



Epileptik Ensefalopati Tanısı Almış Hastalarda Ekzom Dizileme Yöntemi ile Gen Araştırması

Program Kodu: 1002
Proje No: 2014S624

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Dilşad TÜRKDOĞAN

Araştırmacılar: Yrd. Doç. Dr. Elif Sibel ASLAN

Bursiyer(ler): yok

ARALIK 2016
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Erken başlangıçlı epileptil ensefalopati (EBEE)'ler, özellikle beyin gelişiminin en kritik döneminde tedaviye dirençli, birden çok çeşitte ve sık nöbetler ile EEG'de yoğun iktal ve interiktal epileptojen potansiyellerin görüldüğü ve davranışsal, bilişsel 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 alındı. 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 yapıldı. Trio olarak çalışılan ailede fenotiple çok uyumlu yeni bir homozigot 'çerçeve kayması' delesyonu bulundu ve aile içindeki beklenen dağılımı gösterildi. Ohtahara sendromlu 2 bireyi olan ailede fenotiple ilişkilendirilen çok nadir 2 farklı gende yeni varyantlar bulundu. İki gen için de homozigot varyantların aile içi dağılımları da gösterildi. Bunlardan biri EBEE ile ilişkilendirilmişti, 4 mutasyon etki analiz aracında da bildirilmişti ve ailemizdeki fenotiple çok uyuşmaktaydı. İki erkek kardeşin etkilendiği, birinin otistik özellikler taşıdığı ailede ise otizm ve/veya epilepsi ile ilişkili çeşitli genlerde homozigot/bileşik heterozigot varyantlar bulundu. İlk aşamada fenotiple en uyumlu Sanger dizilemesi yapılan 4 genin 2'sinde beklenen aile içi dağılım gösterildi. Bu genlerden en uygunu farklı ailevi fokal epilepsi vakalarında bildirilmiş bir gen varyantıydı ve 3 mutasyon etki analiz aracında zararlı/muhtemelen zararlı olarak bildirilmişti. Ancak aile içindeki dağılımı fenotip ile uyumlu değildi.

Ailevi EBEE olan 3 ailenin 2'sinde fenotiple tam uyumlu tanımlanmış çok nadir 1'er gende yeni mutasyonlar bulundu. Diğer aile için ekzom verisinin aralıklı gözden geçirilmesi ve şüpheli varyant için ileri çalışmalar yapılması uygundur.

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1-ÖZET VE ANAHTAR KELİMELEER.....	iv
2-ABSTRACT AND KEY WORDS.....	v
3-PROJE ANA METNİ	
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	1
GEREÇ VE YÖNTEM.....	3
BULGULAR.....	8
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	12
4-KAYNAKLAR.....	16

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Sayfa No

Tablo 1.....	19
Tablo 2.....	20
Şekil 1.....	21
Şekil 2	22
Şekil 3	23

*Ek 1 dosya, varyantların Sanger dizilimi ve 'homoloji modelleme' ile 3B şekil gösterimini içermektedir

1. ÖZET

Amaç: Erken başlangıçlı epileptik ensefalopatili (EBEE) hastalarda, hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülen genlerde olası mutasyonların araştırılması amaçlandı.

Kapsam ve yöntem : Yakın akraba evliliği ve birden çok etkilenmiş birey olan 3 aile çalışmaya alındı. Yaşayan 2 etkilenmiş kardeş olan 2 ailede 1'er birey, hayatta 1 bireyi olan ailede ise trio olarak yeni nesil dizileme yöntemiyle tüm ekzon dizileme yapıldı. Aday genler homozigot ya da bileşik heterozigot varyantlar içinden seçildi. Fenotiple uyumlu en olası gen varyantları Sanger dizilemesiyle doğrulandı ve aile içindeki dağılımı incelendi. İlgili varyantların biyolojik işlevlere etkisi tahmin araçları yazılımları kullanılarak değerlendirildi.

Sonuç: 1-Trio olarak çalışılan ailede GNB5 geninde 2 ailede tanımlanmış fenotiple birebir uyumlu çerçeve kaymasına neden olan yeni bir delesyon bulundu ve aile içindeki dağılımı gösterildi. Fonksiyon değişikliği gösteren bu varyant çok muhtemelen fenotiple ilişkilidir.

2- İki erkek kardeşin etkilendiği West sendromlu indekste en olası 4 gendeki varyantlardan ikisi doğrulandı. ATRX genindeki tanımlanmamış varyant için 2 etkilenmiş kardeş ile anne, erişkinlikte fokal epilepsisi başlayan teyze, 1 sağlıklı kız kardeş heterozigottu. ATRX ile ilişkilendirilen fenotip epilepsiyle beraber hafif-ağır zihinsel gerilik de içermektedir. Tahmin araçlarında bulunmayan ve intronik yerleşimli bu varyantın fenotiple ilişkisi şüphelidir.

DEPDC5 geni değişik ailevi fokal epilepsilerden ilaca dirençli epilepsilere kadar değişen farklı fenotipteki epilepsilerle ilişkilidir. Bu gendeki varyant anne ve teyze ile sağlıklı 1 kardeş dışında tüm bireylerde heterozigot bir dağılım gösterdi. Mutasyon etki analiz tahmin araçlarının 3'ünde yer alan bu varyant için ileri analizler uygundur.

3-Ohtahara sendromlu 2 kardeşli ailede çok nadir EBEE ile ilişkilendirilmiş SLC25A22 genindeki yeni homozigot varyantının aile içindeki dağılımı beklenene uygundu. Bu mutasyon in slico analizlerde patolojik olarak yer alıyordu ve olgularımızın fenotipi daha önce tanımlanmış fenotiple çok uyumlu olduğu için bu gen varyantı çok muhtemelen hastalıkla ilişkili kabul edildi.

Sonuç olarak, ailevi EBEE olan 3 ailenin 2'sinde tanımlanmış fenotiple tam uyumlu çok nadir 1'er gende yeni mutasyon bulundu. Diğer aile için ekzon verisinin aralıklı gözden geçirilmesi ve şüpheli varyant için ileri çalışmalar yapılması uygundur.

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

2. ABSTRACT

Aim: We aimed to explore the known and candidate genes through utilization of whole-exome sequencing (WES) in patients with early onset epileptic encephalopathies.

Materials and method: We included 3 consanguineous families with more than 1 affected children. By next-generation sequencing, WES was done in 5 cases (in one affected case in each 2 families and one index case and healthy parents in the third family). The most possible variants were validated by Sanger sequencing. To predict effects of variants in silico analyses were done.

Results: 1-We found a novel homozygous frameshift mutation in GNB5 gene in the index case and expected segregation in the family was found. The phenotype is identical to the recently reported very rare homozygous cases.

2- In the index case with West syndrome, only 2 gene variants were confirmed. The novel heterozygous variant in ATRX gene was segregated as following: 2 affected siblings, mother, the maternal aunt who had focal epilepsy with adult onset, and 1 healthy sibling. In silico predictors did not show the pathogenicity of this variant. This variable phenotype of epileptic syndromes and normal intelligence have not been described in phenotypes related with ATRX variants.

Heterozygous variant of DEPDC5 gene was segregated in all the family members except mother, maternal aunt and a healthy sibling. Three predictors analysed the variant as pathogenic. DEPDC5 was associated with various familial focal epilepsies but not with EIEE. Further studies on biological function of the variant would be helpful.

3- In the proband with Ohtahara syndrome, a novel homozygous variant in SLCA25A22 gene was found. The phenotype is identical to the reported rare EOEE cases. In silico predictors include the variant.

In conclusion, the present study demonstrated two novel pathogenic variants in two families which are identical previously reported phenotypes. To find a possible pathogenic variant in the other family, further analysis including intermittent analyses of WES data should be done.

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

3. SONUÇ RAPORU ANA METNİ

1. 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.

2. 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 yaşta 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.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 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

3.1.1 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 (monozigot) biri EBEE tanılı ve 7.ayında vefat eden kız, diğeri EBEE tanılı hayatta olan kız olgu (indeks) vardı. EBEE alan tüm olgularda 3-4 aylar içinde epileptik/tonik spazmlar ile tanınan West sendromu başlamıştı. Uygun tedaviler ile en geç 6 ay içinde tam nöbet kontrolü sağlanmıştı. Indeks olgu ile etkilenmiş olan 2. erkek kardeş olan abisi ve ikiz eşi tarafımızdan takip edilmiş olup nörolojik gelişimleri hiç olmayıp ağır mental motor gerilik ve ciddi otistik bulgular (göz teması ve iletişim yokluğu, stereotipi vs) , horizontal nistagmus, brakisefali ve alında çıkıklık mevcuttu. Indeks olguda doğumda normal olan baş çevresi ilk aylardan sonra yeterli gelişim göstermeyerek mikrosefali oldu. Vefat eden etkilenmiş kardeşlerin ölüm nedeni olarak 1. kardeşin akut gastroenterit, 2. ve 4. kardeşlerin yatakta ölü bulunması, 3. kardeşin ise sepsis sonucu gelişen çoklu organ yetmezliği sonucu vefat etmişti. Bu kardeş 5 yaşında vefat ederken diğer kardeşler 12 ay dan önce kaybedilmişti. Indeks olguda kardiyak değerlendirmede 'hasta sinus sendromu' tanısı kondu. Önerilen kalp pili uygulaması aile tarafından reddedildi.

Takibi yapılan 3 kardeşte de ilk yıllardaki tekrarlanan en az 2 EEG kayıtında 'multifokal epileptojen potansiyel ve temel aktivite yavaşlama' vardı. İlk yıldan sonra epileptojen potansiyel sayıca belirgin azaldı, ancak temel aktivite yaşına uygun olgunlaşmaya ulaşmadı.

Bu raporun yazım aşamasında anne ve babanın 2. derece kuzenlerinin akraba evliliğinden doğan 2 yaşında bir olgunun indeks olgu ve kaybedilen kardeşleri ile bire bir aynı fenotipte sahip olduğu öğrenildi. Bu olgu değerlendirildiğinde öyküde 3. ayda başlayan epileptik spazmlar vardı; tedavi ile 2 ay içinde nöbet kontrolü olmuştu. İlk EEG multifokal epileptojen potansiyel göstermekte tekrarlan 2 ve son EEG incelemeleri normal idi. Göz teması ve takibi kısmen olan olgunun horizontal nistagmus, ağır hipotonisi vardı ve nörogelişimsel hiçbir basamağa ulaşmamıştı. Sosyal iletişim yokluğu ve yoğun orta hat stereotipleri vardı. Brakisefali ve alnı çıkık idi. Bu olguda da 'hasta sinus sendromu' tanısı kondu ve profilaktik kalp pili uygulaması önerildi.

İndeks ve diğer yaşayan etkilenmiş olgunun tanı aşamasında ve sonra 1 yaştan sonra tekrarlanan beyin MRG incelemeleri normaldi. Etkilenmiş ve takip ettiğimiz 3 olguda nörometabolik inceleme anlamlı bulgu göstermedi.

İndeks olguda karyotipi normal idi. Her iki ebeveyn kardiyak değerlendirmesi normal idi. 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 sonra gelişen parsiyel epilepsi) hayatta olan erkek, diğer dört gebeliği sağlıklı iki kız ve iki erkek çocuk vardı.

İndeks olguda ilk başvuru EEG'si ve takip eden 6 ay boyunca 2 EEG kaydında 'hipsaritmi' paterni mevcuttu. Bu dönemde nöbetlerine uygun medikal tedavi almamıştı. Uygun antiepileptik tedavi ile 2 ay içinde spazm nöbetleri tamamen kontrol edildi. Bu nöbetler bir daha tekrarlamamasına rağmen 3 yıl nöbetsizliği izleyerek en az 1 kez/gün kısa süreli jeneralize klonik nöbetleri devam etmektedir. Takip EEG'lerinde multifokal epileptojen potansiyel ve temel aktivite yavaşlama bulgusu sürmektedir. Ağır zihinsel gerilik nedeniyle özel alt sınıfta eğitim alabilmektedir. Alın çıkık ve filtrum kısaydı. Metabolik inceleme normaldi.

Etkilenen diğer kardeşte spazm nöbetleri başladıktan hemen sonra başvurdu; EEG'de 'hipsaritmi' bulgusu belirlendi. Uygun tedavi ile nöbetler hızla kontrol edildi. Takip kayıtlarında multifokal epileptojen potansiyel saptandı. 1.5 yıl nöbetsizlik sonrası parsiyel epilepsi nöbetleri başladı. İlaç tedavisi ile son 2 yıldır nöbetsiz olan olguda akademik başarı normal yaşlıtlarına uygundur. Dikkat ve davranışları açısından sağlıklıdır. EEG'de fokal epileptojen potansiyel vardır. Dismorfik bulgular olmayıp karyotipi normal idi. Metabolik inceleme ve hemoglobin elektroforezi normaldi.

İki olguda da erken çocuklukta beyin MRG incelemeleri normal idi.

Ailenin soy geçmişinde, annenin kız kardeşi 32 yaşında olup yeni başlayan parsiyel epilepsi ve annenin babasında erişkin yaşta başlayan travma ile ilişkilendirilen epilepsi hikayesi vardı. Yurt dışında yaşayan DNA örneği veremedi. (Şekil 2: Aile ağacı). Teyze ise çalışmaya katıldı.

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 devam etmektedir. Ketojenik diyet ağır enfeksiyonları tetiklediği için 1. kardeşte uygulanamadı. İki kardeşte de ağır mental motor gerilik, distonik/diskinetik hareket bozukluğu ve yoğun otistik bulgular vardır. Nörogelişimin hiçbir basamağına ulaşmadılar. Doğumda normal olan baş çevresi ilk aylardan sonra yeterli gelişim göstermeyerek mikrosefali oldu. İki kardeşte de ilk başvuruda hipsaritmi daha sonra yapılan çok sayıda EEG kaydında temel aktivitede yavaşlama ve sayıca giderek azalan multifokal epileptojen potansiyel devam etmektedir. Tonik nöbetler sadece enfeksiyon dönemlerinde olmaktadır.

Etkilenmiş 2 kardeşte dismorfik bulgular olmayıp indeks olguda karyotipi normal idi.

Tanı aşamasında ve daha sonra tekrarlanan kraniyel MRG ve magnetik rezonans spektroskopisi (MRS) incelemeleri normal idi. Etkilenmiş 2 olguda nörometabolik (kan, idrar ve BOS örneklerinde) inceleme anlamlı bulgu göstermedi.

Annede ablasyon tedavisi yapılan aritmi hastalığı (Wolff-Parkinson-White) ve dayıda doğumsal sinirsel sağırılık vardır. Ailenin soy geçmişinde başka bir özellik yoktu (Şekil-3 : Aile ağacı).

3.2 Hastalardan Kan Örneği Temini ve DNA Ayrıştırılması

EBEE tanısı konulmuş hastalardan ve anne-babaları ve etkilenmiş kardeşlerinden en az 2 cc kan örneği alınarak EDTA'lı tüplerde 4° C buzdolabında DNA ayrıştırılması 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.

3.3 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 (Kumar vd., 2009), PolyPhen2 HDIV (Adzhubei, vd 2006), MutationTaster (Schwarz, vd 2014), PROVEAN (Choi, 2012) adlı 4 farklı tahmin aracı ile yapıldı.

Ekzonik bölgeler ya da ekzon/intron sınırlarındaki homozigot varyantlar daha ileri çalışmaya dahil edildi. Missense, nonsense, stop kodon kaybı ve kazanımı, çerçeve kayması olan/ çerçeve kayması olmayan indel ve kırılma varyantları seçildi. Tek nükleotid polimorfizmleri ExAC (<0.001) ve 1000Genomes (<0.005) veri tabanları ile filtrelendi. Dört tahmin aracı ile selim kabul edilen varyantlar dışlandı. Son olarak epilepsi fenotipi ile ilişkili varyantlar seçildi.

3.4 Tespit edilen Mutasyonların Sanger Dizileme ile Validasyonu

Yeni nesil dizileme analizi sonucunda tespit edilen varyantların doğrulanması için ilgili gen bölgeleri için primerler dizayn edildi. Hem indeks olguda hem de diğer aile bireylerinde bu çiftler kullanılarak konvansiyonel PCR yöntemiyle ilgili bölge çoğaltıldı ve yeni nesil dizileme yöntemi ile bulunan varyantlar doğrulandı. PCR ampikon ürünleri %2 agaroz jelde görüntülenip ve sonrasında aynı primerler kullanılarak dizilemeye tabi tutuldu. DNA dizileme reaksiyonları BigDye V1.1 (Life Technologies) ve 3130XL-sequencer (Applied Biosystems) kapiller elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları ENSEMBL referans dizileri kullanılarak analiz edildi..

3.5 . *In silico* Analizi:

Tespit edilen varyantların daha önce bildirilip bildirilmedikleri “dbSNP”, “HGMD”, “Exome Variant” ve “100 genomes” SNP ve mutasyon veritabanlarında araştırıldı. Epilepsi ile ilişkilendirilmiş ya da ilişkili olduğu düşünülen genlerde tespit edilen daha önce bildirilmemiş mutasyonların görüldüğü bölgelerin türler arasındaki korunmuşluğu SIFT (Kumar, vd., 2009), ProPhyLER (Binkley vd., 2010) ve HomoloGene yazılımları kullanılarak gösterildi. SIFT, MutationTaster ((Schwarz, vd 2014) ve PolyPhen2 (Adzhubei, vd 2010) programları tespit edilen varyantların patojenitelerinin tespit edilmesinde kullanıldı. Swiss Model Workspace (Arnold vd., 2006), Phyre2 (Kelley, vd 2009) ve Jmol (Steinbeck, vd, 2003) programları da normal ve mutant proteinlerin 3D görünümelerini oluşturmak ve mutant proteinlerdeki yapısal değişimleri gösterebilmek için kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1 WES sonucu tesbit edilen fenotipe etkisi olacağı düşünülen gen varyantlarının seçimi, Sanger dizilemesi ile doğrulanması ve *in Silico* Analizi:

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. Bunlar içinde çok yakında tanımlanan fenotiple çok uyumlu GNB5 (OMIM:60447) geninde tek bir nükleotid delesyonu, çerçeve kayması ve erken stop kodona neden olmaktaydı (Chr 15: 52439669delC, NM_006578 355delG, A119Pfs*16) (Lodder vd., 2016) (Tablo 1). Bu varyant ExAC ve 1000Genomes veri tabanlarında yoktu. Mutation Taster’da ‘hastalığa neden olan’ varyant şeklinde bildirilmekteydi (Tablo 2). Tespit edilen mutasyonun Sanger dizileme ile validasyonu indeks olgu, anne baba, sağlıklı 2 kardeş, etkilenmiş diğer olgu (kuzen çocuğu) ile anne babasında yapıldı. İndeks olguda ve diğer etkilenmiş aile bireyinde aynı homozigot delesyon belirlendi; diğer tüm aile bireyleri ise taşıyıcı idi (Bkz. Ek 1’de Şekil 1). Mutant proteinlerdeki yapısal değişim gösterilemedi .

Aile-2’ de EBEE tanılı bir indeks olguya tüm ekzom dizi analizi yapıldı. En uygun kalıtım şekilleri, otozomal resesif ya da X’e bağlı kalıtım olarak düşünüldü. Ancak otozomal dominant kalıtıma uygun varyantlar da değerlendirildi. İlk analizde 45 gende 108 varyant tespit edildi. Fenotiple en ilişkili olduğu düşünülen aşağıdaki varyantlar belirlendi (Tablo 1).

A. X’e bağlı kalıtımla ilgili en olası varyantlar:

1-ATRX geni (OMIM 301040) ile ilişkilendirilen ve nörolojik semptomları da içeren başlıca sendromlar Alpha-thalassemia/mental retardasyon sendromu (mental retardasyon-hipotonik yüzler sendromudur. Bu gen defektleri ile ilişkilendirilen zihinsel gerilik en ağırdan hafife kadar tanımlanmıştır. Ayrıca epilepsi ve hafif dismorfik bulgular da bildirilmiştir (Guerrini vd.,2000).

2-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 /EBEE bildirilmemiştir. Ayrıca olgumuzdaki zihinsel geriliğin EBEE geç tedavisi ile ilişkili olma olasılığı yüksektir. Çünkü benzer epilepsi fenotipine sahip kardeşinde erken ve doğru tedavi olmuştur ve akademik beceri normal düzeydedir. Ayrıca olgularımızda da beyin ve kalp anomalileri ve dismorfik bulgular tesbit edilmedi.

3- Epilepsi ile ilişkisi henüz bildirilmemiş ve otizm duyarlılığı ile ilişkili olan NLGN3 geninde homozigot bir varyant tesbit edildi (Jamain, vd. 2013). İndeks olgudaki otistik bulgular West sendromu başladıktan sonra uygun tedaviye geç ulaşması ile ilgili olma olasılığı çok güçlüdür. Nitekim etkilenmiş diğer kardeş erken tedavi almış, nöbetleri kontrol edilmiştir ve sağlıklı nörolojik ve bilişsel gelişime sahiptir.

4.GRIA3 geni nörostimulatör 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). Olgumuzda varyant belirlenen CNIH3 geninin direkt etkileşimde bulunduğu bir glutamat reseptörü ile ilişkilidir. Taşıdığı mutasyon çok güçlü olmamakla beraber aile içindeki değişken epilepsi fenotipi açıklayabileceği düşünüldü.

B- Otozomal genlerle ilgili varyasyonları (Tablo1):

1-DEPDC5 : Otozomal dominant kalıtmıli ailevi parsiyel epilepsilerden infantil spazma dek değişen epilepsi fenotipleri ile ilişkilendirilen bu gendeki varyantın, ailemizdeki fenotip farklılığını açıklayabileceği düşünüldü (Baulac S, Weckhuysen S. 2016).

2-CACNA1H geninde otozomal dominant kalıtmıli heterozigot varyant tesbit edildi. Bu gen

varyantları idiyopatik jeneralize epilepsi ya da çocukluk çağı absans epilepsi ile ilişkilendirilmiştir. Ailedeki hiç bir epilepsi fenotipi bu gendeki varyantlar ile henüz ilişkilendirilmemiştir.

3. CNIH3 geninde bileşik heterozigot varyasyon tesbit edildi. Bu gen AMPA reseptör protein 3'ü kodlar ve glutamatergic sinaptik iletimde etkili olmaktadır. Bu da epilepsi patogeneğinde önemlidir. Ancak herhangi bir hastalık ile henüz ilişkilendirilmemiştir.

Sanger dizileme ile doğrulama aşamasında ilk olarak fenotip ve genetik geçiş ile en uyumlu olduğu ya da olası aday gen düşünülen ATRX, GRIA3, DEPDC5 ve CNIH3 genlerindeki varyantlar seçildi.

Sonuçta;

1-ATRX gen (OMIM:76855894) dizilemesinde yeni tanımlanan varyant (NM_000489 c.5697+9G>A) anne ve 2 kız kardeşte heterozigot, 2 hasta erkek ile 1 kız kardeşte ve teyzede heterozigot olarak bulundu (Bkz. Ek 1- Şekil 2). Baba ve sağlıklı erkek kardeşler varyantı göstermemektedir. Muhtemelen yeni tanımlanan bu varyant kırılma şeklinde etki yapmaktaydı ve mutasyon etki analiz araçlarında yoktu (Tablo 2). Mutasyon bu genden sentezlenen 4 farklı transkript için intronik bölgeye denk gelmekteydi ve protein şeklinde bir hataya sebep olmamaktaydı. Bu nedenle 3B modeli de çizilemedi (Bkz. Ek 1-Tablo 1) .

2-GRIA3 genindeki varyant doğrulanamadı.

3-Anne, teyze ve bir erkek kardeş dışında tüm aile bireyleri, DEPDC5 genindeki (OMIM:32229931) varyantı (NM_001242897:exon23:c.C1901T p.S634F) heterozigot olarak taşımaktaydı (Bkz. Ek 1- Şekil 3). Bu mutasyon kodlayan bölgedeydi; kodlanan 14 farklı transkriptten 11 tanesinde S>F aminoasit değişimine neden olmaktaydı. Bahsi geçen mutasyon aynı genden kaynaklı farklı proteinlerde 6 farklı SNP ID ile gösterildi (rs9621532, rs9621532, rs4821083, rs9621532, rs5749482, rs5994434). ExAC veri tabanında frekansı 1'den küçük olarak belirtilmişti (Tablo 2). MutationTaster'da 'hastalığa neden olan', SIFT'e göre zararlı ve Polyphen2' ye göre 'muhtemelen tahrip edici' olarak yer almıştı (Tablo 2). 3B modeli Ek 1-Şekil 3'de gösterildi.

4- CNIH3 genlerindeki varyant doğrulanamadı.

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 varyantlar Tablo 1'de gösterildi.

1-Bunlar içinde en kuvvetle muhtemel aday SLC25A22 genindeki varyant olup daha önce tanımlanmış fenotiple çok uyumluydu (OMIM 609304) (Molinari, 2009).

2-ABAT geni beyin ve karaciğerde yüksek, tüm dokularda eksprese olmaktadır. Gamma butirik asid (GABA) transaminaz enzimini kodlar. Bu enzim eksikliği ile tanımlanmış çok nadir olan metabolik hastalık (OMIM:613163) ağır psikomotor gerilik ve dirençli epilepsiye neden olur (Jaeken, J vd 1984) (Medina-Kauwe, L. 1999). Bu fenotip olgularımızla oldukça uyumluydu.

3-PIGN genindeki bialelik varyasyonlar çoklu anomaliler (kalp, gastrointestinal, ürogenital, göğüs, beyin), ağır gelişim geriliği, çok sayıda dismorfik bulgular ve ilaca dirençli jeneralize epilepsi ile seyreden çok nadir bir klinik tablo ile ilişkilendirilmiştir (Fleming, vd, 2016) . Pekçok birey 3 yaştan önce ölmüştür. Hastalarımız gerek organ bulguları ve dismorfizmlerinin olmamaları, gerekse de uzun yaşamları nedeniyle bu varyasyon ilk aşamada Sanger dizilemesine dahil edilmedi.

4-PTCHD1 geni heterozigot olarak otizmle ilişkilendirilmiş ancak epilepsi bildirilmemiştir. Bu varyasyon Sanger dizilemesine dahil edilmedi.

SLC25A22 ve ABAT genlerindeki varyantlar Sanger dizilemesine tabii tutuldu.

Sonuç olarak;

1-İndeks olguda ve etkilenmiş kız kardeşinde SLC25A22 genindeki (OMIM: 792932) homozigot mutasyon (NM_001191060 c.350A>G p.Q117R) doğrulandı. Anne ve baba ise bu varyantı heterozigot olarak taşımaktaydılar. Bu gen yüksek beyin ekspresyonu göstermektedir. MutationTaster'da 'hastalığa neden olan', SIFT'e ve Provean'a göre 'zararlı' ve Polyphen2' ye göre 'muhtemelen tahrip edici' olarak yer almıştı (Tablo 2). Sanger dizileme sonucu teknik nedenle Ek 1'e konulamadı; 3B model Ek 1-Şekil 4'de gösterildi.

2- İndeks olguda ve etkilenmiş kız kardeşinde ABAT geninde intron bölgesine denk gelen (OMIM: 8870351) homozigot mutasyon (NM_020686 c.1269+4A>C) doğrulandı (Bkz. Ek 1'de Şekil 5). Ebeveynler heterozigot idi. Varyant 4 mutasyon etki analiz aracına göre hiç bir

hastalıkla ilişkisi tanımlanmamış idi. ExAC veri tabanına göre frekansı ise %0.88 idi (Tablo 2). Bu varyant 6 farklı transkript için intronik bölgeye denk gelmekte ve protein şeklinde bir hataya sebep olmamaktaydı. Bu nedenle de 3B modeli çizilemedi.

Ayrıca indeks olguda annede mevcut Wolf-Parkinson–White hastalığı ile ilişkilendirilmiş dominant kalıtmı PRKAG2 geninde patolojik varyant bulunmadı.

5. 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, nörotransmitter 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 fenotipe ilişkisi kuvvetle muhtemel homozigot varyantların ekzom dizilemesi ile doğrulanması yapıldı.

Aile-1' de GNB5 geninde tesbit edilen homozigot delesyon etkilenmiş olguların fenotipi, çok yakında tanımlanan ve bu gen defekti ile ilişkilendirilen fenotipe birebir uymaktadır. Bu gen beyinde çok yüksek olmakla birlikte tüm vücutta eksprese olmaktadır. Potasyum iyon kanalları içinde bir alt grup oluşturan ve pozitif yükleri hücre içine daha kolay alarak sükünet potansiyelinin devamında etkili olan kanal ile etkileşim içindeki G proteini kodlayan GNB5

geni, hücre zarlarının hiperpolarizasyonunda etkilidir (Lodder, vd. 2016). Ayrıca beyinde dopamin D2 reseptör yoluyla nörotransmitter sinyalizasyonunda rol almaktadır (Shamseldin, vd. 2016).

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-özafagal reflü tanımlanmıştır. Bu bulgular fonksiyonel çalışmayla da doğrulanmıştır. Ağır hipotoni, zihinsel gerilik ve otistik bulgular ve epileptik ensefalopati tablosu olan bizim hastamızda da hasta sinüs sendromu saptanmış ve ‘pacemaker/kalp pili’ uygulaması indikasyonu konmuştur. Anne ve babanın 2. kuzenlerinin akraba evliliğinden doğan 2 yaşında aynı fenotipteki olguda da homozigot delesyon gösterildi. Olgularımızda çerçeve kayması mutasyonu sonucu oluşan homozigot delesyona bağlı olarak klinik tablonun ağır seyretmesi bu yayında tanımlanan ‘fonksiyon kaybı’ değişiklikleri ile tanımlanan ağır fenotiple de uyumludur (Lodder, vd. 2016). Bu çalışmada homozigot delesyon saptanan 6 olgunun tümünde ağır hipotoni ve gelişim geriliği olmasına rağmen sadece 1’inde EBEE vardır; diğer 3 olguda diğer epilepsi tabloları ya da ensefalopatik EEG bulgusu vardır.

Aile-2’de X ile bağlı kalıtım şekline uygun ATRX geninin aile içindeki dağılımına göre 2 hasta kardeş heterozigot, anne ve sağlıklı kız kardeşler taşıyıcıydı. ATRX geni ile ilişkilendirilen ve nörolojik semptomları da içeren başlıca sendromlar Alpha-thalassemia/mental retardasyon sendromu (OMIM 301040) ve 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 (ağır mental retardasyon vs) ortaya çıkışına kadar değişebildiğini gösterdi. Bizim ailemizde de etkilenen iki erkek kardeş benzer EBEE (West sendromu) çeşidine sahip olmakla birlikte erken ve doğru tedaviye ulaşım zamanı ve muhtemelen buna bağlı olarak zihinsel gelişim düzeyleri çok farklıydı. İndeks olguda ağır düzeyde gelişim geriliği ve otistik bulgular varken kardeşinin West sendromu tedaviye hızla yanıt verdi. Bu nedenle indeks olgudaki gelişim düzeyindeki gerilik doğru tedaviye geç ulaşması ile de açıklanabilir. Ayrıca aile içindeki epilepsi fenotipi değişkenlik göstermekteydi. İndeks olguda aktif fokal nöbetler halen devam ediyorken (12 yaşında), kardeşi 2 yıldır nöbetsizdi. Ailede alfa talasemi ve belirtilen dismorfizmler yoktu.

Teyzede 30 yaşından sonra başlayan parsiyel epilepsi vardı ve bu varyantı heterozigot olarak taşımaktaydı. Kızların asemptomatik olması beklenmekle beraber ATRX taşıyıcı kızda X inaktivasyonuna bağlı zihinsel gerilik olan bir olgu bildirilmiştir (Baden c. Vd, 2006). Ancak teyzenin fenotipi (normal zihinsel gelişim düzeyi ve geç başlayan epilepsi) de bu fenotipten uzaktır. ATRX genindeki kırılma mutasyonu Mutation Taster'e göre polimorfizm olarak tahmin edilmesine rağmen bu tahminin tek nükleotid değişim tahminlerine göre hataya daha açık olduğu göz önüne alınması ve ileri fonksiyonel çalışmaya geçilmesi düşünülebilir. Ancak intronik bölgede yerleşimli olması ve protein değişikliğine neden olmaması bu konuda kuşku yaratmaktadır.

DEPDC5 genindeki varyant, anne ve teyze ile sağlıklı 1 kardeş dışında tüm bireylerde heterozigot bir dağılım gösterdi. Vücutta yaygın ve beyinde sadece nöron ve GABAergic ara nöronlarda ekspresyonu olan DEPDC5 geninin mTORC1 yolağında sinyalizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir (Bar-Peled., vd. 2013). Bu gendeki mutasyonlar, ailevi çeşitli fokal epilepsiler (değişken odaklı parsiyel epilepsi (OMIM: 604364), otozomal dominant frontal lob epilepsisi ve çok nadir Rolandik epilepsi ile ilişkilendirilmiştir (Baulac ve Weckhuysen . 2016). Yine ilaca dirençli epilepsilerde fokal kortikal displazi etyolojisinde gösterilmiştir (Baulac S, vd 2015). Ancak henüz EBEE ile ilişkilendirilmemiştir. Bilişsel yetilere ilişkin yapılan bir çalışmada ailemizde bulunan mutasyonun (rs5994434) zeka geriliğine sebep olduğu belirtilmiştir (Loo SK, vd., 2012). Ailemizde bulunan varyant mutasyon etki analiz araçlarının çoğunluğuna göre hastalık ile ilişkilendirilmekle beraber, epileptik olan teyzenin mutasyon taşımaması, heterozigot olan baba ve sağlıklı kardeşlerde henüz epilepsi olmaması, zihinsel geriliğin sadece geç tedavi alan EBEE'li indeks olguda olması nedeniyle bu varyantın fenotiple ilişkisini ortaya koyucu ileri çalışmaların yapılması uygundur.

Aile-3'de klinik bulgularla en uyumlu homozigot varyantlar içinde doğrulaması yapılan en kuvvetle muhtemel aday SLC25A22 genindeki varyanttır. Dört mutasyon etki analiz aracına göre de bu varyant patojen olarak tanımlanmıştır. SLC25 gen ailesi mitokondri zarının içine çeşitli metabolitleri taşıyan taşıyıcılardır (Palmieri, 2004). SLC25A22 proteini glutamatın H⁺ ya da OH⁻ taşınmasını katalize eder. (Fiermonte et al., 2002). Bu gen beyinde miyoklonik nöbetlerin olduğu ve kontrol edilmesine katılan yapılarda ifade olmaktadır (Molinari, vd. 2005). Ailemizdeki fenotip, bu gen varyantları ile ilgili tanımlanmış EBEE tip 3 (OMIM 609304) ile çok uyumludur. Bu klinik tablo daha çok Ortadoğu ülkelerinde görülen çok nadir bir EBEE olup olgularda bizim vakalarımızda olduğu gibi hemen hiç nörolojik gelişim basamağı kaydedilmemiştir (Molinari, vd. 2009).

Bu ailede doğrulanmış homozigot bir diğer varyant ABAT genindedir. Karaciğer ve beyin başta tüm dokularda eksprese olan bu gen, MSS'nin başlıca baskılayıcı nörotransmitteri olan GABA'nın suksinik semialdehite dönüşümünü katalize eden GABA transaminazı kodlar. Tanı beyin, beyin omurilik sıvısı, kan ve idrarda GABA artışı ve kesin olarak enzim düzeyi ölçülerek konabilir. Bugüne dek GABA transaminaz eksikliği ve ABAT geninde varyasyon tesbit edilen 2 olguda tanımlanmış epilepsi, ağır psikomotor gerilik olgularımızın fenotipiyle uyumlu idi (Jaeken, vd. 1984). Ancak olgularımızın kan, idrar ve BOS incelemelerinde GABA düzeyi normal idi ve beyin MRS incelemesinde GABA artışı bulunmadı. Enzim düzeyi ölçümü mevcut koşullarda şimdilik gerçekleştirilemedi. Ayrıca ExAC veri tabanına göre varyantın frekansı belirgin düşüklük göstermemekteydi ve diğer tahmin araçlarında yer almamaktaydı. Bu nedenle bu varyantın fenotipe etkisi şüpheli idi. İntronik bölgede yerleşimli olması ve protein değişikliğine neden olmaması da bu kuşkuyu arttırmaktadır.

Sonuç olarak EBEE fenotipinde etkilenmiş 1'den çok birey olan 3 aileden 5 olguya yapılan WES çalışması sonucu belirlenen varyantların Sanger dizilemesi ile doğrulanması ve tahmin aracı verilerine göre 2 ailede fenotiple ilişkisi daha önce tanımlanmış tablolarla tam uyumlu olan çok nadir 2 gende 1'er yeni mutasyon belirlendi. Bunlardan biri çerçeve kaymasına neden olan homozigot delesyondur ve tahmin araçlarını çoğunda hastalıkla ilişkilendirilmişti. Diğer mutasyon tahmin araçlarını çoğunda hastalıkla ilişkilendirilmişti. Üçüncü ailede belirlenen 2 heterozigot mutasyondan biri 3 tahmin aracında farklı epilepsi fenotipleri ile ilişkilendirilmiş olmakla beraber ailede içindeki dağılımı, ileri analizler ile fenotiple ilişkisinin doğrulanmasını gerektirmektedir. Diğer mutasyon ise in silico analizlerde gösterilemedi ve ailede içindeki dağılımı farklı epilepsi fenotiplerini açıklamamaktaydı. Diğer bir seçenek gelecekte veri tabanlarının yeniden ve aralıklı olarak gözden geçirilerek farklı olası varyantların değerlendirilmesi olacaktır.

4. KAYNAKLAR

Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., et al. 2010. "A method and server for predicting damaging missense mutations", *Nature Methods*, 7(4), 248-9.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. 2006. "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling", *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.

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

Badens C1, Martini N, Courrier S, DesPortes V, Touraine R, Levy N, Edery P. 2006. ATRX syndrome in a girl with a heterozygous mutation in the ATRX Zn finger domain and a totally skewed X-inactivation pattern. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A:2212–2215

Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, 2013. et al. A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 340:1100–1106.

Baulac S, Ishida S, Marsan E, Miquel C, Biraben A, Nguyen DK, Nordli D, Cossette P, Nguyen S, Lambrecq V, Vlaicu M, Daniau M, Bielle F, Andermann E, Andermann F, Leguern E, Chassoux F, Picard F. Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to DEPDC5 mutations. *Ann Neurol* 2015;77:675–683

Baulac S, Weckhuysen S. *DEPDC5-Related Epilepsy*. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. 2016. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Sep 29.

Binkley, J., Karra, K., Kirby, A., Hosobuchi, M., Stone, E.A., Sidow, A. 2010. "ProPhyLER: a curated online resource for protein function and structure based on evolutionary constraint analyses", *Genome Research*, 20(1), 142-54.

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.

Choi Y (2012) A Fast Computation of Pairwise Sequence Alignment Scores Between a Protein and a Set of Single-Locus Variants of Another Protein. *In Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine (BCB '12)*. ACM, New York, NY, USA, 414-417.

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

Kelley, L.A., Sternberg, M.J. 2009. "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server", *Nature Protocols*, 4(3), 363-71.

Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C. 2009. "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm", *Nature Protocols*, 4(7), 1073-81.

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, Nannenberg 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.

Loo SK, Shtir C, Doyle AE, Mick E, McGough JJ, McCracken J, Biederman J, Smalley SL, Cantor RM, Faraone SV, Nelson SF. 2012 *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 51:432-440.

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.

Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D. 2014. "MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age", *Nature Methods*, 11(4), 361-2.

Steinbeck, C., Krause, S., Kuhn, S. 2003. "NMRShiftDB-constructing a free chemical information system with open-source components", *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43(6), 1733-9.

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*, 54:1270-81.

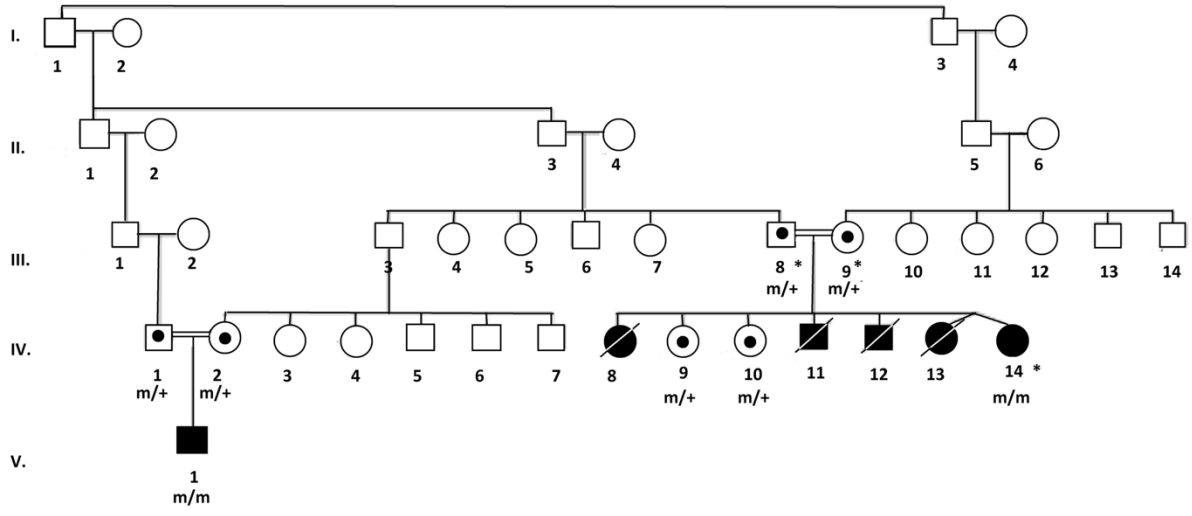
Tablo 1: Tüm ekzom dizileme sonrasında hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen varyantlar (fs:Çerçeve kayması; TNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi; hm: Homozigot; hz: Hemizigot; ht: Heterozigot)

Aile	Konum	Gen	cDNA/Protein Değişikliği	Etki	İlişkili Hastalık (OMIM No.)
1	chr15: 52439669 (hm)	<i>GNB5</i>	NM_006578 c.355delG A119Pfs*16	Çerçeve kayması delesyonu	Kardiyak Aritmili Gelişim Geriliği (617173)
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 (300963)
	chrX:70389940 (hz)	<i>NLGN3</i>	NM_00116666 c.2420 G>A p.R807Q	Ekzonik TNP	X-e bağlı otizm yatkınlığı (300425)
	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		İdiyopatik 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)	<i>PIGN</i>	NM_012327 c. 364 G>C p.E122Q	Ekzonik TNP	Çoklu Konjenital anomaliler-hipotoni-nöbetler sendromu (614080)
	chrX: 23397873	<i>PTCHD1</i>	NM_173495 c.517A>G	Ekzonik TNP	X'e bağlı otizm yatkınlığı (300830)

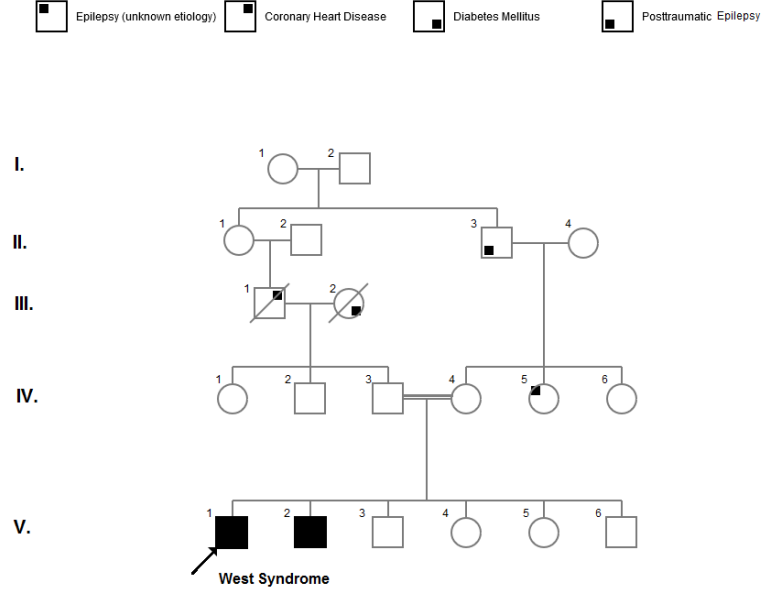
(hz)		p.I173V		
chr11: 792932 (hm)	SLC25A22	NM_001191060 c.350A>G p.Q117R,	Ekzonik TNP	Erken Başlangıçlı Epileptik Ensefalopati (609304)

Tablo 2: Sanger doğrulaması ile tesbit edilen değişikliklerin mutasyon etki analiz araçları tahmin skoru

						Mutasyon etki analiz araçları tahmin skoru			
Aile	Lokus Değişim	Gen	Genotip	Aminoasit Değişimi	ExAC Frekansı	SIFT	Polyphen2	Mutation Taster	Provean
1	chr15:52439669 delC	GNB5	hom	NM_006578:exon4:c.355delG:p.A119fs,	.	.	.	Hastalığa neden olucu	.
2	chrX:76855894 C>T	ATRX	hom	NM_000489:exon23:c.5697+9G>A	.	.	.	Polimorfizm	.
2	chr22:32229931 C>T	DEPDC5	ht	NM_001242897:exon23:c.C1901T p.S634F	%0,98	Zararlı	Muhtemele n zararlı	Hastalığa neden olucu	Nötral
3	chr11:792932 T>C	SLC25A22	hom	NM_001191060:exon6:c.A350G:p.Q117R	.	Zararlı	Muhtemele n zararlı	Hastalığa neden olucu	Zararlı
3	chr16:8870351 A>C	ABAT	hom	NM_020686:exon14:c.1269+4A>C	%0,88	.	.	.	.

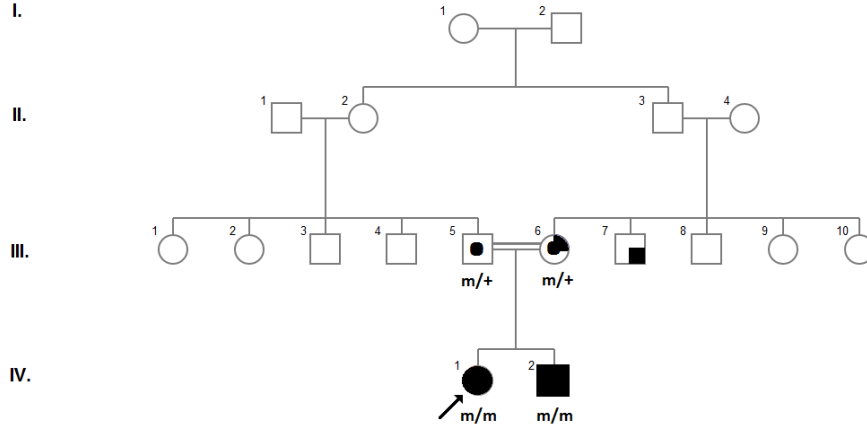


Şekil 1-1: 1. Ailenin soyacağı ve GNB5 genindeki varyantın aile içinde dağılımı



Şekil 2-1: 2. Ailenin soyağacı

 Early onset epileptic encephalopathy
  Wolf parkinson white syndrome
  Congenital sensorineural deafness



Şekil 3-1: 3. Ailenin soyağacı ve SLC25A22 ve ABAT genlerindeki varyantların aile içi dağılımı

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. DİLŞAD TÜRKDOĞAN
Proje No:	214S624
Proje Başlığı:	Epileptik Ensefalopati Tanısı Almış Hastalarda Ekzon Dizileme Yöntemi ile Genetik Etiyolojinin Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	ELİF SİBEL ASLAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	MARMARA Ü. TIP F. DAHİLİ TIP BİLİMLERİ B. ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2015 - 01/04/2016
Onaylanan Bütçe:	29770.0
Harcanan Bütçe:	18600.0
Öz:	EBEE tanısı konulmuş ve edinisel nedenlerin dışlandığı hastalarda, hastalıkla ilişkili olan ya da ilişkili olabileceği düşünülen genlerde olası mutasyonların varlığı araştırılması amaçlandı. 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 ekzon dizileme yapıldı. 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 planlanmaktadır.
Anahtar Kelimeler:	epileptik ensefalopatileri, yeni nesil dizileme, tüm ekzon dizileme, otizm, mental retardasyon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır