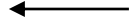


Adınızı soyadınızı giriniz

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



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**( YÜKSEK LİSANS DOKTORA TEZİ )**

**PROGRESİF MİYOKLONİK EPİLEPSİLERDE TÜM  
EKZOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE İLİŞKİLİ  
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**GAREN HARYANYAN**

**DANIŞMAN  
SİBEL AYLİN UĞUR İŞERİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK**

**İSTANBUL-2019**

**TEZ ONAYI**

### YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Garen HARYANYAN tarafından Doç. Dr. Sibel Aylin UĞUR İŞERİ'nin danışmanlığında hazırlanan **“Progresif Miyoklonik Epilepsilerde Tüm Ekzom Dizileme Yöntemi İle İlişkili Genlerinin Araştırılması”** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14.06.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Nerses BEBEK**  
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi  
Nöroloji Anabilim Dalı

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

**Doç. Dr. Özden HATIRNAZ NG**  
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üni. Tıp Fak.  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## BEYAN

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

Garen Haryanyan

## İTHAF

Annem / Babam / Eşim / Hocam

'ya / Aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsün'de başladığım stajımdan itibaren her zaman beni destekleyen ve yanımda olan, Tez çalışmamda ve iş hayatımda bana doğru adımları gösterdiği için danışmanım Sibel Uğur İşeri' ye,

Lisans derecemden sonra beni staj görüşmesi için çağıran ve ilk adımlarımda yanımda olan Feyza Tuncer Kılınç'a,

Lisans üstü eğitimimin başlarında bana destek olan ve her zaman moral konuşmalarıyla öğrencileri ayakta tutarak bir adım daha ileri götürmeye çalışan. Uğur Özbek' e,

Tez kapsamında incelenen ailelerin klinik bilgilerini tarafımıza ileten Dr. Nerses Bebek ve Betül Baykan'a,

Stajımın ilk zamanlarından Tez çalışmamı yaptığım dönemlerde bilgilerini esirgemeyen Emrah Yücesan ve Özkan Özdemir'e,

Laboratuvarda geçen süreleri her zaman keyifli hale getiren ve hiç bir zaman desteklerini benden esirgemeyen Yeşim Kesim' e, Hande Akçakaya' ya, Barış Salman'a, Sevcan Mercan'a,

Aynı çalışma grubunda olmasak da verdikleri fikirlerle beni destekleyen, kongreleri ve projeleri daha eğlenceli hale getiren Khusan Khodzhaev ve Yücel Erbilgin'e,

Her zaman hem enerji hem de destek veren Burçak Vural, Müge Sayitoğlu' na, Özden Hatırnaz Ng' ye, Sinem Fırtına' ya, Didem Altındirek'e,

Özellikle tez yazım aşamasında her türlü huysuzluğumu çeken ve tembellik yaptığımda beni kaldıran Kristin Dinçkayıkçı'ya,

İş hayatımda beni hep destekleyen Genera Diagnostik'teki çalışma arkadaşlarıma,

Destekleri ve güvenleri için Madlen Haryanyan, Yazmacıyan Ailesi, Gökoğlu Ailesi ve Dinçkayıkçı Ailesi'ne,

Arkamda olmaları bana sonsuz güç veren annem Ayda Haryanyan ve babam Kırkor Haryanyan a, eğitim hayatım boyunca yanımdan bir gün olsun ayrılmayan ve yol gösteren ağabeyim Sayat Haryanyan’a,

Lisans öğrenimimin başından itibaren fikir ve düşünceleriyle beni her zaman motive eden, her gün bizi dinleyen ve çizmem gereken yolu, bilimin, bilimsel görüşün, duruşun ve ahlakın ne olduğunu tarif eden Cemal Ün’e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TDP-2017-25510) ve İstanbul Kalkınma Ajansı Geleceğe Yatırım: Biyobanka projesi İSTKA (proje no:TR/15/YNK/0093) tarafından desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| TEZ ONAYI .....                                            | 2  |
| BEYAN.....                                                 | 4  |
| İTHAF.....                                                 | 5  |
| TEŞEKKÜR.....                                              | 6  |
| İÇİNDEKİLER .....                                          | 8  |
| TABLolar LİSTESİ.....                                      | 11 |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                     | 12 |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                      | 14 |
| ÖZET .....                                                 | 16 |
| ABSTRACT.....                                              | 18 |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                      | 20 |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                    | 22 |
| 2.1. Progresif Miyoklonik Epilepsi .....                   | 22 |
| 2.2. Progresif Miyoklonik Epilepsi Alt grupları .....      | 23 |
| 2.2.1. Unverricht-Lundborg Hastalığı (ULH; EPM1A).....     | 24 |
| 2.2.2. ULH benzeri PME .....                               | 24 |
| 2.2.3. Lafora Hastalığı (LH; EPM2A/2B).....                | 25 |
| 2.2.4. Miyoklonus Epilepsi ve Ataksi (MEAK; EPM7) .....    | 25 |
| 2.2.5. CLN14 (EPM3).....                                   | 26 |
| 2.3. Yeni Nesil Dizileme.....                              | 27 |
| 2.3.1. Tüm Ekzom Dizileme .....                            | 28 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                    | 29 |
| 3.1. GEREÇ .....                                           | 29 |
| 3.1.1. Çalışma Kapsamından İncelenen Bireyler .....        | 29 |
| 3.1.2. Çalışmada kullanılan kitler .....                   | 35 |
| 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....                 | 35 |
| 3.1.4. Çalışma Kapsamında Hizmet Alınan Firmalar .....     | 35 |
| 3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çevrimiçi Veri Tabanları ..... | 36 |
| 3.1.6. Çalışmada Kullanılan Analiz Programları .....       | 37 |
| 3.2. YÖNTEM .....                                          | 37 |

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu ve Kalite Ölçümü.....                                           | 37 |
| 3.2.2. Touchdown PCR (TD-PCR, Kademeli sıcaklık düşürmeli primer zincir reaksiyon).....                | 40 |
| 3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....                                                                  | 42 |
| 3.2.4. Sanger dizileme yöntemi.....                                                                    | 42 |
| 3.2.4.1. Lafora Hastalığı ile ilişkili <i>EPM2A</i> ve <i>NHLRC1</i> genlerinin taranması .....        | 43 |
| 3.2.5. Tüm Ekzom Dizileme Analizi .....                                                                | 43 |
| 3.2.5.1. Ham Veriden Varyant Listesinin Oluşturulması.....                                             | 45 |
| 3.2.5.2. Varyant Listesi ve Analizi.....                                                               | 45 |
| 3.2.6. Varyantların Adlandırılması .....                                                               | 48 |
| 3.2.7. Varyantların Segregasyon Analizi .....                                                          | 49 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                       | 50 |
| 4.1. Lafora Hastalığı ile ilişkili <i>EPM2A</i> ve <i>NHLRC1</i> genlerinin tarama sonuçları .....     | 52 |
| 4.1.1. E09-85.....                                                                                     | 52 |
| 4.1.2. E10-101.....                                                                                    | 53 |
| 4.1.3. E04-129 ve E07-130 .....                                                                        | 54 |
| 4.1.4. E14-05, E11-88, E11-38 ve E18-26.....                                                           | 55 |
| 4.1.5. E10-114.....                                                                                    | 56 |
| 4.2. Tüm Ekzom analiz sonuçları .....                                                                  | 57 |
| 4.2.1. E07-269 ve E07-270 .....                                                                        | 58 |
| 4.2.2. E17-40 ve E15-23 .....                                                                          | 59 |
| 4.2.3. E17-41 ve E07-268 .....                                                                         | 60 |
| 4.2.4. E11-148.....                                                                                    | 62 |
| 4.2.5. E10-196.....                                                                                    | 63 |
| 4.2.6. E14-06, E15-25, E11-78, E12-39.....                                                             | 63 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                      | 65 |
| 5.1. Lafora Hastalığı ile ilişkili <i>EPM2A</i> ve <i>NHLRC1</i> geninde tespit edilen varyantlar..... | 65 |
| 5.1.1. Lafora Hastalığı ve uygulanabilecek tedavi yöntemleri .....                                     | 66 |
| 5.1.2. <i>EPM2A</i> geninde tespit edilen varyantlar.....                                              | 67 |
| 5.1.3. <i>NHLRC1</i> geninde tespit edilen varyantlar .....                                            | 68 |
| 5.2. <i>SCARB2</i> geninde tespit edilen ve AMRF ile ilişkilendirilen varyant .....                    | 69 |
| 5.3. <i>KCTD7</i> geninde tespit edilen varyant .....                                                  | 70 |
| 5.4. Sonuç.....                                                                                        | 71 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| KAYNAKLAR .....                 | 72 |
| ETİK KURUL KARARI .....         | 76 |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI..... | 77 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                  | 78 |



**TABLÖLAR LİSTESİ**

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2-1: PME ile ilişkili genler ve alt grupleri.....                                               | 23 |
| Tablo 2-2: CLN ile ilişkili genler ve alt grupleri. ....                                              | 26 |
| Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan kitler ve tedarikçi firmalar.....                                     | 35 |
| Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları. ....                                   | 35 |
| Tablo 3-3: Hizmet alımı yapılan firmalar ve alınan hizmetler. ....                                    | 36 |
| Tablo 3-4: Çevrimiçi veri tabanı listesi. ....                                                        | 36 |
| Tablo 3-5: Kullanılan analiz programları .....                                                        | 37 |
| Tablo 4-1: Sanger ve WES analizleri sonucu hastalarda tespit edilen PME ile ilişkili varyantlar. .... | 51 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3-1: E10-101 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                    | 30 |
| Şekil 3-2: E15-25 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                     | 30 |
| Şekil 3-3: E11-148 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                    | 30 |
| Şekil 3-4: E11-88 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                     | 31 |
| Şekil 3-5: E14-05 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                     | 31 |
| Şekil 3-6: E09-85 nolu birey için aile ağacı ....                                                                                                      | 31 |
| Şekil 3-7: E10-196 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                    | 32 |
| Şekil 3-8: E15-23 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                     | 32 |
| Şekil 3-9: E17-40 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                     | 33 |
| Şekil 3-10: E11-78 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                    | 33 |
| Şekil 3-11: E07-269/270 nolu bireyler için aile ağacı. ....                                                                                            | 33 |
| Şekil 3-12: E14-06 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                    | 34 |
| Şekil 3-13: E10-114 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                   | 34 |
| Şekil 3-14: E04-129 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                   | 34 |
| Şekil 3-15: E17-41 nolu birey için aile ağacı. ....                                                                                                    | 35 |
| Şekil 3-16: QIAamp DNA Blood Maxi Kit izolasyon protokolü şeması. ....                                                                                 | 39 |
| Şekil 3-17: TD-PCR için bölgelere özgü protokoller. ....                                                                                               | 42 |
| Şekil 3-18: <i>EPM2A</i> geni NM_005670.4_ekzon-intron şeması ....                                                                                     | 43 |
| Şekil 3-19: <i>NHLRC1</i> geni için dizayn edilen primer çiftleri. 1.bölge – kırmızı, 2. bölge – yeşil, 3. bölge – siyah kutu ile gösterilmiştir. .... | 43 |
| Şekil 3-20: <i>EPM2A</i> geni ekzon 1 bölgesi düşük kapsama bölgesi (Kırmızı ok) ....                                                                  | 44 |
| Şekil 3-21: PME ile ilişkili genlerin analizi.....                                                                                                     | 46 |
| Şekil 3-22: Kalıtım modellerine göre yapılan analiz. ....                                                                                              | 47 |
| Şekil 3-23: Fenotip bilgilerine göre yapılan analiz.....                                                                                               | 48 |
| Şekil 4-1: NM_005670.3:c.721C>T varyantı CLC Workbench görüntüsü. ....                                                                                 | 52 |
| Şekil 4-2: NM_005670.3:c.259A>G varyantı ailesel segregasyon sonuçları.....                                                                            | 53 |
| Şekil 4-3: NM_198586.2:c.77G>A varyantı CLC Workbench görüntüsü. ....                                                                                  | 54 |
| Şekil 4-4: NM_198586.2:c.436G>A varyantı CLC Main Workbench görüntüsü ....                                                                             | 56 |
| Şekil 4-5: NM_005670.3:c.259A>G varyantı CLC Workbench görüntüsü. ....                                                                                 | 57 |
| Şekil 4-6: E07-269 ve E07-270 hastalarında tespit edilen varyantların CLC Workbench görüntüsü. ....                                                    | 59 |

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-7: (A) E15-23 kodlu hasta, (B) E17-40 kodlu hastada NM_198586.2:c.436G>A varyantı CLC Workbench görüntüsü. .... | 60 |
| Şekil 4-8: E17-41 kodlu hastada tespit edilen NM_005506.3:c.134delA varyantı aile segregasyon sonucu .....              | 61 |
| Şekil 4-9: E11-148 kodlu hastada tespit edilen NM_153033.4:c.407C>A varyantı aile segregasyon çalışması.....            | 62 |



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

PME - Progresif Miyoklonik Epilepsi  
ULH - Unverricht-Lundborg Hastalığı  
LH - Lafora Hastalığı  
CLN - Nöronal Seroid Lipofusinoz  
JME - Jüvenil Miyoklonik Epilepsi  
EEG - elektroensefalografi  
İJE - İdyopatik jeneralize epilepsi  
NGS - Yeni nesil dizileme  
WES - Tüm ekzom dizileme  
CMA - Kromozomal microarray analizi  
PCR - Primer Zincir Reaksiyonu  
NMD - Nonsense Mediated Decay  
TD-PCR - Kademeli Sıcaklık Düşürme Primer Zincir Reaksiyonu  
EPM - Epilepsi, Progresif Miyoklonus  
MEAK - Miyoklonus Epilepsi ve Ataksi  
DNA - Deoksiribonükleik asit  
İSTKA - İstanbul Kalkınma Ajansı  
BAP - Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
A - Adenin  
G - Guanin  
C - Sitozin  
T - Timin  
IGV - Integrative Genomics Viewer  
ACMG - American College of Medical Genetics and Genomics  
OD - Otozomal Dominant  
OR - Otozomal Resesif  
AAV - Adeno ile ilişkili virüs  
LIMP2 - Lizozomal integral protein tip 2

GBA - Glukoserebrozidaz

AMRF - Aksiyon miyoklonus renal yetmezlik

CSTB - Cystatin B

PRICKLE1 - Prickle planar cell polarity protein 1

GOSR2 - Golgi SNAP receptor complex member 2

EPM2A - EPM2A glucan phosphatase, laforin

EPM2B - Epilepsi, Progresif Miyoklonus 2B

KCNC1 - Potassium voltage-gated channel subfamily C member 1

KCTD1 - Potassium channel tetramerization domain containing 1

NHLRC1 - NHL repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1

UCSC - University of California Santa Cruz Genomics Institute

KCNS1 - Potassium voltage-gated channel modifier subfamily S member 1

SLC7A6OS - Solute Carrier Family 7 Member 6 Opposite Strand

GC - Asit hidrolaz glukoserebrosidaz

BTB/POZ - Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac/POxvirus and Zinc finger

NCBI - National Center for Biotechnology Information

BWA - Barrows-Wheeler Alignment

## ÖZET

Haryanyan, G. (2019). Progresif Miyoklonik Epilepsilerde Tüm Ekzom Dizileme Yöntemi ile İlişkili Genlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Progresif Miyoklonus Epilepsisi (PME) aksiyon ile tetiklenen miyoklonus, tonik-klonik nöbetler ve ilerleyici nörolojik bulgular ile kendini gösteren genellikle resesif geçişli bir hastalık grubudur. PME alt grupları arasında ayırıcı tanıyı koymak güçtür, çünkü çoğu PME türü klinik olarak benzer özelliklere sahip olsalar bile genetik olarak heterojendirler. Hastaların bilişsel işleyişleri değerlendirildiğinde PME’ler klinik olarak iki ana grupta incelenebilir. Bilişsel işleyişin normal seyrettiği PME’ler arasında Unverricht-Lundborg Hastalığı (ULH) ve Aksiyon miyoklonus-renal yetmezlik sendromu sayılabilir. Lafora Hastalığı (LH) ve Nöronal Seroid Lipofusinoz (CLN) gibi PME alt gruplarında ise hastalık bilişsel işleyişte zayıflama ile seyreder. Çalışmamızın amacı klinik olarak örtüşen özelliklere sahip PME hasta grubunu yüksek çıktılı yöntemlerle inceleyerek bu hastalarda moleküler altyapıyı aydınlatmak, yeni PME genleri bulmak ve bu pilot çalışma ile ülkemize özgü bir PME genetik profili çıkarılmasına katkı sağlamaktır. PME nadir bir hastalık olduğundan ötürü proje çıktılarımız nadir hastalık araştırmaları ile de örtüşmektedir.

Çalışmamızda, PME ön tanısı almış 18 farklı aileden 21 hastada hastalıkta genetik analizler gerçekleştirilmiş ve hastalığın kaynağı olan genler araştırılmıştır. Bu kapsamda kademeli bir analiz strateji tercih edilmiştir: (i) PME’nin nispeten yaygın bir sebebi olan Lafora Hastalığı ile ilgili *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinin Sanger dizileme yöntemi ile incelenmesi (ii) hem bilinen hem de yeni PME genlerinin kolektif olarak araştırılması için tüm ekzom dizileme yapılması.

Bu çalışmada hedefe yönelik veya yüksek çıktılı yöntemler ile PME hasta grubundaki yoğun genetik heterojenliğin hastalara özgü bireysel sonuçlar verecek şekilde analizini planladık.

Çalışma sonucunda, farklı alt gruplar ile ilişkilendirilmiş *EMP2A*, *NHLRC1*, *SCARB2* ve *KCTD7* genlerinde hastalık ile ilişkilendirilebilecek varyantlar tespit edilmiş ve tek bir kişide hastalıkla ilişkili olabilecek bir gende varyantlar tespit

edilmiştir. Dört hastada ise hastalık ile ilişkili veya ilişkili olabilecek bir varyant tespit edilememiş, aday genler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Ekzom Dizileme, Epilepsi, Genetik, Lafora, Miyoklonik Epilepsi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDP-2017-25510



## ABSTRACT

Haryanyan, G. (2019). Investigation of Genes in Progressive Myoclonic Epilepsies with all Whole Exom Sequencing. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetic Department. Postgraduate. İstanbul.

Progressive Myoclonus Epilepsy (PME) is a disease-induced myoclonus, tonic-clonic seizures, and progressive neurological manifestations. The differential diagnosis for PME subgroups is rather challenging, as most PME types have clinically similar characteristics and they are genetically heterogeneous. PMEs can clinically be classified in two main groups via evaluating the cognitive status of affected individuals. PME subtypes with normal cognitive functioning include Unverricht-Lundborg Disease (ULH) and Action myoclonus-renal failure syndrome. On the other hand, in PME subtypes such as Lafora Disease (LD) and Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (CLN), there is cognitive decline as the disease progresses. Herein, we set out to analyze a cohort of PME patients with clinically overlapping features in order to provide molecular diagnosis, find new PME genes and establish the genetic profile of PME patients specific to our country via this pilot study. Since PME is a rare disease, the outcome of our project also overlaps with rare disease studies.

In this study, we have performed genetic analyses in 21 patients from 18 distinct families. In this context, we have undertaken a serial analysis strategy: (i) Investigation of *EPM2A* and *NHLRC1* genes related to Lafora Disease -a rather common form of PME- by Sanger sequencing (ii) Whole exome sequencing to identify both known and new PME genes.

In the framework of this study, we have analyzed the intense genetic heterogeneity in PME patient group with the aim of providing patient specific results.

As a result of the study, variants have been identified in *EMP2A*, *NHLRC1*, *SCARB2* and *KCTD7* genes associated with different subgroups and in a single patient, a variant in a gene that may be associated with the disease has been identified. In four patients, a variant that could be associated with or associated with the disease could not be identified and candidate genes were selected.

**Key Words:** Exome sequencing, epilepsy, genetic, lafora, myoclonic epilepsy

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDP-2017-25510



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi dünya popülasyonunun %0.5-2' sini etkileyen yaygın karmaşık bir nörolojik hastalık olup, anormal nöronal deşarjlarla birlikte seyreden tekrarlayıcı nöbetlerin serebral fonksiyonda geçici bozulmalara yol açmasıyla kendini gösterir. Nöbetlerin kaynağının beynin tüm veya belirli bölgesinde olması durumunda epileptik sendrom sırasıyla jeneralize veya parsiyel olarak nitelendirilir. Progresif Miyoklonus Epilepsi (PME), epilepsinin jeneralize ve semptomatik bir alt grubudur ve ağır bir klinik tablo ile ilerler. PME' ler aynı zamanda nadir hastalıklar sınıfına dahil genetik geçişli ve nörodejeneratif süreçlerin sorumlu olduğu heterojen bir hastalık grubu olarak da tanımlanırlar.

Tüm epilepsilerin yaklaşık %1'ini oluşturan PME' ler temel olarak aksiyon ve/veya dış uyarılar (ışık, ses ve dokunma) ile tetiklenen ağır miyoklonus ile kendini gösterir. Başlangıç yaşı genellikle geç çocukluk veya ergenlik çağı olsa da PME her yaşta ortaya çıkabilir. PME'de miyokloniye sıklıkla diğer nöbet türleri (özellikle jeneralize tonik-klonik nöbetler), ilerleyici ataksi ve demans gibi farklı nörolojik bulgular da eşlik eder. Sonunda hastalar tekerlekli sandalyeye bağımlı kalırlar ve ortalama yaşam süreleri düşer. PME'yi ailesel kümelenme gösteren jüvenil miyoklonik epilepsi (JME) gibi diğer genetik geçişli epilepsilerden klinik olarak ayırmak özellikle hastalığın ilk evrelerinde zor olabilir. Ancak ilerleyici nörolojik hasar ve antiepileptik ilaç tedavisine direnç gibi bulguların elektroensefalografi (EEG) incelemesi ile desteklenmesi PME tanısını güçlendirir. EEG'de tipik olarak temel aktivitede yavaşlama ve jeneralize epileptiform deşarjlar, ışık duyarlılığı, özellikle oksipital bölgede fokal bulgular görülür.

PME alt grupları benzer klinik özellikler göstermekle beraber hastaların bilişsel işleyişleri değerlendirildiğinde PME'ler klinik olarak iki ana grupta incelenebilir. Bilişsel işleyişin normal seyrettiği PME'ler arasında Unverricht-Lundborg Hastalığı (ULH) ve Aksiyon miyoklonus-renal yetmezlik sendromu sayılabilir. Lafora Hastalığı (LH) ve Nöronal Seroid Lipofusinoz (Ceroid Lipofuscinosis Neuronal; CLN) gibi PME alt grupları ise hastalık bilişsel işleyişte zayıflama ile seyreder. Moleküler olarak karakterize edilen ve ilişkili gen veya bölgenin tespit edildiği PME alt gruplarının çoğunun otozomal resesif geçişli olduğu görülmektedir (Tablo 2-1). Bildirilen gen

varyantları özellikle akraba evliliğine bağı ailelerde veya izole toplumlarda homozigot veya birleşik heterozigot durumdadır. Bununla beraber otozomal dominant veya mitokondrial kalıtım gösteren PME alt grupları de tespit edilmiştir. PME alt gruplarından sorumlu genlerin kodladığı proteinlerin çoğunun endozomal veya lizozomal görevleri vardır, ancak ilişkili hastalık mekanizmaları genelde aydınlatılabilmiş değildir.

PME alt gruplarının genetik heterojenite, fenotipik benzerlik ve diğer epileptik veya nörodejeneratif hastalıklarla benzerlik göstermesinden dolayı bu türleri klinik olarak sınıflandırmakta genellikle zorluk yaşanır. Çoğu durumda bu sınıflandırmayı yapabilecek belirleyici bir klinik özellik veya uygun bir biyobelirteç mevcut değildir. Sonuç olarak PME vakalarının önemli bir kısmında ayırıcı tanı genelde eksik kalmaktadır. Tablo 2-1 de özetlenen PME alt gruplarının klasik PME fenotipine sahip ve ilişkili genleri tespit edilmiş bazı hastalıklar aşağıda detayları ile anlatılmıştır. PME alt grupları EPM (Epilepsi, Progresif Miyoklonus) kısaltması ve takip eden bir numara ile sınıflandırılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı PME hasta grubunda ilişkili genlerin incelenmesidir. Nispeten yaygın faktörlerin elenmesinden sonra yüksek çıktılı ekzom dizileme yöntemi ile hem bilinen hem de PME ile ilişkili yeni genler incelenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Progresif Miyoklonik Epilepsi

Epilepsi dünya popülasyonunun %0.5-2' sini etkileyen yaygın karmaşık bir nörolojik hastalık olup, anormal nöronal deşarjlarla birlikte seyreden tekrarlayıcı nöbetlerin serebral fonksiyonda geçici bozulmalara yol açmasıyla kendini gösterir [1]. Nöbetlerin kaynağının beynin tüm veya belirli bölgesinde olması durumunda epileptik sendrom sırasıyla jeneralize veya parsiyel olarak nitelendirilir. Progresif Miyoklonus Epilepsisi (PME) epilepsinin jeneralize ve semptomatik bir alt grubudur ve ağır bir klinik tablo ile ilerler. PME' ler aynı zamanda nadir hastalıklar sınıfına dahil genetik geçişli ve nörodejeneratif süreçlerin sorumlu olduğu heterojen bir hastalık grubu olarak da tanımlanırlar.

Tüm epilepsilerin yaklaşık yüzde 1'ini oluşturan PME' ler temel olarak aksiyon ve/veya dış uyarılar (ışık, ses ve dokunma) ile tetiklenen ağır miyoklonus ile kendini gösterir [2]. Başlangıç yaşı genellikle geç çocukluk veya ergenlik çağı olsa da PME her yaşta ortaya çıkabilir. PME'de miyokloniye sıklıkla diğer nöbet türleri (özellikle jeneralize tonik-klonik nöbetler, ilerleyici ataksi ve demans gibi farklı nörolojik bulgular da eşlik eder [3]. Sonunda hastalar tekerlekli sandalyeye bağımlı kalırlar ve ortalama yaşam süreleri düşüktür. PME'yi ailesel kümelenme gösteren juvenil miyoklonik epilepsi (JME) gibi diğer genetik geçişli epilepsilerden klinik olarak ayırmak özellikle hastalığın ilk evrelerinde zor olabilir. Ancak ilerleyici nörolojik hasar ve antiepileptik ilaç tedavisine direnç gibi bulguların elektroensefalografı (EEG) incelemesi ile desteklenmesi PME tanısını güçlendirir [4–5]. EEG'de tipik olarak temel aktivitede yavaşlama ve jeneralize epileptiform deşarjlar, ışık duyarlılığı, özellikle oksipital bölgede fokal bulgular görülür.

PME alt grupları benzer klinik özellikler göstermekle beraber hastaların bilişsel işleyişleri değerlendirildiğinde PME'ler klinik olarak iki ana grupta incelenebilir. Bilişsel işleyişin normal seyrettiği PME'ler arasında Unverricht-Lundborg Hastalığı (ULH) ve Aksiyon miyoklonus-renal yetmezlik sendromu sayılabilir. Lafora Hastalığı

(LH) ve nöronal seroid lipofusinoz (Ceroid Lipofuscinosis Neuronal; CLN) gibi PME alt gruplarında ise hastalık bilişsel işleyişte zayıflama ile seyreder.

## 2.2. Progresif Miyoklonik Epilepsi Alt grupları

Moleküler olarak karakterize edilen ve ilişkili gen veya bölgenin tespit edildiği PME alt gruplarının çoğunun otozomal resesif geçişli olduğu görülmektedir (Tablo 2-1). Bildirilen gen mutasyonları özellikle akraba evliliğine bağlı ailelerde veya izole toplumlarda homozigot veya birleşik heterozigot durumdadır. Bununla beraber otozomal dominant veya mitokondrial kalıtım gösteren PME alt gruplarında tespit edilmiştir. PME alt gruplarından sorumlu genlerin kodladığı proteinlerin çoğunun endozomal veya lizozomal görevleri vardır, ancak ilişkili hastalık mekanizmaları genelde aydınlatılabilmiş değildir.

PME alt gruplarının genetik heterojenite, fenotipik benzerlik ve diğer epileptik veya nörodejeneratif hastalıklarla benzerlik göstermesinden dolayı bu türleri klinik olarak sınıflandırmakta genellikle zorluk yaşanır. Çoğu durumda bu sınıflandırmayı yapabilecek belirleyici bir klinik özellik veya uygun bir biyobelirteç mevcut değildir. Sonuç olarak PME vakalarının önemli bir kısmında ayırıcı tanı genelde eksik kalmaktadır. Tablo 2-1’de özetlenen PME alt gruplarının klasik PME fenotipine sahip ve ilişkili genleri tespit edilmiş bazı hastalıklar aşağıda detayları ile anlatılmıştır. PME alt grupları EPM (Epilepsi, Progresif Miyoklonus) kısaltması ve takip eden bir numara ile sınıflandırılmaktadır.

**Tablo 2-1:** PME ile ilişkili genler ve alt grupları.

| Gen             | Hastalık Adı                                                                | Kalıtım | OMIM No: |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|----------|
| <i>CSTB</i>     | Epilepsy, progressive myoclonic 1A (Unverricht and Lundborg)                | OR      | 254800   |
| <i>PRICKLE1</i> | Epilepsy, progressive myoclonic 1B                                          | OR      | 612437   |
| <i>EPM2A</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic 2A (Lafora)                                 | OR      | 254780   |
| <i>NHLRC1</i>   | Epilepsy, progressive myoclonic 2B (Lafora)                                 | OR      | 254780   |
| <i>CERS1</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic, 8                                          | OR      | 616230   |
| <i>KCTD7</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic 3, with or without intracellular inclusions | OR      | 611726   |
| <i>SCARB2</i>   | Epilepsy, progressive myoclonic 4, with or without renal failure            | OR      | 254900   |
| <i>POLG</i>     | Mitochondrial recessive ataxia syndrome (includes SANDO and SCAE)           | OR      | 607459   |
| <i>GOSR2</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic 6                                           | OR      | 614018   |
| <i>KCNC1</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic 7                                           | OD      | 616187   |
| <i>CERS1</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic, 8                                          | OR      | 616230   |

|                 |                                                             |    |        |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|----|--------|
| <i>LMNB2</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic, 9                          | OR | 616540 |
| <i>PRDM8</i>    | Epilepsy, progressive myoclonic, 10                         | OR | 616640 |
| <i>ASAH1</i>    | Spinal muscular atrophy with PME                            | OR | 228000 |
| <i>SERPINI1</i> | Encephalopathy, familial, with neuroserpin inclusion bodies | OD | 604218 |

### 2.2.1. Unverricht-Lundborg Hastalığı (ULH; EPM1A)

PME'nin en yaygın alt grubu olarak ULH olarak gözüktür. Başlangıç yaşı genellikle 6-16 yaşları arasında değişir. Klinik olarak ışık ve ses gibi dış uyaranlarla tetiklenen miyoklonus ve tonik-klonik nöbetlerle karakterizedir. En önemli klinik özelliği ULH hastalarında bilişsel yetinin normal seyretmesidir. Hastalık başlangıcından birkaç yıl sonra hastalarda ataksi, koordinasyon bozukluğu, istemli harekete bağlı tremor ve dizatri gibi serebellar bulgular gözlenebilir. Otozomal resesif kalıtılım gösteren ULH, *CSTB* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir [6]. *CSTB* bir sistein proteaz inhibitörü olan cystatin B/stefin B'yi kodlar. Bu proteinin lizozomlardan sızan proteazlara karşı hücreyi koruyan bir görevi olduğu düşünülmektedir. *CSTB* geninde tespit edilen en sık bozukluk genin promotör bölgesinde yer alan 12 bazlık dodekamer tekrarının (5'-CCCCGCCCCGCG-3') sayıca uzamasıdır. Normal popülasyonda 2, 3 veya 4 kopya olarak gözlenen bu tekrar, hasta bireylerde en az 30 tekrardır. Tekrar artışı ile birlikte *CSTB* geninin anlatımını zayıflar. ULH ayrıca *CSTB* genin kodlayan veya kırılma bölgelerindeki nokta mutasyonlarına bağlı olarak da gelişebildiği gösterilmiştir. Ancak ULH'de tutarlı bir fenotip genotip korrelasyonu yoktur. Örneğin *CSTB* dodekamer tekrar sayısı ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki saptanmamıştır. Hatta *CSTB* geninde aynı anda hem bir dodekamer artışına hem de bir nokta mutasyonuna sahip birleşik heterozigot bireylerde daha ağır bir fenotip gözlenmiştir. ULH'da bildirilen farklı vakalarla fenotip skalası genişlemiş; aynı aileye mensup ULH'li bireylerde dahi farklı klinik seyir izlenmiştir. Bazı ULH hastalarının çok şiddetli olmayan miyokloniler sergilemesi, hastalığa çok daha geç evrelerde tanı konabilmesine veya hastalığın juvenil miyoklonik epilepsi ile karıştırılabilmesine sebep olmaktadır [7].

### 2.2.2. ULH benzeri PME

ULH'nin kendi içinde klinik heterojenite sergilemesinin yansısı ULH'ye benzeyen ancak *CSTB* mutasyonları ile açıklanamayan bazı PME türleri de mevcuttur. Moleküler genetik alanında yaşanan gelişmelerle ULH benzeri bilişsel yetiyi

etkilemeyen otozomal resesif PME ile ilişkili yeni genler tespit edilmiştir. Wnt/beta-catenin sinyal yolağını baskılayan bir nükleer reseptörü kodlayan gen olan Prickle planar cell polarity protein 1 (*PRICKLE1*), ULH'ye benzeyen ancak biraz daha ağır bir fenotipi olan EPM1B'ye yol açmaktadır [8]. Yine ULH'ye benzeyen ancak bazı vakalarında renal yetmezlik de gözlenen EPM4 hastalığı için lizozom ve endozomlarda görevli bir glikoproteini kodlayan *SCARB2* geni sorumlu bulunmuştur [9–10]. Son olarak Golgi cisimciğinde vesiküler trafikten sorumlu bir proteini kodlayan Golgi SNAP receptor complex member 2 (*GOSR2*) genindeki mutasyonlar ULH benzeri EPM6 ile ilişkili bulunmuştur [11]. Dolayısıyla hem ULH tanısını doğru koymak ve hem de ULH'ye klinik olarak benzer fakat farklı PME alt gruplarını tespit etmek için moleküler tanının önemi büyüktür.

### 2.2.3. Lafora Hastalığı (LH; EPM2A/2B)

Lafora hastalığı miyoklonus, tonik-klonik nöbetler, görsel halüsinasyonlar, bilişsel fonksiyonlarda kayıp ve ilerleyici nörolojik hasarla karakterizedir. Prognoz kötüdür ve genellikle 2-10 yıl içinde ölümle sonlanır. EEG başlangıçta idiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) ile karışır, ancak hızla bozulur, temel aktivite yavaşlar, hızlı düzensiz jeneralize diken-çok diken dalga deşarjları ve oksipital dikenler eklenir. Işığa duyarlılık genellikle vardır. Otozomal resesif olarak kalıtılan LH, ilişkili olduğu gen bozukluğuna göre EPM2A veya EPM2B olarak da anılır. Bir protein fosfataz olan laforin proteinini kodlayan *EPM2A* ve bir E3-ubiquitin ligaz olan malin proteinini kodlayan *NHRLC1* genleri LH'de sorumludurlar [12]. Laforin ve malin hücre içinde bir kompleks oluşturarak glikojen metabolizmasını düzenler. Dolayısıyla, LH bir karbonhidrat metabolizması hastalığıdır ve sinir dokusu dahil farklı dokularda hücre içi poliglukoza inklüzyon cisimleri (Lafora cisimleri) ile karakterizedir. Ter bezi kanallarını da içeren deri biyopsisi tanıda önemlidir [3].

### 2.2.4. Miyoklonus Epilepsi ve Ataksi (MEAK; EPM7)

Çok yakın zamanda yapılan ve prototipik PME özellikleri gösteren 80'den fazla bağımsız PME hastasının ekzom dizilemesini içeren bir çalışma PME'ye sebep olan yaygın bir genetik bozukluğu işaret etmiştir [13]. Ortalama %10 vakanın fenotipi *KCNC1* geninde aynı noktada yer alan (c.959G>A; p.Arg320His) ve hastalarda de novo olarak ortaya çıkan bir mutasyonla açıklanabilmiştir. *KCNC1* voltaja duyarlı bir potasyum membran kanalının Kv3.1 adlı alt ünitesini kodlar. p.Arg320His değişiminin

kanal proteini üzerinde dominant-negatif etki göstererek fonksiyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Farklı hastalarda *KCNC1* genin farklı bölgelerinde mutasyonlara rastlanmaması ve Arg320 amino asidinin biyofiziksel olarak özel bir konumda olmasıyla, *KCNC1* genine bağlı PME'nin özellikle p.Arg320His değişimi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

### 2.2.5. CLN14 (EPM3)

Genetik olarak heterojen bir lizozomal hastalık grubu olan Nöronal Seroid Lipofusinozlar (Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal; CLN) çocuklarda kalıtsal nörodejenerasyonun en yaygın sebebidir. CLN klinik olarak ilerleyici motor ve bilişsel gerileme, retina pigment epitelinde dejenerasyon ve takip eden görme kaybı ile tonik-klonik ve miyoklonik nöbetler ile karakterizedir. Hastalar genellikle erken yaşta kaybedilir. CLN alt gruplarında en önemli ayırıcı bulgu nöronlarda ve diğer hücre tiplerinde gözlenen, otofloresan ve tipik bir yapıya sahip materyallerin lizozomal birikim göstermesidir [14]. Çoğunlukla otozomal resesif olarak kalıtılan CLN'de hastalık başlangıç yaşı CLN alt gruplarına göre erken çocukluktan erişkinlik dönemine kadar uzanabilir. Günümüzde 14 adet CLN alt grubu ile ilişkili 13 gen bilinmektedir (Tablo 2-2).

**Tablo 2-2:** CLN ile ilişkili genler ve alt grupları.

| Gen            | Hastalık Adı                                                  | Kalıtım | OMIM No: |
|----------------|---------------------------------------------------------------|---------|----------|
| <i>PPT1</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 1                            | OR      | 256730   |
| <i>TPP1</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 2                            | OR      | 204500   |
| <i>CLN3</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 3                            | OR      | 204200   |
| <i>DNAJC5</i>  | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 4, Parry type                | OD      | 162350   |
| <i>CLN5</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 5                            | OR      | 256731   |
| <i>CLN6</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, Kufs type, adult onset       | OR      | 204300   |
|                | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 6                            |         | 601780   |
| <i>MFSD8</i>   | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 7                            | OR      | 610951   |
| <i>CLN8</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 8                            | OR      | 600143   |
|                | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 8, Northern epilepsy variant |         | 610003   |
| <i>CTSD</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 10                           | OR      | 610127   |
| <i>GRN</i>     | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 11                           | OR      | 614706   |
| <i>ATP13A2</i> | Kufor-Rakeb syndrome                                          | OR      | 606693   |
| <i>CTSF</i>    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 13, Kufs type                | OR      | 615362   |
| <i>KCTD7</i>   | Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 14                           | OR      | 611726   |

CLN alt grupları arasında özellikle EPM3 olarak da bilinen CLN14 dikkat çekmektedir. 2012 yılında PME hastalarında yapılan bir çalışmada CLN14'ten sorumlu *KCTD7* gen mutasyonları herhangi bir metabolik veya patolojik bir işaret olmaksızın özellikle erken yaşta başlayan ve prototipik PME özellikleri taşıyan 7 akraba evliliği yapmış ailede tespit edilmiştir [15]. Resesif durumdaki bu mutasyonlar amino asit değişikliğine sebep olan tek nokta mutasyonları veya küçük insersyon/delesyonlar şeklindedir. *KCTD7* mutasyonuna sahip hastalarda başlangıç yaşı 2 yaş civarındır ve ilk bulguları nöbet (miyoklonik ve/veya tonik-klonik nöbet) veya ataksi olarak bildirilmiştir. İlk bulguları takiben 2 sene içerisinde psikomotor gerilik gözlenmiş ve sonunda tüm hastalarda ciddi boyutta motor ve mental gerilik rapor edilmiştir. Diğer CLN'lerin aksine tüm hastalarda retinal bulgular ile rutin biyokimyasal ve patolojiye yönelik testler normal bulunmuştur. 3 hastanın deri biyopsisinde yapılan elektron mikroskop analizinde CLN ile uyumlu lizozomal birikim materyali tespit edilmemiştir. Dolayısıyla *KCTD7*'nin CLN dışında prototipik PME patojenezindeki rolü ortaya çıkarılmıştır.

PME'ye neden olan hastalıklar toplumlar, aileler ve bireyler arasında klinik ve genetik heterojenite göstermektedir. Bu farklı PME gen defektlerinin değişken PME fenotiplerine nasıl yol açtığı halen bilinmemektedir. Farklı toplumlarda hastalığa yol açan farklı mutasyonların saptanması moleküler genetik tanının ve genetik danışmanlığın daha etkin yapılabilmesini sağlayacaktır. Ayrıca mutasyonların anlaşılması, buna dayalı olarak yeni ve etkili tedavi olanaklarının gelişimi açısından önem taşımaktadır.

### 2.3. Yeni Nesil Dizileme

Genel olarak epilepsi genetiği iki kategori olarak sınıflandırılabilir: (i) primer epilepsi ile ilgili genler ve lokuslar, (ii) epilepsinin bir semptomu olduğu diğer nörolojik hastalıklar ile ilgili genler [16]. Yüksek çıktılı sekanslama teknolojileri her iki kategori için de katkıda bulunmaktadır.

Epilepsi sendromlarının klinik olarak daha iyi tanımlanabilmesi için genetik testlerin daha yaygın kullanımına ihtiyaç vardır [17]. Epilepsi tanısında kullanılan yeni teknolojilerin kullanılması için, sendromları ve nöbetleri ile ilişkilendirilen bazı gen varyasyonları hakkında bilgi sahibi olmak gereklidir.

Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing-NGS), genetik testler için kullanılan yeni bir tekniktir. NGS tekniğinin, epilepsiye sebep olan mutasyonları bulmada ki bunlara de novo, novel ve ailesel mutasyonlar da dahil olmak üzere çok büyük potansiyeli vardır. Hastalığın farklı fenotiplerine rağmen moleküler tanıyı güçlendirmektedir.

### **2.3.1. Tüm Ekzom Dizileme**

Günümüzde NGS çoklu gen sekanslama özelliği sayesinde Sanger sekanslama yöntemin yerini almaktadır. Özgün gen panelleri, tüm ekzom dizileme (WES- Whole Exome Sequencing) ve tüm genom dizileme bu uygulamalardan bazılarıdır.

WES genomun yaklaşık %1-2'lik bölümüne tekabül eden protein kodlayan bölümüne odaklanmaktadır. Hastalığa sebep olan mutasyonların hemen hemen %85'i bu bölgelerde yer almaktadır [18].

Epilepsinin genetik temellerinin NGS ile aydınlatılması, hastalara uygulanan tedavilerde yenilikler ve gelişmelere yol açacaktır.

Şu anda, WES ile daha önce tanı alamamış hastalarda yaklaşık %25 oranında tanı oranına sahiptir. Bu, kromozom çalışmaları (karyotip analizi) (% 5–10) ve CMA (% 15-20) dahil diğer karşılaştırılabilir genetik testlerden daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada WES, özgün bir nörolojik bulgusu olan Mendelyan hastalıklarda tanı oranı %31'dir [19].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

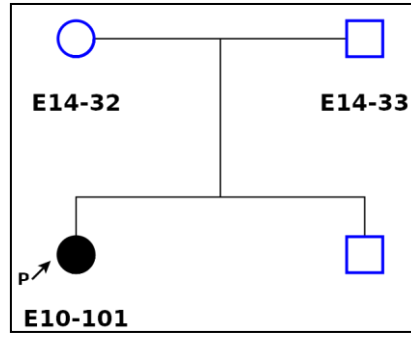
#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Çalışma Kapsamından İncelenen Bireyler

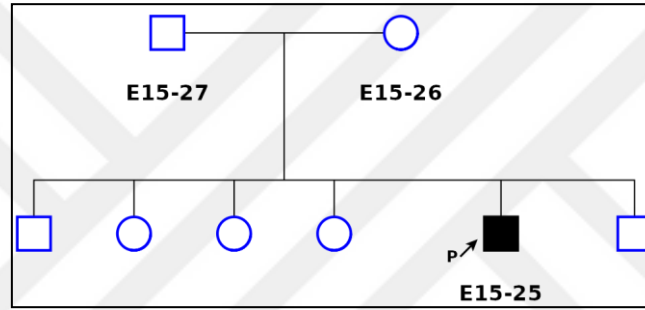
Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 23.02.2018 tarihli 292 sayılı izni kapsamında gerçekleştirilmiştir. İmzalı gönüllü olur formu alınmış toplam 21 (18 bağımsız aile) hasta çalışmada incelenmiştir. Bunun haricinde gerekli görüldüğü durumlarda segregasyon analizleri için bireylerin hasta/sağlıklı aile fertlerinden gönüllü onam formları toplanarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan her bireyden DNA materyali eldesi için 10 ml periferik kan alınmış ve +4°C’lik buz dolabında saklanmıştır. Çalışmanın devamında, periferik kan örneklerinde standart bir şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve numaralandırılmıştır. İzolasyon sonrasında DNA materyalleri uygulanacak deneyler açısından farklı konsantrasyon ve hacimlere bölünerek -20°C’lik derin dondurucuda saklanmıştır. Tüm örnek eldesi ve saklanması ile ilgili çalışmalar tarafımızdan yayınlanan ‘Biyobankalamada Protokol ve Kalite Kılavuzu’ doğrultusunda yapılmıştır [20]. Bu kılavuz 2015-17 yılları arasında İstanbul Kalkınma Ajansı destekli ‘Geleceğe Yatırım: BİYOBANKA’ adı projemizin bir çıktısıdır.

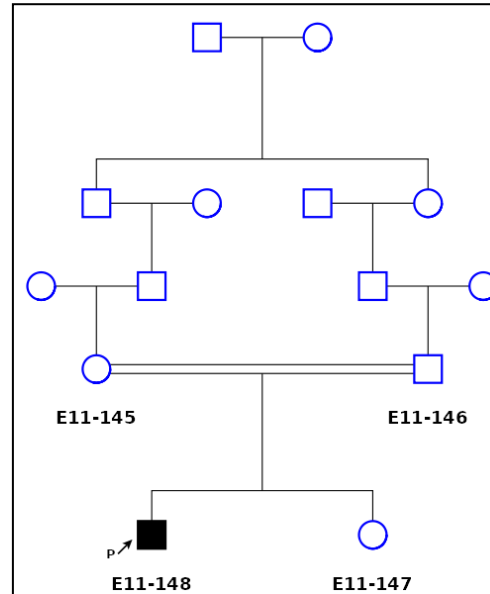
Çalışmaya katılan bireyler, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalında muayene edilmiş veya farklı merkezlerden ilgili bölüme sevk edilmiş hastalardan oluşmaktadır. Tüm hastalar İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Nerses Bebek ve Prof. Dr. Betül Baykan’ın onayı ile laboratuvarımıza BAP araştırma projesi “Progresif Miyoklonik Epilepsilerin Genetik Analizi (TDP-2017-25510)” kapsamında yönlendirilmiştir. Klinik muayeneleri ilgili birimlerde gerçekleştirilmiş ve aile hikayeleri alınarak çalışmaya uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta bireylerin aile ağaçları Şekil 3-1, Şekil 3-15 arasında gösterilmiştir.



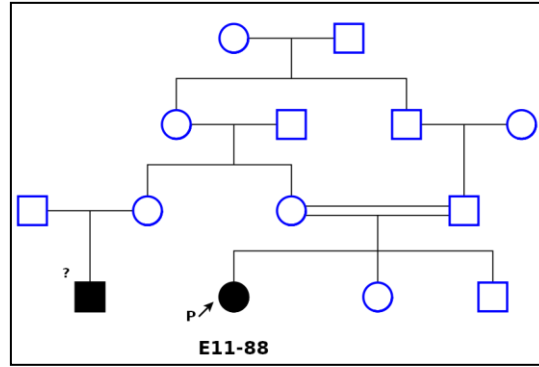
Şekil 3-1: E10-101 nolu birey için aile ağacı.



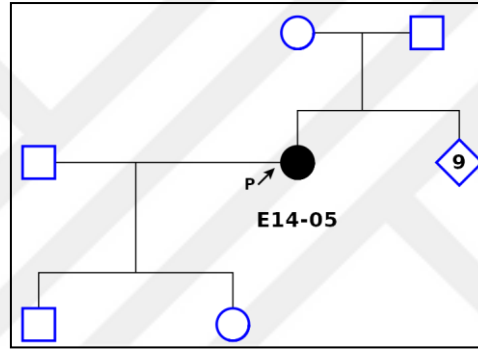
Şekil 3-2: E15-25 nolu birey için aile ağacı.



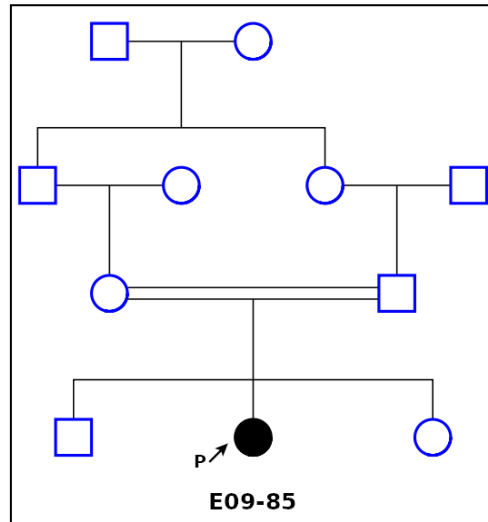
Şekil 3-3: E11-148 nolu birey için aile ağacı.



Şekil 3-4: E11-88 nolu birey için aile ağacı.

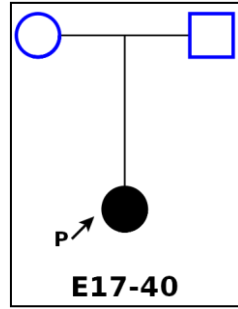


Şekil 3-5: E14-05 nolu birey için aile ağacı.

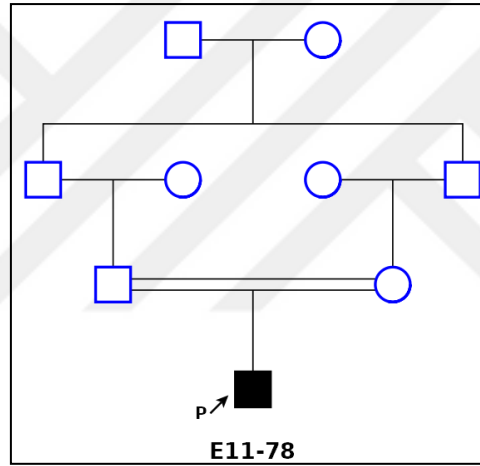


Şekil 3-6: E09-85 nolu birey için aile ağacı

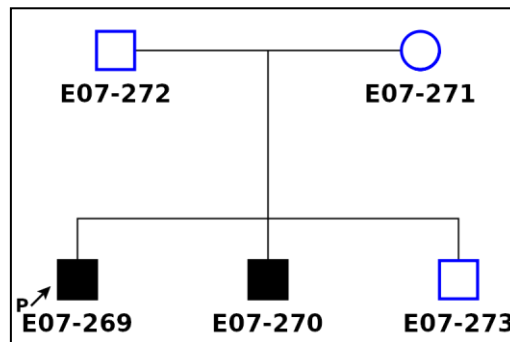




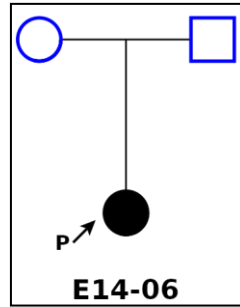
Şekil 3-9: E17-40 nolu birey için aile ağacı.



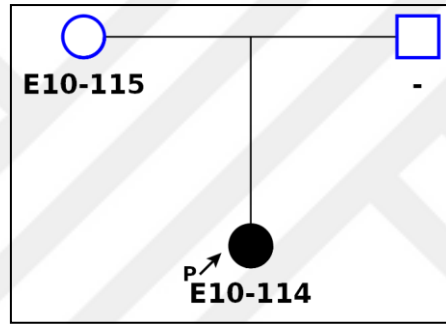
Şekil 3-10: E11-78 nolu birey için aile ağacı.



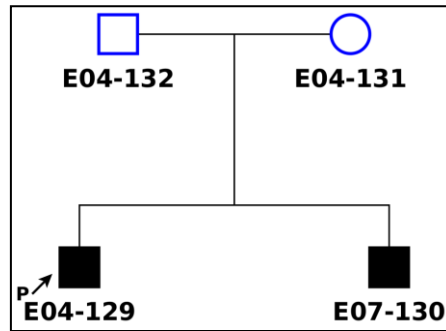
Şekil 3-11: E07-269/270 nolu bireyler için aile ağacı.



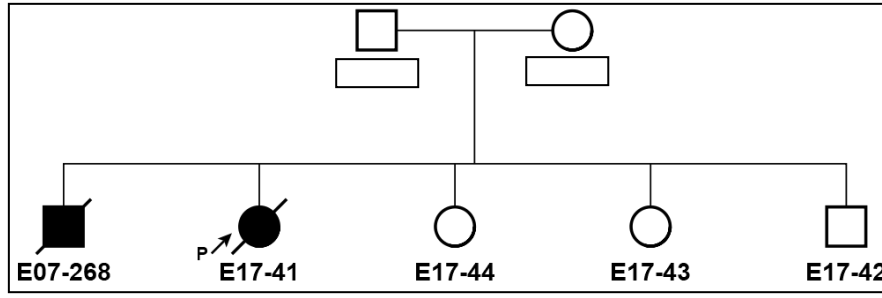
Şekil 3-12: E14-06 nolu birey için aile ağacı.



Şekil 3-13: E10-114 nolu birey için aile ağacı.



Şekil 3-14: E04-129 nolu birey için aile ağacı.



Şekil 3-15: E17-41 nolu birey için aile ağacı.

### 3.1.2. Çalışmada kullanılan kitler

Çalışma boyunca kullanılan kitler Tablo 3-1’te verilmiştir.

**Tablo 3-1:** Çalışmada kullanılan kitler ve tedarikçi firmalar.

| Kullanılan Kit              | Firma                   |
|-----------------------------|-------------------------|
| DreamTaq DNA Polymerase Kit | ThermoFisher Scientific |
| QIAamp DNA Blood Maxi Kit   | Qiagen                  |

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan cihazlar Tablo 3-2’de verilmiştir.

**Tablo 3-2:** Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

| Cihaz Adı                            | Kullanım Amacı                                                                                         |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BioRad MyCycler                      | Sanger dizileme ve segregasyon analizleri öncesi PCR                                                   |
| Elektroforez aparatları (BioRad)     | DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin boy, miktar, kalite ve özgünlük tayini için yürütülecekleri sistem |
| Spektrofotometre/Nanodrop ND-1000    | DNA örneklerinde miktar ve kalite tayini                                                               |
| Bilgisayarlı jel görüntüleme sistemi | Agaroz jelde yürütülen örneklerinin görüntülenmesi                                                     |
| +4°C buzdolabı                       | Örnek ve solüsyon saklama                                                                              |
| -20°C derin dondurucu                | Örnek, kit, enzim ve solüsyon saklama                                                                  |
| Masaüstü Santrifüj                   | DNA izolasyonu, PCR örnek hazırlanması                                                                 |
| İş istasyonu                         | Yüksek çıktı verilerin işlenmesi için bilgisayar                                                       |

### 3.1.4. Çalışma Kapsamında Hizmet Alınan Firmalar

Çalışmada enstitü dahilinde yapılamayan bunun yerine hizmet alınan firmalar Tablo 3-3’te verilmiştir.

**Tablo 3-3:** Hizmet alımı yapılan firmalar ve alınan hizmetler.

| Firma         | Alınan Hizmet                         |
|---------------|---------------------------------------|
| MacroGen Inc. | Sanger Dizileme<br>Tüm Ekzom Dizileme |
| Sentromer     | Primer Sentezi                        |

### 3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çevrimiçi Veri Tabanları

Çalışma boyunca kullanılan in silico analizler için kullanılan çevrimiçi araçlar Tablo 3-4’te verilmiştir.

**Tablo 3-4:** Çevrimiçi veri tabanı listesi.

| <b>Genomik Dizi Veritabanları</b>                                            |                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ensembl veritabanı                                                           | <a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>                                                             |
| NCBI veritabanı                                                              | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/</a>                                     |
| UCSC veritabanı                                                              | <a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>                                                             |
| GeneCards veritabanı                                                         | <a href="http://genecards.org">http://genecards.org</a>                                                                   |
| <b>Populasyon Veritabanları</b>                                              |                                                                                                                           |
| Genome aggregation database (gnomAD)                                         | <a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>                                       |
| dbSNP                                                                        | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>                                           |
| dbVar                                                                        | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/</a>                                       |
| The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database | <a href="http://projects.tcag.ca/lafora/">http://projects.tcag.ca/lafora/</a>                                             |
| <b>Fenotip Veritabanları</b>                                                 |                                                                                                                           |
| ClinVar                                                                      | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>                                   |
| Online Mendelian Inheritance in Man                                          | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/</a>                                         |
| Human Gene Mutation Database                                                 | <a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/</a>                                                   |
| <b>Varyantın Olası Etkisi için Tahmin Araçları</b>                           |                                                                                                                           |
| MutationTaster                                                               | <a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>                                               |
| Polymorphism Pheotyping (PolyPhen-2)                                         | <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>                                 |
| SIFT                                                                         | <a href="http://provean.jcvi.org/index.php">http://provean.jcvi.org/index.php</a>                                         |
| Variant Effect Predictor                                                     | <a href="http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/">http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/</a>                     |
| Human Splicing Finder                                                        | <a href="http://www.umd.be/HSF/">http://www.umd.be/HSF/</a>                                                               |
| InterVar                                                                     | <a href="http://wintervar.wglab.org/evds.php">http://wintervar.wglab.org/evds.php</a>                                     |
| Varsome                                                                      | <a href="https://varsome.com/">https://varsome.com/</a>                                                                   |
| <b>Diğer</b>                                                                 |                                                                                                                           |
| GeneDistiller                                                                | <a href="http://www.genedistiller.org/">http://www.genedistiller.org/</a>                                                 |
| Mutalyzer                                                                    | <a href="https://mutalyzer.nl/">https://mutalyzer.nl/</a>                                                                 |
| Oligonucleotides Properties Calculator                                       | <a href="http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html">http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html</a> |
| NCBI Homologene                                                              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene</a>                             |

### 3.1.6. Çalışmada Kullanılan Analiz Programları

Çalışma boyunca kullanılan analiz programları Tablo 3-5'te verilmiştir.

**Tablo 3-5:** Kullanılan analiz programları

| Analiz Programı                                | Yapılan Analiz                                                                                          |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HaploPainter v1.043 [21]                       | Çalışmaya katılan bireylerin pedigrilerini çizmek için kullanılmıştır.                                  |
| Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.3.5 [22]  | Tüm Ekzom Dizileme analizinde varyasyonların bulunduğu noktalar incelenmiştir.                          |
| CLC Main Workbench v5.02                       | Sanger Dizileme sonrası yapılan dizi analizinde kullanılmıştır                                          |
| Illustrator for Biological Sequences: IBS [23] | Tespit edilen varyasyonların protein primer yapısı üzerinde görselleştirilmesi amacı ile kullanılmıştır |
| FastQC 0.11.8 [24]                             | Ham veri kalite kontrolü için kullanılmıştır                                                            |
| BWA v0.7.1 [25]                                | Ham verilerin referans genoma hizalanması için kullanılmıştır.                                          |
| Picard v2.19.2 [26]                            | PCR ürün dublikelerinin işaretlenmesi için kullanılmıştır.                                              |
| GATK v3.6 [27]                                 | Varyant Listesi oluşturulmasında kullanılmıştır.                                                        |
| pigeon v0.3.8                                  | Ham verinin işlenmesi için akış hattının oluşturulmasında kullanılmıştır.                               |
| dove v0.3.6                                    | Varyantların anotasyonları ve filtrelenmesinde kullanılmıştır.                                          |

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu ve Kalite Ölçümü

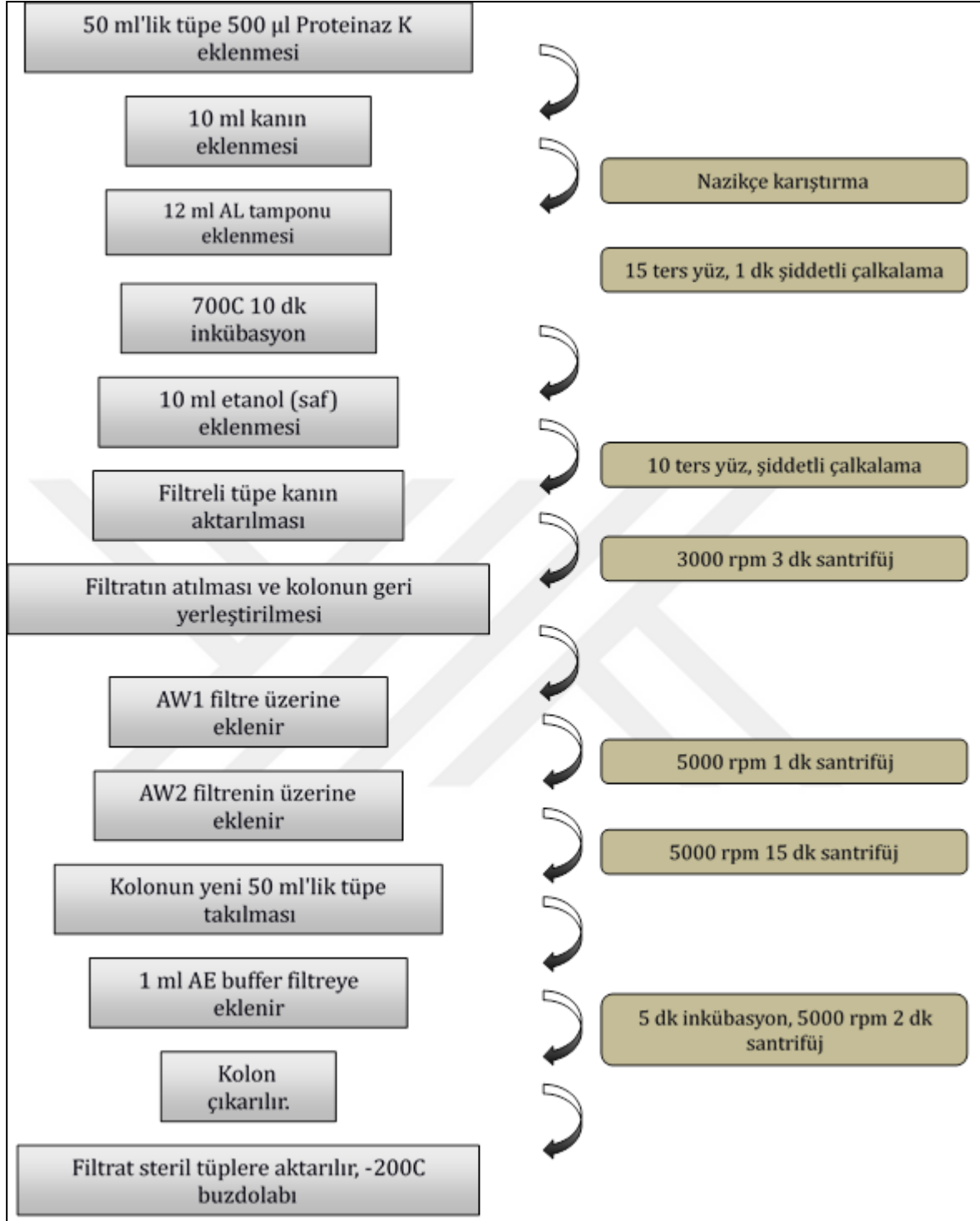
Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan öncelikle +4°C buzdolabında saklanmıştır. İzolasyonda standardizasyonu sağlayabilmek için her birey için QIAamp DNA Blood Maxi Kit kullanılmıştır. Kit ile gelen izolasyon protokolü Şekil 3-16'da şematize edilmiştir.

İzolasyon sonrasında elde edilen DNA materyallerinde kalite kontrolleri agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'larda herhangi bir degradasyon olup olmadığı %1'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak sonrasında görüntüleme sistemikontrol edilmiştir. DNA'ların konsantrasyon, saflık gibi özelliklerini belirlemede Nanodrop kullanılmıştır. Bu aşamada az hacimde DNA cihaza yüklenmiş ve farklı dalga boylarında (260nm, 280nm, 230nm) ölçümler yapıldı.

DNA'ların saflık dereceleri, 260/280nm (1,8-2,0) ve 260/230nm (2,0-2,2) oranları ölçülerek değerlendirilmiştir.

İzolasyonadan sonra devam eden aşamalarda kullanılmak üzere DNA'lar farklı miktar ve konsantrasyonlarda alikotlanarak -20°C'lik derin dondurucularda saklanmıştır.





**Şekil 3-16:** QIAamp DNA Blood Maxi Kit izolasyon protokolü şeması.

### 3.2.2. Touchdown PCR (TD-PCR, Kademeli sıcaklık düşürmeli primer zincir reaksiyon)

Touchdown PCR, tasarlanmış primer çiftlerinin hedeflenen bölge haricinde bağlanmalarını azaltarak deneyin özgünlüğünü artıran bir metottur. Bu metotta, primer bağlanma basamağında sıcaklık, primer çiftleri için hesaplanan  $T_m$  derecelerinde 5-10°C yüksek alınarak gerçekleşen döngüler sırasında kademeli olarak azaltılır. Bu basamak, hesaplanan  $T_m$  derecesinin 2-5°C altında sonlanır. Bu aşamada hedeflenen bölge diğer özgün olmayan bölgelerden daha fazla çoğaltılır ve dominant ürün haline gelir [28].

Touchdown PCR tekniği, Sanger Dizileme yöntemi ile sekanslamaları yapılacak bölgelerin çoğaltılmasında kullanılmıştır. Touchdown PCR tekniğinde kullanılmak üzere DreamTaq DNA Polymerase kiti seçilmiş ve bu yöntem ile PME hastalığına sebep olan yaygın faktörlerden *EPM2A*, *NHLRC1* genlerinde bulunan ekzonların çoğaltılması için kullanılmıştır.

Tüm Ekzom Dizileme hizmeti alınarak gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarına bağlı olarak farklı genlerde bulunan varyasyonların bulunduğu gen bölgelerinin çoğaltılması amacı ile ayrıca kullanılmıştır. Hasta bireylerde tespit edilmiş varyasyonların aile içi dağılımlarını göstermek amacı ile hasta veya sağlıklı aile fertlerinde ilgili bölgeler çoğaltılmıştır.

Bahsedilen veya analizler sonrasında elde edilen genlerin ilgili bölgelerini spesifik olarak çoğaltmak amacı ile özgün primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler Tablo 3-6'da gösterilmiştir. Primerler, NCBI-Primer Designing Tool kullanılarak tasarlanmıştır. Ensembl veritabanı kullanılarak *EPM2A* geni için NM\_005670.4, *NHLRC1* geni için NM\_198586.2 kodlu transkriptler seçilmiş ve tüm ekzonları için primerler dizayn edilmiştir.

**Tablo 3-6:** TD-PCR uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri.

| Gen           | Ekzon/Bölge | SOL 5→3                | SAĞ 5→3                 | Ürün Boyutu | GC% |
|---------------|-------------|------------------------|-------------------------|-------------|-----|
| <i>EPM2A</i>  | Ekzon 1     | CAAAGAAGGCGCAGAACAG    | AGAGCAGGGTCAGCCCAG      | 614bp       | 77  |
|               | Ekzon 2     | TTTGTATCAGCTGCTTTGAGGA | GCCTATAGACCCCTCCCAAG    | 368bp       | 39  |
|               | Ekzon 3     | TGCAGCTCCTTAAACCTCAAA  | CAGACAGCAAGGGTTTCTCTG   | 365bp       | 44  |
|               | Ekzon 4     | GCAAACCTCTCGTATCCCTGC  | GGCTCCTTAGGGAAATCAGG    | 448bp       | 58  |
| <i>NHLRC1</i> | Bölge 1     | ACTGTGACCGTGACCGAGA    | CTCCCCCTGAGTCAAAAATCT   | 545bp       | 71  |
|               | Bölge 2     | ACCTGCCACCACACCTTC     | GGGATTGCACAGATGAGCTT    | 450bp       | 58  |
|               | Bölge 3     | ATCAAGCTTGTCATTGGAGG   | TAGTGCTTCTGATTCCAGGG    | 605bp       | 54  |
| <i>SCARB2</i> | Ekzon 2     | CCTTCCTCTGCTTCTTGGGT   | CTTGGCCCAGTCTACAAAGC    | 430bp       | 47  |
| <i>KCTD7</i>  | Ekzon 3     | GAGATGTGCTGAATTTCTCTGC | CGGTGTTCTGATGGAGACCT    | 266bp       | 58  |
| <i>GABRD</i>  | Ekzon 9     | CCCCGCATGGGAACACC      | ATCCCACTTCGAAACACGCA    | 500bp       | 67  |
| <i>KCNS1</i>  | Ekzon 5     | CCATCCACTCTGACTTGGCTT  | GGTCACGGATCCCTGGTTTT    | 527bp       | 58  |
| <i>CACNB4</i> | Ekzon 6     | AGGATGAGGGCCAAAGAAAGC  | AAACTACTTGCATGTGTGTTCAA | 243bp       | 37  |

Tasarlanan primerlerin kontrolleri UCSC veri tabanında in siliko PCR aracında incelenerek primerlerin bağlanacağı bölgelere denk gelebilecek polimorfizmler incelenmiştir. Ayrıca “UCSC-Blat” ile özellikle primer bağlanma bölgelerine gelen homolojiler test edilmiştir. Uygulanan bu teknik için kullanılan optimize edilmiş protokoller Şekil 3-17’de gösterilmiştir. Her bir TD-PCR sonrasında örnekler agaroz jel elektroforezi kullanılarak çoğaltılan bölgelerin bant boyları kontrol edilmiştir.

| EPM2A_ Ex1       | EPM2A_ Ex2/Ex3   | EPM2A_ Ex4       | SCARB2/KCTD7     |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| TD               | TD               | TD               | 95°C 5'          |
| 95°C 30"         | 95°C 1'          | 95°C 1'          | TD               |
| 65°C -->53°C 30" | 63°C -->52°C 15" | 60°C -->53°C 15" | 94°C 45"         |
| 72 °C 45"        | 72 °C 15"        | 72 °C 15"        | 61°C -->53°C 45" |
| 18 Döngü         | 15 Döngü         | 18 Döngü         | 72 °C 1'         |
| TD sonrası       | TD sonrası       | TD sonrası       | 16 Döngü         |
| 95°C 30"         | 95°C 1'          | 95°C 1'          | TD sonrası       |
| 52°C 30"         | 53°C 15"         | 53°C 15"         | 94°C 45"         |
| 72 °C 45"        | 72 °C 15"        | 72 °C 15"        | 52°C 45"         |
| 20 döngü         | 20 döngü         | 25 döngü         | 72 °C 1'         |
| NHLRC1_Fr1       | NHLRC1_Fr2       | NHLRC1_Fr3       | 25 döngü         |
| TD               | TD               | TD               |                  |
| 95°C 30"         | 95°C 1'          | 95°C 1'          |                  |
| 65°C -->53°C 30" | 63°C -->52°C 15" | 63°C -->53°C 15" |                  |
| 72 °C 45"        | 72 °C 15"        | 72 °C 15"        |                  |
| 18 Döngü         | 17 Döngü         | 15 Döngü         |                  |
| TD sonrası       | TD sonrası       | TD sonrası       |                  |
| 95°C 30"         | 95°C 1'          | 95°C 1'          |                  |
| 52°C 30"         | 53°C 15"         | 53°C 15"         |                  |
| 72 °C 45"        | 72 °C 15"        | 72 °C 15"        |                  |
| 25 döngü         | 25 döngü         | 20 döngü         |                  |

Şekil 3-17: TD-PCR için bölgelere özgü protokoller.

### 3.2.3. Agaroz Jel Elektrophorezi

Agaroz jel elektrophorezi, periferik kandan DNA izolasyonu ve TD-PCR sonrasında kullanılmıştır.

İzolasyon sonrasında genomik DNA materyalinde meydana gelebilecek degradasyonların agaroz jel elektrophorezi tekniği kullanılarak örnekler %1'lik jelde yürütülmüş ve ardından görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

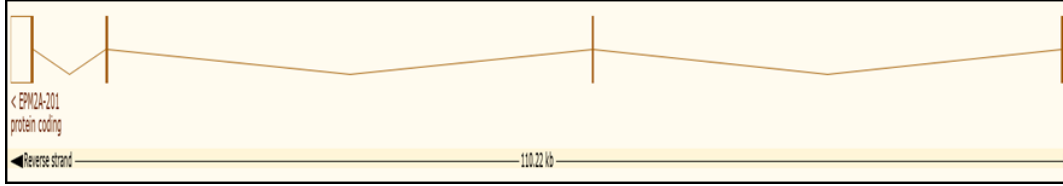
TD-PCR tekniği sonrasında genomik DNA'dan çoğaltılan bölgelerin istenilen boyutta olup olmadığı ve aynı zamanda tasarlanan primerlerin özgün olmayan bölgelere bağlanarak farklı yerleri çoğaltıp çoğaltmadıkları kontrol edilmiştir. Bu amaçla örnekler %2'lik jelde yürütülmüş ve ardından görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

### 3.2.4. Sanger dizileme yöntemi

Sanger dizileme, çalışma boyunca yapılan TD-PCR tekniği sonrası elde edilen örneklerin dizilenerek analize uygun hale getirilmesi amacı ile kullanılmıştır. Bu adım için hizmet alınmıştır. Sanger sonuçları CLC Main Workbench v5.02 programı aracılığı ile referans ampikon dizisine hizalanarak görsel olarak analiz edilmiştir.

### 3.2.4.1. Lafora Hastalığı ile ilişkili *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinin taranması

Çalışmamız öncelikle Lafora öntanısı almış hastalarda *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinin taranması ile başlamıştır. Bu adımda Tablo 3.6’da gösterilen primer çiftleri ile ilgili gen bölgeleri çoğaltılmıştır. *NHLRC1* geni tek ekzondan oluştuğu için tandem ve çakışan bölgeleri olan üç ampikon vasıtası ile 3 bölgede incelenmiştir (Şekil 3-8).



Şekil 3-18: *EPM2A* geni NM\_005670.4\_ekzon-intron şeması

```

CCGTGACCATGACTGTGACCGTGACCGAGAGSCGTGCTGGGGCACGGCCAGGCGGCGCGGGAGTGCACAGGA
CGCGCCATGGCGGCCGAAGCCTCGGAGAGCGGGCCAGCGCTGCATGAGCTCATGCGCGAGGCGGAGATCAGCCTG
CTCGAGTGCAAGGTGTGCTTTGAGAAGTTTGGCCACCGGCAGCAGCGGCGCCCGCGCAACCTGTCTGCGGCCAC
GTGGTCTGCGCTGGCCTGCGTGGCGGCCCTGGCGCACCCGCGCACTCTGGCCCTCGAGTGCCATTCTGCAGGCGA
GCTTGCCGGGGCTGCGACACCAGCGACTGCCTGCCGGTGCTGCACCTCATAGAGCTCCTGGGCTCAGCGCTTCGC
CAGTCCCCGGCGCCCATCGCGCCGCCCCAGCGCCCCGGAGCCCTCACCTGCCACCACACCTTCGCGGGCTGG
GGGACCCTGGTCAACCCACCGGACTGGCGCTTTGTCCCAAGACGGGGCGTGTGCTGGTGGTGCACGACGGCAGG
AGGCGTGTCAAGATTTTGAATCAGGGGGAGSATGCGCGCATCAGTTTGGAGAGAAGGGGACGCTGCCAAGAC
ATTAGGTACCCTGTGGATGTCACCATCACCAACGACTGCCATGTGTTGTCACTGACGCCGGCGATCGCTCCATC
AAAGTGTTTGATTTTTTGGCCAGATCAAGCTTGTCATTGGAGGCCAATTCTCCTTACCTTGGGGTGTGGAGACC
ACCCCTCAGAATGGGATTGTGGTAAGTATGCGGAGGCGAGGTCCTGCACCTCCTGGACGTGCACTTCGCGGAA
GGGGTCCTTCGGAGAACTGAAAGGTTGCAAGCTCATCTGTGCAATCCCGAGGGGTGGCAGTGTCTTGGCTCACC
GGGGCCATTGCGGTCTGGAGCACCCCTGGCCCTGGGGACTGGGGTTTGCAGCACCAGGTGAAAGTGTGTTAGC
TCAAGTATGCAGCTTGTGCGCAAGTGGATACCTTTGGGCTGAGCCTCTACTTTCCCTCCAAAATAACTGCCTCC
GCTGTGACCTTTGATCACCAGGGAATGTGATTGTTGCAGATACATCTGGTCCAGCTATCCTTTGCTTAGGAAAA
CCTGAGGAGTTTCCAGTACCGAAGCCCATGGTCACTCATGGTCTTTGCGATCCTGTGGCTCTTACCTTCACCAAG
GAGAATTTCTCTTGTGCTGGACACAGCATCTCATTCTATAAAGTCTATAAAGTTGACTGGGGGTGATGGGCT
GGGGTGGGTCCCTGGAATCAGAAGCACTAATGCTGCCATTGAATGTTTAAACCCTGGATAAGTCACTTAAAC
TCATCTATCCAGGCAGGGATAATTAAAACCATCTGGCAGACTTACAAAGCTTGGGACAGTTATTGGAGATTAATC
TACCATTTATTGAATGCATACTCTGTGCAAGGAAATTTGCAAATATTAGCTTATTTAATCTGTACTATCCAGTGA
GGTAATTTCTTCCCCCAGATAGAGTCAAGCTCTGTCAACCAGGCTGGAGTGCAGAAGCATGATCACAGCTCA

```

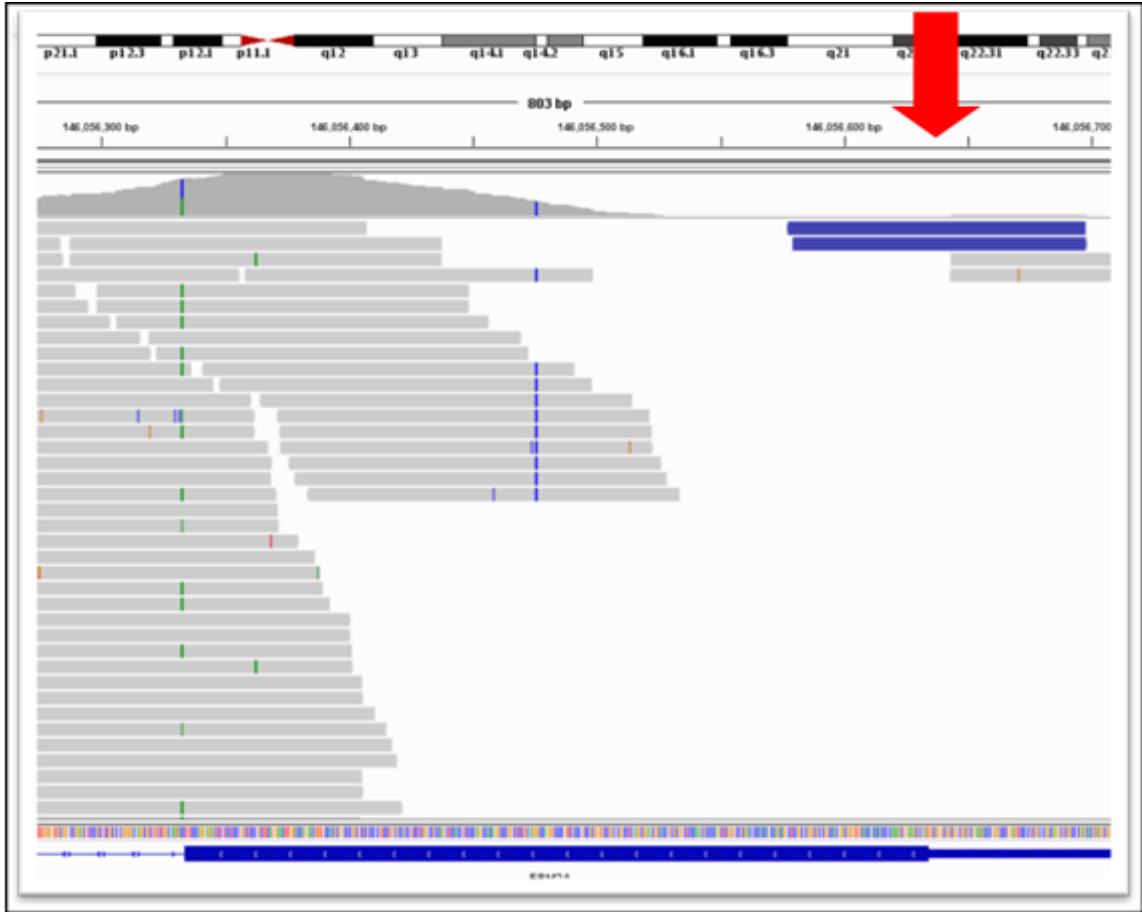
Şekil 3-19: *NHLRC1* geni için dizayn edilen primer çiftleri. 1.bölge – kırmızı, 2. bölge – yeşil, 3. bölge – siyah kutu ile gösterilmiştir.

### 3.2.5. Tüm Ekzom Dizileme Analizi

Çalışmamızın ikinci basamağı WES ile hastalarda tüm ekzonların kolektif analizini yapmaktır. Bu basamakta 2 farklı hasta grubu çalışılmıştır:

(1) *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri taranmış ve negatif bulunmuş hastalar.

(2) Çalışmaya WES aşamasında dahil olmuş, dolayısı ile *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri taranmamış hastalar. İkinci grup hasta için özellikle WES sonuçlarında görsel olarak IGV (Integrative Genomics Viewer) programı ile *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri incelenmiş, eğer hiç veya düşük seviyede okuma varsa bu bölgeler ayrıca Sanger dizileme ile doğrudan okunmaları sağlanmıştır. Özellikle *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinin sırasıyla ilk ekzon ve ampliconları GC açısından zengin oldukları için WES'te düşük coverage almaktadırlar (Şekil 3-19). Sanger dizileme ile bu eksiklik giderilmiştir.



**Şekil 3-20: EPM2A geni ekzon 1 bölgesi düşük kapsama bölgesi (Kırmızı ok)**

WES için MacroGen Inc. firmasından hizmet alınmıştır. Kısaca SureSelect V5 (no-UTR) capture kiti ve NovaSeq dizileme sistemi ile koşumu yapılmıştır. Tarafımıza ulaşan FASTQ formatlarındaki ham veri bölüm 3.2.5.1’de olduğu gibi tarafımızca işlenmiştir..

### 3.2.5.1. Ham Veriden Varyant Listesinin Oluşturulması

Ham veriler, MacroGen Inc firması tarafından FASTQ formatı şeklinde gönderilmektedir. Bu formatta varyant analizi yapmak mümkün değildir. Dolayısıyla, bu verilerin işlenerek analize hazır hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, laboratuvarımızda geliştirilen pigeon yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım, Tablo 3-5 gösterilen çevrimiçi erişime açık araçları (FastQC, BWA, picard, GATK) bir akış şeklinde bize sunmakta ve işlem sonunda vcf formatında varyantların listelendiği dosyaları oluşturmaktadır.

### 3.2.5.2. Varyant Listesi ve Analizi

Ham verilerin işlenmesi Pigeon yazılımı ile elde edilen vcf dosyaları kendi laboratuvarımızda geliştirilen dove yazılımı ile işleme alınmaktadır. Bu yazılımın amacı, listelenmiş varyantların anlamlandırılmasıdır. Yazılım bu amaçlar Ensemble-VEP veri tabanını kullanmaktadır. Bu işlem sonunda elde edilen listeler, varyantlar hakkında farklı bilgiler içeren excel dosyası olarak sunulmaktadır. Her gen için, referans dizileri belirlenmiş ve kapsadığı ekzonlar göz önünde bulundurularak transkriptler analiz için seçilmiştir.

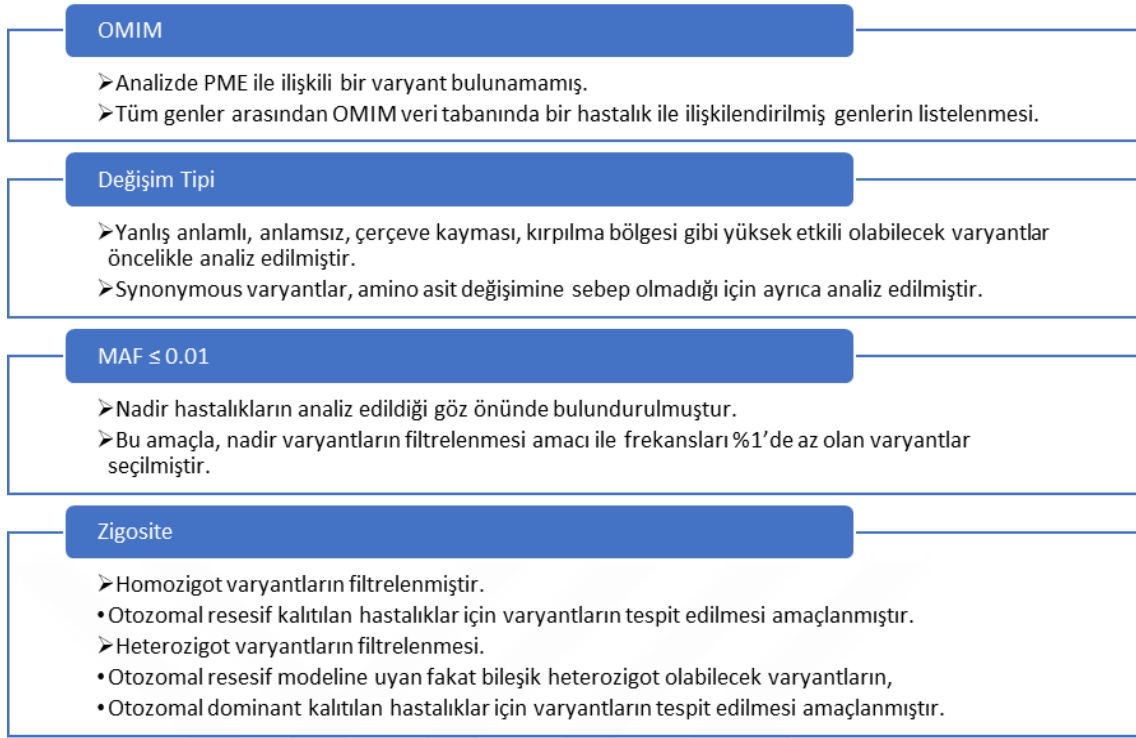
Dove yazılımı, varyant listelerinde farklı filtrelemeler yapıp analiz edebilmemizi sağlamıştır. Varyant analizleri, hedefe yönelik ve zamanı iyi kullanmak amacı ile farklı basamaklar halinde yapılmıştır.

1) PME ile ilişkili genlerin analizi; hastalık ile ilişkilendirilmiş ve literatürde yer almış genler için filtreleme yapılmış ve her hasta için uygulanmıştır (Şekil 3-21). Amaç, analizlerin hedefe yönelik yapılması ve kısa sürede analizlerin bitmesidir. Bu amaç ile kullanılan genler Tablo 2-1 ve Tablo 2-2’de listelenmiştir. Analiz sırasında kullanılan veri tabanları Tablo 3-4’te gösterilmiştir.

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PME ile ilgili genler | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tüm genler arasından Tablo 2-1 ve 2-2’de listelenmiş genlerin filtrelenmesi.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Değişim tipi          | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Yanlış anlamlı, anlamsız, çerçeve kayması, kırılma bölgesi gibi yüksek etkili olabilecek varyantlar öncelikle analiz edilmiştir.</li> <li>➤ Synonymous varyantlar, amino asit değişimine sebep olmadığı için ayrıca analiz edilmiştir.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MAF $\leq 0.01$       | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hastalığın nadir olması göz önünde bulundurulmuştur.</li> <li>➤ Bu amaçla, nadir varyantların filtrelenmesi amacı ile frekansları %1’de az olan varyantlar seçilmiştir.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Zigosite              | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PME genel olarak otozomal resesif kalıtmı bir hastalık olmasına rağmen otozomal dominant kalıtmı tipleride mevcuttur.</li> <li>➤ Homozigot varyantlar filtrelenmesi. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Otozomal resesif kalıtım modeline uygun varyantların tespit edilmesi amaçlanmıştır.</li> </ul> </li> <li>➤ Heterozigot varyantların filtrelenmesi. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Otozomal resesif kalıtım modeline uyan fakat bileşik heterozigot olabilecek varyantların,</li> <li>• Otozomal dominant kalıtım modeline uyan varyantların tespit edilmesi amaçlanmıştır</li> </ul> </li> </ul> |

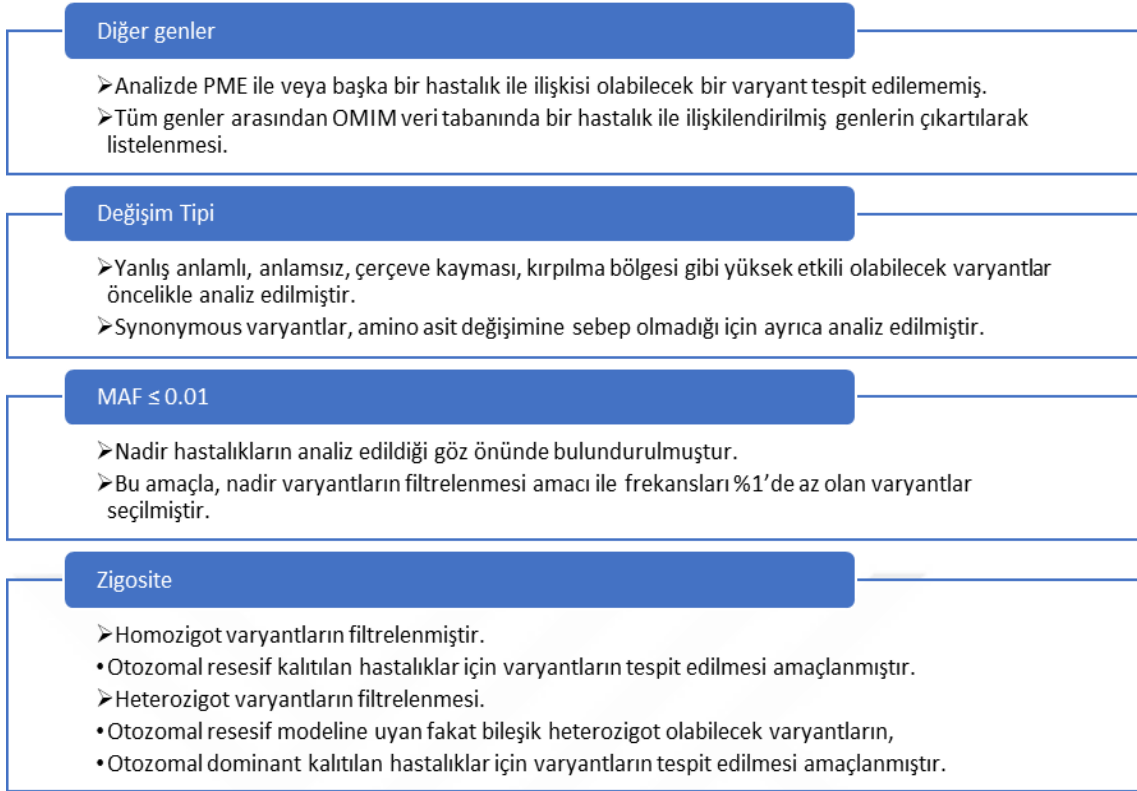
**Şekil 3-21:** PME ile ilişkili genlerin analizi.

2) Kalıtım modellerine göre yapılan analiz; hastalık ile ilişkisi olan genlerin analizinde varyant tespit edilemediği durumlarda farklı bir bakış açısı ile kalıtım modellerine uyan ve literatürde genotip-fenotip ilişkisi olan genlerin incelenmesidir. Bu amaç için, OMIM veri tabanından yararlanılmıştır (Şekil 3-22). Analiz sırasında kullanılan veri tabanları Tablo 3-4’de gösterilmiştir.



**Şekil 3-22:** Kalıtım modellerine göre yapılan analiz.

3) Fenotip bilgilerine göre analiz; daha önceki basamaklarda bir aday gen/varyant tespit edilemediği durumlarda hastalarda belirgin olan klinik bilgiler doğrultusunda yapılan analizlerdir (Şekil 3-23). Amaç; hastalığı açıklayacak hedef dışı bir gen veya yeni bir genin hastalık ile ilişkilendirilmesidir. Analiz sırasında kullanılan veri tabanları Tablo 3-4'te gösterilmiştir.



**Şekil 3-23:** Fenotip bilgilerine göre yapılan analiz.

Filtrelemeler ile elde edilen varyantların in siliko tahmin araçlar (Tablo 3-4) kullanılarak hastalık yapıcı etkisi olabilecekler incelenmiştir. Devamında, hastalık yapıcı olarak değerlendirilen daha önce literatürde bahsi geçmiş veya yeni varyantlar için segregasyon analizi ile devam edilmiştir.

Her hasta için bu basamaklar sırasıyla uygulanmış ve analiz edilmiştir. Analizler bir basamakta varyant tespit edilmesi durumunda sonlandırılmış ve sonraki deney aşamalarına geçilmiştir. Çalışmada bütçe ve zaman kısıtlılığı olduğundan hastalık ile ilişkili olabilecek aday genler için fonksiyonel çalışma yapılamamıştır.

### 3.2.6. Varyantların Adlandırılması

Yapılan analizlerin hepsi hg19 genom versiyonuna göre yapılmıştır, fakat yapılan analizler sonrasında elde edilen sonuçların güncel olarak listelenebilmesi amacı

**Şekil 3-24:** Fenotip bilgilerine göre analiz.

ile her varyasyonun nükleotit ve aminoasit değişiklikleri tekrar Ensembl ve Mutalyzer veri tabanları kullanılarak hg38 genom versiyonuna göre tekrar isimlendirilmiştir.

Ayrıca tespit edilen varyantlar, klinik olarak değerlendirilmesi amacı ile American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kılavuzu doğrultusunda belirlenmiş kanıtlar doğrultusunda değerlendirilmiştir [29]. Bu amaçla Varsome ve Intervar veri tabanları kullanılmıştır.

### **3.2.7. Varyantların Segregasyon Analizi**

Segregasyon analizi, Sanger Dizileme ve Ekzom Dizileme analizleri sonrası elde edilen sonuçların bilinen veya bilinmeyen varyantlar olması fark etmeden proband ve birinci dereceden akrabalarında (anne, baba ve kardeşler) ilgili varyantların varlığını kanıtlamak ve aile içindeki dağılımı gözlemlemektir.

Tespit edilen varyasyonların bulunduğu gen bölgelerine spesifik primer çiftleri tasarlanmış ve TD-PCR ile çoğaltılarak Sanger Dizileme için hizmet alınan firmaya gönderilmiştir.

Bu basamakta, ekzom dizileme analizinde tespit edilen varyasyonların ikinci bir yöntem ile konfirmasyonu da gerçekleştirilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Çalışmada 21 PME hastasının genetik analizleri yapılmıştır. Hastaların her birinde PME fenotipine sebep olabilecek genler araştırılmıştır. Hasta ve aile bireylerinden alınan periferik kandan DNA izolasyonu aynı standart yöntem ile gerçekleştirilmiş ve araştırmanın farklı basamaklarında kullanılmıştır. Her bireyde farklı PME fenotipleri olması sebebi ile varyant tespit etmek için farklı yöntemler kullanılmış ve çıkan bulgular Tablo 4-1’de sunulmuştur. Daha önce belirtildiği hastalar, *CSTB* ve *KCNC1* geninde olabilecek varyantlar açısından başka çalışmalarda negatif sonuç aldıkları için bu çalışmaya dahil edilmiştir.



**Tablo 4-1:** Sanger ve WES analizleri sonucu hastalarda tespit edilen PME ile ilişkili varyantlar.

| Hasta       | Gen      | Kromozomal Lok. | NM Kodu        | Nükleotit Değişim | Aminoasit Değişimi | Varyant No   | Mutasyon Tipi     | Zigosite | Polyphen/Sift | Mutasyonaster   | ACMG sınıflandırma | ACMG* kant       |
|-------------|----------|-----------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------|-------------------|----------|---------------|-----------------|--------------------|------------------|
| E10-114     | EPMA     | 6:146056343     | NM_005670.4    | c.292T>C          | p.Ser8Pro          | -            | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.391/0.506   | Poliromfizim    | VUS                | PM2,BP4          |
| E09-85      | EPMA     | 6:145627891     | NM_005670.4    | c.721C>T          | p.Arg241*          | rs104893950  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | -             | Hastalık Yapıcı | Patojenik          | PVS1,PM2,PP3,PP5 |
| E10-101     | EPMA     | 6:145735240     | NM_005670.4    | c.259A>G          | p.Lys87Glu         | -            | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.996/0       | Hastalık Yapıcı | Muhim Patojenik    | PS1,PM2,PP3      |
| E07-270/269 | EPMA     | 6:145735405     | NM_005670.4    | c.94T>G           | p.Trp32Gly         | rs104893955  | Yanlış anlaşılmış | Het      | 0.999/0.01    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3,PP5      |
| E14-05      | NHLRC1   | 6:18122402      | NM_198586.2    | c.301+1G>T        | -                  | rs1361221383 | Kirpılma bölgesi  | Het      | -             | Hastalık Yapıcı | Patojenik          | PVS1,PM2,PM3,PP3 |
| E17-40      | NHLRC1   | 6:18122402      | NM_198586.2    | c.436G>A          | p.Asp146Asn        | rs769301934  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.998/0.05    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3,PP5      |
| E15-23      | NHLRC1   | 6:18122402      | NM_198586.2    | c.436G>A          | p.Asp146Asn        | rs769301934  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.998/0.05    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3,PP5      |
| E11-88      | NHLRC1   | 6:18122402      | NM_198586.2    | c.436G>A          | p.Asp146Asn        | rs769301934  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.998/0.05    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3,PP5      |
| E18-26      | NHLRC1   | 6:18122402      | NM_198586.2    | c.436G>A          | p.Asp146Asn        | rs769301934  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.998/0.05    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3,PP5      |
| E11-38      | NHLRC1   | 6:18122402      | NM_198586.2    | c.436G>A          | p.Asp146Asn        | rs769301934  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.998/0.05    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3,PP5      |
| E04-129/130 | NHLRC1   | 6:18122530      | NM_198586.2    | c.77G>A           | p.Cys261Tyr        | -            | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.989/0       | Hastalık Yapıcı | Muhim Patojenik    | PM1,PM2,PM5,PP3  |
| E17-41/     | SCARB2   | 4:77117001      | NM_005506.4    | c.134delA         | p.Asn45Mettfs*88   | -            | Çerçeve kayması   | Hom      | -             | Hastalık Yapıcı | Patojenik          | PVS1,PM2,PP3     |
| E07-268     | SCARB2   | 4:77117001      | NM_005506.4    | c.134delA         | p.Asn45Mettfs*88   | -            | Çerçeve kayması   | Hom      | -             | Hastalık Yapıcı | Patojenik          | PVS1,PM2,PP3     |
| E11-148     | KCTD7    | 7:66103332      | NM_153033.4    | c.407C>A          | p.Pro136His        | -            | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.976/0       | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2,PP3          |
| E15-25      | GABRD    | 1:2030073       | NM_000815.4    | c.1150C>T         | p.Pro384Ser        | rs79386457   | Yanlış anlaşılmış | Het      | 0.192/0.17    | Hastalık yapıcı | Muhim Benin        | BP4,BP6          |
| E11-78      | STXBPI   | 9:127660064     | NM_003165.3    | c.281C>T          | p.Pro94Leu         | rs200802985  | Yanlış anlaşılmış | Het      | 0.301/0.27    | Hastalık yapıcı | VUS                | BP6              |
| E14-06      | GLRA1    | 5:151822915     | NM_001146040.1 | c.1132G>A         | p.Gly378Ser        | rs116474260  | Yanlış anlaşılmış | Het      | 0.011/0.28    | Hastalık yapıcı | VUS                | -                |
| E10-196     | SLC7A6OS | 16:68310736     | NM_032178.3    | c.191A>G          | p.Gln64Arg         | rs190706099  | Yanlış anlaşılmış | Hom      | 0.096/0.01    | Hastalık Yapıcı | VUS                | PM2              |

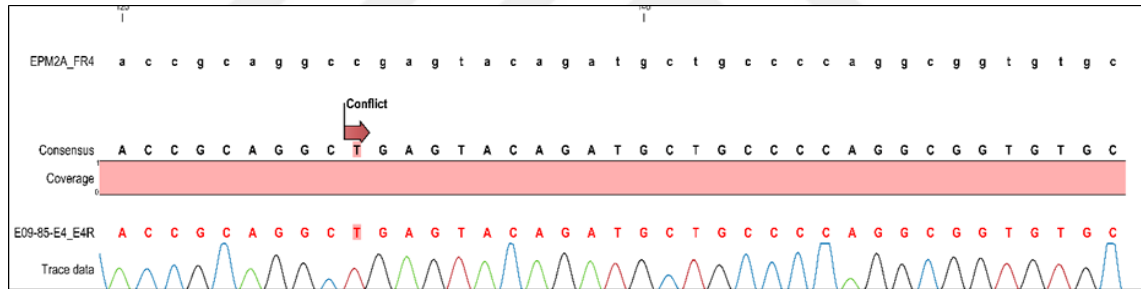
#### 4.1. Lafora Hastalığı ile ilişkili *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinin tarama sonuçları

Çalışmanın birinci adımı olarak Lafora ön tanısı almış 9 hasta bireyde *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri tarandı. Gerekli görüldüğünde tespit edilen varyantlar, ulaşılabilen aile bireylerinde segregasyon incelemeleri yapılmıştır.

##### 4.1.1. E09-85

Lafora Hastalığı ön tanılı hastada, *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri PCR işlemi sonrasında takiben Sanger Dizileme yöntemi ile taranmış ve tespit edilen hastalık ile ilişkilendirilen varyant detaylı bir şekilde Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

CLC Workbench programı ile yapılan Sanger analizi sonucu *EPM2A* geninde literatürde daha önce hastalık ile ilişkilendirilmiş NM\_005670.4:c.721C>T,p.Arg241\* (rs104893950) varyant homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-1). Varyant, ekzon içinde dur kodonu oluşturarak proteinin kısılmasına sebep olmaktadır.



**Şekil 4-1:** NM\_005670.3:c.721C>T varyantı CLC Workbench görüntüsü.

Uniprot veri tabanında amino asit değişimi incelendiğinde, proteinin Tirozin Protein Fosfataz bölgesine denk gelmektedir. Değişimin testip edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin korunmuş olduğu gözlenmiştir.

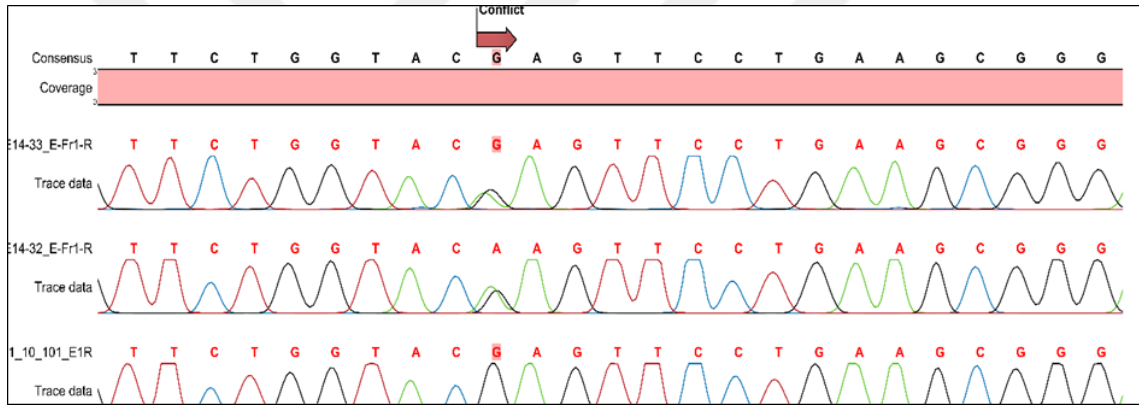
Varyantın diğer in siliko tahmin araçlarında aldığı değerler Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Bireyin, sağlıklı aile bireylerine ulaşılamamış ve varyantın segregasyon analizi yapılamamıştır. Hastada, hastalığı açıklayan bir varyant tespit edilmiş ve araştırma tamamlanmıştır.

#### 4.1.2. E10-101

Lafora Hastalığı ön tanılı hastada, *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri PCR işlemi sonrasında takiben Sanger Dizileme yöntemi ile taranmış ve tespit edilen hastalık ile ilişkilendirilen varyant detaylı bir şekilde Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

CLC Workbench programı ile yapılan Sanger Dizileme ham verisi sonucu *EPM2A* geninde literatürde daha önce belirtilmemiş NM\_005670.4:c.259A>G,p.Lys87Glu varyantı homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-2). Uniprot veri tabanında amino asit değişimi incelendiğinde, proteinin Karbonhidrat Bağlama Tip 20 bölgesine denk gelmektedir. Değişimin testip edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin korunmuş olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-2: NM\_005670.3:c.259A>G varyantı ailesel segregasyon sonuçları.

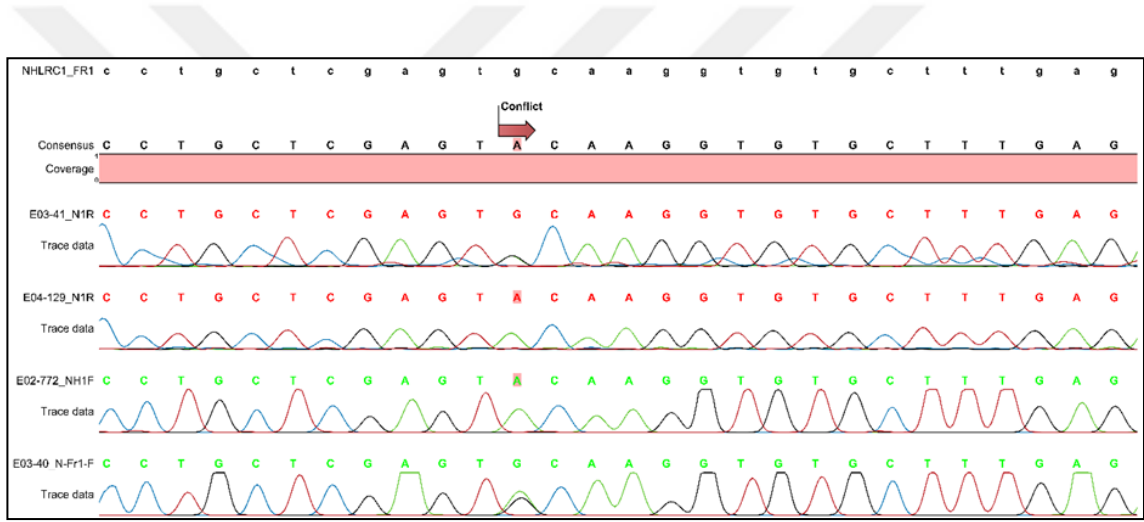
Varyantın diğer in siliko tahmin araçlarında aldığı değerler Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Bireyin tespit edilen varyant açısından ailesel segregasyon incelenmesi yapılmıştır. Bu varyant açısından her iki ebeveynin taşıyıcı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-2).

#### 4.1.3. E04-129 ve E07-130

Lafora Hastalığı ön tanılı hasta kardeşlerde, *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri PCR işlemi sonrasında takiben Sanger Dizileme yöntemi ile taranmış ve tespit edilen hastalık ile ilişkilendirilen varyant detaylı bir şekilde Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

CLC Workbench programı ile yapılan Sanger Dizileme ham verisi sonucu *EPM2A* geninde literatürde daha önce belirtilmemiş NM\_198586.2:c.77G>A, p.Cys26Tyr varyantı hasta kardeşlerde ortak ve homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-3). Değişimin testip edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin korunmuş olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4-3:** NM\_198586.2:c.77G>A varyantı CLC Workbench görüntüsü.

Varyantın diğer in siliko tahmin araçlarında aldığı değerler Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

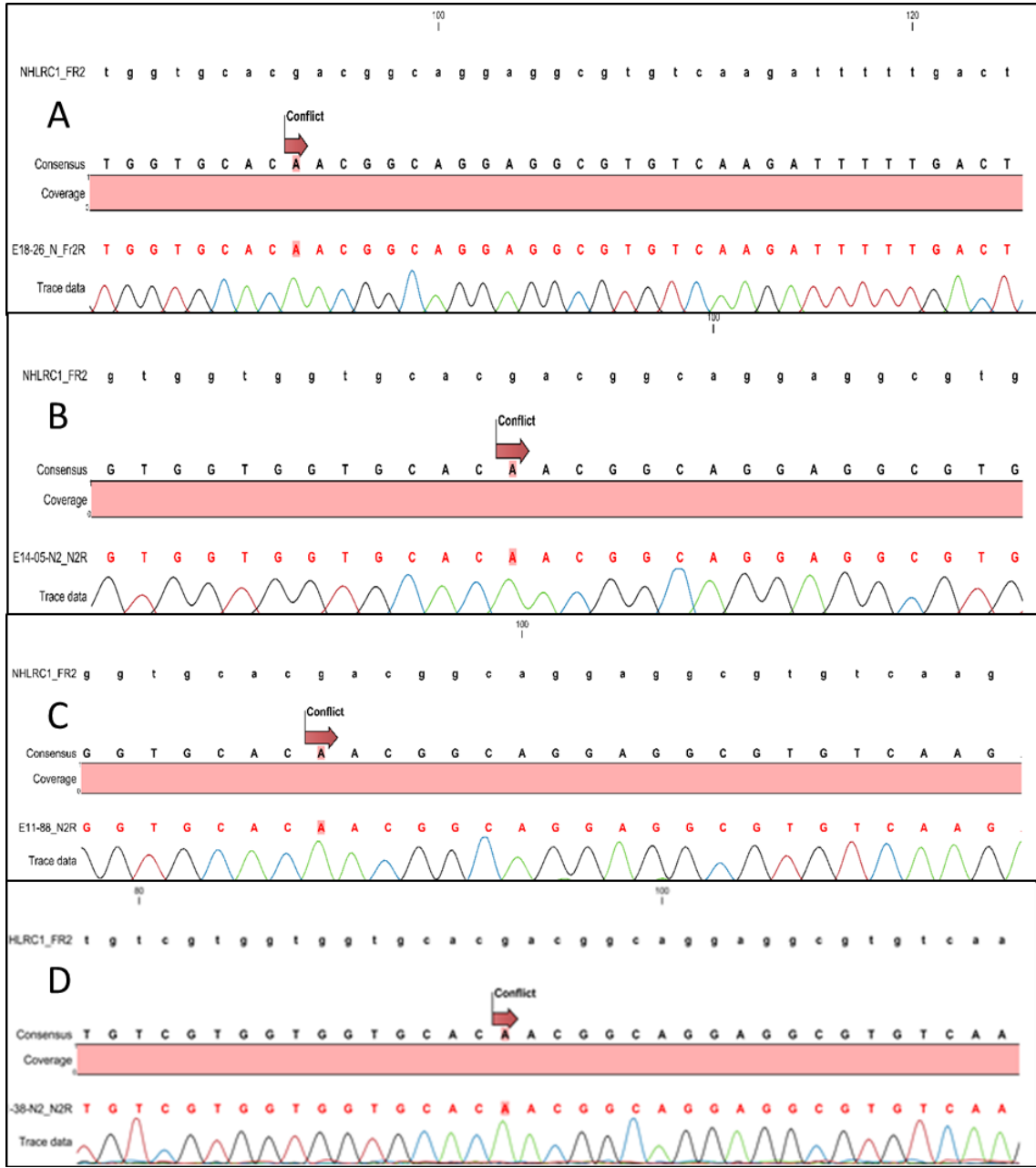
Hasta kardeşlerde tespit edilen varyantların aile segregasyonuna bakılması amacı ile anne ve babadan izin alınarak periferik kandan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu nokta değişiminin ebeveynlerde heterozigot olarak taşındığı Sanger Dizileme ile gösterilmiştir (Şekil 4-3).

#### 4.1.4. E14-05, E11-88, E11-38 ve E18-26

Lafora Hastalığı ön tanılı hastalarda, *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri PCR işlemi sonrasında takiben Sanger Dizileme yöntemi ile taranmış ve tespit edilen hastalık ile ilişkilendirilen varyant detaylı bir şekilde Tablo 4-1’de gösterilmiştir. E14-05, E11-38, E11-88 ve E18-26 no’lu bireyler birbirinden bağımsız hastalardır. Hastalarda tespit edilen varyant aynı olması sebebi ile tek başlık altında değerlendirilmiştir.

CLC Workbench programı ile yapılan Sanger Dizileme ham verisi sonucu *NHLRC1* geninde literatürde daha önce hastalık ile ilişkilendirilmiş NM\_198586.2:c.436G>A, p.Asp146Asn (rs769301934) varyantı homozigot tespit edilmiştir. Uniprot veri tabanında amino asit değişimi incelendiğinde, proteinin NHL1 tekrar bölgesine denk gelmektedir. Değişimin testip edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin korunmuş olduğu gözlenmiştir.

Hasta bireylerde bulunan patojenik varyantın ailesel segregasyon incelemesi sağlıklı aile fertlerine ulaşamadığı için gerçekleştirilememiştir.



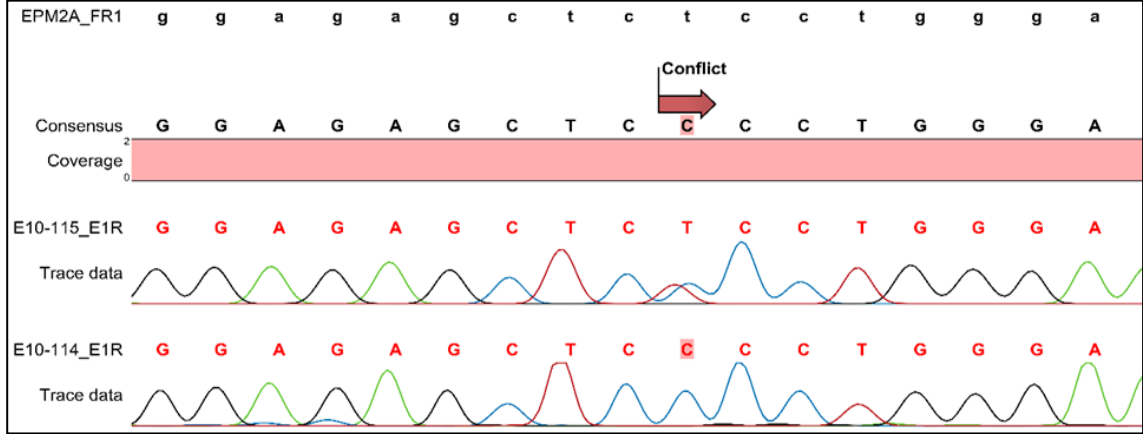
**Şekil 4-4:** NM\_198586.2:c.436G>A varyantı CLC Main Workbench görüntüsü. (A) E18-26 nolu hasta, (B) E11-88 nolu hasta, (C) E14-05 nolu hasta (D) E11-38 nolu hasta.

#### 4.1.5. E10-114

Lafora Hastalığı ön tanılı hastalarda, *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri PCR işlemi sonrasında takiben Sanger Dizileme yöntemi ile taranmış ve tespit edilen hastalık ile ilişkilendirilen varyant detaylı bir şekilde Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

CLC Workbench programı ile yapılan Sanger Dizileme ham verisi sonucu *EPM2A* geninde literatürde daha önce belirtilmemiş NM\_005670.4:c.259A>G,p.Lys87Glu varyantı homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-5).

Uniprot veri tabanında amino asit değişimi incelendiğinde, proteinin Karbonhidrat Bağlama Tip 20 bölgesine denk gelmektedir. Değişimin tespit edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin tam olarak korunmamış olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4-5:** NM\_005670.3:c.259A>G varyantı CLC Workbench görüntüsü.

Varyantın diğer in siliko tahmin araçlarında aldığı değerler Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Bulunan varyantın veri tabanlarındaki tahminlerde yüksek bir skor alamaması ve hastalık yapıcı etkisinin gösterilememesi sebebi ile tüm ekzom çalışmasına dahil edilmiştir. Analizde, PME ile ilişkili olan genler filtrelenmiş ve Sanger Dizileme ile aynı sonuca ulaşılmıştır. Uygulanan diğer analiz basamaklarında hastalığa sebep olabilecek bir aday gen bulunamamıştır.

İki farklı yöntemle tespit edilen varyantın ortak olması sebebi ile hastanın analizinin sonlandırılmasına karar verilmiştir.

#### 4.2. Tüm Ekzom analiz sonuçları

Çalışmanın ikinci adımında, PME ön tanısı almış fakat belirli bir alttür için klinik bilgilerin yetersiz kaldığı vakalar çalışılmıştır. Bu amaçla seçilen yöntem WES, aynı anda Tablo 2-1 ve Tablo 2-2’de gösterilen genlerin araştırılması için kullanışlı ve hastalık ile daha önce ilişkilendirilmemiş genlerin de tespitini sağladığı için uygun bulunmuştur.

Her birey için alınan Ekzom Dizileme hizmeti sonrası elde edilen ham veri ilgili bölüm 5.2.5.1 ve bölüm 5.2.5.2’de anlatıldığı gibi pigeon ve dove araçları ile yapılmış ve Tablo 3-5’te gösterilen analiz paketleri kullanılarak analiz edilmiştir.

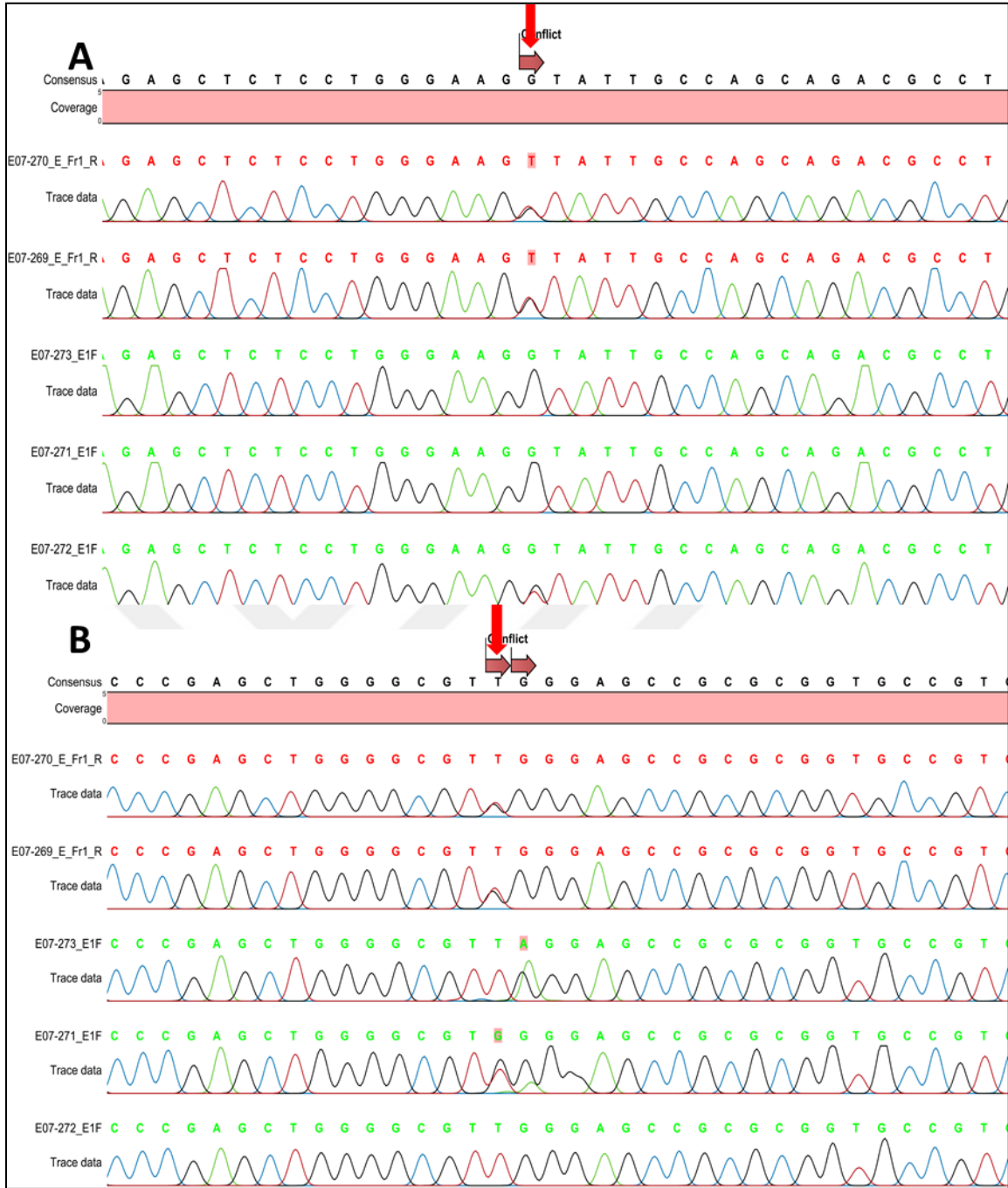
Hastaların analizlerinde Şekil 3-21, Şekil 3-22 ve Şekil 3-23’de gösterilen filtreleme basamakları kullanılmıştır. Analizleri biten ve PME ile ilişkilendirilmiş genler açısından sonuç almış hastalarda bulunan varyantlar Tablo 4-1’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Hastalık ile ilişkili genlerde varyant tespit edilemeyen hastalar için aday genler Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

#### 4.2.1. E07-269 ve E07-270

E07-269 ve E07-270 kodlu hasta kardeşlerde klinik bilgilerin yetersiz olması sebebi ile Tüm Ekzom Dizileme yöntemi uygun bulunmuştur. WES analizi sonucunda tespit edilen varyant Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Öncelikle hasta kardeşlerde, tüm ekzom dizileme PME ile ilişkili genlerin analizi Şekil 3-21’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Kardeşlerde, *EPM2A* geninde NM\_005670.4:c.301+1G>T (rs1361221383) varyantı heterozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-6). Gende, yapılan kapsama analizinde gözlenmiştir ki, genin ekzon 1 bölgesinin başlangıç kısmında yaklaşık 100 bç’lik bir bölge okunmamaktadır. Bu bölge ayrıca Sanger Dizileme ile analiz edilmiştir. Kardeşlerde yapılan Sanger analizi sonucu, kapsanmayan bölgede NM\_005670.4:c.94T>G, p.Trp32Gly (rs104893955) varyantı heterozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-6). Varyantların veri tabanlarında yapılan analizleri Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

İki varyantın da heterozigot tespit edilmesi sebebi ile cis trans ilişkilerinin araştırılması için ebeveynlerin izni alınarak aile segregasyonu analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonrasında, varyantların farklı ebeveynlerden geldiği gösterilmiştir (Şekil 4-6). Hastalarda, hastalığı açıklayabilecek bir bileşik heterozigotluk durumu olduğundan analizi sonlandırılmıştır.



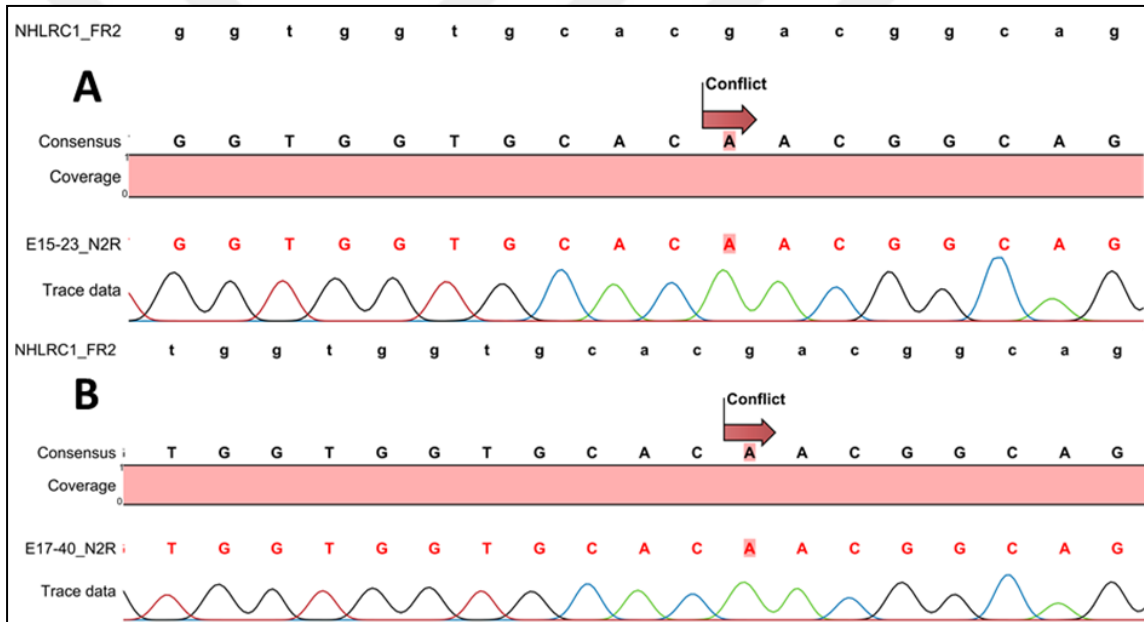
**Şekil 4-6:** E07-269 ve E07-270 hastalarında tespit edilen varyantların CLC Workbench görüntüsü. (A) NM\_005670.3:c.94T>G, (B) NM\_005670.3:c.301+1G>T.

#### 4.2.2. E17-40 ve E15-23

E17-40 ve E15-23 kodlu bireyler birbirinden bağımsız hastalardır. Hastalarda tespit edilen varyant aynı olması sebebi ile tek başlık altında değerlendirilmiştir. WES analizi sonucunda tespit edilen varyant Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Öncelikle hastalarda, PME ile ilişkili genlerin analizi Şekil 3-21’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Hastalarda, *NHLRC1* geninde bilinen ve LH’ye sebep olduğu kanıtlanmış NM\_198586.2:c.436G>A, p.Asp146Asn (rs769301934) varyantı homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-7). Uniprot veri tabanında amino asit değişimi incelendiğinde, proteinin NHL1 bölgesine denk gelmektedir. Değişimin testip edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin korunmuş olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak PME ile ilişkilendirilmiş bir varyant tespit edilmesi sebebi ile analiz bu şekilde sonlandırılmıştır. Bireylerin, sağlıklı aile bireylerine ulaşamamış ve varyantın segregasyon analizi yapılamamıştır.



Şekil 4-7: (A) E15-23 kodlu hasta, (B) E17-40 kodlu hastada NM\_198586.2:c.436G>A varyantı CLC Workbench görüntüsü.

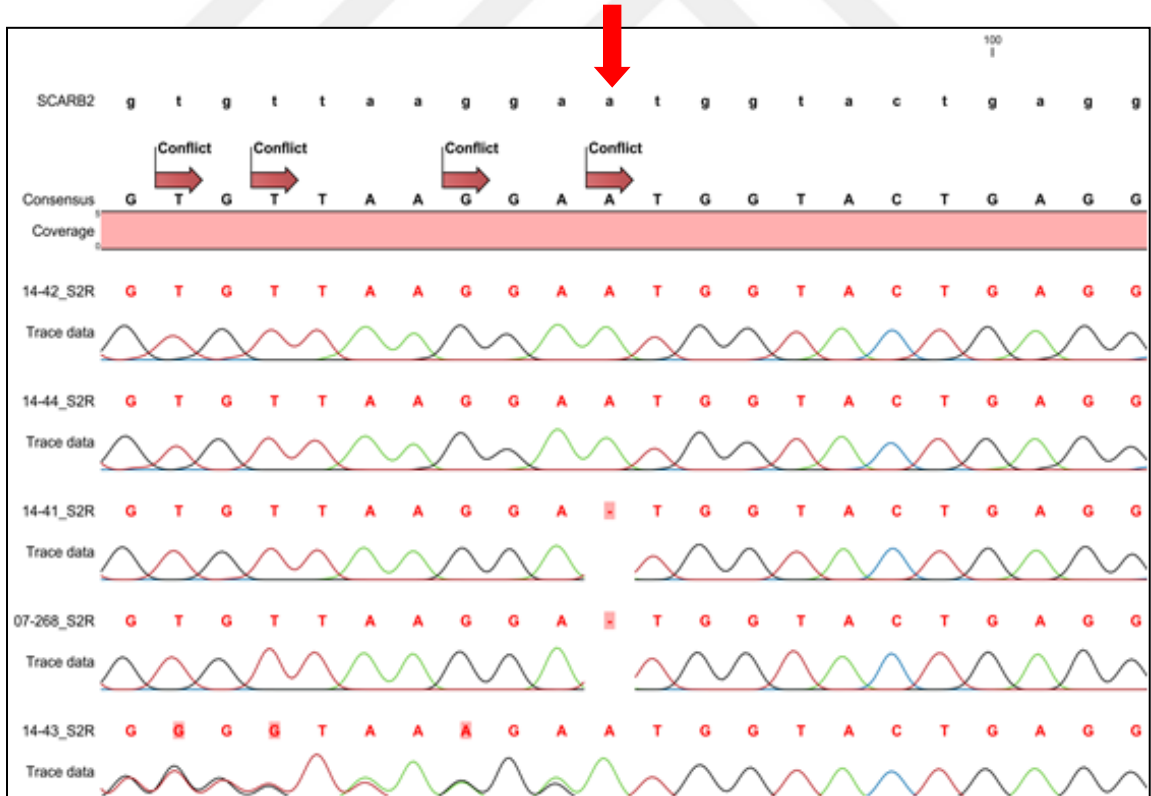
#### 4.2.3. E17-41 ve E07-268

E17-41 ve E07-268 kodlu bireyler kardeşler. E17-41 kodlu hastanın klinik bilgileri belirsiz olması sebebi ile Tüm Ekzom Dizileme yöntemine geçilmesi uygun bulunmuştur. E07-268 kodlu hasta çalışma başlamadan önce hayatını kaybetmiştir, fakat DNA izolasyonu daha önce gerçekleştirilmiş ve saklanmıştır. Bu hasta kardeş örneği için ekzom dizileme hizmeti alınmamıştır. Sadece E17-41 no’lu bireyin analiz

sonucunda tespit edilen varyantın segregasyon çalışması için kullanılması uygun bulunmuştur. Tespit edilen varyant Tablo 4-1’de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

Öncelikle hastalarda, PME ile ilişkili genlerin analizi Şekil 3-21’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Hastada, Aksiyon Miyoklonus-Renal Yetmezlik Sendromu’na sebep olan *SCARB2* geninde daha önce literatürde rapor edilmemiş NM\_005506.3:c.134delA, p.Asn45Metfs\*88 varyantı homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-8).

Ailede, aynı klinik bulguları taşıyan ve hastalık sebebi ile kaybedilen kardeşin (E07-268) ve sağlıklı kardeşler aynı varyant açısından Sanger Dizileme ile incelenmiştir. Kaybedilen hasta kardeşinde delesyonun homozigot varlığı ve sağlıklı kardeşlerde bu varyantın yabancıl tip veya heterozigot bulunması delesyonun patojenik olma olasılığını artırmıştır. Bu şekilde, varyantın sağlıklı ve hasta kardeşler arasında segregasyonu tespit edilmiştir (Şekil 4-8). Sonuç olarak PME ile ilişkilendirilmiş bir varyant tespit edilmesi sebebi ile analiz bu şekilde sonlandırılmıştır.



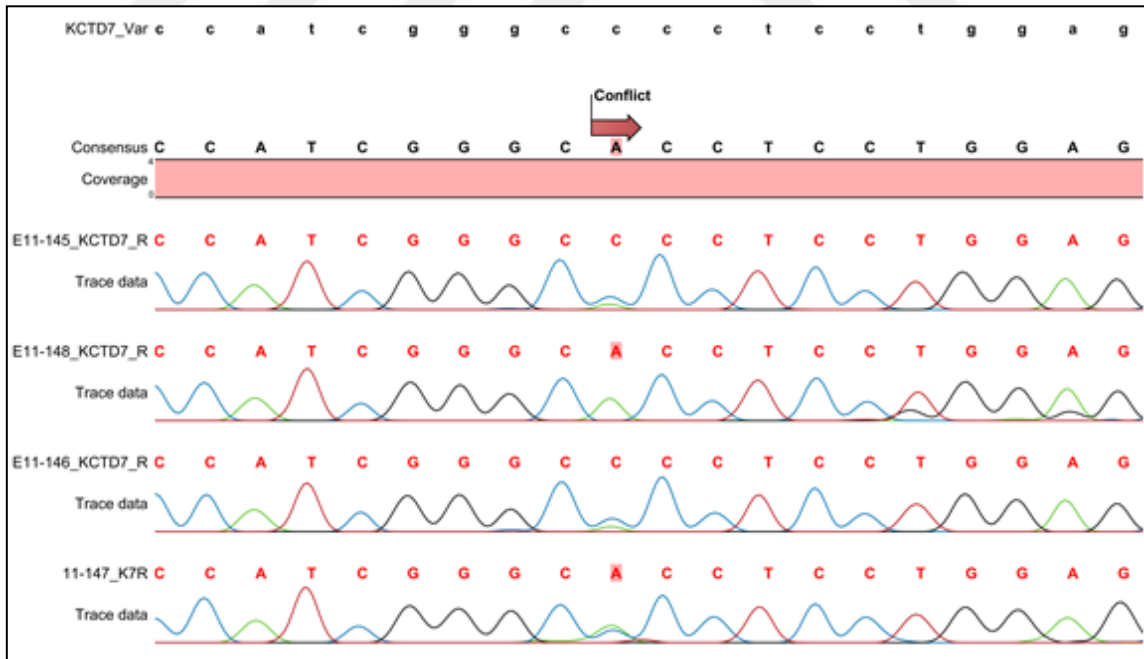
**Şekil 4-8:** E17-41 kodlu hastada tespit edilen NM\_005506.3:c.134delA varyantı aile segregasyon sonucu

#### 4.2.4. E11-148

E11-148 kodlu hastanın klinik bilgileri yetersiz olması sebebi ile Tüm Ekzom Dizileme yöntemine geçilmesi uygun bulunmuştur. WES analizi sonucunda tespit edilen varyant Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Öncelikle hastalarda, PME ile ilişkili genlerin analizi Şekil 3-21’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Hastada, CLN14/EPM3’e sebep olan *KCTD7* geninde daha önce literatürde rapor edilmemiş NM\_153033.4:c.407C>A, p.Pro136His varyantı homozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-9). Uniprot veri tabanında amino asit değişimi incelendiğinde, proteinin BTB/POZ bölgesine denk gelmektedir. Değişimin testip edildiği nokta evrimsel korunmuşluk için NCBI-Homologene veri tabanında analiz edilmiş ve sonuç olarak birçok türde bu bölgenin korunmuş olduğu gözlenmiştir.

Ailede bulunan sağlıklı ebeveyn ve kardeşten alınan kanlardan DNA izole edilmiş ve varyantın Sanger Dizileme yöntemi ile segregasyon analizinde kullanılmıştır. Segregasyon analizi sonucunda, hasta hariç diğer aile fertlerinde varyant heterozigot tespit edilmiştir (Şekil 4-9).



**Şekil 4-9:** E11-148 kodlu hastada tespit edilen NM\_153033.4:c.407C>A varyantı aile segregasyon çalışması

#### 4.2.5. E10-196

E10-196 kodlu hastanın klinik bilgileri yetersiz olması sebebi ile Tüm Ekzom Dizileme yöntemi uygun bulunmuştur.

Öncelikle hastada, PME ile ilişkili genlerin analizi Şekil 3-21’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Hastada yapılan filtreleme sonucunda PME ile ilişkilendirilmiş genlerde klinik ile ilişkilendirilebilecek bir varyant tespit edilememiştir.

Yapılan ilk filtreleme sonucunda varyant tespit edilememesi sebebi ile çalışmaya Şekil 3-22’de gösterilen kalıtım modellerine göre yapılan analiz ile devam edilmiş fakat bu şekilde de herhangi bir varyant tespit edilememiştir.

Son filtreleme basamağı olan ve Şekil 3-23’de gösterilen fenotip bilgilerine göre analiz ile devam edilmiştir. Bu filtreleme sonucunda hastada *KCNS1* geninde NM\_002251.4:c.1519G>A, p.Gly507Arg (rs142180542) varyantı tespit edilmiştir. Varyant, Sanger yöntemi ile Şekil 3-7’de gösterilen aile bireylerinde taranmış ve özellikle benzer bulgulara sahip kuzende varyant segregasyonu etmemiştir. Bu sebeple varyant elenmiştir.

Çalışma sürecinde yurtdışı bağlantılar ile yaptığımız görüşmeler esnasında PME ile ilişkili olabilecek yeni bir gen varyantı tespit edildiği tarafımıza iletilmiştir. Hasta verisinde yapılan kontrol sonrasında *SLC7A6OS* geninde NM\_032178.3:c.191A>G (rs190706099) varyantı homozigot tespit edilmiştir (Tablo 4-1). Varyantın bireyde tespit edilmesinin ardından gerekli izinler alınarak hasta materyali çalışılması amacı ile yurtdışına gönderilmiştir. Ancak varyant için yapılan fonksiyon çalışmaları henüz tamamlanmamıştır.

#### 4.2.6. E14-06, E15-25, E11-78, E12-39

E14-06, E15-25, E11-78, E12-39 kodlu hastalar birbirinden bağımsız bireylerdir. Klinik bilgileri yetersiz olması sebebi ile Tüm Ekzom Dizileme yöntemine geçilmesi uygun bulunmuştur.

Öncelikle hastalarda, PME ile ilişkili genlerin analizi Şekil 3-21’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Hastada yapılan filtreleme sonucunda PME ile ilişkilendirilmiş genlerde klinik ile ilişkilendirilebilecek bir varyant tespit edilememiştir. Ardından devam eden analiz basamakları Şekil 3-22 ve Şekil 3-23’deki gibi uygulanmış ve hastalarda fenotip bulgularını açıklayabilecek varyantlar tespit edilemeye çalışılmıştır.

Bu varyantlar Tablo 4-1’de detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Ancak fenotip genotip ilişkisi kurulamamıştır.



## 5. TARTIŞMA

Tüm epilepsi vakaları arasında oldukça nadir olarak gözlenen PME vakaları heterojen bir genetik altyapıya sahiptir. PME'nin bir çok alt grubu otozomal resesif olarak kalıtılsa da otozomal dominant veya mitokondriyal kalıtmı alt grupları mevcuttur. Literatürdeki bilgiler ışığında PME vakalarında tespit edilen varyantlar genel olarak kurucu etkisinin olduğu veya akraba evliliklerinin sıkça görüldüğü bölgelerde bulunmuştur. Ülkemizde, bilindiği üzere akraba evliliği oranı yüksektir. Bu sebeple nadir hastalıklar ülkemizde daha sık ortaya çıkma eğilimi göstermektedir. Çalışmada incelenen bireylerden elde edilen veriler PME vakalarında da bu şekilde akraba evliliklerinin oldukça nadir olarak görülen varyantların ülkemizde hastalık sebebi olduklarını göstermiştir.

Tez çalışmasına dahil eden toplam 21 hasta arasında analizlerde kolaylık sağlaması amacı ile kardeşler dahil edilmiştir. Çalışma iki basamak olarak tasarlanmıştır. Lafora Hastalığı ön tanılı etkilenmiş bireyler *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinin ekzon bölgelerinde olabilecek varyantlar için Sanger Dizileme yöntemi ile taranmıştır. Diğer etkilenmiş bireylerin PME ön tanıları olup klinik bilgileri doğrultusunda kesin bir alt gruba indirgenememiş, bu sebeple tüm ilişkili genlerin analizi için Tüm Ekzom Dizileme yöntemi uygun bulunmuştur. Çalışmamızın birinci basamağında kullandığımız Sanger Dizileme yöntemi, PME'nin bir alt grubu olan Lafora Hastalığının tanısı için oldukça etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir. Fakat, kesin tanı alamamış hastalarda bu yöntemin kullanılması, diğer alt grupların tespitini zorlaştırmaktadır. Bu amaçla çalışmanın ikinci basamağı olarak uygun görülen WES yöntemi, genetik heterojenite gösteren hastalıklarda ilgili tüm genlerin taranmasını sağlamakta ve tanı oranını yükseltmektedir. Bu şekilde etkilenmiş bireylerde hastalık ile ilişkilendirilmiş genler kısa bir sürede ayrıntılı olarak incelenebilmiştir. İki yöntem kullanılarak yapılan analizler sonucunda *EPM2A*, *NHLRC1*, *SCARB2* ve *KCTD7* genlerinde varyantlar tespit edilmiştir.

### 5.1. Lafora Hastalığı ile ilişkili *EPM2A* ve *NHLRC1* geninde tespit edilen varyantlar

Beyin glikojen metabolizması, öğrenme veya hafıza gibi ana beyin fonksiyonlarında kritik bir rol oynar. Bununla birlikte, beyindeki glikojen

metabolizmasının ve glikojen birikiminin değişmesi, Lafora Hastalığında da gözlemlendiği gibi nörodejeneratif bir etkiye sahiptir [30]. Lafora Hastalığı (LH), *EPM2A* ve *NHLRC1* genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile ortaya çıkan progresif nörodejeneratif otozomal resesif kalıtsımlı bir PME alt grubudur. *EPM2A* ve *NHLRC1* genleri sırasıyla laforin ve malin proteinlerini kodlamaktadır. Bu proteinler, glikojen metabolizmasında yer almakta ve bir bakıma glikojen kalite kontrol mekanizmasından sorumludurlar. İşlevsel bir laforin-malin kompleksinin olmaması, çözünmez halde glikojen meydana gelir ve beyinde hastalığın ilerlemesini sağlayan lafora cisimciği olarak birikir. Hastalığın patolojik özelliklerinden biri olan Lafora cisimleri, hastalığın genetik altyapısı aydınlatılmadan önce dahi metabolik yollar açısından bir yol göstermişlerdir. Lafora cisimleri, apokrin ter bezlerinin salgı asidinin ve ekrin ve apokrin ter kanalı hücrelerinde görülebildiğinden, aksiller cilt biyopsisi sıklıkla tanı için kullanılmaktadır.

#### 5.1.1. Lafora Hastalığı ve uygulanabilecek tedavi yöntemleri

Yukarıda tartışıldığı gibi, Lafora Hastalığı öncelikle nörodejeneratif bir hastalıktır ve semptomlara beyinde laforin veya malin eksikliği nedeniyle oluşan Lafora cisimciği neden olmaktadır. Fonksiyonu bozuk genin işlevsel bir kopyasını vermek için gen terapisi Lafora hastalığı tedavisi için bir seçenek olabilir. Kuşkusuz, gen terapisi kalıtsal hastalıklara yönelik tedavilerin gelişimini önemli ölçüde arttırmıştır. Adeno ile ilişkili virüs (AAV) ve lentivirüs gibi viral vektörlerin kullanımı da dahil olmak üzere bir transgen ortaya koyan çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Nanopartiküller, lipozomlar ve eksozomları kullanan başka dağıtım yöntemleri de vardır.

Lafora hastalığı için diğer bir terapötik seçenek, biriken Lafora cisimlerinin degrede edilmesi olabilir. Bu amaçla, beyne poliglukan degrede eden enzim verilmesiyle ulaşılabilir. Örneğin, farklı türlerde mevcut olan çok çeşitli a-amilazlar arasında, sitosolik şartlar altında çözünmeyen poliglukanları (Lafora cisimleri) degrede edebilen ve minimum immün yanıtı tetikleyecek olanlar seçilebilir.

En umut verici tedavi yollarından biri, beyin glikojen sentezinin azaltılması olabilir. Lafora hastalıklı fare modellerinde beyinde ifade edilen glikojen sentazın (GYS1) kısmen veya tamamen kesilmesi, lafora cisimlerinin oluşumunu engellediği ve nörolojik fenotipin kaybolmasına neden olduğu gösterilmiştir [31]. Glikojen sentezini önlemenin bir başka dolaylı yolu da, bu enzimin dolaylı bir aktivatörü olan PPI alt ünite R5 ifadesini engelleyerek glikojen sentaz aktivitesini azaltmaktır. Lafora hastalığı

farelerinde PP1 alt birimi R5'in engellenmesi, Lafora cisimlerinin oluşumunu neredeyse tamamen önlemiş ve nörodejenerasyonu ve ardından miyoklonik epilepsi fenotipini yok etmiştir [32].

### 5.1.2. *EPM2A* geninde tespit edilen varyantlar

Sanger ve WES yöntemlerinin beraber kullanıldığı çalışmada birbirinden bağımsız 4 hastada toplam 5 varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantlar Tablo 4-1'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir. *EPM2A* genin taranması sonucunda iki tane veri tabanlarında daha önce görülmemiş ve bir tane veri tabanlarında olan fakat hastalık ile ilişkilendirilmemiş varyant tespit edilmiştir. Diğer tespit edilen varyantlar veri tabanlarında hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Varyantlar, The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database veri tabanı kullanılarak ayrıca incelenmiştir. *EPM2A* geninin koladığı laforin proteini aktif iki bölgeden oluşmaktadır. Bir bölge proteinin karbohidratlarla bağlanmasını sağlayan CBM20 diğeri ise tirozin-protein fosfataz bölgesidir. Bu bölgelerde oluşan varyantlar genel olarak glikojenlerin düzgün defosforillenememesine sebep olarak hücre içerisinde agregatlar oluşmasına sebep olmaktadır.

E10-114 kodlu hastada homozigot tespit edilen NM\_005670.4:c.292T>C, p.Ser98Pro varyantı veri tabanlarında daha önce görülmemiştir. Kullanılan in siliko tahmin araçları sonucunda varyant polimorfizm olarak skor vermesi sebebi ile hasta WES yöntemi ile tekrar farklı bir genetik altyapı olması ihtimali araştırılmıştır. Sonuç olarak, WES yöntemi ile aynı varyant tespit edilmiş ve PME ile ilişkili farklı bir gende varyant tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda varyant yeni bir kırılma bölgesi yaratarak transkripsiyon düzeyinde bir etkisi olabileceğini speküle etmekteyiz. Varyantın hastalık ile ilişkisi gelecek fonksiyonel çalışmalarda aydınlatılabilir. Varyantın aile içindeki segregasyonu incelenmek istendi, fakat sadece annenin materyaline ulaşılabilmiştir. Analiz sonunda annede varyant heterozigot tespit edilmiştir. Varyant, uniprot veri tabanında incelendiğinde proteinin CMB20 bölgesine denk düştüğü görülmüştür.

E10-101 kodlu hastada homozigot tespit edilen NM\_005670.4:c.259A>G,p.Lys87Glu varyantı veri tabanlarında daha önce görülmemiştir. Varyantın olduğu noktada başka bir değişim NM\_005670.4:c.259A>T gözlenmiş ve etkisi stop kodon oluşturmaktır. Dolayısı ile aynı noktadaki diğer varyant

ile karıştırılmaması önemli olmuştur. Tespit edilen varyant, aile içinde segregasyonu incelenmiş ve varyantın anne ve babada heterozigot olduğu gözlenmiştir. Tablo 4-1’de in siliko analiz sonuçları da gösterilen varyant, segregasyon ve klinik bilgiler dahilinde incelendiğinde hastalığı açıklayabileceğini düşünebiliriz. Varyant, uniprot veri tabanında incelendiğinde proteinin CMB20 bölgesine denk düştüğü görülmüştür.

E09-85 kodlu hastada homozigot tespit edilen NM\_005670.4:c.721C>T,p.Arg241\* (rs104893950) veri tabanlarında daha önceden hastalık ile ilişkilendirilmiş ve patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Uniprot veri tabanında incelenen varyant tirozin-protein-fosfataz bölgesinden hemen önce olup, stop kodon oluşturması sebebi ile bu bölgenin sentezlenen proteinden silinmesine ve dolayısı ile fonksiyon kaybına sebep olarak hücrede glikojen birikimine sebep olduğu düşünülebilir. Bireyin ailesine ulaşamadığından ailesel segregasyon inclemesi gerçekleştirilememiştir. Tespit edilen varyantın hastalık ile ilişkisi literatürde gösterilmiştir. Dolayısı ile analiz tamamlanmış ve hastalık sebebi aydınlatılabilmektedir.

E07-270/269 kodlu hastalar kardeşlerdir. Tespit edilen heterozigot NM\_005670.4:c.301+1G>T (rs1361221383) varyantı veri tabanlarında daha önce görülmüş fakat hastalık ile ilişkilendirilmemiştir. WES analiz sonucunda ortaya çıkan varyant tek başına hastalığa sebep olamayacağından PME ile ilişkili diğer genlerde taranmış fakat sonuç alınamamıştır. IGV programı kullanılarak *EPM2A* geni incelendiğinde, gende 1. Ekzonun başında 100 bç’lik bir bölgenin tam olarak kapsanmadığı görülmüştür. Sanger yöntemi ile dizilenen ve analiz edilen bölgede daha önce varyantın haricinde NM\_005670.4:c.94T>G,p.Trp32Gly (rs104893955) varyantı kardeşlerde heterozigot tespit edilmiştir. Ardından iki heterozigot varyantın tespit edilmesi ile cis trans ilişkilerinin aydınlatılması sebebi ile anne ve babada segregasyon inclemesi yapılmış ve sonuç olarak varyantların farklı ebeveynlerden çocuklara geçtiği tespit edilmiştir. Hastalarda sonuç olarak tespit edilen varyantlar bileşik heterozigotluk oluşturma ihtimali düşünülmüştür.

### 5.1.3. *NHLRC1* geninde tespit edilen varyantlar

Sanger ve WES yöntemlerinin beraber kullanıldığı çalışmada birbirinden bağımsız 7 hastada toplam 2 varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantlar Tablo 4-1’de detaylı bir şekilde gösterilmiştir. *NHLRC1* genin taranması sonucunda bir tane veri tabanlarında daha önce görülmemiş ve bir tane veri tabanlarında hastalık ile

ilişkilendirilmiş varyant tespit edilmiştir. Varyantlar, The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database veri tabanı kullanılarak ayrıca incelenmiştir. *NHLRC1* geninin kodladığı malin proteini altı tane NHL1 tekrar bölgesi ve bir RING bölgesinden oluşmaktadır. RING bölgesinin varlığı malin proteininin ubiquitinasyondan sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu bölgelere denk gelen varyantlar genel olarak malin proteininin laforin ile ilişki kurmasını kısıtlayarak ve glikojen metabolizmasında ve hücredeki diğer proteozom mekanizmalarında aksaklıklara sebep olabilmektedir.

E04-129/130 kodlu hastalar kardeşlerdir. Tespit edilen homozigot NM\_198586.2:c.77G>A,p.Cys26Tyr varyantı veri tabanlarında daha önce görülmemiştir. Kullanılan in siliko tahmin araçları doğrultusunda varyant patojenik skor almıştır. Varyantın aile içindeki dağılımına bakılmış ve anne babada varyantın heterozigot olduğu görülmüştür. Varyant, uniprot veri tabanında incelendiğinde proteinin Ring-type bölgesine denk düştüğü görülmüştür. Klinik bilgiler, in siliko tahmin ve segregasyon sonuçları beraber değerlendirildiğinde varyantın patojenik olabileceği düşünülmüştür. Varyant, lokusa özgün veri tabanında belirtilememiş fakat aynı kodonda bir varyant hastalık ile ilişkilendirilmiştir.

E14-05, E17-40, E15-23, E11-88, E18-26, E11-38 kodlu hastalar birbirinden bağımsız bireyler olup tespit edilen homozigot NM\_198586.2:c.436G>A,p.Asp146Asn (rs769301934) varyantı hepsinde ortaktır. Varyant, veri tabanlarında daha önce hastalıkla ilişkilendirilmiş ve patojenik olduğu raporlanmıştır. Varyantın aile içinde dağılımı için bireylerin sağlıklı aile fertlerine ulaşamamıştır. Bu mutasyondan etkilenen hastalar, tipik LH fenotipinden daha hafif bir hastalık seyri göstermektedirler. Atipik bir klinik özellik göstermesi sebebiyle bu hastalar genel olarak doğru tanı almakta zorlanabilir. Uniprot veri tabanında varyant incelendiğinde proteinin NHL1 tekrar bölgesine denk gelmektedir.

## 5.2. *SCARB2* geninde tespit edilen ve AMRF ile ilişkilendirilen varyant

Aksiyon miyoklonus-böbrek yetmezliği sendromu (AMRF), *SCARB2* geninde meydana gelen ve lizozomal integral protein tip 2'de (LIMP2) fonksiyon kaybına sebep olan mutasyonlar ile ortaya çıkan otozomal resesif bir PME alt grubudur. Hastalık genel olarak yaşamın ikinci veya onuncu yıllarında etkisini göstermekte ve renal yetmezlik bulguları göstermektedir. LIMP2 proteini çoğu dokuda lizozomal membranda yer

almaktadır. Protein, asit hidrolaz glukoserebrosidazın (GC) lizozomlara taşınmasında önemli bir rolü vardır. GC enzimini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar, glikosfingolipit glukozilseramidinin lizozomda birikmesine sebep olarak Gaucher Hastalığına sebep olmaktadır. LIMP2, GC enzimini endoplazmik redikulumda bağlanarak lizozoma kadar taşır. AMRF'ye sebep olan mutasyonlar incelendiğinde, LIMP2 proteininin endoplazmik retikulumda alıkoyulduğu gözlenmiştir [33].

E17-41 kodlu etkilenmiş bireyde tespit edilen homozigot NM\_005506.4: c.134delA, p.Asn45Metfs\*88 varyantı çerçeve kayması etkisi ile erken stop kodon oluşumuna sebep olmaktadır. Erken stop kodon oluşumu, varyantı taşıyan transkriptlerde nonsense-mediated decay (NMD) mekanizması ile degrede edilebilmektedir. Bu durum, fonksiyon kaybı etkisi ile gen ürününün hiç oluşmamasına sebep olmaktadır [34]. Hastada tespit edilen varyant, bu durumla uyuşmakta ve genin ekzon 2 kısmında yer almaktadır. Transkripsiyon aşamasında mRNA'nın NMD mekanizması ile degrede edilmesine ve glukoserebrosidaz (GBA) ile interaksiyon için önemli olan bu proteinin hiç oluşmamasına sebep olabilir. Varyantın sağlıklı ve hasta kardeşler arasında dağılımı incelenmiştir. Sonuç olarak, hasta kardeş varyant açısından homozigot olmakla beraber sağlıklı kardeşler varyant açısından taşıyıcı ve yabanıl tip olarak gözlenmiştir. Hasta birey, analizlerin devam eden sürecinde hayatını kaybetmiştir. Klinik dosya incelendiğinde hastanın renal yetmezlik sebebi ile hayatını kaybettiği öğrenilmiş ve bu da varyantın klinik olarak hastalığa sebep olabileceği olasılığını artırmıştır. Tablo 4-1'de gösterilen in siliko veri tabanı sonuçları varyantın patojenik etkisini destekleyen niteliktedir.

### 5.3. *KCTD7* geninde tespit edilen varyant

Epilepsinin bir çok türünde potasyum kanallarında meydana gelen anormal değişimler rapor edilmiştir. *KCTD7* geninin kodladığı protein potasyum kanalları tetramerizasyon bölgesi içeren bir protein ailesine dahildir ve gende meydana gelen değişimlerin epilepsiye sebep olduğu bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda pek çok farklı popülasyonda *KCTD7* gen varyantları tespit edilmiş ve PME ile ilişkilendirilmiştir. Gende bulunan varyantlar, K akışını bozmakta ve anormal hücre depolarizasyonuna yol açabilmektedir bu da glutamaterjik nöronlarda nörotransmitter glutamat oluşumu için gerekli olan glutamin taşıyıcı SAT2'nin işlevini etkilemektedir. Gen, OMIM veri tabanında EPM3 hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [35].

E11-148 kodlu bireyin WES analizinde *KCTD7* geninde tespit edilen homozigot NM\_153033.4: c.407C>A, p.Pro136His varyantı daha önce literatürlerde rapolanmamış ve protein üzerinde BTB/POZ bölgesi içinde yer almaktadır. Tespit edilen varyantın aile içindeki dağılımı incelenmiş ve her iki ebeveynde ve sağlıklı kardeşte heterozigot tespit edilmiştir. Varyantın in siliko tahmin araçlarında aldığı sonuçlar ve ailede varyantın dağılımı ve klinik bilgileri göz önünde bulundurulduğunda bireyin hastalığını açıklamada büyük bir etkisi olduğunu ortaya çıkarmıştır.

#### 5.4. Sonuç

Bahsedildiği üzere ülkemizde akraba evliliğinin sıklığının yüksek olması bu gibi nadir hastalıkların ortaya çıkma ihtimalini attırmaktadır. Şimdiye kadar tespit edilen varyantlar genel olarak her hastada farklılık göstermiştir. Buna rağmen *NHLRC1* geninde tespit edilen NM\_198586.2:c.436G>A,p.Asp146Asn varyantı birbirinden bağımsız altı hastada homozigot tespit edilmiştir. Bu hastalar, literatürlerde de bahsedildiği gibi ağır bir LH fenotipi taşımamakta, bazı hastalar günlük yaşamlarına devam etmekte ve aile kurabilmektedir. Çalışmamız ufak bir PME hasta grubunu bir araya getirmiş bile olsa aynı varyantı farklı hastalarda görmek, ülkemizde hafif seyirli epilepsi olan veya genetik tanı alamayan benzer durumlarda bu varyantın etkili olabileceğini düşündürmüştür. LH ön tanısı almış bir hastanın genetik tanı veya danışma alması durumunda bu varyantın önemi büyüktür.

Çalışmada tespit edilen ve daha önce veri tabanlarında veya literatürde hastalık ile ilişkilendirilmemiş varyantlar tespit edilmiştir. Bu çalışmanın bir çıktısı olarak hazırlık aşamasında olan yayınla bu varyantlar literatüre kazandırılmış olacaktır. Çalışmada tek bir yöntem kullanılmamış Sanger ve WES yöntemleri birbirine entegre edilmiş, böylelikle tüm PME genleri taranmış, klinik bilgilerinde eksiklik olsa dahi PME ön tanısı olan hastalarda gerek LH gerekse CLN14 ve AMRF hastalıkları ile ilgili genler kısa sürede tespit edilebilmiştir. Bu da gösteriyor ki gibi genetik heterojenite sahip nadir hastalıkların araştırılmasında WES gibi yöntemler oldukça etkili ve tanı oranını yükseltme potansiyeline sahiptir.

Çalışmamız, mitokondriyal DNA dizileme ve analizini kapsamaktadır. Bu çalışmanın devamı veya genişletilmesi durumunda yapılacak yeni tekniklerde bu problemin düzeltilmesi gerekecektir.

## KAYNAKLAR

1. R. Ottman, Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia*, **46 Suppl 10** (2005) 7–14. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00350.x>.
2. D. Lozsadi, Myoclonus: a pragmatic approach. *Practical Neurology*, **12** (2012) 215–224. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2011-000107>.
3. N. Malek, W. Stewart, & J. Greene, The progressive myoclonic epilepsies. *Practical Neurology*, **15** (2015) 164–171. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2014-000994>.
4. E. Aykutlu, B. Baykan, C. Gürses, N. Bebek, N. Büyükbabani, & A. Gökyigit, Add-on therapy with topiramate in progressive myoclonic epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, **6** (2005) 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.11.014>.
5. K. Knupp & E. Wirrell, Progressive myoclonic epilepsies: it takes a village to make a diagnosis. *Neurology*, **82** (2014) 378–379. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000091>.
6. L. A. Pennacchio, A. E. Lehesjoki, N. E. Stone, V. L. Willour, K. Virtaneva, J. Miao, E. D'Amato, L. Ramirez, M. Faham, M. Koskiniemi, J. A. Warrington, R. Norio, A. de la Chapelle, D. R. Cox, & R. M. Myers, Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science (New York, N.Y.)*, **271** (1996) 1731–1734.
7. L. Mumoli, P. Tarantino, R. Michelucci, A. Bianchi, A. Labate, S. Franceschetti, C. Marini, P. Striano, M. Gagliardi, E. Ferlazzo, V. Sofia, L. Pennese, G. Annesi, U. Aguglia, R. Guerrini, F. Zara, A. Gambardella, & Genetic Commission, Italian League Against Epilepsy, No evidence of a role for cystatin B gene in juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, **56** (2015) e40-43. <https://doi.org/10.1111/epi.12944>.
8. A. G. Bassuk, R. H. Wallace, A. Buhr, A. R. Buller, Z. Afawi, M. Shimojo, S. Miyata, S. Chen, P. Gonzalez-Alegre, H. L. Griesbach, S. Wu, M. Nashelsky, E. K. Vldar, D. Antic, P. J. Ferguson, S. Cirak, T. Voit, M. P. Scott, J. D. Axelrod, C. Gurnett, A. S. Daoud, S. Kivity, M. Y. Neufeld, A. Mazarib, R. Straussberg, S. Walid, A. D. Korczyn, D. C. Slusarski, S. F. Berkovic, & H. I. El-Shanti, A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *American Journal of Human Genetics*, **83** (2008) 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.003>.
9. S. F. Berkovic, L. M. Dibbens, A. Oshlack, J. D. Silver, M. Katerelos, D. F. Vears, R. Lüllmann-Rauch, J. Blanz, K. W. Zhang, J. Stankovich, R. M. Kalnins, J. P. Dowling, E. Andermann, F. Andermann, E. Faldini, R. D'Hooge, L. Vadlamudi, R. A. Macdonell, B. L. Hodgson, M. A. Bayly, J. Savige, J. C. Mulley, G. K. Smyth, D. A. Power, P. Saftig, & M. Bahlo, Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *American Journal of Human Genetics*, **82** (2008) 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.019>.
10. L. M. Dibbens, R. Michelucci, A. Gambardella, F. Andermann, G. Rubboli, M. A. Bayly, T. Joensuu, D. F. Vears, S. Franceschetti, L. Canafoglia, R. Wallace, A. G. Bassuk, D. A. Power, C. A. Tassinari, E. Andermann, A. E. Lehesjoki, & S. F. Berkovic, SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure. *Annals of Neurology*, **66** (2009) 532–536. <https://doi.org/10.1002/ana.21765>.

11. M. A. Corbett, M. Schwake, M. Bahlo, L. M. Dibbens, M. Lin, L. C. Gandolfo, D. F. Vears, J. D. O'Sullivan, T. Robertson, M. A. Bayly, A. E. Gardner, A. M. Vlaar, G. C. Korenke, B. R. Bloem, I. F. de Co, J. M. A. Verhagen, A.-E. Lehesjoki, J. Gecz, & S. F. Berkovic, A mutation in the Golgi Qb-SNARE gene GOSR2 causes progressive myoclonus epilepsy with early ataxia. *American Journal of Human Genetics*, **88** (2011) 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.011>.
12. S. Singh & S. Ganesh, Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Human Mutation*, **30** (2009) 715–723. <https://doi.org/10.1002/humu.20954>.
13. M. Muona, S. F. Berkovic, L. M. Dibbens, K. L. Oliver, S. Maljevic, M. A. Bayly, T. Joensuu, L. Canafoglia, S. Franceschetti, R. Michelucci, S. Markkinen, S. E. Heron, M. S. Hildebrand, E. Andermann, F. Andermann, A. Gambardella, P. Tinuper, L. Licchetta, I. E. Scheffer, C. Criscuolo, A. Filla, E. Ferlazzo, J. Ahmad, A. Ahmad, B. Baykan, E. Said, M. Topcu, P. Riguzzi, M. D. King, C. Ozkara, D. M. Andrade, B. A. Engelsen, A. Crespel, M. Lindenau, E. Lohmann, V. Saletti, J. Massano, M. Privitera, A. J. Espay, B. Kauffmann, M. Duchowny, R. S. Møller, R. Strausberg, Z. Afawi, B. Ben-Zeev, K. E. Samocha, M. J. Daly, S. Petrou, H. Lerche, A. Palotie, & A.-E. Lehesjoki, A recurrent de novo mutation in KCNC1 causes progressive myoclonus epilepsy. *Nature Genetics*, **47** (2015) 39–46. <https://doi.org/10.1038/ng.3144>.
14. J. F. Staropoli, W. Xin, R. Barone, S. L. Cotman, & K. B. Sims, An atypical case of neuronal ceroid lipofuscinosis with co-inheritance of a variably penetrant POLG1 mutation. *BMC medical genetics*, **13** (2012) 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-50>.
15. M. Kousi, V. Anttila, A. Schulz, S. Calafato, E. Jakkula, E. Riesch, L. Myllykangas, H. Kalimo, M. Topçu, S. Gökben, F. Alehan, J. R. Lemke, M. Alber, A. Palotie, O. Kopra, & A.-E. Lehesjoki, Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene. *Journal of Medical Genetics*, **49** (2012) 391–399. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100859>.
16. A. Poduri & D. Lowenstein, Epilepsy genetics--past, present, and future. *Current Opinion in Genetics & Development*, **21** (2011) 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.01.005>.
17. S. F. Berkovic, Genetics of Epilepsy in Clinical Practice. *Epilepsy Currents*, **15** (2015) 192–196. <https://doi.org/10.5698/1535-7511-15.4.192>.
18. M. Choi, U. I. Scholl, W. Ji, T. Liu, I. R. Tikhonova, P. Zumbo, A. Nayir, A. Bakkaloğlu, S. Ozen, S. Sanjad, C. Nelson-Williams, A. Farhi, S. Mane, & R. P. Lifton, Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (2009) 19096–19101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910672106>.
19. Y. Yang, D. M. Muzny, F. Xia, Z. Niu, R. Person, Y. Ding, P. Ward, A. Braxton, M. Wang, C. Buhay, N. Veeraraghavan, A. Hawes, T. Chiang, M. Leduc, J. Beuten, J. Zhang, W. He, J. Scull, A. Willis, M. Landsverk, W. J. Craigen, M. R. Bekheirnia, A. Stray-Pedersen, P. Liu, S. Wen, W. Alcaraz, H. Cui, M. Walkiewicz, J. Reid, M. Bainbridge, A. Patel, E. Boerwinkle, A. L. Beaudet, J. R. Lupski, S. E. Plon, R. A. Gibbs, & C. M. Eng, Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*, **312** (2014) 1870–1879. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14601>.

20. Y. Erbilgin, Sibel Aylin Uğur İşeri, Khusan Khodzhaev, & Garen Haryanyan, *Biyobankalamada Protokol ve Kalite Kılavuzu* (İstanbul Tıp Kitabevi, 2017).
21. H. Thiele & P. Nürnberg, HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **21** (2005) 1730–1732. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth488>.
22. H. Thorvaldsdóttir, J. T. Robinson, & J. P. Mesirov, Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, **14** (2013) 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.
23. W. Liu, Y. Xie, J. Ma, X. Luo, P. Nie, Z. Zuo, U. Lahrmann, Q. Zhao, Y. Zheng, Y. Zhao, Y. Xue, & J. Ren, IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **31** (2015) 3359–3361. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv362>.
24. Andrews S., *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data* (2010).
25. H. Li & R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **25** (2009) 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
26. Picard.
27. A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernytzsky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly, & M. A. DePristo, The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, **20** (2010) 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
28. M. R. Green & J. Sambrook, Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2019** (2019) pdb.prot095141. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095141>.
29. S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H. L. Rehm, & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 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: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, **17** (2015) 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
30. C. Mathieu, I. Li de la Sierra-Gallay, R. Duval, X. Xu, A. Coccagn, T. Léger, G. Woffendin, J.-M. Camadro, C. Etchebest, A. Haouz, J.-M. Dupret, & F. Rodrigues-Lima, Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE. *The Journal of Biological Chemistry*, **291** (2016) 18072–18083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738898>.
31. B. A. Pederson, J. Turnbull, J. R. Epp, S. A. Weaver, X. Zhao, N. Pencea, P. J. Roach, P. W. Frankland, C. A. Ackerley, & B. A. Minassian, Inhibiting glycogen synthesis prevents Lafora disease in a mouse model. *Annals of Neurology*, **74** (2013) 297–300. <https://doi.org/10.1002/ana.23899>.
32. J. Turnbull, A. A. DePaoli-Roach, X. Zhao, M. A. Cortez, N. Pencea, E. Tiberia, M. Piliguian, P. J. Roach, P. Wang, C. A. Ackerley, & B. A. Minassian, PTG Depletion Removes Lafora Bodies and Rescues the Fatal Epilepsy of Lafora Disease. *PLoS Genetics*, **7** (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002037>.
33. L. Dibbens, M. Schwake, P. Saftig, & G. Rubboli, SCARB2/LIMP2 deficiency in action myoclonus-renal failure syndrome. *Epileptic Disorders: International*

- Epilepsy Journal with Videotape*, **18** (2016) 63–72. <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0843>.
34. Z. Coban-Akdemir, J. J. White, X. Song, S. N. Jhangiani, J. M. Fatih, T. Gambin, Y. Bayram, I. K. Chinn, E. Karaca, J. Punetha, C. Poli, Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, E. Boerwinkle, C. A. Shaw, J. S. Orange, R. A. Gibbs, T. Lappalainen, J. R. Lupski, & C. M. B. Carvalho, Identifying Genes Whose Mutant Transcripts Cause Dominant Disease Traits by Potential Gain-of-Function Alleles. *American Journal of Human Genetics*, **103** (2018) 171–187. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.06.009>.
  35. M. N. Moen, R. Fjær, E. H. Hamdani, J. K. Laerdahl, R. J. Menchini, M. D. Vigeland, Y. Sheng, D. E. Undlien, B. Hassel, M. A. Salih, H. Y. El Khashab, K. K. Selmer, & F. A. Chaudhry, Pathogenic variants in KCTD7 perturb neuronal K<sup>+</sup> fluxes and glutamine transport. *Brain: A Journal of Neurology*, **139** (2016) 3109–3120. <https://doi.org/10.1093/brain/aww244>.



**ETİK KURUL KARARI**

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



Sayı : 292

Konu: Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ hk.

Tarih : 23.02.2018

Sayın Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ  
Genetik

İlgi: Genetik Anabilim Dalının 06/10/2017 gün ve 373521 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Bio. Garen HARYANYAN' ın yürüteceği 2017/1115 dosya numaralı "Progresif Miyoklonik Epilepsilerde Tüm Ekzom Dizileme Yöntemi ile ilişkili Genlerinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 23/02/2018 tarih ve 04 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yagız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### PROGRESİF MİYOKLONİK EPİLEPSİLERDE TÜM EKZOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

#### ORIJINALLIK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>4</b>        | % <b>3</b>          | % <b>1</b> | % <b>2</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                  |             |
|----------|------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>Submitted to Istanbul University</b><br>Öğrenci Ödevi         | % <b>2</b>  |
| <b>2</b> | <b>www.jns.dergisi.org</b><br>İnternet Kaynağı                   | % <b>1</b>  |
| <b>3</b> | <b>www.izmir-neurofeedback.com</b><br>İnternet Kaynağı           | % <b>1</b>  |
| <b>4</b> | <b>www.researchgate.net</b><br>İnternet Kaynağı                  | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <b>Submitted to (school name not available)</b><br>Öğrenci Ödevi | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>ebooks.cambridge.org</b><br>İnternet Kaynağı                  | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>polen.itu.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı                      | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <b>library.cu.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı                     | <% <b>1</b> |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                  |                                                                    |                  |            |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------|------------|
| <b>Adı</b>       | Garen                                                              | <b>Soyadı</b>    | Haryanyan  |
| <b>Doğ. Yeri</b> | İstanbul                                                           | <b>Doğ. Tar.</b> | 16/04/1988 |
| <b>Email</b>     | <a href="mailto:garen.hayran@gmail.com">garen.hayran@gmail.com</a> | <b>Uyruğu</b>    | TC         |

### Eğitim Düzeyi

|                 | Mezun Olduğu Kurumun Adı                         | Mez. Yılı |
|-----------------|--------------------------------------------------|-----------|
| <b>Doktora</b>  |                                                  |           |
| <b>Yük.Lis.</b> |                                                  |           |
| <b>Lisans</b>   | Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü | 2015      |
| <b>Lise</b>     | Avrupa Koleji                                    | 2006      |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    | Görevi         | Kurum             | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|----------------|-------------------|------------------|
| 1. | Genom Analisti | Genera Diagnostik | 2018-devam       |
| 2. |                |                   | -                |
| 3. |                |                   | -                |

| Yabancı Dilleri  | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | KPDS/ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|------------------|-------------------|----------|--------|----------------|---------------|
| <b>İngilizce</b> | İyi               | İyi      | İyi    |                |               |
| <b>Fransızca</b> | Zayıf             | Zayıf    | Zayıf  |                |               |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

### Bilgisayar Bilgisi

| Program                    | Kullanma becerisi |
|----------------------------|-------------------|
| CLC workbench              | İyi               |
| Microsoft Ofis programları | İyi               |
| Sophia DDM                 | İyi               |
| Windows, Mac, Linux        | İyi               |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Y. Erbilgin, Sibel Aylin Uğur İşeri, Khusan Khodzhaev, Garen Haryanyan, *Biyobankalamada Protokol ve Kalite Kılavuzu* (İstanbul Tıp Kitapevi, 2017).