



**Epileptik Ensefalopati Tanısı Almış Hastalarda Ekzom Dizileme Yöntemi ile Gen
Araştırması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 214S624

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Dilşad TÜRKDOĞAN

Araştırmacılar: Yrd. Doç. Dr. Elif Sibel ASLAN

Bursiyer(ler): yok

ÖNSÖZ

Erken başlangıçlı epileptil ensefalopati (EBEE)'ler, özellikle beyin gelişiminin en kritik periyodunda tedaviye dirençli genelde birden çok çeşitte ve sık nöbetler ile yoğun iktal ve interiktal EEG epileptojen potansiyellerin görüldüğü ve buna bağlı davranışsal, kognitif ve motor regresyonla sonuçlanan heterojen beyin bozuklukları gurubudur. Etyolojide yapısal beyin anomalileri, metabolik nedenler, çevresel etkenler yanında monogenik nedenler giderek artmaktadır. Son yıllarda moleküler genetik dünyasında gelişen yöntemlerle EBEE ile ilişkilendirilen pek çok gen tanımlanmıştır ve bunların sayısı hızla artmaktadır. Bilinen ilgili genleri içeren panellere kıyasla, tüm ekzom dizileme yöntemleri bu açıdan daha aydınlatıcı olabilmektedir.

Projenin çalışma gurubunu teşkil eden EBEE hastaları genellikle sporadiktir. Bu nedenle, birden çok etkilenmiş bireyin olduğu ve çok az sayıda bulunan aile çalışmaları çok değerlidir. Çalışmamızda tümünde yakın akraba evliliği ve birden çok etkilenmiş birey olan 3 aile ele alınmıştır. Yaşayan 2 etkilenmiş kardeş olan 2 ailede 1'er birey, 4 adet etkilenmiş ancak hayatta olan 1 bireyi olan ailede ise çocuk, anne ve babada tüm ekzom dizileme yapılmıştır. Trio olarak çalışılan ailede fenotiple çok uyumlu bir gen defekti bulunmuştur. Ohtahara sendromu düşünülen 3. ailede de EBEE ile ilişkilendirilmiş yine nadir bir gen varyantı bulunmuştur. İki erkek kardeşin etkilendiği West sendromu ve otizmlı olguda ise otizm ve/veya epilepsi ile ilişkili çeşitli genlerde homozigot/bileşik heterozigot varyantlar bulunmuştur.

Bu aday genlerin Sanger dizileme yöntemi ile aile bireylerinde doğrulanması halen yapılmaktadır.

Bu çalışma, TUBİTAK tarafından desteklenen bir hızlı destek (1002) projesidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
1-ÖZET VE ANAHTAR KELİMELEER.....	III
2-ABSTRACT AND KEY WORDS.....	IV
3-PROJE ANA METNİ	
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	1
GEREÇ VE YÖNTEM.....	3
BULGULAR.....	6
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	8
4-KAYNAKLAR.....	11

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Sayfa no

Tablo 1.....	14
Şekil 1.....	16
Şekil 2	17
Şekil 3	18

1. ÖZET

Amaç: Erken başlangıçlı epileptik ensefalopatiler (EBEE), değişik klinik bulguları olan epileptik sendromları içermekte olup etyoloji çeşitlilik arzeder. Edinsel nedenlerin saptanamadığı olgularda genetik etyolojinin araştırılması, gerek patogenezi anlamak gerekse de akılcı ve özgün tedavi geliştirmek için giderek önem kazanmaktadır. Bu çalışmada EBEE tanısı konulmuş ve edinsel nedenlerin dışlandığı hastalarda, hastalıkla ilişkili olan ya da ilişkili olabileceği düşünülen genlerde olası mutasyonların varlığı araştırılması amaçlandı.

Kapsam ve yöntem : Projenin çalışma gurubunu teşkil eden EBEE hastaları genellikle sporadiktir. Bu nedenle, birden çok etkilenmiş bireyin olduğu aile çalışmaları çok değerlidir. Tümünde yakın akraba evliliği ve birden çok etkilenmiş birey olan 3 aile çalışmaya alındı. Yaşayan 2 etkilenmiş kardeş olan 2 ailede 1'er birey, 4 adet etkilenmiş ancak hayatta 1 bireyi olan ailede ise çocuk, anne ve babada yeni nesil dizileme yöntemiyle tüm ekzom dizileme yapıldı. Aday genler homozigot varyantlar içinden seçildi.

Sonuç: Trio olarak çalışılan ailede fenotiple çok uyumlu bir gen defekti bulunmuştur. Ohtahara sendromu düşünülen 3. ailede de EBEE ile ilişkilendirilmiş yine nadir bir gen varyantı ayrıca epilepsi ile ilişkili bir metabolik hastalıkta tanımlanan varyant da tesbit edilmiştir. İki erkek kardeşin etkilendiği West sendromu ve otizmlı olguda ise otizm ve/veya epilepsi ile ilişkili çeşitli genlerde homozigot/bileşik heterozigot varyantlar bulunmuştur. Bu aday genlerin Sanger dizileme yöntemi ile aile bireylerinde doğrulanması planlanmaktadır. Bu aday genlerin Sanger dizileme yöntemi ile aile bireylerinde doğrulanması halen yapılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Erken çocukluk çağı epileptik ensefalopatileri, genetik etyoloji, yeni nesil dizileme, tüm ekzon dizileme, otizm, mental retardasyon

2. ABSTRACT

Aim: Early onset epileptic encephalopathy (EOEE) includes different epileptic syndromes and etiological factors. Recently, by using new technologies in molecular genetics, the discovery of candidate genes associated with EOEE has progressively increased. If the pathogenesis of seizures is known, it will be possible to develop specific medications and also organize rational treatment options.

In this project we aimed to explore the known and novel candidate genes through utilization of whole-exome sequencing in patients with early onset epileptic encephalopathies (EOEE) whose etiology could not be identified by various metabolic and radiological investigations.

Materials and method: Patients with EOEE are generally sporadic cases. Molecular genetic testing on families with more than one affected patients is very informative. We included 3 consanguineous families with more than 1 affected children. By next-generation sequencing, whole exome analysis was done in 5 cases (in one of two alive index cases in 2 families and in the index case and healthy parents in the third family).

Results: Phenotypic features were very likely related to the gene defect found in the index case and her parents. In the proband with Ohtahara syndrome, a homozygous variant described rarely in EOEE cases was found. Additionally, a homozygous variant reported in a rare metabolic disorder with epilepsy was detected. In the proband with West syndrome a number of homozygous variants of some genes reported to be associated with autism, mental retardation and/or epilepsy were revealed. Confirmation of those genetic variants in the family members by Sanger sequencing is pending.

Key Words: Early onset epileptic encephalopathies, genetic etiology, next generation sequencing, whole exome sequencing, single gene mutations, autism, mental retardation

3. PROJE ANA METNİ

GİRİŞ

Epilepsi en sık nörolojik hastalıklardan olup yaşam boyu sıklığı %3'dür. Erken başlangıçlı epileptik ensefalopatiler (EBEE), özellikle beyin gelişiminin en kritik periyodunda tedaviye dirençli genelde birden çok çeşitte ve sık nöbetler ile yoğun iktal ve interiktal EEG deşarjlarının görüldüğü ve buna bağlı davranışsal, kognitif ve motor regresyonla sonuçlanan heterojen beyin bozuklukları gurubudur. Altta yatan etyoloji yanında süregelen yoğun klinik ve elektrofizyolojik epileptik aktivite, birden çok sayıda ve yüksek doz ilaç kullanımının bilişsel ve davranışsal etkilenimden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Covanis.2012). Değişik klinik bulguları olan epileptik sendromları içeren EBEE'de etyoloji çeşitlilik arzeder. Edinsel nedenlerin saptanamadığı olgularda genetik etyolojinin araştırılması, gerek patogenezi anlamak gerekse de akılcı ve patogeneze yönelik özgün tedaviler geliştirmek için giderek önem kazanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

ILAE (International League Against Epilepsy) tarafından yapılan güncel sınıflandırmada epilepsiler genetik, yapısal-metabolik ve nedeni belli olmayanlar olarak 3 ana gruba ayrılmıştır (Shorvon vd., 2011). EE'ler ise başlangıç yaşı ve elektro-klinik tabloya göre sınıflandırılmıştır. Neonatal ve infantil EE tanımına giren EBEE'leri oluşturan başlıca elektro-klinik tablolar, erken miyoklonik epilepsi, Ohtahara sendromu, Dravet sendromu, West sendromu, malin migratuvar epilepsi ve Doose sendromudur (Kamien, vd., 2012; Covanis, 2012)

EBEE etyolojisi heterojen olup 4 ana grupta incelenebilir: 1-Yapısal beyin anomalileri: fokalkortikaldisplazi, lizensefali, hemimegalensefali gibi gelişimsel malformasyonlar 2-Metabolik nedenler: Amino asit –protein, enerji, lizozomal ve peroksizomal metabolizma bozuklukları gibi3- Çevresel nedenler: hipoksikiskemikensefalopati, hipoglisemi, damarsal olaylar, pre ve postnatal enfeksiyonlar, tümörler ve kafa travması gibi nedenlere bağlı gelişen sekel lezyonlardır. 4- Genetik nedenler: Tanınabilen dismorfik özelliklerle giden sendromlar (Angelman, Aicardi, ARX ile ilgili bozukluklar, PEHO gibi), kromozomal (halka kromozom 21, mikrodelesyon/duplikasyonlar gibi) ve monogenik hastalıklardan (Dravet sendromu SCN1A, CDKL5, FOXG1, MECP2 ve STBP1 gibi) oluşmaktadır.

Hızlı paralel dizileme teknikleriyle elde edilen veriler de novo mutasyonların EE etyolojisinde önemli yeri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu yöntemle Carvill. vd. (2013) 500 EE olgusunda 19 bilinen ve 46 aday geni araştırdılar ve %10 olguda patojenik mutasyonu gösterdiler. Bir diğer ekzon dizileme çalışmasında 264 olgu örnekleri trio olarak değerlendirildi ve 2 yeni patojenik gen mutasyonu gösterildi. Bu çalışmalar ve diğer pek çok yeni çalışmalardan elde edilen veriler (Veeramah vd. 2013; Asher ve Scaglia , 2012; Jain, 2013) gen mutasyonları ve kopya tekrar sayılarının EE'nin en az %20'sinden sorumlu olduğunu göstermektedir.

Tüm ekzon sekanslama yönteminin tanımlanmış genlerin bulunmasının yanında daha önceden saptanmamış yeni mutasyonların da saptanmasına olanak verdiğini göstermiştir (Mastrangelo, vd 2012). Ancak yöntemin pahalı olması ve ulaşılabilirliğinin zor olması nedeniyle literatürde çok sayıda çalışma mevcut değildir ve olanların da vaka sayısı sıklıkla fazla değildir (Mastrangelo, vd 2012).

Şu ana kadar elde ettiğimiz moleküler genetik verileri, epileptik sendromlarda önemli oranda genotipik ve fenotipik heterojenite olduğunu göstermektedir. Örneğin KCNT1 genindeki farklı defektler 2 farklı epilepsi fenotipine neden olmaktadır. Otozomal dominant frontal lob epilepsisi genellikle okul yaşlarından itibaren başlayan ve tedaviye kolay yanıt veren ve belli bir yaştan sonra kaybolan bir fenotiptir. Oysa süt çocukluğunun malin migratuvar epilepsisi bir EBEE çeşidi olup gerek tedaviye yanıtı gerekse de prognozu açısından çok farklı bir noktadadır. Benzer şekilde SCN1A genetik defekti ile oluşan Dravet sendromu ve GEFS sendromu prognostik açıdan geniş bir spektrumun 2 zıt ucundadır.

EBEE içinde etyolojisi en iyi aydınlatılan Dravet sendromu genotipik heterojenitenin tipik bir örneğidir. Olguların %80'inden fazlasında sodyum kanalı patolojisine neden olan SCN1A gen defektleri gösterilmiştir (Hirose vd., 2013). Bu olguların en az %95'i denovo değişikliklerdir. Bu gen defekti gösterilemeyen az sayıda olguda ise farkı sodyum kanalı patolojileri ile ilişkili gen defektleri (SCN2A, SCN8A ve SCN1A vs...) bildirilmiştir.

EE'lerle ilişkili mutasyonlara ait tam fenotipik spektrum halen tamamen ortaya çıkmadığı için seri gen çalışmaları oldukça büyük gruplarda yapılmaktadır. Ancak pozitif sonuç yaklaşık %10 oranı ile sınırlı kalmaktadır (Covanis, 2012). Bu nedenle yeni genlerin araştırılması ya da tanımlanmış genlerde farklı mutasyonların araştırılması genetik tanıya ve fenotip-genotip ilişkisini anlamamızı sağladığı gibi bu zor epilepsi hastalığının patogenezi anlamamıza ve

özgün tedavi geliştirilmesine de katkıda bulunmaktadır. KCNT1 gen defekti saptanan 2 farklı epilepsi fenotipinde genetik defektler farklı da olsa nöbetler K kanallarının işlev kazanımı şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu durumda kinidin, artmış kanal işlevini düzelterek hedefe yönelik ve etkin bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Potasyum kanalları (KCNQ2/3) gen mutasyonlar ile ilişkili epileptik sendromlarda ise retigabine hedefe yönelik bir tedavi seçeneğidir. Dravet sendromunda SCN1A gen defekti artmış Na kanal işlevine neden olur. Bu kanal işlevini etkileyen karbamazepin ve lamotrigine nöbet artışına neden olur. Bu genetik defektin saptanması olumsuz bir tedaviden kaçınılmasını sağlar.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgu Seçimi:

Çalışma gurubu, aşağıdaki seçim ölçütlerine göre belirlendi:

İlk 6 ayda başlayan klinik nöbet öyküsü (ilaca dirençli en az 2 farklı nöbet türü ve yaşla farklı nöbetlerin ortaya çıkması),

- 1- 3'den fazla sayıda farkı zamanlarda yapılmış ve en az 1 saatlik EEG ya da video/EEG moniterizasyonu ile kaydedilen interiktal (hipsaritmi ve varyantları ya da multifokal epileptojen potansiyel ve temel aktivitede yaygın yavaşlama) veya iktal bulgular,
- 2- 3'den fazla sayıda farkı zamanlarda yapılmış nörolojik değerlendirme bulgularına (nöromotor psikososyal gelişimde orta-ağır düzeyde gerilik veya orta-ağır düzeyde zeka geriliği),
- 3- En az 1.5 Tesla ile yapılmış ve nöroradyolog tarafından değerlendirilen kraniyel MR (gerekirse MRS) incelemesinde klinik tabloyu açıklayacak bulgu olmaması,
- 4- Aşağıda belirtilen biyokimyasal ve metabolik testlerde patoloji bulunmaması : 1. Basamak tetkikleri: tam kan sayımı, kan şekeri, kalsiyum, fosfor, magnezyum düzeyleri, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, kan ürik asit, lipid, vitamin B12 ve folat düzeyleri, tiroid fonksiyon testleri, kan gazı ve elektrolitleri, kanda laktat, piruvat ve amonyak düzeyleri, idrarda keton, ürik asit ve redüktan madde, idrar ve kan aminoasitleri, idrar organik asitleri, biotinidaz aktivitesi, homosistein düzeyi, açilkarnitin profili, 2. BOS glukoz, laktat ve aminoasitleri, transferrin izoelektrik fokus, çok uzun zincirli yağ asitleri, bakır ve seruloplazmin düzeyi.
- 5- Sendromik malformatif özelliklere ve/veya pozitif genotipiye sahip olmamak,
- 6- Normal karyotipi,
- 7- Nöbetlerin en az 2 hafta süreyle uygun dozda pridoksal, pridoksal 5 fosfat ve folinik asit oral ya da im uygulamasına yanıt vermemesi

Olgular:

Çalışmaya alınan ailelerin klinik özellikleri ve soyağaçları aşağıda özetlenmiştir.

Aile-1: Anne baba sağlıklı ve 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. Ailenin ilk gebeliği EBEE tanılı 7.ayında vefat eden kız , 2. ve 3. gebelikleri sağlıklı kız, 4. gebelik EBEE tanılı 7.ayında vefat eden erkek, 5. gebelik EBEE tanılı 5 yaşında vefat eden erkek, son gebelik ikiz eşi biri EBEE tanılı 7.ayında vefat eden kız, diğeri EBEE tanılı hayatta olan kız olgu vardı. EBEE alan tüm olgularda nöbetler ilk 2 ay içinde başlayıp Ohtahara sendromu tanısı aldı; izleyen aylar içinde epileptik/tonik spazmlar ile tanınan West sendromuna dönüştü. Uygun tedavilere rağmen yaşamları boyunca hiç bir zaman tam nöbet kontrolü olmadı ve ağır mental motor gerilik ve ciddi otistik bulgular mevcuttu. Ölüm nedeni olarak yatakta mor bulmak ya da nöbet esnasında morarıp ölüm tanımlandı. Yaşayan tek indeks olguda da ilaca kısmen yanıtı parsiyel epilepsi devam etmekteydi. Kardiyak değerlendirmede 2. AV blok vardı. Ailenin soy geçmişinde anlamlı başka bir özellik yoktu. (Şekil-1; Aile ağacı)

Aile-2: Anne ve baba sağlıklı ve aralarında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. Ailenin ilk gebeliği EBEE (3 aylık başlayan West sendromu ve izleyerek parsiyel epilepsi, otizm ve ağır mental motor gerilik) tanılı hayatta olan erkek, 2. gebelik EBEE tanılı (4.5 aylık West sendromu ve hafif düzeyde öğrenme güçlüğü) hayatta olan erkek, diğer dört gebeliği sağlıklı iki kız ve iki erkek çocuk vardı. Ailenin soy geçmişinde, annenin kız kardeşi 32 yaşında olup yeni başlayan parsiyel epilepsi ve annenin babasında erişkin yaşta başlayan posttravmatik epilepsi hikayesi vardı. Yurt dışında yaşayan dede hakkında tıbbi veri sağlanamadı (Şekil 2: Aile ağacı).

Aile-3: Anne ve baba sağlıklı ve aralarında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. Ailenin ilk gebeliği EBEE tanılı kız ve ikinci gebeliği EBEE tanılı erkek olgu idi. Bu olgularda tonik spazm şeklinde nöbetleri 1. ayda başlayıp Ohtahara sendromu tanısı aldılar. İzleyen aylarda West sendromuna dönüştü. Medikal tedavi yarar sağlamadı. Halen tonik spazm, düşme nöbetleri ile EE devam etmektedir. Ketojenik diyet ağır enfeksiyonları tetiklediği için 1. kardeşte uygulanamadı. İki kardeşte de ağır mental motor gerilik ve yoğun otistik bulgular mevcuttur. Dayıda doğumsal sinirsel sağırılık vardır. Ailenin soy geçmişinde başka bir özellik yoktu (Şekil-3 : Aile ağacı).,

Proje ve dolayısıyla bütçe önerisi 8 hasta için yapılmasına rağmen, EBEE olgularında genetik tanı açısından değerli olan ve birden çok etkilenmiş, seçim ölçütlerimize uygun

bireyleri olan ailelerimizin varlığı nedeniyle aile çalışmasına öncelik verildi. Üç hasta ve 1 anne-baba olarak 5 örnekte tüm ekzom dizileme çalışması yapıldı ve bütçe harcaması 3 aileden alınan toplam 5 örnek için gerçekleşti.

Tüm bu tercihler, projenin danışmanı tarafından aşağıdaki gerekçeler ile yapıldı:

1-Tüm ekzom dizileme çalışmalarında, özellikle ailede tek bireyin etkilendiği durumlarda trio çalışması, özellikle resesif geçişli durumlarda olası varyantların analizi açısından sadece etkilenmiş bireyin değerlendirmesinden çok daha bilgi vericidir. Bu nedenle yaşayan tek bireyin olduğu ailede trio olarak 3 bireyde çalışma gerçekleştirildi.

2-Etkilenen iki kardeşin de yaşadığı diğer 2 ailede ise sadece tek etkilenmiş bireyde tüm ekzom dizileme çalışması yapıp olası varyantların aile içinde segregasyonun yapılması tercih edildi.

3- Çalışmanın gerçekleşeceği Biruni Üniversitesi Moleküler Genetik laboratuvarı alt yapı çalışmalarının başvuru aşamasında planlanandan daha yavaş gerçekleşmesi ve daha sonra kapanması nedeniyle yürütücü tarafından başlangıçtan itibaren proje seçim ölçütlerine uygun yeterli sayıda olgu sağlanmasına rağmen kalan 3 hasta çalışmaya alınamadı. Bu olumsuzluklar proje süre aşımına da neden oldu.

Hastalardan Kan Örneği Temini ve DNA Ayırıştırılması

EBEE tanısı konulmuş hastalardan ve anne-babaları ve etkilenmiş kardeşlerinden en az 2 cc kan örneği alınarak EDTA'lı tüplerde 4° C buzdolabında DNA ayırıştırılması yapılana kadar saklandı. DNA eldesi "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)" kiti yardımıyla üretici firmanın protokolü takip edilerek yapıldı. DNA saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop ND-2000c kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. DNA örnekleri, spektrofotometrik analizin yanı sıra jel elektroforezi yöntemi kullanılarak da DNA bütünlüğü açısından analiz edildi.

Yeni Nesil Dizileme ve Analizi

Ekzonik DNA kütüphanesi "Illumina TruSeq Sample Preparation Kit" ve "Illumina TruSeq Exome Enrichment Kit" kitleri yardımıyla üretici firmanın protokolü takip edilerek hazırlandı. "Illumina TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS" kiti ile paired-end küme oluşturma işlemleri ve "TruSeq SBS Kit v3-HS Reagent Kit" kiti ile yakalama sonrası kütüphanelerinin dizilenmesi işlemleri üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. İlk kümeleme işlemi "Illumina cBot Machine" üzerinde yapıldı. Paired-end dizileme ortalama 101 okuma boyunda Illumina HiSeq 2000 sisteminde gerçekleştirildi. "Base calling" ve görüntü analizi "Illumina's Real Time Analysis Software version 1.13" yazılımı kullanılarak yapıldı. Paired-end dizi okuma sonuçları BWA yazılımı aracılığıyla human genome (hg19) referans dizisine eşleştirildi. PCR duplikasyonları (duplicate) SAMtools kullanılarak uzaklaştırıldı. Duplikasyonların

uzaklaştırılmasından sonra, hedeflenmiş ekzon bölgelerinin coverage derinliği BED tools kullanılarak hesaplandı. İnsersiyon ve delesyon bölgeleri civarındaki yeniden eşleştirme işlemi “The Genome Analysis Toolkit v1.6 (GATK) IndelRealigner” kullanılarak yapıldı. Tek nükleotid değişimleri ve küçük indellerin bulunabilmesi için eşleştirilmiş dizi okumaları “GATK UnifiedGenotyper” ile tavsiye edilen parametreler kullanılarak analiz edildi. Kalite skoru 50’nin altında olan varyantlar dışlandı. Geriye kalan varyantlar dbSNP (build 135) ile karşılaştırılarak yeni bir varyant olup olmadığı hususunda incelendi. Hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen genler üzerindeki varyasyonlar Integrative Genomics Viewer (IGV) kullanılarak araştırıldı. Varyant analizi SIFT, PolyPhen2 HDIV, MutationTaster, PROVEAN adlı 4 farklı tahmin aracı ile yapıldı.

Analiz esnasında aşağıdaki filtreleme kriterleri kullanıldı:

- 1) Bölge: Ekzonik, Splays, Kodlamayan RNA ekzonik , Kodlamayan RNA splays
- 2) Fonksiyon: Çerçeve kayması/ Çerçeve kayması olmayan indel, Eşanlamlı olmayan, Stop kodon kazanımı/kaybı
- 3) Frekans: ExAC veritabanı < %1, 1000Genomes veritabanı < %5
- 4) Genotip : Homozigot varyantlar seçildi
- 5) Mutasyon etkisi: 4 tahmin aracı tarafından etkisiz olduğu gösterilen varyantlar elendi
- 6) Kalıtım: Dak ailesinde ayrıca anne babanın heterozigot hastanın homozigot olduğu varyantlar seçildi

BULGULAR:

Fenotipe etkisi olacağı düşünülen gen varyantları:

Aile-1’ de hayatta olan EBEE tanılı olgu ile anne ve babaya tüm ekzom dizi analizi yapıldı. Bu ailenin soyağacı bilgileri bize ilk planda otozomal resesif bir kalıtım olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle ilk önce anne ve babada heterozigot indeks olguda homozigot olan varyantlar filtrelendi. Bu varyantlar içerisinde popülasyon veri tabanları olan 1000 Genomes Project ve ExomeVariant Server veritabanlarında minör allel frekansı 1’in altında olan ve sinonim olmayan varyantlar seçildi Beş gende 5 varyant bulundu. Bunlar içinde fenotipe çok uyumlu 1 varyant belirlendi (Tablo1). GNB5 geninde tesbit edilen ‘çerçeve kayması’ şeklinde değişiklik olup patojen olma olasılığı çok kuvvetlidir. Anne ve babada ise hiçbir semptom olmayıp bu varyant için heterozigot idiler.

Aile-2' de EBEE tanılı bir indeks olguya tüm ekzom dizi analizi yapıldı. Otozomal resesif ya da X'e bağlı kalıtım en uygun kalıtım şekilleri olarak düşünüldü. İlgili varyantlar Tablo 1'de gösterildi.

1. İlk analizde X'e bağlı kalıtım paternine uygun olarak, 45 gende 108 varyant tespit edildi. A-ATRX geni ile ilişkilendirilen ve nörolojik semptomları da içeren başlıca sendromlar Alpha-thalassemia/mental retardasyon sendromu(OMIM 301040) , mental retardasyon-hipotonik yüzler sendromu (OMIM 309580) idi.

B-CCDC22 gen defektleri ile tanımlanmış Ritscher-Schinzel ya da 3C (cranio-cerebro-cardiac) (RSS/3C) beyin kalp anomalileri ile yüz ve ellerde dismorfik bulguları olan nadir bir sendromdur (Leonardi, 2001).

C. GRIA3 homozigot bir varyant olup otizm, epilepsi ve zihinsel gerilik ile ilişkilidir (Philips, vd 2014).

D. NLGN3 homozigot bir varyant otizm duyarlılığı ile ilişkilidir (Jamain, 2013).

2- Otozomal genlerle ilgili varyasyonları (Tablo1):

A. Değişen odaklı ailevi fokal epilepsi ile ilişkilendirilen DEPDC5 ve absans epilepsi ile ilişkilendirilen CACNA1H genlerinde otozomal dominant kalıtmıli heterozigot varyantlar tesbit edildi.

B.Otizm ile şüpheli ilişkisi olan NLGN3 geninde homozigot bir varyant vardır (Jamain, 2013).

C. CNH3 geninde bileşik heterozigot varyasyon tesbit edildi. Bu gen AMPA reseptör protein 3'ü kodlar.

Aile-3'de indeks erkek olguya tüm ekzom dizileme yapıldı. İlk analizde otozomal resesif kalıtım paternine uygun olarak homozigot 91 gende 141 varyant tesbit edildi. Klinik bulgularla en uyumlu varyatlar Tablo 1'de gösterildi. Bunlar içinde en kuvvetle muhtemel aday SLC25A22 genindeki varyant olup bu gen ile ilgili tanımlanmış feontiple çok uyumludur (OMIM 609304) (Molinari, 2009). Ayrıca dirençli epilepsi ve ağır gelişim geriliğine neden olan ABAT genindeki bialelik varyasyonlar klinik tablo ile uyumludur.

5. ve 6. İş paketleri halen yapılmaktadır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda moleküler genetik dünyasında gelişen yöntemlerle EBEE ile ilişkilendirilen pek çok gen tanımlanmıştır ve bunların sayısı hızla artmaktadır. Bu genlerin önemli bir kısmı sinaptogenez, dendritik dallanma, nöronal göç ve farklılaşma, nöroransmitter yapım ve

salınımı, nöron zarı reseptör yapı ve işlevleri ve taşıyıcılarla ilişkili olup MSS gelişimi ve organizasyon şemaları ve epilepsi patogenezi anlamamız konusunda büyük katkıda bulunmaktadır (Carvill vd. 2013). Şu ana kadar elde ettiğimiz veriler, bu epileptik sendromlarda önemli oranda genotipik heterojenite olduğunu göstermektedir (Jain, 2013).

Epilepsi genlerinin bir kısmı MSS gelişimi için gerekli proteinlerle ilişkili olduğu için bu genler epilepsi olmaksızın ya da beraber otizm ve gelişimsel/zihinsel gerilik tabloları ile de ilişkilidir.

Bu çalışmada etyolojisi çeşitli laboratuvar ve radyolojik yöntemlerle saptanamayan erken başlangıçlı epileptik ensefalopati (EBEE) olgularında tüm ekzon dizileme yöntemi ile tanımlanmış genlerin incelenmesi ve ilişki saptanamayan olgularda yeni genlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma grubunu oluşturan olguların tümünde kardeş(ler)de benzer fenotip olup anne ve babalar kuzen evliliği göstermekteydi. Bu nedenle etkilenmiş kardeşleri hayatta olmayan 1. ailede trio olarak tüm ekzom analizi yapıldı. Diğer ailelerde ise etkilenmiş sadece 1'er kardeşte analiz yapıldı. Bir sonraki basamakta tüm aile bireylerinde fenotiple ilişkisi kuvvetle muhtemel homozigot varyantların ekzom dizilemesi ile doğrulanması planlandı.

Aile-1' de soyağacı bilgileri bize ilk planda otozomal resesif bir kalıtım olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle ilk önce anne ve babada heterozigot, indeks olguda homozigot olan varyantlar filtrelendi. Bu varyantlar içinde GNB5 geninde tesbit edilen 'çerçeve kayması' şeklinde delesyon olup hastamızın fenotipi, çok yakında tanımlanan ve bu gen defekti ile ilişkilendirilen fenotipe birebir uymaktadır. Lodder ve vd. (2016) tarafından GNB5 geninde tanımlanan 'fonksiyon kaybı' yada missense mutasyonlar ile kalp hızı değişiklikleri/hasta sinüs sendromu, hipotoni, zihinsel gerilik, epilepsi ve epileptik ensefalopati, retina hastalığı ve gastro-özofageal reflü tanımlanmıştır. Bu bulgular fonksiyonel çalışmayla da doğrulanmıştır. Ağır hipotoni, zihinsel gerilik ve otistik bulgular ve epileptik ensefalopati tablosu olan bizim hastamızda da 2. Derece AV blok saptanmış ve 'pacemaker' uygulaması indikasyonu konmuştur. Olgumuzda çerçeve kayması delesyonuna bağlı olarak klinik tablonun ağır seyretmesi bu yayında tanımlanan fonksiyon kaybı değişiklikleri ile ilişkili ağır fenotiple de uyumludur. Anne ve babada ise hiçbir semptom ve klinik bulgu olmayıp bu varyant için heterozigot idiler. Hastamız ve aile üyelerine bu gene yönelik ekzom dizileme planlandı.

Aile-2' deki kalıtım şekli, otozomal resesif ya da X'e bağlı kalıtım en uygun kalıtım şekilleri olarak düşünüldü. Ancak otozomal dominant kalıtıma uygun varyantlar da değerlendirildi.

1-X ile bağlantılı bir kalıtım şekline uygun 2 farklı gen ve ilişkili fenotipler vardı:

A-ATRX geni ile ilişkilendirilen ve nörolojik semptomları da içeren başlıca sendromlar Alpha-thalassemia/mental retardasyon sendromu (OMIM 301040) , mental retardasyon-hipotonik yüzler sendromu (OMIM 309580) idi. Alpha-thalassemia/mental retardasyon sendromu (OMIM 301040) kraniyal ve yüzde çeşitli dismorfik özellikler, mikrosefali, genital anomaliler, ağır gelişimsel ve zihinsel gerilik, hipotoni ve alfa talasemiye bağlı hafif-orta düzeyde anemidir. Ayrıca 1/3 olguda epilepsi bildirilmiştir (Gibbons vd. 1995) Anemi her olguda eşlik etmeyebilir. Guerrini vd. (2000) 4 etkilenen bireyi olan geniş bir ailede fenotipin yeni bir ATRX mutasyonuna bağlı olarak hafif mental retardasyon ve epilepsiden tam fenotipin ortaya çıkışına kadar değişebildiğini gösterdi. Bizim ailemizde de etkilenen iki erkek kardeş benzer epileptik ensefalopati (West sendromu) çeşidine sahip olmakla birlikte tedaviye yanıt ve zihinsel gelişim düzeyi çok farklıydı. İndeks olguda ağır düzeyde gelişim geriliği ve otistik bulgular varken kardeşinin West sendromu tedaviye hızla yanıt verdi. Gelişim düzeyi abisine göre çok iyi bir düzeyde olup normal eğitim almaktadır. Abideki gelişim düzeyindeki gerilik doğru tedaviye geç ulaşması ile de açıklanabilir. Ancak aktif nöbetleri halen devam ediyorken (12 yaşında), kardeşi uzun yıllardır nöbetsiz idi.

B- CCDC22 gen defektleri ile tanımlanmış Ritscher-Schinzel-2 ya da 3C (cranio-cerebro-cardiac) (RSS/3C) beyin kalp anomalileri ile yüz ve ellerde dismorfik bulguları olan nadir bir sendromdur (Leonardi vd. 2001). Yaklaşık %80 olguda kalp defektleri ile serebellum/arka çukuru tutan (Dandy-Walker ve vermiş hipoplazisi ve arka çukur kistleri gibi) anomaliler vardır. Zihinsel gerilik bildirilen bu sendromda bizim olgumuzda bulunan otistik bulgular ve epilepsi /EE bildirilmemiştir. Bizim olgularımızda da radyolojik olarak bahsi geçen yapısal anomaliler tesbit edilmedi.

C. Epilepsi ile ilişkisi henüz bildirilmemiş aday genlerden otizm ile şüpheli ilişkisi olan NLGN3 geninde homozigot bir varyant tesbit edildi (Jamain, vd. 2013). İlk indeks vakada otizm ve zihinsel gerilik ortağı düzeyde olmakla beraber bu EE tablosunun geç tedavi edilmesi ile ilişkili de olabilir. Nitekim erken tanı alan 2. Kardeşte otizm olmayıp öğrenme güçlüğü hafif düzeydedir.

D.GRIA3 geni nörostimulator bir protein olan glutamat 3 reseptörünü kodlar. Erkeklerde zihinsel gerilik tablosu ile ilişkilidir. Ayrıca makrosefali, epilepsi, miyokloniler ve otistik davranışlar olan klinik tablo da tanımlanmıştır (Philips, vd 2014).

2- Otozomal resesif/dominant kalıtımla ilgili genler ve varyasyonlar:

A.Değişen odaklı ailevi fokal epilepsi ile ilişkilendirilen DEPDC5 ve absans epilepsi ile ilişkilendirilen CACNA1H genlerinde otozomal dominant kalıtmı varyantlar tesbit edildi. Bu epilepsi tabloları bizim olgularımızdan farklı olarak daha ileri yaşlarda ortaya çıkar ve daha iyi bir seyir izler. Teyzede ve muhtemelen dedede bildirilen epilepsi tabloları, indeks olgulardan fenotipik olarak çok farklı olmakla birlikte epilepsi ile ilişkili genlerde bulunan heterozigot varyasyonlar dikkate değerdir. Annede epilepsi olmaması dominant kalıtmı genlerin düşük penetransı ile ilgili olabilir. Ancak bu varyantlar geçmişte EE ile ilişkilendirilmemiştir.

B.CNIH3 geni AMPA reseptör protein 3'ü kodlar ve henüz bildirilmiş bir hastalıkla ilişkili değildir (Gene ID: 72978). AMPA'nın nörostümlatör bir nörotransmitter olması nedeniyle epilepsi ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Aile-3'de Klinik bulgularla en uyumlu varyatlar içinde en kuvvetle muhtemel aday SLC25A22 genindeki varyant olup bu gen ile ilgili tanımlanmış fenotiple çok uyumludur (EBEE tip 3 OMIM 609304) (Molinari,vd. 2009). Bu klinik özellikler, daha çok Ortadoğu ülkelerinde tanımlanmış çok nadir bir EBEE tablosu olup olgularda bizim vakalarımızda olduğu gibi hemen hiç nörolojik gelişim basamağı kaydedilmemiştir.

Ayrıca ABAT geni epilepsi için önemli bir inhibitör nörotransmitter olan GABA metabolizması ile ilişkilidir. Biyokimyasal tanısı ancak BOS'da GABA seviyesi ölçülerek doğrulanan bu çok nadir klinik tablodaki özellikler de bizim olgumuza benzemektedir (Jaeken,vd.1984).

PIGN genindeki bialelik varyasyonlar ağır gelişim geriliği, minör dismorfik bulgular ve ilaca dirençli jeneralize epilepsi ile seyreden çok nadir bir klinik tablo ile ilişkilendirilmiştir (Fleming, vd, 2016)

Tespit edilen aday genlere ait varyantların aile segragasyon çalışmalarının yapılması planlandı.

4. KAYNAKLAR

Asher,Y.J.T, Scaglia E..2012.Molecular bases and clinical spectrum of early infantile epileptic encephalopathies. European Journal of Medical Genetics,55,299-306.

Carvill, GL, Heavin, SB, Yendle, SC, McMahon, JM, O'Roak, BJ, Cook ,J, Khan A, Dorschner, MO, Weaver, M., Calvert S., Malone S., Wallace G, Stanley T, Bye AM, Bleasel A, Howell KB, Kivity S, Mackay MT, Rodriguez-Casero V, Webster R, Korczyn A, Afawi Z, Zelnick N, Lerman-Sagie T, Lev D, Møller RS, Gill D, Andrade DM, Freeman JL, Sadleir LG, Shendure J, Berkovic SF, Scheffer IE, Mefford HC. 2013. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. Nat Genet. 45:825-30.

Covanis, A.2012.'Epileptic encephalopathies (including severe epilepsy syndromes). *Epilepsia*,53,114-126

Fleming L, Lemmon M., Beck N., Johnson M., Mu W., Murdock D., Bodurtha J, Hoover-Fong J, Cohn R, Bosemani T, Barañano K, Hamosh A. 2016. Genotype-phenotype correlation of congenital anomalies in multiple congenital anomalies hypotonia seizures syndrome (MCAHS1)/PIGN-related epilepsy. *Am J Med Genet A*,;170A(1):77-86.

Gibbons RJ, Brueton L, Buckle VJ, Burn J, Clayton-Smith J, Davison BC, Gardner RJ, Homfray T, Kearney L, Kingston HM, Newbury-Ecob R, Porteous MEP, Wilkie AOM, Higgs DR. 1995. Clinical and hematologic aspects of the X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X). *Am J Med Genet.* 55:288–99.

Guerrini R, Shanahan JL, Carrozzo R, Bonanni P, Higgs DR, Gibbons RJ. 2000 . A nonsense mutation of the ATRX gene causing mild mental retardation and epilepsy. *Ann Neurol*.47:117–21.

Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC, Lowenstein DH, Sisodiya SM, Ottman R, Berkovic SF. 2013. Genetics Commission of the International League Against Epilepsy.. *SCN1A* testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*:946-52.

Jaeken, J., Casaer, P., de Cock, P., Corbeel, L., Eeckels, R., Eggermont, E., Schechter, P. J., Brucher, J.-M. 1984. Gamma-aminobutyric acid-transaminase deficiency: a newly recognized inborn error of neurotransmitter metabolism. *Neuropediatrics* 15: 165-169.

Jain,P .2013.'Diagnosis and Management of Epileptic Encephalopathies in Children',Hindawi Publishing Corporation Epilepsy Research and Treatment,1-9

Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., Paris Autism Research International Sibpair Study. 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genet.* 34: 27-29.

Kamien ,B.A. , Cardamone M, Lawson JA, Sachdev R.2012. 'A genetic diagnostic approach to infantile epileptic encephalopathies', *Journal of Clinical Neuroscience*,19,934-941

Leonardi ML, Pai GS, Wilkes B, Lebel RR. 2001. Ritscher-Schinzel cranio-cerebello-cardiac (3C) syndrome: report of four new cases and review. *Am J Med Genet.* 102:237–242

Lodder EM, De Nittis P, Koopman CD, Wiszniewski W, Moura de Souza CF, Lahrouchi N, Guex N, Napolioni V, Tessadori F, Beekman L, Nannenberga EA, Boualla L, Blom NA, de Graaff W, Kamermans M, Cocciadiferro D, Malerba N, Mandriani B, Coban Akdemir ZH, Fish RJ, Eldomery MK, Ratbi I, Wilde AA, de Boer T, Simonds WF, Neerman-Arbez M, Sutton VR, Kok F, Lupski JR, Reymond A, Bezzina CR, Bakkers J, Merla G. 2016. GNB5 mutations Cause an Autosomal-Recessive Multisystem Syndrome with Sinus Bradycardia and Cognitive Disability. *Am J Hum Genet.* 1;99:786.

Mastrangelo, M.2012.' A diagnostic algorithm for the evaluation of early onset genetic-metabolic epileptic encephalopathies', *European Journal of Pediatric Neurology*,16,179-191

Molinari, F., Kaminska, A., Fiermonte, G., Boddaert, N., Raas-Rothschild, A., Plouin, P., Palmieri, L., Brunelle, F., Palmieri, F., Dulac, O., Munnich, A., Colleaux, L.2009. Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin. Genet.* 76: 188-194.

Philips, A. K., Siren, A., Avela, K., Somer, M., Peippo, M., Ahvenainen, M., Doagu, F., Arvio, M., Kaariainen, H., Van Esch, H., Froyen, G., Haas, S. A., Hu, H., Kalscheuer, V. M., Jarvela, I. 2014. X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability--four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J. Rare Dis.* 9: 49, 4.

Shorvon ,S.D.2011.'Etiologic classification of epilepsy',*Epilepsia*,6,1052-1057

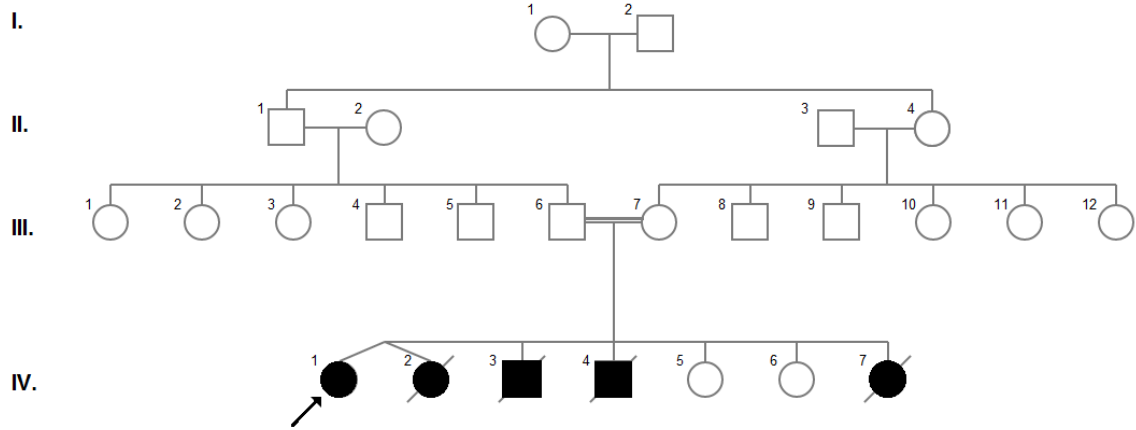
Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, Wolf D, Sprissler R, Salogiannis J, Barth-Maron A, Greenberg ME, Stuhlmann T, Weinert S, Jentsch TJ, Pazzi M, Restifo LL, Talwar D, Erickson RP, Hammer MF. .2013.'Exome sequencing reveals new casual mutations in children with epileptic encephalopathies',*Epilepsia*, 54;1-12

Tablo 1: Tüm ekzom dizileme sonrasında hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen varyantlar (fs:Çerçeve kayması; TNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi; hm: Homozigot; hz: Hemizigot; ht: Heterozigot)

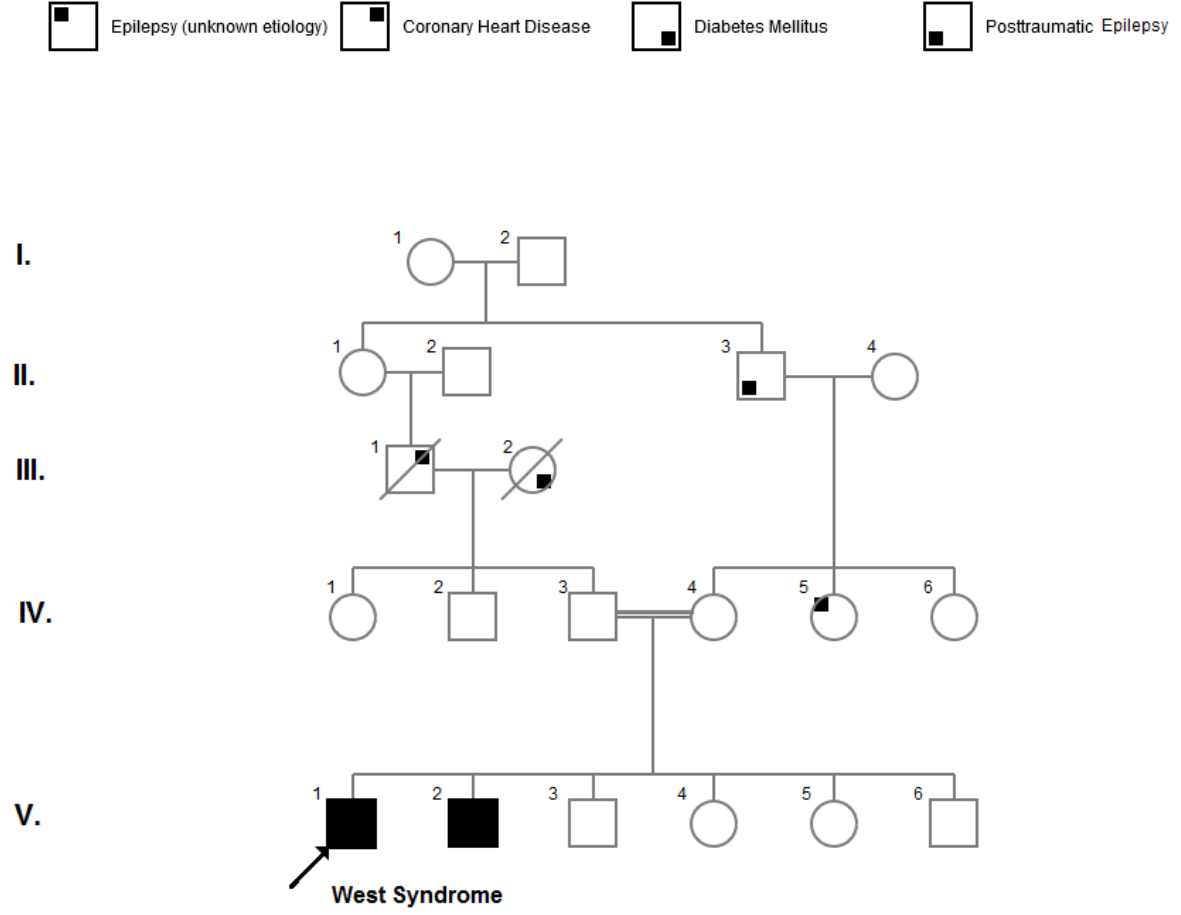
Aile	Konum	Gen	cDNA/Protein Değişikliği	Etki	İlişkili Hastalık (OMIM Numarası)
1	chr15: 52439669	GNB5	NM_006578 c.355delG	Çerçeve kayması	Kardiyak Aritmili Gelişim Geriliği (617173)

	(hm)		A119Pfs*16	delesyonu	
2	chrX: 76855894 (hz)	<i>ATRX</i>	NM_000489 c.5697+9G>A	Kırılma	Alfa Talesemi/ Mental Retardasyon Sendromu (301040); Alfa Talesemi myelodisplazi sendromu, (300448); Mental retardasyon-hipotonik yüz sendromu, (309580)
	chrX: 49104709 (hz)	<i>CCDC22</i>	NM_014008 c.1150 C>T p.R384C	Ekzonik TNP	3C Sendromu
	chrX:70389940 (hz)	<i>NLGN3</i>	NM_00116666 c.2420 G>A p.R807Q	Ekzonik TNP	X-e bağlı otizim yatkınlığı
	chr1:224927025 ve chr1:224927032 (bileşik ht)	<i>CNIH3</i>	NM_152495 c.456-6A>T ve c. 457A>T p.M153L	Bileşik heterozigot kırılma ve ekzonik TNP	
	chrX:122336604 (hz)	<i>GRIA3</i>	NM_001256743c. 385 C>G p.P129A	ekzonik TNP	X-e bağlı mental retardasyon (300699)
	chr16:1268439 (ht)	<i>CACNA1H</i>	NM_001005407 c. 5657 G>A p.R1886H		Idiyopatik jeneralize epilepsi yatkınlığı (611942) ve çocukluk çağı absans epilepsi yatkınlığı (611942)
	chr22:32229931 (ht)	<i>DEPDC5</i>	NM_001242897 c. 1901C>T p.S634F	ekzonik TNP	Değişken odaklı ailesel fokal epilepsi (604364)
3	chr16: 8870351 (hm)	<i>ABAT</i>	NM_020686 c.1269+4A>C,	Kırılma	GABA-transaminaz eksikliği (613163)

chr18: 59824440 (hm)	PIGN	NM_012327 c. 364 G>C p.E122Q	Ekzonik TNP	Çoklu Konjenital anomaliler-hipotoni- nöbetler sendromu (614080)
chrX: 23397873 (hz)	PTCHD1	NM_173495 c.517A>G p.I173V	Ekzonik TNP	X'e bağlı otizim yatkınlığı (300830)
chr11: 792932 (hm)	SLC25A22	NM_001191060 c.350A>G p.Q117R,	Ekzonik TNP	Erken Başlangıçlı Epileptik Ensefalopati (609304)



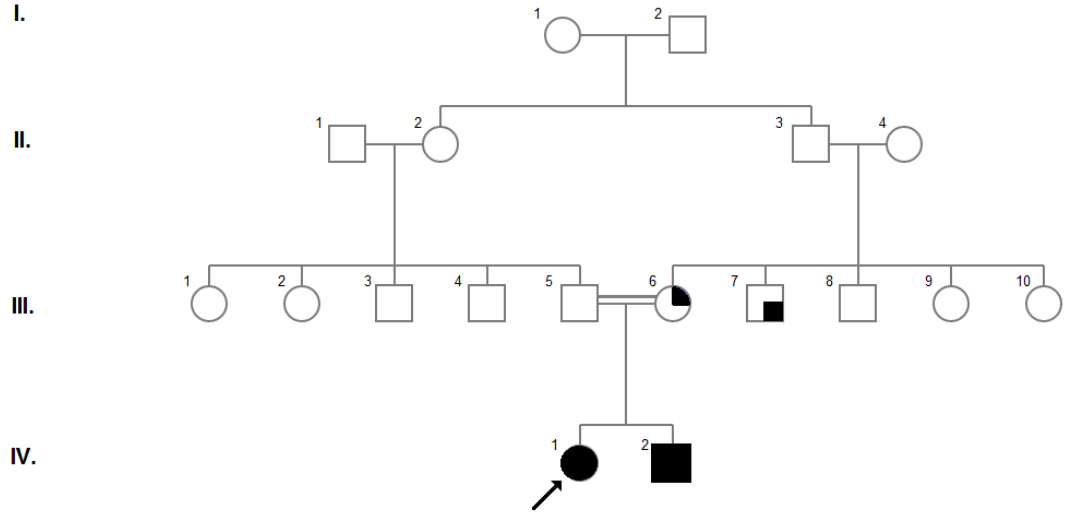
Şekil 1: 1. Ailenin soyacağı



Şekil 2: 2. Ailenin soyağacı

Early onset epileptic encephalopathy
 Wolf parkinson white syndrome

 Congenital sensorineural deafness



Şekil 3: 3. Ailenin soyağacı