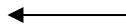


Adınızı soyadınızı giriniz

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 TEZİ)

SICAK SU EPİLEPSİSİNDE TÜM EKZOM ANALİZİ

ÖMER FARUK DÜZENLİ

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

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Annem Ayşe Düzenli ve Babam Musa Düzenli'ye ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Başta annem ve babam olmak üzere, bu mesleğe yönelmem adına ilk kıvılcımı ateşleyen abim Samed Düzenli'ye, maddi manevi desteğini sürekli hissettiren abim İsmail Hakkı Düzenli'ye ve biricik kardeşim Fatmanur Düzenli'ye,

Eğitim öğretim hayatımın en önemli kişilerinden birisi olan, ağacı yaşken eğen ilkokul öğretmenim Sayın Mehmet Korkmaz'a,

Yüksek Lisans tezim süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emrah Yücesan, Uzm. Mol. Bio. Seda Süsgün ve Uzm. Mol. Bio. Barış Salman'a,

Çalışmada incelenen bireylerin klinik bilgilerini tarafımıza ileten ve bilgileriyle katkı sağlayan Prof. Dr. Nerses Bebek'e,

Beni öğrencisi olarak kabul edip danışmanlığımı üstlenen Prof. Dr. Sibel Aylin Uğur İşeri'ne teşekkür ederim.

Bu çalışma, TÜBA-Üstün Başarılı Genç Bilim İnsanı Ödülleri (GEBİP) ve TÜBİTAK 2210/A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ile desteklenmiştir. Çalışmaya katkıları için Epi25 konsorsiyumuna ve olgularımıza teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epilepsi	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma ve Nöbet Tipleri	4
2.1.3. Sıcak Su Epilepsisi.....	6
2.1.4. Epi25 Çalışması	7
2.2. DNA Dizileme	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Çalışma Kapsamında İncelenen Bireyler.....	15
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	15
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	16
3.1.4. Çalışma Kapsamında Hizmet Alınan Firmalar	16
3.1.5. Çalışmada Kullanılan İnternet Siteleri ve Veri Tabanları.....	16
3.1.6. Çalışmada Kullanılan Analiz Programları	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Primer Dizaynı	18
3.2.2. Kademeli Sıcaklık Düşürmeli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TD-PCR, Touchdown PCR).....	19
3.2.3. AgaroZ Jel Elektroföresi	20

3.2.4. Sanger Dizileme	20
3.2.5. Tüm Ekzom Dizileme Analizi	20
3.2.6. CNV Analizi	21
3.2.7. Cinsiyet Tahmini	23
3.2.8. Varyantların Adlandırılması	23
4. BULGULAR	24
4.1. Tüm Ekzom Dizileme Analizi	24
4.1.1. Kalite Kontrolü Sonuçları	24
4.1.2. Filtreleme Sonuçları	26
4.1.3. Tüm Ekzom Dizileme Verisi ile Fonksiyonel Anotasyon Sonuçları	40
4.2. CNV Analizi Sonuçları	43
4.3. SNP ve WES Verisi ile Cinsiyet Tahmini	46
5. TARTIŞMA	48
5.1. WES Analizi ile Tespit Edilen Varyantlar	49
5.2. Fonksiyonel Anotasyon Analizi	53
5.3. WES-CNV Analizi Karşılaştırması	55
5.4. Sonuç ve Öneri	55
KAYNAKLAR	56
HAM VERİLER	65
FORMLAR	66
ETİK KURUL KARARI	67
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	68
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. SSE ile ilgili yapılan genetik çalışmalar ve çalışmalardaki kohort, yöntem ve bulgu bilgileri.....	6
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.	15
Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmaları.	16
Tablo 3-3: Hizmet alımı gerçekleştirilen firmalar.	16
Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan internet siteleri.....	16
Tablo 3-5: <i>In-silico</i> analiz programları.....	17
Tablo 3-6: Çalışmada kullanılan primerler.....	18
Tablo 4-1: Filtrelemeler sonrası neticelerine (<i>consequences</i>) göre varyantların dağılımı.	27
Tablo 4-2: Filtrelemeler sonrası elde edilen heterozigot novel varyantlar.	28
Tablo 4-3. WES analizi sonucu tespit edilen genlerin çeşitli veri tabanlarından çekilen fenotip bilgileri.	29
Tablo 4-4: Fonksiyonel Anotasyon için kullanılan gen listesi.	40
Tablo 4-5: Yolak etkileşimlerine göre elde edilen anotasyon sonuçları.....	41
Tablo 4-6: Gen Ontoloji anotasyon sonuçları.....	42
Tablo 4-7: SNP array verisine dair genel bilgiler.....	44
Tablo 4-8: Cinsiyet tahminlerinin klinik verileri ile karşılaştırılması.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nöbet tiplerinin detaylı sınıflandırılması.	4
Şekil 2-2: Epilepsi tiplerinin sınıflandırılmasına yardımcı iş şeması.	5
Şekil 2-3: Sanger dizilemenin prensibi. a) 1977 yılında Sanger ve ark. tarafından yapılan dizileme metodu. b) 1986 yılında Smith ve ark. tarafından geliştirilen yöntem.	9
Şekil 2-4: Illumina sisteminin kısa-okuma dizileme prensibi. a) Illumina sisteminin kütüphane hazırlama süreci. b) Köprü amplifikasyonu ile kümeler oluşturma. c) Tersinir boya sonlandırıcı kullanarak dizileme süreci. Figür, PMID numarası 23560931 olan makaleden Türkçeleştirilmiştir.	11
Şekil 2-5: Tüm ekzom verisinin analiz süreci. Figür, PMID numarası 19997069 olan makaleden Türkçeleştirilmiştir.	12
Şekil 3-1: Kademeli Sıcaklık Düşürmeli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TD-PCR) grupları ve koşulları.....	20
Şekil 3-2: Tüm Ekzom Dizileme analizi akış şeması. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, HPO: Human Phenotype Ontology, DP: Kapsama Derinliği, AD: Alel Derinliği.	21
Şekil 3-3: CNV analizi akış şeması. WES: Tüm Ekzom Dizileme.	22
Şekil 4-1: Tüm Ekzom Dizileme çıktılarının FastQC aracıyla elde edilen baz başına dizileme kalitesi sonuçları.	25
Şekil 4-2: Tüm Ekzom Dizileme çıktılarının FastQC aracıyla elde edilen okuma başına ortalama kalite skorlarının sonuçları.....	26
Şekil 4-3: Vaka 1'in ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve ilgili bulunduğu OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	30
Şekil 4-4: Vaka 4'ün ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	31
Şekil 4-5: Vaka 5'in ilgili varyantlarının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	33
Şekil 4-6: Vaka 6'nın ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	34
Şekil 4-7: Vaka 7'nin ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	35

Şekil 4-8: Vaka 8'in ilgili varyantlarının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	36
Şekil 4-9: Vaka 9'un ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	38
Şekil 4-10: Vaka 10'un ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.	39
Şekil 4-11: Vaka 7 ve Vaka 8'de tespit edilen <i>SCN9A</i> genindeki varyantların Sanger dizileme sonuçları (hg38'e göre).	40
Şekil 4-12: GenomeStudio'da analiz edilen SNP array verisindeki CNV alanları. Lejantta belirtilen değerler katlanma oranlarını göstermektedir.	45
Şekil 4-13: A) Samtools aracı kullanılarak elde edilen X ve Y kromozomlarının <i>coverage</i> değerlerine ait grafik. B) Normalize edilen <i>coverage</i> değerlerine ait grafik.	46

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG- American College of Medical Genetics and Genomics

BAF- B-allele frequency

BAM- Binary Alignment Map

CNV- Copy Number Variation

ddNTP- Dideoksinükleotit-trifosfat

DEE- Developmental and Epileptic Encephalopathies

EEG- Elektroensefalografi

GGE- Genetic Generalized Epilepsy

GO- Gene Ontology

HGVS- Human Genome Variation Society

IGV- Integrative Genomics Viewer

ILAE- International League Against Epilepsy

İTF- İstanbul Tıp Fakültesi

İÜ- İstanbul Üniversitesi

LRR- Log R Ratio

NAFE- Non-Acquired Focal Epilepsy

SAM- Sequence Alignment Map

SNP- Single Nucleotide Polymorphism

SSE- Sıcak Su Epilepsisi

TD-PCR- Touchdown Polymerase Chain Reaction

VCF- Variant Call Format

VEP- Variant Effect Predictor

VUS- Variant of Uncertain Significance

WES- Whole Exome Sequencing

ÖZET

Düzenli, Ö.F. (2022). Sıcak Su Epilepsisinde Tüm Ekzom Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sıcak Su Epilepsisi (SSE), genellikle banyo sırasında vücudun sıcak su ile teması sonucu ortaya çıkan nöbetler ile karakterize nadir bir epilepsi türüdür. Günümüzde, SSE'nin etyopatogenezini açıklama adına yapılan genetik çalışma sayısı kısıtlıdır. Ayrıca, nadir varyantların bu tür kompleks hastalıklardaki önemi yapılan çalışmalarla gün geçtikçe anlaşılmaktadır. Bu nedenle, çalışmada SSE'nin etyopatogenezini aydınlatmaya katkı sağlayacak nadir varyantların bulunması amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında, Epi25 konsorsiyumu tarafından tüm ekzom dizileme (WES) ve SNP array dizileme işlemleri gerçekleştirilen bağımsız 10 SSE bireyinin verileri ile biyoinformatik analiz yapılmıştır. Analiz sürecinde, ham olarak elde edilen WES verisi kendi iş hattımızdan geçirilip çeşitli filtreleme işlemlerine tabii tutularak ham veriden yanlış anlamlı novel varyantlar tespit edilmiştir. Devamında, yine WES verisi kullanılarak fonksiyonel anotasyon analizi gerçekleştirilmiştir ve varyantların bulundukları genlerin kümülatif bir halde biyolojik sistemdeki etkileri belirlenmiştir. Son olarak, SNP verisi ile CNV analizi yapılarak, genom üzerindeki kopya sayısı değişiklikleri incelenmiştir. WES analizi neticesinde, *SLC1A2*, *KCNB1*, *UBA5*, *ADAM22*, *PIGP*, *SCN2A*, *SCN9A*, *RELN*, *ABCA2*, *CACNA1A* ve *DIAPH1* genlerinde olmak üzere hastalık ile ilişkili olabilecek toplam 12 novel varyant tespit edilmiştir. Fonksiyonel anotasyon analizinde kullanılan gen kümeleri, hücresel süreçler, sinyal iletimi, madde taşınımı gibi bulgular ile ilişkilendirilmiştir. CNV analizi sonuçlarında, önem arz eden kopya sayısı değişikliği tespit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekzom Dizileme, Epilepsi, Sıcak Su Epilepsisi, Fonksiyonel Anotasyon, SNP array.

Bu çalışma, TÜBA-Üstün Başarılı Genç Bilim İnsanı Ödülleri (GEBİP) ve TÜBİTAK 2210/A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Duzenli, O.F. (2022). Whole Exome Analysis in Hot Water Epilepsy. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master's Thesis. İstanbul.

Hot Water Epilepsy (HWE) is a rare type of epilepsy characterized by seizures resulting from contact with hot water, usually during the shower. The number of genetic studies to explain the etiopathogenesis of SSE is limited at the present time. In addition, the importance of rare variants in such complex diseases is being understood day by day with several studies. Therefore, this study aims to find rare variants that will contribute to elucidating the etiopathogenesis of HWE.

Within the scope of the thesis, bioinformatics analysis was performed with the data of 10 independent HWE individuals, whose whole exome sequencing (WES) and SNP array sequencing were performed by the Epi25 consortium. During the analysis process, the raw WES data was passed through our in-house pipeline and subjected to various filtering processes, and novel missense variants were detected from the raw data. After that, functional annotation analysis was performed using WES data and the cumulative effects of the genes in which the variants were found in the biological system were determined. Finally, the copy number variations on the genome were examined by performing CNV analysis with SNP data. As a result of the WES analysis, 12 novel variants that may be associated with the disease were identified in the *SLC1A2*, *KCNBI*, *UBA5*, *ADAM22*, *PIGP*, *SCN2A*, *SCN9A*, *RELN*, *ABCA2*, *CACNA1A*, and *DIAPH1* genes. Gene clusters that are used in functional annotation analysis have been associated with cellular processes, signal transduction, substance transport, etc. No significant copy number variations were detected in the CNV analysis results.

Keywords: Exome Sequencing, Epilepsy, How Water Epilepsy, Functional Annotation, SNP array.

This study was supported by the Turkish Academy of Sciences for the 2019 Distinguished Young Scientist Award and TUBITAK 2210/A Domestic Master Scholarship Program.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, milattan önce 4000’li yıllardan başlayarak günümüze kadar toplumlarda dikkat çeken ve üzerine çalışmalar yapılan bir hastalık grubudur. Epilepsi, beyindeki anormal nöronal aktiviteye bağlı olarak ortaya çıkabilen nöbetlerin nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize edilen nörolojik bir hastalıktır. Dünya genelinde, yaklaşık %6 prevalans oranına sahip olan epilepsi çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır (1). Bunlardan biri olan refleks epilepsileri, bütün epilepsiler içerisinde %6’lık bir yer kaplamaktadır (2). Spesifik bir dış uyarıcı tarafından tetiklenen refleks epilepsileri çeşitli alt grupları bünyesinde barındırır. Bunlardan birisi olan sıcak su epilepsisi (SSE), genellikle banyo sırasında vücudun sıcak su ile teması sonucu ortaya çıkmaktadır.

SSE ilk olarak 1945 yılında Yeni Zelanda’da tanımlanmıştır. SSE ile ilgili yapılan çalışmalardan çoğu olgu sunumu olmakla beraber son yıllarda SSE’nin genetik arka planını da anlamayı amaçlayan çalışmalar kendini göstermeye başlamıştır. Ratnapriya ve ark. (2009) altı farklı SSE ailesinden oluşan bir gruba bağlantı analizi yöntemi uygulamışlardır. Bunun sonucunda, kromozom 10 q21 bölgesinin hastalık ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca bu bölgede yer alan ve hastalık ile ilişkili olabilecek olan *KCNMA1*, *VDAC2*, *SLC25A16* ve *SLC29A3* gibi aday genleri Sanger dizileme ile incelemişler ancak herhangi bir patojenik varyant tespit edememişlerdir. Aynı yıl içerisinde ekip yeni bir çalışma yayınlayarak kromozom 4q24-28 bölgesinde de SSE bağlantı bölgesi olduğunu göstermişlerdir. Sirsi ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada 7 yaşında SSE fenotipi gösteren bir erkek çocuğa epilepsi gen panel testi uygulanmış ve *SYN1* geninde nadir bir mutasyon tespit edilmiştir. Karan ve ark. (2017), bir ailenin üç neslini de dahil ettikleri çalışmalarında tüm ekzom dizileme ve bağlantı analizleri sonucunda *SLC1A1* geninde üç farklı varyant tespit ettiler. Karan ve ark. 2018 yılında yayınlamış oldukları diğer bir çalışmada ise bağlantı analiz yaptıkları SSE hastasında, daha önce hastalıkla ilişkilendirilmemiş kromozom 9’un p24.3-p23 lokusunun hastalık ile ilişkili olacağın tespit etmişlerdir. Türay ve Eröz (2021), 2 yaşındaki Türk SSE hastası birey ve sağlıklı aile bireyleri ile gerçekleştirmiş olduğu tüm ekzom dizileme analizi ve kromozomal mikroarray analizi sonucunda *POGZ* geninde patojenik, *TBCE* geninde belirsiz öneme sahip birer varyant tespit edilip SSE ile

ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalar haricinde, 2019 yılında Epi25 konsorsiyumu tarafından 17.606 bireyin tüm ekzom dizilemesi yapılarak epilepsideki en büyük tüm ekzom dizileme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu konsorsiyuma Türkiye’den 203 adet örnek ile katılım sağlanmıştır ancak varyasyon dağılımı diğer Avrupa ülkelerinden farklı olduğu için analize dahil edilmemiştir. Çalışmanın sonucunda, GABAerjik yolakta yoğunluk gösteren varyantların hastalık etyolojisinde etkili olacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında, Türkiye popülasyonundan elde edilen 10 SSE’ye sahip bireyin genom taramaları Epi25 konsorsiyumu tarafından yeni nesil dizileme yöntemleri ile gerçekleştirilmiş olup elde edilen ham verilerin analizi ile hastalık ile ilişkili aday genlerin/varyantların belirlenmesi, böylece hastalığın genetik etyopatogenezinin aydınlatılabilmesi için önemli bulgular elde edilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

2.1.1. Tarihçe

Epilepsi, ilk olarak Akad medeniyetine ait 4000 yıllık bir tablette “boynun sola döndüğü, ellerin ve ayakların kasıldığı, gözlerin tam açık olduğu ve bilinçsiz haldeyken ağızdan köpük gelmesi” olarak hasta bir bireyin tasviri ile açıklanmaktadır (3).

MÖ 1700’lerde, Antik Mısır döneminde yazılmış olan papirüslerde epilepsi vakalarına rastlanmaktadır. Edwin Smith Papirüsü olarak adlandırılan yazılı evrakta toplamda 48 çeşitli vaka sunulmaktadır. Bu vakalardan 5 tanesinde hastalar “aşırı derecede titreyen” şeklinde açıklanıp epileptik konvülsiyonlara atıf yapılmaktadır. Ayrıca bu vakalar kortikal yaralanmaların neden olduğu ilk fokal nöbetler olarak bilinmektedir (4,5).

MÖ 10. yüzyılda, Babil döneminde yaşayan Esagil-kin-apli isimli bir bilim insanı tarafından yazılmış Sakikku isimli teşhis kılavuzunda epilepsinin tanımı yer almaktadır. Ayrıca bu kılavuzda bazı nöbet tipleri tanımlanıp sınıflandırma yapılmaktadır. Bunların yanı sıra kılavuzda, düşme, nöbet gibi bazı tanımlamaların yapılması, bize antik zamanlarda epilepsiye dair tanı koyucu bilgilerin mevcut olduğuna dair bilgiler sunmaktadır (3,4).

Ayrıca, Çin yazılı kaynaklarında da MÖ 770-221 yıllarına dayanan epilepsiye dair belgeler mevcuttur. “*The Yellow Emperor’s Classic of Internal Medicine*” isimli eski bir Çin yazıtında jeneralize nöbetlere ait bilgi bulunmaktadır (3).

MÖ 5. yüzyılda, Hipokrat, epilepsiye dair birçok tanımlamalar yaparak beynin bu hastalığın temel nedeni olduğuna dair tezini öne sürmektedir. Ayrıca kalıtımın da hastalıkta rol oynadığını belirtmektedir. Antik Yunanda, bu hastalığın kutsal bir hastalık olduğuna dair önceki yıllarda ortaya çıkan fikirlere şiddetle karşı çıkan Hipokrat, hastalığın bilimsel yöntemlerle tedavi edilmesine dair girişimlerde bulunmaktadır (3).

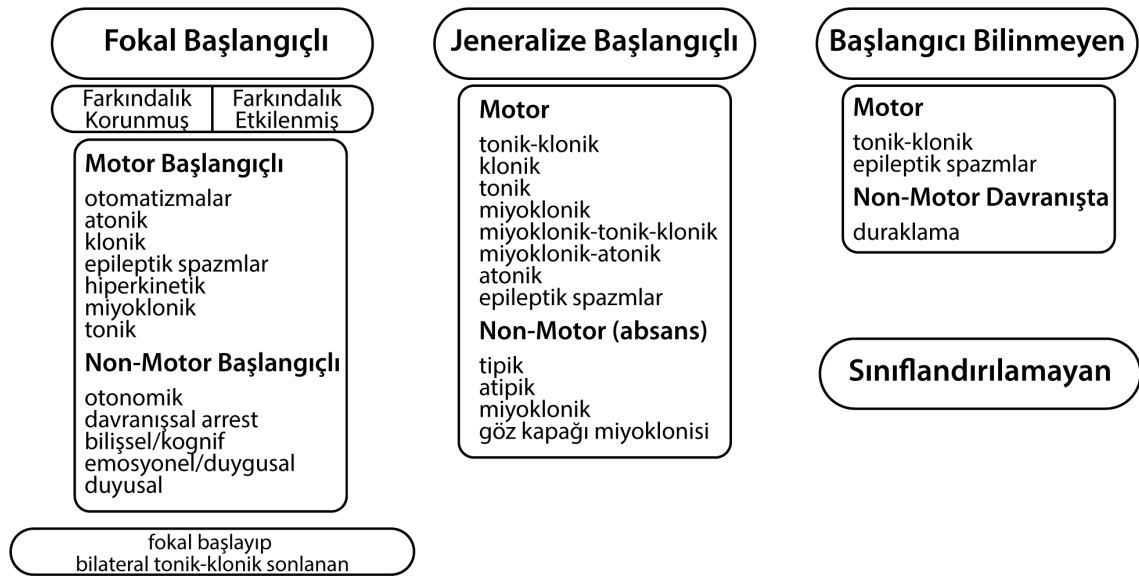
18. yüzyıla kadar birçok bilim insanının öne sürdükleri çeşitli savların ardından, Hipokrat’ın tanımlaması 18. yüzyıl itibariyle günümüze kadar genel kabul görmektedir. 18. yüzyıldan itibaren Samuel Tissot, William Cullen, J.G.F. Maisonneuve, Robert Bentley Todd, Hans Berger, William Gordon Lennox gibi birçok hekim tarafından yazılan yayınlar ile epilepsi gündemde tutulmaktadır (3).

Günümüzde, International League Against Epilepsy (ILAE) tarafından en son 2014 yılında yayınlanan yayın ile epilepsi “Epileptik nöbet geçirmeye kalıcı yatkınlığın bulunduğu ve epileptik nöbetlerin nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize edilen bir beyin hastalığı” olarak tanımlanmıştır (6). Ayrıca, 2017 yılında yayınlanan yayınlar ile epilepsinin ve nöbet tiplerinin sınıflandırması yapılmıştır (7,8).

2.1.2. Sınıflandırma ve Nöbet Tipleri

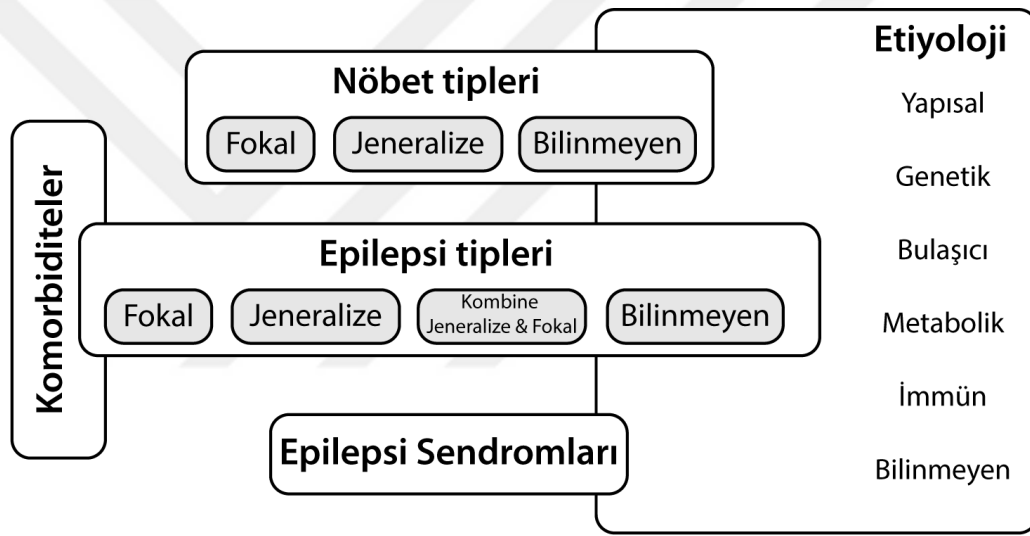
ILAE (*International League Against Epilepsy*) tarafından ilk 1969 yılında bir makalede epilepsi ile ilgili sınıflandırma şeması yayınlanmıştır. Ardından, yayınlanmış olan bu makalenin 1981 yılında nöbetler için (9), 1989 yılında da epilepsi için son revizyonu literatüre kazandırılmıştır (10). Bu makalelerde, nöbet tipleri, ‘parsiyel (fokal)’, ‘jeneralize’, ve ‘sınıflandırılmayan’ epileptik nöbetler olarak üç ana kategoride; epilepsi ve sendromları, ‘lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel)’, ‘jeneralize’, ‘fokal veya jeneralize olup olmadığı belirlenemeyen’ ve ‘özel’ epilepsiler ve sendromlar şeklinde dört ana başlık altında sınıflandırılmıştır.

Fisher ve ark. tarafından nöbet tiplerinin sınıflandırılmasına dair 2017 yılında yayınlanmış olan makalede, ILAE tarafından 1981’de yayınlanmış makaleyi ve 2010 yılında düzenlenmiş ILAE raporlarını temel alarak hem terminolojik hem de yeni nöbet tiplerini sınıflandırma adına yenilikler sunulmaktadır. Fokal başlangıçlı, jeneralize başlangıçlı ve başlangıcı bilinmeyen olarak 3 ana başlık altında sınıflandırılan nöbet tiplerinin detaylı sınıflandırma şeması **Şekil 2-1**’de gösterilmiştir (8).



Şekil 2-1: Nöbet tiplerinin detaylı sınıflandırılması.

2017 yılında Scheffer ve ark. tarafından yayınlanmış ve halen güncelliğini koruyan epilepsinin sınıflandırılmasına ait makale, 2013 yılına ait uluslararası epilepsi topluluklarından elde edilen geri bildirimleri içeren bir taslak belgeye temellendirilmiştir. Bu makalede epilepsi tipleri ‘fokal’, ‘jeneralize’, ‘kombine jeneralize ve fokal’ ve bilinmeyen olarak dört ana başlık altında toplanmıştır. Scheffer ve ark. yayınlamış oldukları makalede, elde edilecek klinik bulguların değerlendirilmesi ile gözlemlenen epilepsiyi sınıflandıracak ve ayrıca tanı koymaya yardımcı olacak bir iş şeması sunmaktadırlar (Şekil 2-2). Bununla beraber, yayınlanan makalede epilepsi etyolojisine dair de düzenlemeler mevcuttur (7).



Şekil 2-2: Epilepsi tiplerinin sınıflandırılmasına yardımcı iş şeması.

Jeneralize epilepsiler, beynin tamamının etkilenmesi sonucunda ortaya çıkan nöbetlere (absans, miyoklonik, atonik, tonik, tonik-klonik) bağlı epilepsilerin sınıflandırıldığı bir epilepsi tipidir. Fokal epilepsiler, beynin bir bölgesi ile sınırlı kalarak ortaya çıkan nöbetler (*focal aware seizures*, *focal impaired awareness seizures*, *focal motor seizures*, *focal non-motor seizures*, and *focal to bilateral tonic-clonic seizures*) sonucu gözlemlenmektedir. Kombine jeneralize ve fokal epilepsiler, hem jeneralize epilepsilerin hem de fokal epilepsilerin elektroensefalografi (EEG) bulgularında görülen farklı dalgaların ikisinin de görüldüğü Dravet sendromu ve Lennox-Gastaut sendromu gibi hastalıkları içeren bir tiptir (7).

2.1.3. Sıcak Su Epilepsisi

Sıcak su epilepsisi, tüm epilepsiler içerisinde yaklaşık %4-7 arasında prevalansa sahip refleks epilepsilerinden biridir (11). Refleks epilepsiler, dış uyarcılar tarafından tetiklenerek ortaya çıkan nöbet tiplerini kapsamaktadır (2). Sıcak su epilepsisi, sıcak su ile temasta (genellikle banyoda) nöbet görülmesi ile karakterizedir (12). Ancak, uyarının kişiden kişiye farklılık göstermesiyle beraber soğuk su ile temaslarda veya yağmur suyunun vücuda değmesiyle de nöbetler tetiklenebilmektedir (11).

İlk sıcak su epilepsisi vakası 1945 yılında Yeni Zelanda’da tespit edilmiştir. Bu vakayı takiben Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Birleşik Krallık, Japonya Hindistan ve Türkiye’den de olgu sunumları yapılmıştır (13). Şu ana kadarki en büyük çalışma 279 vaka içeren Satishchandra ve ark. tarafından Güney Hindistan bölgesinde yapılmıştır (14).

Ülkemizde 1992 yılında 10 hastalık bir grubun klinik ve EEG bulgularını içeren ilk olgu sunumu gerçekleştirilmiştir (15). Ardından, 2001 yılında 21 vakaya dair klinik ve EEG bulgularının sunulduğu farklı bir çalışma gerçekleştirilmiştir (16). Ülkemizdeki en yüksek olgulu vaka sunumunda, 31 erkek ve 19 kadın olmak üzere toplam 50 hastanın 15 yıllık takibi yapılmıştır ve sonucunda vakaların dörtte üçünün iyi prognoza geriye kalanların kronik epilepsiye sahip olduğu belirtilmiştir (17).

Sıcak su epilepsisi ile ilgili ilk genetik çalışma 2009 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada genom çapında bağlantı analizi yapılarak kromozom 10’un q21.3-q22.3 bölgesinin hastalık ile ilişkili olacağı öne sürülmüştür (18). 2017 yılında yapılan bir çalışmada ise genom çapında bağlantı analizi ve tüm ekzom dizileme yöntemleri birlikte kullanılmıştır ve *SLC1A1* geninde üç nadir varyant tespit etmişlerdir (19). 2021 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada ise tüm ekzom dizileme analizi ve kromozomal mikroarray analizi yapılmıştır ve sonucunda *POGZ* ve *TBCE* genlerinde varyant tespit edilmiştir (20). Diğer yapılan çalışmalar Tablo 2-1’de detaylarıyla gösterilmiştir. (18–26)

Tablo 2-1. SSE ile ilgili yapılan genetik çalışmalar ve çalışmalardaki kohort, yöntem ve bulgu bilgileri.

Makale	Kohort	Yöntem	Bulgu
Ratnapriya R. ve ark, 2009 ⁽¹⁸⁾	6 bağımsız aile	Genom çapında bağlantı analizi	10q21.3-q22.3 bölgesi hastalık ile ilişkili tespit edilmiş
Ratnapriya R. ve ark, 2009 ⁽²¹⁾	10 bireyi etkilenmiş dört nesilli bir aile	Genom çapında bağlantı analizi	4q24-q28 bölgesi hastalık ile ilişkili tespit edilmiş
Sirsi D. ve ark, 2017 ⁽²⁵⁾	1 hasta birey	Gen panel testi	<i>SYN1</i> geninde varyant tespit edilmiş
Karan K. ve ark, 2017 ⁽¹⁹⁾	Bağımsız 98 ailenin probandları	Bağlantı analizi ve WES	<i>SLC1A1</i> geninde üç nadir varyant tespit edilmiş
Peron A. ve ark, 2018 ⁽²³⁾	Aynı ailedeki 4 birey	WES	<i>SYN1</i> geninde bir varyant, etkilenmiş iki bireyde ve bir taşıyıcı bireyde tespit edilmiş
Karan K. ve ark, 2018 ⁽²⁴⁾	7 bireyi etkilenmiş üç nesilli bir aile	Genom çapında bağlantı analizi	9p24.3-p23 bölgesi hastalık ile ilişkili tespit edilmiş
Accogli A. ve ark, 2021 ⁽²²⁾	10 farklı aileden toplamda 12 hasta birey	Sanger dizileme	<i>SYN1</i> geninde sekiz patojenik varyant ve iki VUS varyant tespit edilmiş
Türey S. ve ark, 2021 ⁽²⁰⁾	5 hasta birey	WES ve kromozomal mikroarray analizi	<i>POGZ</i> ve <i>TBCE</i> genlerinde birer varyant tespit edilmiş
Krygier M. ve ark, 2022 ⁽²⁶⁾	5 yaşında bir birey	WES	<i>CACNA1A</i> geninde varyant tespit edilmiş

2.1.4. Epi25 Çalışması

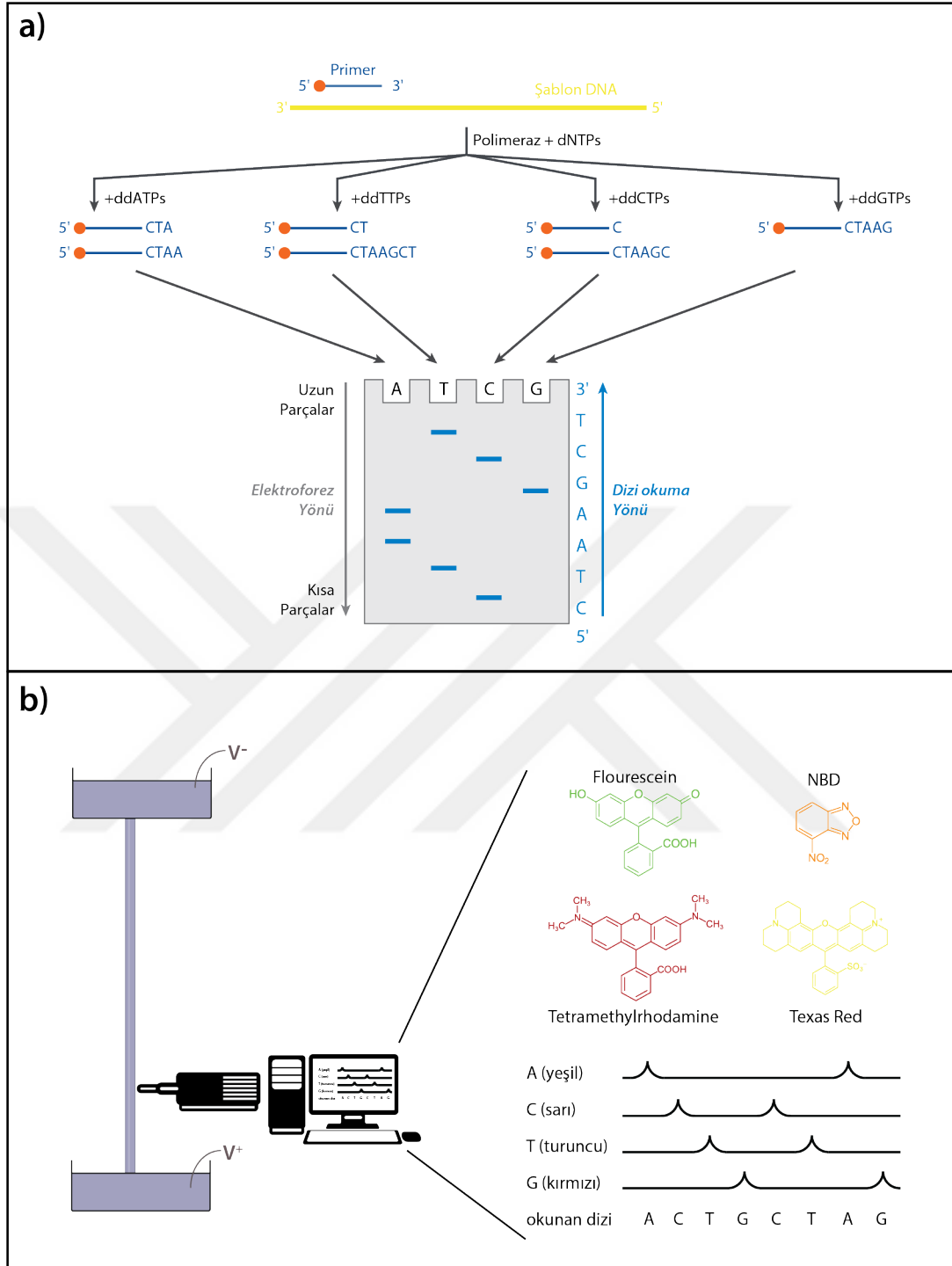
Epi25 konsorsiyumu tarafından, 37 araştırma merkezinden 200'den fazla araştırmacının katılımıyla, yaklaşık 18.000 hasta örneğinin ekzom dizilemesi gerçekleştirilerek epilepside geniş ölçekli tüm ekzom dizileme çalışması yapılmıştır. Bu geniş kapsamlı çalışmada, nadir genetik varyasyonların hastalık üzerindeki rolünün belirlenmesi ve ilgili genlerin hastalığın şiddetiyle ilgisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, örnekler şiddetli gelişimsel ve epileptik ensefalopatiler (DEE'ler), genetik jeneralize epilepsi (GGE) ve edinsel olmayan fokal epilepsi (NAFE) olarak üç fenotipik grupta incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda her üç grupta GABA reseptör genlerinde yanlış anlamlı varyantlar gözlemlenmiştir. Buna karşın, eksitator reseptör genlerinde herhangi bir varyant kümelenmesi gözlemlenmemiştir. Ayrıca, DEE'ler ve GGE gruplarının GABAerjik yolda görevli büyük gen kümelerinde önemli mutasyon birikimi tespit edilmiştir. GGE ve NAFE gruplarının ekzom çapında incelenmesi sonucunda anlamlılık derecesini aşan bir gen bulunmamasına karşın *CACNA1G*, *EEF1A2*, *GABRG2*, *LGII* ve *TRIM3* genlerinin hastalık ile ilişkili olabileceğine değinilmiştir (27). Türkiye'den 203 adet örnek bu çalışmaya dahil edilmiştir ancak varyasyon dağılımındaki farklılıklar nedeni ile Avrupalı olmayan ülkeler (Amerika, Japonya, Kanada, Hong Kong, Yeni Zelanda), İsveç, Finlandiya ve Kıbrıs örnekleri ile beraber analiz dışı tutulmuştur (27).

2.2. DNA Dizileme

1953 yılında, biyolojik bilimlerde yeni bir çağ başlatacak olan, James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin öncülüğünde bir keşif gerçekleşti. Artık, DNA'nın yapısı bilinmektedir ve Crick'in de ifade ettiği gibi yaşamın gizemi keşfedilmiştir. Bu keşfin ardından birçok yaklaşım ve yöntem üretilmiştir. En önemlilerden biri de DNA zincirlerini okumamızı sağlayan, Frederick Sanger ve ark. tarafından geliştirilen Sanger dizileme yöntemidir (28).

1977 yılında temelleri atılan ve 1986 yılında Smith ve ark. tarafından otomatize hale getirilerek geliştirilen bu yöntem birinci-jenerasyon dizileme yöntemi olarak ifade edilmektedir (29). Sanger dizilemenin çalışma prensibinin temelinde, DNA'nın yapısında bulunan deoksiriboz şekerinin farklı formunun kullanılması yer alır. Deoksiriboz şekeri, üçüncü karbonunda bulunan hidroksil grubu sayesinde başka bir nükleotiddeki fosfat atomuna bağlanarak DNA zincirinin uzamasını sağlar. Sanger dizilemede, yapısında

üçüncü karbondaki oksijen atomu uzaklaştırılmış dideoksiriboz şekeri bulunan dideoksinükleotit-trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak DNA zincirinin uzamasının önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Deney tasarımı dizilenecek örnek, 4 ayrı tüp içerisinde, normal PCR materyallerine ek her bir tüp bir ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP veya ddGTP) tipini içerecek şekilde, çoğaltılmaktadır. Böylece, PCR sonucunda rastgele uzunluklarda oluşacak DNA ürünleri yan yana jel elektroforezinde yürütülerek uzunluklarına göre sıralanacaktır. Okuma işlemi, jelde en alttan başlanarak bantlar hangi ddNTP içeren tüp hizasındaysa ilgili dizi o olacak şekilde not edilerek DNA dizileme işlemi gerçekleştirilmiş olacaktır (**Şekil 2-3a**) (28). Smith ve ark. geliştirdiği yöntemle, dört baz tipi için farklı dalga boylarında ışığa veren dört farklı florofor bağlı ddNTPler kullanılmaktadır. PCR işleminin ardından, poliakrilamid jel kolonundan çoğaltılan örnek yürütülerek lazer sayesinde gerçek zamanlı olarak okuma işlemi gerçekleştirilip bilgisayarlar tarafından kaydedilmektedir (**Şekil 2-3b**) (30). Sanger dizilemenin hem yüksek maliyeti hem de yüksek zaman ihtiyacı bu teknolojinin geliştirilmesi gerektiğini gözler önüne sermekteydi.



Şekil 2-3: Sanger dizilemenin prensibi. a) 1977 yılında Sanger ve ark. tarafından yapılan dizileme metodu. **b)** 1986 yılında Smith ve ark. tarafından geliştirilen yöntem.

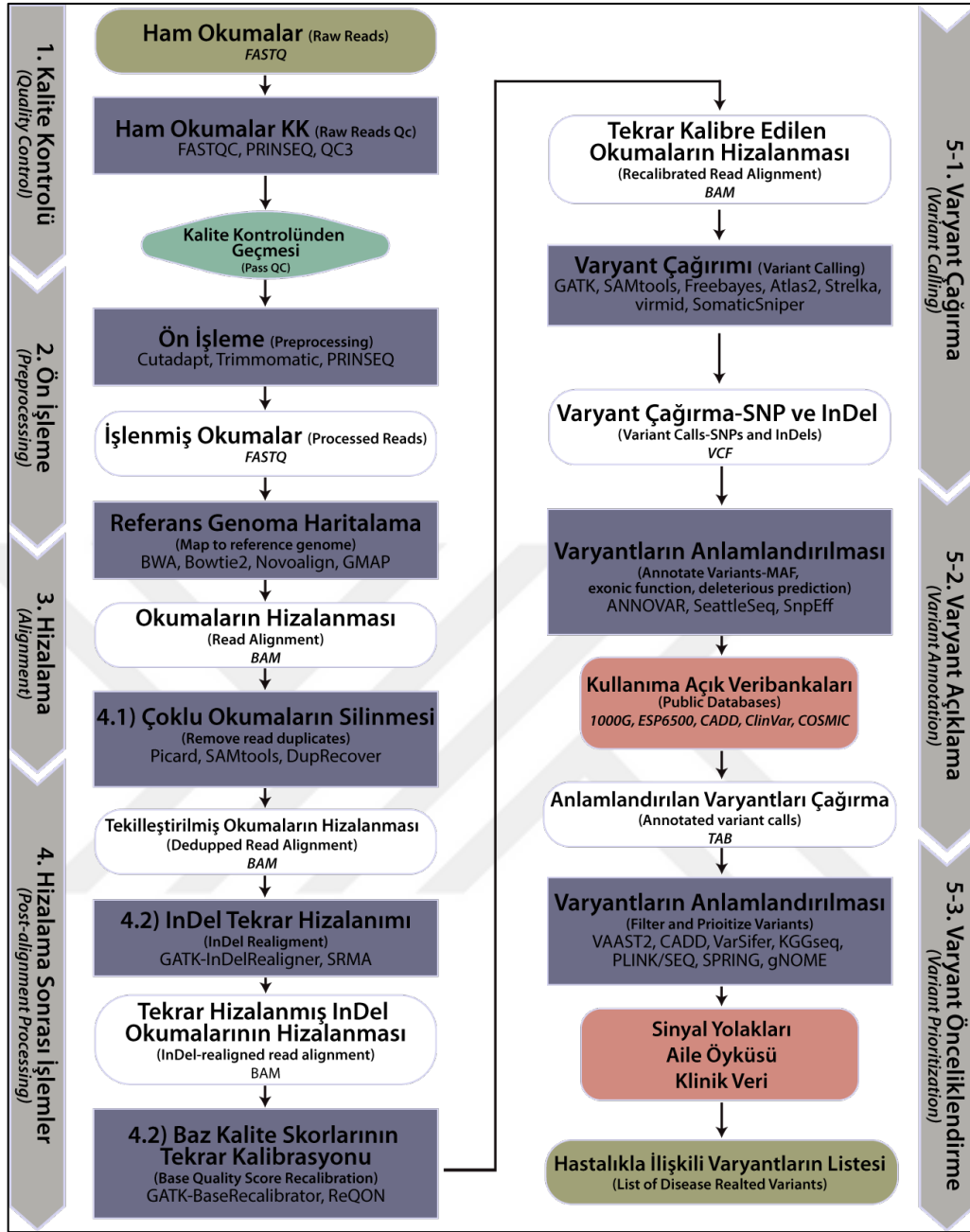
2005’li yıllarda Shendure ve ark. tarafından yapılan çalışma ile yeni nesil dizileme yönteminin temeli oluşturulmuştur. Yapılan çalışmada bakteriyel genom milyonlarca parçalar halinde eş zamanlı olarak dizilenmiştir (31). Sanger dizilemeye göre düşük

maliyetli olması, çok daha kısa sürede genom ölçekli dizilemenin gerçekleştirilmesi nedeniyle bu yöntem ticarileşmiş ve kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (32).

Yeni nesil dizileme yöntemlerinde, kısa-okuma dizilemesi olarak adlandırılan ikinci nesil dizileme ve uzun-okuma dizilemesi olarak adlandırılan üçüncü nesil dizileme yöntemleri olarak iki teknoloji bulunmaktadır. Uzun-okuma yöntemi, minimum 10 kilobaz olacak şekilde megabazlara çıkan okuma aralığına sahiptir. Böylece genomik DNA'da tekrarlı bölgelerin okunmasını sağlamıştır (33). Ancak, kısa-okuma yöntemi, kısa diziler halinde okumasına rağmen daha uygun maliyette olması, doğruluğuna dair olan güven ve çeşitli analiz araçlarının bulunması açısından günümüzde daha avantajlı durumdadır (34). Her iki yaklaşımda da örneklerin hazırlanması, DNA dizilemesi ve veri analizi olarak üç ana işlem vardır.

Kısa-okuma teknolojisinin örnek hazırlanması işleminde ilk olarak, DNA belirli boyutlar halinde parçalara ayrıştırılır. Ardından, DNA parçalarının her iki ucuna adaptör bölgelerinin ligasyonu ve oluşturulan DNA parçalarının katı yüzeye bağlanması sağlanır. Son olarak, amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir. Uzun-okuma teknolojisinde, dizileme işlemi orijinal DNA molekülü üzerinden sürdürüldüğü için amplifikasyon işlemine gerek duyulmamaktadır (35).

DNA dizileme aşamasında, her ticari marka kendi geliştirmiş olduğu farklı dizileme yöntemlerini kullanmaktadır. En yaygın kullanıma sahip olan Illumina sistemi, kısa-okuma dizilemesinde yaklaşık 200 baz çifti şablon DNA dizisi olan yaklaşık 450 baz çiftlik bir şablon DNA/adaptör kompleksinin dizilenmesini sağlamaktadır (**Şekil 2-4a**). DNA parçaları, kendilerine sonradan eklenen adaptör bölgeler sayesinde üzerinde milyonlarca adaptör bölgenin komplementer dizisi bulunan katı yüzeye tutturulur. Ardından köprü amplifikasyonu adı verilen yöntemle şablon DNA çoğaltılmaya başlanır (**Şekil 2-4b**). Çoğaltma aşamasında Illumina tarafından tasarlanan özel nükleotitler kullanılır. Bu nükleotidler, kendilerinin 3' bölgesindeki blok grubun ve floresan grubun uzaklaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Böylece her bir döngüde, üzerinde binlerce DNA parçası bulunan katı yüzeye sırasıyla, nükleotid eklenmesi, eklenen nükleotidin bilgisayara kaydedilmesi ve yıkama yaparak floresan grubun ve blok molekülün uzaklaştırılması aşamaları yapılarak dizileme işlemi gerçekleştirilir (**Şekil 2-4c**). Böylece sıralı bir şekilde çoklu paralel dizileme yapılır (35–37).



Şekil 2-5: Tüm ekzom verisinin analiz süreci. Figür, PMID numarası 19997069 olan makaleden Türkçeleştirilmiştir.

Kalite kontrolü işleminde, ham okumaları içeren FASTQ formatındaki dosya *FastQC*, *PRINSEQ* ve *QC3* gibi çeşitli yardımcı programlar ile işlenerek dizileme işleminin kalite ölçümü gerçekleştirilir. Kalite kontrolünü geçen veriler ön işleme tabi tutulur. Bu aşamada *Cutadapt*, *Trimmomatic*, *PRINSEQ* gibi yardımcı programlar ile gereksiz okumalar veya primerler ve adaptörler gibi istenmeyen dizilerin temizlenmesi işlemi sağlanır. Ardından, okunan dizilerin referans genoma hizalama işlemi yapılır. Bu aşamada Burrows-Wheeler Dönüşümü tekniği veya Smith-Waterman algoritması gibi

yöntemleri kullanan *BWA*, *Bowtie2*, *Novoalign*, *GMAP* gibi farklı yardımcı programlar ile hizalama işlemi gerçekleştirilir. Bu aşamada, ilgili nükleotid ve o nükleotidin baz kalite skorunu metin halinde içeren FASTQ dosyası farklı verileri de içinde barındıran BAM (*binary alignment map*) dosyasına dönüşür. Hizalama sonrası işlemlerde, varyant çağırma işleminin kalitesini etkileyebilecek kirlilikleri en aza indirebilmek için üç aşamalı bir prosedür uygulanır. İlk aşamada tekrarlanan okumaları kaldırmak için Picard, *SAMtools* veya *DupRecover* gibi yardımcı programlar kullanılır. İkinci aşamada, *GATK-InDelRealigner* veya *SRMA* yardımcı programı kullanılarak insersiyon-delesyon (*InDel*) mutasyonların yeniden hizalanması sağlanır. Son olarak, *GATK-BaseRecalibrator* veya *ReQON* yardımcı programı ile baz kalite skorlarının yeniden kalibrasyonu yapılır. Kalibre edilmiş skorlarla tekrar hizalama yapılır. Sonrasında, çeşitli yardımcı programlarla (*GATK*, *SAMtools*, *Freebayes*, *Atlas2*, *SomaticSniper*, vb.) varyant çağırma işlemi gerçekleştirilir. VCF dosyası içerisine kaydedilen çağırılmış varyantlar, *ANNOVAR*, *Snpeff* ve *SeattleSeq* gibi yardımcı programlar ile anlamlandırılır. Bu anlamlandırma sürecinde 1000G, CADD, ClinVar ve COSMID gibi çeşitli veri tabanları kullanılabilir. Anlamlandırma aşamasında, birçok veri tabanı Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) aracı sayesinde tek bir merkez üzerinden kolayca kullanılabilir (39). Anlamlandırılan varyantlar TAB formatı ile kaydedilir. Son olarak elde edilen bu dosya üzerinde çeşitli filtrelemeler ve önceliklendirmeler ile patojenik varyant adayları elde edilir. Bu varyantların, klinik veri ve literatür bilgisi ile değerlendirilerek hastalıkla ilişkili olup olmadıkları tespit edilir (38).

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), popülasyonda en az %1'lik bir frekansa sahip tek baz değişikliğinin gözlemlendiği lokusların genel adlandırılmasıdır (40). SNP array yöntemiyle tüm genom boyunca SNP taraması yapılabilir. Bu bağlamda, çeşitli markaların uyguladığı farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Yaygın kullanıma sahip olanlardan birisi, Illumina platformunun geliştirmiş olduğu yöntemdir. Bu yöntemin temel prensibi, önceden tanımlı SNP bölgesi ve bitişiğindeki 50 bazlık dizinin komplementer olarak bağlı olduğu boncukların belirli lokasyonlara yerleştirilmesiyle oluşturulan çipe önce örneklerin bağlanması sağlanır. Ardından, çift renkli (ddATP ve ddUTP kırmızı, ddCTP ve ddGTP yeşil olarak) antikor boyaması işlemi gerçekleştirilir. Boyama sonrası chipin görüntüsü elde edilir. Görüntüde kırmızı veya yeşil okunan bölgeler homozigot (AA veya BB), aynı boncuktan iki renk sinyalinin de alınması sonucu sarı olarak okunan bölgeler heterozigot (AB) olarak tespit edilir (41). Verinin analizi için,

Illumina'nın geliştirmiş olduğu GenomeStudio veya çeşitli analizler için farklı programlar kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda genel olarak bakılan B alel frekansı (BAF, *B-allele frequency*) ve Log R Kesiri (LRR, *Log R Ratio*) değeri verinin analizi için kritik öneme sahiptir. LRR değeri, tek bir SNP için her iki allelede ölçülen toplam sinyalin normalize edilmiş halidir. BAF değeri, allelerin yoğun oranlarının normalize edilmiş halidir (42).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Kapsamında İncelenen Bireyler

Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi (İÜ) Nöroloji Anabilim Dalı tarafından klinik bulguları incelenip Sıcak Su Epilepsisi teşhisi koyulan ve akraba ilişkisi bulunmayan 10 bağımsız birey dahil edilmiştir. Hasta bireylerin örnekleri, ilk olarak İÜ İstanbul Tıp Fakültesi (İTF) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23.05.2016 tarih ve 2016/606 dosya numarası ile alınmış ve 08.05.2019 tarihinde güncellenmiş 'Epilepsinin Genetik Temellerinin Araştırılması: NIH destekli EPI25 Çalışması' başlıklı çalışma kapsamında alınan etik kurul onayı doğrultusunda toplanmıştır. Bu tez kapsamında, İÜ-İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınmış 2021/1639 numaralı etik kurul onayı ve Helsinki Deklarasyonu prensipleri doğrultusunda çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan hasta verileri Epi25 konsorsiyumu tarafından elde edilmiştir ancak konsorsiyum tarafından gerçekleştirilen çalışmaya belirli filtrelemelerden ötürü bu veriler dahil edilmemiştir (27).

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan cihazlar Tablo 3-1'de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Cihaz Adı	Kullanım
Spektrofotometre/Nanodrop ND-1000	DNA örneğinin konsantrasyon ölçümü için kullanılmıştır.
Vorteks	Örnek karıştırmak için kullanılmıştır.
Masaüstü Santrifüj	Örnek çöktürme işlemi için kullanılmıştır.
BioRad MyCycler	PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek için kullanılmıştır.
Elektroforez aparatları (BioRad)	PCR'da çoğaltılan DNA örneği baz uzunluğuna göre sıralamak için kullanılmıştır.
Bilgisayarlı jel görüntüleme sistemi	Elektroforezde yürütülen örneğin görsel incelemesini sağlamak için kullanılmıştır.
-20°C derin dondurucu	Hasta numunelerinin ve diğer kit ekipmanlarının muhafazası için kullanılmıştır.
İş İstasyonu	<i>In-silico</i> işlemleri gerçekleştirmek için kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Çalışma kapsamında kullanılan kitler Tablo 3-2’de listelenmiştir.

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmaları.

Kit Adı	Üretici Firma
highQu 2X ALLin™ Red Taq Mastermix	Attogene
100 bp DNA ladder (The FastGene®)	Nippon Genetics

3.1.4. Çalışma Kapsamında Hizmet Alınan Firmalar

Çalışma süresince ihtiyaç duyulması dahilinde hizmet alımı gerçekleştirilen firmalar Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Hizmet alımı gerçekleştirilen firmalar.

Firma	Alınan Hizmet
MacroGen Inc.	Sanger Dizileme
Sentromer	Primer Sentezi

3.1.5. Çalışmada Kullanılan İnternet Siteleri ve Veri Tabanları

Çalışma boyunca kullanılmış olan interaktif internet siteleri ve veri tabanları Tablo 3-4’de listelenmiştir.

Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan internet siteleri.

Genomik Dizi Veritabanları	
Ensembl veritabanı	http://www.ensembl.org/
NCBI veritabanı	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/
UCSC veritabanı	http://genome.ucsc.edu/
Fenotip Veritabanları	
ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Online Mendelian Inheritance in Man	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/
DECIPHER	https://www.deciphergenomics.org/
DisGeNET	https://www.disgenet.org/
Diğer	
Mutalyzer	https://mutalyzer.nl/
Ensembl/BioMart	http://www.ensembl.org/biomart/martview
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/
Oligonucleotides Properties Calculator	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
Primer3Plus	https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi
UCSC/ In-Silico PCR	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr
UCSC/BLAT	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
IDT/OligoAnalyzer	https://eu.idtdna.com/calc/analyzer
Sequence Manipulation Suite (SMS): PCR Primer Stats	https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html
ThermoFisher Multiple Primer Analyzer	https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html
ConsensusPathDB	http://cpdb.molgen.mpg.de
STRING Protein- Protein Interaction Networks	http://string-db.org
Epi25 Browser	https://epi25.broadinstitute.org
InterVar	https://wintervar.wglab.org
VarSome	https://varsome.com
Ensembl/Variant Effect Predictor (VEP) aracında kullanılan veritabanları	
1000 Genomes Project	http://www.1000genomes.org/
gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org
Polymorphism Pheotyping (PolyPhen-2)	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
SIFT	http://sift.jcvi.org/
spliceAI	https://github.com/Illumina/SpliceAI

3.1.6. Çalışmada Kullanılan Analiz Programları

Çalışmada, *in-silico* analiz sürecinde kullanılmış olan programlar Tablo 3-5’de gösterilmiştir.

Tablo 3-5: *In-silico* analiz programları

Program	Kullanım
FastQC	Ekzom dizileme verisinin kalite kontrolünü sağlamak için kullanılmıştır.
Samtools	CRAM uzantılı dosyalar üzerinde çeşitli işlemler yapmak için kullanılmıştır. (CRAM uzantılı dosyaları BAM uzantılı dosyalara dönüştürmek, kapsam derinliğini (<i>Depth of coverage</i>) hesaplamak, vb.)
Bcftools	Bam uzantılı dosyalardan varyant çağırma işlemini gerçekleştirmek için kullanılmıştır.
IGV	Tespit edilen varyantların tüm ekzom verisi üzerinde görsel olarak incelemek için kullanılmıştır.
Python 3.10	Analize yardımcı olacak programlar yazmak için kullanılmıştır.
CLC Main Workbench	Sanger dizilemesi gerçekleştirilen örneğin sonuçlarını görsel olarak inceleyebilmek için kullanılmıştır.
GenomeStudio 2.0	SNP array verisinin analizi için kullanılmıştır.
cnvPartition v3-2-0	GenomeStudio eklentisi olan bu program CNV analizi için kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer Dizaynı

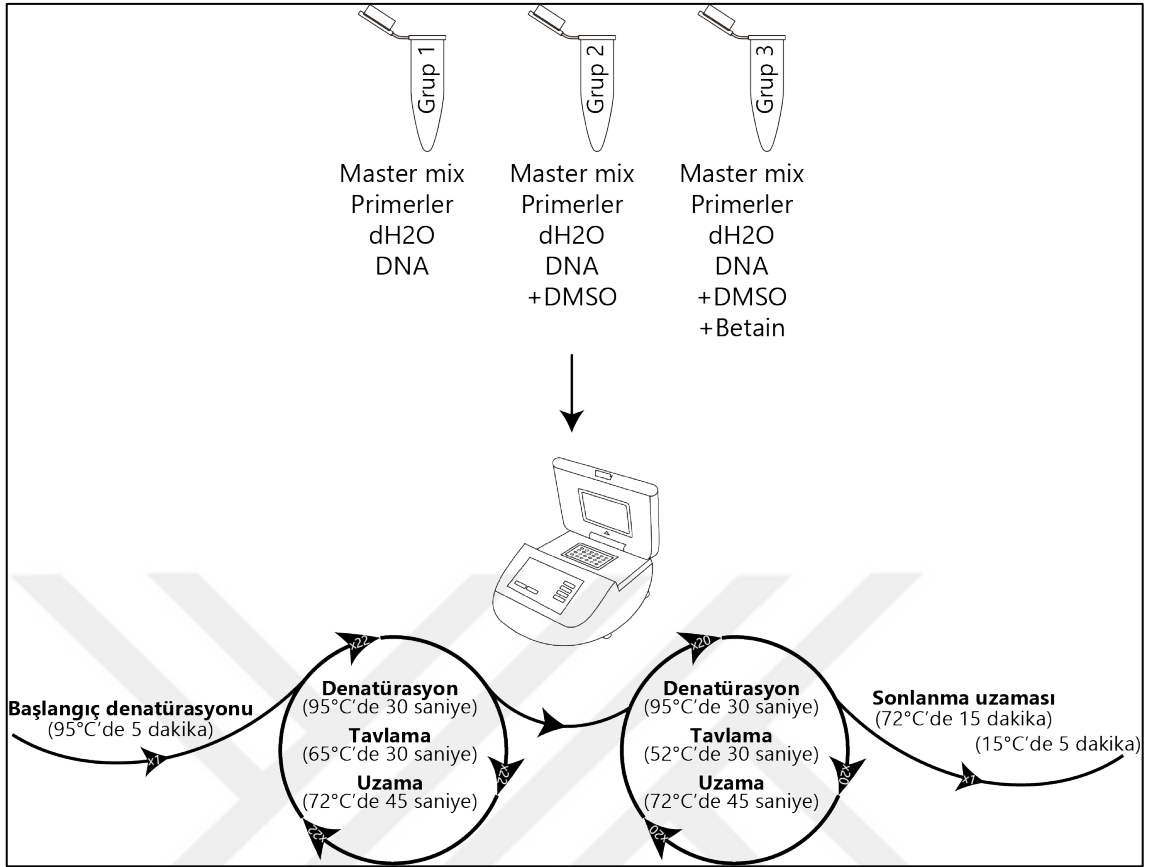
In-silico veri analizi sonrası tespit edilen varyant adaylarının ikincil bir kontrolü sağlanması amacıyla Sanger dizileme işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu süreç, ilk olarak ilgili varyant adayı bölgenin özel tasarlanmış primerlerle çoğaltılma işlemini gerektirir. Primer tasarımı için ilk olarak, Ensembl veri tabanından, ilgili genin ilgili varyantı içeren baz dizisi elde edildi. Elde edilen baz dizisi kullanılarak *Primer3Plus* websitesinde primer tasarım işlemi gerçekleştirildi. Primer adayları çeşitli kalite kontrolü işlemine tabi tutuldu. İlk olarak UCSC'nin kullanıma sunmuş olduğu *In-Silico PCR* ve *BLAT* araçları ile primer adaylarının genomda hangi bölgelere bağlanabileceği, bağlandıkları bölgenin sadece istediğimiz yer olup olmadığı kontrol edildi. Bu kontrolü geçen primer adaylarının, IDT'nin *OligoAnalyzer* aracıyla GC miktarına, erime sıcaklığına, self-dimer, hetero-dimer ve hairpin yapısı oluşturup oluşturmadığına bakıldı. Bu aşamayı da geçen primer adayları, son kontroller olarak hem ThermoFisher'ın *Multiple Primer Analyzer* hem de SMS'nin *PCR Primer Stats* aracı kullanılarak, yapısal etkileşim yapıp yapmadıklarına tekrar bakıldı. Bütün aşamalardan olumlu sonuçlarla geçer primer adayları kullanım için olur aldı (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: Çalışmada kullanılan primerler.

Gen Adı	Forward Primer (5'den 3'e)	Reverse Primer (5'den 3'e)	Ürün Boyutu (bp)
Vaka 6 SCN2A	CTAAATATGAGGTGCTGAG	CCTAGAAGACATTTAGTGACAG	420
Vaka 7 SCN9A	CAATGATCAGGCATTAGTAATTTGA	CCATAGATGTGGAAACTCAAGC	740
Vaka 8 SCN9A	GTTAGAAGGCACGAAAGATAAGTCC	CAATGCCAGAGCCAATTTCAATG	723

3.2.2. Kademeli Sıcaklık Düşürmeli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TD-PCR, Touchdown PCR)

Tüm ekzom analizi sonrası tespit edilen bazı varyanların doğrulamasını yapmak amacıyla Sanger dizilemeye gönderilmeden önce, varyantı içeren ilgili bölgenin çoğaltılması sağlamak amacıyla hasta DNA'sı kullanılarak Kademeli Sıcaklık Düşürmeli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TD-PCR) işlemi gerçekleştirildi. Bu yöntem kullanılarak primerlerin daha verimli çalışması sağlandı. DNA örneklerinin kalitesi ve konsantrasyonu, NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher) cihazında A260/280 (uygun aralık 1,8 - 2,0) ve A260/230 (uygun aralık 2,0 ve 2,2) absorbansları ölçülerek değerlendirildi. Her bir örnek için 3 ayrı reaksiyon grubu hazırlandı. Bunlar, standart PCR karışımı, DMSO eklenmiş, Betain (5M) ve DMSO eklenmiş gruplardır. Standart PCR karışımı, DNA örneği (50 ng/uL), primerler (her biri 10 mM), highQu 2X ALLin™ Red Taq Mastermix (Attogene) ve distile su (dH₂O) içermektedir. PCR reaksiyonu koşulları, başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika; 22 döngü boyunca denatürasyon 95°C'de 30 saniye, tavlama 65°C'de 30 saniye ve uzama 72°C'de 45 saniye; ardından 20 döngü boyunca denatürasyon 95°C'de 30 saniye, tavlama 52°C'de 30 saniye ve uzama 72°C'de 45 saniye; sonlanma uzaması 72°C'de 15 dakika ve 15°C'de 5 dakika olacak şekilde BioRad MyCycler cihazında TD-PCR işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3-1). Örnekler -20°C'lik dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 3-1: Kademeli Sıcaklık Düşürmeli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TD-PCR) grupları ve koşulları.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

TD-PCR'ın doğru çalıştığına ve istediğimiz bölgeyi çoğaltıp çoğaltamadığımıza karar vermek için örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. %2'lik agaroz jel içerisinde 25 dakika boyunca 120 Volt uygulanarak yürütme işlemi gerçekleştirildi. 100 bp DNA ladder (The FastGene®) kullanıldı. Yürütme işlemi sonrası görüntüleme cihazıyla görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

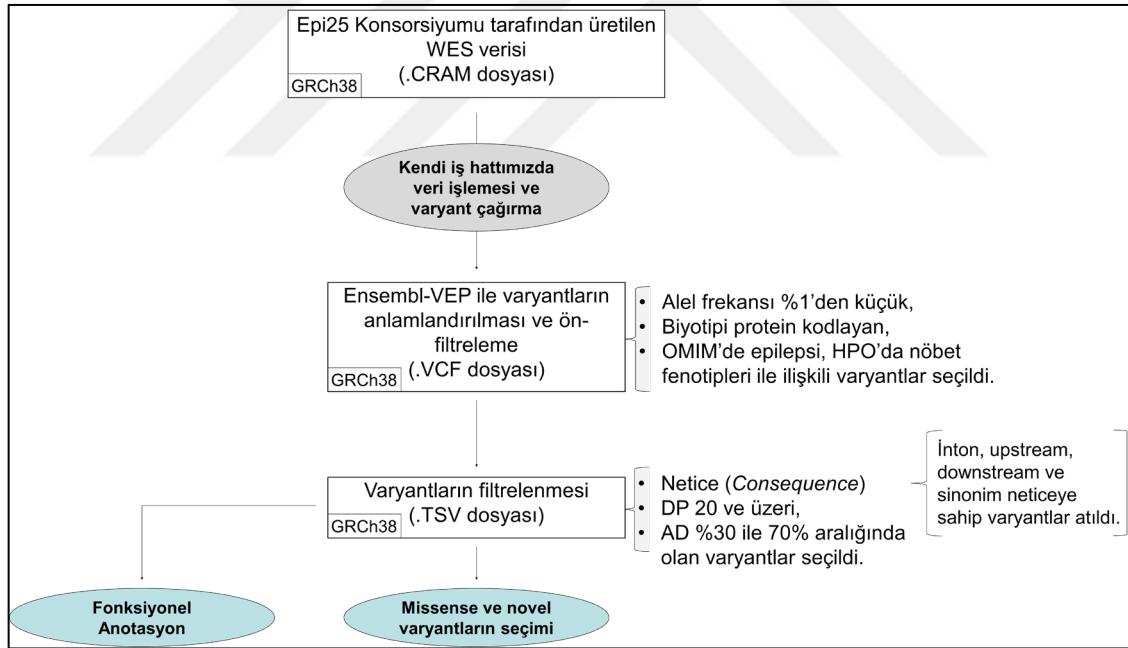
3.2.4. Sanger Dizileme

TD-PCR'dan elde edilen örnekler ve ilgili primerler Sanger dizileme için hizmet alınan firmaya gönderildi. Dizileme sonrası elde edilen sonuçları CLC Main Workbench programında incelendi.

3.2.5. Tüm Ekzom Dizileme Analizi

Çalışma kapsamında kullanılan örnekler, Epi25 konsorsiyumu tarafından tüm ekzom dizileme ve SNP array işlemine tabii tutuldu. Örneklerin dizileme işlemi 151bp'lik çift yönlü okuma yöntemiyle Illumina HiSeq X platformunda Massachusetts Teknoloji

Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Illumina Nextera Rapid Capture Exomes kiti ile ekzom yakalama işlemi gerçekleştirildi. Islak laboratuvar sonrası elde edilen ham veriler Picard aracı kullanılarak GRCh38 insan referans genomuna hizalanarak BAM/CRAM dosyalarına dönüştürüldü. Ardından, elde ettiğimiz CRAM dosyaları laboratuvarımızda geliştirdiğimiz iş hattımızdan geçirilerek işlendi. Ham veriler, bu işleme sürecinde çeşitli filtrelemelere tabii tutuldu. Bu filtrelemeler neticesinde yanlış anlamlı ve novel olan varyantlar tespit edildi. Ayrıca filtrelemeler sonrasında elde edilen varyantları içeren genler kullanılarak fonksiyonel anotasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonel anotasyon işlemi ConsensusPathDB internet sitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada, yolak temelli analizde KEGG ve Reactome veri tabanlarında en az girmiş olduğumuz gen listesinden ikisini içeren ve p değeri 0,01'den küçük olan sonuçlar seçildi. Gen ontoloji (GO) analizinde, GO seviyesi 2 olan biyolojik işlem, moleküler fonksiyon ve hücresel materyal kategorilerinde p değeri 0,01'den düşük olan değerler seçildi (Şekil 3-2).

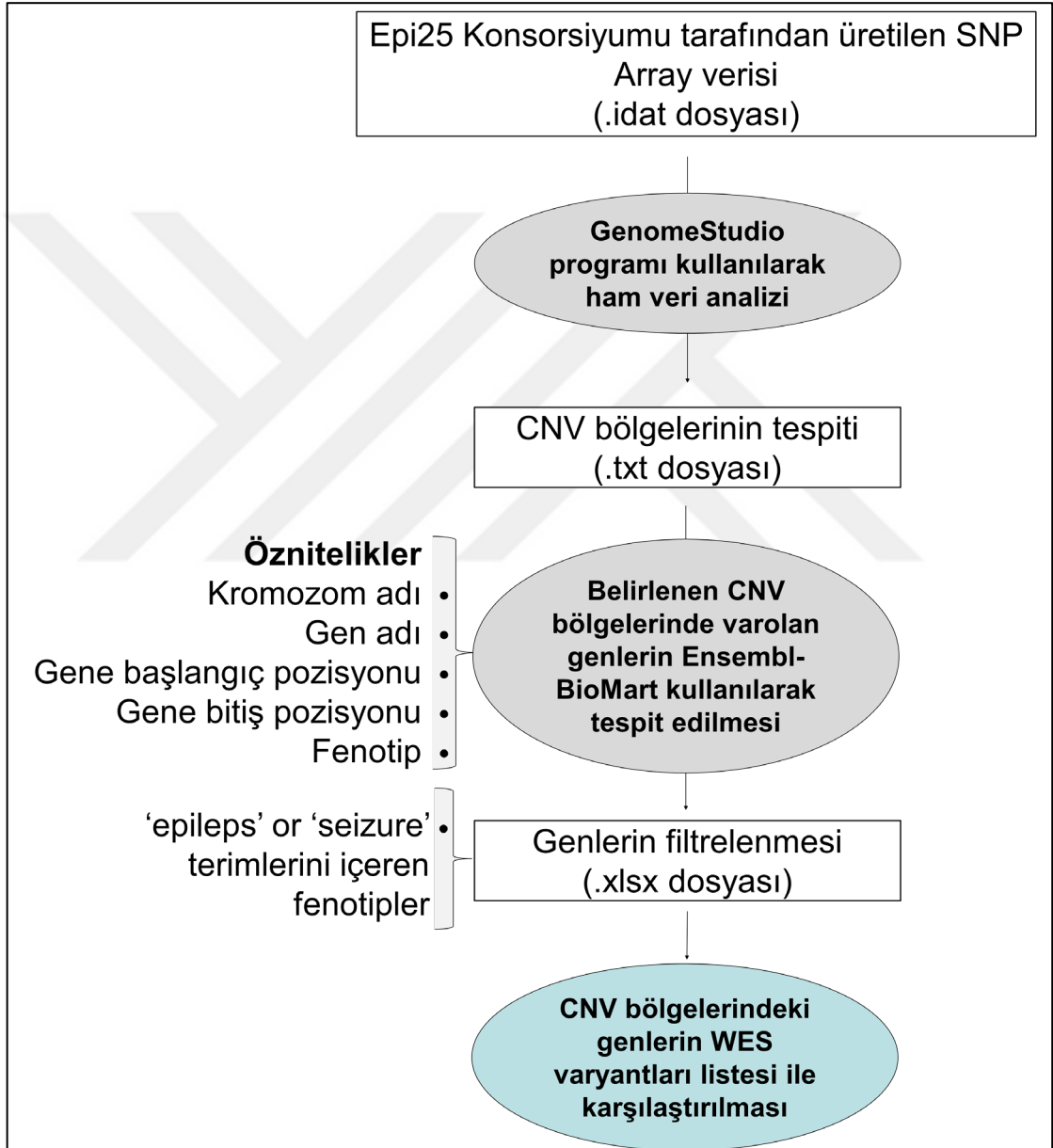


Şekil 3-2: Tüm Ekzom Dizileme analizi akış şeması. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, HPO: Human Phenotype Ontology, DP: Kapsama Derinliği, AD: Alel Derinliği.

3.2.6. CNV Analizi

Epi25 konsorsiyumu tarafından örneklerin tüm ekzom verisine ek olarak SNP array verisi de elde edildi. SNP array verisini elde edebilmek için Illumina Infinium Global Screening Array-24 kiti kullanıldı. Elde edilen ham veriler Illumina

GenomeStudio programı ile görselleştirilebilir ve analiz edilebilir hale getirildi. GenomeStudio programının bir eklentisi olan cnvPartition3.2.0 aracı ile CNV (Kopya Sayısı Değişiklikleri, *Copy Number Variation*) bölgeleri tespit edildi. Ardından, Ensembl/BioMart aracı kullanılarak CNV bölgelerindeki genler listelendi. CNV bölgelerinde bulunan genler ile varyant dosyasındaki genler karşılaştırıldı (Şekil 3-3). Bu sürece ek olarak, verilerin LRR ve BAF skorları da incelendi.



Şekil 3-3: CNV analizi akış şeması. WES: Tüm Ekzom Dizileme.

3.2.7. Cinsiyet Tahmini

Çalışmada, Samtools aracı kullanılarak WES verisinden X ve Y kromozomlarının *coverage* değerleri elde edilmiştir. GenomeStudio programının cinsiyet tahmin aracı ile SNP verisinden cinsiyet tahmini gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Varyantların Adlandırılması

Çalışmada, analizler ve adlandırmalar GRCh38 (hg38) insan referans genomu baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

Seçilen varyantların HGVS adlandırmaları Mutalyzer'da kontrol edilmiştir. Varyantların klinik değerlendirmesi, InterVar ve VarSome internet siteleri kullanılarak *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* standartları ve kılavuzuna göre yapılmıştır.

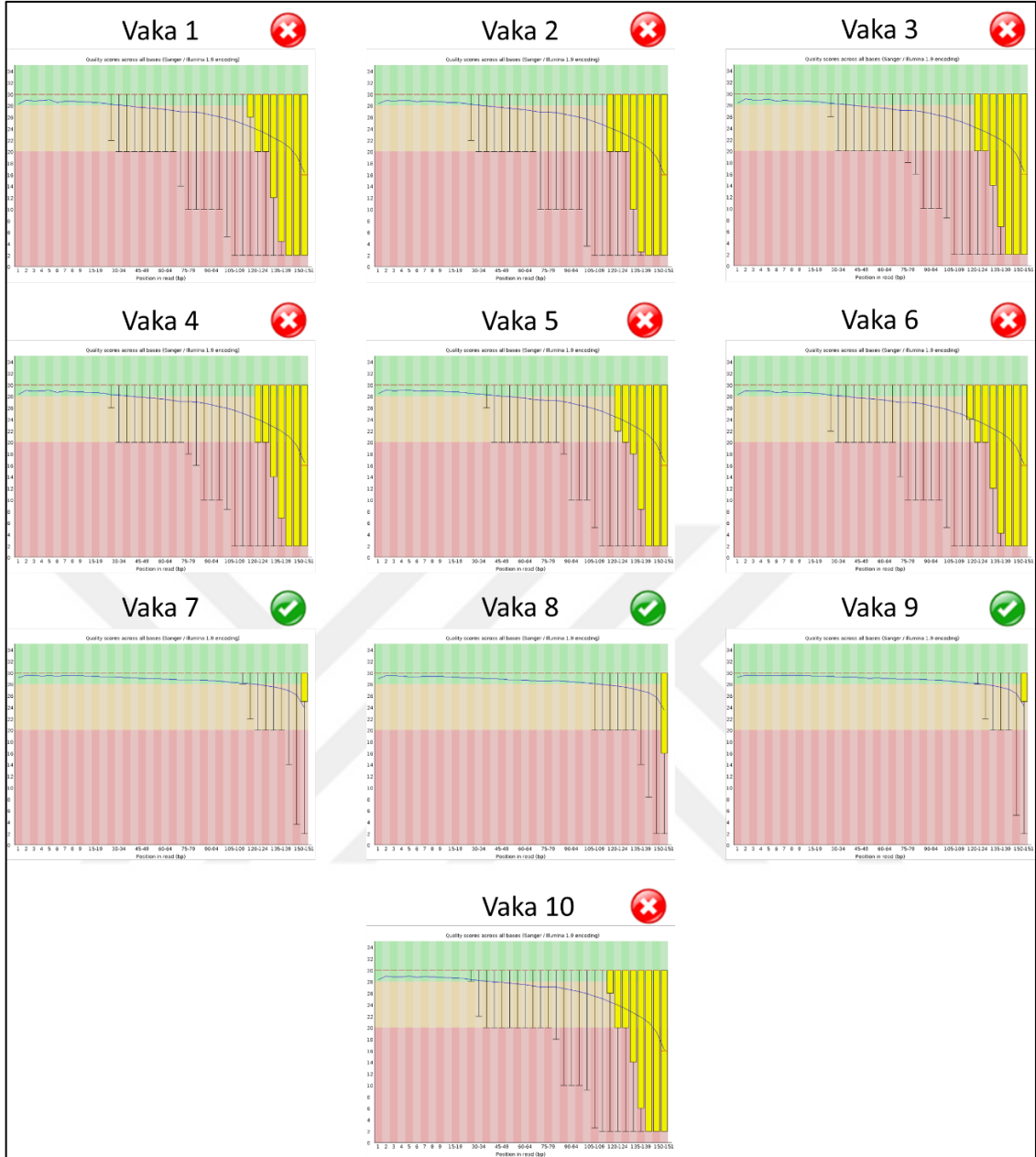
4. BULGULAR

Yapılan bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı tarafından Sıcak Su Epilepsisi (SSE) teşhisi koyulan 10 hasta bireye epi25 konsorsiyumu tarafından uygulanan tüm ekzom dizilemesi ve SNP array çıktıları kullanılmıştır. Çalışma kapsamında tüm ekzom dizileme çıktılarının analizi sonucu novel varyantlar tespit edilmiştir. Ayrıca, yine tüm ekzom dizileme verileri kullanılarak fonksiyonel anotasyon analizi yapılmıştır. SNP array verileri ile CNV analizi gerçekleştirilmiştir. CNV analizinin çıktıları ile tüm ekzom dizileme analizinin çıktıları karşılaştırılarak ilgili bölgelerdeki varyantlar incelenmiştir.

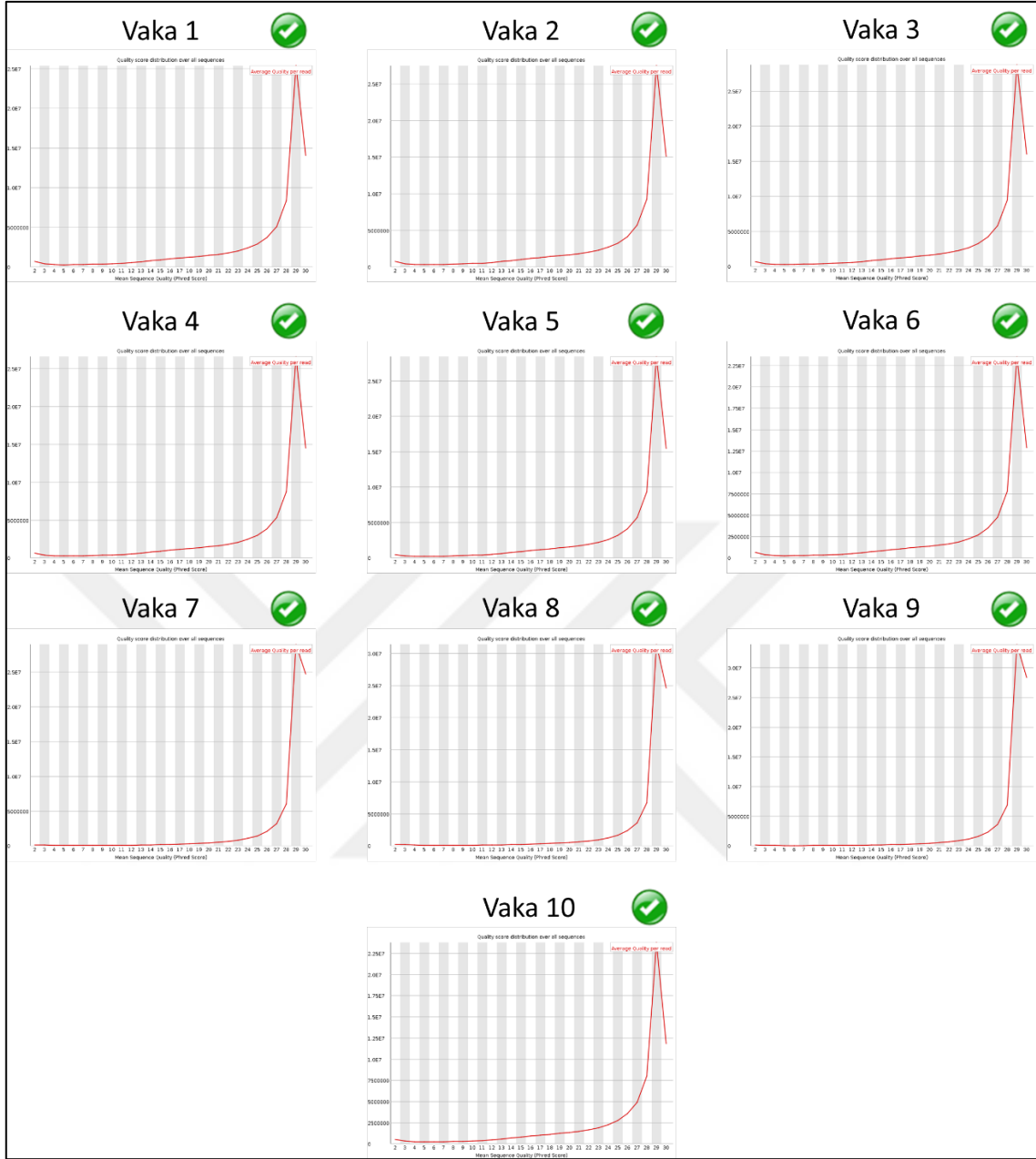
4.1. Tüm Ekzom Dizileme Analizi

4.1.1. Kalite Kontrolü Sonuçları

Epi25 konsorsiyumu tarafından gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme işleminin çıktıları FastQC aracı ile incelenmiştir. Şekil 4-1’de her bir hasta verisi için elde edilen baz başına dizileme kalitesi skorları gösterilmiştir. 7 hasta verisinde, 150 bp’lik okuma işleminin son 15 bazlık okumasında hata payının arttığını görmekteyiz. Bu hastaların ortalama dizileme kalitelerine baktığımızda (phred skorları) FastQC aracından olur aldığını görmekteyiz. Şekil 4-2’yi incelediğimizde, bütün hasta verilerinin okuma başına ortalama kalite skorunun 29 olduğunu görmekteyiz.



Şekil 4-1: Tüm Ekzom Dizileme çıktılarının FastQC aracıyla elde edilen baz başına dizileme kalitesi sonuçları.



Şekil 4-2: Tüm Ekzom Dizileme çıktılarının FastQC aracıyla elde edilen okuma başına ortalama kalite skorlarının sonuçları.

4.1.2. Filtreleme Sonuçları

Şekil 3-2’de belirtildiği üzere, uygulanan çeşitli filtrelemeler sonucunda 10 hastada toplam 93 novel varyant tespit edilmiştir. Tablo 4-1’de varyantların dağılımları gösterilmiştir. Bunların 12 tanesi yanlış anlamlı neticeye sahip varyantlardır.

Yanlış anlamlı varyantların sekiz tanesi SIFT veri tabanına göre tehlikeli olarak; 10 tanesi Polyphen veri tabanına göre tehlikeli olarak belirtilmiştir. Her iki veri tabanına göre tehlikeli olarak işaretlenmeyen, Vaka 4’de *KCNB1* genindeki ve Vaka 5’de *UBA5*

genindeki varyantlardır. Yanlış anlamlı novel varyantların tamamı ACMG sınıflandırmasına göre PM1, PM2 ve PP3 delillerine göre belirsiz öneme sahip varyantlar (VUS, *variant of uncertain significance*) olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 4-2). Ayrıca tespit edilen varyantlara ait fenotip bilgileri çeşitli veri tabanları kullanılarak elde edilmiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-1: Filtrelemeler sonrası neticelerine (*consequences*) göre varyantların dağılımı.

	missense variant	inframe deletion	3 prime UTR variant	5 prime UTR variant	splice region variant & splice polypyrimidine tract variant & intron variant
Vaka 1	1	2	-	2	5
Vaka 2	-	2	1	2	1
Vaka 3	-	1	2	1	3
Vaka 4	1	1	1	2	1
Vaka 5	3	2	-	2	5
Vaka 6	1	1	1	2	3
Vaka 7	1	1	3	2	3
Vaka 8	2	1	2	2	6
Vaka 9	2	-	2	1	3
Vaka 10	1	3	3	3	2

Tablo 4-2: Filtrelemeler sonrası elde edilen heterozigot novel varyantlar.

	hg38 Pozisyonu	Gen Sembolü	Transkript ID (MANE)	cDNA	Ekzon	Protein	Protein Domaini	SIFT	PolyPhen	ACMG Sınıflandırması	ACMG Delilleri	CADD Skoru	AD (Ref, Alt)	DP	VAF
Vaka 1	11-35292428-A-G	<i>SLC1A2</i>	ENST00000278379.9	c.950T>C	7/11	p.Met317Thr	-	T	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	24,0	29,48	77	62%
Vaka 4	20-49373656-C-T	<i>KCNB1</i>	ENST00000371741.6	c.1904G>A	2/2	p.Gly635Asp	-	TLC	B	VUS	PM1, PM2, PP3	16,10	78,74	152	49%
Vaka 5	3-132675649-G-T	<i>UBA5</i>	ENST00000356232.10	c.993G>T	10/12	p.Glu331Asp	-	T	B	VUS	PM1, PM2, PP3	14,94	19,15	34	44%
Vaka 5	7-88145183-G-T	<i>ADAM22</i>	ENST00000413139.2	c.1379G>T	16/32	p.Cys460Phe	Disintegrin (444-531)	D	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	27,4	22,13	35	37%
Vaka 5*	21-37072541-T-G	<i>PIGP</i>	ENST00000464265.5	c.47A>C	1/4	p.His16Pro	-	TLC	B	VUS	PM1, PM2, PP3	18,08	47,25	72	35%
Vaka 5**	21-37072541-T-G	<i>PIGP</i>	ENST00000360525.9	c.-22-4A>C	-	-	-	-	-	-	-	18,08	33,20	72	38%
Vaka 6	2-165307924-A-G	<i>SCN2A</i>	ENST00000375437.7	c.463A>G	3/27	p.Thr155Ala	I Repeat (111-456)	T	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	32	23,15	53	39%
Vaka 7	2-166251846-C-A	<i>SCN9A</i>	ENST00000642356.2	c.3358G>T	18/27	p.Asp1120Tyr	Polar Residues (1117-1131)	D	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	28,1	12,22	38	65%
Vaka 8	2-166311593-G-A	<i>SCN9A</i>	ENST00000642356.2	c.164C>T	2/27	p.Ala55Val	Disordered (26-55)	T	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	23,4	79,93	34	54%
Vaka 8	7-103603341-C-T	<i>RELN</i>	ENST00000428762.6	c.3296G>A	24/65	p.Gly1099Asp	-	D	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	25,6	97,91	172	48%
Vaka 9	9-137008988-C-G	<i>ABCA2</i>	ENST00000341511.11	c.6893G>C	46/49	p.Arg2298Pro	-	D	PsD	VUS	PM1, PM2, PP3	25,5	99,108	188	52%
Vaka 9	19-13299231-T-C	<i>CACNA1A</i>	ENST00000360228.11	c.2402A>G	19/47	p.Glu801Gly	-	D	PsD	VUS	PM1, PM2, PP3	24,8	43,35	207	45%
Vaka 10	5-141576869-G-C	<i>DIAPH1</i>	ENST00000389054.8	c.1283C>G	13/28	p.Pro428Arg	GBD/FH3 (84-449)	D	PD	VUS	PM1, PM2, PP3	27,8	52,43	78	45%

** İlgili varyant tablo içerisindeki tek intronik bölgede bulunan varyanttır.

SLC1A2 genine ait varyant ClinVar veri tabanında belirsiz önem sahip olarak görülmektedir. Ancak bu varyant VarSome üzerinden sisteme girilmiş olmasına rağmen gönderen kişi bilinmemektedir (*not provided*). Tüm varyantlar, SpliceAI algoritması ile taranmıştır ve neticesinde herhangi bir anlamlı sonuç bulunamamıştır. CADD Skoru 30'un altında olan değerler muhtemel zararsız (*likely benign*), 30'un üstündeki değerler muhtemel zararlı (*likely deleterious*) olarak yansıtılmaktadır. PM1: İyi huylu varyasyon haricinde, mutasyonel bir bölgede ve/veya fonksiyonel bir bölgede (enzimin aktif bölgesi gibi) bulunan varyantlar. PM2: Exome Sequencing Project, 1000 Genomes veya ExAC'da kontrollerce yoksun (veya resesif durumda çok düşük frekansa sahip) varyantlar. PP3: *in silico* analizlerde gen veya genin ürünlerinde zararlı bir etki olduğu hesaplanan varyantlar. VUS: *variant of uncertain significance*, D: *Deleterious*, DLC: *Deleterious Low Confidence*, T: *Tolerated*, TLC: *Tolerated Low Confidence*, PD: *Probably Damaging*, PsD: *Possibly Damaging*, B: *Benign*. AD: *Allelic Depths*. DP: *Read Depth*. VAF: *Variant Allele Frequency* (Varyantın okuma değerinin toplam okuma değerine bölünmesi ile elde edilmiştir. Yüzde halinde ifade edilmiştir).

Tablo 4-3. WES analizi sonucu tespit edilen genlerin çeşitli veri tabanlarından çekilen fenotip bilgileri.

Gen Sembolü	OMIM	Morbid	Gene2Phenotype (G2P)	DisGeNET
<i>SLC1A2</i>	600300	Developmental and epileptic encephalopathy 41 (Autosomal dominant)	Monoallelic - Altered gene product structure: Epileptic Encephalopathy	EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 41
<i>KCNB1</i>	600397	Developmental and epileptic encephalopathy 26 (Autosomal dominant)	Monoallelic - Altered gene product structure: Epileptic Encephalopathy, Early Infantile 26	EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 26
<i>UBA5</i>	610552	Developmental and epileptic encephalopathy 44 (Autosomal recessive)	Biallelic - Absent gene product: Severe Infantile-Onset Encephalopathy	EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 44
<i>ADAM22</i>	603709	Developmental and epileptic encephalopathy 61 (Autosomal recessive)	-	EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 61
<i>PIGP</i>	605938	Developmental and epileptic encephalopathy 55 (Autosomal recessive)	-	EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 55
<i>SCN2A</i>	182390	Developmental and epileptic encephalopathy 11 (Autosomal dominant), Episodic ataxia, type 9 (Autosomal dominant), Seizures, benign familial infantile, 3 (Autosomal dominant)	Monoallelic - Altered gene product structure: Infantile Epileptic Encephalopathy, Monoallelic - Absent gene product: Nonspecific Severe ID	EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 11 SEIZURES, BENIGN FAMILIAL INFANTILE, 3
<i>SCN9A</i>	603415	Erythralgia, primary (Autosomal dominant) Paroxysmal extreme pain disorder (Autosomal dominant)	Monoallelic - Altered gene product structure: Erythromelalgia, Primary	Primary Erythralgia Indifference to Pain, Congenital, Autosomal Recessive Epilepsy
<i>RELN</i>	600514	Epilepsy, familial temporal lobe, 7 (Autosomal dominant) Lissencephaly 2 (Norman-Roberts type) (Autosomal recessive)	Biallelic - Absent gene product: Lissencephaly 2	Schizophrenia LISSENCEPHALY SYNDROME, NORMAN-ROBERTS TYPE EPILEPSY, FAMILIAL TEMPORAL LOBE, 7
<i>ABCA2</i>	600047	Intellectual developmental disorder with poor growth and with or without seizures or ataxia (Autosomal recessive)	-	Alzheimer's Disease Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia
<i>CACNA1A</i>	601011	Developmental and epileptic encephalopathy 42 (Autosomal dominant) Episodic ataxia, type 2 (Autosomal dominant) Migraine, Familial Hemiplegic, 1; FHM1 (Autosomal dominant) Spinocerebellar ataxia 6 (Autosomal dominant)	Monoallelic - Altered gene product structure: Epileptic Encephalopathy	Episodic ataxia type 2 (disorder) EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EARLY INFANTILE, 42
<i>DIAPH1</i>	602121	Deafness, autosomal dominant 1, with or without thrombocytopenia (Autosomal dominant) Seizures, cortical blindness, microcephaly syndrome (Autosomal recessive)	-	SEIZURES, CORTICAL BLINDNESS, AND MICROCEPHALY SYNDROME DEAFNESS, AUTOSOMAL DOMINANT 1 (disorder)

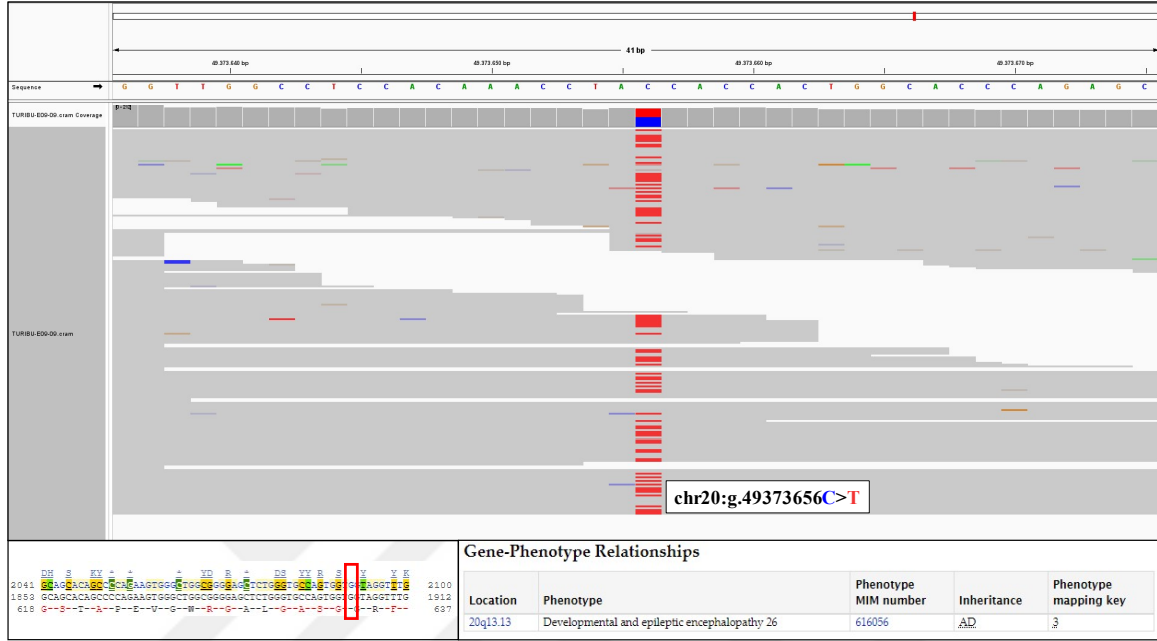
Şekil 4-3’de, Vaka 1’in tüm ekzom analizinde *SLC1A2* geninde tespit edilen varyantın IVG görüntüsü yer almaktadır. Ayrıca, şeklin sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölge tespit ettiğimiz varyantın olduğu bölgeyi göstermektedir. Bu bölgeye baktığımızda daha önceden tespit edilen herhangi bir varyantın olmadığını görmekteyiz. Ancak, varyantı ClinVar veri tabanında kontrol ettiğimizde belirsiz öneme sahip olarak görülmektedir. ClinVar, varyant bilgisini VarSome’den çekmiştir ve VarSome üzerinden varyantın detaylarını incelediğimizde varyantın tanımına ve gönderen kişiye ait bir bilgiye ulaşamamıştır (*not provided*). Şeklin sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *SLC1A2* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde gelişimsel ve epileptik ensefalopati ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-3: Vaka 1’in ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl’da varyant durumu ve ilgili bulunduğu OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38’i referans almaktadır.

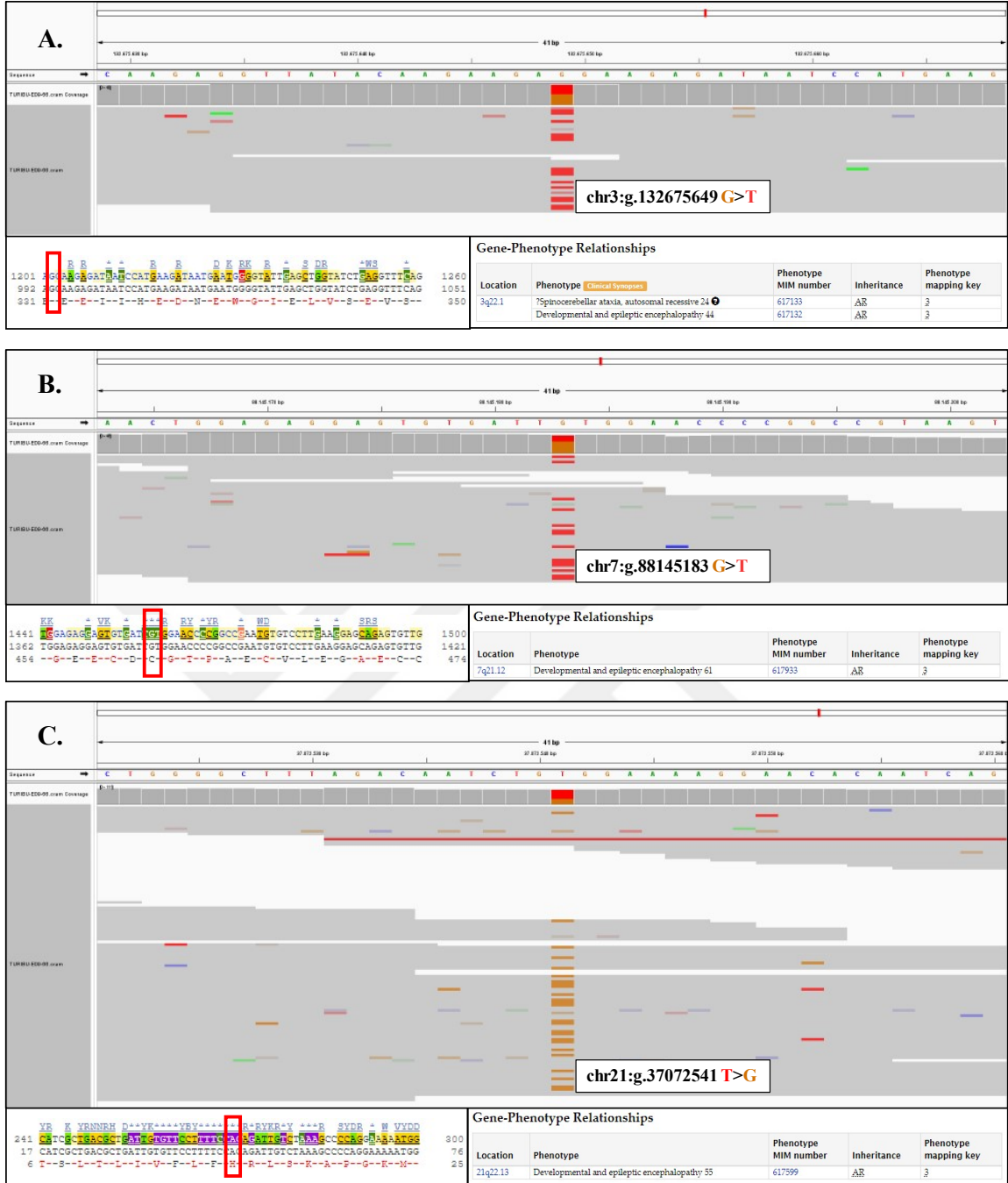
Şekil 4-4’de, Vaka 4’ün tüm ekzom analizinde *KCNBI* geninde tespit edilen varyantın IVG görüntüsü yer almaktadır. Ayrıca, şeklin sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen herhangi bir varyantın olmadığını görmekteyiz. Şeklin

sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *KCNBI* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde gelişimsel ve epileptik ensefalopati ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-5'de, Vaka 5'in tüm ekzom analizinde üç farklı gende tespit edilen varyantlar gösterilmiştir. **Şekil 4-5.A'**da, *UBA5* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen herhangi bir varyantın olmadığını görmekteyiz. *UBA5* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *UBA5* geni, otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde serebrospinal ataksi ve gelişimsel ve epileptik ensefalopati ile ilişkilendirilmiştir. **Şekil 4-5.B'**de, *ADAM22* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı

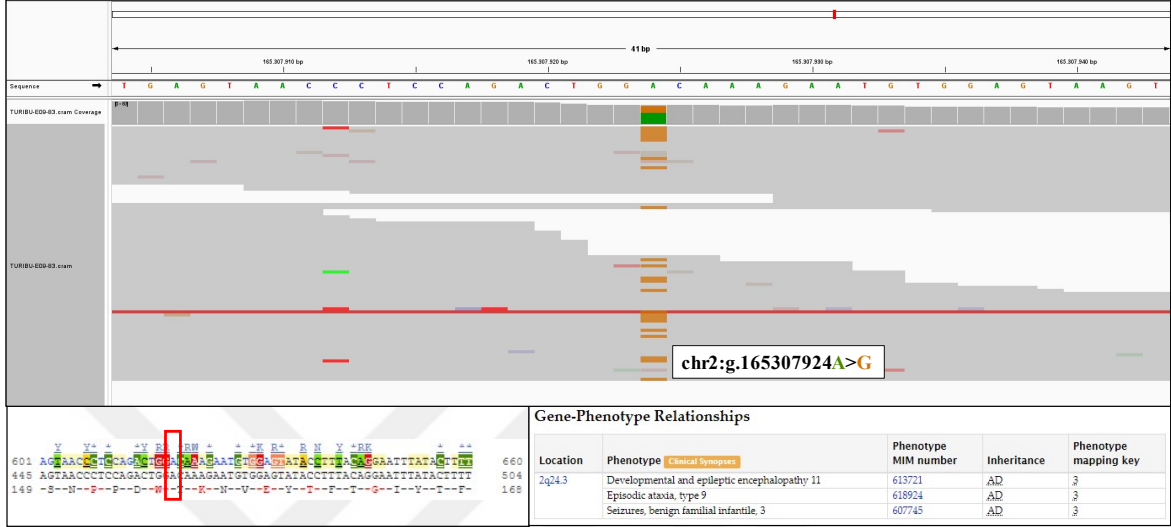
kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen sadece COSMID veri tabanına işlenen insersiyon bir varyantın olduğunu görmekteyiz. *ADAM22* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *ADAM22* geni, otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde gelişimsel ve epileptik ensefalopati ile ilişkilendirilmiştir. **Şekil 4-5.C**'de, *PIGP* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgeyi etkileyen daha önceden tespit edilen iki farklı varyantın olduğunu görmekteyiz. Bunlar, rs769435671 ve rs775016265 kodların sahip indel varyantlardır. *PIGP* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *PIGP* geni, otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde gelişimsel ve epileptik ensefalopati ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-5: Vaka 5'in ilgili varyantlarının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.

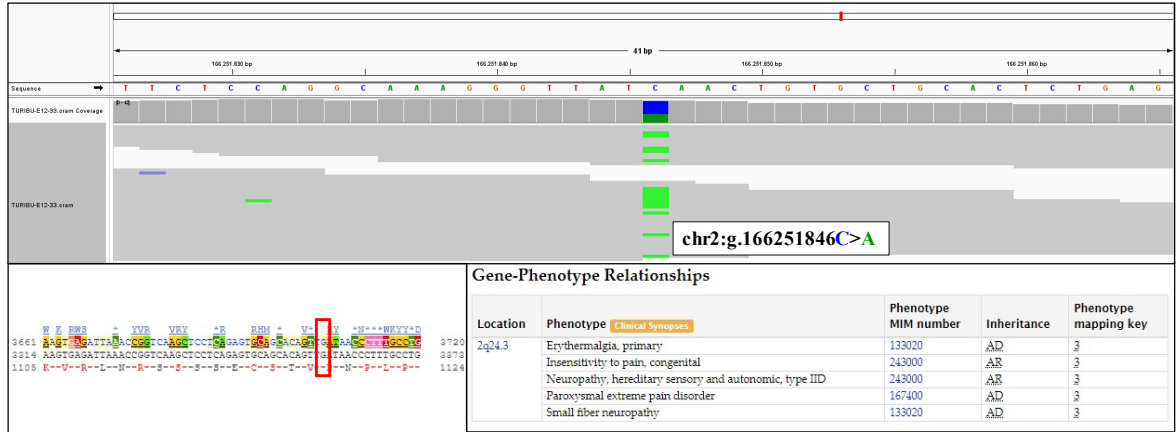
Şekil 4-6'da, Vaka 6'nın tüm ekzom analizinde *SCN2A* geninde tespit edilen varyantın IVG görüntüsü yer almaktadır. Ayrıca, şeklin sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen herhangi bir varyantın olmadığını görmekteyiz. Şeklin

sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *SCN2A* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde gelişimsel ve epileptik ensefalopati, epizodik ataksi ve ailesel iyi huylu çocukluk nöbeti ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-6: Vaka 6'nın ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.

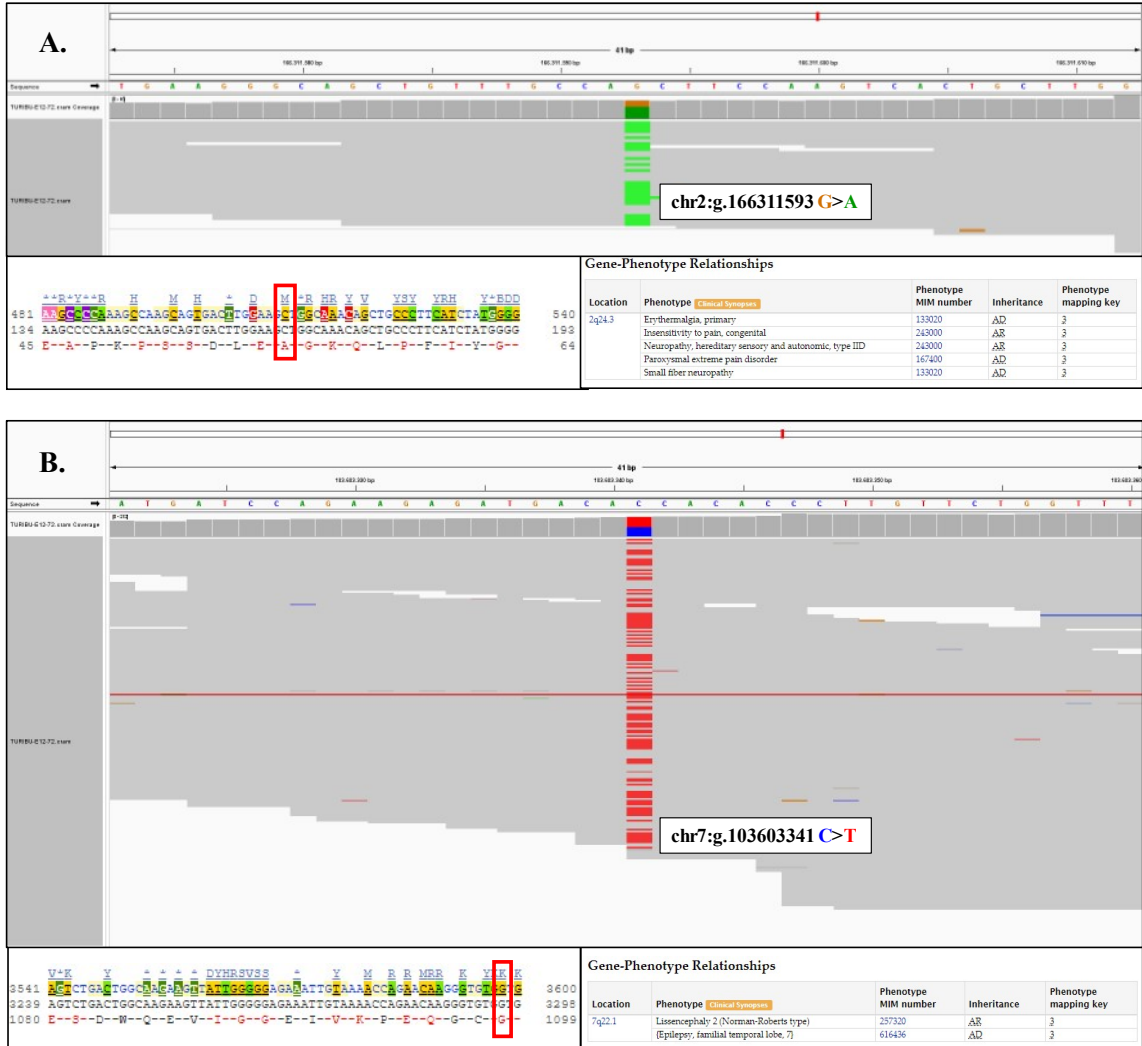
Şekil 4-7'de, Vaka 7'nin tüm ekzom analizinde *SCN9A* geninde tespit edilen varyantın IVG görüntüsü yer almaktadır. Ayrıca, şeklin sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen herhangi bir varyantın olmadığını görmekteyiz. Şeklin sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *SCN9A* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde primer eritromelalji, paroksizmal aşırı ağrı bozukluğu sendromu ve küçük lif nöropatisi; otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde konjenital ağrı duyarsızlığı ve hereditör motor duyuşal nöropati ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-7: Vaka 7'nin ilgili varyantının IGV görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.

Şekil 4-8'de, Vaka 8'in tüm ekzom analizinde iki farklı gende tespit edilen varyantlar gösterilmiştir. **Şekil 4-8.A**'da, *SCN9A* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen rs1222851635 (NM_001365536.1:c.164C>A) kodlu tek nokta varyantını görmekteyiz. Ancak, Epi25 Web Browser ile diğer Epi25 verileri içerisinde bu varyantı arattığımızda bir örnekte de aynı varyantın olduğunu görmekteyiz. *SCN9A* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *SCN9A* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde primer eritromelalji, paroksizmal aşırı ağrı bozukluğu sendromu ve küçük lif nöropatisi; otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde konjenital ağrı duyarsızlığı ve herediter motor duyusal nöropati ile ilişkilendirilmiştir. **Şekil 4-8.B**'de, *RELN* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen rs1368934123 (NM_005045.4:c.3296G>T) kodlu bir varyantın olduğunu görmekteyiz. *RELN* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *RELN* geni,

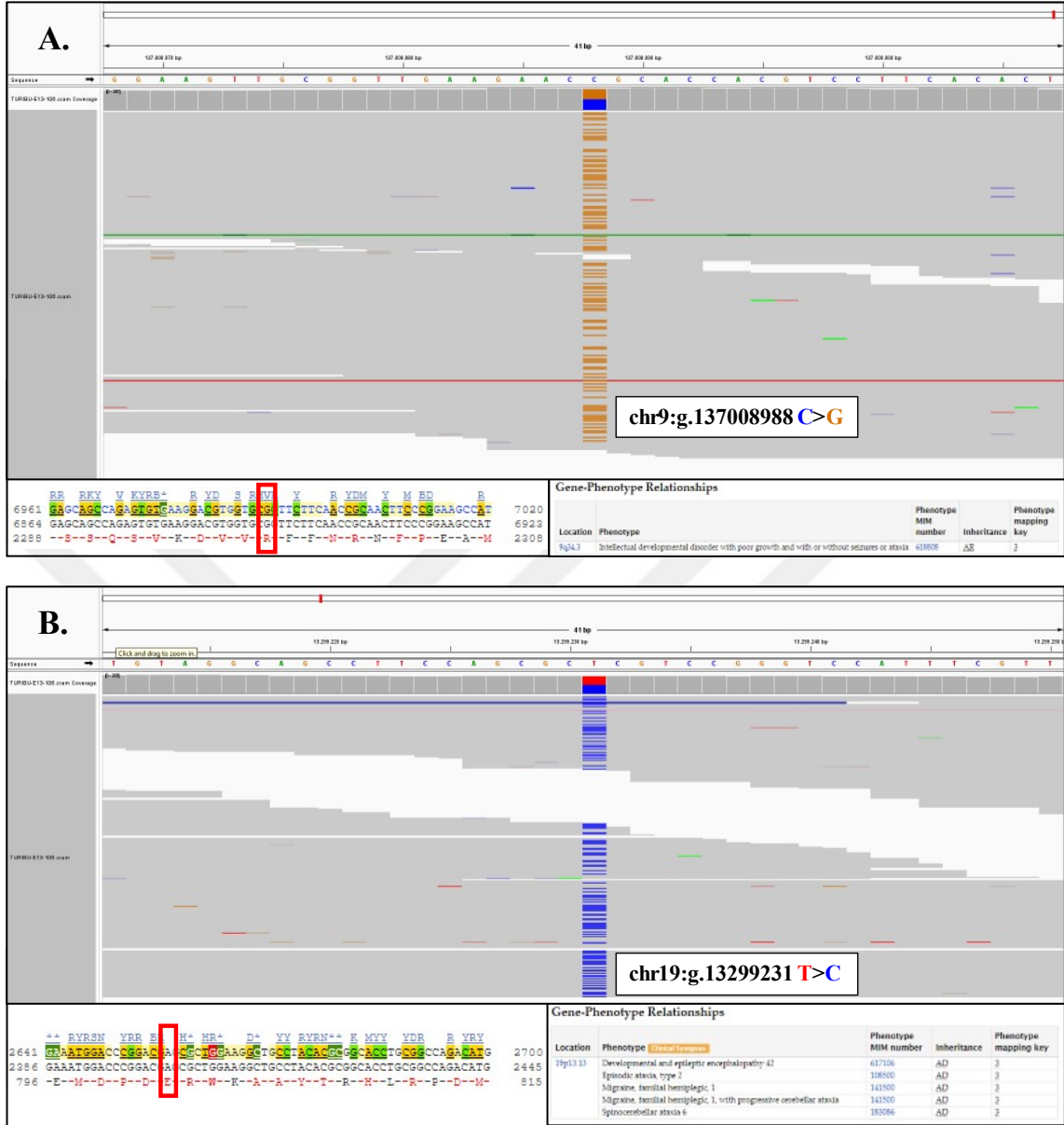
otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde Roberts sendromu; otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde ailesel temporal lob epilepsisi ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-8: Vaka 8'in ilgili varyantlarının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.

Şekil 4-9'da, Vaka 9'un tüm ekzom analizinde iki farklı gende tespit edilen varyantlar gösterilmiştir. Şekil 4-9.A'da, *ABCA2* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen rs374853474 (NM_001606.5:c.6893G>A ve NM_001606.5:c.6893G>C) kodlu iki farklı tek nokta varyantını görmekteyiz. NM_001606.5:c.6893G>C varyantı bulduğumuz varyant ile eşleşmektedir. Bizim tespit ettiğimiz alternatif G aleli sadece

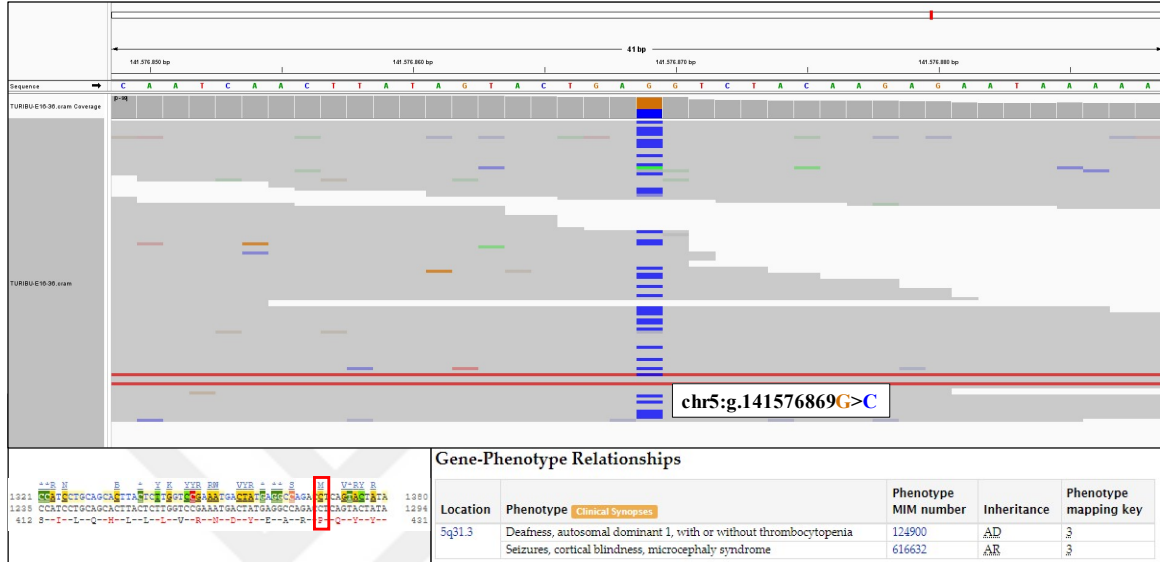
NCBI ALFA veri tabanında gözükmemektedir, ancak varyantın NCBI ALFA veri tabanından çekilen verisinde G alelinin görülme sıklığı ve miktarı sıfır olarak gözükmemektedir. Bu hata ile ilgili Ensembl ile iletişime geçilmiştir ve cevap olarak problemin NCBI kaynaklı olduğu bize iletilmiştir. *ABCA2* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *ABCA2* geni, otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde yetersiz büyüme ve nöbet veya ataksi olan veya olmayan zihinsel gelişim bozukluk ile ilişkilendirilmiştir. **Şekil 4-9.B**'de, *CACNA1A* geninde tespit edilen varyanta ait IGV görüntüsü yer almaktadır. IGV görüntüsünün sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede daha önceden tespit edilen herhangi bir varyantın olmadığını görmekteyiz. *CACNA1A* genine ait IGV görüntüsünün sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *CACNA1A* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde gelişimsel ve epileptik ensefalopati, epizodik ataksi tip 2, ailesel hemiplejik migren, ailesel hemiplejik migrene bağlı progresif serebellar ataksi ve spinoserebellar ataksi ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-9: Vaka 9'un ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.

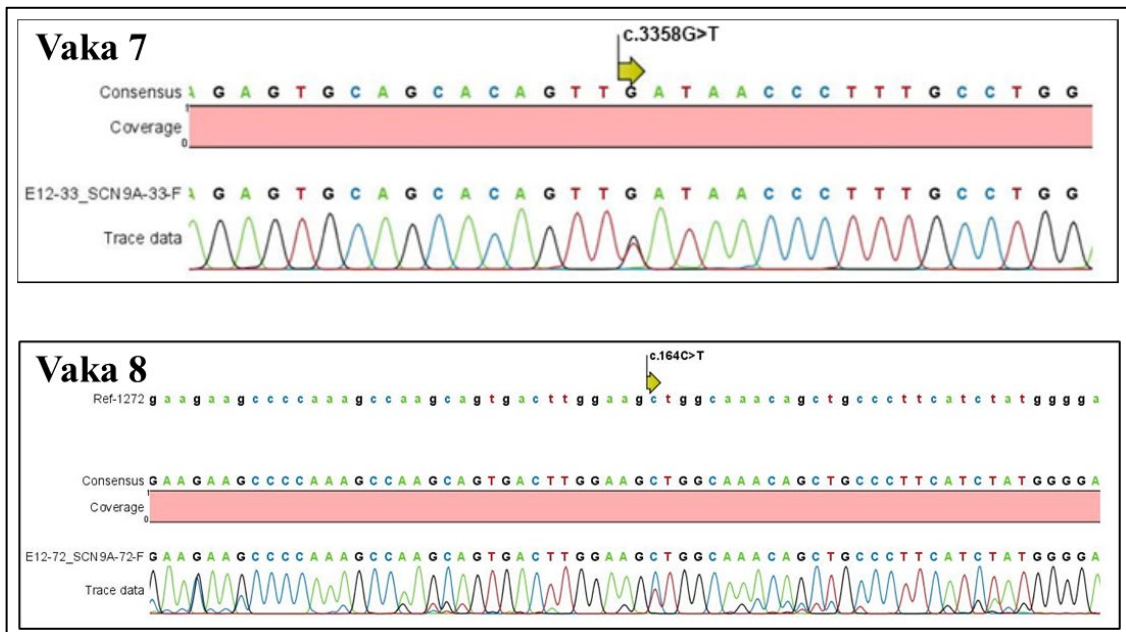
Şekil 4-10'da, Vaka 10'un tüm ekzom analizinde *DIAPH1* geninde tespit edilen varyantın IVG görüntüsü yer almaktadır. Ayrıca, şeklin sol alt bölgesinde Ensembl veri tabanından elde edilen, varyantın bulunduğu bölgede daha önce tespit edilen aynı veya farklı bir varyantın olup olmadığına dair inceleme sonucunun görsel çıktısı bulunmaktadır. Kırmızı kutu ile belirtilen bölgeye baktığımızda, varyant tespit ettiğimiz bölgede bizim tespit ettiğimiz varyanttan farklı olarak, önceden tespit edilen rs1339899658 (NM_005219.5:c.1283C>A) kodlu tek nokta varyantını görmekteyiz. Şeklin sağ alt bölgesinde, OMIM veri tabanından elde edilen, ilgili genin ilişkili olduğu

hastalık/hastalıklar ve kalıtımı ile ilgili bilgi yer almaktadır. *DIAPH1* geni, otozomal dominant kalıtım paterni şeklinde sağırılık trombositopeni ile veya değil; otozomal resesif kalıtım paterni şeklinde nöbet, kortikal körlük, mikrosefali sendromu ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4-10: Vaka 10'un ilgili varyantının IVG görüntüsü, Ensembl'da varyant durumu ve bulunduğu genin OMIM sonucu. Varyant pozisyonu hg38'i referans almaktadır.

Çalışmada, *SCN9A* geninde tespit edilen varyantlar (Vaka 7 ve Vaka 8) için Sanger dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sanger dizileme sonuçlarında, IGV sonuçlarına örtüşen, tespit ettiğimiz varyantlar ile eşleşen sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: Vaka 7 ve Vaka 8’de tespit edilen *SCN9A* genindeki varyantların Sanger dizileme sonuçları (hg38’e göre).

4.1.3. Tüm Ekzom Dizileme Verisi ile Fonksiyonel Anotasyon Sonuçları

Çalışmada, ekzom dizilme verisi kullanılarak her hasta için fonksiyonel anotasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu analiz esnasında Tablo 4-4’deki gen listesi kullanılmıştır. Bu gen listesi, varyant analizi için gerçekleştirilen filtrelemenin neticesinde elde edilen varyant listesinin düzenlenmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 3-2).

Tablo 4-4: Fonksiyonel Anotasyon için kullanılan gen listesi.

Vaka 1	Vaka 2	Vaka 3	Vaka 4	Vaka 5	Vaka 6	Vaka 7	Vaka 8	Vaka 9	Vaka 10
<i>ADRA2B</i>	<i>ADRA2B</i>	<i>ATN1</i>	<i>ADAM22</i>	<i>ADAM22</i>	<i>ATN1</i>	<i>AP3B2</i>	<i>ATN1</i>	<i>ABCA2</i>	<i>ADRA2B</i>
<i>ATN1</i>	<i>DEPDC5</i>	<i>BRAT1</i>	<i>ATN1</i>	<i>ADRA2B</i>	<i>BCKDK</i>	<i>ATN1</i>	<i>CASK</i>	<i>AP3B2</i>	<i>ATN1</i>
<i>DIAPH1</i>	<i>NPRL3</i>	<i>DEPDC5</i>	<i>CNKS2</i>	<i>ATN1</i>	<i>CACNA1H</i>	<i>CNTNAP2</i>	<i>CDKL5</i>	<i>CACNA1A</i>	<i>CASK</i>
<i>GLS</i>	<i>PACS2</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>CTNND2</i>	<i>CNKS2</i>	<i>CNKS2</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>CNKS2</i>	<i>CLN3</i>	<i>CNKS2</i>
<i>GRIA4</i>	<i>POLG</i>	<i>GLS</i>	<i>GPAA1</i>	<i>DLL1</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>EXOC7</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>EPM2A</i>	<i>DIAPH1</i>
<i>GRIN2A</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>GPAA1</i>	<i>KCNB1</i>	<i>EXT2</i>	<i>GPAA1</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>GRM7</i>	<i>GABRB2</i>	<i>EXOC7</i>
<i>GRIN2B</i>	<i>RELN</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>GLS</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>MARCHF6</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>GPAA1</i>	<i>FLNA</i>
<i>KCNQ2</i>	<i>RUBCN</i>	<i>QARS1</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>GPAA1</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>NPRL3</i>	<i>NHLRC4</i>	<i>JRK</i>	<i>GLS</i>
<i>KCNT1</i>	<i>SLC13A5</i>		<i>TRAK1</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>RELN</i>	<i>P4HTM</i>	<i>RELN</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>KCNMA1</i>
<i>NTRK2</i>				<i>KCNQ2</i>	<i>SCN1B</i>	<i>RELN</i>	<i>RUBCN</i>	<i>NPRL3</i>	<i>KCNQ2</i>
<i>PTPN23</i>				<i>PIGP</i>	<i>SCN2A</i>	<i>RHOBTB2</i>	<i>RYR3</i>	<i>P4HTM</i>	<i>PPP3CA</i>
<i>SLC1A2</i>				<i>PLCB1</i>	<i>SLC35A3</i>	<i>SCN9A</i>	<i>SCN9A</i>	<i>PHACTR1</i>	<i>RELN</i>
<i>TBC1D24</i>				<i>RELN</i>		<i>SETD1B</i>	<i>SLC25A22</i>	<i>RELN</i>	<i>RYR3</i>
<i>TRAK1</i>				<i>SEC31A</i>		<i>SLC13A5</i>	<i>SZT2</i>	<i>SCN1B</i>	<i>SETD1B</i>
				<i>TRAK1</i>		<i>SPATA5</i>	<i>TRAK1</i>	<i>SERGEF</i>	
				<i>UBA5</i>				<i>TRAK1</i>	

Gerçekleştirilen fonksiyonel anotasyon analizinde, yolak etkileşimine göre p değeri en düşük ilk beş sonuç Tablo 4-5’de listelenmiştir. En az iki vakada da gözlemlenen sonuçlar şunlardır:

- Glutamaterjik sinaps - *Homo sapiens* (insan),
- Nöronal sistem,
- cGMP-PKG sinyal yolağı - *Homo sapiens* (insan),
- BRAF ve RAF birleşiminden oluşan sinyal,
- Onkogenik MAPK sinyali,
- L1 ve Ankirin arasındaki etkileşim,
- Akson rehberliği,
- Sinir sistemi gelişimi,

- L1CAM etkileşimi.

Bu sonuçları incelediğimizde varyant gözlemlediğimiz genlerin nöronal sistem, sinyal iletimi gibi yollarda göre aldıkları görmekteyiz.

Tablo 4-5: Yolak etkileşimlerine göre elde edilen anotasyon sonuçları.

Yolak İsimleri	Gen Seti #	İçerdiği Aday Gen #	p-değeri	q-değeri	Yolak Kaynağı
Vaka 1 Glutamatergic synapse - Homo sapiens (human)	114	5 (4.4%)	3.04E-08	1.37E-06	KEGG
Neuronal System	391	6 (1.5%)	4.66E-07	8.07E-06	Reactome
Unblocking of NMDA receptors, glutamate binding and activation	20	3 (15.0%)	6.16E-07	8.07E-06	Reactome
Synaptic adhesion-like molecules	21	3 (14.3%)	7.18E-07	8.07E-06	Reactome
Transmission across Chemical Synapses	249	5 (2.0%)	1.50E-06	1.35E-05	Reactome
Vaka 2 mTOR signaling pathway - Homo sapiens (human)	155	2 (1.3%)	0.00349	0.0123	KEGG
cGMP-PKG signaling pathway - Homo sapiens (human)	167	2 (1.2%)	0.00409	0.0123	KEGG
Vaka 3 Metabolism of amino acids and derivatives	339	2 (0.6%)	0.0123	0.0403	Reactome
Neuronal System	391	2 (0.5%)	0.0161	0.0403	Reactome
Vaka 4 Voltage gated Potassium channels	43	2 (4.7%)	0.00036	0.00305	Reactome
Signaling by BRAF and RAF fusions	61	2 (3.3%)	0.00072	0.00305	Reactome
Oncogenic MAPK signaling	69	2 (2.9%)	0.00091	0.00305	Reactome
Potassium Channels	103	2 (1.9%)	0.00202	0.00506	Reactome
Wnt signaling pathway - Homo sapiens (human)	166	2 (1.2%)	0.00516	0.0103	KEGG
Vaka 5 Glutamatergic synapse - Homo sapiens (human)	114	3 (2.6%)	0.00031	0.00777	KEGG
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis - Homo sapiens (human)	26	2 (7.7%)	0.00043	0.00777	KEGG
Spinocerebellar ataxia - Homo sapiens (human)	143	3 (2.1%)	0.0006	0.00777	KEGG
Neuronal System	391	4 (1.0%)	0.00097	0.0095	Reactome
Signaling by BRAF and RAF fusions	61	2 (3.3%)	0.00234	0.0129	Reactome
Vaka 6 Interaction between L1 and Ankyrins	29	3 (10.3%)	1.96E-06	2.75E-05	Reactome
Axon guidance	356	5 (1.4%)	8.63E-06	5.46E-05	Reactome
Nervous system development	379	5 (1.3%)	1.17E-05	5.46E-05	Reactome
L1CAM interactions	102	3 (2.9%)	8.90E-05	0.00031	Reactome
Phase 0 - rapid depolarisation	22	2 (9.1%)	0.00017	0.00044	Reactome
Vaka 7 Interaction between L1 and Ankyrins	29	2 (6.9%)	0.0004	0.00403	Reactome
L1CAM interactions	102	2 (2.0%)	0.00489	0.0161	Reactome
Axon guidance	356	3 (0.8%)	0.0054	0.0161	Reactome
Nervous system development	379	3 (0.8%)	0.00643	0.0161	Reactome
Vaka 8 Interaction between L1 and Ankyrins	29	2 (6.9%)	0.00035	0.00553	Reactome
Signaling by BRAF and RAF fusions	61	2 (3.3%)	0.00153	0.0104	Reactome
Oncogenic MAPK signaling	69	2 (2.9%)	0.00196	0.0104	Reactome
L1CAM interactions	102	2 (2.0%)	0.00422	0.0118	Reactome
Axon guidance	356	3 (0.8%)	0.00433	0.0118	Reactome
Vaka 9 Lysosome - Homo sapiens (human)	128	3 (2.3%)	0.00018	0.00249	KEGG
Interaction between L1 and Ankyrins	29	2 (6.9%)	0.00029	0.00249	Reactome
Nicotine addiction - Homo sapiens (human)	40	2 (5.0%)	0.00056	0.00317	KEGG
GABAergic synapse - Homo sapiens (human)	89	2 (2.2%)	0.00274	0.00684	KEGG
Morphine addiction - Homo sapiens (human)	91	2 (2.2%)	0.00287	0.00684	KEGG
Vaka 10 Neuronal System	391	4 (1.0%)	0.00056	0.00854	Reactome
cGMP-PKG signaling pathway - Homo sapiens (human)	167	3 (1.8%)	0.00062	0.00854	KEGG
Focal adhesion - Homo sapiens (human)	201	3 (1.5%)	0.00106	0.00854	KEGG
Neurotransmitter release cycle	50	2 (4.0%)	0.0012	0.00854	Reactome
Sensory processing of sound by outer hair cells of the cochlea	50	2 (4.0%)	0.0012	0.00854	Reactome

Gerçekleştirilen gen ontoloji anotasyonu analizinde p değeri en düşük ilk beş sonuç Tablo 4-6'de listelenmiştir. Bu sonuçlara göre, en az iki vakada da gözlemlenen hücre materyal sonuçları;

- Hücre projeksiyonu,
- Hücre projeksiyonu kısımları,
- Nöron parçası,
- Glutamaterjik sinaps,

- Membran protein kompleksi,
- Taşıyıcı kompleks,

biyolojik işlem sonuçları;

- Hücre-hücre sinyal iletimi,
- yer belirlemenin tesis edilmesi,
- çok hücreli organizmaların strese tepkisi,
- sistemsel süreç, olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4-6: Gen Ontoloji anotasyon sonuçları.



	Gen Ontoloji Terimleri	Kategori, seviyesi	Gen Seti Sayısı	İçerdiği Aday Gen Sayısı	p-değeri	q-değeri
Vaka 1	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	10 (0.4%)	2.93E-07	9.08E-06
	GO:0044463 <i>cell projection part</i>	CC 2	1515	8 (0.5%)	2.52E-06	3.90E-05
	GO:0007267 <i>cell-cell signaling</i>	BP 2	1646	8 (0.5%)	4.75E-06	0.000134
	GO:0051234 <i>establishment of localization</i>	BP 2	5250	12 (0.2%)	7.24E-06	0.000134
	GO:0097458 <i>neuron part</i>	CC 2	1748	8 (0.5%)	7.44E-06	7.69E-05
Vaka 2	GO:1990130 <i>GATOR1 complex</i>	CC 2	6	2 (33.3%)	2.83E-06	5.66E-05
	GO:0035859 <i>Seh1-associated complex</i>	CC 2	17	2 (11.8%)	2.56E-05	0.000256
	GO:0061919 <i>process utilizing autophagic mechanism</i>	BP 2	542	4 (0.7%)	6.63E-05	0.00239
	GO:0033555 <i>multicellular organismal response to stress</i>	BP 2	68	2 (2.9%)	0.00042	0.00763
	GO:0065009 <i>regulation of molecular function</i>	BP 2	3142	6 (0.2%)	0.00093	0.0111
Vaka 3	GO:0051235 <i>maintenance of location</i>	BP 2	314	2 (0.6%)	0.00678	0.196
	GO:0044446 <i>intracellular organelle part</i>	CC 2	10029	7 (0.1%)	0.0413	0.452
	GO:0044281 <i>small molecule metabolic process</i>	BP 2	2157	3 (0.1%)	0.049	0.402
Vaka 4	GO:0097458 <i>neuron part</i>	CC 2	1748	7 (0.4%)	1.39E-06	3.76E-05
	GO:0098794 <i>postsynapse</i>	CC 2	606	5 (0.8%)	3.22E-06	4.35E-05
	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	7 (0.3%)	8.45E-06	7.60E-05
	GO:0044463 <i>cell projection part</i>	CC 2	1515	5 (0.3%)	0.00027	0.0016
	GO:0098978 <i>glutamatergic synapse</i>	CC 2	308	3 (1.0%)	0.00031	0.0016
Vaka 5	GO:0099634 <i>postsynaptic specialization membrane</i>	CC 2	109	3 (2.8%)	9.00E-05	0.00167
	GO:0098978 <i>glutamatergic synapse</i>	CC 2	308	4 (1.3%)	9.53E-05	0.00167
	GO:0003008 <i>system process</i>	BP 2	2176	8 (0.4%)	0.00013	0.00381
	GO:0007267 <i>cell-cell signaling</i>	BP 2	1646	7 (0.4%)	0.00017	0.00381
	GO:0098796 <i>membrane protein complex</i>	CC 2	1336	6 (0.4%)	0.00045	0.00523
Vaka 6	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	8 (0.4%)	1.08E-05	0.000292
	GO:0097458 <i>neuron part</i>	CC 2	1748	7 (0.4%)	2.40E-05	0.000325
	GO:1990351 <i>transporter complex</i>	CC 2	338	4 (1.2%)	3.92E-05	0.000353
	GO:0044463 <i>cell projection part</i>	CC 2	1515	6 (0.4%)	0.00013	0.00089
	GO:0035637 <i>multicellular organismal signaling</i>	BP 2	201	3 (1.5%)	0.00022	0.00928
Vaka 7	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	8 (0.4%)	0.0001	0.00244
	GO:0044463 <i>cell projection part</i>	CC 2	1515	6 (0.4%)	0.00058	0.007
	GO:0033555 <i>multicellular organismal response to stress</i>	BP 2	68	2 (2.9%)	0.00122	0.0451
	GO:0097458 <i>neuron part</i>	CC 2	1748	6 (0.3%)	0.00125	0.01
	GO:1990351 <i>transporter complex</i>	CC 2	338	3 (0.9%)	0.00201	0.012
Vaka 8	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	9 (0.4%)	1.02E-05	0.000228
	GO:0097458 <i>neuron part</i>	CC 2	1748	8 (0.5%)	1.47E-05	0.000228
	GO:0033555 <i>multicellular organismal response to stress</i>	BP 2	68	3 (4.4%)	1.79E-05	0.000661
	GO:0044463 <i>cell projection part</i>	CC 2	1515	7 (0.5%)	6.12E-05	0.000633
	GO:0051234 <i>establishment of localization</i>	BP 2	5250	10 (0.2%)	0.00146	0.0188
Vaka 9	GO:1990351 <i>transporter complex</i>	CC 2	338	5 (1.5%)	5.65E-06	0.000135
	GO:0097458 <i>neuron part</i>	CC 2	1748	8 (0.5%)	2.71E-05	0.000325
	GO:0098796 <i>membrane protein complex</i>	CC 2	1336	7 (0.5%)	4.58E-05	0.000366
	GO:0007267 <i>cell-cell signaling</i>	BP 2	1646	7 (0.4%)	0.00017	0.00693
	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	8 (0.4%)	0.00018	0.0011
Vaka 10	GO:0032940 <i>secretion by cell</i>	BP 2	1334	7 (0.5%)	1.51E-05	0.000741
	GO:0044463 <i>cell projection part</i>	CC 2	1515	7 (0.5%)	3.50E-05	0.0009
	GO:0003008 <i>system process</i>	BP 2	2176	8 (0.4%)	3.78E-05	0.000926
	GO:0042995 <i>cell projection</i>	CC 2	2278	8 (0.4%)	5.29E-05	0.0009
	GO:0007267 <i>cell-cell signaling</i>	BP 2	1646	7 (0.4%)	6.04E-05	0.000987

BP: Biyolojik işlem-Biological process, CC: Hücresel materyal-Cellular component, GO: Gen ontoloji.

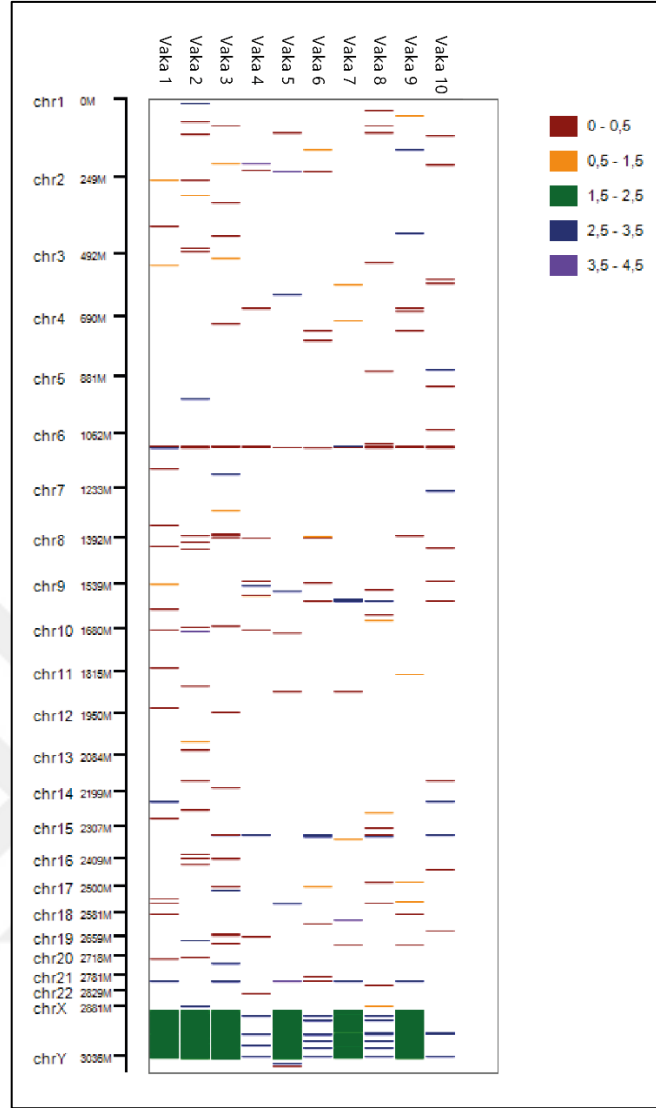
4.2. CNV Analizi Sonuçları

Epi25 Konsorsiyumu tarafından SNP array verisi çıkartılan hasta grubumuzun verileri GenomeStudio programı ile analiz edilmiştir. SNP array verisine dair genel bilgiler Tablo 4-7’de verilmiştir. Verilerin çağrı oranları 0,994 ile 0,997 arasında değişmektedir.

Tablo 4-7: SNP array verisine dair genel bilgiler.

	Çağrı Oranı (<i>Call Rate</i>)	GenomeStudio tarafından tahmin edilen cinsiyet
Vaka 1	0,9955705	Erkek
Vaka 2	0,995222	Erkek
Vaka 3	0,9961804	Erkek
Vaka 4	0,9954177	Kadın
Vaka 5	0,9944078	Erkek
Vaka 6	0,9941721	Kadın
Vaka 7	0,9963332	Erkek
Vaka 8	0,9950534	Kadın
Vaka 9	0,9968432	Erkek
Vaka 10	0,9946906	Kadın

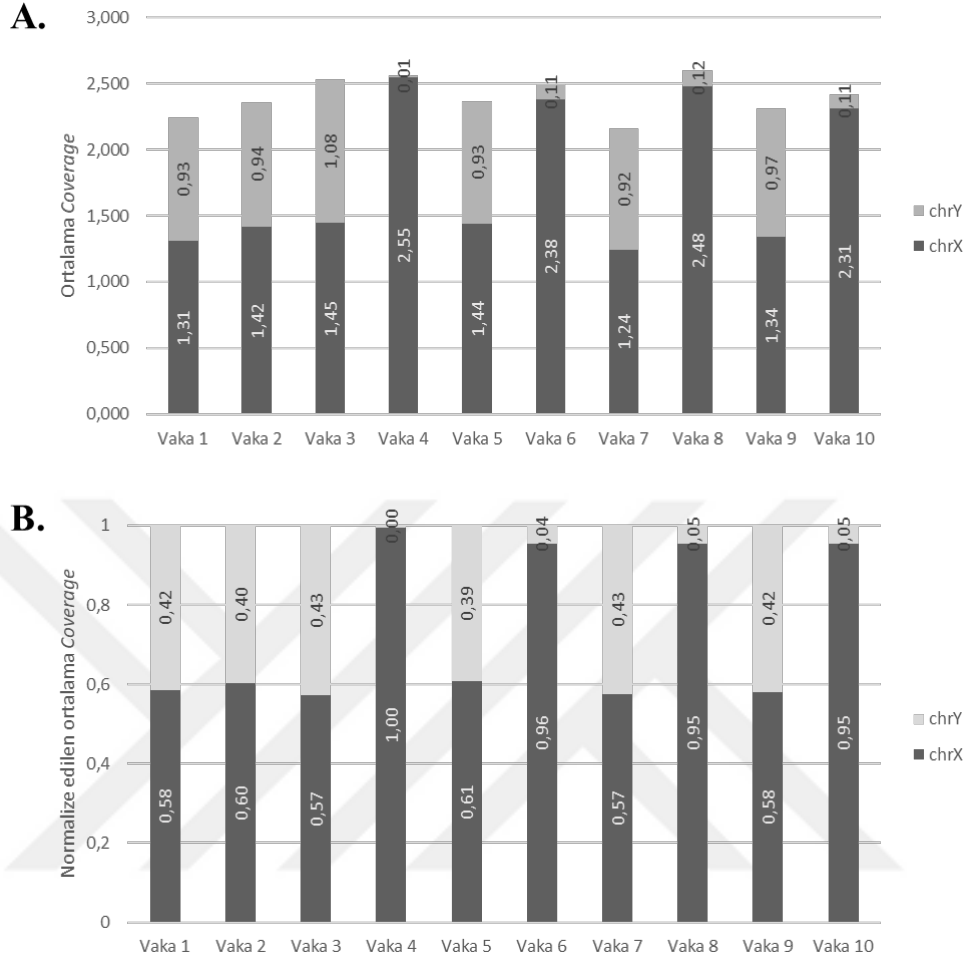
GenomeStudio programında cnvPartition aracını kullanarak kopya sayısı değişikliği (CNV) olan bölgeler tespit edildi (Şekil 4-12). Burada tespit edilen bölgelerin BAF (B Alel Frekansı) ve LOD (*logarithm of the odds*) değerleri incelendiğinde göze çarpan önemli bir değişiklik tespit edilememiştir.



Şekil 4-12: GenomeStudio’da analiz edilen SNP array verisindeki CNV alanları. Lejantta belirtilen değerler katlanma oranlarını göstermektedir.

Analizin devamında, cnvPartition aracı tarafından tespit edilen CNV bölgeleri Şekil 3-3’de belirtilen yöntemle analiz edilmiştir. X ve Y kromozomlarının dahil edilmediği bu analizde herhangi bir anlamlı varyant tespit edilememiştir.

4.3. SNP ve WES Verisi ile Cinsiyet Tahmini



Şekil 4-13: A) Samtools aracı kullanılarak elde edilen X ve Y kromozomlarının *coverage* değerlerine ait grafik. B) Normalize edilen *coverage* değerlerine ait grafik.

Samtool aracı kullanılarak WES verisi üzerinden X ve Y kromozomlarına ait *coverage* değerleri tespit edilmiştir (Şekil 4-13). Bu değerlere bakılarak, Vaka 4, Vaka 6, Vaka 8 ve Vaka 10'un cinsiyetinin Y kromozomunun *coverage* değerinin diğer vakalara göre düşük olmasından ötürü kadın olarak tahmin edilmiştir.

GenomeStudio programının cinsiyet tahmin aracını kullanarak SNP verisi üzerinden cinsiyet tahmini gerçekleştirilmiştir. Tahmin sonuçları Tablo 4-7'da gösterilmiştir.

Hem WES verisi hem de SNP verisi üzerinden tahmin edilen cinsiyetler hastanın klinik verileri ile kıyaslanmıştır (Tablo 4-8). Her iki veri seti üzerinden gerçekleştirilen tahminler klinik veri ile eşleşmiştir.

Tablo 4-8: Cinsiyet tahminlerinin klinik verileri ile karşılaştırılması.

	GenomeStudio Cinsiyet Tahmini	Samtools Cinsiyet Tahmini	Klinik Sonuç
Vaka 1	Erkek	Erkek	Erkek
Vaka 2	Erkek	Erkek	Erkek
Vaka 3	Erkek	Erkek	Erkek
Vaka 4	Kadın	Kadın	Kadın
Vaka 5	Erkek	Erkek	Erkek
Vaka 6	Kadın	Kadın	Kadın
Vaka 7	Erkek	Erkek	Erkek
Vaka 8	Kadın	Kadın	Kadın
Vaka 9	Erkek	Erkek	Erkek
Vaka 10	Kadın	Kadın	Kadın

5. TARTIŞMA

Kompleks hastalıklar, etyopatogenezleri bağlamında çeşitli faktörlere (genetik, çevresel ve yaşayış biçimi, vb.) bağlı olarak ortaya çıkan ve gelişen hastalıklardır (43). Bu hastalıkların genetik arka planlarını aydınlatmak bu nedenlerden ötürü zor olmaktadır. Büyük kohortlarla çalışma yapabilme imkanı arttıkça kompleks hastalıkların oluşumundaki nedenlerin karanlık kalan kısımlarını keşfetmeye yönelik çalışmalar da artmaktadır. Bu tür çalışmaların neticesinde, tespit edilen nadir varyantların kompleks hastalıkların oluşumundaki önemi daha da belirginleşmektedir. 2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, nadir varyantların hem kompleks hastalıkların mekanizmasını anlamak için hem de devamında ilaç tedavisi için hedef ve hastalığın belirlenebilmesi için genetik belirteç olarak kullanabilme açısından yüksek öneme sahip olduğu belirtilmiştir (44). 2022 yılındaki bir çalışmada da hastalığın genetik nedenlerinin varyantların sıklığı ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (45).

Sıcak su epilepsisi (SSE), dış uyarıcının tetiklemesiyle ortaya çıkan nöbetler ile ilişkili ve bütün epilepsiler içerisinde yaklaşık %6'lık bir dilimde bulunan refleks epilepsilerin bir alt türüdür. Bu tür epilepsiler beynin belirli bir bölgesi ile sınırlı kalmasından ötürü fokal epilepsiler olarak da anılmaktadırlar. SSE, hasta bireyin nöbet geçirmesine sıcak su ile temasın (genellikle yıkanma esnasında) neden olduğu nadir bir epilepsi türüdür. SSE, ilk olarak 1945 yılında tespit edilmiştir. SSE hakkında ilk genetik çalışma 2009 yılında bağlantı analizi yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Devamında, bağlantı analizi, tüm ekzom dizileme ve kromozomal mikroarray yöntemlerini içeren kısıtlı miktarda çalışma gerçekleştirilmiştir. 2019 yılında, 17.606 epilepsi hastası ile Epi25 konsorsiyumu tarafından gerçekleştirilen WES çalışması, günümüze kadar yapılmış en kapsamlı genetik çalışmadır.

Bu tez çalışmasında, Epi25 konsorsiyumu tarafından WES ve SNP array işlemi gerçekleştirilen sıcak su epilepsisi tanılı 10 Türk bireyin çıktıları ile tüm ekzom dizileme analizi gerçekleştirilerek hastalığın etyopatogenezini etkileyebilecek aday varyantların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, ilk olarak ham WES verisini laboratuvarımızda geliştirdiğimiz iş hattımızdan geçirip ardından filtrelemeler yaparak olası aday varyantlar belirlenmiştir. Devamında, filtreleme sonrası elde edilen varyant listesinde bulunan genler ile fonksiyonel anotasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, SNP array verisi ile CNV analizi gerçekleştirilip kopya sayısı değişikliği olan

bölgeler belirlenmiştir. Varyant listesinde, CNV analizi sonrası belirlenen bölgelerin içerdiği genlere ait varyantların olup olmadığı karşılaştırılmıştır.

5.1. WES Analizi ile Tespit Edilen Varyantlar

Çalışmada kullanılan 10 hasta bireyin WES verilerinin kalite sonuçları FastQC programı ile incelenmiştir. Şekil 4-1’de baz başına dizileme kalite skorlarının sonuçları gösterilmiştir. Bu sonuçları incelediğimizde, FastQC programı sadece üç hasta bireyin WES verisinin kalite skorunun iyi olduğunu gösterse de Şekil 4-2’deki okuma başına ortalama kalite skorları sonuçlarına baktığımızda verilerin kullanılabilir olduğu görülmektedir.

Çalışmada, WES verisi incelenen 10 hasta bireyin sekizinde gnomAD, ensembl ve Epi25 Browser veri tabanlarında novel olan ve yanlış anlamlı varyant özelliğine sahip 12 varyant tespit edildi (Tablo 4-2). Varyantların bulundukları genlerin fenotipe etkileri çeşitli veri tabanlarında incelenmiştir (Tablo 4-3). Varyantların, SIFT ve PolyPhen gibi tahmin araçlarının kullanılmasıyla proteinin homolojisine ve fonksiyonuna olan etkisi hesaplanmaktadır (46,47).

Vaka 1’de, *SLC1A2* geninin yedinci ekzonunda yer alan ENST00000278379.9:c.950T>C değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde metiyonin amino asidinin treonin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre tolere edilebilir bulunmaktadır. Ancak, PolyPhen aracına göre ise muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmektedir. SLC (*Solute Carrier*) süper ailesi membran taşıyıcı proteinlerin bir kısmını oluşturmaktadır. *SLC1A2* geni bu süper ailenin aile 1’in üye 2’sini kodlamaktadır (48). Bu gen, birçok makalede epilepsi ile ciddi şekilde ilişkilendirilmiştir. Epi4K konsorsiyumu tarafından 2016 yılında yayınlanan bir makalede, epileptik ensefalopati ile ilişkili 531 hasta bireyde yapılan tüm ekzom dizileme neticesinde *SLC1A2* ve *CACNA1A* genlerinde tespit edilen *de novo* varyantların hastalığa neden olabilecek patojenik varyantlar olduğuna dair vurgu yapılmaktadır (49).

Vaka 4’de, *KCNBI* geninin ikinci ekzonunda yer alan ENST00000371741.6:c.1904G>A değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde glisin amino asidinin aspartik asit amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre tolere edilebilir, PolyPhen aracına göre iyi

huylu olarak nitelendirilmektedir. *KCNB1*, nörotransmitter salınımı, epitel elektrolit salınımı, düz kas kasılması gibi işlevleri yürüten voltaj kapılı potasyum kanalı proteinini kodlar (50). Günümüze kadar gerçekleştirilen birçok makalede, *KCNB1* geninde tespit edilen varyantların epilepsi ile ciddi sonuçlara neden olacak derecede bağlantılı olabileceği belirtilmiştir (51,52).

Vaka 5’de, üç ayrı gende birer varyant tespit edilmiştir. *UBA5* geninin onuncu ekzonunda yer alan ENST00000356232.10:c.993G>T değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde glutamik asit amino asidinin aspartik asit amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. *UBA5*’de gözlenen varyant, SIFT aracına göre tolere edilebilir ve PolyPhen aracına göre iyi huylu olarak işaretlenmiştir. *UBA5*, ubikuitin aktive edici enzim ailesinin bir üyesini kodlar ve böylece protein yıkımında önemli bir rol oynar (53). *UBA5*, 2016 yılında Colin ve ark. tarafından yayınlanan makalede çeşitli *in vitro*, *in vivo* ve klinik bulgulara atıf yaparak bu gende gerçekleşen varyantların nöbetlerle karakterize erken başlangıçlı ensefalopatilerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (54). Vaka 5’de tespit edilen diğer varyant, *ADAM22* geninin on altıncı ekzonunda yer alan ENST00000265727.11:c.1379G>T tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde sistein amino asidinin fenilalanin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre zararlı ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. *ADAM22*, ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) ailesinin bir üyesini kodlar ve kodlanan protein hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimlerinde, kas gelişiminde ve nörojenezde görev almaktadır (55). *ADAM22* ve epilepsi ilişkili yayınlanan birçok makalede *LGII-ADAM22* kompleksine dikkat çekilmekte ve bu komplekste gerçekleşecek bir bozukluğun epilepsiye sebep olacağı belirtilmiştir (56,57). Vaka 5’de tespit edilen son varyant, *PIGP* geninin MANE transkriptine göre (ENST00000360525.9) intronik bölgede bulunmaktadır. Ancak başka bir transkripti incelediğimizde, ilgili varyant *PIGP* geninin birinci ekzonunda yer alan ENST00000464265.5:c.47A>C tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde histidin amino asidinin prolin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre zararlı, PolyPhen aracına göre iyi huylu olarak nitelendirilmiştir. *PIGP*, glikozilfosfatidilinositol biyosentezinde görev alan enzimi kodlamaktadır (58). Bu gende gerçekleşen varyantların epilepsi ile ilişkilendirildiği çeşitli makaleler mevcuttur. Krenn ve ark. yapmış olduğu çalışmada, *PIGP* geni ile gelişimsel epileptik ensefalopati arasında ilişki kurdukları ikinci bağımsız ailede tespit edilen homozigot çerçeve kayması varyant

sunulmuştur. Klinik bulgularla desteklenen çalışmada, *PIGP* geninin tek gen hastalığında görev alan bir gen olduğu ve epilepsi ile ilişkili tarama testlerinde bu genin yer alması gerektiği öne sürülmüştür (59).

Vaka 6'da, *SCN2A* geninin dördüncü ekzonunda yer alan ENST00000283256.10:c.463A>G değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde treonin amino asidinin alanin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. *SCN2A*, voltaj kapılı sodyum kanal genin alt ünitesini kodlar ve kodlanan kanal proteini nöronlarda ve kaslarda aksiyon potansiyelinin oluşmasında ve yayılmasında rol alır (60). Bu varyant, SIFT aracına göre tolere edilebilir ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. 2022 yılında yayınlanan bir makalede, bağımsız 72 epilepsi hastası ile yapılan tüm ekzom analizinde *SCN2A* geninde elli dördü yanlış anlamlı olmak üzere toplam elli dokuz varyant bulunmuştur. Bulunan bu sonuçların klinik bulgularla kıyaslanması neticesinde *de novo* varyantların bir çoğunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (61).

Vaka 7'de, *SCN9A* geninin on sekizinci ekzonunda yer alan ENST00000409672.5:c.3358G>T değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde aspartik asit amino asidinin tirozin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre hasar verici ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. Ayrıca aynı gen üzerinde Vaka 8'de bir varyant tespit edilmiştir. Vaka 8'de, *SCN9A* geninin ikinci ekzonunda yer alan ENST00000409672.5:c.164C>T değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde alanin amino asidinin valin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre tolere edilebilir ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. Bu gen de *SCN2A*'da olduğu gibi voltaj kapılı sodyum kanal genin farklı bir alt ünitesini kodlar. Ancak *SCN9A*, ağrının hissedilmesi ile ilgili yolda görev almaktadır (62). Bu gende tespit edilen varyantlar, klinik veya in vitro çalışma içeren birçok makalede epilepsi ile ilişkilendirilmiştir (63–65).

Vaka 8'deki diğer varyant, *RELN* geninin yirmi dördüncü ekzonunda yer alan ENST00000428762.6:c.3296G>A değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde glisin amino asidinin aspartik asit amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre hasar verici ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. *RELN*, beyin gelişimi sırasında hücre-

hücre etkileşimini kontrol ederek nöronal göçü sağlayan, ekstraselüler matrikste görev yapan reelin proteinini kodlar (66). *RELN* geninde ortaya çıkan varyantlar, genelde yaygın bir fokal epilepsi türü olan otozomal dominant lateral temporal epilepsi ile ilişkilendirilmektedir (67,68).

Vaka 9’da, *ABCA2* geninin kırk altıncı ekzonunda yer alan ENST00000341511.11:c.6893G>C değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde arjinin amino asidinin prolin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre hasar verici ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. *ABCA2*, çeşitli moleküllerin hücre içi ve hücre dışı taşınmasını sağlayan membran ilişkili transport protein olan ABC ailesinin bir üyesini kodlamaktadır (69). Arion ve ark. tarafından 2006 yılında temporal lob epilepsi hastalarının örnekleri ile gerçekleştirilen transkriptomik çalışmada *ABCA2* geni farklı eksprese olan genler arasında tespit edilmiştir (70). Vaka 9’da tespit edilen diğer varyant, *CACNA1A* geninin on dokuzuncu ekzonunda yer alan ENST00000360228.11:c.2402A>G değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde glutamik asit amino asidinin glisin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre hasar verici ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. *CACNA1A*, kas kasılması, hormon veya nörotransmitter salınımı gibi çeşitli görevlerde yer alan voltaj kapılı kalsiyum kanal proteinini kodlamaktadır (71). *CACNA1A* geninin epilepsi ile ilişkilendirildiği bir çok çalışma yayınlanmıştır. Güncel çalışmalardan olan Li ve ark. tarafından 2022 yılında yayınlanan makalede, trio-temelli tüm ekzom dizileme yöntemiyle 318 parsiyel epilepsi, 150 jeneralize epilepsi vakaları ve 296 sağlıklı birey ile gerçekleştirilen çalışmada ilişkisiz on epilepsi vakasında on iki varyant tespit edilmiştir ve *CACNA1A* geninin epilepsi ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (72). Krygier ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 5 yaşındaki bir SSE’li bireyde gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme neticesinde *CACNA1A* geninde patojenik bir varyant tespit edilmiştir (26).

Vaka 10’da, *DIAPH1* geninin on üçüncü ekzonunda yer alan ENST00000389054.8:c.1283C>G değişikliği tek nükleotid varyantı olup protein seviyesinde prolin amino asidinin arjinin amino asidine dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu varyant, SIFT aracına göre hasar verici ve PolyPhen aracına göre muhtemel hasar verici olarak nitelendirilmiştir. *DIAPH1*, hücre morfolojisi ve hücre iskeleti

organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan *diaphanous* ilişkili formun proteinini kodlar (73). Al-Maawali ve ark. tarafından yayınlanan makalede, *DIAPH1* geninde gerçekleşen fonksiyon kaybına sebep olacak varyantlar, erken başlangıçlı nöbetler ve birçok nörogelişimsel hastalık ile ilişkilendirilmiştir (73).

5.2. Fonksiyonel Anotasyon Analizi

Çalışmada, her vaka için tespit edilen varyantların sistematik halde neden olabilecek sonuçları belirleyebilmek adına fonksiyonel anotasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılacak gen listeleri, tüm ekzom dizileme analizinde filtrelemelerin ardından elde edilen varyantların bulundukları genler tespit edilerek oluşturulmuştur (Şekil 3-2). Fonksiyonel anotasyonu gerçekleştirmek için Max Planck Enstitüsü tarafından geliştirilen ConsensusPathDB aracı kullanılmıştır. Bu araç, piyasadaki diğer fonksiyonel anotasyon araçlarına göre daha kapsamlı bir araçtır (74). ConsensusPathDB'nin yüksek temsil analizi (*over-representation analysis*) özelliği kullanarak belirlenen gen listelerinde hem yolak analizi hem de gen ontoloji anotasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yolak analizinde, p değeri en düşük ilk beş sonuç Tablo 4-5'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda en az iki vakada bulunan yolaklar tespit edilmiştir. Bu yolakların bir çoğu direkt olarak SSE ile ilişkilendirilmese de epilepsi ve nöbetler ile ilişkilendirilen çalışmalar mevcuttur. Glutamaterjik sinaps ile alakalı, Alcoreza ve ark. 2021 yılında yapmış oldukları çalışmada, sinaptik aralıklara salınan aşırı glutamatin nörotoksisteye neden olmaması için temizlenmesi gerektiğine, bu temizleme işlemini astrositlerin gerçekleştirdiğine ve böylece astrositik glutamat homeostazında gerçekleşecek herhangi bir bozukluğun epilepsinin patolojisi ile ilişkilendirilebileceğine değinilmiştir (75). cGMP-PKG sinyal yolağı, merkezi sinir sistemi üzerinde nöronal uyarılabilirliğin düzenlenmesi ve sinaptik iletim gibi bir çok fonksiyonda rol almaktadır. 2021 yılında yayınlanan bir makalede, cGMP-PKG sinyal yolağının aktivitesini düzenlemiş olduğu A1R (adenozin 1 reseptörü)'nin aktivasyonunun (cGMP-PKG sinyal yolağı tarafından baskılanamaması sonucunda artan aktivasyonun), uzun vadeli nöromodülatör etkilere sebep olacağı, bunun da nöbet aktivitesini şiddetli hale getirebileceğine değinilmiştir (76). Bu makaledeki bilgilerden yola çıkarak bu yolağı etkileyen genlerde fonksiyon kaybına neden olacak bir varyantın aktivasyon baskılanmasını imkansız kılacağı ve bunun neticesinde nöbet şiddetinin artacağı çıkarımı yapılabilir. BRAF ve MAPK (RAF-MEK-

ERK yolağı) yolağı etkileşimi gerçekleşen sinyal iletiminde, hücre proliferasyonu, hücre döngüsünü durdurma, farklılaşma ve apoptosis gibi hücre açısından hayati öneme sahip fonksiyonları tetiklemektedir. Yapılan bir çalışmada, bu yolda gerçekleşen fonksiyon bozukluğu iyi huylu uzun süreli epilepsi ile ilişkili tümörlerin (*Long-term epilepsy-associated tumors*-LEATs) nüksü ve malignitesinin ilerlemesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (77). L1 (veya L1CAM) ve ankirin kompleksinin direkt epilepsi ile ilişkisini bildiren bir makele mevcut değil. Ancak, bu kompleks nöron yapısında bulunmaktadır (78). Bu nedenle burada gerçekleşecek herhangi bir fonksiyon kaybı nörolojik bir hastalığı tetikleyebilme potansiyeline sahiptir.

Gen ontoloji anotasyon analizinde, p değeri en düşük ilk beş sonuç Tablo 4-6'de gösterilmiştir. Hücresel materyallere göre elde edilen bulgular içerisinde en az iki vakada görülen sonuçlar içerisinde bulunan hücre projeksiyonu (GO:0042995) ve hücre projeksiyonu kısımları, kamçı (*flagellum*) veya akson gibi hücre dallanmasında rol alan kısımlar ve dallanma süreci ile ilişkilendirilmektedir. Diğer sonuçlara sırasıyla baktığımızda; nöron parçası (GO:0097458), bir nöronu oluşturan herhangi bir parça (2019 yılında kullanılmayan terim olarak işaretlenmiştir); glutamaterjik sinaps (GO:0098978), nörotransmitter olarak glutamat kullanan sinaps; membran protein kompleksi (GO:0098796), membran ile ilişkili herhangi bir protein kompleksi; taşıyıcı kompleks (GO:1990351), moleküllerin hücre içerisinde veya hücre içerisinden hücre dışına veya hücreler arasında taşınımında rol alan protein kompleksleri olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik işlemlerin sonuçlarını incelediğimizde; hücre-hücre sinyal iletimi (GO:0007267), hücreler arası ligand-reseptör işbirliği ile bilgi aktarımının sağlanması; yer belirlemenin tesis edilmesi (GO:0051234), hareket, bağlama veya seçici bozulma yoluyla herhangi bir maddenin veya hücre bileşeninin konumlandırılması; çok hücreli organizmaların strese tepkisi (GO:0033555), çok hücreli organizmanın hareket, salgılama, enzim üretimi, gen ekspresyonu gibi süreçlerin stres altında değişmesine neden olan süreç; sistemsel süreç (GO:0003008), organ sisteminde organ veya dokular tarafından gerçekleştirilen çok hücreli organizma süreci olarak tanımlanmaktadır (79). Hem hücresel materyal hem de biyolojik işlem sonuçlarında tespit edilen bulguların hücresel süreçler, sinyal iletimi, madde taşınımı gibi başlıklar ile ilintili olması ve bunların nörolojik süreçlere temas etmesi, yapılan analizde kullanılan gen listesindeki genlerin nörolojik hastalıkların patolojisinde rol alabilecekleri çıkarımını yaptırmaktadır.

5.3. WES-CNV Analizi Karşılaştırması

Çalışmada yaptığımız bir diğer analiz, Epi25 konsorsiyumu tarafından gerçekleştirilen SNP array dizilemesi sonuçları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham veriler GenomeStudio programında işlenebilir hale getirilmiştir. Devamında, GenomeStudio programı içerisindeki cnvPartition v3.2.0 aracı ile kopya sayısı değişikliği (CNV) olan bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4-12). CNV bölgelerinin içerdiği genler Ensembl/BioMart aracıyla belirlenmiştir. Ardından belirlenen bu genler fenotiplerine göre filtrelenip WES analizinde tespit edilen varyantların bulundukları genler ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3-3). Bu karşılaştırma neticesinde herhangi bir varyant tespit edilememiştir. Ayrıca B Allel Frekansı (BAF) ve Log R Kesri (LRR) değerleri de incelendiğinde anlamlı bir delesyon yahut insersiyon belirlenmemiştir.

5.4. Sonuç ve Öneri

Çalışmada, WES verilerinin analiziyle, bağımsız 10 hasta bireyden sekizinde en az bir tane olmak üzere toplam on iki novel varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantların tamamının neticesi yanlış anlamlı varyanttır. Ayrıca varyantların çoğu SIFT ve PolyPhen'e göre zararlı olarak işaretlenmiştir. Tüm varyantların klinik yorumu, ACMG kılavuzuna göre VUS olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, hem varyantların bulundukları genlerin özellikleri hem de gerçekleştirilmiş olan fonksiyonel anotasyon analizinin sonuçları bakımından kanal genlerinin ve nöronal sistemde görevli genlerin, nörolojik hastalıkların patolojisi ile ilişkisi literatür bilgisiyle de karşılaştırılınca çok fazla anlam kazanmaktadır. Çalışmada bahsedilen varyantlar ve bulundukları genler, SSE ile ilişkili olabilecek aday varyantlar/genler olarak sunulmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarla bu varyantların fonksiyonel karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilip SSE ile doğrudan ilişkisi in vitro olarak kontrol edilmelidir. Ayrıca, çalışmada sadece hasta bireylere ait veriler üzerinden ilerlendiği için varyantların *de novo* durumu hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle, hastaların aile bireylerinin de dahil olduğu geniş kapsamlı bir çalışma ile varyantların *de novo* durumu teyit edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Epilepsy [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
2. Pejaver R, Srinivasa V, Basavanthappa SP, Srinivasa Murthy CL. Hot water epilepsy: A form of reflex epilepsy - From infancy to adolescence. J Neurosci Rural Pract [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Dec 18];6(4):607–9. Available from: [/pmc/articles/PMC4692029/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264692029/)
3. Kaculini CM, Tate-Looney AJ, Seifi A. The History of Epilepsy: From Ancient Mystery to Modern Misconception. Cureus [Internet]. 2021 Mar 17 [cited 2022 Mar 2];13(3). Available from: <https://www.cureus.com/articles/53579-the-history-of-epilepsy-from-ancient-mystery-to-modern-misconception>
4. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. Epilepsy and Behavior. 2010 Jan;17(1):103–8.
5. Lawrence C. Biomedicine and Health: Surgery | Encyclopedia.com [Internet]. [cited 2022 Mar 8]. Available from: <https://www.encyclopedia.com/science/science-magazines/biomedicine-and-health-surgery>
6. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia. 2014;55(4):475–82.
7. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 12];58(4):512–21. Available from: <http://www.ilae.org/Visitors/Docume>
8. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia. 2017;58(4):522–30.
9. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures: From the Commission on Classification and

- Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1981;22(4):489–501.
10. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes: Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30(4):389–99.
 11. Baysal L, Bebek N, Baykan B. Photosensitivity and Reflex Epilepsies. *Journal of the Turkish Epilepsy Society*. 2014;
 12. Ekici A, Ozdemir O, Yimenicioglu S, Oren A, Sen I. Hot Water Epilepsy Successfully Treated with Daily Clobazam. *Pediatr Emerg Care* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Jun 22];33(10):e98–9. Available from: https://journals.lww.com/pec-online/Fulltext/2017/10000/Hot_Water_Epilepsy_Successfully_Treated_With_Daily.19.aspx
 13. Bharathi NK, Shivappa SK, Gowda VK, Shivalingaiah S, Benakappa A. Clinical, Demographic, and Electroencephalographic Profile of Hot-Water Epilepsy in Children. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Mar 20];88(9):885–91. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12098-020-03570-y>
 14. Satishchandra P, Shivaramakrishana A, Kaliaperumal VG, Schoenberg BS. Hot-Water Epilepsy: A Variant of Reflex Epilepsy in Southern India. *Epilepsia*. 1988;29(1):52–6.
 15. Erdem E, Topcu M, Renda Y, Ciger A, Varli K, Zileli T. Hot water epilepsy. *Clin Electroencephalogr* [Internet]. 1992 [cited 2022 Mar 20];23(3):152–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1628409/>
 16. Bebek N, Gürses C, Gokyigit A, Baykan B, Ozkara C, Derwent A. Hot Water Epilepsy: Clinical and Electrophysiologic Findings Based on 21 Cases. *Epilepsia* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2022 Mar 20];42(9):1180–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1528-1157.2001.31000.x>
 17. Balgetir F, Gönen M, Müngen E, Berilgen A, Müngen B. Long-term clinical course and prognosis of hot water epilepsy: 15-Year follow-up. *Epilepsy & Behavior* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2022 Mar 20];129. Available from: <http://www.epilepsybehavior.com/article/S1525505022000567/fulltext>

18. Ratnapriya R, Satishchandra P, Kumar SD, Gadre G, Reddy R, Anand A. A locus for autosomal dominant reflex epilepsy precipitated by hot water maps at chromosome 10q21.3-q22.3. *Hum Genet* [Internet]. 2009 [cited 2022 Mar 20];125(5–6):541–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19266219/>
19. Karan KR, Satishchandra P, Sinha S, Anand A. Rare SLC1A1 variants in hot water epilepsy. *Hum Genet* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Jun 28];136(6):693–703. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-017-1778-7>
20. Türay S, Eröz R. White–Sutton syndrome with hot water epilepsy and coexistence of SHOX gene variations. *Acta Neurol Belg* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Jun 28];121(3):749–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13760-021-01671-9>
21. Ratnapriya R, Satishchandra P, Dilip S, Gadre G, Anand A. Familial autosomal dominant reflex epilepsy triggered by hot water maps to 4q24-q28. *Hum Genet* [Internet]. 2009 Jul 14 [cited 2022 Aug 25];126(5):677–83. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-009-0718-6>
22. Accogli A, Wiegand G, Scala M, Cerminara C, Iacomino M, Riva A, et al. Clinical and Genetic Features in Patients With Reflex Bathing Epilepsy. *Neurology* [Internet]. 2021 Aug 10 [cited 2022 Aug 25];97(6):e577–86. Available from: <https://n.neurology.org/content/97/6/e577>
23. Peron A, Baratang N v., Canevini MP, Campeau PM, Vignoli A. Hot water epilepsy and SYN1 variants. *Epilepsia* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Aug 25];59(11):2162–3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epi.14572>
24. Karan KR, Satishchandra P, Sinha S, Anand A. A genetic locus for sensory epilepsy precipitated by contact with hot water maps to chromosome 9p24.3-p23. *J Genet* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Aug 25];97(2):391–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12041-018-0947-3>
25. Sirsi D, Armstrong D, Muñoz-Bibiloni J, Redondo B, Park JY. SYN1 Gene Mutation in a Child with Focal Epilepsy and Reflex Bathing Seizures. *J Pediatr Epilepsy* [Internet]. 2017 Mar 7 [cited 2022 Aug 25];06(02):119–24. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0037-1599193>
26. Krygier M, Zawadzka M, Sawicka A, Mazurkiewicz-Bęldzińska M. Reflex seizures in rare monogenic epilepsies. *Seizure*. 2022 Apr 1;97:32–4.

27. Feng YCA, Howrigan DP, Abbott LE, Tashman K, Cerrato F, Singh T, et al. Ultra-Rare Genetic Variation in the Epilepsies: A Whole-Exome Sequencing Study of 17,606 Individuals. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Apr 30];105(2):267–82. Available from: <http://www.cell.com/article/S0002929719302071/fulltext>
28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 [cited 2022 Mar 22];74(12):5463–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/270306/>
29. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021 Nov 1;82(11):801–11.
30. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986;321(6071):674–9.
31. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, et al. Molecular biology: Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* (1979) [Internet]. 2005 Sep 9 [cited 2022 Mar 22];309(5741):1728–32. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1117389>
32. Gkazi A. An Overview of Next-Generation Sequencing [Internet]. *Technology Networks Genomics Research*. 2021 [cited 2022 Mar 22]. Available from: <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/an-overview-of-next-generation-sequencing-346532>
33. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications [Internet]. Vol. 21, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2020 [cited 2022 Mar 31]. p. 597–614. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41576-020-0236-x>
34. Amarasinghe SL, Su S, Dong X, Zappia L, Ritchie ME, Gouil Q. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis [Internet]. Vol. 21, *Genome Biology*. BioMed Central; 2020 [cited 2022 Apr 8]. p. 1–16. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-020-1935-5>
35. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost*. 2019;45(7):661–73.

36. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2013 Jun;6:287–303.
37. Metzker ML. Sequencing technologies the next generation [Internet]. Vol. 11, *Nature Reviews Genetics*. 2010 [cited 2022 Mar 22]. p. 31–46. Available from: www.nature.com/reviews/genetics
38. Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, et al. Review of current methods, Applications, And data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing [Internet]. Vol. 13, *Cancer Informatics*. SAGE Publications; 2014 [cited 2022 Apr 26]. p. 67–82. Available from: [/pmc/articles/PMC4179624/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2562413/)
39. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Jun 18 [cited 2022 Aug 29];26(16):2069–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20562413/>
40. single nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable [Internet]. [cited 2022 Aug 24]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/definition/snp-295/>
41. Steemers FJ, Chang W, Lee G, Barker DL, Shen R, Gunderson KL. Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods* [Internet]. 2006 Jan [cited 2022 Aug 24];3(1):31–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16369550/>
42. sprotocols. Copy Number Variation Detection via High-Density SNP Genotyping. 2014 Dec 30 [cited 2022 Jun 30]; Available from: <https://zenodo.org/record/13529>
43. Complex Diseases: Research and Applications | Learn Science at Scitable [Internet]. [cited 2022 Aug 26]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/complex-diseases-research-and-applications-748/>
44. Momozawa Y, Mizukami K. Unique roles of rare variants in the genetics of complex diseases in humans. *Journal of Human Genetics* 2020 66:1 [Internet]. 2020 Sep 18 [cited 2022 Aug 26];66(1):11–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/s10038-020-00845-2>
45. Karczewski KJ, Solomonson M, Chao KR, Goodrich JK, Tiao G, Lu W, et al. Systematic single-variant and gene-based association testing of thousands of

- phenotypes in 394,841 UK Biobank exomes. *Cell Genomics* [Internet]. 2022 Aug [cited 2022 Aug 26];0(0):100168. Available from: <http://www.cell.com/article/S2666979X22001100/fulltext>
46. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* [Internet]. 2010 Apr [cited 2022 Jun 27];7(4):248–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20354512/>
 47. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* [Internet]. 2001 May [cited 2022 Jun 27];11(5):863–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11337480/>
 48. SLC1A2 solute carrier family 1 member 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6506#summary>
 49. Myers CT, McMahon JM, Schneider AL, Petrovski S, Allen AS, Carvill GL, et al. De Novo Mutations in SLC1A2 and CACNA1A Are Important Causes of Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Aug 8 [cited 2022 Jun 27];99(2):287. Available from: </pmc/articles/PMC4974067/>
 50. KCNB1 potassium voltage-gated channel subfamily B member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3745>
 51. Bar C, Kuchenbuch M, Barcia G, Schneider A, Jennesson M, le Guyader G, et al. Developmental and epilepsy spectrum of KCNB1 encephalopathy with long-term outcome. *Epilepsia* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Jun 27];61(11):2461–73. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epi.16679>
 52. Torkamani A, Bersell K, Jorge BS, Bjork RL, Friedman JR, Bloss CS, et al. De Novo KCNB1 Mutations in Epileptic Encephalopathy. *Ann Neurol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2022 Jun 27];76(4):529. Available from: </pmc/articles/PMC4192091/>
 53. Daida A, Hamano S ichiro, Ikemoto S, Matsuura R, Nakashima M, Matsumoto N, et al. Biallelic loss-of-function UBA5 mutations in a patient with intractable West syndrome and profound failure to thrive. *Epileptic Disord* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Jun 27];20(4):313–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30078785/>

54. Colin E, Daniel J, Ziegler A, Wakim J, Scrivo A, Haack TB, et al. Biallelic Variants in UBA5 Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2022 Jun 27];99(3):695. Available from: [/pmc/articles/PMC5011045/](#)
55. ADAM22 ADAM metallopeptidase domain 22 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=53616>
56. Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, Shigematsu H, Sato Y, Goto-Ito S, et al. Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nature Communications* 2018 9:1 [Internet]. 2018 Apr 18 [cited 2022 Jun 27];9(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-03947-w>
57. Haikazian S, Olson MF. MICAL1 Monooxygenase in Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: Role in Cytoskeletal Regulation and Relation to Cancer. *Genes* 2022, Vol 13, Page 715 [Internet]. 2022 Apr 19 [cited 2022 Jun 27];13(5):715. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/5/715/html>
58. PIGP phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class P [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51227>
59. Krenn M, Knaus A, Westphal DS, Wortmann SB, Polster T, Woermann FG, et al. Biallelic mutations in PIGP cause developmental and epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2022 Jun 27];6(5):968. Available from: [/pmc/articles/PMC6530525/](#)
60. SCN2A sodium voltage-gated channel alpha subunit 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6326>
61. Zeng Q, Yang Y, Duan J, Niu X, Chen Y, Wang D, et al. SCN2A-Related Epilepsy: The Phenotypic Spectrum, Treatment and Prognosis. *Front Mol Neurosci*. 2022 Mar 30;15:78.
62. SCN9A sodium voltage-gated channel alpha subunit 9 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6335>

63. Albaradie R, Baig DN, Bashir S. Sodium voltage-gated channel alpha subunit 9 mutation in epilepsy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(24):7873–7.
64. Zhang T, Chen M, Zhu A, Zhang X, Fang T. Novel mutation of SCN9A gene causing generalized epilepsy with febrile seizures plus in a Chinese family. *Neurological Sciences* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jun 27];41(7):1913–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10072-020-04284-x>
65. Zhang S, Zhang Z, Shen Y, Zhu Y, Du K, Guo J, et al. SCN9A Epileptic Encephalopathy Mutations Display a Gain-of-function Phenotype and Distinct Sensitivity to Oxcarbazepine. *Neurosci Bull* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jun 27];36(1):11–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31372899/>
66. RELN reelin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5649>
67. Dazzo E, Fanciulli M, Serioli E, Minervini G, Pulitano P, Binelli S, et al. Heterozygous Reelin Mutations Cause Autosomal-Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *The American Journal of Human Genetics*. 2015 Jun 4;96(6):992–1000.
68. Michelucci R, Pulitano P, di Bonaventura C, Binelli S, Luisi C, Pasini E, et al. The clinical phenotype of autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy related to reelin mutations. *Epilepsy & Behavior* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Jun 27];68:103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/278904/>
69. ABCA2 ATP binding cassette subfamily A member 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20>
70. Arion D, Sabatini M, Unger T, Pastor J, Alonso-Nanclares L, Ballesteros-Yáñez I, et al. Correlation of transcriptome profile with electrical activity in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2006 May;22(2):374–87.
71. CACNA1A calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/773>
72. Li XL, Li ZJ, Liang XY, Liu DT, Jiang M, Gao LD, et al. CACNA1A Mutations Associated With Epilepsies and Their Molecular Sub-Regional Implications. *Front Mol Neurosci*. 2022 May 4;0:187.
73. Al-Maawali A, Barry BJ, Rajab A, El-Quessny M, Seman A, Coury SN, et al. Novel Loss-of-Function Variants in DIAPH1 Associated With Syndromic

- Microcephaly, Blindness, and Early Onset Seizures. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Jun 28];170A(2):435. Available from: [/pmc/articles/PMC5315085/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26515085/)
74. Herwig R, Hardt C, Lienhard M, Kamburov A. Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB. *Nature Protocols* 2016 11:10 [Internet]. 2016 Sep 8 [cited 2022 Jun 28];11(10):1889–907. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.117>
 75. Alcoreza OB, Patel DC, Tewari BP, Sontheimer H. Dysregulation of Ambient Glutamate and Glutamate Receptors in Epilepsy: An Astrocytic Perspective. *Front Neurol* [Internet]. 2021 Mar 22 [cited 2022 Jun 28];12:652159. Available from: [/pmc/articles/PMC8019783/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/352159/)
 76. Spanoghe J, Larsen LE, Craey E, Manzella S, van Dycke A, Boon P, et al. The Signaling Pathways Involved in the Anticonvulsive Effects of the Adenosine A1 Receptor. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jun 28];22(1):1–26. Available from: [/pmc/articles/PMC7794785/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/344785/)
 77. Marucci G, de Biase D, Visani M, Giulioni M, Martinoni M, Volpi L, et al. Mutant BRAF in low-grade epilepsy-associated tumors and focal cortical dysplasia. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2022 Jun 28];1(2):130. Available from: [/pmc/articles/PMC4212486/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/242486/)
 78. Tai Y, Gallo NB, Wang M, Yu JR, van Aelst L. Axo-axonic Innervation of Neocortical Pyramidal Neurons by GABAergic Chandelier Cells Requires AnkyrinG-Associated L1CAM. *Neuron*. 2019 Apr 17;102(2):358-372.e9.
 79. QuickGO [Internet]. [cited 2022 Jun 29]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>

HAM VERİLER



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SICAK SU EPİLEPSİSİNDE TÜM EKZOM ANALİZİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 17	% 15	% 10	% 10
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to The University of Manchester Öğrenci Ödevi	% 1
5	turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.tcsurg.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	clinvarminer.genetics.utah.edu İnternet Kaynağı	<% 1
9	www.biorxiv.org İnternet Kaynağı	<% 1