

← Adınızı soyadınızı giriniz

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

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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**MİKROSEFALİNİN EŞLİK ETTİĞİ ZİHİNSEL
YETMEZLİK HASTALARINDA İLİŞKİLİ GEN
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

SEVCAN TÜRKER

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

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Sevcan TÜRKER tarafından Prof. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ'nin danışmanlığında hazırlanan "Mikrosefalinin Eşlik Ettiği Zihinsel Yetmezlik Hastalarında İlişkili Gen Varyantlarının Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Zuhur YAPICI
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Nöroloji A. D.

Prof. Dr. Uğur ÖZBEK
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fak.
Tıbbi Genetik A.D.

Doç. Dr. Yelda T. ARGÜDEN
İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fak.
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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

Sevcan TÜRKER



İTHAF

Değerli eşim K.Ethem TÜRKER'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Beni nörogenetikle tanıştırap doktora tez çalışmam boyunca karşılaştığım her zorlu koşulda bana gösterdiği yoğun pozitif desteği ve teşvik ediciliği için danışmanım *Prof.Dr. Sibel Uğur İşeri*'ye,

2013 yılında danışmanım olarak moleküler hematolojiyle başlayan doktora sürecimde nörogenetikle devam eden çalışmalarda da gösterdiği motive edici bilimsel yaklaşımı ve bitmeyen olumlu desteği için *Prof.Dr. Uğur Özbek*'e,

Moleküler hematoloji toplantılarımızın güleryüzü, süregelen çalışmalarımızda ve hayata dair yoluma ışık olan çabaları için *Prof.Dr. Müge Sayitoğlu*'na,

İstanbul Tıp Fakültesi Nörolojii ABD ve Türkiye Spastik Çocuklar Vakfı'ndaki gönüllülerin projede yer alması için emek ve mesai harcayan *Prof.Dr.Zuhal Yapıcı*'ya ve *Uzm.Dr.Nihan Hande Akçakaya*'ya,

Bilime katkı sağlamak için kan örneklerini esirgemedi veren ve çalışmada yer almış değerli ailelerin tüm aile bireylerine, en çok çocuk hastalara ve kardeşlerine,

Bu süreçte bir varyant buldum cümlemlerle başlayan bilimsel istişarelerimizde bilgilerini, pozitif desteklerini ve arkadaşlıklarını benden esirgemeyen değerli Epilepsi grubu arkadaşlarım, *Dr. Yeşim Kesim*'e, *MSc. Barış Salman*'a ve *MSc. Garen Haryanyan*'a,

Bu süreci benim açımdan daha anlaşılır ve değerli kılan arkadaşlarım *Dr.Yücel Erbilgin*'e, *Uzm.Bio.Didem Altındirek*'e, *MSc. Melda Sarıman*'a, *MSc.Fulya Küçükçankurt*'a, *MSc. Eda Sun*'a,

Yine bu süre boyunca bilimsel katkıları için İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Genetik AB Dalı ve İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik doktora programında görevli bütün *hocalarıma*, ayrıca İ.Ü. Aziz Sancar DETAE'daki *akademik, idari ve teknik kadroya*,

Desteği, sabrı ve yardımları için can yoldaşım, sevgili eşim *K.Ethem Türker*'e,

Gerek yurtiçi gerek yurtdışı eğitim ve öğretim hayatım boyunca bugüne kadar bana olan inançlarını ve desteklerini her zaman göstererek hep yanımda olmaya çalışan *Canım Anneme, Canım Babama, Canım Kardeşime ve Değerli Eşime*, tüm aileye yaşam enerjisi aşılayan *biricik yeğenim Kuzey*'e,

Üzerimdeki sonsuz emekleri için çok kıymetlim *merhum Babaanneme*, tüm içtenliğimle çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25704 ve Proje No: TSA-2018-27512.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Nadir Hastalıklar	2
2.1.1. Nadir Nörogelişimsel Hastalıklar.....	4
2.1.1.1. Zihinsel Yetmezlik	5
2.1.1.2. Mikrosefali	8
2.2. Nadir Hastalıklara Moleküler Genetik Yaklaşımlar	14
2.2.1. Tüm Genom Genotiplendirme	14
2.2.1.1. Tüm Genom Genotiplendirme Örneklemeleri	15
2.2.2. Tüm Ekzom Dizileme	17
2.2.2.1. Tüm Ekzom Dizileme Örneklemeleri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Gereç	24
3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Bireyler	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	27
3.1.4. Çalışmada Yararlanılan Ekipmanlar	27
3.1.5. Çalışmada Yararlanılan Çeşitli Veritabanları ve Analiz Programları.....	28
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	30

3.2.1.1. QIAamp DNA Blood Maxi kit ile izolasyon	30
3.2.1.2. Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit ile İzolasyon	31
3.2.1.3. genomik DNA'nın Miktar ve Kalite Tayini.....	32
3.2.2. Tüm Genom Genotiplendirme Tekniği.....	33
3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Tekniği.....	34
3.2.3.1. Çalışma İçin Seçilen WES Kiti ve Deneysel Aşamaları	34
3.2.3.2. Çalışma Kapsamında Geliştirilen Ham Ekzom Verisi İşleme Modelleri	35
3.2.3.3. Anotasyonu Sağlanan Ekzom Verilerinin Analiz Stratejisi	36
3.2.4. Aday Varyant Validasyonu ve Ailesel Dağılım Analizi	40
4. BULGULAR.....	44
4.1. Resesif Kalıtmımlı Bildirilmiş Genlerde Tespit Edilen Varyantlar	48
4.1.1. M1 ve M2 Aileleri.....	48
4.1.2. M3 Ailesi.....	55
4.2. Dominant Kalıtmımlı Bilinen Genlerde Tespit Edilen Varyantlar	57
4.2.1.M4 Ailesi.....	57
4.2.2.M5 Ailesi.....	62
4.3. Fenotipiyle İlişkili Aday Varyant Tespit Edilememiş Olgular	68
4.3.1. M6 Ailesi.....	68
4.3.2. M7 Ailesi.....	73
4.3.3. M8 Ailesi.....	81
4.3.4. M9 Ailesi.....	90
5. TARTIŞMA	93
5.1.1. <i>WDR62</i> geni	95
5.1.2. <i>AP4M1</i> geni.....	97
5.1.3. <i>SOX11</i> geni	98
5.1.4. <i>TRIO</i> geni.....	100
5.2. WES ve SNP-Array ile Genetik Etiyolojisi Kesin Olmayan ve Açıklanamamış Olgular	102
5.3. Sonuç ve Öneriler	106
KAYNAKLAR	107
HAM VERİLER	119
FORMLAR	120
ETİK KURUL KARARI	121

PATENT HAKKI İZNİ	124
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	125
ÖZGEÇMİŞ	126



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bazı nörogelişimsel bozukluklarda yer alan genler ve hücresel fonksiyonları...	4
Tablo 2-2: Mikrosefalinin genetik nedenleri.....	9
Tablo 2-3: MCPH1-MCPH18 lokuslarına ait raporlanmış gen mutasyonları*.....	12-13
Tablo 3 1. Çalışmada Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler.....	27
Tablo 3-2: Kullanılan Kitler ve Ticari firma bilgileri.....	27
Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar ve Bilgileri.....	28
Tablo 3-4: Ham ekzom datası işlemede kullanılan veri işleme modelleri.....	36
Tablo 3-5: Patojenik varyant tespiti için uygulanan ekzom veri analiz stratejisi.....	37
Tablo 3-6: OMIM veri tabanında bildirilen otozomal resesif primer mikrosefali (MCPH) genleri.....	38
Tablo 3-7: Aday varyantların tasarlanan primer bilgileri.....	42
Tablo 3-8: PZR reaksiyon bileşimi.....	43
Tablo 3-9: PZR protokolü.....	43
Tablo 4-1: Çalışmadaki Olgulara Ait Fenotipik Özellikler.....	45
Tablo 4-2: E17_33 kodlu indekste ANNOVAR anotasyonlu ekzom listesinde saptanan SLC27A3 değişimi.....	46
Tablo 4-3: WDR62- NM_001083961.1:c.1605dupT varyantının özellikleri.....	49
Tablo 4-4: Bilinen MCPH mikrosefali genleri analiz sonuçları.....	51
Tablo 4-5: AP4M1- NM_004722.3:c.952C>T varyantının özellikleri.....	56
Tablo 4-6: E17_16 kodlu olguda tespit edilen aday varyantlar.....	58
Tablo 4-7: SOX11- NM_003108.3:c.239C>T varyantının özellikleri.....	60
Tablo 4-8-a: Annenin AA, babanın BB ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin örnek listesi.....	61
Tablo 4-8-b: Annenin BB, babanın AA ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin örnek listesi.....	61

Tablo 4-9: a) Anne (AA), baba (BB) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması ve c) Anne (BB), baba (AA) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplamasıyla ailesel uyum hesabı.....	61
Tablo 4-10: E17_31 kodlu hasta için dominant kalıtmı bilinen genlerde tespit edilen aday varyantlar.....	62
Tablo 4-11: E17_31 kodlu birey için resesif kalıtmı bilinmeyen genlerdeki aday Varyantlar.....	62
Tablo 4-12: E17_31 kodlu hasta birey için dominant kalıtmı bilinmeyen genlerdeki aday varyantlar.....	63
Tablo 4-13: TRIO- NM_007118.3: c.4394A>G varyantının özellikleri.....	65
Tablo 4-14: Annenin AA, babanın BB ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin 10 tanesinin listesi.....	66
Tablo 4-15: Annenin BB, babanın AA ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin 10 tanesinin listesi.....	66
Tablo 4-16: a) Anne (AA), baba (BB) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması ve c) Anne (BB), baba (AA) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplamasıyla ailesel uyum hesabı.....	66
Tablo 4-17: E17_12 kodlu olguda bilinen genler için tespit edilen aday varyantlar.....	68
Tablo 4-18: E17_12 kodlu hastanın ikinci ekzom analiziyle tespit edilen muhtemel varyantlar.....	70
Tablo 4-19: Dominant ve resesif kalıtmı bilinen gen varyantları.....	74
Tablo 4-20: Resesif ve X kromozomu kalıtmı bilinen ve bilinmeyen gen varyantları.....	78
Tablo 4-21: Dominant kalıtmı bilinmeyen genlerin aday varyantları.....	79
Tablo 4-22: E17_33'ün 2. analizinde resesif kalıtmı bilinmeyen genler için tespit edilen olası varyantlar.....	86
Tablo 4-23: E17_33'ün 2. analizinde birleşik heterozigot kalıtmı ve dominant kalıtmı bilinen-bilinmeyen genlerde tespit edilen aday varyantlar.....	86
Tablo 4-24: Fenotipi açıklanabilen olgulardaki varyantların özellikleri.....	92
Tablo 5-1: Psödo-trio ailesinin ailesel uyum hesabı.....	102

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: MCPH oluşumundaki moleküler etki mekanizması.....	10
Şekil 2-2: Tüm ekzom dizileme tekniğinin deneysel aşamalarının gösterimi.....	19
Şekil 3-1: Tez kapsamında çalışılmış tüm ailelerin HaploPainter programından elde edilmiş detaylı aile ağaçları.....	25-26
Şekil 3-2: İzolasyon sonrası çalışmadaki 7 olguya ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 3-3:Agilent SureSelect V6 kiti özelinde tüm ekzom dizileme tekniğinin deneysel aşamalarının gösterimi.....	35
Şekil 4-1: E17_33 kodlu bireyde chr1:153744868 G>A değişiminin INTS3 genine denk düştüğünü gösteren IGV görseli.....	46
Şekil 4-2: INTS3 ve SLC27A3 genlerinin NCBI Genome Data Viewer görüntüsü (hg19).....	47
Şekil 4-3: WDR62-NM_001083961.1:c.1605dupT;p.Glu536* aday varyantı IGV görüntüsü.....	48
Şekil 4-4: M1 ve M2 ailelerinde WDR62-NM_001083961.1:c.1605dupT varyantının ailesel segregasyon gösterimi.....	50
Şekil 4-5:WDR62 referans ve tespit ettiğimiz mutant protein diziliminin kıyas gösterimi.	51
Şekil 4-6-A:M2 ailesi 13.kromozom CNV analizi için B allel frekansı ve LogR değerleri görüntüsü.....	52
Şekil 4-6-B: M1 ve M2 ailelerinin WDR62- NM_001083961.1:c.1605dupT ve rs2301734 varyantları açısından haplotip görseli.....	54
Şekil 4-6-C: NM_001083961.1:c.1605dupT ve rs2301734 varyantları için M2 ailesinin yeni gDNA örneklerinden elde edilen Sanger Dizileme kromatogram görselleri.....	54
Şekil 4-6: AP4M1 dur kodon varyantının IGV görseli.....	56
Şekil 4-7: AP4M1-NM_004722.3:c.952C>T varyantının ailesel dağılım görseli.....	56

Şekil 4-8: AP4M1 referans ve mutant protein diziliminin kıyas gösterimi.....	57
Şekil 4-9: SOX11 (A) ve DYRK1A (B) genlerinde tespit edilen aday varyantların IGV görseli.....	59
Şekil 4-10: SOX11- NM_003108.3:c.239C>T varyantı için M4 ailesi Sanger kromatogram görseli.....	60
Şekil 4-11: TRIO geninde NM_007118.3:c.4394A>G IGV görseli.....	64
Şekil 4-12: TRIO-NM_007118.3:c.4394A>G varyantının ailesel segregasyon görseli.....	65
Şekil 4-13: TRIO de novo varyantının olası tekraralama riski ve ebeveyn kaynağının olasılık hesabı.....	67
Şekil 4-14: HECW2-chr2:NM_020760.3:c.1679C>T IGV görseli.....	69
Şekil 4-15: HECW2 aday varyantının kromatogram görseli.....	69
Şekil 4-16: SCN1A-NM_001165963.1:c.2909C>T varyantı IGV görseli.....	71
Şekil 4-17: SCN1A-NM_001165963.1:c.2909C>T; p.Thr970Ile evrimsel korunmuşluk gösterimi.....	71
Şekil 4-18: A)SCN1A-NM_001165963.1:c.2909C>T varyantının ailesel dağılım gösterimi B) E19_08 kodlu bireyde (baba) varyantın (siyah okla işaret edilmiştir) kromas görüntüsü.....	72
Şekil 4-19: M6 ailesinin 8.kromozomuna ait BAF ve LRR görseli.....	73
Şekil 4-20: HSPG2 geninde aday iki varyantın IGV görseli.....	74
Şekil 4-21: PLEKHG2 varyantlarının IGV görseli.....	74
Şekil 4-22:DYRK1A aday varyantının IGV görseli.....	75
Şekil 4-23: HSPG2 rs149159881(A) ve rs189089389 (B) ailesel segregasyon gösterimi.....	76
Şekil 4-24: PLEKHG2 A) rs34975345 C>G ve B) rs111487768 G>A ailesel segregasyon görseli.....	77
Şekil 4-25: DYRK1A-NM_001347721.2:c.76G>A varyantının ailesel dağılım görseli.....	77
Şekil 4-26: LGSN rs1166386174 A>C varyantının IGV görseli.....	78

Şekil 4-27: LGSN rs1166386174 A>C varyantının ailesel segregasyon görseli.....	79
Şekil 4-28: RIBC1-NM_001031745.5:c.296G>A;p.Arg99Gln varyantı Ailesel segregasyon görseli.....	80
Şekil 4-29: DPP6-NM_130797.4:c.526A>G;p.Thr176Ala varyantı Ailesel segregasyon görseli.....	80
Şekil 4-30: E17_23 kodlu bireyin Illumina OmniExpress 24V1.1 çipinden elde edilen trizomi 21 görseli.....	81
Şekil 4-31: DDHD1 (1), C2CD3 (2) ve INTS3 (3) gen varyantlarına ait IGV görselleri.....	82
Şekil 4-32:DDHD1-chr14:NM_001160148.1:c.1709G>A;p.R570Q, varyantının M8 ailesine ait kromatogram görseli.....	83
Şekil 4-33: C2CD3-chr11:NM_015531.5:c.5082G>T;p.Q1694H, varyantının M8 ailesine ait kromatogram görseli.....	84
Şekil 4-34: INTS3-chr1:NM_023015.5:c.2773G>A;p.E925K varyantının M8 ailesine ait kromatogram görseli.....	85
Şekil 4-35: E17_33'e ait VATK anotasyonlu ekzom verilerinin 2. Analizinde tespit edilebilen aday varyantların IGV görselleri.....	87-88
Şekil 4-36: INTS5-NM_030628.2:c.967G>C;p.Gly323Arg, aday varyantının ailesel segregasyon görseli.....	88
Şekil 4-37:KMT2B-NM_014727.2:c.3101A>C;p.Glu1034Ala, aday varyantının ailesel segregasyon görseli.....	89
Şekil 4-38:LMX1A-NM_001174069.1:c.184_185del p.Cys62ArgfsTer23 varyantının ailesel segregasyon görseli.....	89
Şekil 4-39: E17_33 kodlu olgunun 3.kromozomuna ait BAF ve LRR görseli.....	90
Şekil 4-40:E17_18 kodlu bireyin 1.kromozomunun tamamına ait CNVgörseli.....	91
Şekil 5-1: SOX11 proteini HMG domain varyantlarını gösteren şematik diyagram..	99
Şekil 5-2: E17_31'de bildirilen de novo değişimin yerini gösteren TRIO proteininin tam şematik diyagramı.....	101

Şekil 5-3: LGSN rs1166386174 A>C varyantının LGSN domainindeki lokalizasyonu.....	105
---	-----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

WES: whole genome sequencing, tüm ekzom dizileme

ZY: Zihinsel yetmezlik

CNV: Copy number variation, kopya sayısı değişiklikleri

SNP: Single nucleotide polimorphism, tek nükleotid değişikliği

MCPH: Otozomal resesif primer mikrosefali, MicroCephal Primary Hereditary autosomal recessive

MCPH2: Microcephaly 2, primary, autosomal recessive, with or without cortical malformations

aCGH: array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

RD: rare disease; nadir hastalık

NDD: Neurodevelopmental disorder, Nörogelişimsel bozukluklar

ASD: autism spectrum disorder, otizm spektrum bozukluğu

DD: developmental delay; gelişim geriliği

WGS: whole genome sequencing, tüm genom dizileme

NGS :next generation sequencing, Yeni nesil dizileme

IQ :Intelligence Quotient, zeka testi

DHODH : dihidroorotet dehidrogenaz geni

SD : standart sapma

OFC : occipitofrontal circumference-baş çevresi ölçümü

NPC :nöronal progenitor hücreleri, neuronal progenitor cells

CDK5RAP2 :CDK5 regulatory subunit associated protein 2

CEP152 :centrosomal protein 152

WDR62: WD repeat domain 62

CEP63: centrosomal protein 63

CEP72: centrosomal protein 72

CEP131: centrosomal protein 131

CEP90: centrosomal protein 90

CCDC14: coiled-coil domain containing 14

BAF: B alel frekansı

LogRR: log R oranı

A: Adenin

G:Guanin

C:Sitozin

T:timin

LCR: Düşük kopya sayısı, Low Copy Repeats

BCL: Ham ekzom verileri, base call files

BWA: *Burrows-Wheeler Aligner*, Ekzom aracı

SAM: sekans hizalaması / harita, SAM

BAM: ikili hizalama / harita, BAM

PZR: polimeraz zincir reaksiyonu

GATK: Genom analizi araç kiti, Genome Analysis Toolkit

VCF: *variant calling format*

MCSZ: Microcephaly, seizures, and developmental delay sendromu

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

C₂H₅OH :etil alkol, EtOH

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

LOH: heterozigotluk kaybı, *loss of heterozygosity*

gDNA: genomik DNA

MAF: minör allel frekansı

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

DNM: *De novo* mutasyonları

DS: Dravet Sendrom

NMD: RNA bozulması; nonsense mediated RNA decay

AP:adaptin

HMG: High Mobility Group

CCS:Coffin-Siris sendromu

DH :Dbl homoloji domaini

PH: Pleckstrin homoloji domaini

GEFD1: Guanine nucleotide exchange factors (GEF) domaini

VEP: Variant Effector Prediction

ÖZET

Türker, S. Mikrosefalinin Eşlik Ettiği Zihinsel Yetmezlik Hastalarında İlişkili Gen Varyantlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Nadir nörogelişimsel hastalık grubunun önemli bir bileşeni olan sendromik zihinsel yetmezliğe sıkça, mikrosefali bulgusu da eşlik eder. Mikrosefali ve azalan beyin hacmine bağlı bilişsel ve iletişimsel kısıtlılığın yanı sıra gelişim geriliği, hipotoni ve çeşitli dismorfik bozukluklar gibi ek fenotipik özellikler de bu vakalarda gözlemlenmektedir. Zika virüsünün son yıllarda artan görülme sıklığı, dikkati aslında yüzlerce farklı sendromda yer alan primer mikrosefaliye çekmiştir. Bu olguların yarısından fazlası genetik tanıdan yoksundur.

Son derece genetik ve klinik heterojenite gösteren hastalıklarda Sanger gibi klasik dizileme yöntemleriyle hastalık ilişkili varyant tespiti mümkün olamayabilir. Yeni nesil dizileme yöntemlerinden biri olan WES, bu tür hastalıklarda yüksek çıktılı veri analiziyle tüm kalıtım modellerinde patojenik varyant keşfini kolaylaştıran güncel bir tekniktir. Ebeveyn akrabalığının ülkemiz gibi yaygın olduğu toplumlarda özellikle resesif etkili genlere bağlı doğumsal anomalilerin görülme riski yükselir. Bu tez çalışmasında akraba veya aynı yöre evliliği bulunan ailelerden toplam 9 sayıda mikrosefali tanısını prenatal veya doğum sırasında almış hastalarla tüm genom genotiplendirme ve WES tekniğiyle özellikle nadir ve resesif patojenik değişikliklerin tespiti hedeflenmiştir. Diğer bir hedef de *de novo* değişimler olmuştur.

Çalışmanın neticesinde iki bağımsız ailede MCPH2 ilişkili yeni ve fonksiyon kaybı yaratan WDR62 patojenik varyasyonu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız bu varyasyonun ortak bir kurucu ata kaynaklığı olduğunu düşündürmektedir. Farklı bir hastada, literatürde SPG50'yle bildirilmiş bilinen varyant bulunmuştur. İki farklı ailede ise *SOX11* ve *TRIO* genlerinde *de novo* ve yeni mutasyonlar tespit edilmiştir. Tüm hastalar mikrosefali, ZY, hipotoni ve gelişim geriliği çekirdek fenotipine sahip olup sözü edilen genlerin primer mikrosefali patogeneziindeki rolleri dikkat çekmektedir. Bu genlerin hücre bölünmesi, NPC farklılaşmasında rolleri vardır. Ayrıca çalışmamız akraba evliliğine bağlı ailelerde heterozigot ve *de novo* değişimlerin de göz ardı edilmemesi gerektiğine önemli bir kanıttır.

Anahtar Kelimeler : Mikrosefali, Zihinsel Yetmezlik, Tüm Ekzom Dizileme, *WDR62, AP4M1, SOX11, TRIO*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25704 ve Proje No: TSA-2018-27512.

ABSTRACT

Türker S. Investigation of Associated Gene Variants in Intellectual Disability Accompanied by Microcephaly. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Syndromic intellectual disability with accompanying microcephaly is an important group of rare neurodevelopmental disorders. The affected individuals have limited cognitive and communicative skills due to microcephaly and reduced brain volume. Additional phenotypic features include developmental delay, hypotonia and various dysmorphic disorders. The recent increase in the incidence of Zika virus-induced microcephaly in recent years has drawn attention to primary microcephaly, which is actually present in hundreds of different syndromes. More than half of these cases lack genetic diagnosis.

Disease-related variant detection may not be possible with conventional gene analysis in disorders with extremely genetic and clinical heterogeneity. Whole exome sequencing (WES), one of the next generation sequencing methods, is an up-to-date technique that facilitates the discovery of pathogenic variants in all inheritance models by high-throughput data analysis in such disorders. The risk of rare and recessive congenital anomalies increases due to increased high rate of consanguinity in certain populations including ours. In this studythesis, we aimed to determine the rare and potentially recessive pathogenic variations in 9 patients from consanguineous families that have been diagnosed with primary microcephaly in prenatal term or birth. Another focus of this study is *de novo* variants associated with this phenotype.

As a result of this study, a novel loss-of –function *WDR62* pathogenic variant related to MCPH2 was detected in two different families possibly having a common founder. In a different patient, the known variant reported with SPG50 was found. *De novo* and new mutations were detected in *SOX11* and *TRIO* genes in two different families. These proteins encoded by these genes are involved in key cellular processes including NPC differentiation and cell division. Finally, out study draws attention to *de novo* variants that may be overlooked in consanguineous families.

Key Words: Microcephaly, Intellectual Disability, Whole Exome Sequencing, *WDR62,AP4M1, TRIO,SOX11*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2017-25704 and Project No: TSA-2018-27512.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Zihinsel yetmezlik (ZY), kişide yetişkinlikten önce öğrenme, akıl yürütme ve iletişim kurma becerilerindeki sınırlı yeteneğin ömür boyu devam ettiği nörolojik bozukluktur [1]. ZY prevalansı %1-3 arasındadır [2]. Kompleks bir durum olan ZY'nin etiyolojisinde hem çevresel hem de genetik faktörler rol oynamaktadır [2,3]. Bugüne kadar, ZY ile ilişkili otozomal dominant/resesif ve X'e bağlı kalıtım gösteren pek çok gen tanımlanmıştır [3,4]. Bu genlerin çoğu X kromozomuna bağlı geçiş gösteren genler olsa da X'e bağlı kalıtım modelleri zihinsel yetmezliklerin yalnızca %10'unu açıklayabilmektedir. Fenotipe katkı sağlayan otozomal genlerin ise pek çoğunun halen keşfedilmeyi beklediği düşünülmektedir [3]. ZY tek başına yani izole olarak görülebileceği gibi mikrosefali, polidaktili gibi doğumsal anomaliler ile epilepsi gibi farklı nörolojik bulgularla seyreden son derece heterojen fenotip de sergileyebilmektedir [5]. Akraba evliliğinin sık olduğu ülkelerde, patojenik varyantların frekansında artış görülebilmektedir. Bu sebeple konjenital anomalilerin karşımıza çıkma riski akraba evliliği düşük toplumlara göre daha yüksektir [3,7].

Gelişen array teknikleri (SNP array ve array CGH yöntemleri) sayesinde tüm genom CNV (kopya sayısı çeşitliliği, copy number variation; CNV) tespiti ve bu CNV'lerin hastalıklarla ilişkilendirilmeleri mümkün olmuştur. Ayrıca tüm ekzom dizileme gibi genlerin protein kodlayan bölgelerinin hedefli ve yüksek çıktılı olarak dizilenmesi prensibine dayalı yöntemler de hem tek gen hastalıklarında genotip-fenotip ilişkisinin belirlenmesine hem de kompleks hastalıklarda nadir varyasyonların katkısının tespit edilmesinde son derece önem kazanmıştır [10]. Özellikle son yıllarda SNP-CNV array ve tüm ekzom dizileme çalışmalarının katkısıyla genomdaki kopya sayısı değişikliklerinin ve yeni gen varyant/larının heterojen etiyolojiye sahip ZY ile birlikte seyreden mikrosefalili birçok olguda fenotipik ilişkisi gösterilmiştir [8-13].

Bu bağlamda, ülkemizde akraba evliliğinin yüksek oranda seyrettiği baz alınarak, akraba evliliği ve/veya aynı yöreden evlilik bulunan konjenital mikrosefali tanımlı hastalara sahip ailelerde tüm ekzom dizileme ve tüm genom SNP genotiplendirme yöntemleri birlikte uygulanarak hastalıkla ilişkili aday bölgeler ve/veya özellikle resesif kalıtım gösteren nadir gen varyant/larının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nadir Hastalıklar

Nadir (rare disease;RD) hastalık terimi vücutta herhangi bir sistemi tutan, yaşam süresini kısaltan veya yaşam kalitesini bozan ve çoğu durumda tanısı zor ve tedavisi kısıtlı hastalıklara verilen genel bir isimdir [14]. Bu açılardan yüksek maliyetli global bir sağlık sorunudur. Nadir hastalıklar, popülasyonun küçük bir yüzdesini etkilediği gerçeğiyle tanımlanır ve genel geçer bir RD eşik frekansı yoktur. Avrupa Birliği'ne göre RD'ın tanımı, 2000 kişide bir görülen hayatı tehdit eden ve kronik olarak varolan hastalıklardır [15]. Amerika Birleşik Devletler'inde 1500'de 1 kişiyi etkileyen hastalıklar, Japonya'da ise 2500'de 1 kişiyi etkileyen hastalıklar nadir hastalıklar başlığı altına girmektedir [15].

Günümüzde, genetik hastalıkların bir kataloğu olan Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) ve nadir hastalıklar için kapsamlı bir referans portalı olan Orphanet'in sorgulanmasıyla yaklaşık 7000-8000 kadar nadir hastalığın varolduğu bilinmektedir. Dünya genelinde bu koşullardan 350 milyon kişinin etkilendiği tahmin edilmektedir [14]. Avrupa'da ise nüfusun % 8'inin RD'den birine sahip olduğu ve yaklaşık 36 milyon Avrupalı'nın bu hastalıklardan birinden etkilendiği veya yaşamları boyunca etkileneceği tahmin edilmektedir [15]. Bu hastalıklar nadir olsada bir grup olarak kabul edildiğinde nadir görülen hastalıklar yaklaşık % 6-8 oranında bir prevalansa sahiptir [14,15].

2014 yılında İtalya'nın Veneto bölgesinde 10 yıl süreyle yapılan epidemiyolojik çalışma kapsamında, nadir hastalıkların pediatrik popülasyon için mortalite verileri göz önüne alındığında, ölümlerden doğumsal malformasyonlar % 36,5 oranında, metabolik bozukluklar ve sinir sistemi hastalıkları % 20,6 oranlarında sorumludur [16]. Bu üç nadir hastalık grubu, pediatrik hastalıklar arasındaki yaygın vakaların yaklaşık yarısını oluştururken (% 57,5), çocuk ve ergen ölümlerinin de üçte ikisinden sorumludur (% 77,1) [16]. Bu araştırma nadir hastalıkların pediatrik popülasyon için yenidoğan döneminde erken kesin tanı gerekliliğinin ve ardından doğru tedavi uygulanabilmesi açısından önemini vurgulamaktadır [15,16].

Nadir genetik hastalıklarda; lokus heterojenitesi, çalışacak çok az sayıda hasta veya ailenin bulunması, bazı hastalıkların üremeye izin vermemesiyle soyun devam edememesi gibi çeşitli nedenler sebebiyle hastalık ilişkili gen keşfi oldukça güçleşmektedir [17]. Ancak, nadir hastalık araştırmalarında yeni nesil dizileme tekniklerinden tüm ekzom dizilemenin kullanımıyla, dominant Freeman–Sheldon [18], resesif Miller [19] ve dominant Schinzel–Giedion [20] sendromlarından sorumlu genlerin tanımlanması bu yöntemin nadir hastalıklarla ilişkili gen bulmadaki etkinliğinin ilk kanıtlarıdır.

WES’te trio (ebeveyn-proband) dizilemenin mümkün olmadığı durumda sadece probandların heterozigot varyant kesişimi kullanılarak keşfedilen *EZH2 de novo* varyantlarının nadir Weaver Sendromuna sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır [21]. İlginç olan diğer çalışmada, aynı ailede iki kardeşin oküler ve cilt hipopigmentasyonu, konjenital nötroponi, immün disregülasyonu ve Crohn hastalığı ile karakterize yeni ve değişken penetran bir sendroma sahip olduğu düşünülürken, WES yöntemiyle bu iki kardeşin de *G6PC3* varyantlarıyla okülokütan albinizm tip 4 ve *SLC45A2* varyantlarıyla ağır konjenital nötroponi tip 4 olduğu gösterilmiştir [22]. Sonuçta "benzersiz" olarak beklenen fenotipin iki ayrı bilinen fenotip karışımını temsil ettiği WES yöntemiyle kanıtlanmıştır.

Nadir hastalıkların %80’i genetik temele sahiptir, tek gen veya protein defekti sebebiyle özgül bir yolağın fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak gelişebilir. Aynı genetik defekti taşıyan hastalar farklı klinik bulgular sergileyebilmektedir [23,24,25] hatta bazı bireyler hastalık yapıcı gen defektini taşıyor olsa bile hastalığın etkilerini göstermeyebilir [26]. Bu nedenle, nadir hastalıklarda genetik nedenin etkisinin anlaşılması karmaşık biyolojik yollara dair bilgi edinilmesine izin verirken öte yandan RD’ler, yaygın hastalıklar ve bilinmeyen yollar için model oluşturarak kişiselleştirilmiş tedavinin de yolunu açmaktadır [15]. Bu bağlamda, nadir hastalıklarla çalışan uluslararası genetik merkezlerinin ve araştırma enstitülerinin detaylı fenotip ve genetik varyasyon verileri paylaşımı için işbirliği büyük önem arz etmektedir [16].

2.1.1. Nadir Nörogelişimsel Hastalıklar

Nadir nörolojik hastalıklar, kasları, merkezi ve periferik sinir sistemini etkilerler ve nadir görülen tüm hastalıkların yaklaşık % 50'sini temsil eden heterojen bir hastalık grubu olarak bilinirler [27,28]. Nörogelişimsel bozukluklar (neurodevelopmental disorders;NDD) ise bu başlık altında yer alıp, otizm spektrum bozukluğu (autism spectrum disorder;ASD), zihinsel yetmezlik (ZY), gelişim geriliği (developmental delay;DD), şizofreni ve epilepsiyi içeren fakat bunlarla sınırlı olmayan son derece farklı heterojen fenotiplerin sergilendiği nörolojik hastalıklardır [27]. Erken başlangıçlı (bebeklik, çocukluk veya ergenlik) ve kişide yaşam boyu devam eden bozukluklardır. NDD'ların 18 yaş altı popülasyonun %2 ila 5'ini etkilediği düşünülmektedir [28].Farklı fenotiplerin sergilendiği NDD'ların genetik etiolojisinin son derece heterojen olduğu bilinen bir gerçektir [29,30]. Tablo 2-1'de bazı NDD grubu hastalıklarının ilişkili olduğu genler gösterilmektedir [27].

Tablo 2-1:Bazı nörogelişimsel bozukluklarda yer alan genler ve hücresel fonksiyonları.

Hastalık	İlişkili Genler	Hücresel Fonksiyon
Lissencephaly	<i>DCX</i> (Doublecortin) and <i>LIS1</i> (Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha)	Lissencephaly Kortikal göç venöroprogenitor proliferasyonu
Fragile X syndrome (FXS)	<i>FMRI</i> (Fragile X mental retardation protein)	mRNA translayonunun negatif düzenleyicisi
Autism spectrum disorders (ASD)	<i>NLGN3</i> (Neuroigin-3), <i>NLGN4</i> (Neuroigin-4), <i>NRXN1</i> (Neurexin-1)	Sinaptik yapı ve sinyal iletimi
Non-syndromic intellectual disability (ID)	<i>SYNGAP1</i> (synaptic Ras-GTP activating protein1), <i>SNAP25</i> (synaptosomal-associated protein 25)	Sinaptik fonksiyon ve nörotransmisyon
Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)	<i>SNAP25</i> (synaptosomal-associated protein 25), <i>DRD4</i> (dopamine receptor D4), <i>DRD5</i> (dopamine receptor D5), <i>SLC6A3</i> (dopamine transporter), <i>SLC6A4</i> (serotonin transporter SERT), <i>HTR1B</i> (serotonin receptor 1B)	Nörotransmisyon
Rett syndrome (RTT)	<i>MECP2</i> (Methyl-CpG binding protein 2)	Metillenmiş DNA'nın bağlanması, transkripsiyon modülasyonu
Prader-Willi syndrome	<i>SNORD116</i>	Küçük kodlamayan RNA'ları modifiye edici
Williams syndrome	<i>CLIP2</i> , <i>ELN</i> , <i>GTF2I</i> , <i>GTF2IRD1</i> , <i>LIMK1</i>	Mikrotübül organizasyonu, Transkripsiyon, beyin gelişimi
Angelman syndrome (AS)	<i>UBE3A</i> (Ubiquitin-protein ligase E3A)	Proteozomlarda hedef proteinlerin degradasyonu

Kaynak: [27]Homberg ve ark., 2015.

Ortalama olarak, bir yenidoğan 50 ila 100 arasında yeni genetik varyantla doğar, bu yüksek bireysel genetik değişkenlik göz önüne alındığında, NDD'larla ilişkili varyantlar yüzlerce farklı gendeki, tek nükleotit değişiklikleri (SNV) olabileceği gibi genomda binlerce nükleotit kaybı veya kazancını (CNV) içeren değişimler de olabilmektedir [31,32]. NDD'ların genetik heterojenitesini aydınlatmak için yararlanılan 2 genel yol vardır. Genomda kopya sayısı değişiklikleri bulmak için karyotipleme, FISH, arrayCGH ve SNP array teknikleri kullanılır. SNV ve küçük insersiyon delesyon mutasyonlarının tespitinde ise panel veya tüm ekzom dizileme gibi Yeni nesil dizileme (next generation sequencing;NGS) yöntemlerinden yararlanılır. Panel ve ekzom dizilemeyle de CNV değişikliği taranabilir. Klasik dizileme yöntemlerine göre daha uzun okumaların elde edilebildiği WGS (whole genome sequencing,WGS) daha yaygın hale geldiğinde dengeli/dengesiz değişimler, tekrar farklılıkları gibi genomun her tür varyasyonu tespit edilebilecek duruma gelecektir [33,34,35,36,37,38,39].

NDD'lu vakalar için mevcut tedavi stratejileri tipik olarak palyatiftir; saldırganlık, nöbetler, hiperaktivite veya anksiyete gibi altta yatan semptomları yönetmeye odaklanır [40]. Dolayısıyla, yukarıda bahsedilen NGS teknolojilerinin klinik pratiğe girişleri ve rutin fenotip odaklı tanıda kullanımının yaygınlaşması NDD'ların daha önce tanımlanmamış alt tiplerinin keşfi ve kişiselleştirilmiş tedavi için umut vaat etmektedir.

2.1.1.1. Zihinsel Yetmezlik

NDD'ların en yaygın grubunu Zihinsel Yetmezlik (ZY; eski kullanımı ile mental retardasyon) oluşturur. Amerikan Psikiyatri Derneğinin tanımına göre ZY 18 yaş öncesi ortaya çıkan, kavramsal, sosyal, pratik beceriler gibi davranışlarda ifade bulan hem zihinsel fonksiyonların hem de uyumsal davranışların bozulması ile karakterize edilmektedir [1,28]. İngiltere Sağlık Bakanlığı'nın tanımına göre ise ZY yetişkinlikten önce başlayan ve gelişim üzerinde kalıcı bir etkisi olan zihinsel engellilikten ziyade öğrenme yetersizliği olarak tanımlanmaktadır [41]. Genel olarak bu bireyler algısal ve kantitatif akıl yürütme, sözlü anlama, soyut düşünme, talimat ve kuralları anlama, hafıza, problem çözme ve deneyimden öğrenme gibi işlevsel eksikliklere sahiptirler.

Eski terminolojide 'mental gerilik' olarak ifade edilmekte olan ZY, daha güvenilir ve yeterli olarak 7 yaşından büyük bireyler için uygulanan Intelligence Quotient (IQ) test skorunun 70'in altında olduğu durumla tespit edilmektedir[42,43]. Bu

testten alınan skora göre ZY hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli olmak üzere dört sınıfa ayrılır. Hafif ZY, tüm vakaların yaklaşık % 85'ini oluşturur[42,43]. Bu bireyler 50 ila 70 arasında bir IQ değerine sahiptir ve günlük yaşamın görevleri, kavramsal gelişim ve sosyal ortamlarda yetkinlik konusunda gecikmeler sergilerler. Orta şiddetli ZY, tüm ZY'lerin % 10'unu oluşturur [42,43]. Bu bireylerin IQ değeri 30 ile 49 aralığındadır[42,43]. Kişisel sağlık ve güvenlik ile ilgili temel becerileri öğrenme kapasitesine sahiptir. Olguların yaklaşık % 3,5'ini etkileyen şiddetli ZY'nin IQ aralığı ise 20-35 arasındadır[42,43]. Bu bireyler genellikle gelişimsel gerilik yaşarlar, konuşmayı anlama kapasitesine sahiptir, ancak iletişim becerileri kısıtlıdır. Son olarak şiddetli ZY tüm vakaların sadece % 1,5'ini oluşturur[42,43]. Bu bireylerde IQ değeri 20'nin altında ölçülür ve ZY genellikle başka konjenital durumlar ile birlikte gözlenir. Bu bağlamda, şiddetli ZY'ye sahip bireyler genellikle son derece sınırlı sözlü iletişim ve fiziksel kısıtlılık sergilerler [42,43].

ZY bir bireyde tek başına seyredip aşikar olarak herhangi bir bulgunun eşlik etmediği durumda non-sendromik ZY; dismorfik bozukluklar, gelişim geriliği, malformasyonlar, epilepsi, ataksi, spastisite veya mikrosefali gibi çeşitli nörolojik bulguların eşlik ettiği durumdaysa sendromik-ZY adını almaktadır [44]. Bu iki durum ayrıca izole ve izole olmayan ZY olarak da adlandırılabilir [44]. Bu klinik heterojenite, aynı zamanda ekstrem genetik heterojeniteyi yansıtmaktadır.

ZY'in prevalansı %1 ila %3 arasındadır ve her sosyal sınıf ve kültürde mevcuttur [45]. Cinsiyet bazında %30 oranında erkekler daha fazla etkilenmiştir [1,28]. Bu durum çoğunlukla X kromozomuna bağlı resesif ZY fenotipinin etkilenmemiş anneden erkek çocuğuna geçmesidir [44,45].

ZY'in etiyolojisinde non-genetik sebepler; doğum öncesi ve sonrası enfeksiyonlar, diyabet, fenilketonüri, erken doğum, iyot eksikliği, yetersiz beslenme, teratojenler (örneğin alkole maruz kalma, ilaçlar, kimyasal maddeler), doğuma bağlı komplikasyonlar önemli role sahiptir [46]. Ayrıca, genetik faktörlerinde çoğu ZY vakası ile ilişkili olduğu bilinen bir gerçektir [46]. ZY otozomal dominant, otozomal resesif ve X-kromozomuna bağlı kalıtım göstermektedir. ZY'ye neden olan genlerin sayısı yüksektir [45,46,47]. Genel bir bakışla, 1416 ZY geni tanımlanmıştır; bu genlerden 802'si otozomal resesif ZY, 525'i otozomal dominant ZY ve 132'sinin X-kromozomuna

bağlı ZY sebebi olduğu bildirilmiştir (Eylül 2016 itibariyle SysID veritabanı; <http://sysid.cmbi.umcn.nl/>) [47].

Otozomal resesif ZY genlerinin toplam sayısının çok daha yüksek olduğu tahmin edilmekle birlikte çoğunun henüz keşfedilemediği düşünülmektedir [48]. Ebeveyn akrabalığının yaygın olduğu toplumlarda taşıyıcılık durumundaki nadir patojenik varyantların çocuklarda homozigot olarak karşımıza çıkması çok olasıdır ve ZY bağlamında da ultra nadir otozomal resesif formlarının ortaya çıkmasına sebep olur [3]. Zaten ebeveynleri akraba olan çocukların ZY riskinin olmayanlara göre 2-3 kat artmış olduğu hesaplanmıştır [49].

Şiddetli ZY çoğunlukla sporadiktir, oysa hafif ZY daha çok ailesel vakalarda görülmektedir [3]. Beklenildiği gibi sporadik vakaların çoğunda ilişkili genetik varyasyon *de novo* olarak ortaya çıkar. *De novo* küçük dizi varyasyonları kadar yine *de novo* nadir kopya sayısı değişiklikleri (copy number variation; CNV) de şiddetli ZY'ye sebep olabilir [50,51,52]. Bununla birlikte daha yaygın ve kompleks kalıtıma uygun ZY fenotipleri daha hafif seyreder [3]. Ancak, hafif ZY formlarının altında yatan yetersiz beslenme gibi çevresel faktörler bilinirken, genetik bileşenler hakkında yeterli bilgi mevcut değildir [53].

Trizomi 21'in sebep olduğu Down ve Fragile X sendromlarının mikroskop altındaki tespitiyle başlayan ZY'in moleküler genetik tanısı, X-kromozomuna bağlı ZY'in tek gene bağlı formlarından sorumlu 100'den fazla gen tanımlamasıyla devam etmiştir [3]. Sitogenetik çalışmalar, Prader-Willi, Angelman, Williams, Smith-Magenis, Miller-Dieker ve DiGeorge sendromları gibi klinik olarak farklı ZY sendromlarını açıklayan otozomal mikrolelesyon ve mikroduplikasyonları ortaya çıkarmıştır [4]. Ardından NGS teknolojisiyle birlikte resesif geçişli nadir bir sendrom olan Miller sendromunda tüm ekzom dizilemeyle nedensel gen *DHODH* (dihidroorotet dehidrogenaz) olarak tanımlanmıştır [19]. Ayrıca WES, Schinzel-Giedion [20], Kabuki [19] ve Bohring-Opitz sendromları [54] gibi ZY ilişkili otozomal dominant sporadik sendromların nedensel genlerinin de tespit edilmesini sağlamıştır. Bugün için bilinen tahmin %50'den fazla ZY vakasının moleküler genetik tanıdan yoksun olduğudur [47]. Ancak, genetik dizilimdeki tüm ekzon (WES) hatta tüm genomun (WGS) bir seferde dizilenmesine imkan tanıyan NGS, öncesinde çalışılması zor ve güç olan nadir

monogenik ZY sendromlarından sorumlu genlerin ortaya çıkarılmasını kolaylaştırmaktadır [17].

2.1.1.2. Mikrosefali

Mikrosefali nadir görülen nörogelişimsel bir hastalıktır ve başçevresi ölçümünün beklenenin altında olması ile tanımlanır. Bilinen bir tedavisi bugün için mümkün değildir ve kişide hayat boyu süregelen bir durumdur [55,56]. Mikrosefali; gebelik esnasında genelde ikinci trimester döneminde, yenidoğanlarda, büyüme sürecinde baş çevresi (ya da occipitofrontal circumference-OFC) ölçümünün (dünya sağlık örgütü tarafından) yaş ve cinsiyete göre belirlenen referans aralık dışındaysa tanı alır. Mikrosefali -2 veya -3 standart sapmanın (SD) eşiti veya bu değer altındaki ölçümlerle tanımlanan nörolojik bir bozukluktur [55]. Özellikle şiddetli mikrosefali -3 veya daha alt OFC (-3 ve -13SD) ölçümlerine sahiptir [56]. Mevcut insidans oranı popülasyonun akrabalık durumu ve tipine bağlı olarak 100.000’de 1,3 ila 150 oranında değişmektedir [57].

Mikrosefali gebelik süresince veya doğumda gelişirse **konjenital (doğuştan, primer, primary veya birincil) mikrosefali**, doğumdan sonraki büyüme sürecinde gelişir ise **doğum sonrası veya kazanılmış (postnatal, acquired veya sekonder) mikrosefali** olarak adlandırılmaktadır [55,57,58]. Konjenital mikrosefali genetik ya da çevresel faktörlerin intrauterin dönemde beynin normal şekilde büyüme ve gelişmesini engelleyerek oluşur [55,56]. Tablo 2-2’de mikrosefalinin genetik sebepleri sayısal kromozom anomalileri, mikrodelesyon/duplikasyon, monogenik ve metabolik nedenler olmak üzere 4 kategoride detaylandırılmaktadır [58].

Tablo 2-2: Mikrosefalinin genetik nedenleri

Tip	Nedenler
Sayısal Kromozom Anomalileri	Trizomi 13, trizomi 18, trizomi 21, diğer anöploidiler
Mikrodelesyon ve/veya mikroduplikasyon Sendromları	Delesyon 4p-Wolf-Hirschhorn Delesyon 5p-Cri-du-chat Deletion 22q11 Deletion 17p13.3 Miller-Dicker Sendrom Duplikasyon 3q29 Duplikasyon 17q21.31 Duplikasyon Xq28 Duplikasyon 22q11 Diğer delesyon ve duplikasyonlar
Monogenik	MCPH1-18 Kortikal displazi, Kompleks, diğer beyin malformasyonları Meier-Gorlin Sendrom Seckel sendrom Nijmegen sendrom Bloom sendrom Warsaw Sendrom X-kromozomal mikrosefali Aicardi-Goutieres Sendrom Cockayne Sendrom Cornelia de Sendrom Rubenstein-Taybi Sendrom Feingold Sendrom Rett Sendrom, konjenital Mowat-Wilson sendrom Smith-Lemli Sendrom
Metabolik Nedenler	Serin biyosentez bozuklukları Sterol biyosentez bozuklukları Mitokondriyopati Glikozilasyon sendromunun Konjenital bozuklukları

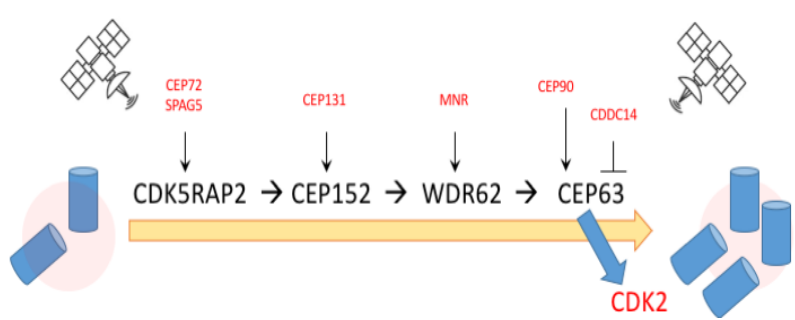
Kaynak: [58].

Alvarado-Socarras ve ark. Congenital microcephaly: A diagnostic challenge during Zika epidemics. *Travel Med Infect Dis.* 2018;23:14-20. doi: 10.1016/j.tmaid.2018.02.002.

Hipoksik yaralanma, Fenilketonüri, teratojen maruziyeti ve enfeksiyonlar gibi maternal metabolik anormallikler dahil olmak üzere çeşitli çevresel faktörlerle de beyin gelişimi engellenebilir ve konjenital mikrosefali oluşabilir [55-59]. Mikrosefaliye neden olan konjenital enfeksiyonlar TORCH enfeksiyonları [Toxoplasmosis, Diğer enfeksiyonlar (Sifiliz, Varicella, Zoster, Parvovirus B-19), Rubella, Cytomegalovirus, Herpes virus] olarak bilinir [56-59]. Mikrosefalinin yanı sıra, bu intrauterin enfeksiyonları olan çocukların sıklıkla hepatosplenomegali, döküntüler, korioretinit ve intrakraniyal kalsifikasyonları içerebilen başka anormal klinik bulguları da vardır [59].

Son yıllarda TORCH enfeksiyonlarının yanı sıra Zika virüsünün de konjenital mikrosefaliye neden olduğu bilinmektedir. 2015–2016 yıllarında, Brezilya'daki tüm canlı doğumların %4–8'ine kadar artan oranda mikrosefali görüldüğünü bildiren raporlar mevcuttur [60]. Hamilelik sırasında sivrisineklerle bulaşan Zika virüs enfeksiyonlarının olgulardaki bu dramatik artış sebebinin başlıca kaynağı olabileceği

gösterilmektedir [60]. *In vitro* çalışmalarla, Zika virüsünün nöronal proliferasyon, göç ve farklılaşma sürecini etkileyen nöronal progenitör hücrelerinin (neural progenitor cells;NPC) apoptozuna yol açtığı gösterilmiştir [61]. Virüs NPC'leri istila eder ve sentrozom sayısı ve oluşan iğ ipliklerinin doğru konumlanmasını değiştirerek hücre bölünmesi anormalliklerine sebep olur [62,63]. Moleküler düzeydeki bu tarz bozukluklar virüs dışı kalıtsal primer mikrosefalinin temel mekanizması olarak bilinir [64]. Örneğin, insanlarda otozomal resesif primer mikrosefali fenotipi ile ilişkili CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit associated protein 2), CEP152(centrosomal protein 152), WDR62 (WD repeat domain 62) ve CEP63(centrosomal protein 63) isimli 4 proteinin her biri kendisine özgü sentrozom uydu proteini sayesinde hiyerarşik olarak sentrozoma lokalize olur. Şekil 2-1'de kırmızı ile gösterilen uydu proteinlerinden CEP72 (centrosomal protein 72) ve SPAG5 CDK5RAP2'nin sentrozoma ulaştırılmasında görevlidir. Aynı şekilde sırasıyla CEP131(centrosomal protein 131) CEP152'den, MOONRAKER (MNR) WDR62'den ve CEP90 da(centrosomal protein 90) CEP63'den sorumludur. CCDC14 (coiled-coil domain containing 14) ise CEP63'ü sentrozomdan uzaklaştırarak süreci bloke eder. Tüm bu proteinlerin düzenli bir şekilde sentrozomlara yerleşmesi ile sikline bağlı bir kinaz olan CDK2 sentrozoma çekilerek sentrozom duplikasyonu gerçekleşir, hücre döngüsü devam eder [64].



Şekil 2-1: MCPH oluşumundaki moleküler etki mekanizması.

Konjenital mikrosefalinin otozomal resesif kalıtım gösteren tipi otozomal resesif primer mikrosefalidir (MicroCephal Primary Hereditary; MCPH), anormal nöronal göç veya nöral apoptoz nedeniyle oluşan nörogenik mitotik bir hastalıktır [65]. MCPH insidansı, popülasyona bağlı olarak canlı doğum başına 1: 30.000–1: 250.000 arasındadır [66]. MCPH, akraba evliliklerinin sık olduğu toplumlarında daha yaygındır

[67]. Toplam 18 farklı MCPH lokusu MCPH1-MCPH18 tanımlanmıştır ve bu lokuslar sırasıyla *MCPH1*, *WDR62*, *CDK5RAP2*, *CASC5*, *ASPM*, *CENPJ*, *STIL*, *CEP135*, *CEP152*, *ZNF335*, *PHC1*, *CDK6*, *CENPE*, *SASS6*, *MFSD2A*, *ANKLE2*, *CIT* ve *WDFY3* genlerini içerir [68]. MCPH'nin en yaygın nedenleri *ASPM*'deki (% 68.6) bialelik mutasyonlarla, bunu takip eden *WDR62*(% 14.1) ve *MCPH1* (% 8) gen mutasyonlarıdır [68]. Dünya çapında MCPH'nin nadir fenotiplerini açıklayan gen mutasyonlarının 300'den fazla ailede farklı hastalarda bulunduğu bildirilmiştir [68]. Tablo 2-3'te MCPH lokuslarındaki genler için bugüne kadar raporlanan mutasyonlar sunulmuştur.

İnsandaki nöroenezisi anlamak ve çalışmak için MCPH uygun model bir hastalıktır [69]. Tanımlanan MCPH genlerinin tümü nöroepitelde eksprese edilir [65]. Nöronların çoğu, beyin ventriküllerini kaplayan nöroepitelyumun baskın hücreleri olan nöron progenitörlerinden köken alır. Nöral progenitör hücrelerin mitotik aktivitesi simetrik (iki nöral progenitör hücre oluşur) ve asimetrik (bir postmitotik nöral ve bir progenitör hücre oluşur) hücre bölünmesi şeklinde oluşmaktadır [70]. Simetrik ve asimetrik bölünme arasındaki dengeyi bozan herhangi bir bozulma, beyin boyutunun küçülmesine yol açan nöroprogenitor ve nöronal hücrelerin sayısını büyük ölçüde azaltabilir [71]. Gelişim sırasındaki bu bölünmelerin zamanlaması son nöron sayısı için kritik olduğundan, mitotik hücre bölünmesinin düzenlemesindeki herhangi bir değişiklik mikrosefali gibi kortikal bozukluklara yol açar [72].

Tablo 2-3: MCPH1-MCPH18 lokuslarına ait raporlanmış gen mutasyonları*.

MCPH1–<i>Microcephalin</i>		
74C-G transversion Ser25-to-ter (S25X) substitution Exon2		Jackson et al. (2002)
1-bp insertion (427insA) Truncated protein of 146 a.a Exon5		Trimborn et al. (2004)
150- to 200-kb deletion – Exon1–6		Garshasbi et al. (2006)
1-bp insertion (566insA) Frameshift mutation Exon6		Darvish et al. (2010)
147C-G transversion His49-to-gln (H49Q) substitution Exon3		Darvish et al. (2010)
215C-T transition Ser72-to-leu (S72L) substitution Exon3		Darvish et al. (2010)
302C-G transversion Ser101-to-ter (S101X) substitution Exon4		Farooq et al. (2010)
MCPH2–<i>WDR62</i>		
4-bp deletion (c.4205delTGCC) Val1402GlyfsTer12 Exon31		Bilguvar et al. (2010)
c.1576G-A substitution Glu52-to-Lys (E526 K) substitution Exon12		Bilguvar et al. (2010)
G-to-C transversion Try224-to-Ser (W224S) substitution Exon6		Bilguvar et al. (2010)
C-to-T transition Glu to termination substitution (Q470X) Exon11		Bilguvar et al. (2010)
17-bp deletion Gly1280AlafsTer21 Exon30		Bilguvar et al. (2010)
1313G-A transition Arg438-to-His (R438H) substitution Exon10		Nicholas et al. (2010)
1-bp duplication (4241dupT) Premature termination Exon31		Nicholas et al. (2010)
1531G-A transition Asp511-to-Asn (D511N) substitution Exon11		Nicholas et al. (2010)
1-bp insertion (3936insC) Premature termination Exon30		Yu et al. (2010)
1-bp deletion (363delT) Premature termination Exon4		Yu et al. (2010)
193G-A transition Val65-to-Met (V65M) substitution Exon2		Yu et al. (2010)
1-bp deletion (2083delA) – Exon17		Murdock et al. (2011)
2-bp deletion (2472_2473delAG) – Exon23		Murdock et al. (2011)
MCPH3–<i>CDK5RAP2</i>		
c.243 T-A transversion Ser81-to-Ter (S81X) substitution Exon4		Bond et al. (2005)
c.246 T-A transversion Tyr82-to-Ter (Y82X) substitution –		Hassan et al. (2007)
c.15A-G transition – Intron26		Bond et al. (2005)
c.700G-T transversion Glu234-to-Ter (E234X) substitution Exon8		Pagnamenta et al. (2012)
c.4546G-T transversion Glu1516-to-Ter (E1516X) substitution –		Lancaster et al. (2013)
c.4672C-T transition Arg1558-to-Ter (R1558X) substitution –		Lancaster et al. (2013)
5-bp deletion (c.524_528del) Gln175ArgfsTer42 Exon7		Tan et al. (2014)
MCPH4–<i>CASC5</i>		
6125G-A transition Met2041-to-Ile (M2041I) substitution Exon18		Genin et al. (2012)
MCPH5–<i>ASPM</i>		
2-bp deletion (719-720delCT) Premature termination 15 codons downstream Exon3		Bond et al. (2002)
7-bp deletion (1258-1264delTCTCAAG) Premature termination 31 codons downstream Exon3		Bond et al. (2002)
7761 T-G transversion Immediate truncation Exon18		Bond et al. (2002)
1-bp deletion (9159delA) Premature termination four codons downstream Exon21		Bond et al. (2002)
9178C-T transition Gln3060-to-Ter (Q3060X) substitution Exon21		Kumar et al. (2004)
3978G-A transition Trp1326-to-Ter (W1326X) substitution Exon17		Kumar et al. (2004)
349C-T transition Arg117-to-Ter (R117X) substitution –		Kumar et al. (2004)
6189 T-G transversion Tyr2063-to-Ter (Y2063X) substitution Exon18		Shen et al. (2005)
1-bp insertion (4195insA) Premature termination Exon6		Saadi et al. (2009)
2389C-T transition Arg797-to-Ter (R797X) substitution Exon18		Saadi et al. (2009)
2-bp deletion 7781delAG –		Saadi et al. (2009)
MCPH6–<i>CENPJ</i>		
1-bp deletion (17delC) Thr6fsTer3 –		Leal et al. (2003); Bond et al. (2005)
1-bp deletion (c.18delC) Ser7ProfsTer2 Exon 2		Sajid Hussain et al. (2013)
3704A-T transversion Glu1235-to-Val (E1235 V) substitution Exon16		Bond et al. (2005)
4-bp deletion (3243delTCAG) – Exon11		Gul et al. (2006 b)

IVS11-1G-C – Intron11	Al-Dosari et al. (2010)
2462C-T transition Thr821-to-Met (T821M) substitution Exon7	Darvish et al. (2010)
MCPH7-STIL	
3715C-T transition Gln1239-to-Ter (Q1239X) substitution Exon18	Kumar et al. (2009)
1-bp deletion (3655delG) – Exon18	Kumar et al. (2009)
G-to-A transition – Intron16	Kumar et al. (2009)
c.2392 T-G transversion Leu798-to-Trp (L798W) substitution Exon14	Papari et al. (2013)
c.453 + 5G-A transition Asp89GlyfsTer8 Intron5	Kakar et al. (2015)
MCPH8-CEP135	
1-bp deletion (970delC) Gln324SerfsTer2 Exon8	Hussain et al. (2012)
c.1473 + 1G-A transition Glu417GlyfsTer2 Intron11	Farooq et al. (2016)
MCPH9-CEP152	
A-to-C transversion Gln265-to-Pro (Q265P) substitution –	Guernsey et al. (2010)
C-to-T transition Arg987-to-Ter (R987X) substitution –	Guernsey et al. (2010)
MCPH10-ZNF335	
3332G-A transition Arg1111-to-His (R1111H) substitution Exon20	Yang et al. (2012)
MCPH11-PHC1	
c.2974C-T transition Leu992-to-Phe (L992 F) substitution	Awad et al. (2013)
MCPH12-CDK6	
c.589G-A transition Ala197-to-Thr (A197 T) substitution Exon5	Hussain et al. (2013)
MCPH13-CENPE	
c.2797G-A transition Asp933-to-Asn (D933N) substitution –	Mirzaa et al. (2014)
c.4063A-G transition Lys1355-to-Glu (K1355E) substitution	Mirzaa et al. (2014)
MCPH14-SASS6	
c.185 T-C transition Ile62-to-Thr (I62 T) substitution Exon3	Khan et al. (2014)
MCPH15-MFSD2A	
c.476C-T transition Thr159-to-Met (T159M) substitution –	Guemez-Gamboa et al. (2015)
c.497C-T transition Ser166-to-Leu (S166L) substitution Exon 10	Guemez-Gamboa et al. (2015)
c.1016C-T transition Ser339-to-Leu (S339L) substitution –	Alakbarzade et al. (2015)
MCPH16-ANKLE2	
c.2344C-T transition Gln782-to-Ter (Q782X) substitution Exon11	Yamamoto et al. (2014)
c.1717C-G transversion Leu573-to-Val (L573 V) substitution Exon10	
MCPH17-CIT	
c.317G-T transversion Gly106-to-Val (G106 V) substitution Exon4	Li et al. (2016)
c.376A-C transversion Lys126-to-Gln (K126Q) substitution –	Li et al. (2016)
c.689A-T transversion Asp230-to-Val (D230 V) substitution –	Li et al. (2016)
c.1111 + 1G-A transition Gly353_371delinsAla Intron9	Shaheen et al. (2016)
c.29_38delATCCTTTGGA Asn10MetfsTer15 Exon2	Harding et al. (2016)
c.753 + 3A-T Asp221Ter Intron7	Basit et al. (2016)
MCPH18-WDFY3	
c.7909C-T transition Arg2637-to-trp (R2637W) substitution –	Kadir et al. (2016)

*Kaynak [68]: Naveed M, Kazmi S.K, Amin M, Asif Z, Islam U, Shahid K, ve ark. Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). Genet Res (Camb). 2018;100:e7. Table 2’den alıntılanmıştır. [68 numaralı referans]

Genetik ve metabolik bozukluklar, enfeksiyonlar, teratojenler, perinatal ve postnatal yaralanmalar ve bazı sendromlar (örn:Galloway-Mowat Sendromu MIM#: 251300) ikincil mikrosefaliye sebep olabilir [55,56]. Postnatal mikrosefalili çocukların doğumda normal bir baş büyüklüğü vardır, gelişim esnasında beklenen normal baş büyümesi devam etmez ve standartların altında seyreder. Primer ve sekonder mikrosefalinin etiyolojileri benzer olsada oluşum mekanizmaları birbirinden farklıdır[56,65,66]. Nöronların büyük çoğunluğu fetal yaşamın 21. haftasına kadar oluşur, ancak dendritik bağlantı ve miyelin baskın olarak doğumdan sonra oluşmaktadır. Primer mikrosefali bu nedenle nöronların üretiminin azalması nedeniyle oluşurken, sekonder mikrosefali normal/e yakın sayıdaki nöronların dendritik bağlantı ve aktivite düşüklüğünden kaynaklanmaktadır [56,65,66].

Mikrosefali nadir de olsa tek başına izole bir bulgu olarak görülebilir ama bunun yanında eşlik ettiği yüzlerce sendromda tanımlanmıştır. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) veri tabanında belirli bir fenotiple indekslenmiş ve klinik özet bölümünde mikrosefali bulgusunun yer aldığı 1438 girdi vardır [73]. Londra Tıbbi Veritabanına göre ise mikrosefaliyle bildirilmiş olan 800'den fazla sendrom mevcuttur [74]. Klinikte mikrosefalili olgular sadece azalan beyin hacmine bağlı olarak gelişen ZY'ye sahip olarak karşımıza çıkmamaktadır; epilepsi, ataksi, spastisite, nistagmus, motor gerilik gibi son derece heterojen bir fenotip barındırmaktadır. Örneğin, 2014 yılında mikrosefalili 680 çocuğun yer aldığı ve nedensel faktörlerin araştırıldığı bir çalışmada %41 oranındaki olguya etiyolojik tanı verilemediği bildirilmiştir [75]. Öte yandan 2018 yılında gelişen NGS teknikleriyle mikrosefali ilişkili hedef gen panelleri ve WES uygulamaları sayesinde tanı oranının %8,5 arttığı bildirilmiştir [58].

2.2. Nadir Hastalıklara Moleküler Genetik Yaklaşımlar

Bu bölümde tüm genom analiz teknolojilerinden tez kapsamında ağırlıklı olarak yararlanılan tüm genom SNP-array genotipleme ve tüm ekzom dizileme teknikleri tanıtılacaktır.

2.2.1. Tüm Genom Genotiplendirme

Genomdaki değişikliklerin sınıflamasında yapısal varyasyonlar başlığı altında yer alan kopya sayısı çeşitliliği insan genomunun bilinen karmaşıklığını daha da artırmaktadır. CNV'ler referans genomla kıyaslandığında DNA sekansında meydana

gelen kayıp (loss) ya da kazanç (amplification) bölgeleri olarak ifade bulur [76,77]. İnsan genomunda baz çiftlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP) gibi CNV'ler de genetik çeşitliliğe katkıda bulunmaktadır. Nadir CNV'ler bilindiği üzere yalnızca genetik çeşitliliğe değil, gelişim geriliği, otizm spektrum bozukluğu ve nöropsikiyatrik bozukluklar gibi farklı nörogelişimsel hastalıklara da sebep olmaktadır [78]. CNV'ler kalıtsal olabileceği gibi *de novo* olarak da ortaya çıkabilirler [79,80]. Sonraki bölümde sendromik ZY ve ilişkili CNV'ler özelinde deneysel örneklemeler detaylandırılmıştır.

Genom çapında CNV tespitinde kullanılan iki yaygın yöntem, array CGH ve SNP-array teknikleridir. SNP-array tekniğinin avantajı hem genotip versini ifade eden B alel frekansı (BAF) hem de göreceli sinyal yoğunluğunu ifade eden LogR parametresini sunmasıdır [81]. Her SNP alleli için olabilecek 3 kombinasyon (homozigot, heterozigot ve ikinci alel için homozigot) A, T, C ve G baz içeriklerinden bağımsız olarak sadece A ve B aleli cinsinden ifade edilir. Dolayısı ile genotiplenen her SNP'in BAF değeri olarak AA, AB veya BB şeklinde ifadenir. B alel frekansı daima düşük frekanslı alleli belirtir ve bunun A ve B alel toplamına oranı BAF değerini ortaya koyar[81]. Genotip verisinden elde edilen BAF değerleri AA için 0, AB için 0,5, BB için 1'dir. Otozom kromozomlarda bu değerlerden farklı oluşan sapmalar bir kromozomal farklılığın göstergesidir [81]. Ancak analizde SNP'lerin ışıma oranını ifade eden logR oranı da BAF ile birlikte değerlendirilmelidir. Normal gen kopya sayısı (2) için beklenen logR oranı 0'dır, azalan değer genin kopya kaybını, artan değer ise kopya kazancını belirtir [81].

2.2.1.1. Tüm Genom Genotiplendirme Örneklemeleri

CNV'ler hem genetik çeşitlilik hem de nadir ve yaygın görülen insan hastalıklarını tetikleyebilen zararlı lezyonların potansiyel kaynağıdır. Genomumuzdaki CNV'lerin birden fazla genin dozajını etkilediği durumda fenotipe gen kopya sayısı arasındaki ilişkinin yorumlanması güçlüğü doğar. Örneğin, Dauber ve ark tarafından 2013 yılında aCGH tekniğiyle 8q24.3'te üst üste binen mikrolezyonlar koloboma, mikrosefali, gelişme geriliği, kısa boy, kraniyofasiyal, kardiyak ve böbrek defektleri fenotipi 5 bireyde tespit edilmiştir [78]. 78kb'lık bu kayıp *SCRIB*, *NRBP2* ve *PUF60* genlerini içermektedir. Yapılan detaylı çalışmalarla *SCRIB* ve *PUF60*'ın birlikte kaybının bu sendromik fenotipe katkı sağladığı ortaya çıkarılmıştır. Bu veriler, daha

önce genetik bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş iki genin fonksiyonları hakkında bilgi verirken CNV'lerin karmaşık genetik altyapıya katkısını da göstermektedir [78].

Low Copy Repeats (LCR) veya segmental duplikasyon bölgeleri diye de bilinen genom bölgeleri yüksek derecede homoloji gösteren DNA dizilerine sahiptir. 10q22.3-q23.3 bölgelerinde meydana gelen delesyonların LCR3 ve LCR4'te olduğu bununda ZY, dismorfik bulgular, kardiyak defektleri, serebellar anomaliler ve makrosefaliyle ilişkili olduğu bilinmektedir. 10q22.3-q23.3 delesyon bozukluğu nadir hastalıktır, bugüne kadar tanımlı sadece 13 hasta vardır. HumanOmni1-Quad Chip (Illumina, Inc.) ile Tang ve arkadaşları 10. Kromozomun uzun kolunda sözü edilen spesifik bölgede *BMPRI1A* ve *NGR3* genlerini içeren 8,2Mb'lık *de novo* duplikasyonun konjenital anomalilerle birlikte, mikrosefali, kardiyak defektleri ve orta şiddetli ZY ile ilişkili olduğunu tanımlamıştır [82].

İlginç olan diğer bir çalışmada, 16p13.3'te intersitisyel duplikasyonlara sahip olan 25 bireyin genotip-fenotip incelemesiyle sadece *CREBBP* geninin içerildiği bölge Rubinstein-Taybi sendromu için kritik bir bölge olarak tanımlanmıştır. 2013 yılına kadar bu sendrom için değişken veya eksik penetran fenotip rapor edilmemiştir. Ancak Li ve ark. [83] tarafından 5 yaşında bir erkek çocuğu ZY, orta derece atrogripozis (bükük eklem) ve karakteristik yüz bozukluklarıyla birlikte gelişim geriliği, geniş başparmaklar, mikrosefali ve yapısal beyin MRG anormallikleriyle bildirilmiştir. Sözü edilen bu tipik fenotipin sorumlusu 16p13.3'te yer alan 1,5Mb'lık *de novo* intersitisyel duplikasyonu SNP-array yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu rapor Asya toplumunda bildirilen ikinci 16p13.3 duplikasyon vakasını tanıtarak fenotipin değişkenliğini vurgulamakla birlikte sendromun bilinen fenotipik spektrumunu da genişletmektedir [83].

Infinium BeadChip SNP-array (Illumina, Inc.) çipiyle ise 4 nesil bir ailenin 10 kişisi 2,5 milyon SNP'le genotiplendirilmiştir. Tüm genom genotipleme veri analizi, etkilenen beş erkek bireyde, X-kromozomu üzerinde 3.95 Mb'lık tek bir kopya kazancı olduğunu belirlemiştir. Bu CNV sağlıklı anneden kalıtılmıştır. Etkilenen 5 kişide orta ile şiddetli ZY, nöbet ve davranışsal anormallikler göstermektedir. X'e bağlı ZY, erkeklerde en sık görülen nörolojik hastalık şeklidir ve popülasyonda görülme oranı %5-10 civarındadır [84].

2.2.2. Tüm Ekzom Dizileme

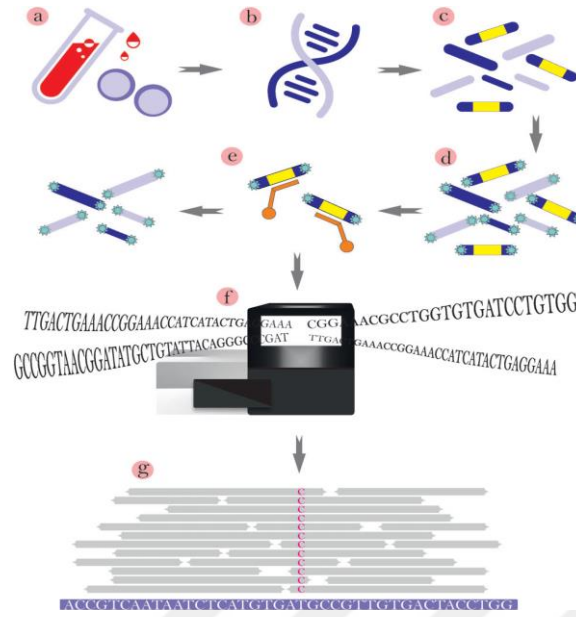
NGS teknolojisi tüm genom dizileme, tüm ekzom dizileme, tekli/çoklu gen panel dizileme ve transkriptom dizilemeyi de içeren, aynı bölgenin birden fazla kez dizilenmesine imkan veren güncel derin dizileme metodudur [85]. Tüm ekzom dizileme yöntemi yaklaşık 30 milyon baz [3×10^7 , (30Mb)] çifte karşılık gelen insan genomunun sadece %1-1,5'unun (kodlayan bölgelerinin) dizilenmesine imkan sunsada, özellikle Mendel kalıtımı sergileyen hastalıklarda hastalık nedeni mutasyonların veya hastalığa-yatkınlık mutasyonlarının ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılan son derece güçlü bir NGS yöntemidir [86]. WES ile genomdaki yaklaşık 20.000 gene ait bütün ekzonlar, ekzon-intron sınırları ve/veya kodlanmayan bölgeler (*untranslated regions*;UTRs) dizilenir. Bu seçilen ticari ekzom yakalama (exome capture) kitinin özelliğine göre değişir. WES günümüzde, yüksek verimlilik ve doğruluk ile Mendel kalıtımı gösteren nadir veya kompleks hastalıklarda özellikle küçük çaptaki baz değişimlerinin (tek nokta değişiklikleri, küçük insersiyon ve/veya delesyonlar) belirlenmesinde kullanılan etkin bir tekniktir [87]. Bu teknik aynı zamanda anne, baba, çocuk üçlülerinde *de novo* varyasyonların tespiti, hasta kardeş çiftlerinde ortak varyasyonların filtrelenmesi gibi aile tabanlı çalışmalar için de uygundur[88,89]. WES tekniği kütüphane hazırlanması, bu kütüphanenin dizilenmesi, dizileme verisinin işlenmesi (hizalama, varyant çağırma ve anotasyon) ve çeşitli filtreleme seçenekleri ile varyant önceliklendirme gibi temel basamaklardan oluşur [88-90]. Aşağıda ayrıntılı olarak bu aşamalar detaylandırılacaktır.

WES tekniğinin ilk deneysel adımı yüksek kaliteli genomik DNA'nın elde edilmesidir (Şekil 2-2) [91]. Bu aşamayı kütüphane hazırlığı ve ekzom zenginleştirme basamakları takip eder. Bu işlemlerde günümüzde yaygın olarak kullanılan Agilent, Nimblegen, Illumina gibi firmaların ticari ekzom yakalama kitleridir. Bu kitler kullanılan DNA miktarları, genomda hedeflenen ekzon sayısı, kullanılan prob sayısı, DNA fragmentasyon metodu gibi farklılıklar içersede deneysel aşamalar genelde şu 4 prensip temelinde benzer şekilde uygulanmaktadır: DNA parçalanması, adaptör molekül bağlanması, hedef bölge zenginleştirme ve dizileme [85-91].

DNA mekanik olarak ultrasonik veya biyolojik olarak enzimatik parçalama metoduyla rastgele parçalara ayrılır (Şekil 2-2) [91]. Elde edilen fragmanların ucuna dizileme esnasında kullanılmak üzere adaptör oligonükleotitler ligasyon ile eklenir ve

kütüphane hazırlanmış olunur (**library preparation**) [85-91]. Ardından hedef bölgelerin yakalanması (**exome capture**) aşaması günümüzde çoğunlukla prob-yakalama tekniği ile gerçekleştirilir [85-91]. Bu teknikte solüsyon içerisindeki fragmanlar kendilerine özgü üretilmiş olan ve manyetik boncuklara bağlanma özelliğindeki proplar ile hibridize edilir [85-91]. Manyetik yakalama tekniği ile de bu proplar ve hibridize olmuş hedefli fragmanlar ile hedef zenginleştirilir (**target enrichment**) [85-91]. Böylece ilk başta hazırlanan kütüphaneden sadece hedefli ekzonlar yakalanmış olunur. Daha sonra adaptörler vasıtası ile hedef fragmanlar dizilenir. Tekniğin en önemli özelliği, tek seferde tüm ekzonik bölgelerin birden fazla kez dizilenmesine olanak vermesidir. Ancak her ekzonun aynı verimde dizilenememesi yöntemin en zayıf özelliğidir [89]. Tekniğin dizileme aşaması milyonlarca kısa DNA okuması yapabilen Life Technologies SOLID, Illumina Hi-Seq, Pacific Bioscience's RS gibi çok çeşitli ticari platformlarda yapılabilir [85-91]. WES tekniği Şekil 2-2'de özet olarak gösterilmiştir [91].

DeneySEL aşamaların sonunda dizileme cihazından elde edilen ham ekzom verilerinin (base call files;BCL files) hastalıkla ilişkili varyant analizi öncesi işlenerek analiz edilebilecek duruma getirilmesi gerekmektedir. Bu aşamalar uzmanlaşmış biyoinformatik ve istatistiksel yaklaşımları gerektirir [85-91]. Ham verilerin işlenmesi hizalama (**alignment**), varyant çağırma (**variant calling**) ve anotasyon/anlamlandırma (**annotation**) aşamalarını içerir [85-91]. Her bir aşama için farklı algoritmalar geliştirilmiştir ve bu algoritmaların farklı kombinasyonlarda kullanılması ile çeşitli analiz iş akışları (**pipeline**) oluşturulabilmektedir [85-91]. Günümüzde bu iş akışlarına veriden öğrenen yapay zeka uygulamaları da eşlik etmektedir.



Şekil 2-2: Tüm ekzom dizileme tekniğinin deneysel aşamalarının gösterimi.

Kaynak [91]: Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. Brief Funct Genomics 2016 Sep;15(5):374-84.

Dizileme cihazından elde edilen ham data (BCL files), düzinelerce veya yüzlerce baz çifti arasında değişen kısa okumaların (DNA fragmanları) nükleotid baz çağrılarını FASTQ dosyası biçiminde işlenir. Bu format yaygın şekilde NGS ham verileri için standart dosya formatı olarak kabul edilmektedir ve sekans kalitesinin değerlendirmesini kolaylaştırmak için Phred-ölçekli baz kalite puanlarını içerecek şekilde geliştirilmiştir. Ham verilerin kalitesini değerlendirmek için FastQC, FastQ Screen, FASTX-ToolKit, NGS QC Toolkit, PRINSEQ, QC-Chain gibi çeşitli araçlar geliştirilmiştir [88]. Baz kalitesi skor dağılımı, sekans kalitesi skor dağılımı, okuma başına düşen ortalama baz içeriği, okumalardaki GC dağılımı, okuma uzunluğu dağılımı gibi parametrelerin kalite değerlendirmesinden geçen ham veriler, bir sonraki basamakta “alignment” yani hizalamaya tabi tutulur [88].

Hizalama, kısa DNA okumalarının her birinin insan genomundaki referans pozisyonlarına eşlenmesidir. Bu basamak son derece kritiktir çünkü kısa okumaların referans genoma hizalanması aşamasında herhangi bir hata analizin geri kalanına taşınacaktır. Hizalama için ticari olarak temin edilebilen veya ücretsiz olarak kullanılabilen çeşitli yazılım programları mevcuttur, bunlardan birkaçı Bowtie / Bowtie2 [92, 93], BWA [94,95] MAQ [96], Novoalign ve SOAP [97] programlarıdır.

Bu adımda ortaya çıkan hizalanmış sekans, sekans hizalaması / harita (SAM) veya ikili hizalama / harita (BAM) dosyasında (Li ve diğerleri, 2009a) saklanır. SAM dosyaları genellikle dosyayı 3-4 kez azaltan binary-SAM (BAM) biçiminde sıkıştırılır. BAM formatı, hizalanmış okumalar için standart bir formattır [98].

Bir sonraki basamak olan varyant çağırma aşamasında doğru ve güvenilir varyantların elde edilmesine imkan sunabilmek için hizalanan verinin 3 basamakta değerlendirilmesi gerekir. Öncelikle Picard MarkDuplicates ve SAMtools gibi programlar kullanılarak duplike okumalar işaretlenerek datadan çıkarılır [98,99]. Çünkü kısa okumalardaki değişken GC içeriği nedeniyle kütüphane hazırlığı aşamasında, bazen aynı genomik bölge birden fazla çoğaltılabilir neticede istenmeyen PZR-duplikeleri oluşabilir. Oluşan bu duplikelerin analizler sırasında yanlış-pozitif varyant tespitine yol açmaması için mutlaka hizalanmış veri datasından çıkarılması gerekmektedir. Ardından, GATK (Genome Analysis Toolkit) IndelRealigner programı kullanılarak polimorfizmlerin yaygın bir formu olan indels varyantlar referans genoma yeniden hizalanır [100]. Üçüncü basamakta, varyant çağırma doğruluğunu arttırmak amacıyla GATK BaseCalibrator ile her bir baz için baz kalite skorları yeniden kalibre edilir. Bu basamak için Bioconductor package ReQON [101] veya NGSUtils suite [102] programı kullanılabilir. Böylece doğruluğu kontrol edilmiş ham datada varyant çağırma aşamasına geçilir.

Varyant çağırma, hizalanan nükleotid dizilerinin referans diziyle karşılaştırılarak değişken bölge/lerin saptandığı başka bir biyoinformatik aşamadır. Bu bölgelerin pozisyonları *variant calling format* (VCF) uzantılı bir dosyaya kaydedilir [103]. Günümüzde yaygın olarak kullanılan varyant çağırma programları arasında SAMtools [98], FreeBayes, GATK [100] ve Atlas2 [104] bulunmaktadır. GATK, UnifiedGenotyper ve HaplotypeCaller [100] adlı iki ana varyant çağırma programı içerir; varyant çağırma, SNP filtreleme ve kalite yeniden kalibrasyonu için MapReduce [105] fonksiyonel programlama tekniğinden yararlanır. Varyant çağırma aşamasında en yüksek kaliteyi GATK programı sunmaktadır [100].

Analiz aşamasına geçmeden önce varyant çağırma ile tespit edilen varyantlara ait [kromozom, genomik lokasyon, gen sembolü, ekzonik işlev, transkript ve protein pozisyonu bilgisi, bilinen varyant ise “rs” kodu, amino asit değişimi, minor allel frekansı, olası patojenite tahmini ve varyantın (biliniyorsa) tespit edildiği genin

ilişkilendirildiği hastalık/fenotip gibi çeşitli] ek özellikler varyant listesine eklenmelidir. ANNOVAR [106], GATK VariantAnnotator [100] ve SnpEff [108] gibi çeşitli anotasyon programlarından biriyle ekzom datasında tespit edilen varyantların fonksiyonel adlandırılması (anotasyon) gerçekleştirilir. Elde edilen .csv uzantılı data hastalık sebebi mutasyonun tespiti için artık analiz edilebilecek durumdadır.

2.2.2.1. Tüm Ekzom Dizileme Örneklemeleri

WES geleneksel dizileme yöntemleriyle (Sanger dizileme) kıyaslandığında hem maliyet-etkin hem de küçük aileler veya tek sporadik olguyla hastalık ilişkili nedensel varyantın tanımlanmasını mümkün kılan bir tekniktir [108]. Çocukluk çağı nörogelişimsel bozukluklarda, WES öncesinde, kromozomal mikroarray testi ve spesifik-hastalık ilişkili gen panel testleri gibi uygulanan ilk kademe genetik testlerle tanı oranı %25 iken, WES uygulamalarıyla bu oran %48'lere ulaşmıştır [109-111]. Ayrıca, başka bir çalışmada WES'in tanı oranı benzer şekilde %41 olarak açıklanmıştır [110]. Son yıllarda WES özellikle yüksek derecede genotip ve fenotip heterojenite gösteren hastalıklarda moleküler genetik sebeplerin tespitiyle doğru, güvenilir ve hızlı tanı için en sık başvuru teknikleri [109-111].

Son derece heterojen altyapıya sahip olan mikrosefalinin tanısal çalışması kapsamlıdır; beyin görüntüleme, metabolik ve oftalmolojik değerlendirmeler, cilt veya kas biyopsileri, karyotipleme veya mikroarray analizi ve bilinen mikrosefali genlerinin mutasyon analizlerini içerir. Sanger dizilemeyle aday gen testi gibi hedefli dizilemelerin kullanımı oldukça sınırlıdır ve teşhis verimleri genellikle düşüktür. Buna karşılık, WES, hastalıktan sorumlu gen veya genler hakkında önceden bir bilgi gerektirmeden analizi mümkün kıldığından [112], mikrosefali gibi nadir nörogelişimsel bozukluk için yeni genetik nedenlerin tespitinde en etkili teknik olarak kabul edilmektedir [86,113].

Bugüne kadar bazılarının yalnızca birkaç ailede veya belirli etnik gruplarda tespit edildiği 600'den fazla farklı gen mikrosefali ile ilişkili olarak tanımlanmıştır [114]. Bir örnek, 19q13.33 kromozomunda *PNKP* genidir [OMIM # 605610]. Protein ürünü, bir DNA onarım enzimi olan *PNKP* geni 2010'dan bu yana mikrosefali, nöbetler ve gelişim geriliğiyle seyreden nadir bir sendromik nörogelişimsel bozukluktan (MCSZ) (OMIM # 613402) sorumlu olarak bildirilmiştir. Bugüne kadar bu genle ilişkili olarak dünya genelinde 10 aile kaydedilmiştir [115,116]. Yapılan çalışmalarla, olgulardaki nörogelişimsel semptomlarla ilişkili olarak ilaç tarafından kontrol edilen nöbetler,

destekli yürüme, şiddetli ilerleyici serebellar atrofi, şiddetli tonik-klonik kasılmalar ve şiddetli mikrosefaliden orta şiddetli mikrosefaliye kadar değişen fenotipik çeşitliliğin altı çizilmiştir. Güncel bir yayınla İran kökenli geniş bir ailede yine aynı gende 3 nesil boyunca kalıtılan *novel* homozigot yanlış anlamlı mutasyonun 378. lizin amino asitinin triyonin'e dönüşümüne sebep olduğu 1 hastada WES tekniğiyle tespit edilmiştir. Diğer 5 hasta ve sağlıklı aile bireylerinin Sanger dizilemesiyle sözü edilen patojenik değişim yine hastalarda konfirme edilmiştir. Böylece WES aracılığıyla ortaya çıkarılan aday varyant sayesinde ailedeki tüm vakalar MCSZ sendromu tanısını alabilmiştir [116].

Dastan ve arkadaşları WES yöntemini patojenik 16p11.2 duplikasyonunu sağlıklı anneden kalıttığı bilinen olgunun geniş bir nörogelişimsel bozukluk spektruma sahip olarak sergilediği klinik çeşitliliği açıklayabilecek genomik değişiklikleri aramak için kullanmıştır [117]. Analiz sonucunda vakada birleşik heterozigot kalıtıma sahip iki farklı yeni kırılma bölgesi mutasyonu *VPS13B* (8q22.2) geninde tespit edilmiştir. Sanger dizilemeyle de bu varyantların ebeveynlerden kalıtıldığı gösterilmiştir. *VPS13B* mutasyonları probandın fenotipiyle (zihinsel yetmezlik, mikrosefali, retina distrofisi, eklem hiper mobilitesi ve nötropeniyle) uyum gösteren Cohen Sendromuna neden olmaktadır. Bu çalışma ailesel dup16p11.2 patojenik CNV değişimine sahip olan sağlıklı anne ve Cohen Sendromlu çocukta, WES tekniği temeliyle ailedeki klinik farklılıktan sorumlu gen mutasyonlarının ortaya çıkarılmasını sağlayan ilk rapordur [117].

2014 yılında ebeveynleri arasında akrabalık bulunan iki bağımsız ailede iki bağımsız hasta bireyde *CRIP1* gen mutasyonları (insersiyon ve delesyon mutasyonları) ilk kez kısa boy, mikrosefali ve çeşitli yüz bulgularıyla tanımlı otozomal resesif kalıtıma sahip SSMCF (MIM# 615789) fenotipinden sorumlu olarak raporlanmıştır [118]. Bu iki birey 2017 yılına kadar bu fenotipi sergileyen ve bilinen tek iki vakadır. Leduc ve ark. tarafından WES ve CNV analiziyle her biri bir ebeveyninden kalıtılmış olan birleşik heterozigot varyantlara sahip üçüncü hasta ise postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, dismorfik özellikler, oftalmolojik ve pigmentasyon anormallikleri ve iki taraflı ayak parmaklarında (4-5) sindaktili bulgularıyla bildirilmiştir [119]. Bu hasta *CRIP1* geninin 1. ekzonunda annesinden kalıttığı c.8G>A yanlış anlamlı mutasyona ve babasından kalıttığı 1,331bp delesyon mutasyonuna sahiptir. Bu çalışma tanı almamış hastalar için yapılan WES'in özellikle ekzon-spesifik CNV analiziyle birlikte değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır [119].

Başka bir WES çalışmasında ise ilk kez SASS6 geninde homozigot c:185C>T değişimi Pakistan kökenli akrabalık öyküsüne sahip ailede MCPH'ya sebep olarak bildirilmiştir. Bu homozigot mutasyonun prosentriol oluşumunu bozduğu ve böylelikle anormal nöronal hücre bölünmesine ve mikrosefaliye sebep olduğu kanıtlanmıştır [120]. Bu tarihten sonra bu gen ve MCPH ilişkisiyle bildirilmiş başka bir rapor yoktur. Ancak, 2019 yılında abort edilen fetüsün deri materyalinden elde edilen genomik DNA'ya uygulanan trio-WES tekniğiyle bu kez birleşik heterozigot mutasyonların MCPH'ye sebep olduğu bildirilmiştir [121]. Tüm bu çalışmalar mutasyon spektrumlarının genişlemesi ve yeni genlerin keşfine imkan sunup, mikrosefali patogenezi ve moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

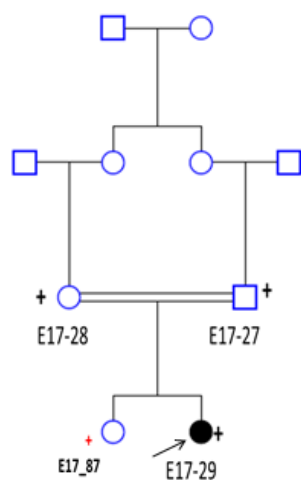
3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Bireyler

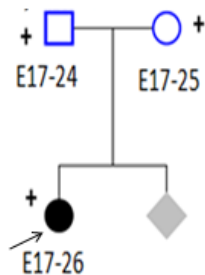
Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.11.2016 tarihli 1331 sayılı ve 2016/1231 dosya numaralı yazısı çerçevesinde yapılmıştır. Bu çalışmaya ebeveynleri akraba evliliği ve/veya aynı yöreden evlilik gerçekleştirmiş olan ve mikrosefali bulgusunun eşlik ettiği zihinsel öğrenme yetersizliği tanılı hastaya sahip, toplam 10 aile Türkiye Spastik Çocuklar Vakfı'ndan ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'ndan davet edilmiştir. Ancak, bir ailedeki olgunun (E17_37, Tablo 4-1 bakınız) doğuma bağlı bir sendrom sebebiyle mikrosefali geliştirmiş olma ihtimali ve primer mikrosefaliye sahip olmama durumu klinisyen tarafından değerlendirilerek çalışmadan çıkarılmıştır. Bu tez çalışmasında toplam 9 aile çalışılmıştır (Tablo 4-1).

Olgularla birlikte diğer sağlıklı aile üyeleri de klinik olarak detaylı incelenmiştir. Aileler çalışmaya kendi rızaları ile katılmak istediklerini imzalı onam formları ile beyan ettikten sonra periferik kan örnekleri EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) muhteviyatlı kan tüplerine alınmıştır. Örnekler, bekletilmeden (izolasyon yapıncaya kadar +4°C'ta muhafaza edilmiş) aynı gün içerisinde DNA izolasyon işlemine tabi tutulmuştur. DNA örneklerine kendi oluşturduğumuz kayıt dizin sırasına göre rastgele kodlar verilmiş, izolasyon sonrası 2 kopya örnek -20°C ve -80°C dondurucularda muhafaza edilmiştir. Ayrıca çalışma boyunca elde edilen sonuçlar şifre korumalı bilgisayarlarda saklanmıştır.

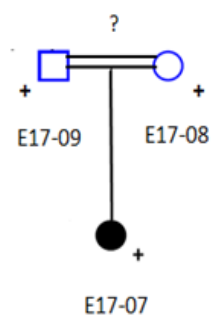
Çalışmaya dahil edilen 8 hastanın karyotip analiz sonucu normal olarak tarafımıza bildirilmiştir. Bir hastanın (E17_23) ise aCGH raporu ile 21. kromozom açısından trizomik olduğu bildirilmiştir. Her aile için ayrıntılı pedigrî HaploPainter V.1.0403 programı ile elde edilmiştir (Tablo 3-1). Çalışmadaki hastalarda primer mikrosefali ve zihinsel öğrenme yetersizliği ortak klinik tanıdır. Bunun yanında dirençli epilepsi, destekli yürüme, spastisite, gelişim geriliği, ataksi gibi birbirinden farklı bulgularında ortak fenotipe eşlik edebildiği bu hastalar son derece heterojen klinik fenotipe sahiptir.



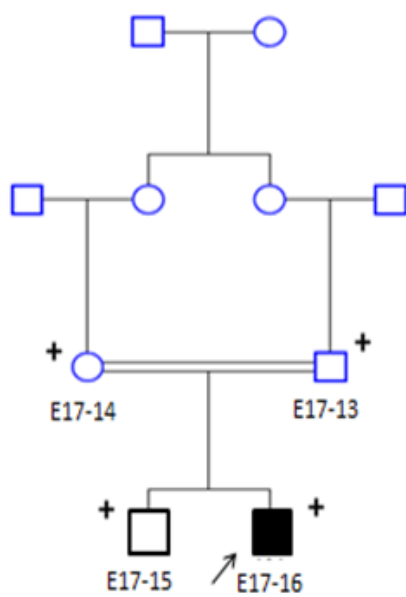
M1 ailesi



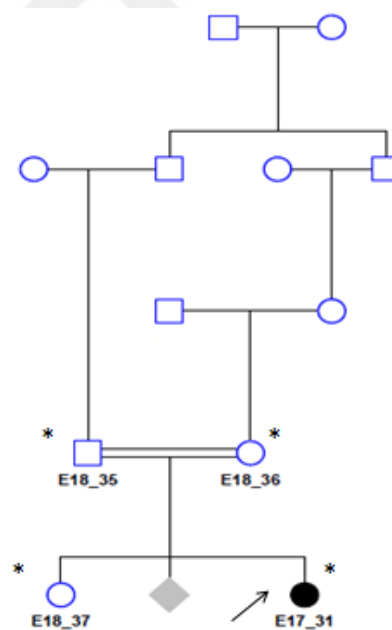
M2 ailesi



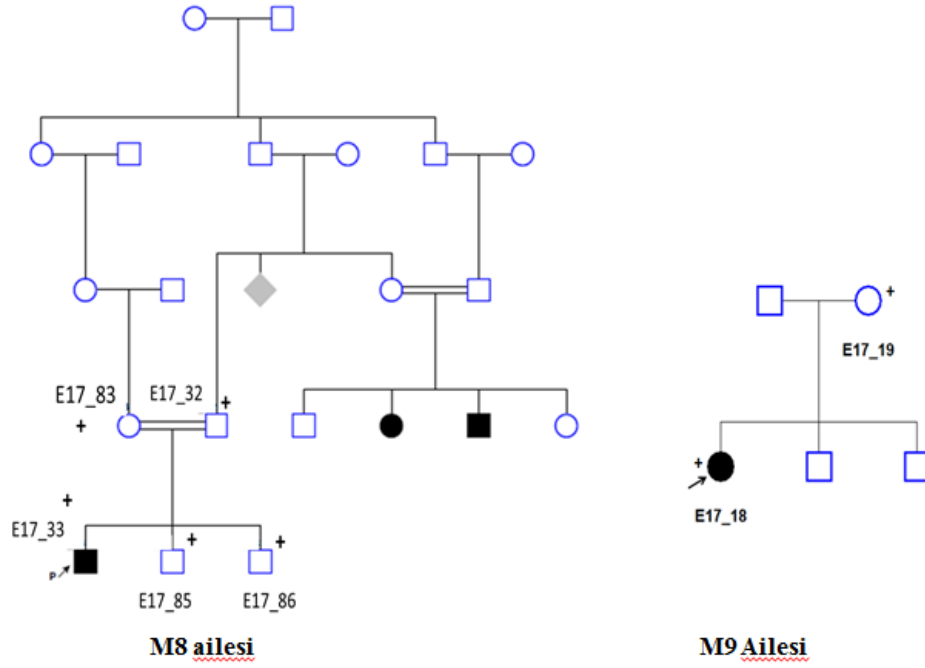
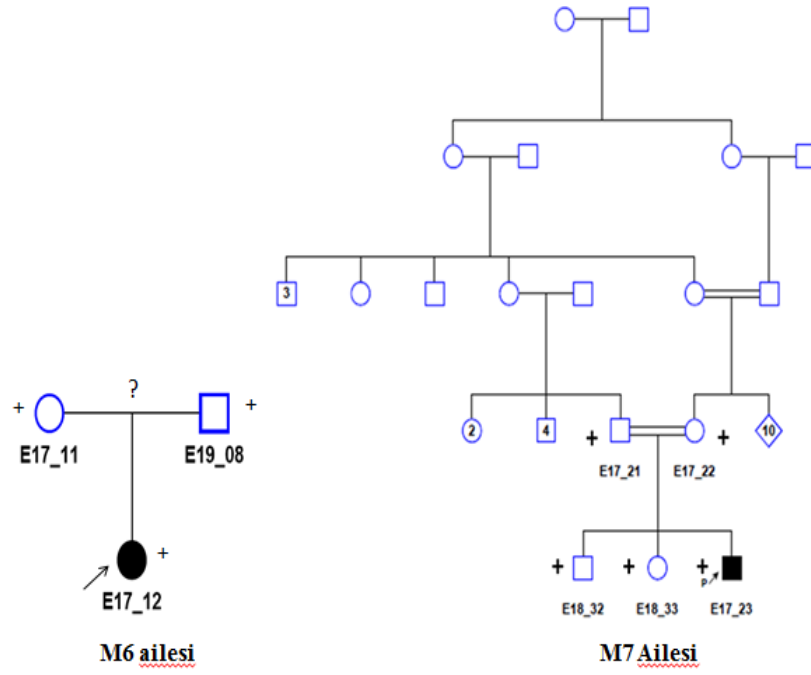
M3 ailesi



M4 ailesi



M5 ailesi



Şekil 3-1: Tez kapsamında çalışılmış tüm ailelerin HaploPainter programından elde edilmiş detaylı aile ağaçları.

+ işaretli bireylerin kan örneklerinden elde edilmiş gDNA'ları mevcuttur. * İşaretli bireylerin gDNA örnekleri mevcuttur.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3-1’de özetlenmektedir.

Tablo 3-1. Çalışmada Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Ticari Firma/Menşei Ülke
C ₂ H ₅ OH (etil alkol, EtOH %100)	Merck, Almanya
2X DreamTaq Green Buffer (20mM MgCl ₂)	Thermo Scientific, Amerika
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma, Almanya
Betain (5M)	Promega, Amerika
Tris	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Agaroz	Invitrogen, İsviçre
50bp-DNA ladder	Biotechrabbit, Almanya
Etidyum bromür	Sigma, Almanya

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Çalışma kapsamında yararlanılan kitler menşei ülke ve firma adı olarak Tablo 3-2’de özetlenmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan Kitler ve Ticari firma bilgileri

Kimyasal Madde	Ticari Firma/Menşei Ülke
QIAamp Blood Maxi Kit	Qiagen, Amerika
Invitrogen PurelinkGenomic DNA Mini Kit	Thermoscientific, Amerika
SureSelect V6 WES kiti	Agilent Technologies, Amerika
HumanOmniExpress-24 v1.1	Illumina, South Korea

3.1.4. Çalışmada Yararlanılan Ekipmanlar

Çalışmada çeşitli aşamalarda kullanılan tüm cihazlara ait bilgiler Tablo 3-3’te özetlenmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar ve Bilgileri.

Cihazın İsmi	Firma ismi
Steril Kabin	Thermo Scientific, HERA (51022515)
Jel görüntüleme düzeneği	UVP Imaging System
Spektrofotometre	NanoDrop ND-2000/Thermoscientific
Bilgisayarlar	HP(W2072A),NOC(207LM00001),LG 22MP57HQ-P
Derin dondurucular	Sanyo Labcool +4°C, Uğur Soğutma Makinaları Sanayi LTd. Tic. A.S. (UFR 370 GD)
Inkübator	Hibrigene Techne
Santrifüjler	Eppendorf Centrifuge (5415C), Labofuge, Thermo Scientific Megafuge 40R
Vorteks	Yellowline (TTS2) , Biosan Vortex V-1 Plus
Jel Screen Sistemi	UVP Imaging System
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf, Gilson
Etüv	Techne Hybrigen
PZR cihazı	Biorad Thermal Cyclers T100
Hassas terazi	Shimadzu
Distile su cihazı	Millipore
Güç kaynağı	Stratagene

3.1.5. Çalışmada Yararlanılan Çeşitli Veritabanları ve Analiz Programları

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT): İnsan genomundaki amino asit değişiminin, dizi homolojisine ve amino asitlerin fiziksel özelliklerine dayanarak protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin eder.

Polymorphism Phenotyping v2 (Polyhen2): Varyasyonlardan kaynaklanan amino asit değişimlerini, fiziksel ve evrimsel özelliklerine göre karşılaştırarak insan protein yapısı ve fonksiyonu üzerindeki olası etkisini öngören bir yazılım aracıdır.

MutationTaster: DNA dizisinde meydana gelen amino asit, kısa insersiyon ve / veya delesyon (indel) mutasyonlarının, yanlış anlamlı, sinonim ve intronik değişikliklerin patojenik potansiyelini değerlendiren biyoinformatik uygulamadır.

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): Bilinen tüm Mendeliyen hastalıkların ve 15.000'den fazla insan geni hakkında kapsamlı fenotip-genotip ilişkisi detaylandıran ve ücretsiz olarak ulaşılabilen veritabanıdır.

Primer 3: Varsayılan program özellikleriyle DNA'nın özgül bölgesindeki değişiklikleri tespit edebilmek için primer tasarlamada yararlanılan yazılımdır.

Ensembl: Pekçok omurgalı türüne ait genomik bilgiyi içeren, Variant Effector Prediction (VEP) aracı ile DNA dizisindeki değişiklikleri değerlendiren, bu değişikliklere ait populasyon genetiği bilgilerini sunan günümüzdeki en kapsamlı ve güncel genomik veritabanıdır.

UCSC: *In silico* PCR ve UCSC-Blat araçlarıyla primer tasarımında yararlandığımız insan ve pekçok farklı organizmaya ait genom bilgilerini içeren sık sık güncellenen güvenilir veritabanıdır.

The Universal Protein Resource (Uniprot): Protein sekansı ve fonksiyonları hakkında kapsamlı bilgi veren kaynaktır. Aday varyantın protein dizisinde hangi domain veya bölgeye denk düştüğünün belirlenmesinde yararlanır.

gnomAD: Genom Toplama Veri Tabanı çok sayıda büyük ölçekli dizileme projesinden hem ekzom hem de genom dizileme verilerini toplayıp harmanlayarak varyantların allel frekans gibi özelliklerini özet veriler halinde kullanıma sunmak amacıyla uluslararası araştırmacılar koalisyonu tarafından geliştirilen bir kaynaktır.

ExAC: Exome Aggregation Consortium (ExAC), çok çeşitli büyük ölçekli dizileme projelerinden ekzome dizileme verilerini toplayarak, bilimsel topluluklar için özet veriler şeklinde bilgileri araştırmacıların kullanımına sunan veritabanıdır.

Mutalyzer: İnsan Genom Varyasyon Topluluğunun belirlediği kurallara göre DNA dizisindeki değişimin position converter aracıyla transkript, cDNA ve kromozomal pozisyonunu ayrıca Namechecker ile varyasyonun dizideki doğru yerini kontrol etmemizi sağlayan sürekli güncellenen veri tabanıdır.

dbSNP: İnsan genomundaki SNP'lerin bilinen veya bilinmeyen olarak tespitine imkan veren SNP veri tabanıdır. Kromozomal pozisyon, değişimin tipi, sıklık, klinik önemi, varsa ilişkili yayınlar hakkında bilgi verir.

NCBI: Genom referans dizisi, DNA, RNA, protein domain ve yapı, genler ve ekspresyonu, dizi homolojisi, sekans analizi, taksonomi gibi insan genetiğiyle ilgili pekçok bilgiyi içeren güncellenen bir veri tabanıdır.

Analiz Arayüzleri:

GenomeStudio:İllumina SNP-array çipinin tanıtıldığı ve CNV analizinde GT genotyping modülüyle txt uzantılı dosya yaratmada kullanılan programdır.

CNV Partition: Genome Studio programının uzantısı olan ve CNV bölgelerinin tespitinde kullanılan bir araçtır.

Integrative Genomics Viewer (IGV): Ham ekzom verilerine ait değişimleri BAM dosyasından referans diziye hizalı şekilde gösteren, okunma sayısı ve değişimin çevresindeki baz ve amino asit dizisini de gösterebilen programdır.

CLC Main Wokbench 12.0.3: Sanger dizileme verilerinin ab1. formatındaki dosyalar kullanarak referans diziye hizalayan ve varyantı analiz etmemizi sağlayan programdır.

HaploPainter: Cinsiyet, Hasta ya da sağlıklı ve akrabalık bilgileri girilerek aile ağacı çiziminde kullanılan program.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan kan örnekleri, ebeveynlerden 7-10 ml, indeks ve sağlıklı kardeşlerden 3-5ml, 2 yaş veya daha küçük yaştaki sağlıklı kardeşlerden ise 2ml olacak şekilde EDTA muhteviyatı bulunan steril tüplere alınmıştır. Kan örneklerinin hacimleri göz önünde bulundurularak Qiagen firmasının QIAamp DNA Blood Maxi kiti veya Thermofisher firmasının Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kiti kullanılarak gDNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. QIAamp DNA Blood Maxi kit ile izolasyon

İlk olarak, serum ve plazma fazlarını homojenize edebilmek ve örnekleri oda sıcaklığına (15–25°C) dengelemek için örnekler makaralı-silindir-karıştırıcıda maksimum 2-3 dk. bırakılmıştır. Ardından aşağıdaki işlem basamakları takip edilmiştir.

1-500µl Proteinaz K enzimi 50ml’lik falkon tüpe pipetlenir, üzerine kan örneği ilave edilir ve tüp hafifçe çalkalanır. Sonraki işlem basamakları, periferik kan hacmine göre değişkenlik gösterir; 3-5ml veya 5-10ml kan hacmine göre uygun olan protokol takip edilerek uygulanır.

2- Falconların üzerine, 3-5ml kan örneği için 6ml, 5-10ml kan örneği için 12ml AL buffer eklenir. 15 kez ters çevrilerek karıştırılan örnekler 1dk süresince yoğun şekilde çalkalanır.

3-70°C’de 10dk. boyunca inkübasyona bırakılır.

4-Ardından 3-5ml’lik örnek için 5ml, 5-10ml’lik örnek için ise 10ml %99 saflıkta Etilalkol (EtOH) ilave edilir. Tüpler, alt-üst çevrilerek 10 kez karıştırılır ve bir süre kuvvetli bir şekilde çalkalanır.

5-3-5ml’lik örnek kullanıldıysa çözeltinin tamamı, 5-10ml’lik örnek kullanıldıysa solüsyonun yarısı QIAamp filtreli tüpe transfer edilir ve 3000rpm’de 3dk boyunca santrifüj edilir. Dibe çöken karışım uzaklaştırılır.

6-5-10ml’lik örnek tüpünde kalan çözeltinin diğer yarısı tüpe aktarılır, 3000rpm’de 3dk boyunca santrifüj edilir ve çöken karışım yine atılır. 3-5ml’lik kan örneği için bu işlem basamağının tekrarlanmasına gerek kalmaz.

- Bu aşamadan sonra protokolün işlem basamakları 3-5ml veya 5-10ml ‘lik örnekler için aynıdır.

7-Filtreli tüplerin üzerine 5ml AW1 Buffer eklenir ve 4700rpm’de 2dk. boyunca santrifüj edilir. Dipteki filtrat uzaklaştırılır.

8-Filtrenin üzerine 5ml AW2 buffer eklenir, 4700rpm’de 17 dk boyunca santrifüj edilir. Filtrat yine uzaklaştırılır.

9-Filtreli tüpün filtresi temiz bir tüpe aktarılır ve filtrenin üzerine dikkatli bir şekilde 1000µl Buffer AE eklenir. Oda sıcaklığında 5dk. inkübasyona bırakılır, 4700rpm’de 3 dk santrifüj edilir.

10-Elde edilen gDNA’nın 2 kopyasından biri A stoğu (500µl) -20°C’de ve diğeri B stoğu (500µl) -80°C’de muhafaza edilir.

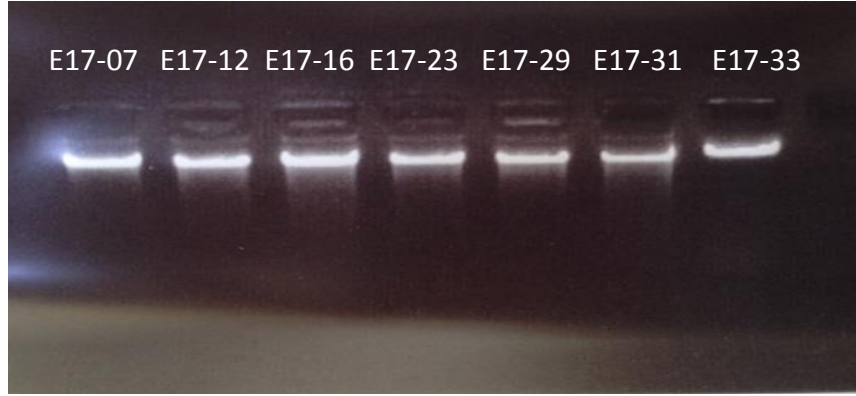
3.2.1.2. Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit ile İzolasyon

Bu çalışmada, yalnızca 2 sağlıklı kardeşten 2ml. periferik kan örneği alınmış ve bu örnekler başlıkta adı belirtilen kit ile DNA izolasyonuna tabi tutulmuştur. İşlem basamakları aşağıdaki gibi sıralandığı şekliyle uygulanmıştır.

- 1-200µl periferik kan örneği steril ependorf tüpüne alınır ve üzerine 20µl. Proteinaz K ilave edilir.
- 2- 20µl RNase A eklenir, kısa bir vorteks işlemi uygulandıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona tabi tutulur.
- 3- İnkübasyondan sonra 200µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklenir ve 3-4sn vortekslenir.
- 4- 55°C’de 10dk inkübe edilir.
- 5- 200µl %96-100 etanol eklenir ve homojenizasyon için 5sn vortekslenir.
- 6- Toplam 640µl karışım, kitle birlikte tedarik edilen PureLink Spin Column Collection tüpüne aktarılır. Bu kolonlu toplama tüpü oda sıcaklığında 10,000×g 1dk boyunca santrifüj edilir. Toplama tüpü atılır, tüpün kolon kısmı yeni bir PureLink Collection tüpüne yerleştirilir.
- 7- Kolon’un üzerine dikkatli bir şekilde 500µl Wash Buffer 1 eklenir, 10.000 x g’de 1dk santrifüj edilir. Toplama Tüpü atılır, kolon yeni bir steril toplama tüpüne yerleştirilir.
- 8- Bu kez 500µl WashBuffer 2 ilave edilir ve 3dk maksimum hızda santrifüj edilir. Toplama tüpü atılır. Filtreli kısım korunur.
- 9- Filtreli kolon 1.5mL’lik steril ependorf tüpüne yerleştirilir ve filtrenin üzerine 25µl PureLink Genomic Elution Buffer dikkatlice eklenir. 1dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu tamamlanır, maksimum hızda 1dk boyunca santrifüj edilerek, elde edilen DNA örneği -20°C’de muhafaza edilir.

3.2.1.3. genomik DNA’nın Miktar ve Kalite Tayini

Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonu ve kalitesi, NanoDrop 2000 Spektrofotometre üzerinde 260 ve 280 nm’de optik yoğunluk ölçülerek belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu, $1=50\mu\text{g/ml}$ OD okumaya dayanarak hesaplanmıştır. DNA’ların saflığı ise 260nm/280nm oranı 1,8-2,0 aralığında ve 260nm/230 nm oranı ise 2,0-2,2 aralığı baz alınarak değerlendirilmiştir. İzolasyon sonrası, aynı örnek iki ayrı tüpte biri -20°C diğeri daha uzun süreli muhafaza edilmek adına -80°C’de saklanmaya alınmıştır. Deneysel işlemler öncesi örnekler %1’lik agaroz jelde DNA degradasyonu açısından görüntülenmiştir (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: İzolasyon sonrası çalışmadaki 7 olguya ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

3.2.2. Tüm Genom Genotiplendirme Tekniği

Genomumuzun 4 milyon bç'lik kısmında ve 1000'den fazla sayıda bulunan CNV'lerin tespiti çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir [77]. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon mikroyarray (aCGH) tekniğiyle genomdaki onlarca ya da yüzlerce kilobaz büyüklüğünde CNV tespit edilebilmektedir [122]. Ancak, günümüzde gelişmiş çözünürlük ve genom kapsamının artışıyla birlikte tüm genom SNP genotiplendirme aCGH'e göre, daha hassas olup 1kb'ye kadar olan değişim bölgelerini dahi tespit edebilen, alternatif bir CNV tekniği olarak karşımıza çıkar [122]. SNP-array yöntemi aCGH gibi deney öncesi hasta ve kontrol örneklerini işaretleme ve karıştırma zorunluluğu barındırmadığından kullanıcı dostu bir yöntemdir [81]. Özellikle çalışmamızda tüm genom genotiplendirme için SNP-array tercih edilmiş sebeplerimiz hem uzmanlığımızın bu yönde olması hem de sinyal bilgisi ile birlikte tüm genom genotip bilgisine ulaşabilmemiz ve bu sayede *de novo* varyantlar için anne-baba konfirmasyonu yapabilmemiz ve heterozigotluk kaybı (loss of heterozygosity; LOH) bölgelerini tespit edebilmemizdir.

Çalışmamız kapsamında olguların tamamına ve *de novo* varyant tespit edilen olguların ebeveynleri de dahil olmak üzere toplam 15 bireye tüm genom SNP genotiplendirmesi yapılmıştır. Bunun için MacroGen firmasından hizmet alımında bulunulmuş olup her bireyin DNA materyalleri 200 ng olacak şekilde hazırlanmıştır. Illumina firmasının Human OmniExpress-24 v1.1 BeadChip arrayi seçilmiş ve 713,014 SNP belirteci içeren bu kit protokole uygun şekilde firma tarafından uygulanarak genotiplendirme gerçekleştirilmiştir.

IScan cihazı ile taranan kitten elde edilen *.idat dosyaları yani ham veriler tarafımıza iletilmiştir. GenomeStudio v2.0.4. programının genotyping modülü ile kalite kontrolünü (call rate 0,99 ve/veya üzeri bir orana sahip oldukları belirlenmiş olan) geçmiş olan örneklerin CNV analizleri BAF ve LogR oranları dikkate alınarak yapılmıştır. Ayrıca, ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics ;ACMG) kriterleri için *de novo* varyantlarda gerekli olan ailesel konfirmasyon SNP-array sonuçları kullanılarak tarafımızca geliştirilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

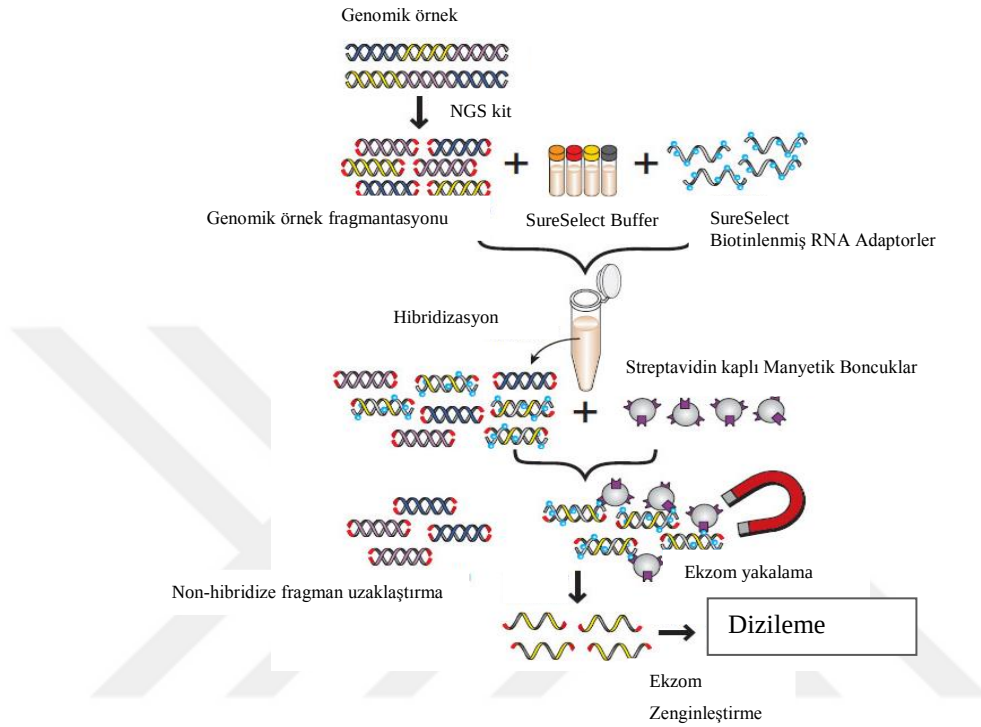
3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Tekniği

3.2.3.1. Çalışma İçin Seçilen WES Kiti ve Deneysel Aşamaları

Bu tez çalışması kapsamında toplanan ailelerden seçilmiş hasta bireylerden 7'sine ait gDNA (genomik DNA) örneği ile yalnızca bir aileye ait DNA örnekleri trio şeklinde (E17_26 kodlu hasta ve ebeveynleri-Bölüm 4, M2 ailesi) Agilent SureSelect V6-without UTR kiti kullanılarak, NovaSeq dizileme cihazında 100X derinlikte tüm ekzom dizilemeye tabi tutulmuştur. Bu kit, ekzonlar ve ekzon-intron sınırları da dahil olmak üzere 9 GB genomik içerik sunar, *untranslated regions* (UTRs) ise kapsamamaktadır. Özetle, 2µg gDNA ultra-sonikator ile yaklaşık 150-200 bp'lık küçük DNA fragmanlarına ayrılmıştır. Kütüphane hazırlığı aşamasında ekzon bölgelerini belirlemek için RNA:DNA hibritleşmesi baz alınarak 120 baz uzunluğunda biotinlenmiş tamamlayıcı RNA (complementary RNA;cRNA) adaptör molekülleri kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu uzun RNA belirleyicileri genomdaki yanlış eşleşmeleri çok büyük oranda elimine eder ve DNA:DNA hibridizasyonuna göre daha güçlü bir eşleşme sağlar. Ayrıca, yine bu aşamada hibridize olan fragmanlar streptavidin kaplı manyetik boncuklarla işaretlenmiştir. Hibridizasyon gerçekleştiremeyen fragman ve boncuklar ise yıkamalarla uzaklaştırılmıştır. Ekzom yakalama aşamasında manyetik boncuklar aracılığıyla yalnızca hibridize olan DNA fragmanları belirlenmiş ve zenginleştirme aşamasında sadece bu diziler çoğaltılmıştır. Ardından Nova-seq dizileme cihazında '*paired-end sequencing*' yani çift-yönlü dizileme yapılmıştır (Şekil 3-3).

Tüm bu deneysel işlemler hizmet alımı şeklinde MacroGen, Inc (Güney Kore) firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Cihazdan elde edilen ham ekzom verisi BCL dosya formatındadır ve Bcl2Fastq aracı ile FASTQ dosya formatı haline getirilmiştir. Okumaların kalite kontrolü FastQC programı ile yapılmıştır. Dizileme sonrası olgulara

ait ham veriler Macrogen firması tarafından *fastq* dosya formatında tarafımıza iletilmiştir. Laboratuvarımızda geliştirdiğimiz ham ekzom veri işleme modelleriyle her bir bireye ait veriler tarafımızdan işlenerek anotasyonları sağlanmıştır.



Şekil 3-3:Agilent SureSelect V6 kiti özelinde tüm ekzom dizileme tekniğinin deneysel aşamalarının gösterimi. Kaynak [123].

3.2.3.2. Çalışma Kapsamında Geliştirilen Ham Ekzom Verisi İşleme Modelleri

Bireylere ait ham ekzom verilerinin, varyant analizi öncesinde laboratuvarımızda çeşitli biyoinformatik basamaklar uygulanarak anotasyonlarının sağlanması için ANNOVAR, VANK ve DOVE isimli 3 farklı ham ekzom verisi işleme modeli geliştirilmiştir (Tablo 3-4).

Ham verilerin BWA-MEM (Burrows-Wheeler Alignment Tool) programı kullanılarak hg19/GRCh37 referans insan genomuna hizalaması gerçekleştirilmiştir. Picard programı ile hizalanan diziler kromozomlarına göre sıralanarak Sam dosya formatı BAM formatına çevrilmiştir, yine Picard aracılığıyla duplike okumalar işaretlenmiş ve datadan çıkarılmıştır. GATK (Genome Analysis Toolkit) programının InDel realignment paketi kullanılarak yeniden hizalama gerçekleştirilmiştir. GATK Base Recalibrator BQSR (Base Quality Score Recalibration) programıyla baz kalite skor

kalibrasyonu yeniden gerçekleştirilmiştir. GATK Haplotypecaller programı ile varyant çağırma yapılmıştır. Buraya kadar ham dataya uygulanan biyoinformatik işlemler için Pigeon adı verilen bir yazılım programı geliştirilmiştir. Her 3 veri işleme modelinde de anotasyon aşamasına kadar aynı yazılım programı kullanılarak SNP'ler ile indel varyasyonlar belirlenmiştir. ANNOVAR modelinde ANNOVAR programı, VATK modelinde Ensembl (Variant Effector Predictor) VEP 90 versiyonu, DOVE modelinde yine Ensembl VEP 95 versiyonu kullanılarak tespit edilen varyantların anotasyonları gerçekleştirilmiştir. Ensembl VEP 95 versiyonu kullanılarak yaptığımız anotasyon dosyalarına DOVE adı verilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan her 3 ham ekzom veri işleme modeline ilişkin benzerlikler ve farklılıklar Tablo 3-4'te gösterilmektedir.

Tablo 3-4: Ham ekzom datası işlemede kullanılan veri işleme modelleri.

Program adı İşlem	Hizalama (hg19/GRCh37)	Duplikelerin İşaretlenmesi, Indel yeniden hizalama, Baz Yeniden Kalibrasyonu	Varyant Çağırma	Varyant Anotasyonu	Frekans bilgilerinin alındığı yer
ANNOVAR	BWA-MEM	Picard ve GATK BQSR	GATK Haplotype Caller	ANNOVAR	1000 genome
VATK	BWA-MEM	Picard ve GATK BQSR	GATK Haplotype Caller	Ensembl 90 VEP Versiyon	Ensembl VEP 90
DOVE	BWA-MEM	Picard ve GATK BQSR	GATK Haplotype Caller	Ensembl 95 VEP Versiyon	1000genome+gnomAD (Ensembl VEP 95)

3.2.3.3. Anotasyonu Sağlanan Ekzom Verilerinin Analiz Stratejisi

Tüm ekzom dizileme tekniğiyle yaklaşık olarak genomda 20,000 kodlayan varyant tespit edilmektedir, çoğunun patojenik olmadığı bu varyasyonlar arasından hastalıkla ilişkili olabilecek varyantın tanımlanma süreci tekniğin en zor kısmıdır [125]. Bu zorluk, mutant allel yeni (novel) olduğunda ve varyantın patojenitesi ile ilgili bilgi veya herhangi bir literatür olmadığında daha da karmaşıklaşır. En yaygın olarak tespit edilen varyantlar, sinonim varyantlardır, bunu sinonim olmayan varyantlar ve kırılma bölgesi varyantları izler, daha da az yaygın olan çerçeve kayması ve dur kodon

varyantlarıdır. Varyant listesinde, varyantın türü, hastalığın varsayılan/bilinen kalıtım şekli, minör allel frekansı, okuma derinliği, evrimsel korunmuşluk ve protein değişiminin öngörülen etkisine göre yapılan çeşitli analizlerle fenotip ilişkili varyantın tespitine çalışılır [124].

Bizim çalışmamızda her olgu uygun kalıtım modeli ve allel frekans filtreleri kullanılarak beş basamaklı olarak nadir hastalık varyantlarının tespitine yönelik Tablo 3-5'te gösterilen sırayla detaylı analiz edilmiştir. Bazı olgular için bu analiz basamakları ham veri işleme modellerinden elde edilen .csv uzantılı varyant listelerine 2 veya 3 kez yeniden uygulanarak tekrarlı analizler uygulanmıştır (Bölüm 4- E17_12, E17_23 ve E17_33 sırasıyla M6, M7 ve M8 ailesi).

Tablo 3-5:Patojenik varyant tespiti için uygulanan ekzom veri analiz stratejisi.

ANALİZ STRATEJİSİ
1- Bilinen mikrosefali genleri a) Bilinen otozomal resesif primer mikrosefali genleri- OMIM veri tabanı b) https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/162/ bildirilmiş mikrosefali panel genleri
2- Resesif kalıtım modeli a) Omim filtresi-bilinen genler b) Omim filtresiz-bilinmeyen genler
3- Birleşik (compound) heterozigotluk
4- X-kromozomuna bağlı kalıtım modeli
5- Dominant kalıtım modeli a) Omim filtreli-bilinen genler b) Omim filtresiz-bilinmeyen genler

Hastaların fenotipi ile uyumlu olduğunu düşündüğümüz daha önceden tanımlanmış 17 adet MCPH geni [125] ile Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) veri tabanında MCPH ile ilişkili olarak (2019 Nisan tarihli güncel versiyonu baz alınarak) bildirilen genlerle birlikte toplam 25 mikrosefali geni analiz edilmiştir (Tablo 3-6). Bu genlerden; yalnızca *WDFY3* otozomal dominant kalıtım göstermekte, diğer genler resesif kalıtım sergilemektedir, analiz esnasında bu kalıtım farkı dikkate alınmıştır (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: OMIM veri tabanında bildirilen otozomal resesif primer mikrosefali (MCPH) genleri.

Sitogenetik Lokasyon	Fenotip	Kalıtım *^	Fenotip-MIM numarası	Gen/Lokus	Gen/lokus MIM numarası
1p34.2	Mikrosefali 15, primer, otozomal resesif	AR	616486	<i>MFSD2A</i>	614397
1p33	Mikrosefali 7, primer, otozomal resesif	AR	612703	<i>STIL</i>	181590
1p21.2	Mikrosefali 14, primer, otozomal resesif	AR	616402	<i>SASS6</i>	609321
1q31.3	Mikrosefali 5, primer, otozomal resesif	AR	608716	<i>ASPM</i>	605481
1q32.1	Mikrosefali 20, primer, otozomal resesif	AR	617914	<i>KIF14</i>	611279
2q11.2	Mikrosefali 23, primer, otozomal resesif	AR	617985	<i>NCAPH</i>	602332
3q23	Mikrosefali 19, primer, otozomal resesif	AR	617800	<i>COPB2</i>	606990
4q12	Mikrosefali 8, primer, otozomal resesif	AR	614673	<i>CEP135</i>	611423
4q21.23	https://www.omim.org/entry/616486 Mikrosefali 18, primer otozomal dominant	AD^	617520	<i>WDFY3</i>	617485
4q24	Mikrosefali 13, primer, otozomal resesif	AR	616051	<i>CENPE</i>	117143
7q21.2	Mikrosefali 12, primer, otozomal resesif	AR	616080	<i>CDK6</i>	603368
7q22.1	Mikrosefali 25, primer, otozomal resesif	AR	618351	<i>MAP11</i>	618350
8p23.1	Mikrosefali 1, primer, otozomal resesif	AR	251200	<i>MCPH1</i>	607117
9q33.2	Mikrosefali 3 primer, otozomal resesif	AR	604804	<i>CDK5RAP2</i>	608201
11q25	Mikrosefali 22, primer, otozomal resesif	AR	617984	<i>NCAPD3</i>	609276
12p13.31	Mikrosefali 21, primer, otozomal resesif	AR	617983	<i>NCAPD2</i>	615638
12p13.31	Mikrosefali 11, primer, otozomal resesif	AR	615414	<i>PHC1</i>	602978
12q23.2	Mikrosefali 24, primer, otozomal resesif	AR	618179	<i>NUP37</i>	609264
12q24.23	Mikrosefali 17, primer, otozomal resesif	AR	617090	<i>CIT</i>	605629
12q24.33	Mikrosefali 16, primer, otozomal resesif	AR	616681	<i>ANKLE2</i>	616062
13q12.12-q12.13	Mikrosefali 6, primer, otozomal resesif	AR	608393	<i>CENPJ</i>	609279
15q15.1	Mikrosefali 4, primer, otozomal resesif	AR	604321	<i>KNL1</i>	609173
15q21.1	Mikrosefali 9, primer, otozomal resesif	AR	614852	<i>CEP152</i>	613529
19q13.12	Mikrosefali 2, primer, otozomal resesif, kortikal bozukluklarla seyreden veya izole	AR	604317	<i>WDR62</i>	613583
20q13.12	Mikrosefali 10, primer, otozomal resesif	AR	615095	<i>ZNF335</i>	610827

*AR:otozomal resesif ^AD:otozomal dominant

Kaynak:<https://www.omim.org/phenotypicSeries/PS251200> (17.04.2019 tarihli)

Bilinen mikrosefali genlerine ek olarak İngiltere Ulusal Sağlık Servisi ve Edinburg Üniversitesi işbirliği ile 100,000 Genome Projesinin nadir hastalıklar programı altında Primer Mikrosefali, Mikrosefali Cücelik Spektrumu ve Şiddetli Mikrosefali ile ilişkili genleri içeren bir gen paneli oluşturulmuştur ve elektronik erişime açıktır.

<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/activity/?panel=162> adresinden ayrıntılı gen listesine ulaşılabilir [126]. Bu paneldeki genler üç farklı kategori altında toplanmıştır. 3 ya da daha fazla birbirinden bağımsız ailede tanımlanmış genler veya fonksiyonel çalışmalarla ilişkisi kesinleşmiş genler (88gen) yeşil kategoride bilinen genler olarak değerlendirilmiş, diğer genler (28) ise bilinmeyen ve olası hastalık ilişkili olarak sarı ya da kırmızı kategoriye alınmıştır (*Severe microcephaly*-Version 1.47) [126]. Bu gen listesine genom projesi çalışmaları süresince yeni genlerde

eklenmektedir. *Severe microcephaly* (versiyon 1.47) panel genlerinin monoallelilik, biallelik ya da X kromozomuna bağılı kalıtımı dikkate alınarak çalışmadaki 8 olgunun gen panelindeki toplam 116 gen açısından ekzom verileri analiz edilmiştir.

İkinci basamakta, ailelerin akraba evliliği ve/veya aynı yöreden evlilik gerçekleştirmiş olması dikkate alınarak resesif kalıtım modeline göre homozigot varyantlar analiz edilmiştir. Bu analiz basamağının ilk seçeneğinde, kalıtım modeli ve MAF (minör allel frekansı) filtreleriyle, OMIM fenotip filtresi *microcephaly*, *intellectual disability*, *mental retardation* anahtar kelimeleri kullanılarak bilinen mikrosefali gen varyantlarının analizi için uygulanmıştır. İkinci seçenek olarak, bu OMIM filtresi hiç kullanılmadan bilinmeyen gen varyantları incelenmiştir. Üçüncü basamakta resesif kalıtımın diğer çeşidi birleşik (compound) heterozigot varyantlar ise dominant kalıtım modeli özelinden incelenmiştir.

Dördüncü basamakta, X-kromozomuna bağılı kalıtım modeline göre özellikle erkek olgularda resesif hemizigot varyantlar analiz edilmiştir. Son olarak, dominant kalıtım modeli ve MAF filtreleriyle yine OMIM fenotip filtresinde *microcephaly*, *intellectual disability*, *mental retardation* anahtar kelimeleri kullanılarak/kullanılmayarak sırasıyla bilinen ve bilinmeyen mikrosefali genleri heterozigot varyantlar açısından araştırılmıştır. Ancak, bu kalıtım özelinde varyantın *de novo* veya bir ebeveynin bu varyant açısından mozaik olmasına öncelik verilmiştir. Tüm bu basamaklardaki analizlerde MAF değeri ≤ 0.01 olarak kabul edilmiş ve uygulanmıştır.

Ayrıca, incelenen her bir varyantın alel frekansı 60,706 akraba olmayan bireyin ekzom verisi ExAC veri tabanında, 141,456 akraba olmayan bireyin ekzom (125,748 bireyin ekzom verisi) ve genom (15,708 bireyin genom verisi) dizi verilerini içeren gnomAD veri tabanındaki bilgiler doğrultusunda değerlendirilmiştir. 1000 Genome veri tabanında ise varyantların hem allel hem de homozigot/heterozigot genotip frekans bilgileri değerlendirilerek analizler gerçekleştirilmiştir.

American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kılavuzundaki kriterlere göre genomdaki varyantlar beş kategoriye ayrılır: patojenik, muhtemel patojenik, muhtemel zararsız, zararsız ve klinik önemi bilinmeyen varyantlar [127]. Bu kılavuza göre konjenital ve yüksek penetranslı hastalıklarda, sağlıklı tek bir bireyin varyanta resesif kalıtım için homozigot, dominant kalıtım için heterozigot ve X'e bağılı kalıtım için hemizigot olarak sahip olması; bu varyantın zararsız varyant olarak

değerlendirilmesi ve elenmesi için güçlü bir kanıttır (ACMG-BS2 kriteri) [127]. Biz analiz stratejimizde bu sayıyı dominant kalıtım özelindeki varyantlar için 5 bireyle sınırlandırdık.

Yukarıda detaylandırılan analiz basamaklarında allel frekansı, kalıtım modeli ve bilinen/bilinmeyen genler için uygulanan üç ayrı filtrelemeyle ekzom veri listelerindeki aday varyantların sayısı azaltılmıştır. Filtrelenen verideki aday varyantlar arasından olası hastalık ilişkili varyantın tespiti oluşturduğumuz, varyant önceliklendirme kriterlerimize göre yapılmıştır. İlk kriter mutasyon tipidir. Dur kodonu ve çerçeve kayması varyantlarının protein seviyesinde zararlı etkilere sahip olma olasılığı yüksektir ve bu, on binlerce varyantı içeren listede bize varyant önceliklendirme için iyi bir başlangıç noktası sağlamaktadır [13]. Bunu takiben ekzom veri listesinde kırılma bölgesi varyantları, yanlış anlamlı ve sinonim varyantlar sırasıyla analiz edilmiştir.

Bunun yanında, listedeki her bir aday varyanta ait literatürdeki gen-hastalık bilgisi (tüm genler her bir analiz basamağında Pubmed veri tabanında mikrosefali, zihinsel yetmezlik, nörogelişimsel bozukluk yazılarak incelenmiştir), evrimsel korunmuşluk, tahmin araçlarına göre patojenite olasılığı, aday genlerin beyin, korteks ve serebellumdaki ekspresyon düzeyi, okuma derinliğinin 20X veya üzerinde olması değerlendirilerek patojenik varyant tespitine yönelik ayrıntılı analizler gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen bütün aday varyantların ham okuma verileri Integrative Genomics Viewer (IGV) programı kullanılarak kontrol edilmiştir. SIFT, Polyphen2, MutationTaster gibi çeşitli tahmin araçlarından yararlanılarak aday varyantların olası potansiyel patojenitesi belirlenmiştir [128-131].

Filtrelenen ekzom veri listesi analizleri sırasında yukarıda sözü edilen önceliklendirme kriterlerinin yanı sıra her olgunun kendine özgü heterojen klinik özellikleri de dikkate alınarak, fenotiple ilişkili olabilecek en kuvvetli patojenik aday varyant/lar tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.2.3.4. Aday Varyant Validasyonu ve Ailesel Dağılım Analizi

WES okumalarında ortalama 50-125bp nükleotid uzunluğundaki fragmanlar Sanger dizilemeye göre daha yüksek oranda dizileme hata payına sahiptir, bu yüzden tespit edilen varyasyonun altın standart olarak kabul edilen dizileme tekniği Sanger ile validasyonu gereklidir [132]. Bu tez çalışmasında ekzom veri analizleri neticesinde

seçilen aday varyantların doğrulaması ve takiben ailesel segregasyon analizleri Sanger dizilemeyle yapılmıştır.

Her aday varyant için gen-spesifik primer tasarımları NCBI veri tabanında varyantın tespit edildiği transkriptin NM kodu girilerek, dizide varyantında içerildiği en az 1000 bazlık gen dizisi FASTA formatında seçilerek başlatılmıştır. Ardından Primer3 v.0.4.0 programında seçilen bu dizi sisteme girilerek optimum şartlar altında (erime sıcaklığı yakın, uzunlukları 18-27 nükleotidi geçmeyecek ve kendisi veya birbiriyle hairpin yapısı kuramayacak) ileri ve geri primerler tasarlanmıştır [133,134]. UCSC'nın in silico PCR araç özelliği kullanılarak bölge hg19 ve hg38'e göre görselleştirilmiştir; yine güncel dbSNP (dbSNP151) aracı kullanılarak primer bölgelerine denk düşen yaygın SNP veya tekrarlı bölgenin (SINE, LINE) olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ardından, UCSC Blat aracı kullanılarak genomda yalnızca seçilmiş varyantın içerildiği özgül genom bölgesinin oğaltılacağı teyit edilmiştir. Çoğaltılacak bölgenin GC yüzdesi OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator) programı kullanılarak belirlenmiştir. Tasarlanan primerler MacroGen, Inc (Hollanda) ve Sentromer DNA teknolojileri (İstanbul) firmalarına sentez ettirilmiştir. Primerlere ait detaylı bilgiler Tablo 3-7'de sunulmaktadır.

Tablo 3-7: Aday varyantların tasarlanan primer bilgileri.

Gen Sembolü	Gen Pozisyonu (hg19)	İleri primer dizisi	Geri Primer dizisi	Amplikon Boyu (bp)
<i>AP4M1</i>	ENST00000359593.4:c.952C>T	GCTTTGGCTAATGGAGTTGG	GCTGCATCTGAAGGGAGAAG	287
<i>WDR62</i>	ENST00000270301.7:c.1605dupT	GGCCATGATAAGGGGTCTC	TCATACATCCACCCCTTTGG	462
<i>SOX11</i>	ENST00000322002.3:c.239C>T	CAGCGGATCATGGTGCAG	GGGTCCATTTTGGGCTTT	392
<i>TRIO</i>	ENST00000344204.4:c.4394A>G	ACCCTGCCATCCATTGAATA	CCAGTGAAGGGACCAGAAAA	499
<i>SCN1A</i>	ENST00000303395.4:c.2909C>T	TTGAATTCTAATGACCATTTCTAGG	TGCAGGGGCACTGTATATT	691
<i>HECW2</i>	ENST00000260983.3:c.1679C>T	GGGTACCCATCTTCTCTTGG	CCAGGTCACTCTCTCCCTCA	488
<i>DPP6</i>	ENST00000404039.1:c.334A>G	TGGCTCCTTGGAGTATCTGC	TCTGTAAATGTGTAAAAGCCTTAGGA	699
<i>DYRK1A</i>	ENST00000338785.3:c.76G>A	TGGAGAAGTCCCTCAATAATTAATA	AAGGAATAAAGTCCATTCCAA	600
<i>HSPG2</i>	ENST00000374695.3:c.11072C>T	ACCCCTAAGAATTGGCAGTG	TATCACAGAGGCAGGGATGG	398
<i>HSPG2</i>	ENST00000374695.3:c.1844G>A	GCTCTGCTCCTTCTGCAGTT	TACACGGTCTGGATGAGCAC	827
<i>LGSN</i>	ENST00000370657.4:c.740T>G	TGACTGGTGAGCCTCTTTTG	TGCCACTTCTTTGACACCTG	356
<i>PLEKHG2</i>	ENST00000205135.4:c.1048C>G	ACAGCCTGCATTGTGAGTTG	GCCAGAGCCCTGTGTGAG	287
<i>PLEKHG2</i>	ENST00000425673.1:c.2221G>A	ATCCTGGGAACTGGGAGAG	GGATCCGCTCGCTGTAAA	336
<i>RIB1C</i>	ENST00000375327.3:c.296G>A	GTGGGACAAATTGGATGGAC	GCATTCTCAGCCGTGTGTC	365
<i>KMT2B</i>	ENST00000222270.7:c.3101A>C	CCTCTCCATCTTCTCCGTTG	GAGTCATCCGAATCCTCGAA	359
<i>LMX1A</i>	ENST00000294816.2:c.184_185delTG	CCAGGTTTGGCATGGTCTAC	ATGTACACGACTGCGTGAA	396
<i>C2CD3</i>	ENST00000313663.7:c.5082G>T	TGACAGAGCGGAAAGTATCG	AAAGCATTTCAGGCTCTGC	245
<i>DDHD1</i>	ENST00000323669.5:c.1709G>A	GCTGAATCGATTGTATCCCTTT	CAACAGTCTCCAGCTTGATTAGG	396
<i>INTS3</i>	ENST00000318967.2:c.2773G>A	GGTTTGTGGCGACATCTA	TTATCCCGAGTGTGGTTGT	482
<i>INTS5</i>	ENST00000330574.2:c.967G>C	GCCCAAGATTGCCTCAGTT	CCACAAGCTCTCCAGAGACA	218

Aday varyantların validasyon ve ailesel segregasyon analizi için Tablo 3-8’de gösterilen volüm ve miktarlar kullanılarak; PZR amplifikasyonu Tablo 3-9’da verilen touchdown PZR döngüsel koşulları altında Biorad PZR analizörü ile gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendikten sonra dizileme hizmeti için Macrogen,Inc (Güney Kore) firmasından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Bireylerin dizileme sonuçları ‘.ab1’ formatında iletilmiştir ve CLC Main Workbench 12.0.3 programında kromatogramlar referans gen dizisiyle karşılaştırılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Tüm varyantlar Mutalyzer programının NameChecker modülü kullanılarak NM koduna göre önerildiği biçimde cDNA ve protein pozisyonuna göre adlandırılmıştır.

Tablo 3-8: PZR reaksiyon bileşimi.

Konsantrasyon	Çözeltiler/Solüsyonlar	Miktar (µl)
2X	Dream Taq Green Master Mix	10
	dH ₂ O	9
50ng/ µl	DNA	2
2.5mM	İleri Primer	2
2.5mM	Geri Primer	2
	Toplam Hacim	25µl

Tablo 3-9: PZR protokolü.

İşlem	Sıcaklık	Süre
	105°C	
Erime	95°C	5dk
	94°C	45sn
İniş	61°C (-0,5°C)	16döngü
	72°C	
	94°C	45sn
PZR	52°C	20 döngü
	72°C	
Son uzama	72°C (final uzama)	15dk
	15°C	5dk
	10°C	∞

4. BULGULAR

Bu çalışmada ebeveynleri arasında akraba evliliği ve/veya aynı yöreden evlilik bulunan toplam 9 ailedeki 7 indekse ve bir aileye trio (parent-indeks) olarak tüm ekzom dizileme tekniği uygulanmıştır. Dokuzuncu ailede ise baba kan vermeyi reddettiğinden, yalnızca hasta bireye (E17_18, M9 ailesi) tüm genom genotiplendirme tekniği uygulanmıştır. Tüm olgulara ait fenotipik özellikler olguların kodlarıyla birlikte Tablo 4-1’de detaylı olarak verilmiştir.

Hizmet alımı şeklinde uygulanan WES yönteminde ıslak laboratuvar ve ham data eldesi Macrogen,Inc (Güney Kore) firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Tarafımıza iletilen 7 hastanın *fastq* formatlı ekzom dosyalarının Bölüm 3.2.3.2.’de detaylandırılan ANNOVAR, VANK ve/veya DOVE isimli ham ekzom veri işleme modelleriyle anotasyonları sağlanmıştır. Sırasıyla neden 3 farklı ekzom veri işleme modeline ihtiyaç duyulduğu, ekzom verilerinin analizleri ve gerektiğinde yapılan tekrar analizleri neticesinde tespit edilen nadir patojenik varyant bulgularından, bunların validasyon ve ailesel dağılım taramasından bahsedilecektir.

Macrogen firması tarafından iletilen indekslere ait *fastq* dosyaları birincil olarak ANNOVAR işleme modelindeki biyoinformatik süreçlerle işlenerek anotasyonları sağlanmıştır (Tablo 3-4). Ekzom verilerinin analizi esnasında E17_33 kodlu hastanın 1.kromozomundaki g.153744868G>A varyantının .csv uzantılı dosyasında yazdığı gibi (Tablo 4-2) *SLC27A3* genine lokalize olmadığı IGV görüntüsünde ortaya çıkmış ve varyantın *INTS3* geninde yer alan bir değişim olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-1).

Tablo 4-1: Çalışmadaki Olgulara Ait Fenotipik Özellikler.

		HASTA KODU									
		E17_ 29	E17_ 26	E17_ 07	E17_ 16	E17_ 31	E17_ 12	E17_ 23	E17_ 33	E17_ 18	E17_ 37
F E N O T İ P İ K Ö Z E L L İ K L E R	<i>Mikrosefali</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	<i>ZÖY</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	<i>Hipotoni</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	<i>Gelişim Geriliği</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	<i>Epilepsi</i>	√	-	-	-	-	√	-	-	√	-
	<i>Direnç -li</i>										
	<i>Nöbet Öyküsü</i>	√	-	√	√	-	√	-	-	√	-
	<i>(ateş- li)</i>										
	<i>Spastisite</i>	-	-	√	-	-	√	-	√	-	-
	<i>Hidrocefali</i>	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ataksi</i>	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-
	<i>Nistagmus</i>	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-
	<i>Mikrolissen Sefali</i>	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-
	<i>Destekli Yürüme</i>	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-
	<i>Skolyoz</i>	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Strabismus</i>	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-
	<i>Dismorfik bulgular</i>	-	√	-	√	√	√	√	√	√	√
	<i>Hipertelorizm</i>	-	-	-	√	√	-	-	-	-	-
	<i>Smian Çizgisi</i>	-	-	-	√	-	-	√	-	-	-
	<i>Akrabalık durumu</i>	√	*	*	√	√	-	√	√	-	?
	<i>Cinsiyet</i>	♀	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♂

√ pozitif, var - negatif, yok

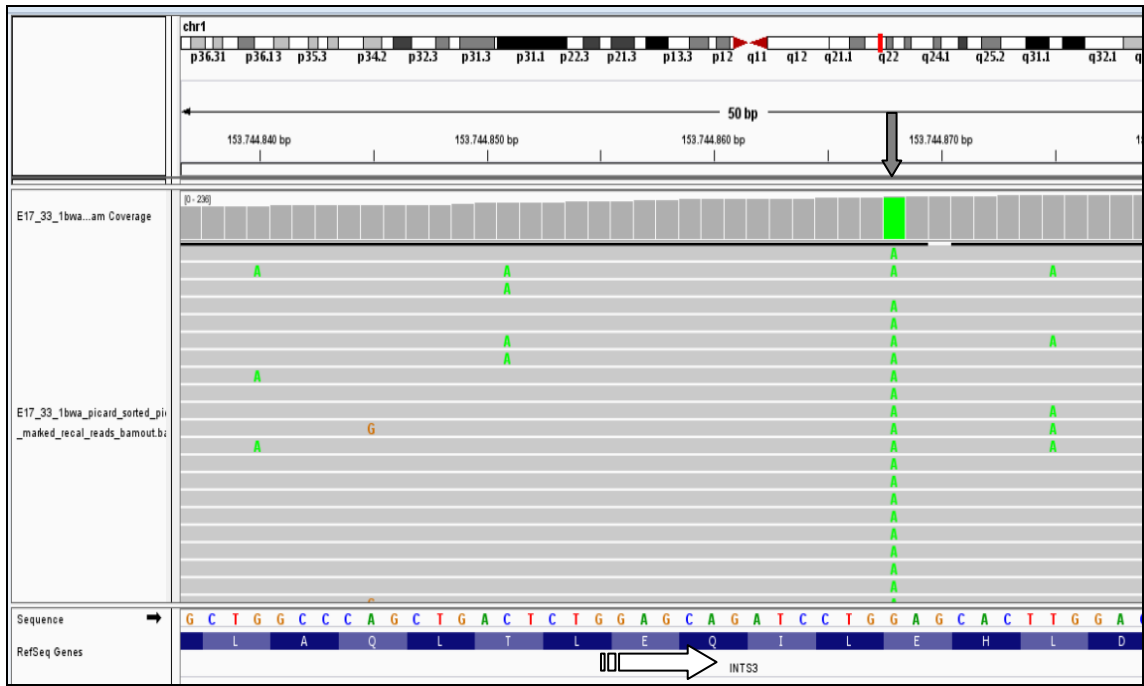
*Aynı köyden ebeveynler

? Bilinmiyor

♀ kadın, ♂ erkek

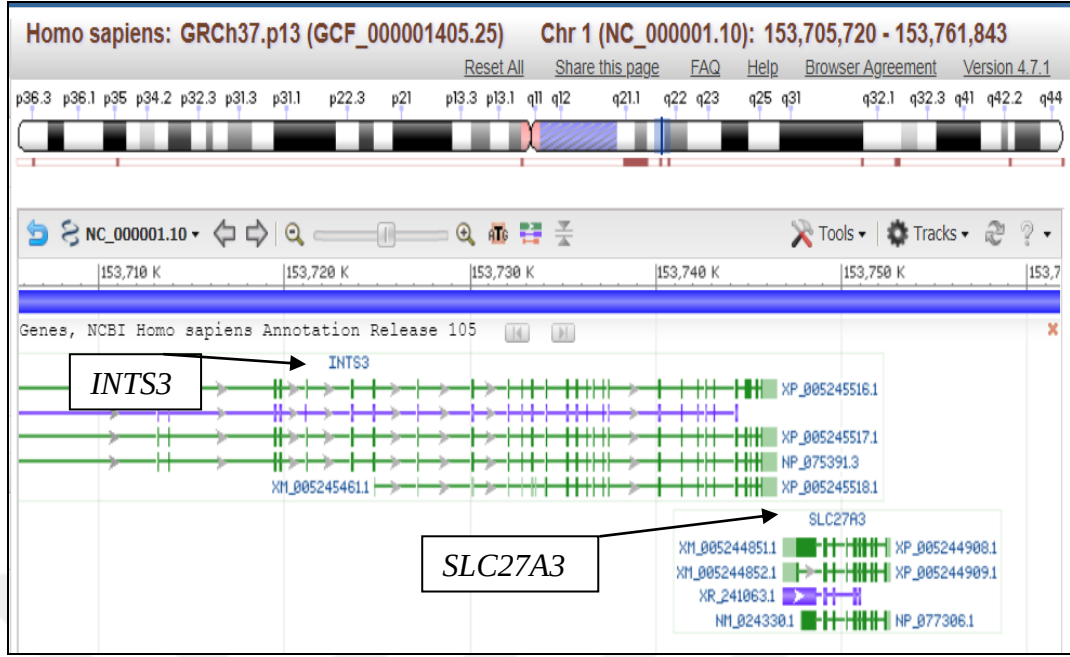
Tablo 4-2: E17_33 kodlu indekste ANNOVAR anotasyonlu ekzom listesinde saptanan *SLC27A3* değişimi.

Kromozom pozisyonu (hg19)	Referans allel	Alternatif allel	Zigosite	Gen	Okuma sayısı (referans vs alternatif allel)	Varyant Etkisi
Chr1:153744868	G	A	1/1	<i>SLC27A3</i>	0/187	Yanlış anlamlı mutasyon



şekil 4-1: E17_33 kodlu bireyde chr1:153744868 G>A değişiminin *INTS3* genine denk düştüğünü gösteren IGV görseli. (hg19). Gri okla değişim, beyaz okla *INTS3* geni işaret edilmiştir.

Bu iki genin NCBI veri tabanında Genome Data Viewer programıyla *INTS3*-chr1:153,700,526-153,746,555 ve *SLC27A3*-chr1:153,746,830-153,752,633 ortak bölge paylaşmadıkları hg19 insan genomuna göre kontrol edilmiştir (şekil 4-2). Bunun yanında literatürde, integrator kompleks genlerinin 2017 yılında zihinsel yetmezlik, spastisite, yüz bozuklukları ve yapısal beyin anomalileri ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir [135].



Şekil 4-2: INTS3 ve SLC27A3 genlerinin NCBI Genome Data Viewer görüntüsü (hg19).

ANNOVAR anotasyonlu datada karşılaştığımız diğer bir sorun ise allel frekans değerleri ile ilgilidir. Özellikle polimorfik alleller için Ensembl veri tabanında verilen MAF değerleri alternatif allele göre verilebildiği gibi bazen de referans allele göre verilebilmektedir. Ensembl’da MAF değeri verilmeyen alternatif allel varyant listemizde otomatik olarak 0 (sıfır) MAF değerine sahipmiş gibi görünmektedir. Bu durumda ekzom veri listemizde var olan MAF değerleri konusunda bir karışıklık ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple ANNOVAR anotasyonlu datadan farklı olarak VANK ve DOVE anotasyonlu datalarda 1000 Genome ‘a göre polimorfik alleller elenip, gnomAD veri tabanlarından alternatif allel frekansları çekilerek MAF değeri konusunda bu yanlışlığın önlenmesi sağlanmıştır.

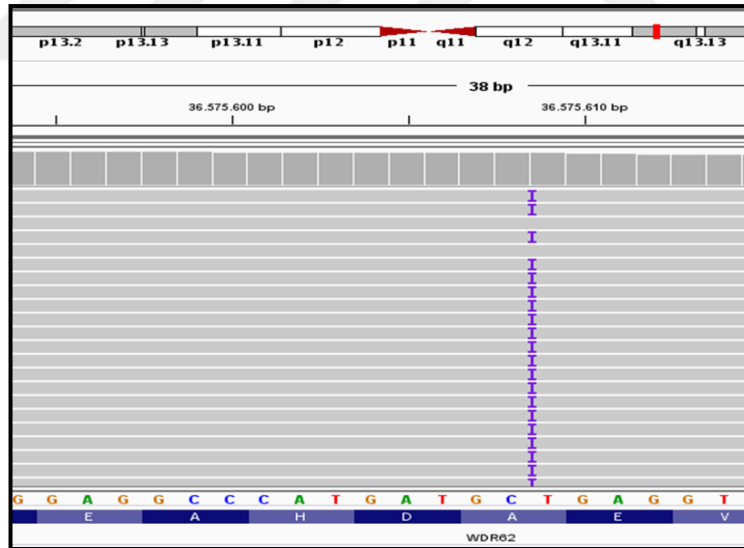
Bahsedilen MAF değeri karmaşıklığı ve SLC27A3 varyantı özelinde fenotiple ilişkili olabilecek ancak ekzom veri listemizde yer almaması muhtemel olan gen varyantlarını kaçırmamak adına ANNOVAR anotasyonlu ekzom dosyalarının analizine devam edilmeyip nokta koyulmuştur. Bu bağlamda, olguların ham verileri VANK veri işleme modeli ile yeniden anote edilmiş ve indekslerin (7 olgunun) ilk ekzom veri analizleri VANK anotasyonlu dosyaları üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu analiz neticesinde aday varyant tespit edilememiş veya Sanger validasyonu sonucuna göre elenmiş varyantlara sahip olgulara analiz strateji basamakları (Bölüm 3.2.3.3 ve Tablo:3-5) ikinci bir analiz ile yeniden uygulanmıştır. Bu tekrar analizinden de sonuç

alınamayan iki hastamızın (E17_12 ve E17_23) ham ekzom datasının üçüncü kez DOVE modeli ile anotasyonu sağlanmış ve üçüncü analizleri DOVE anotasyonlu dosyaları üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.1. Resesif Kalıtmılı Bildirilmiş Genlerde Tespit Edilen Varyantlar

4.1.1. M1 ve M2 Aileleri

M1 ailesindeki ebeveynler aynı yöreden olup 1.Derece kuzen evliliği gerçekleştirmiştir. Bu ailede E17_29 kodlu hasta; prenatal dönemde gebeliğin 8. ayında mikrosefali tanısını almıştır. 1,5 yaşından itibaren dirençli epilepsi sebebiyle nöbet öyküsü pozitif olan olgu, hipotoni ve zihinsel öğrenme yetersizliğine sahiptir. Hastanın VATK anotasyonlu ekzom verileri, analiz stratejimizin birinci basamağı uygulanarak [Tablo 3-5:1.a)] bilinen MCPH gen varyantları açısından incelenmiştir. Bu analiz sonucunda OMIM veri tabanında MCPH2 (Microcephaly 2, primary, autosomal recessive, with or without cortical malformations; MIM: 604317) ile ilişkili *WDR62* geninde daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş ve homozigot genotipli dur kodon varyantı tespit edilmiştir. Varyantın IGV görseli Şekil 4-3'te sunulmaktadır.



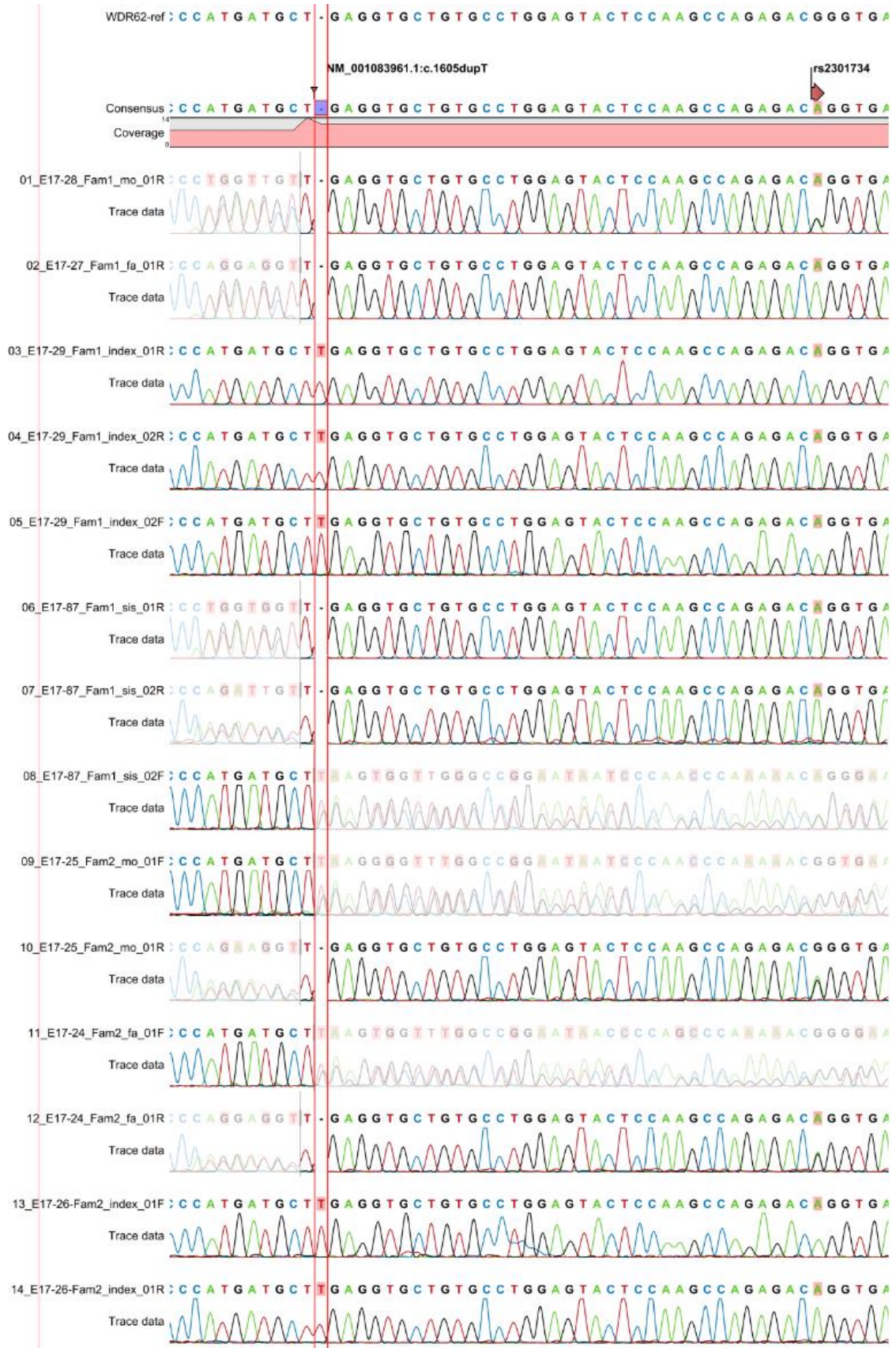
Şekil 4-3: *WDR62*-NM_001083961.1:c.1605dupT;p.Glu536* aday varyantı IGV görüntüsü. (hg19).

WDR62-NM_001083961.1:c.1605dupT;p.Glu536* aday varyantı sekans validasyonu ile hastada (03_E17_29_Fam1_indeks_01R) doğrulanmış ve ailesel segregasyon analiziyle ebeveynlerin (02_E17_27_Fam1_fa_01R ve 01_E17_28_Fam1_mo_01R) ve sağlıklı kardeşin (06_E17_87_Fam1_sis_01R) heterozigot varyant taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4-4 ve Tablo 4-3). Varyantın

536. amino asitten sonra erken sonlanma kodon oluşumuna sebep olduğu Mutalyzer Name Checker Programı aracılığıyla Şekil 4-5'te gösterilmiştir. Aile bu varyant tespiti sonrası tarafımızdan bilgilendirilmiş, aileye teknik rapor sunulmuştur.

Tablo 4-3: WDR62- NM_001083961.1:c.1605dupT varyantının özellikleri.

Gen	Transkript	Varyant	Varyant Etkisi	Lokasyon (Genomik)	Hastalık
WDR62	ENST00000401500.6 NM_001083961.1	c.1605dupT (p.Glu536*)	Dur kodon	19:g.36,084,707dupT (hg38)	MCPH2 (OMIM: 604317)



Şekil 4-4: M1 ve M2 ailelerinde WDR62-NM_001083961.1:c.1605dupT varyantının ailesel segregasyon gösterimi . Fam1 M1 ailesini, Fam2 M2 ailesini belirtir. Mo=anne, fa=baba, sis=kızkardeş, indeks=hasta.

Reference protein									
1	MAAVSGGYA	RNDAGEKLPS	VMAGVPARRG	QSSPPPPAPPI	CLRRRTLRST	ASEETVQNRV			
61	SLEKVLGITA	QNSGLTCDP	GTGHVAYLAG	CVVVILDPKE	NKQQHIFNTA	RKSLALAFS			
121	PDGKYIVTGE	NGHRPAVRIW	DVEEKNQVAE	MLGHKYGVAC	VAFSPNKHIX	VSMGYQHDW			
181	LNWMDWKKDI	VVASNKVSCR	VIALSFSEDS	SYFVTVGNRH	VRFWFLEVST	ETKVTSTVPL			
241	VGRSGILGEL	HNNIFCGVAC	GRGRHAGSTF	CVSYSGLLCQ	FNEKRVLEKW	INLKVSLSSC			
301	LCVSQELIFC	GCTDGIIRIF	QAHS LHLYAN	LPKPHYLVGD	VAQGLEPSFL	FHRKAEAVYP			
361	DTVALTFDPI	HQWLSGVYKD	HSIYIWDVKD	INRVGKVMSE	LFHSSYVMNV	EVYPEFEDQR			
421	ACLPSGSLT	CSSDNTIRFW	NLDSSPDSHW	QKNIFSNTLL	KVVYVENDIQ	HLQDMISHFPD			
481	RGSENGTPMD	VKAGVRVMQV	SPDGQHLASG	DRSGNLRHIE	LHFHDELVKV	EAHDAEVLCL			
541	EYSKPETGLT	LLASASRDRL	IHVLNVEKNY	NLEQTLDHHS	SSITAIFKAG	NROIQMISCG			
601	ADKSIYFRSA	QQGSGLHFFV	RTHHVAEKT	LYDMOIIDITQ	KYVAVACQDR	NVRVYNTVNG			
661	KQKKCYKGSQ	GDEGSLKLVH	VDPSTFLAT	SCSDKSISVI	DFYSGECAIK	MFGHSEIITS			
721	HKFTYDCHHL	ITVSGDSCVF	INHGLPEITN	CMKQHLEID	HRQQQHTND	KKRSGHPRQD			
781	TYVSTPSEIH	SLSPGEQTED	DLEEECEPEE	MLKTPSKDSL	DPOPRCLLTN	GKSLPLHAKRL			
841	LGDDOVADGL	AFHAKRSYQP	HGRHAERAGQ	EPLKTILDAQ	DLDQCYFTPMK	PESLENSILD			
901	SLEPQSLASL	LSSESPPQEA	GRGHPSFLPQ	QKESSEASEL	ILYSLAEAVT	VTGDSQCYCR			
961	KEVEAGPGDQ	QGDSYLRVSS	DSPKDQSPPE	DSGESEADLE	CSFAAIZHSPA	PPDPAPRFA			
1021	TSLPHFPDCA	GPTDELSLP	EGSPVPSSSL	PQTPEQEKFL	RHMFETLTES	PCRELFPAAAL			
1081	GDVEASEAED	HFFNPLRSIS	TQFLSSLLQA	SRFTHTFPPR	ATQCLVKSP	VKLMDRGGSQ			
1141	PRAGTGYASP	DRTHVLAAGK	AETLEAWRP	PPPCLTSLAS	CVPASSVLPT	DRNLPTPTSA			
1201	PTPLAQSVH	APSTCSYMEA	TASSRARISR	SISLGDSEGP	IVATLAQPLR	RPSSVGLAS			
1261	LQELQAITT	ATTPSLDSEG	QEPALRSNGN	HEARANRLT	LSSACDGLLQ	PPVDTPQGVY			
1321	VPAVSFPAPS	PVEESALRLH	GSAFRPSLPA	PESPLPAHP	SNPQLPEARP	GIPGGTASLL			
1381	EPTSGALGLL	QSSPARHSEP	WVPVEALPPS	PLELSRVGNI	LHRLQTTTQE	ALDLVRLVLS			
1441	SGQVDTQQQ	ARTELVSTFL	WIHSQLEAEC	LVGTSVAPAQ	ALPSPGPPSP	PTLYPLASPD			
1501	LQALLEHYSE	LLVQAVRRKA	RGH*						
Protein predicted from variant coding sequence									
1	MAAVSGGYA	RNDAGEKLPS	VMAGVPARRG	QSSPPPPAPPI	CLRRRTLRST	ASEETVQNRV			
61	SLEKVLGITA	QNSGLTCDP	GTGHVAYLAG	CVVVILDPKE	NKQQHIFNTA	RKSLALAFS			
121	PDGKYIVTGE	NGHRPAVRIW	DVEEKNQVAE	MLGHKYGVAC	VAFSPNKHIX	VSMGYQHDW			
181	LNWMDWKKDI	VVASNKVSCR	VIALSFSEDS	SYFVTVGNRH	VRFWFLEVST	ETKVTSTVPL			
241	VGRSGILGEL	HNNIFCGVAC	GRGRHAGSTF	CVSYSGLLCQ	FNEKRVLEKW	INLKVSLSSC			
301	LCVSQELIFC	GCTDGIIRIF	QAHS LHLYAN	LPKPHYLVGD	VAQGLEPSFL	FHRKAEAVYP			
361	DTVALTFDPI	HQWLSGVYKD	HSIYIWDVKD	INRVGKVMSE	LFHSSYVMNV	EVYPEFEDQR			
421	ACLPSGSLT	CSSDNTIRFW	NLDSSPDSHW	QKNIFSNTLL	KVVYVENDIQ	HLQDMISHFPD			
481	RGSENGTPMD	VKAGVRVMQV	SPDGQHLASG	DRSGNLRHIE	LHFHDELVKV	EAHDA*			

Şekil 4-5:WDR62 referans ve tespit ettiğimiz mutant protein diziliminin kıyas gösterimi.

VATK programı aracılığıyla ilk etapta anotasyonu sağlanmış olan 7 hastanın ekzom verilerine analiz stratejimizin 1.basamağının a şikkının uygulanmasıyla, (Tablo 4-4'te de gösterildiği gibi) E17_29 kodlu hasta birey dışında MCPH gen varyantları ile ilişkili olabilecek başka hasta tespit edilmemiştir.

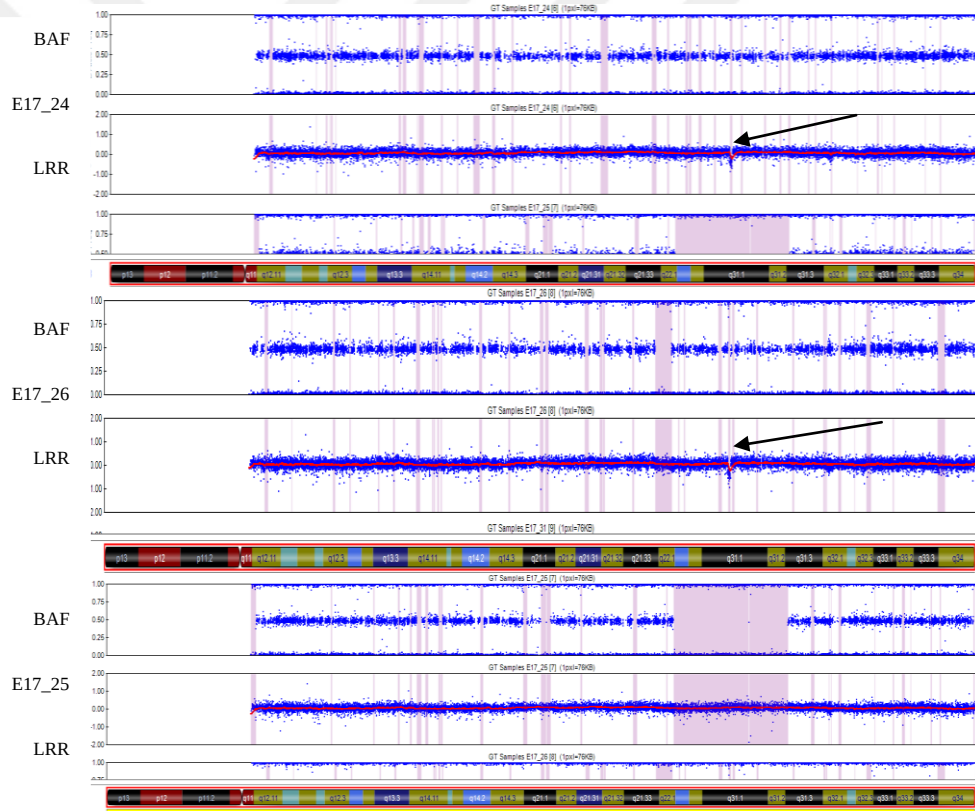
Tablo 4-4: Bilinen MCPH mikrosefali genleri analiz sonuçları.

Hasta Kodu	İncelenen MCPH Gen Sayısı	Genlerde Saptanan Varyant Sayısı	Tespit Edilen İlişkili Gen
E17-07	25	82	-
E17-12	25	82	-
E17-16	25	106	-
E17-23	25	93	-
E17-29	25	74	WDR62
E17-31	25	95	-
E17-33	25	94	-

Farklı bir aile olan M2 ailesinde ebeveynleri aynı köyden olan ve doğumda mikrosefali tanısı almış E17_26 kodlu hasta gelişim geriliğinin yanında ZY öyküsüne de sahiptir. Tez kapsamında toplanan aileler ilgili ilk değerlendirmede bu hastanın dismorfik bulguları ön planda olduğundan ve kısıtlı maddi kaynak sebebiyle WES uygulaması için sadece 7 hasta seçebileceğimizden ilk etapta bu hastanın WES yerine

tüm genom genotiplendirme uygulamasına alınması kararlaştırılmıştır ve çalışmaları sonraya bırakılmıştır.

Ebeveynleriyle birlikte hastaya da uygulanan genotiplendirme sonrası tarafımızca gerçekleştirilen SNP-array datası CNV analizi sonucuna göre E17_26 kodlu hasta ve E17_24 kodlu babada chr13:82,406,612-82,736,934'te 0,33MB'lık bir bölgenin kopya kaybı tespit edilmiştir. Sözü edilen bölge Şekil 4-6-A'da okla işaret edilmiştir. E17_25 kodlu anne bu bölge için kopya kayıp veya kazancına sahip değildir. Bu kopya kaybının yer aldığı bölgede Ensembl 37 ve UCSC veri tabanlarında yapılan incelemeye göre bir gen lokalizasyonu mevcut değildir. Genotiplendirme analizi kapsamında bu hasta ve ebeveynlerinin genomunda 13.kromozomda dahil patolojik bir CNV değişikliği tespit edilmemiştir.



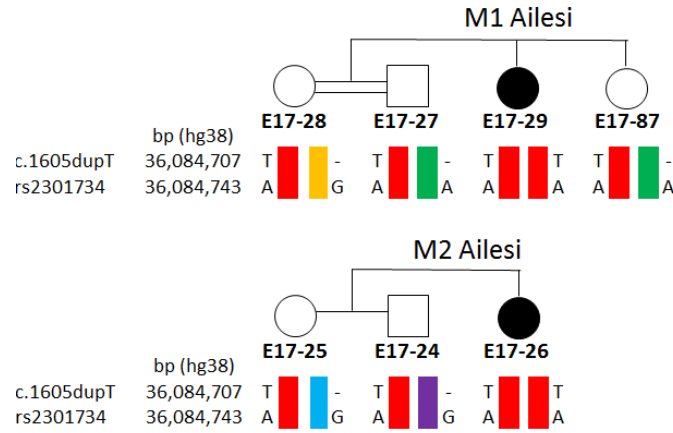
Şekil 4-6-A:M2 ailesi 13.kromozom CNV analizi için B allel frekansı ve LogR değerleri görüntüsü. E17_26 (hasta) ve E17_24 (baba) aynı kopya kaybına sahiptir, okla işaret edilmiştir. Anne (E17_25 herhangi kopya kaybı veya kazancına sahip değildir.

Maddi kaynak sağlandığında ise hasta birey ve ebeveynlerine trio-WES uygulanmıştır, bunun için MacroGen firmasından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Daha önceki hasta bireylere uygulanan kit Agilent SureSelect V6-without UTR kullanılmıştır. Firmanın tarafımıza ilettiği fastq dosyaları Sophia arayüzü ile işlenmiş ve sonuçlar

Sophia DDM ile yüksek derecede patojenikten zararsız varyanta kadar sınıflandırılmıştır. Ticari program Sophia'nın ham ekzom verilerinin anotasyonu için kullandığı biyoinformatik araçlar bilinmemektedir. Analiz sonucunda OMIM veri tabanında MCPH2 (MIM: 604317) ile ilişkili *WDR62* geninde daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş ancak M1 ailesinde E17_29'da (hasta bireyde) tespit edilen dur kodonu varyantı (Tablo 4-3); E17_26 kodlu hastamızda da saptanmıştır. Yapılan Sanger dizileme sonuçlarına göre *WDR62* dur kodon varyantının anne (09_E17_25_Fam2_mo_01F, 10_E17_25_Fam2_mo_01R), baba (11_E17_24_Fam2_mo_01F, 12_E17_24_Fam2_mo_01R) heterozigot taşıyıcısı iken hasta birey (13_E17_26_Fam2_mo_01F, 13_E17_26_Fam2_mo_01R) homozigot genotipine sahiptir (Şekil 4-4). Ailede segregasyon eden varyant hastanın fenotipini açıklayabilmektedir.

Her iki ailenin kan örneği vermek amacıyla ard arda iki farklı günde geldikleri ve bilgimize göre literatürde yer almayan nadir ve novel bu varyantın iki ailede de tespiti her ne kadar aynı şehir kökenli olsalarda öncelikle örnek karışıklığını akla getirmiştir. M1 ailesinde sağlıklı kız kardeşin (E17_87) diğer aile bireylerinden farklı bir günde kan örneği verdiği ve dizileme sonucuyla kanıtlanan heterozigot taşıyıcılığı aslında bize M1 ailesinde örnek karışıklığı olmadığını teyit etmektedir. Ancak yine de M1 ailesindeki hasta (E17_29) ve sağlıklı kız kardeş (E17_87) ikinci kez Sanger dizilemeye tabi tutulmuştur. Analiz sonucuna göre hasta (04_E17_29_Fam1_indeks_02R, 05_E17_29_Fam1_indeks_02F) homozigot, kızkardeş (07_E17_87_Fam1_sis_02R, 08_E17_87_Fam1_sis_02F) heterozigot *WDR62* novel varyantına sahiptir (Şekil 4-4).

Şekil 4-4'de dikkat edilirse rs2301734 kodlu (MAF=0.12) yaygın bir varyant vardır. Şekil 4-6-B'de bu varyantın haplotip analizine göre M1 ailesindeki baba E17_27 AA, M2 ailesindeki baba E17_24 AG genotipine sahiptir. Dolayısıyla bu varyantlar özelinden genelleme yapılarak babaların kesinlikle farklı bireyler olduğu söylenebilir.



Şekil 4-6-B: M1 ve M2 ailelerinin WDR62- NM_001083961.1:c.1605dupT ve rs2301734 varyantları açısından haplotip görseli. Hastalık ilişkili varyantın dahil olduğu haplotip kırmızı olarak işaretlemiştir. Hasta bireylerde bu haplotip için homozigotluk gözlenmektedir.

M2 ailesinden hasta ve ebeveynlerle irtibat kurularak yeni kan örneği istenmiş ve DNA izolasyonu Bölüm 3.2.1.1'deki gibi Qiagen Maxi kiti kullanılarak protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Yeni örneklerden elde edilen gDNA ile M2 ailesi teyit amaçlı ikinci kez sekans validasyonu ve segregasyon analiziyle WDR62- NM_001083961.1:c.1605dupT ve rs2301734 varyantları açısından incelenmiştir. Analiz sonucuna göre E17_26 kodlu hasta homozigot NM_001083961.1:c.1605dupT genotipe sahipken, ebeveynleri bu varyantın heterozigot taşıyıcısı olarak ikinci kez teyit edilmiştir (Şekil 4-6-C). Rs2301734 polimorfik varyant açısından ise ebeveynler AG, hasta ise AA genotipine sahiptir (Şekil 4-6-C).



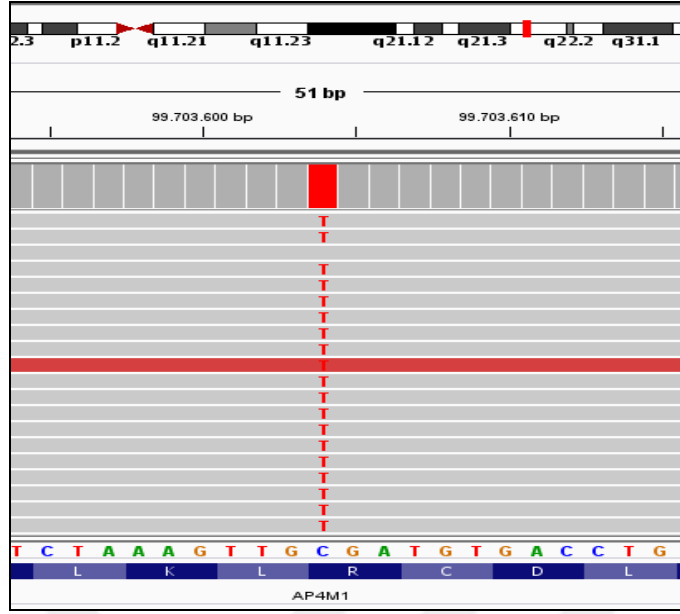
Şekil 4-6-C: NM_001083961.1:c.1605dupT ve rs2301734 varyantları için M2 ailesinin yeni gDNA örneklerinden elde edilen Sanger Dizileme kromatogram görselleri. E17_26- hasta, indeks, E17_25-mo-anne, E17_24-fa-baba.

4.1.2. M3 Ailesi

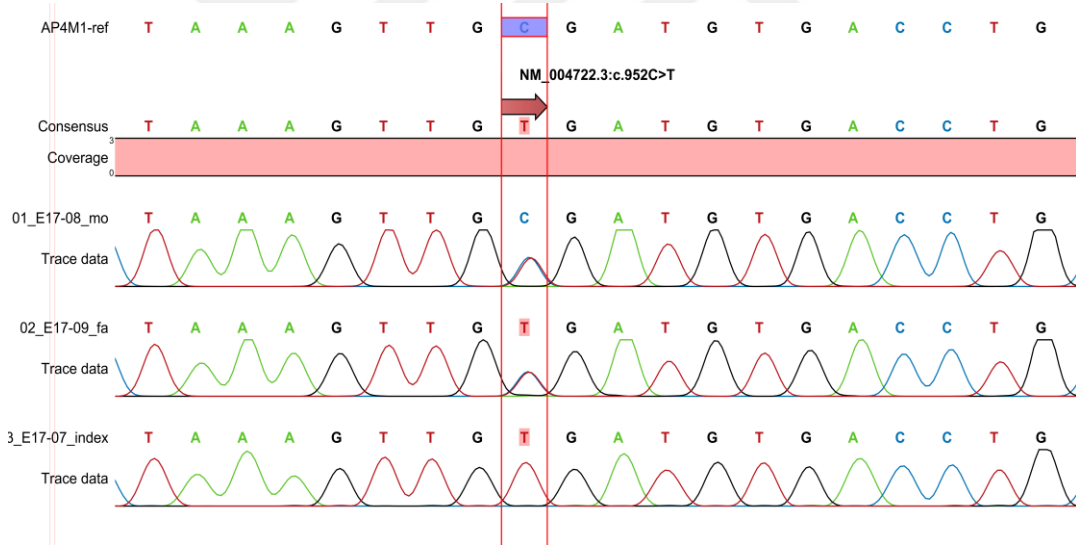
Ebeveynleri aynı köyden olan ve aralarında anne tarafından muhtemel akrabalık öyküsü bulunan ancak netleştirilemeyen E17_07 kodlu birey mikrosefali tanısını doğum öncesi dönemde almıştır. Mikrosefali bulgusunun eşlik ettiği zihinsel öğrenme yetersizliğinin yanı sıra hasta alt ekstremitelerde belirgin spastisite, üst ekstremitelerde hipoton, skolyoz, gelişim geriliği ve hidrosefaliye de sahip son derece heterojen fenotip sergilemektedir. Bir yaşına yakın ilk nöbetini geçirmiş ve 4 yaşında olan hastanın 5-6 nöbeti daha mevcuttur. Son yıllarda yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesiyle doğal yollardan gebelik elde edemeyen çiftlere *in vitro fertilizasyon* adı verilen embriyo transfer yöntemiyle çocuk sahibi olma şansı açılmıştır, olgumuzun ebeveynleride bu şanstı yararlanmıştır.

Olgunun ilk etapta VATK anotasyonlu verileri fenotipiyle uyumlu olduğunu düşündüğümüz bilinen MCPH gen varyantları ve panel genleri açısından (Bölüm 3.2.3.3 Tablo 3-5:1 a ve b) analiz edilmiş ancak varyasyon tespit edilememiştir. İkincil olarak aynı yöreden olmaları ve muhtemel akrabalık durumuda dikkate alınarak resesif kalıtım özelinde homozigot varyantlar analiz edilmiştir. Bunun için ekzom veri datası zigosite filtresi, MAF filtresi (frequency<0.01) ve OMIM fenotip filtresi (*microcephaly*, *intellectual disability* ve *mental retardation*) anahtar kelimeleri kullanılarak filtrelenmiştir (Bölüm 3.2.3.3, Tablo 3-5:2a). Bu analiz neticesinde daha önce literatürde SPG50 (Spastic paraplegia 50, autosomal recessive; MIM#612936) ile ilişkilendirilmiş *AP4M1* (adaptor related protein complex 4 subunit mu 1) rs730882249 dur kodon varyantı bizim hastamızın ekzom verilerinde de tespit edilmiştir (Şekil 4-6) [136].

Yapılan dizileme analiziyle hastanın *AP4M1* geni NM_004722.3:c.952C>T;p.Arg318* (rs730882249: ClinVar'da Patojenik ve Olası Patojenik [136]) varyantı açısından homozigot genotipe sahip olduğu ve ebeveynlerin heterozigot formda bu varyant açısından taşıyıcılığı kesinlik kazanmıştır (Şekil 4-7, Tablo 4-5). Referans protein dizisiyle erken sonlanma kodonu sebebiyle oluşan güdük proteinin karşılaştırmalı dizilimi Şekil 4-8'de gösterilmektedir.



Şekil 4-6: *AP4M1* dur kodon varyantının IGV görseli.



Şekil 4-7: *AP4M1*-NM_004722.3:c.952C>T varyantının ailesel dağılım görseli. Kırmızı ok varyantı işaret etmektedir. 01_E17_08_mo (Anne) ve 02_E17_09_fa (baba) heterozigot, indeks 03_E17_07_index homozigot varyanta sahiptir.

Tablo 4-5: *AP4M1*- NM_004722.3:c.952C>T varyantının özellikleri.

Gen	Transkript	Varyant	Varyant Etkisi	Lokasyon (Genomik)	Hastalık
<i>AP4M1</i>	NM_004722.3 ENST00000359593.8	c.952C>T (p.Arg318*)	Dur kodon	7:g.100105981C>T (hg38)	SPG50 (MIM: 612936)

Reference protein	
1	MISQFFILSS KGDPLIYKDF RGDSGGRDVA ELFYRKLTGL PGDESPVVMH HHGRHFHHR
61	HSGLYLVVTT SENVSPFSL ELLSRLATLL GDYCGSLGEG TISRNVAVY ELLDEVLDYG
121	YVQTTSTEML RNFIQTEAVV SKPFSLFDLS SVGLFGAETQ QSKVAPSSAA SRPVLSSRSD
181	QSQKNEVFLO VVERLSVLIA SNGSLLKVDV QGEIRLKSFL PSSEMIRIGL TEEFCVGKSE
241	LRGYGPGIRV DEVSFHSSVN LDEFESHRL RLQPPQGELT VMRYQLSDDL PSPLPFRFLP
301	SVQWDRGSGR LQVYLKLRCD LLSKSQALNV RLHLPLPRGV VLSQELSSP EQKAELAEGA
361	LRWDLPRVQG GSQLSGLFQM DVPGPPGPPS HGLSTSASPL GLGPASLSFE LPRHTCSGLQ
421	VRFLRLAFRP CGNANPHKWV RHLSHSDAYV IRI*
Protein predicted from variant coding sequence	
1	MISQFFILSS KGDPLIYKDF RGDSGGRDVA ELFYRKLTGL PGDESPVVMH HHGRHFHHR
61	HSGLYLVVTT SENVSPFSL ELLSRLATLL GDYCGSLGEG TISRNVAVY ELLDEVLDYG
121	YVQTTSTEML RNFIQTEAVV SKPFSLFDLS SVGLFGAETQ QSKVAPSSAA SRPVLSSRSD
181	QSQKNEVFLO VVERLSVLIA SNGSLLKVDV QGEIRLKSFL PSSEMIRIGL TEEFCVGKSE
241	LRGYGPGIRV DEVSFHSSVN LDEFESHRL RLQPPQGELT VMRYQLSDDL PSPLPFRFLP
301	SVQWDRGSGR LQVYLKLRCD*

Şekil 4-8: AP4M1 referans ve mutant protein diziliminin kıyas gösterimi.

4.2. Dominant Kalıtmı Bilinen Genlerde Tespit Edilen Varyantlar

4.2.1.M4 Ailesi

Bu ailenin ebeveynleri aynı yöreden olup 1.Derece kuzen evliliği gerçekleştirmişlerdir ailede bir sağlıklı bir de mikrosefali bulgusuyla ZY tanılı toplam 2 erkek çocuk vardır. Vaka 4 aylık havale öyküsüyle beraber gelişim geriliği, hipotoni, hipertelorizm, strabismus, sol elde smian çizgisi ve yüzde çeşitli dismorfik bulgular sergilemektedir. Son derece klinik heterojenite gösteren bu olgunun tüm ekzom dizileme -VATK anotasyonlu verilerinin- analizinde Bölüm 3.2.3.3'te (Tablo 3-5'te) anlatıldığı gibi öncelik bilinen MCPH ve panel genlerine verilmiştir. Sonraki adımda ebeveynler arasındaki aynı yöre ve akrabalık öyküsü dikkate alınarak resesif kalıtımla seyreden homozigot nadir varyantların analizi gerçekleştirilmiştir. Birleşik heterozigot varyant analizinde ise OMIM veritabanında Mental Retardation, Autosomal Recessive 38; (MRT38 OMIM#615516)'le ilişkili *HERC2* geninde alternatif allel okuma sayıları 2,8 ve 12 olan üç farklı varyant tespit edilmiştir (Tablo 4-6). Bu okuma sayılarının önceki Sanger validasyonu çalışmalarımızdan edindiğimiz deneyime göre yanlış pozitifliği yüksektir. İlaveten, MRT38 hastamızın ZY, gelişim geriliği, strabismus ve hipotoni bulgularını karşılamakta, ancak mikrosefali bulgusunu karşılamamaktadır. Tüm bu sebeplerle ve vakanın erkek cinsiyetinde olmasına istinaden dominant kalıtım analizine geçmeden önce X kromozomuna bağlı hemizigot nadir varyant analizi de

gerçekleştirilmiştir (Bölüm3.2.3.3.Tablo3-5:4.basamak). Ancak, bu analiz neticesinde de hastanın fenotipiyle ilişkili aday bir varyant tespit edilememiştir.

Son analiz basamağında, dominant kalıtım modeli, allel frekans ve OMIM filtresi *microcephaly*, *intellectual disability* ve *mental retardation* anahtar kelimeleri kullanılarak bilinen mikrosefali ve ZY genleri açısından analiz yapılmıştır. Neticede hastamızın fenotipiyle uyum gösteren 2. Kromozomdaki *SOX11*'de yaptığımız araştırma dahilinde veri tabanlarında kayıtlı olmayan novel bir varyant ve 21.kromozomda *DYRK1A*'da rs751513164 koduyla bildirilmiş toplam iki aday varyant tespit edilmiştir [(Tablo:4-6, Şekil 4-9: A) ve B)]. *SOX11* geni Mental Retardation, Autosomal Dominant 27 (MRD27,MIM#615866), *DYRK1A* geni ise Mental Retardation, Autosomal Dominant7 (MRD7,MIM# 614104) ile OMIM veri tabanında ilişkilendirilmiş genlerdir (Tablo:4-6).

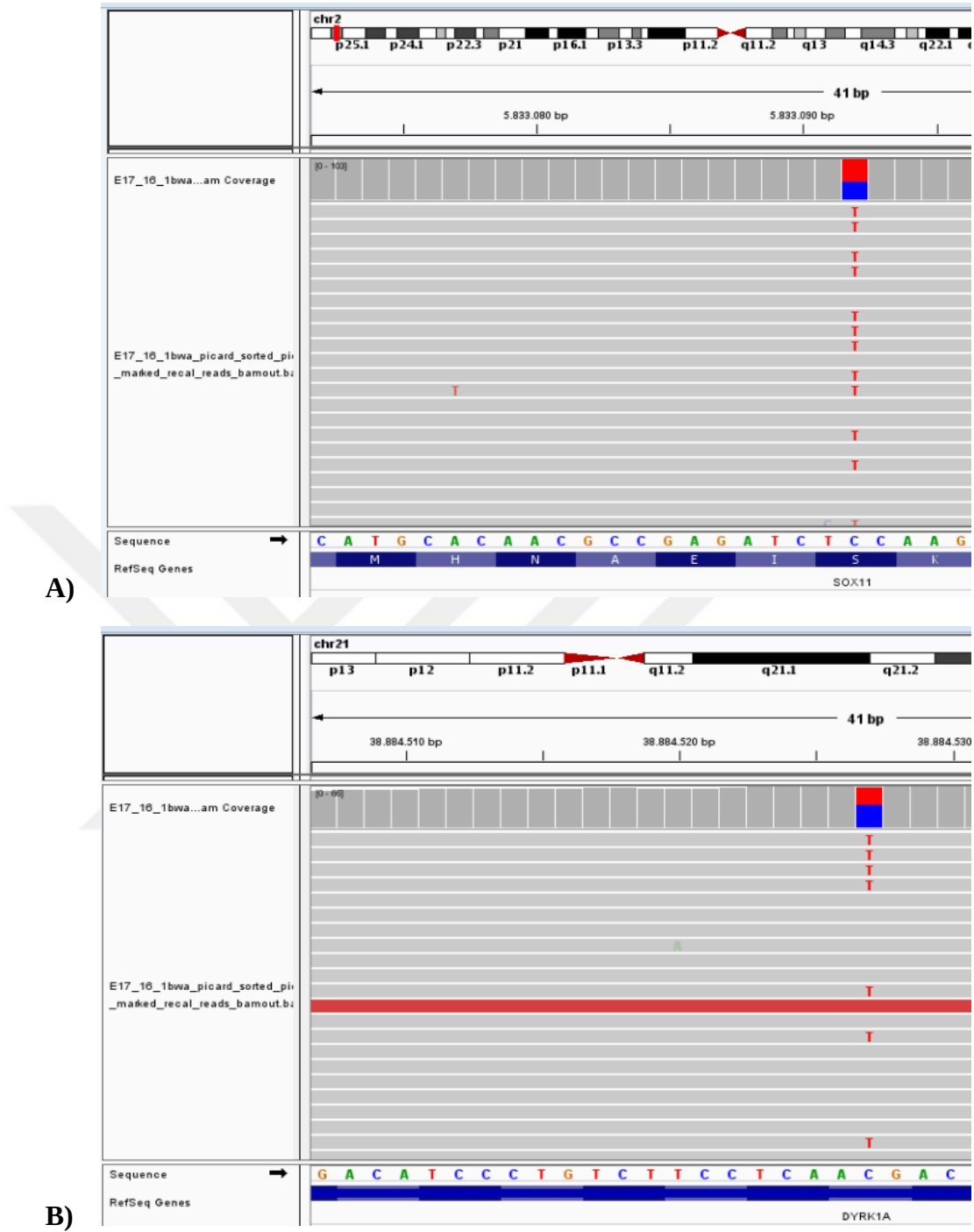
Tablo 4-6: E17_16 kodlu olguda tespit edilen aday varyantlar.

Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık
chr2:5833092	43,57	<i>SOX11</i>	ENST00000322002.3:c.239C>T	MRD27
chr15:28446615	3,2	<i>HERC2</i>	ENST00000261609.7:c.7703G>T	MRT38
chr15:28518115	87,8	<i>HERC2</i>	ENST00000261609.7:c.836del	MRT38
chr15:28518153	76,12	<i>HERC2</i>	ENST00000261609.7:c.801-3C>G	MRT38
chr21:38884527	34,27	<i>DYRK1A</i>	ENST00000398960.2:c.1985C>T	MRD7

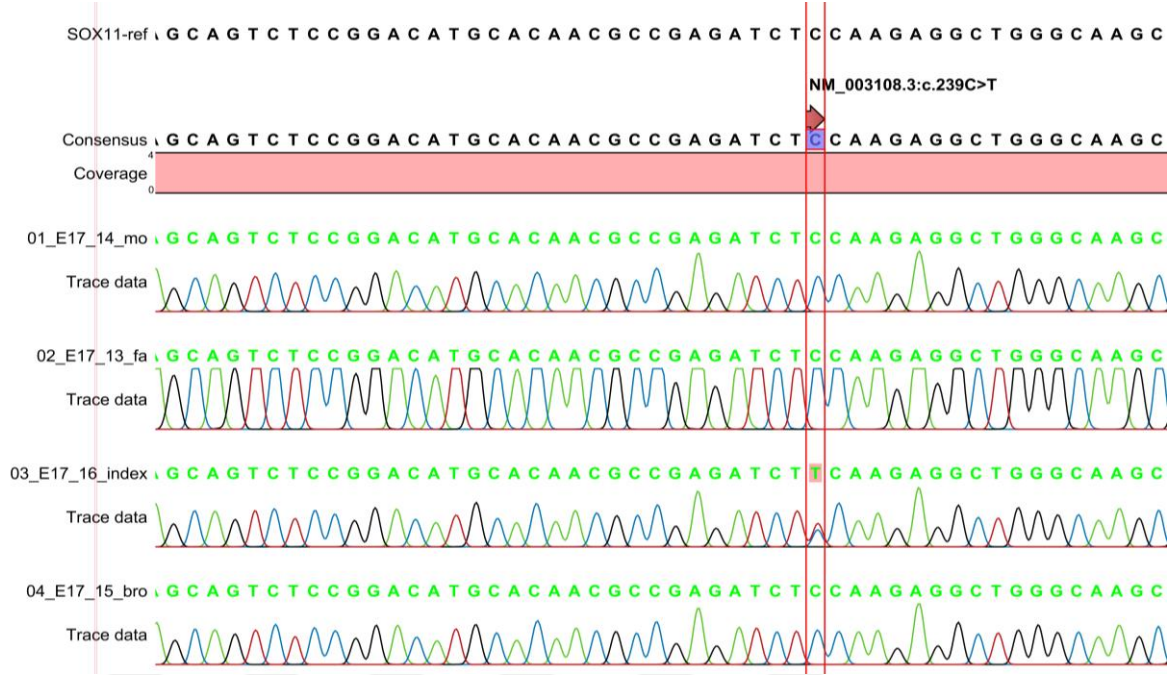
*Sırasıyla Referans ve alternatif allelerin okunma sayısı. Major bulgu gri ile işaretlenmiştir.

DYRK1A'daki aday varyantın gnomAD veri tabanında 4 kişide heterozigot formda bulunmuş olması ACMG kılavuzu kriterlerine göre varyantın elenmesi için yeterlidir (bakınız bölüm 3.2.3.3 ACMG-BS2 kriteri) [127]. MRD27'deki beşinci ayak ve el parmak tırnak hipoplazisi fenotip bulguları hastamızda yeniden yapılan ayrıntılı klinik değerlendirme çerçevesinde saptanmış olup, *SOX11* varyantı Tablo 4-6'daki en kuvvetli olası patojenik varyant olarak öne çıkmıştır.

Yapılan sekans analiziyle E17_16 kodlu hastamızın bu varyant açısından heterozigot genotipe sahip olduğu doğrulanırken, ailesel segregasyon analizine göre ebeveynlerin ve sağlıklı kardeşinde yabanıl tip homozigot olduğu kesinlik kazanmıştır (Şekil 4-10). Ayrıca, bu gende aynı lokalizasyonda yer alan farklı bir değişim c.239C>A; p.S80Y COSMIC veri tabanında (COSM6787415) bildirilmektedir.



Şekil 4-9: *SOX11* (A) ve *DYRK1A* (B) genlerinde tespit edilen aday varyantların IGV görseli.



Şekil 4-10: SOX11- NM_003108.3:c.239C>T varyantı için M4 ailesi Sanger kromatogram görseli.

Tablo 4-7: SOX11- NM_003108.3:c.239C>T varyantının özellikleri.

Gen	Transcript	Varyant	Varyant Etkisi	Lokasyon (Genomik)	Hastalık
SOX11	NM_003108.3 ENST00000322002.4	c.239C>T (p.Ser80Phe)	Yanlış anlamlı varyasyon	2:g.5692960 C>T (hg38)	MRD27 (OMIM: 615866)

ACMG kılavuzu kriterlerine göre daha önce ailede hastalık öyküsü yoksa ve olguda tespit edilen varyant *de novo* ise patojenik etkisini kanıtlamak için aile uyumunun gösterilmesi şarttır (ACMG-PS2 kriteri) [127]. Bunun için ebeveynler ve hasta için uyguladığımız tüm genom genotiplendirme yöntemiyle elde edilen SNP genotiplerinin yer aldığı excell verisinde annenin AA/BB, babanın BB/AA çocuğun ise zorunlu AB heterozigot olduğu durumlar belirlenmiştir. Her iki durumdan çocuğun AA veya BB olduğu ve çipin okuma yapmadığı durumlar çıkarılarak aile uyumu hesaplanmıştır. Tablo 4-8-a,b ve 9'da örnek olarak 1.kromozomdaki ilk 10'ar SNP sunulmuştur. Yapılan hesaplama ve sonuçlara göre aile uyumu %99,836 olarak bulunmuştur (Tablo 4-9).

Tablo 4-8-a: Annenin AA, babanın BB ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin örnek listesi. (hg19)

Kromozom	Pozisyon	SNP kodu	E17_13(Baba)	E17_14(Anne)	E17_16(Çocuk)
1	37055734	rs6682952	AA	BB	AB
1	37488337	rs522481	AA	BB	AB
1	37509352	rs2859741	AA	BB	AB
1	37902331	rs10908350	AA	BB	AB
1	38092723	rs4074961	AA	BB	AB
1	38098036	rs4233215	AA	BB	AB
1	38121934	rs10908366	AA	BB	AB
1	38721663	rs11802770	AA	BB	AB
1	38738105	rs12075194	AA	BB	AB

Tablo 4-8-b: Annenin BB, babanın AA ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin örnek listesi. (hg19)

Kromozom	Pozisyon	SNP kodu	E17_13(Baba)	E17_14(Anne)	E17_16(Çocuk)
1	36585077	rs12074848	BB	AA	AB
1	37070248	rs12063741	BB	AA	AB
1	37074351	rs4653210	BB	AA	AB
1	37785527	rs10908340	BB	AA	AB
1	37796436	rs4653277	BB	AA	AB
1	37809549	rs727670	BB	AA	AB
1	37939173	rs2492301	BB	AA	AB
1	38078300	rs4652964	BB	AA	AB
1	38465315	rs4634868	BB	AA	AB

Tablo 4-9: a) Anne (AA), baba (BB) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması ve c) Anne (BB), baba (AA) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplamasıyla ailesel uyum hesabı. NC: No call.

a	Anne AA ve Baba BB olduğu SNP'ler (Çocuk zorunlu heterozigot olmalı)	14.871
b	(a) sıklığında çocukta okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	36
c	Anne BB ve Baba AA olduğu SNP'ler (Çocuk zorunlu heterozigot olmalı)	15.021
d	(c) sıklığında çocukta okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	36
e	Analize dahil edilen toplam SNP sayısı = a+c-b-d	29.820
f	(a) sıklığında çocuğun AB olmadığı SNP sayısı (=AA veya BB)	23
g	(c) sıklığında çocuğun AB olmadığı SNP sayısı (=AA veya BB)	26
h	Çocuğun zorunlu heterozigotluğa uymadığı toplam SNP sayısı = f+g	49
i	Çocuğun AB olduğu SNP sayısı = e-h	29771
j	Beklenen trio dağılımını bozan SNP yüzdesi = h*100/e	%0,164
k	Beklenen trio dağılımındaki SNP yüzdesi = i*100/e	%99,836

4.2.2.M5 Ailesi

1.Derece kuzen çocuğu ile evlilik bulunan ailede hasta bireyin mikrosefali bulgusu gebelikte teşhis edilmiştir. Bu teşhise eşlikçi ZY’le şuan 11 yaşında olan kız hastada hipertelorizm ve konuşma geriliği mevcuttur. Bu olgunun VATK anotasyonlu ekzom veri analizlerinde önceki hastalarda olduğu gibi (E17_29 ve E17_26 kodlu hastalar hariç bakınız Bölüm 4.1.1) bilinen MCPH ve panel genleri ile ilişkili sonuç saptanamamıştır. Analiz stratejimizin (Bölüm 3.2.3.3) 2.analiz basamağında resesif kalıtım modeli, MAF ve OMIM filtrelerine göre filtrelediğimiz ekzom veri listesi analizinde resesif kalıtmı bilinen genler için aday saptanamamıştır. Ancak, 5. analiz basamağının a şıkında dominant kalıtım modeline göre yapılan analizde hasta için toplam 4 aday varyant tespit edilmiştir (Tablo 4-10). Resesif ve dominant kalıtmı bilinmeyen genler için elde edilen aday varyantlar ise Tablo 4-11 ve Tablo 4-12’de özetlenmektedir. Bu hastanın ekzom verisine analiz strateji basamaklarının tamamının uygulanmasıyla fenotiple uyumlu olabilecek toplam 42 aday varyant tespit edilmiştir.

Tablo 4-10: E17_31 kodlu hasta için dominant kalıtmı bilinen genlerde tespit edilen aday varyantlar.

Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık
chr5:14397234	31,25	TRIO	ENST00000344204.4:c.4394A>G	MRD44
chr9:95055722	5,9	IARS	ENST00000375643.3:c.-8+1G>T	GRIDHH
chr10:94353214	20,15	KIF11	ENST00000260731.3:c.77+5G>C	MCLMR
chr11:124791089	12,5	HEPACAM	ENST00000298251.4:c.1196G>A	MLC2B

*Sırasıyla Referans ve alternatif allelerin okunma sayısı. Major bulgu gri ile işaretlenmiştir.

Tablo 4-11: E17_31 kodlu birey için resesif kalıtmı bilinmeyen genlerdeki aday varyantlar.

Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Varyantın bilinen rs kodu
chr4: 2943419	0,70	NOP14	ENST00000314262.6:c.2089C>T	rs61740573
chr4: 4861703	0,31	MSX1	ENST00000382723.4:c.77G>C	rs567549350
chr4: 5578101	0,35	EVC2	ENST00000310917.2:c.2898C>G	rs73074138
chr4: 5630442	0,32	EVC2	ENST00000310917.2:c.1490T>C	rs113869406
chr10:11894195	0,49	PROSER2	ENST00000277570.5:c.119G>A	rs148688412
chr10:50740659	0,135	ERCC6	ENST00000355832.5:c.352C>T	rs377708438
chr17:72340981	0,34	KIF19	ENST00000389916.4:c.664G>A	rs34016821

*Sırasıyla Referans ve alternatif allelerin okunma sayısı

Tablo 4-12: E17_31 kodlu hasta birey için dominant kalıtmı bilinen genlerdeki aday varyantlar.

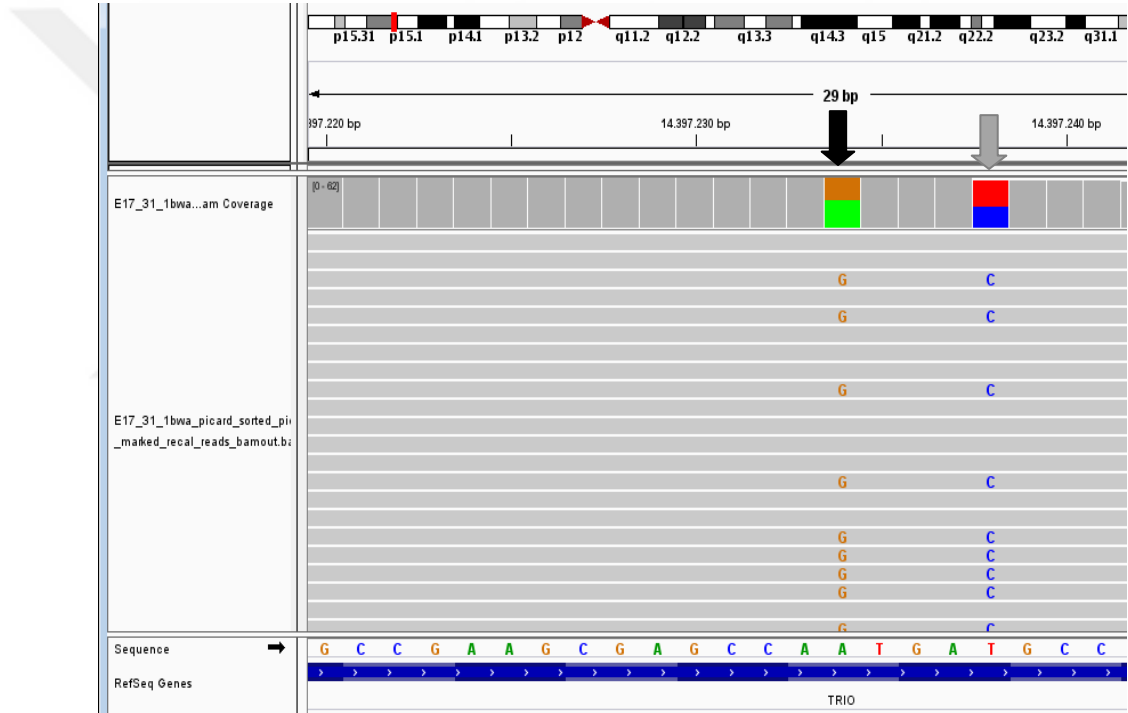
Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Varyantın bilinen rs kodu
chr1: 16890671	40,93	NBPF1	ENST00000430580.2:c.3187A>G	-
chr1: 16891365	62,12	NBPF1	ENST00000430580.2:c.3113C>T	-
chr1: 16901021	119,19	NBPF1	ENST00000287968.8:c.454T>C	-
chr1: 16909220	10,3	NBPF1	ENST00000392963.5:c.209A>G	-
chr1: 23520526	61,59	HTR1D	ENST00000314113.3:c.187A>T	rs115985527
chr1: 33958995	69,91	ZSCAN20	ENST00000361328.3:c.1653G>C	-
chr1: 39818738	33,26	MACF1	ENST00000289893.4:c.6579G>C	-
chr1:145368518	147,28	NBPF10	ENST00000342960.5:c.10496C>T	rs61813437
chr1:146420092	21,18	NBPF12	ENST00000309471.8:c.1702C>A	-
chr1:202698950	24,21	KDM5B	ENST00000367264.2:c.4490G>A	rs139343230
chr1:203024616	62,51	PPFIA4	ENST00000272198.6:c.368G>T	-
chr1:212118173	37,19	INTS7	ENST00000366992.3:c.2494C>A	-
chr1:212118180	38,19	INTS7	ENST00000366992.3:c.2487T>C	-
chr2: 73496103	18,22	FBXO41	ENST00000295133.5:c.839T>C	-
chr2: 73496249	23,20	FBXO41	ENST00000295133.5:c.693G>T	-
chr2: 99787052	23,19	MITD1	ENST00000289359.2:c.541G>C	-
chr3: 432816	24,20	CHL1	ENST00000256509.2:c.2765C>G	rs746209242
chr3: 49698525	30,7	BSN	ENST00000296452.4:c.9247T>A	-
chr3:184103913	18,28	CHRD	ENST00000204604.1:c.1898C>T	rs201020244
chr7:104753188	28,24	KMT2E	ENST00000257745.4:c.4985T>C	rs144315355
chr8:135522334	37,28	ZFAT	ENST00000521673.1:c.92del	rs560485775
chr8:145739430	37,40	RECQL4	ENST00000428558.2:c.1940G>T	rs372664774
chr16: 3716025	40,19	TRAP1	ENST00000246957.5:c.1330T>A	rs61756351
chr16: 71898924	19,25	ZNF821	ENST00000313565.6:c.68C>T	rs139528518
chr18: 8825568	43,38	SOGA2	ENST00000306285.7:c.2035G>A	rs538316788
chr18: 25589724	21,27	CDH2	ENST00000269141.3:c.659C>T	rs199534055
chr19: 46974132	23,22	PNMAL1	ENST00000313683.10:c.161G>A	rs565739284
chr19: 47856483	31,38	DHX34	ENST00000328771.4:c.196C>T	rs553380305
chr20: 62904903	17,18	PCMTD2	ENST00000308824.6:c.1036C>G	-
chrX:118603873	101,11	SLC25A5	ENST00000317881.8:c.361G>T	rs753913830
chrX:153187092	36,54	ARHGAP4	ENST00000350060.5:c.238C>T	COSM4662938

*Sırasıyla Referans ve alternatif allelerin okunma sayısı.

Bir önceki sayfada yer alan Tablo 4-12'nin devamıdır.

Çalışmamız süresince analizleri devam eden bu olgu, ebeveynleri ve sağlıklı kardeşiyle birlikte başka bir merkez tarafından klinik ekzom dizilemeye tabi

tutulmuştur. Bu dizileme sonuçlarıyla kendi aday varyant listemizi merkezle irtibata geçerek karşılaştırdığımızda Tablo 4-10'daki *TRIO* gen varyantı dışındaki varyantlarla, Tablo 4-11 ve Tablo 4-12'deki varyantların tümü adaylığını yitirmiştir. Çünkü, dominant kalıtmıli heterozigot varyantların ebeveynlerde ve/veya sağlıklı kız kardeşte/de bulunması ya da resesif kalıtmıli homozigot varyanta sağlıklı kardeşinde sahip olması listemizi tek aday varyanta (*TRIO*) indirgemıştır. Diğer merkez tarafından *TRIO* varyantı ise ebeveynlerde ve sağlıklı kardeşte bölgenin teknik olarak dizilenememiş, sadece hastada dizilenebilmiş olması sebebiyle direk elenmiştir. Kendi ekzom datamızda tespit ettiğimiz *TRIO* aday varyantına ait IGV görseli Şekil 4-11'de sunulmaktadır.



Şekil 4-11: *TRIO* geninde NM_007118.3:c.4394A>G IGV görseli. Siyah ok ekzom listesindeki *TRIO* aday varyantı, Gri ok ise T>C rs30774, MAF=0.39 yaygın değişimi aynı okumalarda işaret etmektedir.

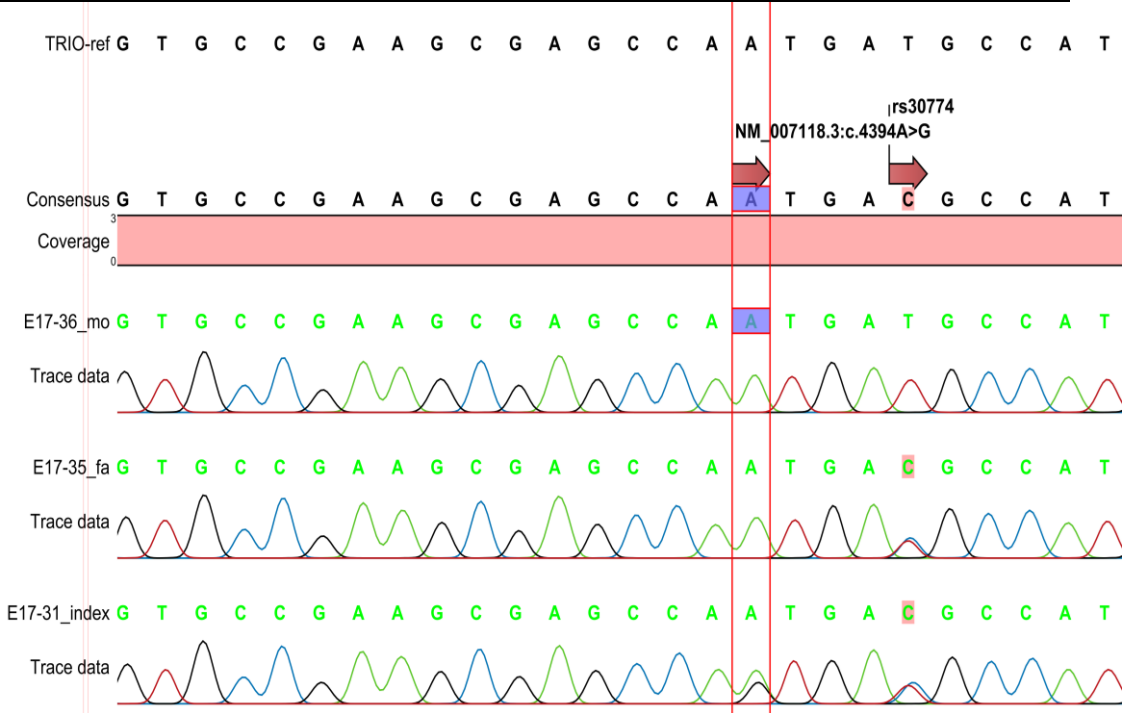
Analizler sonucunda elimizde tek aday varyantın kaldığı *TRIO* geni daha önce OMIM veri tabanında MRD44 (Mental Retardation, Autosomal Dominant 44; MRD44; MIM#617061) ile ilişkilendirilmiştir. MRD44 hastanın fenotipi ile son derece uyumlu klinik özelliklere sahiptir (Tablo 4-1).

Yapılan ailesel segregasyon analizinde ebeveynlerin *TRIO* NM_007118.3:c.4394A>G;p.Asn1465Ser varyantı açısından referans homozigot genotipe, E17_31 kodlu indeksin ise heterozigot *de novo* varyasyona sahip olduğu

kesinleşmiştir (Tablo 4-13, Şekil 4-12). Valide edilen bu varyant, değişimlerin toplum sıklığını kontrol ettiğimiz germline mutasyon veri tabanları gnomAD ve ExAC'ta yer almaz iken somatik mutasyon veritabanı COSMIC'te gözlenmiştir (**COSM5516939**).

Tablo 4-13: *TRIO*- NM_007118.3: c.4394A>G varyantının özellikleri.

Gen	Transkript	Varyant	Varyant Etkisi	Lokasyon (Genomik)	Hastalık
<i>TRIO</i>	NM_007118.3 ENST00000344204.8	c.4394A>G (p.Asn1465Ser)	Yanlış Anlamlı mutasyon	5:g.14,397,125 (hg38)	MRD44 (MIM:617061)



Şekil 4-12: *TRIO*-NM_007118.3:c.4394A>G varyantının ailesel segregasyon görseli. NM_007118.3:c.4394A>G, rs30774 (MAF:0.39) gösterilmektedir.

Önceki bölüm 4.2.1’de de bahsedildiği gibi *de novo* *TRIO* varyantı için ACMG-PS2 kriteri gereğince ailesel uyumun kanıtı gerekmektedir. Annenin AA/BB, babanın BB/AA çocuğun ise zorunlu AB heterozigot olduğu durumlarla, çocuğun AA veya BB olduğu ve çipin okuma yapmadığı durumlar excell üzerinden filtrelenerek, aile uyumu hesaplanmıştır. Tablo 4-14,15 ve 16’da örnek olarak 1.kromozomdaki ilk 10’ar SNP sunulmuştur. Yapılan hesaplama ve sonuçlara göre aile uyumu %99,825 olarak bulunmuştur (Tablo 4-16).

Tablo 4-14: Annenin BB, babanın AA, ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin 10 tanesinin listesi. (hg19)

Kromozom	Pozisyon	SNP kodu	E18_35(Baba)	E18_36(Anne)	E17_31(Çocuk)
1	891945	rs13303106	AA	BB	AB
1	1110586	rs9442387	AA	BB	AB
1	1664124	rs2294489	AA	BB	AB
1	2222583	rs903919	AA	BB	AB
1	2240006	rs2173049	AA	BB	AB
1	2522392	rs2296443	AA	BB	AB
1	2898960	rs6681741	AA	BB	AB
1	2919942	rs12022429	AA	BB	AB
1	2938265	rs4576609	AA	BB	AB

Tablo 4-15: Annenin AA, babanın BB, ve çocuğun AB genotipini sağladığı kromozom 1'deki SNP'lerin 10 tanesinin listesi. (hg19)

Kromozom	Pozisyon	SNP kodu	E18_35(Baba)	E18_36(Anne)	E17_31(Çocuk)
1	994391	rs2488991	BB	AA	AB
1	1335790	rs1240708	BB	AA	AB
1	1663831	rs3817856	BB	AA	AB
1	1865298	rs2803316	BB	AA	AB
1	1926087	rs6661597	BB	AA	AB
1	2251160	rs12082516	BB	AA	AB
1	2849190	rs12403214	BB	AA	AB
1	2905605	rs10909852	BB	AA	AB
1	2917377	rs12025260	BB	AA	AB

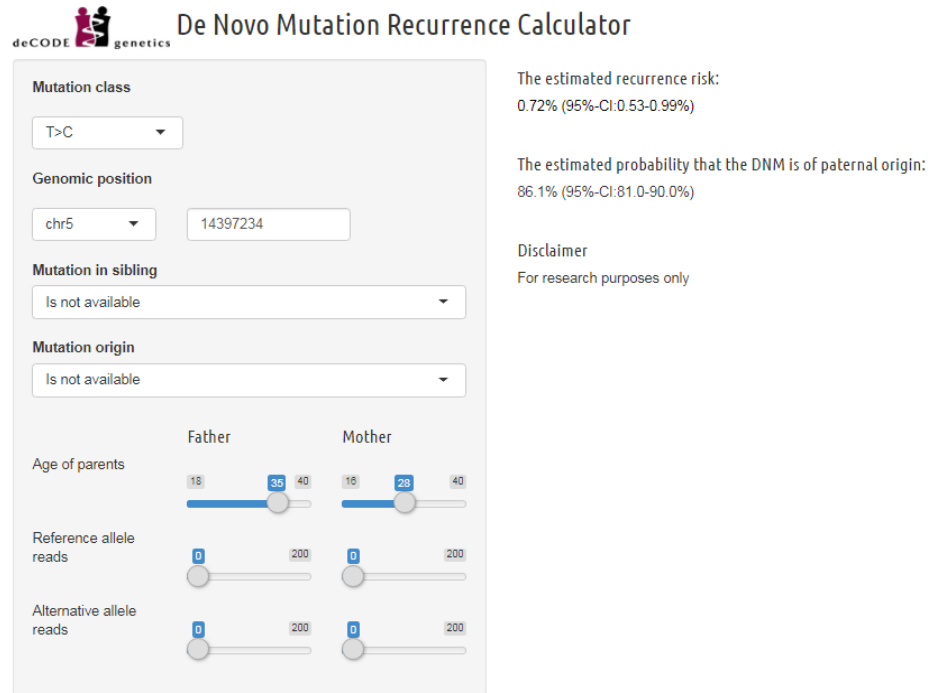
Tablo 4-16: a) Anne (AA), baba (BB) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplaması ve c) Anne (BB), baba (AA) ve çocuk (AB) olduğu durum hesaplamasıyla ailesel uyum hesabı.

NC: No call.

a	Anne AA ve Baba BB olduğu SNP'ler (Çocuk zorunlu heterozigot olmalı)	18.196
b	(a) şıkında çocukta okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	77
c	Anne BB ve Baba AA olduğu SNPler (Çocuk zorunlu heterozigot olmalı)	18.435
d	(c) şıkında çocukta okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	46
e	Analize dahil edilen toplam SNP sayısı = a+c-b-d	36.508
f	(a) şıkında çocuğun AB olmadığı SNP sayısı (=AA veya BB)	30
g	(c) şıkında çocuğun AB olmadığı SNP sayısı (=AA veya BB)	34
h	Çocuğun zorunlu heterozigotluğa uymadığı toplam SNP sayısı = f+g	64
i	Çocuğun AB olduğu SNP sayısı = e-h	36.444
j	Beklenen trio dağılımını bozan SNP yüzdesi = h*100/e	%0,175
k	Beklenen trio dağılımındaki SNP yüzdesi = i*100/e	%99,825

Genel olarak germline *de novo* mutasyon oranı genetik hastalığı olan kişilerde, olmayanlara göre daha yüksek olabilir ve ileri baba yaşı ile ilişkili artan bir mutasyon yükünün olduğu varsayılmaktadır [79]. Geleneksel dizileme yöntemlerine kıyasla daha uzun okumaların elde edilebildiği WES tekniğiyle, hastamızda IGV görüntüsünde patojenik mutasyonun 3 baz sonrasında yaygın bir değişim rs30774 T>C, (MAF=0.39) aynı okumalarda (cis oryantasyonlu) yer almaktadır (Şekil 4-11). Bu değişimler takip edilerek *de novo* varyantın ebeveyn kaynağı öne sürülebilir.

Sanger validasyonu ile hem hastanın hem de babanın bu değişime sahip olması hastadaki *de novo* varyantın baba allelinde meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4-12). Ayrıca, Jónsson ve ark yaptığı bir çalışmada parental orijin, parental yaş, mozaiklik gibi pek çok durum incelenerek *de-novo* mutasyon tekrarlama risk tahmini ve ebeveyn kaynağı ile ilgili bir algoritma oluşturulmuştur (<http://de-novo-risk.decode.is>) [80]. Bu hesaplama göre, *de novo* *TRIO* varyantının tahmini tekrarlama riski %0,72 iken baba kökenli olma olasılığı ise %86,1'dir (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: *TRIO de novo* varyantının olası tekrarlama riski ve ebeveyn kaynağının olasılık hesabı. Mutation class: A>G, Genomic position: chr5 14397234, Mutation in siblings: ulaşılabilir değil, Mutation origin: ulaşılabilir değil, Father baba yaşı: 35 Mother anne yaşı: 28 Reference allele reads: 0 Alternatif allele reads: 0.

4.3. Fenotipiyle İlişkili Aday Varyant Tespit Edilememiş Olgular

4.3.1. M6 Ailesi

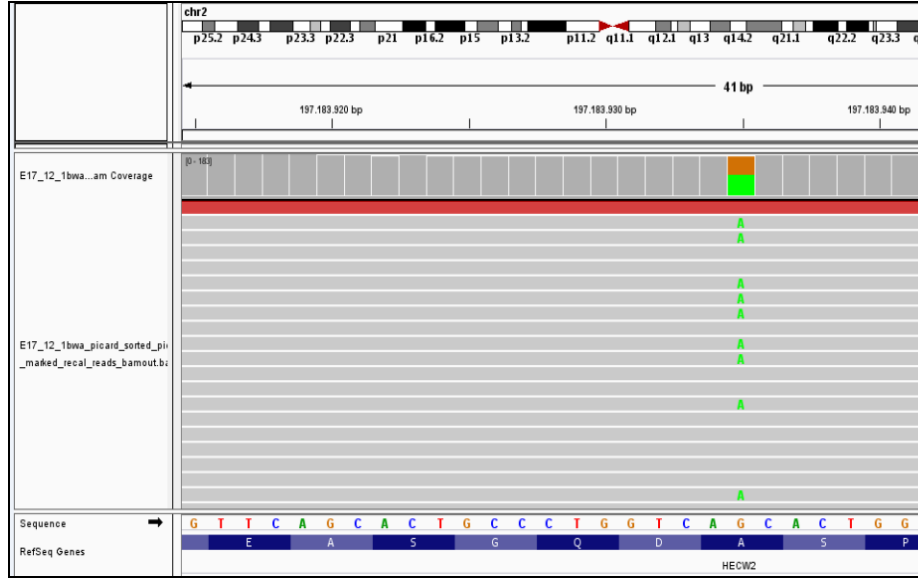
Ebeveynleri arasında aynı yöre veya akraba evliliği olmadığı bilgisine sahip olduğumuz E17_12 kodlu hasta gebelikte saptanan mikrosefali ve korpus kallosum agenizisi ile ZY'e sahiptir. Bunların yanında epilepsi, nistagmus, ataksi, spastisite (sağda) ve brakisefalisi mevcut son derece heterojen fenotipli bir hastadır. Hastanın gebelikte saptanan mikrosefali bulgusundan hareketle analiz basamaklarımız sırasıyla VATK anotasyonlu ekzom verilerine uygulanmıştır.

MCPH ve panel genleri ile ilişkili varyant saptanamayan veri listesinde, resesif kalıtlı bilinen genler için aday bulunamamıştır. Ancak, dominant kalıtlı bilinen genler için yapılan analizde *TRIO*, *HECW2* ve *KIRREL3* genleriyle, resesif kalıtlı birleşik heterozigot varyanta sahip *KIAA1033* genine ait aday varyantlar tespit edilmiştir (Tablo 4-17). Tablo 4-17 dikkatle incelendiğinde, *TRIO* ve *HECW2* geni dışındaki genlerin alternatif allellerinin okuma sayılarının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca, *HECW2* *de novo* mutasyonları nörogelişimsel gerilik, ZY, nöbetler, strabismus, nistagmus, hipotoni ve dismorfik yüz bozuklukları ile ilişkisi literatürde bildirilmiştir [137]. Fenotiple uyumu sebebiyle öncelik *HECW2* varyantının validasyonuna verilmiştir (Şekil 4-14).

Tablo 4-17: E17_12 kodlu olguda bilinen genler için tespit edilen aday varyantlar.

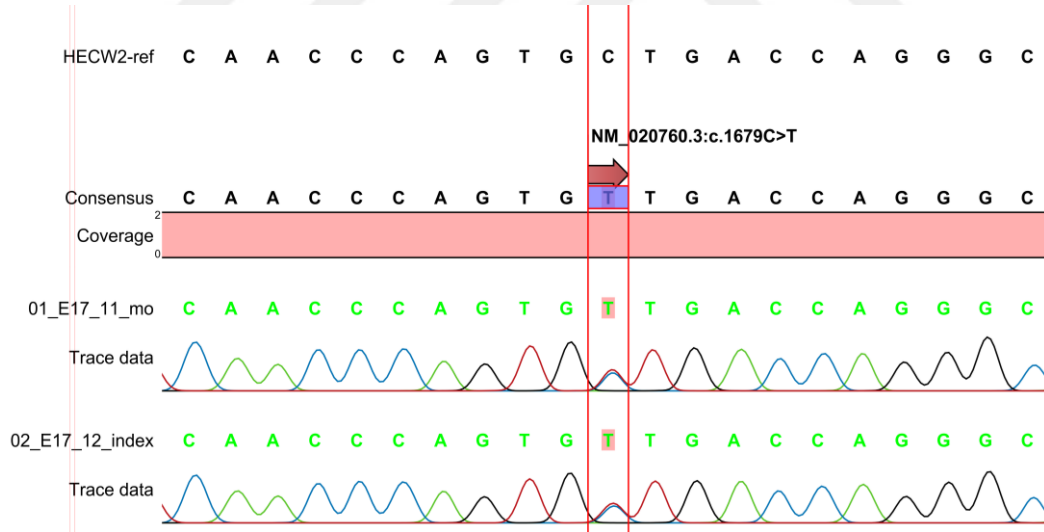
Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık
2	80,86	<i>HECW2</i>	ENST00000260983.3:c.1679C>T	NDHSAL
5	11,12	<i>TRIO</i>	ENST00000344204.4:c.7137_7148dup	MRD44
11	24,3	<i>KIRREL3</i>	ENST00000525144.2:c.591+4A>T	MRD4
11	26,3	<i>KIRREL3</i>	ENST00000525144.2:c.590A>T	MRD4
11	26,3	<i>KIRREL3</i>	ENST00000525144.2:c.589A>T	MRD4
12	4,2	<i>KIAA1033</i>	ENST00000332180.5:c.1039-2A>G	MRT43
12	18,2	<i>KIAA1033</i>	ENST00000332180.5:c.2386T>C	MRT43

*Sırasıyla referans ve alternatif allelerin okunma sayısı. Major bulgu gri ile işaretlenmiştir.



Şekil 4-14: HECW2-chr2:NM_020760.3:c.1679C>T IGV görseli.

Yapılan Sanger dizileme ile HECW2-chr2:NM_020760.3:c.1679C>T; p.Ala560Val varyantı hasta ve annede aynı heterozigot genotipte bulunmasıyla adaylığını yitirmiştir (Şekil 4-15). Babaya ise ulaşılammıştır.



Şekil 4-15: HECW2 aday varyantının kromatogram görseli.

(01_E17_11_mo =anne, 02_E17_12_indeks = hasta).

Bölüm 3.2.3.3’de ifade edildiği gibi resesif ve dominant kalıtmı bilinen genler için yapılan analiz sonucunda bu hastanın fenotipiyle birebir örtüşen kuvvetli bir aday belirlenememiştir. Tablo 4-17’de yer alan *TRIO* geninin ilişkili olduğu MRD44 hastanın fenotipiyle bire bir örtüşmemektedir. Sonuç olarak hastanın fenotipini açıklayacak herhangi bir varyantın bulunamamış olması hastanın VATK anotasyonlu ekzom verilerinin tüm analiz strateji basamaklarının baştan sona uygulanmasıyla ikinci

kez yeniden analiz edilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Tablo 4-18’le ikinci analiz sonucunda resesif, dominant ve X’e bağlı kalıtım için elde edilen aday varyantlar sunulmaktadır.

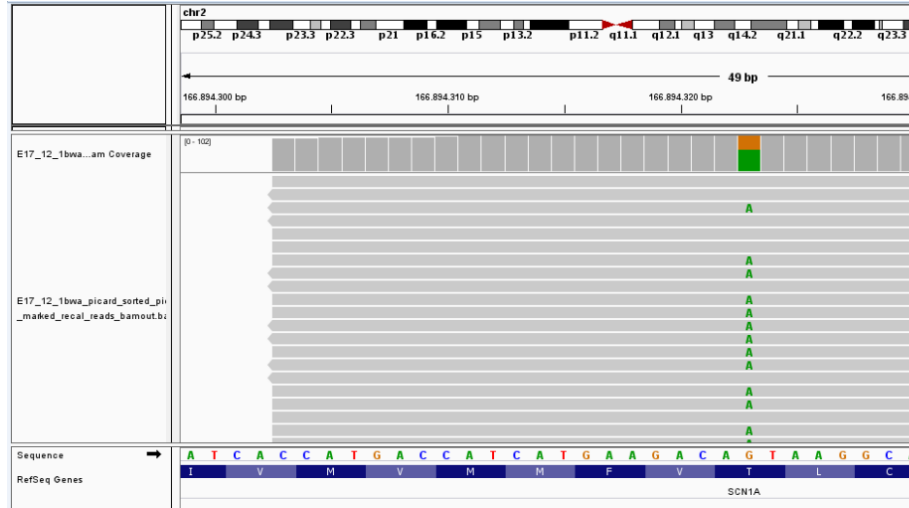
Tablo 4-18: E17_12 kodlu hastanın ikinci ekzom analiziyle tespit edilen muhtemel varyantlar.

Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık
8	0,42	<i>FBXL6</i>	ENST00000331890.5:c.1225+5_1225+6insTTGTTCTGGGTTGTGGCCAGGCACGTGAGGTGTGGGGGCCCTGTGCCGTGC	-
X	3,37	<i>VCX3B</i>	ENST00000381029.4:c.409_498del	-
1	15,6	<i>CPSF3L (INTS11)</i>	ENST00000411962.1:c.1314-2A>T	-
3	48,45	<i>PLXNA1</i>	ENST00000251772.4:c.4441-4G>T	-
5	11,12	<i>TRIO</i>	ENST00000344204.4:c.7137_7148dup	MRD44
7	38,6	<i>RELN</i>	ENST00000343529.5:c.1402A>C	LIS2, ETL7
1	21,20	<i>EIF2B3</i>	ENST00000360403.2:c.71C>T	VWM
1	9,16	<i>CEP350</i>	ENST00000367607.3:c.1192C>G	-

*Sırasıyla referans ve alternatif allellerin okunma sayısı.

Hastanın doğumdaki baş çevresinin 35cm. yani normal sınırlarda, ilerleyen dönemde gelişim geriliğiyle birlikte seyreden acquiried yani *kazanılmış mikrosefalisinin* olduğu ayrıca ilk günlerinde başlayan ateşli nöbet öyküsünde varlığı açıklık kazanmıştır. Ancak, ikinci analiz sonuçlarına göre bu ek bulguları karşılayan aday varyant listemizde (Tablo 4-18) yer almamaktadır.

Bu yeni fenotip bilgileri ışığında DOVE iş akışı modeliyle (Bölüm 3.2.3.2) E17_12 kodlu hastanın ham ekzom verilerinin üçüncü kez anotasyonu sağlanmış ve analiz strateji basamaklarının (Bölüm 3.2.3.3) sırayla uygulanmasıyla üçüncü kez analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kez 5. analiz basamağında a) seçeneğinde dominant kalıtmı bilinen genlerin analizinde Dravet Sendromla (DS) ilişkisi bilinen *SCN1A* geninde heterozigot yanlış anlamlı bir varyant saptanmıştır, IGV görseli Şekil 4-16’dadır.



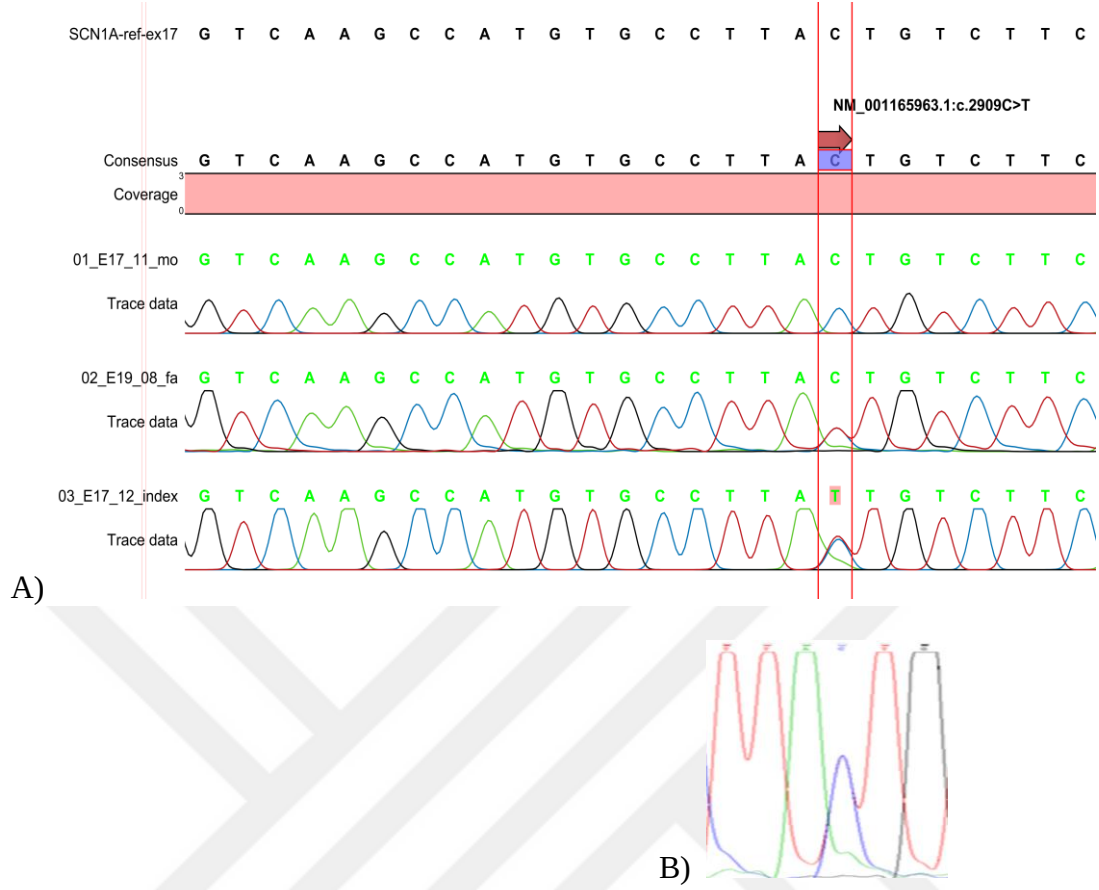
Şekil 4-16: SCN1A-NM_001165963.1:c.2909C>T varyantı IGV görseli.

SCN1A *de novo* varyantlarının DS vakalarının çoğunluğunu oluşturduğunun bilinmesi [138], ek bulgular ışığında hastanın fenotipinin sendroma uyumu, nadir olan varyantın gnomAD veri tabanında 1 kişide tespit edilsede IGV görüntüsünün veritabanında erişilebilir olmaması, korunmuş bir bölgede yer alması varyantın incelenmesi gerekliliğini kuvvetlendirmiştir (Şekil 4-17).

NP_001159435.1	942	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	991
XP_003309330.1	942	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	991
XP_001101023.1	942	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	991
XP_005640320.1	942	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	991
NP_001180147.1	931	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	980
NP_061203.2	931	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	980
NP_110502.1	942	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIRNLVVLNLFALL	991
XP_003641634.1	951	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCI	TVFMMVMVIGNLVVLNLFALL	1000

Şekil 4-17: SCN1A-NM_001165963.1:c.2909C>T; p.Thr970Ile evrimsel korunmuşluk gösterimi.

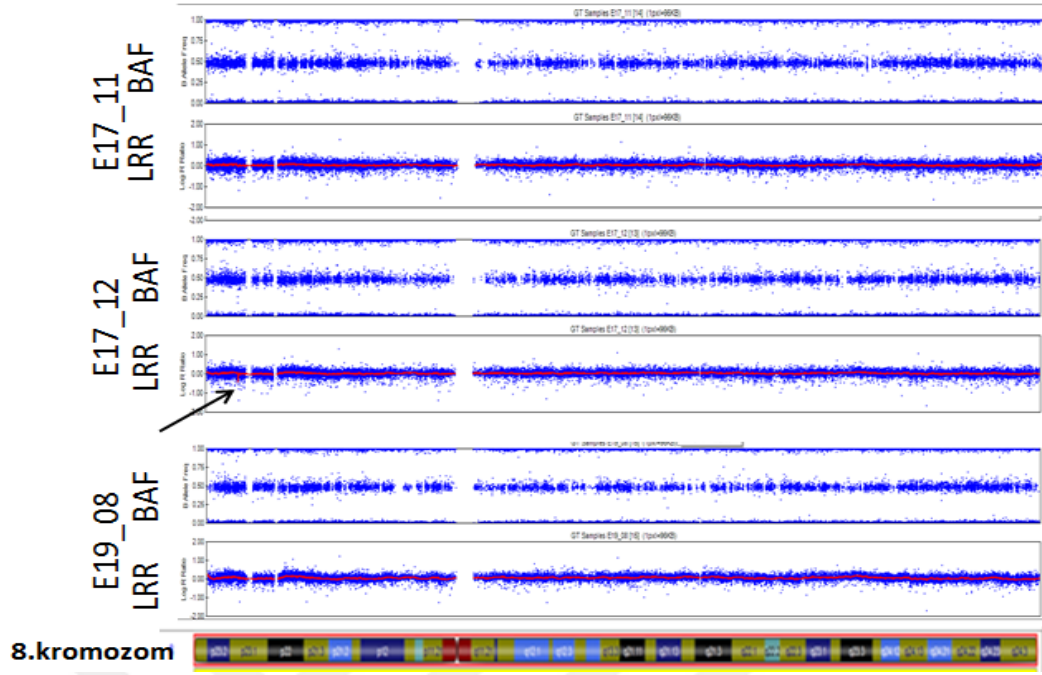
Yapılan Sanger analiziyle *SCN1A*-NM_001165963.1:c.2909C>T varyantının hasta (03_E17_12_index) ve babada (02_E19_08_fa) heterozigot, annede (01_E17_11_mo) ise yabancıl tip homozigot olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-18:A ve B). Her ne kadar fenotip bilgileri Dravet sendromla uyumluluk göstersedeyse, varyant fenotipi açıklayamaz. Sonuç olarak, E17_12 kodlu birey için üç farklı anotasyon modeli uygulanmış ve ekzom veri analizleri hatta tekrarlı analizleri neticesinde fenotipi açıklayabilecek olası bir varyant bulunamamıştır.



Şekil 4-18: A) *SCN1A*-NM_001165963.1:c.2909C>T varyantının ailesel dağılım gösterimi

B) E19_08 kodlu bireyde (baba) varyantın (siyah okla işaret edilmiştir) kromas görüntüsü.

Tüm ekzom dizileme verileriyle çözümleyemediğimiz bu hastaya tüm genom genotiplendirme yöntemide uygulanmıştır. Yapılan CNV analizi neticesinde sadece hastanın 8.kromozomunda delesyon bir bölge tespit edilmiştir ancak detaylı incelendiğinde bölgede (hg19-Chr8:5.599.399 -5.605.087) spesifik bir gen yoktur (Şekil 4-19). Anne, baba ve olgunun diğer kromozomlarında da tespit edilmiş CNV mevcut değildir.



Şekil 4-19: M6 ailesinin 8.kromozomuna ait BAF ve LRR görseli.

Ok olgudaki kayıp bölgeyi işaret etmektedir.

4.3.2. M7 Ailesi

2.derece kuzen çocuğu ile evlilik bulunan ailede E17_23 kodlu birey Down Sendromu ve çeşitli dismorfik bulgularla birlikte ileri hipotoni, gelişim geriliği, kortikal displazi, mikrosefali, mental ve motor retardasyon klinik bulgularına sahiptir. Dış bir merkez tarafından yapılmış olan AffymetrixCytoScan-1500Karray raporu: arr[hg19] 21q11.2q22.3(15,006,457-47,919,747)x3, 3p14.2p11.1(60,743,057-90,485,635)hmz, 3q11.1q13.11(93,536,053-104,239,779)hmz, 6p12.3p11.147,086,923-58,741,497)hmz, 6q11.1q21(61,968,745-105,943,342)hmz olarak sonuçlandırılmıştır.

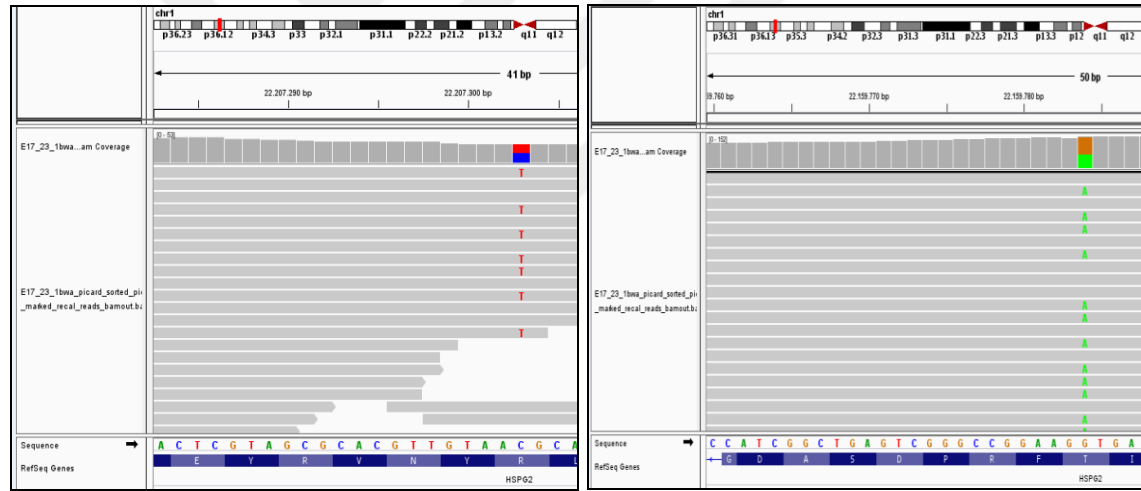
Yalnızca indeks tüm ekzom dizilemeye tabi tutulmuş ve VATK anotasyonlu dosyalar üzerinden yapılan analize göre bilinen MCPH ve panel genleri ile ilişkili varyant tespit edilememiştir (Bölüm3.2.3.3,Tablo3-5). Ancak resesif ve dominant kalıtmı bilinen genler için yapılan analizde Tablo 4-19'da gösterildiği gibi *PLEKHG2*, *HSPG2*, *DYRK1A* aday varyantları tespit edilmiştir. *PLEKHG2* ve *HSPG2* ilişkili fenotip hastanın sadece gelişim geriliği ve dismorfik bulgularıyla uyumluyken, *DYRK1A* ilişkili fenotip hastanın mikrosefali, ZY, hipotoni, gelişim geriliği ve dismorfik tüm bulgularını karşılamaktadır. Her ne kadar alternatif alel okuma sayısı düşük (Tablo 4-19 bakınız sadece 5) olsada vakanın 21. kromozom açısından trizomik

olduğu göz önünde bulundurularak (Şekil 4-30) *DYRK1A* varyantı pozitif bulgu olarak değerlendirilmiştir. Tespit edilen aday varyantlara ait IGV analizleri de Şekil 4-20, 4-21 ve 4-22’de sunulmuştur.

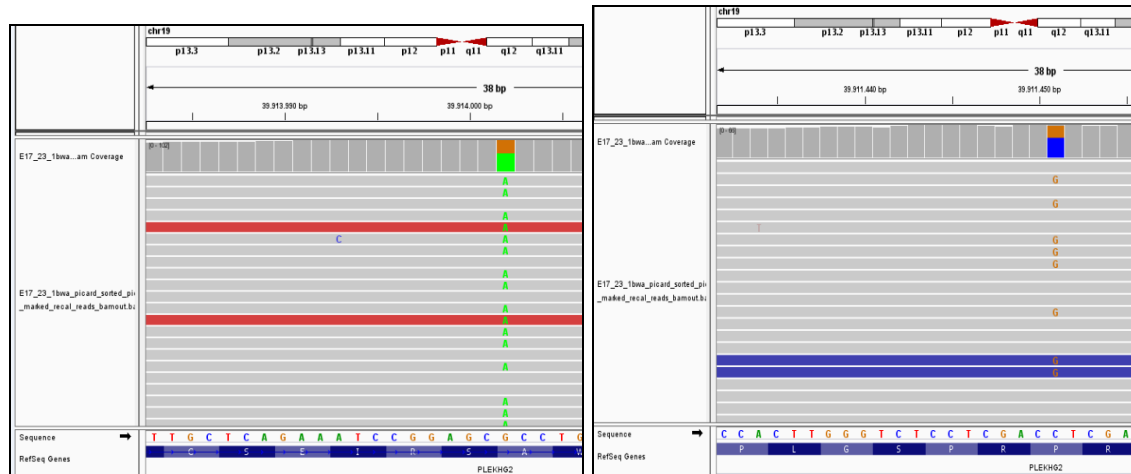
Tablo 4-19: Dominant ve resesif kalıtmı bilinen gen varyantları.

Lokali zasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık	Varyantın bilinen rs kodu
1	72,57	<i>HSPG2</i>	ENST00000374695.3:c.11 072C>T	SJS1, DDSH	rs149159881
1	13,12	<i>HSPG2</i>	ENST00000374695.3:c.18 44G>A	SJS1, DDSH	rs189089389
19	42,57	<i>PLEKHG2</i>	ENST00000425673.1:c.22 21G>A	LDAMD	rs111487768
19	38,23	<i>PLEKHG2</i>	ENST00000205135.4:c.10 48C>G	LDAMD	rs34975345
21	37,5	<i>DYRK1A</i>	ENST00000321219.8:c.76 G>A	MRD7	-

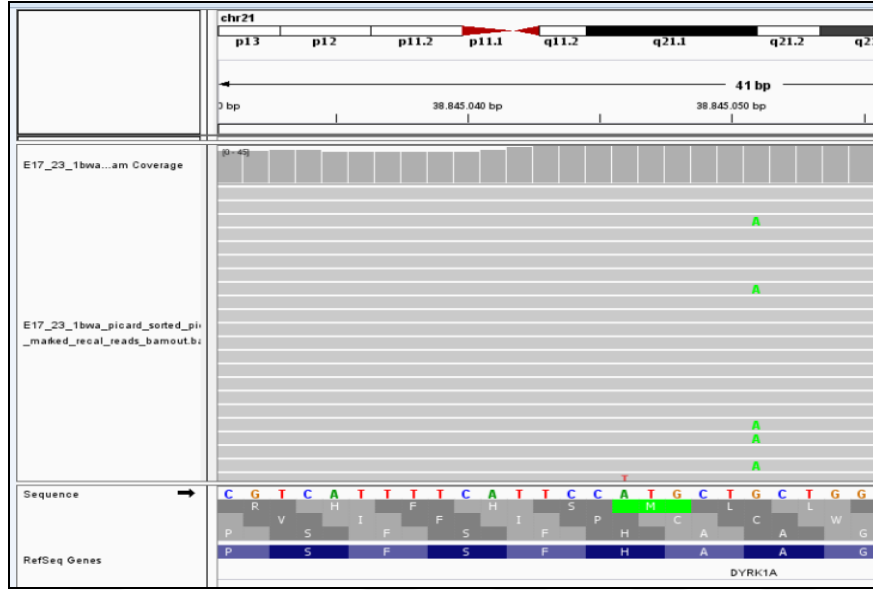
*Sırasıyla Referans ve alternatif alellerin okunma sayısı.



Şekil 4-20: *HSPG2* geninde aday iki varyantın IGV görseli.

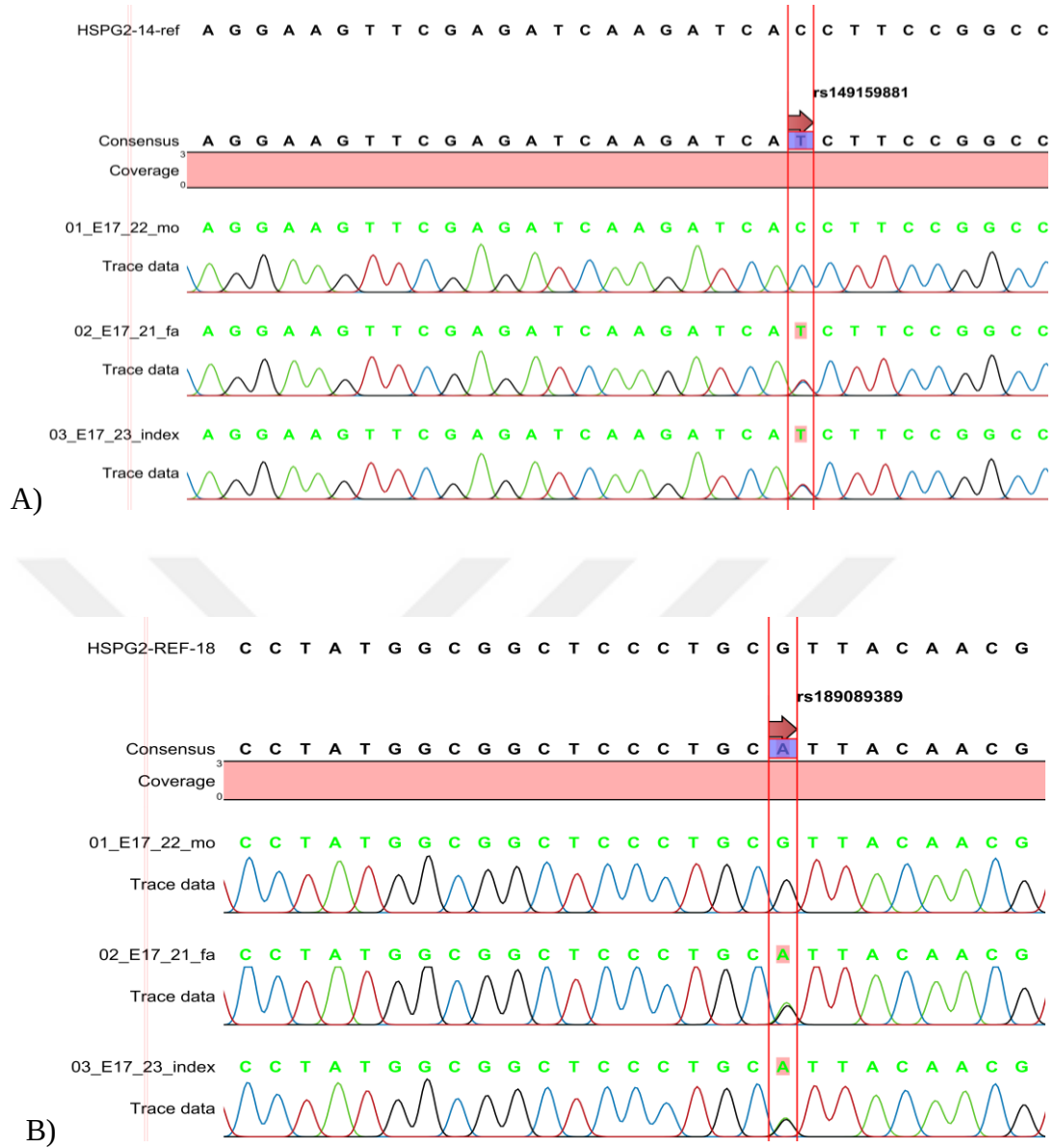


Şekil 4-21: *PLEKHG2* varyantlarının IGV görseli.

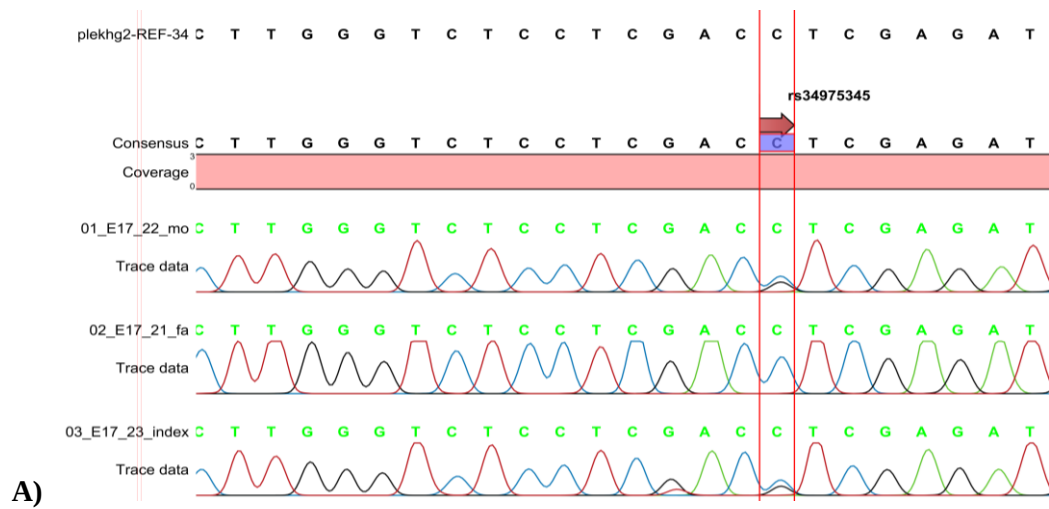


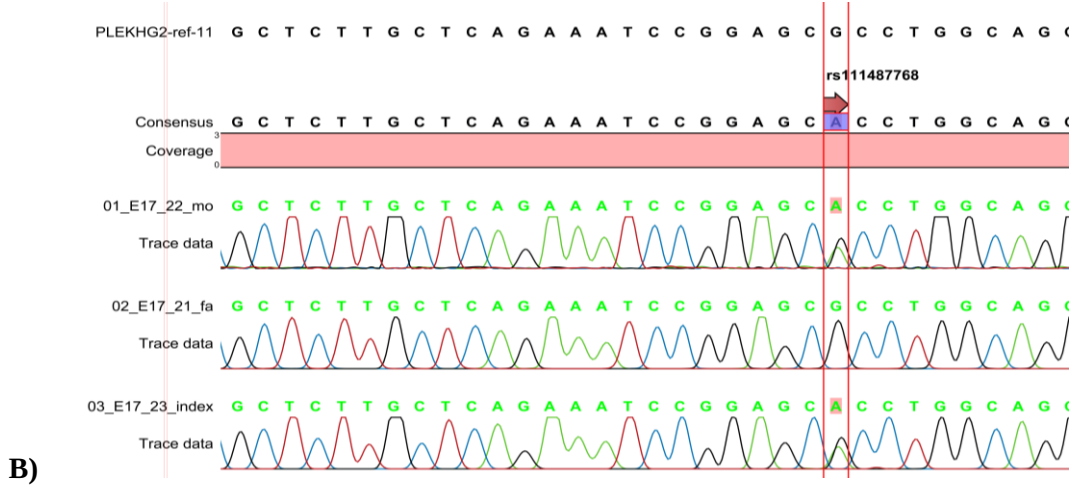
Şekil 4-22: *DYRK1A* aday varyantının IGV görseli.

Beş gen varyantının validasyonu ve ailesel segregasyonu Sanger dizileme ile gerçekleştirilmiştir. *HSPG2* rs149159881 G>A ve rs189089389 G>A değişimlerine ait dizileme sonucuyla hasta (03_E17_23_index) ve baba (02_E17_21_fa) her iki varyantın heterozigot taşıyıcısı, anne (01_E17_22_mo) ise bu varyantlar açısından yabanıl tip homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-23). *PLEKHG2* rs34975345 C>G ve rs111487768 G>A değişimleri için ise hasta (03_E17_23_index) ve anne (01_E17_22_mo) heterozigot genotipe sahipken baba (02_E17_21_fa) her iki varyant için de yabanıl tip homozigottur (Şekil 4-24). MRD7 ile ilişkilendirilmiş olan *DYRK1A* genindeki aday varyant için ise hasta (03_E17_23_index) ve anne (01_E17_22_mo) heterozigot taşıyıcı, baba (02_E17_21_fa) yabanıl tip homozigottur (Şekil 4-25). Sonuç olarak *HSPG2*, *PLEKHG2* ve *DYRK1A* varyantları ailesel dağılım göstermediği için adaylıkları ortadan kalkmıştır.

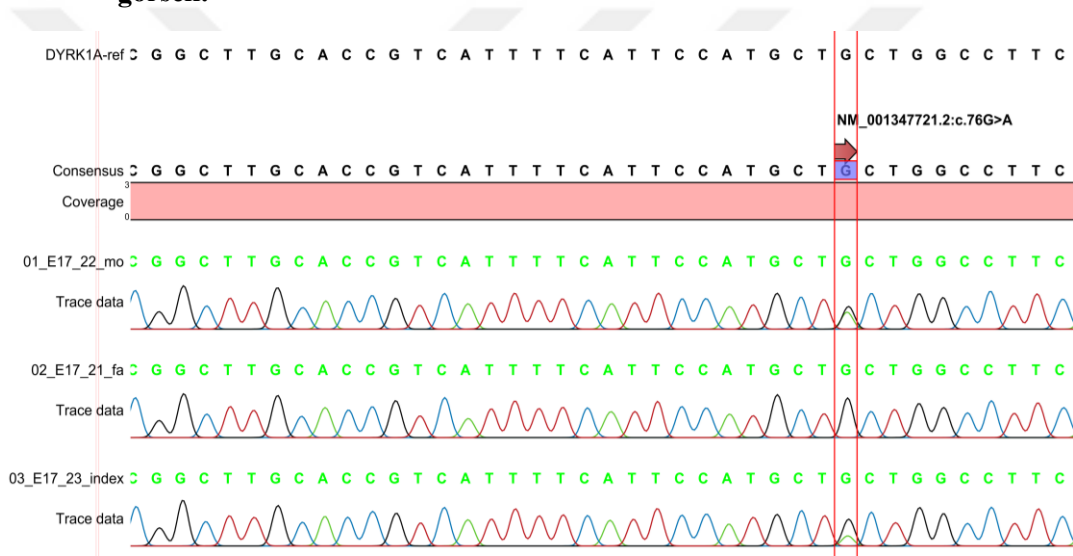


Şekil 4-23: HSPG2 rs149159881(A) ve rs189089389 (B) ailesel segregasyon gösterimi.





Şekil 4-24: PLEKHG2 A) rs34975345 C>G ve B) rs111487768 G>A ailesel segregasyon görseli.



Şekil 4-25: DYRK1A- NM_001347721.2:c.76G>A varyantının ailesel dağılım görseli.

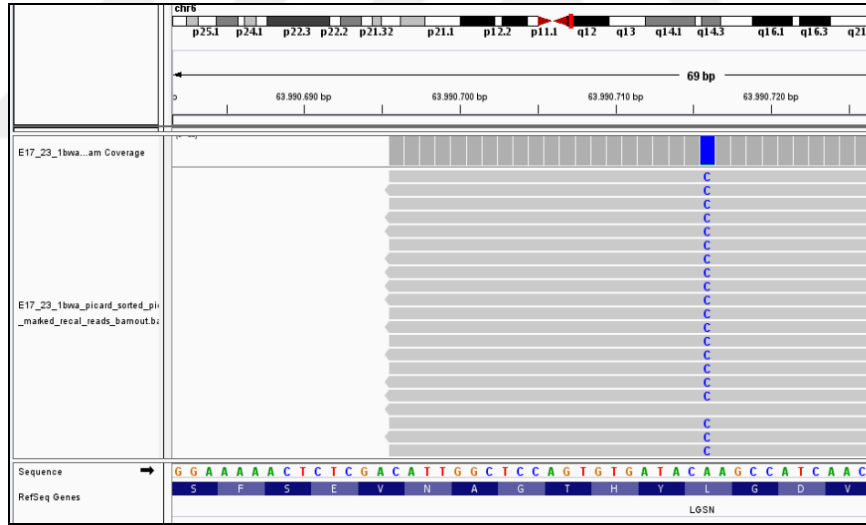
Olgumuzun VATK anotasyonlu ekzom verilerinin resesif ve X kromozom kalıtmı bilinen genler için yapılan analizinde Tablo 4-X’de gösterilen 2 aday varyant tespit edilmiştir. Omurgalı göz lensinde şaparon protein olarak görev yapan pseudo-glutamin proteinini kodlayan *LGSN* (Lengsin, Lens Protein With Glutamine Synthetase Domain) genindeki rs1166386174 kodlu değişim gnomAD (gnomAD v2.1.1) ve Ensembl (hg38.p12) veri tabanlarında homozigot genotiple bildirilmemiştir. Bu değişim her 3 tahmin aracına göre hastalık yapıcı etkiye sahiptir (Tablo 4-20) ve varyasyonun IGV analizi Şekil 4-26’da sunulmuştur. Plexin proteininin semaforinler için reseptör olarak görev yaptığı bilinen *PLXNB3* genindeki aday varyant rs781784671, her 3 tahmin aracına göre zararlı olarak değerlendirilmesine (Tablo4-20), beyin, korteks ve serebellumda yüksek seviyede eksprese edildiği tespit edilmesine ve ayrıca 0.00004

düşük allel frekansına sahip olmasına rağmen gnomAD veritabanında 4 kişide hemizigot olarak bulunduğundan validasyon çalışmasına alınmamıştır. Hatırlanacağı üzere önceki bölümlerde de sözü edildiği gibi ACMG kriterlerine göre X'e bağlı kalıtmıda sağlıklı tek bir erkek bireyde varyantın hemizigot olarak tespiti elenmesi için yeterlidir [127].

Tablo 4-20: Resesif ve X kromozomu kalıtmı bilinen ve bilinmeyen gen varyantları. (hg19).

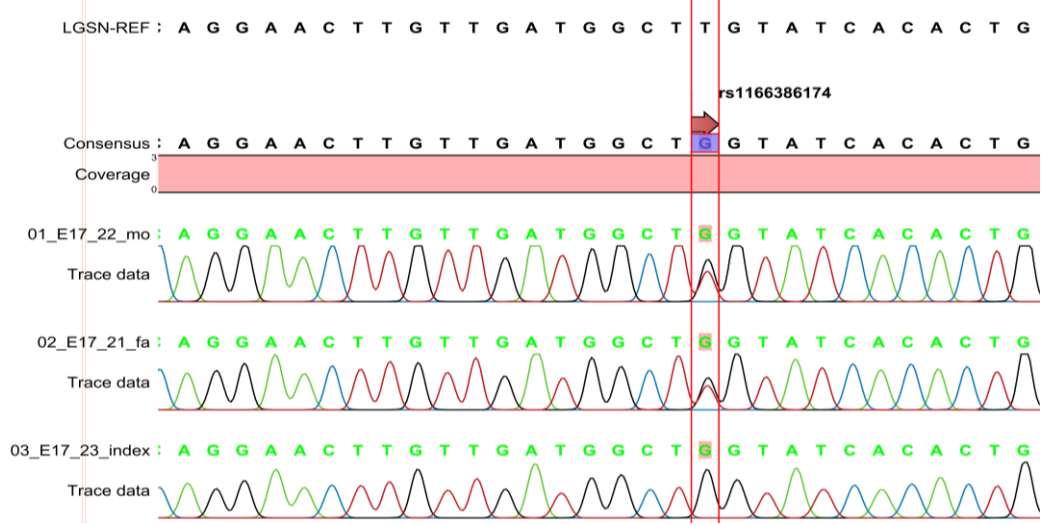
Lokalizasyon	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Varyantın bilinen rs kodu	Polyphen Tahmini ve skoru	Sift Tahmini ve Skoru	Mutation Taster Tahmini ve Skoru
6	0,22	LGSN	ENST00000370657.4: c.740T>G	rs1166386174	Muhtemel zararlı (1.00)	Zararlı (0)	Hastalık Yapıcı (0.98)
X	3,41	PLXNB3	ENST00000361971.5: c.5390C>T	rs781784671	Muhtemel zararlı (0.995)	Zararlı (0)	Hastalık Yapıcı (0.99)

*Sırasıyla Referans ve alternatif alellerin okunma sayısı.



Şekil 4-26: LGSN rs1166386174 A>C varyantının IGV görseli.

Yapılan sanger dizileme analiziyle LGSN-rs1166386174 kodlu homozigot yanlış anlamlı değişimin hastada (03_E17_23_index) doğrulandığı, anne (01_E17_22_mo) ve babanın (02_E17_21_fa) varyantın heterozigot taşıyıcısı olduğu dolayısıyla ailede segreg ettiği kesinleşmiştir (Şekil 4-27).



Şekil 4-27: LGSN rs1166386174 A>C varyantının ailesel segregasyon görseli.

Bu hasta için analiz stratejimizin (Bölüm 3.2.2.3.) son basamağı olan dominant kalıtmı bilinen gen varyantları analizinde (VATK anotasyonlu verilerinden) toplam 7 aday varyant saptanmıştır (Tablo 4-21). Literatürde bu genlerin işlevleriyle ilgili sınırlı bilgi olması nedeniyle bu adayların konfirmasyonu sonraya bırakılmıştır.

Tablo 4-21: Dominant kalıtmı bilinen genlerin aday varyantları.

Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık	Varyantın bilinen rs kodu
1	44/31	<i>PTCHD2</i>	ENST00000294484.6:c.2284C>A	-	-
1	60/40	<i>PDE4DIP</i>	ENST00000313382.9:c.3394G>A	-	-
2	29/19	<i>KIDINS220</i>	ENST00000256707.3:c.2396C>T	-	-
2	19/41	<i>POTEF</i>	ENST00000357462.5:c.2158G>A	-	rs774204672
3	46/48	<i>CHRD</i>	ENST00000204604.1:c.2466G>C	-	-
20	17/19	<i>STAU1</i>	ENST00000340954.7:c.223G>A	-	-
21	43/7	<i>RUNX1</i>	ENST00000300305.3:c.1270T>C	-	-

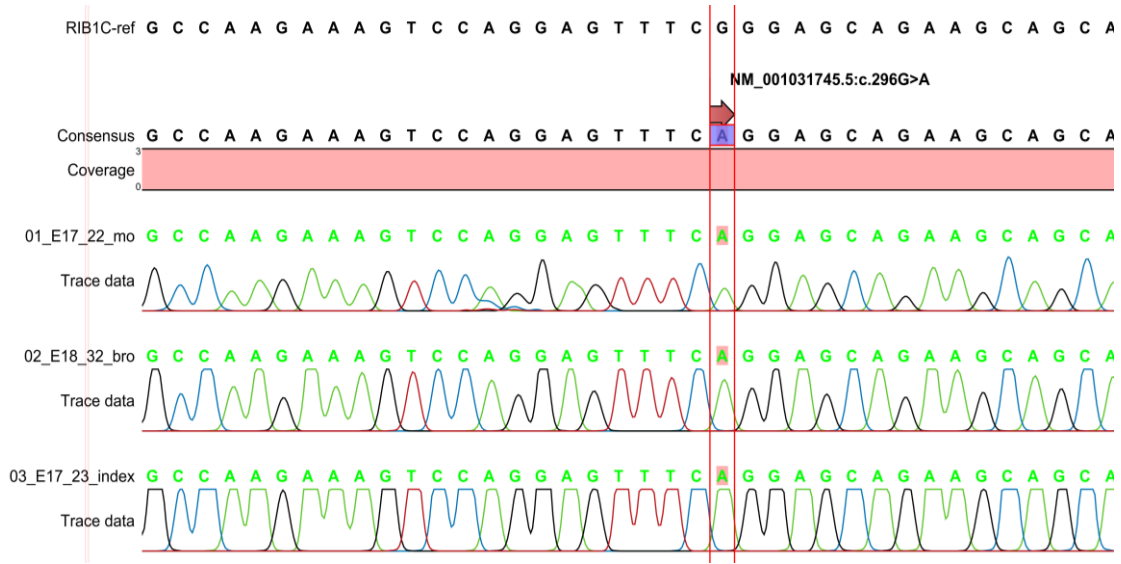
*Sırasıyla Referans ve alternatif alellerin okunma sayısı.

Öte yandan olası bir ihtimalle gözden kaçırılarak fenotipi açıklayabilecek LGSN dışında başka bir aday varyant tespiti için E17_23 kodlu hasta bireyin ham ekzom verileri Dove modeliyle 3.kez anote edilmiş ve Bölüm 3.2.3.3, Tablo 3-5'teki analiz strateji basamakları uygulanarak yeniden analiz gerçekleştirilmiştir.

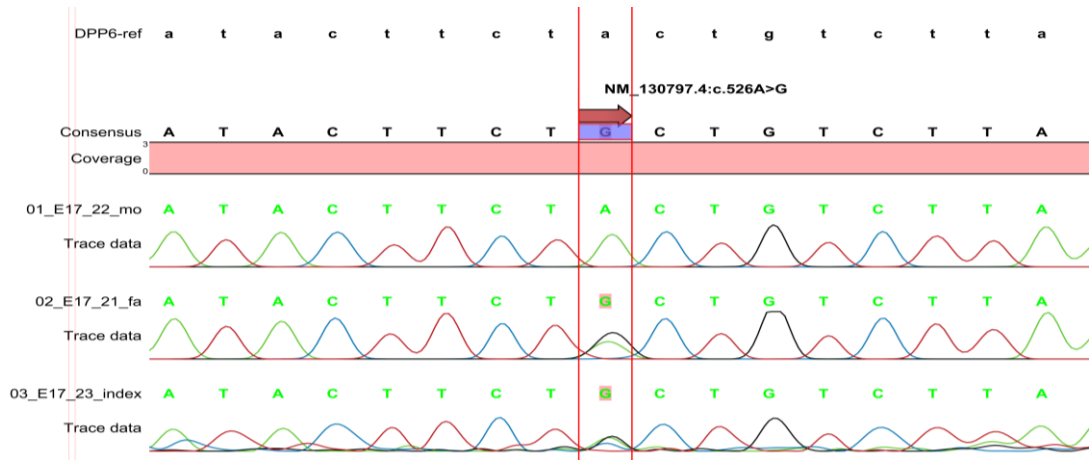
Sonuçta, *RIBC1*-NM_001031745.5:c.296G>Ap.Arg99Gln ve *DPP6*-NM_130797.4:c.526A>G p.Thr176Ala (*DPP6*, Mental retardation, autosomal dominant 33 ile ilişkilidir) iki aday varyant olarak belirlenmiştir. *RIBC1* geni Malacard veri

tabanında Cornelia La Dange sendromunda ilişkili gen olarak bildirilmiştir ve Omim’de mikrosefali ve ZY fenotipine sahip bir sendromdur.

Dizileme analizlerine göre *RIBC1* aday varyantı hem hastada (03_E17_23_index) hem de sağlıklı erkek kardeşte (02_E18_32_bro) mevcuttur. Ailesel segregasyon göstermeyen bu varyantın dolayısıyla adaylığı ortadan kalkmıştır (Şekil 4-28). *DPP6* gen varyantı hem baba hem de hastada heterozigot genotipe sahip olup segrege etmediğinden elenmiştir (Şekil 4-29). Sonuç olarak tüm ekzom dizileme yöntemiyle E17_23 kodlu hasta için tespit edilebilen *LGSN* aday varyantı dışında doğrulanan olası başka bir aday varyant yoktur.

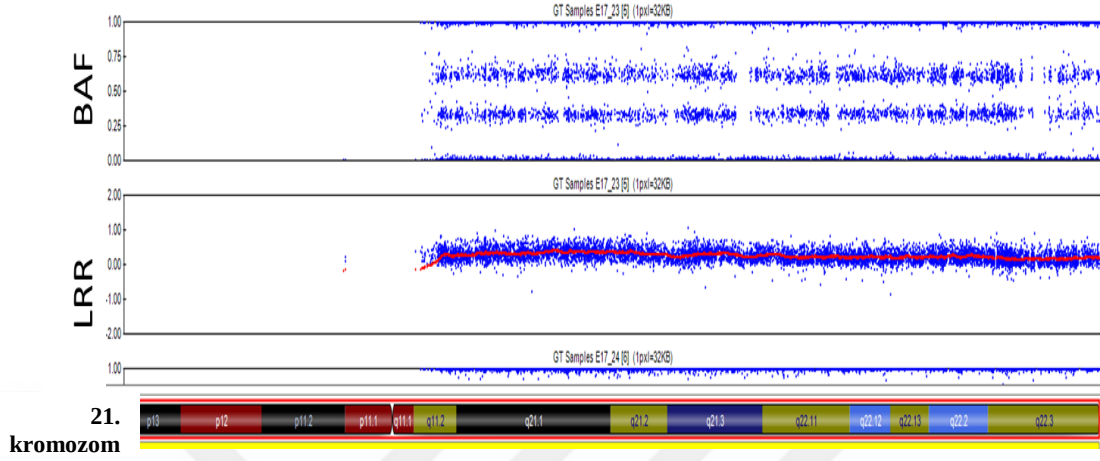


Şekil 4-28: *RIBC1*-NM_001031745.5:c.296G>A;p.Arg99Gln varyantı Ailesel segregasyon görseli. 01_E17_22_mo=anne, 02_E18_32_bro=sağlıklı erkek kardeş, 03_E17_23_index= hasta.



Şekil 4-29: *DPP6*-NM_130797.4:c.526A>G;p.Thr176Ala varyantı Ailesel segregasyon görseli. 01_E17_22_mo=anne, 02_E17_21_fa=baba, 03_E17_23_index= hasta

E17_23 için yapılan genotiplendirme analizi sonucuna göre bu hasta aCHG sonucuyla tutarlılık gösterip, 21.kromozom açısından trizomiktir (Şekil 4-30). Analiz boyunca hastada fenotipiyle ilişkili olabilecek herhangi bir CNV'ye rastlanmamıştır.



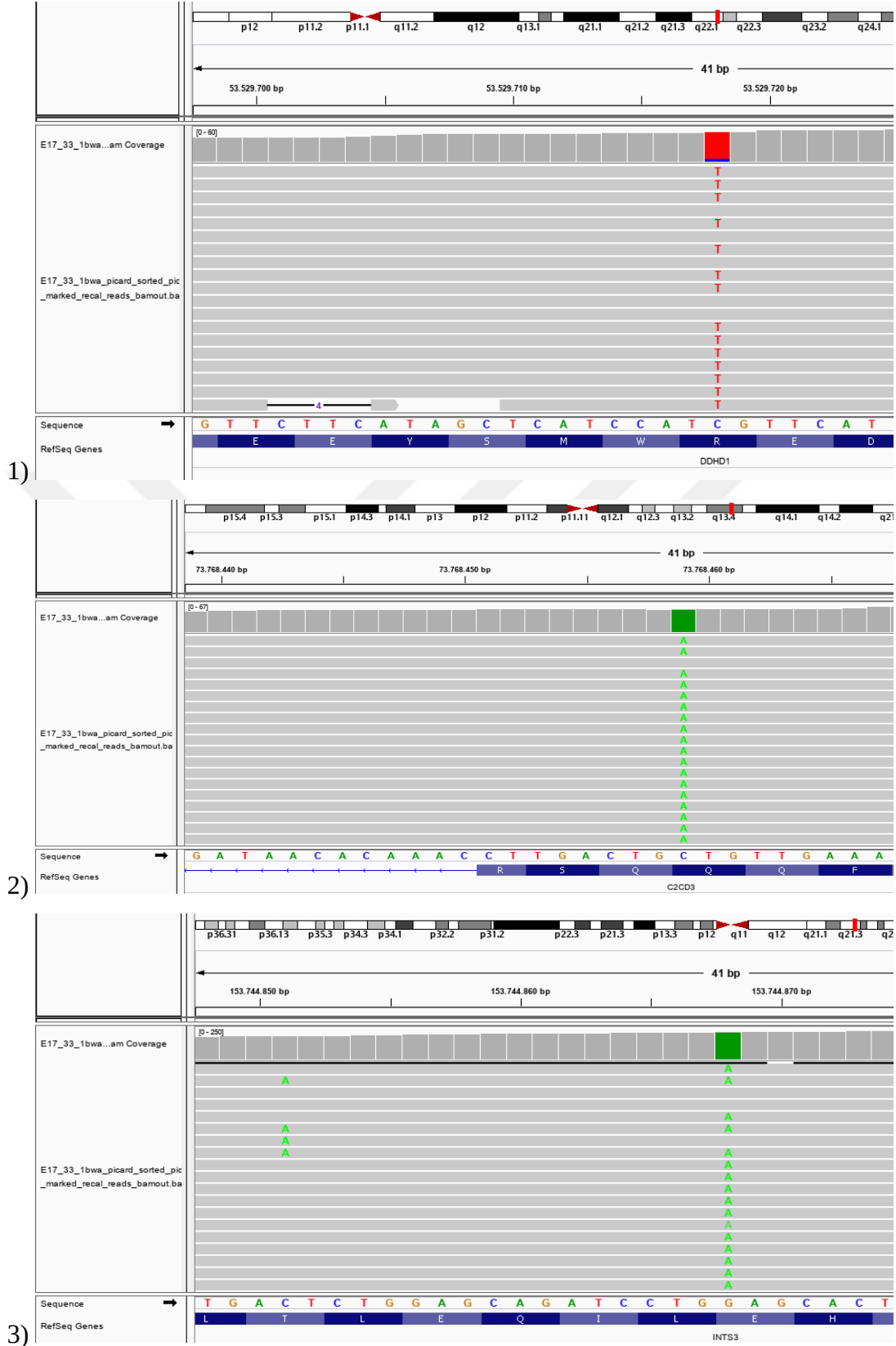
Şekil 4-30: E17_23 kodlu bireyin Illumina OmniExpress 24V1.1 çipinden elde edilen trizomi 21 görseli.

4.3.3. M8 Ailesi

Çalışmamızda ANNOVAR anotasyonunun açığını farkedip, farklı veri işleme modelleri oluşturma sürecini başlatmamıza sebep olan E17_33 kodlu hasta mikrosefali, ZY, tüm vücutta spastisite, bakışla kontakt kurma, konuşamama, destekli yürüme ve mikrolissensefali ile uyumlu MR bulgularına sahiptir (Tablo 4-1). Ebeveynleri arasında 1,5 derece kuzen evliliği bulunan bu ailede, iki de sağlıklı erkek kardeş vardır (Şekil 3-1-M8 ailesi). Ayrıca bu ailede baba tarafındaki akrabalarda motor mental retardasyon öyküsü mevcuttur (Şekil 3-1).

ANNOVAR anotasyonundan sonra hastanın ham ekzom verilerinin VANK veri işleme modeliyle yeniden anotasyonu sağlanmış olup Bölüm 3.2.3.3'te (Tablo 3-5'te) ilk analiz strateji basamağı uygulanarak MCPH genleri araştırılmıştır. Hastada MCPH ve panel genleri (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/162/>) [126] ile uyumlu patojenik bulgu saptanamamıştır. İkinci basamakta, ebeveynlerin akrabalığı baz alınarak resesif kalıtım modeli özelinde yapılan analiz sonrası toplam üç farklı aday varyant belirlenmiştir ve bunların IGV görselleri Şekil 4-31'de sunulmaktadır:

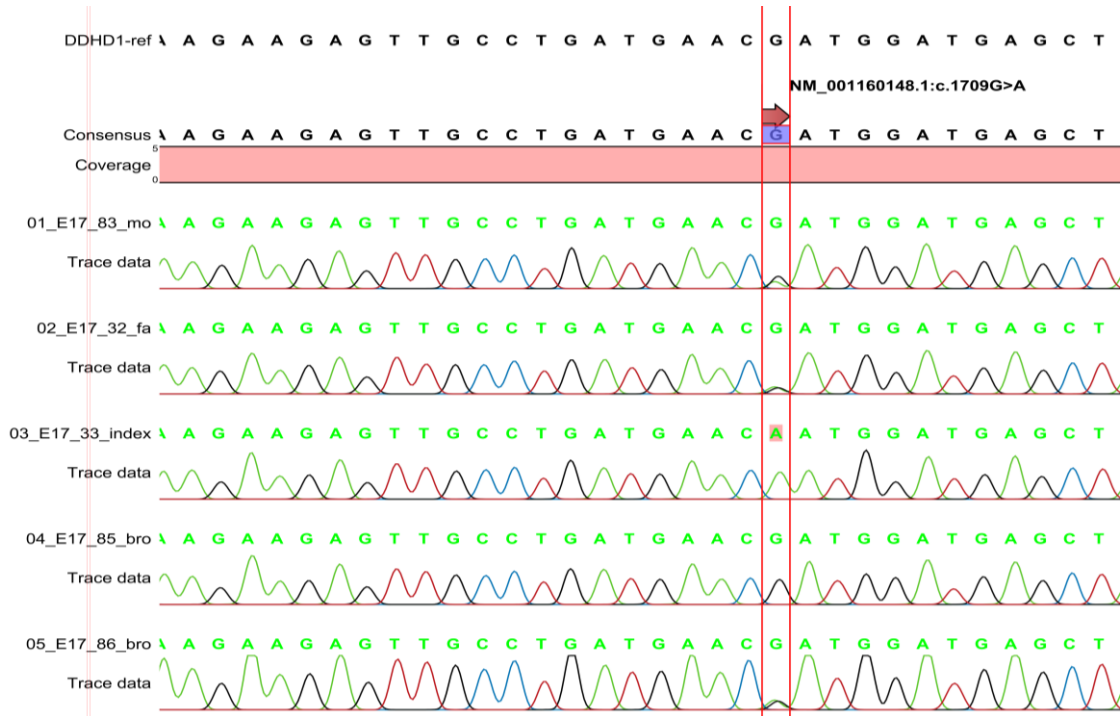
- 1) *DDHD1*-chr14:NM_001160148.1:c.1709G>A;p.R570Q,
- 2) *C2CD3*-chr11:NM_015531.5:c.5082G>T;p.Q1694H,
- 3) *INTS3*-chr1:NM_023015.5:c.2773G>A;p.E925K.



Şekil 4-31: *DDHD1* (1), *C2CD3* (2) ve *INTS3* (3) gen varyantlarına ait IGV görselleri.

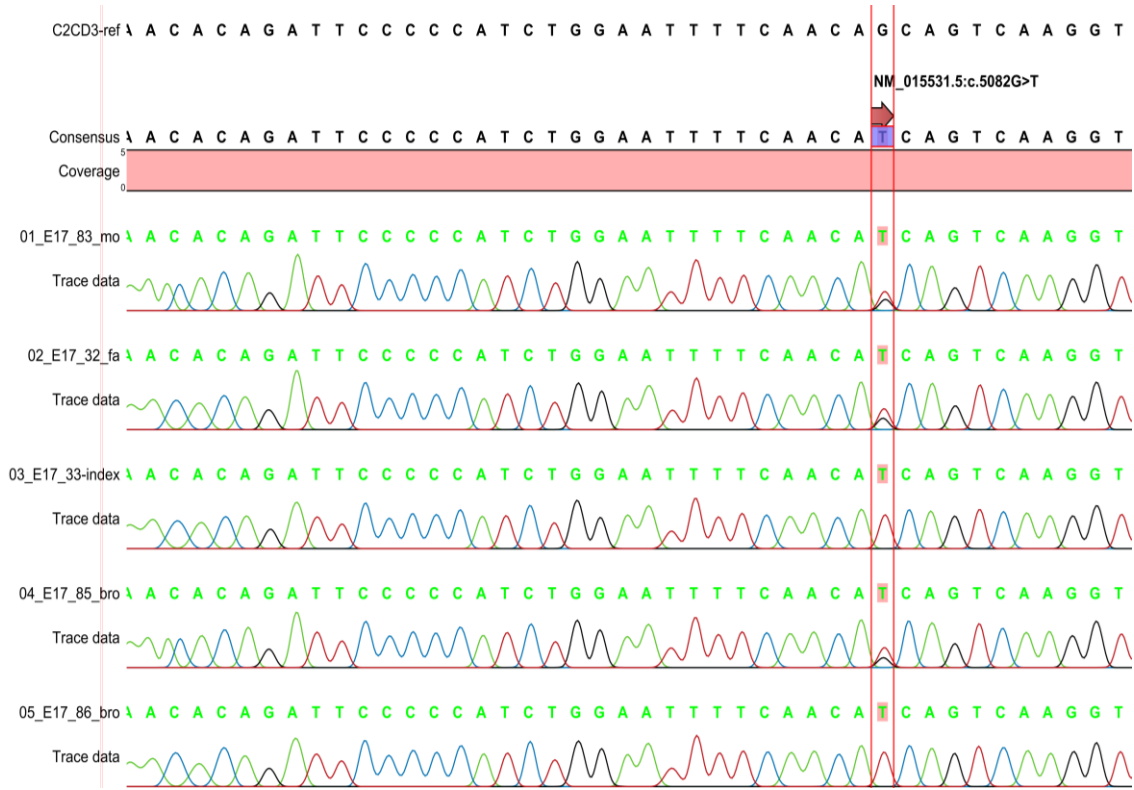
Bu adaylardan 14.kromozomda yer alan *DDHD1* geni OMIM veri tabanında Spastik parapilaji 28, otozomal resesif (MIM#609340) ile ilişkilendirilmiş olup, hastanın destekli yürüme fenotipini karşılamaktadır. 11. Kromozomda lokalize olan *C2CD3* geni ise Oriofacialdijital sendrom 14; OFD14 (MIM#615948) ile ilişkilendirilmiş ve destekli yürüme bulgusu hariç hastanın geri kalan tüm fenotipik karakteristiğini açıklayabilecek bir adaydır. 1.kromozomdaki aday *INTS3* geninin ait olduğu İntegrator kompleks subunit ailesi üyelerinden biallelik *INTS1* ve *INTS8* gen mutasyonları nadir ve resesif kalıtmımlı insan nörogelişimsel sendromları ile ilişkilendirilmiştir [135]. *INTS1* mutasyonları destekli yürüme, gelişimsel bozukluk, konuşma güçlüğü, *INTS8* ise mikrosefali, hipotoni, ZY özellikleri ile ilişkilidir [135]. Buradan hareketle bilinen *DDHD1*,*C2CD3* gen varyantlarıyla birlikte *INTS3* novel bir gen adayı olarak konfirmasyon listemize alınmıştır.

Yapılan Sanger dizi analizine göre E17_33 kodlu hasta *DDHD1* varyantının homozigot, sağlıklı 2 erkek kardeş (05_E17_86_bro ve 04_E17_85_bro) ve ebeveynler (baba 02_E17_32_fa ve anne 01_E17_83_mo) heterozigot taşıyıcısıdır. Varyant hastada (03_E17_33_index) konfirme edilmiş olup ailesel segregasyon sergilemektedir (Şekil 4-32).

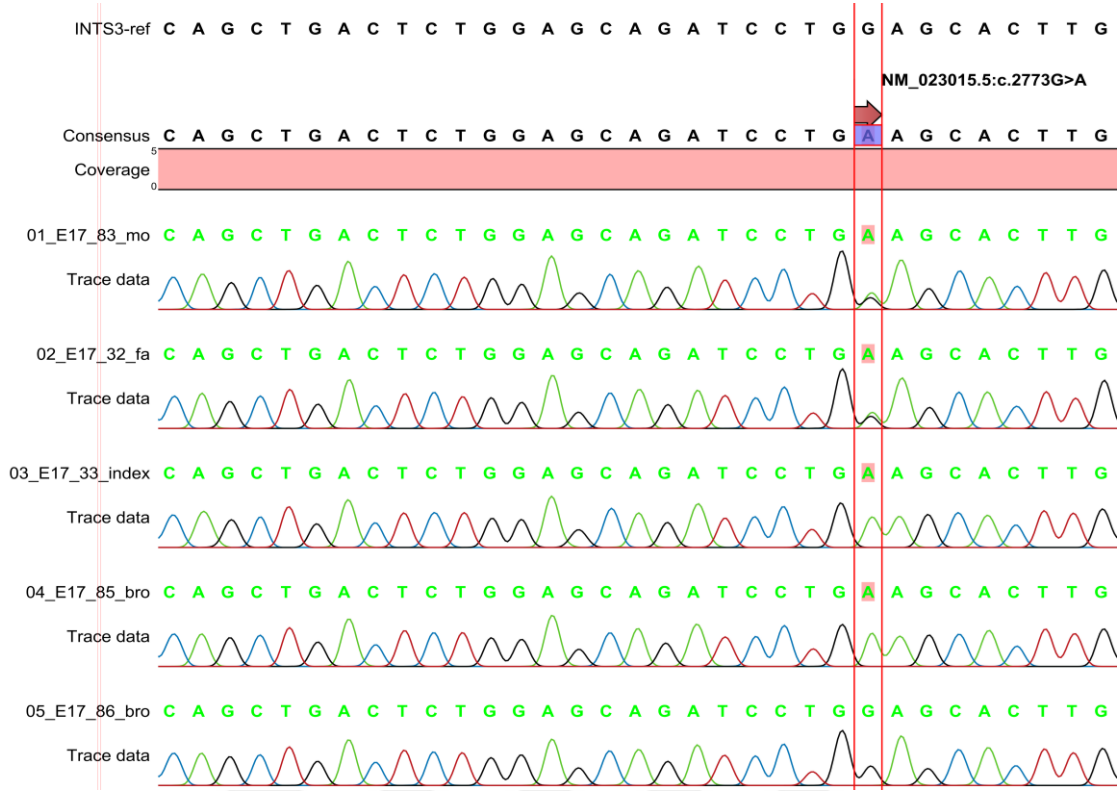


Şekil 4-32:*DDHD1*-chr14:NM_001160148.1:c.1709G>A,p.R570Q, varyantının M8 ailesine ait kromatogram görseli.

C2CD3 aday varyantı dizileme analizine göre hasta (03_E17_33_index) ve sağlıklı kardeşlerden birinde (05_E17_86_bro) homozigot genotip saptanmış olup ebeveynlerin (02_E17_32_fa baba, 01_E17_83_mo anne) ve diğer kardeşin (04_E17_85_bro) heterozigot taşıyıcılığı doğrulanmıştır. Varyant ailesel segregasyon göstermediğinden adaylığı ortadan kalkmıştır (Şekil 4-33). *INTS3* varyantının Sanger analizleri neticesinde E17_33 kodlu hastayla E17_85 kodlu sağlıklı kardeşin homozigot, diğer sağlıklı kardeşin yabanıl tip homozigot ve ebeveynlerin heterozigot genotipe sahip olduğu bulunmuştur. Sağlıklı erkek kardeşin hastayla aynı homozigotluğu taşıması varyantın elenme sebebidir (Şekil 4-34).



Şekil 4-33: C2CD3-chr11:NM_015531.5:c.5082G>T:p.Q1694H, varyantının M8 ailesine ait kromotogram görseli.



Şekil 4-34: INTS3-*chr1*:NM_023015.5:c.2773G>A:p.E925K varyantının M8 ailesine ait kromotogram görseli.

E17_33 kodlu hastanın VATK anotasyonlu ekzom verileri birleşik heterozigotluk, X-kromozomuna bağlı ve dominant kalıtım modelleri özelinde Bölüm 3.2.3.3'te detaylandırıldığı üzere analiz kriterlerine uygun olarak Tablo 3-5'te özetlendiği gibi analiz edilmiştir. Ancak neticede, son derece heterojen fenotipe sahip olan bu olgunun genotip-fenotip ilişkisini açıklayabilecek aday varyant bulunamamıştır. Bu sebeple, indeksin VATK anotasyonlu ekzom verilerine analiz basamakları yeniden uygulanarak ikinci bir analiz daha gerçekleştirilmiştir.

Bu 2. analizde, resesif kalıtım modeli bazında bilinen genlerden, iki gen *INTS5* ve *SHANK3*'te olası patojenik iki varyant saptanmıştır (Tablo 4-22). Daha önce de sözü edildiği üzere integrator kompleksler nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmiştir [135]. 2018 yılında WES yöntemiyle motor gerilik, konuşma geriliği, otizm, ZY, ataksi, alt ekstremitelerde ilerleyici spastisite, dismorfik bulgular, kısa boy, mikrosefali fenotipine sahip 14 yaşındaki erkek olguda toplam 2 novel *de novo* varyant *SHANK3*'ün 21. ekzonunda 375bp'lik CpG zengin bölgede tespit edilmiştir [139].

Ayrıca, birleşik heterozigot kalıtmı ve dominant kalıtmı bilinen - bilinmeyen genlerde tespit edilen aday varyantlar ise toplam 14'tür. Bunlardan *KMT2B* çocukluk

çağı distoni 28 ile ilişkilendirilmiş gendir ve indeksin mikrosefali, ZY, gelişim geriliği, spastisite gibi fenotipik özellikleriyle uyumludur. *LMX1A* geninin de yer aldığı 1q23.3q24.1 bölgede 8 vaka intersitisyel delesyonlarla bildirilmiş ve orta dereceli ZY ve mikrosefali ile ilişkilendirilmiştir. Tablo 4-23’de öncelik genotip-fenotip korelasyonu uygunluğu açısından *KMT2B* ve *LMX1A* gen varyantlarına verilmiş ve diğer genlerin konfirmasyonu sonraya bırakılmıştır. Özetle, E17_33 kodlu indeksin 2. ekzom analizi sonucunda tespit edilen toplam 4 olası patojenik varyantın IGV görüntüleri Şekil 4-35’de sunulmaktadır.

Tablo 4-22: E17_33’ün 2. analizinde resesif kalıtmalı bilinmeyen genler için tespit edilen olası varyantlar.

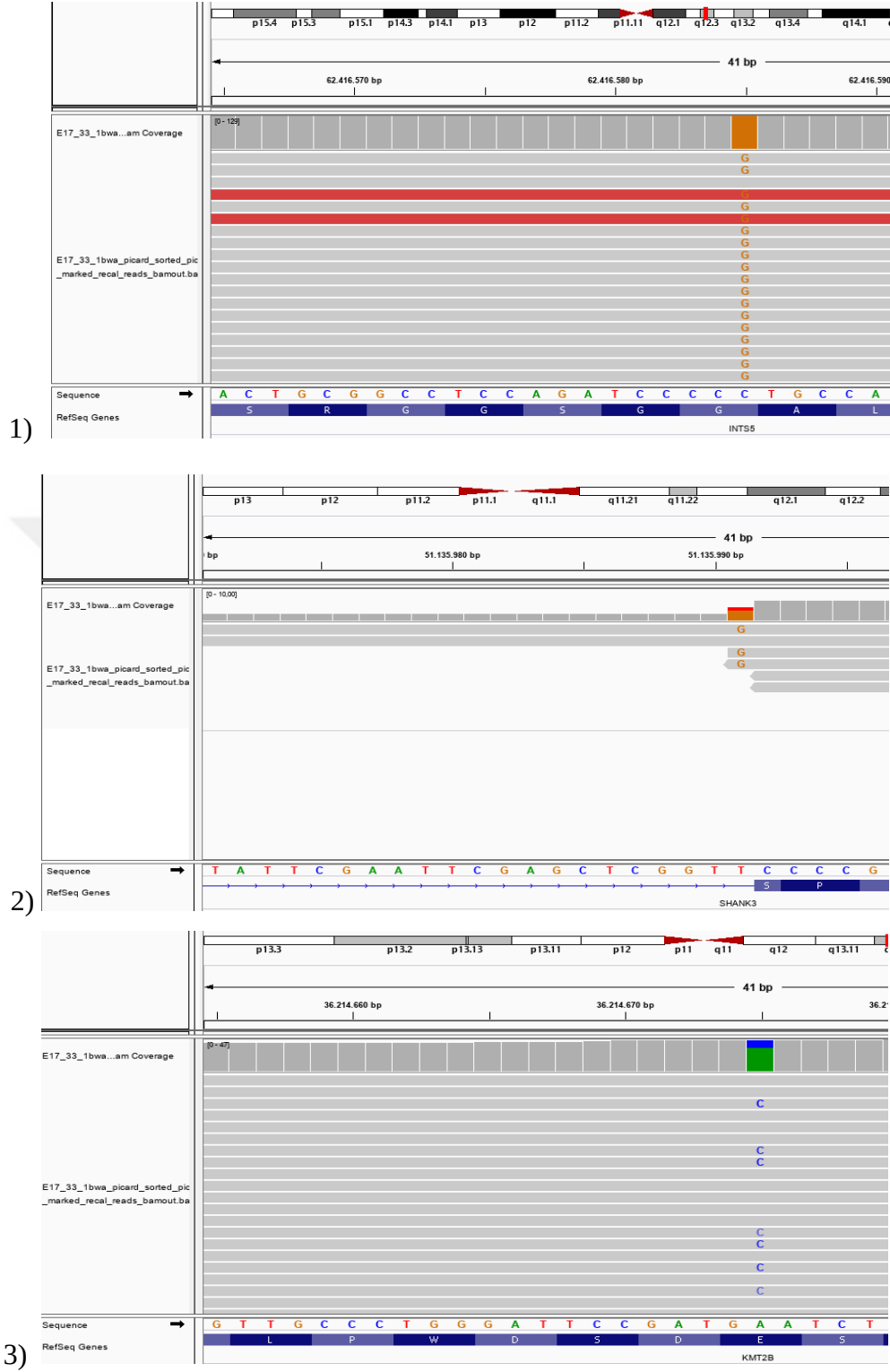
Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık
11	0/123	<i>INTS5</i>	ENST00000330574.2:c.967G>C	-
22	1/3	<i>SHANK3</i>	ENST00000262795.3:c.1394T>G	-

*Sırasıyla Referans ve alternatif alellerin okunma sayısı.

Tablo 4-23: E17_33’ün 2. analizinde birleşik heterozigot kalıtmalı ve dominant kalıtmalı bilinen - bilinmeyen genlerde tespit edilen aday varyantlar.

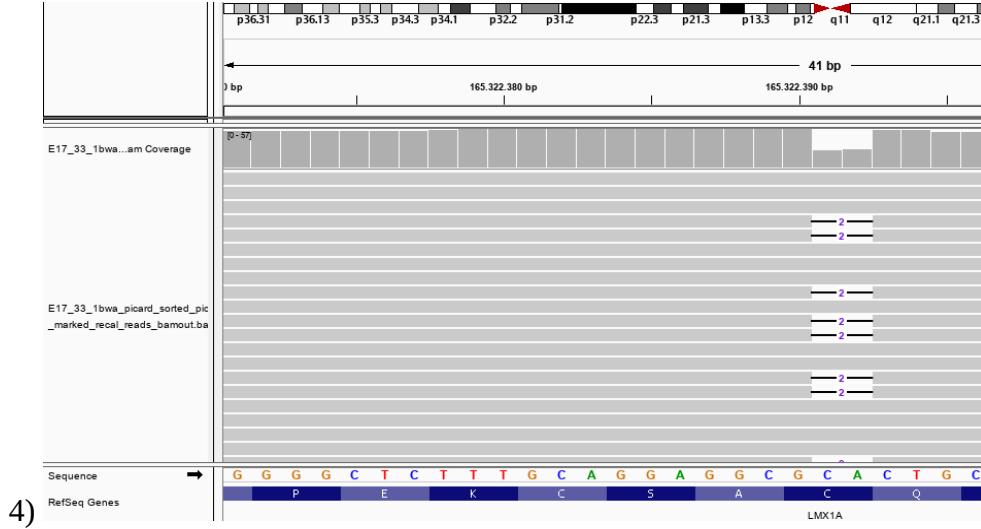
Lokalizasyon (hg19)	Okuma Sayısı*	Gen	Değişim	Genin İlişkilendirildiği Hastalık	Varyantın bilinen rs kodu
1	78/62	<i>ARID1A</i>	ENST00000324856.7:c.5449G>A	CSS2	rs375250508
1	79/69	<i>ARID1A</i>	ENST00000324856.7:c.5636G>A	CSS2	rs371595717
1	30/25	<i>CELSR2</i>	ENST00000271332.3:c.8235_8246dup	-	rs773722162
1	75/9	<i>HRNR</i>	ENST00000368801.2:c.5389_5392del	-	rs754237366
1	71/8	<i>HRNR</i>	ENST00000368801.2:c.5384_5385insACAT	-	rs762457435
1	23/26	<i>LMX1A</i>	ENST00000294816.2:c.184_185del	-	-
1	65/63	<i>CDK18</i>	ENST00000360066.2:c.556A>T	-	-
1	68/56	<i>HIST3H3</i>	ENST00000366696.1:c.397G>C	-	rs759900631
2	18/5	<i>GAD1</i>	ENST00000486850.1:c.231T>A	CPSQ1	-
2	16/3	<i>GAD1</i>	ENST00000486850.1:c.243G>C	CPSQ1	-
2	17/3	<i>GAD1</i>	ENST00000486850.1:c.249T>A	CPSQ1	-
3	52/23	<i>CNTN4</i>	ENST00000358480.3:c.1624G>A	-	rs763159501
4	61/35	<i>TMEM175</i>	ENST00000264771.4:c.103C>T	-	rs542936413
19	32/10	<i>KMT2B</i>	ENST00000222270.7:c.3101A>C	DYT28	-

*Sırasıyla Referans ve alternatif alellerin okunma sayısı.



Şekil 4-35: E17_33'e ait VATK anotasyonlu ekzom verilerinin 2. Analizinde tespit edilebilen aday varyantların IGV görselleri.

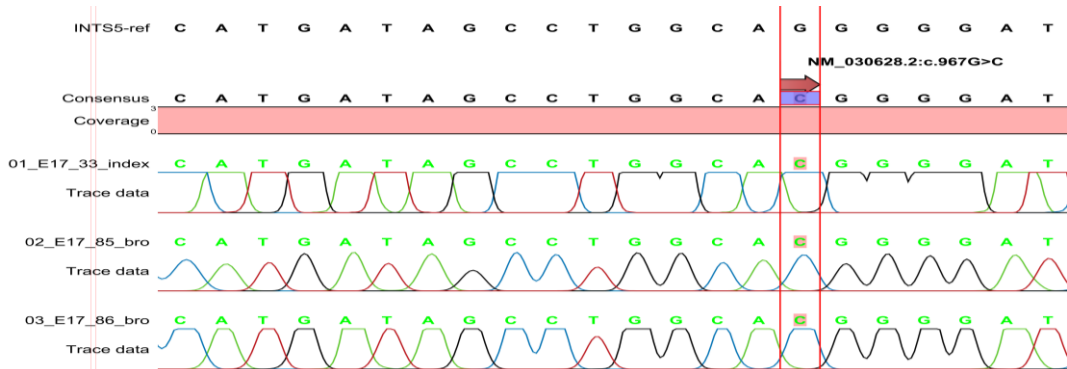
1)INTS5NM_030628.2:c.967G>Cp.Gly323Arg,2)SHANK3-NM_001080420.1:c.1394T>G,p.Phe465Cys, 3)KMT2B-NM_014727.2:c.3101A>C,p.Glu1034Ala,4)LMX1A-NM_001174069.1:c.184_185del p.Cys62ArgfsTer23



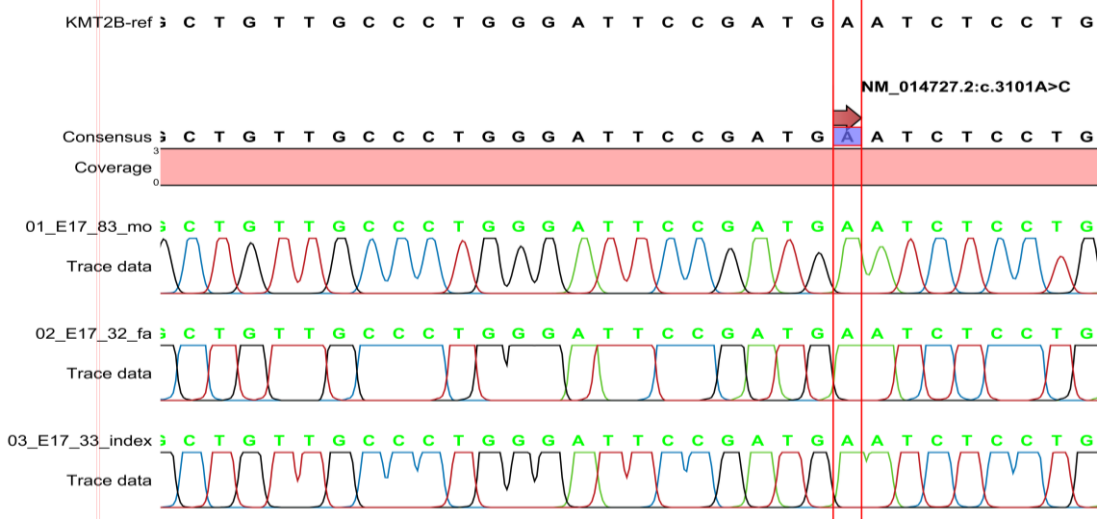
Şekil 4-35 devamı: E17_33'e ait VATK anotasyonlu ekzom verilerinin 2. Analizinde tespit edilebilen aday varyantların IGV görselleri.

1) *INTS5*-NM_030628.2:c.967G>C,p.Gly323Arg, 2) *SHANK3*-NM_001080420.1:c.1394T>G,p.Phe465Cys, 3) *KMT2B*-NM_014727.2:c.3101A>C,p.Glu1034Ala, 4) *LMX1A*-NM_001174069.1:c.184_185del p.Cys62ArgfsTer23.

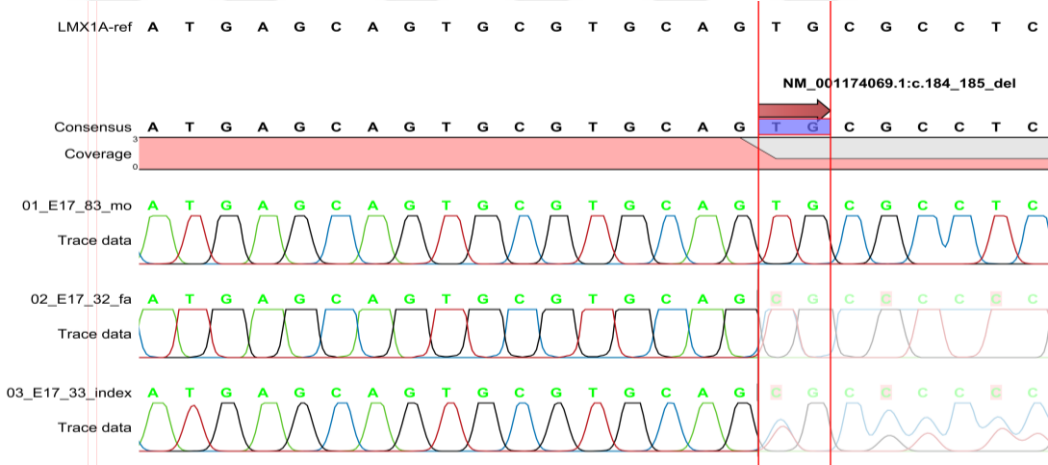
Sanger dizileme sonuçlarına göre aday varyantlardan *KMT2B* konfirme edilememiş, *INTS5* ve *LMX1A* varyantları ise hastada (01_E17_33_index) valide edilmiş ancak ailede segregasyon etmemiştir. *INTS5* varyantı indeks (01_E17_33_index) ve sağlıklı 2 kardeş (02_E17_85_bro ve 03_E17_86_bro) homozigot genotiple saptanmıştır (Şekil 4-36). *KMT2B* varyantı doğrulanamamış yani anne, baba ve indekste yabanıl tip homozigot olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-37). *LMX1A* varyantı ise indeksle (03_E17_33_index) babanın (02_E17_32_fa) aynı heterozigot genotipe sahip olması sebebiyle elenmiştir. Dolayısıyla tümünün adaylıkları ortadan kalkmıştır (Şekil 4-38).



Şekil 4-36: *INTS5*-NM_030628.2:c.967G>C,p.Gly323Arg, aday varyantının ailesel segregasyon görseli.



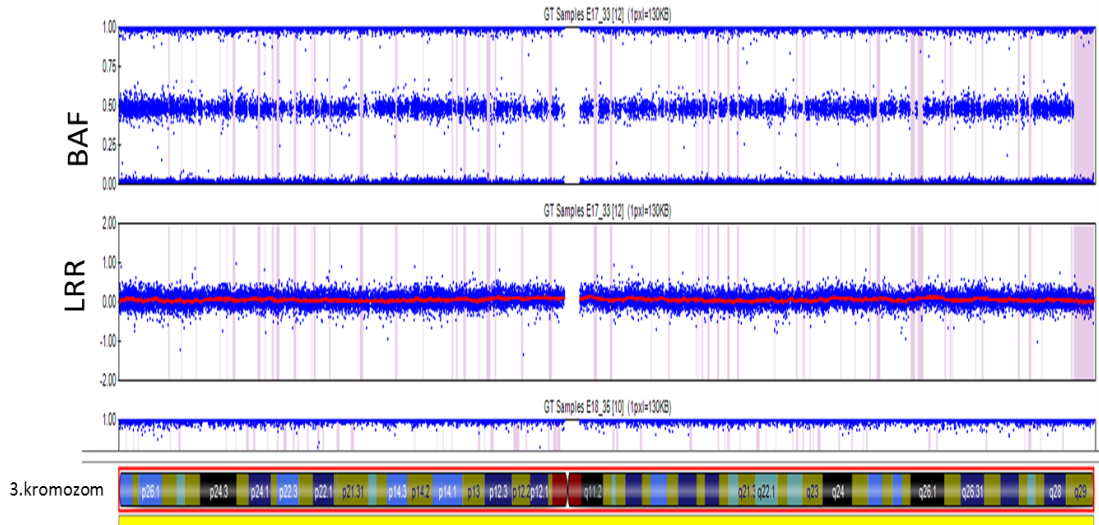
Şekil 4-37:KMT2B-NM_014727.2:c.3101A>C,p.Glu1034Ala, aday varyantının ailesel segregasyon görseli.



Şekil 4-38:LMX1A-NM_001174069.1:c.184_185del p.Cys62ArgfsTer23 varyantının ailesel segregasyon görseli.

Bu hasta için son aday *SHANK3* varyantı ise GC’ce son derece zengin bölgeye denk düşmektedir ve dizayn edilen eldeki primerlerle PZR yöntemiyle özgül bölgenin çoğaltılması mümkün olmamıştır. Bu bölge toplam 4 okumaya sahiptir. Özetle, E17_33 kodlu vakanın tüm ekzom analizleri sonucunda destekli yürüme bulgusunu açıklayan konfirme edilmiş *DDHD1* varyantı dışında fenotipiyle uyumlu olabilecek başka bir aday varyant tarafımızdan tespit edilememiştir.

Öte yandan hasta tüm genom genotiplendirmeye tabi tutulmuş ve yapılan detaylı CNV analizine göre hastanın genomunda patojenik kopya sayısı değişimine rastlanmamıştır. Şekil 4-39’da 3.kromozoma ait BAF ve LRR değerleri örnek olarak gösterilmiştir.

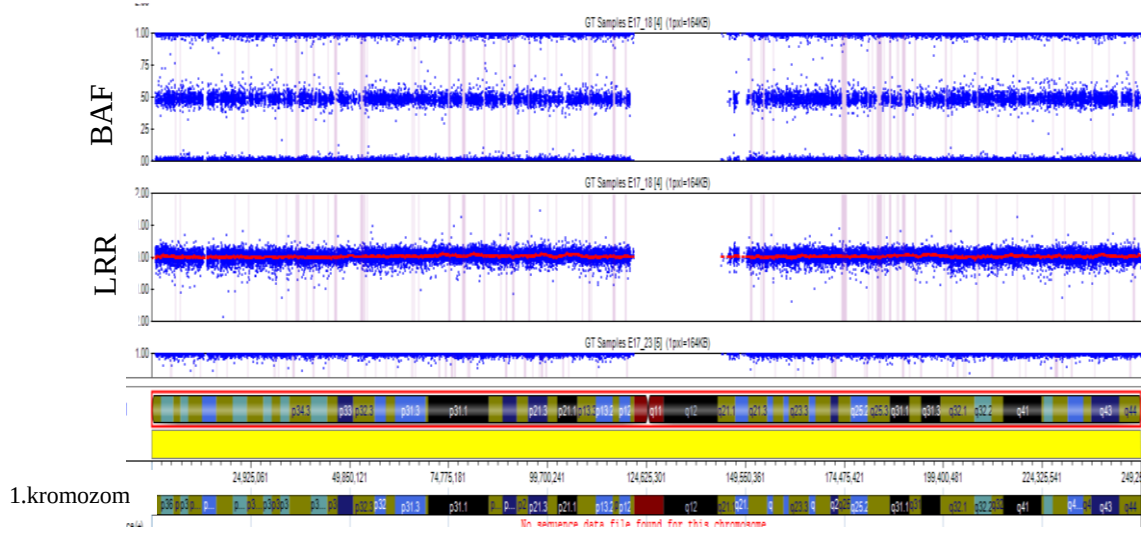


Şekil 4-39: E17_33 kodlu olgunun 3.kromozomuna ait BAF ve LRR görseli.

4.3.4. M9 Ailesi

Çalışmada ebeveynleri arasında akraba veya aynı yöre evliliği bulunmayan tek aile M9'daki E17_18 kodlu birey prenatal dönemde mikrosefali tanısını almıştır (Şekil 3-1). 1999 doğumlu olan hasta birey 2,5 yaşında yürüyebilmiş, 3 yaşında ilk kez konuşabilmiştir. Kendisi 9 yaşında epilepsi tanısı almış ve 13 yaşından itibaren de ilaç kullanımı mevcuttur. Ellerde araknodaktili ve damakta hafif yüksek bulgularla son derece heterojen fenotip sergilemektedir. Ayrıca, ailede baba tarafında mental retardasyon öyküsü mevcuttur. aahtar

Ailede ebeveynler arasında akrabalık/aynı yöre durumu bulunmadığından, hastada dismorfik bulgular ön planda olduğundan ve özellikle baba kan örneği vermeyi reddettiğinden bu aileye yapılmak istenen trio WES uygulaması gerçekleştirilememiştir. Yalnızca olgu tüm genom genotiplendirmeye tabi tutulabilmiştir. İndeks için yapılan CNV analizi sonucunda kopya kaybı veya kazancı olarak ifade edilecek herhangi bir patolojik bölge tespit edilmemiştir. Yapılan analize örnek teşkil etmesi için Şekil 4-40'da 1.kromozoma ait LRR ve BAF değerleri görselleştirilmiştir.



Şekil 4-40:E17_18 kodlu bireyin 1.kromozomunun tamamına ait CNVgörseli.

BAF ve LRR değerleri incelendiğinde CNV değişimi yoktur.

Özetle bu bölümde 5 ailede 4 farklı gende patojenik varyantlar tespit edilmiştir. Tablo 4-24’te ACMG kılavuzuna göre değerlendirilen bu varyantlarla ilgili özellikler sunulmaktadır.

Tablo 4-24: Fenotipi açıklanabilen olgulardaki varyantların özellikleri.

Transkripsiyon kodu	Lokasyon	Mutasyon tipi	Sembol/Elzon asit	Amino Tanımlı Varyant Kodu	Farklı kolokelize varyant	NCBI Transkript	SIFT	Polyp hen	AF ClinVar	ACMG (WinterVar)
ENST00000359593.8:c.952C>T; p.(Arg318*)	7:100105981- 100105981	stop_gain d	AP4M1 12/15R/*	rs730882249,C M146528		NM_004722.4	-	-	-	2x (LP: P: PVS1, PSS3, PM2, PP3, PP5 P)
ENST00000401500.6:c.1605dupT19-36084707- ; p.(Glu536*)	36084707	frameshift_ variant	WDR62 12/32-/X	-	-	NM_0010839 61.2	-	-	-	LP: PVS1, PM2
ENST00000322002.3:c.239C>T; p.(Ser80Phe)	2:5692960- 5692960	missense_v ariant	SOX11 1/1 S/F	-	rs1553327809; COSM6787415 (c.239C>A; p.S80V)	NM_003108.4 D(0)	ProD(0.997)	-	-	LP: PS2, PM1, PM2, PP3
ENST00000344204.8:c.4394A>G;5:14397125- p.(Asn1465Ser)	14397125	missense_v ariant	TRIO 29/57N/S	COSM5516939	-	NM_007118.4 D(0.03)	ProD(0.949)	-	-	LP: PS2, PM1, PM2, PP3

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada konjenital mikrosefaliye sahip ve ebeveynleri genel olarak akraba veya aynı yöreden olan 9 sayıda hastada WES ve kademeli olarak tüm genom SNP genotiplendirme teknikleri uygulanmıştır. WES'in monogenik Mendel tipi bozukluklarda ilişkili mutasyon tespit başarısı göz önüne alındığında hastaların WES analizine öncelik verilmiş, bütçe doğrultusunda SNP array seçilmiş hasta ve yakınlarına uygulanmıştır.

Bu kademeli analiz süreci sonucunda 5 bağımsız hastada (E17_07, E17_16, E17_26, E17_29, E17_31) 4 farklı primer mikrosefali geninde (sırasıyla, *AP4M1*, *SOX11*, *WDR62*, *WDR62*, *TRIO*) homozigot ve *de novo* heterozigot patojenik varyasyonlar tespit ettik. SNP array tekniğini özellikle *de novo* varyasyona sahip hastaların aile uyumluluğunu biyolojik olarak test etmek için kullandık. Genom çapında CNV bakma kapasitesine sahip SNP arrayler ile aynı zamanda bu bireylerde ve ek seçili bireylerde patojenik CNV'ler araştırdık. Sonuç olarak farklı tekniklerin kombinasyonu ile fenotip genotip korelasyonları bariz olarak 5 hastada açığa çıkarılabilmektedir. Kalan hastalar da önemi henüz bilinmeyen varyasyonlar tespit edilmiştir.

WES, çekirdek aileler ve/veya bazen tek indeksle yeni varyantları saptama gücü ile modern genetikçiler için paha biçilmezdir. Bilinmeyen etiyolojiye sahip nadir görülen hastalıklarda % 21 ila 25 arasında değişen bir teşhis oranına sahiptir. WES'te hem ileri hem de geri ipliklerin dizilenmesi “paired end-reads” yani çift yönlü dizilemeye imkan verir. Bunlar, insan genomu referans dizisine hesaplamalı olarak eşlendiğinde single-reads yani tekli okumalardan daha uzun menzilli bilgi sağlar. Ancak temel koşul, WES ile elde edilen ham verilerin doğru bir şekilde referans genoma hizalanması ve anlamlandırılmasıdır.

Çalışmadaki olguların ham ekzom verilerinin analiz edilebilecek hale getirilmesi için 3 farklı ekzom analiz iş akış modeli kullanılmıştır. Her ne kadar 3 farklı modelde de anotasyon basamağına kadar kullanılan biyoinformatik yazılım araçları aynı olsa da, fonksiyonel adlandırma için kullanılan programlar farklıdır. Analizler sırasında her bir modelde karşılaştığımız problemler bir öğrenme süreci sağlayarak laboratuvarımızda uyguladığımız ‘*in house pipeline*’ yazılımını geliştirmemize de yardımcı olmuştur. Annovar anotasyonlu E17_33 kodlu hastanın verilerinde IGV görseliyle *INTS3* genine

lokalize varyantın veri listesinde *SLC27A3*'te yer alması, bu modeldeki hizalama problemini açığa çıkarmıştır. Bu sebeple bütün ham veriler VANK modeliyle yeniden hizalanmış ve varyantların fonksiyonel adlandırması Ensembl VEP 90'a göre yapılmıştır. Bu kez IGV görseliyle *INTS3*'te yer alan varyant, hastanın veri listesinde de *INTS3*'te yer almaktadır.

E17_29'da *WDR62*-NM_001083961.1:c.1605dupT;p.Glu536* ve E17_07'de *AP4M1*-NM_004722.3:c.952C>T;p.Arg318*, E17_16'da *SOX11* NM_003108.3:c.239C>T ve E17_31'de *TRIO*-NM_007118.3:c.4394A>G varyantları olguların VANK anotasyonlu ekzom veri listelerinde tespit edilmiştir ve bu hastaların fenotip-genotip korelasyonunu açıklamaktadır (Tablo 4-24). Elde edilen bu pozitif bulgular aşağıda sırayla tartışılacaktır. Ayrıca, E17_33'ün yalnızca destekli yürüme bulgusunu karşılayan *DDHD1* ve E17_23'te valide edilen *LGSN* varyantları da bu modeldeki analizler sonucunda keşfedilmiştir. VANK anotasyonlu ekzom verileri iki kez tekrarlı analiz edilen E17_33 genetik etiyolojisini kesinleştiremediğimiz vakadır.

Bunlarla birlikte bu modelde karşımıza çıkan ana problem MAF sorunudur. VANK modelinde ENSEMBL veritabanının sunduğu MAF değerini kullanmayı uygun görmüştük. Çünkü bu hem 1000 Genom hem de gnomAD için ortalama tek bir değer olarak karşımıza çıkıyordu. Ancak çok yaygın varyantlar (MAF-0,5) için bu parametre anotasyon sonrası fark ettiğimiz bir soruna sebep oldu. Eğer 1000 Genome referans alleli ENSEMBL referans aleli birbirinden farklı ise çok yaygın olmasına rağmen bu varyantın sıklığı listemize 0 olarak düştü. Bundan sebep, MAF filtresi uygulanan VANK veri dosyalarında frekans cut off (0,01) değerimizden daha büyük olupta 0 olarak yer alan polimorfik varyantların analizi özellikle dominant kalıtım özelinde hem analizi güç hale dönüştürmüş hem de zaman kaybına sebep olmuştur.

Daha sağlıklı MAF değeri elde ettiğimiz DOVE modelinde ise Ensembl VEP 95 versiyonu kullanılmıştır. Bu anotasyon ile ENSEMBL MAF parametresi değil hem 1000 Genome hem de gnomAD MAF değerleri ayrı ayrı listeye alınmıştır. Ayrıca ilk iki modelden farklı olarak bu model varyantların sadece kanonikal transkriptleri üzerinden filtrelenmesini mümkün kılmaktadır. Bu filtre datayı azaltarak ekzom listesini küçültmekte ve patojenik varyanta daha kolay ulaşılabilir hale getirmektedir. Ancak bu modelde de anote edilmiş ekzom verilerinin tekrar analizleri neticesinde ilk WES uygulamamızdan kalan iki hastanın (E17_12, M6 ailesi E17_23, M7 ailesi) fenotip-

genotip ilişkisi çözümlenememiştir. Öte yandan yalnızca SNP-array yaparak CNV değişikliği taradığımız E17_18 kodlu indeks, tüm genom genotiplemeyle genetik etiyolojisini açıklayamadığımız diğer hastadır. Sırayla bu üç hastaya ait bilgiler de tartışılacaktır.

5.1 WES ile Genetik Etiyolojisi Açıklanan Olgular

5.1.1. *WDR62* geni

Otozomal resesif primer mikrosefali, doğumda ciddi mikrosefali ile seyreden nadir bir nörogelişimsel hastalık grubudur. Genetik heterojenitenin sergilendiği MCPH grubunda 1'i dominant kalıtım gösteren, 24 farklı resesif tipi mevcuttur (OMIM). Bu gruptan MCPH2, *ASPM* geni ile ilişkili MCPH5'ten sonra ikinci sıklıkta gözlenir ve *WDR62* genindeki biallelik patojenik varyasyonlardan kaynaklanır [140]. Kromozom 19q13.2'deki MCPH2 lokusuna lokalize olan *WDR62* geni bu tezde referans olarak kullanılan NM_001083961.2 transkriptinde 32 ekzondan oluşur. *WDR62* birden çok WD40 domaini içeren 1523 amino asitlik bir protein kodlar.

WDR62 ile ilişkili mikrosefalide hastalar mikrosefali, kortikal malformasyonlar ile orta veya şiddetli ZY sergiler. Mikrosefalinin yanında, bu hastalarda çeşitli beyin malformasyonları ve nöbet öyküsü de mevcut olabilir. Bugüne kadar bu gende 40'ın üzerinde mutasyon bildirilmiştir [140]. 2016 yılında ilk kez *WDR62* iki birleşik heterozigot mutasyonu ile MCPH2'ye ek dermatolojik bulgularla Çinli bir kız çocuğunda bildirilmiştir [141].

Bu çalışmada iki bağımsız aileden (M1 ve M2 aileleri) iki hasta kız çocuğunda (E17_29 ve E17_26) *WDR62* geninin 12. ekzonunda resesif modelde daha önce bildirilmemiş yeni bir homozigot erken stop kodon varyasyonu WES tekniğiyle ortaya çıkarılmıştır. Bu varyasyonun ACMG kriterlerine göre patojenik olduğu çalışmamızda gösterilmiştir (Tablo 4-24). Tespit edilen varyasyonlar birebir aynı olduğu için öncelikle WES vcf dosyalarının biyoinformatik olarak farklı bireylere ait olduğu gösterilmiştir. Ancak vcf'ler arasında dikkat çekici bir benzerlik mevcuttur. Yapılan haplotip analizi ile 2 indeks olgunun varyasyonu bilinmeyen ortak bir atadan almış olabileceği anlaşılmıştır (Şekil 4-6-B). M2 ailesine tekrar ulaşarak bağımsız kan örneklerinden bulgu tekrar teyit edilmiştir. Ayrıca M1 ailesinde bu *novel* varyant için farklı zamanda kanı alınmış taşıyıcı olan sağlıklı bir kız kardeş olması ve varyanta yakın 'rs'

polimorfizmi ile 2 ailedeki babanın farklı bireyler olduğunun gösterilmesi de trioların bağımsız bireylere ait olduğunun farklı kanıtlarıdır (Şekil 4-4 ve Şekil 4-6-B ve C).

Homozigot varyasyonu taşıyan her iki olguda da mikrosefali, ZY, hipotoni, gelişim geriliği vardır. E17_29'da dirençli epilepsi ve nöbet öyküsü mevcut olup, E17_26'da çeşitli dismorfik bulgular ön plandadır. Varyantın ailelerdeki segregasyonu da farklı zamanlarda ve mümkünse alınan farklı kan örnekleri ile gösterilmiştir (Bölüm 4.1.1).

Literatürde, CDK5RAP2, CEP152, WDR62 ve CEP63 gibi primer mikrosefali-ilişkili (MCPH) proteinlerin birleşerek bir protein kompleksi oluşturduğu gösterilmiştir. Sentirol duplikasyonu ve hücre döngüsü ilerleyişinde rolü olan CDK2'nin sentrozomal lokalizasyonu için primer mikrosefali-ilişkili proteinler ve onların sentiolar satelit partner proteinleri gereklidir (Şekil 2-1) [64]. Mikrosefali-ilişkili proteinlerin herhangi birinin kaybı, tıpkı hastalarımızdaki WDR62 fonksiyon kaybı gibi, sentirol duplikasyonu veya stabilizasyonunu bozarak anormal hücre bölünmesi meydana getirebilir [142].

Doğumdaki beyin büyüklüğü temel olarak nöroprogenitor hücrelerin çoğalma ve kendini yenileme yeteneğine bağlıdır. Embriyo gelişim sürecinde bir nöroprogenitor hücrenin simetrik bölünmesi iki özdeş nöroprogenitor hücresinin oluşmasına neden olurken asimetrik bölünme bir progenitor hücrenin üretimine, diğerinin ise apoptoza uğramasına yol açar [143]. Bu gelişim sürecinde NPC'ler göçe uğrayarak olgun nöronlara farklılaşırlar. Yeterli sayıda NPC'nin oluşamaması nöron sayısında etkileyerek konjenital mikrosefali gelişimine yol açabilir [140].

Hastalarımızda tespit edilen ve 32 ekzonluk genin 12. ekzonunda yer alan bu novel varyant erken dur kodonuna bağlı RNA bozulması (nonsense mediated RNA decay; NMD) mekanizması ile homozigot durumda tamamen işlevsiz alleler üretebilir. Neticede, E17_29 ve E17_26 kodlu hastalar da embriyo gelişim süreçlerinde normal hücre bölünmesinde sentirol biyogenezinde gerekli olan WDR62 proteini üretilmeyerek, anormal hücre bölünmesi sonucu yeterli sayıda nöron oluşamamasına bağlı birincil mikrosefali gelişmiş olabilir.

5.1.2. *AP4M1* geni

M3 ailesindeki E17_07 kodlu hastada WES aracılığıyla saptanmış nadir *AP4M1* mutasyonu Sanger dizilemeyle valide edilmiştir. Bu mutasyon, 15 ekzona sahip *AP4M1* geninin 12. ekzonunda 318.amino asit (p.Arg318*) arginini kodlayan CGA kodonundaki sitozin nükleotidinin timin nükleotidine dönüşümüyle erken sonlanma kodonu TGA'nın oluşumuna neden olmuştur.

AP kompleksleri (adaptin;AP), plazma membranındaki trans-golgi ile plazma membranı arasındaki veziküler iletişim için önemli olup kargolanacak molekülün belirlenmesinde ve veziküler iletişim trafiğinin seçiliminde rol oynar [144,145]. *AP4M1*, evrimsel olarak korunmuş heterotetramerik kompleks olan AP4'ün iki büyük (α veya β), bir orta (μ) ve küçük (σ) adaptin alt birimlerinden μ 'yü kodlar. AP4 nöronlarda AMPA reseptör iletişiminde önemli rolü vardır, AP4 otofajik yolak ve AMPA reseptör aracılığıyla somatodendritik kargo proteinlerini regüle eder [144,145].

Dört AP4 alt ünitesinden herhangi birini etkileyen mutasyonların (*AP4M1*, *AP4E1*, *AP4S1* ve *AP4B1*) şiddetli ZY, mikrosefali, ilerleyici spastik parapleji, konuşma gecikmesi/yokluğu ve büyüme geriliği ile karakterize otozomal resesif AP4 eksikliği sendromuna neden olduğu bulunmuştur [136,146]. *AP4M1* gen mutasyonları ise ilk kez akraba evliliğine sahip otozomal resesif tip tetraplejik serebral palsi ve ZY bulunan Fas kökenli bir ailenin beş üyesinde tespit edilmiştir (SPG50, eskiden CPSQ3;MIM:612936). Bu hastalar infantil hipotoni, tüm uzuvlarda ilerleyici spastisite, bağımsız yürüme eksikliği, mikrosefali, ciddi ZY, stereotipik kahkaha, beyaz madde anormallikleri ve değişken serebellar atrofiye sahiptir [147].

Fare embriyolarının farklı gelişim evrelerinde, tüm ventriküler bölgelerde *AP4M1* ekspresyonu gösterilmiştir. Bu lokalizasyon, nöroglial progenitör proliferasyonu ile karakterize edilen beyin bölgelerine karşılık geldiğinden *AP4M1* mutasyonlarının nöronları etkileyebileceğini düşündürmektedir [147].

Hastamızda tespit edilen rs730882249 değişimi, *AP4M1* proteinin Mu homoloji domaininde yer almaktadır. Bu domain endositozda yer alan proteinlerde bulunan önemli bir protein-protein etkileşim modülüdür. rs730882249 değişimi sebebiyle proteindeki erken sonlanma ya da mRNA'nın tamamının NMD aracılığıyla yıkımı probandda *AP4M1* fonksiyon kaybına neden olabilir. Dolayısıyla değişim *AP4M1*'in ilişkilendirildiği ve hastadaki SPG50 fenotipinin sorumlusu olarak öne sürülebilir.

5.1.3. *SOX11* geni

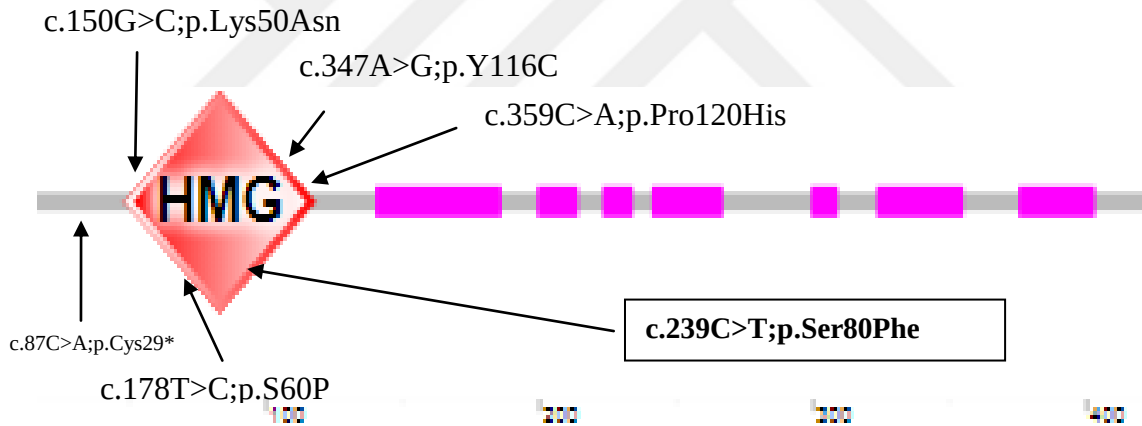
Doğuştan mikrosefali tanılı E17_16 kodlu hastanın bulunduğu M4 ailesi için yapılan tüm genom analizleri neticesinde aday varyant literatürde Coffin-Siris (MRD27) Sendrom 9'la ilişkilendirilmiş *SOX11* (SRY-Related HMG-Box Gene 11) geninde tanımlanmıştır. Bulunan varyant NM_003108.3:c.239C>T değişimiyle *SOX11* proteinin 80.pozisyonundaki Serin amino asidinin Fenilalanine dönüşümüne neden olan yanlış anlamlı bir varyanttır. İntron içermeyen tek bir ekzona sahip olan bu gen 2p25.2'ye lokalizedir ve *SOX* gen ailesine dahildir.

SOX proteinleri, SRY kutusu ve High Mobility Group (HMG) DNA bağlanma domaini adı verilen ortak bir motife sahip transkripsiyon faktörleridir. *SOX* proteinleri, pek çok dokuda aktivatör veya baskılayıcı olarak gen ekspresyonunu düzenler ve gelişim sürecinin birçok evresinde önemli rollere sahiptir [148]. Özellikle *SOX11*'in beyin gelişiminde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. İnsanda nöron gelişimi embriyonun 42. gününde başlar [149]. Fetüste, nöronal progenitörler subventriküler bölgede lokalizedir. Subventriküler bölgede üretildikten sonra, nöronlar dışarıya kortikal katmanlara doğru göç eder ve olgun nöronlara farklılaşır. Progenitör hücrelerden nöronal üretim ve işlevsel nöronlara farklılaşma süreçleri sağlıklı beyin gelişimi için sıkı bir şekilde düzenlenmelidir [149]. Ayrıca, *SOX11/sox11* nörogenez için gereklidir, bu genin fonksiyon kaybı ile erken embriyo döneminde merkezi sinir sistemi gelişimi bozulur [150]. *Sox11* null farelerde, proliferasyonun azalmasına ve nöronal progenitör hücrelerin anormal farklılaşmasına bağlı ince beyin zarı oluşumu ve beyin ağırlığının azaldığı gösterilmiştir. *SOX11*'in yalnızca nöron değil göz gelişiminde de rol oynadığına dair kanıtlar vardır [151]. Ayrıca, *sox11*'in Pax6-BAF kompleksiyle beraber erişkin nöral progenitör hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynar [150]. *SOX11* insan nörogelişimsel hastalıkları için güçlü bir aday geni temsil eder.

Coffin-Siris Sendrom ZY, gelişim geriliği, mikrosefali, hipoplastik tırnaklar özellikle el ve ayak beşinci parmakları, yüz dismorfolojisi ve beslenme güçlüğü başta olmak üzere nadir konjenital bozukluklarla karakterizedir 92 Coffin-Siris sendromu (CCS) klinik tanılı hasta arasından yalnızca 2 vakada *SOX11 de novo* mutasyonlarını bildirmiştir [152]. Her iki hasta da mikrosefali, büyüme geriliği, yüz dismorfolojisi, hipoplastik beşinci ayak tırnakları ve orta dereceli ZY sergilerken, birinde konuşma geriliği yokken, diğeri de nispeten daha yüksek bir IQ'ya sahiptir [152]. Farklı bir

çalışmayla, Hempel ve ark. (2016), 7 olguda *SOX11* dahil olmak üzere 2p25 kromozomunda delesyon ve üç kişide *de novo* *SOX11* varyantlarını bildirmiştir. Hastaların tümünün mikrosefali, gelişimsel gerilik ve tırnak hipoplazisi gibi hafif CSS özelliklerine sahip oldukları bildirilmiştir [153]. Okamoto ve ark. tarafından ise CSS kardiyak anomalisiyle birlikte erkek bir hastada bildirilmiştir [154].

Çalışmamız kapsamında ise *SOX11*-NM_003108.3:c.239C>T; p.Ser80Phe novel varyantı saptadığımız hastamız (E17_16) konjenital mikrosefali, ZY, havale öyküsü, gelişim geriliği, hipotoni, strabismus, sol elde simian çizgisi ve yüz dismorfolojisi ile tipik CCS fenotipini sergilemekte olduğundan, hastada *SOX11* CCS'den sorumlu olarak öne sürülebilir. Varyant genin HMG Domaininde yer almaktadır (Şekil 5-1). Yapılan *in silico* analizler, *SOX11* ekspresyonunun erken fetal evrede beyinde en yüksek seviyede olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Sox11 knockdown *xenopus laevis*'te mikrosefali ile ilişkilendirilmiştir [153].



Şekil 5-1: SOX11 proteini HMG domain varyantlarını gösteren şematik diyagram.

E17_16 kodlu hastadaki c.239C>T;p.Ser80Phe yeni *de novo* değişim, Tsurusaki ve ark 2014 ve Hempel ve ark 2016 yıllarında proteinin HMG domaininde bildirilen *SOX11* mutasyonları.

Bununla birlikte, c.239C>T mutasyonu *SOX11* HMG domaininde yer alır, bu nedenle herhangi bir protein ürününün DNA'ya bağlanamaması ve gen ekspresyonunu indükleyememesi muhtemeldir. Mutant proteinin, doğası göz önüne alındığında dengesiz olması da beklenir. Bu nedenle, hastadaki özgül mutasyonun *SOX11*'in hedef genlerini düzenleme kabiliyetine müdahale etmesi ve böylece fetal evrede beyin gelişimini etkileyerek mikrosefaliye sebep olması öne sürülebilir.

5.1.4. *TRIO* geni

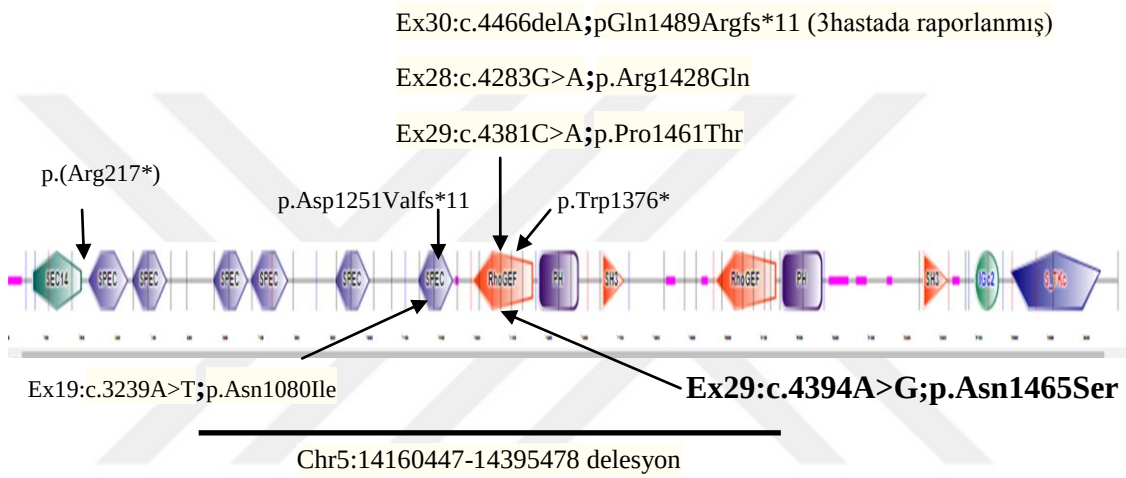
Prenatal döneminde mikrosefali klinik tanısını almış, postnatal döneminde de gelişim geriliği, hipertelorizm ve konuşma geriliği sergileyen E17_31 kodlu hasta için yapılan WES ve sekans validasyonu ile 57 ekzonlu, 3097 amino asit kodlayan *TRIO* geninin 29.ekzonunda 1465. Asparajin amino asidini serine dönüştüren yanlış anlamalı değişim tanımlanmıştır (Şekil 5-2). Trio Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (*TRIO*) geni 5p15.2'ye lokalizedir, ve evrimsel süreçte güçlü bir şekilde korunduğu gösterilmiştir [155].

TRIO, gelişen beyinde yüksek oranda ifade edilir; sıçan modellerinde beyinde doğum sonrası genin tüm transkriptleri gösterilmiştir [156,157]. *TRIO* ve onun paraloğu kalirin, memeli nöronal gelişiminde temel rol oynamaktadır. Farelerde trio delesyonu, nöronal göçün bozulmasına ve akson kusurlarına, global beyin azalmasına ayrıca hipokampus, serebellum ve korteksin anormal yapısal gelişimine neden olur [158,159]. Kısa süre önce hipokampus ve beyin korteksine özgü *Trio* knockoutlu fare modeliyle, *Trio*'nun hipokampusun nöronal gelişimini düzenlediği ve yetişkin farelerin öğrenme yeteneğini ve zekasını etkilediği sonucuna varıldığı bildirilmiştir. Fare sinir sistemindeki knockout veya spesifik *Trio* delesyonu embriyonik olarak ölümcüldür; embriyolar beyin organizasyonunda kusur gösterir ve beyin boyutunda azalma meydana gelir [158-160].

TRIO, beyincik, korteks, hipokampus ve talamusta dahil olmak üzere gelişmekte olan beynin birçok alanında yüksek oranda ifade edilir [156,160]. *TRIO* merkezi sinir sisteminde dahil olmak üzere pekçok dokuda eksprese edilen GEF'i kodlar [158,160]. Her bir GEF modülü bir Dbl homology (DH) domain ve Pleckstrin homology (PH) domaininden oluşur. *TRIO* iki ayrı GEF domainine sahiptir (Şekil5-2). Birinci GEF domaini GEFD1, Rac1 ve RhoG 'yi GDP'yi GTP'ye katalizleyerek aktive eder [161]. HEK293 hücre hattında *in vitro* fonksiyonel ekspresyon çalışmaları, GEFD1 alanını erken dur kodon mutasyonun ve yanlış anlamalı mutasyonların RAC1 aktivasyonunun azalmasına neden olduğunu göstermiştir [161].

Pengelly ve ark. tarafından *TRIO* varyantlarıyla rapor edilen 6 hastanın 5'i zihinsel yetmezlik, davranışsal bozukluklar, dismorfizm ve mikrosefaliyi içeren çekirdek bir fenotipi paylaşmaktadır [161]. Bununla birlikte bu 5 hastanında rapor edilen mutasyonları GEF modülünün DH domainindedir (Şekil 5-2). Sadece 1 hasta

Spectrin domaininde mutasyona sahiptir ve diğer hastaların sahip olduğu çekirdek fenotipi mikrosefali bulgusuz olarak paylaşmaktadır (Şekil 5-2). 2300 ZY'likli vakanın tarandığı farklı bir çalışmada ise 4 hasta *TRIO* geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarıyla bildirilmiştir [162]. İlginç olarak, Pengelly ve ark. tarafından bildirilen hastalarla bu 4 hasta benzer iskelet anomalileri, kısa boy, beslenme güçlüğü, asimetrik yüz ve mikrosefali bulgularını paylaşmaktadır. Dikkat çeken Pengelly ve ark.'ın raporladığı hastalar Ba ve ark.'ın truncated mutasyonlarla raporladığı hastalardan daha şiddetli mikrosefaliye sahiptir [161].



Şekil 5-2: E17_31’de bildirilen *de novo* değişimin yerini gösteren TRIO proteininin tam şematik diyagramı. Pennelly ve ark. tarafından keşfedilen mutasyonlarda Ex19:c.3239A>T, p.Asn1080Ile, Ex30:c.4466delA, pGln1489Argfs*11, Ex28:c.4283G>A, p.Arg1428Gln, Ex29:c.4381C>A, p.Pro1461Thr gösterilmiştir. p.(Arg217*), p.Asp1251Valfs*11, p.Trp1376*, Chr5:14160447-14395478 delesyon mutasyonları Ba ve ark. tarafından keşfedilenler gösterilmiştir. E17_31’deki Ex29:c.4394A>G; p.Asn1465Ser mutasyonu 1.RhoGEF domaininde yer almaktadır. TRIO, N-terminal SEC14 alanı, birkaç spektrin tekrarı, iki DH-PH Rho-GEF birimi, Ig-benzeri alan ve C-terminal varsayılan serin/treonin kinaz alanı SEC14 domainlarine sahiptir.

Şekil 5-2’de ilgi çeken özellik mikrosefalinin sadece GEFD1 bölgesinde, *TRIO* tarafından RAC1 aktivasyonunu etkileyen mutasyonları barındıran kişilerde mevcut olduğunun gösterilmiş olmasıdır [161]. Sinir sistemindeki Trio fonksiyonuna temel olarak Rac1 aktivasyonu aracılık ettiğinden, Rac1 aktivasyonunun Trio varyantları tarafından değiştirilmesinin mikrosefali ile ilişkili olduğu önerilebilir [161]. Ayrıca, Trio’nun hücre bölünmesinde görevli olduğu da gösterilmiştir [163] ve hücre döngüsü düzenlemesi ile ilişkili birçok genin farklı mikrosefali formlarında mutasyona uğradığı bilinmektedir [164]. Bu nedenle, *TRIO* mutasyonlu hastalarda gözlenen mikrosefali fenotipi bir hücre döngüsü kusurundan da kaynaklanabilir [161].

Çalışmamızda E17_31 kodlu hastada tespit edilen *de novo* heterozigot *TRIO* varyantı GEFD1 modülünde yer almaktadır (Şekil 5-2). Daha önce şiddetli mikrosefali tanısıyla GEFD1 modülü *de novo* heterozigot *TRIO* varyantları ilişkisi kesinleşmiştir [161]. Ayrıca, E17_31, bu hastalarla oldukça benzer fenotip göstermektedir. Bu bağlamda, E17_31 için *TRIO*-NM_007118.3:c.4394A>G; p.Asn1465Ser sorumlu patojenik varyant olarak öne sürülebilir.

ACMG kriterleri gereğince (PS2) ailesel validasyonun mecburi koşuluğu *de novo* mutasyonlar için M4 ve M5 ailelerinde yapılan hesaplamalara göre sırasıyla % 99,836 ve %99,825 oranında ailesel uyum vardır. Aynı yöntemle farazi olarak seçtiğimiz ve aralarında kan bağı olmayan 3 bireyi ‘psödo-trio’ olarak adlandırdık ve aralarındaki ailesel uyumu hesapladık. Anne (E18-36), baba (E17_24) ve çocuk (E17_16) olarak yaptığımız bu psödo-trio hesaplamasında ancak %38’lik bir uyum oranına ulaştık (Tablo 5-1).

Tablo 5-1: Psödo-trio ailesinin ailesel uyum hesabı.

a	Anne AA ve Baba BB olduğu SNP’ler (Çocuk zorunlu heterozigot olmalı)	23.476
b	(a) şıkında çocukta okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	31
c	Anne BB ve Baba AA olduğu SNPlar (Çocuk zorunlu heterozigot olmalı)	23.791
d	(c) şıkında çocukta okuma yapılamayan durum sayısı (NC)	35
e	Analize dahil edilen toplam SNP sayısı = a+c-b-d	47.201
f	(a) şıkında çocuğun AB olmadığı SNP sayısı (=AA veya BB)	14.470
g	(c) şıkında çocuğun AB olmadığı SNP sayısı (=AA veya BB)	14.795
h	Çocuğun zorunlu heterozigotluğa uymadığı toplam SNP sayısı = f+g	29.265
i	Çocuğun AB olduğu SNP sayısı = e-h	17.936
j	Beklenen trio dağılımını bozan SNP yüzdesi = h*100/e	%62
k	Beklenen trio dağılımındaki SNP yüzdesi = i*100/e	%38

5.2. WES ve SNP-Array ile Genetik Etiyolojisi Kesin Olmayan ve Açıklanamamış Olgular

Ekzom dizilemeye tabi olan bireyde ortalama 20.000-30.000 varyant listelenir bunun 9.000 ila 11.000 varyantı sinonim olmayan varyantlardır. Klinik ve genetik heterojenite gösteren Sendromik ZY gibi hastalıklarda WES tekniğinin doğasından ve analizin filtreleme aralık darlığından kaynaklanabilen bazı sınırlamalar bazen moleküler genetik sebebe ulaşmayı zorlaştırabilir.

On binlerce varyant arasından; farklı frekanslardaki varyantları sınıflandırma ve küçük bir veri setinde aday genleri rafine edip mutasyonu tespit edebilme, ekzom dizilemede en temel başlıca zorluk olabilir. Diğer bir zorluk, genomdaki bazı GC'ce zengin bölgelerde WES'in olağan teknik kusurundan dolayı düşük kapsama ve ekzom yakalama oranına sahip olması sayılabilir. Ayrıca, insan referans genom dizisinde biyolojik olarak var olan segmental kopyalarla dizileme sırasında doğru okumaların yapılması ve data analizinde kullanılan filtrelerle patojenik bölgelerin dışlanması ihtimali de mümkün olabilmektedir. Sözü edilen bu problemlerden çalışma boyunca karşılaşılanlar bu bölümde detaylandırılmıştır.

Örneğin, E17_33 kodlu bireyde *SHANK3* geninde NM_001080420.1:c.1394T>G,p.Phe465Cys tespit edilen ve IGV görüntüsüyle doğrulanan aday varyant için PZR yöntemiyle ileri primer: ACTAGGCTGCCCTGACCAC ve geri primer: CTTACGGCGATGAACTTG ile özgül bölge çoğaltılmasına çalışılmıştır. Bu primerlerle elde edilen ampikonun GC içeriği %77'dir. Farklı bir primer çifti tasarımına çalışılmış ancak daha düşük içerik elde edilememiştir. Deneysel aşamada *SHANK3* geni için özgül bölge çoğaltılması gerçekleştirilememiştir bölge GC nükleotidlerce zengindir.

SHANK3 geninin bir kopyasındaki delesyon veya mutasyonlar, 22q13.3 delesyon sendromu olarak da adlandırılan Phelan-McDermid sendromuna sebep olur. Bu sendrom gelişimsel gerilik, ciddi derecede bozulmuş bir dil, otistik davranışlar, makrosefali ve minör dismorfik özelliklerin bulunduğu bir nörogelişimsel bozukluktur [165]. Öte yandan WES ile mikrosefali, motor gerilik, konuşma geriliği, otizm, ZY,ataksi, alt ekstremitelerde ilerleyici spastisite, dismorfik bulgular, kısa boy fenotipine sahip bir olguda *SHANK3*'ün tek bir alelinde tespit edilen iki farklı *de novo* mutasyon bildirilmiştir [166]. İlginç olan hastamızın da çok benzer bu fenotipe sahip olmasıdır. IGV analizinde toplam 4 okumanın 1/3 oranında alternatif allel lehine heterozigot genotipe sahip oluşu (Şekil 4-35:2), dominant kalıtmı *de novo* bir varyant olabileceğini işaret etmektedir. Sanger validasyonunu gerçekleştirememiş olsakta E17_33 için WES listesinden elde kalan tek adaydır. Hastanın yüksek heterojenite sergileyen bulguları yeni bir sendromu işaret edebileceği gibi ailesel segregasyon gösteren *DDHD1* (Spastic parapleji 28) ve validasyonu gerçekleştirilememiş *SHANK3* birlikteliğinin bu karmaşık fenotipi açıklayabileceği ihtimalini de düşündürmektedir.

Özellikle WES'te bilinen genler için yapılan analizler sırasında, ek klinik detaylarının varlığı analizi farklılaştırabilir. E17_12 kodlu hastanın negatif *HECW2* validasyonu sonrası hasta için DOVE anotasyonlu ekzom veri listesinde yeni aday *SCN1A* varyantı olarak belirlenmiştir. FASTQ ve BAM dosyalarının yeniden analizinin başlangıçta kaçırılan varyantları tanımlaması nadir bir durum değildir [167].

İki farklı anotasyon dosyasından iki farklı gen varyantının değerlendirilmesi, bu modellerin birbirlerine üstünlüğünü göstermemektedir. Hastanın, konjenital mikrosefali değil ikincil mikrosefali bulgusundan ve ateşli nöbet öyküsünden hareketle DOVE modelinde *SCN1A* varyant tespiti yapıldığı hatırdan çıkarılmamalıdır, çünkü varyant VATK anotasyonlu dosyada da mevcuttur. Ancak, Sanger dizileme babanın hastayla aynı genotipe sahip olduğunu göstermiş ve hasta için Dravet sendrom ihtimalini ortadan kaldırmıştır.

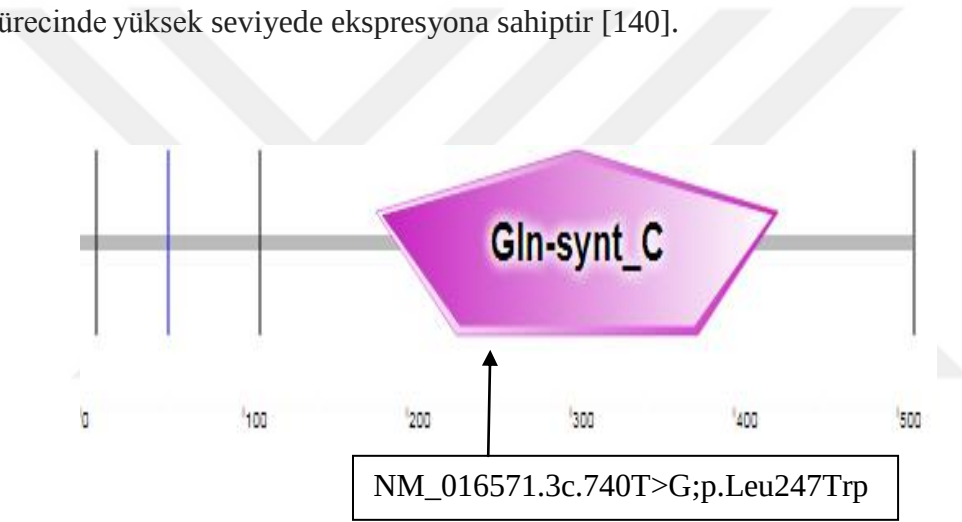
WES'te aslında genelde odaklanılan sinonim olmayan varyantların analizidir, çoğu zaman sinonim varyantlar dışlanarak saf dışı bırakılabilir. Ancak, amino asit değişikliğine sebep olmayan ve filtrelediğimizde listeyi yarı yarıya azaltarak daha kolay analiz imkanı sunan sinonim varyantların, özellikle protein ekspresyonu ve kırılma değişiklikleri yaratarak patojen etkiye sahip olabileceği yadsınmamalı ve mutlaka analiz edilmelidir. *In silico* tahmin araçları genelde sinonim varyasyonları değerlendiremez ve bu nedenle bu değişkenlerin işlevsel sonuçlarına dair anlayışımız yetersiz yorumlama ile çoğu zaman sınırlı kalmaktadır. Ancak, human splicing finder gibi programlarla bu değişkenler değerlendirilebilmektedir (<http://www.umd.be/HSF/HSF.shtml>).

Hem VATK hem de DOVE modelinde kullanılan Ensembl VEP aracılı anotasyonda sinonim olup kırılma etkisine sahip varyantlar dışlanmamış, ekzom veri listesine dahil edilmiştir. Dolayısıyla, E17_12 kodlu hastada bu durum göz önünde bulundurulmuş ve gerekli analizler gerçekleştirilmiştir. Buna rağmen, E17_12 tüm genom genotiplendirme ve WES yöntemiyle olası genetik etiyolojisini çözümleyemediğimiz hastadır.

WES analizlerinde karşılaşılabilen bir zorlukta, patojen etkide olabilecek aday genlerin daha önceden hastalık ilişkisi bildirilmemiş ve fonksiyonel çalışmaları hakkında da yeterli ve kesin bilginin olmaması durumudur. E17_23'te valide ve segrege eden *LGSN* varyantı bu bağlamda VUS (Variant Unknown Significance) olarak değerlendirilmiştir. Gen 6q12'ye lokalizedir ve 509 aa'lık bir protein kodlamaktadır.

Literatürde bildiğimiz kadarıyla *LGSN* ve mikrosefali, ZY ilişkisi rapor edilmemiştir. Kodladığı protein, bir glutamin sentez aktivitesine sahip olmadığı ve şaperon proteini olarak işlev görebileceği için yalancı-glutamin sentetaz olarak adlandırılır. Şaperonlar, protein katlanmasında görevlidir, hücrede yanlış katlanmış proteinleri tanıyarak düzeltir veya düzeltilmesi mümkün olmayan proteinleri parçalayarak hücrenin zarar görmesini engeller [168].

Bu protein lense lokalizedir ve katarakt hastalığı ile ilişkili olabilir. Alternatif kırılma mekanizmasıyla, birden çok transkript varyantı vardır. Aday varyantın tespit edildiği *LGSN-201* kodlu transkript (NM_016571.2) brainspan veri tabanında beyinde özellikle NPC'lerin yoğun olarak bulunduğu subventriküler zonda embriyonik gelişim sürecinde yüksek seviyede ekspresyona sahiptir [140].



Şekil 5-3: *LGSN* rs1166386174 A>C varyantının *LGSN* domainindeki lokalizasyonu.

Gln-synt_C :Glutamin sentetaz katalitik domain.

Bu çalışma kapsamındaki 9 olgudan sadece birine WES uygulanamamıştır, bu birey E17_18 olup, yalnızca SNP-array çalışılabilmiştir ve genomunda patojenik CNV saptanamamıştır. Ebeveynlerinde akrabalık ve aynı yöre evliliği bulunmayan bu hasta bazında, sendromik zihinsel yetersizlik gibi yüksek derecede klinik ve genetik heterojenite gösteren hastalıklarda *de novo* mutasyonların (mozaik ebeveynlerde) patojenik etkide olabileceği hatıra getirilmelidir. Literatürde her bir bireyin genomunda anne-babasından var olmayan 70 *de novo* mutasyon taşıdığı bilgisi yer almaktadır [169]. Bu konuda öncü çalışma Visser ve ark. tarafından yapılmıştır [170]. 10 trio (sağlıklı anne, baba ve etkilenmiş çocuk) aCGH ile patojenik CNV taşımadıkları belirlendikten sonra, WES'e tabi tutulmuştur. Yaygın varyantlar analizden çıkarılarak, çocukta olan

ebeveynlerde bulunmayan varyantlar arasından patojenik olabilecekler listelenmiştir. Bu stratejiyle 10 trionun 7'sinde aday patojenik mutasyon tanımlanmıştır [170].

M9 ailesinde ebeveynlerde akraba veya aynı yöre evliliğinin bulunmaması otozomal resesiften ziyade dominant kalıtım ihtimalini düşündürmektedir. Bu durumda trio-WES potansiyel olarak patojenik olanın, indeks-WES dizilemeye göre daha efektif biçimde tanımlanmasına yardımcı olabilir. Ancak, babanın kan vermeyi reddetmesi bizim için bu aileye trio-WES uygulama ihtimalimizi ortadan kaldırmıştır.

5.3. Sonuç ve Öneriler

Çalışma kapsamında nadir ve özellikle otozomal resesif kalıtılan varyantların 9 akraba/aynı yöre evliliği bulunan ailelerde tanımlanmasına çalışılmıştır. Patojenik CNV saptanmamış olan bu ailelerin 5'inde hastaların heterojen klinik fenotipini açıklayabilen *WDR62*, *SOX11*, *TRIO* genlerinde 3 yeni patojenik varyantla beraber *AP4M1* geninde daha önce tanımlı 1 patojenik varyant tespit edilmiştir. Burada analizleri ebeveynlerdeki akrabalık veya aynı yöre durumu her ne kadar resesif kalıtım modeline yönlendirse de, 5 ailenin ikisinde *de novo* varyantlarının keşfi; özellikle nadir ve kompleks hastalıkların akraba ailelerdeki analizlerinde dominant kalıtımında değerlendirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Hastalığın kaynağının resesif veya *de novo* olmasının tespiti özellikle genetik danışma alanında tekrarlama riskinin hesaplanması açısından aileler için son derece önemlidir. *De novo* varyantlarımız için herhangi bir ebeveynde mozaikliği işaret eden bir bulguya en azından çalıştığımız kan dokusunda rastlamadık. Ancak özellikle olası gonodal mozaiklik durumu bu varyasyonlar için tekrarlama riskini arttıracaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda zaten majör bir bulgusu olan Down Sendrom'lu E17_23 ve WES uygulanamayan E17_18 hariç, 7 hastanın 5'inin genetik etiyolojisinin NGS tekniklerinden WES'le aydınlatılması sağlanmıştır. Hastalardaki dominant kalıtım özelindeki mutasyonların varlığı da göz önüne alınarak direkt trio-WES önerilebilir. Sonuçlar pilot çalışma kabul edilerek mikrosefali bulgusu olan ancak moleküler genetik tanıdan yoksun bireylere WES uygulanabilirliğinin göstergesi olmuştur.

Tespit edilen 4 gen (*WDR62*, *AP4M1*, *SOX11*, *TRIO*) nöral farklılaşma ve hücre döngüsünde rol alır. Bu yolları hedefleyen tedavilerin gelişmesi bu heterojen ve nadir hastalık grubundan mustarip bireyler için bir umut ışığı olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1.American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Text Revision. 4th ed. Washington: American Psychiatric Association; 2000.
- 2.Kaufman L, Ayub M, Vincent J.B. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodevelop Disord*. 2010;2:182-209
- 3.Vissers L.E, Gilisen C, Veltman J.A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders.*Nature Reviews Genetics*. 2016;Volume 17:9-18
- 4.Vissers L.E. ve Stankiewicz P. Microcelektion and mikroduplikasyon sendromleri. *Methods Mol Biol*. 2012. 838:p.29-75
- 5.Shaheen R., Al-Salam Z., El-Hattab A.W., Alkuraya F.S. The syndrome dysmorphic facies, renal agenesis, ambiguous genitalia, mikrosefali, polidaktily ve lissensefali (DREAM-PL): Report of two additional patients. *Am J Med Genet A*. 2016; Aug 2.
- 6.Stoll C, et al. Parental consanguinity as a cause for increased incidence of birth defects in a study of 238,942 consecutive births. *Ann Genet*. 1999;42(3):133-9.
- 7.Figueiredo T, Melo U.S, Pessoa L.S, Nobrega P.R, Kitajima J.P, Correa I ve ark. Homozigous missense mutation in MED25 segregates with syndromic intellectual disability in a large consanguineous family. *J Med Genet*. 2015;52:123-127.
- 8.Leduc M.S, Niu Z, Bi W, Zhu W, Miloslavskaya I, Chiang T ve ark. CRIPT exonik deletion and a novel missense mutation in a female with short stature, dysmorphic features, mikrosefali, and pigmentary abnormalities.*Am J Med Genet A*. 2016;170(8):2206-11.
- 9.Tang M, Yang Y.F, Xie L, Chen J.L, Zhang W.Z, Wang J ve ark. Duplikasyon of 10q22.3-q23.3 encompassing BMP1A and NGR3 associated with congenital heart disease, mikrosefali, and mild intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2015 ;167A
- 10.Giorgio E, Ciolfi A, Biamino E, Caputo V, Di Gregorio E, ve ark. Whole exome sequencing is necessary to clarify ID/DD cases with de novo copy number variants of uncertain significance: Two proof-of-concept examples. *Am J Med Genet A*. 2016;170(7):1772-912):3174-9.
- 11.Basit S, Al-Harbi K.M, Alhijji S.A, Albalawi A.M, Eldardear A ve ark. CIT, a gene involved in neurogenic cytokinesis, is mutated in human primary mikrosefali. *Hum Genet*. 2016;135(10):1199-207.
- 12.Leduc M.S, Niu Z, Bi W, Zhu W, Miloslavskaya I, Chiang T, Streff H, ve ark. CRIPT exonik deletion and a novel missense mutation in a female with short stature, dysmorphic features, mikrosefali, and pigmentary abnormalities. *Am J Med Genet A*. 2016;170(8):2206-11.
- 13.Choi M., Scholl U.I, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P., ve ark. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(45):p.19096-101.
- 14.Klimova B, Storek M, Valis M, Kuca K. Global View on Rare Diseases:A Mini Review.*CurrMedChem*.2017;24(29):3153-3158.

- 15.Julkowska D, Austin CP, Cutillo CM, Gancberg D, Hager C, Halftermeyer J, ve ark. The importance of international collaboration for rare diseases research: a European perspective. *Gene Ther.* 2017. 24(9):562-571.
- 16.Mazzucato M, Visonà Dalla Pozza L, Manea S, Minichiello C, Facchin P. A population-based registry as a source of health indicators for rare diseases: the ten-year experience of the Veneto Region's rare diseases registry. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;19:9:37.
17. Boycott K. M., Vanstone M. R., Bulman D. E, MacKenzie, A. E. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat. Rev. Genet.* 2013;14, 681–691.
- 18.Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, ve ark. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes.*Nature.* 2009;10;461(7261):272-6.
- 19.Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, ve ark. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. 2010; *Nat Genet.*42(1):30-5.
- 20.Hoischen A, van Bon BW, Gilissen C, Arts P, van Lier B, Steehouwer M, ve ark. De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet.* 2010;42(6):483-5.
- 21.Gibson WT, Hood RL, Zhan SH, Bulman DE, Fejes AP, Moore R, ve ark. Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome.*Am J Hum Genet.* 2012;90(1):110-8.
- 22.Fernandez BA, Green JS, Bursey F, Barrett B, MacMillan A, McColl S, ve ark. Adult siblings with homozygous G6PC3 mutations expand our understanding of the severe congenital neutropenia type 4 (SCN4) phenotype. *BMC Med Genet.* 2012; 21;13:111.
- 23.Owen I. C, Bowden R, Parker J.M, Patterson J, Patterson J, Price S, ve ark. Extending the phenotype associated with the CSNK2A1-related Okur–Chung syndrome—A clinical study of 11 individuals. *Am. J. Med. Genet.* 2018;176, 1108–1114.
- 24.Singh, T. Kurki IM, Curtis D, Purcell MS, Crooks L, McRae J, ve ark. Rare loss-of-function variants in SETD1A are associated with schizophrenia and developmental disorders. *Nat. Neurosci.*2016;19,571–577.
- 25.Balasubramanian M, Willoughby J, Fry AE, Weber A,Firth HV, Deshpande C, ve ark. Delineating the phenotypic spectrum of Bainbridge-Ropers syndrome: 12 new patients with de novo, heterozygous, loss-of-function mutations in ASXL3 and review of published literature. *J. Med. Genet.* 2017;54, 537–543.
- 26.Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha EK, Sathirapongsasuti JF, ve ark. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci. Transl. Med.*2016; 8, 322ra9.
- 27.Homberg JR, Kyzar EJ, Scattoni ML, Norton WH, Pittman J, Gaikwad S, ve ark. Genetic and environmental modulation of neurodevelopmental disorders: Translational insights from labs to beds. *Brain Res Bull.* 2016;125:79-91.

28. American Psychiatric Association. Neurodevelopmental disorders. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington, VA: 2013.; *American Psychiatric Association Publishing*.
29. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, ve ark. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511:344–7.
30. Turner TN, Coe BP, Dickel DE, Hoekzema K, Nelson BJ, Zody MC, ve ark. Genomic patterns of de novo mutation in simplex autism. *Cell*. 2017;171:710–22. e712
31. Lynch, M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2010;107, 961–968.
32. Tărlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Exp Mol Med*. 2018; 7;50(8):100.
33. Manning, M., Hudgins, L., Professional, P. & Guidelines, C. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet. Med*. 2010.12, 742–745.
34. Volkmar F, Siegel M, Woodbury-Smith M, King B, McCracken J, State M; American Academy of Child and Adolescent Psychiatry (AACAP) Committee on Quality Issues (CQI). Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 2014. 53, 237–257.
35. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, ve ark. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*. 2014; 515:216–221.
36. Yuen, R.K, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, ve ark. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat. Med*. 2015.21, 185–191.
37. Krupp DR, Barnard RA, Duffourd Y, Evans SA, Mulqueen RM, Bernier R ve ark. Exonic mosaic mutations contribute risk for autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet*. 2017.101, 369–390.
38. Lim ET, Uddin M, De Rubeis S, Chan Y, Kamumbu AS, Zhang X, ve ark. Rates, distribution and implications of postzygotic mosaic mutations in autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci*. 2017.20, 1217–1224.
39. Rivière JB, Mirzaa GM, O’Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, ve ark. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012.44(8):934–40. doi: 10.1038/ng.2331.
40. Sahin M, Sur M. Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science*. 2015;350(6263).
41. Department of Health . Valuing people: a new strategy for learning disabilities for the 21st century . London : Department of Health ,2001.
42. Vickers RR, Gibson JS. A Review of the Genomic Analysis of Children Presenting with Developmental Delay/Intellectual Disability and Associated Dysmorphic Features. *Cureus*. 2019;12:11(1):e3873.

43. Boat TF, Wu JT. Mental Disorders and Disabilities among Low-income Children. Washington, D.C. The National Academic Press. 2015; Clinical characteristics of intellectual disabilities.
44. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of nonsyndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord*. 2010;2(4):182-209.
45. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(3):117-34.
46. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:161-187.
47. Reuter MS, Tawamie H, Buchert R, Hosny Gebril O, Froukh T, Thiel C ve ark. Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders. *AMA Psychiatry*. 2017;1:74(3):293-299.
48. Weller M, Tanieri M, Pereira JC, Almeida Edos S, Kok F, Santos S. Consanguineous unions and the burden of disability: a population-based study in communities of Northeastern Brazil. *Am J Hum Biol*. 2012;24(6):835-840.
49. Jamra R. Genetics of autosomal recessive intellectual disability. *Med Genet*. 2018;30(3):323-327.
50. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, ve ark. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med*. 2012;4:367(14):1321-31.
51. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, ve ark. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med*. 2012; 367, 1921–1929.
52. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, ve ark. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511,344–347.
53. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, ve ark. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011;478:57–63.
54. Heinzen EL, Depondt C, Cavalleri GL, Ruzzo EK, Walley NM, Need AC, ve ark. Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy. *Am. J. Human. Gen*. 2012; 91:293–302.
55. Abuelo D. Microcephaly syndromes. *Semin Pediatr Neurol*. 2007;14(3):118-27.
56. Woods CG. Human microcephaly. Review. *Curr Opin Neurobiol*. 2004;14(1):112-7.
57. Hashmi J.A, Al-Harbi K.M, Ramzan K, Albalawi A.M, Mehmood A, Samman M.I, ve ark. A novel splice-site mutation in the ASPM gene underlies autosomal recessive microcephaly. *Ann. Saudi Med*. 2016;36:391–396.
58. Alvarado-Socarras J.L, Idrovo Á.J, Contreras-García G.A, Rodríguez-Morales A.J, Audcent T.A, Mogollon-Mendoza A.C, ve ark. Congenital microcephaly: A diagnostic challenge during Zika epidemics. *Travel Med Infect Dis*. 2018;23:14-20.

59. Hanzlik E, Gigante J. Microcephaly. *Children (Basel)*. 2017;9:4(6). pii: E47. doi: 10.3390/children4060047.
60. Soares de Araújo J.S, Regis C.T, Gomes R.G.S, Tavares T.R, Rocha dos Santos C, Assuncao P.M, ve ark. Microcephaly in north-east Brazil: A retrospective study on neonates born between 2012 and 2015. *Bull. World Health Organ*. 2016. doi: 10.2471/BLT.16.170639.
61. Russell K, Oliver S.E, Lewis L, Barfield W.D, Cragan J, Meaney-Delman D, ve ark. Update: Interim Guidance for the Evaluation and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 2016;65:870–878.
62. Souza B.S.F, Sampaio G.L.A, Pereira C.S, Campos G.S, Sardi S.I, Freitas L.A.R, ve ark. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci. Rep*. 2016;doi: 10.1038/srep39775.
63. Wolf B, Diop F, Ferraris P, Wichit S, Busso C, Misse D, ve ark. Zika virus causes supernumerary foci with centriolar proteins and impaired spindle positioning. *Open Biol*. 2017;7:160231.
64. Kodani A, Yu TW, Johnson JR, Jayaraman D, Johnson TL, Al-Gazali L, ve ark. Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication. *Elife*. 2015;22:4.
65. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, ve ark. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics*. 2015;8 Suppl 1:S4.
66. Zaqout S, Morris-Rosendahl D, Kaindl AM. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): an update. *Neuropediatrics*. 2017;48(3),135–142.
67. Muhammad F, Mahmood Baig S, Hansen L, Sajid Hussain M, Anjum Inayat I, Aslam M, ve ark. Compound heterozygous ASPM mutations in Pakistani MCPH families. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009;149A(5), 926–930.
68. Naveed M, Kazmi S.K, Amin M, Asif Z, Islam U, Shahid K, ve ark. Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). *Genet Res (Camb)*. 2018;100:e7.
69. Nicholas AK, Swanson E.A, Cox J.J, Karbani G, Malik S, Springell K, ve ark. The molecular landscape of ASPM mutations in primary microcephaly. *J Med Genet*. 2009;46(4):249-53.
70. Finlay BL, Darlington RB. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*. 1995;268(5217):1578–1584.
71. Kaindl A. M, Passemard S, Kumar P, Kraemer N, Issa L, Zwirner A, ve ark. Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Progress in Neurobiology*. 2010;90(3):363–383.
72. Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science*. 1988;241(4862):170–176.
73. OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). <http://www.omim.org/> (Accessed 24 July 2017).
74. London Medical Database. [<http://www.imdatabases.com>]. August 2014.

- 75.von der Hagen M, Pivarcsi M, Liebe J, von Bernuth H, Didonato N, Hennermann JB, ve ark. Diagnostic approach to microcephaly in childhood: a two-center study and review of the literature. *Dev Med Child Neurol*. 2014;56(8):732-41.
- 76.Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, ve ark.Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2007;81(4):768-79.
77. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, ve ark. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 2010;464:704-712.
- 78.Dauber A, Golzio C, Guenot C, Jodelka FM, Kibaek M, Kjaergaard S, ve ark. SCRIB and PUF60 are primary drivers of the multisystemic phenotypes of the 8q24.3 copy-number variant.*Am J Hum Genet*. 2013;7;93(5):798-811.
- 79.Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease.*Nat Rev Genet*. 2012;13(8):565-75.
- 80.Jónsson H, Sulem P, Arnadottir GA, Pálsson G, Eggertsson HP, Kristmundsdottir S. ve ark. Multiple transmissions of de novo mutations in families. *Nat Genet*. 2018;50(12):1674-1680.
81. Iseri SAU. Kopya sayısı değişikliklerinin SNP array ile tespiti. Türkiye klinikleri-2. 2016 ;Ulusal Çocuk Genetik Sempozyumu Özel sayısı.2016;12(4):54-9.
82. Tang M, Yang Y.F, Xie L, Chen J.L, Zhang W.Z, Wang J. Duplication of 10q22.3-q23.3 encompassing BMPR1A and NGR3 associated with congenital heart disease, microcephaly, and mild intellectual disability.*Am J Med Genet A*. 2015;167A(12):3174-9.
83. Li Z, Liu J, Li H, Peng Y, Lv W, Long Z, ve ark. Phenotypic expansion of the interstitial 16p13.3 duplication: a case report and review of the literature.*Gene*. 2013;1;531(2):502-5.
84. Basit S, Malibari OI, Al-Balawi AM, Afzal S, Eldardear AE, Ramzan K. Xq21.31-q21.32 duplication underlies intellectual disability in a large family with five affected males. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(1):87-93.
85. Grada, A., Weinbrecht, K. Next-generation sequencing: methodology and application.*J Invest Dermatol*. 2013;133(11):p.1-4.
86. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet*. 2012;57:621–32.
87. Zhang X. Exome sequencing greatly expedites the progressive research of Mendelian diseases. *Front. Med*. 2014; 8(1): 42–57.
- 88.Bao R,Huang L, Andrade J,Tan W, Kibbe WA, Jiang H, ve ark. Review of Current Methods, Applications, and Data Management for the Bioinformatics Analysis of Whole Exome Sequencing. *Cancer Inform*. 2014; 13(Suppl 2): 67–82.
89. Wang Z, Liu X, Yang BZ, Gelernter J.The role and challenges of exome sequencing in studies of human diseases. *Front Genet*. 2013; 26;4:160.

90. Rabbani B, Tekin M, Mahdih. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of Human Genetics*. 2014;59,5-15.
91. Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics* 2016 Sep;15(5):374-84.
92. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009; 10(3):R25.
93. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9(4):357-9.
94. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754-60.
95. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010; 26(5):589-95.
96. Li H, Ruan J, Durbin R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res*. 2008; 18(11):1851-8.
97. Li R, Yu C, Li Y, Lam TW, Yiu SM, Kristiansen K, Wang J. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics*. 2009; 25(15):1966-7.
98. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. *Bioinformatics*. 2009; 25(16):2078-9.
99. Guo Y, Long J, He J, Li CI, Cai Q, Shu XO, Zheng W, Li C. Exome sequencing generates high quality data in non-target regions. *BMC Genomics*. 2012; 13:194.
100. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010; 20(9):1297-303.
101. Cabanski CR, Cavin K, Bizon C, Wilkerson MD, Parker JS, Wilhelmsen KC, et al. ReQON: a Bioconductor package for recalibrating quality scores from next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2012 ;13:221.
102. Breese MR1, Liu Y. NGSUtils: a software suite for analyzing and manipulating next-generation sequencing datasets. *Bioinformatics*. 2013;29(4):494-6.
103. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. 1000 Genomes Project Analysis Group. *Bioinformatics*. 2011; 27(15):2156-8.
104. Challis D, Yu J, Evani US, Jackson AR, Paithankar S, Coarfa C, et al. An integrative variant analysis suite for whole exome next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:8.
105. Dean J, Ghemawat S. MapReduce: simplified data processing on large clusters. *Commun.* 2008; ACM 51 107–113 10.1145/1327452.1327492.
106. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164–e164.

107. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, ve ark. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain. 2012; 6(2):80-92.
108. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(5): 490–497.
109. Miller, D.T,. Consensus statement:chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86(6):p.749-764.
- 110.Srivastava, S. et al., Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol*. 2014;76:p.473-483.
- 111.Gahl, W.A., et al., The National Institutes of Health Undiagnosed Diseases Program: insights into rare diseases. *Genet Med*. 2012;14:p.51-59.
112. Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpa N, Schroth J, Bielas S, Schaffer AE, ve ark.Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. *Sci Transl Med*. 2012;4:138ra–78.
113. Dymant DA, Sawyer SL, Chardon JW, Boycott KM. Recent Advances in the Genetic Etiology of Brain Malformations. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13:1–10.
114. Ko“hler S., Vasilevsky N.A., Engelstad M., Foster E., McMurry J., Ayme´ S., ve ark. The human phenotype ontology in 2017. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:865–76.
- 115.Shen J, Gilmore EC, Marshall CA, Haddadin M, Reynolds JJ, Eyaid W., ve ark. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet* 2010;42:245–9.
- 116.Nair P, Hamzeh AR, Mohamed M, Saif F, Tawfiq N, El Halik M,ve ark. Microcephalic primordial dwarfism in an Emirati patient with PNKP mutation. *Am J Med Genet A* 2016;170:2127–32.
117. Dastan J, Chijiwa C, Tang F, Martell S, Qiao Y, Rajcan-Separovic E, ve ark. Exome sequencing identifies pathogenic variants of VPS13B in a patient with familial 16p11.2 duplication. *BMC Med Genet*. 2016; 10;17(1):78.
118. Shaheen R, Fageih E, Ansari S, Abdel-Salam G, Al-Hassnan ZN, Al-Shidi T, ve ark. Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome Res*. 2014; 24(2):291-9.
119. Leduc MS, Niu Z, Bi W, Zhu W, Miloslavskaya I, Chiang T, ve ark.CRIPT exonic deletion and a novel missense mutation in a female with short stature, dysmorphic features, microcephaly, and pigmentary abnormalities. *Am J Med Genet A*. 2016;170(8):2206-11.
120. Khan MA, Rupp VM, Orpinell M, Hussain MS, Altmuller J, Steinmetz MO, ve ark. A missense mutation in the PISA domain of HsSAS-6 causes autosomal recessive primary microcephaly in a large consanguineous Pakistani family. *Hum Mol Genet*.2014; 23 (22) 2014.5940–5949.
121. Zhang Y, Li H, Pang J, Peng Y, Shu L, Wang H. Novel SASS6 compound heterozygous mutations in a Chinese family with primary autosomal recessive microcephaly. *Clin Chim Acta*. 2019;491:15-18.

122. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, T. Andrews D, ve ark. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;Vol 444. 444-454.
123. Richard A. A. Stein M.D. Cost Advantages Over Whole-Genome Sequencing Likely Main Factor in Growth. *Genetic Engineering & Biotechnology News (GEN)* 2011;Vol. 31, No. 18. Erişim 19.11.208, <https://www.genengnews.com/uncategorized/target-enrichment-field-continuing-to-expand/>
124. Bamshad, MJ., Ng, SB., Bigham, AW., Tabor, HK., Emond, M.J., Nickerson, D. A., ve ark. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011. 12(11):745–55.
125. Khan MA, Windpassinger C, Ali MZ, Zubair M, Gul H, Abbas S, ve ark. Molecular genetic analysis of consanguineous families with primary microcephaly identified pathogenic variants in the ASPM gene. *J Genet*. 2017;96(2):383-387.
126. Martin AR, Williams E, Foulger RE, Leigh S, Daugherty LC, Niblock O, ve ark. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet* (2019) doi:10.1038/s41588-019-0528-2 Erişim 19.11.2019 <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/activity/?panel=162>
127. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, ve ark. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
128. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
129. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46:310–315.
130. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009; 4:1073–1081.
131. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7:575–576.
132. Ku CS, Wu M, Cooper DN, Naidoo N, Pawitan Y, Pang B, Iacopetta B, Soong R. Exome versus transcriptome sequencing in identifying coding region variants. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012;12(3): 241–251.
133. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. Rozen, S.G. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(15):e115.
134. Koressaar, T., Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289-91.
135. Oegema R, Baillat D, Schot R, van Unen LM, Brooks A, Kia SK ve ark. Human mutations in integrator complex subunits link transcriptome integrity to brain development. *PLoS Genet*. 2017;13(5):e1006809.

136. Tüysüz B, Bilguvar K, Koçer N, Yalçınkaya C, Çağlayan O, Gül E, ve ark. Autosomal recessive spastic tetraplegia caused by AP4M1 and AP4B1 gene mutation: expansion of the facial and neuroimaging features. *Am J Med Genet A*. 2014; 164A(7):1677-85.
137. Berko ER, Cho MT, Eng C, Shao Y, Sweetser DA, Waxler J. Ve ark. De novo missense variants in HECW2 are associated with neurodevelopmental delay and hypotonia. *J Med Genet*. 2017;54(2):84-86.
138. Xu X, Yang X, Wu Q, Liu A, Yang X, Ye AY ve ark. Amplicon Resequencing Identified Parental Mosaicism for Approximately 10% of "de novo" SCN1A Mutations in Children with Dravet Syndrome. *Hum Mutat*. 2015. 36(9):861-72.
139. Zhu W, Li J, Chen S, Zhang J, Vetrini F, Braxton A, ve ark. Two de novo novel mutations in one SHANK3 allele in a patient with autism and moderate intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2018;176(4):973-979.
140. Zombor M, Kalmár T, Nagy N, Berényi M, Telcs B, Maróti Z, ve ark. A novel WDR62 missense mutation in microcephaly with abnormal cortical architecture and review of the literature. *J Appl Genet*. 2019;60(2):151-162.
141. Cherkaoui I, Zrhidri A, Jdioui W, Lyahyai J, Raymond L, Egéa G, ve ark. A novel non sense mutation in WDR62 causes autosomal recessive primary microcephaly: a case report. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):118.
142. Fujita H, Yoshino Y, Chiba N. Regulation of the centrosome cycle. *Molecular & Cellular Oncology*, 2016; 3:2.
143. Barbelanne M, Tsang WY. Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *Biomed Res Int*. 2014; <https://doi.org/10.1155/2014/547986>.
144. Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell*. 1999; 10(8):2787-802.
145. Robinson MS. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol*. 2004; 14(4):167-74.
146. Moreno-De-Luca A, Helmers SL, Mao H, Burns TG, Melton AM, Schmidt KR, ve ark. Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *J Med Genet*. 2011; 48(2):141-4.
147. Verkerk AJ, Schot R, Dumée B, Schellekens K, Swagemakers S, BertoliAvella AM, ve ark. Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy. *Am J Hum Genet*. 2009;85:40–52.
148. Pillai-Kastoori L, Wen W, Morris AC. Keeping an eye on SOXC proteins. *Dev Dyn* 2015;244:367–76. [10.1002/dvdy.24235](https://doi.org/10.1002/dvdy.24235).
149. Urban N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 2014;8:396 [10.3389/fncel.2014.00396](https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396).
150. Ninkovic J, Steiner-Mezzadri A, Jawerka M, Akinci U, Masserdotti G, Petricca S, ve ark. The BAF complex interacts with Pax6 in adult neural progenitors to establish a neurogenic cross-regulatory transcriptional network. *Cell Stem Cell*. 2013; 13, 403–418.

151. Pillai-Kastoori L, Wen W, Wilson SG, Strachan E, Lo-Castro A, Fichera M, ve ark. SOX11 is required to maintain proper levels of hedgehog signalling during vertebrate ocular morphogenesis. *PLoS Genet.* 2014;7:e1004491.
152. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, ve ark. De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Commun.* 2014a;2;5:4011.
153. Hempel A, Pagnamenta AT, Blyth M, Mansour S, McConnell V, Kou I, ve ark. Deletions and de novo mutations of SOX11 are associated with a neurodevelopmental disorder with features of Coffin-Siris syndrome. *J Med Genet.* 2016;53(3):152-62.
154. Okamoto N, Ehara E, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome and cardiac anomaly with a novel SOX11 mutation. *Congenit Anom (Kyoto).* 2018;58(3):105-107.
155. Schmidt S, Debant A. Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio. *Small GTPases.* 2014; 5:e29769.
156. Ma XM, Huang JP, Eipper BA, Mains RE. Expression of Trio, a member of the Dbl family of Rho GEFs in the developing rat brain. *J Comp Neurol.* 2005; 482(4):333-48.
157. McPherson CE, Eipper BA, Mains RE. Multiple novel isoforms of Trio are expressed in the developing rat brain. *Gene.* 2005; 347(1):125-35.
158. Peng YJ, He WQ, Tang J, Tao T, Chen C, Gao YQ, ve ark. Trio is a key guanine nucleotide exchange factor coordinating regulation of the migration and morphogenesis of granule cells in the developing cerebellum. *J Biol Chem.* 2010; 285(32):24834-44.
159. O'Brien S.P, Seipel K, Medley Q.G, Bronson R, Segal R, Streuli M. Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(22):12074-8.
160. Zong W, Liu S, Wang X, Zhang J, Zhang T, Liu Z, Wang D, Zhang A, Zhu M, Gao J. Trio gene is required for mouse learning ability. *Brain Res.* 2015; 1608:82-90.
161. Pengelly RJ, Greville-Heygate S, Schmidt S, Seaby EG, Jabalameli MR, Mehta SG, ve ark. Mutations specific to the Rac-GEF domain of TRIO cause intellectual disability and microcephaly. *J Med Genet.* 2016;53(11):735-742.
162. Ba W, Yan Y, Reijnders MR, Schuurs-Hoeijmakers JH, Feenstra I, Bongers EM, ve ark. TRIO loss of function is associated with mild intellectual disability and affects dendritic branching and synapse function. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(5):892-902.
163. Cannet A, Schmidt S, Delaval B, Debant A. Identification of a mitotic Rac-GEF, Trio, that counteracts MgcRacGAP function during cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 2014; 25(25):4063-71.
164. Barbelanne M, Tsang WY. Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:547986.
165. Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, ve ark. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet.* 2003;40(8):575-84.

166. Zhu W, Li J, Chen S, Zhang J, Vetrini F, Braxton A, ve ark. Two de novo novel mutations in one SHANK3 allele in a patient with autism and moderate intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2018;176(4):973-979.
167. Zighelboim I., Mutch D.G., Knapp A., Ding L., Xie M., Cohn D.E., ve ark. High frequency strand slippage mutations in CTCF in MSI-positive endometrial cancers. *Hum Mutat* 2014. 35:63–65.
168. Díaz-Villanueva JF, Díaz-Molina R, García-González V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):17193-230.
169. Sasani TA, Pedersen BS, Gao Z, Baird L, Przeworski M, Jorde LB, Quinlan AR. Large, three-generation human families reveal post-zygotic mosaicism and variability in germline mutation accumulation. *Elife*. 2019;8. pii: e46922.
170. Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P ve ark. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet*. 2010;42(12):1109-12.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 1331

Tarih : 21.11.2016

Konu : Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ hk.

Sayın Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ
Genetik

İlgi: Genetik Anabilim Dalının 14/10/2016 gün ve 370733 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Arş. Gör. Sevcan MERCAN' ın yürüteceği 2016/1231 dosya numaralı "Mikrosefalinin Eşlik Ettiği Zihinsel Yetmezlik Hastalarında ilişkili Gen Varyantlarının Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/11/2016 gün ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

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

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Mikrosefalinin Eşlik Ettiği Zihinsel Yetmezlik Hastalarında ilişkili Gen Varyantlarının Araştırılması"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, TÜBİTAK			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Mikrosefalinin Eşlik Ettiği Zihinsel Yetmezlik Hastalarında ilişkili Gen Varyantlarının Araştırılması"			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	24/10/2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	Belge Adı	☐	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒			
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	☐			
	İLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
KARAR BİLGİLERİ	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:19	Tarih: 11/11/2016			
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ' nin sorumluluğunda ve Arş. Gör. Sevcan MERCAN' ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐ H ☒ İZİNLI
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐ H ☐ İZİNLI
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐ H ☒ İZİNLI
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐ H ☐ İZİNLI
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐ H ☐ İZİNLI

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİKROSEFALİNİN EŞLİK ETTİĞİ ZİHİNSEL YETMEZLİK HASTALARINDA İLİŞKİLİ GEN VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%2	%1	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
2	www.tibbigenetik2018.org İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.uniprot.org İnternet Kaynağı	<%1
5	zfin.org İnternet Kaynağı	<%1
6	www.labome.org İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sevcan	Soyadı	Türker
Doğ.Yeri	Muratlı	Doğ.Tar.	01.01.1983
Email	mercansevcan@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE Genetik	
Yük.Lis.	The Australian National University	2011
Lisans	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi	2005
Lise	Tekirdağ Tuğlacılar Lisesi	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Arş.Gör.	Kafkas Üniversitesi	2012-devam

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	-	IELTS 6,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Erbilgin Y, Eskazan AE, Hatirnaz Ng O, Salihoglu A, Elverdi T, Firtina S, Tasar O, **Mercan S**, Sisko S, Khodzhaev K, Ongoren S, Ar MC, Baslar Z, Soysal T, Sayitoglu M, Ozbek U. Deep sequencing of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia patients with resistance to tyrosine kinase inhibitors. Leuk Lymphoma. 2019 Jan;60(1):200-207. doi: 10.1080/10428194.2018.1473573.

Erbilgin Y, Firtina S, **Mercan S**, Hatirnaz Ng O, Karaman S, Tasar O, Karakas Z, Celkan TT, Zengin E, Sarper N, Yildirmak ZY, Sisko S, Ozbek U, Sayitoglu M. Prognostic gene alterations and clonal changes in childhood B-ALL. Leuk Res. 2019 Aug;83:106159. doi: 10.1016/j.leukres.2019.05.009.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

