

PROJE KAPANIŞ RAPORU

Proje Adı ve No.: Erken Çocukluk Çağı Epileptik Ensafalopatilerinde Tüm Ekzom Dizileme Yöntemi ile Gen Defektlerinin Belirlenmesi- SAGB-120516-0209

Yürütücü: Prof. Dr. Dilşad TÜRKDOĞAN

ÇALIŞMA BASAMAKLARI:

1- Tüm Ekzom Dizileme İşlemi :

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine sahip ve aCGH sonuçları normal çıkan 13 olguda gerçekleştirildi. Bu aşamada aşağıda tanımlanan işlem basamakları gerçekleştirildi:

1.1- Çoklu Parelel dizileme (Massively parallel sequencing)

Yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri ile genomik veriden çoklu paralel dizileme yapılarak yüksek hacimli dijital veri kısa bir süre içinde elde edilebilmektedir. Bu yeni teknolojinin temel noktası, birçok dizileme reaksiyonunu eş zamanlı yaparak birim zamanda daha fazla sonuç elde edebilmesidir. Bu nedenle bu sistemler yüksek verimli (high-throughput) sistemler olarak da bilinmektedir.

1.2.Tüm Ekzom dizileme ve analiz

Tüm ekzom dizileme, genomik DNA'nın sadece kodlayan bölgelerinin prob - yakalama (capture) teknolojisi ile elde edilerek, YND cihazlarında dizilenmesidir. Ekzon bölgelerinin yakalanması amacı ile K40, K74, K111, K112, K206, K300, K301, K302, K303 nolu hastalarda Agilent SureSelect V5 kiti ve K304, K305, K306 ve K307 nolu hastalarda Sophia WES V1 kiti kullanılmıştır.

Örnek hazırlama aşamasından sonra, ortalama 300 uzunlukta elde edilen DNA parçaları Illumina NovaSeq cihazı ile her iki uçtan (pair-end) 150 bp olarak dizilenmiştir. Ham veri Sophia DDM® veri analizi platformu aracılığı ile analiz edilmiştir. Hizalama ve varyant bulma işlemleri Sophia Genetics'in tescilli bir temel algoritması olan Pepper® tarafından hg19 insan genom referansına göre gerçekleştirilmiştir. Hizalama sonrası her bir örnek için okuma kalitesini içeren bilgiler aşağıdaki Tablo 1 ve 2'de sunulmuştur.

Genomik DNA parçalarının insan referans genomuna hizalama işlemi sonrasında elde edilen dosya BAM formatındadır. BAM formatındaki verinin görselleştirilmesi amacı ile Integrative Genomics Viewer (IGV) yazılımı kullanıldı (1).

2- Varyantların Analizi:

Hizalama işleminden sonra, tekli nükleotid değişimlerinin (SNP) ve küçük INDEL (insersiyon-delesyon) tespiti ve anotasyonu yapıldı. Varyant bulma ve anotasyon işlemleri Sophia Genetics'in MOKA® yazılımı ile gerçekleştirildi ve her bir varyant için varyantın protein dizilimi üzerindeki etkisi (missense, stop gain vs), çeşitli popülasyonlardaki (1000G,Exac,ESP) görülme sıklığı, tahminleme algoritmaları (SIFT,PolyPhen) ile varyantın yıkıcılık etkisi gibi bilgiler eklendi. Hastalık etkeni olabilecek varyantların filtrelenmesi Sophia DDM yazılımı üzerinde gerçekleştirildi. Ayrıca varyant analizine, PROVEAN, HGMD ve Clin Var tahmin araçları da eklendi. Akraba evliliği olan ailelerde, hasta bireyin anne-babadan aldığı ortak haplotipi analiz etmek amacı ile homozigotluk haritalaması HomSI yazılımı ile yapıldı (2) .

Tüm ekzom dizileme sonucu 25X okuma derinliği açısından değerlendirildiğinde %94.22'sinin bu açıdan analize uygun olduğu saptanmıştır. Yapılan analizde yüksek olasılıkla protein üzerine etkisi olacağı düşünülen small insersiyon ve delesyon (küçük insersiyon ve delesyon), frameshift (çerçeve kayması mutasyonları), nonsense (erken dur kodonu oluşumu ile güdük protein oluşumuna sebep olan mutasyonlar), missense (aminoasit değişikliği yaratan nokta mutasyonlar), splice-site (splicingi bozan mutasyonlar) ön planda değerlendirilmiş olup filtreleme kriteri olarak ESP, 1000G ve EXAC veri tabanlarında sıklığı %1'in altında olan nadir varyantlar incelemeye alınmıştır.

Filtreleme adımları ve bu işlemler sonucunda geriye kalan varyant bilgileri Tablo 3' te sunulmuştur.

Tablo1 : Örnek Başına Okuma Sayısı İstatistikleri

Örnek	Okuma Sayısı		
	Toplam	Hizalanan	Hizalanan yüzdesi
K40	40,168,218	39,828,611	99.15%
K74	46,475,924	46,088,304	99.17%
K112	45,299,292	44,933,610	99.19%
K206	44,462,772	44,035,516	99.04%
K302	49,260,952	48,797,266	99.06%
K303	46,998,836	46,603,125	99.16%
K111	58,220,514	57,729,529	99.16%
K300	49,260,952	48,797,266	99.06%
K301	46,998,836	46,603,125	99.16%

K304	127,496,868	123,214,483	96.64%
K305	136,348,900	132,129,280	96.91%
K306	91,496,916	89,388,892	97.7%
K307	78,060,906	76,507,207	98.01%

Tablo 2 : Hedef Bölge Okuma Derinliği İstatistikleri

Örnek	Hedef Bölge Okuma Derinliği		
	25×	50×	100×
K40	86.87%	61.24%	19.02%
K74	89.90%	69.10%	27.84%
K112	89.20%	67.60%	26.04%
K206	88.78%	66.23%	24.69%
K302	92.68%	76.14%	39.26%
K303	90.95%	72.21%	33.29%
K111	94.22%	81.68%	50.03%
K300	92.68%	76.14%	39.26%
K301	90.95%	72.21%	33.29%
K304	99.48%	69.58%	79.34%
K305	99.33%	96.92%	82.15%
K306	98.38%	92.75%	72.49%
K307	98.62%	91.98%	67.43%

Tablo 3 : Varyant Filtreleme Adımları

Filtreleme Adımları	Örnek			
	K40	K74	K112	K206
Toplam varyant (okuma sayısı ≥5)	96460	104308	102430	95455

GMAF <0.01 in 1000Genome, ExAC ve ESP5400	11721	12796	12658	11583
Çeşitli hastalıklardan oluşan in-house exome veri tabanında e (n = 20) bulunmayan	4906	5433	5389	4793
Fonksiyon kaybı yapan (Frameshift/in-frame INDEL, missense, nonsense, no start or splicing, exon±25)	852	786	1144	992
Hastalık ilişkili gen (n=63)	1	1	1	1

Filtreleme Adımları	Örnek								
	K111	K300	K301	K302	K303	K304	K305	K306	K307
Toplam varyant (okuma sayısı ≥5)	96612	91143	93438	89139	112967	128897	118599	113265	126883
GMAF ≤0.01 in 1000Genome, ExAC ve ESP5400	9028	8495	8463	8006	10847	17191	15712	13938	16686
Çeşitli hastalıklardan oluşan in-house exome veri tabanında e (n = 20) bulunmayan	757	844	732	802	738	1782	1665	1278	1466
Fonksiyon kaybı yapan (Frameshift/in-frame INDEL, missense, nonsense, no start or splicing, exon±25)	1606	1661	1368	1433	1623	3908	3726	2911	2941
Varyant Frekansı ≥ %10 (Yalancı pozitif elemesi)	714	761	709	761	686	1200	1062	1018	1001
OMIM veri tabanında tanımlı genlerde	556	569	559	595	535	865	808	759	828
Aday varyant	1	3	3	2	2	2	2	3	3

3-Varyantların Sanger dizileme tekniği ile değerlendirmesi:

Tüm ekzom dizileme işlemi gerçekleştirilen 13 hastada fenotiple ilişkili farklı nadir varyantlar bulundu ve Sanger doğrulaması ile aile içi dağılım da yapıldı. Olguların aile ağaçları ve varyantların dağılımı ile in silico tahmin araçlarına göre analizleri Tablo 4'de verildi.

TÜM ÇALIŞMA BASAMAKLARI SONUCU ELDE EDİLEN BULGULAR:

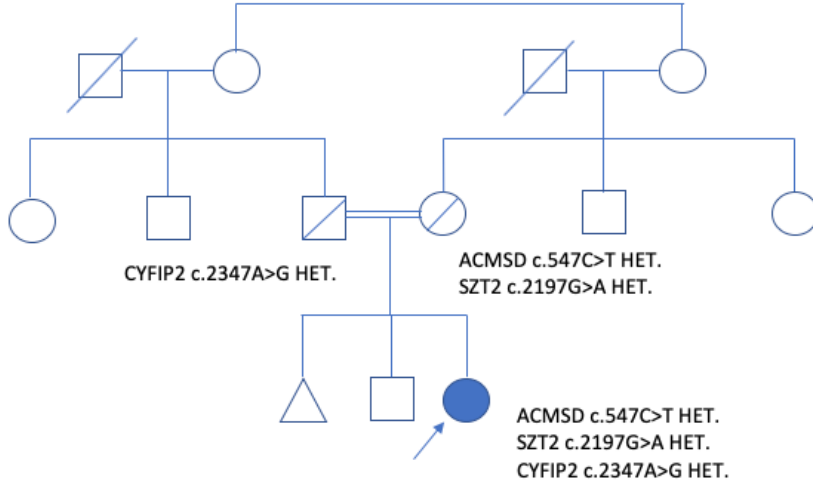
1-Olgu K40: Hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 2 nadir varyant tesbit edildi (Tablo 4):

1- SCN2A (MIM:613721) geninde heterozigot (NM_001040142) nadir bir varyant olup Clinvar ve HGMD'de tanımlanmamıştı. Segregasyon analizinde aynı varyasyon sağlıklı annede de heterozigot olarak saptandı. Bu sebeple hastalıkla ilişkili olmadığı düşünüldü.

2- CYFIP2 geninde c.2347A>G (p.Ile783Val) heterozigot (NM_001037333) bir varyant olup Clinvar ve HGMD'de tanımlanmamış bir mutasyondur. Segregasyon analizinde aynı varyasyon sağlıklı babada da heterozigot olarak saptandı. Bu nedenle klinik bulguları ile ilişkili olmadığı düşünüldü.

3- ACMSD geninde heterozigot c.547C>T (p.Arg183*) varyasyonu saptandı. Varyasyon Clinvar ve HGMD'de tanımlanmamış olup popülasyon veri tabanlarında da bulunmuyordu. Ancak stop kodon oluşturması sebebiyle varyasyonun protein üzerinde etkili olabileceği öngörüldü. Ayrıca OMIM'de tanımlı bir fenotipi olmayan gen, Pubmed'de "The ACMSD gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism." yayınında epilepsi ile ilişkilendirildiği için ebeveynlerden de segregasyon analizine gidildi. Ancak varyasyon sağlıklı annede de saptandığı için fenotipi açıklayamacağı düşünüldü.

Aile ağacı ve varyantların aile için dağılımı Şekil 1'de görülmektedir

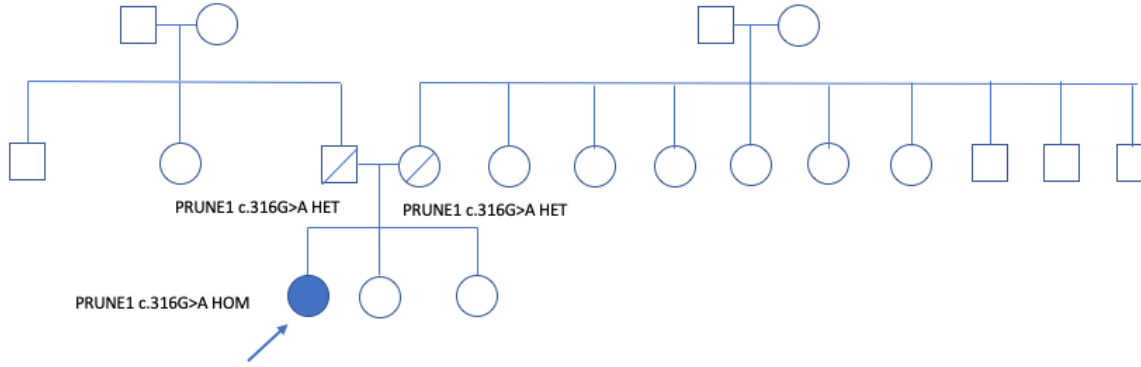


Şekil 1: Olgu K40'ın aile ağacı ve varyantların aile için dağılımı

2-Olgu K74: Hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 2 nadir varyant tesbit edildi (Tablo 4):

1-GABRD geninde c.847+4 C>T heterozigot (NM_000815) nadir bir varyant olup Clinvar ve HGMD'de tanımlanmamış bir mutasyondur. Segregasyon analizinde aynı varyasyon sağlıklı annede de heterozigot olarak saptandı. Bu sebeple hastalıkla ilişkili olmadığı düşünüldü.

2-PRUNE1 geninde c.316G>A (p.Asp106Asn) (NM_021222) homozigot mutasyonu saptandı. Bu varyant Clinvar ve HGMD'de tanımlanmış olup "Neurodevelopmental disorder with microcephaly, hypotonia, and variable brain anomalies" (MIM: 617413) fenotipi ile ilişkilendirilmişti (3) . Bu olgu da Türkiye'den bildirilmişti. Segregasyon analizinde aynı mutasyon için ebeveynler ve sağlıklı kardeş heterozigottu (Şekil 2). Ayrıca hasta olguda homozigot varyant doğrulandı. Böylece hastanın moleküler genetik tanısı konmuş oldu. Bizim olgumuzun fenotipinde epileptik ensefalopati olması ve beyin anomalilerinin olmaması özgün bir özellik göstermekteydi.

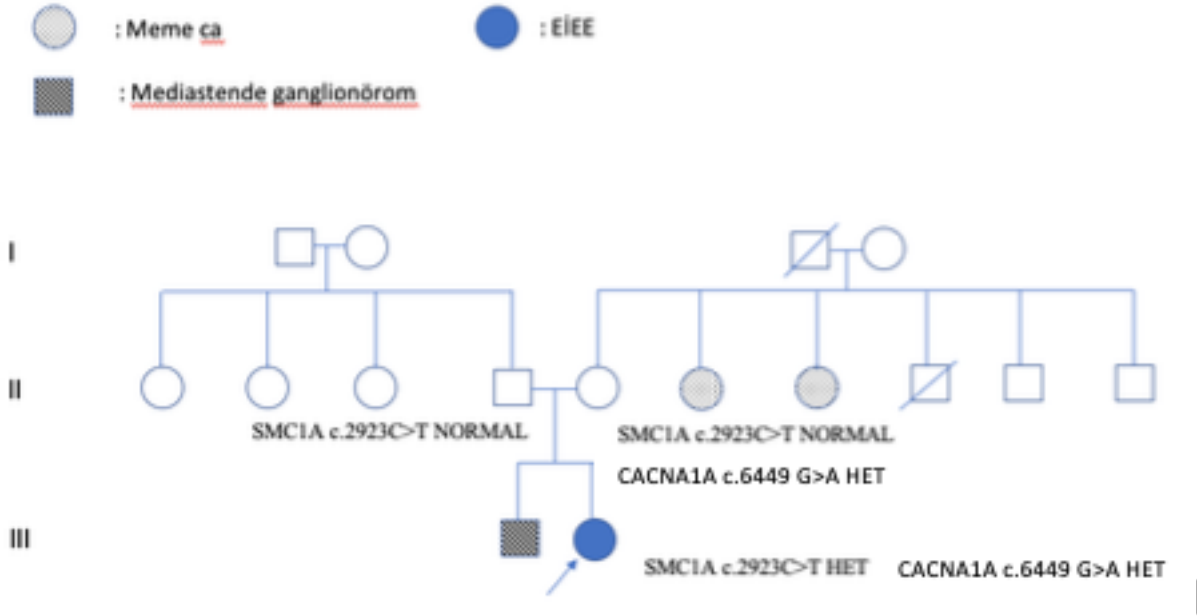


Şekil 2: Olgu K70'in aile ağacı ve varyantların aile için dağılımı

3-Olgu K112: Hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 2 nadir varyant tesbit edildi (Tablo 4):

1-CACNA1A geninde heterozigot c.6449 G>A (NM_000068) nadir bir varyant saptandı. Bu varyant Clinvar ve HGMD'de tanımlanmamıştı. Segregasyon analizinde aynı varyasyon sağlıklı annede de heterozigot olarak saptandı. Bu sebeple hastalıkla ilişkili olmadığı düşünüldü.

2-SMC1A geninde heterozigot c.2923C>T (p.Arg975*) (NM_006306) mutasyonu saptandı. Bu mutasyon Clinvar ve HGMD'de tanımlanmış olup "epilepsy, early onset, with cluster seizures" ile ilişkilendirilmişti (3). Segregasyon analizi sonucunda mutasyonun de novo olduğu gösterildi. X'e bağlı dominant kalıtım göstermesi ve kliniğin uyumlu olması sebebiyle hastalıktan sorumlu mutasyonun bu olduğu düşünüldü. Böylece hastanın moleküler genetik tanısı konmuş oldu. Epilepsi fenotipi de tanımlanan olguya belirgin benzerlik göstermekteydi (4). Ayrıca farklı dismorfik özellikleri de vardı.



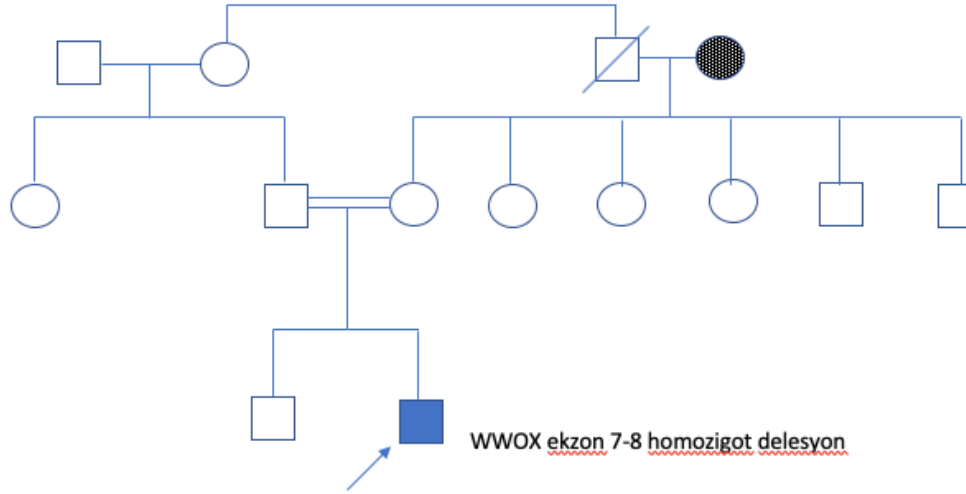
Şekil 3: Olgu K112'in aile ağacı ve varyantların aile için dağılımı

4. Olgu K206. Hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 2 nadir varyant tesbit edildi (Tablo 4):

1-ARX geninde 25031550-2503850 hemizigot delesyon (NM_139058) saptandı. Ancak MLPA analizi ile doğrulanamadı.

2-WWOX geninde homozigot ekzon 7-8 delesyonu (NM_016373) saptandı (Şekil 4). Diğer örneklerde aynı bölgede böyle bir değişiklik olmaması nedeniyle bu delesyonun teknik bir sorundan kaynaklanmadığı kabul edildi. MLPA analizi delesyonu doğrulandı. Bu delesyon Clinvar ve HGMD'de tanımlanmış olup "epileptic encephalopathy, early infantile, 28; EİEE28" ile ilişkilendirilmişti (5) ve klinik bulgularla tam örtüşmekteydi. Böylece hastanın moleküler genetik tanısı kondu.

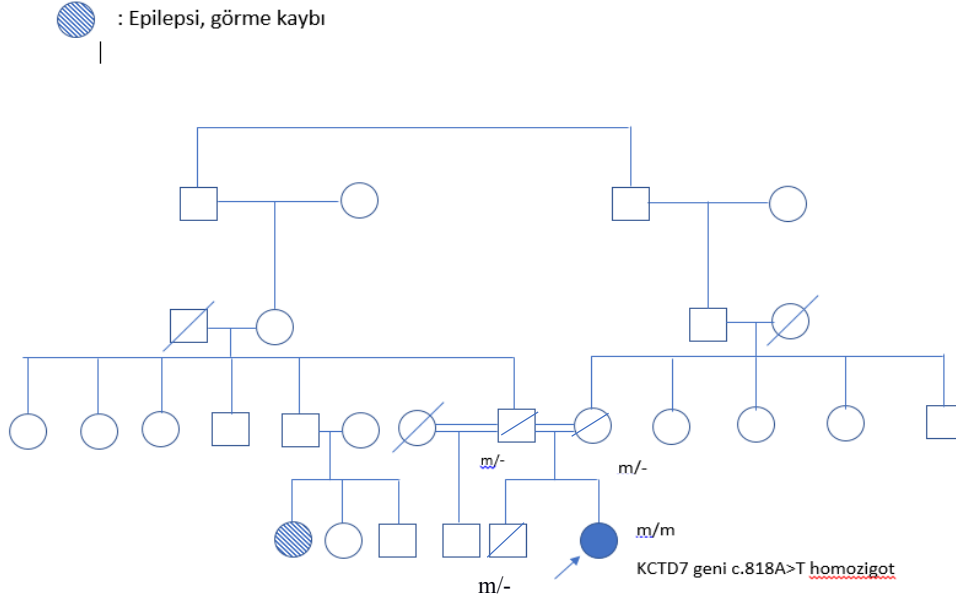
● : Epilepsi ■ : EİEE



Şekil 4: Olgu K260'ın aile ağacı ve varyantların dağılımı

5. Olgu K111: Hastanın kliniğinde ilerleyici ataksi, serebellar bulgular, ilaca dirençli miyoklonik olmak üzere farklı nöbetler ve radyolojik olarak ilerleyici serebellar atrofi vardı. Elektron mikroskopisi incelemesinde periferik duysal sinirde osmofilik granüller tesbit edildi ve 'Ceroid Lipofuskinosis' ön tanısı kondu. Yapılan analiz sonucunda hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde KCTD7 (MIM:611725) geninde homozigot c.818A>T (p.Asn273Ile) (NM_001167961) nadir bir varyant saptandı (Tablo 4). Hastaya yapılan homozigotluk analizi sonuçlarında ilgili varyantı da içine alan geniş bir homozigot variant bölge (Chr7: 36-70 Mbp) tespit edildi. Bu varyant Clinvar ve HGMD'de tanımlanmış bir mutasyondur. Saptanan bu mutasyon, daha önce yayınlanmış ve Ceroid Lipofuskinosis Nöronal (CLN14) (MIM: 611726) olarak tanı konmuş ve yine Türk ailelerinden N27 ve N41 no.lu ailelerde de gösterilmiş idi (6). Bu varyantın klinik tabloyu

kesinlikle açıklaması nedeniyle doğrulama ve aile içi dağılımın araştırılması için Sanger dizilemesi yapıldı. Homozigot varyant olguda doğrulandı, anne baba ve 2 kardeşi de taşıyıcı olarak bulundu (Şekil 5). Böylece hastanın moleküler genetik tanısı konmuş oldu.



Şekil 5: Olgu K111' in aile ağacı ve varyantların aile içi dağılımı

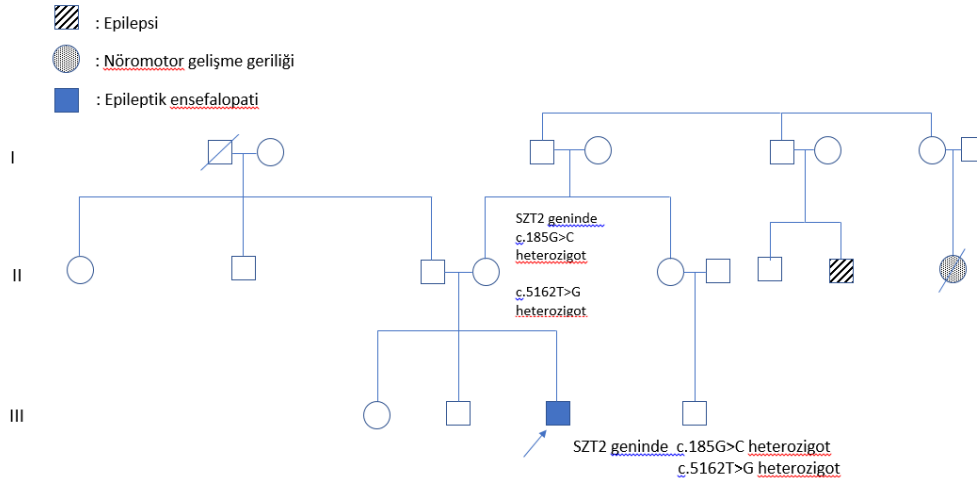
6. Olgu K300: Hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 3 farklı gende 4 nadir varyant bulundu (Tablo 4):

1- SZT2 (MIM:615463) geninde heterozigot c.185G>C ve heterozigot c.5162T>G varyasyonları saptandı (Tablo 4). Tahmin araçlarının bir kısmında hastalık yapıcı ya da tahrip edici idi (Tablo 4).

2- EHMT1 geninde heterozigot c.407C>G ve

3-MBD5 geninde heterozigot c.4358A>G varyasyonları saptandı. Bu 2 varyant da tahmin araçlarının bir kısmında hastalık yapıcı ya da tahrip edici idi (Tablo 4). Segregasyon analizinde her dört varyant annede saptanmış olup (Şekil 6), klinik açıdan annenin sağlıklı olması sebebiyle varyasyonların patojenitesi hakkında net bir yorum yapılamadı. Analiz edilen diğer genlerde herhangi bir mutasyona rastlanmadı.

Akraba evliliği olmayan bu hasta için yapılan homozigotluk haritalaması sonucunda, homozigot bölge tespit edilemedi. Hasta nadir varyantları da heterozigot olarak görülmektedir. Bu durumda hastada homozigot resesif geçişli bir varyant değil, birleşik heterozigotluk ya da digenik etkili bir sonuç beklenmektedir.



Şekil 6: Olgu K300'ün aile ağacı ve varyantların dağılımı

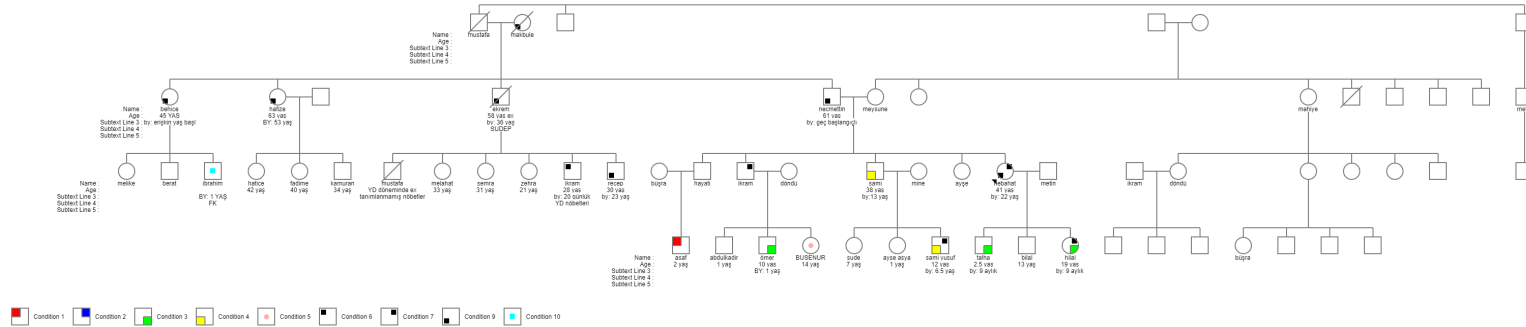
7. Olgu K301: Sık ve yakın akraba evlilikleri olan ve sıklıkla fokal epilepsiler (11 olgu), 1 olguda sadece febril konvülsiyon olan geniş bir ailenin EBEE fenotipinde olan tek olgusu idi (Şekil 7). Ailede hakim olarak görülen ailevi fokal epilepsi tanısı nedeni ile, en çok ilişkili 2 gen (KCNT1, DEPDC5) incelendi. Ancak etkili olabilecek bir varyant bulunamadı. Daha sonra fokal epilepsi ile ilişkilendirilmiş 24 gen (CHRNA2, CHRNA4, CHRNB2, DEPDC5, GRIN2A, GRIN2B, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, LGI1, MIOS, NPRL2, NPRL3, NTRK2, PCDH19, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN8A, SEC13, TBC1D24, WDR24, WDR59) analiz edildi. Etkili bir varyant bulunamadı.

Diğer epilepsy genleri ile ilgili nadir varyantlar incelenerek hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 3 farklı gende 3 nadir varyant bulundu (Tablo 4):

1- DOCK7 geninde homozigot c.3257T>A (p.Leu1086*) (NM_014141) trunkasyon mutasyonu saptandı (Tablo 4) (Şekil 7). Mutation Tester'a göre hastalık yapıcı bu mutasyonun. Sanger dizilemesi ile aile içi dağılım analizi de yapılmış olup anne ve babanın aynı mutasyon için taşıyıcı oldukları saptanmıştır (Şekil 7).

DOCK7 geninde EBEE23 (MIM: 615859) adlı klinik tablo ile ilişkilendirilmiş sadece bir yayın olup akraba olmayan 3 kız kardeşte bileşik heterozigot trunkasyon mutasyonları tanımlanmıştır (7). Olguların fenotipi olgumuzla tam uymakta olup genetik geçişi ile de tanı koydurucudur. Fokal epilepsisi olan halada ve kızında bu varyant tesbit edilmedi. Ayrıca bu iki amcanın ikiyeş çocuklarında aynı varyasyon analiz edildi ve normal saptandı. Bu verileri projemizin çalışma aşamasında yayınladık (8).

1522061744208-petek family
2018-03-26



Şekil 7: Olgu K301'in aile ağacı ve varyantın dağılımı

2- CNTNAP2 geninde in silico analizlerde hastalık yapıcı olan heterozigot varyant tesbit edildi (Tablo 4). CNTNAP2/ NM_014141; heterozigot varyantı sağlıklı baba ve fokal epilepsisi olan halada ve epilepsisi olan oğlunda saptandı. Fokal epilepsisi olan amcalarda ve ailenin fokal epilepsili diğer aile üyelerinde ise bu varyant saptanmadı (Şekil 7). Bu gen ile ilişkili epilepsi tablosunun resesif bir kalıtım göstermesi ve segregasyon analizinin uyumlu olmaması nedeniyle de kliniği açıklayıcı olmadığı düşünüldü.

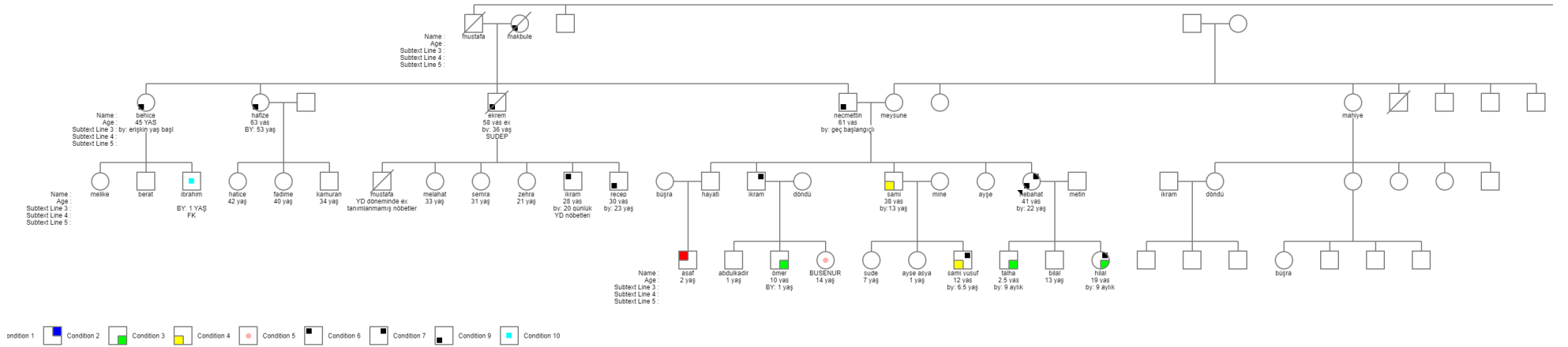
3-SCN9A geninde heterozigot c.2384T>C (p.Val795Ala) varyasyonu saptandı. İn silico analizlerde hastalık yapıcı olduğu öngörülen heterozigot varyant sağlıklı bireylerde (sağlıklı yengede ve EEG anomali olan hasta kızında heterozigot) de tesbit edildi (Tablo 4). Fokal epilepsisi olan amcalar ve onların epilepsi tanımlı çocuklarında bu varyant tespit edilmedi. Segregasyon analizinin uyumlu olmaması sebebiyle varyasyonun kliniği açıklayıcı olmadığı öngörüldü.

8. Olgu K302

Yapılan analiz sonucunda hastanın klinik bulguları ve aile ağacı analizi ile birlikte değerlendirildiğinde 2 gende anlamlı varyant bulundu:

Ailede hakim olarak görülen ailevi fokal epilepsi tanısı nedeni ile fokal epilepsi ile ilişkilendirilmiş 24 gen (KCNT1, DEPDC5, CHRNA2, CHRNA4, CHRNA2, DEPDC5, GRIN2A, GRIN2B, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, LGI1, MIOS, NPRL2, NPRL3, NTRK2, PCDH19, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN8A, SEC13, TBC1D24, WDR24, WDR59) ve daha sonra tüm nadir varyantlar analiz edildi. Fenotiple uyumlu bir varyant bulunamadı.

1744208-petek family
-26



Şekil 9: Olgu K303 aile ağacı ve varyantların dağılımı

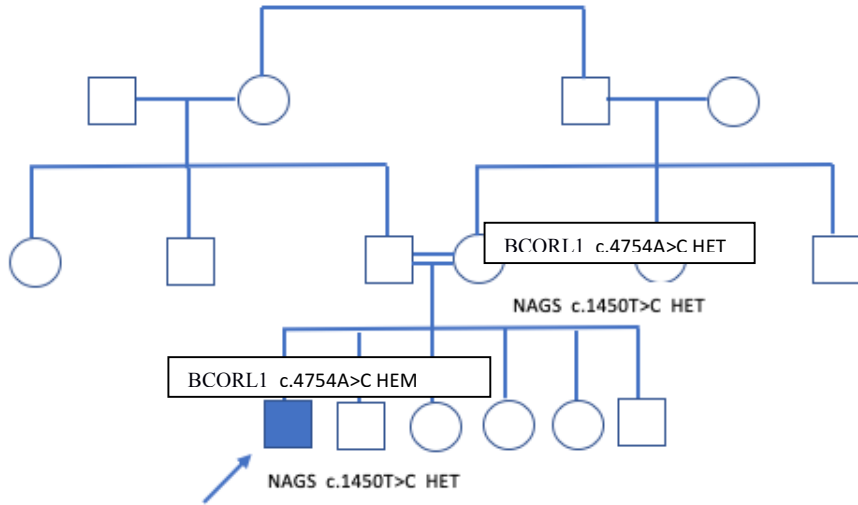
10. Olgu K304:

Yapılan analiz sonucunda;

1- NAGS geninde heterozigot c.1450T>C (p.Trp484Arg) mutasyonu saptandı (Tablo 4). Mutasyon HGMD veri tabanında hastalıkla ilişkili mutasyon ve Clinvar veri tabanında ise patojenik olarak tanımlıdır (9). NAGS geni mutasyonları OMIM veri tabanında otozomal resesif N-asetilglutamat sentaz eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce literatürde genin promotor ve enhancer bölgelerinde mutasyonlar

tanımlanmış ve hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Hastada 2. Mutasyonun gösterilebilmesi amacıyla NAGS geni promoter ve enhancer bölge Sanger dizilemesi yapıldı. Ancak patolojik varyant bulunamadı. Hastalık resesif olarak tanımlandığı için olgumuzun durumunu açıklamamaktaydı. Ancak olası ikinci mutasyonun derin intronik, UTR bölgeleri ya da gross insersiyon ya da delesyon mutasyonu şeklinde olma olasılığı bulunduğu ve bu açıdan WGS ve ekzon array ile araştırılmasının gerekli olduğu düşünüldü.

2- BCORL1 geninde hemizigot c.4754A>C (p.Gln1585Pro) varyasyonu saptandı (Tablo 4). Varyasyon popülasyon çalışmalarında nadir olarak bildirilmiş bir varyant olmakla birlikte HGMD ya da Clinvar'da herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemişti. OMIM'de gen ile ilişkili bir fenotip olmamakla birlikte Pubmed'de "Variants in the transcriptional corepressor BCORL1 are associated with an X-linked disorder of intellectual disability, dysmorphic features, and behavioral abnormalities." yayını mevcuttu. İn-silico analizlerde varyasyonun patojenitesi hakkında çelişkili sonuçlar bulunmakla birlikte, olgunun bazı klinik bulgularını açıklayabileceği düşünülerek anne ve olgudan Sanger doğrulaması istendi. Sanger analizinde saptanan varyasyon için annenin heterozigot, olgunun hemizigot olduğu gösterildi. Annenin X'e bağlı hastalık olması sebebiyle klinik göstermiyor olabileceği düşünüldü.



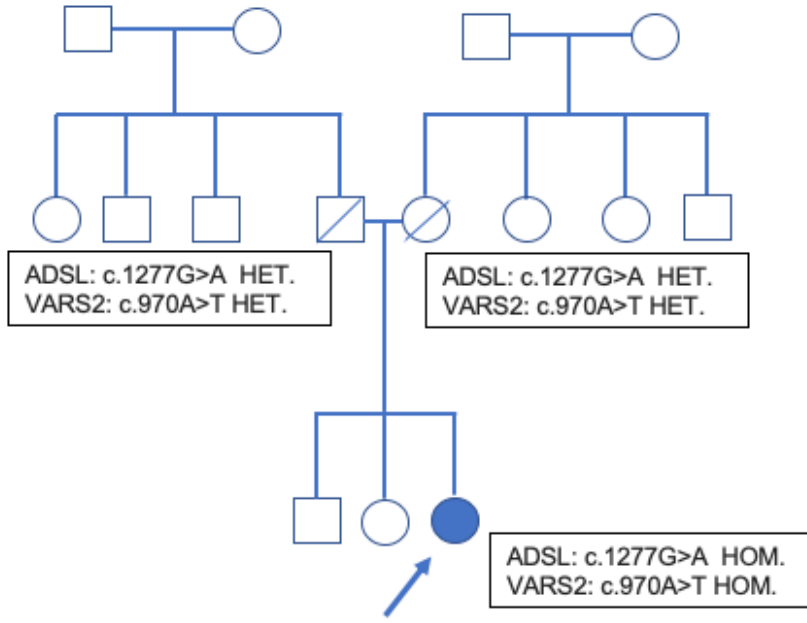
Şekil 10. Olgu K304 aile ağacı ve varyantların dağılımı

11. Olgu K305:

Yapılan analiz sonucunda 2 gende homozigot mutasyonlar saptandı ve saptanan varyasyonlar Sanger yöntemi ile doğrulanmış olup segregasyon analizinde sağlıklı anne ve babanın mutasyonları heterozigot olarak taşıdıkları saptanmıştır.

1- ADSL geninde homozigot c.1277G>A (p.Arg426His) mutasyonu saptandı. (Tablo 4). Mutasyon HGMD veri tabanında hastalıkla ilişkili mutasyon ve Clinvar veri tabanında ise patojenik olarak tanımlıdır (10). ADSL geni mutasyonları OMIM veri tabanında otozomal resesif Adenylosuccinase deficiency ile ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonun hastalık ile ilişkili olduğu kabul edildi.

2- VARS2 geninde homozigot c.970A>T (p.Ile324Phe) varyasyonu saptandı. Saptanan varyasyon ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak değerlendirilmektedir. Varyasyona popülasyon çalışmalarında (1000G, ExAC, ESP, gnomAD) daha önce hiç rastlanmamıştır. VARS2 geni mutasyonları OMIM veri tabanında otozomal resesif Combined oxidative phosphorylation deficiency type 20 ile ilişkilendirilmiştir (#615917). Fenotipte progressive external ophthalmoplegia, ptosis, and ataxia ve 1 olguda nöbet tanımlanmıştır. Ayrıca beyin MRG'da ilerleyici ak madde tutulumu vardır. Olgumuzda klinik bulgular ilerleyici olmayıp, radyolojik bulgu yoktur.



Şekil 11. Olgu K305 aile ağacı ve varyantların dağılımı

12. Olgu K306:

Yapılan analiz sonucunda 3 gende mutasyonlar saptandı:

1- NALCN geninde homozigot c.3954+1G>A varyasyonu saptanmıştır (Tablo 4). Saptanan varyasyon ACMG kriterlerine göre patojenik olarak değerlendirilmektedir. Varyasyona popülasyon çalışmalarında (1000G, ExAC, ESP, gnomAD) daha önce hiç rastlanmamıştır. NALCN geni mutasyonları OMIM veri tabanında otozomal resesif “Hypotonia, infantile, with psychomotor retardation and characteristic facies 1” ilgili fenotipi ile ilişkilendirilmiş olup hastamızın klinik bulguları ve dismorfik özellikleri (üçgen yüz, mikrognati, düşük yerleşimli ve büyük kulaklar, geniş ağız, ince üst dudak) fenotiple örtüşmektedir (11). Sanger yöntemi ile segregasyon analizinde bu varyant olguda

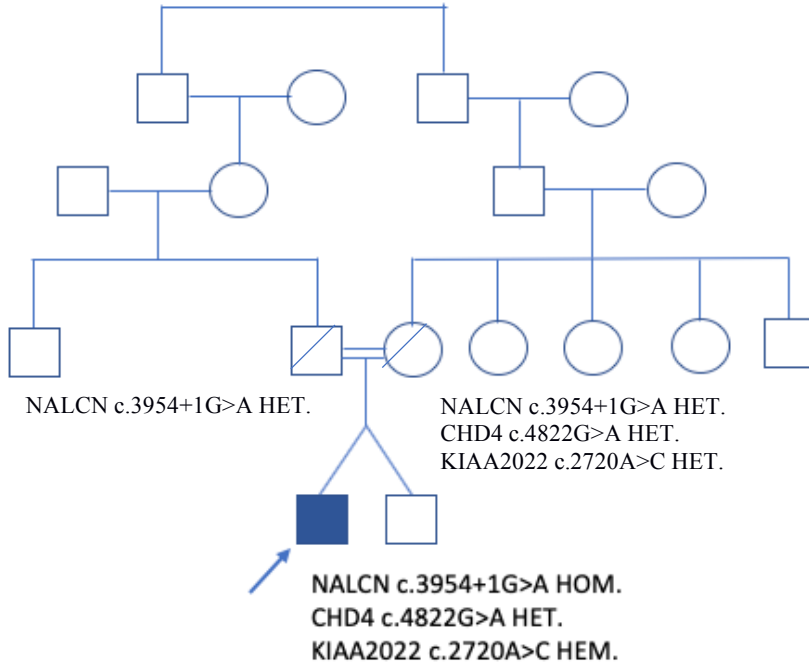
doğrulanmış ve sağlıklı anne ve babanın mutasyonları heterozigot olarak taşıdıkları saptanmıştır. Bu nedenlerle olgumuzun fenotipini açıklayan bu varyant hastalık ile ilişkili olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca olguda aşağıdaki 2 genetik varyasyon daha saptanmıştır. Ancak klinik tablo ile uyumlu görüşmemiştir:

2- KIAA2022 geninde hemizigot c.2720A>C (p.Glu907Ala) varyasyonu saptanmıştır. Sanger yöntemi ile segregasyon analizinde bu varyant olguda doğrulanmış ve sağlıklı annenin mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı saptanmıştır. Saptanan varyasyon ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak değerlendirilmektedir. Varyasyona popülasyon çalışmalarında ExAC ve ESP'de 1 hemizigot olgu daha önce hiç bildirilmiştir. KIAA2022 geni mutasyonları OMIM veri tabanında X'e bağlı mental retardasyon tip 98 ile ilişkilendirilmiştir (12). İn-silico analizlerde varyasyonun hastalık yapıcı olmadığı öngörülmektedir. Bu gen varyantları ile ilişkilendirilen dismorfik özelliklerin bir kısmı (yuvarlak yüz, kısa filtrum, kısa burun, öne dönük burun delikleri, belirgin nazal köprü) hastamızda yoktur.

3- CHD4 geninde daha önce literatürde konjenital kalp hastasında tanımlanmış (13) ve patojenik olarak Clinvar veri tabanında bildirilmiş olan heterozigot c.4822G>A (p.Val1608Ile) mutasyonu saptanmıştır. Ancak olgunun konjenital kalp hastalığı bulunmamaktadır. Ayrıca varyasyonun in-silico analizleri hastalık yapıcı olmadığı yönündedir. ACMG kriterlerine göre varyant klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak değerlendirilmektedir. Segregasyon analizinde de anne heterozigot olarak saptanmıştır.

K-306



Şekil 12. Olgu K306 aile ağacı ve varyantların dağılımı

13. Olgu K307:

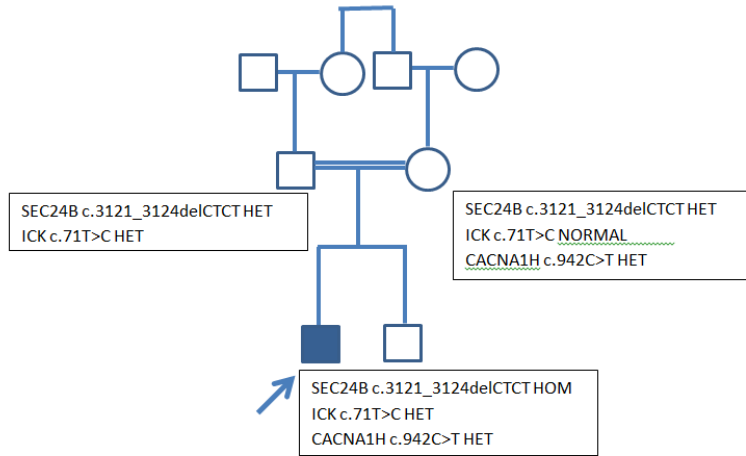
Yapılan analiz sonucunda 3 gende mutasyonlar saptandı:

1- CACNA1H geninde heterozigot c.942C>T (p.Pro341Pro) varyasyonu saptanmıştır (Tablo 4). Saptanan varyasyon ACMG kriterlerine göre klinik önemi belirsiz varyasyon (VUS) olarak değerlendirilmektedir. Varyasyona popülasyon çalışmalarında (1000G, ExAC, ESP, gnomAD) daha önce hiç rastlanmamıştır. İn-silico analizlerde varyasyonun hastalık yapıcı olduğu öngörülmektedir. CACNA1H geni mutasyonları

OMIM veri tabanında “Epilepsy, idiopathic generalized, susceptibility to, 6” (#611942) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Segregasyon analizinde aynı varyant annede de saptanmıştır. Bu sebeple varyasyonun kliniği açıklamadığı düşünülmüştür.

2-ICK geninde heterozigot c.71T>C (p.Ile24Thr) varyasyonu saptanmıştır. Saptanan varyasyon ACMG kriterlerine göre klinik önemi belirsiz varyasyon (VUS) olarak değerlendirilmektedir. Varyasyona popülasyon çalışmalarında (1000G, ExAC, ESP, gnomAD) daha önce hiç rastlanmamıştır. İn-silico analizlerde varyasyonun hastalık yapıcı olmadığı öngörülmektedir. ICK geni mutasyonları OMIM veri tabanında “Epilepsy, juvenile myoclonic, susceptibility to, 10” (#617924) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Segregasyon analizinde aynı varyant sağlıklı annede de saptanmıştır. Bu sebeple varyasyonun kliniği açıklamadığı düşünülmüştür.

3- SEC24B geninde homozigot c.3121_3124delCTCT (p.Leu1041Metfs*29) varyasyonu saptanmıştır. (Tablo 4) Saptanan varyasyon ACMG kriterlerine göre klinik önemi belirsiz varyasyon (VUS) olarak değerlendirilmektedir. Varyasyona popülasyon çalışmalarında (1000G, ExAC, ESP, gnomAD) daha önce hiç rastlanmamıştır. İn-silico analizlerde varyasyonun hastalık yapıcı olduğu öngörülmektedir. SEC24B geni mutasyonları OMIM veri tabanında herhangi bir fenotiple ilişkilendirilmemiştir. Ancak literatüre bakıldığında temporal lobe epilepsisi ve hipokampal sklerozu olan olgularda SEC24B geninde nadir varyasyonlara rastlandığı bildirilmiştir (14). Bu varyant için segregasyon analizinde ebeveynlerin heterozigot , olgumuzun ise homozigot olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı kardeşte segregasyon devam etmektedir.



Tablo 4: Olgularda bulunan varyantların in-silico ve diğer veri tabanlarına göre analizleri

Tahmin araçları	K40		K40	K74		K112		K206	
	SCN2A: c.2197G>A (p.Ala733Thr) heterozigot	CYFIP2: c.2347A>G (p.Ile783Val) NM_001037333 heterozigot	ACMSD: c.547C>T (p.Arg183*) NM_001237865 heterozigot	GABRD: intron 7 (C.847+4 C>T) heterozigot	PRUNE: c.316G>A (p.Asp106Asn) NM_021222 homozigot	CACNA1A: c.6449 G>A) NM_000068 heterozigot	SMC1A: c.2923C>T (p.Arg975*) NM_006306 heterozigot		WWOX: Ekzon 7-8 NM_016373 Homozigot delesyon
ExAC	Tanımlı değil	Nadir variant (MAF <0.01)	Tanımlı değil	Nadir variant (MAF <0.01)	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil		Tanımlı değil
1000G	Tanımlı değil	Nadir variant (MAF <0.01)	Tanımlı değil	Nadir variant (MAF <0.01)	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil		Tanımlı değil
ESP	Tanımlı değil	Nadir variant (MAF <0.01)	Tanımlı değil	Nadir variant (MAF <0.01)	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil		Tanımlı değil
Mutation taster	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı	-	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı		-
SIFT	Tahrip edici ^b	Tahrip edici		-	Tahrip edici		-		-
POLYPHEN 2	İyi huylu ^c	Muhtemelen tahrip edici		-	Muhtemelen tahrip edici		-		-
PROVEAN	Nötral ^d	Zararlı		-	Zararlı		-		-
HGMD	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı (patojenik)	Tanımlı değil	Tanımlı (patojenik)		Tanımlı (patojenik)
Clinvar	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı (patojenik)	Tanımlı değil	Tanımlı (patojenik)		Tanımlı (patojenik)

Tahmin araçları	K111	K300		K301		
	[§] KCTD7: c.818A>T (p.Asn273Ile) homozigot	SZT2 c.185G>C (p.Ser62Thr) heterozigot	SZT2 c.5162T>G (p.Phe1721Cys) heterozigot	DOCK7 c.3257T>A (p.Leu1086*) homozigot	SCN9A c.2384T>C (p.Val795Ala) heterozigot	CNTNAP2 c.3653C>T (p.Pro1218Leu) heterozigot
ExAC	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
1000G	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
ESP	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
Mutation taster	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı	Polimorfizm	Hastalık yapıcı
SIFT	Tahrip edici ^b	Tahrip edici	Tahrip edici		Tolere edilebilir	Tahrip edici

POLYPHEN2	Muhtemelen tahrip edici ^c	Muhtemelen tahrip edici	İyi huylu		İyi huylu	İyi huylu
PROVEAN	Zararlı ^d	Nötral	Zararlı		Nötral	Zararlı
HGMD	Tanımlı, hastalık yapıcı	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
Clinvar	Tanımlı, patojenik	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil

Tahmin araçları	K302		K303	K304	
	HRASLS: c.454+1G>A homozigot	SCN8A: c.2629A>C (p.Asn877His) heterozigot	KCNH6: c.469G>T (p.Glu157*) heterozigot	BCORL1: c.4754A>C (p.Gln1585Pro) hemizigot	NAGS: c.1450T>C (p.Trp484Arg) heterozigot

ExAC	210 het, 1 hom	Tanımlı değil	Tanımlı değil	30 hemizigot	Tanımlı değil
1000G	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	1 homozigot	Tanımlı değil
ESP	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
Mutation taster	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı
SIFT	-	Tahrip edici	-	Tolere edilebilir	Tahrip edici
POLYPHEN2	-	Muhtemelen tahrip edici	-	benign	Muhtemelen tahrip edici
PROVEAN	-	Zararlı	-	Zararlı	Zararlı
HSF	Hastalık yapıcı	-	-	-	-
HGMD	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı: DM (Disease mutation)
Clinvar	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı: Patojenik

[§]Varyant (gen: pozisyon)

Tahmin araçları	K305		K306		
	ADSL: c.1277G>A (p.Arg426His) homozigot	VARs2: c.970A>T (p.Ile324Phe) homozigot	NALCN: c.3954+1G>A homozigot	CHD4: c.4822G>A (p.Val1608Ile) heterozigot	KIAA2022: c.2720A>C (p.Glu907Ala) hemizigot
ExAC	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	9 het	1 hemizigot
1000G	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
ESP	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	9 het	1 hemizigot
Mutation taster	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı ^a	Polimorfizm	Polimorfizm
SIFT	Tahrip edici	-	-	Tolere edilebilir	Tolere edilebilir
POLYPHEN2	Muhtemelen tahrip edici	Benign	-	Benign	Benign
PROVEAN	Zararlı	-	-	Nötral	Nötral
HSF	-	-	Zararlı	-	-

HGMD	Tanımlı: DM (Disease mutation)	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı: DM (disease mutation)	Tanımlı değil
Clinvar	Tanımlı: Patojenik	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı: Patojenik	Tanımlı değil

Tahmin araçları	K305		K306		
	ADSL: c.1277G>A (p.Arg426His) homozigot	VAR2: c.970A>T (p.Ile324Phe) homozigot	NALCN: c.3954+1G>A homozigot	CHD4: c.4822G>A (p.Val1608Ile) heterozigot	KIAA2022: c.2720A>C (p.Glu907Ala) hemizigot
ExAC	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	9 het	1 hemizigot
1000G	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil

ESP	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil	9 het	1 hemizigot
Mutation taster	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı ^a	Hastalık yapıcı ^a	Polimorfizm	Polimorfizm
SIFT	Tahrip edici	-	-	Tolere edilebilir	Tolere edilebilir
POLYPHEN2	Muhtemelen tahrip edici	Benign	-	Benign	Benign
PROVEAN	Zararlı	-	-	Nötral	Nötral
HSF	-	-	Zararlı	-	-
HGMD	Tanımlı: DM (Disease mutation)	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı: DM (disease mutation)	Tanımlı değil
Clinvar	Tanımlı: Patojenik	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı: Patojenik	Tanımlı değil

Tahmin araçları	K307		
	CACNA1H: c.942C>T (p.Pro341Pro) heterozigot	ICK: c.71T>C (p.Ile24Thr) heterozigot	SEC24B: p.Leu1041Metfs*29 (c.3121_3124delCTCT) homozigot
ExAC	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
1000G	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
ESP	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
Mutation taster	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı	Hastalık yapıcı
SIFT	-	Tolere edilebilir	-
POLYPHEN2	-	Benign	-
PROVEAN	-	Nötral	-
HSF	Splicing'i bozma potansiyeli	-	-
HGMD	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil
Clinvar	Tanımlı değil	Tanımlı değil	Tanımlı değil

TARTIŞMA VE SONUÇ:

Klinik, radyolojik, ayrıntılı metabolik testler ve karyogram/moleküler karyotipleme ile etyolojisi açıklanamayan 13 olguya tüm ekzom dizileme yapıldı ve % 77 (10) olguda, 3'ü de novo olan klinik tabloyu açıklayan varyant bulundu: Olguların 5'inde (%38) fenotiple örtüşen, HGMD ve Clinvar'da *patolojik olarak tanımlı mutasyonlar* bulunarak kesin moleküler genetik tanı konmuş oldu. Beş hastada ise fenotiple örtüşen, aile içi segregasyonu uygun ancak HGMD ve Clinvar'da tanımlı olmayıp in silico analizlerde sadece 'mutation taster'da 'hastalık yapıcı' olarak tanımlanan '*muhtemel patolojik*' varyantlar bulundu. Bu olguların 1'inde hastalık yapıcı etkisi henüz bildirilmemiş ancak epilepsi ile ilişkili olması muhtemel farklı bir gende de varyant gösterildi. Son 3 hastada ise kliniği açıklayacak heterozigot varyantlar bulundu ancak bu varyantların aile içi segregasyonu uygun değildi. Hatta 1 olguda (K300) tüm genom çalışması da sonuçsuz kaldı. Ailelere genetik danışma verilirken olası penetrans farklılıkları da dikkate alınmıştır.

Erken çocukluk çağı epileptik ensafalopatilerinde tüm ekzom dizileme yöntemi ile olguların yaklaşık %30'una tanı konulmaktadır (15,16). Çalışmaya dahil edilen olguların nöbet başlama yaşları, seçme ölçütleri ve diğer özellikler ile bu farklılıkları açıklayabilir. Bizim çalışmamızda tüm ekzom dizileme yöntemi ile tanı konulma oranının daha yüksek olmasının, olgu sayısının azlığı ile ilgili olabileceği gibi, öncesinde tüm olguların aCGH ile taranarak kopya sayı değişikliklerinin dışlanması, klinik fenotip ile belirlenebilecek tek gen defektlerinin guruba alınmaması (SCN1A ile ilişkili Dravet sendromu gibi), ayrıntılı metabolik incelemeler ve metabolik tedavilerin (vitamin B6, PNP5, folinik asid) denenmiş olması gibi güçlü ön seçim ölçütlerinin kullanılmış olması sonucu olduğunu düşünüyoruz.

Anlamli varyant bulunamayan olgularda, 1 yıl arayla yeni tanımlanan varyantlara yönelik analizleri sürdürmeyi planlıyoruz.

KAYNAKÇA

1-James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, Jill P. Mesirov. Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology 2011; 29: 24-26.

2-Gormez Z, Bakir-Gungor B, Sagioglu MS (2014) HomSI: a homozygous stretch identifier from next-generation sequencing data. Bioinformatics 30(3):445-447. doi:10.1093/bioinformatics/btt686.

3-Karaca E., Harel T., Pehlivan D., et al. Genes that affect brain structure and function identified by rare variant analyses of mendelian neurologic disease. Neuron 2015; 88: 499-513.

4-Lebrun N, Lebon S, Jeannet PY, et al Early-onset encephalopathy with epilepsy associated with a novel splice site mutation in SMC1A. *Am J Med Genet A*. 2015;167A:3076-81.

5-Mignot C, Lambert L, Pasquier L, et al. WWOX-related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. 2015 ;52 :61-70.

6- Kousi, M., Anttila, V., Schulz, A., et al. Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene. *J. Med. Genet*. 2012; 49: 391-399 .

7- Perrault, I., Hamdan, F. F., Rio, M., Capo-Chichi, J.-M., Boddaert, N., Decarie, J.-C., Maranda, B., Nabbout, R., Sylvain, M., Lortie, A., Roux, P. P., Rossignol, E., Gerard, X., Barcia, G., Berquin, P., Munnich, A., Rouleau, G. A., Kaplan, J., Rozet, J.-M., Michaud, J. L. Mutations in DOCK7 in individuals with epileptic encephalopathy and cortical blindness. *Am. J. Hum. Genet*. 94: 891-897, 201

8- Turkdogan D, Turkyilmaz A, Gormez Z, Sager G, Ekinici G. A novel truncating mutation of DOCK7 gene with an early-onset non-encephalopathic epilepsy. *Seizure*. 2019 Jan 16;66:12-14.

9-Veeramah, K. R., O'Brien, J. E., Meisler, et al. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *Am. J. Hum. Genet*. 2012; 90: 502-512.

10- Häberle J, Schmidt E, Pauli S, Kreuder JG, Plecko B, Galler A, Wermuth B, Harms E, Koch HG. Mutation analysis in patients with N-acetylglutamate synthase deficiency. *Hum Mutat* 2003; 21:593-7.

11- Marie S, Cuppens H, Heuterspreute M, Jaspers M, Tola EZ, Gu XX, Legius E, Vincent MF, Jaeken J, Cassiman JJ, Van den Berghe G. Mutation analysis in adenylosuccinate lyase deficiency: eight novel mutations in the re-evaluated full ADSL coding sequence. *Hum Mutat* 1999;13:197-202.

12-de Lange, I. M., Helbig, K. L., Weckhuysen, S., et al. De novo mutations of KIAA2022 in females cause intellectual disability and intractable epilepsy. *J. Med. Genet*. 2016; 53: 850-858.

13-Sifrim, A., Hitz, M.-P., Wilsdon, A., et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nature Genet*. 2016; 48: 1060-1065.

14-Wong JKL, Gui H, Kwok M, Ng PW, Lui CHT, Baum L, Sham PC, Kwan P, Cherny SS. Rare variants and de novo variants in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neurol Genet*. 2018; 114:e245.

15- Papuc SM Abela L, Steindl K, et al. The role of recessive inheritance in early-onset epileptic encephalopathies: a combined whole-exome sequencing and copy number study. *Eur J Human Genet.* 2019; 27:408-421.

16- Hamdan FF, Myers CT, Cossette P' et al. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet* 2017 2;101:664-685.