanın başarılı olduğunu ortaya koyduk.
- ✓ Takip ettiğimiz BY hastalarında öncelikle nispeten sık görülen; WBS, PWS-AS, FXS, RS gibi BY nedenlerine yönelik tanı testlerini uyguladık. Bu tanı testleriyle 19 hastanın etyolojisini belirledik.
- ✓ Spesifik tanı testleri ile tanısını koyamadığımız ve kliniği spesifik olmayan durumlarda; array CGH, WES gibi genom çapındaki yöntemleri uyguladık.
- ✓ Bu yöntemlerde öncelikle array CGH 'i uyguladık ve 50 hastanın tanısını bu şekilde ortaya koyduk.
- ✓ Array CGH ile tanısını koyamadığımız hastalardan takibine devam edenlere WES uyguladık ve 34 hastaya tanı koyduk.
- ✓ Takip ettiğimiz hastalardaki uygulamalarımızı değerlendirdiğimizde; genotip-fenotip heterojenitesinin yüksek olduğu BY'de öncelikle nispeten sık görülen

etyolojiler açısından incelemenin önemini gördük. Çünkü spektrumu dar ve spesifik olan yöntemleri uygulamak hem maddi açıdan hem de süre açısından oldukça avantajlıdır.

- ✓ Kliniği özelleştiremediğimiz durumlarda ise genom çapındaki yöntemleri uygulamanın tanıya ulaşmada oldukça yararlı olduğunu gördük.
- ✓ Genom çapındaki tanı yöntemlerinin olumsuz yanı ise nispeten pahalı olması ve bu çalışmalar esnasında ortaya çıkan devasa verinin değerlendirilmesidir.
- ✓ Genom çapında elde edilen verileri değerlendirmede mümkün olduğunca tüm veritabanları incelenmeli ve yapay zeka destekli analiz çözümlenmelerinden faydalanılmadır.
- ✓ NGS gibi yüksek teknoloji ürünlerinin kullanılabilirliğinin gittikçe artması BY gibi hastalıklarda tanı koyma başarıımızı artıran, umut verici bir durumdur.

Sonuç olarak; 328 hasta ile yaptığımız bu çalışma, BY etyolojisine tanısal yaklaşımı ortaya koyan, tanı yöntemlerinin başarısını gösteren ve güncel literatürle kıyaslamasını yaparak literatürle olan farklarımızı ortaya koyması açısından önemlidir. Kullandığımız ve WGS gibi kullanmadığımız tanı yöntemleriyle yapılacak çalışmalarla, BY tanısında izlenecek olan algoritmalar daha da netleşecek ve nihayetinde en kısa sürede en verimli çalışmalar uygulanarak hastaya optimum fayda sağlanacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. American Psychiatric Association. DSM-V: Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders. Fifth. American Psychiatric Association, editör. Arlington, VA: American Psychiatric Press; 2013.
2. Bartnik M, Nowakowska B, Derwińska K, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Kędzior M, Bernaciak J, vd. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. J Appl Genet. 03 Şubat 2014;55(1):125–44. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13353-013-0181-x>
3. Harripaul R, Noor A, Ayub M, Vincent JB. The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability. Cold Spring Harb Perspect Med . 01 Mart 2017;7(3):a026864. Available at: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a026864>
4. Moeschler JB. Genetic Evaluation of Intellectual Disabilities. Semin Pediatr Neurol . Mart 2008;15(1):2–9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107190910800003X>
5. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması. 2018. baskı. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü, editör. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü. Ankara,Türkiye: Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü; 2018.
6. Hu H, Kahrizi K, Musante L, Fattahi Z, Herwig R, Hosseini M, vd. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. Mol Psychiatry . 04 Temmuz 2019;24(7):1027–39.
7. Aral, N., Baran G., Bulut Ş. ÇS. Çocuk Gelişimi I. İstanbul: Ya-Pa Yayınları; 2000.
8. Jorden A. Cummings and Lee Sanders. Intelligence and Language. İçinde: Charles Stangor and Jennifer Walinga, editör. Introduction to Psychology . Saskatchewan , CA: University of Saskatchewan Open Press; 2019.
9. Alfred Binet & Théodore Simon. The Development of Intelligence in Children (the Binet-Simon Scale). Goddard H, editör. Baltimore,MD: Williams and

- Wilkins Company; 1916.
10. Wechsler D. Wechsler Intelligence Scale for Children. Wechsler Intelligence Scale for Children. San Antonio, TX, US: Psychological Corporation; 1949.
 11. Wechsler D. The measurement and appraisal of adult intelligence, 4th ed. 4th baskı. The measurement and appraisal of adult intelligence, 4th ed. Baltimore, MD, US: Williams & Wilkins Co; 1958. ix, 297–ix, 297.
 12. Frankenburg WK, Dodds JB. The Denver Developmental Screening Test. *J Pediatr* . Ağustos 1967;71(2):181–91. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347667800702>
 13. Deary IJ, Batty GD. Cognitive Epidemiology. *J Epidemiol Community Heal* . 01 Mayıs 2007;61(5):378–84. Available at: <http://jech.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jech.2005.039206>
 14. Schalock, R. L., Borthwick-Duffy, S., Bradley V, Buntix, W. H. E., Coulter, D. L., Craig EPM, Al E. Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports. 11th baskı. AAIDD Ad Hoc Committee on Terminology and Classification, editör. Washington, DC: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities; 2010.
 15. World Health Organization. International Classification of Diseases ICD-11 . 2019. Available at: <https://icd.who.int/>
 16. Bertelli MO, Munir K, Harris J, Salvador-Carulla L. “Intellectual developmental disorders”: reflections on the international consensus document for redefining “mental retardation-intellectual disability” in ICD-11. Marco O. Bertelli D, editör. *Adv Ment Heal Intellect Disabil* . 04 Ocak 2016;10(1):36–58.
 17. Patel DR, Cabral MD, Ho A, Merrick J. A clinical primer on intellectual disability. *Transl Pediatr* . Şubat 2020;9(S1):S23–35.
 18. Committee to Evaluate the Supplemental Security Income Disability Program for Children with Mental Disorders. Clinical Characteristics of Intellectual Disabilities. İçinde: TF B, editör. *Mental Disorders and Disabilities Among Low-Income Children* . Washington , DC , US: National Academies Press; 2015. s. 1–8.
 19. Lai D-C, Tseng Y-C, Hou Y-M, Guo H-R. Gender and geographic differences

- in the prevalence of intellectual disability in children: Analysis of data from the national disability registry of Taiwan. *Res Dev Disabil* . Kasım 2012;33(6):2301–7.
20. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord* . 29 Aralık 2010;2(4):182–209.
 21. Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in Understanding – Genetic Basis of Intellectual Disability. *F1000Research* . 07 Nisan 2016;5:599.
 22. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, vd. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* . 11 Şubat 2003;60(3):367–80.
 23. Bauters M, Van Esch H, Marynen P, Froyen G. X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet* . 2005;48(3):263–75.
 24. Zablotsky B, Black LI, Blumberg SJ. Estimated Prevalence of Children With Diagnosed Developmental Disabilities in the United States, 2014-2016. *NCHS Data Brief* . Kasım 2017;(291):1–8.
 25. Croen LA, Grether JK, Selvin S. The Epidemiology of Mental Retardation of Unknown Cause. *Pediatrics* . 01 Haziran 2001;107(6):e86–e86.
 26. Bilder DA, Pinborough-Zimmerman J, Bakian A V, Miller JS, Dorius JT, Nangle B, vd. Prenatal and Perinatal Factors Associated with Intellectual Disability. *Am J Intellect Dev Disabil* . 01 Mart 2013;118(2):156–76.
 27. Leonard H, Glasson E, Nassar N, Whitehouse A, Bebbington A, Bourke J, vd. Autism and Intellectual Disability Are Differentially Related to Sociodemographic Background at Birth. Scott J, editör. *PLoS One* . 30 Mart 2011;6(3):e17875.
 28. Hermans H, Evenhuis HM. Multimorbidity in older adults with intellectual disabilities. *Res Dev Disabil* . Nisan 2014;35(4):776–83.
 29. Kvarnung M, Nordgren A. Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. İçinde: *Advances in experimental medicine and biology*

- . United States; 2017. s. 39–54.
30. Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet* . 16 Nisan 2008;16(4):422–34.
 31. Bélanger SA, Caron J. Evaluation of the child with global developmental delay and intellectual disability. *Paediatr Child Health* . 16 Ağustos 2018;23(6):403–10.
 32. Ilyas M, Mir A, Efthymiou S, Houlden H. The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing. *F1000Research* . 16 Ocak 2020;9:22.
 33. Purugganan O. Intellectual Disabilities. *Pediatr Rev* . Haziran 2018;39(6):299–309.
 34. Srour M, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch Dis Child* . Nisan 2014;99(4):386–9.
 35. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, vd. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* . 01 Ekim 2006;140(19):2063–74.
 36. Descartes M, Korf BR, Mikhail FM. Chromosomes and Chromosomal Abnormalities. İçinde: Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM, Schor NF, Finkel RS, Gropman AL, vd., editörler. *Swaiman’s Pediatric Neurology* . Elsevier; 2017. s. 268–76.
 37. Hutaff-Lee C, Cordeiro L, Tartaglia N. Cognitive and medical features of chromosomal aneuploidy. İçinde: *Handbook of clinical neurology* . Netherlands; 2013. s. 273–9.
 38. Thapar A, Cooper M. Copy Number Variation: What Is It and What Has It Told Us About Child Psychiatric Disorders? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* . Ağustos 2013;52(8):772–4.
 39. Vissers LELM, Stankiewicz P. Microdeletion and Microduplication Syndromes. İçinde 2012. s. 29–75.
 40. Genetics Home Reference. Cells and DNA . Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health & Human Services. 2020 [kaynak

23 Haziran 2020].

41. Online Mendelian Inheritance in Man O. Total Number of Genes with Phenotype-Causing Mutation . OMIM. 2020 [kaynak 26 Haziran 2020].
42. van Bokhoven H. Genetic and Epigenetic Networks in Intellectual Disabilities. *Annu Rev Genet* . 15 Aralık 2011;45(1):81–104.
43. Willemsen MH, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet* . Şubat 2014;85(2):101–10.
44. Saldarriaga W, Tassone F, González-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, Hagerman R. Fragile X syndrome. *Colomb medica (Cali, Colomb* . 2014;45(4):190–8.
45. Gold WA, Krishnarajy R, Ellaway C, Christodoulou J. Rett Syndrome: A Genetic Update and Clinical Review Focusing on Comorbidities. *ACS Chem Neurosci* . 21 Şubat 2018;9(2):167–76.
46. Iwase S, Bérubé NG, Zhou Z, Kasri NN, Battaglioli E, Scandaglia M, vd. Epigenetic Etiology of Intellectual Disability. *J Neurosci* . 08 Kasım 2017;37(45):10773–82.
47. Gomes A, Korf BR. Genetic Testing Techniques . *Pediatric Cancer Genetics*. Elsevier Inc.; 2018. 47–64 s.
48. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, vd. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet* . 18 Kasım 2007;15(11):1105–14.
49. Garrido-Cardenas J, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo J, Manzano-Agugliaro F. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors* . 14 Mart 2017;17(3):588.
50. Ciotti P, Di Maria E, Bellone E, Ajmar F, Mandich P. Triplet Repeat Primed PCR (TP PCR) in Molecular Diagnostic Testing for Friedreich Ataxia. *J Mol Diagnostics* . Kasım 2004;6(4):285–9.
51. Monaghan KG, Lyon E, Spector EB. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* . 13 Temmuz 2013;15(7):575–86.

52. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, vd. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* . Nisan 2009;84(4):524–33.
53. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RKC, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* . Ocak 2014;42(D1):D986–92.
54. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance In Man (OMIM). *Hum Mutat* . Ocak 2000;15(1):57–61.
55. Nowakowska B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genet* . 30 Kasım 2017;58(4):449–57.
56. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* . 15 Temmuz 2011;13(7):680–5.
57. Fujiura GT, Li H, Magaña S. Health Services Use and Costs for Americans With Intellectual and Developmental Disabilities: A National Analysis. *Intellect Dev Disabil* . 01 Nisan 2018;56(2):101–18.
58. Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, vd. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *Eur J Hum Genet* . 04 Ekim 2015;23(11):1513–8.
59. Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. Genetic Basis of Intellectual Disability. *Annu Rev Med* . 14 Ocak 2013;64(1):441–50.
60. Di Nuovo S, Buono S. Behavioral phenotypes of genetic syndromes with intellectual disability: Comparison of adaptive profiles. *Psychiatry Res* . Ekim 2011;189(3):440–5.
61. Vissers LELM, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* . 27 Ocak 2016;17(1):9–18.
62. Gomes A, Korf B. Genetic Testing Techniques. İçinde: *Pediatric Cancer Genetics* . Elsevier; 2018. s. 47–64.
63. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JPT, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19

- studies and 13,926 subjects. *Genet Med* . Mart 2009;11(3):139–46.
64. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, vd. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet* . Mayıs 2010;86(5):749–64.
 65. Zhang W. Extracellular Domains of α -Neurexins Participate in Regulating Synaptic Transmission by Selectively Affecting N- and P/Q-Type Ca^{2+} Channels. *J Neurosci* . 27 Nisan 2005;25(17):4330–42.
 66. Dudanova I, Sedej S, Ahmad M, Masius H, Sargsyan V, Zhang W, vd. Important Contribution of α -Neurexins to Ca^{2+} -Triggered Exocytosis of Secretory Granules. *J Neurosci* . 11 Ekim 2006;26(41):10599–613.
 67. Kasem E, Kurihara T, Tabuchi K. Neurexins and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Res* . Şubat 2018;127:53–60.
 68. Yuan H, Wang Q, Liu Y, Yang W, He Y, Gusella JF, vd. A rare exonic NRXN3 deletion segregating with neurodevelopmental and neuropsychiatric conditions in a three-generation Chinese family. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* . Eylül 2018;177(6):589–95.
 69. Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, Chung R-H, vd. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet* . 01 Ağustos 2012;21(15):3513–23.
 70. Vaags AK, Lionel AC, Sato D, Goodenberger M, Stein QP, Curran S, vd. Rare Deletions at the Neurexin 3 Locus in Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* . Ocak 2012;90(1):133–41.
 71. Riegel M, Moreira LM, Espirito Santo LD, Toralles MBP, Schinzel A. Interstitial 14q24.3 to q31.3 deletion in a 6-year-old boy with a non-specific dysmorphic phenotype. *Mol Cytogenet* . 19 Aralık 2014;7(1):77.
 72. Broix L, Jagline H, L Ivanova E, Schmucker S, Drouot N, Clayton-Smith J, vd. Mutations in the HECT domain of NEDD4L lead to AKT–mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopia. *Nat Genet* . 03 Kasım 2016;48(11):1349–58.
 73. Yanpallear S, Wang T, Koh DCI, Quarta E, Fulgenzi G, Tessarollo L.

- Nedd4-2 haploinsufficiency causes hyperactivity and increased sensitivity to inflammatory stimuli. *Sci Rep* . 08 Aralık 2016;6(1):32957.
74. Stouffs K, Verloo P, Brock S, Régál L, Beysen D, Ceulemans B, vd. Recurrent NEDD4L Variant in Periventricular Nodular Heterotopia, Polymicrogyria and Syndactyly. *Front Genet* . 05 Şubat 2020;11.
 75. Han JY, Lee IG. Genetic tests by next-generation sequencing in children with developmental delay and/or intellectual disability. *Clin Exp Pediatr* . 15 Haziran 2020;63(6):195–202.
 76. Harripaul R, Vasli N, Mikhailov A, Rafiq MA, Mittal K, Windpassinger C, vd. Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Mol Psychiatry* . 11 Nisan 2018;23(4):973–84.
 77. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, vd. VarSome: the human genomic variant search engine. Wren J, editör. *Bioinformatics* . 01 Haziran 2019;35(11):1978–80.
 78. Peter D, Patrick Finn J, Klisak I, Liu Y, Kojis T, Heinzmann C, vd. Chromosomal localization of the human vesiculamine transporter genes. *Genomics* . Aralık 1993;18(3):720–3.
 79. Rilstone JJ, Alkhater RA, Minassian BA. Brain Dopamine–Serotonin Vesicular Transport Disease and Its Treatment. *N Engl J Med* . 07 Şubat 2013;368(6):543–50.
 80. Sanders AAWM, de Vrieze E, Alazami AM, Alzahrani F, Malarkey EB, Soroush N, vd. KIAA0556 is a novel ciliary basal body component mutated in Joubert syndrome. *Genome Biol* . 29 Aralık 2015;16(1):293.
 81. Johansson S, Berland S, Gradek GA, Bongers E, de Leeuw N, Pfundt R, vd. Haploinsufficiency of MEIS2 is associated with orofacial clefting and learning disability. *Am J Med Genet Part A* . Temmuz 2014;164(7):1622–6.
 82. Ostergaard E, Hansen FJ, Sorensen N, Duno M, Vissing J, Larsen PL, vd. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain* . 01 Mart 2007;130(3):853–61.
 83. Guemez-Gamboa A, Nguyen LN, Yang H, Zaki MS, Kara M, Ben-Omran T, vd. Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid

transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome. *Nat Genet* . 25 Temmuz 2015;47(7):809–13.

84. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, vd. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* . 04 Temmuz 2014;511(7509):344–7.



