

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR İLE
İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN GENETİK VE
FONKSİYONEL KARAKTERİZASYONU**

TÜLAY ÖNCÜ ÖNER

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970194

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR İLE
İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN GENETİK VE
FONKSİYONEL KARAKTERİZASYONU**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

TÜLAY ÖNCÜ ÖNER

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.116 sayılı proje ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970194

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR	x
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Nörogelişimsel Bozukluklar	8
2.2. Nöronal Gelişim Mekanizması.....	12
2.3. Nörogelişimsel Bozuklukların Genetiği	15
2.4. Dizileme Teknolojileri.....	18
2.4.1. Sanger Dizileme	19
2.4.2. İnsan Genom Projesi.....	21
2.4.3. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri	22
2.4.3.1. Tüm Genom Dizileme	25
2.4.3.2. Tüm Ekzom Dizileme.....	25
2.4.3.3. RNA Dizileme	26
2.4.3.4. Diğer Dizileme Uygulamaları	28
2.5. tRNA (Transfer RNA).....	28
2.5.1. tRNA Yapısı ve Fonksiyonu	28
2.5.2. Wooble Hipotezi.....	31
2.5.3. tRNA Modifikasyonları.....	32
2.6. <i>OCLN</i> Geni.....	34
2.7. Elongatör Kompleksi ve <i>ELP6</i> Geni	36
2.7.1. Elongatör Kompleksi.....	36
2.7.2. <i>ELP6</i> Geni	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44

3.1. Araştırmanın Tipi	44
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	44
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	44
3.4. Çalışma Materyali	44
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	46
3.6. Veri Toplama Araçları.....	47
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	47
3.6.2. Genetik Analizler.....	49
3.6.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....	49
3.6.2.1.1. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyon ve Saflıklarının Belirlenmesi	50
3.6.2.2. Tüm Ekzom Dizileme Analizi	51
3.6.2.2.1. Yeni Nesil Dizileme Adaptörlü Kütüphane Hazırlığı	51
3.6.2.2.2. Ekzom Yakalama.....	51
3.6.2.2.3. Biyoinformatik Analiz	52
3.6.2.3. Önceliklendirilen Genlerdeki Mutasyonların <i>In Silico</i> Analizleri ve Doğrulanması ..	53
3.6.2.3.1. <i>In Silico</i> Analizler	53
3.6.2.3.2. Mutasyonların Sanger Dizileme İle Doğrulanması	54
3.6.2.3.2.1. PCR Reaksiyonlarının Kurulması	55
3.6.2.3.2.2. PCR Ürünlerinin Agaroza Jelde Görüntülenmesi	57
3.6.2.3.2.3. PCR Ürünlerinin Dizilenmesi.....	58
3.6.2.3.3. <i>ELP6</i> ve <i>OCN</i> Genlerinde Saptanan Missense Mutasyonlar İçin Türler Arası Korunmuşluk Analizi	58
3.6.3. Fonksiyonel Analizler	58
3.6.3.1. Deriden Punch Biyopsi Alınması	59
3.6.3.1.1. Primer Kültür Oluşturulması	59
3.6.3.1.2. Primer Kültür Hücrelerinin Pasajlanması.....	60
3.6.3.1.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü	60
3.6.3.1.4. Primer Kültür Hücrelerinin Dondurulması.....	61
3.6.3.2. Primer Kültür Hücrelerinden DNA İzolasyonu.....	62
3.6.3.2.1. Sanger Dizileme İle <i>ELP6</i> Genindeki Missense Mutasyonun Doğrulanması.....	63
3.6.3.3. RNA Dizileme Analizi	64
3.6.3.3.1. Primer Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu.....	64

3.6.3.3.1.1. RNA Miktar ve Saflık Tayini	65
3.6.3.3.1.2. Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi	65
3.6.3.3.2. RNA Dizileme İşlemi	65
3.6.3.3.3. Biyoinformatik Analiz	71
3.6.3.3.3.1. Kalite Kontrol	71
3.6.3.3.3.2. Karşılaştırmalı Ekspresyon Analizi	71
3.6.3.3.4. RNA Dizileme Analizi Sonuçlarının qPCR İle Doğrulanması	72
3.6.3.3.4.1. RNA'dan cDNA Eldesi	72
3.6.3.3.4.2. qPCR İşlemi	74
3.6.3.4. tRNA Modifikasyon Analizi	75
3.6.3.4.1. Primer Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	76
3.6.3.4.1.1. RNA Miktar ve Saflık Tayini	77
3.6.3.4.1.2. RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi	77
3.6.3.4.2. tRNA İzolasyonu	77
3.6.3.4.3. tRNA Parçalanması	77
3.6.3.4.4. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Analizi	78
3.6.3.5. Scratch Assay İle Migrasyon Analizi	79
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	80
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	81
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	81
3.10. Etik Kurul Onayı	82
4. BULGULAR	83
4.1. <i>OCN</i> Geni İle İlgili Bulgular	83
4.1.1. Aile-1	83
4.1.1.1. Aile-1'de Tüm Ekzom Dizileme, Sanger Dizileme ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları	83
4.1.2. Aile-2	86
4.1.2.1. Aile-2'de Tüm Ekzom Dizileme, Sanger Dizileme ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları	87
4.2. <i>ELP6</i> Geni İle İlgili Bulgular	90
4.2.1. Aile-3	90

4.2.1.1. Aile-3'te Tüm Ekzom Dizileme, Sanger Dizileme ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları.....	90
4.2.1.2. Deri Biyopsi Örneklerinden Primer Hücre Kültürü Oluşturulması ve Mutasyonun Validasyonu.....	96
4.2.1.3. Primer Kültür Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve Dizileme Analizi.....	98
4.2.1.3.1. RNA Dizileme Analizi Sonuçları.....	98
4.2.1.4. Primer Kültür Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve tRNA Modifikasyon Analizi	115
4.2.1.4.1. tRNA Modifikasyon Analizi Sonuçları	116
4.2.1.5. Primer Kültür Hücrelerinde Scratch Assay İle Migrasyon Analizi.....	119
5. TARTIŞMA	120
5.1. <i>OCLN</i> Geni.....	121
5.2. <i>ELP6</i> Geni	128
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	142
7. KAYNAKLAR.....	144
8. EKLER.....	162
8.1. Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Raporu.....	162
8.2. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Raporu.....	165
8.3. Araştırmacı Özgeçmişi	168

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1: Aile-1, Aile-2 ve Aile-3'te yer alan hastaların klinik özellikleri	45-46
Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar	47
Tablo 3: Çalışmada kullanılan malzemeler	48-49
Tablo 4: PCR işlemi için kullanılan primer dizilerinin listesi	55
Tablo 5: <i>OCN</i> geninde saptanan frameshift mutasyonun doğrulanması için <i>OCN1-F</i> ve <i>OCN1-R</i> primerleri ile kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları	55
Tablo 6: <i>OCN</i> geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması için <i>OCN2-F</i> ve <i>OCN2-R</i> primerleri ile kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları	56
Tablo 7: <i>ELP6</i> geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması için <i>ELP6-F</i> ve <i>ELP6-R</i> primerleri ile kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları	56
Tablo 8: <i>OCN1-F</i> ve <i>OCN1-R</i> primerleri ile kurulan PCR profili	56
Tablo 9: <i>OCN2-F</i> ve <i>OCN2-R</i> primerleri ile kurulan PCR profili	57
Tablo 10: <i>ELP6-F</i> ve <i>ELP6-R</i> primerleri ile kurulan PCR profili	57
Tablo 11: SuperScript II reverse transkriptaz enzimi ile first strand cDNA sentezi sıcaklık profili	67
Tablo 12: Kütüphane miktarının çoğaltılmasında kullanılan sıcaklık profili	70
Tablo 13: Kapa qPCR kiti ile kurulan PCR reaksiyon bileşenleri	70
Tablo 14: Kütüphane miktar ölçümünde kullanılan qPCR programı	71
Tablo 15: RNA'dan cDNA eldesinde kullanılan malzemeler ve miktarları	73
Tablo 16: RNA'dan cDNA eldesinde kullanılan malzemeler ve miktarları (devam)	73
Tablo 17: RNA'dan cDNA eldesinde kullanılan sıcaklık profili	73
Tablo 18: qPCR işleminde kullanılan primerler	74
Tablo 19: qPCR reaksiyon bileşenleri	75
Tablo 20: qPCR işleminde kullanılan sıcaklık profili	75
Tablo 21: HPLC koşulları	78
Tablo 22: Kütle parametreleri değerleri	78
Tablo 23: Aile-1'de <i>OCN</i> geninde saptanan frameshift mutasyonun özellikleri	84
Tablo 24: Aile-2'de <i>OCN</i> geninde saptanan missense mutasyonun özellikleri	87
Tablo 25: <i>OCN</i> geninde saptanan missense mutasyonun <i>in silico</i> analiz sonuçları	88

Tablo 26: Aile-3'te <i>ELP6</i> geninde geninde saptanan missense mutasyonun özellikleri.....	90
Tablo 27: <i>ELP6</i> geninde saptanan missense mutasyonun <i>in silico</i> analiz sonuçları	92
Tablo 28: DNA bağlanma bölgesi tespitine yönelik <i>in silico</i> analiz sonuçları.....	94
Tablo 29: <i>ELP6</i> proteini <i>in silico</i> PTM analiz sonuçları	95
Tablo 30: RNA dizileme için izole edilen RNA'ların miktar ve saflık değerleri.....	98
Tablo 31: Dizileme çalışmasına ait kalite kontrol istatistikleri	99-100
Tablo 32: Elongatör kompleksi genlerinin normalize edilmiş (DeSeq2) yoğunluk değerleri.....	110
Tablo 33: Hasta-4, Hasta-5 ve Anne örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla RNA dizileme analizi sonucu saptanan log2 kat değişimler	115
Tablo 34: tRNA modifikasyon analizi için izole edilen RNA'ların miktar ve saflık değerleri.....	115
Tablo 35: İzole edilen tRNA'ların miktar ve saflık değerleri.....	116
Tablo 36: tRNA modifikasyon analizinde saptanan nükleozidlerin pik alanı bilgileri ve normalizasyon verileri	117
Tablo 37: <i>OCLN</i> geninde mutasyon saptanan hastaların genetik ve klinik özellikleri...	123-124

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Hasta DNA'sından kişiselleştirilmiş tıp yolculuğuna kadar geçen süreç	11
Şekil 2: Gelişmekte olan (A) ve olgun beyinde (B) nörogelişimsel bozukluklarda etkilenen süreçler.....	14
Şekil 3: Nörogelişimsel bozuklukların genetik mekanizmaları	16
Şekil 4: Sanger dizileme yöntemi	20
Şekil 5: Yeni nesil dizileme teknolojileri.....	24
Şekil 6: tRNA'ların yapısı.....	30
Şekil 7: Genetik kod dejenerasyonu.....	31
Şekil 8: tRNA modifiye edici enzimler ile nörolojik ve metabolik bozukluklarda yer alan tRNA modifikasyon bölgeleri	33
Şekil 9: <i>OCN</i> geninin genomik lokasyonu	34
Şekil 10: Elongatör kompleksi.....	38
Şekil 11: Elongatör kompleksinin biyolojik işlevleri	39
Şekil 12: <i>ELP6</i> geninin genomik lokasyonu	42
Şekil 13: tRNA modifikasyon analizi deney düzeneği	75
Şekil 14: Aile-1'in pedigrisi.....	83
Şekil 15: Aile 1'de saptanan frameshift mutasyonun <i>OCN</i> geni (A) ve proteini (B) üzerindeki gösterimleri	84
Şekil 16: <i>OCN1-F</i> ve <i>OCN1-R</i> primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	85
Şekil 17: Aile-1'de <i>OCN</i> geninde saptanan frameshift mutasyonun kromatogram görüntüleri.....	85
Şekil 18: Aile-1'de <i>OCN</i> geninde saptanan frameshift mutasyonun bilgileriyle NMDEscPredictor veritabanında oluşturulan görüntü	86
Şekil 19: Aile-2'nin pedigrisi.....	86
Şekil 20: <i>OCN2-F</i> ve <i>OCN2-R</i> primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	87
Şekil 21: Aile-2'de <i>OCN</i> geninde saptanan missense mutasyonun kromatogram görüntüleri....	88

Şekil 22: Aile-2’de saptanan missense mutasyonun <i>OCN</i> geni (A) ve proteini (B) üzerindeki gösterimleri	89
Şekil 23: <i>OCN</i> genindeki missense mutasyonun yol açtığı amino asit değişikliğinin korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırılması	89
Şekil 24: Aile 3’ün pedigrisi	90
Şekil 25: ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	91
Şekil 26: <i>ELP6</i> geninde saptanan missense mutasyonun kromatogram görüntüleri	91
Şekil 27: Aile 3’te saptanan missense mutasyonun <i>ELP6</i> geni (A) ve proteini (B) üzerindeki gösterimi	92
Şekil 28: <i>ELP6</i> genindeki missense mutasyonun yol açtığı amino asit değişikliğinin korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırılması	93
Şekil 29: ELP6 proteininin ikincil yapısının dizi zincir görünümü	93
Şekil 30: ELP456 kompleksinin üç boyutlu yapısı	94
Şekil 31: Dört bireyden elde edilen primer hücre kültürlerine ait resimler	96
Şekil 32: Primer kültür hücrelerinden elde edilen DNA’lar ve ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	97
Şekil 33: Primer kültür hücrelerinde doğrulaması yapılan <i>ELP6</i> genindeki missense mutasyonun kromatogram görüntüleri	97
Şekil 34: RNA dizileme için izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	98
Şekil 35: Örnek başına toplam okumalara ait histogram	99
Şekil 36: Hasta-4 örneklerinin FastQC kalite grafikleri	101
Şekil 37: Hasta-5 örneklerinin FastQC kalite grafikleri	102
Şekil 38: Anne örneklerinin FastQC kalite grafikleri	103
Şekil 39: Kontrol örneklerinin FastQC kalite grafikleri	104
Şekil 40: Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol örneklerini içeren PCA grafikleri.....	105
Şekil 41: Ham verilere (A) ve normalize edilmiş (DESeq2) verilere (B) ait yoğunluk dağılım grafikleri	106
Şekil 42: Tüm genlere ait (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği	107

Şekil 43: En yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 genin (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği.....	108
Şekil 44: En yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 genin kodladığı proteinler arasındaki etkileşim	109
Şekil 45: Elongatör kompleksinin etkileşimde olduğu genlerin (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği.....	110
Şekil 46: Hasta-4, Hasta-5 ve Anne örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma (A) ve anlamlı artış (B) gösteren gen sayılarına ait Venn diyagramları	111
Şekil 47: Kontrol ve hasta örneklerinin (Hasta-4 ve Hasta-5) karşılaştırmalı ekspresyon analizini özetleyen volkan grafiği	112
Şekil 48: Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneklerine kıyasla anlamlı azalma gösteren genlerde GO_Biological_Process_2018 gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları.	113
Şekil 49: Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneklerine kıyasla anlamlı azalma gösteren genlerde GO_Cellular_Component_2018 gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları.	114
Şekil 50. Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı artış gösteren genlerde GO_Cellular_Component_2018 gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları.....	114
Şekil 51: tRNA modifikasyon analizi için izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	116
Şekil 52: tRNA modifikasyon analizi normalizasyon verileriyle oluşturulan görsel.	118
Şekil 53: Elongatör ilişkili tRNA modifikasyonlarına ilişkin dört bireye ait normalize pik alanlarının kıyaslanması	118
Şekil 54: Scratch assay analizinde sırasıyla 0., 12., 24. ve 36. saatlerde çekilen Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylere ait hücrelerin görüntüleri.....	119

KISALTMALAR

aCGH	: “Array Comparative Genomic Hybridisation” (Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon)
ACMG	: “American College of Medical Genetics Organization”
AGS	: “Aicardi-Goutieres Syndrome”
ALS	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ANKRD28	: “Ankyrin Repeat Domain 28”
BLC-PMG	: “Band-like Calcification with Simplified Gyration and Polymicrogyria”
BDNF	: Beyin Kökenli Nöron Büyüme Faktörü
BRP	: “Bruchpilot”
CADD	: “Combined Annotation Dependent Depletion”
cDNA	: Komplementer DNA
CNV	: “Copy Number Variation” (Kopya Sayısı Değişiklikleri)
CSF	: “Cerebrospinal Fluid” (Serebrospinal Sıvı)
CT	: Bilgisayarlı Tomografi
CTS	: “Centro-Temporal Spikes” (Sentro-temporal Diken Dalgalar)
CTU	: Sitosolik Tioüridilaz
ddNTP	: Dideoksinükleotid Trifosfat
DMD	: Duchenne Kas Distrofisi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNMT3A	: DNA Metiltransferaz-3A
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
DSM-5	: “The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fifth Edition”
DSSP	: “Dictionary of Secondary Structure of Proteins”
DYNC2H1	: “Dynein Cytoplasmic 2 Heavy Chain 1”
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELP6	: “Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 6”
ExAC	: “Exome Aggregation Consortium”

FBS	: Fetal Bovine Serum
FD	: “Familial Dysautonomia” (Ailesel Disotonomi)
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
FTSJ1	: FtsJ Metiltransferaz Homolog 1
GnomAD	: “Genome Aggregation Database”
GO	: “Gene Ontology”
GSEA	: Gene Set Enrichment Analizi
GTE_x	: “The Genotype-Tissue Expression”
HAT	: Histon Asetil Transferaz
hESC	: İnsan Embriyonik Kök Hücreleri
hetADAT	: Heterodimerik Adenozin Deaminaz
HGMD	: “Human Gene Mutation Database”
HSP70	: Isı Şok Proteini 70
ICC	: “Intracranial Compliance”
JAK-STAT	: Janus Protein Kinaz/Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktive Ediciler
JNK	: c-Jun NH2-terminal Kinaz
KAT	: Lizin Asetiltransferaz
KEGG	: “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
KIF15	: “Kinesin Family Member 15”
KRTAP5-10	: “Keratin Associated Protein 5-10”
LINE	: “Long INterspersed Elements”
LTR	: “Long Terminal Repeat”
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MARVEL	: “MAL and Related Proteins for the Vesicle Traffic and Membrane Link”
maxAAF	: “Maximum Subpopulation Allele Frequency”
MCCC2	: “Methylcrotonoyl-CoA Carboxylase 2”
mRNA	: Mesajcı RNA
MS	: Multipl Skleroz
ncRNA	: Non-coding RNA (Kodlamayan RNA)
NGS	: “Next Generation Sequencing” (Yeni Nesil Dizileme)
NMD	: Nonsense-aracılı Yıkım
OCLN	: “Occludin”

OMIM	: “Online Mendelian Inheritance in Man”
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PCA	: “Principal Component Analysis” (Temel Bileşenler Analizi)
PCR	: “Polymerase Chain Reaction” (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PMG	: Polimikrogiri
PXK	: “PX Domain-containing Protein Kinase-like Protein”
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	: Rolandik Epilepsi
RNA	: Ribonükleik asit
RNA-Seq	: RNA Dizileme
RNAPII	: RNA Polimeraz II
RNaz	: Ribonükleaz
rRNA	: Ribozomal RNA
SAM	: S-Adenozil-L-Metiyonin
shRNA	: “Short Hairpin RNA”
SINE	: “Short INterspersed Elements”
SNV	: “Single Nucleotide Variant” (Tek Nükleotid Varyantları)
STRING	: “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins”
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TNS1	: Tensin 1
TORCH	: “Toxoplasmosis, Other Infections, Rubella, Cytomegalovirus Infection, and Herpes Simplex”
tRNA	: Transfer RNA
TPR	: “Tetratricopeptide Repeat”
UTR	: “Untranslated Region”
VCF	: “Variant Calling File”
VEP	: “Variant Effect Predictor”
WDR4	: “WD Repeat Domain 4”
WDR36	: “WD Repeat Domain 36”
WES	: “Whole Exome Sequencing” (Tüm Ekzom Dizileme)
WGS	: “Whole Genome Sequencing” (Tüm Genom Dizileme)
ZO	: Zonula Okludens

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca deneyimleriyle beni yönlendiren, fikirleriyle bana ışık tutan ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr. Sultan CİNGÖZ'e; tez izleme komitesindeki hocalarım Prof.Dr. Oğuz ALTUNGÖZ ve Prof.Dr. Ayşe Semra HIZ'a; desteklerinden dolayı Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm öğretim üyesi ve çalışanlarına; çalışmalarımı eğlenceli hale getiren ve fikirlerini benimle paylaşan tüm bölüm arkadaşlarıma; desteklerinden dolayı "University of Washington Center for Mendelian Genomics"e; sonsuz desteği için Manisa Celal Bayar Üniversitesi öğretim üyesi Doç.Dr. Pınar MIZRAK ÖZFİRAT'a, ihtiyacım olan her konudaki yardımları için Öğr.Gör. Şengül CAN'a, RNA dizileme analizinin biyoinformatik kısmındaki desteği için Dr. Kemal ŞANLI'ya, bugüne kadar hep yanımda olan canım arkadaşlarıma; maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgi, sabır ve içtenlikleriyle her zaman yanımda olan ve beni destekleyen canım annem Şaziye ÖNCÜ, babam Salim ÖNCÜ, kardeşim Gülay ÖNCÜ İNCE ve eşi Yunus İNCE'ye, yakın zamanda aramızdan ayrılan melek babaannem Cemile ÖNCÜ'ye; beni her konuda destekleyen ve her zaman yanımda olan eşim Ramazan ÖNER'e, doktora eğitimim boyunca 2228-B programı kapsamında bana sağladığı burstan dolayı TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Tülay ÖNCÜ ÖNER

NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR İLE İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN GENETİK VE FONKSİYONEL KARAKTERİZASYONU

Tülay Öncü Öner

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim
Dalı, Narlıdere/İZMİR

ÖZET

Nörogelişimsel bozukluklar, merkezi sinir sisteminin büyüme ve gelişme hasarları ile ilişkili, bilişsel, nörolojik ve psikiyatrik bozukluklardan oluşan geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır. Son yıllarda genetik alanındaki gelişmeler sayesinde bu bozukluklarla ilişkili yeni birçok gen ve lokus tanımlanmasına rağmen; çoğu hastada hâlâ spesifik tanı konulamamakta, tedavi planlanamamaktadır. Bu durumda genetik ve fenotipik heterojenitenin rolü büyüktür. Çalışmanın amacı ebeveynleri akraba olan, nörogelişimsel bozukluğa sahip çocukların hastalık fenotipleriyle ilişkili olabilecek aday gen/gen bölgelerini belirlemek ve *ELP6* geninde saptanan mutasyonun etkisini fonksiyonel çalışmalarla ortaya koymaktır.

Çalışmanın genetik analiz aşamasında beş hasta çocuğun yer aldığı üç ailede tüm ekzom dizileme analizi yapılmış, biyoinformatik analizlerle aday genler önceliklendirilmiş, mutasyonlar Sanger dizilemeyle doğrulanmıştır. Aile-1’de iki kardeşte *OCNL* geninde saptanan frameshift mutasyonun (p.Trp58Phefs*10) Türkiye popülasyonunda “founder” etkisi olabileceği düşünülmektedir. Aile-2’de saptanan *OCNL* genindeki novel homozigot missense mutasyon (p.Ile67Phe) BLC-PMG fenotipi için ek genetik bulgular sunmaktadır. Aile-3’te iki kardeşte *ELP6* geninde homozigot missense mutasyon (p.Leu118Trp) saptanmıştır. Çalışmanın fonksiyonel analiz aşaması Elongatör kompleksinin subuniti olan *ELP6* genine yöneliktir. Aile-3’teki iki kardeş, anneleri ve kontrol bireyden punch deri biyopsi örnekleri alınmış, primer hücre kültürleri oluşturulmuştur. RNA dizileme, tRNA modifikasyon analizi,

migrasyon analizi yapılmış ve dört bireyin verileri kıyaslanmıştır. RNA dizileme analiziyle ekspresyonu anlamlı düzeyde değişen genler belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Elongatör kompleksinin işlevleriyle uyumlu bulunmuştur. tRNA modifikasyon analizi sonucunda hastalarda Elongatör ilişkili modifikasyonlarda azalma tespit edilmiştir. Hastalara ait hücrelerin migrasyon hızlarının kontrolden yüksek olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak elde edilen verilerle *OCLN* gen varyantları genişletilmiştir. Literatürde ilk defa insanda *ELP6* gen mutasyonu bildirilmiştir. Fonksiyonel analiz sonuçlarının, *ELP6*'nın işlevini anlamaya katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nörogelişimsel Bozukluklar, Fonksiyonel Karakterizasyon, Tüm Ekzom Dizileme, RNA Dizileme, tRNA Modifikasyon Analizi

GENETIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS

Tulay Oncu Oner

Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences, Department of Medical
Biology and Genetics, Narlidere/İZMİR

ABSTRACT

Neurodevelopmental disorders include a wide spectrum of cognitive, neurological, psychiatric disorders related to growth and developmental damage of central nervous system. Although new genes/loci associated with these diseases have been identified in recent years, there is still no specific diagnosis or treatment for most patients due to genetic and phenotypic heterogeneity. Aim of study is to determine candidate gene/gene regions that may be associated with disease phenotype of patients with neurodevelopmental disorders and to reveal effect of mutation detected in *ELP6* through functional studies.

In genetic analysis part, WES was performed in three families, candidate genes were prioritized with bioinformatics analysis, mutations were confirmed by Sanger sequencing. A frameshift mutation (p.Trp58Phefs*10) in *OCN*, detected in Family-1, suggested a potential founder effect in Turkish population. A novel homozygous missense mutation (p.Ile67Phe) in *OCN*, detected in Family-2, provides additional genetic findings for BLC-PMG phenotype. A homozygous missense mutation (p.Leu118Trp) was detected in *ELP6* in Family-3. In functional analysis part, punch skin biopsy samples were taken from two siblings, their mothers in Family-3 and a control individual, then primary cell cultures were prepared. Differentially expressed genes were determined by RNA-seq and the results were compatible with the function of Elongator complex. Results of tRNA modification analysis showed that Elongator-dependent tRNA modifications decrease in patients. Migration rates of patients's cells were higher than control's.

Consequently, variation spectrum of *OCLN* gene has been expanded. *ELP6* mutation has been reported for the first time in humans. Functional analysis results will contribute to understanding function of *ELP6*.

Key Words: Neurodevelopmental Disorders, Functional Characterization, Whole Exome Sequencing, RNA Sequencing, tRNA Modification Analysis

1. GİRİŞ VE AMAC

Nörogelişimsel bozukluklar, yaşamın erken döneminde nöronal gelişimin farklılaşması sonucu ortaya çıkmaktadır. Yeni doğan çocukların en yaygın malformasyonlarından olmakla birlikte; toplumda nadir görülen spesifik genetik sendromlardan, otizm spektrum bozuklukları, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, motor bozuklukları, özgül öğrenme bozukluğu, iletişim bozuklukları ve zihinsel yetersizliğe kadar oldukça geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır (1, 2). Bu hastaların çoğunun bakımı oldukça zor olup aileleri maddi ve manevi yönden büyük zarar görmektedir. Genetik değişiklikler ve embriyonel dönemdeki uygunsuz çevresel koşullar oluşmalarında önem taşımaktadır. Nörogelişimsel hastalıklar, görünüşte farklı primer tanı ve dikkate değer klinik heterojenite göstermelerinin yanı sıra, birbirleriyle örtüşen fenotipik özellikleriyle de yıllarca ilgi odağı olmuştur (3). Nörogelişimsel bozukluklarda çoğu zaman genotip öncelikli yaklaşım uygulanarak genetik değişiklikler saptanmakta ve klinik bulgular ile birlikte değerlendirilerek genotip-fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılmaktadır.

Nörogelişimsel bozuklukların araştırılması çalışmalarında genetik heterojenite en önemli kısıtlayıcı nedenlerden birisidir. Genetik altyapının bilinmemesi nedeniyle hastalara tanı konulmasında ve tedavi protokollerinin belirlenmesi ve takip edilmesinde de çeşitli zorluklar yaşanmaktadır. Bazı hastalar tedaviye yanıt verirken bazıları ise hiçbir tedaviye yanıt verememektedir. Tüm bu zorluklara rağmen son 15-20 yılda moleküler genetik, gelişim biyolojisi ve nöroradyolojik alanlardaki gelişmeler sayesinde nörogelişimsel bozukluğa sahip hastaların fenotipleri ile ilgili çok sayıda gen ve gen bölgesi önerilmiştir. Ancak mevcut bilgilerle bu sınıflandırmalarda yer alamayan pek çok hasta bulunmaktadır (4, 5).

Yeni nesil dizileme teknolojileri araştırmacılara genom, transkriptom, epigenom ve DNA-protein etkileşimleri ile ilgili pek çok bilgi sağlamaktadır. Bu dizileme teknolojileri yeni gen ve fenotip ilişkisi belirlemede tanısal sürecin bir parçası haline gelmiştir. Tüm ekzom dizileme analizi, Mendelyan hastalıklarda hastalığa neden olan potansiyel varyantları düşük maliyetle ve hızlı bir şekilde tanımlayabilmekte ve özellikle pek çok tanısal test uygulanmasına rağmen tanı konulamamış nörogelişimsel bozukluğa sahip çocuklarda hızlı tanı konulmasına imkân sağlamaktadır. Bu nedenlerle tüm ekzom dizileme analizinin hastalık tanısının yanı sıra tarama, tedavi ve prenatal tanı da önemli düzeyde kullanım alanları

oluşturmuştur (6, 7). RNA dizileme (RNA-Seq) yöntemi de mRNA (mesajcı RNA)'dan üretilen komplementer DNA (cDNA)'ları yüksek verimli bir şekilde doğrudan dizilemek için yeni nesil dizileme teknolojisini kullanmaktadır. RNA (Ribonükleik asit) dizileme aslında bir gen anlatım çalışmasıdır ve tüm transkriptom verisinin anlık bir görüntüsünü sunmaktadır. Hem transkripsiyonel yapının hem de transkriptlerin ekspresyon seviyelerinin kapsamlı bir görünümünü vermektedir. RNA dizileme ile hücrel transkripsiyonel profil detaylı olarak incelenebilmekte, yeni transkriptler, gen füzyonları ve alternatif kırılma bölgeleri tespit edilebilmektedir. RNA dizilemenin, tüm genom dizilemenin kullanımının artmasıyla birlikte, varyantların etkilerinin değerlendirilmesi noktasında daha fazla yer bulacağı düşünülmektedir (8, 9).

Protein fonksiyonu üzerinde hastalığa neden olan mutasyonların dört olası etkisi vardır. Bunlar; proteinin fonksiyon kaybı, fonksiyon kazanımı, yeni bir özellik kazanımı, bir genin yanlış zamanda veya yanlış yerde ekspresyonudur. Bu etkiler transkripsiyonel ve translasyonel mekanizmalar ve sinyal yolları üzerinden hastalık fenotipleri ile karşılık bulabilmektedir. Amino asit değişikliğine yol açan kodlanan dizideki missense mutasyonlar, genin fonksiyonunu bozabilmekte, ortadan kaldırabilmekte ya da proteini dengesiz hale getirebilmektedir. Bir proteinin kodlama dizisindeki en zararlı değişikliklerden olan frameshift mutasyonlar ise okuma çerçevesini değiştirerek translasyonun erken sonlanmasına neden olabilmektedir (10). Bir hastalık fenotipinde tespit edilen yeni bir gen veya gen bölgesinin moleküler ve biyolojik süreçlere olan etkisini ortaya koymak amacıyla hücre kültürlerini içeren *in vitro* ve hayvan deneylerini içeren *in vivo* çalışmalarla fonksiyonel analizlere başvurulmaktadır. Bu amaçla gen ürününün işlevleri, hücrel lokalizasyonu, yer aldığı biyolojik ve moleküler süreçler, etkileşimde olduğu diğer proteinler ve içerdiği fonksiyonel birimler göz önüne alınarak fonksiyonel karakterizasyonuna yönelik deney basamakları oluşturulmaktadır. Ayrıca son yıllarda hastalıkla ilişkili mutasyonların fonksiyonel analizinde biyoinformatik yaklaşımlar da sıklıkla kullanılmakta ve mutasyonun patojenik etkilerini öngörmek adına *in silico* analizler yapılabilmektedir (11).

Çalışmanın genetik karakterizasyon kısmındaki amacı ebeveynleri akraba evliliği olan nörogelişimsel bozukluğa sahip beş hasta çocukta fenotipik değişiklikleri ile ilişkili olabilecek genomik değişiklikleri saptamaktır. Bu amaçla hastalarda tüm ekzom dizileme analizi ile hem yeni aday genler hem de bilinen aday genlerde yeni mutasyonlar saptanarak bunlara bağlı fenotipler tanımlanmaya çalışılmıştır. Genomik çalışma sonucunda önceliklendirilen

hastalığın etiyolojisinde yer alan hedef gen ve gen ürünleri için, nöronal gelişim mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayacak yeni *in silico* ve *in vitro* deneysel modellerin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda planlanan çalışmanın fonksiyonel karakterizasyon kısmındaki amacı ise *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun etkilerine ve *ELP6* geninin foksiyonunu anlamaya yönelik bulgular elde etmektir. Elongatör kompleksi transkripsiyon sürecinde rol oynadığından, bu kompleksin bir subuniti olan *ELP6* genindeki missense mutasyonun diğer genlerin ekspresyonlarını etkileme potansiyeli olabileceği düşünülmüş ve RNA dizileme analizi ile hastaların transkriptom profillerinin incelenmesine karar verilmiştir. Elongatör kompleksinin nörolojik bozukluklarla ilişkisinin tRNA modifikasyonundaki rolü aracılığıyla gerçekleşebildiği ve hücre migrasyonunu etkilediği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu bulgular ışığında *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun Elongatör kompleksinin bu iki önemli fonksiyonu üzerinde etkisi olup olmadığının saptanması hedeflenmiştir. Hem transkripsiyonel hem de translasyonel süreci etkileyebilecek olan Elongatör kompleksiyle ilgili her çalışma büyük önem arz etmektedir.

Nörogelişimsel bozuklukların genetik temellerini belirlemek ve karakterize etmek, bu bozuklukların önlenmesi ve tedavi edilmesi ile ilgili stratejiler geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Nörogelişimsel bozukluklarda aday genlerin ve bu genlerin ekspresyon ürünlerinin saptanması, hastalıkların tanısında kullanılabilecek biyobelirteç panelleri ve tedavi için spesifik ilaç geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörogelişimsel Bozukluklar

Nörogelişimsel bozukluklar, anormal beyin gelişimi sonucunda biliş, davranış, iletişim ya da motor becerilerde oluşan bozukluklarla karakterize edilen çok yönlü durumlardır (12). Bu bozukluklar toplumumuzda ciddi bir sağlık problemi olmakla birlikte; dünya genelinde çocukların %2-5'ini etkilemektedir. Nörogelişimsel bozuklukların nedenleri genellikle gebelik veya doğum sırasında oluşmaktadır. Gebelik enfeksiyonu ve annenin alkol tüketimi gibi çeşitli mekanizmalar bu tür gelişimsel bozukluklara neden olabilirken, gelişimsel açıdan önemli genlerdeki genetik çeşitliliğin zarar görmesinin büyük bir katkısı vardır (13). Belirtileri gelişimin erken dönemlerinde, çoğunlukla da okul çağı öncesinde görülmektedir. Bu bozukluklar toplumsal, bireysel, uğraşsal ve eğitsel işlevlerde aksamalara neden olmaktadır (14, 15).

Nörogelişimsel bozukluklarda semptomların ciddiyeti, başlangıç yaşı ve farklı klinik fenotiplerin komorbiditesindeki değişkenliği içeren fenotipik heterojenite görülmektedir (16). Nörogelişimsel bozuklukların klinik heterojenliği, teşhis sürecinin uzun ve masraflı olmasına yol açmakta ve kişiselleştirilmiş tıp arayışını zorlaştırmaktadır (17).

Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı'nın son baskısının (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition; DSM-5) kriterlerine göre nörogelişimsel bozukluklar; otizm spektrum bozuklukları, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, motor bozuklukları, özgül öğrenme bozukluğu, iletişim bozuklukları, zihinsel yetersizlikler ve diğer nörogelişimsel bozukluklar şeklinde sınıflandırılmıştır (2). Bu bozukluklardan iki veya daha fazlasının komorbiditesi sıklıkla gözlenmektedir. Nörogelişimsel bozukluğu olan hastalarda zihinsel yetersizlik, otizm spektrum bozuklukları ve epilepsi kombinasyonu çok sık görülmektedir (18). Epilepsinin otizmlili bireylerde genel nüfusa göre 10-30 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca otizmlili bireylerin %28-83'ünde dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu; %0.7-27 bipolar bozukluk, %17-56'sında obsesif kompulsif bozukluk, %17'sinde travma sonrası stres bozukluğu komorbiditesinin varlığı ortaya konmuştur. Zihinsel yetersizliği olan bireylerde genel popülasyonun 3-4 katı daha fazla psikiyatrik bozuklukların görüldüğü tespit edilmiştir. Bazı klinik çalışmalar şizofreninin, bipolar bozukluk gibi diğer psikiyatrik hastalıklarla, aynı

zamanda bazı yapısal beyin malformasyonlarının yanı sıra, farklı şiddetteki bilişsel bozukluklarla birlikte olabileceğini göstermiştir. Öğrenme geriliği ve şizofreni hastalığı olan bireylerde epileptik nöbet yatkınlığı dikkat çeken klinik özelliklerden olmuştur. Korpus kallozum anomalilerinin de zihinsel yetersizlik, otizm, epilepsi, serebral palsi ve şizofreni gibi yaygın nörogelişimsel bozukluklarla birlikte görüldüğü rapor edilmiştir (19-21). Aynı zamanda, minör dismorfizm (yüz ve diğer yüzeysel fiziksel anomaliler) veya çoklu konjenital anomaliler de nörogelişimsel bozukluk semptomları ile bir arada gözlenebilmektedir. Bu örnekler, nörogelişimsel hastalıklar arasında epidemiyolojik açıdan bir bağ olma olasılığını güçlendirmektedir. Komorbid durumların değerlendirilmesi, tespiti ve tedavisi bu bireylerin eğitsel programlarına, öğrenmelerine, hayat kalitelerine önemli derecede katkı sağlamaktadır (22, 23).

Nörogelişimsel bozuklukların genetik alt yapısı oldukça karmaşıktır. Bir veya birden fazla etken aynı anda hastalık nedeni olabilmektedir (24, 25). Kromozomal yeniden düzenlemeler, kopya sayısı varyasyonları (Copy Number Variation; CNV), küçük indeller ve nokta mutasyonları dâhil olmak üzere nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkili çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır (18). Nörogelişimsel bozukluklarda etkilenmiş genler büyük işlevsel ağlar üzerinde rol oynamakta; nöronal gelişim, nöronal göç, akson rehberliği, sinyal yolları, kromatin ve transkripsiyon düzenlenmesinde görev almaktadır (26). Pek çok çalışma, paylaşılan moleküler yolların nörogelişimsel bozuklukları karakterize eden çoklu klinik bulguları açıklayabileceğini öne sürmektedir. Farklı nörogelişimsel bozuklukların paylaşılan bu patojenik mekanizmalarının tanımlanması, gözlenen komorbiditeleri açıklamaya yardımcı olacak ve etkili tedavi için yol gösterici olacaktır (18).

Nörogelişimsel bozuklukların genetik heterojenliğini açıklamak için ilk adımlar, karyotipleme ve FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır (27). Down, Turner ve Klinefelter sendromları gibi klinik olarak şüpheli kromozom anöploidisi olan belirli bir grup hasta için veya kromozomal yeniden düzenlemeleri düşündüren bir aile öyküsü için karyotip analizi ilk başvurulacak genetik test olarak önerilmektedir. Bunun nedeni, nörogelişimsel bozukluğa sahip hastaların önemli bir kısmında (%4-28.4) trizomi, subtelomerik yeniden düzenlemeler ve dengeli kromozomal yeniden düzenlemeler dâhil olmak üzere kromozom anormalliklerinin tespit edilmesidir. Örneğin idiyopatik şiddetli zihinsel yetersizliği olan hastaların %6'sında subtelomerik kromozom yeniden düzenlemeleri rapor edilmiştir (28). Karyotipleme analizi, nedeni bilinmeyen ve

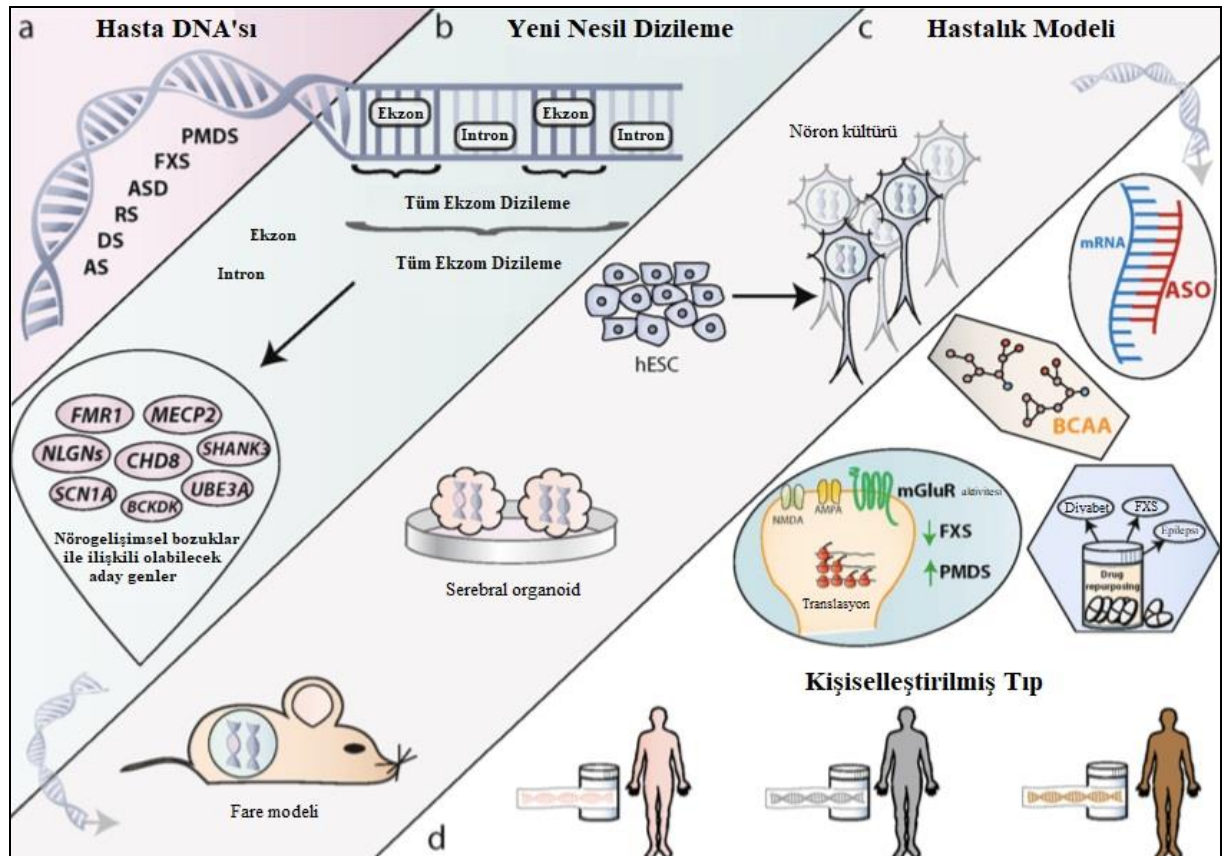
ailede nörogelişimsel bozukluk geçmişi olmayan bireylerde genetik test için oldukça faydalıdır. Diğer yandan fenotipin belirli bir bozukluğu düşündürdüğü veya araştırılacak belirli genomik bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunduğu durumlarda FISH analizi uygulanabilmektedir. FISH analizi, Duchenne kas distrofisinde (DMD) distrofin, şizofrenide *DISC1* ve Menkes hastalığında *ATP7A* ve subtelomerik delesyon sendromları gibi kromozomal kırılma noktalarında konjenital anomalilerle ilişkili birçok hastalık geninin tanımlanmasını sağlamıştır (22).

Tüm genomun analizini mümkün kılan, aCGH (Array Comparative Genomic Hybridization), SNP array ve dizileme tekniklerinin geliştirilmesi ile beraber nörogelişimsel bozukluklar için genetik ilişkilendirme araştırmaları artmıştır. Gelişimsel yetersizliği olan bireylerin artmasıyla nükleotid varyasyonlarının daha doğru bir şekilde tespit edilme ihtiyacı doğmuştur. Bu bağlamda geliştirilen kromozomal mikroarray teknolojisi genetik varyasyon tespiti için zemin hazırlamıştır (27). aCGH, gelişim geriliği ve zihinsel yetersizliği olan bireyler için karyotip analizinin yerini alarak genetik testin ilk adımı olarak kullanılmaya başlanmış ve tanısal verimi büyük ölçüde artırmıştır. aCGH, nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkili CNV'leri tanımlamak için güçlü bir yaklaşımdır ve pek çok çalışmada spesifik klinik özelliklerle ilişkili rekürren mikrodelsyonlar ve mikroduplikasyonlar bu teknik ile tanımlanabilmektedir. Ayrıca, yapılan son çalışmalar, nadir ve *de novo* CNV'lerin klinik olarak anlamlı kabul edildiğini ve nörogelişimsel bozukluk vakalarının %15-20'sinden sorumlu olabileceğini göstermiştir (22). SNP array, hem DNA polimorfizmlerini saptamak hem de dozaj değişikliklerini ölçmek için kullanılabilir. Daha önce tanı konulamayan nadir genetik hastalıkların moleküler temellerinin aydınlatılması amacıyla sıklıkla başvurulmuş bir yöntem olmuştur (28).

Yeni nesil dizileme teknolojileri nadir hastalık araştırmaları, teşhis ve tedavilerinde dönüm noktası olmuştur. Ucuz ve hızlı genetik teşhis imkânı sağlayarak pek çok genin geniş fenotipik spektrumunu aydınlatmış; aynı hastada digenik kalıtım ve birden fazla nadir hastalığın varlığının tespitine olanak sağlamış; gelecek vaat eden yeni terapilerin yolunu açmıştır (29). Moleküler genetik, gelişimsel biyoloji ve nörogörüntüleme alanlarındaki gelişmeler nörogelişimsel bozuklukların çok daha iyi anlaşılmasını; tanı, prognoz ve tedavi için yardımcı olabilecek yeni sınıflandırmaların yapılmasını sağlamıştır. Fakat hâlâ mevcut bilgilerle bu sınıflandırmalarda yer alamayan birçok hasta bulunmaktadır. Ayrıca otizm

spektrum bozukluğu, zihinsel yetersizlik gibi nörogelişimsel bozuklukların tedavisi hâlen büyük bir sorun olmaya devam etmektedir (17).

Bulunan birkaç yüz risk geni ile etiyolojik değişkenlik ve heterojen klinik görünüm göz önüne alındığında, bireysel hastalar için genotip-fenotip tabanlı tanı zorunlu hale gelmiştir. Genomik dizileme, hasta DNA'sından kişiselleştirilmiş ilaca kadar giden yolda kılavuzluk etmektedir. Bu süreçte nörogelişimsel bozukluk teşhisi konan hastalardan öncelikle DNA elde edilmektedir. Tüm ekzom dizileme veya tüm genom dizileme analizi sonucunda nörogelişimsel bozukluklara yatkınlık gösteren bir dizi gende mutasyonlar tanımlanmaktadır. Bunların altında yatan mekanizmaları anlamak için hESC (insan embriyonik kök hücreleri)'den türetilmiş nöronlar gibi hücre kültürlerinde, organoidlerde veya fare, sıçan, zebra balığı gibi hayvan modellerinde mutasyonlar oluşturulmaktadır. Hastalık modellemesi sayesinde kişiye özgü tıp uygulamasını sağlayan hedefler ortaya çıkarılmaktadır (17, 40) (Şekil 1).



Şekil 1. Hasta DNA'sından kişiselleştirilmiş tıp yolculuğuna kadar geçen süreç (17)

Nörogelişimsel bozuklukların etiyolojisini anlamak, kalıtsal genetik bileşenlerin tanımlanmasından bozukluk riskine yatkın bireysel faktörlerin tanımlanmasına ve bu faktörlerin birlikte düzensizliğe yol açtığı mekanizmaların belirlenmesine kadar birçok zorlukla karşı karşıyadır (30). Nörogelişimsel bozuklukların araştırılmasının en önemli nedeni, hastalara doğru tanıyı koyabilmek ve bunun sonucunda daha başarılı eğitim programlarına ve müdahalelere yol açabilecek daha iyi bir anlayış elde etmektir. Nörogelişimsel bozuklukların daha iyi anlaşılması sadece bir bozukluğun davranışsal ve biyolojik yönlerinin açıklanmasıyla sınırlı kalmamakta, aynı zamanda beyin ve davranış arasındaki bağlantıya aracılık ettiği için bilişsel veya psikolojik süreçlerin de incelenmesi gerekmektedir. Bu bozuklukların araştırılması, tipik gelişimsel yolları ve genel olarak biliş hakkındaki teorik anlayışımızı ilerletmek için hayati önem taşımaktadır (15).

2.2. Nöronal Gelişim Mekanizması

Nöronal gelişim; nöronal indüksiyon, göç, farklılaşma, aksonal kılavuzluk ve sinaps oluşumunu gerektiren karmaşık bir süreçtir. Hem hücre hareketliliği hem de aktin hücre iskeleti, nöronal öncüllerin çoğalmasını ve gelişmekte olan beynin farklı bölümlerine göç etmesini düzenlemede merkezi bir rol oynamaktadır. Nöronal öncüller nihai hedeflerine ulaştıklarında, sinaps oluşturmak için akson ve dendritlerin üretimini ve genişletilmesini içeren, fonksiyonel sinir devrelerinin kurulmasıyla sonuçlanan farklılaşma sürecine girmektedirler. Sinapslar, elektrik sinyallerinin nörotransmitterlerin salınımını tetiklediği ve bunun sonucunda postsinaptik reseptörleri aktive ettiği özel hücre-hücre temas bölgeleridir. Bu yüksek düzeyde düzenlenmiş süreç, hücre iskeleti organizasyonuna, veziküler trafiğe ve polarize ekzositoza dayanmaktadır (31). Nöronal gelişim sürecinde sitokinler, nöronal büyüme faktörleri, morfojenler ve klasik rehber moleküller önemli rol oynamaktadır (32).

Döllenmeden iki hafta sonra embriyo ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere üç tabaka geliştirmektedir. Embriyonel gelişimin 18-21. gününde nöroepitelyal hücre tabakası, beynin ve omuriliğin öncüsü olan nöral tüpü oluşturmak için içe doğru katlanmaktadır. Kıvrımların ve çıkıntılarının gelişmesiyle nöral tüpte farklı bölgeler ayırt edilebilir hale gelmektedir. Serebral korteks, nöral tüpün en ön segmenti olan telensefalondan gelişmektedir. Olgun serebral korteks, boyutu büyüdükçe giderek kıvrımlı hale gelen, yaklaşık 3-4 mm kalınlığında ince bir tabakadır. Nöral tüpü kaplayan nöroepitelyum, tüm

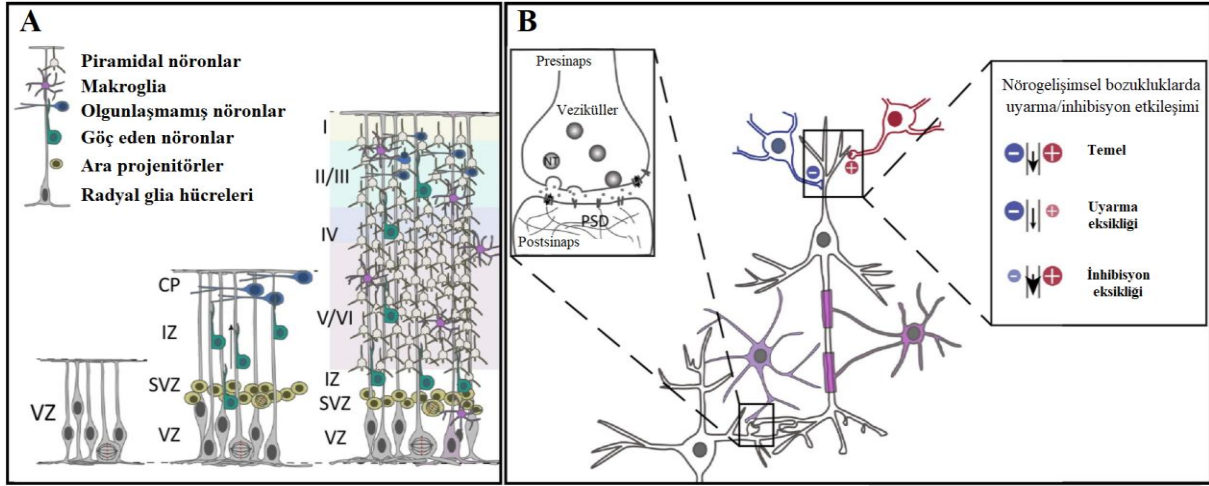
önemli beyin hücre tiplerinin kaynağıdır. Glial hücreleri bir iskele olarak kullanarak, nöroepitelyumun ventriküler bölgesinde oluşan nöronlar, oluşan beynin yüzeyine radyal olarak göç etmektedirler. Nöronların sürekli üretimi ve göçü, hücre iskelet ağına bağlı bir süreç olan serebral korteksin histolojik olarak tanınabilir altı katmanının oluşumuna yol açmaktadır. Serebral korteksin nöron ve destekleyici hücrelerin üretimi ile oluşumu ve organizasyonu, kortikal gelişim sırasında üst üste gelen aşamalarda gerçekleşmektedir. Malformasyonlar genellikle bu adımlarla bağlantılı olarak oluşmaktadır (33, 34).

Kan-beyin bariyeri, gelişim sırasında ve yetişkin beyinde serebral ortamın homeostazında oldukça önemlidir. Embriyonel gelişimin 12-18. hafta aralığında, yani nöronal hücre proliferasyonu ve göçünün aşamaları boyunca, perisitler tarafından ventriküler bölgeye doğru yönlendirilen radyal glianın uzunluğu boyunca kılcal damarlar oluşmaktadır. Kılcal damarlar olgunlaştıkça bazal lamina sürekli bir yapıya dönüşmekte, endotel hücreleri ve astrositler arasında sıkı bağlantılar oluşmakta ve radyal glial hücreler oluşmaktadır. 16-18. haftadan itibaren ise, hızlı kortikal büyüme periyodu sırasında korteks içindeki kılcal damarların sayısı hızla artmaktadır (35, 36).

Kortikal organizasyon olayları gebeliğin beşinci ayı ile doğum sonrası birkaç yılı kapsamaktadır. Bu süreçte ilk olarak alt tabaka nöronları yerleşmekte ve farklılaşmaktadır. Ardından kortikal nöron tabakaları dizilmekte ve tabakalar oluşmaktadır. Daha sonra dentritik ve aksonal dallanma meydana gelmekte, sinaps oluşumu gözlenmekte, hücre ölümü ve sinapsların arıtılmasının ardından glial proliferasyon, farklılaşma ve myelinizasyon gerçekleşmektedir. İnsanda myelinizasyon süreci gebeliğin 2-3. aylarında ön beyinde başlamakta ve erişkin yaşama kadar devam etmektedir (37). Bu yüzden nörogelişimi dinamik bir süreç olarak değerlendirmek gerekmektedir. Nörogelişimsel süreçler, nöronların terminal farklılaşmasını kontrol eden yüzlerce genin ekspresyonunu düzenleyen çok sayıda faktöre bağlıdır. Gelişim süreçleri sırasında aktive edilen genlerin çoğu, transkripsiyonel uzama evresinde düzenlenmektedir (38).

Nörogelişimsel bozukluklarda risk varyantları öncelikli olarak protein sentezinin düzenlenmesi, transkripsiyonel ve epigenetik regülasyon, sinaptik sinyalizasyon olmak üzere üç kritik süreçte rol oynayan genlerde bulunmaktadır. Bu süreçlerin homeostazı; doğum öncesinde nörogenez, nöronların göçü ve farklılaşması veya sinaptik olgunlaşma sırasında (Şekil 2A); doğum sonrası gelişimde ise engelleyici/uyarıcı dengenin ortaya çıkması sırasında

(Şekil 2B) bozulabilmektedir. Nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkilendirilmiş farklı varyantlar, aslında bu mükemmel homeostatik dengeyi kontrol etmek için hangi moleküler yolların ve proseslerin temel rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 2. Gelişmekte olan (A) ve olgun beyinde (B) nörogelişimsel bozukluklarda etkilenen süreçler. AP: aksiyon potansiyeli, CP: kortikal plaka, IZ: iç subventriküler bölge, PSD: postsinaptik yoğunluk, SVZ: subventriküler bölge, VZ: ventriküler bölge'yi ifade etmektedir (18).

Nadir ve yaygın nörogelişimsel bozukluklara neden olan varyantlar, nörogelişim sırasında protein sentezinin homeostatik dengesini sıklıkla değiştirmektedir. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-mTOR, bu denge için anahtar yolağı temsil etmektedir ve bugüne kadar çeşitli nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkilendirilmiştir. Transkripsiyon düzenleyiciler ve kromatin yeniden modelleyicileri grubundaki proteinler; beyindeki gelişimsel genlerin transkript seviyelerini düzenleyerek, gelişim sırasında kortikal inhibitör ve uyarıcı bağlantıların olgunlaşmasını ve ayrıca nöronal spesifikasyonu ve aktiviteye bağlı yanıtları yönlendiren düzenleyici ağları kontrol etmektedir. *MECP2*, *SETD5*, *CHD8*, *ASH1L*, *ARID1B* ve *KMT2A* genleri daha önce nörogelişimsel hastalıklarla ilişkilendirilmiş kromatin yeniden modelleyicileri ve transkripsiyon düzenleyicilerine örnek olarak verilebilir. Bu proteinlerin çoklu hedefleri göz önüne alındığında, bunlardan herhangi birinin düzensizliği pleiotropik etkiler gösterebilmektedir. Gelişim sırasında, hücre-adhezyon molekülleri ve iskele ve sinaptik sinyal-ilişkili proteinler olmak üzere iki ana protein grubu, nöronal devrelerin aktiviteye bağlı oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Zararlı varyantlar bu proteinleri kodlayan

genlerde beyin gelişim sürecini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Bu gruptaki genlere ise *NRXN* (Neurexins) ve *NLGN* (Neurologin) örnek olarak verilebilir (18).

2.3. Nörogelişimsel Bozuklukların Genetiği

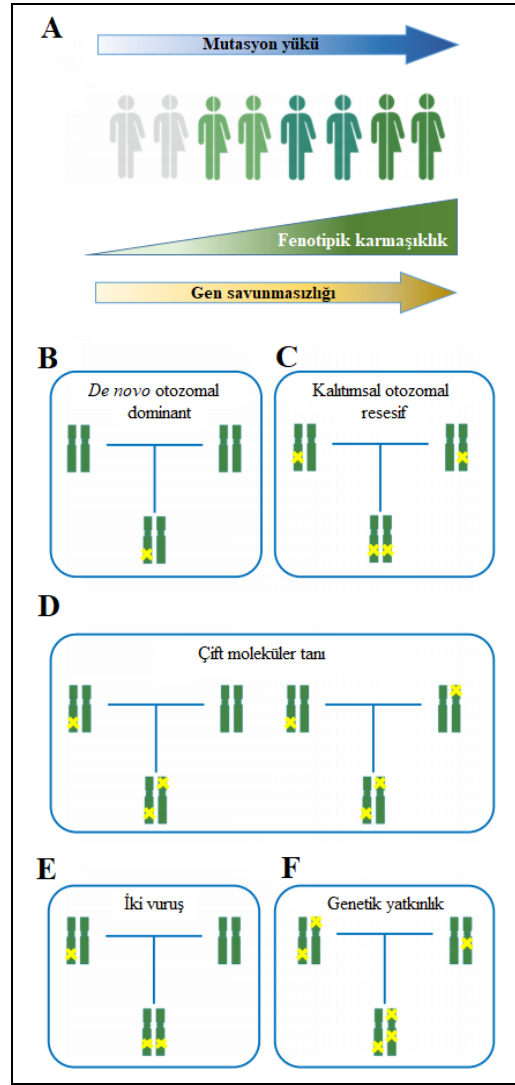
İnsan ve diğer memeli genomlarının dizilenmesi ile insan genetik varyasyonunu anlamaya yönelik önemli adımlar atılmıştır. Tüm genom dizileme ve tüm ekzom dizilemenin ortaya çıkışı ile nörogelişimsel bozuklukların altında yatan birçok kalıtsal ve *de novo* germline varyant tanımlanmıştır (17, 27).

Yeni doğmuş bir bebek ortalama 50 ila 100 arasında yeni genetik varyant edinmektedir. Bu durum her birey için 0.86 oranında amino asit değişikliğine yol açan *de novo* mutasyon ile sonuçlanmaktadır (39). Böylesi yüksek bireysel değişkenlik ve kalıtım göz önüne alındığında, yüzlerce farklı gende tek nükleotid değişikliklerinden (Single Nucleotide Variant; SNV) binlerce nükleotide kadar kayıp veya kazanca yol açan CNV'lere kadar nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili çok sayıda varyant rapor edilmiştir (17, 40).

Nörogelişimsel bozuklukların potansiyel genetik nedenlerinin belirlenmesi, bu bozuklukların başlangıcından sorumlu moleküler mekanizmaları anlamak ve bozukluğun ilerlemesini izlemeye ve gelecekteki komplikasyonları öngörmeye yardımcı olabilecek bir genotip-fenotip korelasyonunun tanımlanması için hayati önem taşımaktadır. Günümüze kadar nörogelişimsel bozukluğa neden olan çok sayıda gen tanımlanmasına rağmen, birçok hastaya hâlâ moleküler tanı konamamaktadır. Ayrıca, genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmaları, örtüşen genetik etiyojiye sahip hastalar arasında klinik belirtilerin sayısının ve ciddiyetinin önemli ölçüde değişebileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, eksik kalıtsallık ve fenotipik değişkenlik, nörogelişimsel bozuklukların multifaktöriyel veya poligenik yapısına işaret etmektedir (18, 41, 42).

Ailesel nörogelişimsel bozukluklar, genetik ve genetik olmayan faktörlerin ortak bir genetik arka plan varlığında bu bozuklukların patogeneze katkısını incelemek için oldukça önemlidir. Bu nedenle, uyumlu olmayan fenotiplere sahip monozygotik ikizler üzerinde veya birden fazla etkilenen çocukta eksik penetrans ve fenotipik değişkenliğin gözlemlendiği ailelerde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu araştırmalar, yalnızca hastalığın moleküler nedenlerinin belirlenmesi için değil, aynı zamanda risk faktörlerinin ve koruyucu faktörlerin tanımlanması için de yüksek potansiyele sahiptir. Ayrıca, daha doğru genotip-fenotip korelasyonları

oluşturulmasına da katkı sağlamaktadır. Kalıtsal nörogelişimsel bozuklukların incelenmesi sayesinde, fenotipik sonucun gen savunmasızlığı ve mutasyon yükü olmak üzere iki ana prensip temelinde oluştuğu ortaya konmuştur (18) (Şekil 3A).



Şekil 3. Nörogelişimsel bozuklukların genetik mekanizmaları (18)

Gen savunmasızlığı, belirli bir genin yıkıcı varyantları tolere etme yeteneği olarak tanımlanabilmektedir. Mutasyonlara karşı tolerans ne kadar düşükse, savunmasızlık seviyesi o kadar yüksek olacaktır. Nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmiş bazı genler, çarpıcı bir dozaj duyarlılığı ile karakterize edilen “haploinsufficient” genlerdir. *DEPDC5*, *CACNA1A* ve *SCN8A* gibi bazı genler, yüksek derecede savunmasız genler kategorisine girmektedir ve bu genleri etkileyen mutasyonlar, önemli hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu genlerin zarar

görmesi, başka nedensel olayların yokluğunda da bir hastalık fenotipinin başlangıcını indükleme olasılığına sahiptir; bu nedenle nörogelişimsel bozuklukların monogenik formlarıyla sonuçlanmaktadır. Bu genleri etkileyen mutasyonlar normalde güçlü bir negatif seçici baskıya maruz kalmaktadır. Bu nedenle popülasyon çalışmaları, diğer genomik lokuslara kıyasla savunmasız genlerde daha az sayıda yıkıcı varyant olduğunu kabul etmektedir. Başka bir deyişle, yüksek derecede savunmasız genlerdeki mutasyonlar, önemli hastalık riski ve yüksek penetrasyonla ilişkili nadir varyantlar olarak kategorize edilebilmektedir (18, 43).

Savunmasızlık spektrumunun diğer ucu, yıkıcı mutasyonlara daha az duyarlı olan genleri içermektedir. Bu genlerdeki varyantlar, negatif seçici baskı altında değildirler ve sıklıkla ailelerde nesiller boyunca aktarılmaktadır. Savunmasız genleri etkileyen tek yıkıcı olaylar, kendi başlarına hastalığa neden olmadıklarından, düşük hastalık riskine sahip yaygın varyantlar kategorisine girmektedirler. Bununla birlikte son çalışmalar, poligenik yapıya sahip nörogelişimsel bozuklukların önemli bir bölümünün ortak genetik varyantlara atfedilebileceğini göstermiştir. Aslında, bu mutasyonel olayların ilave etkileri, bir hastalık fenotipi ile sonuçlanabilmektedir. Bununla birlikte, bu durumlarda fenotipik sonuç, yalnızca mutasyonların etkilerinin toplamına değil, aynı zamanda etkilenen genler arasındaki fiziksel veya fonksiyonel etkileşimlere (örneğin epistaz) de bağlıdır. Epistatik etkileşimler ve dozaj hassasiyeti, bir hastalık fenotipinin nüfuz etme ve mutasyon yükü kavramlarıyla ilişkilidir (18). Örneğin, sodyum kanalları *CACNA1A* ve *SCN8A*'daki işlev kaybı monoallelilik mutasyonları, çoğunlukla hareket bozukluğu, zihinsel yetersizlik, otizm spektrum bozuklukları ve iyi huylu ailesel infantil nöbetler gibi klinik özelliklerle ilişkilendirilmiştir (Şekil 3B). Dozaj hassasiyeti ve mutasyon yükü kriterlerine uygun olarak, *CACNA1A* ve *SCN8A*'nın kalıtsal germline biallelik mutasyonlarının, monoallelilik değişikliklere kıyasla daha şiddetli fenotiplerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Şekil 3C). Yakın zamanda bildirilen *CACNA1A* ve *SCN8A* birleşik (compound) heterozigot probandları, epileptik ensefalopatinin varlığı ile karakterize edilirken, heterozigot ebeveynler ve kardeşlerin ise nöbet olmaksızın sadece hafif bilişsel bozukluk sergilediği rapor edilmiştir (18, 44, 45).

Bazı durumlarda, daha yüksek bir mutasyon yükü, iki vuruş modeli olarak bilinen bir mekanizma olan germline ve somatik olayların bir kombinasyonu ile belirlenebilmektedir. Klasik iki vuruş hipotezinde, kurucu kalıtsal bir mutasyon savunmasız bir genetik arka plan oluşturmaktadır. Daha sonra gelişim sırasında meydana gelen bir somatik darbe, bir hastalık

fenotipinin başlangıcından veya hâlihazırda mevcut olan klinik özelliklerin genişlemesinden sorumlu olacaktır (Şekil 3E). İki vuruş modeline örnek olarak *DEPDC5* genindeki mutasyonlar verilebilir. *DEPDC5*'i etkileyen germline heterozigot işlev kaybı mutasyonları, ailevi refrakter fokal epilepsilerin başlıca nedenidir. *DEPDC5*'in biallelik inaktivasyonuna neden olan ikinci bir somatik varyantın, şiddetli fenotipi olan hastalarda fokal kortikal displazinin ek gelişiminden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (18, 46).

Birincil ve ikincil varyantlar, birbirinden farklı genomik lokuslarda da ortaya çıkabilmekte; böylece klasik iki vuruş hipotezi genişleyebilmektedir (Şekil 3D). Yapılan çalışmalarla, nörogelişimsel bozukluklarda çoklu moleküler tanıların önemli katkısı olduğu ortaya konmuştur. Mutasyon yükü kavramına paralel olarak, genotip-fenotip korelasyon analizleri, birden fazla gende mutasyona sahip bireylerin etkilenme olasılığının daha yüksek olduğunu ve bozucu olayların sayısının, gözlenen klinik belirtilerin sayısı ve şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin, farklı mutasyonel olayların katkısı, yakın zamanda, aile içi klinik değişkenlik ile karakterize edilen iki ailede incelenmiştir. Her iki ailede de, probandların ek klinik özellikleri, daha az ciddi şekilde etkilenen kardeşlerde bulunmayan ek lokuslardaki mutasyonlarla açıklanmıştır (18).

Ortak genetik varyantların kümülatif yükü, genetik arka planı sonraki patolojik olaylara karşı daha savunmasız hale getiren ilk isabeti de temsil edebilmektedir (Şekil 3F). Aslında, son zamanlarda nörogelişimsel bozukluk öyküsü olan ailelerde ortak varyantların kombinasyonundan kaynaklanan yükün, daha düşük eğitimsel kazanıma ve zihinsel yetersizliğe genetik yatkınlıkla pozitif olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir (18).

Özetle literatürde şu anda mevcut olan veriler, nörogelişimsel bozuklukların tamamen monogenik formlarının istisna olduğuna işaret etmektedir. Çoğu nörogelişimsel bozukluk vakası büyük olasılıkla çok faktörlü veya poligenik bir yapıya sahiptir. Bu durum bu bozuklukların hem klinik hem de moleküler düzeyde geniş heterojenliğini doğrulayıcı niteliktedir. Ayrıca klinik sonuçların çeşitli düzeylerde genetik olmayan faktörlerden de etkilenebileceği unutulmamalıdır (18).

2.4. Dizileme Teknolojileri

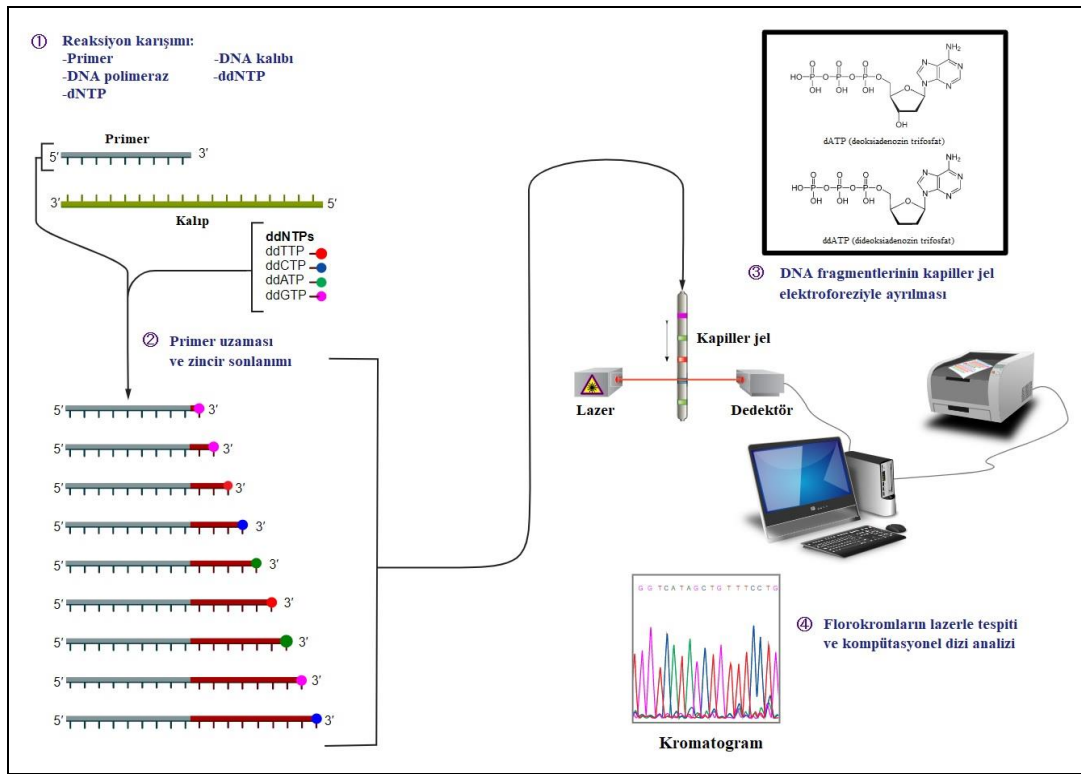
1953'te Watson ve Crick'in DNA (Deoksiribonükleik Asit)'nin çift sarmal yapısını tanımlamasıyla birlikte genom araştırmalarının ve moleküler genetiğin temelleri atılmıştır

(47). 1940'lı yıllarda DNA baz kompozisyonunun saptanması ile ilgili metotlar bulunmuş olmasına rağmen; ancak 1960'lı yıllara gelindiğinde doğrudan kimyasal analiz ile DNA'daki nükleotid dizilimlerinin belirlenmesine başlanabilmektedir (48). 1965 yılında mayadan izole edilen alanin tRNA'sının nükleotid dizilimi yayımlanmıştır (49). 1970'li yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle paralel olarak nükleotid dizilerinin saptanmasına yönelik analiz çalışmaları da artmıştır (48). 1977 yılında moleküler biyoloji ve genetik alanında dönüm noktası olan dizileme yöntemleri ile ilgili iki makale yayımlanmıştır. Bunlardan biri Maxam-Gilbert yöntemi olarak adlandırılan DNA dizilerinin kimyasal reaksiyonlar sonucu bölünmesinin ardından reaksiyon ürünlerinin jel elektroforezi sistemiyle ayrıldığı bir yöntemdir (50). Diğer yöntem ise Sanger yöntemi olarak adlandırılan DNA dizilerinin baz spesifik bir şekilde sonlandırılmasına sebep olan dideoksinükleotidlerin kullanıldığı bir yöntemdir (51). Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemleri birinci nesil dizileme olarak ifade edilmektedir ve takip eden dizi araştırmalarının temellerini oluşturmuşlardır. Maxam-Gilbert yönteminde tehlikeli kimyasalların kullanımı ve daha uzun sürede sonuç alınması kullanımını kısıtlamıştır. Bu nedenle Sanger yöntemi daha çok tercih edilen yöntem olmuş ve bugüne kadar en yaygın kullanılan DNA dizileme tekniği olarak yer etmiştir. Günümüzde yüksek verimli dizi analizinde elde edilen verilerin doğrulanması amacıyla da sıklıkla kullanılmaktadır (52, 53, 54). 1986 yılında Mullis ve ark. tarafından ilgililenilen DNA bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR)'nin keşfedilmesi DNA dizi analizi kullanımının yaygınlaşmasını sağlamıştır (55).

2.4.1. Sanger Dizileme

Sanger dizileme, *in vitro* DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz tarafından zincir sonlandırıcı dideoksinükleotidlerin seçici olarak dâhil edilmesine dayanmaktadır (51). Sanger dizileme için tek iplikli DNA kalıbı, primer, DNA polimeraz, dNTP (deoksinükleotid trifosfat) ve ddNTP (dideoksinükleotid trifosfat)'ye ihtiyaç vardır. Dört paralel reaksiyon söz konusudur. Her bir reaksiyon ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP'den sadece birini içermektedir. DNA polimeraz enziminin katalizlemesiyle *in vitro* DNA replikasyonu gerçekleşmekte ve iki nükleotid arasındaki fosfodiester bağının oluşması için gereken 3'-OH grubundan yoksun olan ddNTP'lerin katılımıyla zincir uzaması durmaktadır. Böylelikle tüm olası zincir uzunlukları

oluşmakta ve 3' uçları floresan işaretli bu ürünler elektroforez ile birbirinden ayrılmaktadır. Fragmanların büyüklüklerine göre sıralanması ile nükleotid dizilimleri doğru bir şekilde saptanabilmektedir. Günümüzde bu amaçla optik sistemler kullanılmaktadır. Dört nükleotid bazının her biri için bir tane olmak üzere dört florofor kullanımı söz konusudur. Zincirlerin işaretli nükleotidlerle sonlanması prensibine dayanan dizileme tepkimeleri, dizileme kapillerleri içinde otomatik olarak gerçekleşmektedir. ddNTP işaretli zincirler kılcal kanal içindeki jelde elektroforetik göç esnasında, lazer ışınının önünden geçmektedirler. Lazer, dört nükleotidden birini simgeleyen özgül işarete göre floresan sinyal oluşturmaktadır. Dizi elektronik olarak okunup kaydedilmektedir. Sıralı nükleotidlerin dizideki yerlerini simgeleyen dört farklı renkte ve sıralı grafik tepeler şeklinde görüntülenmektedir (56-58) (Şekil 4).



Şekil 4. Sanger dizileme yöntemi (61)

Sanger dizilemede 400-800 baz uzunluğunda DNA dizileri yüksek doğrulukla okunabilmektedir (59). Bu dizileme yöntemindeki en büyük kısıt, ilgilenilen dizinin ilk 15-40 bazı ile 700-900 bazdan sonraki kısmının dizileme kalitesinin kötüleşmesidir (51). Sanger

dizileme metodu insan, hayvan ve bitki genomlarının dizilenmesinde başarıyla kullanılmıştır; ancak İnsan Genom Projesi'nin yürütülmesi sırasında karşılaşılan zorluklar sebebiyle daha uygun maliyetli, doğruluğu yüksek ve kısa zamanda daha fazla dizileme yapabilen yeni yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı oluşmuştur (60).

2.4.2. İnsan Genom Projesi

İnsan Genom Projesi, DNA dizilemesi için atılan ilk büyük adım olmuştur. 13 yıl boyunca sürmüş ve 2003 yılında tamamlanmıştır. İnsan Genom Projesi, birinci nesil dizileme yöntemi olan Sanger dizileme ile gerçekleştirilmiştir. Bu proje, hastalık genleri ve markırları tek tek bulmak ve haritalamak yerine, insan genomundaki tüm DNA dizisini belirlemek, 24 kromozomu haritalamak, binlerce geni tanımlamak ve tüm genlerin fonksiyonlarını ortaya koymak için oluşturulmuştur (62). İnsan genom projesinde ilk üzerinde durulan konu 22 otozomun tamamının ve cinsiyet kromozomlarının hem fiziksel hem de genetik bağlantı haritalarının oluşturulmasını ve gen tanımlamasını, izolasyonunu ve tüm insan genomunun dizi analizine alınmasını kolaylaştırmak amacıyla her kromozomu telomerden telomere çevreleyen klon veya parça topluluklarının birleştirilmesidir. İnsan Genom Projesi ile insan genomundaki DNA'nın organizasyonunun tahmin edilenden çok daha fazla karmaşık olduğu görülmüştür (10).

DNA üzerindeki kodlama dizilerine ekzon, kodlanmayan dizilere ise intron denilmektedir. Bazı intronlar gen aktivitesi için gerekli olan dizileri içermektedir. Translasyon başlamadan önce intronlar uzaklaştırılmaktadır. İtronların uzaklaştırılıp ekzonların birleşmesi RNA işlenimi/kırılma (splicing) olarak isimlendirilmektedir. Splicing, doğru okuma çerçevesinde istenmeyen bir değişim olmasını önlemek amacıyla çok düzgün bir şekilde yapılmalıdır (58). Bazı genler farklı koşullarda farklı biçimlerde okunmaktadır. Bazı durumlarda genlerin tüm ekzonları sırasıyla okunup kopyaları çıkarılamamaktadır. Bir ekzonun bir kısmı okunup, hemen sonrasında başka bir kısmına ya da başka bir ekzonuna atlanabilmektedir. Alternatif splicing olarak adlandırılan bu mekanizma sonucunda bir genin farklı uzunlukta ve farklı işlev gösteren transkript varyantları ortaya çıkmaktadır (63).

İnsan genomunun 2.85 milyar nükleotid ve 20.000-25.000 protein kodlayan gen içerdiği bildirilmiştir. Protein kodlayan gen sayısı beklenenin altında olmakla birlikte genomun %1.2 kadarını oluşturmaktadır (64). Genomun %75'inden fazlasının seçici olarak kopyalandığı,

ancak transkriptlerin sadece küçük bir kısmının protein ürünlerine dönüştüğü görülmektedir. İnsan genomunda, genlerin yanı sıra intronlar, UTR (untranslated region)'ler ve psödogenler olmak üzere gen ilişkili diziler ile LINE (Long INterspersed Elements), SINE (Short INterspersed Elements), LTR (Long Terminal Repeat) ve transpozonları içeren serpiştirilmiş tekrarlar, mikrosatellitler ve diğer bölgeleri kapsayan genlerin dışındaki DNA dizileri bulunmaktadır. Protein yapımına katılmayan intronların ve DNA'nın genlerin dışında kalan dizilerinin hücre ve canlı yaşamında çok önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Ayrıca genomda bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin kromozom yapısının korunmasına katkı sağladıkları görülmüştür. Protein kodlama kapasitesi olmayan transkriptlerin geri kalanı kodlamayan RNA (non-coding RNA; ncRNA) olarak isimlendirilmektedir. Son yıllarda artan çalışmalarla bu kodlamayan RNA'ların gen ekspresyonu regülasyonu, sitoplazmada post-transkripsiyonel kontrol, çekirdeğin epigenetik modülasyonu, sinyal iletimi gibi pek çok biyolojik süreçte biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar aracılığıyla etkisi olduğu gösterilmiştir (58, 65).

İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasıyla fenotip ve genetik farklılıklar ilişkilendirilmiş ve elde edilen bulgular genom çalışmalarına referans teşkil etmiştir (66). Genom projelerinin artmasıyla ve veritabanlarında daha fazla genom dizisi biriktikçe, genomik adı altında genomların araştırılmasını kapsayan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Genomik, genlerin ve genomların yapılarını, işlevlerini ve evrimini incelemek amacıyla veritabanlarındaki nükleotid dizi bilgilerini kullanmaktadır (62).

2.4.3. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing; NGS); genom, transkriptom ve DNA-protein etkileşimlerinin geniş kapsamlı analizini mümkün kılan; böylece genom varyasyonları, genetik ve epigenetik düzenleyici ağlar, nükleer yapılanma ve kromatin yapısı hakkında bilgi edinmemizi sağlayan bir teknolojidir. Yeni nesil dizileme teknolojisi mRNA ve küçük RNA'ların profillerinin çıkarılması, ekspresyon çalışmaları için RNA dizilenmesi, atasal DNA'nın araştırılması, kromatin yapısı ve metilasyon paterninin belirlenmesi, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu ve metagenomik analiz çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (59, 67). Nadir hastalıklardaki mutasyonları tanımlamada, invaziv olmayan prenatal tanıda, kişiye özgü kanser tümör mutasyonları

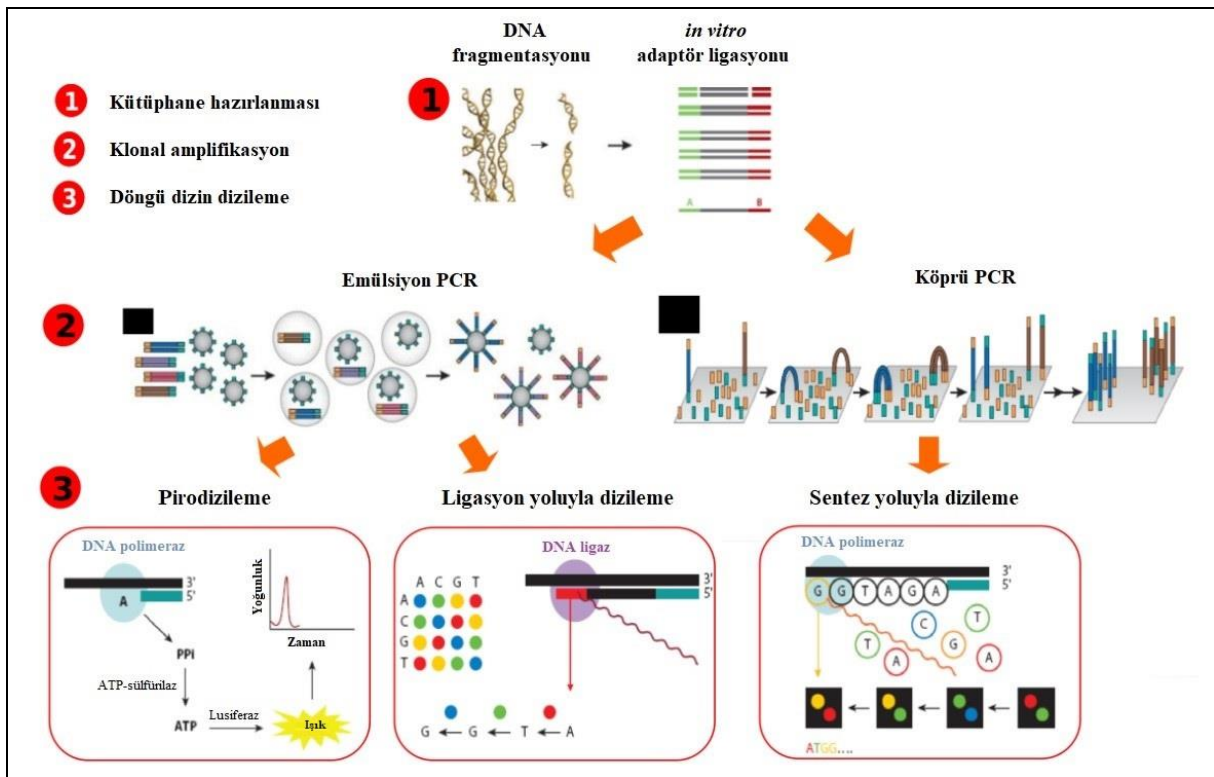
belirlemede, enfeksiyöz ajan tanımlamada ve kompleks hastalıklarda yatkınlık belirlemede kullanımı da klinik uygulamaları arasındadır (68).

2005 yılında piyasaya ilk tanıtıldığından bu yana, yeni nesil dizileme teknolojilerinin genomik araştırmalar üzerinde muazzam bir etkisi olmuştur. Yeni nesil teknolojiler, genom dizileme ve yeniden dizileme gibi standart dizileme uygulamaları ve daha önce Sanger dizileme tarafından keşfedilmemiş yeni uygulamalar için kullanılmıştır (53). Yeni nesil dizileme teknolojisi Sanger dizileme yönteminden önemli ölçüde farklıdır. Kalıp hazırlanması, DNA sentezi ile elektroforez kullanılmadan dizileme, yüksek çözünürlüklü görüntüleme, dizi etiketi oluşturma ve genom hizalama yöntemlerinin birleşiminden oluşmaktadır. Paralel olarak milyonlarca dizinin okunması nispeten daha kısa sürede ve düşük maliyetle dizilimi mümkün kılmaktadır (58). Milyonlarca küçük DNA parçası, paralel dizileme ile eş zamanlı olarak dizilenmekte, böylelikle genomdaki her baz birden çok kez okunabilmekte ve varyasyonların tespiti daha doğru bir şekilde yapılabilmektedir (59).

Yeni nesil dizilemede, DNA molekülleri rastgele enzimatik reaksiyonlar ile kesilerek parçalara ayrılmakta, DNA parçaları adaptör diziler vasıtasıyla bağlanmakta, çok sayıda DNA parçasıyla genom kütüphanesi oluşturulmakta, solid bir yüzey ya da emülsiyon damlalar içindeki boncuklar üzerinde genomik kütüphanenin amplifikasyonu gerçekleştirilmekte, dizileme işlemi yapılmakta ve ardından elde edilen veriler bilgisayar programıyla analiz edilmektedir. Gelişmiş biyoinformatik analiz araçları sayesinde yeni nesil dizileme teknolojileri başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir (59, 60) (Şekil 5).

Yeni nesil dizileme teknolojileri yeni yaklaşımlar ve hayal bile edilemeyecek kadar çok bilgi sağlamaktadır. Bu denli çok bilgiyi depolamak, analiz etmek ve değerlendirmek için gelişmiş biyoinformatik analiz araçları gerekmektedir (67). Muazzam güçlü yönlerine ve potansiyeline rağmen yeni nesil dizileme teknolojisinin sınırlamaları ve zorlukları da bulunmaktadır. Test hassasiyeti %100 değildir ve ilişkili herhangi bir genin tamamının veya bir kısmının kapsanmaması sebebiyle yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Aynı zamanda dizi derinliğinin yeterli olmaması nedeniyle de tespit edilen varyantların güvenilirliği değişmektedir. Genellikle birden fazla aday varyant olduğu için verilerin sunulması ve yorumlanması ile ilgili zorluklar mevcuttur. Dizilenen kilobaz sayısı arttıkça daha fazla aday varyant bulma ihtimali de artmaktadır. Aynı zamanda novel veya nadir mutasyonların yorumlanmasında, dizilenmesi veya analizi zor olan genom bölgelerinin

dizilenmesinde, yapısal gen varyasyonunu ve kopya sayısı varyasyonunu tespit etme kabiliyeti konularındaki sınırlamalar da diğer zorluklardır. Bunların dışında tesadüfi bulgular ve doğrudan test yaptırmak isteyen etkilenmemiş probandlara nasıl rehberlik edileceğine ilişkin etik zorluklar da mevcuttur. Bu nedenle en kısa sürede çalışma kalitesi, varyant yorumlama ve kalite kontrol için standartların tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Her ne kadar yeni nesil dizilemeyi klinik olarak anlamlı tüm genetik değişiklikleri saptamak için tek bir yöntem olarak kullanma arzusu olsa da bu sınırlamalardan dolayı mümkün olamamaktadır (29, 70).



Şekil 5. Yeni nesil dizileme teknolojileri (69)

Tüm yeni nesil dizileme sürecini DNA ekstraksiyonundan biyoinformatik analize kadar doğrulamak çok önemlidir. Validasyon işlemi, tek nükleotid değişiklikleri, farklı boyutlardaki insersiyonlar veya delesyonlar, varsa CNV veya translokasyonlar gibi farklı genetik değişiklikleri doğrulamak amacıyla mutlaka uygulanmalıdır (70).

Yeni nesil dizileme, birçok klinik laboratuvarında germline ve somatik genetik mutasyonları tespit etmek için rutin olarak kullanılmaktadır. Kalıtsal hastalıklarda, germline

mutasyonlar için “targeted” (hedefli) panel, tüm ekzom, tüm genom veya mitokondriyal DNA dizilemesine başvurulmaktadır. Bir klinik fenotip ile ilişkili genler için hedefli paneller genellikle kalıtsal bozukluklar için ilk test seçeneğidir. Hedeflenen test bilgisi olmadığı durumlarda ise tüm ekzom dizileme analizi uygulanmaktadır (70).

2.4.3.1. Tüm Genom Dizileme

Tüm genom dizileme (Whole Genome Sequencing; WGS) analizinde genomun tamamı dizilenmekte; ekzonların yanı sıra kodlanmayan ve olası düzenleyici bölgelerdeki genetik varyasyonlar da saptanabilmektedir. Bu analiz ile delesyonlar, amplifikasyonlar, kromozomal translokasyonlar ve uniparental dizomi dâhil olmak üzere yapısal varyantlar kolayca tanımlanabilmektedir. Tüm genom dizilemenin maliyetinin yüksek olması ve veri analizinin karmaşık olması kısıtlamaları arasındadır. Dizi verilerinin analizine yönelik biyoinformatik yaklaşımlar geliştikçe ve maliyet azaldıkça, tüm genom dizilemenin mutasyon tespiti için baskın platform haline geleceği düşünülmektedir (71).

2.4.3.2. Tüm Ekzom Dizileme

Tüm ekzom dizileme (Whole Exome Sequencing; WES), insan genomunda protein kodlayan tüm bölgelerin dizilenmesini sağlayan ve özellikle monogenik hastalıklarda yaygın olarak kullanılan hedef zenginleştirme yöntemidir. Bu yaklaşım tüm genom dizilemesine kıyasla dizileme yükünün yaklaşık %1-2’sini gerektirmekte; ekzonik ve splice-site varyantların belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Belirli bir gen veya gen grubu seçmeden, insan genomunda bilinen 20.000’den fazla genin kodlama bölgelerinin eşzamanlı olarak test edilmesine imkân vermektedir (72).

Hastalıkla ilişkili büyük etki gösteren mutasyonların yaklaşık %85’inin ekzonik bölgelerde olduğu tahmin edilmektedir. Monogenik hastalıkların çoğunun ekzonlardaki mutasyonlar sonucunda oluştuğu ve hastalık mutasyonlarının yaklaşık %60’ının missense ve nonsense mutasyonlar olduğu görülmektedir. Ekzom dizileme yönteminin kullanılmaya başlamasından itibaren Mendelyan hastalık genlerinin tanımlanmasında önemli bir artış yaşanmıştır. Son 10-15 yılda OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)’e belirli bir fenotipin moleküler temelli tanımının yapıldığı binlerce giriş yapılmıştır. Tüm ekzom

dizileme analizi beyin malformasyonları, epilepsi, otizm, zihinsel yetersizlik gibi nörogelişimsel bozukluklar için gen keşif yöntemi olarak kullanılmaktadır. Birçok yeni hastalık geni ve yolağı bu yöntemle tanımlanmıştır. Özellikle SNV ve küçük insersiyon/delesyonların tespitinde güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır (72, 73). Örneğin dünya çapında 65 milyondan fazla insanı etkileyen epilepsi için önemli sayıda risk geni bu yöntemle tanımlanmıştır. *De novo* dominant mutasyonlar epileptik bozukluklarla birlikte sıklıkla tanımlansa da, somatik mozaizm ve resesif bozukluklar da görülmektedir. Ayrıca *de novo* kopya sayısı varyasyonları ile birlikte *de novo* nokta mutasyonları zihinsel yetersizlik vakalarının da çoğunu açıklayabilmektedir. Tüm ekzom dizileme verileri ışığında, epilepsi ve zihinsel yetersizlik bozukluklarında olduğu gibi otizmin moleküler temeli de birçok farklı gende nadir *de novo* varyasyonlar ile karakterize gibi görünmektedir (17, 29).

Ekzom dizileme analizinde genomik DNA, insan genomundaki yaklaşık 200.000 ekzonu yakalamak için tasarlanmış proplar içeren boncuklara veya arraylere hibridize edilmektedir. Boncuklar üzerinde “captured” (yakalanan) DNA daha sonra yeni nesil dizilemeye tabi tutulmaktadır. Ekzom dizilemenin başlıca avantajları, genomun sadece %1-2'si analiz edildiğinden, düşük maliyeti ve nispeten derin sekans kapsamıdır. Diğer yandan tüm ekzom dizilime ile ekzon dışındaki bölgelerdeki mutasyonlar (genomun >%98'i) ve intronik kırılma noktalarına sahip kromozomal translokasyonlar gibi çoğu yapısal varyant saptanamamaktadır (71). Tüm ekzom dizileme analizi genellikle varyantların yorumlanmasına yardımcı olmak için hasta çocuğu ve her iki ebeveyni (üçlü test=trio) test etmeyi içermektedir. Böylece elde edilen veriler ile başka kardeşler ya da sonraki nesiller için mevcut olan hastalık riski hesaplanabilmektedir (70).

2.4.3.3. RNA Dizileme

Transkriptom, hem tip hem de miktar açısından bir hücredeki transkriptlerin tam setidir. Hibridizasyon tabanlı mikroyarray ve Sanger dizileme temelli yöntemler dâhil olmak üzere bir hücre popülasyonunun transkriptomunu karakterize etmek için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Yüksek verimli dizileme temelli yöntemlerin ortaya çıkışıyla birlikte transkriptom çalışmalarının şekli değişmiştir (9).

RNA dizilemenin amacı, hem kodlayan hem de kodlamayan RNA'lar dâhil olmak üzere transkribe olmuş tüm genlerin dizilenmesidir. RNA dizileme, yüksek verimli DNA dizileme

teknolojileri kullanılarak cDNA'ların doğrudan dizilenmesini ve bunu takiben dizileme okumalarının genomla eşleştirilmesini içermektedir. Üretilen okumalar, transkript kantifikasyonu, diferansiyel ekspresyon testi, referans-bazlı gen anotasyonu ve *de novo* transkript “assembly” (birleştirme) olmak üzere birçok transkriptom analizinde kullanılabilir. Ekzon ve intronların tanımlanmasına, sınırlarının haritalanmasına ve genlerin 5' ve 3' uçlarının tanımlanmasına imkân vermesi sayesinde ökaryotik transkriptomların karmaşıklığı hakkında daha kapsamlı bulgular sağlamaktadır. Ökaryotik transkriptomlar üst üste binen (“overlapping”) transkriptleri, transkribe intergenik bölgeleri ve bol miktarda non-coding RNA'ları içermesinden dolayı oldukça karmaşıktır. RNA dizileme ile gen ekspresyon seviyeleri hakkında kantitatif bilgi edinilmesinin yanı sıra post-transkripsiyonel değişiklikler ve kromozomal yeniden düzenlemelerle oluşan füzyon transkriptler tespit edilebilmekte, transkripsiyon başlangıç bölgeleri ile yeni splicing varyantları belirlenebilmekte ve allel ekspresyonu izlenebilmektedir. Transkriptom dizilemesi, tüm ekzom dizilemesine benzer şekilde, genomun kodlamayan bölgelerindeki mutasyonları tespit edememektedir. Bir genin bir veya her iki kopyasının kaybına neden olan mutasyonları veya RNA döngüsünü (“turnover”) hızlandıran mutasyonları (örneğin, nonsense-aracılı yıkıma neden olan frameshift veya nonsense mutasyonlar) tespit edememektedir. Ayrıca, transkriptom dizileme, bolca eksprese edilen transkriptlere doğru eğimlidir (“biase”) ve bu nedenle, daha düşük seviyelerde eksprese edilen genlerin dizileme kapsamı düşük olabilmekte veya hiç olmayabilmektedir (9, 71, 74).

Diğer teknolojilere kıyasla, RNA dizileme çok yüksek bir sinyal/gürültü oranı ve çok geniş dinamik aralık sağlamaktadır. Ayrıca biyolojik ve teknik replikalar arasında yüksek bir korelasyon söz konusudur ve tekrarlanabilir özelliktedir. RNA dizileme, transkriptomun yapısını tek baz çifti çözünürlüğünde analiz etmek, genomu açıklamak ve genom çapı ölçeğinde (“genome wide scale”) gen ekspresyonunu ölçmek için güçlü bir yaklaşımdır. RNA moleküllerinin doğrudan dizilimi mümkün olmakla birlikte, çoğu RNA dizileme deneyi, DNA temelli dizileme üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bu prosedürün başarısı, mRNA popülasyonunun dizisini, büyüklüğünü ve karmaşıklığını temsil eden mRNA'dan yüksek kaliteli, tam uzunlukta, çift sarmallı cDNA'nın üretilmesine bağlıdır. cDNA kütüphanesi hazırlama yöntemi, araştırılan RNA türüne bağlı olarak değişmekte; bunlar boyut, dizi, yapısal özellikler bakımından farklılık gösterebilmektedir. Yüksek kaliteli ticari kitlerin ve tasarlanmış ters transkriptaz enziminin bulunması bu prosedürleri basitleştirmektedir (9, 75).

2.4.3.4. Diğer Dizileme Uygulamaları

Özellikle kanser hücrelerinde genom çapında epigenetik modifikasyonları karakterize etmek için yeni nesil dizileme uygulamaları ortaya çıkmaktadır. DNMT3A (DNA Metiltransferaz-3A) dâhil DNA metilasyonunu düzenleyen genler AML (Akut Miyeloid Lösemi)'de sıklıkla mutasyona uğramaktadır. Genom çapındaki DNA metilasyonunu tek baz çözünürlükte eşlemek ve post-translasyonel olarak modifiye edilmiş (örneğin metillenmiş ve asetillenmiş) histonların genom üzerindeki yerini haritalayarak kromatin yapısını değerlendirmek için yeni nesil dizileme teknikleri geliştirilmiştir (71). Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu, metagenomik araştırmalar, atasal DNA mikrobiyolojisi diğer dizileme uygulama alanlarını oluşturmaktadır. Ayrıca son yıllarda nanopor ve mikrokışkan teknolojilerinin kullanımıyla yeni nesil dizileme teknolojilerinin farklı yönlerinin gelişmesi sağlanmaktadır. Analizlerin daha kısa sürede tamamlanması, daha doğru sonuçlar alınması ve maliyetin düşürülmesi için yeni uygulamalardan yararlanılmaya devam edilmektedir (59).

2.5. tRNA (Transfer RNA)

2.5.1. tRNA Yapısı ve Fonksiyonu

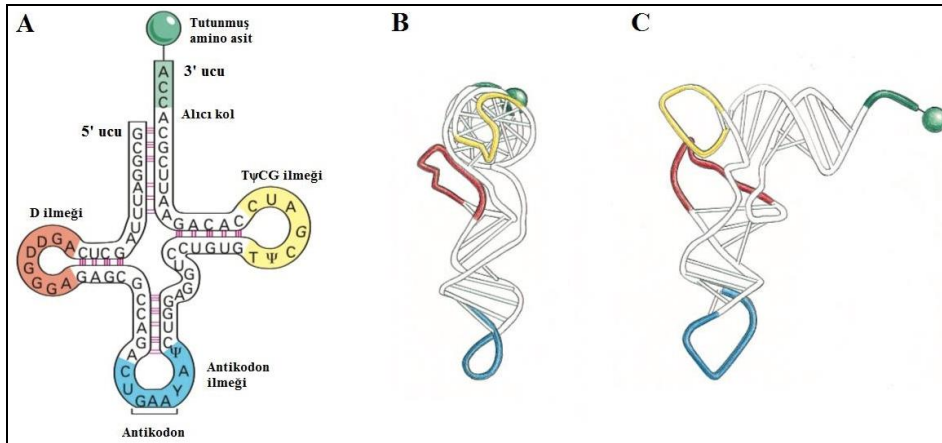
DNA, protein sentezi için bilgi depolamakta; mRNA ise, DNA'da kodlanmış bilgileri taşımaktadır. Ancak pek çok biyolojik aktivitenin proteinlerle gerçekleştirildiği bilinmektedir. Amino asitlerin her proteindeki lineer sırası proteinin üç boyutlu yapısını ve aktivitesini saptamaktadır. Bu yüzden amino asitlerin DNA'da kodlandığı gibi doğru sırada yerleştirilmesi; işlevsel proteinlerin üretimi ve dolayısıyla hücrelerin ve organizmaların görev yapması için son derece önemlidir. Translasyon, bir polipeptid zincirinde amino asitleri doğru sırada birleştirmek için bir mRNA'nın nükleotid dizisinin kalıp olarak kullanıldığı işlemin tamamıdır (76). Protein sentezinin temel mekanizması, uzamakta olan zincirin sonundaki karboksil grubu ile yeni gelen amino asidin serbest amino grubu arasında bir peptid bağının oluşmasıdır. Böylelikle bir protein N-ucundan (amino terminali) C-ucuna (karboksi terminali) doğru aşamalı olarak sentezlenmektedir. Bu süreçte bir mRNA molekülündeki üçlü nükleotidlerden oluşan kodonlar belirledikleri amino asitlere bağlanmazlar. Uyarlayıcı molekül olarak bilinen ve küçük RNA molekülü olan tRNA'lar hem kodonu tanıyıp

bağlanmakta hem de yüzeyindeki başka bir bölge ile amino aside bağlanarak mRNA'nın proteine yazılımını sağlamaktadır (77).

1957 yılında Robert W. Holley tRNA'ların varlığını gözlemlemiş, 1965 yılında ise alanine özgü tRNA'nın birincil yapısını göstermiştir (78, 79). 1960'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nden Jacques Fresco, Alex Rich ve Don Caspar ile Birleşik Krallık'tan bir grup araştırmacı tarafından tRNA'ların yapısı ile ilgili oldukça önemli çalışmalar yapılmıştır (80). tRNA'nın ikincil ve üçüncül yapıları ise Kim Sung-Hou, Alexander Rich ve Aaron Klug'un X-ışını kristalografisi çalışmalarıyla aydınlatılmıştır (81, 82). 3'-bağlı amino asitleri ile tRNA molekülleri yonca yaprağı şeklinde ikincil bir yapıya ve L-şeklinde üçüncül yapıya katlanan 70-90 nükleotidlik lineer dizilerdir (83) (Şekil 6). X-ışını kristalografi çalışmaları ile tüm tRNA'ların translasyon sürecinde ribozomlara uygun yerleşimleri için L-şeklinde katlandığı gösterilmiştir (84). L-şeklindeki molekülün eşleşmemiş ucunda yer alan iki bölge tRNA'nın protein sentezindeki işlevi bakımından son derece önemlidir. Bu bölgelerden biri ardışık üç nükleotidden oluşan ve mRNA molekülündeki tamamlayıcı kodon ile eşleşen antikodonu oluşturmaktadır. Diğer bölge ise kodon tarafından tanımlanan amino asidin tRNA'ya bağlandığı molekülün 3' ucundaki kısa tek iplikli bölümdür (77). Çoğu tRNA'nın 5' ucunda guanilat (pG) bulunurken, tüm tRNA'ların 3' ucunda CCA dizisi bulunmaktadır. Amino asitler terminal adenosin nükleozidinin ribozuna kovalent bağlanmaktadır. mRNA kalıbı katlanmış tRNA'nın diğer ucunda yer alan ve uygun kodona tamamlayıcı baz eşleşmesi ile bağlanan antikodon halkası tarafından tanınmaktadır. Amino asitlerin özgül tRNA'lara bağlanması aminoasil tRNA sentetaz ile sağlanmaktadır. Amino asit, aminoasil AMP sentetaz ara ürününü oluşturmak üzere ATP ile reaksiyona girmekte ve aktive olmaktadır. Aktive olan amino asit tRNA'nın 3'-CCA ucuna transfer olmakta ve AMP serbest kalmaktadır (84, 85). Yüksek enerjili kovalent bağ yeni bir amino asidin eklenmesiyle bozulmakta; ancak eklenen en son amino asitteki eşdeğer bir bağ ile yer değiştirmektedir. Böylelikle eklenen her amino asit kendi bağlanması için gerekli olan enerji yerine, kendinden sonra gelecek amino asit için gerekecek etkinleştirme enerjisini taşımaktadır (77).

tRNA sentetazın her tRNA'ya doğru amino asidi yüklediğinin kontrolü birkaç mekanizmanın aynı anda çalışmasıyla gerçekleşmektedir. Öncelikle tRNA sentetaz doğru amino asidi seçmelidir. Doğru amino asitler kendi sentetazının etkin yerindeki cebe karşı diğer amino asitlerden çok daha yüksek ilgi göstermektedirler. Doğru amino asitten daha büyük amino asitlerin etken yerden atıldığı görülürken; örneğin sadece bir metil grubu farkı

olan benzer iki amino asit arasındaki ayrımın doğru yapılabilmesi tek aşamalı bir mekanizma ile mümkün değildir. Diğer kontrol mekanizması amino asidin AMP'ye kovalent olarak bağlanmasının ardından gerçekleşmektedir. tRNA sentetazı bağladığında amino asidi sentetaz üzerindeki ikinci bir cebe doğru itmektedir. Bu cebin boyutları doğru amino asidi dışlarken ona benzeyen farklı amino asitlerin cebe girmesine izin vermektedir. Amino asit bu cebe girdiğinde AMP'den hidrolizlenmekte ve enzimden ayrılmaktadır. Bu süreç yaklaşık 40.000 eşleşmede bir hata oluşturacak şekilde ilerlemektedir. Ayrıca tRNA sentetaz da doğru tRNA grubunu tanımalıdır. tRNA sentetazların çoğu tamamlayıcı antikodonu doğrudan tanımaktadır. Bu sentetazlar şekil ve yük açısından her biri antikodondaki bir nükleotide tamamlayıcı olan, ardışık üç nükleotid bağlama cebi içermektedir. Diğer sentetazlar için ise asıl belirleyici özellik alıcı gövdenin nükleotid dizisidir. Birçok durumda tRNA üzerinde çeşitli pozisyonlardaki nükleotid dizileri sentetaz tarafından okunmaktadır (77).



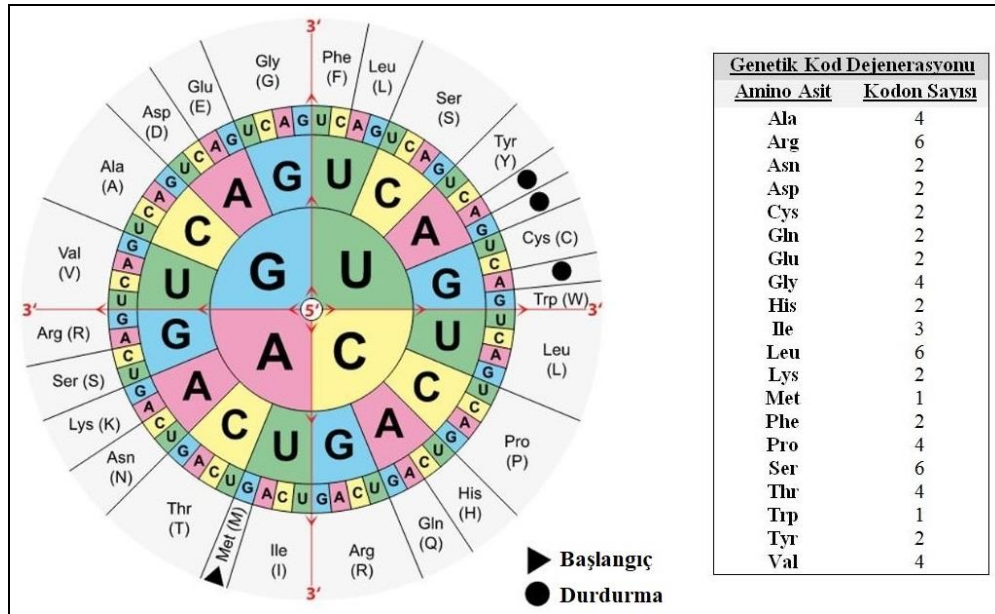
Şekil 6. tRNA'ların yapısı. **A.** tRNA'ların yonca yaprağı yapısı. **B ve C.** X-ışını kırınımı incelemesinden elde edilmiş gerçek L-şeklindeki tRNA molekülünün görünümü (77)

Ökaryotik tRNA'lar RNA polimeraz III tarafından sentezlenmektedir. tRNA'lar önce büyük öncül tRNA şeklinde sentezlenip, ardından olgun tRNA moleküllerini oluşturacak şekilde budanmaktadır. Bazı tRNA öncüllerinde bulunan intronlar ise kesip-yapıştırma şeklinde kırılmaktadır. Budanma ve kırılma işlemleri için öncül tRNA'nın yonca yaprağı şeklinde ve doğru bir biçimde katlanmış olması gerekmektedir. Her olgun tRNA molekülündeki ~10 nükleotidden biri normal G, U, C ya da A ribonükleotidinin değişikliğe uğramış halidir. Bu değişikliklerin bir kısmı antikodonun yapısını ve baz eşleşmesini etkilemektedir. Bu şekilde tRNA molekülünün uygun mRNA antikodonunu tanınması

kolaylaşmaktadır. Değişikliklerin bir kısmı ise tRNA'nın hatasız bir şekilde doğru amino aside bağlanmasını sağlamaktadır (77). mRNA üzerindeki kodonların okunması dur kodonuna kadar sürmekte ve dur kodonuna gelindiğinde protein sentezi sonlanmaktadır. Sentezlenen protein; bazı bölgelerin kesilip-çıkarılması, yan grupların eklenmesi, paketlenerek üç boyutlu yapısını alması gibi post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek fonksiyonel protein haline gelmekte ve hücre içindeki fonksiyonunu yerine getirmektedir (86).

2.5.2. Wooble Hipotezi

Kodonlar ve antikodonlar arasında kusursuz Watson-Crick baz eşleşmesi söz konusu değildir. Bu şekilde bir eşleşme olsaydı hücreler her bir amino asidi belirleyen her kodon için bir tane olmak üzere en az 61 tRNA bulundurmak durumunda olurdu. Ancak pek çok hücre 61'den daha az tRNA içermektedir. Metiyonin ve triptofan hariç, tüm amino asitler birden fazla kodon tarafından kodlanmaktadır (Şekil 7). Bu durum tek bir tRNA antikodonunun belirli bir amino aside karşılık gelen birden fazla kodonu tanıyabilmesiyle mümkündür. Bu tanıma genişliği wobble pozisyonu olarak adlandırılan mRNA kodonunun üçüncü (3') bazı ve onun tRNA antikodonunun ilişkili ilk (5') bazı arasındaki standart olmayan eşleşmeden kaynaklanmaktadır. Bir kodonun ilk ve ikinci bazları ise ilişkili antikodonun üçüncü ve ikinci bazlarıyla her zaman güçlü Watson-Crick baz eşleşmesi yapmaktadır (76, 87, 88).



Şekil 7. Genetik kod dejenereasyonu (89)

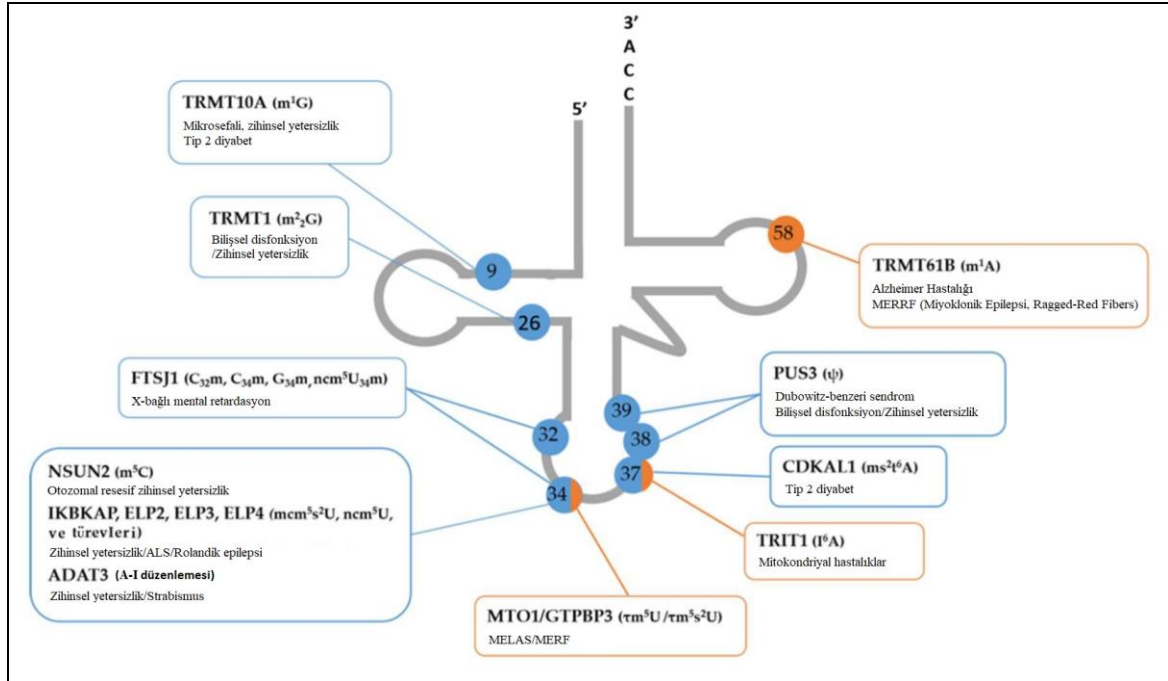
2.5.3. tRNA Modifikasyonları

Translasyon, tRNA'nın mRNA ve proteine katılan amino asitler arasında adaptör rol oynaması ile ribozomlarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle tRNA ve ribozomlar, translasyonun merkezi bileşenleridir (84, 88). Translasyonel makine yüksek derecede verimli ve doğru olmasının yanında esnektir. Kodon seçimi ve durumu, aminoasillenmiş tRNA'lar ve nutrientlerin mevcudiyeti ve stres sinyallerine yanıt olarak gen ekspresyonu düzenlenebilmektedir. Translasyonel prosesin esnekliği tRNA üzerindeki spesifik baz ve riboz modifikasyonları ile elde edilmektedir. Modifikasyonlar; alkilasyon, izomerizasyon, asetilasyon, hidrojenasyon, tiyolasyon ve özellikle 2'-OH grubunda baz ve riboz şeker kısmında sıklıkla gözlenen metilasyon aracılığıyla gerçekleşmektedir (90). tRNA modifikasyonlarının farklı biyolojik rolleri hakkındaki bilgimiz yüksek verimli dizileme ve kütle spektrometrisindeki teknolojik gelişmelerle birlikte artmıştır. Modifiye nükleozidlerin translasyonda tRNA performansını nasıl etkilediğinin yanı sıra aracı metabolizmanın regülasyonunu, antibiyotik üretimini, ökaryotik virüslerin gen ekspresyonunu, hücre bölünmesini, hücre döngüsü kontrolünü, UV duyarlılığını ve mutasyon frekansını nasıl etkilediğine yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur (91, 92).

tRNA sisteminin karmaşıklığı, hücresel düzenleyici programlarda kullanımı için büyük potansiyel sağlamaktadır. İnsan genomunda enzim aracılı ribonükleozid modifikasyonları içeren kapsamlı transkripsiyon sonrası işlemlerle yüzlerce tRNA kodlayan gen bulunmaktadır. Hem tRNA hem de ribozomal RNA (rRNA) göz önüne alındığında, kanonik adenzin, guanozin, sitidin ve üridine ek olarak tüm organizmalar arasında 100'den fazla ribonükleozid modifikasyonu tanımlanmıştır. Bu modifiye edilmiş ribonükleozidlerin kimyasal yapıları, biyosentetik yolları, RNA modifiye edici enzimler ve RNA dizilerindeki modifiye edilmiş rezidülerin lokasyonları hakkında kapsamlı bilgi sağlayan "MODOMICS" (<http://genesilico.pl/modomics/modifications>) ve "The RNA Modification Database" (<https://mods.rna.albany.edu>) gibi RNA modifikasyon veritabanları bulunmaktadır (93).

Hemen hemen tüm tRNA'ların antikodon halkaları, birkaç modifiye nükleotid içermektedir. Bunlardan en önemlileri 34. ve 37. pozisyonlardaki nükleotidlerdir. Wobble pozisyonu olan 34. pozisyonundaki nükleotid, kod çözme sırasında aminoasil tRNA bağlanma bölgesinde mRNA kodunun üçüncü bazıyla eşleşirken; 37. pozisyonundaki nükleotid, antikodonun 3'-ucuna bitişiktir. tRNA antikodon halkalarındaki modifikasyonların, doğru

mRNA kodunun çözülmesinde önemli rolleri vardır. Özellikle, tRNA 34. pozisyon modifikasyonları, üçüncü nükleozidde farklılık gösteren birçok mRNA kodonunu çözmek için tRNA kapasitelerinin artırıldığını, dolayısıyla dejenere genetik kodun nasıl çevrildiğini açıklamaktadır. Ayrıca antikodon modifikasyonlarının, karşılık gelen aminoasit tRNA sentetazlar tarafından tanınmayı artırdığı ve translokasyon sırasında çerçeve kaymasını önleyici görev yaptığı gösterilmiştir. Bu işlevleri göz önüne alındığında tRNA modifikasyonlarının translasyonel verimlilik ve doğrulukta önemli rolleri olduğu görülmektedir. Ayrıca tRNA modifikasyonlarının bakteri ve ökaryotlarda translasyon, metabolizma ve stres cevabını birleştirmede de rol oynadığı bildirilmiştir (94).



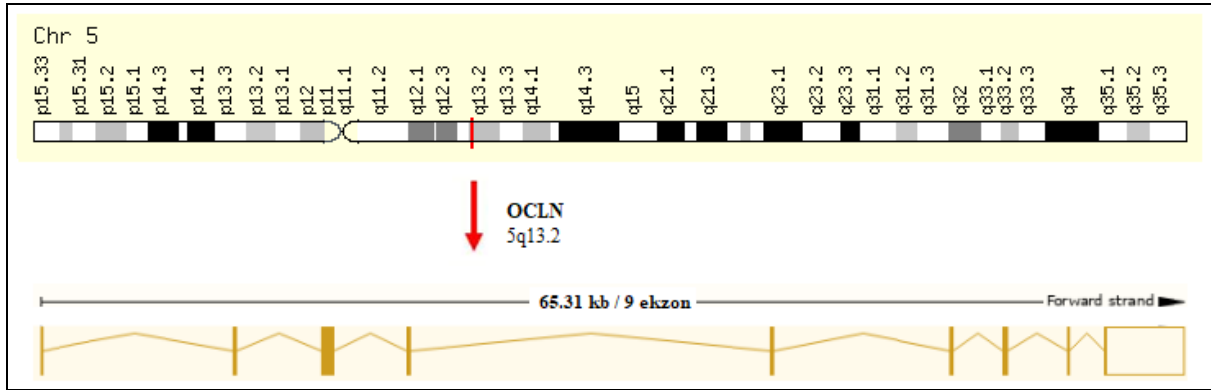
Şekil 8. tRNA modifiye edici enzimler ile nörolojik ve metabolik bozukluklarda yer alan tRNA modifikasyon bölgeleri. Sitosolik tRNA defektleriyle ilişkili hastalıklar, modifikasyonlar ve tRNA modifiye edici enzimler mavi çerçeve içinde; mitokondriyal tRNA defektleriyle ilişkili hastalıklar, modifikasyonlar ve tRNA modifiye edici enzimler ise turuncu çerçeve içinde belirtilmiştir (96).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, tRNA modifikasyonları ile nörolojik ve metabolik bozukluklar dâhil insan hastalıkları arasındaki ilişkiler aydınlatılmaya çalışılmıştır (91) (Şekil 8). İnsanlarda RNA modifikasyon yollarının deregülasyonunun Tip 2 diyabet ve birkaç

mitokondriyal hastalıkla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (95). Zihinsel yetersizlik, ALS, rolandik epilepsi, mikrosefali gibi nörolojik bozukluklar da çeşitli tRNA modifikasyonları ile ilişkilendirilmiştir (96).

2.6. OCLN Geni

OCLN (Occludin) geni; *PPP1R115*, *PTORCH1* olmak üzere çeşitli isimler almaktadır. 5 transkript varyantı ve 9 ekzonu (8'i kodlayıcı ekzon) bulunmaktadır. Genomik lokasyonu 5q13.2, genomik koordinatları ise chr5:69,492,292-69,558,104 (GRCh38/hg38)'dir (97) (Şekil 9). Ayrıca, tersine çevrilmiş ve kısmen kopyalanmış olan *OCLN* psödogeni mevcuttur. Bu psödogen, atasal *OCLN* geninin 5. ekzonun bir kısmının ve 6-9. ekzonların tamamının bir kopyasını içermektedir. *OCLN* geninin transkriptleri, splicing çeşitliliği göstermekte ve alternatif splice varyantlarının değişken ekspresyonunu sergilemektedir (98).



Şekil 9. *OCLN* geninin genomik lokasyonu (97, 99)

OCLN geni, ~65kDA ağırlığında bir integral membran proteini olan Okludini kodlamaktadır. Sıkı bağlantı parasellüler permeabilite bariyerinin sitokin ile regülasyonu için gerekli olan bir proteindir. Okludinin amino asit dizilimi memeli türleri arasında yüksek derecede korunmuştur (100, 101).

Kan beyin bariyeri; beyni kanda dolaşan toksin ve zararlı maddelerden koruyan, serebral hücre fonksiyonları için gerekli besinlerin geçişine izin veren, beynin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gerekli olan son derece önemli ve oldukça karmaşık bir sellüler sistemdir. Bu bariyerin seçici geçirgen özelliği vücut gelişimi sırasında

değişebilmektedir. Kan beyin bariyerinin bozulması durumunda nöronal inflamasyon başlamakta ve beyin hücreleri zarar görmektedir. Bu durum Multipl Skleroz (MS), inme, Alzheimer hastalığı gibi birçok nörolojik hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır. Kan beyin bariyerinde beyin hücrelerine madde geçişi sıkı bağlantılar ve metabolik bariyer aracılığıyla denetim altındadır (102). Sıkı bağlantılar; Okludin, Klaudin ve Zonula okludens (ZO)'lerin birbiriyle koordineli bir şekilde ilişkileri sonucu oluşmaktadır. Okludin, vücut boyunca epitelial sıkı bağlantılarda her yerde eksprese olmaktadır. Gelişen insan beyinde Okludin, nöroepitelyumda ifade edilmektedir. Bununla birlikte, “wild type” Okludin proteinine karşı antikolar kullanılarak, ekspresyonun epitelden nöronal hücre tiplerine geçiş sırasında ortadan kalktığı gösterilmiştir. Okludin, anjiyogenez sırasında nörovasküler sıkı bağlantılarda ve kan beyin bariyeri oluşturan olgun serebral endotelinde yüksek oranda eksprese olmaya devam etmektedir (103-105). Okludin; ZO-1 ve ZO-2 gibi sıkı bağlantı komponentleriyle etkileşim içindedir. Sıkı bağlantıda Okludin lokalizasyonu için ZO-1'in gerektiği ve Okludinin C-terminal kısmının bazolateral membranda Okludin hedefi olarak ZO-1'e bağlandığı bildirilmiştir (106).

OCLN geni tarafından sentezlenen protein, Occludin/ELL domain ve Marvel (MAL and related proteins for the vesicle traffic and membrane link) domain olmak üzere iki fonksiyonel domain içermektedir. Occludin/ELL domain, proteinin C-terminal kısmında bulunmaktadır ve RNA polimeraz II elongasyon faktörünün ELL ailesinin bir parçasıdır. 4-transmembran-heliks bölge mimarisine sahip olan Marvel domain ise, membran appozisyonunda rol oynamakta ve *OCLN* geninin 3. ve 4. ekzonları tarafından kodlanmaktadır. *OCLN* geninde çeşitli splice varyantlar rapor edilmiştir. Epitel hücrelerde genin 4. ekzonunun delesyonunu içeren varyantların hücre membranında doğru lokalize olmadıkları saptanmıştır (98, 107). Benzer şekilde HeLa hücrelerinde yapılan çalışmalarda 3. ekzonu olmayan *OCLN* varyantlarının hücre membranında lokalize olmadıkları gösterilmiştir. 4-transmembran domain yokluğunda izoformların membranda lokalize olmadıkları ancak sitoplazmada kaldıkları belirtilmiştir (108). Bu çalışmalar membran appozisyonunda Marvel domain'in rolünü açıkça ortaya koymaktadır. *OCLN* psödogeni tarafından kodlanan protein ise Occludin/ELL domain içerirken, Marvel domain içermemektedir (98).

Günümüze kadar *OCLN* geninde çok sayıda mutasyon rapor edilmiştir. O'Driscoll ve ark. (2010) *OCLN* genindeki varyantların şiddetli otozomal resesif nörogelişimsel bir bozukluk olan BLC-PMG (“Band-like Calcification with Simplified Gyration and

Polymicrogyria”)’ye neden olduğunu bildirmişlerdir. BLC-PMG aynı zamanda psödo-TORCH (“Toxoplasmosis, Other Infections, Rubella, Cytomegalovirus Infection, and Herpes Simplex”) fenotipi olarak da adlandırılmaktadır. BLC-PMG’li hastalara başlangıçta intrakraniyal kalsifikasyon bulgularından dolayı AGS (“Aicardi-Goutieres Syndrome”) tanısı konduğu; ancak detaylı incelemeler sonucunda klinik ve radyolojik bulguların AGS’den oldukça farklı olduğu rapor edilmiştir. BLC-PMG (OMIM 251290) fenotipine sahip hastalarda bilateral simetrik polimikrogiri ve gri cevher kalsifikasyonunun yanı sıra mikrosefali, gelişimsel duraksama ve erken başlangıçlı nöbetler görülmektedir. Aynı zamanda hastaların çoğunda serebrospinal sıvı (“cerebrospinal fluid”; CSF) protein seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (100).

Polimikrogiri (PMG), beyin yüzeyinin düzensiz görünümüne yol açan aşırı kortikal katlanma ve sık sulcus ile karakterize bir serebral kortikal malformasyondur. PMG’nin birkaç histolojik tipi tanımlanmıştır. Hem tabakalanmamış hem de klasik dört tabakalı PMG’ye genellikle nodüler heterotopiler, beyaz cevherin anormal miyelinasyonu, lateral ventriküllerin dilatasyonu, korpus kallozum agenezisi, serebellar hipoplazi eşlik etmektedir (109). Polimikrogirili hastalarda zihinsel yetersizlik, epilepsi, motor disfonksiyon ve konuşma bozuklukları görülmektedir. PMG ile ilişkilendirilen birkaç kromozomal lokus bulunmaktadır; bunlardan 22q11.2 ve 1p36 delesyonları için tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. PMG’li hastalarda *WDR62*, *TUBB2B*, *TUBA8*, *TUBB3*, *SRPX2*, *NHEJ1*, *PAX6* ve *TBR2* genlerinde çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. *GPR56* gen mutasyonlarının azalmış beyaz cevher ve serebellar anomaliler ile bilateral frontoparietal PMG’ye neden olduğu bildirilmiştir (110-114).

2.7. Elongatör Kompleksi ve ELP6 Geni

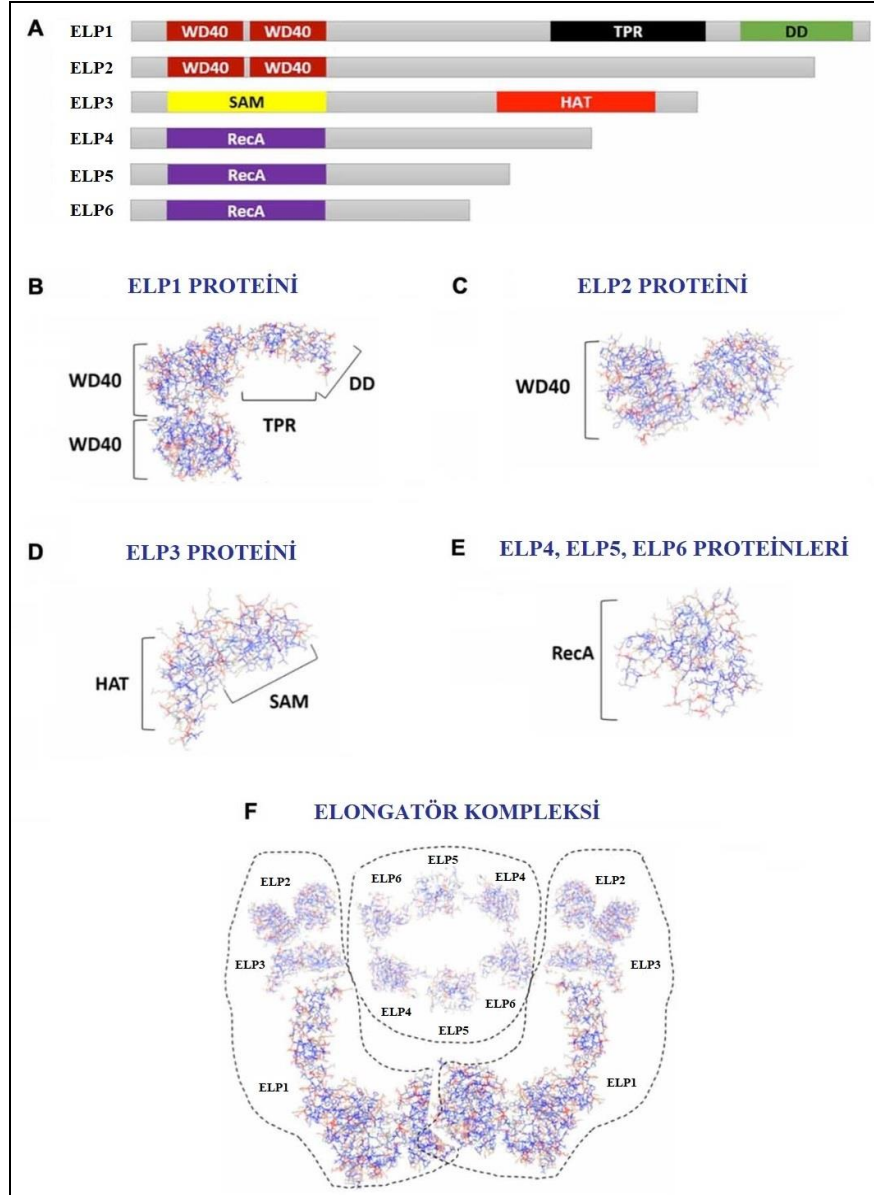
2.7.1. Elongatör Kompleksi

Elongatör kompleksi ELP1-6 olmak üzere altı subunitin her birinden iki kopya içeren, oldukça büyük (~900kDa) ve yüksek derecede korunmuş bir ökaryotik protein kompleksidir (115-117) (Şekil 10F). Bu kompleks ilk olarak bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)’da RNA polimeraz II’nin (RNAPII) uzayan formunun bileşimini belirlemeye yönelik bir biyokimyasal saflaştırmayla keşfedilmiştir. Bu çalışmayla molekül ağırlıkları ~150kDa (ELP1), ~85kDa (ELP2) ve ~60kDa (ELP3) olmak üzere üç protein içeren yeni bir

kompleks tanımlanmıştır (118). Purifikasyon yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte holo-Elongatörün aslında küçük boyutlarda üç farklı subunit (ELP4, ELP5, ELP6) daha içerdiği gösterilmiştir (119). Elongatör kompleksi ELP123 core alt kompleksi ve ELP456 aksesuar alt kompleksi olmak üzere iki alt kompleks şeklinde organize olmaktadır (120, 121). Elongatör subunitlerinin etkileşimi ve karmaşık hizalanması ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. ELP456 heterohekzameri, çevresinde yer alan iki ELP123 alt kompleksi için köprü görevi görmektedir. Elongatör subunitler mayadan insana kadar hem dizilimleri hem de diğer alt birimlerle etkileşimleri bakımından evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuştur. Günümüze kadar mayalarda her bir subunitin karakterizasyonu yapılmıştır (Şekil 10A). IKBKAP olarak da isimlendirilen ELP1, altı subunitin en büyüğüdür ve diğer subunitler için iskele gibi işlev görmektedir. ELP1, iki adet WD40 domain, spesifik peptid ligandlarına bağlanıp protein-protein etkileşimlerini düzenleyen bir adet TPR (“Tetratricopeptide Repeat”) domain ve bir adet C-terminal-lokalize dimerizasyon domain içermektedir (Şekil 10B). ELP2, Elongatör kompleksinin ikinci büyük alt subunitidir ve iki adet WD40 domain içermektedir (Şekil 10C). ELP1 ve ELP2, ELP123 alt kompleksinin stabilitesine katkı sağlamakta ve Elongatör aktivitesini düzenleyen farklı faktörlerden gelen sinyalleri birleştirmektedir. ELP3, Elongatör için enzimatik core olarak işlev görmektedir. Çeşitli radikal reaksiyonları katalize etmek için gerekli olan bir adet SAM (S-Adenozil-L-Metiyonin) domain ve bir adet HAT (Histon asetil transferaz) domain içermektedir (Şekil 10D). ELP456 alt kompleksi bir RecA-benzeri kıvrımı (fold) paylaşmaktadır ve heterohekzamerik, halka benzeri bir yapıya birleştirilmektedir (38) (Şekil 10E). ELP123 hekzameri asetil-transferaz aktivitesine sahipken; ELP456 hekzameri tRNA’ya ve ATP’ye bağlanmaktadır (121, 115).

Elongatör ilk olarak RNAPII hiperfosforilasyonu ile ilişkili transkripsiyon elongasyon faktörü olarak tanımlanmış ve *in vitro* deneylerde histonları (H3 ve H4’ün kuyruklarını) asetile ettiği gösterilmiştir (115). Elongatörün önemli bir kısmı sitoplazmiktir, bu kompleksin hücrede ek moleküler fonksiyonlar gerçekleştirme olasılığını artırmaktadır. Mayadaki genetik veriler, bazı tRNA’ların wobble pozisyonunda üridinler üzerinde 5-metoksi-karbonil-metil (mcm5) ve 5-karbamoil-metil (ncm5) gruplarının varlığı için Elongatör kompleksinin gerekli olduğunu göstermiştir. Mayada, 5-metoksi-karbonil-metil-2-tioüridin (mcm5s2U) içeren tRNA(Lys/UUU), tRNA(Gln/UUG) ve tRNA(Glu/UUC)’nin çeşitli kombinasyonlarının aşırı ekspresyonlarının transkripsiyon yanıtındaki kusurları bastırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle Elongatör kompleksinin birincil rolünün tRNA modifikasyonlarını katalize etmek olduğu

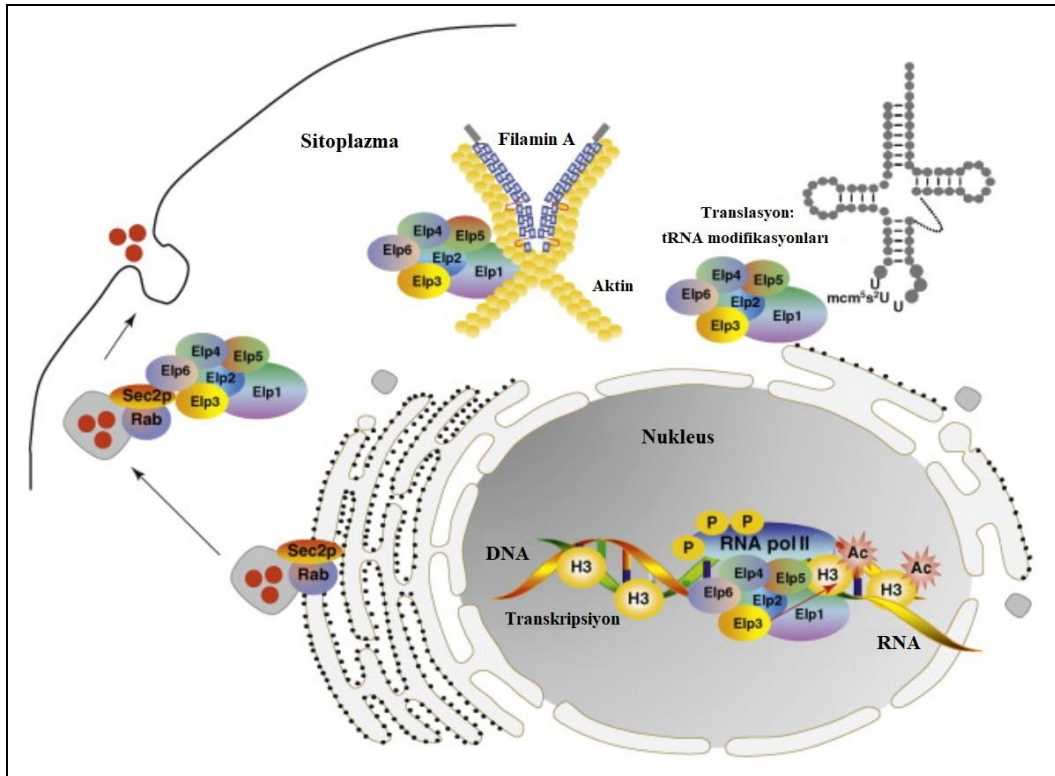
düşünülmektedir (115, 116). Yapılan çalışmalarla Elongatör kompleksinin transkript elongasyonu, histon asetilasyonu (122) ve wobble üridin tRNA modifikasyonunun (123) yanı sıra ekzositoz (124), zigotik paternal genom demetilasyonu (125), sitoskelet regülasyonu (126), α -tubulin asetilasyonu (127), hücre göçü (128) ve transkripsiyonel susturma (129) gibi farklı birçok hücresel fonksiyonu olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 10. Elongatör kompleksi. **A.** ELP1-6 proteinlerinin domainleri. **B.** ELP1 proteininin üç boyutlu gösterimi. **C.** ELP2 proteininin üç boyutlu gösterimi. **D.** ELP3 proteininin üç boyutlu gösterimi. **E.** ELP4-5-6 proteinlerinin üç boyutlu gösterimi. **F.** Elongatör kompleksinin üç boyutlu gösterimi (38)

Elongatör kompleksi RNAPII transkript uzamasını nukleusta histon asetilasyonu, sitoplazmada ise tRNA modifikasyonu aracılığıyla desteklemektedir (115) (Şekil 11). Bilinen iki substratı Histon H3 ve α -tubulin, Elongatör kompleksinin sitozol ve nukleustaki farklı rollerini yansıtmaktadır. Nükleer Elongatör, promotor-distal gen gövdesinde histon H3'ün asetilasyonu yoluyla stres ile indüklenebilir genlerin bir alt kümesinin transkripsiyonel uzamasını düzenleyebilmektedir. Sitozolde α -tubulinin Elongatör aracılı asetilasyonu ise, hücre içi trafik ve hücre migrasyonuna katkıda bulunmaktadır (130).

Elongatör kompleksinin tüm türler arasında korunan fonksiyonu çeşitli kurtarma deneyleri ile açıkça gösterilmiştir. Altı alt birimi kodlayan genlerden herhangi birinin silinmesi mayada hemen hemen aynı biyokimyasal fenotipleri vermiştir. Bu durum, Elongatör kompleksini içeren proteinler arasında sıkı bir fonksiyonel ilişki olduğunu ve kompleksin fonksiyonel bütünlüğünün, alt birimlerinin yokluğunda tehlikeye girdiğini göstermektedir (38).



Şekil 11. Elongatör kompleksinin biyolojik işlevleri (131)

Elongatör subunitlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar çok çeşitli moleküler fenotiplere yol açabilmektedir. Fare ve sineklerde Elongatör subunitlerindeki delesyonlar embriyonik lethaldir. *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*)’da yapılan bir çalışmada *ELP3* genindeki delesyon sonucunda pupa evresinde larva ölümü gözlenmiştir (132). Fare model organizmasının kullanıldığı bir çalışmayla kortikal projenitörlerde *ELP3* geninin koşullu delesyonunun nörogenez defektlerine ve nöronal prekürsörlerde protein homeostazi defektleriyle tetiklenen mikrosefaliye neden olduğu gösterilmiştir (133). *D. melanogaster*’de yapılan mutagenез taramalarında *ELP3*’teki iki fonksiyon kaybı mutasyonunun (R475K ve R456K) *ELP3*’ün nöronal iletişim ve sağkalım ile ilişkili olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca *ELP3*’ün zebra balığında susturulması motor aksonal anormalliklere neden olmuştur (134). Fare ile yapılan başka bir çalışmada ise *ELP1* geninin nakavtı sonucu embriyonik letalite gözlenirken; proteinin azalan ekspresyonu periferel nöropatlere neden olmuştur. Bu bulgular genin nöronal gelişimde kritik rol oynadığına işaret etmektedir (135). Yine farede *ELP1*’in spermatogenez sırasında mayoz için gerekli olduğunu göstermek için “loss-of-function” (fonksiyon kaybı) yaklaşımı kullanılmış ve *ELP1*’in yokluğunun apoptoz artışı ve gametogenezin tamamen durdurulması ile sonuçlanan sinapsis ve mayotik rekombinasyondaki bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (136). *ELP1*, *ELP3* veya *ELP4*’ün fare homologlarının ifadesinin azaltılmasının zigotik paternal genom demetilasyonunu bozduğu bildirilmiştir. Fare beyin analizlerinde gelişim boyunca kortikal nöronlarda Elongatörün ekspresyonuna bakılmış ve shRNA (short hairpin RNA) ile Elongatörün inhibisyonunun nöronların migrasyon hızını azalttığı gösterilmiştir (125, 127). *Xenopus* nöral krest hücreleri ve postmitotik kortikal nöronlarda, çeşitli transforne hücre hatlarında, fibroblastlarda Elongatörün yokluğunun hücre migrasyonunu bozduğu bildirilmiştir (115).

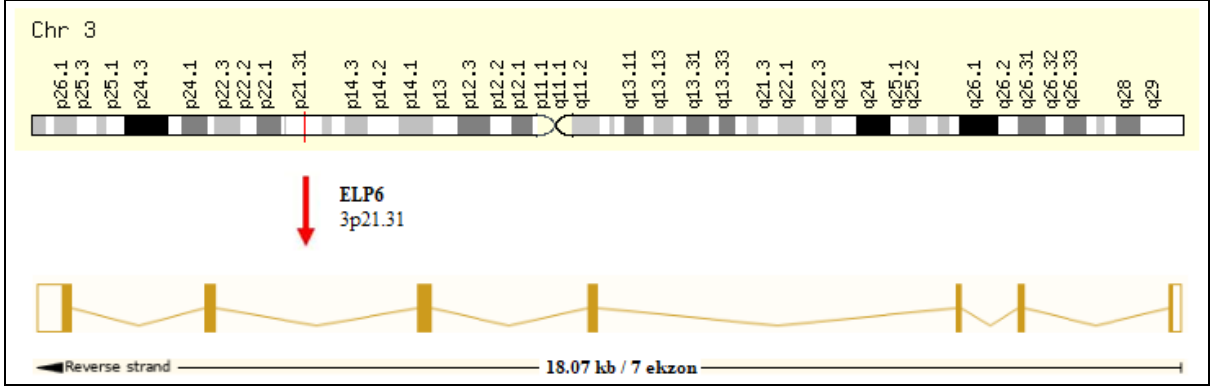
Elongatör subunitlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların insan hastalıklarıyla ilişkisi de çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. *ELP1* genindeki mutasyonlar ailesel disotonomi (Familial Dysautonomia; FD) ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalık, duyuşal ve otonom sinirlerin gelişim bozukluğu ve ilerleyen dejenerasyonu ile karakterizedir (137, 138). Son zamanlarda yapılan çalışmalar FD’nin tRNA modifikasyon defektleriyle ilişkisine yönelmiştir. FD hastalarından alınan hücrelerde modifiye wobble üridin miktarlarının azaldığı bildirilmiştir (139). Ayrıca Elongatör kompleksinin nöronal migrasyon hedef doku innervasyonunu ve duyuşal ve sempatik nöronların hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir (140). *ELP2*

geni, dizileme çalışmaları sonucunda zihinsel yetersizlik ile ilişkilendirilmiştir (141, 142). Elongatör kompleksinin katalitik subuniti *ELP3*'teki varyantların bir motor nöron hastalığı olan amiotrofik lateral skleroz (ALS) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (134). *ELP3*, Wnt sinyal yolağının bir transkripsiyonel hedefidir. Sağlıklı intestinal epiteliumda ekspresyonunun düşük olduğu; ancak *ELP3* insan kolon adenokarsinom biyopsilerinde upregüle olduğu gözlenmiştir (143). Benzer şekilde *ELP3*'ün normal meme dokusunda az miktarda eksprese olduğu; fakat meme kanseri hastalarının biyopsilerinde ve meme kanser fare modelindeki meme tümörlerinde düzeyinin çarpıcı şekilde uyarıldığı bildirilmiştir (144). *ELP4*'ün, rolandik epilepside (RE) sentro-temporal diken dalga ("Centro-Temporal Spikes"; CTS) elektroensefalogramı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (145). Elongatör kompleksi aktivitesinin kanserle olan ilişkisini ortaya koyan bir çalışmada melanom hücrelerde *ELP1*, *ELP3*, *ELP5* ve *ELP6* aracılığıyla Elongatörün ifadesinin azalması hücre migrasyonunu sınırlamış ve tümörjenitesini azaltmıştır (146). *ELP3*'ün, ilgili kanser kök hücrelerinin alt havuzunu (subpool) muhafaza etmek için gerekli olan Sox9 seviyelerinin regülasyonu yoluyla bağırsakta Wnt-bağımlı tümör başlangıcında ve rejenerasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (147). Başka bir çalışmayla da sitosolik tioüridilaz (CTU) 1/2 ile birlikte *ELP3*'ün, onkoprotein DEK'in ve dolayısıyla proinvaziv transkripsiyon faktörü LEF1'in translasyonunun regülasyonu yoluyla metastaz ve insan meme kanserindeki önemi gösterilmiştir (144).

Tüm bu çalışmalar insan Elongatör subunitlerindeki defektlerin özellikle nörolojik hastalıklar ve kanser ile ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bir asetil transferaz kompleksi olan Elongatör kompleksinin bu özelliklerinin altında Elongatör ilişkili tRNA modifikasyonları ile diğer enzimatik fonksiyonlarının yatıyor olabileceği düşünülmektedir.

2.7.2. *ELP6* Geni

ELP6 (*Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 6*) geni; *C3orf75*, *TMEM103*, *ATP1* olmak üzere çeşitli isimler almaktadır. 15 transkript varyantı ve 7 ekzonu bulunmaktadır. Genomik lokasyonu 3p21.31, genomik koordinatları ise chr3:47,495,640-47,513,722 (GRCh38/hg38)'dir (97) (Şekil 12).



Şekil 12. *ELP6* geninin genomik lokasyonu (97, 99)

ELP6, Elongatör kompleksinin altı alt biriminden birisidir. Mayada yapılan çalışmalarla Elongatör kompleksinin tüm alt birimlerinin, kompleksin kararlılığına, bütünlüğüne ve işlevselliğine eşit derecede katkıda bulundukları gösterilmiştir (148). Kompleksin transkripsiyon elongasyonu, hücre hareketliliği, hücre iskeleti organizasyonu, ekzositoz ve hücre içi trafik dâhil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerdeki rolü, pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Elongatör kompleksi, nukleusta histon asetilasyonu yoluyla RNA polimeraz II transkript uzamasını teşvik etmektedir ve ayrıca sitoplazmada tRNA modifikasyonu yoluyla translasyonel doğruluğu düzenlemektedir (149). tRNA antikodonlarının wobble pozisyonunda üridinlerin Elongatör ilişkili modifikasyonları, translasyonel elongasyonun doğruluğu ve kinetiği için son derece önemlidir. Bu modifikasyonlar aynı zamanda kotranslasyonel katlanma dinamiklerini de yönlendirmektedir (149, 150). Elongatörün aksesuar alt birimi olan ELP456 hekzameri tRNA'ya direk bağlanmaktadır; single-strand DNA veya oligo (U) RNA'ya ise bağlanmamaktadır (116). ELP456, diğer RecA-benzeri NTPazlara benzer şekilde ATP'ye bağlanmakta ve hidrolize edebilmektedir. Mayada yapılan çalışmalarda tRNA bağlanma bölgesinin *ELP6* geni üzerinde olduğu bulunmuştur (121). ELP456 tRNA'nın antikodon halkasına spesifik olarak bağlanmakta ve muhtemelen tRNA bağlanmasını ve salıverilmesini kontrol etme aracı olarak ATPaz aktivitesini korumaktadır (38).

Elongatör kompleksi üzerine pek çok çalışma bulunmakla birlikte, bu çalışmaların daha çok ELP123 alt kompleksine yoğunlaştıkları görülmektedir. *ELP6* geni ile ilgili yakın zamanda yayımlanan bir çalışmada, Purkinje nöronlarının hücre tipine özgü dejenerasyonunu tetikleyen yeni bir serebellar ataksi fare modelinde *ELP6* geninde tek nokta mutasyonu (p.Leu126Gln) tanımlanmıştır. Bu mutasyonun kompleksi destabilize ettiği, tRNA

fonksiyonunun deregüle olduğu ve translasyon regölasyonundaki işlevini tehlikeye atarak proteinin yanlış katlanmasına, proteotoksik strese ve nihayetinde nöron ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (149). Literatürde *ELP6* geni ile ilgili bir hastalıkla ilişkilendirilmiş insanda bildirilen bir mutasyon bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda, Eylül 2016-Ağustos 2020 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nörolojisi Bilim Dalı'na ve S.B.Ü. Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Nörolojisi Polikliniği'ne tedavi amaçlı gelen ve daha önceki çalışmalarımızda karyotip ve array CGH analizleri yapılmış, nörogelişimsel bozukluğu olan çocuklara sahip ve akraba evliliği olan ailelerden üç aile önceliklendirilmiştir. Araştırma kapsamında Aile-1 ve Aile-3'te nörogelişimsel bozukluğa sahip ikişer çocuk bulunurken, Aile-2'de nörogelişimsel bozukluğu olan bir hasta çocuk bulunmaktadır. Hastaların klinik özellikleri Tablo 1'de ayrıntılı şekilde yer almaktadır. Nörogelişimsel bozuklukları olan hastaların seçimi sırasında kafa travması, tümör, enfeksiyon, alkol ve ilaç kullanımı gibi nedenlerle merkezi sinir sisteminin gelişimsel bozukluğu oluşmuş hastalar araştırmaya dâhil edilmemiştir. Çalışma kapsamında hastaların ve ebeveynlerinin kanları ve punch deri biyopsi örneklerinden elde edilen hücreler kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nörolojisi Bilim Dalı'na ve S.B.Ü. Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Nörolojisi Polikliniği'ne tedavi amaçlı gelen, akraba evliliğinden doğan ve nörogelişimsel bozukluğu olan çocuklara sahip üç aile yer almaktadır. Çalışma süresince Aile-1, Aile-2 ve Aile-3 olmak üzere üç ailede bulunan toplam 11 bireyin kanları ile Aile-3'teki iki hasta kardeş (Hasta-4 ve Hasta-5), çocukların annesi ve

kontrol birey olmak üzere toplam dört bireyden alınan punch deri biyopsi örneklerinden elde edilen hücreler kullanılmıştır.

Tablo 1. Aile-1, Aile-2 ve Aile-3'te yer alan hastaların klinik özellikleri

Aile Numarası	Hasta Numarası	Klinik Özellikleri
Aile-1	Hasta-1	-Beslenme zorluğu -Gelişme geriliği -Epilepsi -Aksiyel hipotoni -Mikrosefali -Atipik yüz görünümü -Hiperaktif derin tendon refleksleri -Üst ve alt ekstremitte spastisitesi -İnce korpus kallozum -Polimikrogiri -Serebral ve serebellar atrofi -Alt ekstremitte klonusu -Hipernatremi -Diabetes insipidus
	Hasta-2	-Beslenme zorluğu -Görme bozukluğu -Gelişme geriliği -Epilepsi -Aksiyel hipotoni -Hiperaktif derin tendon refleksleri -Üst ve alt ekstremitte spastisitesi -Mikrosefali -İnce korpus kallozum -Polimikrogiri -Spastik tetraparezi -Serebral ve serebellar atrofi -Hipernatremi -Diabetes insipidus -Lateral ventrikülde bilateral ilerlemiş genişleme -Korpus kallozum atrofisi
Aile-2	Hasta-3	-Beslenme zorluğu -Görme bozukluğu -Gelişme geriliği -Epilepsi -Jeneralize hipotoni -Derin tendon reflekslerinin yokluğu -Mikrosefali -İnce korpus kallozum -Polimikrogiri -Band-like kalsifikasyon -Lateral ventriküllerin dilatasyonu

Tablo 1-devamı. Aile-1, Aile-2 ve Aile-3’te yer alan hastaların klinik özellikleri

Aile-3	Hasta-4	-Beslenme zorluğu -Gelişme geriliği -Epilepsi -Epileptik ensefalopati -Ağır düzeyde mental motor retardasyon -Mikrosefali -Spastik tetraparezi -Dismorfik yüz görünümü -İnce uzun parmaklar -Üst üste binen parmaklar -Hiperaktif derin tendon refleksler -Kalça çıkığı -Düşük yerleşimli kulak -Skolyoz -Diffüz serebral atrofi
	Hasta-5	-Beslenme zorluğu -Gelişme geriliği -Epilepsi -Ağır düzeyde mental motor retardasyon -Mikrosefali -Spastik tetraparezi -Dismorfik yüz görünümü -İnce uzun parmaklar -Üst üste binen parmaklar -Bilek kontraktürü -Büyük dil -Düşük yerleşimli kulak -Strabismus -2x2 cm “cafe-au-lait” lekeleri -Çukur damak -Gaga şeklinde el başparmağı -Kaşeksi -Hiperaktif derin tendon refleksler -Skolyoz -Diffüz serebral atrofi -Ventriküllerin pasif dilatasyonu -İnce korpus kallozum

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili mutasyonların genetik karakterizasyonu aşamasında, bağımsız değişken fenotip değişikliklerine neden olan genomdaki değişikliklerdir; bağımlı değişken hastalığın genotipik özellikleriyle değişen fenotipik özellikleridir. Çalışmanın fonksiyonel karakterizasyon aşamasında ise, *ELP6* genindeki missense mutasyon bağımlı değişkeni oluştururken; hastalarımızda nörogelişimsel

bozuklukta rol oynayan diğer genler ve hastalığa neden olabilecek çevresel etmenler bağımsız değişkenleri oluşturmaktadır. Deney setlerinde hastalardan elde edilen verilerin kıyaslanması amacıyla *ELP6* genindeki missense mutasyonu taşımayan bir birey Kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de, malzemeler ise Tablo 3’te yer almaktadır.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Model
Soğutmalı mikrosantrifüj	Eppendorf	5415R
Santrifüj	Hettich	Rotanta 460 R
Su banyosu	PolyScience	PolyScience
Thermal cycler	Bio-rad	MJ Mini
Jel elektroforez sistemi	Thermo Scientific	Easycast B2
Jel görüntüleme cihazı	Vilber	E-box CX5
Güç kaynağı	Bio-rad	PowerPac Basic
Vorteks	IKA	MS3 Basic
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Torray Pines Scientific	HS10
Nanodrop	Thermo Scientific	Nanodrop2000
Qubit florometre	Thermo Fisher Scientific	Qubit 4.0
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific	Multiskan Go
Mikrodalga fırın	Beko	MD1510
Derin dondurucu -80°C	Hettich	HT 5786-A
Derin dondurucu -20°C	Bosch	GSD26N13NE
Buzdolabı	Bosch	KDV52X60NE
Otoklav	Nuve	NC90M
Hassas terazi	Precisia	205 A SCS
Çalkalayıcı inkübatör	Eppendorf	Termomixer comfort
Laminar flow kabin	Aura vertical	S.D.4
CO ₂ inkübatörü	Eppendorf	Galaxy 170S
Inverted mikroskop	Nikon	Diaphot
Inverted mikroskop	Euromex	OX-2053
Mikroskop kamerası	Euromex	CMEX5.0
Pipet tabancası	Greiner	Greiner bio-one
Pipet seti 3’lü (0.5-10ul, 10-100ul, 100-1000ul)	Eppendorf	Eppendorf Research® plus
Sonikatör	Covaris	S220

Tablo 3. Çalışmada kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası
Genomik DNA izolasyon kiti	NucleoSpin® Blood L	740954.20
Genomik DNA mini kit	Invitrogen	K1820-01
Kandan RNA izolasyon kiti	PAXgene® Blood RNA Kit	762174
RNA izolasyon kiti	Qiagen RNeasy® Mini Kit	74104
miRNA izolasyon kiti	Qiagen miRNeasy® Mini Kit	217004
cDNA sentez kiti	Thermo Scientific- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	K1621
Kan için RNA tüpleri	PAXgene Blood RNA Tubes	762165
EDTA'lı tüp	BD Vacutainer® Plus Plastic K2EDTA Tubes	367861
1.5 ml mikrosantrifüj tüpü	Greiner	616201
PCR tüpleri (0.5 ml)	Axygen	321-05-051
PCR tüpleri (0.2 ml)	Axygen	PCR-02-C
15 ml falkon tüp	Greiner	188271
50 ml falkon tüp	Greiner	227261
10 µl steril pipet ucu	Greiner	FT10
100 µl steril pipet ucu	Greiner	FT100
1000 µl steril pipet ucu	Greiner	FT1000(G)
5 ml serolojik pipet	Sarstedt	86.1253.001
10 ml serolojik pipet	Sarstedt	86.1254.001
25 ml serolojik pipet	Sarstedt	86.1685.001
dNTP	Promega	U1420
Taq DNA polimeraz	Thermo Scientific	EP0401
Primer	Eurofin	-
1 kb DNA markır	Thermo Scientific	SM1331
100 bp DNA markır	New England Biolabs	N3231S
50 bp DNA markır	New England Biolabs	N3236S
Etidyum bromür	Sigma	E1510-10ml
Agaroz	Sigma	A9539-500G
Tris baz	Sigma	T6066
Borik asit	Sigma	B6768
Etanol	Appllichem	A3678
Etanol	Merck	1.00983.2500
2-propanol	AppliChem	A3928.2500PE
β-merkaptotetanol	AppliChem	A1108.0100
Bakır sülfat	AppliChem	A3880.0500
Hemositometre	Heinz Herenz	1080343
Cryotüp	Sarstedt	72.380992
25 cm ² flask (T25)	Sarstedt	83.3910.002
75 cm ² flask (T75)	Sarstedt	83.3911.002
100 x 20 mm petri	Sarstedt	83.3902
6 kuyucuklu plaka	Sarstedt	83.3920

Tablo 3-devamı. Çalışmada kullanılan malzemeler

DMEM	Gibco	41965-039
RPMI 1640	Gibco	21875-034
FBS (Fetal bovine serum)	Gibco	10500-064
L-gutamin	Gibco	25030-081
Penisilin/streptomisin	Gibco	15140-122
Amfoterisin B	Sigma	A2942-100
Sodyum piruvat	Biological Industries	03-042-1B
Non-esansiyel amino asit solüsyonu	Thermo Fisher	11140050
PBS (Fosfat tampon solüsyonu)	Gibco	70011-036
Tripsin/EDTA	Gibco	25200-056
DMSO (Dimetilsülfoksit)	AppliChem	A3672,0250
Tripan mavisi	Sigma	T8154-100ml
Steril su	Lonza	BE-17-724F
Otoklav bandı	SLAB	19mm x 50m
Filtre (0.2µm)	Sartorius	16534
Şırınga	Tibset	2 cc
Bisturi	Beybi	0197
Parafilm	Laboratory Film	4inx125 ft. Roll
T4 DNA polimeraz	New England Biolabs	M0203
T4 polinükleotid kinaz	New England Biolabs	M0201
Magnetic AMPure XP beads	Beckman Coulter	A63881
KAPA HTP/LTP Library Preparation Kits	Roche Diagnostics	-
LightCycler®480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics	04887352001

3.6.2. Genetik Analizler

3.6.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dâhil edilme kriterlerine sahip ve daha önceki çalışmalarımızda karyotip analizi ile array CGH sonuçları normal çıkan üç ailede tüm ekzom dizileme analizi yapmak amacıyla öncelikle çalışma grubundaki bireylerin kanları alınarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla üç ailedeki hasta çocuklar ve anne-babaları olmak üzere toplam 11 bireyden EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer® Plus Plastic K2EDTA Tubes) 2'şer ml kan alındı ve -20°C'de muhafaza edildi.

İzolasyon işlemine başlamadan önce kit içeriği ile ilgili ön hazırlıklar yapıldı. Liyofilize haldeki Proteinaz K, kit içeriğinde bulunan 3.15 ml Proteinaz tamponu ile çözüldü. 20 ml konsantre halde bulunan BQ2 tamponu, 80 ml saf etanol (Appllichem, cat no. A3678) ile

seyreltildi. Kandan DNA izolasyonu üretici firmanın protokolünde önerdiği şekilde gerçekleştirildi (NucleoSpin® Blood L, cat no. 740954.20).

1. İzolasyon işlemine başlarken -20°C’de EDTA’lı tüplerde muhafaza edilen kan örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Homojenizasyonun sağlanması için tüpler hafifçe vortekslendi (IKA, MS3 basic vorteks), 2 ml kan örneği alınarak 15 ml’lik steril falkon tüplere aktarıldı.
3. Proteinlerin ayrışması için her bir örneğe 150 µl Proteinaz K solüsyonundan, deterjan etkisi için ise 2 ml BQ1 tamponundan eklenerek yaklaşık 1 dk vorteks yapıldı.
4. Örnekler 56°C’deki su banyosunda 45 dk bekletildi.
5. İnkübasyonun ardından oda sıcaklığına getirilen örnekler DNA’nın ayrılabilmesi için 2 ml saf etanol (Applichem, A3678) eklenerek 30 sn vortekslendi.
6. Oluşan lizatlar 15 ml’lik toplama tüplerinin içerisine yerleştirilmiş olan kolonlara aktarıldı ve 4500 x g hızda 5 dk santrifüj edildi (Hettich Rotanta 460 R, masaüstü santrifüj). Toplama tüpünde biriken lizatlar uzaklaştırıldı.
7. Kolonların yıkanması için 2 ml BQ2 tamponundan eklendi ve 4500 x g hızda 5 dk santrifüj edildi.
8. İkinci yıkama işlemi için yine 2 ml BQ2 tamponundan eklendi ve ardından kolonların kurutulması için tüpler 4500 x g hızda 10 dk santrifüj edildi. Kolonlar yeni steril toplama tüplerine yerleştirildi.
9. DNA’nın tutulduğu kolonlara 200 µl 70°C’ye getirilmiş elüsyon tamponundan eklenerek 4500 x g hızda 3 dk santrifüj edildi.
10. DNA örnekleri, 1.5 ml’lik steril ependorf tüplere alındı. Stok DNA’lar işlem görecekları zamana kadar -20°C’de muhafaza edildi.

3.6.2.1.1. İzole Edilen DNA’ların Konsantrasyon ve Saflıklarının Belirlenmesi

DNA örneklerinin miktarları ve saflıkları Nanodrop2000 (Thermo Scientific) cihazında tayin edildi. A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakıldı. Her iki oranın da 1.8’den büyük olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda DNA örnekleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek DNA’nın sağlamlığına karar verildi. Yüksek kalitede olan DNA örnekleri tek bir bant halinde gözlemlendi.

3.6.2.2. Tüm Ekzom Dizileme Analizi

Yeterli miktar ve kalitede DNA'ları izole edilen 3 ailede bulunan toplam 11 birey için tüm ekzom dizileme analizi Washington Üniversitesi Genom Bilimleri Departmanı'nda gerçekleştirildi.

3.6.2.2.1. Yeni Nesil Dizileme Adaptörlü Kütüphane Hazırlığı

1 µg 50 µl olacak şekilde hazırlanan örnek DNA Covaris S220 cihazı kullanılarak, ses dalgası teknolojisi ile 300 bp olacak şekilde kırıldı. Kırılan örnekler çalışılacak plaka düzenine aktarıldı. Kırmanın ardından T4 DNA polimeraz ve T4 polinükleotid kinaz “blunt-end” ile DNA uçları tamir edilerek düz bir hale getirildi. Sonrasında uçlarına bir Adenin bazı eklenen fragmentler, Illumina tarafından dizayn edilen adaptörler ile birleştirildi ve yine hazır gelen primerler kullanılarak PCR işlemi yapıldı. Herbir aşamanın sonunda örnekler protokol gereği Magnetic AMPure XP beads (Beckman Coulter) kullanılarak yıkandı. Bu aşamaya kadarki tüm işlemler Illumina platformları için KAPA kütüphane hazırlama kiti (KAPA library preparation kit for Illumina platform) kullanılarak yapıldı. PCR işleminin ardından QUBIT florometre (ThermoFisher Scientific) kullanılarak örneklerin miktarı tayin edildi ve 300 ng'dan yüksek DNA örnekleri ile “capture” (yakalama) aşamasına geçildi.

3.6.2.2.2. Ekzom Yakalama

Herbiri miktarca eşit şekilde hesaplanan örnekler aynı tüpte birleştirildi. Cot-1 DNA ve custom adapter blocking oligos (IDT) eklenerek uçurma işlemi uygulandı. Tamamen kurutulan örnekli karışım Roche/Nimblegen protokolüne uygun olarak biyotin işaretli DNA problemlerine (Nimblegen SeqCap EZ version 2) tutturularak 47°C'de 72 saat boyunca thermal cycler cihazında bekletildi. Sonrasında streptavidin beadleri ile farklı “stringency”lerdeki solüsyonlar yardımı ile yıkanan karışım, yapılan son bir PCR işleminin ardından tekrar AMPure XP beadler ile temizlenip son haline getirildi. En doğru miktar tayini Real-time PCR ile mümkün olduğundan; kullanılan universal adaptörlere uyumlu KAPA Biosystems kantitasyon kiti ve ViiA™ 7 Real-Time PCR Sistemi kullanılarak miktarı belirlendi. Ayrıca eşzamanlı olarak Bioanalyzer çipli elektroforez sistemde fragmanların uzunluğu ve homojenliği görüntülendi. Havuzdaki kütüphanenin uzunluğu ~400 bp ve miktarı ≥5 nM olduğunda dizilemeye alındı. Dizileme için Illumina HiSeq2000 cihazı kullanıldı.

3.6.2.2.3. Biyoinformatik Analiz

HiSeq 2000'den elde edilen tüm ekzom dizileme verileri CASAVA kullanılarak BCL formatından FastQ formatına çevrildi. Dizileme verilerinin ön analizinde adaptör diziler Trimmomatic ile kesildi ve geriye kalan kırılmış dizilerin kalite kontrolü FastQC kullanılarak yapıldı. Okumalar BWA-MEM kullanılarak referans insan genomuna (GRCh38/hg38) hizalandı (151). İlk hizalama işlemi sonucunda, hizalama verisi SAM formatında elde edildi (152). Her bir hizalama dosyası PicardTools'un MergeSAM özelliği kullanılarak birleştirildi. Kopya okumaların silinmesi ve okumaların genomik koordinatlar baz alınarak düzenlenmesi için de sırasıyla Picardtools MarkDuplicates ve SortSam fonksiyonları kullanıldı. Bu aşamadan sonra mutasyonların belirlenmesi amacı ile GATK yöntemi kullandı ve referans insan genomu olarak bu aşamada yine GRCh38/hg38 kullanıldı (153). Elde edilen sonuçlar VCF ("Variant Calling File") formatında saklandı. Ekzom varyantlarının anotasyonu VEP v.83 ("Variant Effect Predictor") kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler GEMINI v.0.19.1 kullanılarak analiz edildi (154) ve şüphelenilen varyantlar dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>); ESP6500 (v2) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>); 1000 Genomes (faz 3) (<http://www.1000genomes.org/>); ExAC (r0.3) ("Exome Aggregation Consortium"; <http://exac.broadinstitute.org/about>) ve UK10K (Şubat 2016) (<https://www.uk10k.org>) veritabanlarında tarandı. Bu veritabanlarındaki maksimum alt popülasyon allel frekansı ("Maximum subpopulation allele frequency"; maxAAF) 0.005'ten büyük olan varyantlar dışlandı. Ayrıca genotip kalitesi (GQ) <20 ve okuma derinliği (DP) <6 olan okumalar hariç tutuldu. Üç ailedeki varyantlar filtrelenerek hastalık aday varyantları otozomal resesif segregasyon modeline göre seçildi. Ebeveynler mutasyonu heterozigot formda taşıırken, hastalar homozigot durumdadır. Özellikle gnomAD ("Genome Aggregation Database"; <http://gnomad.broadinstitute.org>) veritabanında düşük allel frekansı olan nadir varyantlara odaklanıldı. Varyantlar patojenitelerine göre "American College of Medical Genetics Organization" (ACMG) kriterleri doğrultusunda patojenik (pathogenic), muhtemel patojenik (likely pathogenic), etkisi bilinmeyen (uncertain significance), muhtemelen iyi huylu (likely benign) ve iyi huylu (benign) şeklinde sınıflandırıldı. Fenotip ile ilişkili olduğu düşünülen potansiyel olarak zararlı varyantlar ACMG kriterleri kullanılarak önceliklendirildi (155).

Segrege olan varyantların OMIM (<https://www.omim.org>), Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) ve

HGMD (“Human Gene Mutation Database”; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) veritabanlarında rapor edilip edilmediği tespit edildi. Segregasyon filtresinin uygulanmasının ardından, Aile 1’de *MCCC2* (“Methylcrotonoyl-CoA Carboxylase 2”), *WDR36* (“WD Repeat Domain 36”), *OCN* (“Occludin”) genlerindeki üç ekzonik varyant; Aile 2’de *ANKRD28* (“Ankyrin Repeat Domain 28”), *DYNC2H1* (“Dynein Cytoplasmic 2 Heavy Chain 1”), *KIF15* (“Kinesin Family Member 15”), *KRTAP5-10* (“Keratin Associated Protein 5-10”), *PXK* (“PX Domain-containing Protein Kinase-like Protein”) ve *OCN* (“Occludin”) genlerindeki altı ekzonik varyant; Aile-3’te *TNS1* (“Tensin 1”) ve *ELP6* (“Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 6”) genlerindeki iki ekzonik varyant patojenik varyantlar olarak daha ayrıntılı bir şekilde araştırıldı. Hastaların klinik özellikleri, gen fonksiyonları, protein ekspresyonları ve *in silico* tahmin araçlarından elde edilen bulgular birlikte değerlendirilerek Aile-1 ve Aile-2 için *OCN* geni (OMIM 602876), Aile-3 için ise *ELP6* geni (OMIM 615020) nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkili olabilecek aday genler olarak önceliklendirildi.

3.6.2.3. Önceliklendirilen Genlerdeki Mutasyonların In Silico Analizleri ve Doğrulanması

Genlerin dizilerine ulaşmak için Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) ve Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>), genlerin kodladığı proteinlerin dizilerine ve domain bilgilerine ulaşmak için ise Uniprot (<https://www.uniprot.org>) veritabanları kullanıldı. Proteinlerin ekspresyonlarıyla ilgili bilgi edinmek amacıyla Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>), proteinlerin diğer proteinlerle etkileşimlerini görmek amacıyla STRING (“Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins”; <https://string-db.org/cgi/input.pl>) veritabanlarından yararlanıldı. Genlerin daha önce bir hastalıkla ilişkilendirilip ilişkilendirilmediğini tespit etmek amacıyla OMIM veritabanında tarama yapıldı.

3.6.2.3.1. In Silico Analizler

ELP6 ve *OCN* genlerinde tespit edilen missense mutasyonların olası patojenik etkilerini saptamak amacıyla Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (“Sorting Intolerant From Tolerant”; <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), PROVEAN (“Protein Variation Effect Analyzer”; <http://provean.jcvi.org/index.php>) ve SNAP (“Screening for Non-

Acceptable Polymorphisms”; <http://www.rostlab.org/services/SNAP>) veritabanları; protein stabilitesi üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla ise I-Mutant (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) veritabanı kullanıldı. *OCN* geninde saptanan frameshift mutasyonun protein üzerindeki etkisini tahmin etmek amacıyla ise Mutation Taster ve NMDescPredictor (<https://nmdprediction.shinyapps.io/nmdescpredictor/>) veritabanlarından yararlanıldı.

S. cerevisiae model organizmasında ELP6 proteininin ikincil yapısını 3D koordinatlarından türetmek için DSSP (“Dictionary of Secondary Structure of Proteins”) kullanıldı. Elongatör kompleksi ELP456 alt biriminin yine *S. cerevisiae* model organizmasıyla oluşturulan üç boyutlu yapısı RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) veritabanından elde edildi.

ELP6 genindeki missense mutasyonun meydana geldiği pozisyonu içeren DNA bağlanma bölgesinin varlığı DNABind (<https://dnabind.szilab.org>), DP-Bind (<http://lcg.rit.albany.edu/dp-bind/>) ve DRNAPred (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/DRNAPred/>) veritabanları kullanılarak; post-translasyonel modifikasyonların varlığı ise ModPred (<http://montana.informatics.indiana.edu/ModPred/index.html>) veritabanı kullanılarak *in silico* araçlarla tahmin edilmeye çalışıldı.

3.6.2.3.2. Mutasyonların Sanger Dizileme İle Doğrulanması

Ekzom dizileme analizi ile *ELP6* ve *OCN* genlerinde saptanan mutasyonların Sanger dizileme ile doğrulanması amacıyla, mutasyonun olduğu bölgeler sınırlandırılarak “Oligo” programı ile üç primer çifti dizayn edildi (Tablo 4). Primerlerin hedef bölgelere spesifitesi UCSC Blat (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) programı ile incelendi. Primerlerin GC içeriği ve Tm sıcaklığı gibi özellikleri ile “hairpin”, “self-dimer”, “hetero-dimer” yapıları oluşturma durumları OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) programı kullanılarak kontrol edildi.

Liyofilize halde gelen primerlere konsantrasyonu 100 pmol/μl olacak şekilde steril distile su eklendi. Bu ana stoklar 1:10 oranında seyreltilerek 10 pmol/μl konsantrasyonlu çalışma stokları hazırlandı. Primerler -20°C’de muhafaza edildi.

Tablo 4. PCR işlemi için kullanılan primer dizilerinin listesi

Gen Adı	Primer Adı (F:Forward Primer R:Reverse Primer)	Primer Dizisi (5'-3')	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
OCN (frameshift mutasyon)	OCN1-F	CATTTTCAGCAAACCGAATCA	293
	OCN1-R	CCAAAGCCACTTCCTCCATA	
OCN (missense mutasyon)	OCN2-F	ATGCTCTCTCAGCCAGCCTA	301
	OCN2-R	TTGCTGCTCTTGGGTCTGTA	
ELP6	ELP6-F	AGCAATGGCAGGTAAGGG	637
	ELP6-R	TCTCTTAAGGGCGCTAGGAG	

3.6.2.3.2.1. PCR Reaksiyonlarının Kurulması

Üç primer çifti için thermal cycler cihazının gradient özelliği sayesinde aynı anda sekiz farklı annealing sıcaklığının denendiği reaksiyonlar kurularak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyonları tamamlanan her bir primer çifti için hazırlanan PCR reaksiyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 5-7’de, sıcaklık ve süre bilgilerini içeren PCR profilleri ise Tablo 8-10’da yer almaktadır.

Tablo 5. *OCN* geninde saptanan frameshift mutasyonun doğrulanması için OCN1-F ve OCN1-R primerleri ile kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	1X (µl)
dH ₂ O	18.1
Taq Polimeraz Tampon	3
dNTP (10 mM)	1
MgCl ₂	3
Primer-Forward (10 µM)	1
Primer-Reverse (10 µM)	1
Fermentas Taq Polimeraz	0.4
DNA (25ng/µl)	2.5
Toplam	30

Tablo 6. *OCLN* geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması için OCLN2-F ve OCLN2-R primerleri ile kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	1X (µl)
dH ₂ O	18.3
Taq Polimeraz Tampon	3
dNTP (10 mM)	1
MgCl ₂	3
Primer-Forward (10 µM)	1
Primer-Reverse (10 µM)	1
Fermentas Taq Polimeraz	0.4
DNA (25ng/µl)	2.3
Toplam	30

Tablo 7. *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması için ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	1X (µl)
dH ₂ O	17.4
Taq Polimeraz Tampon	3
dNTP (10 mM)	2
MgCl ₂	3
Primer-Forward (10 µM)	1
Primer-Reverse (10 µM)	1
Fermentas Taq Polimeraz	0.4
DNA (25ng/µl)	2.2
Toplam	30

Tablo 8. OCLN1-F ve OCLN1-R primerleri ile kurulan PCR profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	30
Primer bağlanması	58	20 sn	
Zincir uzaması	72	30 sn	
Son döngüde zincir uzaması	72	7 dk	1

Tablo 9. OCLN2-F ve OCLN2-R primerleri ile kurulan PCR profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	32
Primer bağlanması	59	28 sn	
Zincir uzaması	72	30 sn	
Son döngüde zincir uzaması	72	7 dk	1

Tablo 10. ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile kurulan PCR profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Primer bağlanması	50	28 sn	
Zincir uzaması	72	30 sn	
Son döngüde zincir uzaması	72	7 dk	1

3.6.2.3.2.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

54 gr Tris Baz (Sigma, T6066) ve 27.5 gr Borik Asit (Sigma, B6768) ve 20 ml 0.5M EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (pH:8) solüsyonunun karıştırılıp steril distile su ile toplam hacmin 1 lt'ye tamamlanmasıyla 5X TBE (Tris-Borat-EDTA) stok tamponu hazırlandı. Bu tampon, agaroz jel hazırlamada ve elektroforez yürütme tankının doldurulmasında kullanılmak amacıyla distile su ile 0.5X TBE şeklinde seyreltilti.

Hastaların ve ailelerinin DNA'larıyla kurulan PCR işleminde reaksiyon ürünlerinin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. PCR örneklerinden 5 µl ve yükleme tamponundan 1 µl karıştırılarak jel kuyucuklarına yükleme yapıldı. PCR ürünlerinin uzunluklarının belirlenmesi amacıyla 50 bp (New England BioLabs, N3236S) ve 100 bp (New England BioLabs, N3231S) DNA markırları kullanıldı. Jel tank sistemi güç kaynağına (Biorad PowerPac Basic) bağlandı ve örnekler, 90-100 V arası sabit gerilimde 20-30 dk boyunca yürütüldü. Yürütülen PCR örnekleri jel görüntüleme cihazında (Vilber E-box CX5) görüntüldü.

3.6.2.3.2.3. PCR Ürünlerinin Dizilenmesi

Üç farklı primer çifti ile kurulan reaksiyonlarda PCR örneklerinin agaroz jelde yürütülmesiyle spesifik tek bant gözlemlendi. Elde edilen PCR örnekleri dizileme işlemi için “Macrogen” firması Amsterdam şubesine gönderildi. Dizilemesi yapılan örneklerle ait bilgiler FASTA formatıyla ve kromatogram şeklinde tarafımıza iletildi. Diziler NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) veritabanı kullanılarak referans genom ile karşılaştırıldı. Kromatogram görüntülerinin analizi için ise “ChromasPro Version 1.34” programı kullanıldı. Tüm hastalarda ekzom dizileme sonucu önceliklendirilen genlerdeki mutasyonlar doğrulandı.

3.6.2.3.3. ELP6 ve OCLN Genlerinde Saptanan Missense Mutasyonlar İçin Türler Arası Korunmuşluk Analizi

ELP6 ve OCLN genlerinde saptanan missense mutasyonlar için amino asit düzeyinde korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırma yapıldı. Uniprot veritabanı kullanılarak insan dâhil toplam 12 farklı türün protein dizilerine ulaşıldı ve “Jalview” programında ClustalX seçeneği kullanılarak amino asitlere özel renkler verildi.

3.6.3. Fonksiyonel Analizler

Günümüze kadar nörogelişimsel bozukluğu olan hastalarda OCLN geninde pek çok mutasyon tanımlanmış ve genotip-fenotip ilişkisi kurulabilmiştir. Bu nedenle OCLN geninde saptadığımız iki farklı mutasyon için *in silico* analiz araçları kullanılarak protein üzerindeki etkileri tahmin edilmeye çalışıldı. Elongatör kompleksi ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bu kompleksin bir subuniti olan ELP6 geni ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle Aile-3'te missense mutasyon saptanan ELP6 geninde ileri fonksiyonel analizler yapılmasına karar verildi. Bu amaçla Aile-3'te yer alan Hasta-4, Hasta-5 ve Anne ile bu missense mutasyonu taşımayan Kontrol birey olmak üzere toplam dört bireyden punch deri biyopsi örnekleri alınarak primer hücre kültürleri oluşturuldu.

3.6.3.1. Deriden Punch Biyopsi Alınması

Punch deri biyopsi örneklerini almak üzere Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireyleri S.B.Ü. Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne çağrıldı ve bilgilendirme sonrası onam formları imzalatıldı. Alanında uzman bir cerrah tarafından bireylerin kasık bölgelerinden steril koşullar altında deri biyopsi örnekleri alındı. Bu amaçla bireylere öncelikle lokal anestezi yapıldı, 2 dk içinde anestezinin etki ettiği görüldü. Biyopsi alınacak deri bölgesi antiseptik solüsyon ile temizlendi. Hasta-4 ve Hasta-5 bireyleri için 3 mm'lik, Anne ve Kontrol bireyleri için ise 4 mm'lik punch aletleri kullanıldı. Punch aleti, dik bir şekilde deri üzerine konuldu ve vertikal basınç uygulanarak döndürüldü. Yeterli derinlikte yani tam kat deri biyopsisi alındığından emin olduktan sonra zemin bistüri kullanılarak kesildi. Elde edilen punch deri biyopsileri hızlı bir şekilde taşıma ortamına aktarıldı. Taşıma ortamı olarak 25 ml RPMI 1640, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin, %1 non-esansiyel amino asit solüsyonu kullanıldı. Bireylerde oluşan yaralar sekonder iyileşmeye bırakıldı, hemostazın sağlanmasının ardından antibiyotikli pomad sürülüp gazlı bez ile kapatıldı ve bantlandı. Defekt kapanıncaya kadar pansumanlara devam edildi.

3.6.3.1.1. Primer Kültür Oluşturulması

Uygun taşıma ortamlarına alınan punch deri biyopsi örnekleri vakit kaybetmeden Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümü laboratuvarına getirilerek primer hücre kültürleri oluşturuldu. Primer kültür oluşturma protokolü şu şekildedir:

1. Laboratuvara getirilen punch deri biyopsi örnekleri 100 x 20 mm petri (Sarstedt, 83.3902) içinde steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılıp petri yüzeyine yapıştırıldı. Bu şekilde her birey için üçer petri hazırlandı.
2. Petrilere yapıştırılan her parçanın üzerine FBS-Amfoterisin B karışımından damlatıldı (20 ml FBS + 100 µL Amfoterisin B). 4-5 saat kadar 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Beklemenin ardından hazırlanan karışımdan doku parçalarının üzerine 500 µl daha ilave edilerek inkübasyona bırakıldı.
3. Ertesi gün %86 RPMI 1640, %10 FBS, %1 non-esansiyel amino asit solüsyonu, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren 7 ml komple ortam petrinin

kenarından ilave edildi. Bu şekilde 4-5 gün boyunca petriler hiç çıkarılmadan 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi.

4. Sonrasında 2-3 günde bir petrilerin ortamı çekildi ve 7 ml taze ortam ilavesi yapıldı.
5. Mikroskop altında kontaminasyon kontrolü ve hücrelerin gözlemlenmesi yapıldı.

3.6.3.1.2. Primer Kültür Hücrelerinin Pasajlanması

Konfluent olan petrilerdeki hücreler, dokulara zarar verilmeden kaldırıldı ve pasajlama işlemi yapıldı. Primer kültür hücrelerinin pasajlanma protokolü şu şekildedir:

1. 100 x 20 mm petri içindeki 7 ml ortamın tamamı uzaklaştırıldı.
2. 1 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
3. Doku örneklerinin üzerine gelmemesine dikkat edilerek 1 ml Tripsin-EDTA eklendi.
4. 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde birkaç dk bekletildi. Hücrelerin kalktığı gözlemlendikten sonra 15ml’lik falkonlara alındı.
5. Petriye 2 ml ortam eklendi ve petride kalan hücreler de toplanarak 15 ml’lik falkona alındı. Böylece tripsin aktivasyonu inhibe edildi.
6. Petriye 7 ml taze ortam eklendi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.
7. 15 ml’lik falkon 300 x g hızda 7 dk santrifüj edildi.
8. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine her biri için 5 ml ortam ilave edilerek T25 flasklara ekim yapıldı ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.6.3.1.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü

Primer kültür hücreleri ve pasajlanmış hücreler ile analizlere başlamadan önce hücrelerin sayımları ve canlılık kontrolleri yapıldı. Hücre sayımı ve canlılık kontrolü protokolü şu şekildedir:

1. 100 mm x 20 mm petri içindeki 7 ml ortamın tamamı uzaklaştırıldı.
2. 1 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı.

3. Doku örneklerinin üzerine gelmemesine dikkat edilerek 1 ml Tripsin-EDTA eklendi.
4. 37°C'de, %5 CO₂'lik inkübatörde birkaç dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra 15 ml'lik falkonlara alındı.
5. Petriye 2 ml ortam eklendi ve petride kalan hücreler de toplanarak 15 ml'lik falkona alındı.
6. Hücre süspansiyonundan 50 µl bir eppendorf tüpe alınarak üzerine 50 µl %0.4 tripan mavisi eklendi. Böylece 1:1 oranında hücre süspansiyonu-boya karışımı oluşturuldu.
7. Hemositometrenin kenar kısımlarına su damlatıldı ve üstü lamel ile kapatıldı. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak pipet yardımıyla lam ve lamel arasında kalan boşluktan verildi.
8. 10X büyütme objektif kullanılarak inverted mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirildi.
9. Mavi boyayı içine almayan ve renksiz gözlenen hücreler canlı hücre, mavi boyayı içine alan ve mavi renk gözlenen hücreler ise ölü hücre olarak değerlendirildi.
10. Hemositometre üzerindeki beş alandaki hücreler sayıldı ve toplam hücre sayısı hesaplandı. 1 ml hücre süspansiyonundaki hücre sayısı ve % hücre canlılığı aşağıdaki formüller ile hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı (Hücre sayısı/ml): } \frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{\text{Sayılan kare sayısı}} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

$$\% \text{ Hücre canlılığı: } \frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Toplam ölü ve canlı hücre sayısı}} \times 100$$

3.6.3.1.4. Primer Kültür Hücrelerinin Dondurulması

Primer kültür hücreleri daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere dondurularak saklandı. Primer kültür hücrelerinin dondurulması protokolü şu şekildedir:

1. 100 mm x 20 mm petri içindeki 7 ml ortamın tamamı uzaklaştırıldı.

2. 1 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
3. Doku örneklerinin üzerine gelmemesine dikkat edilerek 1 ml Tripsin-EDTA eklendi.
4. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde birkaç dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra 15 ml'lik falkonlara alındı.
5. Petriye 2 ml ortam eklendi ve petride kalan hücreler de toplanarak 15 ml'lik falkona alındı. Böylece tripsin aktivasyonu inhibe edildi.
6. Hücre sayımı gerçekleştirildi ve her bir cryotüp içinde 1×10^6 hücre olması için gerekli miktardaki hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkonlara alındı.
7. 15 ml'lik falkonlar 300 x g hızda 7 dk santrifüj edildi.
8. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine %10 DMSO + %30 FBS + %60 RPMI1640 (%86 RPMI 1640, %10 FBS, %1 non-esansiyel amino asit solüsyonu, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren komple ortam) içeren 1 ml dondurma ortamı eklenerek dikkatle pipetaj yapıldı.
9. Hücre ve dondurma ortamı karışımı cryotüplere alındı ve -80°C'de izopropanol içeren kaplarda muhafaza edildi.

3.6.3.2. Primer Kültür Hücrelerinden DNA İzolasyonu

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol olmak üzere dört bireyden alınan punch deri biyopsileri ile oluşturulan primer kültür hücrelerinde *ELP6* genindeki mutasyonun varlığını tespit etmek amacıyla DNA izolasyonu yapıldı.

İzolasyon işlemine başlamadan önce kit içeriği ile ilgili ön hazırlıklar yapıldı. Konsantre haldeki Wash Buffer 1 için 15 ml ve Wash Buffer 2 için 17.5 ml etanol (%96–100, Merck) eklendi.

Primer kültür hücrelerinden DNA izolasyonu üretici firmanın protokolünde önerdiği şekilde gerçekleştirildi (PureLink Genomic DNA Mini Kit, cat no. K1820-01).

1. Primer kültür hücreleri petri yüzeyinden kaldırılarak süspanse hale getirildi, sayımın ardından 2×10^6 hücre ile DNA izolasyonu işlemine başlandı.
2. Petrilerden toplanan hücreler 15ml'lik falkonda 300 x g hızda 7 dk santrifüj edildi.

3. PBS ile iki kez yıkama işlemi yapıldı.
4. Hücre pelleti üzerine 200 µl PBS eklenerek resuspanse edildi.
5. Karışıma 20 µl Proteinaz K eklendi.
6. Karışıma 20 µl RNazA (Ribonükleaz A) eklendi, vorteks ile iyice karıştırıldı ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Karışıma 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen bir solüsyon elde edene kadar vortekslendi.
8. Protein parçalanması için 55°C'deki su banyosunda 10 dk inkübe edildi.
9. Lizata 200 µl etanol (%96–100, Merck) eklendi ve homojenizasyon için 5 sn vortekslendi.
10. Lizatın tamamı (~640 µl), toplama tüpü içine yerleştirilmiş PureLink Spin kolona aktarıldı.
11. Oda sıcaklığında 10.000 x g hızda 1 dk santrifüj edildi. Ardından kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
12. 500 µl Wash Buffer 1 eklendi ve oda sıcaklığında 10.000 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
13. 500 µl Wash Buffer 2 eklendi ve oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi.
14. PureLink Spin kolonu 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 50 µl Genomic Elution Buffer doğrudan kolon membranına pipetlendi.
15. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.
16. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.6.3.2.1. Sanger Dizileme İle ELP6 Genindeki Missense Mutasyonun Doğrulanması

Primer kültür hücrelerinden elde edilen DNA'lar 25 ng/µl konsantrasyona seyreltildi. *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması için kandan elde edilen DNA'larla kurulan PCR protokolü birebir uygulandı. ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile

kurulan PCR işleminde Tablo 7’de yer alan bileşenler ve miktarları kullanıldı ve Tablo 10’da yer alan PCR profili uygulandı.

3.6.3.3. RNA Dizileme Analizi

Elongatör kompleksi transkripsiyon sürecinde önemli rol oynadığından, Aile-3’te *ELP6* geninde tanımlanan missense mutasyonun bu sürece etkilerini saptayabilmek amacıyla RNA dizileme analizi yapılmasına karar verildi.

3.6.3.3.1. Primer Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerinden alınan punch deri biyopsilerinden elde edilen primer kültür hücrelerinden RNA dizileme yapmak amacıyla total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

İzolasyon işlemine başlamadan önce kit içeriği ile ilgili ön hazırlıklar yapıldı. Konsantre haldeki Buffer RPE’nin üzerine 4 hacim etanol (%96–100, Merck) eklendi. DNaz I (Deoksiribonükleaz I) stok solüsyonu hazırlandı. Her 1 ml Buffer RLT için 10 µl β-merkaptoetanol eklendi.

Primer kültür hücrelerinden RNA izolasyonu üretici firmanın protokolünde önerdiği şekilde gerçekleştirildi (Qiagen RNeasy® Mini Kit, cat no. 74104).

1. Primer kültür hücreleri petri yüzeyinden kaldırılarak süspanse hale getirildi, sayım işleminin ardından 3×10^6 hücre ile RNA izolasyonu işlemine başlandı.
2. Petrilere toplanan hücreler 15ml’lik falkonda 300 x g hızda 7 dk santrifüj edildi.
3. Buzda soğutulmuş PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
4. Hücre pelletinin üzerine 350 µl Buffer RLT eklendi ve 1 dk vorteks yapılarak homojenizasyon sağlandı.
5. 350 µl %70’lik etanol eklendi ve iyice karışması sağlandı.
6. 700 µl karışım RNeasy spin kolona aktarıldı ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
7. 350 µl Buffer RW1 eklendi ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.

8. 10 µl DNaz I ve 70 µl DNA parçalama tamponu (RDD) karıştırıldı. 80 µl DNaz I inkübasyon karışımı doğrudan RNeasy spin kolonun membranına pipetlendi ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15 dk bekletildi.
9. 350 µl Buffer RW1 eklendi ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
10. 500 µl Buffer RPE eklendi ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
11. 500 µl Buffer RPE eklendi ve 10.000 x g hızda 2 dk santrifüj edildi.
12. Akış kısmını içeren işleme tüpü atıldı ve kolon yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirildi. Maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.
13. Kolon yeni bir 1.5 ml'lik ependorfa yerleştirildi ve membranın tamamını ıslatacak şekilde 30 µl RNaz içermeyen su ilave edildi.
14. 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10.000 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
15. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edildi.

3.6.3.3.1.1. RNA Miktar ve Saflık Tayini

İzole edilen total RNA örneklerinin miktar ve saflığını belirlemek amacıyla 2 µl örnek yüklemesiyle mikropilaya okuyucuda ölçüm yapıldı. RNA'nın saflığını değerlendirirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakıldı.

3.6.3.3.1.2. Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

Total RNA örnekleri %1'lik agaroz jel hazırlanarak yürütüldü. 1 µl RNA örneği, 2 µL steril su ve 2 µl yürütme boyası karıştırılarak jel kuyucuklarına yükleme yapıldı. 1 kb DNA markırı (Thermo Scientific, SM1331) da kontrol amacıyla yüklendi. RNA örnekleri 80 V sabit gerilimde 30 dk boyunca yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.6.3.3.2. RNA Dizileme İşlemi

RNA dizileme işlemi TÜBİTAK MAM'da gerçekleştirildi. Total RNA örneklerinden 3 µg RNA hazırlandı. İzole edilen total RNA'lar kalite ölçümlerini geçtikten sonra, Illumina TruSeq Stranded Total RNA örnek hazırlama kitleri kullanılarak NovaSeq 6000 platformunda

(Illumina) dizileme işlemi yapıldı. Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol olmak üzere dört örneğin her biri için 3 tekrarlı okuma yapıldı.

RNA dizileme işlemine hazırlık aşamasında total RNA'dan rRNA'lar uzaklaştırıldı, mRNA'lar saflaştırıldı, parçalandı, cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA dizileme analizinin detaylı protokolü şu şekildedir:

rRNA'nın bağlanması ve uzaklaştırılması

1. Total RNA, rRNA bağlama plakasının her kuyucuğunda son hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile dilüe edildi.
2. Her kuyucuğa 5 µl rRNA bağlama tamponu ve ardından 5 µl uzaklaştırma karışımı eklendi.
3. Örnekler RNA denatürasyonu için thermal cycler cihazına yerleştirildi ve 68°C'de 5 dk bekletildi.
4. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Örnekler, 35 µl rRNA uzaklaştırma boncukları (RRB) içeren rRNA uzaklaştırma plakasına alındı ve iyice karıştırıldı.
6. 1 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, 1 dk boyunca manyetik bir stand üzerinde tutuldu.
7. RNA temizleme plakasına aktarım sonrası, 1 dk boyunca manyetik bir stand üzerinde tutuldu.

RNA'nın temizlenmesi

1. Her kuyucuğa 99 µl RNAClean XP boncukları eklendi ve karıştırıldı.
2. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Manyetik bir stand üzerinde tutuldu ve yaklaşık 5 dk bekletildi.
4. Her bir kuyucuktaki süpernatant uzaklaştırıldı.
5. 200 µl %70'lik etanol ile yıkama işlemi yapıldı, 30 sn manyetik stand üzerinde inkübe edildi. Her kuyucuktaki süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı.

6. Manyetik stand üzerinde 15 dk hava ile kurumaya bırakıldı.
7. 11 µl elüsyon buffer eklendi ve karıştırıldı.
8. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi ve sonrasında 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
9. Manyetik bir stand üzerinde tutuldu ve yaklaşık 5 dk bekletildi.
10. 8.5 µl süpernatant DFP plakalara (depleted RNA fragmentation plate) yerleştirildi.
11. 8.5 µl EPH (Elute, Primer, Fragment High Mix) karışımı eklendi ve karıştırıldı.
12. Örnekler thermal cycler cihazında 94°C’de 8 dk inkübe edildi.

First strand cDNA sentezi

1. 1 µl SuperScript II reverse transkriptaz enzimi ile 9 µl First Strand Synthesis Act D karışımı karıştırıldı.
2. Bu karışımdan 8 µl alındı ve parçalanmış RNA örneklerini içeren DFP plakaya kondu ve iyice karıştırıldı.
3. Örnekler thermal cycler cihazına yerleştirildi ve first strand cDNA sentezi için Tablo 11’deki program kullanıldı.

Tablo 11. SuperScript II reverse transkriptaz enzimi ile first strand cDNA sentezi sıcaklık profili

Sıcaklık (°C)	Süre
25	10 dk
42	15 dk
70	15 dk

Second strand cDNA iplikçığının sentezlenmesi

1. CTE (end pair control), resuspanسیون buffer ile 1:50 oranında seyreltildi. Her kuyucuğa 5 µl dilüe edilmiş CTE kondu.

2. Her kuyucuğa 5 µl resuspansiyon buffer (RSB) eklendi.
3. Her kuyucuğa 20 µl SMM (Second Strand Marking Master Mix) eklendi ve karıştırıldı.
4. 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
5. 16°C'ye ayarlanan thermal cycler cihazında 1 saat inkübe edildi. Oda sıcaklığına gelene kadar beklendi.
6. cDNA clean up plakaya 90 µl AMPure XP boncukları eklendi.
7. DFP plakadaki örneklerin tamamı cDNA clean up plakaya alındı ve karıştırıldı.
8. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
10. Manyetik bir stand üzerinde tutuldu ve yaklaşık 5 dk bekletildi.
11. Her bir kuyucuktan 135 µl süpernatant uzaklaştırıldı.
12. 200 µl %80 etanol ile yıkama işlemi yapıldı, 30 sn manyetik bir stand üzerinde inkübe edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
13. Manyetik stand üzerinde 15 dk hava ile kurumaya bırakıldı.
14. Her kuyucuğa 17.5 µl resuspansiyon buffer eklendi ve iyice karıştırıldı.
15. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
16. 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
17. Manyetik bir stand üzerinde tutuldu ve yaklaşık 5 dk bekletildi.
18. 15 µl süpernatant adapter ligation plakalarına yerleştirildi.

3' adenilat grubun eklenmesi

1. CTA (A-Tailing Control), 1:100 oranında resuspansiyon buffer ile dilüe edildi. Her kuyucuğa 2.5 µl dilüe CTA ilave edildi.
2. Her kuyucuğa 12.5 µl A-Tailing mix (ATL) eklendi ve karıştırıldı.
3. 280 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
4. 37°C'de 30 sn, 70°C'de 5 dk inkübe edildi.

Adaptörlerin bağlanması

1. 1 µl CTL (Ligation Control) ile 99 µl resuspansiyon buffer karıştırıldı.

2. 2.5 µl dilüe CTL, 2.5 µl ligasyon karşımı ve 2.5 µl RNA adaptör eklendi ve karıştırıldı.
3. 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
4. 30°C’de 10 dk inkübe edildi.
5. 5 µl STL (Stop Ligation Buffer) eklendi.

Bağlanan fragmentlerin temizlenmesi

AMPure ile protokolde belirtildiği üzere adaptör eklenmiş cDNA örneği saflaştırıldı.

1. Her kuyucuğa 42 µl AMPure XP beads eklendi ve karıştırıldı.
2. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
3. 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
4. Manyetik bir stand üzerinde tutuldu ve 2-5 dk bekletildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
5. 200 µl %80 etanol ile yıkama işlemi yapıldı, 30 sn manyetik bir stand üzerinde inkübe edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
6. Manyetik stand üzerinde 15 dk hava ile kurumaya bırakıldı.
7. Her kuyucuğa 52.5 µl resuspansiyon buffer eklendi ve iyice karıştırıldı.
8. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
9. 280 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
10. Manyetik bir stand üzerinde tutuldu ve 2-5 dk bekletildi.
11. 50 µl süpernatant CAP (Clean Up ALP Plate) plakalara alındı.
12. İşlemler 50 µl AMPure XP beads eklenerek tekrarlandı. Tek modifikasyon 22.5 µl resuspansiyon buffer eklenmesiydi.
13. Son aşamada 20 µl süpernatant PCR plakalarına alındı.

DNA parçalarının PCR ile çoğaltılması

1. PCR plaka buz üzerine yerleştirildi ve her kuyucuğa 5 µl PPC (PCR Primer Cocktail) kondu.
2. Her kuyucuğa 25 µl PCR Master Mix ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
3. Örnekler thermal cycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 12’deki program çalıştırıldı.

Tablo 12. Kütüphane miktarının çoğaltılmasında kullanılan sıcaklık profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	98	30 sn	1
Denatürasyon	98	10 sn	55
Primer bağlanması	60	30 sn	
Zincir uzaması	72	30 sn	
Son döngüde zincir uzaması	72	5 dk	1

4. Amplifiye edilen ürün için AMPure XP beads kullanılarak yukarıda belirtildiği gibi temizleme işlemi yapıldı.

Kütüphanenin doğrulanması ve miktar ölçümleri

Kütüphanenin uzunluk ve saflıkları Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında Agilent High Sensitivity DNA Kit ve çipleri kullanılarak tespit edildi. Elde edilen kütüphaneler 1:10 oranında dilüe edilerek 1 µl miktarda çipe yüklendi.

Hazırlanan kütüphanelerin miktar ölçümleri için Illumina ile uyumlu olan SYBR Green I kimyasına dayanan Kapa qPCR kiti kullanıldı. Elde edilen PCR ile zenginleştirilmiş olan her bir kütüphane için 1/32.000 ve 1/64.000 oranında hazırlanan ve kit içerisinde bulunan standartlar için üç tekrarlı şekilde qPCR ile ölçümler gerçekleştirildi. Kapa qPCR reaksiyon bileşenleri ve kullanılan PCR programı Tablo 13-14'te yer almaktadır.

Tablo 13. Kapa qPCR kiti ile kurulan PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	1X (µl)	Son konsantrasyon
Ultra saf su (PCR grade)	20	-
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	10	1X
Forward Primer (10 µM)	0.4	200 nM
Reverse Primer (10 µM)	0.4	200 nM
Kalıp DNA		< 20 ng

Tablo 14. Kütüphane miktar ölçümünde kullanılan qPCR programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Enzim aktivitesi	95	3 dK	-
Denatürasyon	95	1-3 sn	40
Hibridizasyon/ Polimerizasyon/Veri toplama	60	≥20 sn	40

Viaa7 (Applied Biosystem) cihazı kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Miktarlar, kullanılan standartlarla gerçekleştirilen standart eğriye bağlı olarak analiz edildi.

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol olmak üzere toplam dört birey için üç tekrarlı olacak şekilde hazırlanan örnekler NovaSeq 6000 cihazına yüklendi.

3.6.3.3.3. Biyoinformatik Analiz

3.6.3.3.3.1. Kalite Kontrol

Illumina NovaSeq 6000 cihazından alınan .bcl formatındaki ham dizi verileri öncelikle bcl2fastq (ver. 2.20) programı kullanılarak FastQ formatına dönüştürüldü. Sonrasında, FastQ verileri Trim Galore (ver. 0.6) programı yardımıyla, adaptör dizilerin ve düşük kalitedeki bazların kırılması suretiyle kalite kontrol filtrelemesine tabi tutuldu (156).

Sonuç olarak her bir FastQ dosyası için elde edilen toplam okumalar ve G+C yüzdesi parametreleri kalite kontrol analizinde listelendi. Ayrıca her bir dizileme çalışmasındaki okuma başına kalite değerlerini gösteren grafikler ayrı ayrı ve bütünleşik olarak sırasıyla FastQC (ver. 0.11.7) (157) ve MultiQC (ver. 1.5) (158) programları kullanılarak oluşturuldu.

3.6.3.3.3.2. Karşılaştırmalı Ekspresyon Analizi

Kalite kontrole tabi tutulan FastQ formatındaki diziler STAR programı ile, yine STAR programının indeksleme algoritmasıyla oluşturulmuş insan genom indeksine (hg38-release98) hizalanarak, örneklerde bulunan genlerin yoğunluk değerleri sayı (count) cinsinden belirlendi (159). Örneklerle ait yoğunluk verileri Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis; PCA) yöntemi ile çok değişkenli uzayda incelenerek örneklerin lineer benzerlikleri

gözlemlendi. Örneklerin, yoğunluklarının benzerliklerine göre veri dağılımının ilk iki ve ilk üç temel bileşene izdüşümlerini yansıtacak şekilde, PCA grafikleri oluşturuldu. Sonrasında Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol örneklerindeki gen yoğunlukları DESeq2 (ver. 1.26) R kütüphanesi ile karşılaştırmalı ekspresyon analizine tabi tutuldu (160). Karşılaştırmalı ekspresyon analizinde hasta örneklerinde kontrole göre anlamlı artış ve azalma gösteren genler listelendi ve tüm genlerin anlamlılık durumları volkan grafiği ile gösterildi. Karşılaştırmalı ekspresyon analizi sonucunda hasta örneklerinde anlamlı artış ve azalma gösteren genler için “Gene Set Enrichment” Analizi (GSEA) Gseapy (ver. 0.9.16) Python kütüphanesi kullanılarak ve Gene Ontology (GO) (biyolojik süreç, moleküler fonksiyon, hücresel bileşen) ile Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veritabanları baz alınarak gerçekleştirildi (161-163). Tüm gen yoğunlukları, örneklerde en yüksek farklılık gösteren 50 gene ait transkript yoğunlukları ile Elongatör kompleksinin etkileşimde olduğu genlere ait transkript yoğunlukları ısı haritası grafikleri ile gösterildi. Sonuç olarak elde edilen grafik ve tablolar Pandas (ver. 0.25.3), Scipy (ver. 1.4.1), Numpy (ver. 1.17.3) ve Matplotlib (ver. 3.1.3) kütüphaneleri ve Python3 (ver. 3.7) programlama dili kullanılarak oluşturuldu.

3.6.3.3.4. RNA Dizileme Analizi Sonuçlarının qPCR İle Doğrulanması

RNA dizileme analizi sonucunda biyoinformatik veriler ışığında önceliklendirilen genlerin ekspresyon seviyelerinin doğrulanması amacıyla qPCR (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) işlemi gerçekleştirildi.

3.6.3.3.4.1. RNA'dan cDNA Eldesi

qPCR analizi için öncelikle RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Thermo Fisher) kullanılarak Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerine ait total RNA örneklerinden cDNA elde edildi. Bu amaçla ilk aşamada kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 15'te yer almaktadır.

Tablo 15. RNA'dan cDNA eldesinde kullanılan malzemeler ve miktarları

Bileşenler	1X (µl)
Kalıp RNA	1 µg
Primer-(oligo dT) ₁₈	1
Primer-random hekzamer	1
Nükleaz içermeyen su	12 µl'ye tamamlanana kadar
Toplam	12

Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dk inkübe edildi. Ardından buz üzerine alındı. İkinci aşamada Tablo 16'da verilen karışım hazırlanarak örneklerin üzerine ilave edildi.

Tablo 16. RNA'dan cDNA eldesinde kullanılan malzemeler ve miktarları (devam)

Bileşenler	1X (µl)
5X reaksiyon tamponu	4
RiboLock RNaz inhibitörü	1
dNTP (10 mM)	2
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1
Toplam	8

Hazırlanan örnekler Tablo 17'de verilen sıcaklık profilinde thermal cycler cihazına yerleştirildi.

Tablo 17. RNA'dan cDNA eldesinde kullanılan sıcaklık profili

Sıcaklık (°C)	Süre
25	5 dk
42	60 dk
70	5 dk

Elde edilen cDNA örnekleri uzun süreli saklanacağından -80°C'de muhafaza edildi.

3.6.3.3.4.2. qPCR İşlemi

RNA dizileme analizi sonucunda elde edilen ekspresyon verilerinin doğrulanması amacıyla qPCR işlemi yapıldı. Validasyon için ekspresyonu en fazla değişen ilk 50 gen arasından ve hastalar ile kontrol birey arasında ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık olan kromatin organizasyonunda rol oynayan genlerden seçim yapıldı. “Primer3” (<https://primer3.ut.ee>) programı kullanılarak primer çiftleri dizayn edildi. Primer dizileri Tablo 18’de yer almaktadır.

Tablo 18. qPCR işleminde kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Adı (F:Forward Primer R:Reverse Primer)	Primer Dizisi (5'-3')
SMYD3	SMYD3-F	GAGACATCGAGGTGGGAGAG
	SMYD3-R	GGCAACGGAAACAGTCACAT
H2BC9	H2BC9-F	GCATCTCCTCCAAAGCCATG
	H2BC9-R	TTGTTGTAATGAGCCAGGCG
H3C6	H3C6-F	GAGATCCGTCGCTACCAGAA
	H3C6-R	CGAAAAGCCCCACCAAGTAG
CHRM2	CHRM2-F	GGTAGTGGGGTCTTCAGGTC
	CHRM2-R	AGCCAAGATTGTCCTGGTGA
TLR4	TLR4-F	ACCTCCCCTTCTCAACCAAG
	TLR4-R	TGTCTGGATTTCACACCTGGA
LITAF	LITAF-F	GGCATGAATCCTCCTTCGTA
	LITAF-R	TGTTGCAGGAAGGACAACAC
GSTM3	GSTM3-F	TCCTGGAGTTCACGGATACC
	GSTM3-R	ATCCAGGAGGTAGGGCAGAT

qPCR işlemi LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) cihazında, 96’lık plaka düzeneğinde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Kat. No. 04887352001) karışımı kullanılarak hazırlandı ve her örnek için üç tekrar olacak şekilde çalışıldı. cDNA örnekleri 1:20 oranında seyreltilti. Kullanılan reaksiyon bileşenleri Tablo 19’da, kullanılan sıcaklık profili ise Tablo 20’de yer almaktadır.

Tablo 19. qPCR reaksiyon bileşenleri

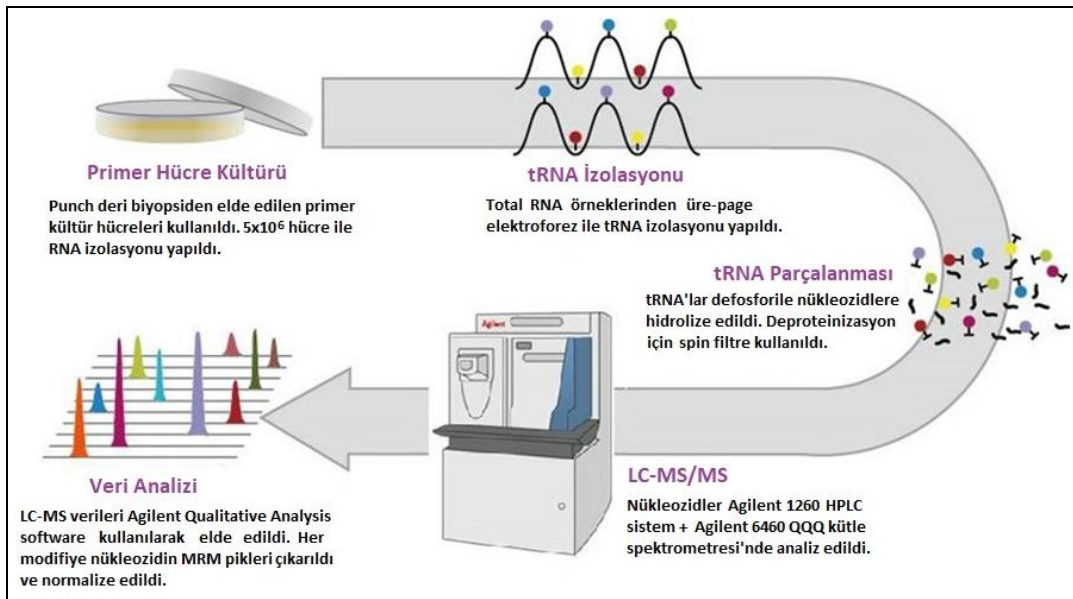
Bileşen	1X (µl)
Master karışımı	2
Forward Primer (10 µM)	1
Reverse Primer (10 µM)	1
cDNA	3

Tablo 20. qPCR işleminde kullanılan sıcaklık profili

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Pre-inkübasyon	95	5 dk	1
Amplifikasyon	95	10 sn	39
	55	20 sn	
	72	30 sn	
Erime eğrisi	65°C - 95°C (0.5°C artış)	0.01 sn	

3.6.3.4. tRNA Modifikasyon Analizi

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerden alınan punch deri biyopsi örneklerinden elde edilen primer kültür hücrelerinde *ELP6* geninin işlevlerinden yola çıkılarak tRNA modifikasyonlarını tespit etmek amacıyla Şekil 13'te yer alan deney düzeneği kuruldu. LC-MS analizi Arraystar Inc. (Amerika Birleşik Devletleri) firmasında gerçekleştirildi.



Şekil 13. tRNA modifikasyon analizi deney düzeneği

3.6.3.4.1. Primer Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

tRNA modifikasyon analizi için Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol örneklerinden öncelikle total RNA izolasyonu yapıldı.

İzolasyon işlemine başlamadan önce kit içeriği ile ilgili ön hazırlıklar yapıldı. Konsantre haldeki Buffer RWT üzerine 2 hacim, yine konsantre haldeki Buffer RPE'nin üzerine ise 4 hacim etanol (%96–100, Merck) eklendi.

Primer kültür hücrelerinden RNA izolasyonu üretici firmanın protokolünde önerdiği şekilde gerçekleştirildi (Qiagen miRNeasy® Mini Kit, cat no. 217004).

1. Primer kültür hücreleri petri yüzeyinden kaldırılarak süspanse hale getirildi, sayımın ardından 5×10^6 hücre ile RNA izolasyonu işlemine başlandı.
2. Petrilerden toplanan hücreler 15ml'lik falkonda 300 x g hızda 7 dk santrifüj edildi.
3. Buzda soğutulmuş PBS ile iki kez yıkama işlemi yapıldı.
4. Hücre pelletinin üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi ve 1.5 dk vorteks ile karıştırılarak 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn vortekslendi.
6. 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
7. 12.000 x g hızda +4°C'de 15 sn santrifüj edildi.
8. Üstteki "aqueous" faz yeni bir ependorfa alındı. Üzerine 1.5 hacim (~525 µl) %100 etanol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
9. Karışımdan 700 µl alınıp toplama tüpünün içine yerleştirilmiş RNeasy mini spin kolona aktarıldı ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
10. Karışımın geri kalan kısmı için kolona aktarım ve santrifüj işlemleri tekrarlandı.
11. 350 µl Buffer RWT eklendi ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
12. 80 µl DNaz I inkübasyon karışımı doğrudan RNeasy spin kolonun membranına pipetlendi ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15 dk bekletildi.
13. 350 µl Buffer RWT eklendi ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
14. Kolon yeni bir toplama tüpüne alınarak 500 µl Buffer RPE eklendi ve 10.000 x g hızda 15 sn santrifüj edildi.
15. Kolon yeni bir toplama tüpüne alınarak 500 µl Buffer RPE eklendi ve 10.000 x g hızda 2 dk santrifüj edildi.
16. Kolonun kuruması için maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.

17. Kolon yeni bir 1.5 ml'lik ependorfa yerleştirildi ve membranın tamamını ıslatacak şekilde 40 µl RNaz içermeyen su ilave edildi. 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10.000 x g hızda 1 dk santrifüj edildi.
18. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edildi.

3.6.3.4.1.1. RNA Miktar ve Saflık Tayini

İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığını belirlemek amacıyla 2 µl örnek yüklemesiyle mikropipetle okuyucuda ölçüm yapıldı. A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılarak RNA'nın saflığı değerlendirildi.

3.6.3.4.1.2. RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

RNA örnekleri %1'lik agaroz jel hazırlanarak yürütüldü. 1 µl RNA örneği, 2 µL steril su ve 2 µl yürütme boyası karıştırılarak jel kuyucuklarına yükleme yapıldı. RNA örnekleri 80 V sabit gerilimde 30-40 dk boyunca yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.6.3.4.2. tRNA İzolasyonu

Üre-page elektroforezi ile total RNA örneklerinden tRNA'lar elde edildi. Total RNA'lar, 7 M üre içeren %7.5 PAGE (29:1; akrilamid:bisakrilamid) ile ayrımlandı. 60-90 nükleotidlik tRNA bandları jelden kesildi, 0.3 M NH₄Ac ile ekstrakte edildi. Ardından glikojen ve etanol ile presipitasyon işlemi uygulandı. Saflaştırılmış tRNA'lar, Qubit RNA HS Assay kiti (ThermoFisher, Q32855) kullanılarak kantifiye edildi.

3.6.3.4.3. tRNA Parçalanması

Saflaştırılan tRNA'lar tek bir nükleozide hidrolize edildi ve daha sonra 10U Benzonaz (Sigma), 0.1 U Fosfodiesteraz I (ABD Biyolojik), 1U Alkalın Fosfat (NEB) içeren 50 µl reaksiyon hacminde defosforile edildi. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. 300 µl deiyonize su eklenerek 10000-Da MWCO spin filtre (Satorius) durulandı ve 4°C'de 300 x g hızda 7 dk santrifüj edildi. Hidrolize RNA örneği durulanmış spin filtreye aktarıldı ve 4°C'de 16.000 x g hızda 10 dk santrifüj edildi. Filtrasyon LC-MS analizinde kullanılmak üzere toplandı.

3.6.3.4.4. LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) Analizi

LC-MS analizinde Agilent 1260 HPLC sistem + Agilent 6460 QQQ kütle spektrometresi, SB-Aq 3.5 µm 2.1x 150 mm HPLC kolonu (Agilent) kullanıldı. Bileşiklerin kantitasyonunun yüksek duyarlılık ve özgüllükte yapıldığı hedefli bir tandem MS yöntemi olan çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanıldı.

tRNA'dan elde edilen tek nükleozid karışımları LC-MS sistemine yüklendi. Tablo 21'de verilen HPLC koşulları uygulandı. Kütle parametrelerine ait değerler ise Tablo 22'de verilen şekilde ayarlandı.

Tablo 21. HPLC koşulları

Zaman (dk)	Solüsyon A	Solüsyon B	Akış hızı (ml/dk)
0.0	%99.9	%0.1	0.35
5.0	%99.9	%0.1	0.35
15.0	%90	%10	0.35
15.1	%40	%60	0.35
20.0	%0	%100	0.35
20.1	%99.9	%0.1	0.35
30.0	%99.9	%0.1	0.35

Solüsyon A olarak nihai %0.1 (hacim/hacim) formik asit konsantrasyonu elde etmek için ilgili miktarda formik asit ve HPLC-grade su karışımı; Solüsyon B olarak nihai %0.1 (hacim/hacim) formik asit konsantrasyonu elde etmek için ilgili miktarda formik asit ile %100 asetonitril karışımı kullanılmıştır.

Tablo 22. Kütle parametreleri değerleri

Parametreler	Değerler
Gaz sıcaklığı	325°C
Gaz Akışı	6 L/dk
Nebulize	40 psi
Steath Gaz Akışı	10L/min
Kapiller	4000V (pozitif)

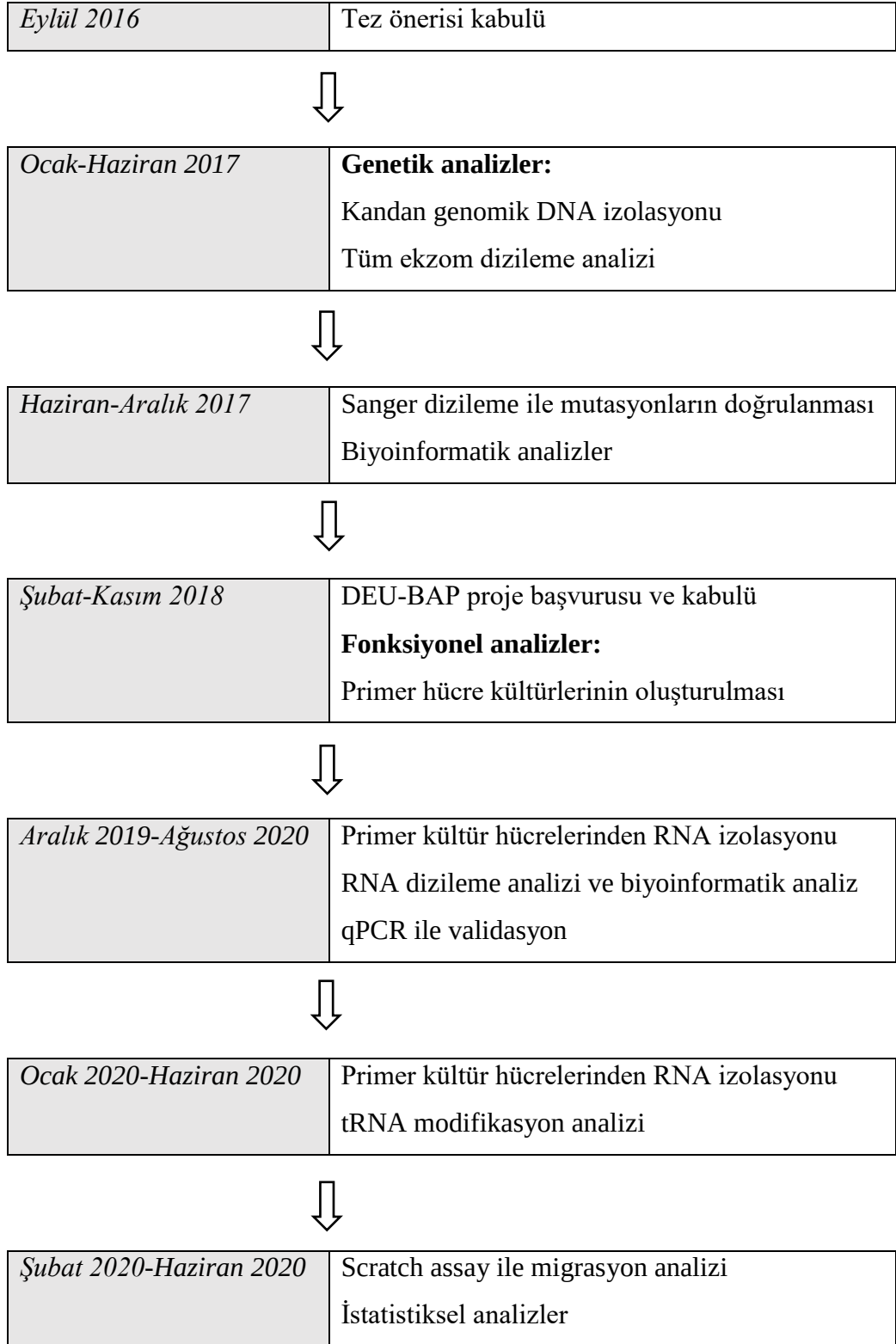
Her örnek için modifiye edilmiş nükleozidlerin tepe (pik) bilgisi Agilent Qualitative Analysis software kullanılarak elde edildi. Sinyal-gürültü oranı 5'ten az olmayan MRM pikler, saptanabilir bir nükleozid olarak kabul edildi. Kanonik adenosin, guanozin, sitidin ve üridin dâhil olmak üzere toplam 49 farklı nükleozid tespiti yapıldı. Elde edilen pik alanları modifiye nükleozid/modifiye olmayan nükleozid şeklinde oranlanarak normalizasyon işlemi yapıldı. Normalize edilmiş pik değerleri incelenerek dört bireydeki tRNA modifikasyonları karşılaştırıldı.

3.6.3.5. Scratch Assay İle Migrasyon Analizi

Hücrelerin hareketi; yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır. *In vitro* yara oluşturma testleriyle hücrelerin migrasyonu basit ve ucuz bir şekilde tespit edilebilmektedir. Scratch assay ile tek tabaka halindeki hücrelerde çizik oluşturulduğunda hücre-hücre bağlantılarında hasarlar meydana gelmektedir. Yaranın olduğu bölgede büyüme faktörü ve sitokin miktarları artmakta ve buna bağlı olarak hücreler çoğalıp göç etmektedir (164).

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerinden elde edilen hücrelerin migrasyon hızlarını tespit etmek amacıyla birinci pasaj sonrası scratch assay yapıldı. Her bir birey için 6 kuyucuklu plakalara ve her bir kuyucukta 200.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücreler %100 konfluent olana kadar 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. 200 µl'lik steril mikropipet ucu ile lineer çizgiler çizilerek yaralar oluşturuldu. PBS ile hücre kalıntıları temizlendi ve plakalara taze ortam eklendi. Hücreler ve oluşturulan çizikler 6'şar saat aralıklarla 4X büyütme objektif kullanılarak kamera bağlantılı inverted mikroskop altında görüntülendi. Scratch assay analizi üç farklı zamanda tekrarlandı. Her plakada oluşturulan çiziklerin farklı zamanlardaki durumları Image-J software kullanılarak analiz edildi (165). Migrasyon hızları SPSS programıyla istatistiksel olarak değerlendirildi. Dört bireye ait hücrelerin migrasyon hızları arasında fark olup olmadığının tespiti için Kruskal-Wallis testi, hangi bireylerin hücrelerinin migrasyon hızlarının diğerlerinden farklı olduğunun tespiti için ise Tamhane's T2 Post-Hoc testi kullanıldı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmanın genetik analiz kısmında üç aileye ait tüm ekzom dizileme verileri ve hastalara ait klinik özellikler dikkate alınarak biyoinformatik araçların kullanılmasıyla aday genler önceliklendirilmiştir. Saptanan mutasyonların patojenik etkilerini ortaya koymak amacıyla *in silico* tahmin analizleri yapılmış ve veritabanlarındaki skorlar ve öngörüler değerlendirilmiştir. Ayrıca missense mutasyonların yol açtığı amino asit değişikliklerinin korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırması yapılmıştır. Bu mutasyonların validasyonu Sanger dizileme sonucu elde edilen dizi bilgileri ve kromatogram görüntüleriyle sağlanmıştır.

Araştırmanın fonksiyonel analiz kısmında elde edilen RNA dizileme verileri için dört bireye ait gen yoğunlukları DESeq2 R kütüphanesi ile karşılaştırmalı ekspresyon analizine tabi tutulmuştur. Karşılaştırmalı ekspresyon analizinde hasta örneklerinde kontrole göre anlamlı artış ve azalma gösteren genler listelenmiş ve tüm genlerin anlamlılık durumları volkan grafiği ile gösterilmiştir. Bu analiz sonucunda anlamlı artış ve azalma gösteren genler için Gene Set Enrichment Analizi Gseapy Python kütüphanesi kullanılarak ve Gene Ontology ile KEGG veritabanları baz alınarak gerçekleştirilmiştir. qPCR işlemi için seçilen genlerin belirlenmesinde p değerleri ile genlerin hastalardaki ekspresyon seviyelerinin kontrol bireydeki ekspresyon seviyelerine oranları dikkate alınmıştır. tRNA modifikasyon analizinde farklı nükleozidlere ait pik değerleri normalize edilmiş (modifiye nükleozid pik alanı/modifiye olmayan nükleozid pik alanı) ve dört bireyden elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Scratch assay uygulamasında ise dört bireyden alınan punch deri biyopsi örneklerinden elde edilen hücrelere çizik atılarak yaralar kapanıncaya kadar gözlenmiş ve elde edilen veriler Image-J software ile değerlendirilmiştir. Migrasyon hızlarının istatistiksel değerlendirilmesi için SPSS programı kullanılmıştır. Hücrelerin migrasyon hızları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile, farkın hangi gruplar arasında olduğu ise Tamhane's T2 Post-Hoc testi ile belirlenmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Ölüm ya da farklı nedenlerle hastalara veya ailelerine ulaşamaması en büyük problemdir. Araştırmanın genetik analiz kısmı başarıyla tamamlanmıştır. Araştırmanın fonksiyonel analiz kısmında araştırma bütçesi doğrultusunda birden fazla kontrolün olmaması verilerin analizi sürecinde zorluklar yaşanmasına neden olmuştur. Aynı zamanda araştırma

kapsamında kullanılan cihazların bir kısmının üniversite bünyesinde olmaması nedeniyle süreç yönetiminde sıkıntılar yaşanmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından; 03.05.2018 tarihinde 2229-GOA protokol numarası ve 2018/11-66 karar numarası ile alınmış “Nörogelişimsel Bozukluklar İle İlişkili Mutasyonların Genetik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu” başlıklı araştırmaya ilişkin etik kurul onayı EKLER kısmında yer almaktadır.

Çalışmada yer alan bir aile için bireylerden punch deri biyopsi örnekleri alınarak fonksiyonel analizlerin yapılması ihtiyacı doğmuştur. Bu nedenle ek bir etik kurul başvurusu yapılmıştır. Bu amaçla Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından; 12.09.2019 tarihinde 490-SBKAEK protokol numarası ve 2019/14-05 karar numarası ile alınmış “Epilepsi İle Birlikte Beyin Malformasyonu Gözlenen Nörogelişimsel Bozukluklar İle İlişkili Mutasyonların Genetik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu” başlıklı araştırmaya ilişkin etik kurul onayı da EKLER kısmında yer almaktadır.

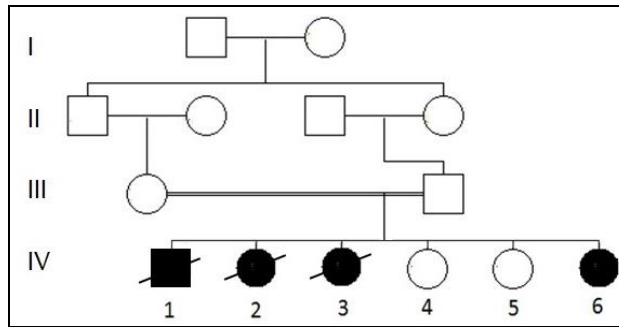
4. BULGULAR

Nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkili mutasyonların genetik ve fonksiyonel karakterizasyonunu amaçlayan çalışmamızda ebeveynleri akraba evliliği olan ve epilepsi ile birlikte beyin malformasyonu gözlenen nörogelişimsel bozukluğa sahip beş hastanın yer aldığı üç farklı aile bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalarımızda karyotip ve aCGH analizi sonuçları normal çıkan bu üç ailede, tez çalışması kapsamında tüm ekzom dizileme analizi yapılmıştır. Hastaların klinik özellikleri ve tüm ekzom dizileme analizi sonuçlarının birlikte değerlendirilmesiyle; Aile-1’de frameshift mutasyon saptanan *OCLN* geni, Aile-2’de missense mutasyon saptanan *OCLN* geni ve Aile-3’te missense mutasyon saptanan *ELP6* geni hastaların fenotipik değişiklikleriyle ilişkili olabilecek genler olarak önceliklendirilmiştir.

4.1. *OCLN* Geni İle İlgili Bulgular

4.1.1. Aile-1

Nörogelişimsel bozukluğu olan Hasta-1 ve Hasta-2’nin yer aldığı Aile-1’in pedigrisi Şekil 14’te yer almaktadır.



Şekil 14. Aile-1’in pedigrisi. Kare erkek bireyi, daire dişi bireyi, IV-3: Hasta-1 ve IV-6: Hasta-2’yi ifade etmektedir.

4.1.1.1. Aile-1’de Tüm Ekzom Dizileme, Sanger Dizileme ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları

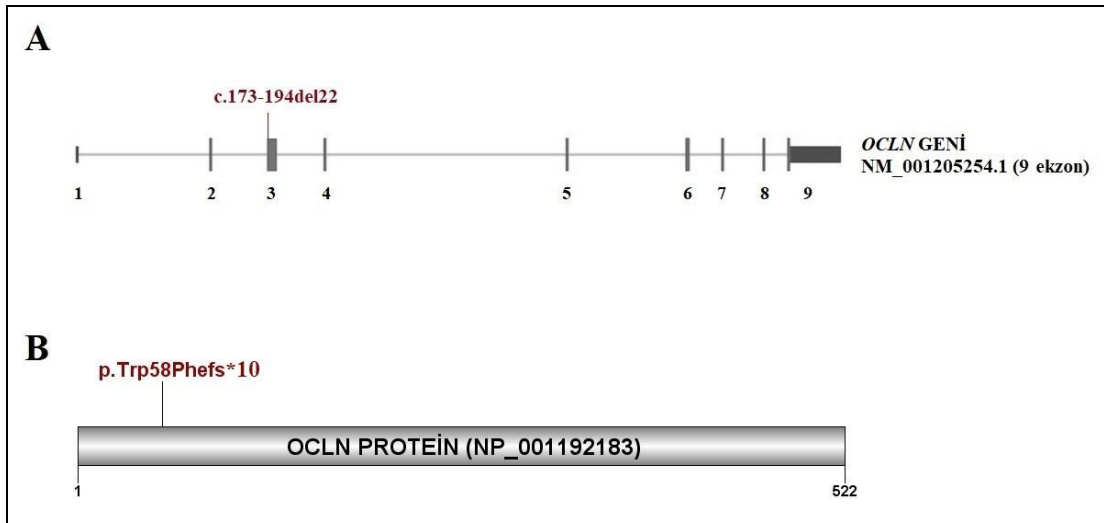
Tüm ekzom dizileme işlemi sonrası yapılan biyoinformatik analizler ile Aile-1’de *OCLN* geninde saptanan frameshift mutasyon önceliklendirilmiştir. Hasta-1 ve Hasta-2’de bu

mutasyon homozigot durumda gözlenirken, çocukların anne ve babasında heterozigot formda gözlenmiştir. Mutasyona ait bilgiler Tablo 23'te yer almaktadır.

Tablo 23. Aile-1'de *OCLN* geninde geninde saptanan frameshift mutasyonun özellikleri

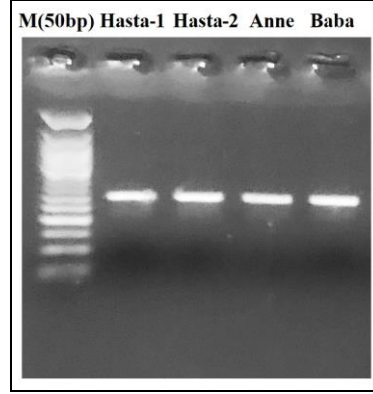
GEN	<i>OCLN</i>
Mutasyon tipi	frameshift
Genomik lokasyon	chr5:68805090
Nükleotid değişikliği	c.173_194del22
Amino asit değişikliği	p.Trp58Phefs*10
rs numarası	rs797045841

OCLN geninde saptanan frameshift mutasyon genin üçüncü ekzonundadır; protein üzerinde ise Marvel domain'de bulunmaktadır. Mutasyonun gen ve protein üzerindeki yerleşimleri Şekil 15'te yer almaktadır.



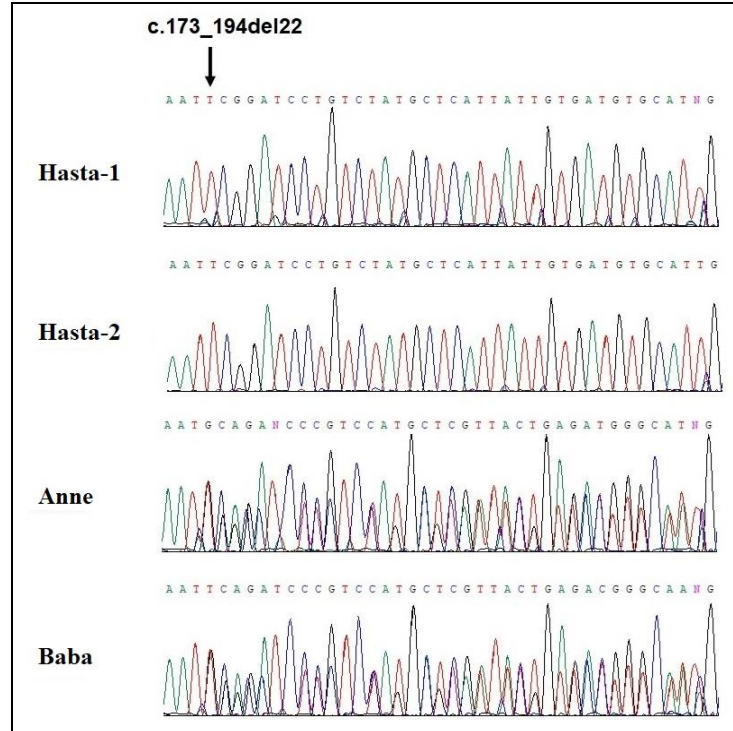
Şekil 15. Aile 1'de saptanan frameshift mutasyonun *OCLN* geni (A) ve proteini (B) üzerindeki gösterimleri

Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda *OCLN* geninde saptanan frameshift mutasyonun doğrulanması amacıyla Sanger dizileme işlemi yapılmıştır. *OCLN1-F* ve *OCLN1-R* primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülüp jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. 293 bp'lik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 16'da yer almaktadır.



Şekil 16. OCLN1-F ve OCLN1-R primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Hasta-1, Hasta-2, anne ve babalarına ait PCR ürünlerinin Sanger yöntemi ile dizilenmesi sonucu fasta formatında gelen diziler ile NCBI Blast veritabanı kullanılarak referans genom ile karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda kromatogram görüntüleri “ChromasPro Version 1.34” programı kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen verilerle frameshift mutasyonun doğrulaması yapılmıştır. Hasta-1, Hasta-2, anne ve babaya ait kromatogram görüntüleri Şekil 17’de yer almaktadır.



Şekil 17. Aile-1’de *OCLN* geninde saptanan frameshift mutasyonun kromatogram görüntüleri

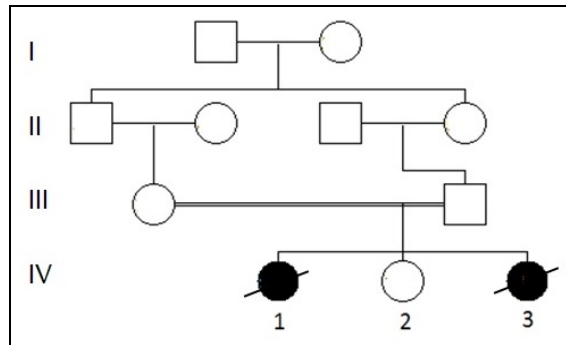
OCNL geninde saptanan frameshift mutasyonun protein üzerindeki etkisini tahmin etmek için ise Mutation Taster ve NMDEscPredictor veritabanlarından yararlanılmıştır. Mutation Taster veritabanında bu mutasyon hastalık nedeni olarak değerlendirilmiştir (skor=1). NMDEscPredictor veritabanına göre, frameshift mutasyon sonucunda proteinin nonsense-aracılı yıkım (nonsense-mediated decay; NMD+) ile bozunmaya uğrayacağı tahmin edilmektedir. Nonsense-aracılı yıkım, olgunlaşmamış translasyon sonlanma kodunu içeren mRNA'ların yıkım sürecini ifade etmektedir. Frameshift mutasyon sonucu stop kodonu olduğu durumlarda hücrede kesilmiş proteinler toksik etki yaratabilmektedir; bu nedenle nonsense-aracılı yıkım son derece önemlidir (166). NMDEscPredictor veritabanında Aile-1'de *OCNL* geninde saptanan frameshift mutasyonun bilgileriyle oluşturulan görüntü Şekil 18'de yer almaktadır.



Şekil 18. Aile-1'de *OCNL* geninde saptanan frameshift mutasyonun bilgileriyle NMDEscPredictor veritabanında oluşturulan görüntü

4.1.2. Aile-2

Nörogelişimsel bozukluğu olan Hasta-3'ün yer aldığı Aile-2'nin pedigrisi Şekil 19'da yer almaktadır.



Şekil 19. Aile-2'nin pedigrisi. Kare erkek bireyi, daire dişi bireyi, IV-3: Hasta-3'ü ifade etmektedir.

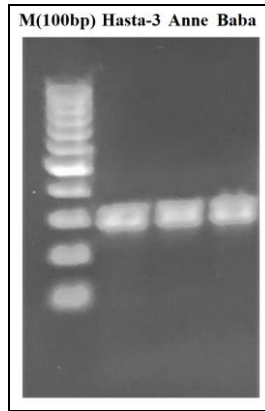
4.1.2.1. Aile-2’de Tüm Ekzom Dizileme, Sanger Dizileme ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Tüm ekzom dizileme işlemi sonrası yapılan biyoinformatik analizler ile Aile-2’de *OCNL* geninde saptanan missense mutasyon önceliklendirilmiştir. CADD (“Combined Annotation Dependent Depletion”) skoru 27.2’dir. Hasta-3’te bu mutasyon homozigot durumda gözlenirken, hastanın anne ve babasında heterozigot formda gözlenmiştir. Mutasyona ait bilgiler Tablo 24’te yer almaktadır.

Tablo 24. Aile-2’de *OCNL* geninde geninde saptanan missense mutasyonun özellikleri

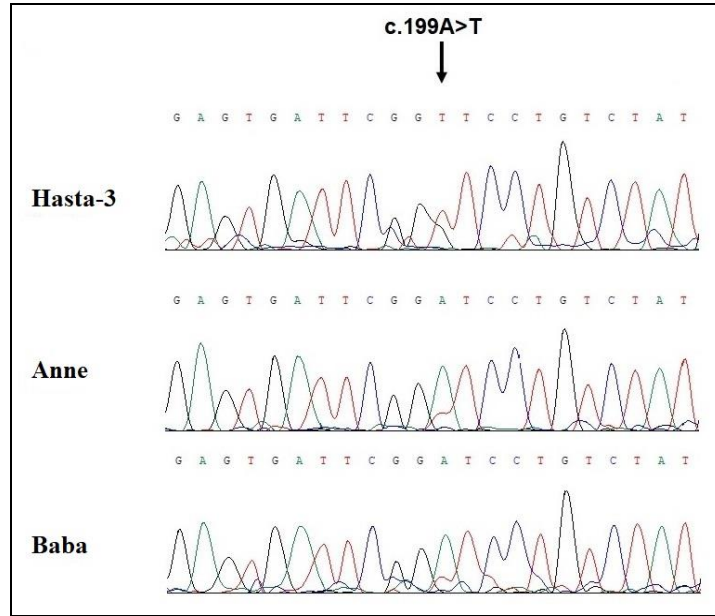
GEN	<i>OCNL</i>
Mutasyon tipi	missense
Genomik lokasyon	chr5:68805116
Nükleotid değişikliği	c.199A>T
Amino asit değişikliği	p.Ile67Phe
rs numarası	rs766112658

Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda *OCNL* geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması amacıyla Sanger dizileme işlemi yapılmıştır. *OCNL*2-F ve *OCNL*2-R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülüp jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. 301 bp’lik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 20’de yer almaktadır.



Şekil 20. *OCNL*2-F ve *OCNL*2-R primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Hasta-3, anne ve babasına ait PCR ürünlerinin Sanger yöntemi ile dizilenmesi sonucu fasta formatında gelen diziler referans genom ile karşılaştırılmış ve kromatogram görüntüleri incelenmiştir. Bu verilerle missense mutasyonun doğrulaması yapılmıştır. Hasta-3, anne ve babasına ait kromatogram görüntüleri Şekil 21’de yer almaktadır.



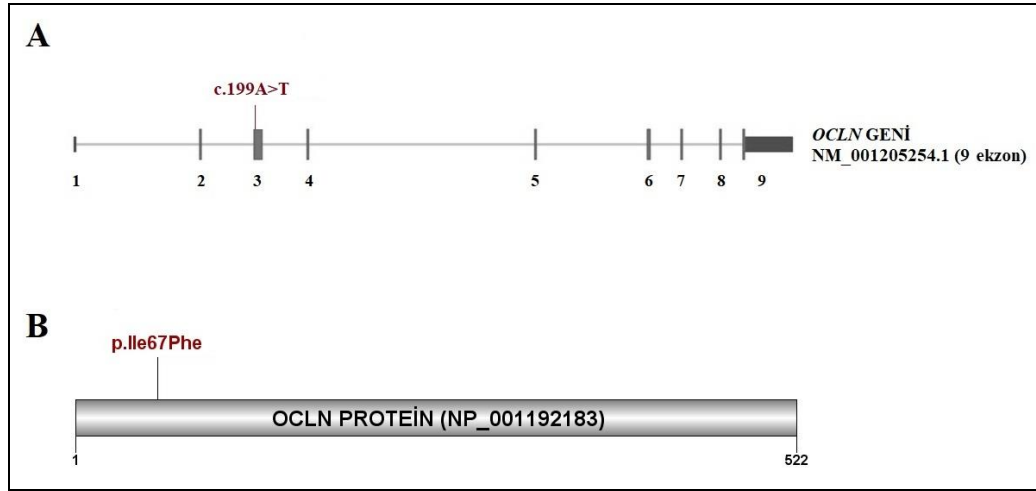
Şekil 21. Aile-2’de *OCLN* geninde saptanan missense mutasyonun kromatogram görüntüleri

OCLN genindeki missense mutasyon sonucunda polar olmayan alifatik R grublu, dallanmış zincirli ve hidrofobik özellikteki izolösin amino asidi yerine, aromatik R grublu fenilalanin amino asidi kodlanmaktadır. *OCLN* geninde saptanan bu missense mutasyonun olası patojenik etkisini görmek amacıyla *in silico* tahmin araçları kullanılmıştır. Bu missense mutasyon ile ilgili Mutation Taster, SIFT, PROVEAN, SNAP ve I-Mutant veritabanlarından elde edilen bilgiler Tablo 25’te yer almaktadır.

Tablo 25. *OCLN* geninde saptanan missense mutasyonun *in silico* analiz sonuçları

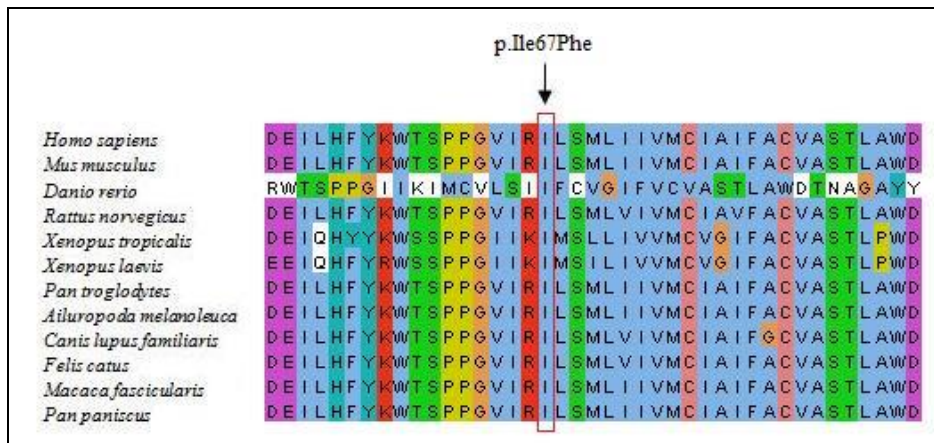
Veritabanı	Skor	Tahmin
Mutation Taster	0.999	Hastalık yapıcı
SIFT	0.03	Tahrip edici
PROVEAN	-2.608 (cutoff=-2.5)	Zararlı
SNAP	47 (%71 doğruluk)	Etkileyici
I-Mutant	-1.85 (DDG<0)	Stabiliteyi azaltmakta

OCLN geninde saptanan missense mutasyon genin üçüncü ekzonundadır; protein üzerinde ise Marvel domain’de bulunmaktadır. Mutasyonun gen ve protein üzerindeki yerleşimleri Şekil 22’de yer almaktadır.



Şekil 22. Aile-2’de saptanan missense mutasyonun *OCLN* geni (A) ve proteini (B) üzerindeki gösterimleri

OCLN genindeki mutasyonun yol açtığı amino asit değişikliğinin olduğu bölge için korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırılması yapılmıştır. “Jalview” programında ClustalX seçeneği kullanılarak amino asitlere özel renkler verilmiştir. İnsan dâhil 12 türü içeren karşılaştırma analizi sonucu elde edilen görüntü Şekil 23’te yer almaktadır.

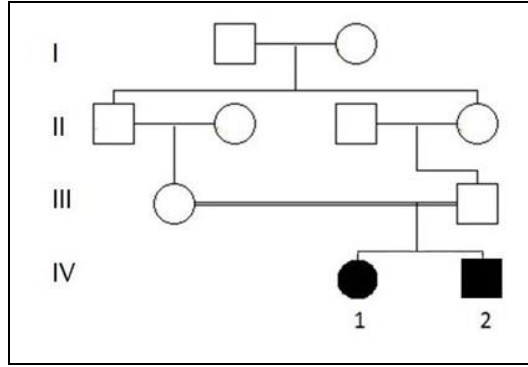


Şekil 23. *OCLN* genindeki missense mutasyonun yol açtığı amino asit değişikliğinin korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırılması. Hasta-3’te gözlenen amino asit değişikliğinin (p.Ile67Phe) olduğu kısım kırmızı kutuyla gösterilmiştir.

4.2. ELP6 Geni İle İlgili Bulgular

4.2.1. Aile-3

Nörogelişimsel bozukluğu olan Hasta-4 ve Hasta-5'in yer aldığı Aile-3'ün pedigrisi Şekil 24'te yer almaktadır.



Şekil 24. Aile 3'ün pedigrisi. Kare erkek bireyi, daire dişi bireyi, IV-1: Hasta-4 ve IV-2: Hasta-5'i ifade etmektedir.

4.2.1.1. Aile-3'te Tüm Ekzom Dizileme, Sanger Dizileme ve Biyoinformatik Analiz Sonuçları

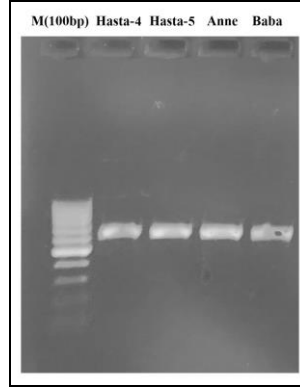
Tüm ekzom dizileme işlemi sonrası yapılan biyoinformatik analizler ile Aile-3'te *ELP6* geninde saptanan missense mutasyon önceliklendirilmiştir. CADD skoru 22.6'dır. Hasta-4 ve Hasta-5'te bu mutasyon homozigot durumda gözlenirken, hastaların anne ve babasında heterozigot formda gözlenmiştir. Mutasyona ait bilgiler Tablo 26'da yer almaktadır.

Tablo 26. Aile-3'te *ELP6* geninde geninde saptanan missense mutasyonun özellikleri

GEN	<i>ELP6</i>
Mutasyon tipi	missense
Genomik lokasyon	chr3:47543312
Nükleotid değişikliği	c.353T>G
Amino asit değişikliği	p.Leu118Trp
rs numarası	-

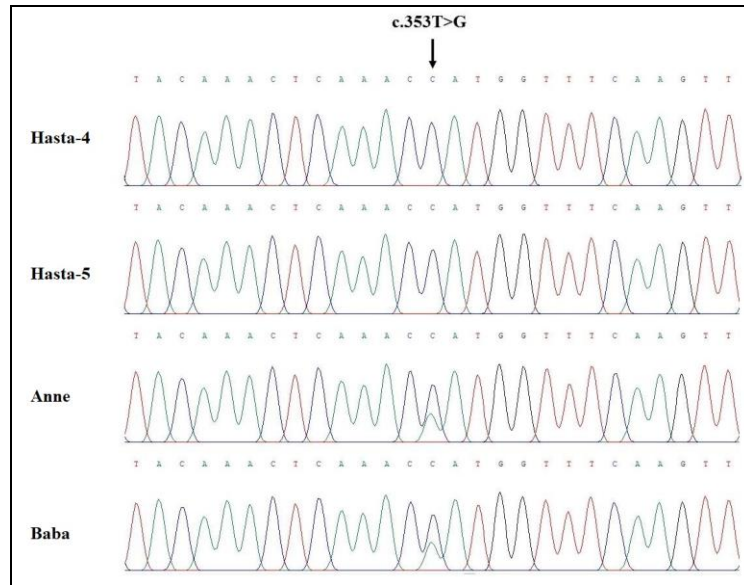
Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun doğrulanması amacıyla Sanger dizileme işlemi yapılmıştır. ELP6-F ve ELP6-R primerleri

kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülüp jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. 637 bp'lık PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 25'te yer almaktadır.



Şekil 25. ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Hasta-4, Hasta-5, hastaların anne ve babasına ait PCR ürünlerinin Sanger yöntemi ile dizilenmesi sonucu fasta formatında gelen diziler referans genom ile karşılaştırılmış ve kromatogram görüntüleri incelenmiştir. Bu verilerle missense mutasyonun doğrulaması yapılmıştır. Hasta-4, Hasta-5, anne ve babaya ait kromatogram görüntüleri Şekil 26'da yer almaktadır.



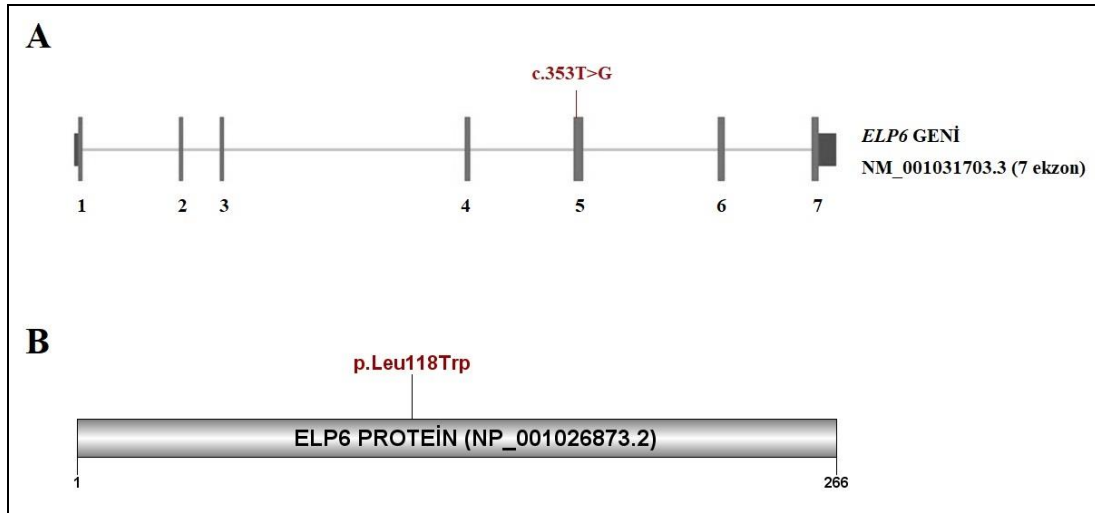
Şekil 26. ELP6 geninde saptanan missense mutasyonun kromatogram görüntüleri

ELP6 genindeki missense mutasyon sonucunda polar olmayan alifatik R grublu, dallanmış zincirli ve hidrofobik özellikteki lösin amino asidi yerine, aromatik R grublu triptofan amino asidi kodlanmaktadır. *ELP6* geninde saptanan bu missense mutasyonun protein üzerindeki olası etkilerini görmek amacıyla *in silico* tahmin araçları kullanılmıştır. Bu mutasyon için Mutation Taster, SIFT, PROVEAN, SNAP ve I-Mutant veritabanlarından elde edilen bilgiler Tablo 27’de yer almaktadır.

Tablo 27. *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun *in silico* analiz sonuçları

Veritabanı	Skor	Tahmin
Mutation Taster	0.99995	Hastalık yapıcı
SIFT	0	Tahrip edici
PROVEAN	-5.522 (cutoff=-2.5)	Zararlı
SNAP	56 (%75 doğruluk)	Etkileyici
I-Mutant	-0.35 (DDG<0)	Stabiliteyi azaltmakta

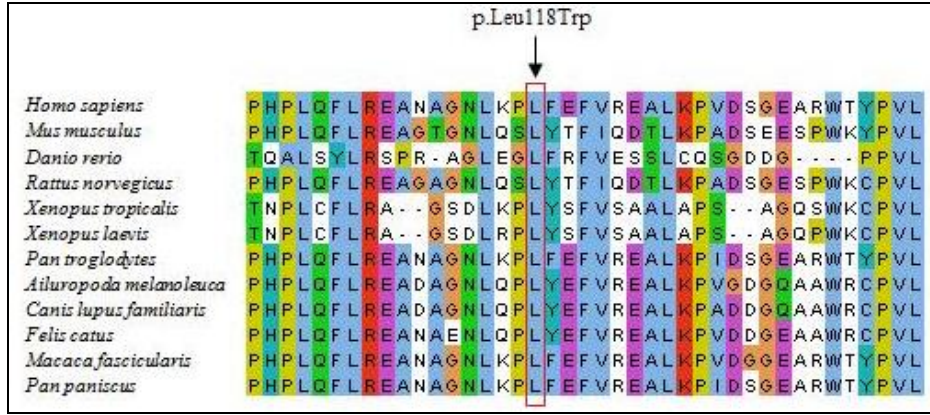
ELP6 geninde saptanan missense mutasyon genin beşinci ekzonundadır. Mutasyonun gen ve protein üzerindeki yerleşimleri Şekil 27’de yer almaktadır.



Şekil 27. Aile 3’te saptanan missense mutasyonun *ELP6* geni (A) ve proteini (B) üzerindeki gösterimi

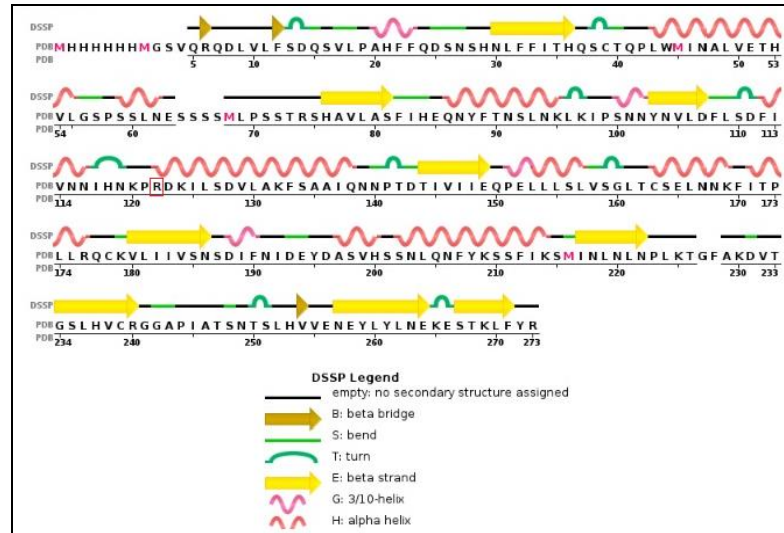
ELP6 geninde nükleotid değişikliği sonucu değişen amino asit için korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırılması yapılmıştır. “Jalview” programında ClustalX seçeneği

kullanılarak amino asitlere özel renkler verilmiştir. İnsan dâhil 12 türü içeren karşılaştırma analizi sonucu elde edilen görüntü Şekil 28’de yer almaktadır.



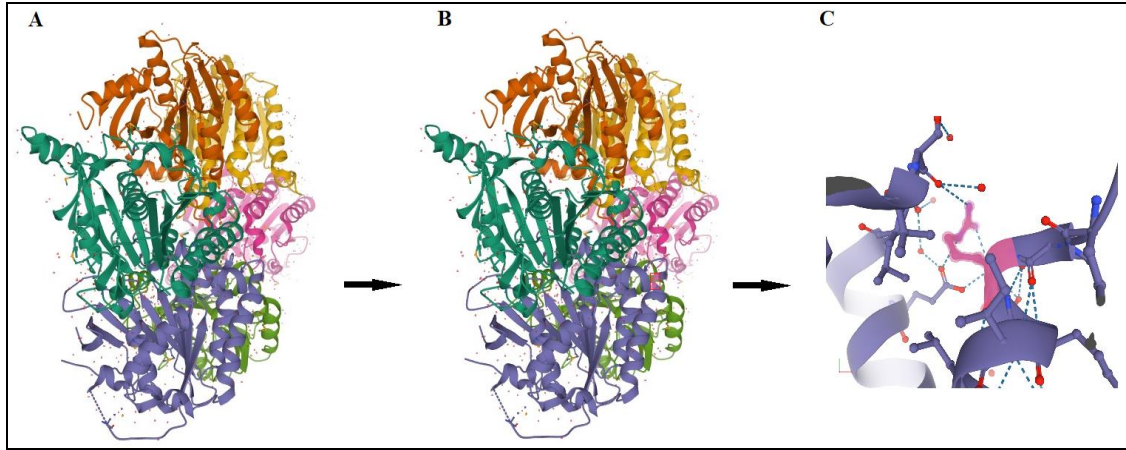
Şekil 28. ELP6 genindeki missense mutasyonun yol açtığı amino asit değişikliğinin korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırılması. Hasta-4 ve Hasta-5’te gözlenen amino asit değişikliğinin (p.Leu118Trp) olduğu kısım kırmızı kutuyla gösterilmiştir.

S. cerevisiae model organizmasında ELP6 proteininin ikincil yapısını 3D koordinatlarından türetmek için DSSP (Dictionary of Secondary Structure of Proteins) kullanılmıştır. ELP6 proteininin ikincil yapısında %34 helikal (14 heliks, 96 rezidü) ve %21 beta sheet (12 strand, 60 rezidü) bulunmaktadır (167) (Şekil 29).



Şekil 29. ELP6 proteininin ikincil yapısının dizi zincir görünümü (PDB ID:4A8J). *S. cerevisiae*’nın ELP6 geni model alınarak oluşturulmuştur ve Aile-3’te saptanan mutasyonun yeri kırmızı kutu içerisinde gösterilmiştir (167).

Bu missense mutasyon ELP6 proteininde alfa-heliks tabakanın başlangıcında yer almaktadır. Amino asidin değişmesi sonucunda bu yapının etkilenme olasılığı vardır. Elongatör kompleksi ELP456 alt biriminin RCSB Protein Data Bank veritabanında *S. cerevisiae* model organizmasıyla oluşturulan üç boyutlu yapısına ulaşılmış ve Aile-3'te saptanan nükleotid değişikliğinin olduğu rezidü incelenmiştir (Şekil 30).



Şekil 30. ELP456 kompleksinin üç boyutlu yapısı (PDB ID:4A8J). **A.** ELP456 kompleksi. **B.** Elp456 kompleksi üzerinde Aile-3'te saptanan mutasyonun meydana geldiği bölge kırmızı kutu içerisinde gösterilmiştir. **C.** ELP6 geninde saptanan mutasyonun meydana geldiği bölgenin yakınlştırılmış görünümü. Şekil *S. cerevisiae*'nın ELP456 kompleksi model alınarak oluşturulmuştur (167).

Bu missense mutasyon için ek *in silico* analizler yapılmıştır. DNABind, DP-Bind ve DRNAPred veritabanları kullanılarak ELP6 genindeki missense mutasyonun bulunduğu lokasyonu içeren bir DNA bağlanma bölgesi olup olmadığı araştırılmıştır. Tablo 28'de yer alan program çıktılarına göre herhangi bir DNA bağlanma bölgesi tespit edilememiştir.

Tablo 28: DNA bağlanma bölgesi tespitine yönelik *in silico* analiz sonuçları

Veritabanı	Skor	Threshold değeri	İhtimal	Tahmin
DNABind	-0.655	0.5896	0.3419	DNA bağlanma bölgesi yok
DP-Bind	0.7782	1	0	DNA bağlanma bölgesi yok
DRNAPred	0.0788	0.4727	0	DNA bağlanma bölgesi yok

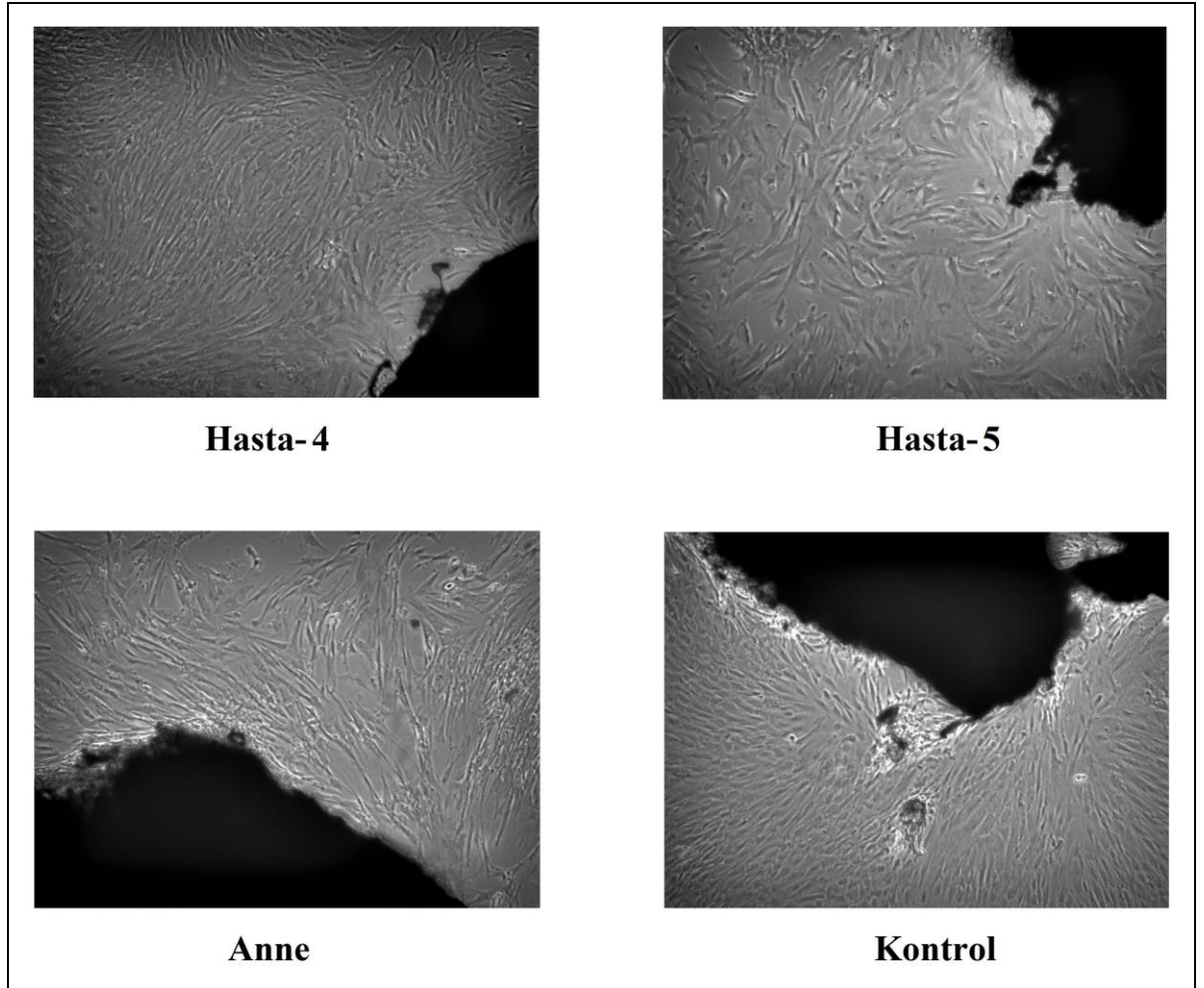
ELP6 proteini için olası post-translasyonel modifikasyonlar ModPred veritabanı kullanılarak araştırılmıştır. Rezidülerde meydana gelebilecek olası modifikasyonlar skor ve güvenilirlik düzeyleriyle birlikte Tablo 29’da yer almaktadır. Veritabanına göre, ELP6 genindeki missense mutasyonun olduğu pozisyonda herhangi bir post-translasyonel modifikasyon öngörülmemektedir.

Tablo 29. ELP6 proteini *in silico* PTM analiz sonuçları

Rezidü	Modifikasyon	Skor	Güvenilirlik	Bilgi
M1	N-terminal asetilasyon	0.87	Orta	Novel tahmin
N10	N-bağlı glikozilasyon	0.97	Yüksek	Novel tahmin
T12	Fosforilasyon	0.71	Orta	Novel tahmin
R15	ADP-ribozilasyon	0.67	Orta	Novel tahmin
A16	Amidasyon	0.50	Orta	Novel tahmin
A27	Amidasyon	0.54	Orta	Novel tahmin
K67	Ubikitinasyon	0.53	Düşük	Novel tahmin
T73	Amidasyon	0.54	Orta	Novel tahmin
R76	ADP-ribozilasyon	0.54	Düşük	Novel tahmin
R78	ADP-ribozilasyon	0.50	Düşük	Novel tahmin
Q98	Pyrrolidone karboksilik asit	0.58	Orta	Novel tahmin
K99	PUPlasyon	0.73	Orta	Novel tahmin
N114	N-bağlı glikozilasyon	0.83	Orta	Novel tahmin
K116	Metilasyon	0.65	Düşük	Novel tahmin
K116	SUMOlasyon	0.55	Düşük	Novel tahmin
K116	Ubikitinasyon	0.57	Düşük	Novel tahmin
K116	Asetilasyon	0.72	Orta	Novel tahmin
K127	Asetilasyon	0.50	Düşük	Novel tahmin
P128	Hidroksilasyon	0.60	Düşük	Novel tahmin
S131	O-bağlı glikozilasyon	0.77	Orta	Novel tahmin
R135	Amidasyon	0.70	Orta	Novel tahmin
T137	Amidasyon	0.50	Orta	Novel tahmin
W172	Amidasyon	0.58	Orta	Novel tahmin
K175	Ubikitinasyon	0.57	Düşük	Novel tahmin
S185	O-bağlı glikozilasyon	0.74	Orta	Novel tahmin
Q224	Pyrrolidone karboksilik asit	0.50	Düşük	Novel tahmin
S233	Fosforilasyon	0.62	Düşük	Novel tahmin
R239	ADP-ribozilasyon	0.50	Düşük	Novel tahmin
Y247	Amidasyon	0.80	Orta	Novel tahmin
K252	Metilasyon	0.71	Orta	Novel tahmin
K259	SUMOlasyon	0.58	Düşük	Novel tahmin
K259	Ubikitinasyon	0.61	Düşük	Novel tahmin
K259	PUPlasyon	0.50	Düşük	Novel tahmin
K259	Asetilasyon	0.64	Düşük	Novel tahmin
S262	Fosforilasyon	0.62	Düşük	Novel tahmin

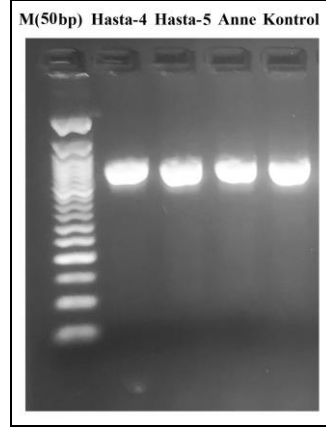
4.2.1.2. Deri Biyopsi Örneklerinden Primer Hücre Kültürü Oluşturulması ve Mutasyonun Validasyonu

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve *ELP6* genindeki missense mutasyonu taşımayan Kontrol birey olmak üzere dört bireyden punch deri biyopsi örnekleri alınmış ve primer hücre kültürleri oluşturulmuştur. Dört bireyden elde edilen primer hücre kültürlerinin görüntüleri Şekil 31’de yer almaktadır.



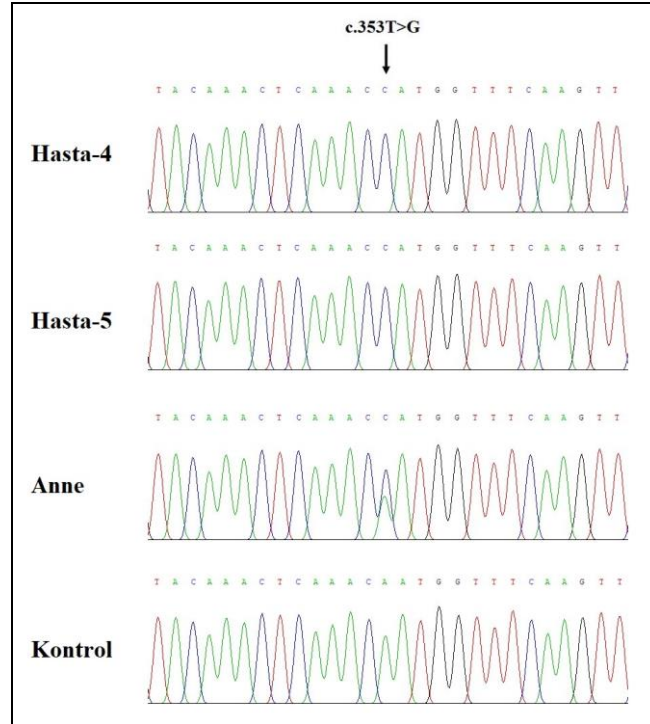
Şekil 31. Dört bireyden elde edilen primer hücre kültürlerine ait resimler

Primer kültür hücrelerinde *ELP6* geninde saptanan mutasyonun durumunu tespit etmek amacıyla DNA izolasyonu yapılmış ve *ELP6*-F ve *ELP6*-R primerleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. 637 bp’lik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 32’de yer almaktadır.



Şekil 32. Primer kültür hücrelerinden elde edilen DNA'lar ve ELP6-F ve ELP6-R primerleri ile kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Sanger dizileme işlemi sonucunda elde edilen Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerine ait kromatogram görüntüleri Şekil 33'te yer almaktadır.



Şekil 33. Primer kültür hücrelerinde doğrulaması yapılan *ELP6* genindeki missense mutasyonun kromatogram görüntüleri

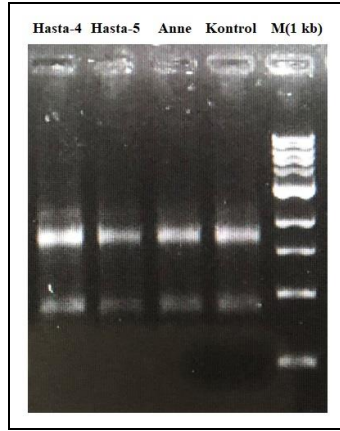
4.2.1.3. Primer Kültür Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve Dizileme Analizi

RNA dizileme işlemi için Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerinin primer hücre kültürlerinden izole edilen RNA miktarları ve saflık değerleri Tablo 30’da yer almaktadır.

Tablo 30. RNA dizileme için izole edilen RNA’ların miktar ve saflık değerleri

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Hasta-4	537.1	2.129	2.250
Hasta-5	278.5	2.132	2.247
Anne	261.1	2.110	2.110
Kontrol	322.2	2.128	2.219

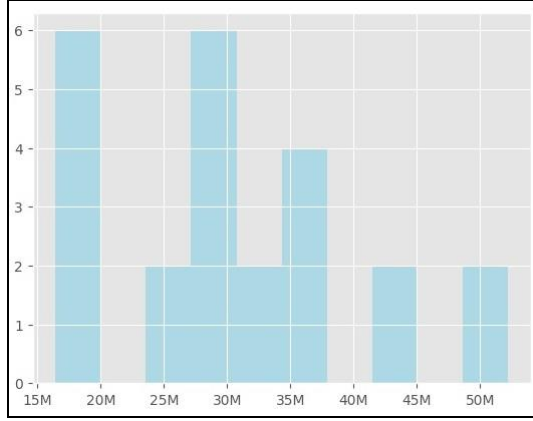
Uygun miktar ve saflıkta elde edilen total RNA’lar aynı zamanda agaroz jele yüklenmiş ve kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Jel elektroforez görüntüsü Şekil 34’te yer almaktadır.



Şekil 34. RNA dizileme için izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.2.1.3.1. RNA Dizileme Analizi Sonuçları

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerinden elde edilen primer kültür hücrelerinden total RNA izolasyonunu takiben Illumina NovaSeq 6000 sistemi kullanılarak üçer tekrarlı şekilde RNA dizileme işlemi yapılmıştır. Her bir örnek için çift uçlu okuma sonucunda oluşan FastQ formatında iki dosya bulunmaktadır. Örnek başına toplam okumalar yaklaşık 16 milyon ile 52 milyon aralığında değişmektedir (Şekil 35).



Şekil 35. Örnek başına toplam okumalara ait histogram. X eksenini toplam okumayı, y eksenini ise örnek sayısını ifade etmektedir.

Her bir FastQ dosyası için elde edilen toplam okumalar ve G+C yüzdesi parametreleri kalite kontrol analizinde listelenmiştir. Okuma uzunluğunun 70-151 bp aralığında, %GC'nin 51-55 aralığında olduğu görülmüştür. Dizileme çalışmasına ait kalite kontrol istatistikleri Tablo 31'de yer almaktadır.

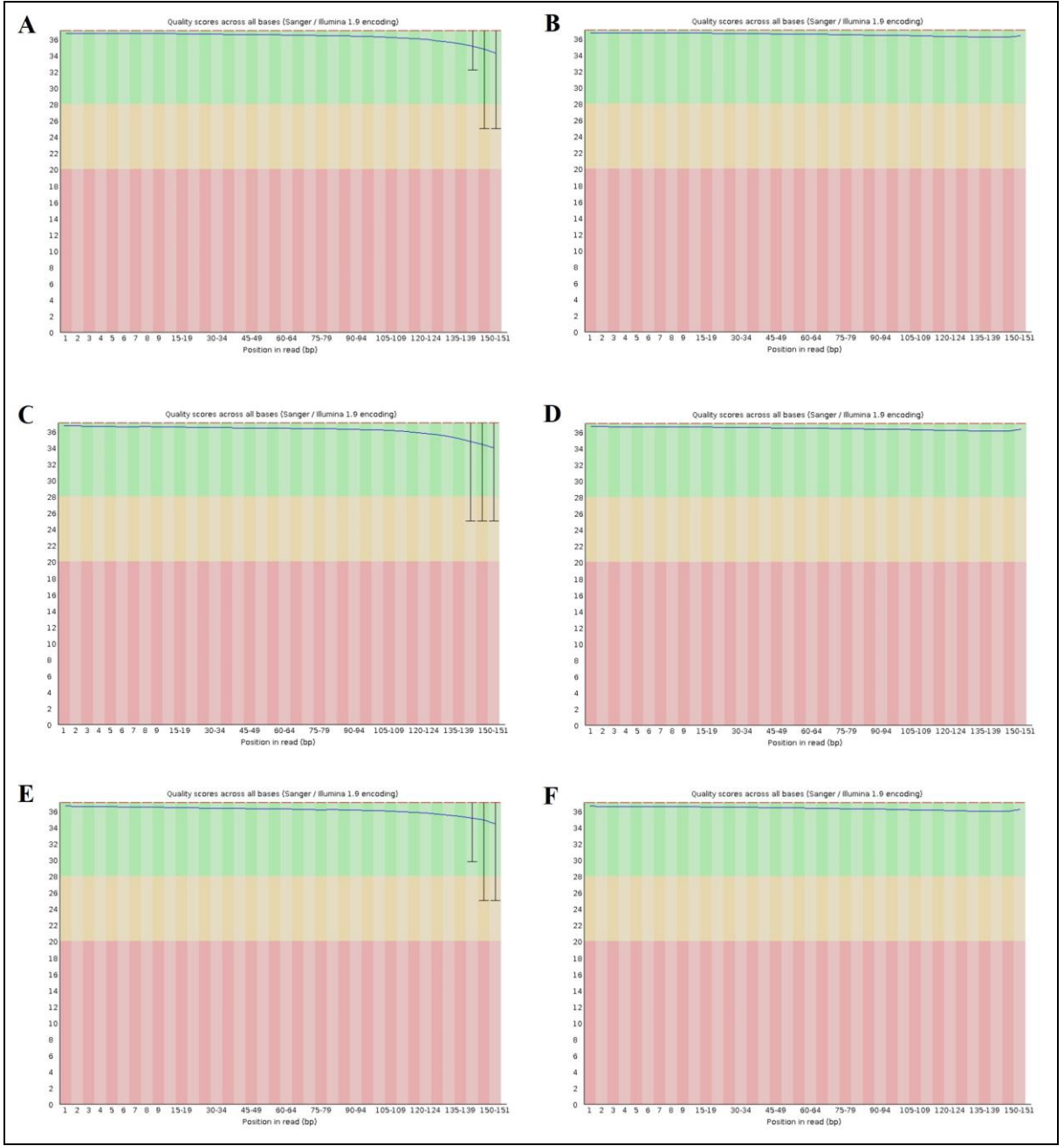
Tablo 31. Dizileme çalışmasına ait kalite kontrol istatistikleri. Parantez içerisindeki değerler kalite filtresi sonucunda değerlerde görülen yüzde (%) artış ya da azalışı (-) göstermektedir.

Dosya ismi	Toplam dizi	Dizi uzunluğu	%GC	Ortalama (mean) dizi uzunluğu	Kalite skorları (mean base quality)
Hasta-4 (1-R1)	34417701 (%-0.74)	70-151	54	138.21 (%-8.47)	36.65 (%0.10)
Hasta-4 (2 R1)	16415146 (%-0.78)	70-151	53	139.62 (%-7.53)	36.64 (%0.17)
Hasta-4 (3-R1)	17721701 (%-1.02)	70-151	53 (%1.92)	139.74 (%-7.46)	36.63 (%0.10)
Hasta-4 (1-R2)	34417701 (%-0.74)	70-151	54	138.24 (%-8.45)	36.49 (%0.57)
Hasta-4 (2-R2)	16415146 (%-0.78)	70-151	53	139.66 (%-7.51)	36.42 (%0.77)
Hasta-4 (3-R2)	17721701 (%-1.02)	70-151	53	139.80 (%-7.42)	36.32 (%0.63)
Hasta-5 (1-R1)	25434862 (%-1.03)	70-151	52 (%1.96)	138.64 (%-8.18)	36.65 (%0.08)
Hasta-5 (2-R1)	27976976 (%-0.71)	70-151	54	139.56 (%-7.57)	36.66 (%0.08)
Hasta-5 (3-R1)	19324688 (%-0.82)	70-151	51	140.89 (%-6.69)	36.65 (%0.07)
Hasta-5 (1-R2)	25434862 (%-1.03)	70-151	52	138.72 (%-8.14)	36.27 (%0.86)

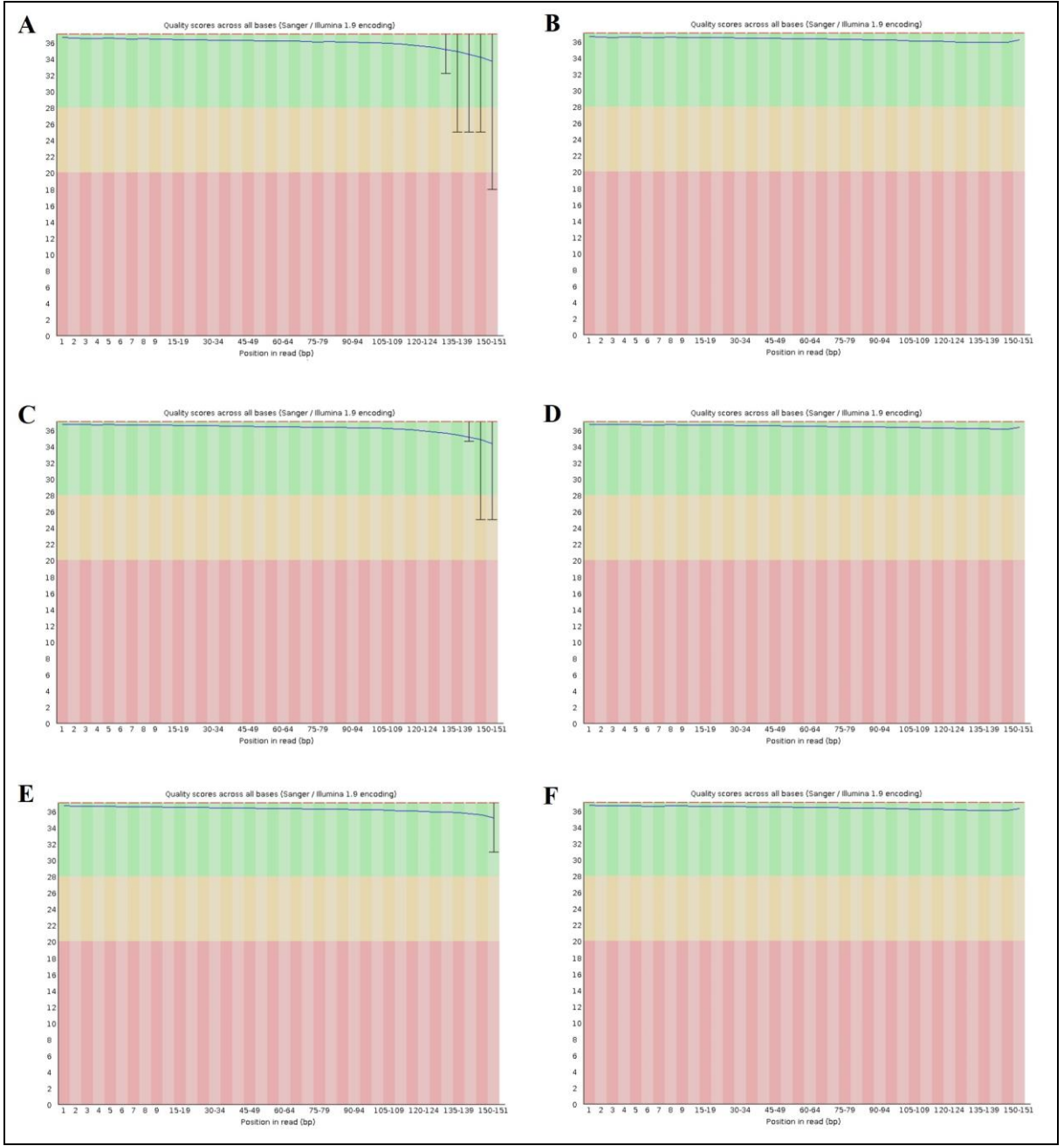
Tablo 31-devamı. Dizileme çalışmasına ait kalite kontrol istatistikleri

Dosya ismi	Toplam dizi	Dizi uzunluğu	%GC	Ortalama (mean) dizi uzunluğu	Kalite skorları (mean base quality)
Hasta-5 (2-R2)	27976976 (%-0.71)	70-151	54	139.58 (%-7.56)	36.45 (%0.61)
Hasta-5 (3-R2)	19324688 (%-0.82)	70-151	51	140.92 (%-6.67)	36.38 (%0.35)
Anne (1-R1)	44122891 (%-0.67)	70-151	53	139.99 (%-7.29)	36.65 (%0.09)
Anne (2-R1)	52195232 (%-1.13)	70-151	52	138.33 (%-8.39)	36.65 (%0.08)
Anne (3-R1)	35346112 (%-0.86)	70-151	55 (%1.85)	138.08 (%-8.56)	36.66 (%0.14)
Anne (1-R2)	44122891 (%-0.67)	70-151	53	140.03 (%-7.27)	36.41 (%0.50)
Anne (2-R2)	52195232 (%-1.13)	70-151	52	138.43 (%-8.32)	36.26 (%0.78)
Anne (3-R2)	35346112 (%-0.86)	70-151	55	138.13 (%-8.52)	36.46 (%0.68)
Kontrol (1-R1)	27890850 (%-0.86)	70-151	51	139.88 (%-7.37)	36.63 (%0.08)
Kontrol (2-R1)	27833932 (%-1.32)	70-151	53	136.60 (%-9.54)	36.66 (%0.12)
Kontrol (3-R1)	31086588 (%-0.83)	70-151	52	140.67 (%-6.84)	36.63 (%0.07)
Kontrol (1-R2)	27890850 (%-0.86)	70-151	51	139.94 (%-7.32)	36.29 (%0.59)
Kontrol (2-R2)	27833932 (%-1.32)	70-151	53	136.70 (%-9.47)	36.37 (%0.89)
Kontrol (3-R2)	31086588 (%-0.83)	70-151	52 (%-1.89)	140.71 (%-6.82)	36.37 (%0.55)

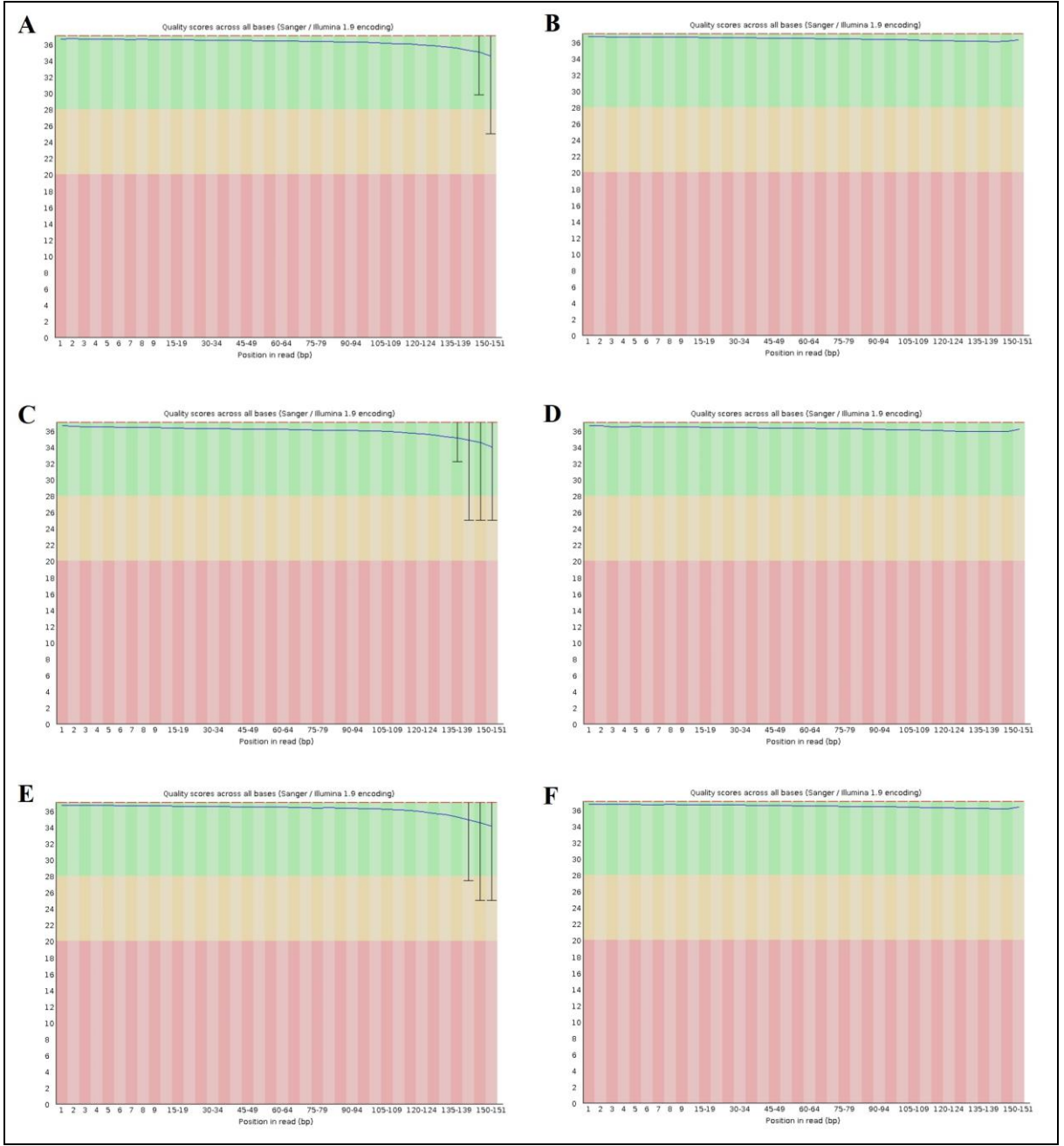
RNA dizileme analizi sonucunda elde edilen verilerin kontrolü FastQC programı kullanılarak gerçekleştirilmiş, adaptör diziler ve düşük kalitedeki bazlar kırılmıştır. Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol olmak üzere dört bireye ait sonuçların kalite filtrelemesi öncesi ve kalite filtrelemesi sonrası grafikleri Şekil 36-39'da yer almaktadır. FastQC kalite grafiklerinde yeşil, sarı ve kırmızı olmak üzere üç farklı alan olmakla birlikte; yeşil alan kalite değerlerinin yüksek olduğunu, kırmızı alan ise kalite değerlerinin düşük olduğunu göstermektedir. Dört bireye ait üç tekrarlı RNA dizileme sonuçlarının hepsinin yeşil alanda yer aldıkları ve dizileme kalitelerinin iyi olduğu görülmektedir.



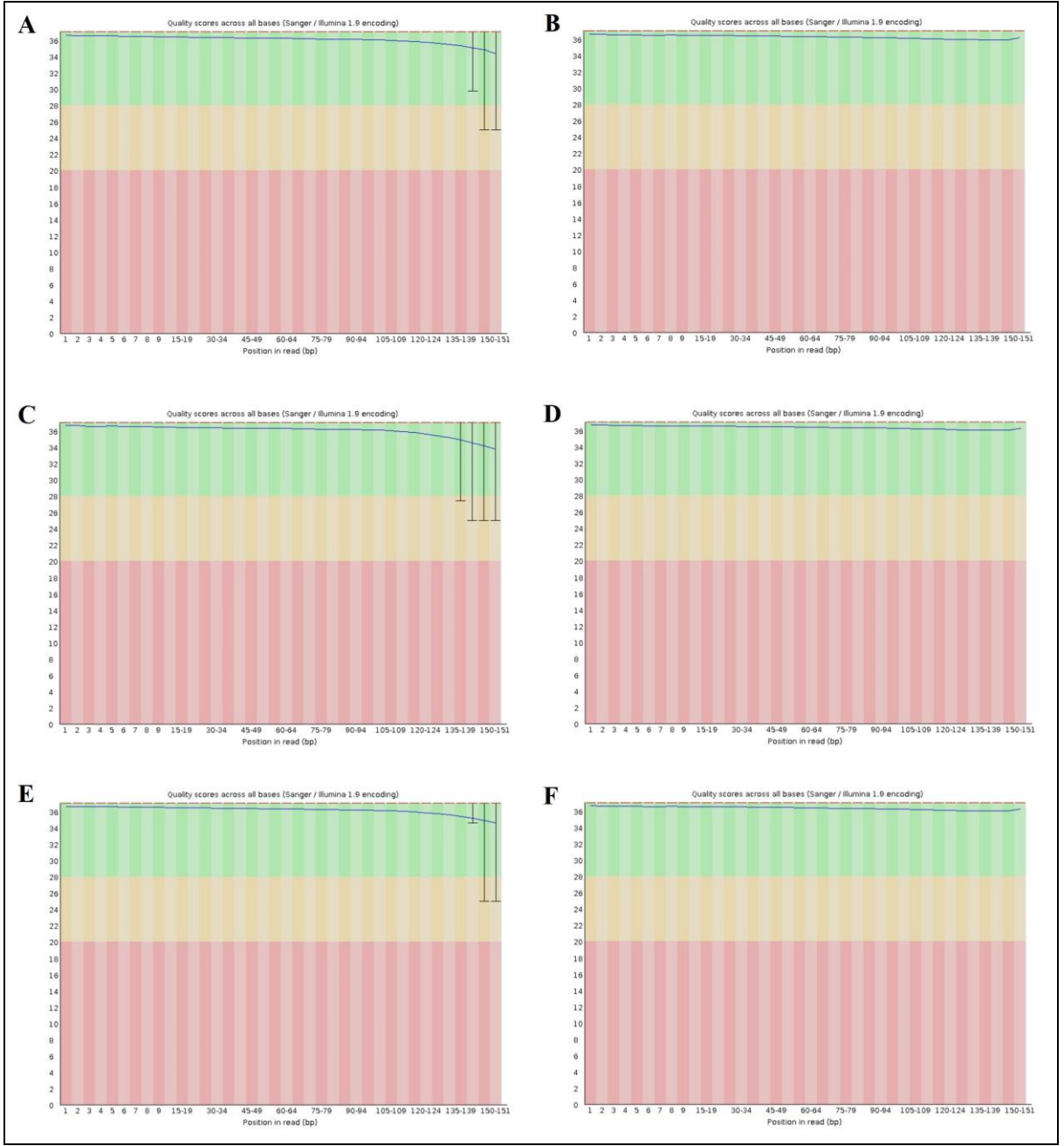
Şekil 36. Hasta-4 örneklerinin FastQC kalite grafikleri. Hasta-4 örneği birinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (A) ve sonrası (B) FastQC kalite grafiği. Hasta-4 örneği ikinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (C) ve sonrası (D) FastQC kalite grafiği. Hasta-4 örneği üçüncü tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (E) ve sonrası (F) FastQC kalite grafiği



Şekil 37. Hasta-5 örneklerinin FastQC kalite grafikleri. Hasta-5 örneği birinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (A) ve sonrası (B) FastQC kalite grafiği. Hasta-5 örneği ikinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (C) ve sonrası (D) FastQC kalite grafiği. Hasta-5 örneği üçüncü tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (E) ve sonrası (F) FastQC kalite grafiği

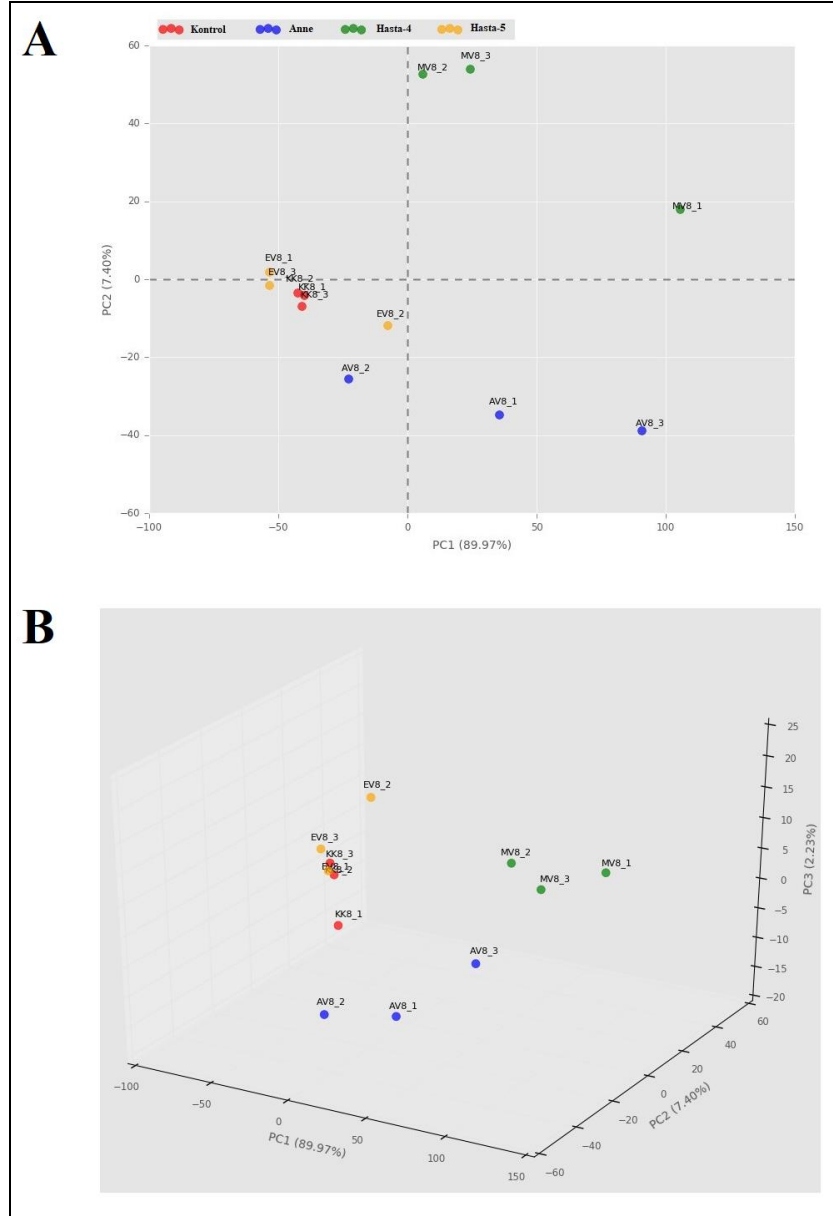


Şekil 38. Anne örneklerinin FastQC kalite grafikleri. Anne örneği birinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (A) ve sonrası (B) FastQC kalite grafiği. Anne örneği ikinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (C) ve sonrası (D) FastQC kalite grafiği. Anne örneği üçüncü tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (E) ve sonrası (F) FastQC kalite grafiği



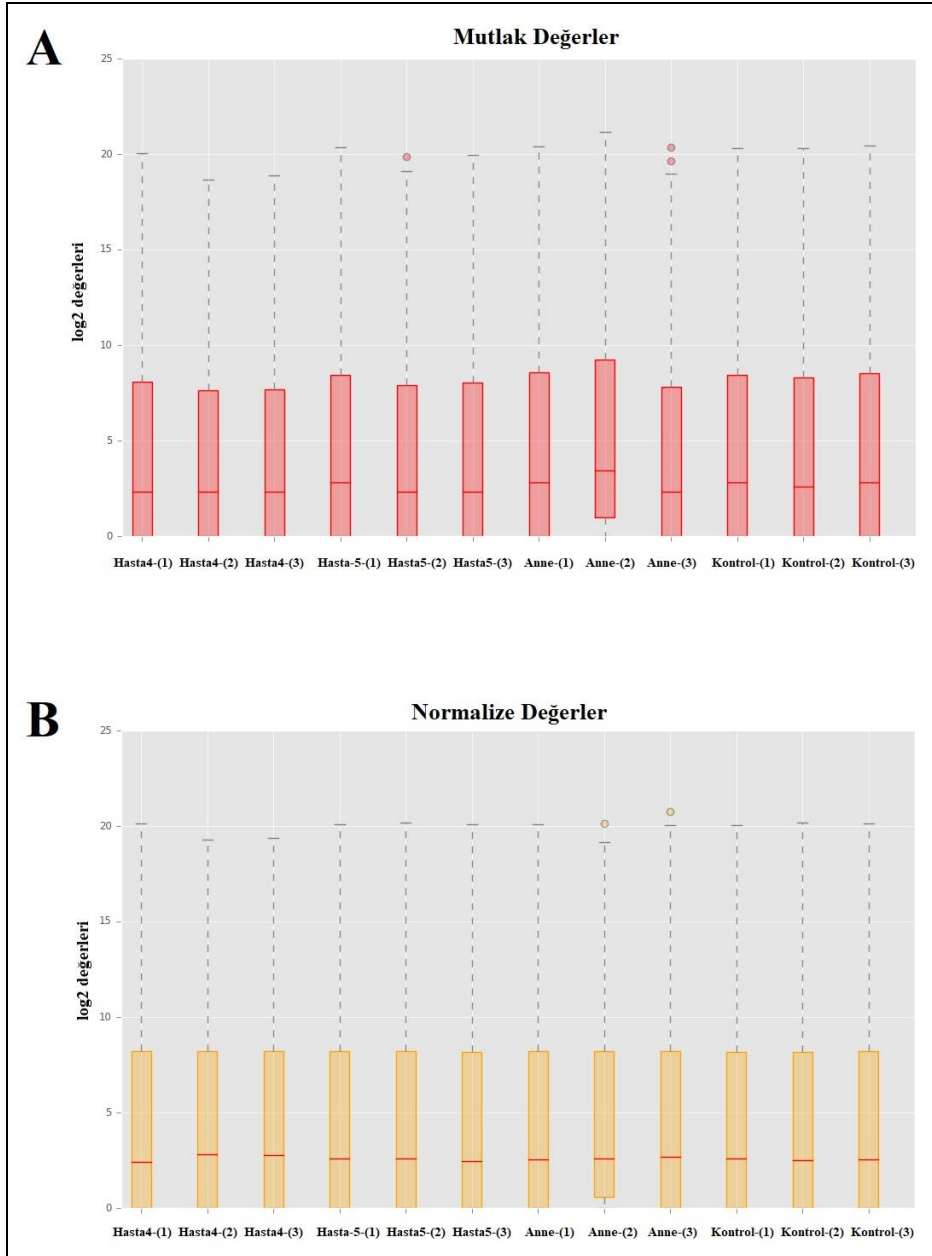
Şekil 39. Kontrol örneklerinin FastQC kalite grafikleri. Kontrol örneği birinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (A) ve sonrası (B) FastQC kalite grafiği. Kontrol örneği ikinci tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (C) ve sonrası (D) FastQC kalite grafiği. Kontrol örneği üçüncü tekerrürüne ait kalite filtrelemesi öncesi (E) ve sonrası (F) FastQC kalite grafiği

RNA dizileme verilerinin ön işleme aşamasında boyut indirgeme algoritmaları uygulanmıştır. Örneklere ait yoğunluk verileri Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis; PCA) yöntemi ile çok değişkenli uzayda incelenerek örneklerin lineer benzerlikleri gözlemlenmiştir. Örneklerin, yoğunluklarının benzerliklerine göre veri dağılımının ilk iki ve ilk üç temel bileşene izdüşümünü yansıtacak şekilde oluşturulan PCA grafikleri Şekil 40'ta yer almaktadır.



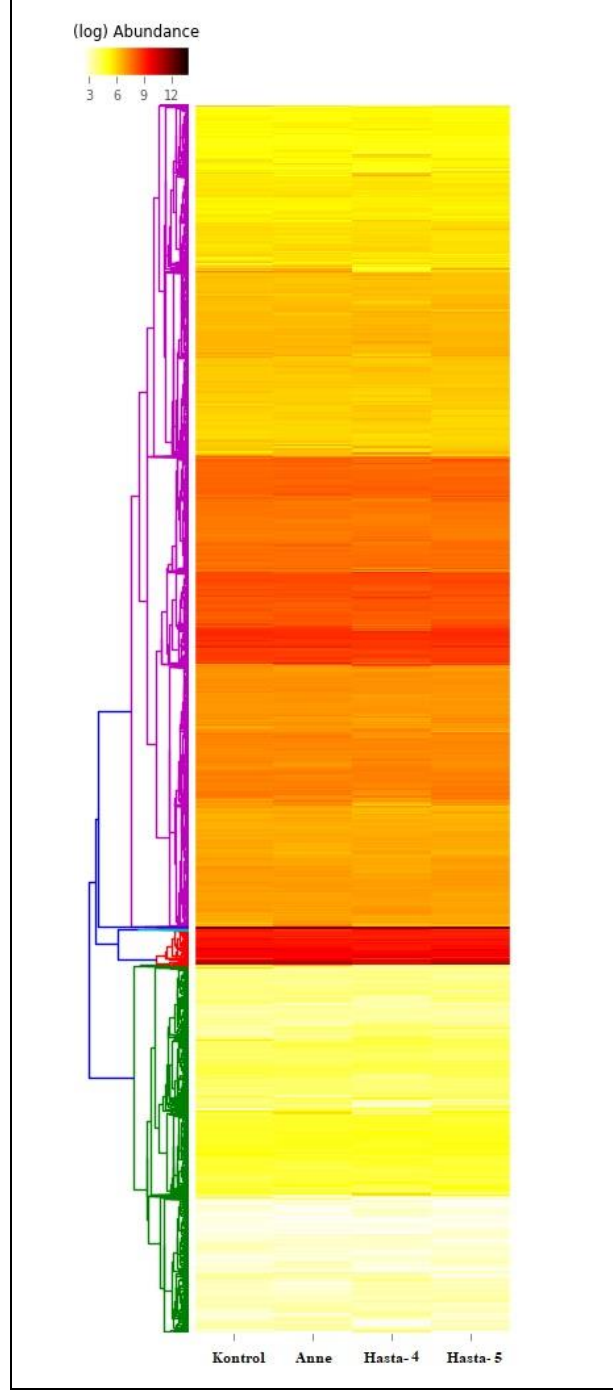
Şekil 40. Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol örneklerini içeren PCA grafikleri. **A.** ilk 2 temel bileşen, **B.** ilk 3 temel bileşen baz alınarak oluşturulmuştur. MV-8: Hasta-4, EV-8: Hasta-5, AV-8: Anne, KK-8: Kontrol'ü temsil etmektedir.

Kalite kontrole tabi tutulan FastQ formatındaki diziler STAR programı ile, yine STAR programının indeksleme algoritmasıyla oluşturulmuş insan genom indeksine (hg38-release98) hizalanarak, örneklerde bulunan genlerin yoğunluk değerleri sayı (count) cinsinden belirlenmiştir. Bu değerler log2 şeklinde ifade edilmiştir. Ham verilere ve normalize edilmiş (DESeq2) verilere ait yoğunluk dağılım grafikleri Şekil 41’de yer almaktadır.



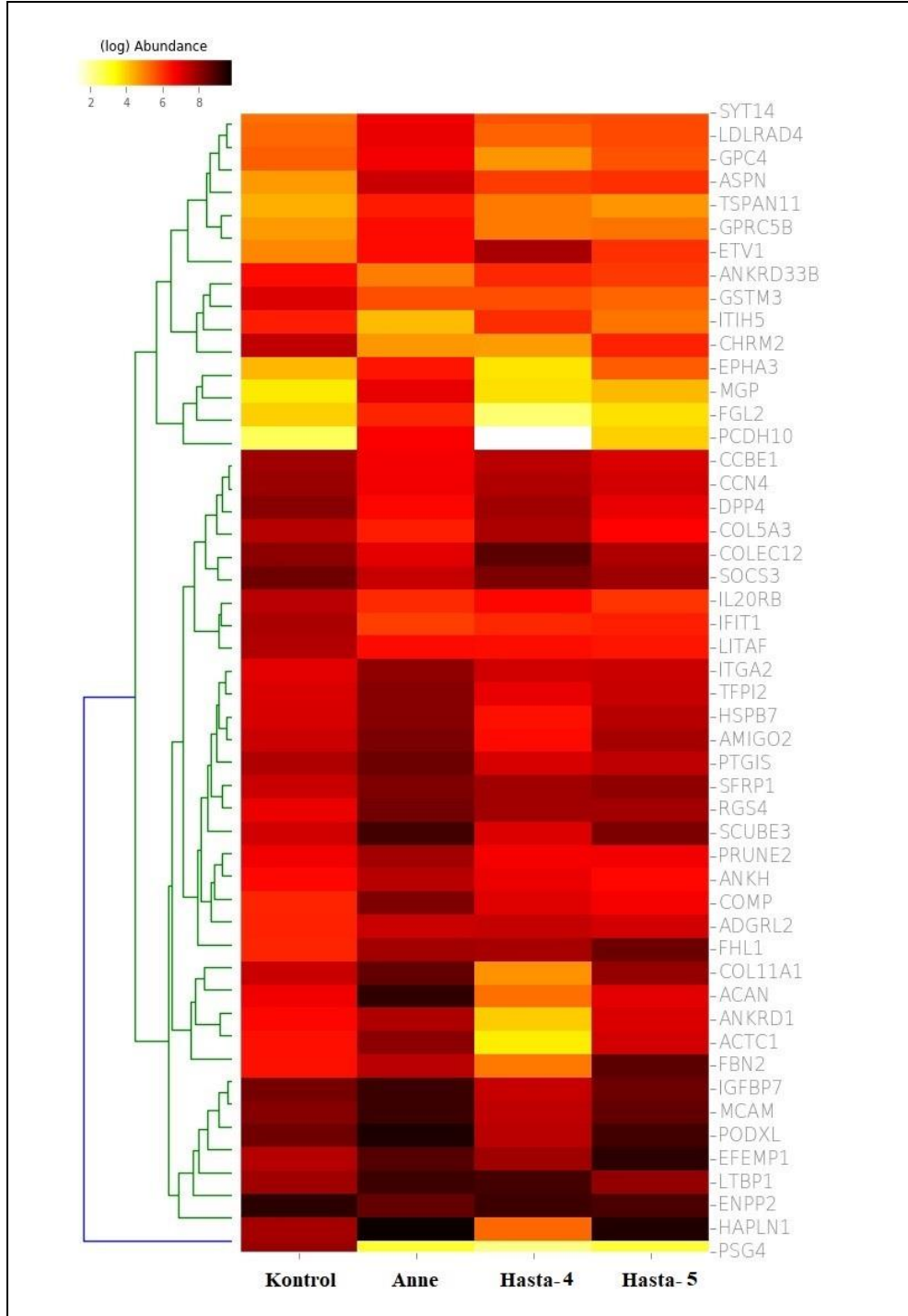
Şekil 41. Ham verilere (A) ve normalize edilmiş (DESeq2) verilere (B) ait yoğunluk dağılım grafikleri

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol olmak üzere dört bireye ait RNA dizileme analizi sonuçları ile transkriptom profilinin bütününe görmek amacıyla tüm genlere ait (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği oluşturulmuştur. Bu ısı haritası grafiği Şekil 42’de yer almaktadır.

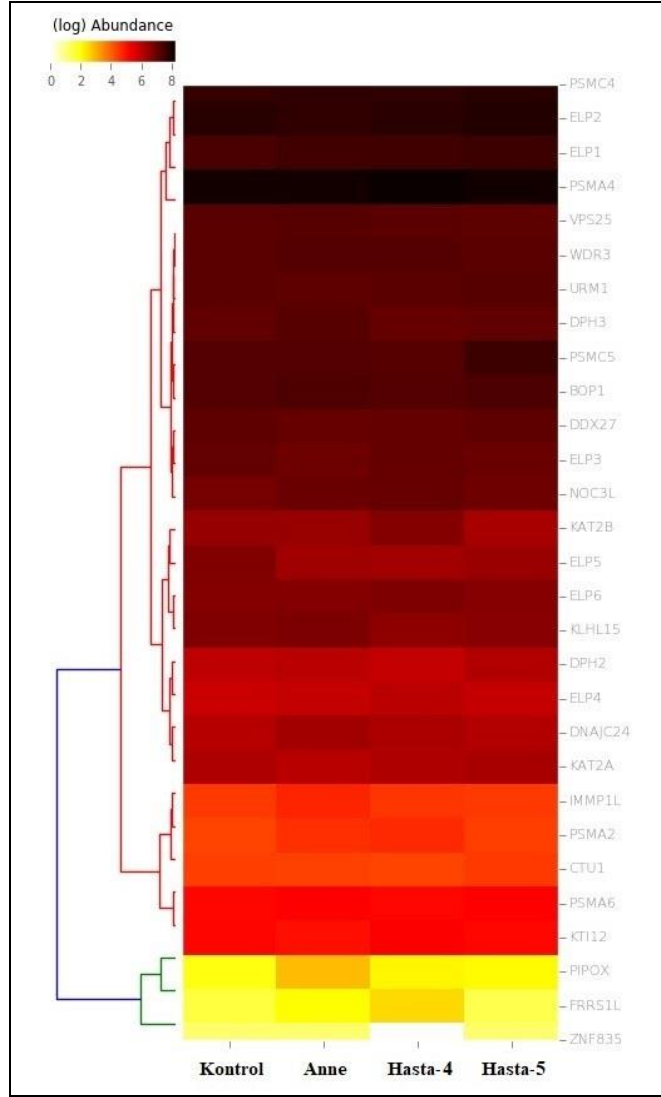


Şekil 42. Tüm genlere ait (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği

Ardından dört bireyin verileriyle en yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 genin (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği oluşturulmuştur. Bu ısı haritası grafiği Şekil 43'te yer almaktadır.



Şekil 43. En yüksek anlamlı farklılık gösteren 50 genin (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği



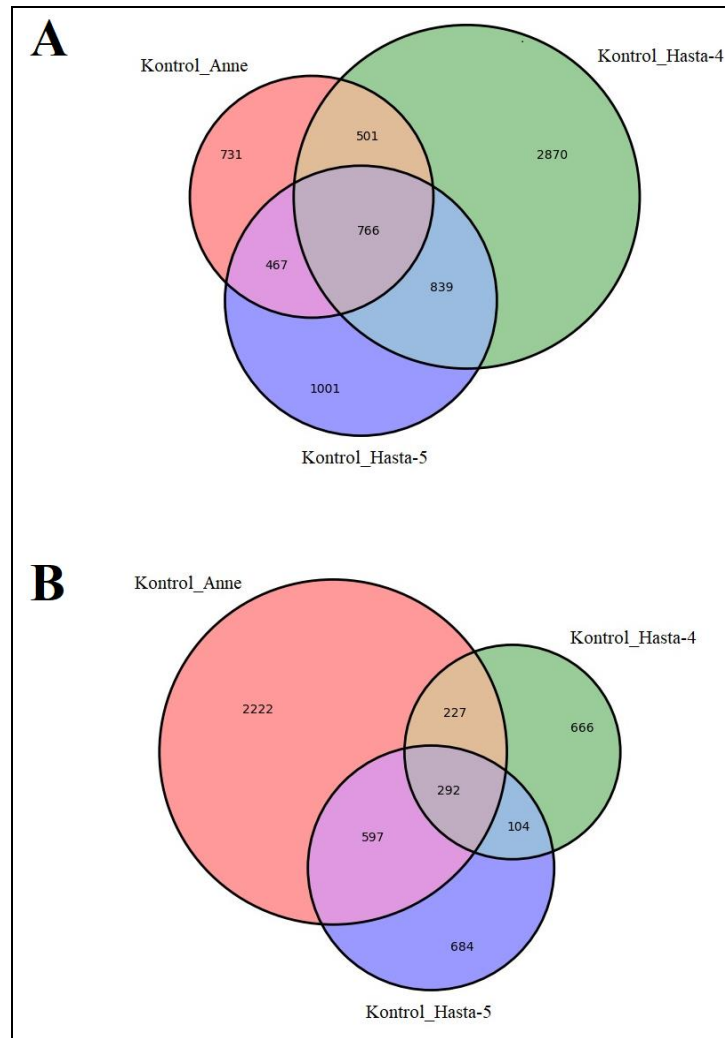
Şekil 45. Elongatör kompleksinin etkileşimde olduğu genlerin (log) normalize edilmiş (DESeq2) yoğunluk değerlerini içeren ısı haritası grafiği

Tablo 32. Elongatör kompleksi genlerinin normalize edilmiş (DeSeq2) yoğunluk değerleri

GENLER	Kontrol	Anne	Hasta-4	Hasta-5
<i>ELP1</i>	1755.19427	1958.84849	2011.22421	2045.31095
<i>ELP2</i>	2669.09109	2441.51296	2607.37818	2798.18559
<i>ELP3</i>	1311.11134	1126.01291	1260.59312	1186.90241
<i>ELP4</i>	359.952041	381.036688	439.47726	379.641185
<i>ELP5</i>	900.201105	609.16722	593.255641	639.353974
<i>ELP6</i>	870.903781	861.070512	926.716784	845.262819

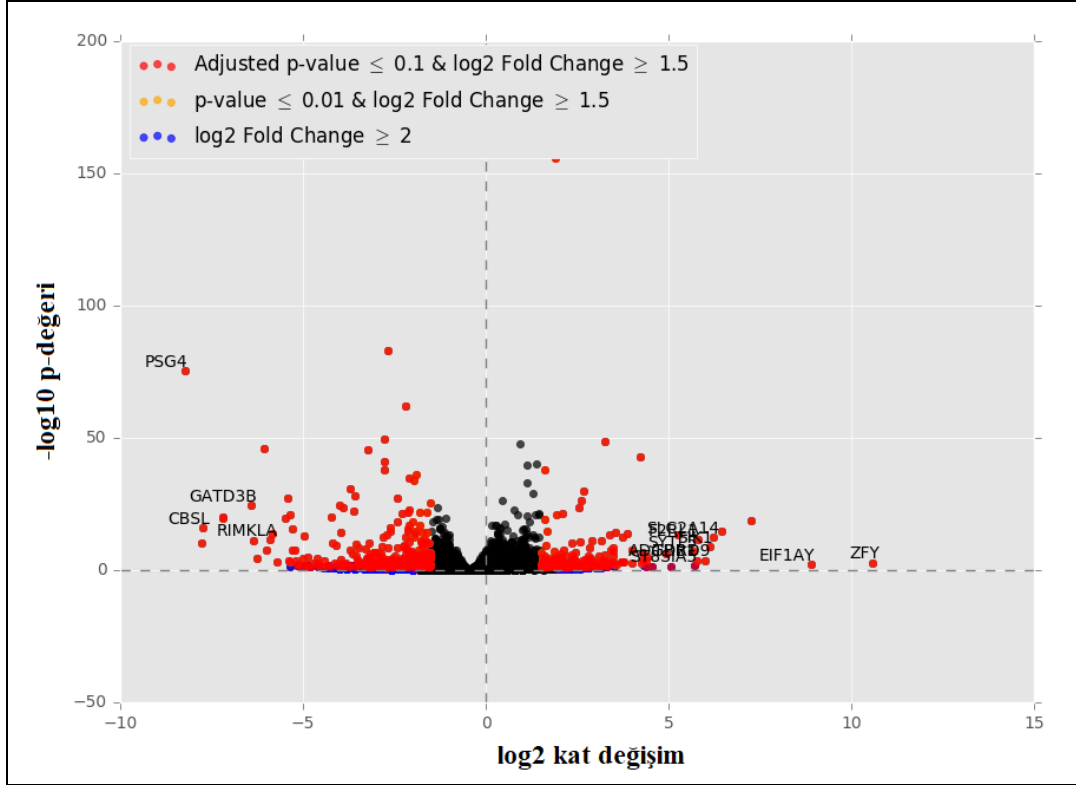
Elongatör kompleksi genlerinden *ELP5* geninin ekspresyonunun kontrol bireyde hastalara kıyasla yüksek oluşu dikkat çeken bir bulgudur. Ek çalışmalarla *ELP6* genindeki missense mutasyonun bu etkiyi yaratıp yaratmadığının test edilmesi gerekmektedir.

Hasta-4, Hasta-5 ve Anne örneklerinin Kontrol örneğiyle kıyaslanması sonucunda anlamlı azalma ve anlamlı artış gösteren genler belirlenmiş ve bu genlerin sayılarıyla Venn diyagramları oluşturulmuştur. Hasta-4, Hasta-5 ve Anne örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma ve artma gösteren gen sayılarına ait Venn diyagramları Şekil 46'da yer almaktadır.



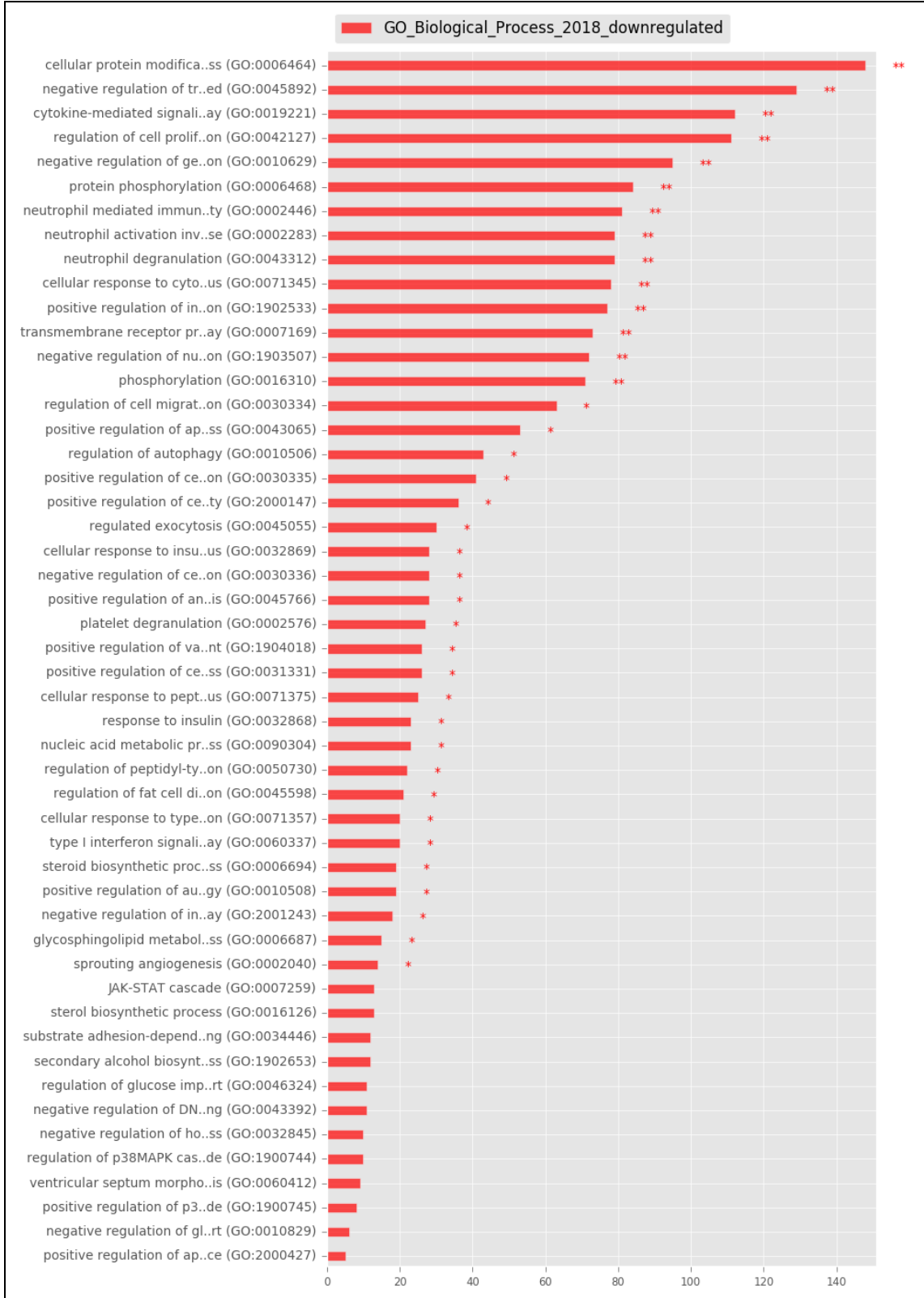
Şekil 46. Hasta-4, Hasta-5 ve Anne örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma (**A**) ve anlamlı artış (**B**) gösteren gen sayılarına ait Venn diyagramları

Karşılaştırmalı ekspresyon analizinde Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı artış ve azalma gösteren genlerin anlamlılık durumları volkan grafiği ile gösterilmiştir. Gen ekspresyon seviyelerinin kat değişimlerine (fold change) ve p-değerlerine göre oluşturulan grafik Şekil 47’de yer almaktadır.

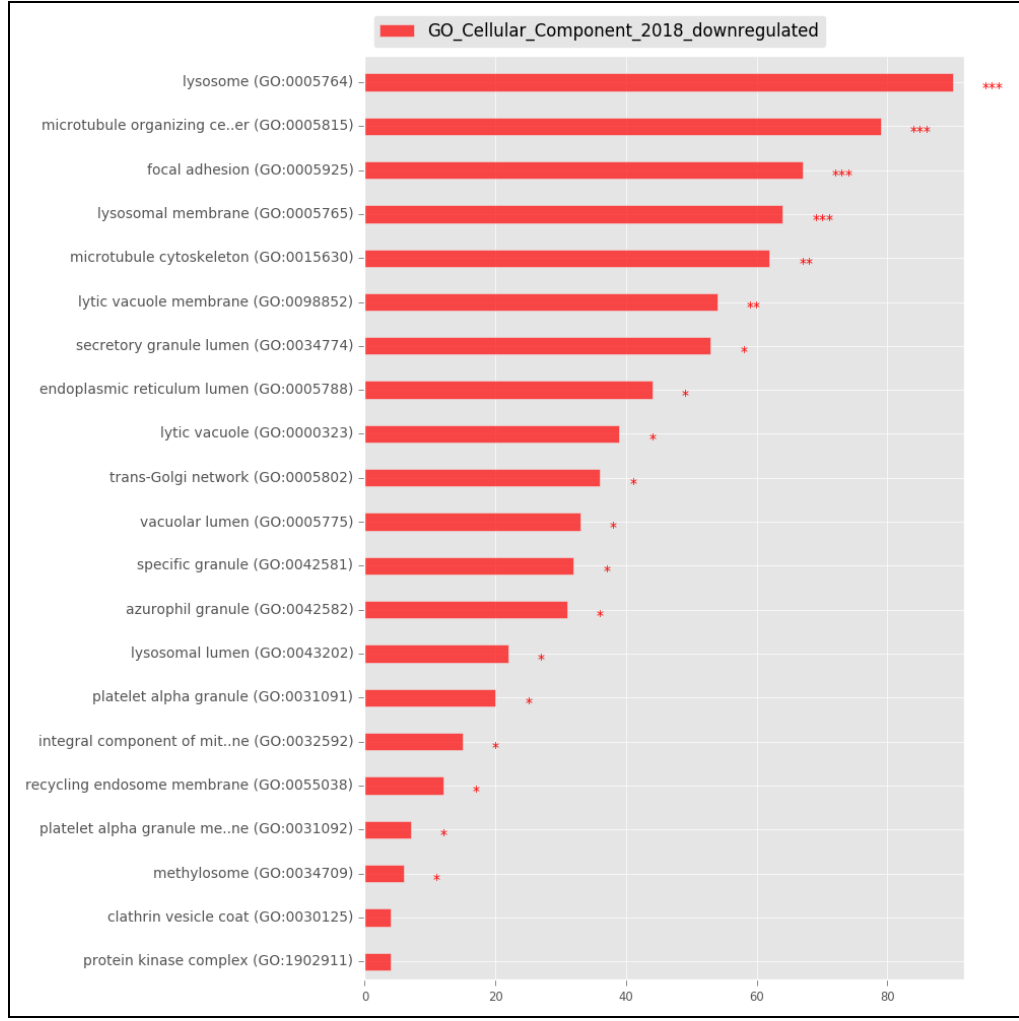


Şekil 47. Kontrol ve hasta örneklerinin (Hasta-4 ve Hasta-5) karşılaştırmalı ekspresyon analizini özetleyen volkan grafiği

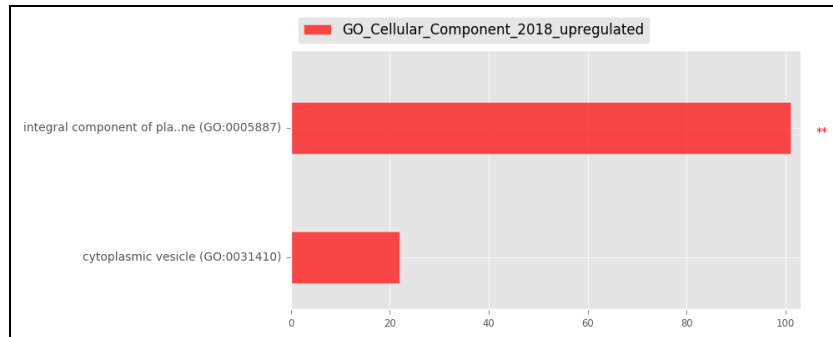
Karşılaştırmalı ekspresyon analizi sonucunda anlamlı artış ve azalma gösteren genler için Gene Set Enrichment Analizi (GSEA) Gseapy (ver. 0.9.16) Python kütüphanesi kullanılarak ve Gene Ontology (biyolojik süreç, moleküler fonksiyon, hücresel bileşen) ile KEGG veritabanları baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında GO veritabanından elde edilen veriler kullanılmıştır. Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma ve artış gösteren genlerde GO biyolojik süreç ve hücresel bileşen gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları Şekil 48-50’de yer almaktadır. Grafiklerde y eksenini yolak ismini, x eksenini o yolaktaki gen sayısını ifade etmektedir.



Şekil 48. Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma gösteren genlerde GO_Biological_Process_2018 gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları. p-value ≤ 0.05(*), 0.01(**), 0.001(***)



Şekil 49. Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma gösteren genlerde GO_Cellular_Component_2018 gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları. p-value ≤ 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***)



Şekil 50. Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı artış gösteren genlerde GO_Cellular_Component_2018 gen kümelerine yönelik enrichment analizi sonuçları. p-value ≤ 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***)

RNA dizileme analizi sonucunda ekspresyonu en fazla değişen ilk 50 gen arasından *CHRM2*, *TLR4*, *LITAF*, *GSTM3* genleri ve kromatin organizasyonunda rol oynayan genlerden *SMYD3*, *H2BC9*, *H3C6* genleri seçilerek validasyon için qPCR işlemi yapılmıştır. Tablo 33'te yer alan RNA dizileme sonucunda elde edilen ekspresyon değişimleri qPCR işlemiyle doğrulanmıştır. *H2BC9* (H2B Clustered Histone 9) ve *H3C6* (H3 Clustered Histone 6)'nın Hasta-4 ve Hasta-5'te Kontrol bireye kıyasla ekspresyonları yüksek iken, *SMYD3* (SET And MYND Domain Containing 3)'ün ekspresyonu ise düşüktür. *SMYD3* özellikle Histone 3'ün Lys-4'ünü metillemekte ve RNA polimeraz kompleksinin bir üyesi olarak transkripsiyonel aktivasyonda rol oynamaktadır.

Tablo 33. Hasta-4, Hasta-5 ve Anne örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla RNA dizileme analizi sonucu saptanan log2 kat değişimler

GENLER	<i>SMYD3</i>	<i>H2BC9</i>	<i>H3C6</i>	<i>CHRM2</i>	<i>TLR4</i>	<i>LITAF</i>	<i>GSTM3</i>
Hasta-4/Kontrol	-1.578	1.144	1.611	-4.720	-3.156	-2.292	-2.712
Hasta-5/Kontrol	-1.147	0.884	1.019	-2.062	-2.461	-2.084	-2.843
Anne/Kontrol	-0.482	0.592	0.957	-3.866	-0.044	-1.404	-1.909

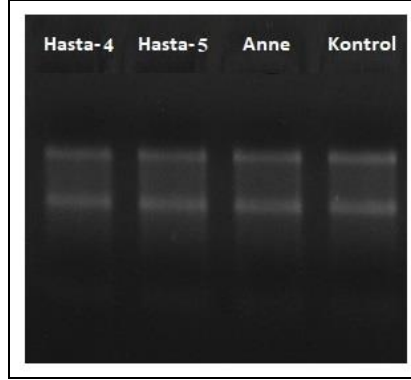
4.2.1.4. Primer Kültür Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve tRNA Modifikasyon Analizi

tRNA modifikasyon analizi amacıyla Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerinin primer hücre kültürlerinden izole edilen RNA miktarları ve saflık değerleri Tablo 34'te yer almaktadır.

Tablo 34. tRNA modifikasyon analizi için izole edilen RNA'ların miktar ve saflık değerleri

Örnek	A260/280 Oranı	A260/230 Oranı	Konsantrasyon (ng/μl)	Hacim (μl)	Miktar (ng)
Hasta-4	1.97	2.28	595.63	15	8934.45
Hasta-5	1.97	2.28	586.38	15	8795.7
Anne	1.93	2.05	394.02	15	5910.3
Kontrol	1.92	2.21	416.47	15	6247.05

Uygun konsantrasyon ve saflıkta izole edilen RNA'lar agaroz jele yüklenmiş ve kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Jel elektroforez görüntüsü Şekil 51'de yer almaktadır.



Şekil 51. tRNA modifikasyon analizi için izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Üre-page elektroforezi ile total RNA örneklerinden tRNA'lar elde edilmiştir. Saflaştırılmış tRNA miktarlarına ait bilgiler Tablo 35'te yer almaktadır.

Tablo 35. İzole edilen tRNA'ların miktar ve saflık değerleri

Örnek	Başlangıçtaki total RNA miktarı (µg)	Purifiye edilen tRNA konsantrasyonu (ng/µl)	Purifiye edilen tRNA hacmi (µl)
Hasta-4	5	15.13	10
Hasta-5	5	14.02	10
Anne	5	16.01	10
Kontrol	5	14.29	10

4.2.1.4.1. tRNA Modifikasyon Analizi Sonuçları

LC-MS analizine tabi tutulan örneklerde kanonik adenosin, guanosin, sitidin ve üridin dâhil olmak üzere toplam 49 farklı nükleozidin miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen pik alanları modifiye nükleozid/modifiye olmayan nükleozid şeklinde oranlanarak normalizasyon işlemi yapılmıştır. Hem ham veri hem de normalize edilmiş verilere ait bilgiler Tablo 36'da yer almaktadır.

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireydeki tRNA modifikasyonlarına ait normalizasyon verileri kıyaslanmıştır. Pek çok nükleozid modifikasyonu için Kontrol'e ait

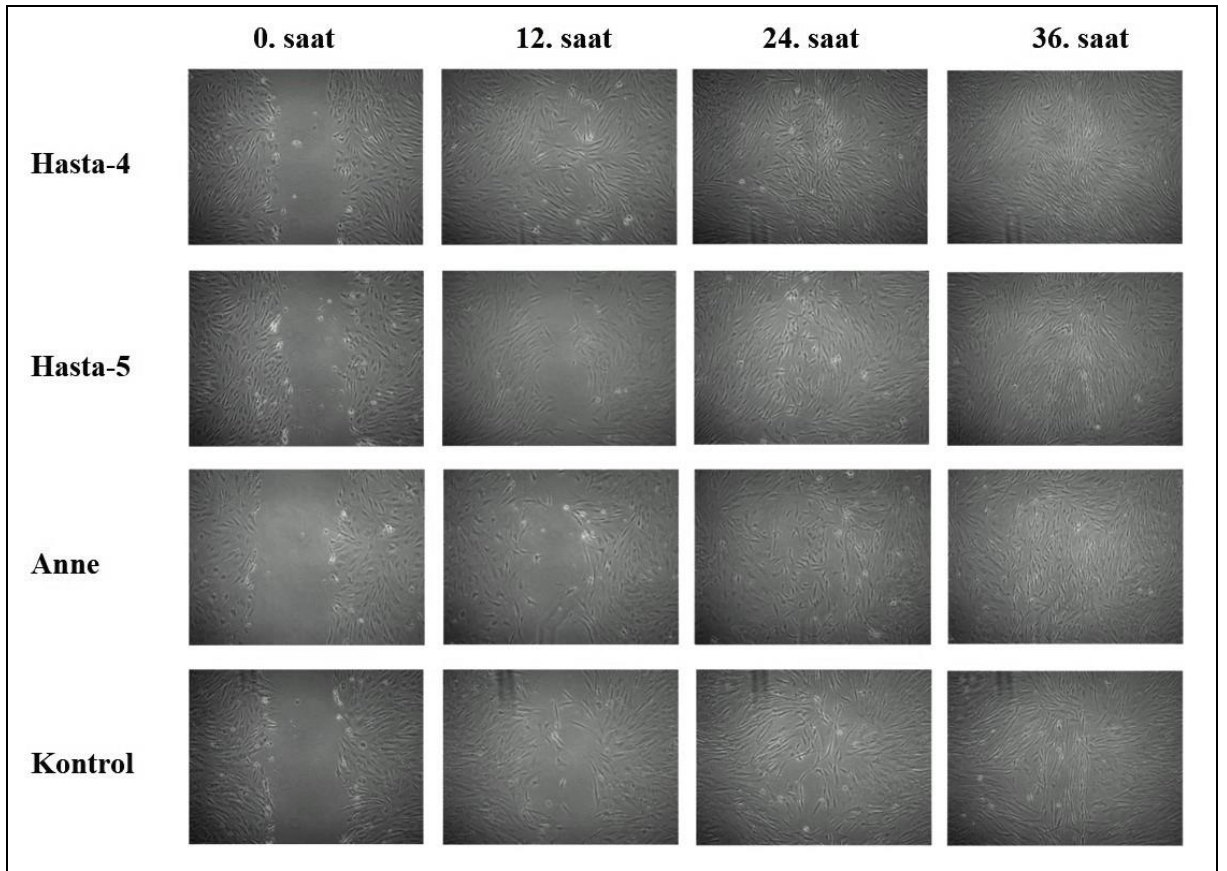
değerler diğer bireylerin değerlerinden yüksektir. Normalizasyon değerleri excel programında renklendirilmiş ve toplam profiller görselleştirilmiştir. Oluşturulan görüntü Şekil 52’de yer almaktadır.

Tablo 36. tRNA modifikasyon analizinde saptanan nükleozidlerin pik alanı bilgileri ve normalizasyon verileri

Nükleozid	Sembol	Ham Pik Alanı				Normalizasyon Verileri			
		Hasta-4	Hasta-5	Anne	Kontrol	Hasta-4	Hasta-5	Anne	Kontrol
Cytidine (Sitidin)	C	566423	884415	735264	253717	1	1	1	1
Adenosine (Adenozin)	A	968562	1134261	1126041	703916	1	1	1	1
Guanosine (Guanozin)	G	34291	53854	58954	25121	1	1	1	1
Uridine (Üridin)	U	28334	44407	35800	11987	1	1	1	1
3'-O-methyladenosine	3'-OMeA	31269	35710	47041	25549	0.0322839426	0.0314830537	0.0417755659	0.0362955239
2'-O-methylcytidine	Cm	698	1894	817	1401	0.0012322946	0.0021415286	0.0011111655	0.0055219004
3-methylcytidine	m3C	21831	45511	36862	13504	0.0385418671	0.0514588739	0.0501343735	0.0532246558
5-methylcytidine	m5C	17250	23370	27680	19090	0.0304542718	0.0264242465	0.0376463420	0.0752413122
N6-isopentenyladenosine	i6A	60	58	61	52	0.0000619475	0.0000511346	0.0000541721	0.0000738725
5,2'-O-dimethylcytidine	m5Cm	11	27	69	15	0.0000194201	0.0000305287	0.0000938438	0.0000591210
1-methyladenosine	m1A	31586	40197	32618	17296	0.0326112319	0.0354389334	0.0289669737	0.0245711136
2-thiocytidine	s2C	5151	6635	8294	6063	0.0090939104	0.0075021342	0.0112803020	0.0238967038
N2,N2,7-trimethylguanosine	m2,2,7G	169	95	62	107	0.0049284069	0.0017640287	0.0010516674	0.0042593846
N4-acetyl-2'-O-methylcytidine	ac4Cm	120	72	170	117	0.0002118558	0.0000814097	0.0002312095	0.0004611437
N6-methyladenosine	m6A	69561	116276	122191	52298	0.0718188407	0.1025125610	0.1085138108	0.0742957967
3'-O-methylcytidine	3'-OmeC	698	957	833	1401	0.0012322946	0.0010820712	0.0011329264	0.0055219004
2'-O-methyladenosine	Am	31639	35773	46916	25741	0.0326659522	0.0315385965	0.0416645575	0.0365682837
N2, N2-dimethylguanosine	m22G	1654	3378	3386	1055	0.0482342306	0.0627251458	0.0574346100	0.0419967358
2'-O-methyluridine	Um	32	280	160	306	0.0011293852	0.0063053122	0.0044692737	0.0255276550
2'-O-methylguanosine	Gm	34	27	20	10	0.0009915138	0.0005013555	0.0003392475	0.0003980733
1-methylguanosine	m1G	2629	4078	3659	1594	0.0766673471	0.0757232518	0.0620653391	0.0634528880
7-methylguanosine	m7G	359	235	248	179	0.0104692193	0.0043636499	0.0042066696	0.0071255125
N2-methylguanosin	m2G	60	97	67	90	0.0017497302	0.0018011661	0.0011364793	0.0035826599
2-thiouridine	s2U	410	379	515	129	0.0144702478	0.0085346905	0.0143854749	0.0107616585
4-thiouridine	s4U	1352	2029	1953	1137	0.0477165243	0.0456909947	0.0545530726	0.0948527572
5-methyluridine	m5U	4837	5746	8752	6283	0.1707136303	0.1293940145	0.2444692737	0.5241511638
N4-acetylcytidine	ac4C	37	67	26	125	0.0000653222	0.0000757563	0.0000353614	0.0004926749
3'-O-methyluridine	3'-OMeU	32	280	173	318	0.0011293852	0.0063053122	0.0048324022	0.0265287395
5-methyl-2-thiouridine	m5s2U	739	793	678	549	0.0260817393	0.0178575450	0.0189385475	0.0457996163
5-methoxyuridine	mo5U	2710	2082	3144	3450	0.0956448084	0.0468845002	0.0878212291	0.2878117961
Pseudouridine	Y	69	191	62	93	0.0024352368	0.0043011237	0.0017318436	0.0077584049
3-methyluridine	m3U	1515	2647	2285	1014	0.0534693301	0.0596077195	0.0638268156	0.0845916409
1-methylpseudouridine	m1Y	7526	9688	7889	8603	0.2656172796	0.2181638030	0.2203631285	0.7176941687
5-hydroxymethylcytidine	hm5C	474	282	218	234	0.0008368304	0.0003188548	0.0002964921	0.0009222874
5,2'-O-dimethyluridine	m5Um	5316	5607	6293	7649	0.1876191148	0.1262638773	0.1757821229	0.6381079503
N6-threonylcarbamoyladenine	t6a	8373	15427	16994	4564	0.0086447744	0.0136009261	0.0150918128	0.0064837282
2-methylthio-N6-threonylcarbamoyladenine	ms2t6A	287	549	553	339	0.0002963156	0.0004840156	0.0004911011	0.0004815916
5-carboxymethyluridine	cm5U	83	173	116	133	0.0029293428	0.0038957822	0.0032402235	0.0110953533
5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine	mcm5s2U	5	7	13	10	0.0001764664	0.0001576328	0.0003631285	0.0008342371
5-Methoxycarbonylmethyluridine	mcm5U	2861	2925	3635	3961	0.1009740947	0.0658679938	0.1015363128	0.3304413114
2-methylthio-N6-isopentenyladenosine	ms2i6A	43	118	111	30	0.0000443957	0.0001040325	0.0000985755	0.0000426187
5-taurinomethyl-2-thiouridine	tm5s2U	24	13	31	40	0.0008470389	0.0002927466	0.0008659218	0.0033369484
5-oxyacetic acid uridine	cmo5U	99	136	25	43	0.0034940354	0.0030625802	0.0006983240	0.0035872195
5-carbamoylmethyluridine	ncm5U	27	50	176	22	0.0009529188	0.0011259486	0.0049162011	0.0018353216
5-taurinomethyluridine	tm5U	285	131	89	91	0.0100585869	0.0029499854	0.0024860335	0.0075915575
5-formyl-2'-O-methylcytidine	f5Cm	15	13	35	10	0.0000264820	0.0000146990	0.0000476019	0.0000394140
Dihydrouridine	D	178	21	55	166	0.0062822051	0.0004728984	0.0015363128	0.0138483357
5-formylcytidine	f5c	26	26	33	11	0.0000459021	0.0000293980	0.0000448818	0.0000433554
5-methoxycarbonylmethyl-2'-o-methyluridine	mcm5Um	482	721	1164	1067	0.0170113644	0.0162361790	0.0325139665	0.0890130975

4.2.1.5. Primer Kültür Hücrelerinde Scratch Assay İle Migrasyon Analizi

Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerinden elde edilen hücrelerin migrasyon hızlarını analiz etmek amacıyla scratch assay yapılmıştır. Bu amaçla 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler konfluent olduklarında pipet ucu ile lineer çizikler atılmış ve çizikler kapanana kadar incelemede bulunulmuştur. Elde edilen görüntüler Image-J software kullanılarak analiz edilmiştir. Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol'e ait mikroskop kamerası ile çekilen scratch assay görüntüleri Şekil 54'te yer almaktadır.



Şekil 54. Scratch assay analizinde sırasıyla 0., 12., 24. ve 36. saatlerde çekilen Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylere ait hücrelerin görüntüleri

Dört bireye ait hücrelerin migrasyon hızları Kruskal-Wallis ve Tamhane's T2 Post-Hoc testleri kullanılarak SPSS programında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hasta-4'e ait hücrelerin migrasyon hızının diğer bireylere ait hücrelerin migrasyon hızından anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Hasta-4'ün hücrelerinin migrasyon hızı en yüksek iken, bunu Hasta-5, Anne ve Kontrol bireye ait hücreler takip etmektedir.

5. TARTIŞMA

Beyin ve merkezi sinir sisteminin büyümesi ve gelişiminin bozulması sonucu oluşan nörogelişimsel bozukluklar zihinsel yetersizlik, motor bozukluklar, otizm spektrum bozuklukları, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu ve bazı epileptik sendromlar gibi geniş bir yelpazeyi içermektedir. Genetik ve fenotipik heterojenite söz konusu olduğundan tanı ve tedavi stratejilerinde zorluklar yaşanmaktadır. Hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkisiyle oluşabilen bu bozuklukların bazı özellikleri doğum sonrası ilaçlar ve özel eğitim planlamasıyla iyileştirilebilmektedir (1). Bu amaçla öncelikli olarak hastalara doğru tanı konması ve bu doğrultuda tedavi planlaması yapılması gerekmektedir.

Günümüzde moleküler düzeyde tanımlanmış kalıtsal insan hastalıklarının çoğu monogenik karakterdedir; yani net bir şekilde ayırt edilebilen hastalık durumu tek bir gendeki hatadan kaynaklanmaktadır. Ancak diğer birçok genetik hastalık daha karmaşık kalıtım motifi sergilemektedir. Bu grupta genetik heterojeniteden dolayı çok sayıdaki farklı genin herhangi birindeki mutasyon aynı hastalığa neden olabilmektedir (76). Son 15-20 yılda, genetik ve genomik alanındaki teknolojik ve metodolojik ilerlemeler sayesinde karmaşık nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili mutasyonlar benzeri görülmemiş bir şekilde tanımlanmaya başlamıştır. Günümüze kadar nörogelişimsel bozukluklar 1.000 lokusun üzerindeki mutasyonla ilişkilendirilmiştir (40). Nörogelişimsel bozukluklarda etiyolojik değişkenlik, heterojenlik ve tanımlanan birkaç yüz risk geni göz önüne alındığında; bireysel hastalar için genotip-fenotip tabanlı tanı zorunlu hale gelmiştir (17). Ayrıca nörogelişimsel bozukluğa sahip hastalar benzer fenotipler gösterebilirler bile genetik olarak çok heterojen bir grubu temsil etmektedir ve aynı varyantlara sahip birden fazla hastanın bulunması oldukça zordur.

Çalışmamızın ilk aşamasında ebeveynleri akraba evliliği olan ve epilepsi ile birlikte beyin malformasyonu gözlenen nörogelişimsel bozukluğa sahip beş hastada, hastalığın altında yatan genetik değişiklikler belirlenerek genotip-fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla hastalar ve ebeveynleri dâhil olmak üzere toplam 11 bireyde tüm ekzom dizileme analizi yapılmıştır.

5.1. *OCLN* Geni

Çalışma grubundaki nörogelişimsel bozukluğu olan hastaların klinik özellikleri doğrultusunda tüm ekzom dizileme işlemi ve biyoinformatik analizler sonucunda Aile-1 ve Aile-2’de *OCLN* geni hastaların fenotipinden sorumlu aday gen olarak belirlenmiştir.

O’Driscoll ve ark. (2010), *OCLN* genindeki varyantların BLC-PMG’ye neden olduğunu rapor etmişlerdir. BLC-PMG intrakraniyal kalsifikasyon ve polimikrogiri ile karakterize edilen ve otozomal resesif kalıtılan nadir nörogelişimsel bir bozukluktur. BLC-PMG fenotipine sahip hastalarda bilateral simetrik polimikrogiri ve gri cevher kalsifikasyonunun yanı sıra mikrosefali, gelişimin durması ve erken başlangıçlı nöbetler görülmektedir (100). Ayrıca rapor edilen hastaların bazılarında böbrek fonksiyon bozukluğuna benzer bir ekstrakraniyal fenotip de gözlenmiştir (168-170).

OCLN geni tarafından kodlanan Okludin, endotel ve epitel sıkı bağlantı noktalarının her yerinde bulunan bir proteindir ve kan beyin bariyerinin gelişimi ve sürdürülmesi için son derece önemlidir (105, 171). Hücreler arası sıkı bağlantılar epitelyal ve endotel dokular için yapısal bütünlük sağlamakta, homeostazın sürdürülmesi için hayati önem taşıyan son derece polarize bariyerler olarak işlev görmektedirler (172). İnsan dışındaki türlerde *OCLN* ortologlarının analizi sonucunda Okludin yüksek derecede korunduğu görülmüştür. Okludin ve özellikle genin 3. ve 4. ekzonları tarafından kodlanan Marvel domain’in gelişen insan beyinde etkili protein fonksiyonu için kritik olduğu ve *OCLN* genindeki mutasyonların, kan beyin bariyerini veya downstream sinyal olaylarını bozarak BLC-PMG’ye neden olduğu bildirilmiştir (100). Membran appozisyonunda rol oynayan Marvel domain’in bir kısmından veya tamamından yoksun protein formlarının sitoplazmada eksprese edilirken, tüm Marvel domain’i içeren formların hücre zarı üzerinde ifade edildiği gösterilmiştir (100, 173).

Yabanıl tip yetişkin farede Okludin ekspresyonu, serebral korteksin 2/3 katmanlarında ve hem nakavt fare modelinde hem de BLC-PMG’li olgulardaki beyin kalsifikasyon modelini yansıtan serebellumda belirgindir. Raleigh ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada *OCLN* geninin 3. ekzonundan yoksun bir klon ile üretilen fare modelinin, herhangi bir PMG kanıtı içermediği bildirilmiştir. Farelerin doğum sonrasında yaşayabildikleri, homozigot mutant erkeklerin çiftleşemediği ve dişilerin emme ile ilgili problemleri olduğu; ancak epilepsi, gelişimin durması gibi insanlarda görülen şiddetli nörogelişimsel bozukluklara ait özelliklerin

hiçbirini göstermedikleri rapor edilmiştir. Okludin eksikliği olan farelerin beyinde, özellikle kılcal damarların ve kılcal damar venüllerinin duvarları boyunca ilerleyen serebellar ve bazal gangliyon kalsifikasyonu gösterdiği belirtilmiştir. Farelerdeki ekstraserebral anomalilere dair kanıtlar da literatürde bildirilen hastalarda bulunmamaktadır (174). Bu farklılıklar, farelerde Okludinin eksik nakavtı veya Okludin ekspresyonu ve fonksiyonunda dokuya özgü farklılıklar dâhil olmak üzere bir dizi nedenden kaynaklanıyor olabilir.

Okludin, diğer proteinler arasında, Par3, Par6, PKC, PATJ ve p85 α içeren, korunmuş bir polarite kompleksinin yeniden devresi yoluyla epitel hücre göçünde önemli olduğu gösterilmiştir. Etienne-Manneville ve ark. (2001), bir epitelyal yara kapanma deneyinde Okludini siRNA ile knockdown ederek, mikrotübül yeniden oryantasyonunda, hücre çıkıntılarının oluşumunda ve yara iyileşmesindeki değişiklikleri bildirmişlerdir (175). Göç eden epitel hücrelerde olduğu gibi Okludin içeren bir bağlantı kompleksi, insan beyin gelişiminde nöronların göç etmesi için de gerekli olabilir (176). Epitel hücre döngüsünde Okludin rolünü destekleyen çalışmalar da mevcuttur. Runkle ve ark. (2011) mitoz sırasında Okludin hücre zarında sentrozomal yeniden lokalizasyonunu ve γ -tubulin, perisentrin ve sentrozom fonksiyonlarında rolleri olduğu bilinen proteinlerle ilişkisini göstermişlerdir. Ayrıca, Okludin fosforilasyonunun hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (177).

OCLN genindeki mutasyonlar doğum öncesi ve sonrası yaşamdaki hayati işlevleri bozan kortikal malformasyonlara neden olmaktadır. Literatürde progresif mikrosefali, beyin kalsifikasyonu ve polimikrogiri, zihinsel yetersizlik ve epilepsi dâhil olmak üzere nörolojik ve klinik semptomları olan 24 aileden 35 olguda 16 farklı *OCLN* gen mutasyonu tanımlanmıştır (100, 168-170, 172, 178, 179). Çalışma grubumuzdaki Aile-1’de yer alan Hasta-1 ve Hasta-2’de *OCLN* geninde tespit edilen c.173_194del22; p.Trp58Phefs*10 (NM_001205254.1) frameshift mutasyon; Aile-2’de yer alan Hasta-3’te *OCLN* geninde tespit edilen c.199A>T; p.Ile67Phe (NM_001205254.1) missense mutasyon hastaların fenotipik değişiklikleriyle ilişkili olabilecek genomik değişiklikler olarak önceliklendirilmiştir. İki mutasyon da hastalarda homozigot, ebeveynlerinde ise heterozigot formda bulunmaktadır. Çalışmamızda yer alan üç hasta dâhil olmak üzere; bugüne kadar tanımlanan *OCLN* geni mutasyonları ve hastaların klinik özellikleri Tablo 37’de detaylı bir şekilde yer almaktadır.

Tablo 37. OCLN geninde mutasyon saptanan hastaların genetik ve klinik özellikleri

Olgu raporu (Aile/hasta numarası)	Ekzon	Nükleotid değişikliği	Amino asit değişikliği	Klinik Özellikler															
				Cinsiyet	Beslenme zorluğu	Görme bozukluğu	İşitme bozukluğu	Büyüme geriliği / GG	Hipotoni	Hiperrefleks/ spastisite	Böbrek tutulumu	Diğer organ tutulumu	Epilepsi	Mikrosefali	Korpus kallozum	PMG	BLC	Lateral ventrikül dilatasyonu	
O'Driscoll ve ark. (F085)	3 ve 4?	arr5q13.2(68,839,890x2,68,840,602-68,844,536x 0,68,852,777x2)	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	K	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	NA	+	+	NA
				E	-	+	NA	-	+	+	-	PDA, PFO, yarık dudak	+	+	NA	+	+	NA	
O'Driscoll ve ark. (F275)	3 ve 4?	arr5q13.2(68,839,890x2,68,840,602-68,844,536x 0,68,852,777x2)	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	E	+	NA	NA	+	-	+	NA	-	+	+	H	+	+	+	
				E	NA	NA	NA	+	-	+	+ Böbrek yetmezliği	-	+	+	NA	+	+	Displastik V	
O'Driscoll ve ark. (F386)	3	c.51-?_730-?del	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	K	-	+	NA	+	-	+	+ hafif böbrek displazisi, DI	PDA	+	+	NA	+	+	NA	
				E	+	+	NA	+	-	+	-	Göbek fitiği	+	+	NA	+	+	NA	
O'Driscoll ve ark. (F312)	3	c.512dupA	p.Tyr171*	E	+	+	+	-	+	+	NA	-	+	+	İnce	+	+	Büyük V	
	3	c.656T>C	p.Phe219Ser	K	+	+	NA	-	-	+	NA	NA	+	+	NA	+	+	NA	
O'Driscoll ve ark. (F351)	intron 5- 6	c.1037+5G>A	Donor splice site değişikliği	K	-	+	NA	NA	+	+	-	-	+	+	NA	+	+	NA	
O'Driscoll ve ark. (F375)	3	c.171_193delATGGACCTCTCCTCCAGGAGTG	p.Lys57Asnfs*37 (=p.Trp58Phefs*10)	E	+	NA	NA	NA	-	+	NA, hipernatremi episodları	NA	+	+	Küçük	+	+	NA	
				K	NA	+	NA	-	-	+	NA	NA	+	+	NA	+	+	NA	
Aggarwal ve ark.	3	c.252delC	p.Ser85Profs*14	E	+	-	-	NA	-	+	+ Böbrek yetmezliği	NA	+	+	NA	-	+	NA	
				K	+	-	-	NA	-	+	+ CRF'de akut	-	+	+	NA	+	+	NA	
LeBlanc ve ark.	9	Novel translokasyon	-	K	+	+	NA	+	NA	NA	+ CRF	-	+	+	NA	-	+ Hafif	NA	
				K	+	+	NA	+	NA	NA	+ ARF	-	+	+	NA	+	+	GenişlemişV	
Elsaidve ark.	5	c.981delC	p.Asn328Metfs*4	K	NA	+	+	NA	+	+	+ CRF, DI, hipernatremi	Karaciğer kalsifikasyonu, GER	+	NA	NA	+	+	Genişlemiş lateral V	
				K	NA	+	+	NA	+	+	+ Mikroskobik hematüri	-	+	NA	NA	+	+	İkincil ventriküler dilatasyon	
Jenkinson ve ark. (F131)	6	c.1218C>T	p.Ser407Asnfs*66 Kriptik splice site	K	+	NA	NA	+	NA	+	NA	-	+	+	NA	+	+	NA	
Jenkinson ve ark. (F468)	7	c.1320_1336del	p.Gln441Thrfs*5	K	NA	NA	NA	+	+	NA	VUR	-	+	+	İnce	+	+	NA	
Jenkinson ve ark. (F523)	7	c.1284_1287del	p.Gln428Hisfs*56	E	NA	NA	NA	+	NA	NA	DI	NA	+	+	NA	-	+	NA	
Jenkinson ve ark. (F557)	3	c.711_714delinsATCCCCAGTA	p.Cys237*	K	NA	NA	NA	+	+	+	-	NA	+	+	NA	+	+	NA	
Abdel-Hamid ve ark. (F1)	4	c.809delA	p.Lys270Argfs*62	E	+	+	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+	
Abdel-Hamid ve ark. (F2)	intron 5- 6	c.1037+5G>C	Splice site IVS5+5G>C	E	+	-	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+ Asimetrik	
Abdel-Hamid ve ark. (F3)	3	c.51-?_730-?del	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	E	+	+	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+ Hafif	
Abdel-Hamid ve ark. (F4)	3	c.51-?_730-?del	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	E	+	+	+	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+	
Abdel-Hamid ve ark. (F5)	6	c.1180delG	p.Glu394Serfs*91	E	+	+	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+	

Tablo 37-devamı. OCLN geninde mutasyon saptanan hastaların genetik ve klinik özellikleri

Olgu raporu (Aile/hasta numarası)	Ekzon	Nükleotid değişikliği	Amino asit değişikliği	Klinik Özellikler														
				Cinsiyet	Beslenme zorluğu	Görme bozukluğu	İşitme bozukluğu	Büyüme geriliği / GG	Hipotoni	Hiperrefleks/ spastisite	Böbrek tutulumu	Diğer organ tutulumu	Epilepsi	Mikrosefali	Korpus kallozum	PMG	BLC	Lateral ventrikül dilatasyonu
Abdel-Hamid ve ark. (F6)	4	c.858_861delTTAT	p.Ile286Metfs*45	K	+	-	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+
				K	+	-	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+
				E	+	+	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+ Hafif
Abdel-Hamid ve ark. (F7)	6	c.1169C>G	p.Ser390*	K	+	+	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+
				E	+	-	NA	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	-
Abdel-Hamid ve ark. (F8)	3	c.51-?_730-?del	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	E	+	-	Hafif	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+ Hafif
Abdel-Hamid ve ark. (F9)	3	c.51-?_730-?del	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	E	+	-	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+
Abdel-Hamid ve ark. (F10)	3	c.51-?_730-?del	p.Lys18_Glu243? Transmembran domainlerin delesyonu	K	+	-	-	+	+	+	-	NA	+	+	İnce	+	+	+
Ekinci ve ark.	3	c.173_194del22	p.Trp58Phefs*10	F	+	NA	NA	+	NA	+	+ DI, hipernatremi	GER	+	+	NA	+	+	+
Hasta-1 ve Hasta-2	3	c.173_194del22	p.Trp58Phefs*10	K	+	-	-	+	+	+	+ DI, hipernatremi	NA	+	+	İnce	+	NA	NA
				K	+	+	-	+	+	+	+ DI, hipernatremi	NA	+	+	İnce	+	NA	NA
Hasta-3	3	c.199A>T	p.Ile67Phe	K	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	İnce	+	+	+

Kısaltmalar: ARF, Akut böbrek yetmezliği; BLC, “Band-like calcification with simplified gyration”; CRF, Kronik böbrek yetmezliği; DI, Diabetes insipidus; F, Aile; GER, Gastroözofageal reflü; GG, Gelişimsel gecikme; H, Hypogenesis; NA, Veri yok; PDA, “Patent duktus arteriozus”; PFO, “Patent foramen ovale”; PMG, Polimikrogiri; V, Ventrikül; VUR, Vezikoüreteral reflü.

Not: Gri dolguyla renklendirilmiş hastalar çalışmamızda yer alan hastalardır.

Hastalarımızda *OCLN* geninde saptanan mutasyonların patojeniteleri hakkında *in silico* tahmin araçları kullanılarak bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Hasta-1 ve Hasta-2’de tespit edilen c.173_194del22; p.Trp58Phefs*10 (NM_001205254.1) frameshift mutasyonun *in silico* tahmin analizlerinde Mutation Taster programına göre hastalık oluşturu mutasyon olduğu; NMDEscPredictor veritabanına göre bu mutasyon sonucunda proteinin nonsense-aracılı yıkım (NMD+) ile bozunmaya uğrayacağı öngörülmektedir. GnomAD veritabanındaki mevcut veriler incelendiğinde bu frameshift mutasyonun Avrupa popülasyonunda (non-Finnish) 251.494 allelden 1 allelde heterozigot durumda saptandığı ve allel frekansının 3.98e-6 olduğu görülmektedir (180).

OCLN proteininin kesilmesi durumunda sıkı bağlantı işlevlerinin önemli derecede etkilenebileceği bildirilmiştir. Sıkı bağlantı, bir zar içi multipl protein kompleksi oluşturmakta, bitişik hücreler arasında adezyon temas, kan beyin bariyeri ve vasküler bütünlük dâhil epitel ve endotelyal bariyerlerin işlevselliğini sürdürmektedir. C-terminal kısmı kesilmiş *OCLN* proteininin hastalarda parasellüler geçirgenliği artırarak vasküler ekstrasvazyona ve beyinde ve diğer organlarda kireçlenmeye yol açtığı tahmin edilmektedir (170).

Literatür verileri incelendiğinde, Hasta-1 ve Hasta-2’de *OCLN* geninde tespit edilen bu frameshift mutasyonun daha önce O’Driscoll ve ark. (2010) tarafından çalışma grubumuzdan farklı bir Türk ailesindeki iki kardeşte ve Ekinci ve ark. (2020) tarafından yine farklı bir Türk ailesinden bir hastada rapor edildiği görülmüştür (100, 168). Bildirilen bu üç hasta ile çalışma grubumuzdaki Hasta-1 ve Hasta-2 benzer klinik özelliklere sahiptir. Polimikrogiri, mikrosefali, mental retardasyon, hiperrefleks/spastisite ve epilepsi bulguları tüm hastalardaki ortak bulgulardır. Beslenme güçlüğü ile hipernatremi beş hastanın dördünde, korpus kallozum anomalileri ile kalsifikasyon bulguları ise beş hastanın üçünde bildirilmiştir. Diğer hastalarda bu bulgular rapor edilmediğinden durumları bilinmemektedir. Hasta-1 ve Hasta-2’nin kalsifikasyon bulguları CT (Bilgisayarlı Tomografi) verileri olmadığı için değerlendirilememiştir. Hasta-1 vefat ettiği ve Hasta-2 için de ebeveyn onayı alınamadığından CT çekilememiştir.

Abdel-Hamid (2017) tarafından beş Mısırlı ailede *OCLN* geninde ilk “founder” mutasyon (c.51-?_730-?del; p.Lys18_Glu243?) rapor edilmiştir. Bildirilen beş farklı ailede beslenme güçlüğü, gelişim bozuklukları, hipotoni, hiperrefleks/spastisite, epilepsi,

mikrosefali, BLC-PMG, lateral ventrikül dilatasyonu ve ince korpus kallozum bulguları ortaktır. Çalışmamızda elde edilen bulgular Hasta-1 ve Hasta-2’de saptanan c.173_194del22; p.Trp58Phefs*10 (NM_001205254.1) frameshift mutasyonunun Türkiye popülasyonunda olası “founder” (kurucu) etkisini akla getirmektedir. Çalışma grubumuzdaki aile ile birlikte toplam üç farklı Türk ailesinde aynı mutasyon tespit edilmiştir. Bu delesyon bölgesinin hotspot mutasyon bölgesi mi olduğunu ya da burada founder etkinin mi söz konusu olduğunu söyleyebilmek için bu ailelere ulaşarak haplotip analizi yapılması gerekmektedir.

Hasta-3’te saptanan c.199A>T; p.Ile67Phe (NM_001205254.1) missense mutasyonun *in silico* tahmin analizlerinde Mutation Taster, SIFT, PROVEAN ve SNAP veritabanlarına göre amino asit değişikliğinin protein yapısını olumsuz etkilediği ve hastalık oluşturma potansiyeli yüksek bir mutasyon olabileceği öngörülmektedir. I-Mutant veritabanına göre ise mutasyonun protein stabilitesini azalttığı tahmin edilmektedir. GnomAD veritabanındaki mevcut veriler incelendiğinde; bu varyasyonun Avrupa popülasyonunda (non-Finnish) 251.494 allelden 5 allelde heterozigot durumda saptandığı ve allel frekansının 1.99×10^{-5} olduğu görülmektedir (180). Bu nadir missense mutasyon literatürde daha önce herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Bugüne kadar literatürde bildirilen 16 farklı *OCN* gen mutasyonundan sadece bir tanesi missense mutasyondur. O’Driscoll (2010) tarafından bildirilen c.656T>C; p.Phe219Ser (NM_002358.2) missense mutasyonun da çalışmamız kapsamında *in silico* tahmin araçlarıyla patojenitesi incelenmiştir. Mutation Taster (Hastalık yapıcı, olasılık: 0.990), PROVEAN (Zararlı, skor: -2.597) ve SNAP (Etkileyici, skor: 36; doğruluk: %66) veritabanlarına göre mutasyonun protein üzerinde olumsuz etkileri olabileceği; SIFT (Tolere edilebilir, skor: 0.17) veritabanına göre ise mutasyonun tolere edilebileceği öngörülmektedir. I-mutant veritabanının tahminine göre mutasyon sonucunda proteinin stabilitesi düşmektedir (skor: -2.69). Bu *in silico* analiz verileri ışığında çalışma grubumuzdaki Hasta-3’te rapor edilen mutasyonun patojenik olma olasılığı daha yüksek görünmektedir. Her iki hastadaki klinik özellikler incelendiğinde beslenme bozukluğu, görme problemleri, hiperrefleks/spastisite, epilepsi, mikrosefali, PMG ve kalsifikasyon bulgularının ortak olduğu görülmektedir. Diğer yandan Hasta-3’te gelişim geriliği, hipotoni, lateral ventriküllerin dilatasyonu ve ince korpus kallozum bulguları gözlenirken, O’Driscoll (2010) tarafından bildirilen hastada gelişim geriliği ve hipotoni bulgularının olmadığı bildirilmiştir ve diğer özelliklere ilişkin veriler ise rapor edilmediğinden bilinmemektedir.

Proteinin zarar görmesi, parasellüler geçirgenliğin artması nedeniyle beyin, seminifer tübülleri ve böbrekler gibi dokularda kan-epitel bariyerinin bozulmasına yol açmaktadır. Gelişmekte olan nörovasküler ünite içinde değişen hücre sinyalinin, hücre aracılı bağışıklık hasarının ve artmış parasellüler geçirgenliğin polimikrogiirinin yanı sıra ektopik kalsifikasyona yol açtığı düşünülmektedir (100).

OCLN geninin lokalize olduğu kromozom 5q13, rekürren (tekrarlayan) duplikasyon/delesyon olaylarına maruz kalan kararsız bir bölgedir. *OCLN* geninin 5-9 ekzonlarını içeren bir psödogen tanımlanmıştır. Bu psödogen ile tam uzunluktaki atasal *OCLN* geni arasında %99'dan fazla benzerlik olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalara göre bu bölgenin kopya sayısı varyasyonlarına düşünülenden daha fazla eğilimli olduğu ve bir bireyde atasal *OCLN* geninin iki kat kopyasının olabileceği belirtilmiştir (181). Bu nedenle *OCLN* psödogeninin varlığı, ilgili bölgelerde patojenik varyantların saptanmasına engel teşkil edebilecek potansiyeldedir. Bu durum homozigot bir varyantı maskeleyebilir ve genomik dizileme analizi sırasında varyantın heterozigot formda görünmesine neden olabilir.

OCLN genindeki mutasyonların kortikal malformasyona ve ICC (intracranial compliance)'ye neden olduğu mekanizmalarla ilgili bilinmeyen noktalar mevcuttur. İnsanlarda fenotip, gelişen beyindeki kan beyin bariyeri disfonksiyonu ve hücre döngüsü ile hücre göçünü içeren downstream sinyal olayları dâhil olmak üzere potansiyel mekanizmalardan kaynaklanabiliyor olabilir (182). *OCLN*, hem epitelyumda hem de endotelde geniş çapta ifade edildiğinden; çeşitli hücre hatlarında Okludin protein ekspresyon seviyeleri, hücresel lokalizasyon ve bariyer işlevi üzerindeki bireysel varyantların etkisini incelemek mümkün olabilir. *OCLN* mutasyonları gelişimsel bir beyin bozukluğunu tetikliyor gibi görüldüğünden, Okludin nörone göçte, mikrotübüler ağ ile etkileşimine bağlı olarak, fonksiyonel öneme sahip olması mümkündür. Göç eden nöronlarda veya bunların destekleyici hücrelerinde Okludin ifadesinin gösterilmesi, beyindeki *OCLN* mutasyonlarının fonksiyonel sonuçlarını anlamaya yönelik önemli bilgiler sunacaktır.

Sonuç olarak çalışma grubumuzdaki Hasta-1, Hasta-2 ve Hasta-3'e ait veriler ve literatürdeki mevcut bulgular incelendiğinde polimikrogiiri, mikrosefali, epilepsi ve böbrek yetmezliği (diabetes insipidus/hipernatremi) bulgularının *OCLN* geni ile ilişkili tutarlı fenotipik özellikler olduğu söylenebilir. Bu örtüşen fenotiplerin, *OCLN* genindeki mutasyonlarla ilişkili olabileceği, olgulardaki ek fenotiplerin ise diğer genlerdeki patojenik

veya olası patojenik varyantlarla veya diğer faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca saptanan iki farklı mutasyon da genin 3. ekzonundadır. *OCN* geninin 3. ve 4. ekzonlarının proteinin fonksiyonel domain'lerinden Marvel domain'i kodladığı ve Marvel domain'in fonksiyonları göz önüne alındığında bu varyasyonların nörogelişimsel bozukluklara yol açabilecek potansiyelde olduğu görülmektedir.

5.2. *ELP6* Geni

Çalışma grubundaki hastaların klinik özellikleri doğrultusunda tüm ekzom dizileme işlemi ve biyoinformatik analizler sonucunda *ELP6* geni, Aile-3'te nörogelişimsel bozukluğu olan iki hastanın fenotipik değişiklikleriyle ilişkili olabilecek aday gen olarak belirlenmiştir. Hasta-4 ve Hasta-5'te *ELP6* geninde c.353T>G; p.Leu118Trp homozigot missense mutasyon saptanmıştır. Bu missense mutasyonun *in silico* tahmin analizlerinde Mutation Taster, SIFT, PROVEAN ve SNAP veritabanlarına göre hastalık oluşturma potansiyeli yüksek bir mutasyon olduğu ve amino asit değişikliğinin proteinin yapısını olumsuz yönde etkileyebileceği öngörülmektedir. I-Mutant veritabanına göre ise amino asit değişikliğine neden olan bu mutasyonun protein stabilitesini azalttığı tahmin edilmektedir. Bu missense mutasyon GnomAD veritabanında mevcut değildir (180).

ELP6, Elongatör kompleksinin altı alt biriminden birisidir. İnsan Elongatör kompleksinin *ELP1*'den *ELP4*'e kadar olan subunitlerinin karakterizasyonu yapılmıştır; ancak *ELP5* ve *ELP6* subunitlerinin çok daha fazla bilinmeyen yönleri bulunmaktadır (146). Mayalarda yapılan çalışmalarda Elongatör kompleksi alt birimlerini kodlayan genlerin herhangi birisinin delesyonu sonucunda hemen hemen aynı biyokimyasal fenotiplerin olduğu görülmüştür. Elongatör kompleksini içeren proteinler arasında sıkı bir fonksiyonel ilişki vardır; bu nedenle alt birimlerden birinin etkilenmesi sonucunda kompleksin bütünlüğünün etkilenebileceği düşünülmektedir (38). Yakın zamanda yapılan bir çalışma ile serebellar ataksi fare modelinde *ELP6* genindeki tek nokta mutasyonunun (p.Leu126Gln) *ELP456* alt kompleksini destabilize ettiğinin gösterilmesi bu düşüncüyü kanıtlar niteliktedir (149).

Elongatör kompleksi subunitlerindeki mutasyonlar, insanda farklı nöronal hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. *ELP1* geni mutasyonları bir otozomal resesif bozukluk olan ailesel disotonomi ile ilişkilendirilmiştir (138). Ailesel disotonomi en sık rastlanan kalıtsal duyuşal

ve otonom nöropatiler arasındadır. FD hastalarında duysal ve otonom sinir sisteminin ilerleyici dejenerasyonu sonucu kardiyovasküler disfonksiyon, ağrı duyarsızlığı, gastrointestinal disfonksiyon, skolyoz, kusma, kusurlu göz yaşarması, ileri derecede terleme ve postural hipotansiyon semptomları gözlenmektedir. Bu semptomların nöronal büyüme faktör yolağındaki bir eksikliğe bağlı olabileceği öne sürülmüştür. FD hastalarında mortalite yüksektir ve hastaların sadece %40'ı 20 yaşından sonra hayatta kalabilmektedir (183-185). Yapılan bir çalışmada ailesel disotonomi hastalarının %99.5'inde *ELP1* geninin 20. intronunun splice donör bölgesinde bir T→C transisyonu (2507+6T→C) gözlenmiştir. Bu durum anormal splicing ile sonuçlanmaktadır. Bu yanlış splicing, dokuya özgü ekzon atlamasına (skipping) ve bunun sonucunda tam uzunluktaki *ELP1* protein seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır. Minör FD haplotipi taşıyan kişilerde, 19. ekzondaki bir missense mutasyon da bir konsensus serin/treonin kinaz fosforilasyon bölgesini bozmaktadır. Bu mutasyon, *ELP1*'in kusurlu fosforilasyonuna neden olmaktadır. FD'den etkilenen bireylerde fonksiyonel *ELP1*'in olmaması normal nöronal gelişim ve fonksiyon için gerekli olan gen aktivasyon proseslerini önlüyor olabilir (138). *ELP1* proteininin kesik formu, nonsense-aracılı yıkım (NMD) yolağı tarafından bozunmasından dolayı hastalarda tespit edilememektedir. FD mutasyonu tam penetran değildir; merkezi ve periferik sinir sisteminde sadece kesilmiş (truncated) *ELP1* proteini üretilirken; diğer hücre tiplerinde daha düşük seviyelerde de olsa tam uzunluktaki protein sentezlenebilmektedir. Yapılan bir çalışmayla *ELP1* seviyelerinin FD hastalarından alınan nöronal dokuda çok düşük olduğu; lenfoblastlarda ise değişmediği rapor edilmiştir (186, 187). Ayrıca heterozigot taşıyıcılarda *ELP1* ekspresyonunun azaldığı ancak ailesel disotonomi gözlenmediği bildirilmiştir. Bu durum sinir sistemi gelişimi ve işleyişinde *ELP1* için dokuya özgü bir eşik değerinin (threshold) varlığını göstermektedir (188).

ELP2 geni mutasyonları zihinsel yetersizlik ile ilişkilendirilmiştir. Najmabadi ve ark. (2011) büyük ölçekli bir dizileme çalışması ile, *ELP2* geninde zihinsel yetersizlik ve bununla ilişkili nörolojik bozukluklarla bağlantılı olan homozigot mutasyonlar tespit etmişlerdir. İki ailede c.1663A>C; p.T555P (NM_018255.4) ve c.1385G>T; p.R462L (NM_018255.4) olmak üzere iki farklı missense mutasyon tanımlamışlar ve *ELP2*'nin zihinsel yetersizlik için yeni bir aday gen olabileceğini bildirmişlerdir (141). Cohen ve ark. (2015), ağır zihinsel yetersizlik, spastik dipleji ve kendine zarar verme özellikleri olan iki erkek kardeşte tüm ekzom dizileme ile birleşik heterozigot missense varyant saptamışlardır. Her iki varyasyon

(c.812A>G; p.H271R (NM_001242875.3) ve c.1579C>T; p.R527W (NM_001242875.3)) omurgalı ve omurgasızlar arasında korunmuş rezidüleri etkilemektedir (142). Khalilov (2018), zihinsel yetersizlik ve spastik kuadriparezi olan bir hastada ekzom dizileme sonucu *ELP2* geninde c.1385G>A; p.Arg462Gln (NM_018255.3) homozigot mutasyon saptamıştır. Sanger dizileme ile mutasyonu doğrulamış ve ardından hastanın iki kardeşinin de bu mutasyonu homozigot, ebeveynlerinin ise heterozigot durumda taşıdıklarını tespit etmiştir (189). *ELP2* geninde mutasyon saptanan zihinsel yetersizliği bulunan hastalardaki nörolojik bozukluğun mekanizması, Elongatör fonksiyonunun bozulması ile ilişkili olabilir (38). Bu hastalarda Elongatör fonksiyonunun kaybı, nöronal büyümeyi/göçü ve aktin hücre iskeletini etkileyebilir. Merkezi sinir sisteminde aktin hücre iskeleti, büyüme konisi (“growth cone”) motilitesi ve akson kılavuzluğu için son derece önemlidir (142, 188). Ayrıca *ELP2*, Elongatör ile JAK-STAT (Janus protein kinaz/sinyal iletici ve transkripsiyon aktive ediciler) kaskadı dâhil olmak üzere çeşitli sinyal yolları arasındaki etkileşimlere aracılık eden bir sinyal dönüştürücü görevi görmektedir (190). Bu nedenle *ELP2*’nin resesif bilişsel bozuklukların gelişiminde önemli yeri olan yeni bir gen olması muhtemeldir (38).

ELP3 geninin allelik varyantları ALS ile ilişkilendirilmiştir. ALS primer motor korteks, kortikospinal kanallar, beyin sapı ve omurilikte motor nöronların dejenerasyonuna bağlı ilerleyici kas güçsüzlüğü ve atrofi ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. En sık görülen bu kazanılmış motor nöron hastalığının tedavisi bulunmamaktadır. Yutma ve solunum güçlüğü nedeniyle bu hastaların ortalama yaşam süresi 3-5 yıldır (191, 192). Simpson ve ark. (2009) insanlarda ALS için 1483 bireyi kapsayan mikrosatellit tabanlı bir genetik assosiasyon çalışması ve *D. melanogaster*’de nöronal iletişim ve hayatta kalma açısından önemli olan genler için bir mutagenез taraması gerçekleştirmişlerdir. Genetik assosiasyon çalışmasında, *ELP3* allelik varyantlarını üç farklı popülasyonda ALS ile ilişkilendirmişlerdir. *D. melanogaster*’deki mutagenез taraması ile, anormal fotoreseptör aksonal hedefleme ve nörodejenerasyon sağlayan *ELP3* geninde iki farklı fonksiyon kaybı mutasyonu (p.R475K ve p.R456K) tanımlamışlardır. *ELP3* geninin allelik varyantlarının aksonal biyoloji için çok önemli olduğunu belirtmişlerdir. Buna ek olarak, zebra balığında antisense morfolino kullanarak *ELP3* geninin nakavtının motor nöronların doza bağlı kısalmasına ve anormal dallanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (134).

ELP4 geni mutasyonları rolandik epilepsi ile ilişkilendirilmiştir. Rolandik epilepsi, çocukluk çağında sık gözlenen parsiyel epilepsidir. 3-13 yaş aralığında görülmekle birlikte;

9-10 yaşlarında görülme sıklığı en yüksek düzeydedir. Genellikle hastalarda 15-16 yaşlarında klinik bulgular gerilemektedir. Elektroensefalografide sentro-temporal diken dalgalarla karakterizedir ve genelde uykuda gelişen fokal veya sekonder jeneralize nöbetler görülmektedir (193). Strug ve ark. (2009) rolandik epilepsi için genom çapında bir assosiasyon çalışması yapmışlar ve elde ettikleri haritalama kanıtları ile keşif ve replikasyon veri setlerinde CTS'nin *ELP4*'teki SNP markırları ile ilişkisine işaret etmişlerdir. *ELP4* genindeki kodlanmayan bölgede yer alan bir mutasyonun, beyin gelişimi sırasında, muhtemelen hücre göçünde ve aktin hücre iskeleti yollarındaki genler ve proteinlerle etkileşime bağlı olarak beyne özgü Elongatör kompleksi fonksiyonunu bozduğunu, bu durumun da nöbetlere ve nörogelişimsel bozukluklara yatkınlığa yol açtığını öne sürmüşlerdir. Elde ettikleri veriler ışığında *ELP4*'ün rolandik epilepsi patogenezi ile ilişkili olduğunu ve RE ailelerinde CTS riski üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğunu bildirerek; insanda *ELP4* geni ile bildirilen ilk hastalık ilişkisini tanımlamışlardır (145). *ELP4*'ün anormal fonksiyonları, kortikal projeksiyon nöronlarının migrasyonunu bozmaktadır. *ELP4* aynı zamanda Beyin Kökenli Nöron Büyüme Faktörü (BDNF) ile aynı gen lokusunda komşuluk göstermektedir. Bu nedenle rolandik epilepside *ELP4* ile BDNF'nin birlikte hareket ediyor olabileceği üzerinde durulmaktadır (194).

Literatürde insanda tanımlanmış ve herhangi bir nörolojik hastalıkla ilişkilendirilmiş *ELP5* ve *ELP6* gen mutasyonuna rastlanmamıştır.

Nörodejeneratif hastalıklara genellikle nöronal ölüme yol açan transkripsiyonel disfonksiyon eşlik etmektedir ve bu durumların çoğunda kromatin asetilasyonu HAT aktivitesinin kaybı ile ilgili bir mekanizma tarafından bozulmaktadır (38). Elongatör kompleksi, çeşitli nörogelişimsel süreçler için kritik olan genlerden bazılarının transkripsiyonel düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Han ve ark. (2007)'nin insan 293T hücre hattı ve Li ve ark. (2011)'nin HeLa hücre hattında yaptığı çalışmalar sonucunda hücrelerin apoptotik uyarılardan korunmasında ve protein yapılarının stabilizasyonunda önemli rol oynayan ısı şok proteini 70 (HSP70)'in transkripsiyonel uzamasında Elongatör kompleksinin rolü olduğu görülmüştür (195, 196). Bakterilerden insanlara genomlar birden fazla HSP70 kodlamaktadır. İnsanlarda 13 HSP70 homologu, farklı hücresel kompartmanlarda (sitozol, çekirdek, ER ve mitokondri) eksprese edilmektedir. İzofom seviyeleri ise büyüme ve dokuya özgü aktiviteler gibi hücresel ihtiyaçlara göre düzenlenmektedir (197). HSP70'in hem gelişmekte olan hem de yetişkin memeli beyinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür.

Çeşitli nörodejeneratif hastalık modellerinde toksisitenin azaltılması gibi nöroprotektif bir rolü vardır. Aynı zamanda aksonal taşıma ve nöronal sinyalizasyonda rol oynamaktadır (38).

Elongatör kompleksinin, integrin reseptörü CD61, Tenascin-C ve aktin hücre iskeleti modulatorlerini kodlayan genler gibi hücre göçüne dâhil olan birkaç genin aktivasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (188). Tenascin-C ve integrinlerin, merkezi sinir sistemi gelişimi sırasında yüksek oranda nöronal hücre dışı matriste eksprese edildiği ve nöronal öncüllerin proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını artırdığı gösterilmiştir (38).

Elongatör kompleksi çok sayıda transkripsiyondan bağımsız nörogelişimsel süreçleri de düzenlemektedir. Elongatör kompleksi, Rab proteinleri ile etkileşerek veziküler trafik ve ekzositozdaki rolü temelinde sinaptogenez ile ilişkilidir. Rab proteinleri, vezikül oluşumu, vezikül hareketi ve membran füzyonunu içeren membran trafiğini düzenlemektedir. Aynı zamanda polarize nörit büyümesini, aksonal trafiği ve sinapsların oluşumunu ve idamesini düzenleyerek nörogelişimde merkezi bir rol oynamaktadır (38). *ELP1* ile Rab guanin nükleotid değişim faktörü Sec2p arasında bir etkileşim olduğu bildirilmiştir. Bu etkileşim Sec2p'nin lokalizasyonu ve ökaryotik hücrelerde veziküler trafiğin kilit molekülleri olan Rab proteinlerinin aktivasyonu için gereklidir. Sec2p, ekzositoz bölgelerine alınan önemli bir proteindir ve Sec4p aktivasyonunu hedeflemektedir. *S. cerevisiae*'de Rab GTPaz Sec4p, golgiden plazma zarına polarize sekresyonda merkezi bir rol oynamakta, golgi sonrası salgı veziküllerinin ekzositozunu düzenlemektedir. Sec4p'nin salgı veziküllerini efektör vasıtasıyla plazma zarına bağlayarak etki ettiği düşünülmektedir (131). Rahl ve ark. (2005), Sec2p'nin lokalizasyonunu ve böylece polarize sekresyon için kritik olan Rab aktivasyon olayını düzenlemek için bir sitozolik sinyal iletim yolağında Elongatör kompleksinin işlev gördüğünü ileri sürmüşlerdir (124).

Elongatör kompleksi, *D. melanogaster* nöronlarında nörotransmitter salınımı ve sinaps oluşumunu düzenlemektedir. Miśkiewicz ve ark. (2011) Elongatör kompleksinin nörotransmitterlerin salındığı presinaptik yoğunluğun ayrılmaz bir bileşeni olan Bruchpilot (BRP)'u asetile etmek için gerekli olduğunu göstermişlerdir. BRP, N-terminali plazma zarına bakan, Ca²⁺ kanallarına temas eden ve C terminali sinaptik vezikülleri yakalayan sitoplazmaya uzanan bireysel iplikçiklere sahip büyük bir sitoiskeletal-benzeri proteindir. BRP'nin asetilasyonu sonucunda sitoplazmik dokunaçların yeniden düzenlendiği ve böylece

veziküllerin BRP'nin C-terminal ucu tarafından yakalanmasının ve veziküllerin yoğun cisimciklere taşınmasının düzenlendiği bir model önerilmiştir (198).

Goffena ve ark. (2018) Elongatör kompleksinin memeli periferik nöronlarında kodon-“biased” genlerin translasyonu için gerekli olup olmadığını araştırdıkları çalışmalarında farelerde *ELP1*'in koşullu nakavtı sonucunda dorsal kök ganglionlarında proteom ve transkriptom analizi yapmışlardır. Koşullu nakavt nöronlarda yanlış düzenlenen proteinlerin Gene Ontology biyolojik proses analizi sonuçlarında kromatin susturma (GO:0006342) ilk sırada yer alırken, bunu küçük GTPaz-aracılı sinyal iletimi (GO:0007264), ekzositozun regülasyonu (GO:0017157), protein transportu (GO:0015031), sitokinezin regülasyonu (GO:0032465) takip etmektedir. Elongatör koşullu nakavt embriyolarda birden fazla H2A histonunun upregüle olduğunu bildirmişlerdir. Elongatör kaybının, *BRCA2* ve DNA hasarını onarmak için gerekli diğer genlerin ekspresyonunun azalmasına yol açtığını ve bu verilerin FD patogenezi için yeni bir ışık tutacağını belirtmişlerdir. Bu bulguların FD ile doğan bireylerin genel popülasyona kıyasla daha kısa yaşam süreleri boyunca kansere yakalanma olasılığının iki katından daha fazla olmasının ve 30 yaş öncesi bireylerde kanser başlangıcının meydana gelmesinin nedenlerini açıklayabilecek düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir (199).

Gen ekspresyonunun kontrolünü anlamak, genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi anlamamız açısından kritik öneme sahiptir (200, 201). Gen ekspresyonu teknolojileri ile farklı doku ya da hücre popülasyonlarındaki transkripsiyonel aktivitenin anlık görüntüsü elde edilebilmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirilen fonksiyonel genomik çalışmalarıyla, hastalık patogenezi ve normal hücresel süreçlerin kıyaslanabilmesi amacıyla hastaların ve sağlıklı bireylerin dokuları karşılaştırılmaktadır (202). Çalışmamızda transkripsiyon sürecinde önemli rol oynayan *ELP6* geninde saptanan missense mutasyonun diğer genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerine ait primer kültür hücreleri kullanılarak RNA dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Dört bireyin transkriptom profilleri incelendiğinde Hasta-4'ün diğer bireylerden çok daha farklı bir profile sahip olduğu görülmektedir. Bu hastada ekzom dizileme analizi sonucu önceliklendirilen *ELP6* genindeki missense mutasyona ek olarak farklı genlerde, CADD skorları oldukça yüksek varyasyonlar da bulunmaktadır. Transkriptom profilindeki kaymanın nedeninin bu genlerdeki varyasyonlar olabileceği düşünülmektedir.

Dört bireyden elde edilen RNA dizileme analizi sonuçlarının Elongatör kompleksinin fonksiyonlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. GO biyolojik proses sonuçları incelendiğinde Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma gösteren genlerin büyük kısmının sellüler protein modifikasyonları ile transkripsiyon regülasyonu yollarında olduğu görülmektedir. Örneğin hastalarda kontrole göre ekspresyonu anlamlı düzeyde ($p<0.01$) azalmış en fazla gen bulunduran hücresel protein modifikasyon prosesleri (GO:0006464) yolağı biyolojik proses başlığı altındaki ilk yolaktır. Bu proses başlığı proteinler, peptidler veya yeni oluşmuş polipeptidlerde meydana gelen bir veya daha fazla amino asidin kovalent değişimini; bir proteinde oluşması hedeflenen tRNA'ların modifikasyonunu içermektedir (203). Bunu transkripsiyonun negatif regülasyonu, sitokin aracılı sinyal yolları, proliferasyonun regülasyonu yolları takip etmektedir. Aynı zamanda Elongatör kompleksinin işlevlerinden ekzositozun düzenlenmesini içeren genlerin hastalardaki ekspresyonlarında da Kontrol bireye kıyasla anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Bunun yanı sıra kromatin organizasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonunda hastalar ve Kontrol birey arasında anlamlı farklılıklar dikkat çekmektedir. Örneğin Hasta-4 ve Hasta-5'te *H2BC9* ve *H3C6* genlerinin ekspresyon seviyeleri Kontrol bireye kıyasla yüksek iken, *SMYD3* geninin ekspresyon seviyesi düşüktür. Bu genlerdeki ekspresyon farklılıkları qPCR ile de doğrulanmıştır. Hasta-4 ve Hasta-5 örneklerinde Kontrol örneğine kıyasla anlamlı azalma gösteren GO hücresel bileşen sonuçları incelendiğinde ilk sırada lizozom yer alırken; bunu mikrotübül düzenleme merkezi, fokal adhezyon, lizozomal membran, mikrotübül sitoiskelet, litik vakuol membran, salgı granül lümeni takip etmektedir. Hastalar ve kontrol arasında ekspresyonu en fazla değişen ilk 50 gen arasında yer alan *LITAF* geni ile ilişkili yollardan birisi de lizozomdur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar tRNA'lar ve nörolojik bozukluklar arasındaki ilişkiyi destekleyici niteliktedir. Antikodon halkasında bulunan bazı modifiye bazlar aminoasilasyon için gerekli iken, antikodon döngüsü dışındaki diğer modifikasyonlar ise tRNA'nın yapısı ve stabilitesi için önemli olabilmektedir (91). Genel olarak, tRNA modifikasyonları, ribozom bağlanma afinitesini artırmakta, yanlış okumayı azaltmakta ve çerçeve kaymasının modüle edilmesini sağlamaktadır. Bu işlevleri sonucunda tRNA modifikasyonları translasyon oranını ve uygunluğunu etkilemektedir (204-207). Hiper modifiye nükleozidler çoğu zaman, kodon tanımada ve aynı zamanda translasyonel verimlilik ve doğruluğun sürdürülmesinde doğrudan rol oynadıkları tRNA'ların wobble pozisyonunda bulunmaktadır (91).

Nörogelişimsel bozukluklarda farklı tRNA modifikasyonlarının azaldığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Guanozinlerin dimetilasyonu (m22G), tRNA'ların 26. pozisyonunda meydana gelmektedir ve bu proses insan tRNA metiltransferaz 1 tarafından katalize edilmektedir. Bu genin bir homozigot frameshift mutasyon ile inaktivasyonu, resesif bilişsel bozukluklar için bir biyobelirteçtir (91). Şimdiye kadar karakterize edilen insan tRNA'larında, psödoüridin 13 farklı pozisyonunda bulunmaktadır ve farklı psödoüridilazlar (Pus), her bir pozisyonundaki modifikasyonu katalizleyebilmektedir. İnsan tRNA'sında 39. pozisyonunda urasilin psödoüridine izomerleştirilmesindeki rolü ile bilinen *PUS3* genindeki bir missense mutasyonun, zihinsel yetersizliği olan hastalarda modifikasyonu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (208). tRNA(Leu), tRNA(Trp) ve tRNA(Phe) üzerindeki 32. ve 34. pozisyonlar, bir metiltransferazı kodlayan *FTSJ1* (FtsJ metiltransferaz homolog 1) geni tarafından metillenmektedir. Bu gendeki mutasyonlar sendromik olmayan X-bağılı mental retardasyon ve zihinsel yetersizlik ile ilişkilendirilmiştir (209). tRNA(Leu)'nun 34. pozisyonunda ve ayrıca birkaç tRNA üzerinde 48-50. pozisyonlarda m5C oluşumu meydana gelmektedir. Yüksek ökaryotlarda, bilinen tek m5C RNA metiltransferazları NSun2 ve Dnmt2'dir ve her iki enzimin de tRNA'yı hedeflediği doğrulanmıştır. Nsun2'deki eksiklik zihinsel yetersizlik ile ilişkilendirilmiştir. Adenozin deaminaz, tRNA'ların 34. pozisyonunda adenozin-inozin dönüşümünü katalize etmektedir ve heterodimerik adenozin deaminaz (hetADAT) tarafından kodlanmaktadır. Zihinsel yetersizliği olan bireylerde hetADAT'ın alt birimlerinden birini kodlayan *ADAT3*'te bir missense mutasyon bildirilmiştir. Ökaryotlarda ve bakterilerde meydana gelen tRNA'nın 7-metilguanozin (m7G) modifikasyonu, neredeyse her zaman 46. pozisyonunda bulunmaktadır ve baza pozitif bir yük veren bir modifikasyondur (91). İnsan WD repeat domain 4 (*WDR4*), m7G'nin oluşumundan sorumlu maya TRM82 protein kompleksine en yakın homologudur. *WDR4*, Down sendromu fenotiplerinin aday genleri için yapılan bir araştırmada tanımlanmıştır, ancak doğrudan bir ilişki henüz gösterilememiştir (210).

Klassen ve ark. (2015) Elongatör kompleksi eksikliği olan maya suşunda wobble üridin modifikasyonlarının kaybının tRNA (Lys/UUU) fonksiyonunu etkilediğini ve toplam protein seviyesinin düşmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, bir tRNA alt kümesinde bu değişikliklerin kaybının, maya ve *C. elegans*'ta aynı kökenli kodonlarında ribozom duraklamasına yol açtığı gösterilmiştir. Elongatör kompleksinin işlevinin bozulması sonucu translasyon kinetiği bozulmakta, bunun sonucunda da hücrede protein homeostazı bozulmaktadır.

agregat oluşumu gözlenmektedir (38, 211). Ökaryotlarda, 34. pozisyonundaki üridin, tRNA(Lys), tRNA(Glu) ve tRNA(Gln) antikodonlarında, 5-karbamoil-metil-üridin (ncm5U), 5-metoksi-karbonil-metil-üridin (mcm5U) veya 5-metoksi-karbonil-metil-2-tiyo-üridin (mcm52U) olarak modifiye olmaktadır. Bu modifikasyonlar için Elongatör kompleksinin gerekli olduğu bildirilmiştir. Elongatör aracılı metil grubunun tRNA U34'e transferi, bir kofaktör kompleksi olan Kti11/Kti13'ten bir elektron transferiyle birleştirilmiş SAM aracılı bir mekanizmayı içermektedir. Glatt ve ark. (2016), *ELP3* ile böyle bir tRNA modifikasyonu için yapısal temeli göstermişlerdir (212). İlginç bir şekilde, kusurlu Elongatör ile ilişkili fenotipler, tRNA'ların 34. pozisyonunda mcm5s2U oluşumunun eksikliğinden kaynaklanmaktadır. mcm5s2U modifikasyonunun yokluğunda kodon translasyon hızının azaldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. FD hastalarından elde edilen serebrum ve fibroblastlarda, mcm5s2U modifikasyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Anormal splicing nedeniyle düşük ELP1 seviyeleri FD'de verimsiz translasyon ile sonuçlanmaktadır. Bu durum Elongatörün baskın rolünün translasyon oranının düzenlenmesi olduğu hipotezini desteklemektedir (213). Sporadik ALS hastalarında da, motor kortekste ELP3 proteini ve mcm5s2U seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (214). Goffena ve ark. (2018) farelerde *ELP1*'in koşullu nakavtı sonucunda mcm5s2U tRNA modifikasyonu seviyelerinin kontrollere kıyasla daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (199). Kojic ve ark. (2018) serebellar ataksi fare modelinde *ELP6* genindeki tek nokta mutasyonunun (p.Leu126Gln) tRNA fonksiyonunun deregülasyonuna, proteinin yanlış katlanmasına, proteom agregasyonuna ve nöronal ölüme yol açtığını bildirmişlerdir. Mutasyonu taşıyan farelerde serebellar dokuda ncm5U ve mcm5U tRNA modifikasyonlarının, FD hastalarında tespit edilenle benzer oranda (%29-36) azaldığını belirtmişlerdir (149).

Nöronlar, yanlış katlanmış proteinlerin toksisitesine özellikle duyarlıdırlar, bu durum nörodejeneratif patolojilerin temelini oluşturabilmektedir. Elongatör, nöronlarda α -tubulin asetilasyonunu etkilediğinden, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve ALS gibi nörolojik bozukluklarda da önemli rol oynayabilme olasılığı vardır. Bu bağlamda, Elongatör ilişkili tRNA modifikasyonunun, spesifik nöronların gelişimi ve hayatta kalması için gerekli olan proteinlerin biyosentezi ve homeostazındaki kritik adımları düzenlediği öne sürülmüştür (38, 131, 211). Elongatör kompleksinin sinir hücrelerindeki spesifik rollerinin mekanizmasıyla ilgili hâlâ bilinmeyen yönler bulunmaktadır. Sinir

hücrelerinin, diğer hücre tiplerine kıyasla belirgin şekilde daha yüksek protein sentezi oranları nedeniyle translasyonel kusurlara özellikle duyarlı oldukları düşünülmektedir (117).

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonucunda Elongatör kompleksinin ana rolünün tRNA modifikasyonlarının düzenlenmesi yoluyla translasyonel doğruluğu korumak olduğu öne sürülmektedir. Buradan yola çıkılarak Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerine ait primer kültür hücrelerinin kullanılmasıyla tRNA modifikasyon analizi yapılmasına karar verilmiştir. Dört birey için her bir nükleozide ait değerler “modifiye nükleozid pik alanı/modifiye olmayan nükleozid pik alanı” şeklinde normalize edilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, literatürde Elongatör ilişkili tRNA modifikasyonları olarak bildirilen ncm5U, mcm5U ve türevleri mcm5s2U ve mcm5Um nükleozidlerinin normalizasyon değerlerinin Hasta-4 ve Hasta-5’te Kontrol bireye kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular *in vivo* hayvan deneylerinde ve diğer Elongatör subunitlerinin eksikliği sonucu insanlarda saptanan verilerle uyumludur. Elongatör ilişkili tRNA modifikasyonlarının dışındaki pek çok tRNA modifikasyonuna ait normalizasyon değerlerinin de Hasta-4 ve Hasta-5’te Kontrol bireye kıyasla daha düşük seviyede olduğu görülmektedir. Bunlardan 34. pozisyonda meydana gelen ac4C modifikasyonu tRNA molekülünün tersiyer yapısının yapısal stabilitesinin sağlanmasında önemlidir. *E.coli* tRNA(Met)’in antikodon halkasında meydana gelen bu modifikasyonun protein biyosentezi sırasında AUA izolösün kodonunun yanlış okunmasını önlediği ve AUG kodonunun tam olarak tanınmasını sağladığı gösterilmiştir (215-216). 48. pozisyondaki m5C modifikasyonunun varlığının, bazın hidrofobikliğini ve baz istiflenmesini (stacking) artırdığı; böylece tRNA üçüncül yapıya katlanmasını stabilize etmeye yardımcı olduğu bildirilmiştir (217). 32. pozisyondaki s2C modifikasyonunun kodon tanımayı kısıtladığı ve aminoasilasyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (218). s4U’nün spesifik tRNA düzeylerinin değişmesine yanıt olarak, UV’ye yakın bir sensör ve hücre büyümesinin bir düzenleyicisi olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (219). D (dihidroüridin)’nin tRNA’da stabil bir “hairpin” yapısının oluşmasına neden olduğu ve tRNA’nın katlanması ile stabilitesinde önemli olduğu belirtilmiştir (220). Hasta-4 ve Hasta-5’te Kontrol bireye kıyasla azalan Elongatör ilişkili olmayan tRNA modifikasyonlarının *ELP6* genindeki missense mutasyon ile ilişkilendirilebilmesi için aynı mutasyonu taşıyan daha fazla sayıda hastanın analiz edilip daha fazla sayıda kontrol bireyle karşılaştırılması gerekmektedir.

İnsanlarda tRNA modifikasyonlarındaki kusurların nörolojik bozukluklarla ilişkisini anlamak ve terapötik müdahalelere ulaşabilmek için bu modifikasyonların enzimatik ve

mekanik düzeyde karakterizasyonu yapılmalıdır (91). Elongatör kompleksi tarafından tRNA tanıma mekanizmasının daha fazla araştırılmasının; antikodon halkasının nasıl tanındığına ve diğer pozisyonlardaki üridinler modifiye olmadan kalırken neden sadece tRNA'nın wobble pozisyonundaki üridinlerin bu spesifik modifikasyon reaksiyonuna tabi olduğuna dair yapısal bir açıklama sunacağı düşünülmektedir (117).

Elongatör kompleksinin hücre migrasyonu ile ilişkili olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur. Elongatör, çok sayıda yolağın aktivitesini düzenleyen ve stres ile aktive edilen bir protein kinaz olan JNK (c-Jun NH2-terminal kinaz)'yı aktive etmektedir. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesinin bir üyesi olan JNK; hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü, dönüşümü, apoptoz ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (221). Elongatör kompleksinin HeLa ve HEK293 hücrelerinde hücre stres sırasında JNK aktivitesini çoğalttığı ve internöronların uygun şekilde migrasyonu için gerekli olan efektör proteinleri fosforile etmek için JNK aktivitesini güçlendirebileceği rapor edilmiştir (222). Farelerde yapılan JNK nakavt çalışmaları, beyin morfogenez, aksonal özellikler, akson büyümesi ve kılavuzluğundaki önemli rollerini ortaya koymuştur. Ayrıca, JNK'nın sinaps ve bellek oluşumunu yönettiği gösterilmiştir. JNK yolağının nörogelişim için çok önemli olduğu; yolaktaki genlerin bozulmasının otizm, şizofreni ve zihinsel yetersizlik gibi nöropsikiyatrik bozukluklara duyarlılığı artırdığı belirtilmektedir (223).

Elongatör kompleksinin, filamin A ile etkileşimi yoluyla nöronal öncüllerin göçünü düzenlediği gösterilmiştir. Sitoplazmik *ELP1* membran kırılmalarında filamin A ile lokalize olmaktadır ve *ELP1* eksikliği olan hücrelerde kusurlu bir aktin hücre iskeleti organizasyonu tanımlanmıştır (131). Filamin A, göç eden hücrelerin ön kenarlarında kortikal aktin filamentleri ve dinamik üç boyutlu ağları organize etmektedir. Ayrıca çeşitli membran proteinleri ve göç ve adhezyonun hücre içi araçları ile etkileşime girmekte ve membran kırılmalarının oluşumunda mekanik bir eleman olarak işlev görmektedir. Filamin A'nın fonksiyon kaybı mutasyonları, nöronların kortekse göç edememesi ve lateral ventriküller boyunca nöronal hücre gövdelerinin birikmesi sonucu meydana gelen X-bağlı nörogelişimsel bozukluk olan periventriküler heterotopiye neden olmaktadır (224). *ELP3*'ün de, HeLa hücrelerinin kenarlarındaki aktin açısından zengin alanlara, aktin benzeri filamentlere ve mitokondriye lokalize olduğu gösterilmiştir (225).

α -tubulinin Elongatör kompleksi tarafından asetilasyonu, nöronal migrasyon ve dallanmada (branching) rol oynayabilecek başka bir Elongatör kompleksi fonksiyonudur. Nöronlarda hücreSEL α -tubulinin büyük kısmı asetillenmektedir. Sadece Lizin-40 üzerinde meydana gelen α -tubulin asetilasyonu, mikrotübülün lüminal iç yüzeyi üzerinde bulunmaktadır. Sitozolik Elongatör kompleksin *ELP3* subuniti, insan ve fare hücrelerinde α -tubuline özgü KAT (Lizin Asetiltransferaz) olarak tanımlanmıştır. α -tubulin asetilasyonunun özellikle Kinezin-1'in bağlanmasını ve motilitesini artırdığı gösterilmiştir (130). Nörofilamentlerin ve mikrotübüllerin yavaş aksonal taşınmasında işlev gören spesifik motorların hepsi henüz tanımlanamamıştır. Nakavt farelerden alınan Kinezin-1 nöronları içeren çalışmalar ile bunun anterograd (ileriye doğru) motor olduğu gösterilmiştir (226). Serebral kortekste Elongatör kompleksi, mikrotübüllerin asetilasyonuna aracılık etmektedir ve böylece tanımlı kargoların gelişen nöronlarda büyüyen nöritlere ve olgun hücrelerde aksonlara anterograd taşınmasını yönlendirebilir. α -tubulin asetilasyonu son zamanlarda α -tubulin düzeylerinin post-translasyonel düzenlenmesi ve polimerizasyon ve depolimerizasyon dinamikleri ile de ilişkilendirilmiştir. Hem taşıma hem de mikrotübül dinamiklerindeki değişiklikler hücreSEL motiliteyi doğrudan etkileyebilmektedir (130). Creppe ve ark. (2009), α -tubulin K40A'nın ekspresyonu yoluyla mikrotübüllerdeki α -tubulin asetilasyon seviyelerinin düşürülmesinin ve *ELP1/ELP3* susturulmasının neden olduğu göç kusurlarını yinelediğini bildirmişlerdir. Projeksiyon nöronlarının farklılaşması, *ELP1* veya *ELP3* subunitlerinin susturulması dallanma hatalarına yol açtığından dolayı Elongatör aktivitesine de kritik olarak bağlıdır. Elongatör kompleksi, sitoplazmada çeşitli proteinlerin asetile edildiği çok sayıda karakterize edilmemiş substratı hedefliyor olabilir (127). Artan deneysel ve klinik kanıtlar, spesifik proteinlerin veya organellerin hatalı hücre içi taşınmasının ALS, Huntington, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif süreçlerin ayırt edici özelliği olabileceğini düşündürmektedir (130).

Fare kortikal nöronlarında shRNA ile Elongatörün inhibisyonunun nöronların migrasyon hızını azalttığı gösterilmiştir (127). *Xenopus* nöral krest hücreleri ve postmitotik kortikal nöronlarda, çeşitli transforMe hücre hatlarında ve fibroblastlarda Elongatörün yokluğunun hücre migrasyonunu bozduğu ortaya konmuştur (115). Melanom hücrelerde yapılan bir çalışmada *ELP1*, *ELP3*, *ELP5* ve *ELP6* aracılığıyla Elongatörün ifadesinin azalmasının hücre migrasyonunu sınırladığı ve tümörijeniteyi azalttığı rapor edilmiştir (146). HeLa, nöronal türevli *ELP1* RNAi hücreleri ve FD fibroblastlarındaki deneyler sonucunda,

ELP1 eksik hücrelerin *in vitro* hücre motilitesinde kusurlar sergilediği gösterilmiştir (188). *ELP4*'ün anormal fonksiyonlarının, kortikal projeksiyon nöronlarının migrasyonunu bozduğu rapor edilmiştir (194).

Elongatör kompleksin subunitlerinin hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinden yola çıkılarak *ELP6* genindeki missense mutasyonun hücre migrasyon hızı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hasta-4, Hasta-5, Anne ve Kontrol bireylerine ait deri biyopsi örneklerinden elde edilen hücrelerde scratch assay ile yaralar oluşturulmuş ve yara kapanma sürecinde hücrelerin migrasyon hızları gözlenmiştir. Migrasyon analizi sonuçlarına göre, Hasta-4 ve Hasta-5'e ait hücrelerin göç hızının Anne ve Kontrol bireylere ait hücrelerden yüksek olduğu görülmüştür. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre Hasta-4'e ait hücrelerin migrasyon hızının diğer bireylerin hücrelerine ait migrasyon hızlarından anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu durum Hasta-4'te *ELP6* geni dışındaki genlerdeki varyasyonlardan kaynaklanıyor olabilir. Bu doğrultuda diğer genlerin ve varyasyonların detaylı araştırılması ve gerekiyorsa bunlarla ilgili ek fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir. Diğer yandan Elongatör kompleksi subunitlerinin eksikliğinde migrasyon hızının olumsuz etkilendiğine dair çalışmalar rapor edilmiştir. Ancak çalışmamız kapsamında *ELP6* geninde missense mutasyon bulunan hastalarda hücre migrasyonunun olumsuz etkilendiğine dair bir bulguya rastlanmamıştır. Aksine Hasta-4 ve Hasta-5'e ait hücrelerin migrasyon hızları Anne ve Kontrol bireylere kıyasla daha hızlıdır. RNA dizileme bulgularına göre hücre hareketini düzenleyen genlerin bir kısmının ekspresyonunun arttığı, bir kısmının ise azaldığı görülmektedir. Çeşitli mekanizmalar ile bu mutasyon hücrelerin hareketini hızlandırıcı bir etki yaratıyor olabilir. Ancak ileri fonksiyonel analizlerle bu olasılığın test edilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak Hasta-4 ve Hasta-5'e ait veriler ve literatürdeki mevcut bulgular incelendiğinde Elongatör kompleksinin bir subuniti olan *ELP6* geninin nöronal gelişim sürecinde kritik roller oynayabileceği görülmektedir. Elongatör kompleksinin işlevleri doğrultusunda elde edilen bulgular *ELP6* genindeki missense mutasyonun kompleksin yapısını ve stabilitesini etkilediğini düşündürmektedir. *In silico* analizler ile de patojenik etkileri ortaya konan bu mutasyon, kompleksin işlevlerini etkileyebilecek düzeyde görünmektedir. Hasta-4 ve Hasta-5'te saptanan missense mutasyon nörogelişimsel bozukluğu olan hastalarda rapor edilen ilk *ELP6* gen mutasyonu olması bakımından oldukça önemlidir. RNA dizileme analizi verileri incelendiğinde hastalarda özellikle transkripsiyon düzenlenmesi

ve protein modifikasyonlarında rol oynayan genlerin ekspresyonunun kontrole göre düşük oluşu dikkat çekmektedir. Bu mutasyon gelişim sürecindeki proteinler üzerindeki etkisi aracılığıyla Elongatör fonksiyonunu kısmen ortadan kaldırıyor olabilir. Bunu tespit etmek için farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları içeren ileri fonksiyonel testlere ihtiyaç vardır. tRNA modifikasyon analizi verileri incelendiğinde Elongatör ilişkili ncm5U ve mcm5U ve türevlerinin normalizasyon değerlerinin Hasta-4 ve Hasta-5'te Kontrol bireye göre düşük oluşu; model organizmalarda ve diğer Elongatör kompleksi subunitleri için insanda şimdiye kadar bildirilen çalışmalardaki bulguları doğrular niteliktedir. Ayrıca *ELP6* geninde homozigot missense mutasyon saptanan hastalara ait hücrelerin migrasyonları ile ilgili ilginç bulgular elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüze kadar 600'den fazla nörolojik bozukluk tanımlanmıştır; ancak bunların pek çoğu için hâlâ bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Birçok nörolojik bozukluk, sinir sisteminin gelişimindeki kusurlardan kaynaklanan kalıtsal hastalıklardır. Nörogelişim, çeşitli genetik ve çevresel faktörler tarafından düzenlenen karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Bu süreçte nöronal öncül hücreleri fonksiyonel nöronlara dönüştürmek için gerekli olan bir dizi karmaşık ve koordineli olay gerçekleşmektedir. Bu karmaşık süreçlerin düzensizliği çeşitli nörogelişimsel bozukluklara yol açmaktadır.

Epilepsi ile birlikte beyin malformasyonu gözlenen nörogelişimsel bozukluğu olan hastalarımızda *OCNL* geninin 3. ekzonunda iki farklı mutasyon tanımlanmıştır. Missense mutasyon ile *OCNL* gen varyant çeşitliliği artırılmıştır. Saptanan frameshift mutasyonun ise Türkiye popülasyonunda “founder” etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu olasılığın, bu frameshift mutasyonun bildirildiği ailelere ulaşılarak haplotip analizi ile doğrulanması gerekmektedir. Hastalarda görülen nörogelişimsel bozuklukların ciddiyeti göz önüne alındığında Okludinin ve özellikle Marvel domain'in beyin gelişimi ve işlevinde önemli bir role sahip olduğu görülmektedir. *OCNL*'nin beyindeki normal işlevinin anlaşılması ile ilgili hâlâ eksik noktalar bulunmaktadır. *OCNL* geninde rapor edilen mutasyonlar doğrultusunda fonksiyonel analizlerin yapılması bu boşlukları doldurabilir. Bazı varyantların hücresel veya doku düzeyinde etkisi, özellikle farklı beyin bölgelerinde ve nöronal hücre tiplerinde araştırılmayı beklemektedir. Göç eden nöronlarda veya bunların destekleyici hücrelerinde Okludin ifadesinin gösterilmesi, *OCNL* gen mutasyonlarının beyindeki fonksiyonel sonuçlarını anlamaya yönelik önemli veriler sunacaktır.

Literatürde ailesel disotonomi, zihinsel yetersizlik, ALS ve rolandik epilepsi dâhil çeşitli nörogelişimsel bozuklukları olan hastalarda genetik analizler sonucunda Elongatör kompleksi alt birimlerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu bulgular evrimsel olarak oldukça korunmuş Elongatör kompleksinin nörogelişimin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. İnsan Elongatör kompleksinin *ELP1*'den *ELP4*'e kadar olan subunitlerinin karakterizasyonu yapılmıştır; ancak *ELP5* ve *ELP6* subunitlerinin daha çok bilinmeyen yönleri bulunmaktadır. Yaptığımız genetik çalışma sonucunda insanda *ELP6* geninde nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilen ilk mutasyon tanımlanmıştır ve fonksiyonel

Çalışma sonucunda nrogeleşimsel bozukluğu olan hastalarımızın fenotipleriyle uyumlu veriler elde edilmiştir. Elongatör kompleksinin transkripsiyonel bir regülatör olarak hareket etme olasılığını desteklemek için büyük miktarda veri mevcuttur. Çalışmamız kapsamında elde edilen RNA dizileme bulgularının GTEx (The Genotype-Tissue Expression) verileriyle kıyaslanması ve böylece çalışmanın kontrol birey sayısı kısıtının ortadan kaldırılması planlanmaktadır. İlerleyen süreçte hastalarımızdan elde edilen hücrelerle proteom analizi yapılarak Elongatör kompleksinin translasyon sürecindeki etkilerinin saptanması hedeflenmektedir. Hastalarımızda kontrole kıyasla azalmış Elongatör ilişkili olmayan tRNA modifikasyonlarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla daha fazla sayıda kontrol bireyin ve aynı mutasyonu taşıyan hastanın analiz edilmesine ihtiyaç vardır. Elongatör kompleksinin etkileştiği molekülleri, regülatörleri, aktivitesinin altında yatan moleküler mekanizmayı ve substrat spesifikliğini tanımlamayı amaçlayan gelecekteki yüksek çözünürlüklü yapısal ve fonksiyonel çalışmalar, bu çok alt birimli kompleksin gerçek doğasına ışık tutacaktır.

Farklı tipteki nrogeleşimsel bozukluklar ile ilişkili genlerin tanımlanması, bu hastalıkların nörobiyolojik mekanizmaları hakkındaki bilgimizin artması, var olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, kişiye özgü tedavi yöntemlerinin bulunması ve daha doğru tanı konmasına yardımcı olacaktır. Aynı fenotipteki bireylerin büyük kohortlarının genetik olarak araştırılması ve genlerin ayrıntılı fonksiyonel karakterizasyonuna yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Genetik nedenleri günümüzde tam olarak aydınlatılamayan nrogeleşimsel bozukluklar için tanı ve tedavi imknlarının oluşabilmesi açısından yapılan her çalışma büyük önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Aksoy UM. Nörogelişimsel Bozukluklar: Bir ağacın farklı dalları. İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Tıp Dergisi. 2019. 11(Ek sayı):1-4.
2. American Psychiatric Association: (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). American Psychiatric Pub. 2013.
3. Kaufman WE, Capone GT, Clarke M, Budimirovic DB. Chapter 4: Autism in genetic intellectual disability. In: Zimmerman AW, editor. Autism: Current theories and evidence. Totowa NJ: Humana Press. 2008. 81-107.
4. Thompson PM, Stein JL, Medland SE, Hibar, DP ve ark. The ENIGMA Consortium: large-scale collaborative analyses of neuroimaging and genetic data. Brain imaging and behavior. 2014. 8(2):153-182.
5. Klein M, Onnink M, van Donkelaar M, Wolfers T ve ark. Brain imaging genetics in ADHD and beyond—mapping pathways from gene to disorder at different levels of complexity. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2017. 80:115-155.
6. Çağlayan AO. Yeni nesil dizileme teknolojisinin tıpta kullanımı: örnek hastalık grubu olarak nörogelişimsel hastalıklar. Türkiye Klinikleri Tıbbi Genetik-Özel Konular. 2016. 1(1):155-160.
7. Bayram Y, Karaca E, Akdemir ZÇ, Atik MM ve ark. Nadir hastalıkların moleküler temeli ve tüm ekzom dizileme yöntemi. Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler-Özel Konular. 2016. 12(4):46-53.
8. Güngörürler E. Akut lenfoblastik lösemi hücre hatlarında Wnt sinyal yolağı yeni nesil RNA dizileme analizleri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi. 2017.
9. Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. Current protocols in molecular biology. 2010. 89(1):4-11.
10. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Tunçbilek E. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. Güneş Kitabevi. 2005.
11. Mooney S. Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. Briefings in bioinformatics. 2005. 6(1):44-56.

12. Mullin AP, Gokhale A, Moreno-De-Luca A, Sanyal S ve ark. Neurodevelopmental disorders: mechanisms and boundary definitions from genomes, interactomes and proteomes. *Translational psychiatry*. 2013. 3(12):e329.
13. Study DDD, McRae JF, Clayton S, Fitzgerald T ve ark. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature*. 2017. 542(7642):433-438.
14. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M ve ark. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014. 511:344-347.
15. Van Herwegen, J, Riby, D. (Eds.). *Neurodevelopmental disorders: Research challenges and solutions*. Psychology Press. 2014.
16. Chow J, Jensen M, Amini H, Hormozdiari F ve ark. Dissecting the genetic basis of comorbid epilepsy phenotypes in neurodevelopmental disorders. *Genome Medicine*. 2019. 11(1):1-14.
17. Tărlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Experimental & molecular medicine*. 2018. 50(8):1-7.
18. Parenti I, Rabaneda LG, Schoen H, Novarino G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends in Neurosciences*. 2020. 43(8):608-621.
19. Malhotra D, McCarthy S, Michaelson JJ, Vacic V ve ark. High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron*. 2011. 72(6):951-963.
20. Woodberry KA, Giuliano AJ, Seidman LJ. Premorbid IQ in schizophrenia: a meta-analytic review. *Am. J. Psychiatry*. 2008. 165:579-587.
21. Cascella NG, Schretlen DJ, Sawa A. Schizophrenia and epilepsy: is there a shared susceptibility? *Neurosci Res*. 2009. 63:227-235.
22. Zhang DL, Chen SZ, Liu XM. Recent perspectives of pediatric neurodevelopmental disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017. 21(4 Suppl):65-69.
23. Mukaddes NM, Ercan, ES. *Nörogelişimsel Bozukluklar*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2018.
24. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M ve ark. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 2014. 94(5):677-694.
25. 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.

26. Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 2003. 13:310-316.
27. Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature.* 2015. 519:223-228.
28. Mao X, Young BD, Lu YJ. The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research. *Current genomics.* 2007. 8(4):219-228.
29. Fernandez-Marmiesse A, Gouveia S, Couce ML. NGS technologies as a turning point in rare disease research, diagnosis and treatment. *Current medicinal chemistry.* 2018. 25(3):404-432.
30. De la Torre-Ubieta L, Won H, Stein JL, Geschwind DH. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nat. Med.* 2016. 22:345-361.
31. Haucke V, Neher E, Sigrist SJ. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011. 12:127-138.
32. Usta MB, Terzi M, Karabekiroğlu K, Aral A. Nörogelişimsel bozukluklarda nöronal büyüme faktörlerinin klinik kullanımı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 2019. 28(2):98-107.
33. Gilbert SF. *Developmental biology.* 6th edition ed.2000, Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2003.
34. Liu JS. Molecular genetics of neuronal migration disorders. *Current neurology and neuroscience reports.* 2011. 11(2):171-178.
35. Virgintino D, Girolamo F, Errede M, Capobianco C ve ark. An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis. *Angiogenesis.* 2007. 10(1):35-45.
36. Bertossi M, Roncali L, Nico B, Ribatti D ve ark. Perivascular astrocytes and endothelium in the development of the blood-brain barrier in the optic tectum of the chick embryo. *Anatomy and embryology.* 1993. 188(1):21-29.
37. Güngör S, Yalınzoğlu D, Topçu M, Doçenti PY ve ark. Kortikal gelişimsel malformasyonlar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2007. 50:210-225.
38. Kojic M, Wainwright B. The many faces of elongator in neurodevelopment and disease. *Frontiers in molecular neuroscience.* 2016. 9:115.

39. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010. 107:961-968.
40. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K ve ark. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet. Med*. 2014. 16:176-182.
41. Li Y, Jia X, Wu H, Xun G ve ark. Genotype and phenotype correlations for SHANK3 de novo mutations in neurodevelopmental disorders. *Am. J. Med. Genet. A*. 2018. 176:2668-2676.
42. Casanova EL, Gerstner Z, Sharp JL, Casanova MF ve ark. Widespread genotype-phenotype correlations in intellectual disability. *Frontiers in psychiatry*. 2018. 9:535.
43. Iossifov I, Levy D, Allen J, Ye K ve ark. Low load for disruptive mutations in autism genes and their biased transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. 112(41):E5600-E5607.
44. Reinson K, Öiglane-Shlik E, Talvik I, Vaher U ve ark. Biallelic CACNA1A mutations cause early onset epileptic encephalopathy with progressive cerebral, cerebellar, and optic nerve atrophy. *American journal of medical genetics Part A*. 2016. 170(8):2173-2176.
45. Wengert ER, Tronhjem CE, Wagnon JL, Johannesen K ve ark. Biallelic inherited SCN8A variants, a rare cause of SCN8A-related developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsia*. 2019. 60(11):2277-2285.
46. Ribierre T, Deleuze C, Bacq A, Baldassari S ve ark. Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *The Journal of clinical investigation*. 2018. 128(6):2452-2458.
47. Kelsoe JR. Genomics and the Human Genome Project: implications for psychiatry. *International Review of Psychiatry*. 2004. 16(4):294-300.
48. Başaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010. 67(2):85-96.
49. Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT ve ark. Structure of a ribonucleic acid. *Science*. 1965:1462-1465.
50. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977. 74:560-564.

51. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977. 74:5463-5467.
52. Darcan C, Türkyılmaz O. Yeni nesil dizileme teknolojisine genel bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2017. 5(1):41-49.
53. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. 2008. 92(5):255-264.
54. Yangın S, Tanman Ü, Cansaran-Duman D. Onkolojik ilaç geliştirilmesinde yeni nesil dizileme teknolojilerine dayalı farmasötik uygulamalar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2019:473.
55. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R ve ark. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986. 51(1):263-73.
56. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *DNA Sequence*. 2008. 26(10):1135-1145.
57. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P ve ark. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986. 321(6071):674-679.
58. Passarge E. (Editörler: Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö). *Renkli Genetik Atlası*. Palme Yayıncılık. 2015.
59. Doğan M, Eröz R, Recep Yüce H, Özmerdivenli R. Yeni nesil dizileme (YND) hakkında bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2017. 19(1):27-30.
60. Kızmaz MZ, Paylan İC, Erkan S. DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*. 2017. 6(2):47-53.
61. <https://www.biomadam.com/method-of-dna-sequencing> (Erişim Tarihi: 10 Haziran 2020).
62. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Öner C. *Genetik kavramlar*. Palme Yayıncılık. 2011.
63. Ateş K. Gen mi, RNA mı? *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2006. 6(11):43-49.
64. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004. 431(7011):931.

65. Coşan DT, Yapıcı E, Kurt H. Epigenetikten Kansere Uzanan Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar. Osmangazi Tıp Dergisi. 2018. 40(3):114-121.
66. Akyol I, Yıldız MA, Tutar E. Yeni Nesil Nükleotid Dizileme Metotlarının Biyokimyasal Temelleri. Tarım ve Doga Dergisi. 2017. 20(1):1.
67. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni nesil DNA dizileme. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2011. 1(1):11-18.
68. Saraç A, Yüksel B. Yeni nesil dizileme teknolojileri ve sağlıkta uygulama alanları. Türkiye Klinikleri Medical Genetics-Special Topics. 2016. 1(2):1-7.
69. Sanchez A. Introduction to next generation sequencing. 2011. <https://www.slideshare.net/ueb52/introduction-to-next-generation-sequencing-v2> (Erişim Tarihi: 20 Mayıs 2020).
70. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. Archives of pathology & laboratory medicine. 2017. 141(11):1544-1557.
71. Welch JS, Link DC. Genomics of AML: clinical applications of next-generation sequencing. Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book. 2011. (1):30-35.
72. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D ve ark. Opportunities and challenges of whole-genome and-exome sequencing. BMC genetics. 2017. 18(1):1-13.
73. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P. ve ark. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. Genetics in Medicine. 2016. 18(7):696-704.
74. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC bioinformatics. 2011. 12(1):323.
75. Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2017. 8(1):e1364.
76. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M ve ark. (Çeviri Eds Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö). Moleküler hücre biyolojisi. 6. Baskıdan çeviri. Ankara, Palme Yayıncılık. 2011:1-30.
77. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M ve ark. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science. 2002.
78. Holley RW. Structure of an alanine transfer ribonucleic acid. Jama. 1965. 194(8):868-871.

79. Holley RW, Everett GA, Madison, JT, Zamir, A. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1965. 240(5):2122-2128.
80. Clark BF. The crystal structure of tRNA. *Journal of biosciences*. 2006. 31(4):453-457.
81. Ladner JE, Jack A, Robertus JD, Brown RS ve ark. Structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975. 72(11):4414-4418.
82. Kim SH, Quigley GJ, Suddath FL, McPherson A ve ark. Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain. *Science*. 1973. 179(4070):285-288.
83. Gu C, Begley TJ, Dedon PC. tRNA modifications regulate translation during cellular stress. *FEBS letters*. 2014. 588(23):4287-4296.
84. Cooper GM, Hausman RE, Sakızlı M, Atabey, N. *Hücre: moleküler yaklaşım*. İzmir Tıp Kitabevi. 2006.
85. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*. (Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç). Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık. 2005.
86. Yılmaz E. Nükleik asitlerin yapısı, fonksiyonu ve genom organizasyonu. Türk Hematoloji Derneği-Moleküler Hematoloji Kursu. http://www.turkhematolojidernegi.com.tr/thdData/userfiles/file/molhem_01.pdf. (Erişim Tarihi: 29 Mayıs 2020).
87. Tuite MF, von der Haar T. Transfer RNA in Decoding and the Wobble Hypothesis. *eLS*, 2001:1-7.
88. Griffiths AJ, Gelbart, WM, Lewontin RC, Miller, JH. *Modern genetic analysis: integrating genes and genomes*. Macmillan. 2002. 1.
89. <https://jgi.doe.gov/proving-codon-genetic-code-flexibility/> (Erişim Tarihi: 1 Haziran 2020).
90. Kamble AS, Sambhare SB, Fandilolu PM, Sonawane KD. Structural significance of modified nucleoside 5-taurinomethyl-2-thiouridine, $\tau\text{m}5\text{s}2\text{U}$, found at 'wobble' position in anticodon loop of human mitochondrial tRNA Lys. *Structural Chemistry*. 2016. 27(3):839-854.
91. Bednářová A, Hanna M, Durham I, VanCleave T ve ark. Lost in translation: defects in transfer RNA modifications and neurological disorders. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017. 10:135.

92. Persson BC. Modification of tRNA as a regulatory device. *Molecular microbiology*. 1993. 8(6):1011-1016.
93. Chan CT, Dyavaiah M, DeMott MS, Taghizadeh K ve ark. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS genetics*. 2010. 6(12).
94. Rozov A, Demeshkina N, Khusainov I, Westhof E ve ark. Novel base-pairing interactions at the tRNA wobble position crucial for accurate reading of the genetic code. *Nature communications*. 2016. 7(1):1-10.
95. Thiaville PC, de Crecy-Lagard V. The emerging role of complex modifications of tRNA in signaling pathways. *Microb. Cell*. 2015. 2:1-4.
96. Pereira M, Francisco S, Varanda AS, Santos M ve ark. Impact of tRNA modifications and tRNA-modifying enzymes on proteostasis and human disease. *International journal of molecular sciences*. 2018. 19(12):3738.
97. <https://www.genecards.org> (Erişim Tarihi: 2 Haziran 2020).
98. Kohaar I, Ploss A, Korol E, Mu K ve ark. Splicing diversity of the human OCLN gene and its biological significance for hepatitis C virus entry. *Journal of virology*. 2010. 84(14):6987-6994.
99. <https://www.ensembl.org/index.html> (Erişim Tarihi: 2 Haziran 2020).
100. O'Driscoll MC, Daly SB, Urquhart JE, Black GC ve ark. Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *The American Journal of Human Genetics*. 2010. 87(3):354-364.
101. Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M ve ark. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *The Journal of Cell Biology*. 1996. 133(1):43-47.
102. Gültürk S, İmir G, Tuncer E. Kan beyin bariyeri. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2007. 29(2):147-154.
103. Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure-remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Developmental biology*. 1996. 180(2):664-679.
104. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*. 1995. 154(1):8-20.

105. Virgintino D, Errede M, Robertson D, Capobianco C ve ark. Immunolocalization of tight junction proteins in the adult and developing human brain. *Histochemistry and cell biology*. 2004. 122(1):51-59.
106. Li Y, Fanning AS, Anderson JM, Lavie A. Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface. *Journal of molecular biology*. 2005. 352(1):151-164.
107. Ghassemifar MR, Sheth B, Papenbrock T, Leese HJ ve ark. Occludin TM4-: an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain. *Journal of Cell Science*. 2002. 115(15):3171-3180.
108. Chen YH, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *The Journal of cell biology*. 1997. 138(4):891-899.
109. Villard L. Polymicrogyria. *Orphanet Encyclopedia*. August 2004.
110. Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B ve ark. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Human molecular genetics*. 2006. 15(7):1195-1207.
111. Cantagrel V, Lossi AM, Lisgo S, Missirian C ve ark. Truncation of NHEJ1 in a patient with polymicrogyria. *Human mutation*. 2007. 28(4):356-364.
112. Mitchell TN, Free SL, Williamson KA, Stevens JM ve ark. Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2003. 53(5):658-663.
113. Baala L, Briault S, Etchevers HC, Laumonnier F ve ark. Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nature genetics*. 2007. 39(4):454-456.
114. Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS ve ark. G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science*. 2004. 303(5666):2033-2036.
115. Close P, Bose D, Chariot A, Leidel SA. Dynamic regulation of tRNA modifications in cancer. In *Cancer and Noncoding RNAs*. Academic Press. 2018. 163-186.
116. Kolaj-Robin O, Séraphin B. Structures and activities of the Elongator complex and its cofactors. In *The Enzymes*. Academic Press. 2017. 41:117-149.
117. Glatt S, Séraphin B, Müller CW. Elongator: transcriptional or translational regulator? *Transcription*. 2012. 3(6):273-276.

118. Otero G, Fellows J, Li Y, de Bizemont T ve ark. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Molecular cell*. 1999. 3(1):109-118.
119. Krogan NJ, Greenblatt JF. Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 2001. 21(23):8203-8212.
120. Chariot A, Leidel SA. Dynamic regulation of tRNA modifications in cancer. In *Cancer and Noncoding RNAs*. 2018:171-173.
121. Dalwadi U, Yip CK. Structural insights into the function of Elongator. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018:1-10.
122. Wittschieben BØ, Otero G, de Bizemont T, Fellows J ve ark. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular cell*. 1999. 4(1):123-128.
123. Huang BO, Johansson MJ, Byström AS. An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA*. 2005. 11(4):424-436.
124. Rahl PB, Chen CZ, Collins, RN. Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol. Cell*. 2005. 17:841-853.
125. Okada Y, Yamagata K, Hong K, Wakayama T ve ark. A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature*. 2010. 463:554-558.
126. Johansson MJO, Esberg A, Huang B, Björk, GR. ve ark. Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Mol Cell Biol*. 2008. 28:3301-3312.
127. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert M. L, Gillard M ve ark. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin. *Cell*. 2009. 136:551-564.
128. Tielens S, Huysseune S, Godin JD, Chariot A ve ark. Elongator controls cortical interneuron migration by regulating actomyosin dynamics. *Cell research*. 2016. 26(10):1131-1148.
129. Li Q, Fazly AM, Zhou H, Huang S ve ark. The elongator complex interacts with PCNA and modulates transcriptional silencing and sensitivity to DNA damage agents. *PLoS Genet*. 2009. 5(10).e1000684.

130. Creppe C, Buschbeck M. Elongator: an ancestral complex driving transcription and migration through protein acetylation. *BioMed Research International*. 2011.
131. Nguyen L, Humbert S, Saudou F, Chariot A. Elongator—an emerging role in neurological disorders. *Trends in molecular medicine*. 2010. 16(1):1-6.
132. Walker J, Kwon SY, Badenhorst P, East P ve ark. Role of elongator subunit Elp3 in *Drosophila melanogaster* larval development and immunity. *Genetics*. 2011. 187(4):1067-1075.
133. Laguesse S, Creppe C, Nedialkova DD, Prévot PP ve ark. A dynamic unfolded protein response contributes to the control of cortical neurogenesis. *Developmental cell*. 2015. 35(5):553-567.
134. Simpson CL, Lemmens R, Miskiewicz K, Broom WJ ve ark. Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum. Mol. Genet*. 2009. 18:472-481.
135. Chen YT, Hims MM, Shetty RS, Mull J ve ark. Loss of mouse Ikbkap, a subunit of elongator, leads to transcriptional deficits and embryonic lethality that can be rescued by human IKBKAP. *Molecular and cellular biology*. 2009. 29(3):736-744.
136. Lin FJ, Shen L, Jang CW, Falnes PØ ve ark. Ikbkap/Elp1 deficiency causes male infertility by disrupting meiotic progression. *PLoS Genet*. 2013. 9(5):e1003516.
137. Slaugenhaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, Leyne M ve ark. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* March 2001. 68(3):598-605.
138. Anderson SL, Coli R, Daly IW, Kichula EA ve ark. Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am J Hum Genet*. 2001. 68(3):753-758.
139. Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K ve ark. Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. 112(9):2764-2769.
140. Jackson MZ, Gruner KA, Qin C, Tourtellotte WG. A neuron autonomous role for the familial dysautonomia gene ELP1 in sympathetic and sensory target tissue innervation. *Development*. 2014. 141(12):2452-2461.
141. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T ve ark. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011. 478(7367):57-63.

142. Cohen JS, Srivastava S, Farwell KD, Lu HM ve ark. ELP2 is a novel gene implicated in neurodevelopmental disabilities. *American journal of medical genetics Part A*. 2015. 167(6):1391-1395.
143. Ladang A, Rapino F, Heukamp LC, Tharun L ve ark. Elp3 drives Wnt-dependent tumor initiation and regeneration in the intestine. *J Exp Med*. 2015. 212(12):2057-75.
144. Delaunay S, Rapino F, Tharun L, Zhou Z ve ark. Elp3 links tRNA modification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis in breast cancer. *Journal of Experimental Medicine*. 2016. jem-20160397.
145. Strug LJ, Clarke T, Chiang T, Chien M ve ark. Centrottemporal sharp wave EEG trait in rolandic epilepsy maps to Elongator Protein Complex 4 (ELP4). *Eur. J. Hum. Genet*. 2009. 17:1171-1181.
146. Close P, Gillard M, Ladang A, Jiang Z ve ark. DERP6 (ELP5) and C3ORF75 (ELP6) regulate tumorigenicity and migration of melanoma cells as subunits of Elongator. *J. Biol. Chem*. 2012. 287(39):32535-32545.
147. Ladang A, Rapino F, Heukamp LC, Tharun L ve ark. Elp3 drives Wnt-dependent tumor initiation and regeneration in the intestine. *Journal of Experimental Medicine*. 2015. 212(12):2057-2075.
148. Frohloff F, Jablonowski D, Fichtner L, Schaffrath R. Subunit communications crucial for the functional integrity of the yeast RNA polymerase II Elongator (γ -toxin target (TOT)) complex. *J. Biol. Chem*. 2003. 278:956-961.
149. Kojic M, Gaik M, Kiska B, Salerno-Kochan A ve ark. Elongator mutation in mice induces neurodegeneration and ataxia-like behavior. *Nature communications*. 2018. 9(1):1-13.
150. Esberg A, Huang B, Johansson MJ, Byström AS. Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for Elongator complex in transcription and exocytosis. *Mol. Cell*. 2006. 24:139-148.
151. Houtgast EJ, Sima VM, Bertels K, Al-Ars Z. Hardware acceleration of BWA- MEM genomic short read mapping for longer read lengths. *Comput Biol Chem*. 2018. 75:54-64.
152. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T ve ark. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009. 25(16):2078-9.

153. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R ve ark. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013. 43:11.0.1-33.
154. Paila U, Chapman BA, Kirchner R, Quinlan AR. GEMINI: integrative exploration of genetic variation and genome annotations. *PLoS Comput Biol*. 2013. 9:e1003153.
155. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D 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. *Genetics in medicine*. 2015. 17(5):405-423.
156. Krueger F. Trim galore!: a wrapper tool around Cutadapt FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files (Babraham Institute). 2015. 516-517.
157. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Ref. Source*. 2010.
158. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016. 32(19):3047-3048.
159. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J ve ark. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013. 29(1):15-21.
160. Love, MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 2014. 15(12):550.
161. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF ve ark. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*. 2016. 44(W1):W90-W97.
162. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic acids research*. 2004. 32(suppl_1):D258-D261.
163. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*. 2000. 28(1):27-30.
164. Liang CC, Park AY, Guan, JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007. 2(2):329.
165. Chen Y. Scratch Wound Healing Assay. *Bio-protocol*. 2012.
166. Gürkök T, Boztepe G, Koyuncu M, Parmaksız İ. P Cisimcikleri ve mRNA Döngüsü. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 2013. 5:54-60.
167. <https://www.rcsb.org> (Erişim Tarihi: 4 Haziran 2020).

168. Ekinçi F, Yildizdas RD, Horoz OO, Herguner O ve ark. A homozygote frameshift mutation in OCLN gene result in Pseudo-TORCH syndrome type I: A case report extending the phenotype with central diabetes insipidus and renal dysfunction. *European Journal of Medical Genetics*. 2020. 103923.
169. Aggarwal S, Bahal A, Dalal A. Renal dysfunction in sibs with band like calcification with simplified gyration and polymicrogyria: report of a new mutation and review of literature. *Eur. J. Med. Genet*. 2016. 59:5-10.
170. Elsaid MF, Kamel H, Chalhoub N, Aziz NA ve ark. Whole genome sequencing identifies a novel occludin mutation in microcephaly with band-like calcification and polymicrogyria that extends the phenotypic spectrum. *Am. J. Med. Genet. Part A*. 2014. 164:1614-1617.
171. Ballabh P, Hu F, Kumarasiri M, Braun A ve ark. Development of tight junction molecules in blood vessels of germinal matrix, cerebral cortex, and white matter. *Pediatric research*. 2005. 58(4):791-798.
172. Jenkinson EM, Livingston JH, O'Driscoll MC, Desguerre I ve ark. Comprehensive molecular screening strategy of OCLN in band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *Clin. Genet*. 2018. 93:228-234.
173. Sánchez-Pulido L, Martín-Belmonte F, Valencia A, Alonso MA. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in biochemical sciences*. 2002. 27(12):599-601.
174. Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L ve ark. Tight junction–associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Molecular biology of the cell*. 2010. 21(7):1200-1213.
175. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*. 2001. 106(4):489-498.
176. Du D, Xu F, Yu L, Zhang C ve ark. The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Developmental cell*. 2010. 18(1):52-63.
177. Runkle EA, Sundstrom JM, Runkle KB, Liu X ve ark. Occludin localizes to centrosomes and modifies mitotic entry. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. 286(35):30847-30858.

178. Abdel-Hamid MS, Abdel-Salam GM, Issa MY, Emam BA ve ark. Band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria: report of 10 new families and identification of five novel OCLN mutations. *J. Hum. Genet.* 2017. 62:553-559.
179. LeBlanc MA, Penney LS, Gaston D, Shi Y ve ark. A novel rearrangement of occludin causes brain calcification and renal dysfunction. *Hum. Genet.* 2013. 132:1223-1234.
180. <https://gnomad.broadinstitute.org> (Erişim Tarihi: 05 Haziran 2020).
181. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S ve ark. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Biomembranes.* 2005. 1669(1):34-42.
182. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology.* 2008. 130(1):55-70.
183. Aguayo AJ, Nair CP, Bray GM. Peripheral nerve abnormalities in the riley-day syndrome. Findings in a sural nerve biopsy. *Arch. Neurol.* 1971. 24:106-116.
184. Axelrod FB, Abularrage JJ. Familial dysautonomia: a prospective study of survival. *J. Pediatr.* 1982. 101:234-236.
185. Axelrod FB. Familial dysautonomia. *Muscle Nerve.* 2004. 29:352-363.
186. Cuajungco MP, Leyne M, Mull J, Gill SP ve ark. Tissue-specific reduction in splicing efficiency of IKBKAP due to the major mutation associated with familial dysautonomia. *Am. J. Hum. Genet.* 2003. 72:749-758.
187. Slaugenhaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, Leyne M ve ark. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am. J. Hum. Genet.* 2001. 68:598-605.
188. Close P, Hawkes N, Cornez I, Creppe C ve ark. Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Mol. Cell.* 2006. 22:521-531.
189. Khalilov D. Çocukluk Çağı epileptik ensefalopatili ve epilepsi hastalığı olan otizmlı olguların klinik- elektrofizyolojik ve genetik olarak değeriendirilmesi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İstanbul. 2008.
190. Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci.* 2000. 97:10120-10125.

191. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2001. 344:1688-1700.
192. Kaya A, Özcan F. Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalarıyla iletişim ve güncel teknolojiler. *The Journal of Turkish Family Physician.* 2017. 8(2):43-48.
193. Bayram E, Topcu Y, Karakaya P, Yiş U ve ark. Rolandik epilepsi her zaman selim bir hastalık mıdır? *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2013. 27(2):91-94.
194. Savaş M. Rolandik epilepsi olgularında dil bozuklukları ile anti nöronal antikor ilişkisinin incelenmesi. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İstanbul.* 2019.
195. Li F, Ma J, Ma Y, Hu Y ve ark. hElp3 directly modulates the expression of HSP70 gene in HeLa cells via HAT activity. *PLoS One.* 2011. 6:e29303.
196. Han Q, Hou X, Su D, Pan L ve ark. hELP3 Subunit of the Elongator complex regulates the transcription of HSP70 gene in human cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007. 39:453-461.
197. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2019. 20(11):665-680.
198. Miśkiewicz K, Jose LE, Bento-Abreu A, Fislage M ve ark. ELP3 controls active zone morphology by acetylating the ELKS family member Bruchpilot. *Neuron.* 2011. 72(5):776-788.
199. Goffena J, Lefcort F, Zhang Y, Lehmann E ve ark. Elongator and codon bias regulate protein levels in mammalian peripheral neurons. *Nature communications.* 2018. 9(1):1-10.
200. Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, Ptacek R ve ark. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. *Medical science monitor basic research.* 2014. 20:138.
201. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics.* 2009. 10(1):57-63.
202. Koptur M. RNA dizileme veri analizi. 2020. https://www.researchgate.net/publication/340254761_RNA_Dizileme_Veri_Analizi.
203. <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/> (Erişim Tarihi: 12 Haziran 2020).
204. Agris PF, Vendeix FA, Graham WD. tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol.* 2007. 366:1-13.

205. Yarian C, Townsend H, Czestkowski W, Sochacka E ve ark. Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *J Biol Chem.* 2002. 277:16391-16395.
206. Urbonavicius J, Qian Q, Durand JM, Hagervall TG ve ark. Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.* 2001. 20:4863-4873.
207. Bjork GR, Durand JM, Hagervall TG, Leipuviene R ve ark. Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism. *FEBS Lett.* 1991. 452:47-51.
208. Shaheen R, Han L, Faqeih E, Ewida N ve ark. A homozygous truncating mutation in PUS3 expands the role of tRNA modification in normal cognition. *Hum. Genet.* 2016. 135:707-713.
209. Gong P, Li J, Dai L, Zhang K ve ark. Genetic variations in FTSJ1 influence cognitive ability in young males in the Chinese Han population. *J. Neurogenet.* 2008. 22:277-287.
210. Michaud J, Kudoh J, Berry A, Bonne-Tamir B ve ark. Isolation and characterization of a human chromosome 21q22.3 gene (WDR4) and its mouse homologue that code for a WD-repeat protein. *Genomics.* 2000. 68:71-79.
211. Klassen R, Grunewald P, Thüring KL, Eichler C ve ark. Loss of anticodon wobble uridine modifications affects tRNA^{Lys} function and protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 2015. 10:e0119261.
212. Glatt S, Zabel R, Kolaj-Robin O, Onuma OF ve ark. Structural basis for tRNA modification by Elp3 from *Dehalococcoides mccartyi*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. 23:794-802.
213. Karlsborn T, Tükenmez H, Chen C, Byström AS. Familial dysautonomia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. 454:441-445.
214. Bento-Abreu A, Jager G, Swinnen B, Rue L ve ark. Elongator subunit 3 (ELP3) modifies ALS through tRNA modification. *Hum. Mol. Genet.* 2018. 27:1276-1289.
215. Kumbhar BV, Kamble AD, Sonawane KD. Conformational preferences of modified nucleoside N(4)-acetylcytidine, ac4C Occur at “Wobble” 34th position in the anticodon loop of tRNA. *Cell biochemistry and biophysics.* 2013. 66(3):797-816.

216. Ikeuchi Y, Kitahara K, Suzuki T. The RNA acetyltransferase driven by ATP hydrolysis synthesizes N4-acetylcytidine of tRNA anticodon. *The EMBO journal*. 2008. 27(16):2194-2203.
217. Trixl L, Lusser A. The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2019. 10(1):e1510.
218. Vangaveti S, Cantara WA, Spears JL, DeMirici H ve ark. A Structural Basis for Restricted Codon Recognition Mediated by 2-thiocytidine in tRNA Containing a Wobble Position Inosine. *Journal of Molecular Biology*. 2020. 432(4):913-929.
219. Mandler M, Fitzsimmons C, McDonald K, Batista P. Elucidating the modification status of tRNAs in response to environmental and metabolic stress. 2020. 25th Annual Meeting of the RNA Society.
220. Dyubankova N, Sochacka E, Kraszewska K, Nawrot B ve ark. Contribution of dihydrouridine in folding of the D-arm in tRNA. *Organic & biomolecular chemistry*. 2015. 13(17):4960-4966.
221. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000. 103:239-252.
222. Smith SE, Coker NK, Tucker E. JNK signaling controls branching, nucleokinesis, and positioning of centrosomes and primary cilia in migrating cortical interneurons. 2020. *bioRxiv*.
223. Coffey ET. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci*. 2014. 15:285-299.
224. Johansen LD, Naumanen T, Knudsen A, Westerlund N ve ark. IKAP localizes to membrane ruffles with filamin A and regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Journal of cell science*. 2008. 121(6):854-864.
225. Barton D, Braet F, Marc J, Overall R ve ark. ELP3 localises to mitochondria and actin-rich domains at edges of HeLa cells. *Neurosci. Lett*. 2009. 455:60-64.
226. Yurtkap Ö, Arslan BA. Nörodejeneratif hastalıklarda aksonal transport. *The Journal of Neurobehavioral Sciences*. 2018. 5(2):115-123.

8. EKLER

8.1. Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.

03.05.2018

Sayı : 408

Sayın Prof.Dr.Sultan CİNGÖZ,

Kurulumuz tarafından 03.05.2018 tarih ve 2229-GOA protokol numaralı 2018/11-66 karar numarası ile görüşülen “Nörogelişimsel Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik Karakterizasyonu” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2229-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nörogelişimsel Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik Karakterizasyonu	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Sultan CİNGÖZ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	Araştırmacı dilekçesi	30.04.2018		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/11-66	Tarih: 03.05.2018
	Prof.Dr.Sultan CİNGÖZ'ün sorumlusu olduğu "Nörogelişimsel Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik Karakterizasyonu" isimli klinik araştırmaya ait 30.04.2018 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışma adının "Nörogelişimsel Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu" olarak değiştirilmesi ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.

358

12.09.2019

Prof.Dr.Aycañ ÜNALP

Kurulumuz tarafından 12.09.2019 tarih ve 490-SBKA EK protokol numaralı 2019/14-05 karar ile onayı alınan **“Epilepsi ile Birlikte Beyin Malformasyonu Gözlenen Nörogelişimsel Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu”** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Ayşegöl YILDIZ
Başkan

Fk: Etik Kurul Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Epilepsi ile Birlikte Beyin Malformasyonu Gözlenen Nörolojik Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	490-SBKAER

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Dekanlık Binası Kat:2 İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
	TELEFON	0 232 4122254 - 0 232 4122258
	FAKS	0232 4122243
	E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Ayca ÜNALP			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	S.B.C. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Uzmanı ve Yardımcısı, Ağız ve Burun Hastanesi, Çocuk Nöroloji			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Sultan Cingöz			
	(TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için) DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİL CİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tam cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☒			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05.09.2019	2.0	Türkçe	☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu- yetişkin	05.09.2019	2.0	Türkçe	☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu- ebeveyn	05.09.2019	2.0	Türkçe	☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu- kontrol	05.09.2019	2.0	Türkçe	☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama	
SIGORTA		☐				
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒	10.09.2019 tarihli istak imzalı			
BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU		☐				
İLAN		☐				
YILLIK BİLDİRİM		☐				
SONUÇ RAPORU		☐				
GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		☐				
DIĞER		☒		-Klinik Araştırmalar Başvuru Formu -Araştırmacı özgeçmişleri		

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşe Gül Yıldız
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Epilepsi ile Birlikte Beyin Malformasyonu Gözlenen Nörogelişimsel Bozukluklar ile İlişkili Mutasyonların Genetik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	490-SHKAEK

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/14-05	Tarih:12.09.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof.Dr.Aysegül Yıldız

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Aysegül YILDIZ	Psikiyatri	DEÜ Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEÜ Onkoloji İnstitüsü Preventif Onkoloji A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Ayşe KARCI	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Pembe KESKİNOĞLU	Biyoistatistik	DEÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilgi A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Erdem YAKA	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji A.D.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.M.Cenk ECEVİT	KBB	DEÜ Tıp Fakültesi KBB A.D.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Ulaş YIĞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Nöroloji)	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Tugba YAVUZŞEN	Onkoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Onkoloji B.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Uğur Önsel TÜRK	Kardiyoloji	Kardiyoritm Kalp Hastalıkları Merkezi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Yasemin ERAÇ	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.İlkay AKSU	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Öğr.Gör.Dr.Cemal Hüseyin GÜVERCİN	Tıp Tarihi ve Etik	DEÜ Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Av.Nevra ÖZBEK TANER	Hukuk	Avukat	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Hayat ALBAYRAK	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	Emekli	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Aysegül Yıldız
İmza:

Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

8.3. Araştırmacı Özgeçmişi



TÜLAY ÖNCÜ ÖNER

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

Web Adresi

Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2014 - Şu Anda (6 yıl 8 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (DR)

01 Eylül 2011 - 05 Şubat 2014 (2 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Genomik Değişikliklerden Yararlanarak Korpus Kallozum Anomalileri ile İlişkili Genlerin Saptanması
Tez Konusu: Korpus Kallozum Beynin Sağ Ve Sol Hemisferlerini Birbirine Bağlayan Sinir Ağlarından Oluşan Bir Yapıdır. İki Hemisfer Arasındaki Duyusal, Motor Ve Bilişsel Bilginin İletilmesinde Rol Oynamaktadır. Korpus Kallozum Anaomalilerinin Populasyonda Prevelansı 0.3% Ve 0.7% Aralığında Değişmektedir. Korpus Kallozum Anomalileri Pek Çok Çevresel Ve Genetik Etken Sonucu Oluşabilmektedir. Herhangi Bir Sendromla Bağlantısı Olmayan, Korpus Kallozum Displazilerine Yol Açan Aday Genler Üzerinde Çalışmalar Devam Etmektedir. Yapılan Çalışmalar Sonucunda Akt3, Cep170, Sdccc8, Adss, C1orf100, C1orf101, Disc1, Gap43, Zbtb20 Ve Znf238 Genlerinin Korpus Kallozum Anomalileriyle İlişkili Aday Genler Olabileceği İleri Sürülmüştür. Znf238 Geni Nöronal Proliferasyonda, Göçte Ve Gelişmekte Olan Serebral Korteksin Farklaşmasında Dikkate Değer Bir Rol Oynamaktadır. Bu Çalışmada 61 Hastada Znf238 Geninin Tüm Ekzonları Pcr İle Çoğaltılarak Dna Dizisi Analizleri Gerçekleştirilmiştir.
Tarih: 2014
Tez Danışmanı: SULTAN CİNGÖZ

22 Haziran 2007 - 22 Haziran 2011 (4 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ, BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 00192

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Şubat 2015 - Şu Anda (5 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
UZMAN, UZMAN, MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

01 Şubat 2018 - Şu Anda (2 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Moleküler Belirteçler
Genetik Karakterizasyon
Tıbbi Genetik
Nadir Genetik Hastalıklar
Biyoinformatik
Biyostatistik
Sitogenetik
Nörodejeneratif Hastalıklar
Korpus Kallozum
AFLP Markörleri
Biyomühendislik
Mutasyonlar
Tek Nükleotit Polimorfizmi
İnsan Moleküler Genetiği

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

T. ÖNCÜ ÖNER, A. ÜNALP, İ. P. DORU, S. AĞILKAYA, H. GÜLERYÜZ, A. SARAÇ, B. ERGÜNER, B. YÜKSEL, S. H. KURUL & S. CİNGÖZ, Gpr56 Homozygous Nonsense Mutation Pr271* Associated With Phenotypic Variability In Bilateral Frontoparietal Polymicrogyria, The Turkish Journal of Pediatrics, 2018, 0041-4301, 60, 3, 229-237.

T. ÖNCÜ ÖNER & Ş. CAN, Sağlıkta Biyoistatistiksel Uygulamalar, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 2018, 2458-9799, 3, 1, 39-45.

A. Y. AYDAR, T. ÖNCÜ ÖNER & E. F. ÜÇÜK, Effects Of Hydroxytyrosol On Human Health, EC NUTRITION, 2017, -, 11, 4, 147-157.

O. ERDOĞAN, S. NEMLİ, T. ÖNCÜ ÖNER & B. TANYOLAÇ, Genetic Variation Among Pathotypes Of Verticillium Dahliae Kleb. From Cotton In Western Turkey Revealed By Aflp, CANADIAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY-REVUE CANADIENNE DE PHYTOPATHOLOGIE, 2013, 0706-0661, 35, 3, 354-362.

Bildiriler

A. Y. AYDAR, T. YILMAZ & T. ÖNCÜ ÖNER, Methods For Reducing Bitterness Of Table Olives, Sözlü Sunum, II. International University-Industry Cooperation, R D And Innovation Congress, 14 Kasım 2018, 15 Kasım 2018.

T. ÖNCÜ ÖNER, A. ÜNAL, E. BAYRAM, A. S. HIZ, İ. KAYTAN & S. CİNGÖZ, Ocln Gene Variants Identified By Exome Sequencing Among Cases With Neurodevelopmental Disorders, Sözlü Sunum, 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018.

A. Y. AYDAR & T. ÖNCÜ ÖNER, Bilimsel Araştırmalarda Kullanılan Spss, Sas Ve R Programların İncelenmesi, Poster Sunumu, International Conference On Data Science And Applications (Icondata), 04 Ekim 2018, 07 Ekim 2018.

T. ÖNCÜ ÖNER & S. CİNGÖZ, Zbtb18 Genindeki Nonsinonim Snp'lerin In Silico Analizi, Sözlü Sunum, International Conference On Data Science And Applications (Icondata), 04 Ekim 2018, 07 Ekim 2018.

T. ÖNCÜ ÖNER, A. ÜNALP, I. P. DÖRÜ, S. AĞILKAYA, H. GÜLERİYÜZ, A. SARAÇ, B. ERGÜNER, S. H. KURUL & S. CİNGÖZ, Bilateral Frontoparietal Polimikrogride Fenotipik Değişkenlik İle İlişkili Gpr56 Homozigot Nonsense Mutasyonu P.r271*, Poster Sunumu, Xv. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi (uluslararası Katılımı), 26 Ekim 2017, 29 Ekim 2017.

T. ÖNCÜ ÖNER, A. ÜNALP & S. CİNGÖZ, Nörogelişimsel Bozukluğu Olan Hastada Ctp1 Geninde Saptanan Homozigot Missense Mutasyon, Poster Sunumu, Xv. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi (uluslararası Katılımı), 26 Ekim 2017, 29 Ekim 2017.

T. ÖNCÜ ÖNER, E. F. ÜÇÖK & A. Y. AYDAR, Biosensors: Dna Biosensors, Poster Sunumu, Second International Conference On Advances In Science, Icas 2017, 13 Eylül 2017, 15 Eylül 2017.

E. F. ÜÇÖK, T. ÖNCÜ ÖNER & A. Y. AYDAR, Quantification Of Bacteria In Mixed Culture Using Molecular Biology Methods, Poster Sunumu, Second International Conference On Advances In Science, Icas 2017, 13 Eylül 2017, 15 Eylül 2017.

A. Y. AYDAR, E. F. ÜÇÖK & T. ÖNCÜ ÖNER, Recent Developments In Microbial Oil Production, Poster Sunumu, Second International Conference On Advances In Science, Icas 2017, 13 Eylül 2017, 15 Eylül 2017.

S. AĞILKAYA, T. ÖNCÜ ÖNER, E. BAYRAM, S. HIZ & S. CİNGÖZ, Korpus Kallozum Agenezili Olguda Zbtb20 Ve Gap43 Genlerini İçeren De Novo 3q13 Delesyonun Moleküler Sitogenetik Analizi, Sözlü Sunum, Xiv. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi (uluslararası Katılımı), 27 Ekim 2015, 30 Ekim 2015.

T. ÖNCÜ ÖNER, E. BAYRAM, S. AĞILKAYA, U. YIŞ, S. HIZ & S. CİNGÖZ, Korpus Kallozum Anomalileri Olan Çocuklarda Zbtb18 Genindeki Değişikliklerin Saptanması, Poster Sunumu, Xiv. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi (uluslararası Katılımı), 27 Ekim 2015, 30 Ekim 2015.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Farklı Kurutma Yöntemlerinin Inula Viscosa (L)'nin Antioksidan Özelliklerinin ve Fenolik Biyoerişilebilirliğinin, Pc-3 Hücre Hatında Proliferasyon ve Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Vakfıkebir Ekmeği Hamurunun Kimyasal ve Mikrobiyolojik Açidan Karakterizasyonu, Metagenomik Analizi ve Ekmeğin Özellikleri, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TÜBİTAK İKİLİ İŞBİRLİĞİ (DİĞER), BURSIYER, Valorization of olive seeds and leaves and nutraceutical or food additives, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Epilepsi İle Birlikte Beyin Malformasyonu Gözlenen Nörogelişimsel Bozukluklar İle İlişkili Mutasyonların Genetik Ve Fonksiyonel Karakterizasyonu, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

BAP, ARAŞTIRMACI, Ege Bölgesi Asma Çeşitlerinde Değerli Metabolit İçeriği İle İlişkili Markörlerin Yeni Nesil Sekanslama Teknolojileri Kullanılarak Belirlenmesi, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Eylül 2017, 01 Mart 2020.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Kemoterapi Alan Malign Solid Tümörlü Hastalarda Cryptosporidium Spp.'nin Mikroskopik, Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Aralık 2018, 01 Şubat 2020.

KALKINMA BAKANLIĞI, ARAŞTIRMACI, Avrupa Birliği Ufuk 2020 Programına Yönelik Etkili Proje Yazma Eğitimi (2017 Yılı Teknik Destek Programı - Referans No: Tr33/17/td/0094), Yürütülen Kuruluş: PROJE KOORDİNASYON UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ, Destek Alınan Kuruluş: ZAFER KALKINMA AJANSI GENEL SEKRETERLÜĞÜ (Yurt İçi) , 01 Eylül 2018, 01 Eylül 2018.

BAP, ARAŞTIRMACI, Zeytinyağı Ekstraksiyonunda Ultrason Uygulamasının Yağın Verimi Ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Ocak 2016, 01 Ocak 2017.

BAP, ARAŞTIRMACI, Kesim Sonrası Ph Ve Renk Değerleri İle Sığır Eti Tekstür Değerleri Arasındaki İlişkinin Etin Olgunlaştırılması Boyunca İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Haziran 2015, 01 Mayıs 2016.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

1190746, Zeytin İç Çekirdeği ve Yaprığının Nutrasötik veya Fonksiyonel Gıda Olarak Değerlendirilmesi, Uluslararası, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, TOVAG - Tarım, Ormancılık Ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Ayrılma Tarihleri: 22.04.2020 - 01.04.2023, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.04.2020 - 01.04.2023.

BİDEB Destekleri

TÜLAY ÖNCÜ ÖNER, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Online Başvuru Onaylanmadı, 2018 - 1.
TÜLAY ÖNCÜ ÖNER, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2011 - 3, 01.10.2011 - 31.08.2013.
TÜLAY ÖNCÜ ÖNER, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2012 - 3, 01.10.2012 - 31.08.2013.
TÜLAY ÖNCÜ ÖNER, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Programı, Bursu Kesildi, 2013 - 2, 01.03.2014 - 28.02.2018.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0