

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**Mental Retardasyon Ve/Veya Multipl Konjenital Anomali'li Olguların
Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle
Genetik Etiyolojisinin Araştırılması**

Dr. Hasan TAŞLIDERE
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Asude DURMAZ

Ocak 2016
İzmir

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimi süresi ve tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen başta tez danışmanım Doç. Dr. Asude DURMAZ'a olmak üzere Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Özgür Çoğulu ve değerli hocalarımız Prof. Dr. Cihangir ÖZKINAY, Prof. Dr. Ferda Özkınay, Doç. Dr. Hüseyin Onay, Doç. Dr. Haluk Akın, Doç. Dr. Emin Karaca, Doç. Dr. Burak Durmaz ve Doç. Dr. Ayça Aykut'a minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim. Bilgi ve deneyimlerini daima benimle paylaşan hekim ve çalışma arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Dr. Hasan TAŞLIDERE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
TABLO DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Giriş	1
2. Literatür Özeti.....	3
2.1 Zekanın Tanımı	3
2.2 Zeka Ölçümünde Kullanılan Testler	3
2.3 ID'nin Tanımı, Epidemiyolojisi ve Sınıflandırılması	3
2.4 ID'nin Etiyolojisi	5
2.5 ID'li Olguların Tanısı	6
2.6 ID'ye Sebep Olan Genetik Nedenler	6
2.6.1 Kromozomal anomaliler	7
2.6.2 Tek Gen Hastalıkları	13
2.7 MCA tanımı (konjenital anomali sınıflandırılması)	16
2.8 ID ve/veya MCA'nin Sebebinin Araştırılmasında Kullanılan Genetik Yöntemler	16
2.8.1 Karyotip Analizi	16
2.8.2 Subtelomerik FISH Yöntemi	17
2.8.3 Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu	17
2.8.4 Yeni Nesil Dizileme (NGS)	18
3. Materyal-Metod	38
3.1 Olgu Seçimi.....	38

3.2	Olgularda Moleküler Genetik Çalışma	39
3.2.1	DNA İzolasyonu.....	40
3.2.2	Örneklerin Hazırlanması.....	41
3.2.3	Ekzom Bölgelerinin Çoğaltılması ve Sekanslanması.....	41
3.2.4	Verilerin İşlenmesi ve Analizi.....	41
3.2.5	Saptanan varyasyonların sanger sekanslama ile doğrulanması ve segregasyon analizi	42
4.	Bulgular	45
4.1	Olgu 1 (R.K.).....	48
4.2	Olgu 2 (Ü.C.E)	53
4.3	Olgu 3 (Ş.U.)	56
4.4	Olgu 4 (S.A).....	58
4.5	Olgu 5 (E.E.).....	60
4.6	Olgu 6 (Ç.Ü.)	63
4.7	Olgu 7 (E.Ö.)	66
4.8	Olgu 8 (H.İ.)	68
5.	Tartışma.....	71
6.	Sonuç.....	91
7.	Kaynaklar.....	92

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. NGS'de tespit edilen varyantların önceliklendirilmesi	31
Şekil 2. Çalışmanın akış şeması.....	40
Şekil 3. Varyantların analizinde izlenen strateji.....	46
Şekil 4. 1 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	50
Şekil 5. 1 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	51
Şekil 6. 1 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (IQSEC2)	52
Şekil 7. 1 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (PMS2)	53
Şekil 8. 2 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	55
Şekil 9. 2 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	55
Şekil 10. 2 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (PLA2G6)	56
Şekil 11. 3 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	57
Şekil 12. 3 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	58
Şekil 13. 4 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	59
Şekil 14. 4 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	60
Şekil 15. 5 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	61
Şekil 16. 5 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	62
Şekil 17. 5 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (AGTR2).....	62
Şekil 18. 5 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (MSH2)	63
Şekil 19. 6 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	65
Şekil 20. 6 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	65
Şekil 21. 7 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	67
Şekil 22. 7 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	67
Şekil 23. 8 No'lu Olgunun Aile Ağacı.....	69
Şekil 24. 8 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri	70
Şekil 25. 8 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (FRMPD4)	71
Şekil 26. Farklı türlerde IQSEC2 geni amino asit dizilimi (900. pozisyonda valin)	75
Şekil 27. IQSEC2 proteinine ait domainler ve Val900 ile mutasyonun yer aldığı domain	76
Şekil 28. Farklı türlerde PLA2G6 geni amino asit dizilimi (596. pozisyonda lösin)	79
Şekil 29. PLA2G6 proteinine ait domainler ve L596F mutasyonun yer aldığı domain.....	80
Şekil 30. Farklı türlerde FRMPD4 geni amino asit dizilimi (1033. pozisyonda aspartat)	88

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. ID'nin etiyojisi.....	6
Tablo 2. Sık görülen bazı mikrolelesyon sendromları ve insidansları.....	12
Tablo 3. Yeni Nesil Dizileme platformlarının genel özellikleri.....	23
Tablo 4. Varyantların değerlendirilmesinde kullanılan veritabanları.....	32
Tablo 5. Patojenik varyantların sınıflandırılmasındaki kriterler.....	33
Tablo 6. Benign varyantların sınıflandırılmasındaki kriterler.....	34
Tablo 7. Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerin birlikte kullanılması sonucu varyantların etkisinin belirlenmesi.....	35
Tablo 8. ACMG'nin yayımladığı kılavuza göre klinik sekanslamada IF tespit edildiğinde rapor edilmesi gereken genlerin listesi.....	37
Tablo 9. WES yapılan olgulardaki datanın kalite ölçüt parametreleri.....	45
Tablo 10. Olgularda WES sonucu bulunan varyantların sayısı ve aday genlerde bulunan mutasyonların önceliklendirilmesindeki basamaklar.....	47
Tablo 11. Çalışmada Saptanan Mutasyonlar.....	48

KISALTMALAR

MR	:	Mental retardasyon
ID	:	Intellectual disability
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
MCA	:	Multipl konjenital anomali
IQ	:	Intelligenz quotient (Zeka katsayısı)
AGTE	:	Ankara Gelişim Tarama Envanteri
FISH	:	Fluoresan in Situ Hybridization
CGH	:	Comparative Genomic Hybridization
MLPA	:	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
XLID	:	X'e bağlı intellectual disability
CNV	:	Copy Number Variants ((Kopya Sayısı değişiklikleri))
NGS	:	Yeni nesil dizileme
WES	:	Tüm ekzom dizileme
ACMG	:	American College of Medical Genetics and Genomics
IF	:	Rastlantısal bulgu
NHLBI	:	National Heart, Lung, ve Blood Institute
MAF	:	Minör allel frekansı
ICD	:	International Classification of Diseases
ARID	:	Otozomal resesif intellectual disability
sARID	:	Sendromik otozomal resesif intellectual disability
nsARID	:	Sendromik olmayan otozomal resesif intellectual disability
MMR	:	Mismatch repair
NBIA	:	Beinde demir birikimi ile giden nörodejenerasyon

- PKAN : Pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyon
- FAHN : Yağ asit hidroksilaz ilişkili nörodejenerasyon
- MPAN : Mitokondriyal membran proteini ilişkili nörodejenerasyon
- BPAN : Beta iletici proteinle ilişkili nörodejenerasyon
- INAD : Klasik infantil nöroaksonal distrofi
- NAD : Atipik nöroaksonal distrofi
- PLAN : Fosfolipaz A2 ilişkili nörodejenerasyon



ÖZET

Mental retardasyon (MR) zekayı etkileyen tüm yeteneklerin kaybı ve ilerlememesi sonucu oluşan, genel zihinsel fonksiyonların ortalamanın anlamlı derecede altında olması şeklinde tanımlanmaktadır. Günümüzde MR yerine zihinsel yetersizlik (intellectual disability, ID) terimi kullanılmaya başlanmıştır. ID yaklaşık olarak popülasyonun %1-3'ünü etkilemektedir. ID kadınlara göre erkeklerde daha sık görülmektedir. ID izole olabileceği gibi multipl konjenital anomaliler de (MCA) eşlik edebilir. Bu çalışmada genetik bir sebepten olduğu tahmin edilen tanısı konulamamış ID ve/veya multipl konjenital anomalisi olan 8 olgu tüm ekzom dizileme tekniği ile araştırılmıştır.

Çalışmada 3 tanesi X'e bağlı kalıtım paterni, 1 tanesi otozomal resesif kalıtım paterni gösteren toplamda 4 olguda (%50) tanı konulmuştur. Olgularda bulunan mutasyonlar *IQSEC2* (p.Val900Ile), *PLAG2G6* (p.Leu542Phe), *AGTR2* (p.Tyr189X), *FRMPD4* (p.Asp1033Asn) genlerinde bulunmuştur. Tanı konulan olgularda saptanan mutasyonların hepsi ilk defa çalışmamızda saptanmıştır. Ayrıca rastlantısal olarak 2 olgu ve ebeveynlerinde ACMG (American College of Medical Genetics) tarafından bildirilmesi önerilen genlerden 2 tanesinde (*PMS2* ve *MSH2*) mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar da ilk defa çalışmamızda saptanmıştır.

Bu çalışma, ülkemizde tanısı konulamamış ID ve/veya multipl konjenital anomalisi olan olguların yeni nesil dizileme ile etiyolojilerini aydınlatmaya yönelik yapılmış ilk çalışmadır. Olgulardaki genetik etiyolojisinin aydınlatılması, gelişebilecek komplikasyonların önlenmesine ve etkilenen ailelere daha etkili genetik danışma verilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Yeni Nesil Dizi Analizi, Multipl Konjenital Anomali, Mental Retardasyon, Mutasyon

ABSTRACT

Mental retardation (MR) is defined as significantly lower average general intellectual function caused by the loss of all ability to affect intelligence and progress. Currently, the term “intellectual disability (ID)” is being used instead of MR. Approximately 1-3 percent of the global population has an intellectual disability. ID is more common in men than in women. ID may be isolated or may be associated with multiple congenital anomalies (MCA). In this study, eight of undiagnosed ID and/or MCA cases supposed to have genetic etiology were analyzed by whole exome sequencing.

The results revealed that three of four cases had the X-linked inheritance pattern and one of them showed the autosomal recessive pattern of inheritance. The diagnosis was established for these four cases corresponding 50 percent diagnosis rate. The mutations in these cases were found to be in *IQSEC2* (p.Val900Ile), *PLAG2G6* (p.Leu542Phe), *AGTR2* (p.Tyr189X), *FRMPD4* (p.Asp1033Asn) genes. All of the mutations identified in our patients were novel. Furthermore, the novel mutations in *PMS2* and *MSH2* mutations were coincidentally identified in two patients and their parents, and these genes are proposed to be reported by American College of Medical Genetics.

This study is the first study in our country which aim to figure out the etiology of undiagnosed ID and/or MCA cases with next generation sequencing. The identification of genetic etiology for these kind of cases will contribute to prevent complications and provide more effective genetic counseling for affected families.

Key Words: Next-Generation Sequencing, Multiple Congenital Anomaly, Mental Retardation, Mutation

1. Giriş

Mental retardasyon (MR) Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından zekayı etkileyen tüm yeteneklerin kaybı ve ilerlememesi sonucu oluşan, genel zihinsel fonksiyonların ortalamanın anlamlı derecede altında olması şeklinde tanımlanmaktadır. Günümüzde MR yerine intellectual disability (ID) terimi kullanılmaya başlanmıştır (1). Zekanın normalin altında olması IQ puanınının 70'in altında olması olarak tanımlanır (2). 5 yaşın altındaki çocuklarda ID'nin tanımlanması zordur ve gelişme geriliği tanımı tercih edilmektedir (3).

ID toplumdan topluma sıklığı değişmekle birlikte toplumun % 1-3'ünü etkileyen yaygın toplumsal bir sorundur (4). ID kadınlara göre erkeklerde daha sık görülmektedir. Erkek/kadın oranı yapılan bir çalışmada 1.4/1.0 olarak tespit edilmiştir (3). ID izole olabileceği (non-sendromik) gibi multipl konjenital anomaliler'de (MCA) eşlik edebilir (sendromik). Öncelikle etiyolojisinin aydınlatılması ve tanıya ulaşılabilmesi için sendromik ve non-sendromik ID'nin ayırıcı tanısının ayırt edilmesi gerekmektedir.

ID DSM-V'e göre hafif, orta, ağır ve çok ağır ID olmak üzere dört ana sınıfta incelenir (1). ID tam olarak çözümlenmemiş bir sağlık sorunu ve büyük bir sosyo-ekonomik yüküdür. Kromozomal anomaliler ID'nin en önemli nedenlerindedir. Ciddi ID'li olguların %22'sinde altta yatan neden kromozomal bir bozukluktur (5). Günümüze kadar 450'den fazla genin ID ile ilişkisi bildirilmiş olup bu sayının 2,000 - 3,000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (5, 6). Ancak hala ID'li olguların %60'nın etiyolojisi bilinmemektedir (7). Nedeni aydınlatılamamış olgular son yılların devrim niteliğindeki buluşu olan yeni nesil dizileme yöntemleri ile araştırılmaktadır. Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla ve oldukça hızlı bir şekilde dizileme yapılabilmektedir. Günümüzde bu yöntemlerden en sık başvurulanı Tüm Ekzom Dizileme' dir. Bu

yöntemle genomumuzun %1,5'lik kısmını oluşturan protein kodlayan bölgeler dizilenmekte ve bu bölgelerdeki değişiklikler saptanabilmektedir.

Altta yatan genetik etiyolojinin erken dönemde belirlenmesi hasta ve aile açısından oldukça önemlidir. Çünkü bu sayede uygun tedavi seçenekleri belirlenebilir, hastalıkla ilişkili komplikasyonlar erken dönemde tespit edilebilir ve tekrarlama riski ile sonraki gebelikler hakkında aileler bilgilendirilebilmektedir.

Ülkemizde tanısı konulamamış ID ve/veya multipl konjenital anomali olan olguların yeni nesil dizileme ile etiyolojilerini aydınlatmaya yönelik yapılmış yayın bulunmamaktadır. Bu çalışmada Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Genetik Bilim Dalı polikliniğinden izlenen ID ve/veya multipl konjenital anomali nedeniyle araştırılan, klinik olarak bilinen bir sendrom veya hastalığa uymayan 8 çocuk olgunun tüm ekzom dizileme tekniği ile altta yatan genetik nedenini bulmayı hedeflemekteyiz.

2. Literatür Özeti

2.1 Zekanın Tanımı

Zeka tanımı itibariyle göreceli bir kavram olup farklı toplum ve zamanlarda birbirinden farklı olarak tanımlanmıştır. En geniş anlamıyla zeka zihnin öğrenme, öğrenilenden yararlanabilme, yeni durumlara adapte olup ve bu durumlara çözüm yolları bulabilme yeteneğidir. Zekanın gelişimini birçok genetik ve çevresel etmenler etkilemektedir. Zeka genomumuzda yer alan birçok genin birçok yolağı etkilemesi ve aynı zamanda çevresel uyarıların da katkısıyla gelişmektedir.

2.2 Zeka Ölçümünde Kullanılan Testler

Soyut bir kavram olan zekanın tanımlanması kadar ölçülmesi de zordur. Uygulanabilir ilk zeka testinin geliştiricileri Fransız psikolog Alfred Binet ve Dr. Theodor Simon'dur. 20. yüzyılın başlarında yayımlanan bu testin adı "Binet-Simon Testi"dir . Bu testin amacı özel eğitime ihtiyacı olan başarısız çocukların normal populasyondan ayırt edilmesini sağlamaktır. IQ (Intelligenz quotient) Alman psikolog Wilhelm Stern tarafından 1912 yılında zekayı değerlendirmek için ortaya koyduğu bir deyimdir. Bu testde zeka oranı zeka yaşının takvim yaşına bölünerek yüz ile çarpılmasıyla elde edilir. 1955 yılında David Wechsler tarafından yetişkinler için Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) ve çocuklar için Wechsler Intelligence Scale of Children (WISC) yayınlamış ve toplum içindeki zeka düzeyleri bir çan eğrisi modeli ile değerlendirilmiştir. Bu testler ortalama her on yılda bir güncellenmekte ve günümüzde kullanılmaktadır. Ayrıca "Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE)" "Denver Gelişim Envanteri", ve "Stanford-Binet testi" günümüzde klinik uygulamalarda yer alan zeka ölçeklerindedir.

2.3 ID'nin Tanımı, Epidemiyolojisi ve Sınıflandırılması

ID toplumdan topluma sıklığı değişmekle birlikte toplumun % 1-3'ünü etkileyen yaygın toplumsal bir sorundur (4). American Association on Intellectual and Developmental Disabilities'in belirlediği standartlara göre intellectual disability, mental

retardasyon ve entellektüel yetersizlik terimlerini kapsamaktadır ve günümüzde mental retardasyon yerine intellectual disability (ID) terimi kullanılmaya başlanmıştır (1).

Amerikan Psikiatri Derneği'nin "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Zihinsel Bozukluklar için Tanı ve İstatistik El Kitabı, DSM-V)" isimli kitabında ID tanımı şu şekilde yapılmaktadır (8):

- Zihinsel işlevlerde önemli derecede kısıtlılık
- Sosyal ve pratik beceriler gibi adaptif davranışlarda önemli derecede kısıtlılık
- Başlama yaşının 18'den önce olması

Bu kriterleri sağlayan bireylere ID tanısı konulmaktadır. Zekanın normalin altında olması IQ puanının 70'in altında olması olarak tanımlanır (2). Beş yaşın altındaki çocuklarda MR'nin tanımlanması zordur ve gelişme geriliği tanımı tercih edilmektedir (3). ID izole olabileceği gibi multipl konjenital anomaliler'de (MCA) eşlik edebilir. ID 'li olguların yaklaşık %1'ine dismorfik bulgular ile birlikte santral sinir sistemi, kardiyovasküler, ürogenital sistem gibi major organ sistemlerini etkileyen bulgular da mevcut olabilir (9). Olgulardaki mevcut konjenital anomalilerin sayısı ve özellikleri ID 'nin genetik kaynaklı olabileceği hakkında bilgi verir. ID kadınlara göre erkeklerde daha sık görülmektedir. Erkek/kadın oranı toplumdan topluma farklılık gösterse de yapılan bir çalışmada 1.4/1.0 olarak tespit edilmiştir (3). Erkeklerde ID'nin daha sık gözlenmesinin nedenleri arasında X'e bağlı ID 'nin erkekleri etkilemesi önemli ölçüde yer tutmaktadır (10).

ID DSM-V'e göre hafif, orta, ağır ve çok ağır ID olmak üzere dört ana sınıfta incelenir (1).

Hafif ID: IQ seviyesi 50-69 arasında olan gruptur . Tüm ID'li olguların % 85'ini oluşturular (11, 12). Normal çocuklardan okul yaşına kadar ayırt edilmeyebilirler. Uygun eğitimle olguların birçoğu kendi yaşamlarını bakıma muhtaç olmadan sürdürebilecek sosyal ve mesleki yetenek kazanabilirler.

Orta ID: IQ seviyesi 35-49 arasında olan gruptur . Tüm ID'li olguların % 10'unu oluşturular (11, 12). Okul öncesi yıllarda konuşma yeteneğine sahiptirler. Özel

eğitimden fayda görürler. Kendi bakımlarını karşılayabilecek ve basit işlerde çalışabilecek durumdadırlar.

Ağır ID: IQ seviyesi 20-34 arasında olan gruptur. Tüm ID'li olguların % 3-4'nü oluşturular. Motor fonksiyonlarında gerilik vardır. Okul dönemine kadar konuşamayabilirler. Özel eğitimle temel bakımlarını sağlayabilecek duruma gelebilirler. Çok basit işleri kontrol altında yaparlar.

Çok ağır ID: IQ seviyesi 20'nin altında olan gruptur. Tüm ID'li olguların % 1-2'sini oluşturular. Olgular genellikle bakıma muhtaçtırlar. Yaygın bir gelişme geriliği mevcut olup özel eğitimle bazı motor becerileri kazanırlar.

Bu grupların haricinde derecesi belirlenemeyen ID'li olgular mevcut olup standart gelişim testleri tarafından değerlendirilemezler. Uyumsuz kişiler bu grupta yer alır.

Sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlarda hafif ID oranı yüksektir. Orta ve ağır ID ise sosyoekonomik düzeyden bağımsız olarak her toplumda benzer oranlarda görülür.

2.4 ID'nin Etiyolojisi

ID genetik defektlerden olabileceği gibi sinir sisteminin gelişimini ve fonksiyonunu etkileyen çevresel faktörlerden de kaynaklanmaktadır. En yaygın çevresel faktörler gebelik dönemindeki malnutrisyon, prenatal ve postnatal asfiksi, fetal alkol sendromu, nörotoksik bileşiklere maruziyet, prematüre doğum, perinatal ve postnatal asfiksi veya travma olmaktadır. Bu faktörler hafif ID sıklığına büyük katkıda bulunurlar (12). Buna karşılık, genetik nedenler ciddi ID'li olgularda daha sık görülmektedir. Orta ve ciddi ID'li olguların etiyolojisinde % 65'i bulan oranda genetik nedenler oluşturmaktadır (12-14). Bu bilgiler ışığında genetik veya metabolik tanı oranı ciddi ID'de %65, orta ID'de %50 iken; hafif ID'li olgularda %20 olmaktadır. ID'nin etiyolojisi ortaya çıkma dönemleri bakımından prenatal, perinatal ve postnatal olarak üçe ayrılır (15). Bu etiyojik nedenler tablo 1'de gösterilmiştir (3). ID'li olguların hala %60'nın etiyolojisi bilinmemektedir (7).

Tablo 1. ID'nin etiyolojisi (3)

Prenatal	Perinatal	Postnatal
Enfeksiyon (Tokso plazma, rubella, sitomegalovirüs, herpes simpleks virüsü gibi)	Hipoksi	Edinsel beyin hasarı
Genetik anomaliler Trizomi 21 Fragile X Diğer (nokta mutasyonları; kromozomal delesyon, duplikasyon, yeniden düzenlenmeler)	Prematüre doğum komplikasyonları	SSS hemorajisi
Toksinler ve teratojenler Alkol kullanımı İlaç kullanımı Radyasyona maruziyet	İntrakranial hemoraji	SSS enfeksiyonu
Konjenital hipotiroidizm	Perinatal santral sinir sistemi komplikasyonları	SSS maligniteleri
Yenidoğan metabolik hastalıklar		Şiddetli çevresel faktörlerin yoksunluğu Şiddetli malnutrisyon Toksinler (Kurşun, civa)

SSS : Santral SİNİR SİSTEMİ

2.5 ID'li Olguların Tanısı

ID'li bir olguya yaklaşımda öncelikle ayrıntılı bir anamnez alınmalı prenatal, perinatal ve postnatal dönemdeki risk faktörleri sorgulanmalıdır (Tablo 1). Üç kuşağı içeren aile ağacı çizilmeli ve ailedeki benzer öyküye sahip bireyler ve akraba evliliği sorgulanmalıdır. Soyağacı hastalığın kalıtım modeli ve olası genetik nedenler açısından bilgi verici olabilir.

Olgularda büyüme ve gelişmenin derecesini belirleyen ölçümler ve dismorfik muayane ile ayrıntılı bir fizik muayene yapılmalı ve sendromik olgular araştırılmalıdır.

Olgulara düşünülen etiyolojiye yönelik laboratuvar ve metabolik testler yapılmalı, santral sinir sistemi başta olmak üzere gerekli görüntüleme yöntemlerine başvurulmalıdır.

2.6 ID'ye Sebep Olan Genetik Nedenler

ID izole olabileceği gibi (non-sendromik), multipl konjenital anomalilerin de eşlik ettiği bir sendromun parçası da (sendromik) olabilir. Öncelikle etiyolojisinin

aydınlatılması ve tanıya ulaşılabilmesi için sendromik ve non-sendromik ID'nin ayırıcı tanısının ayırt edilmesi gerekmektedir. Altta yatan nedenin aydınlatılması ile hastalığın prognozu hakkında bilgi verilebilir, tedavinin düzenlenmesi ve tekrarlama risklerinin önlenmesi sağlanabilir. ID'ye sebep olan genetik nedenler dört ana grupta sınıflandırılabilir.

1. Kromozomal anomaliler
 - i. Sayısal kromozomal anomaliler
 - ii. Yapısal kromozomal anomaliler
2. Tek Gen Hastalıkları
 - i. Otozomal dominant
 - ii. Otozomal resesif
 - iii. X'e bağlı dominant
 - iv. X'e bağlı resesif
3. Poligenik-Multifaktöriyel nedenler
4. Mitokondriyal nedenler

2.6.1 Kromozomal anomaliler

Kromozom Yunanca'da chroma "renkli" ve soma "cisim" kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Kromozom, DNA'nın paketlenmesi sonucu bölünen hücrelerde görülebilen koyu boyanmış genetik yapıdır. İnterfaz evresinde kromatin şeklinde bulunan genetik materyalimiz, hücre bölünme evresine geçtiği andan itibaren bu kromatin iplikçikleri spiral şeklinde kıvrılır, kalınlaşır ve yoğunlaşmış bir şekilde kromozom haline geçerler. Bu sayede genetik materyalimiz kromozom yapısının oluşmasıyla sayı ve morfolojileri analiz edilebilmesine imkan sağlar.

İnsan vücut (somatik) hücrelerinde 23 anneden ve 23 tanesi babadan olmak üzere iki haploit (n) takımın zigotta birleşmesi sonucu diploit ($2n=46$) kromozom vardır. 22 çift kromozom "otozomal", bir çift cinsiyet kromozomu "gonozomal" kromozom adını alır. Bir metafaz kromozomu iki kardeş kromatitden oluşur. Bu kardeş kromatitler mitozun anafaz evresinde birbirlerinden ayrılırlar.

Kromozomlar ışık mikroskobu ile mitoz bölünmenin metafaz evresinde incelenirler. Metafaz evresi kromozomların en iyi yoğunlaştıkları ve en iyi görülebilir hale geldikleri evredir.

Kromozomal anomaliler ID'nin en önemli nedenlerindedir. Ciddi ID'li olguların %22'sinde altta yatan neden kromozomal bir bozukluktur (5). Kromozomal anöploidiler arasında en yaygın neden trizomi 21'dir (16, 17).

Kromozom düzensizlikleri sayısal ve yapısal olmak üzere iki grupta incelenir. Bu anormallikler, tüm vücut hücrelerinde olabileceği gibi sadece bir veya daha fazla sayıda hücre klonlarını kapsayabilir.

2.6.1.1 Sayısal Kromozomal Anomaliler

İnsan eşey hücrelerinde 23 adet kromozom bulunur ve bu sayı insan için haploid sayıdır (n). Somatik hücrelerdeki kromozom sayısı ise eşey hücrelerdeki kromozom sayısının iki kat olup diploid ($2n$) dir.

Kromozom sayısındaki artış ya da azalışlar temel kromozom sayısının ($n=23$) tam katları kadar oluyorsa buna poliploidi denir.

Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmeler anöploidi adını alır.

2.6.1.1.1 Down Sendromu

Down sendromu önemli bir toplumsal sorundur. Canlı doğumlar arasındaki sıklığı 1.2/1000 dolayındadır ve ID ile ilişkili en sık görülen anöploididir (6). Hastalığın temel nedeni kromozom 21'in mayoz sırasındaki ayrılmama durumudur. Görülme sıklığı anne yaşındaki artışa bağlı olarak yükselmektedir. Temel patoloji 21. kromozomun trizomik olmasıdır.

Morfolojik bulguları: Mongol tip göz yapısı, gözlerin köşesinde epikantik katlanma, irisin noktalı olması (Brushfield lekeleri), ağzın açık kalmasını sağlayan dil yapısı, burun kökü basıklığı, küçük ve kıvrık kulaklar, avuç içinde simian çizgisi gözlenir. Bunların haricinde bu sendromda birçok sistemde anomalide vardır. Konjenital kalp

hastalıkları, SSS bulguları, mental retardasyon, immün yetmezlik bunlardan sadece birkaçıdır.

ID sebepleri arasında en büyük yeri tutar. Büyük çoğunluğunda hafif-orta mental retardasyon gözlenir. Olgular özel eğitim alarak kendine yeter hale gelebilmektedir.

2.6.1.1.2 Edwards Sendromu

Otozomal trizomiler arasında Down sendromundan sonra en sık gözlenen ikinci trizomidir. Temel kusur 18. kromozomun trizomik olmasıdır. Görülme sıklığı tüm gebelerde 1/3000'dir (18). Büyük çoğunluğu prenatal dönemde kaybedilir. Büyüme gelişme geriliği, mental retardasyon, mikrosefali, yarık damak/dudak, omfalosel, konjenital kalp ve böbrek anomalileri temel klinik bulguları arasındadır.

2.6.1.1.3 Patau Sendromu

Patau sendromu görülme sıklığı 10.000 canlı doğumda bir görülen bir kromozomal anomalidir (19). Temel patoloji 13. kromozomun trizomik olmasıdır.

Başlıca bulguları ID, mikrosefali, holoprozansafali, yarık dudak/damak, meningomyelosel, omfalosel, konjenital kap ve böbrek anomalileridir. Yaşam beklentisi genellikle bu olgularda bir yıl civarında olmaktadır.

2.6.1.1.4 Klinefelter sendromu

Bu hastalarda fazladan bir X kromozomu vardır. Karyotipleri 47,XXY dir. Canlı erkek doğumların 1/500'ünde görülür. Fenotipik olarak erkektirler. Bu bireylerin erişkin dönemlerinde infertilite, testislerin küçük olması (hipogonadizm) ve azospermi ile karakterizedirler. Uzun boylu ve hırçın davranışlı oldukları gözlenir. Bu hastalarda testosteron düzeyleri düşük ve buna sekonder gonadotropin (FSH ve LH) düzeyleri yüksek veya normaldir (20). Testosteron düzeylerindeki düşme nedeni ile sekonder seks karakterlerinin gerilediği ve jinekomasti görülür. Hastalar taşıdıkları iki X kromozomu nedeni ile X kromatini pozitifler.

2.6.1.2 Yapısal Kromozomal Anomaliler

Sayısal düzensizlikler anlatıldığı üzere hücre bölünmesindeki kusurlardan kaynaklanmaktaydı. Fakat yapısal düzensizliklerin nedeni aynı ya da farklı kromozomlardaki kırılma ve yeniden düzenlemelerdir. Yapısal kromozomal anomaliler klinikte ID ve/veya MCA'ler ile karşımıza çıkabilmektedir. Yapısal kromozomal anomaliler arasında; translokasyonlar, delesyon/duplikasyonlar, inversiyonlar, ring kromozomlar, izokromozom ve marker kromozomlar yer almaktadır.

Bir kromozomdan kopan yada kırılan parçanın diğer bir kromozoma yerleşmesine *translokasyon* denmektedir. Gen sayısının ve niteliğinin aynı kaldığı translokasyonlara dengeli, gen sayısının ve niteliğinin değiştiği ve çoğunlukla fenotopik düzensizliklere yol açanlara dengesiz translokasyon denmektedir. Translokasyonlar karşılıklı (resiprokal) translokasyon, sentrik kaynaşma (Robertsonian) tipi translokasyon, insersiyonel (transpozisyon) tipi translokasyon olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Delesyon kırılma sonucu bir kromozomun küçük bir parçasının kopmasına denmektedir. Delesyon iki türlü olabilir. Bir darbe sonucu kırılan kromozom parçası kopmasına "terminal delesyon" ya da iki darbe sonucu kopan parça aradan çıktıktan sonra iki parça yeniden kaynaşmasına "interstisyel delesyon" denmektedir.

Mikrodelesyon sendromlarında ışık mikroskopunda görülemeyecek kadar küçük kayıplar olmaktadır. FISH tekniği ile bu mikrodelesyonlar gösterilebilmektedir.

Duplikasyon homolog iki kromozomdan birinde çift darbe sonucu kopan parçanın diğerinde tek darbe sonucu kopan aralığa girerek kaynaşması sonucu ortaya çıkmaktadır. Tekrar parçadaki genler ardışık hale gelirse tandem duplikasyon, ters ardışık hale gelirse ters tandem duplikasyon olarak adlandırılır. Delesyonlar ve duplikasyonlar genellikle mayoz bölünmede eşit olmayan krosing over sonucu ortaya çıkar.

Bir kromozoma iki darbe gelmesi sonucu kopan parçanın kaybolmadan, yani delesyona uğramadan kendi eksenini etrafında 180 derece dönerek yine eski yerine yapışmasına *inversiyon* denir.

Bir kromozomun iki ucunda iki darbe sonucu, iki kırılma olur ve bu kırık uçlara başka bir parça birleşmeden iki uç kaynaşır ve halka şeklinde bir kromozom ortaya çıkmasına *ring kromozom* adı verilmektedir.

Metafazda iğ ipliklerine sentromerleri ile tutunan kromozomlar, normalde boylamasına bölünerek iki kromatide ayrılmaktadır. *İzokromozomda* ise normalde boylamasına ayrılacak olan bu kromozomların bir hata sonucu enlemesine bölünmesi olmaktadır. Bu durumda yavru hücrelerden birinde yalnızca kromozomların kısa kolları bulunurken diğerinde yalnızca uzun kollar bulunmaktadır.

Herhangi bir kromozom yapısına uymayan ve kesin olarak tanımlanamayan çok küçük kromozomlara *marker kromozom* denmektedir.

2.6.1.2.1 Mikrodelesyon Sendromları

Ardışık gen delesyonu (Contiguous gene deletion) olarak da adlandırılır. Mikrodelesyonların oluşma mekanizmaları arasında mayoz esnasında kromozomlar arasında non-allelic homolog rekombinasyon yer almaktadır (21). Konvensiyonel sitogenetik yöntemler ile karyotip analizinin çözünürlüğü en iyi koşullarda yaklaşık 5 Mb düzeyindedir. Bu nedenle rutin karyotip analizinde saptanamayan daha küçük delesyon, duplikasyon ve translokasyon gibi anomalilerin daha yüksek çözünürlüklü incelenmesi için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin başında için Floresan in Situ Hybridization (FISH), comparative genomic hybridization (CGH), arrayCGH, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) gibi moleküler ve moleküler sitogenetik yöntemler yer almaktadır. Bazı sık görülen mikrodelesyon sendromları tablo 2'de özetlenmiştir (22).

Tablo 2. Sık görülen bazı mikrodelyasyon sendromları ve insidansları (21).

Sendrom	Lokus	Delesyon insidansı
Di George/ Velokardiyofasyal Sendrom	22q11.2	1/4000
Prader Willi Sendromu	15q11-q13	1/15000
Angelman Sendromu	15q11-q13	1/15000
Williams Sendromu	7q11.23	1/25000
Smith Magenis Sendromu	17p11.2	Nadir
Miller Dieker Sendromu	17p11.3	Nadir
Cri du Chat Sendromu	5p15	Nadir
Retinoblastom	13q14	Nadir
Rubinstein Taybi Sendromu	16p13.3	Nadir
Wolf Hirschhorn Sendromu	4p16.3	Nadir
WAGR	11p13	Nadir

2.6.1.2.2 Subtelomerik Yeniden Düzenlenmeler

Ökaryotik kromozomların uç kısımlarında yer alan DNA dizilerine telomer denmektedir. Telomerler kromozomların yapısının korunmasında ve replikasyonun lineer şekilde olmasını sağlamaktadır. Ayrıca mayozda homolog kromozom eşleşmesinde kritik rol almaktadır. Minisatellit dizilerinden oluşur ; insanda TTAGGG dizisinin ardışık tekrarından oluşan 2-15kb boyutundaki yapılardır. Bu telomerik bölgelerin hemen yanında çeşitli tekrarlayan DNA dizilerini içeren, gen içeriğinden oldukça zengin bu bölgeler subtelomerik bölge olarak adlandırılır. Subtelomerik bölgeler bu tekrar dizilerinden dolayı yeniden düzenlenmelere çok açıktırlar. Bu durum yapısal kromozom anomalilerin bu bölgelerde daha sık görülmesinin sebebini ortaya koymaktadır.

Karyotip testi normal olan ID'li olguların %2,5'inde subtelomerik bölgelerdeki kayıplar gösterilmiştir (17).

2.6.2 Tek Gen Hastalıkları

Hastalardaki klinik bulguların oluşumunda tek bir gen bölgesindeki meydana gelen değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Genel olarak mendelian kurallarına uyarlar ve belirli kalıtım kalıpları gösterirler.

İnsanda 46 tane kromozom bulunmaktadır. Bunlardan 44 tanesi otozomal kromozomlar ve bunlar üzerindeki genler de otozomal genlerdir. Geriye kalan iki tanesi ise kadında XX ve erkekte XY biçiminde bulunur. Bunlara cinsiyet (seks) kromozomları ya da gonozom ve bunlarda bulunan genlere gonozomal genler adı verilir. ID'ye neden olabileceği düşünülen 2,000 - 3,000 arasında gen tahmin edilmektedir (6). Günümüzde ise 450'den fazla genin ID ile ilişkisi bildirilmiştir (6). ID 'ye neden olan tek gen hastalıkları X'e bağlı, otozomal dominant ve otozomal resesif olarak sınıflandırılır.

Bağlantı analizi gibi geleneksel yöntemler için otozomal dominant kalıtıma uyan ID'li geniş aile bulmak çoğunlukla azalmış fertilitate nedeniyle çok nadirdir. Klinik uygulamada daha çok izole olgular görülür. Bu da otozomal dominant ID'li olgularda de-novo DNA yeniden düzenlemelerin ve varyasyonların yaygın bir sebebi olduğu fikrini ortaya koymaktadır. Nitekim kullanılan hasta seçimine bağlı olarak yapılan çeşitli büyük kohort çalışmalarında CNV'lerin ID'li olguların %15-20'sinin sebebi olduğu gösterilmiştir (23, 24). Son zamanlarda tüm ekzom dizileme ve tüm genom dizileme yaklaşımları de-novo DNA varyantları belirlemek için ID ve otizmlide hastalarda kullanılmaktadır. Bu çalışmalar ciddi ID'li hastaların yaklaşık % 35-45'ine de-novo varyantların sebep olabileceğini göstermektedir (25, 26).

Otozomal resesif ID (ARID)'ye neden olan genetik sebeplerin aydınlatılmasına büyük ailelerin yetersiz olması ve genetik heterojenite engel olmuştur (27-29). Bu nedenle, en başarılı çalışmalar ARID'nin sendromik formlarına sebep olan genlerinin tanımlanmasında olmuştur. Çünkü aynı bulgulara sahip birden çok ailenin olması ve bu ailelerden elde edilen genetik bilgilerin birleştirilmesi sayesinde altta yatan genetik sebep bulunabilmiştir. Sonuç olarak ARID'nin sendromik formlarına (sARID) sebep olan 250'den fazla gen tanımlanmıştır. Buna karşın ARID 'nin sendromik olmayan formlarına sebep olan genlerin tanımlanması ise daha az olmaktadır (6, 30, 31). Günümüze kadar ancak 40'dan fazla lokus rapor edilmiştir. 2007'ye kadar sadece 3 gen *PRSS12* (29) ,

CRBN (28) ve *CC2D1A* (27) nsARID ile ilişkilendirilebilmiştir. 2007 yılında Najmabadi ve arkadaşları akraba evliliği oranının %40'dan fazla olduğu İran popülasyonunda bir proje başlatmış ve sekiz yeni lokus nsARID 'de tanımlamıştır (32). Daha sonraki çalışmalarda ise nsARID 'ye neden olan *GRIK2* (33), *TUSC3* (34) , *TRAPPC9* (35), *ST3GAL3* (36), ve *ZC3H14* (37) gibi yeni genlerde homozigot mutasyonlar saptanmıştır. Sonrasında akraba evliliği yapmış İsrail'li bir ailede *TECR* (38) ve akraba evliliği yapmış Umman'lı geniş bir ailede *KIAA1033* genindeki mutasyonların nsARID ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (39).

DNA sekanslama alanındaki yüksek çıktılı tekniklerin ilerlemesi ile çok daha fazla ARID genleri tanımlanmıştır. Son zamanlarda hedefe yönelik yeni nesil dizileme tekniğinin daha önce homozigosite haritalaması yapılan ve çoğunlukla tek bir lokus tanımlanan akraba evliliği yapmış 136 İran'lı aileye uygulandığı bir çalışma ile bilinen 29 ARID geninde segregasyon olan varyasyon saptanmış ve daha önce ARID ile ilişkisi bilinmeyen genlerde 50 tane varyasyon bulunmuştur. Bu varyasyonların bulunduğu 29 gen nsARID ile ilişkilendirilmiştir (40). Günümüze kadar 41 tane genin nsARID ile ilişkili olduğu bulunmuş ve sadece 10 gendeki mutasyonların birden çok ARID 'li ailede tekrarladığı gösterilmiştir (41). Bundan dolayı çoğu ARID geninde bulunan mutasyonların tek bir kez gösterilmesi ID'ye neden olabilmesi konusunda şüphenin ötesinde kanıtlanmış değildir.

Tek gen hastalıkları ile ilişkili ID'ler içinde en fazla görülen X'e bağlı ID grubu yer alır. ID'ye neden olan gen sayısı X kromozomunda otozomal kromozomlara göre iki kat fazla oranda yer alması nedeni ile yakın zamana kadar ID ile ilişkili genetik çalışmalar X kromozomu üzerinde yoğunlaşmıştır (14). Günümüze kadar 112 tane gen XLID ile ilişkilendirilmiştir (42). Bu çalışmalar ışığında ID' li erkeklerin %10-12'sinin XLID olduğu tahmin edilmektedir (31). Erkeklerde tek X kromozomu olmasından dolayı bu kromozomda taşınan hastalıklar açısından hemizigot olup, XLID 'den daha çok ve ağır bir şekilde etkilenmektedirler. Kızlarda X kromozomlarından birinin dengesiz inaktivasyon paternine bağlı olarak XLID daha hafif bir klinikle ortaya çıkabilmektedir.

2.6.2.1 Frajil X Sendromu

ID'ye sebep olan tek gen hastalıkları içerisinde en yaygın olanıdır. Ortalama 5000 erkek bireyde bir görüldüğü tahmin edilmektedir ve ID'li olguların yaklaşık %0,5'ni oluşturmaktadır (43). ID'ye sebep olan tek gen hastalıkları içerisinde en iyi bilene *FMR1* genindeki mutasyonların yol açtığı Frajil X Sendromu XLID'ye neden olarak tanımlanan ilk gendir (44-46). Xq27.3'de yer alan *FMR1* genindeki CGG üçlü tekrar dizisindeki artışa bağlı olarak ortaya çıkar. *FMR1* geni ile kodlanan FMRP nöronal gelişim için gerekli bir proteindir. *FMR1* geninin 5' translyasyona uğramayan bölgesindeki CGG üçlü tekrar dizisinin artışı *FMR1* geninin metile olmasına ve protein ekspresyonunun azalmasına yol açar. Bu tekrar sayısı 200'ün üzerine geçtiğinde full mutasyon olarak adlandırılır. Premutasyon taşıyıcılarında ise tekrar sayısı 55-200 arasındadır (47).

Hastalığın klinik bulguları arasında ID, makroorşidizm, karakteristik yüz görünümü (uzun yüz yapısı, büyük kulaklar, çıkık elmacık kemikler) yer almaktadır (48). Frajil X sendromu kızlarda X kromozomlarından birinin inaktive olmasından dolayı daha hafif bulgular verir. Premutasyon taşıyıcı anne adaylarının erkek çocuklarında antisipasyonla fullmutasyon görülebilmektedir.

2.6.2.2 Metabolik Hastalıklar

Doğumsal metabolik hastalıklar çoğunlukla otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıklarıdır. Otozomal resesif kalıtılan bu hastalıkların akraba evliliğinin yüksek oranda olduğu ülkemizde daha sıklıkla akla gelmesi gerekir. Bu hasta grubunda bir maddenin başka bir maddeye çevrilmesinde görev alan enzimi ya da enzimin kofaktörünü kodlayan tek gen hatalarından kaynaklanmaktadır. Normal işlev için gerekli maddelerin sentezlenememesi veya ara ürünlerin çeşitli organ ve dokularda birikmesine bağlı olarak bulgular ortaya çıkar. Metabolik hastalıklar sıklıkla mental retardasyon ile birlikte dir. Billinen metabolik hastalıkların tarandığı büyük bir hasta grubunda doğumsal metabolik hastalıkların tanısı konulamamış ID'li olguların yaklaşık %3'ünden sorumlu olduğu ortaya konmuştur (49).

Ülkemizde yeni doğan tarama programı içinde yer alan Fenilketonüri ve hipotroidi hastalıklarında erken tanı ve uygun tedavi yöntemleri ile mental retardasyon

önlenebilmektedir. Fenilketonüri hastalığı otozomal resesif kalıtılır ve 12q24.1'de lokalize Fenil alanin hidroksilaz (PAH) genindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar. Enzimin çalışmaması sonucu fenilalanin ve metabolitleri vücutta birikir ve beyin hasarına neden olur. Tedavi edilmemiş ve erken tanı konulamayan olgularda mental retardasyon görülebilmektedir. Ayrıca bu olgular açık saç ve göz rengine sahip olup genellikle ciltte artmış pigmentasyona sahiptir.

2.7 Multipl Konjenital Anomaliler

Konjenital malformasyonlar doğumda tanımlanabilen vücut bölümleri ya da organların morfogenez defektleri olup yaklaşık %2-3 prevalansında görülmektedir (50). Hem genetik hem de çevresel etmenler rol oynamaktadır. Bilinen fenotipik paternlerin aksine birçok konjenital malformasyonlar farklı patolojik yollar ve nedenlerle tanımlanmaktadır. Bu yüzden tanılma süreci boyunca laboratuvar testleri, görüntüleme, fenotip analizi ve anamnezi içeren uzun ve zorlu bir takip yapılmaktadır.

Major malformasyonlar medikal ya da cerrahi tedavi gerektiren fonksiyon bozukluğu oluşturan defektler olup, medikal destek ihtiyacı olmayan ya da fonksiyon bozukluğu yapmayan defektler de minör malformasyonlar olarak adlandırılmaktadır ve %4'ten daha az görüldüğü bildirilmiştir (50).

Konjenital anomalilerin etiolojisine bakıldığında; anomalilerin yaklaşık %10-20'sinin genetik nedenlerden, %10-20'sinin çevresel nedenlerden, %60-80'nin ise bilinmeyen faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (50).

2.8 ID ve/veya MCA'nin Sebebinin Araştırılmasında Kullanılan Genetik Yöntemler

2.8.1 Karyotip Analizi

ID ve/veya MCA ile başvuran olgularda ilk yapılması gereken karyotip analizidir. Genellikle periferik kandaki lenfositler kültüründen elde edilen kromozomlar Giemsa bantlama yöntemiyle ışık mikroskobu altında incelenir. Konvansiyonel karyotipleme ile yaklaşık 5 Mb'dan daha küçük yapısal anomaliler saptanamamaktadır (51).

ID'li olgularda karyotip analizinin tanı değeri yaklaşık %15 oranındadır. Bu olguların en az üçte ikisini Down sendromu oluşturmaktadır (4, 7).

2.8.2 Subtelomerik FISH Yöntemi

Kromozomların subtelomerik bölgeleri klinikte nedeni açıklanamamış ID, tekrarlayan gebelik kayıpları ve hematolojik malignitelerde de araştırılmaktadır. Karyotip analizinde yüksek çözünürlüklü bantlama ile 5 Mb'dan büyük değişiklikler saptanabilir. Ancak subtelomerik bölgelerdeki daha küçük değişiklikler rutin sitogenetik analizlerle gözden kaçabilmekte ve daha farklı tekniklerle bu küçük değişiklikler saptanabilmektedir. Moleküler sitogenetik teknikler ile kromozom anomalilerinin tespiti belirgin ölçüde artmıştır. Yeni moleküler sitogenetik teknikler subtelomerik bölgelerdeki anomaliler dahil olmak üzere birçok mikrodelesyon/mikroduplikasyon sendromlarının tanımlanmasına yol açmıştır. Çoklu prob kullanılarak yapılan Fluorescence in situ hybridization (FISH) analizi klinik olarak ilk kullanılan ve en çok tercih edilen moleküler sitogenetik tekniktir. FISH tekniği ile aynı anda bir ya da birden fazla bölge incelenebilir. FISH özellikle mikrodelesyon sendromlarından şüphelenilen hastaların değerlendirilmesinde geniş kullanım alanına sahiptir. Bundan dolayı FISH tabanlı bir test istemeden önce klinik olarak bir tanıdan şüphe duyulmalıdır. Bu sınırlamaların üzerinden multipleks ligation dependent prob amplifikasyon (MLPA) tekniği gelmektedir. Bu teknik sayesinde tek bir reaksiyonla genomun 40-50 bölgesindeki delesyon veya duplikasyonlar aynı anda incelenebilmektedir. Bu yöntemler ID'li olgulara tanısal anlamda %5-10'una katkı sağlamaktadır (52).

2.8.3 Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu

Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu (CGH) ilk olarak 1992 yılında Kallioniemi ve ark.'ları tarafından uygulanmaya başlanmıştır (53). Bu yöntemde araştırılacak genomik DNA ile referans genomik DNA karşılaştırılarak, genom boyunca oluşmuş kayıp ve kazançların tespiti sağlanır. Bu iki genomik materyal genellikle yeşil ve kırmızı florokomlar kullanılarak farklı renklerde flöresans ile işaretlenir. Elde edilen flöresans renk farklılıklarına göre hasta ve referans genomik DNA birbirleri ile karşılaştırılarak kromozomal yeniden düzenlenmeler gösterilebilir.

Ancak CGH'in yeterli çözünürlükte olmaması sonucu mikroarray teknolojisi geliştirilmiştir. Bu yöntemde temel olarak; cam matris üzerine transfer edilmiş referans hedef dizi hastanın DNA'sı ile hibridize edilir. Bu teknikle çözünürlük artmış ve tüm genom taranarak genomdaki delesyon ve duplikasyon gibi yapısal değişiklikler saptanır hale gelmiştir.

Mikroarrayler boyutları 25 ile 85 baz çifti arasında değişen sentetik oligonükleotitler ya da boyutları 75 kb ile 200 kb arasında olan BAC (bacterial artificial chromosomes) klonları gibi DNA'nın belirli bir bölgesi kullanılarak yapılır (54). Array teknolojisindeki son gelişmeler tüm genomu konvansiyonel sitogenetik yöntemlere göre 10-10000 kat kadar daha yüksek rezolüsyonda inceleyebilmektedir. Nedeni açıklanamamış MR/MCA'lı olgularda array-CGH olguların yaklaşık %16,7'sinde CNV (Copy Number Variants) tanımlamıştır (52, 55-57). CGH çalışmalarında saptanan CNV'lerin boyutları 0.25-15 Mb aralığındadır (58). Rezolüsyon, kullanılan proplara ve klonlar arasındaki mesafeye bağlı olarak sınırlı olabilmekte ve 100 kb ile 1 Mb arasında değişebilmektedir. Bu nedenle daha yüksek çözünürlükte anomallikleri tespit etmek için SNP (single-nucleotide polymorphism) array teknolojisi geliştirilmiştir. SNP array genotipleme, submikroskopik CNV'leri tanımlama, düşük düzey kromozomal mozaizm ve üniparental dizomiye tanımlamada geniş bir kullanım alanına sahiptir (7, 59-61). Ek olarak array-CGH teknikleri sağlıklı bireylerde daha önce düşünülen daha fazla CNV olduğunu göstermiştir. Bu CNV'ler patojenik ya da benign olabilir. Sağlıklı bireylerin % 12'sinde genomlarının CNV içerdiği bildirilmiştir (62). Bu da yapılan çalışmalarda bulunan CNV'lerin yorumlanmasını sıklıkla zorlaştıran bir etken olmuştur.

2.8.4 Yeni Nesil Dizileme (NGS)

1970'li yıllarda Sanger ve arkadaşları (63) ile Maxam ve Gilbert (64) zincir sonlandırma ve fragmentasyon teknikleri ile DNA'nın dizilimini sağlayan metodlar geliştirmişlerdir. DNA dizi analizleri, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Sanger dizileme ve floresan tabanlı elektroforez teknolojileri kullanılarak insan DNA dizisinin büyük çoğunluğu tanımlanmıştır. 1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından devrimsel nitelik taşıyan PCR'in keşfi ile moleküler genomik alanda muazzam ilerlemeler olmuştur. Yüksek verimli

dizileme teknolojileri dahil olmak üzere giderek artan çeşitli moleküler yöntemler geçtiğimiz on yılda ortaya çıkmıştır.

Sanger yönteminin kısıtlamaları daha ucuz ve hızlı sekans teknolojilerine olan ihtiyacı arttırmıştır. Bu ihtiyaç, yeni nesil dizileme yöntemlerinin doğmasına yol açmıştır. 2004 yılında yeni nesil dizileme (NGS) teknikleri ortaya çıkmış ve hastalıklara neden olan genleri bulmak dahil birçok moleküler genetik alanında devrim olmuştur (65). 2005 yılında ise ilk NGS teknolojisi piyasaya sürülmüştür (66). NGS yöntemi sayesinde yüksek hacimde paralel dizileme yapılarak milyonlarca DNA fragmenti eş zamanlı bir şekilde sekanslanabilmektedir. Bu sayede tüm genomun kısa bir sürede sekanslanması mümkün hale gelmiştir. NGS yöntemleri beraberinde üç büyük yeniliği getirmiştir. İlk olarak DNA fragmanlarının bakteriyel klonlanmasının yerine hücre barındırmayan sistem içinde NGS kütüphanelerin hazırlanmasına olanak sağlamıştır. İkincil olarak aynı anda milyonlarca kısa dizilemenin yapılması ve son olarak da sekans çıktısı elektroforeze ihtiyaç duymaksızın direk olarak tespit ediliyor olmasıdır. NGS tarafından oluşturulan muazzam sayıdaki okumalar benzeri görülmemiş bir hızda tüm genom dizilimini sağladı. Bununla birlikte, NGS teknolojilerin bir dezavantajı göreceli olarak kısa okumalar yapmasıdır. Bu kısa okumaların genomda birleştirilmesi zor olduğundan yeni hizalama algoritmaların geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

2.8.4.1 Tüm Ekzom Dizileme'nin Temeli

Tüm ekzom dizileme (WES) genomdaki sadece protein kodlayan bölgeleri hedef alan prob hibridizasyon yöntemine dayanmaktadır. Tüm süreç örnek hazırlama, hibridizasyon ve dizileme olmak üzere üç basamakta sınıflandırılır. İlk basamakta fiziksel yöntemlerle (sonikasyon, nebulizasyon vb.) DNA rastgele yerlerden parçalanarak yaklaşık 250 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilir. Fragmentlerin uçları T4 DNA ligase ile tamir edilir ve fragmentlerin 3' poly-A kuyruğuna paired-end adaptörler takılır. Örnek hazırlamadaki son aşama ise oluşturulan kütüphanenin birkaç siklus ile çoğaltılmasıdır. Oluşturulan kütüphanenin çoğaltılmasında hedef zenginleştirme kitleri kullanılmaktadır. Hazırlanan bu ekzom kütüphanenin kalitesi ve miktarı dizilemeye geçmeden önce Agilent 2100 Bioanalyzer gibi çok hassas yöntemler ile analiz edilir. Bu ekzom kütüphanesi örneğin Illumina platformunda paired-end reads

ile her okumada 75–100 baz verimle dizilenir. İzotermal köprü çoğaltma yöntemini kullanarak yüzeydeki bir oligonükleotide bağlanan her bir fragment her kümede yaklaşık 1000 tane aynı molekül klonal kümeleri meydana getirir ve oluşan her bir klonal kümeden bir okuma dizisi elde edilir. DNA zinciri büyürken dizileme prosedürü, eklenen flörsan işaretli bazların hassas bir kamera ile tespitine dayanır. Tekrarlayan bu döngü sırasıyla gelecek bazı belirler.

Dizilemeden sonra bu çıktılar haritalama, varyantların tanımlanması ve varyant ile ilişkili olarak bilgilerin eklenmesi (annotation) olmak üzere üç ana basamakta işlenir. Sekans verisi Burrows–Wheeler Aligner (15) aracılığıyla referans dizi olan hg18/hg19 (GRCh37)'ye karşı hizalanır. Bir sonraki basamak olan varyantların tanımlanması aşamasında Burrows–Wheeler Aligner tarafından oluşturulan veriler SAMTools (15), Genome Analysis Tool Kit (15), ve Picard (<http://picard.sourceforge.net>) kullanılarak Sequence Alignment Map (SAM) formatına dönüştürülür. SAMTools verileri işleyerek ve sınıflandırarak kalite kontrol, kısa okumaların hizalanması ve varyant tanımlanması için kullanılır. Kısa hizalanmış okumalarda daha hızlı bir şekilde varyantların tanımlanması için SAM formatı BAM (binary equivalent SAM format) formatına çevirilir.

PCR duplikasyonları Picard MarkDuplicate ve SAMTools kullanılarak çıkartılır. Ortalama kapsamı ve kapsama derinliği (Average coverage and depth of coverage) Genome Analysis Tool Kit's Depth of Coverage analizi ile hesaplanır. ANNOVAR (15) genetik varyantların fonksiyonları hakkında bilgi vermek için kullanılan bir araçtır. Bulunan varyantlara yönelik genin ismi, kromozomal pozisyonu, nükleotit değişikliği, aminoasit değişikliği ve mutasyon çeşiti, SIFT (sorting intolerant fromtolerant)(15) ve Polyphen (polymorphism phenotyping) (15) değerleri, single-nucleotide polymorphism (SNP) veritabanı ID numaraları, SNP'in 1000 genom projesindeki allel sıklığı ve sekans kalitesi hakkında bilgi verir. VAAST (Variant Annotation, Analysis and Search Tool) bu bilgiler ışığında istatistiksel değerlendirme ile aday genleri ve varyasyonları sıraya koyarak bir listeleme yapar (15). Çoğu araştırmacı varyantları fonksiyonuna dayalı olarak verileri filtreler. Varyantlarının yaklaşık yarısı zararlı olduğu düşünülmemen ve genellikle filtremeden çıkartılan sinonim değişikliklerdir. Bazı yayınlarda sinonim varyantların hastalığa neden olabileceği bildirilse de bu ihtimal çok düşüktür. Geriye kalan varyantlar missense, nonsense, indel, splice-site mutasyonları ve kodlama

yapmayan RNA transkriptleridir. Yaklaşık %5 varyant veritabanlarında rapor edilmemiştir (15). Belirtildiği gibi SIFT ve PolyPhen gibi biyoinformatik veritabanlarının patojenik hükmü temelinde varyantlar isimlendirilir. Dolayısıyla, patojenik varyantlar korunmuş bölgelerde proteinin fonksiyonunu veya yapısını bozabilir. Zamanla edinilen tecrübelerle ilgili olarak farklı analitik sistemler nedensel varyantı tanımlamak için kullanılabilir.

Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemlerinden bazıları Roche 454, Illumina Genome Analyzer, Applied Biosystems SOLID, Ion Torrent, Helicos ve Pacific Biosciences olup bu platformların genel özellikleri tablo 3'de belirtilmiştir (67).

Roche/454

İlk yüksek verimli (high-throughput) sekanslama teknolojisi, Roche firması tarafından 2005 yılında piyasaya sürülen 454 pirosekanslama cihazıdır (66). Bu cihaz emülsiyon PCR ve piro dizileme teknolojisinin kombinasyonuna dayanmaktadır. Emülsiyon PCR yönteminde bir yağ solüsyonu içindeki su damlacıklarında yer alan kalıp DNA, PCR ile çoğaltılır ve her damlacıkta yer alan kalıp DNA'dan klonal bir koloni oluşturulur. Pirosekanslama ise "sentezleyerek sekanslama" prensibine dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu tek iplikli DNA (ssDNA) dizisinin üzerine tamamlayıcı dizinin sentezlenmesi ile gerçekleştirilir. Sanger sekanslamadan farkı, dideoksinükleotide zincir sonlanma tekniği yerine nükleotid birleşmesi sonucunda salınan pirofosfatın belirlenmesine dayanmasıdır. ATP sülfirilaz PPI'ı ATP'ye dönüştürür. ATP, lüsisiferaz enzimi aracılığıyla lusiferinin oksilüsiferine dönüşmesini sağlar ve bu reaksiyonda ışımaya meydana gelir. Ortama salınan bu ışımaya ile büyüyen DNA'ya eklenen her bir nükleotit tespit edilir. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında oluştuğu tespit edilir. Ortaya çıkan bu ışık CCD kamera tarafından kaydedilir. Bu sistemin gücü uzun okumalar yapmasıdır. En son piyasaya sürülen 454 GS FLX platformu uzunluğu 1000 baz çiftine kadar olan yaklaşık bir milyon okuma yapabiliyor. Bu avantajı sayesinde diğer NGS platformları ile karşılaştırıldığında maliyeti daha yüksek olmasına rağmen, en uygun kullanıldığı alanlar de novo assembly

(birleştirme) ve metagenomikdir (68, 69). Ancak, 454 teknolojisi aynı nükleotiti uzatabildiği için homopolimerlerin saptanmasında problemi vardır. Bu yüzden yaptıkları en yaygın hata çeşitleri insersiyon ve delesyonların saptanmasında olmaktadır (70).

Illumina/Solexa

Illumina platformu array temelli sentezleyerek sekanslama ve köprü amplifikasyonu yöntemini kullanmaktadır (71). Bu cihazlar da adaptör bağlanmış DNA kütüphanelerine ihtiyaç duymaktadırlar. Reaksiyon, “flowcell” adı verilen yüzeyinde oligonükleotidlerin bulunduğu özel aparatlarda gerçekteşmektedir. DNA molekülleri bu flowcell üzerindeki primerlere bağlanır, sonra çoğaltılarak klonal koloniler oluştururlar. Genome Analyzer piyasaya sürülen ilk Illumina platformudur. 35 baz çifti uzunluğunda okuma yapar ve her yürütme 2-3 gün içerisinde 1 gigabaz dan fazla yüksek çıktı verir. Genome Analyzer II ve HiSeq 2000 gibi daha gelişmiş platformları platformlar ile birlikte daha büyük çıktılar ve daha uzun okumalar elde edilmektedir. Illumina sistemlerinin yüksek verimli sekanslamaları ve sistem maliyetlerinin daha uygun olmalarına rağmen kısa okumalar yapması başlıca dezavantajını oluşturmaktadır (72). En çok yaptığı hata çeşiti ise yerdeğiştirme mutasyonları tespiti sırasında olmaktadır.

Ion-Torrent

Ion-Torrent teknolojisi emülsiyon PCR ve iyon yarı iletken dizileme kullanır (73). Optik tarama ve floresan nükleotidlere ihtiyaç duyulmamaktadır. Ion semikonduktor dizileme de DNA'nın polimerizasyonu sırasında meydana çıkan hidrojen iyonlarının hipersensitif iyon sensorleri tarafından tespitine dayanır. Okuma uzunluğu 200 baz çifti kadar olup 2-4 saat içerisinde 10 gigabaza kadar çıktı verebilir (67). En çok yaptığı hata çeşiti insersiyon ve delesyonların saptanmasında gerçekteşir.

Life teknolojisi/Applied Biosystem

Bu teknolojide SOLID platformu ve emülsiyon PCR kullanır. Applied Biosystemin SOLID platformunda ligasyon temelli dizileme yöntemi kullanılır (74). İki bazlı kodlama ile hata oranı düşürülmektedir. Primerler pirodizilemede olduğu gibi adaptörler yardımıyla kalıp ipliğe hibridize olur. Bu metotta DNA polimeraz yerine DNA ligaz enzimi kullanılır. Floresan işaretli oligonükleotid problemler kalıp DNA'ya hibridize olur ve primerle ligasyona girer. Şu anki NGS yöntemleri içerisinde SOLID sistemi hata oranı en düşük platformdur. En yaygın hata çeşiti ise yerdeğiştirme mutasyonlarıdır (67).

Tablo 3. Yeni Nesil Dizileme platformlarının genel özellikleri (46).

Şirket	Platform	Çoğaltma	Sekanslama	Okuma Uzunluğu	Çıktı hacmi/zaman (okuma başına)	Baskın hata tipi	Hata oranı
Roche/454 Life Sciences	GS FLX Titanium XL+ GS FLX Titanium XLR70 GS Junior	Emülsiyon PCR	Pirosekanslama	1 kb'a kadar 600 bp'a kadar ~400 bp	700 Mb/23 s 450 Mb/10 s 35 Mb/10 s	Indel	%0.5
Illumina	HiSeq 2000 Genome Analyzer IIx MiSeq	Köprü PCR	Reversible terminator kullanarak sentezleyerek dizileme	36–100 bp 35–150 bp 36–250 bp	105–600 Gb/2– 11 gün 10–95 Gb/2– 14 gün 540 Mb–8.5 Gb/4– 39 s	Yerdeğiştirme	%0.2
Life Technologies/ Applied Biosystems	5500xl SOLiD™ system SOLiD™ 4 system	Emülsiyon PCR	Ligasyon temelli dizileme	35–75 bp 25–50 bp	10–15 Gb/gün 25–100 Gb/3.5– 16 gün	Yerdeğiştirme	%0.1
Life Technologies/Ion Torrent	Ion Proton™ sequencer (Proton I chip) Ion PGM™ sequencer (318 chip)	Emülsiyon PCR	Ion semiconductor dizileme	200 bp'a kadar 35–200 bp	Up to 10 Gb/2– 4 s 300 Mb–1 Gb/0.9– 4.5 s	Indel	%1
Helicos BioSciences	HeliScope™ single molecule sequencer	YOK	Tek molekül sekanslama	25–55 bp	21–35 Gb/8 gün	Delesyon	%5
Pacific Biosciences	PacBio RS	YOK	Tek molekül sekanslama	250 bp– 10 kb	NA	Indel	%15

NGS teknolojileri tüm genom dizileme, tüm ekzom dizileme, transkriptome dizileme ve metilasyon çalışmaları gibi birçok alanda geniş uygulama alanına sahiptir. Tüm genom dizileme ile insan genomunun tamamı (3.2 milyar baz çifti) dizilenebilmektedir. Tüm ekzom dizileme ise sadece protein kodlayan bölgelerin

(ekzom) dizilenmesi amaçlanır. Ekzon (EXpressed regiON) kelimesi “ifade olan bölge” anlamına gelmektedir. Bu bölgeler de genomun %1,5'lik bir kısmını oluşturmaktadır. Bu yöntem ile tüm genomu dizilemek yerine protein kodlayan bölgelere odaklanması, dizileme maliyetinin önemli oranda düşmesine olanak sağlar. Ayrıca, tüm ekzom dizileme sonucunda ortaya çıkan verilerin filtrelenmesi daha kolay ve hızlı olmaktadır. Mendeliyen hastalıklarda; hastalık yapıcı mutasyonların yaklaşık olarak %85'i ekzonlarda veya ekzon-intron birleşme bölgelerinde yer almaktadır (75, 76). Bu mutasyonların yaklaşık % 56'sı missense/nonsense, %24'ü küçük insersiyon ve delesyonlar, %10'u splicing ve% 1,8'i düzenleyici mutasyonlardır (75). Bu veriler ışığında WES hastalığa neden olan varyantların %78'ini saptayabilmektedir . Bu nedenle etkilenmiş bireylerde öncelikle tüm ekzom dizileme yapmak hem iş gücünü hem de maddi yükü azaltmaktadır ve daha çok tercih edilen bir yöntem olmuştur. Tüm genom dizileme ise intronik ve intergenik bölgelerdeki varyantlar ile insersiyon, delesyon ve translokasyonlar gibi yapısal varyantların tespitinde daha duyarlıdır.

2.8.4.2 WES'in Kullanım Alanları

2.8.4.2.1 Tek Gen Hastalıkları

Günümüzde tahminen 6000 üzerinde tek gen hastalığı tanımlanmış ve yaklaşık üçte ikisinin moleküler temeli bilinmemektedir (OMIM Statistics). Hastalığın altta yatan patogenetik mekanizmasının anlaşılması çoğunlukla fenotiple ilişkili olarak hastalığa neden olan genin ve varyasyonun bulunmasına bağlıdır. Bir hastada ya da küçük bir ailede yeni tanımlanan bir varyant tespit edildiğinde, tanımlanan genetik tanının sadece bulunan varyanta dayanarak yapılması oldukça zordur. Bulunan varyasyonun kontrol popülasyonunda olmaması ve aynı hastalığa sahip bireylerde aynı ya da farklı varyantların aynı gende tanımlanması yeni bulunan varyantın patolojik olduğunu doğrulamak için kullanılır. Eğer hastalık oldukça nadir görülen sıklıkta ise daha fazla hasta bulmak zor olacaktır. Bununla birlikte daha ileri fonksiyonel çalışmalar yeni bulunan varyasyonun patolojik etkisinin doğrulanmasında kritik role sahiptir. Eğer mutasyona uğramış gen hastalıkla ilişkisi bilinen bir yolda role sahip ise biyokimyasal deneylerin uygulanması uygun olacaktır. Nadir tek gen hastalıklarına neden olan yeni

genin tanımlanması ile biyolojik yolların anlaşılmasının yanı sıra yeni tedavi olanakları açısından da önemli bir rol üstlenecektir. Son yayınlar WES'in Mendelian hastalıklara neden olan genlerin bulunmasında güçlü bir araç olduğunu göstermiştir (77).

2.8.4.2.2 Kompleks Hastalıklar

Geçtiğimiz on yılda genetik araştırma toplulukları, etiyolojisinde çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı kompleks hastalıklarla ilgili geniş kapsamlı çalışmalarda bulundular. Assosiyasyon çalışmaları kompleks hastalıkların genetik etiyolojisini aydınlatmak için yıllardır uygulanmaktadır (78). Yüksek çıktılı genotipleme teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte, GWAS toplum düzeyinde bağlantı dengesizliği ilkesi temelinde kompleks hastalıklara yatkınlık genlerini bulmak için temel araç olmuştur (79). SNP arrayde genotipleme için çok fazla markerın kullanılması ile birlikte büyük ölçekli populasyonlar genetik çalışmalarda GWAS'ı uygulanabilir kılmıştır. 2005'den beri 8000'den fazla lokus çeşitli kompleks hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Tüm genom ya da belirli bölgelerin dizilenmesi ile tüm polimorfizmleri daha doğru ve eksiksiz bir bakış açısı ile değerlendirilmesine olanak sağlamıştır (80). Birçok NGS çalışmalarından elde edilen bilgilere dayalı olarak nadir kodlayıcı varyantlara yönelik ekzom genotipleme arrayleri dizayn edilmiştir. Günümüzde, kompleks hastalıklarda nadir ekzonik varyantların rolünün araştırılması için ekzom arrayleri hızlı ve ekonomik bir araç olarak kullanılmaktadır (81).

2.8.4.2.3 Kanser

Yaşam boyu genetik değişikliklerin birikmesi malign neoplazma veya kansere yol açabilir. WES kanserin oluşum mekanizmalarının anlaşılmasında yeni bakış açıları getirmiştir (82). Kanseri hücreleri DNA sekansının normal hücrelerle karşılaştırılarak tanımlanması kanserin patogenezinin daha da iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Varyasyonların kanserin oluşma sürecinde önemli etkileri olabilmektedir. WES kullanılarak kanserin somatik ve germline mutasyonlarını saptamak mümkün kılınmıştır. WES kanser yollarını ve moleküler mekanizmalarının detaylı bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, WES ilgili farmakogenetik varyantın saptanması gibi terapötik amaçlarla ve hedefe yönelik gen-hastalık-ilaç etkileşimlerinde de kullanılmaktadır (83, 84).

2.8.4.3 Tek Gen Hastalıklarının Analizinde Kullanılan Yöntemler

Mendelian hastalıklarda hastalık yapıcı gendeki varyasyonun tespitinde kullanılan yaklaşımlar şu şekildedir:

2.8.4.3.1 Aile Temelli Çalışmalar

Bu tip çalışmalardaki temel yaklaşım bir aile içinde etkilenen bireyler birlikte sekanslandığında, etkilenen bireylerdeki ortak mutasyonların seçilmesine dayanır. Çünkü bu bireyler hastalığa neden olduğu düşünülen aynı yapısal varyantı barındırırlar. Bu strateji sayesinde aday genler sınırlandırılır. Aday genlerdeki varyasyonların doğruluğu için ailedeki etkilenmemiş bireyler de sekanslanır ve bu mutasyonu taşımadıkları gösterilir. Resesif hastalıklar için homozigosite haritalama ile resesif veya dominant hastalıklar için linkaj analizi gibi yöntemlerin kombinasyonu ile oluşturulan bütünleştirici yaklaşımlar aday geni tanımlamada birlikte kullanılmaktadır. SNP array ile homozigot bölgelerin saptanması resesif kalıtım düşünülen ailede aday genlerin sayısında azalma sağlamaktadır. Çünkü homozigotluk gösteren bölgedeki varyasyonların patojenik olduğu düşünülmektedir.

Bağlantı analizleri ailede birden fazla etkilenmiş bireylerin olduğu durumlarda ekzom sekanslama ile beraber kullanılmaktadır (85). Dominant kalıtlı hastalıklar için bir ailede etkilenmiş bireylerde bulunan ortak heterozigot varyantlar seçilmektedir. Merkezi sinir sistemini etkileyen kalıtsal yaygın lökoensefalopati hastalığında genom - wide bağlantı analizi kullanılarak Rademakers ve arkadaşları tarafından 5.kromozomunun q kolunda 233 tane aday gen tanımlanmış ve ekzom sekanslama ile bu aday bölgede *CSF1R* geninde heterozigot varyant saptanıp ve 13 etkilenmiş ailede de farklı heterozigot varyantlar saptanarak doğrulanmıştır (86).

Retinitis pigmentosa, osteogenezis imperfekta, işitme kaybı gibi lokus heterojenitesi gösteren hastalıklarda farklı ailelerde farklı kalıtım paterni gözlemlenebilir. Bu nedenle klinik bulguların tam olarak tanımlanması ve kalıtım modelin tespiti aday gen yaklaşımında yardımcı olacaktır. Bir çalışmada Abou Jamra ve

arkadaşları akaraba evliliği yapmış 8 etkilenmiş bireyin olduğu üç ailede resesif kalıtım modeli ile mental retardasyona neden olan patojenik varyantları tanımlamak için autozygosity haritalama ve ekzom sekanslama yöntemlerini bir arada kullanmışlardır (87). Bu yaklaşım ile araştırmacılar bu ailelerde adaptor protein kompleksini kodlayan üç tane gende mutasyon tanımlamışlardır.

X'e bağlı kalıtım gösteren aile ağaçlarında X kromozomu üzerindeki varyantların analizi yardımcı olabilmektedir. Örneğin ekzom sekanslama etkilenmiş üç erkek bireyde sınıflandırılmamış X'e bağlı letal konjenital malformasyon sendromunda *OFD1* geninde bir splice mutasyonu tanımlamıştır (88).

2.8.4.3.2 Akrabalık İlişkisi Olmayan Bireylerle Yapılan Çalışmalar

Eğer birbirinden bağımsız birden çok etkilenmiş (sporadik olgular) bireylerin olduğu durumlarda lokus heterojenitesi olmadığı varsayılarak olgular arasında ortak patojenik gen araştırılabilir. Bu yaklaşım overlap strateji olarak adlandırılır (89). Örnek olarak Schinzel–Giedion sendromunun nedeni bu strateji kullanılarak bulunmuştur (90). Ayrıca Saitsu ve arkadaşları konjenital hipomyelinizasyon lökoensefalopati'li birbirinden bağımsız üç etkilenmiş bireye yapılan ekzom sekanslama sonucunda *POLR3A* ve *POLR3B* genlerinde birleşik heterozigot saptamışlardır (91). Dünyada nadir görülen bir hastalık olan Kabuki sendromunda olduğu gibi anne-babadan çocuğa kalıtım rapor edilmişse de olguların çoğu sporadikdir. WES yöntemi ile 10 ailenin 7'sinde Kabuki sendromuna neden olan varyantı *MLL2* geninde ortaya konulmuştur. Geriye kalan üç aileye yapılan sanger sekanslama ile ailelerin ikisinde *MLL2* geninde mutasyon saptanmış ve bu sendromun ana sebebinin bu gendeki mutasyonlar sonucu olduğu gösterilmiştir (92). Geriye kalan tek ailede ise farklı genlerdeki mutasyonlar hastalığın patogenezisini açıklayabilmiştir. Ek olarak aynı ekip tarafından 43 hastanın 26'sında *MLL2* geninde sanger sekanslama ile mutasyon saptanmıştır. Bir sendromun klinik ve genetik heterojenitesi gen bulunmasını zorlaştırmakta ve benzer klinik bulgulara sahip olguların birlikte değerlendirilmesi yeni gen bulmaya yardımcı olmaktadır.

2.8.4.3.3 De-novo mutasyonlar

De-novo mutasyonların önemli bir kısmı çoğunlukla fetus olmak üzere olgularda sporadik olarak meydana gelmekte ve olgular hayatta kalamadıkları için bu mutasyonlar toplumdan elimine olmaktadır. Bundan dolayı bu letal mutasyonlar genellikle tanımlanamamıştır. De-novo mutasyon oranının her kuşakta $7.6 \times 10^{-9} - 2.2 \times 10^{-8}$ olduğu tahmin edilmektedir. Bu da her haploid genom başına yaklaşık olarak 10^8 bazda 1 spontan olarak meydana gelmesi anlamına gelmektedir (93, 94).

De-novo mutasyonların analizi için anne-baba ve çocuğun bir arada olduğu trio çalışmalar yapılmaktadır. Patojenik olmayan varyantlar çıkarılır ve sonra anne-babada da var olan varyantlar dışlanır. Bulunan değişiklik sekanslama ya da haritalama hatası olabileceği için bulunan varyasyonun mutlaka sanger ile doğrulanması gerekmektedir. De-novo mutasyonun tespiti hastalığın sebebini göstermede yeterli değildir. Fonksiyonel analizler gibi ek çalışmalar bulunan değişikliğin hasar verici olup olmadığı araştırılmalıdır. Varyasyonun patojenitesi sadece mutasyonun çeşitine bağlı olmayıp mutasyonun lokalizasyonu ve proteinin fonksiyonunu nasıl etkilediği de önemlidir (95).

De-novo mutasyon çalışmaları Schinzel-Giedion sendromu gibi nadir mendeliyen hastalıklarda de novo mutasyonun tespitinde kullanılmaktadır (96). Ek olarak ID gibi heterojenite gösteren hastalıkların genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında da kullanılmaktadır. Trio temelli ekzom sekanslamaların sporadik otizm spektrumlu olgularda yeni gen keşfi için güçlü bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar sporadik otizm spektrumlu 20 olguda ekzom sekanslama yaparak 21 de-novo mutasyon tanımlamışlardır (92). Son zamanlarda Sanders ve arkadaşları otizm spektrum hastalığı olan etkilenmiş ailelerde WES kullanarak de-novo mutasyonların beyinde eksprese olan genleri etkileyerek bir risk oluşturduğunu göstermişlerdir (97). Iossifov ve arkadaşları 343 ailede otizm spektrumlu etkilenmiş bir bireye ve etkilenmemiş en az bir kardeşine ekzom sekanslama yapmışlar ve gen yapısını bozan mutasyonları etkilenmiş bireylerde daha sık bulmuşlardır. Bu çalışmada 350-400 genin otizm yatkınlık geni olabileceği tahmin edilmiştir (98).

2.8.4.3.4 Aday Gen Stratejisi

Dominant bir şekilde tek bireyin etkilendiği diğer aile üyelerinin incelenemediği ya da etkilenmiş başka bireyin olmadığı durumlarda seçenekler kısıtlıdır. Bu durumda öncelikle bulunan değişikliğin protein yapısını ve fonksiyonunu nasıl etkilediği önemlidir. Özellikle stop kodonu oluşturan mutasyonlar, frame-shift mutasyonları ile splice site mutasyonları değerlendirilir. Yanlış anlamlı mutasyon olduğunda iki ana kriter dikkate alınmalıdır. Birincisi proteinin yapısını nasıl etkileyebileceği (örneğin, Grantham skoru), ikinci ise değişikliğe uğrayan nükleotitin evrimsel süreçteki korunmasıdır (örneğin, phyloP veya GERP skoru). Patojenik olarak değerlendirilen mutasyonlar benign varyasyonlara göre belirgin bir şekilde evrimsel süreçte korunmuşlardır. dbSNP and Human Genome Mutation Database'de bu skorların karşılaştırılmasına dayanarak patojenik yanlış anlamlı varyantların PhyloP skoru >2.5'dir (99). Aslında şu ana kadar ekzom sekanslama ile tanımlanıp, yayımlanan hemen hemen tüm yanlış anlamlı ya da anlamsız mutasyonlar beklenenden daha fazla korunmuşlardır.

Geleneksel aday gen yaklaşımlarına benzer bir şekilde fenotiple ilgili genin fonksiyonu ve patofizyolojisi daha ileri yaklaşımlarda kullanılabilir. Belli bir aday varyasyon olmadığına (örneğin, protein sonlandırıcı mutasyonlar) çoğu çalışmada yanlış anlamlı varyantın proteinin yapısına ve fonksiyonuna etkisinin hesaplamaya dayalı öngörülerini yerini almaktadır (100). Ancak NGS'de bu tahmin öngörülü programların kullanımı ile ilgili bazı sorunlar mevcuttur. Bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksek olmalıdır. Örnek olarak, Ng ve arkadaşları tarafından Miller sendromu'na neden olarak tanımlanan iki mutasyondan biri benign olarak tahmin edildiği için gözden kaçırılmıştır (101). Bundan dolayı bazı çalışmalarda yanlış anlamlı mutasyonları değerlendirmek için farklı metotların tahminsel değerleri birlikte kullanılmaktadır. Diğer taraftan ise bu metotların birlikte kullanılması araştırılması gereken potansiyel zarar verici mutasyonların sayısını arttırmaktadır.

Uygulamada bütün çalışmalarda tek bir strateji kullanmayıp bazı çalışmalarda bu stratejilerin kombinasyonu kullanılabilir. Bu sürecin son basamağı ise hala mutasyon tespitinde altın standart olan geleneksel sanger dizileme ile doğrulamadır.

En önemlisi patojenitenin kesin tespiti için bağımsız hasta grubunda doğrulanması ve/veya fonksiyonel deneyler yapılması gerekmektedir.

2.8.4.4 Varyantların Tanımlanması Ve Aday Gen Yaklaşımı

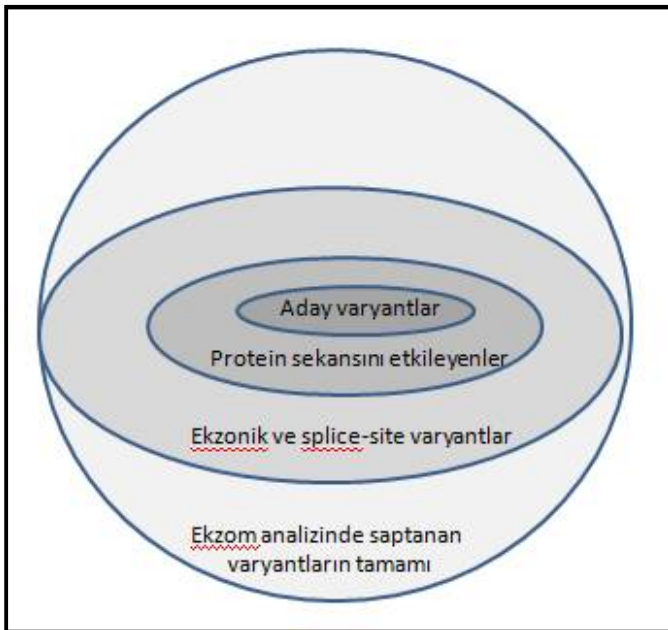
Sekans çıktısı singlenucleotide polymorphism veritabanı (102), 1000 Genome Project (103), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>) ve HapMap (104) gibi veritabanları ile karşılaştırılır (Tablo 4). Avrupa-Amerikan kökenli bireylerin ekzom analizinde ortalama 20 000 varyanta rastlanırken, Afrikan-Amerikan kökenli bireylerde bu sayının yaklaşık 24 000 olduğu gözlenmiştir (105). Bu varyasyonların sayısı etnik köken, capturing protokol, sekanslama platformu, haritalama algoritması ve varyantları isimlendirme metotlarına göre değişebilmektedir. Hastalığa neden olabileceği düşünülen varyantların sayısı çalışma dizaynına bağlı olarak 100-500 patojenik varyant seviyesine düşürülmektedir (89, 99, 104). Bir çalışmada her genomun farklı yollardaki proteinlerin erken sonlanmasına neden olan (truncating) 165 homozigot varyant taşıdığı gösterilmiştir (106). Bu nedenle homozigosite haritalama, bağlantı analizi, Sanger sekanslama gibi bütünleyici genomik analizler uygulanmadan hastalığa neden olduğu düşünülen varyant ilgili gen direkt olarak tanımlanamaz. Bununla birlikte dört etkilenmiş bireyi olan bir aile ile ya da en az iki etkilenmiş bireyin olduğu iki veya üç aile ile çalışılırsa, olağan filtreleme sistemleri kullanıldığında hastalığa neden olan geni tanımlanabilir (107). Robinson ve arkadaşlarının varsayımına göre; birden çok etkilenmiş bireyin olduğu sporadik olgularda aynı gendeki mutasyonların hastalığa sebep olduğu düşünülduğünde hedef genlerin (yaklaşık 20 000) %5'i etkilenen bireylerde muhtemel hastalığa neden olan varyantı göstermektedir (108). Bir birey sekanslandığında ve olağan filtreleme yapıldığında yaklaşık 1000 tane gen (20.000 x %5) aday olarak geriye kalmaktadır. Eğer ikinci birey de sekanslanırsa sadece 50 gendeki (1000 x %5) varyant her iki bireyde aday gen olarak geriye kalmaktadır. Üçüncü etkilenen bireyin sekanslanmasından sonra en az bir genin üç etkilenmiş bireyde de varyanta sahip olabileceği tahmin edilmektedir (108).

NGS ile her genomda milyonlarca varyant tanımlanmakta ancak sadece bir ya da iki tanesi mendelian hastalığın patolojisini açıklayabilmektedir. Bu aşamada hastalığa neden olan varyant (1) sadece hastalarda olmalı veya en azından genel

popülasyonda çok nadir bulunmalı, (2) genomun protein kodlayıcı bölgelerinde yer almalı, (3) mutant gen tarafından kodlanan proteinin fonksiyonunu direk olarak etkilemelidir.

Bugüne kadar yayımlanan çoğu tüm genom çalışmaları genomun kodlama yapan % 2'lik kısmına odaklanmıştır. Mendel bozukluklar için bilinen genetik nedenlerin yaklaşık % 85'i protein kodlayan bölgeleri etkilemektedir (75). Bu yaklaşık 3-4 milyon olan varyant sayısını 25 000'ne kadar azaltmaktadır. Bir varyantın okuma sayısı gibi kalite kriterleri temelinde filtreleme yapılarak yanlış pozitif varyantlar elenmektedir. Sonrasında kodlama yapmayan bölgelerdeki ve sinonim varyantlar filtreleme ile çıkartılmaktadır. Böylece hastalığa neden olduğu düşünülen potansiyel varyant sayısı yaklaşık 5000 seviyesine azaltılabilmektedir. Bu aşamadan sonra varyant sayısını azaltabilmek için yayınlanmış çalışmalardan elde edilen veriler veya dbSNP gibi veritabanları kullanılarak daha önce tanımlanmış varyantlar çıkartılır. Bu basamakta tipik olarak potansiyel aday varyant sayısı %90-95 azaltılır. Bu durumda geriye kalan 150 ile 500 arasında sinonim olmayan ve splice-site değişikliler potansiyel patojenik varyant olarak önceliklendirilir (Şekil 1) (99) (96, 101, 109).

Şekil 1. NGS'de tespit edilen varyantların önceliklendirilmesi (89).



Tablo 4. Varyantların değerlendirilmesinde kullanılan veritabanları (110)

Popülasyon veritabanları	
Exome Aggregation Consortium	http://exac.broadinstitute.org/
Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS
1000 Genomes Project	http://browser.1000genomes.org
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
Hastalık veritabanları	
ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
OMIM	http://www.omim.org
Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.org
Human Genome Variation Society	http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html
Sekans veritabanları	
NCBI Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
RefSeqGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg
Locus Reference Genomic (LRG)	http://www.lrg-sequence.org
Yanlış anlamlı mutasyonların etkisinin öngörülmesi	
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
SIFT	http://sift.jcvi.org
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org
MutationAssessor	http://mutationassessor.org
Condel	http://bg.upf.edu/fannsdb/
PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
Splice site mutasyonların etkisinin öngörülmesi	
GeneSplicer	http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2
Nükleotidlerin evrimsel korunmuşluğunun öngörülmesi	
GERP	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html
PhyloP	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/

2.8.4.5 Sekanslama ile Saptanan Varyantların Sınıflandırılması

American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), Association for Molecular Pathology (AMP) ve College of American Pathologists gruplarından oluşan temsilcilerle sekanslama ile tespit edilen varyantların yorumlanması için bir kılavuz yayınlanmıştır (110). Bu kılavuzda varyantların sınıflandırılmasında popülasyon verileri, bilgisayar verileri, fonksiyonel veriler, segregasyon verileri gibi analizlerin sonucunda yapılmasını tavsiye etmişlerdir (Tablo 5,6). Mendelian hastalıklara neden olan genlerdeki mutasyonları tanımlamak için standart bir terminoloji kullanılmasını tavsiye

etmişlerdir. Bu terminolojiye göre varyantların "patojenik", "olası patojenik", "önemi bilinmeyen", "olası benign" ve "benign" olarak adlandırılmasını önerdiler (Tablo 7).

Tablo 5. Patojenik varyantların sınıflandırılmasındaki kriterler (110)

Patojenitenin kanıtı	Kategori
Çok güçlü	PVS1 Fonksiyon kaybettirici mutasyonlar (nonsense, frameshift, splice site, başlangıç kodon, tek ya da birden fazla ekzon delesyonları)
Güçlü	PS1 Daha önce tanımlanmış patojenik aynı aminoasit değişikliğinin aynı kodondaki farklı nükleotit değişikliğinden kaynaklanması PS2 De-novo varyant tanımlanması PS3 İn-vivo veya in vitro yapılan fonksiyonel çalışmalar
Orta	PS4 Etkilenen bireylerdeki varyant sıklığının kontrol gruplara göre önemli ölçüde artmış olması
İlimli	PM1 Mutasyonun hot spot ve/veya kritik ve iyi tanımlanmış domainde yer alması PM2 Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium veritabanlarında kontrol gruplarda olmaması (resesif ise çok düşük sıklıkta olması) PM3 Resesif hastalıklar için patojenik varyantın trans şeklinde tespit edilmesi PM4 Tekrarlamayan bölgelerde in-frame delesyon/insersiyondan kaynaklanan ya da stop kodonu değiştirerek proteinin uzunluğunun değişmesi PM5 Patojenik missense mutasyon tespit edilen bölgede farklı bir missense değişikliğinin saptanması PM6 De-novo olduğu tahmin edilen ancak anne-baba'nın çalışılmadığı durumlar
Destekleyici	PP1 Hastalığa neden olduğu bilinen bir gende aynı ailedeki birden çok etkilenmiş bireyde segregasyonu olması PP2 Benign missense varyant oranının düşük olduğu bir gende missense varyant tespit edilmesi ve hastalığın mekanizmasında missense varyantların rol almaları PP3 Birden çok bilgisayar programlarının gen veya gen ürününün zararlı (deleterious) bir şekilde etkilendiğinin gösterilmesi (conservation, evolutionary, splicing etkisi gibi) PP4 Hastanın fenotipi ya da aile öyküsü tek bir genetik etyolojiye sahip hastalıkla uyumlu olması PP5 Son zamanlarda güvenilir bir kaynakta patojenik olarak rapor edilmiş ancak ispatı için laboratuvarında bağımsız değerlendirme gerçekleştirmek için elverişli olmayan

Tablo 6. Benign varyantların sınıflandırılmasındaki kriterler (110)

Benign kriterler	Kategori
Tek başına	BA1 Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium veritabanlarında Allel sıklığı >%5 olması
Güçlü	BS1 Allel sıklığının hastalık için beklenende daha yüksek olması BS2 Erken yaşlarda tam penetrans olması beklenen resesif (homozigot), heterozigot (dominant), X'e bağlı (hemizigot) hastalıklar için sağlıklı yetişkin bireylerde gözlenmesi BS3 İn vivo ve in vitro fonksiyonel çalışmalarda protein fonksiyonu ve splicing üzerine hasar verici etkisinin gösterilememesi BS4 Ailedeki etkilenmiş bireylerde segregasyon olmaması
Destekleyici	BP1 Hastalığın sebebinin öncelikle gende proteinin erken sonlanmasına sebep olan varyantların olduğu bilinen durumlarda missense varyant tespiti BP2 Tam penetrans otozomal dominant bir hastalıkta patojenik bir varyant ile trans pozisyonunda gözlenmesi ya da herhangi bir kalıtım paterninde cis durumunda patojenik varyant gözlenmesi BP3 Fonksiyonu bilinmeyen tekrarlayıcı bölgelerde in-frame delesyon ya da insersiyon saptanması BP4 Birden çok bilgisayar programlarının gen veya gen ürününün zararlı bir şekilde etkilendiğinin gösterilmemesi (conservation, evolutionary, splicing etkisi gibi) BP5 Alternatif bir moleküler temeli olan bir hastada varyant gözlenmesi BP6 Son zamanlarda güvenilir bir kaynakta benign olarak rapor edilmiş ancak ispatı için laboratuvarla bağımsız değerlendirme gerçekleştirmek için elverişli olmayan BP7 Sinonim (sessiz) varyasyonun splicing tahmin algoritmalarında splice konsensüs dizilerine etki etmemesi ve yeni bir splice oluşturmaması ve nükleotitin yüksek korunmuş bir bölgede yer almaması

Tablo 7. Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerin birlikte kullanılması sonucu varyantların etkisinin belirlenmesi (110)

Patojenik	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Çok güçlü (PVS1) VE <ul style="list-style-type: none"> a) ≥ 1 Güçlü (PS1–PS4) YA DA b) ≥ 2 Orta (PM1–PM6) YA DA c) 1 Orta (PM1–PM6) ve 1 destekeyici (PP1–PP5) YA DA d) ≥ 2 Destekeyici (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Güçlü (PS1–PS4) YA DA (iii) 1 Güçlü (PS1–PS4) VE <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 3 Orta (PM1–PM6) YA DA (b) 2 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 2 destekeyici (PP1–PP5) YA DA (c) 1 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 4 destekeyici (PP1–PP5)
Olası patojenik	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Çok güçlü (PVS1) VE 1 orta (PM1–PM6) YA DA (ii) 1 Güçlü (PS1–PS4) VE 1–2 orta (PM1–PM6) YA DA (iii) 1 Güçlü (PS1–PS4) VE ≥ 2 destekeyici (PP1–PP5) YA DA (iv) ≥ 3 Orta (PM1–PM6) YA DA (v) 2 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 2 destekeyici (PP1–PP5) YA DA (vi) 1 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 4 destekeyici (PP1–PP5)
Benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Tek başına (BA1) YA DA (ii) ≥ 2 Güçlü (BS1–BS4)
Olası Benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Güçlü (BS1–BS4) VE 1 destekeyici (BP1–BP7) YA DA (ii) ≥ 2 Destekeyici (BP1–BP7)
Önemi bilinmeyen	<ul style="list-style-type: none"> (i) Yukarıda sıralanan kriterler bir arada değilse (karşılanmıyorsa) YA DA (ii) Benign ve patojenik kriterler çelişkili ise

2.8.4.6 Rastlantısal Bulgular

Tüm genom analizinde bir bireyin 4 milyon varyant taşıdığı kabul edilmektedir. Bu varyantlar içerisinde 100,000'den fazlasının Human Genome Mutation Database'de tanımlanan kalıtsal hastalıklara sebep olduğu tanımlanmıştır. Tüm bu varyantlar hastaya herhangi bir sonuç belirtilmeden önce dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır.

2013 yılında ACMG tarafından tüm genom ve ekzom sekanslanmasında bulunan rastlantısal bulguların (Incidental Findings, IF) rapor edilmesine yönelik bir bildiri

yayımlanmıştır (58). ACMG çalışma grubu 24 kalıtsal durumla ilişkili 56 gendeki bulguların değerlendirilmesi ve rapor edilmesini önermiştir. Bu 56 gen doğrudan hasta veya hasta yakınlarına yönelik tıbbi yarar ilişkisi olduğu göz önüne alınarak belirlenmiştir (Tablo 8). Bu yararlı koşullar patojenik mutasyonların uzun bir süre asemptomatik olarak kaldığı önlenebilir ve tedavi edilebilir hastalıkları içermektedir.

IF olarak bir varyantını tanımlamadan önce, genetik danışman ayrıntılı bir fizik muayene ve üç kuşak aile öyküsü de dahil olmak üzere ilgili tüm hasta bilgilerini gözden geçirmelidir. WGS / WES analizinden elde edilen herhangi bir varyant, hastalık nedeni de olsa, uygun bir endikasyon ya da ayırıcı tanısı olmadan izlenen varyant IF olarak kabul edilebilir (64). Örneğin, eğer genetik bir hastalığın tanısını koymak için WGS / WES uygulanan hasta için detaylı bir aile ağacı elde edilemiyorsa huntingtin (*HTT*) geninde tespit edilen mutasyon IF olarak düşünülebilir. Ancak, hasta test öncesi danışma sırasında ayrıntılı bir şekilde sorgulandığında bir klinik tanı olmadan onun büyükbabasinda Huntington hastalığını andıran semptomları gösterdiği öğrenildiğinde bu durum farklıdır. Bu durumda, daha önce IF olarak kabul edilen bir varyant test sonuçlarında beklenen varyant olarak yeniden değerlendirilebilir. Test sonrasında danışmanlık sırasında araştırılan aile öyküsü ile elde edilen bilgi de sonuca ulaşma adına farklı bir seçenektir. Her halükarda, WGS / WES'de tespit edilen varyantların önemini ortaya çıkarmak için çalışılırken hem hasta hem de aile bireyleri ile ilgili kesin olan bilgilerin önemi vurgulanmalıdır. Hastanın ayrıntılı bir izlem muayenesini ile birlikte ek literatür ve veritabanı aramaları dahil olmak üzere test sonrası değerlendirmede klinik ve moleküler genetik alanında uzmanlar gereklidir.

ACMG önerileri genomik testlerin standardizasyonu için bir olanak sağlamaktadır. Danışmanların deneyimleriyle ilgili daha fazla veri ve kanıtların birikmesi ile klinik uygulamada bilgilerin düzgün bir şekilde entegrasyonu kritik bir öneme sahiptir.

Tablo 8. ACMG'nin yayımladığı kılavuza göre klinik sekanslamada IF tespit edildiğinde rapor edilmesi gereken genlerin listesi (58).

Gene ismi	İlişkili olduğu hastalık	Gene ismi	İlişkili olduğu hastalık
<i>BRCA1</i>	Hereditary breast and ovarian cancer	<i>MYBPC3</i>	Hypertrophic cardiomyopathy, Dilated cardiomyopathy
<i>BRCA2</i>		<i>MYH7</i>	
<i>TP53</i>	Li-Fraumeni syndrome	<i>TNNT2</i>	
<i>STK11</i>	Peutz-Jeghers syndrome	<i>TNNI3</i>	
<i>MLH1</i>	Lynch syndrome	<i>TPM1</i>	
<i>MSH2</i>		<i>MYL3</i>	
<i>MSH6</i>		<i>ACTC1</i>	
<i>PMS2</i>		<i>PRKAG2</i>	
<i>APC</i>	Familial adenomatous polyposis	<i>MYL2</i>	
<i>MUTYH</i>	MYH-associated polyposis	<i>LMNA</i>	
<i>VHL</i>	Von Hippel Lindau syndrome	<i>GLA</i>	
<i>MEN1</i>	Multiple Endocrine Neoplasia type 1	<i>RYR2</i>	Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
<i>RET</i>	Multiple Endocrine Neoplasia type 2	<i>PKP2</i>	Arrhythmogenic right-ventricular cardiomyopathy
<i>RET</i>	Familial Medullary Thyroid cancer	<i>DSP</i>	
<i>NTRK1</i>		<i>DSC2</i>	
<i>PTEN</i>	PTEN Hamartoma tumor syndrome	<i>TMEM43</i>	
<i>RB1</i>	Retinoblastoma	<i>DSG2</i>	
<i>SDHD</i>	Hereditary paragangliomapheochromocytoma syndrome	<i>KCNQ1</i>	Romano-Ward long QT syndromes types
<i>SDHAF2</i>		<i>KCNH2</i>	
<i>SDHC</i>		<i>SCN5A</i>	1, 2, and 3, Brugada syndrome
<i>SDHB</i>		<i>LDLR</i>	Familial hypercholesterolemia
<i>TSC1</i>	Tuberous Sclerosis complex	<i>APOB</i>	
<i>TSC2</i>		<i>PCSK9</i>	
<i>WT1</i>	WT1-related Wilms tumor	<i>RYR1</i>	Malignant hyperthermia susceptibility
<i>NF2</i>	Neurofibromatosis type 2	<i>CACNA1S</i>	
<i>COL3A1</i>	EDS, vascular type	<i>SMAD3</i>	Aortic Aneurysms and Dissections
<i>FBN1</i>	Marfan syndrome,	<i>ACTA2</i>	
<i>TGFBR1</i>	Loeys-Dietz syndromes, and familial Thoracic	<i>MYLK</i>	
<i>TGFBR2</i>		<i>MYH11</i>	

3. Materyal-Metod

3.1 Olgu Seçimi

Olgular Ocak 2008 - Ocak 2014 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Genetik Bilim Dalı Polikliniği'nden izlenen mental retardasyon ve/veya multipl konjenital anomali nedeniyle araştırılan, klinik olarak bilinen bir sendrom veya hastalığa uymayan 0-18 yaş aralığındaki olgular arasından seçilmiş olup; sekiz olgu ebeveynleri ve kardeşleri ile birlikte bu çalışmaya dahil edildi. Olguların detaylı anamnezleri alınmış olup dismorfik bulguları, fizik muayene bulguları, laboratuvar bulguları, özgeçmiş bilgileri, soygeçmiş bilgileri ve aile ağaçları standard bir forma kaydedildi.

Olguların çalışmaya dahil edilme kriterleri ;

- i. Daha önce yapılan genetik testleri normal saptanmış (yüksek rezolüsyonlu karyotipleme, FISH, Frajil X ve öntanı için düşünülen genetik sendromlar için yapılan moleküler analizleri normal olarak saptanmış)
- ii. Doğumda asfiksi, teratojen maruziyeti ya da kaza olmayan
- iii. 1 tane major konjenital anomali
- iv. 2 veya 3 tane minor konjenital anomali
- v. Dismorfik bulguları mevcut olan olgulardan seçilmiştir.

Olguların çalışmaya dahil edilmeme kriterleri ;

- i. 18 yaşından büyük olgular
- ii. Doğumda asfiksi, teratojen maruziyeti ya da herhangi bir kazanın mevcut olması

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen çalışmanın Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu onayı (2015-TIP-053 nolu) alındı. Fotoğraflarının ve klinik bilgilerinin yayınlanmasına izin

verdiklerini belirten gönüllü olur formu imzalatıldıktan sonra hasta grubundan, ebeveynlerinden ve kardeşlerinden 2 ml EDTA'lı tüpe kan örnekleri alındı.

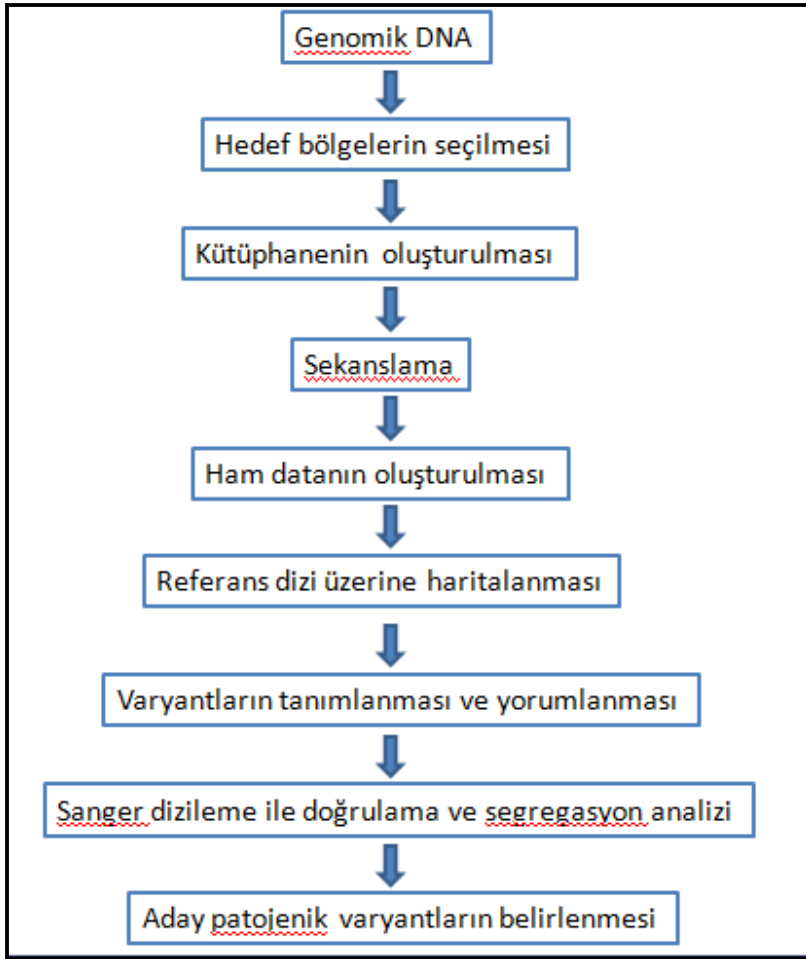
3.2 Olgularda Moleküler Genetik Çalışma

Bu çalışma EUTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Genetik Bilim Dalı, EUTF Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı ve Yale Üniversitesi Nörogenetik Laboratuvarı ile birlikte yürütüldü. Olguların fizik muayene ve tanı işlemleri EUTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Genetik Bilim Dalı tarafından yapıldı. Olgulara yapılacak olan tüm ekzom dizileme tekniği ve sonuçların analizi Yale Üniversitesi (Nörogenetik Laboratuvarı'nda), hastalığa neden olan değişikliklerin Sanger dizi analizi ile doğrulanması ve segregasyon analizi ise EUTF Tıbbi Genetik AD'da yapıldı.

Çalışmanın Akış Şeması (Şekil 2'de gösterilmiştir):

1. DNA İzolasyonu
2. Örneklerin hazırlanması
3. Ekzom bölgelerinin çoğaltılması ve sekanslama (WES)
4. Verilerin işlenmesi ve analizi
5. Saptanan varyasyonların Sanger dizi analizi ile doğrulanması ve segregasyon analizi

Şekil 2. Çalışmanın akış şeması



1.bölüm den (DNA İzolasyonu) 5. bölüme (Saptanan varyasyonların sanger dizi analizi ile doğrulanması ve segregasyon analizi) kadar olan kısım Yale üniversitesi Genom Merkezinde yapıldı, analizler sonucunda hastalığa sebep olduğunu düşündüğümüz değişikliklerin sanger dizileme ile doğrulanması ve ve segregasyon analizi (5. bölüm) ise EUTF Tıbbi Genetik AD'nda yapıldı.

3.2.1 DNA İzolasyonu

Her hastadan, ebeveynlerinden ve kardeşlerinden EDTA' lı kan alındı. Alınan kan miktarı pediatrik grupta 'Pediatrik popülasyonda yürütülecek klinik araştırmalarda etik yaklaşımlara ilişkin kılavuz' doğrultusunda minimum kilogram başına 0.8 ml maksimum ise 2 ml, yetişkinlerde ise 2 ml olacak şekilde EDTA'lı venöz kan örneği

alındı. Kan lenfosit hücrelerinden protokole uygun olarak QIAcube AllPrep DNA/RNA FFPE kit (Product No:80234; QIAGEN, Germany) kiti kullanılarak QIAcube Robotik DNA izolasyon cihazı ile DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonrası her örnekten 100 mikrolitre, ortalama konsantrasyonları 30 ng/ µl, saflıkları (A260/280 değeri) ortalama 1.8'in üzerinde olan DNA elde edildi.

3.2.2 Örneklerin Hazırlanması

Genomik DNA fiziksel rastgele yerlerinden parçalanarak fragmente edildi. Bu parçalama işlemi sonikasyon (ses dalgalarının enerjisinden yararlanarak biyolojik maddenin parçalanması) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. İşlem sonunda elde edilen 140 baz boyutundaki DNA fragmentlerinin her iki ucuna 6 baz eklenerek indeksleme yapıldı. Elde edilen bu fragmentlerin uçlarına sekanslama işleminde kullanılmak amacıyla adaptörler bağlandı. Ardından bu fragmentlerin pürifikasyon aşaması gerçekleştirildi ve örneğimizin hazırlanmış kütüphanesi oluşturuldu.

3.2.3 Ekzom Bölgelerinin Çoğaltılması ve Sekanslanması

Ekzom bölgelerinin çoğaltılması için NimbleGen SeqCap EZ exome v2.0 kiti kullanıldı. Hedef bölgelerin seçimi sırasında elde edilen fragmentlere bağlanan adaptörler, flow cell üzerinde bulunan adaptörlere komplementerdir. Elde edilen fragmentleri içeren solüsyon flow cell içerisine yüklenerek fragmentlerin bu yüzeye bağlanması sağlanmaktadır. Sekanslama işlemi her bir lane üzerinde 6 örnek olmak üzere flow cell üzerinde Illumina HiSeq2000 alt yapısı kullanılarak gerçekleştirildi. .

3.2.4 Verilerin İşlenmesi ve Analizi

3.2.4.1 Ham (Raw) Data Elde Edilmesi

İşlem sonrası elde edilen paired-end sekans verisi üretici firma tarafından cihaz üzerinde bioinformatik yazılımlar (CASAVA) kullanılarak analize hazır ham data olan FASTQ dosya formatı elde edildi.

3.2.4.2 Ham datanın referans genoma haritalanması

Ham verinin human genome (hg19) üzerine haritalanması için BWA/Stampy hibrit programı kullanılarak gerçekleştirildi. Analize hazır human genome (hg19) üzerine hizalanmış bam dosyası oluşturulurken çeşitli kalite filtreleri uygulandı. PCR duplikasyonlarının ayıklanması için PICARD tools kullanıldı.

3.2.4.3 Varyantların Tanımlanması, Filtrelenmesi ve Yorumlanması

Varyasyonların tespit edilmesi ve küçük kopya sayısı değişikliklerinin (indel) belirlenmesi için The Genome Analysis Toolkit (GATK) v1.6 kullanıldı.

Olgularda bulunan varyasyonların filtrelenmesi aşamasında öncelikle 1000 Genomes Project ve National Heart, Lung, ve Blood Institute (NHLBI) exome sequence project (ESP6500, Exome Variant Server) veritabanlarında daha önce tanımlanmış MAF > %1 olan varyasyonlar elendi. Sonrasında fonksiyon kaybettirici ve yanlış anlamlı mutasyonlar seçildi. Kalan varyasyonlar içerisinde öncelikle daha önce OMIM'de tanımlanmış bilinen genlerin hastalıkla ilişkisi araştırıldı. Daha önce tanımlanan genlerin hastalıkla ilişkilendirilemediği durumlarda aday gen yaklaşımı içerisinde diğer genlerdeki varyasyonlar araştırıldı.

Varyasyonların yorumlanması aşamasında hastalığın düşünülen kalıtım paternine göre homozigot veya heterozigot varyantlar önceliklendirildi. Sonrasında OMIM, Pubmed, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP6500, Exome Variant Server), 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Yale ekzom verileri, Ensemble, GERP, PolyPhen, SIFT (prediction programlar) gibi veritabanlarından faydalanılarak varyantların herbiri manuel olarak analiz edildi.

3.2.5 Saptanan varyasyonların sanger sekanslama ile doğrulanması ve segregasyon analizi

3.2.5.1 PCR aşaması

Tüm ekzom dizilemesi sonucunda hastalığa neden olabileceği düşünülen bilinen genlerde veya aday gen yaklaşımında önceliklendirilen varyasyonların

doğrulanması ve segregasyon analizi için Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı'nda sanger dizileme yapıldı.

Hastalarda saptanan tüm varyasyonların doğrulanması ve segregasyon analizi için her iki ebeveyninden ve varsa sağlıklı kardeştan elde edilen DNA'lardan çalışılan gen bölgeleri PCR yöntemi ile uygun primerler kullanılarak çoğaltıldı.

3.2.5.2 Amplifiye Edilen Bölgenin Değerlendirilmesi

PCR ürünlerinin amplifiye olup olmadığını anlamak için örneklerin yürütüleceği % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler 140 Volt akımda yürütüldükten sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntüleri alındı. Jel görüntüleri yorumlandıktan sonra uygun uzunlukta amplifiye olmuş ürünlere çalışmanın devam eden basamakları uygulandı.

3.2.5.3 PCR Ürünlerinin Birinci Pürifikasyon İşlemi

Amplifiye olmuş ürünlere fazla PCR ürünlerinin ayrıştırılması için Fermentas Gene Jet PCR Purification Kit (Product No: K0701; Fermentas, USA) kiti ile pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.4 Pürifikasyon Ürünlerinin Cycle Sequencing İşlemi

Pürifiye edilen PCR ürünleri dideoksi veya zincir sonlanma metodu denilen yöntemle dizi analizi yapılmak üzere cycle sequencing işlemine tabi tutuldu. ABI Prism V3.1 Big-Dye Terminator Kiti (Applied Biosystems,USA), 5X Buffer (Applied Biosystems,USA), sekans primerleri ve distile su ile hazırlanan karışıma, pürifiye edilmiş ürünler eklenerek uygun PCR programında cycle sequencing yapıldı.

3.2.5.5 Ürünlerin İkinci Pürifikasyon İşlemleri

Cycle sequencing ürünlerine, içerisindeki florasan işaretli ddNTP'leri ve diğer PCR bileşenlerini ortamdaki uzaklaştırmak için ticari bir pürifikasyon kiti olan Zymo Research DNA Sequencing Clean-Up Kiti (Product No: D4050; Zymo, USA) ile pürifikasyon işlemi yapıldı.

3.2.5.6 Örneklerin Sekans Cihazına Yüklenmesi

Platelere yüklenen örnekler, 94 °C'de 2 dakika süreyle denatüre edilip buzda bekletildikten sonra ABI PRISM® 3130 Genetik Analizöre yüklendi. Örnekler Sequencher 5.0 programında, <http://www.ensembl.org/index.html> sitesindeki incelenecek genlerinin dizilimi referans alınarak değerlendirildi.



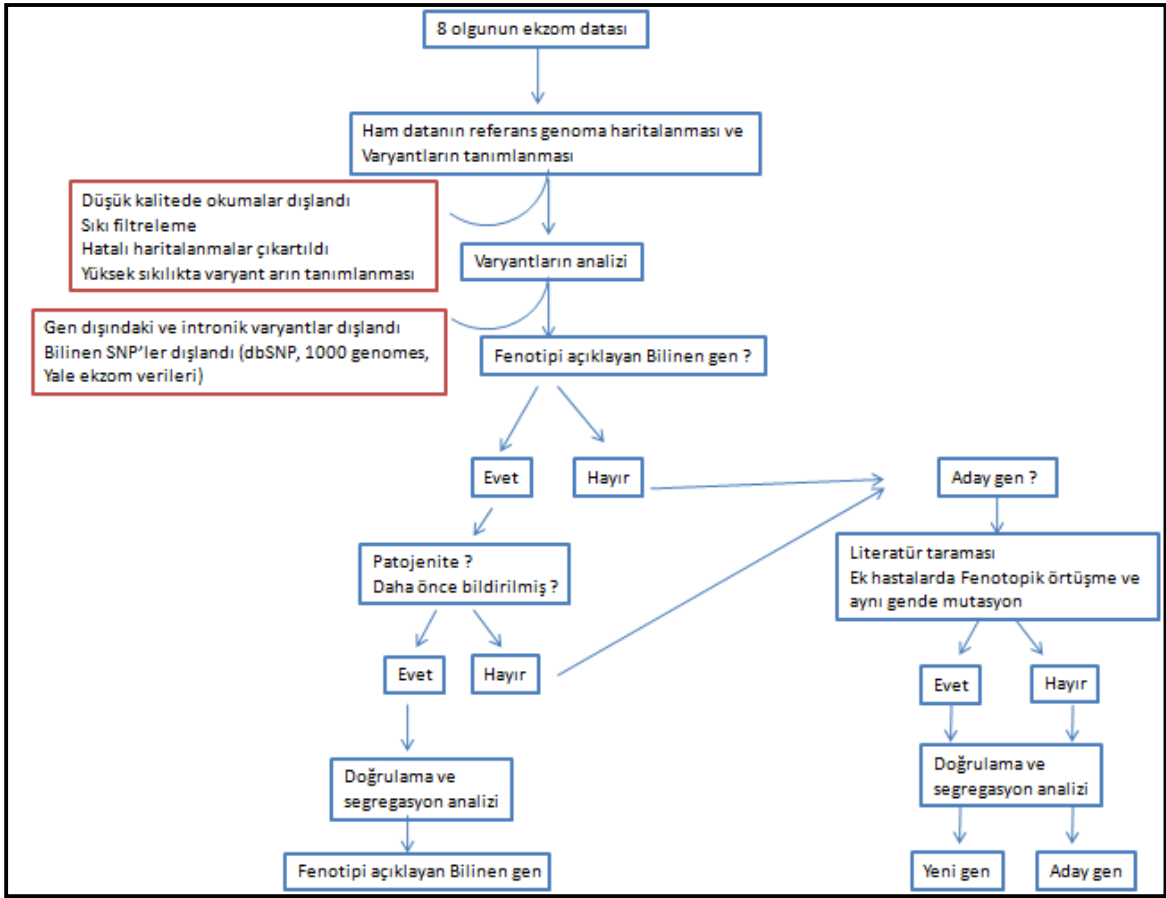
4. Bulgular

Çalışmaya ID ve/veya multipl konjenital anomali nedeniyle araştırılan, klinik olarak bilinen bir sendrom veya hastalığa uymayan olgular alınmıştır. Yaşları 4 ile 17 arasında değişen 4'ü erkek 4'ü kız olmak üzere 8 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların hepsine altta yatan genetik etiyojolojiyi aydınlatmak amacıyla WES uygulanmıştır. Analiz etmeden önce datanın kalitesi tablo 9'da belirtilen ölçütlerle (metriklerle) değerlendirildi. Datanın analiz için yeterli olduğu kanaat getirilerek analize başlandı. Varyantların analizi aşamasında izlenen yol şekil 3'de gösterilmiştir. Filtreleme sonucunda olgularda hastalığa neden olabileceği düşünülen bilinen ya da aday genler sanger dizileme ile doğrulandı ve segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizinde resesif kalıtıldığı düşünülen hastalıklar için anne-baba ve sağlıklı kardeşte bulunan varyantın homozigot olmaması, dominant kalıtıldığı düşünülen hastalıklarda bulunan varyantın anne-baba ve sağlıklı kardeşte olmaması, X'e bağlı kalıtıldığı düşünülen hastalıklar için ise annenin taşıyıcı, babada ve var ise sağlıklı erkek kardeşte varyantın olmamasına dikkat edildi.

Tablo 9. WES yapılan olgulardaki datanın kalite ölçüt parametreleri

	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3	Olgu 4	Olgu 5	Olgu 6	Olgu 7	Olgu 8
Okuma sayısı (Milyon)	65.7	70.7	80.9	60.6	63.1	85.1	56.8	65.0
Ortalama kapsayıcılık (Coverage, X)	61.6	69.1	76.5	55.5	61.2	78.0	55.8	62.9
En az 4 kere okunan baz yüzdesi (4X)	97.74%	98.25%	98.15%	97.67%	98.10%	98.21%	97.96%	98.17%
En az 8 kere okunan baz yüzdesi (8X)	95.56%	96.89%	96.79%	95.21%	96.51%	96.85%	96.12%	96.67%
En az 20 kere okunan baz yüzdesi (20X)	84.84%	89.62%	89.94%	82.97%	87.78%	89.97%	85.60%	88.45%
Ortalama hata oranı	0.44%	0.34%	0.41%	0.51%	0.36%	0.36%	0.36%	0.34%
PCR duplikasyon yüzdesi	5.87%	5.37%	7.80%	5.50%	5.13%	9.15%	5.27%	5.33%

Şekil 3. Varyantların analizinde izlenen strateji



WES ile bulunan varyant sayısı hasta başına ortalama 10,618'di (Tablo 10). MAF >%1 olan varyantlar çıkartıldıktan sonra hasta başına ortalama varyant sayısı 1074'dü. Genin dışındaki, intronik ve sinonim varyantlar çıkartıldıktan sonra hasta başına ortalama varyant sayısı 714'dü. Homozigot varyant sayısı hasta başına 72, heterozigot varyant sayısı hasta başına 641'di. Geriye kalan bu varyantlar çeşitli veritabanları kullanılarak manuel olarak analiz edildi ve her hastada 1-10 arasında hastalığın klinik bulgularıyla ilişkilendirilebilecek değişiklikler saptandı. Her hastada bu genler sanger dizi analizi ile doğrulama yapıldıktan sonra her iki ebeveynde ve varsa sağlıklı kardeşte segregasyon analizi yapıldı. Bu analizler sonucunda 8 hastanın 4'ünde Olgu1, Olgu 2, Olgu 5, Olgu 8 olmak üzere hastalığa sebep olduğu düşünülen *IQSEC2*, *PLA2G6*, *AGTR2* ve *FRMPD4* genlerinde mutasyon saptandı. Ayrıca hastaların ikisinde Olgu1 ve Olgu 5'de rastlantısal olarak bulunduğu ACMG tarafından rapor edilmesi tavsiye edilen genlerden *PMS2* ve *MSH2* genlerinde mutasyon saptandı (Tablo 11).

Tablo 10. Olgularda WES sonucu bulunan varyantların sayısı ve aday genlerde bulunan mutasyonların önceliklendirilmesindeki basamaklar

	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3	Olgu 4	Olgu 5	Olgu 6	Olgu 7	Olgu 8
Bulunan varyasyonların sayısı	10329	10700	10803	10621	10549	10817	10824	10302
MAF >%1 olan bilinen varyantlar çıkartıldıktan sonra (1000 genome ve dbSNP)	1008	1125	1068	1071	1071	1106	1074	1071
Genin dışındaki, intronik ve sinonim varyantlar çıkartıldıktan sonra (homozigot/heterozigot)	648 (74/574)	763 (87/675)	723 (61/662)	710 (57/653)	703 (88/615)	738 (52/686)	704 (73/631)	722 (84/638)
Hastalığın klinik bulgularıyla ilişkilendirilen bilinen genler	<i>IQSEC2</i> <i>CD96</i> <i>PMS2</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>NDUFB3</i> <i>TBX3</i> <i>GARS</i> <i>NROB2</i> <i>LIM2</i> <i>MITF</i> <i>POLG2</i> <i>TCOF1</i> <i>FREM2</i> <i>FRAS1</i>	<i>ATP6V0A4</i> <i>BBS9</i> <i>BBS12</i> <i>COL11A1</i> <i>KANSL1</i> <i>SEMA3E</i> <i>SIX1</i>	<i>AGTR2</i> <i>SACS</i> <i>MSH2</i>	<i>GLI3</i> <i>GRIN2A</i> <i>KIF1B</i> <i>LEMD3</i> <i>SPAST</i>	----	<i>FGRF1</i> <i>HSPD1</i> <i>NEB</i>
Aday genler	-----	-----	-----	-----	-----	<i>PLIN5</i>	<i>PIK3C2G</i>	<i>SEC16A</i> <i>TACC2</i> <i>TAF9B</i> <i>FRMPD4</i> <i>MAP7D3</i>
Sanger dizileme ile doğrulama ve segregasyon sonuçları	<i>IQSEC2</i> <i>CD96</i> <i>PMS2</i>	<i>PLA2G6</i>	-----		<i>AGTR2</i> <i>MSH2</i>	-----	-----	<i>FRMPD4</i>

Tablo 11. Çalışmada Saptanan Mutasyonlar

Saptandığı olgu	Gen	Mutasyon	c.DNA	Mutasyonun tanımlandığı yayın
Olgu 1	<i>IQSEC2</i>	Hemizigot p.Val900Ile	c.2698G>A	Çalışmamızda
	<i>CD96</i>	Homozigot p.Pro346Ser	c.1036C>T	(rs200729689)
	<i>PMS2</i>	Heterozigot p.Glu663Lys	c.1987G>A	Çalışmamızda
Olgu 2	<i>PLA2G6</i>	Homozigot p.Leu542Phe	c.1624C>T	Çalışmamızda
Olgu 5	<i>AGTR2</i>	Hemizigot p.Tyr189X	c.567C>G	Çalışmamızda
	<i>MSH2</i>	Homozigot p.Val97Ala	c.290T>C	Çalışmamızda
Olgu 8	<i>FRMPD4</i>	Hemizigot p.Asp1033Asn	c.3097G>A	Çalışmamızda

4.1 Olgu 1 (R.K.)

Motor mental retardasyon nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 10 yaşında erkek olgu miadında 3000 gr olarak doğmuş. Olgunun anne ile babası arasında kan uyumsuzluğundan dolayı doğumunun ikinci günü başlayıp iki hafta süren ve fototerapi gerektiren sarılığı olmuş. Nörolojik değerlendirilmesinde nöromotor gelişim basamaklarında gecikme saptanan olgunun 1.5 yaşında başını tuttuğu, 3.5 yaşında desteksiz oturduğu, ancak şu ana kadar desteksiz yürüyemediği öğrenildi. Olgunun ağır dil gelişim problemleri olup konuşamamaktadır. Olgu 9 yaşında bilateral kriptorşidizm nedeniyle opere olmuş.

Annesi ile babası arasında akrabalık olan olgunun (Şekil 4) 10 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 19 kg (<3p) boy: 125 cm (3<p), baş çevresi: 50 cm (<-2SD) olup mikrosefali, mavi sklera, şaşılık, uzun kirpikler, dismorfik kulak yapısı, alt ekstremitelerde spastisite, derin tendon refleksinde artış, ellerde stereotipik

hareketler, ayaklarda istemsiz hareketler ve otistik benzeri davranışlar gözlenmiştir (Şekil 5).

Olgunun hemogram ve rutin idrar tahlili, biyokimya, laktik asit, pürüvik asit, biotinidaz, aril sülfataz-A, idrarda indirgen madde atılımı, idrar ve kan amino asit kromotografisi normal olarak saptanmıştır. Ayrıca olgunun idrar mukopolisakkarid atılımı normal bulunmuştur. Bu sonuçlarla olgu da metabolik bir hastalık düşünülmemiştir.

Olgunun çekilen grafilerinde bilateral koklodizier açısı >135 derece olup coxa valga lehine düşünülmüş olup ayrıca alt servikal üst torakal vertebralarda füzyon defekti saptanmış, diğer kemik yapılar olağan olarak gözlenmiştir .

Kulak burun boğaz muayenesinde yapılan ERA testinde sol kulak 45 db, sağ kulak 60 db olarak saptanmıştır. Olgu işitme cihazı kullanmaktadır. Yapılan VEP incelenmesi normal olarak değerlendirilmiştir. Ekokardiyografisi normal olarak değerlendirilmiştir.

Olgunun 4 yaşında çekilen kranial MR görüntülemesinde hipomyelinisasyon saptanmıştır. Ancak 7 yaşında çekilen kranial MR normal olarak değerlendirilmiştir. EEG'sinin anormal olduğu olgunun nöbet geçirme öyküsü bulunmamaktadır.

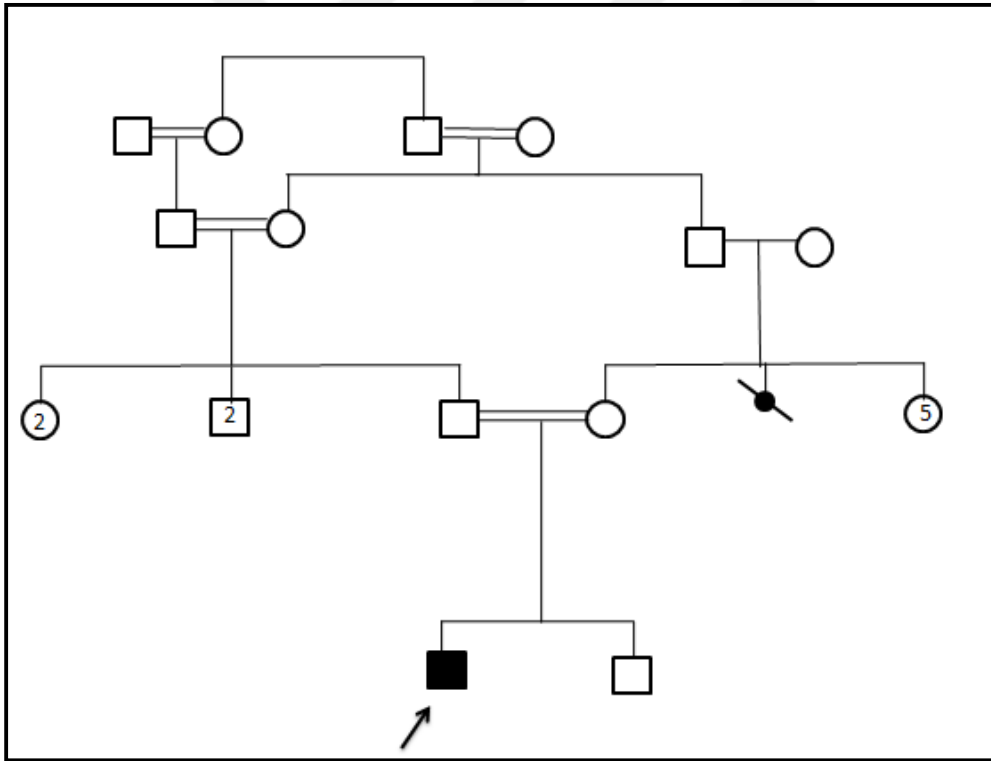
Olgunun karyotip analizi, subtelomerik FISH çalışması, Fragil X testi ve Rett sendromuna yönelik *FOXP1* ve *MECP2* genlerinin dizi analizi sonuçları normal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan WES analizi sonucu *IQSEC2* geninin 8. ekzonunda hemizigot 2698'inci pozisyonda yer alan guanin nükleotidinin yerini adenin nükleotidinin aldığı (c.2698G>A) saptanmıştır (Şekil 6). Bu değişiklik proteinin 900'üncü amino asidi olan valinin yerine izölösinin geçmesine (p.Val900Ile) sebep olmaktadır. Annede heterozigot olarak saptanan bu mutasyon, babada ve sağlıklı erkek kardeşinde saptanmamıştır. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir.

Olguda saptanan diğer mutasyon *CD96* geninde homozigot 1036'nci pozisyonda yer alan sitozin nükleotidinin yerini timin nükleotidinin aldığı (c.1036C>T) değişikliği idi. Bu değişiklik proteinin 346'nci amino asidi olan prolin yerine serinin geçmesine (p.

Pro346Ser) sebep olmaktadır. Anne-babada ve sağlıklı erkek kardeşinde bu değişiklik heterozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyon veritabanlarında rs200729689 numarası ile kayıtlıdır.

Olguda ayrıca WES analizi sonucu rastlantısal bulgu olarak *PMS2* geninde mutasyon saptanmıştır. *PMS2* geninde heterozigot 1987'nci pozisyonda yer alan guanin nükleotidinin yerini adenin nükleotidinin aldığı (c.1987G>A) saptanmıştır (Şekil 7). Bu değişiklik proteinin 663'üncü amino asidi olan glutamat yerine lizinin geçmesine (p.Glu663Lys) sebep olmaktadır. Annede de heterozigot olarak saptanan bu mutasyon babada ve sağlıklı erkek kardeşinde saptanmamıştır. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir.



Şekil 4. 1 No'lu Olgunun Aile Ağacı

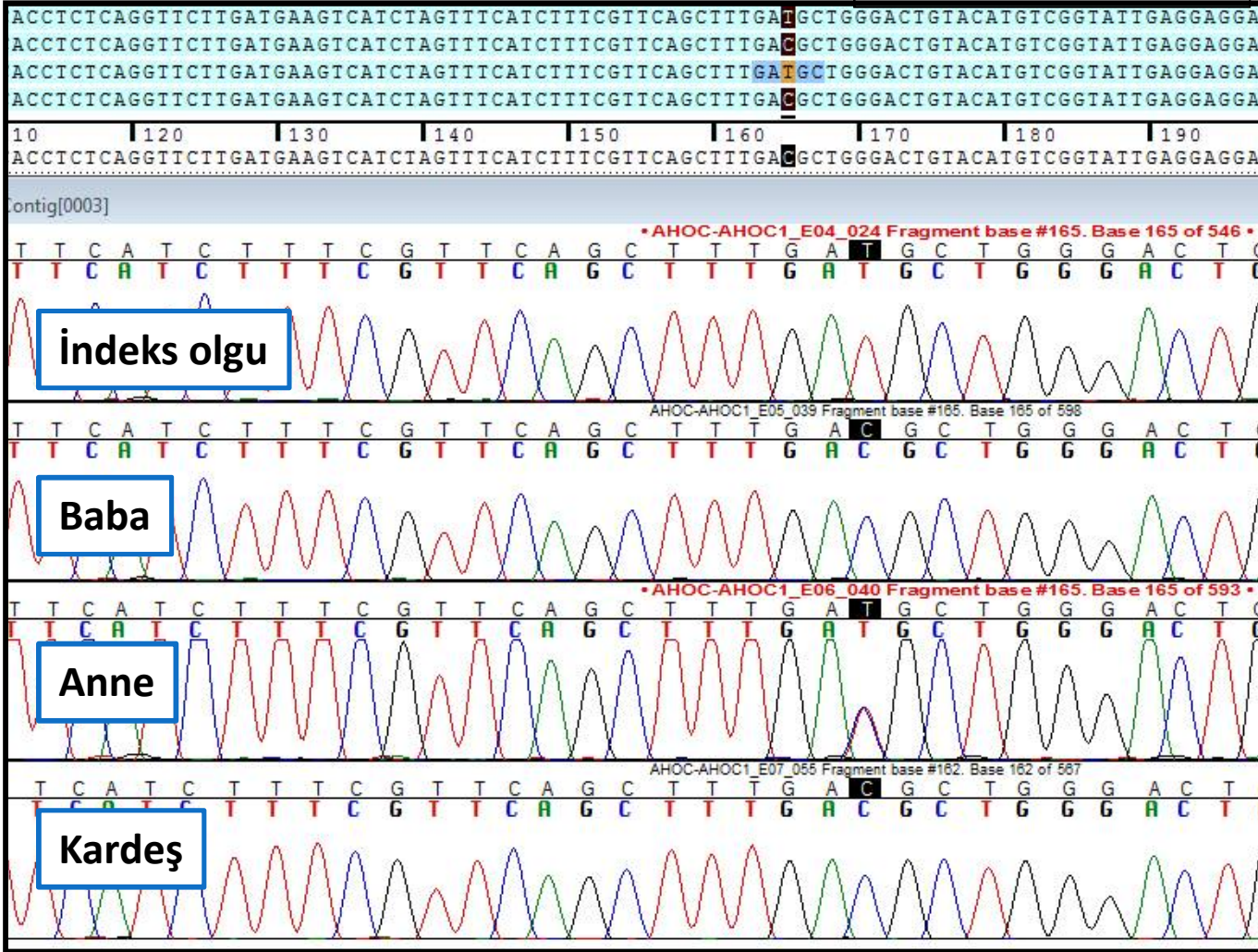


Şekil 5. 1 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri

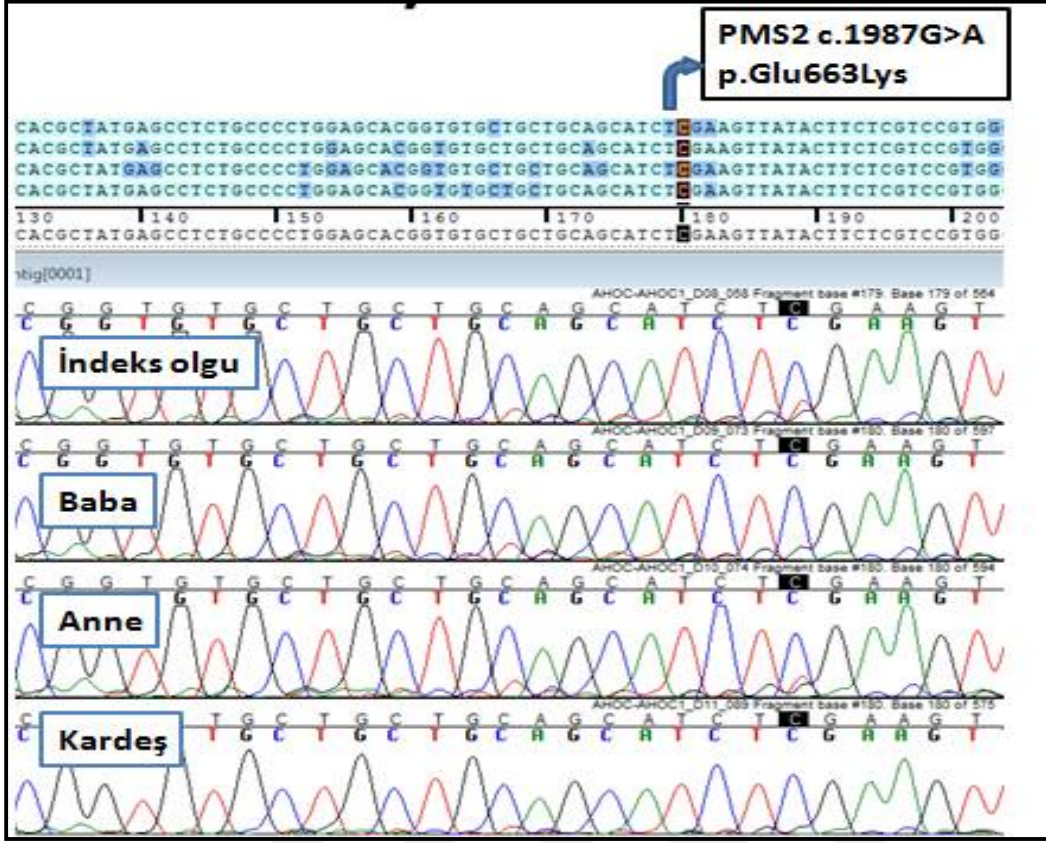




**IQSEC2 c.2698G>A
(p.Val900Ile)**



Şekil 6. 1 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (IQSEC2)



Şekil 7. 1 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (PMS2)

4.2 Olgu 2 (Ü.C.E)

Mental retardasyon ve spastik diparezi nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 12 yaşında kız olgu miadında 3400 gr olarak doğmuş. Olgunun nöromotor gelişimi normal olarak ilerlemiş; başını tutması 2-3 aylık, desteksiz oturması 6-7 ay ve yürümesi 12-13 aylık iken olmuş. Olguda 17 aylık iken çömeldiği yerden kalkamama ve dengesini kaybederek düşme başlamış. Olgu 4 yaşında iken sallanarak yürümeye ve ayaklarının iç kısımlarını basarak yürümeye başlamış olup olguda pes ekinovarus saptanmış. 10 yaşında ortopedi tarafından pes ekinovarus nedeniyle opere olmuş. Olgu 2-3 kelimelik cümleler kurabiliyormuş. Soygeçmişinde ise annenin akalazyaya, trombosit fonksiyon bozukluğu, spastisite , ASD nedeniyle takipte olan 5 yaşında erkek çocuğunun ex olduğu; ayrıca akalazyaya ve moya moya hastalığı ile takipte olan kız çocuğun 2 yaşında ex olduğu bildirildi. Annesi ile babası arasında akrabalık olan (Şekil 8) olgunun yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 27.5 kg (10-25p), boy: 128 cm (3p)

olup, ince üst dudak, aşağı dönük palpebral fissürler, düşük kulak, bulböz burun, proksimal çıkışlı başparmak, disartri, alt ekstremitelerde spastisite saptandı (Şekil 9).

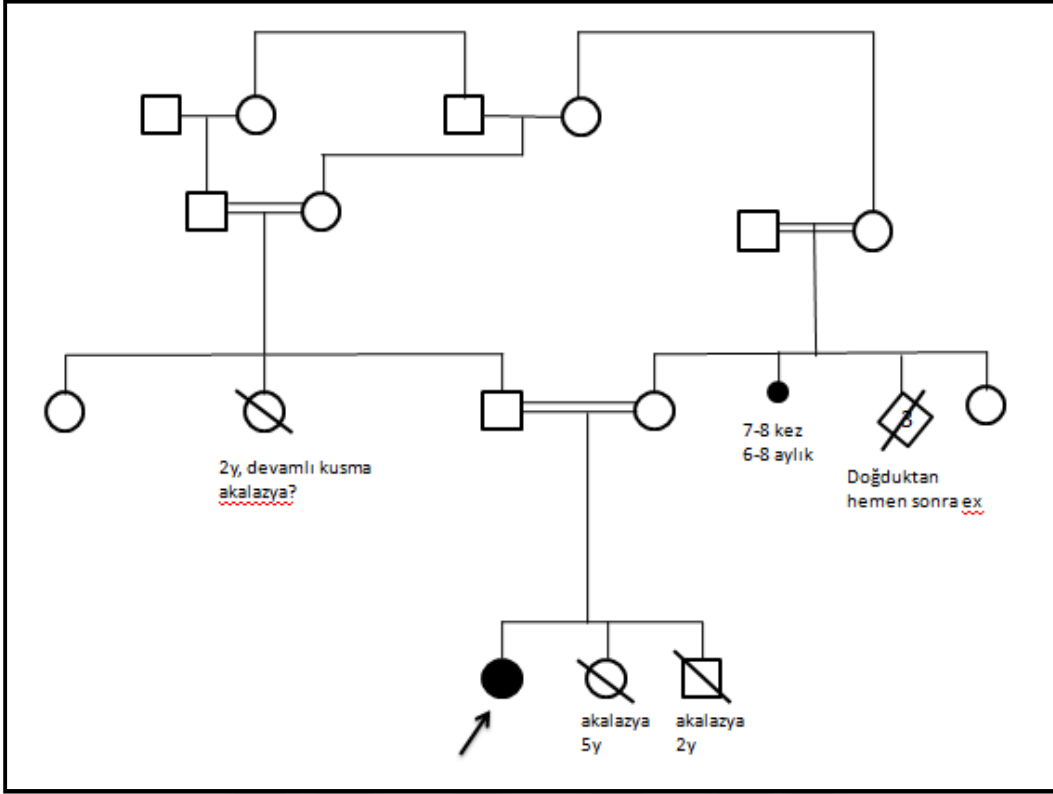
Olgunun hemogram ve rutin idrar tahlili, biyokimya, laktik asit, pürüvik asit, idrarda indirgen madde atılımı, idrar ve kan amino asit kromatografisi normal olarak saptanmıştır. FT3, FT4 ve TSH normal sınırlarda bulunmuştur.

Yapılan göz muayenesi normal olarak değerlendirilmiştir. Kulak burun boğaz muayenesinde yapılan ERA testinde sol kulak 20 db, sağ kulak 20 db olarak saptanmıştır.

Kranial MR incelemesinde bilateral serebellar atrofiye rastlanmıştır. Ekokardiyografi, EEG, abdominal ultrasonografi, torasik ve lumbar MR, difüzyon MR, kemik survey normal olarak değerlendirilmiştir.

Olgunun karyotip analizi ve glikozilasyon defekti için bakılan *PMM2* geninin dizi analizi normal olarak değerlendirilmiştir.

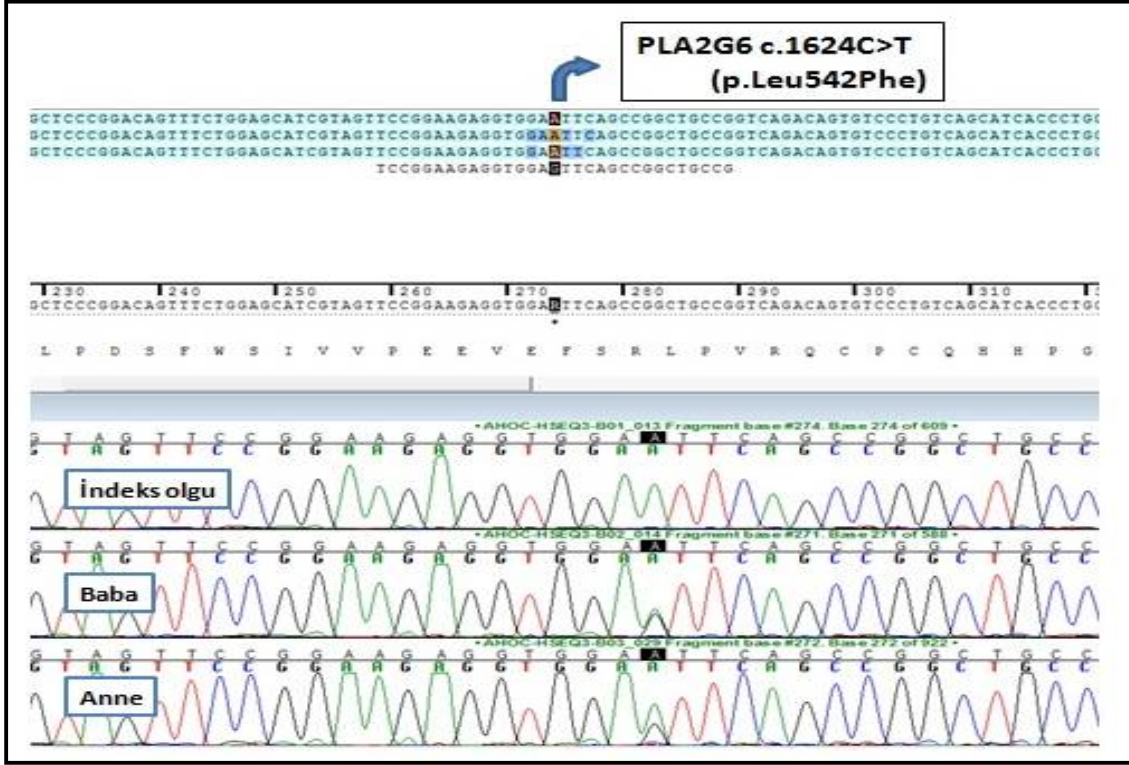
Yapılan WES analizi sonucu *PLA2G6* geninde homozigot 1624'üncü pozisyonda yer alan sitozin nükleotidinin yerini timin nükleotidinin aldığı (c.1624C>T) saptanmıştır (Şekil 10). Bu değişiklik proteinin 542'nci amino asidi olan lösinin yerine fenilalanin geçmesine (p.Leu542Phe) sebep olmaktadır. Anne-babada değişiklik heterozigot olarak gösterilmiştir. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir.



Şekil 8. 2 No'lu Olgunun Aile Ağacı



Şekil 9. 2 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri



Şekil 10. 2 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (PLA2G6)

4.3 Olgu 3 (Ş.U.)

Mental retardasyon nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 17 yaşında kız olgu, miadında 3500 gr olarak doğmuş. Olgunun özgeçmişinde 1,5 yaşında febril konvülsiyon öyküsü mevcuttur. Soygeçmişinde amcasının iki kızında da mental retardasyon tariflenmiş. Annesi ile babası arasında akrabalık olmayan (Şekil 11) olgunun 12 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 71 kg (>97p), boy: 157cm (75-90p) olup dar alın, seyrek dişler, mikroretrognati, trunkal obezite, ellerde iğsi parmaklar mevcuttur (Şekil 12). Endokrin polikliniğinde de takip edilen olguda insülin direnci ve hiperkolesterolemi saptanmıştır.

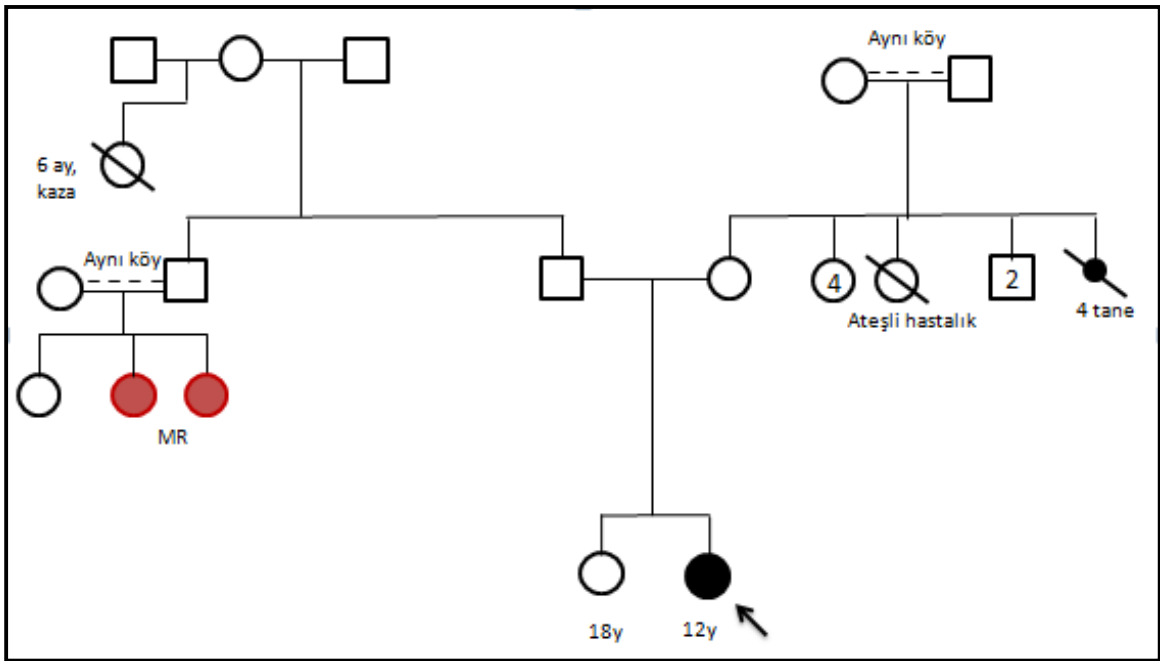
Laboratuvar bakısında rutin biyokimya, hemogram ve tiroid fonksiyon testleri normal olarak değerlendirilmiştir. Olgunun metabolik testleri normal olarak bulunmuştur.

Yapılan göz muayenesinde bilateral katarakt, panüveit saptanmıştır.

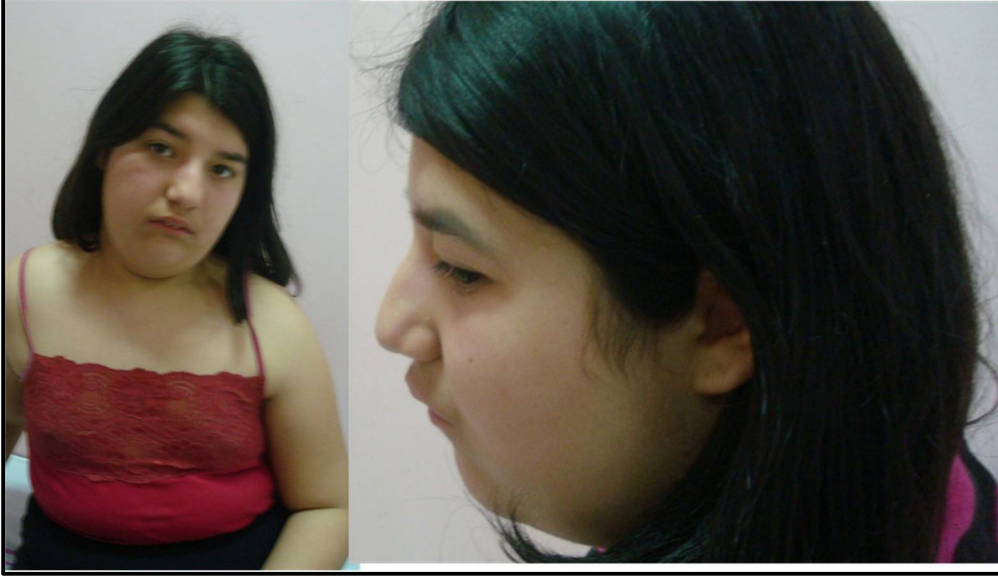
Ekokardiyografi, abdominal ultrasonografi, kranial BT, kranial ve difüzyon MR, lumbosakral vertebra grafi normal olarak değerlendirilmiştir.

Olgunun karyotip analizi, subtelomerik FISH ve Prader-Willi probu ile yapılan FISH çalışmasında patolojik bir bulguya rastlanılmamıştır.

Yapılan WES analizi sonucu olgunun klinik bulgularını açıklayacak mutasyon bulunamamıştır.



Şekil 11. 3 No'lu Olgunun Aile Ağacı



Şekil 12. 3 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri

4.4 Olgu 4 (S.A)

Motor mental retardasyon nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 16 yaşında erkek olgu, miadında 3300 gr olarak doğmuş. Nörolojik değerlendirilmesinde nöro-motor gelişim basamaklarında gecikme saptanan olgunun baş tutma 1 yaş, desteksiz oturması 20-22 ay, emekleme 2,5 yaş, yürüme 3,5 yaş, tek kelimeler 1 yaş, kısa cümleler 2,5-3 yaşında olmuş ve kas tonusu alt ekstremitelerde hafif artmış olup ataksik yürüyüşü mevcutmuş. 3 yaş 9 aylık iken yapılan AGTE testinde olgunun gelişim alanında 2 yaş 6 ay-2 yaş 8 ay düzeyinde fonksiyon gösterdiği görülmüştür. 7 yaş 2 aylık iken yapılan Denver II testinde motor alanlarda belirgin, diğer alanlarda da bir miktar gecikmeye rastlanılmıştır. 12 yaşında yapılan IQ testinde hafif düzeyde zihinsel işlevsellik belirtilmiştir.

Annesi ile babası arasında akrabalık olmayan (Şekil 13) olgunun 12 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 50 kg (75-90p), boy: 141cm (<3p) olup horizontal ve vertikal nistagmus, disdiadokinezi, proksimal çıkışlı başparmak, ayak 2. ve 3. parmakları arasında sindaktili ve obezite mevcuttur (Şekil 14). Endokrin polikliniğinde de takip edilen olguda bozulmuş glukoz toleransı saptanmış olup iki yıldır glukofen ve büyüme

hormonu kullanmaktaymış. Olgunun metabolik testleri normal olarak bulunmuştur. FT3, FT4 ve TSH normal sınırlarda bulunmuştur.

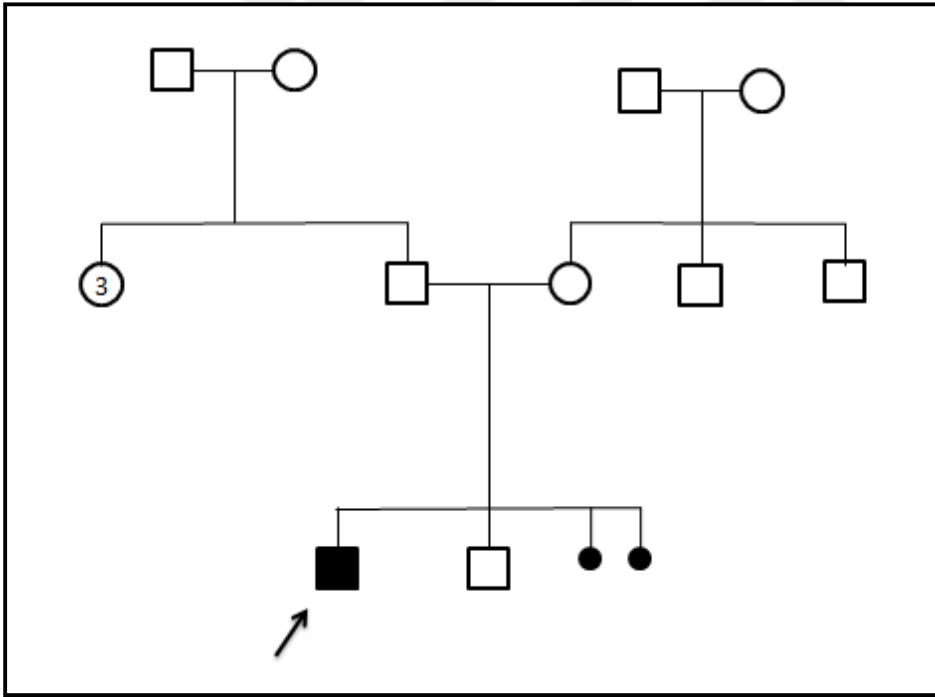
Abdominal ultrasonografide hepatosteatoz saptanmıştır.

Kranial MR incelemesinde diffuz serebral ve serebellar beyaz cevher tutulumu saptanmıştır.

VEP analizinde bilateral görsel iletimde gecikme saptanmıştır.

Olgunun karyotip analizi, subtelomerik FISH çalışması, Fragil X testi, Canavan sendromu için ASPA ve Pelizalus-mersbacher sendromu için PLP1 genlerinin dizi analizi sonuçları normal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan WES analizi sonucu olgunun klinik bulgularını açıklayacak mutasyon bulunamamıştır.



Şekil 13. 4 No'lu Olgunun Aile Ağacı



Şekil 14. 4 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri

4.5 Olgu 5 (E.E.)

Motor mental retardasyon nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 8 yaşında erkek olgu, miadında 3500 gr olarak doğmuş. Özgeçmişinde 3 aylık iken başlayan nöbetler ve spastisite mevcutmuş. Nörolojik değerlendirilmesinde nöro-motor gelişim basamaklarında gecikme saptanan olgu yürüyememekte, konuşamamakta ve katı besinleri çiğneyememekte olup sıvı gıdalarla beslenmekteymiş. Son bir yıldır başını tutabilmekte ve desteksiz oturabilmekteymiş. Hiperaktivitesi olan olgu göz temaslarından kaçınmakta, kendi kendine gülme ve bağırma atakları olmaktadır.

Soygeçmişinde annenin biri 5 aylık epilepsi tanısıyla, diğeri 8 yaşında epilepsi ve serebral palsi tanılarıyla olmak üzere iki erkek çocuğu ex olmuş. Annesi ile babası arasında akrabalık olan (Şekil 15) olgunun 6 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 20kg (25-50p), boy: 46cm (<3p) olup kaba yüz görünümü, ekzoftalmus, hipertelorizm, şaşılık, yay şeklinde kaşlar ve kalın alt dudak saptandı (Şekil 16).

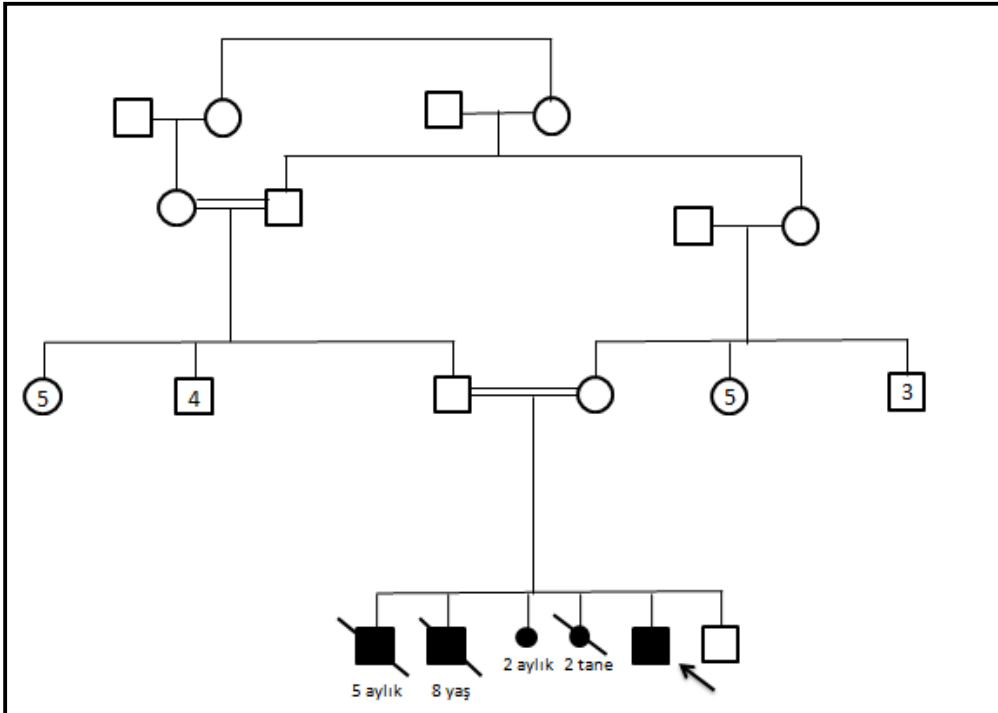
Kranial MR incelemesinde bilateral serebral ve serebellar ensefalomalazi ve atrofi saptandı.

EEG'de serebral biyoelektrik aktivitede çoklu odaklı epilepsi ve belirgin jeneralizasyon varlığını düşündürmektedir.

Olgunun karyotip analizi normal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan WES analizi sonucu AGTR2 geninin 1. ekzonunda hemizigot 567'nci pozisyonda yer alan sitozin nükleotidinin yerini guanin nükleotidinin aldığı (c.567C>G) saptanmıştır (Şekil 17). Bu değişiklik proteinin 189'uncu amino asidi olan triptofan yerine dur kodonu geçmesine (p.Tyr189X) sebep olmaktadır. Annede heterozigot, baba da normal olarak gösterilmiştir. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir. Olgunun 1 yaşındaki erkek kardeşinde mutasyon bakılamamıştır. Ancak nöromotor gelişiminin normal olarak ilerlediğini annesi belirtmiştir.

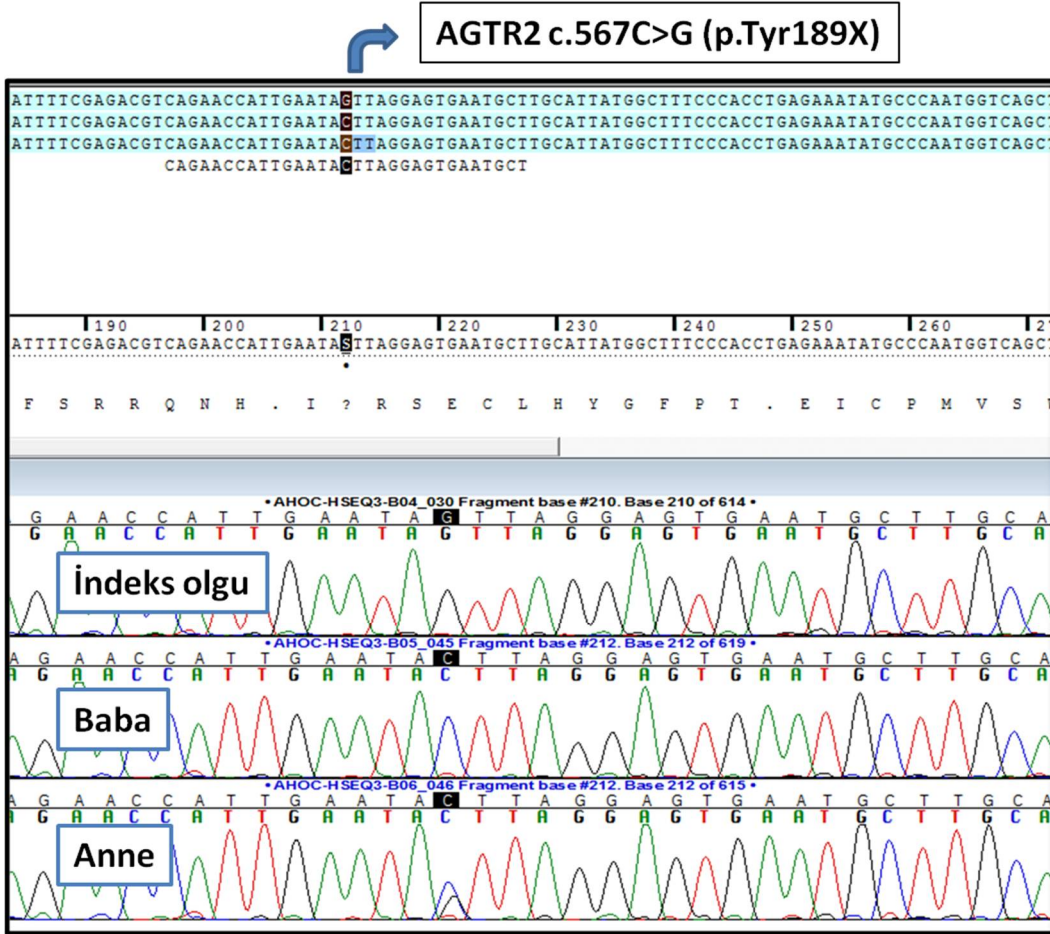
Olguda ayrıca WES analizi sonucu insidental bulgu olarak MSH2 geninde de mutasyon saptanmıştır. MSH2 geninde homozigot 290'ıncı pozisyonda yer alan timin nükleotidinin yerini sitozin nükleotidinin aldığı (c.290T>C) saptanmıştır (Şekil 18). Bu değişiklik proteinin 97'nci amino asidi olan valin yerine alanin geçmesine (p.Val97Ala) sebep olmaktadır. Anne-babada heterozigot olarak gösterilmiştir. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir.



Şekil 15. 5 No'lu Olgunun Aile Ağacı



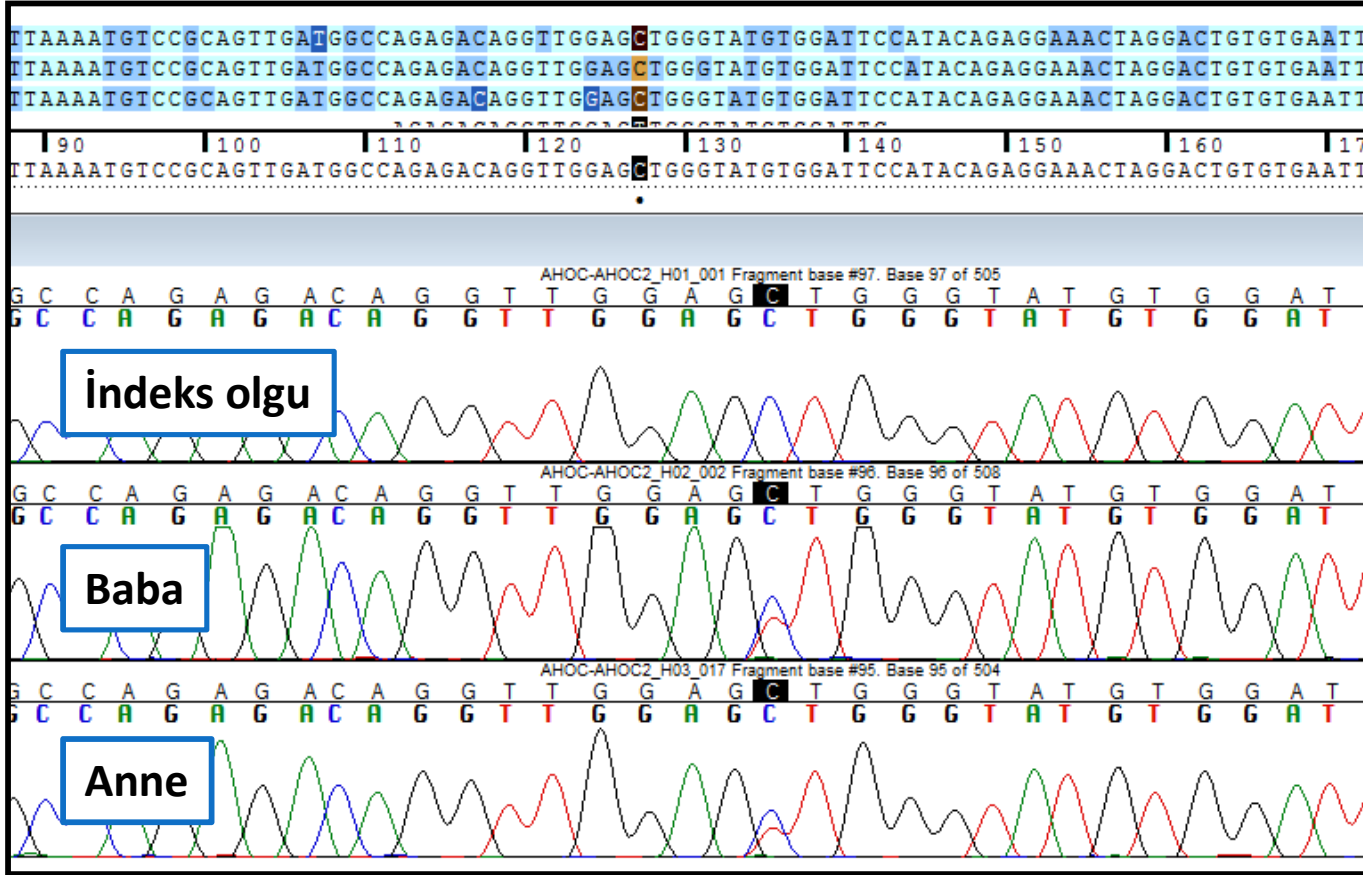
Şekil 16. 5 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri



Şekil 17. 5 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (AGTR2)



MSH2 c.290T>C (p.Val97Ala)



Şekil 18. 5 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (MSH2)

4.6 Olgu 6 (Ç.Ü.)

Gelişme geriliği nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 4 yaşında kız olgu, 28 haftalık prematür olarak doğmuş. Olgunun özgeçmişinde 4-5 aylık iken nekrotizan enterokolit ve retinopati nedeniyle opere olduğu belirtilmiştir. Nörolojik değerlendirilmesinde nöro-motor gelişim basamaklarında gecikme saptanan olgu yürüyememekte ve konuşamamaktadır. Olgu IgG düşüklüğü nedeniyle IVIG tedavisi almaktaymış ve yenidoğan döneminden beri epilepsi atakları geçiriyormuş. Soygeçmişinde ikiz kız kardeşi diyafragma hernisi nedeniyle doğumdan hemen sonra ex olmuş. Annesi ile babası arasında akrabalık olmayan (Şekil 19) olgunun 3 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 11 kg (<3p), boy: 79cm (<3p), baş çevresi 43cm

(<3p) olup, mikrosefali, strabismus, hipertelorizm, düz oksiput, alt ekstremitelerde spastisite ve sol ayakta pes ekinovarus saptanmış (Şekil 20).

Yapılan göz muayenesi nistagmus ve ROP (Retinopathy of prematurity) saptanmış.

Kontrastsız Beyin BT ile lateral ventriküller içerisinde hemoraji ile uyumlu görünüm ve sağda kuşkulu germinal matriks kanaması saptanmıştır.

Kontrastsız Beyin BT tetkiki sonradan tekrar yapıldığında önceki ile kıyaslamalı olarak değerlendirildiğinde ventrikül içi kanamada kısmi regresyon söz konusu olup her iki lateral ventrikül posterior hornunda milimetrik seviyelenme gösteren hematom saptanmıştır.

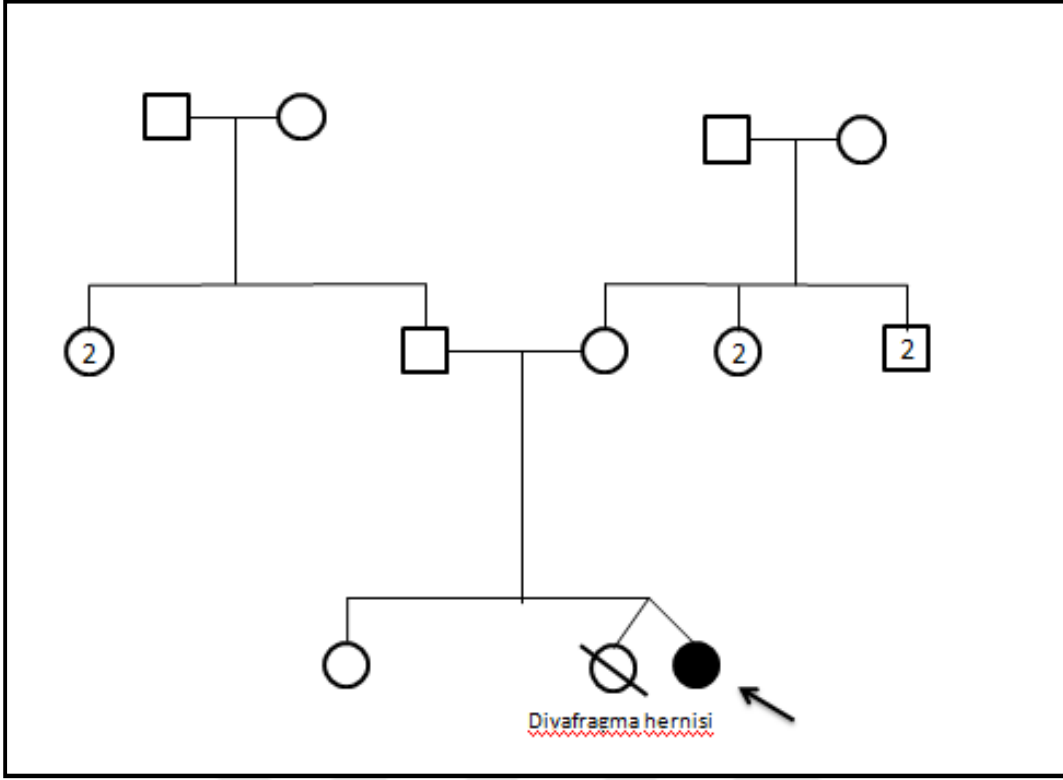
Yüksek Rezolüsyonlu Akciğer BT ile akciğerlerde küçük ve büyük hava yolu hastalığının göstergesi olabilecek atelektazi ve hiperinflasyon saptanmıştır.

Difüzyon MR ile serebral myelizasyon paterni yaklaşık 3 ay civarında olup gecikme, hipokampal formasyon gelişiminde yetersizlik saptanmış olup periventriküler lökomalazi ya da hemoraji bulgusuna rastlanılmamıştır.

3D Kranial BT, abdomen USG, EEG ve işitme testi normal olarak değerlendirilmiştir.

Olgunun karyotip analizinde ve subtelomerik FISH çalışmasında patolojik bir bulguya rastlanmamıştır.

Yapılan WES analizi sonucu olgunun klinik bulgularını açıklayacak mutasyon bulunamamıştır.



Şekil 19. 6 No'lu Olgunun Aile Ağacı



Şekil 20. 5 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri

4.7 Olgu 7 (E.Ö.)

Gelişme geriliği nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 5 yaşında kız olgu, miadında 3470 gr olarak doğmuş. Özgeçmişinde meningomyelosele bağlı hidrocefali nedeni ile doğduğu gün opere olmuş. Annesi ile babası arasında akrabalık olan (Şekil 21) olgunun 1 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 9100 gr (25p), boy: 74cm (50p), baş çevresi 52 cm (75-90p) olup basık burun, temporal alopesi, dismorfik kulak, kule kafa (oxycephaly), pektus karinatum, basık burun kökü, ayak 2-3 parmakları üst üste binme, ayak başparmağında tetik parmak saptandı (Şekil 22).

Annede bakılan folik asit seviyesi normal olarak saptanmıştır.

Yapılan göz dibi muayenesi ve işitme testi normal olarak değerlendirilmiştir.

Tiroid, kalça, tüm batın ultrasonografi ve ekokardiyografi normal olarak saptanmıştır.

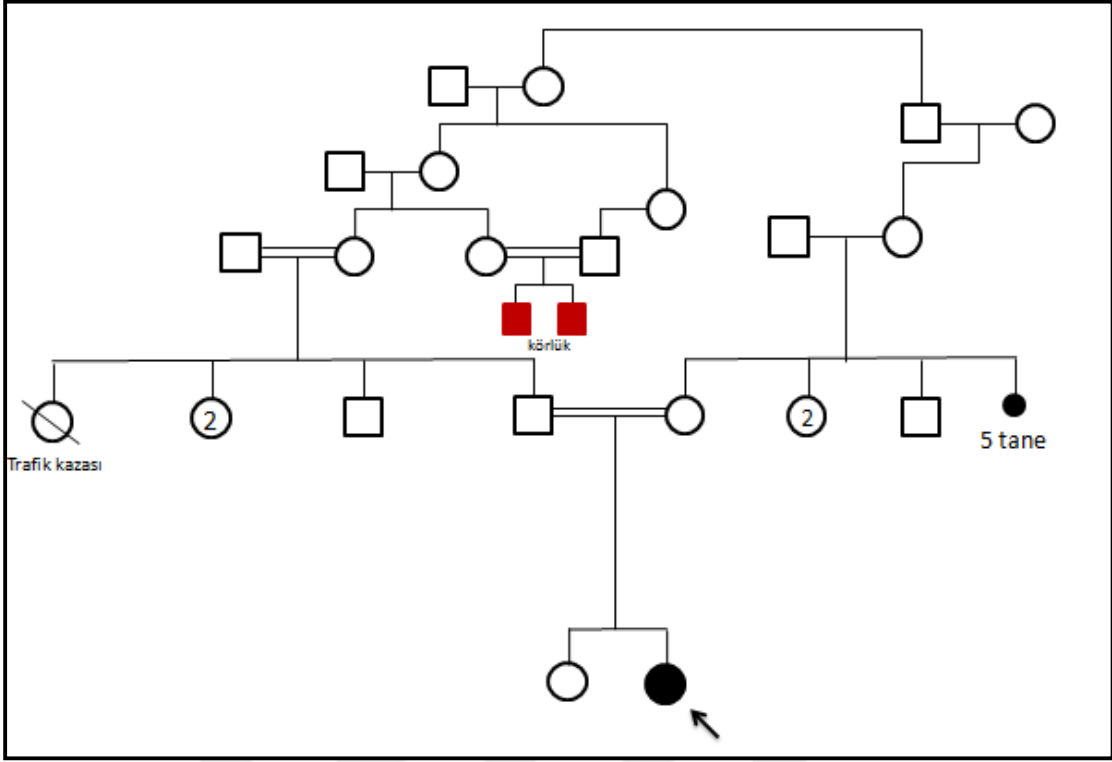
Kranial USG'de hidrocefali, korpus kallosum agenezisi, ventriküloperitoneal şant saptanmıştır.

Kranial MR incelemesinde meningomyelosele, hidrocefali, corpus callosum agenezisi saptanmıştır.

Kranial BT incelemesinde sağ paryetal kemik posteriorunda Burr Hole defekti ve bu defekten ventriküler sisteme uzanan şant katateri saptanmış.

Olgunun karyotip analizi normal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan WES analizi sonucu olgunun klinik bulgularını açıklayacak mutasyon bulunamamıştır.



Şekil 21. 7 No'lu Olgunun Aile Ağacı



Şekil 22. 7 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri

4.8 Olgu 8 (H.İ.)

Motor mental retardasyon nedeniyle Pediatrik Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen 6 yaşında erkek olgu, miadında 1000 gr olarak doğmuş. Özgeçmişinde intrauterin gelişim geriliği ve hareketlerde azlık tespit edilen olgu 3 aylık iken sağ inguinal herni ve 4 aylık iken diyafragma hernisi sebebiyle opere olmuş. 2 yaşında sol akciğerde atelektazi nedeniyle lobektomi operasyonu geçirmiş. 3 yaşında ateşli bir nöbet geçirme öyküsü olan olgunun ilerleyen dönemlerde nöbetleri tekrarlaması nedeniyle antiepileptik ilaç kullanmakta olduğu belirtilmiştir. Ortopedi servisine konsulte edilen olguda bilateral kalça çıkığı saptanmış. AGTE orta düzeyde gelişimsel gecikme saptanmıştır.

Annesi ile babası arasında akrabalık olan (Şekil 23) olgunun 5 yaşında yapılan fizik muayenesinde ağırlık: 12 kg (<3p), boy: 95cm (<3p), baş çevresi 46 cm (<-2 SD) olup mikrosefali, asimetrik yüz, kalın dudaklar, makrostomi, kulak memesi yokluğu, mikroretrognati, iri gözler, şaşılık, pektus ekskavatum, eklem laksitesi, kifoskolyoz, elde 2. ve 4. parmaklarda klinodaktili, ayak 4. parmağın 3.parmağa göre daha kalın, halluks valgus, stereotip hareketler, her iki alt ekstremitte kasları atrofik ve spastikte gözlenmiştir (Şekil 24). Olgunun soygeçmişinde ise dayısının 7 aylık erkek çocuğunda gelişme geriliği olduğu belirtildi.

Laboratuvar bakısında rutin biyokimya, hemogram ve metabolik testleri normal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan göz muayenesinde sol gözde lateral deviasyon (20°) saptanmış. İşitme testi normal olarak değerlendirilmiştir.

Abdominal ultrasonografi normal olarak saptanmıştır.

Kranial MR'da asimetrik görünümde kranium, mikrosefali sağ hemikranium saptanmıştır. Sağ serebral hemisferde beyaz cevherde kronik iskemik değişikliklere sekonder gliosis alanları saptanmış olup MR spektroskopisi normal olarak değerlendirilmiştir.

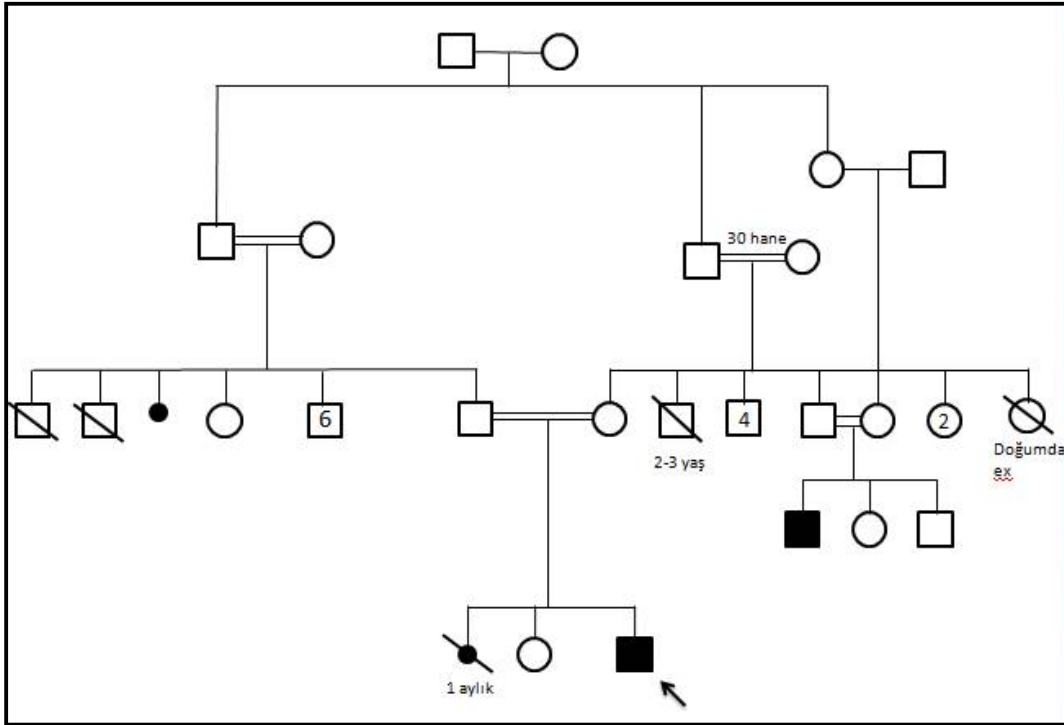
Yüksek Rezolüsyonlu Akciğer BT ile sol pnömonektomiye bağlı sağ akciğerde hiperinflasyon, sağ akciğerde üst ve ortada daha belirgin tüm loblarda sol tarafa şift,

mediasten ve kalpte tümüyle sol hemitoraksa yer değiştirme, sağ orta lob medial segmentte ve sağ alt lobda buzlu cam tarzında pnömonik infiltrasyonlar yanısıra sağ alt lobda küçük fokal konsolidasyon odakları saptandı. Vertebral kolonda şiddetli rotoskolyoz dikkat çekmekteydi.

EEG ile temel aktivite yaşına göre immatür, her iki hemisferin frontal bölümlerinde yüksek amplitütlü epileptiform odak saptanan olguda video kaydı ile nöbet izlenmedi. Kemik surveyde ciddi rotoskolyoz, bilateral konjenital kalça çıkığı, osteoporoz saptanmıştır.

Olgunun karyotip analizi ve Feingold sendromu için bakılan *MYCN* geninin dizi analizi sonucu normal olarak değerlendirilmiştir.

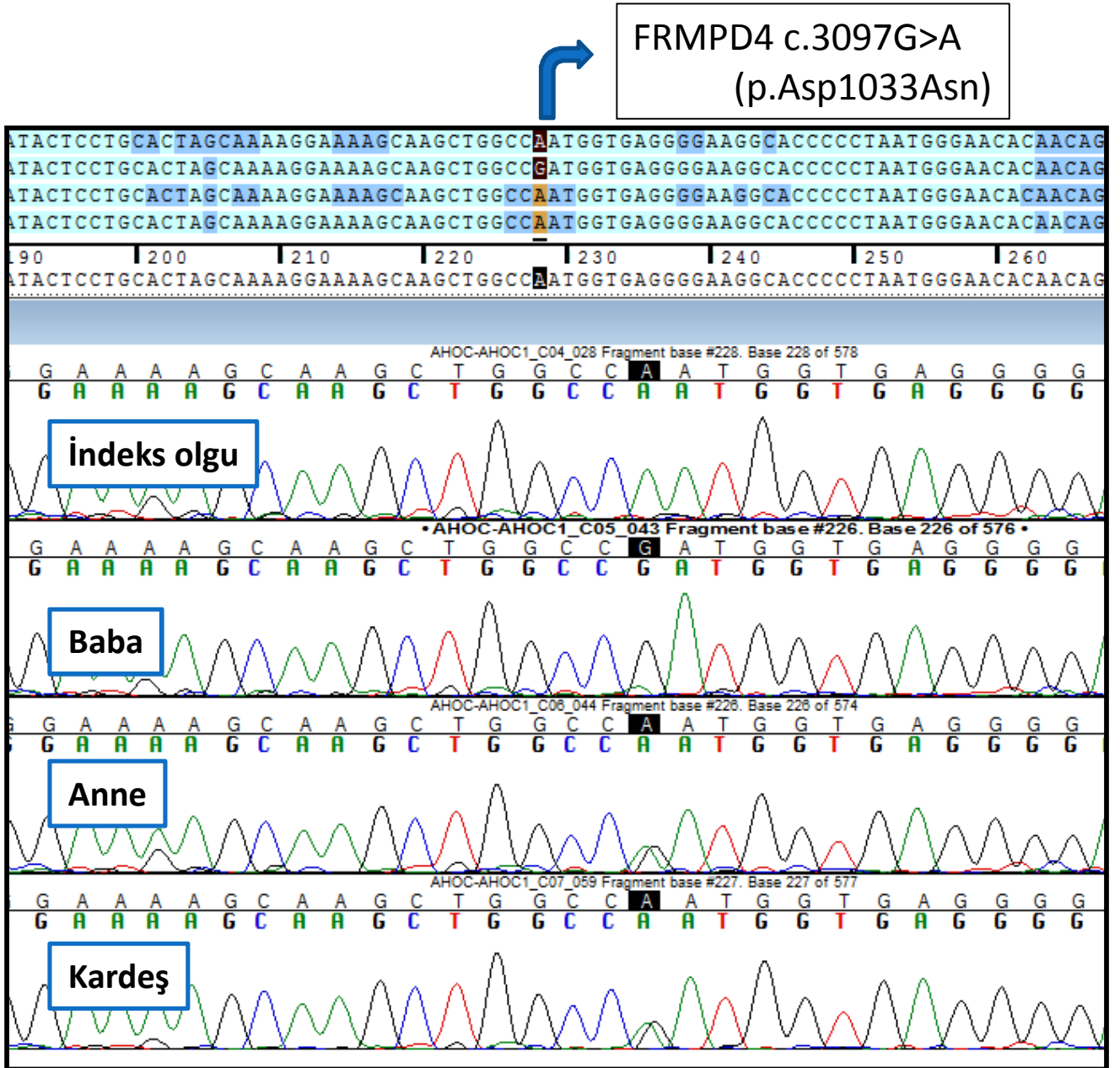
Yapılan WES analizi sonucu *FRMPD4* geninde hemizigot 3097. pozisyonda yer alan guanin nükleotidinin yerini adenin nükleotidinin aldığı (c.3097G>A) saptanmıştır (Şekil 25). Bu değişiklik proteinin 1033'üncü amino asidi olan aspartat yerine asparajin geçmesine (p.Asp1033Asn) sebep olmaktadır. Annede ve sağlıklı kız kardeşinde heterozigot, baba da normal olarak gösterilmiştir. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir.



Şekil 23. 8 No'lu Olgunun Aile Ağacı



Şekil 24. 8 No'lu Olgunun dismorfik özellikleri



Şekil 25. 8 No'lu Olgunun Sanger Dizi Analizi Görüntüsü (FRMPD4)

5. Tartışma

ID 18 yaşından önce başlayan IQ değerinin 70'in altında olduğu, entelektüel fonksiyonlarda ve adaptif davranışlarda önemli derecede azalmalarla karakterize bir sağlık sorunudur. ID toplumlar arası sıklığı değişmekle birlikte %1-3 oranında görüldüğü tahmin edilmektedir (4). Ancak sosyo-ekonomik düzeyi düşük olan ve akraba evliliğinin sık yapıldığı toplumlarda daha sık görülmektedir. Hastalıkların Uluslararası

Sınıflandırmasında (International Classification of Diseases, ICD10) ID tanı konulmasının en pahalı olduğu hastalıklar içerisinde yer almakta olup, dünya çapında önemli bir sosyoekonomik sorundur ve genetik servislerine en çok sevk edilen hastalık grubunu oluşturmaktadır (30). Bir ömür boyunca bakım maliyeti çok yüksek olup kişi başına 1 milyon doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (111). ID sadece klinik bir bulgu olabilir ya da bir sendromun bir parçası olarak da yer alabilmektedir. Ancak sendromik ya da sendromik olmayan ID'lerin arasında keskin bir ayırım yapmak mümkün değildir. Mali zorluklar ötesinde, ID'li olguların bakımı aile üzerinde önemli sosyal ve duygusal etkileri olabilmektedir. ID'li bireylerin ebeveynleri ve kardeşleri sosyal etkileşimlerde damgalanmış, etkilenmemiş aileler tarafından gelen bir yabancılaşma ve bağımlı bir bireyin tüm hayatı boyunca bakımını yüklenme gibi nedenlerden dolayı kronik bir stres yaşamaktadırlar. ID'li olguların genetik sebebinin aydınlatılması ile ilişkili klinik bulguların daha önceden fark edilmesi ve tedavisine yönelik önlemler, diğer aile bireylerine taşıyıcılığı belirlenmesine yönelik testlerin yapılabilir olması ile genellikle ailelere teselli vermektedir. Bu amaçla planladığımız çalışmamızda ID ve/veya multipl konjenital anomali nedeniyle araştırılan, klinik olarak bilinen bir sendrom veya hastalığa uymayan, 8 çocuk olgunun tüm ekzom dizileme tekniği ile altta yatan genetik nedenin bulunması ve etiyolojideki yerleri araştırılmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen 8 olgunun 4'ünde Olgu1, Olgu 2, Olgu 5, Olgu 8 olmak üzere hastalığa sebep olduğu düşündüğümüz *IQSEC2*, *PLA2G6*, *AGTR2* ve *FRMPD4* genlerinde mutasyon saptandı. Tanı konulan olgularda bulduğumuz mutasyonların 3 tanesi X'e bağlı kalıtım paterni gösterirken; 1 tanesi ise otozomal resesif kalıtım paterni göstermektedir. Bulduğumuz mutasyonların tamamı ilk defa bu çalışma ile saptanan yeni mutasyonlardır. Ayrıca hastaların ikisinde Olgu1 ve Olgu 5'de ACMG tarafından rapor edilmesi tavsiye edilen genlerden *PMS2* ve *MSH2* genlerinde mutasyon saptandı. Bu genlerde saptadığımız mutasyonlar da ilk defa bu çalışma ile saptanan yeni mutasyonlardır.

ID'de genetik faktörler önemli bir rol oynamakta olup, klinik ve genetik heterojenite oldukça fazla olmaktadır. Genetik sebepler haricinde de enfeksiyon, travma gibi sebeplerde kognitif bozukluklara yol açsa da ciddi ID'li olguların çoğunda sitogenetik anormaliliklerden nokta mutasyonuna kadar değişen aralıkta, hatta

epigenetik değişikliklerinde dahil olduğu altta yatan genetik bir sebep bulunmaktadır. Örneğin, mikroskobik olarak görünebilen sitogenetik anormallikler (anöploidi, büyük delesyon, inversiyon ve yeniden düzenlenmeler) olguların %15'ine (4); mikroarray tarafından saptanan CNV'ler geriye kalan olguların %15'ine (23), nokta mutasyonlar ve küçük insersiyon ya da delesyonlar ek olarak olguların %10'una neden olmaktadır (30). Ek olarak metilasyon gibi epigenetik nedenlerde çok nadir bazı vakalarda bildirilmiştir. Günümüze kadar 450'den fazla genin ID ile ilişkisi bildirilmiştir. Ancak ID'li olguların hala %60'nın etiyolojisi bilinmemektedir (7). Nedeni aydınlatılamamış olgular son yılların devrim niteliğindeki buluşu olan yeni nesil dizileme yöntemleri ile araştırılmaktadır.

Vissers ve arkadaşları tarafından ID'li 10 olguya ve anne-babalarına WES uygulanmıştır. Bu olgular, 8 erkek ve 2 kız, orta ve ciddi düzeyde ID 'li olup ve aile öyküsü negatif olan hastalardan oluşturulmuştur. Bu olguların klinik değerlendirilmeleri sonucu sendrom ya da etiyolojik tanıya ulaşılamamış olup yapılan sitogenetik analiz, array temelli genomik profillemeye ve *FRM1* geninde herhangi bir patolojik bulguya rastlanılmamıştır. WES sonucunda ikisi bilinen ID geni olmak üzere toplam 6 olguda ID ile fonksiyonel bağlantılı genlerde de-novo mutasyon tespit etmişlerdir. Ayrıca bir olguda da anneden kalıtılan XLID geninde bir mutasyon saptamışlar ve bu mutasyonun da annede de-novo meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu çalışma ile nedeni aydınlatılamamış izole ID'li olguların ana nedeninin de-novo mutasyonlardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (99).

Joep de Ligt ve arkadaşları tarafından IQ seviyesi 50'nin altında olan nedeni açıklanamamış ciddi ID'li 100 olguya (53 kız ve 47 erkek) ve onların etkilenmemiş anne-babalarına WES uygulanmıştır. Klinik olarak ayırıcı tanısı zor olan ID'nin sendromik olmayan formunda değerlendirilen bu olgular daha öncesinde metabolik hastalıklar açısından taranan ve yapılan genetik testler (250K Affymetrix SNP array, hedefe yönelik genler) sonucu herhangi bir etiyolojik neden bulunmayan çocuk hastalardan oluşturulmuştur. WES sonucu 13 olguda bilinen ID genlerinde 10 de-novo mutasyon ve 3 X'e bağlı kalıtım paterni gösteren mutasyon saptamışlardır. Ayrıca mutasyon buldukları aday genlerden 3 tanesi benzer fenotipik özellik gösteren başka olgularda da aynı genlerde mutasyon gösterilerek yeni gen olarak düşünölmüştür. Sonuç olarak bu

çalışmada tanı oranlarını çoğunluğu de-novo mutasyon olmak üzere % 16 olarak belirtmişlerdir (25).

Yang ve arkadaşları tarafından WES yapmış oldukları ilk 250 probandin verilerini sundukları çalışmada tanı oranlarını % 25 olarak belirtmişlerdir. Olguların yaklaşık %80'ini nörolojik bulguları olan ve çoğunluğu 18 yaşından küçük olgulardan oluşturulmuştur. Bütün hastalar kromozomal mikroarray analiz, DNA sekanslama çalışmaları, metabolik taramalar ya da bu testlerin kombinasyonundan oluşan genetik testler açısından araştırılmışlardır. Tanı konulan olgulara bakıldığında 33 otozomal dominant, 16 otozomal resesif ve 9 X'e bağlı kalıtım gösteren genlerde mutasyon bulunmuşlardır. Bu çalışmada tanı koymanın yanısıra ek olarak 250 hastanın 30'nda toplam 16 gende rastlantısal bulgu saptamışlardır. 16 genin 9 tanesi ACMG tarafından rapor edilmesi tavsiye edilen genleri oluşturmaktaymış (112).

Need ve arkadaşları tarafından tanısı konulamayan ID ve/veya MCA'lı 12 olguya ve anne-babalarına WES uygulanmıştır. Olgular seçilirken aşağıda bahsedilen kriterlerden en az ikisinin olduğu hastalar seçilmiştir: (1) nedeni aydınlatılamamış ID ve/veya gelişme geriliği; (2) bir major konjenital anomali; (3) 2-3 minör konjenital anomali; (4) fasiyal dismorfizm. Buna ek olarak, aşağıdaki uygunluk gereksinimlerini karşılayan aileleri seçmişlerdir: (1) biyolojik paternite test için uygun olması; (2) kromozomal mikroarray dahil genetik testleri normal olması; (3) özgeçmişinde doğumda asfiksi, teratojenlere maruziyet ve kaza/travma olmaması. Sonuç olarak bu çalışmada 12 olgunun 6'sında olası bir genetik tanı konulmuştur (113).

Yukarıda literatürde özetlendiği kadarıyla tanı oranları %16-25 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda tüm ekzom dizileme ile olguların %50'sinde moleküler tanı başarısı sağlanmıştır. Literatürden yüksek saptanan bu oran hasta seçiminde çok titiz olmamız ve kalıtım biçiminin tek gen hastalıklarının olduğunu düşündüğümüz olguları tercih etmemizle açıklanabilir.

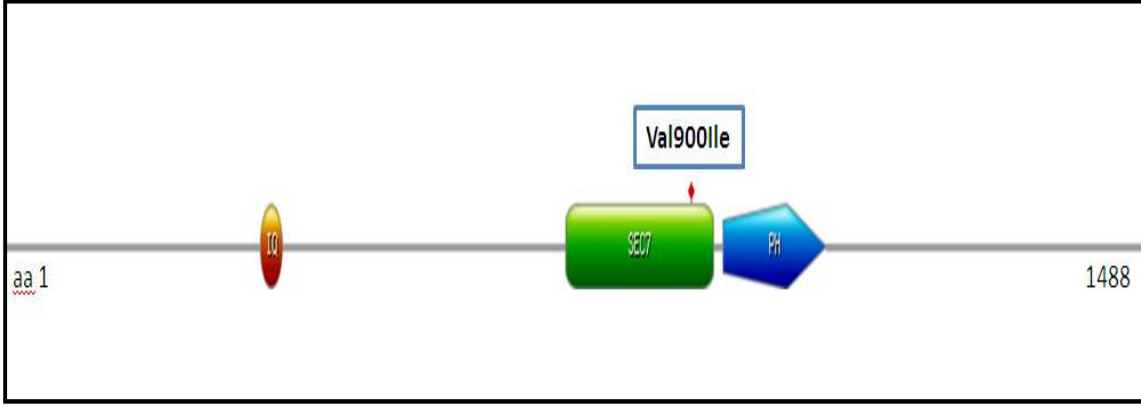
Mutasyon saptanan 1. hastamız olan olgu 1'de tanımlanan mutasyon *IQSEC2* geninin 8. ekzonunda yer alan hemizigot p.Val900Ile değişikliği idi. Bu değişiklik 2698. nükleotidin guaninden adenine yer değiştirmesi ile 900. pozisyondaki amino asit olan valin yerine izolösin geçmesine (p.Val900Ile) sebep olmaktadır. Annede heterozigot

olarak saptanan bu mutasyon, babada ve sağlıklı erkek kardeşinde saptanmamıştır. Veri tabanlarında yer almayan bu varyasyon modelleme programlarıyla değerlendirildiğinde hastalık yapıcı olarak belirtilmiştir. Ayrıca mutasyonun etkisini değerlendirmek için yaptığımız analizlerde bu amino asidin evrimsel süreçte iyi korunmuş olduğu belirlenmiş (Şekil 26) ve Sec7 domain de yer aldığı görülmüştür (Şekil 27). Bu bulgularla değişikliğin patojenik bir mutasyon olduğu düşünülmüştür. Mutasyonun klinik etkinliğinin gösterilebilmesi için fonksiyonel çalışmalar gereklidir.

	Val900 ile
<u>H. sapiens</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>O. garnettii</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>E. europaeus</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>P. vampyrus</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>P. anubis</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>C. simum</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>O. orca</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>L. vexillifer</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>N. galili</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>P. maniculatus</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV
<u>M. musculus</u>	QSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPSV

Şekil 26. Farklı türlerde IQSEC2 geni amino asit dizilimi (900. pozisyonda valin)

IQSEC2 geni Xp11.22 bölgesinde yer almakta olup, 15 ekzondan oluşmaktadır. *IQSEC2* geni 1488 aminoasitten oluşan GTP bağlayıcı proteinlerin ADP-ribozilasyon faktörü ailesi için guanin nükleotid değişim faktörleri sağlayan protein kodlamaktadır. Bu protein IQ, Sec7 ve PH domainlerinden oluşmaktadır (Şekil 27). *IQSEC2* geni insan beyinde nöral ortamın homeostasisin sürdürülebilmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Patojenik mutasyonlardan dolayı guanin nükleotid değişim faktörü aktivitesinin kaybı hastalığın mekanizmasının muhtemel alta yatan sebebi olmaktadır. Bu sonuçta aktin hücre iskeleti organizasyonu düzenlenmesini etkileyen ARF6 substratının azalmış aktivasyonuna neden olmaktadır (114).



Şekil 27. IQSEC2 proteinine ait domainler ve Val900Ile mutasyonun yer aldığı domain

IQSEC2 geninde meydana gelen mutasyonlar nörokognitif ve nöropsikiyatrik fenotiplere neden olan mekanizmalarla bağlantısı bulunmaktadır. *IQSEC2* geninde meydana gelen mutasyonlar nsXLID'ye neden olmaktadır. Rapor edilen etkilenen bireylere bakıldığında *MECP2*, *FOXP1*, *CDKL5*, ve *MEF2C* genlerinde hasar verici değişikliklerin sebep olduğu fenotipik bulgularla örtüşmektedir (115). Günümüze kadar çok az sayıda *IQSEC2* geninde mutasyon bildirilmiştir.

1988 yılında sendromik olmayan herediter XLID'li bir aile tanımlanmıştır (116). Sonrasında bu aile birçok ailenin analiz edildiği bir projeye dahil edilmiş olup *IQSEC2* geninde p.R863W mutasyonu saptanmıştır. Aynı çalışmada farklı ailelerde olmak üzere p.Q801P, p.R758Q, p.R359C mutasyonları da tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan 3 tanesi *IQSEC2*'nin Sec7 domaininde, geriye kalan bir mutasyon ise *IQSEC2*'nin IQ domaininde yer aldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada Sec7 domaininde meydana gelen yanlış anlamlı değişikliklerin wild-tipine göre GTP'nin ARF6 (ADP-ribosylation factor 6)'ye bağlanmasının önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu olguların ortak klinik bulguları ID, nöbet, konuşma becerilerinde gerilik, otistik davranışlar ve psikiyatrik problemler olarak belirtilmiştir (114). Bizim olgumuzun da bahsedilen olgularla klinik bulguları örtüşmekte olup saptadığımız mutasyon proteinin fonksiyonunu etkilediği belirlenen Sec7 domaininde bulunmaktaydı.

Rauch ve arkadaşları tarafından 2012 yılında sendromik olmayan sporadik ID'li 20 olguya ve ebeveynlerine ekzom sekanslama yapılmış ve *IQSEC2* geninde yanlış

anlamli mutasyon (Arg855*1) tanimlanmistir. Olgunun klinik bulgulari ID, yuruyememe, konusamama, sterotip hareketler, sasilik, hipermetropi ve brakisefali olarak belirtilmistir. Bu olguda bizim olgumuzdaki gibi nobet ve anormal kranial MR bulgulari saptanmamistir (26).

Tran Mau-Them ve arkadaslarinin 2013 yilinda yaptiklari calismada 3 erkek olguda X kromozomunda *IQSEC2* genini de kapsayan 2 tane de-novo intragenik duplikasyon ve 1 tane yanlis anlamli mutasyon saptanmistir. Olgularin klinik bulgulari ciddi ID, yenidoğan döneminde hipotonisite, motor gelişiminde gerilik, sasilik, otistik davranislar, stereotipik el hareketleri, hiperkinezi, mikrosefali (2/3), nobet ataklari (2/3), yuruyememe ya da çok az yurume, konusamama ya da çok az konusma, davranissal sorunlar ve hafif düzeyde anormal yüz bulgulari olarak belirtilmistir. Üç olgunun sadece birinde anormal MR bulgusu saptanmistir (115).

2014 yilinda Gandomi ve arkadaslari tarafından ekzom sekanslama ile benzer fenotipleri olan 2 olguda *IQSEC2* geninde mutasyon tanimlanmistir. Bu iki olgunun ortak bulgulari gelişme geriligi, nobet ataklari, hipotoni, görme bozukluklari (sasilik, astigmatizm), plagisefali, anormal MR bulgulari, konusamama, sterotipik hareketler ve otistik benzeri davranislardan olusuyormuş. İlk olguda p.S861T mutasyonu bulunmuş ve ek bulgular olarak hafif fasyal hipoplazi, bilateral coxa valga ve objelerin takibinde yetersizlik mevcutmuş. Bu olguda saptanan mutasyonun da bizim olgumuzdaki gibi *IQSEC2'nin* Sec7 domaininde lokalize olduğu belirtilmistir. İkinci olgu da p.C684X mutasyonu tespit edilmiş ve ek bulgu olarak gaga burun, yuvarlak yüz, hafif maksiller hipoplazi, geniş aralıklı meme uçlari, hiperekstansibilite ve derin tendon reflekslerinde kayip gözlenlenmiş (117).

Bizim olgumuz lietatürdeki olgularla kıyaslandığında ID, mikrosefali, gelişim geriligi, yuruyememe, konusamama, sasilik, stereotipik hareketler, hiperkinezi, otistik benzeri davranislar, bilateral coxa valga gibi klinik bulgularla örtüşmektedir. Olgumuzda ayrıca bilateral kriptorşidizm, duyma kaybı (ERA testinde sol kulak 45 db, sağ kulak 60 db) ve alt servikal üst torakal vertebralarda füzyon defekti mevcuttur. Bu ek bulgular ile *IQSEC2* geninde meydana gelen mutasyonlara bağlı oluşan fenotipe katkı sağlamış olmaktadır.

Olgu 1'de saptanan diğer mutasyon *CD96* geninde homozigot p.Pro346Ser değişikliği idi. Bu değişiklik 1036. nükleotidin sitozinden timine yer değiştirmesi ile 346. pozisyondaki amino asit olan prolin yerine serinin geçmesine (p.Pro346Ser) sebep olmaktadır. Anne-babada ve sağlıklı erkek kardeşinde bu değişiklik heterozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyon veritabanlarında rs200729689 numarası ile kayıtlıdır. ExAC Browser veritabanında bu değişiklik homozigot olarak yer almamaktadır ve allel frekansı 0.0001905 olarak verilmiştir. *CD96* geninde yer alan mutasyonlar C sendromuna (Opitz Trigonosefali Sendromu) yol açmaktadır. Bu sendromun temel bulguları trigonosefali, mikrosefali, sternum anomalileri, kısa ekstremiteler, epikantus, strabismus, kas tonusu kaybı, yüz felci, kalp defektleri, kriporşidizm, akciğer ve böbrek anomalileri ve epilepsidir. Olgumuz bu sendromun bulguları açısından özellikle de en ayırt edici bulgusu olan trigonosefali açısından değerlendirilerek olgumuzda bulunan bu değişikliğin klinik bulgularına katkısı açısından araştırılacaktır.

Olgu 1'de ayrıca rastlantısal bulgu olarak *PMS2* geninin 12. ekzonunda yer alan heterozigot Glu663Lys mutasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik 1987. nükleotidin guaninden adenine yer değiştirmesi ile 663. pozisyondaki amino asit olan glutamat yerine lizinin geçmesine (p.Glu663Lys) sebep olmaktadır. Annede de heterozigot olarak saptanan bu mutasyon babada ve sağlıklı erkek kardeşinde saptanmamıştır. Bu mutasyon veritabanlarında tanımlı değildir. Bu değişiklik modelleme programlarıyla değerlendirildiğinde patojenik bir mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

PMS2 geni 7. kromozomun kısa kolunun 22.1 bölgesinde yer almakta olup DNA yanlış eşleşme tamirinde (MMR) yer alan genlerden biridir. Bugüne kadar veritabanlarında 53 missense/nonsense, 26 küçük delesyon, 14 küçük insersiyon, 28 splicing, 70 büyük delesyon, 3 küçük indel, 4 büyük insersiyon ve 3 kompleks olmak üzere toplamda 202 tane mutasyon bildirilmiştir. *PMS2* genindeki mutasyonların Herediter nonpolipozis kolorektal kanser, Turcot sendromu ve Supratentorial primitif nöroektodermal tümörlere ilişkisi bulunmaktadır (118). Olgumuzun soygeçmişi daha da ayrıntılı sorgulandığında annesinin babasının prostat ca ile takip edildiği ve babasının babaannesinin kolon ca nedeniyle ex olduğu öğrenildi.

Olgumuz ve ailedeki risk altındaki bireylerin *PMS2*'nin neden olduğu bu maligniteler açısından takip edilmesi önerilecektir. Ayrıca hem *IQSEC2* hem de *PMS2* geninde

mutasyon saptadığımız olgu literatürde ilk defa bu iki genin birlikteliği açısından da önem taşımaktadır.

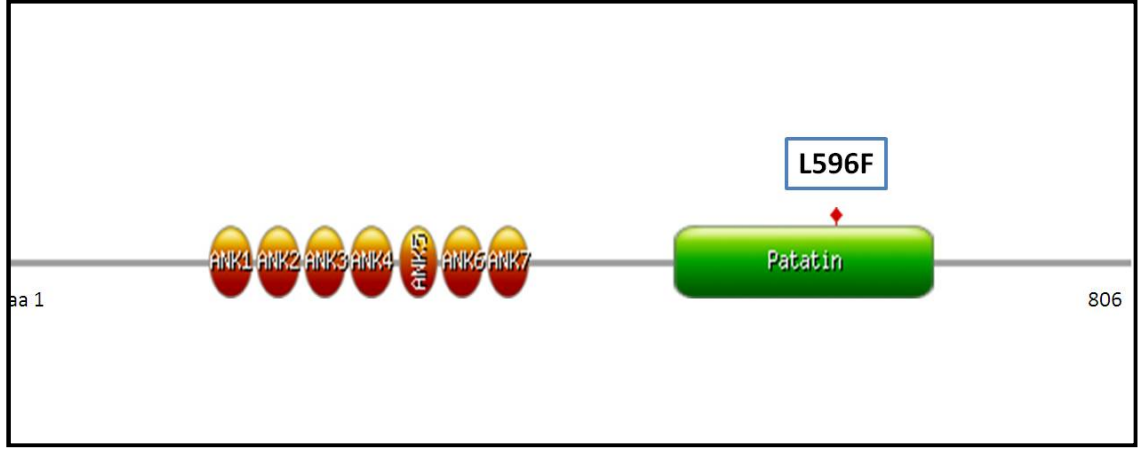
Mutasyon saptanan 2. hastamız olan Olgu 2’de tanımlanan mutasyon *PLA2G6* geninin 13. ekzonunda yer alan homozigot p.Leu542Phe değişikliği idi. Bu değişiklik 1624. nükleotidin sitozinden timine yer değiştirmesi ile 542. pozisyonadaki amino asit olan lösin yerine fenilalanin geçmesine (p.Leu542Phe) sebep olmaktadır. Bu değişiklik anne ve babada heterozigot olarak gösterilmiştir. Veri tabanlarında yer almayan bu varyasyon modelleme programlarıyla değerlendirildiğinde hastalık yapıcı olarak belirtilmiştir. Ayrıca mutasyonun etkisini değerlendirmek için yaptığımız analizlerde bu amino asidin evrimsel süreçte iyi korunmuş olduğu belirlenmiş (Şekil 28) ve patatin domainde yer aldığı görülmüştür (Şekil 29). Bu bulgularla değişikliğin patojenik bir mutasyon olduğu düşünülmüştür. Mutasyonun klinik etkinliğinin gösterilebilmesi için fonksiyonel çalışmalar gereklidir.

Species	Amino Acid Sequence	Position
H.sapiens	HTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLV	630
P.troglodytes	HTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLV	657
P.paniscus	HTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLV	630
G.gorilla	HTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVTLRPPAQPSDQLV	630
M.fascicularis	HTKMTDVKKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLV	630
M.mulatta	HTKMTDVKKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLV	630
C.sabaeus	HTKMTDVKKPNVMLTGTLSDRQPAELHLFRNXDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLV	659
R.roxellana	HTKMTDVKKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPARPSDQLV	630
O.garnettii	HTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPESIREPRFSQNVNLRPPTLPSDQLV	631
T.syrichtha	HTKMTDVKKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQVINLKPLTQPSDQLV	631

*****:*:*:***** ***** :*:*****:*:*:* : *****

Şekil 28. Farklı türlerde *PLA2G6* geni amino asit dizilimi (596. pozisyonda lösin)

PLA2G6 geni 22q13.1 bölgesinde yer almakta olup, 17 ekzondan oluşmaktadır. *PLA2G6* geni 806 aminoasitten oluşan protein kodlamaktadır ve ANK tekrar bölgeleri ile patatin domaininden oluşmaktadır (Şekil 29). Bu protein yağ asitlerinin fosfolipitlerden salınmasını katalize eden enzim sınıfında olup fosfolipidlerin yeniden düzenlenmesinde, araşidonik asit salınımında, lökotrien ve prostaglandin sentezinde, fas-aracılıklı apoptozisde, glukoz ile uyarılmış B hücrelerine transmembran iyon akışında rol almaktadır (119-121).



Şekil 29. PLA2G6 proteinine ait domainler ve L596F mutasyonun yer aldığı domain

Beyinde demir birikimi ile giden nörodejenerasyon (NBIA) ilerleyici motor semptomlar, nörolojik gerileme ve radyolojik olarak fark edilebilen demir birikimi ile seyreden karakterize bir grup hastalığı kapsar (119, 122). En önemli çocukluk çağı NBIA sendromları pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyon (PKAN), yağ asit hidroksilaz ilişkili nörodejenerasyon (FAHN), mitokondriyal membran proteini ilişkili nörodejenerasyon (MPAN), beta ilerletici proteinle ilişkili nörodejenerasyon (BPAN) ve fosfolipaz A₂ ilişkili nörodejenerasyon (PLAN) sayılmaktadır. Fosfolipaz A₂ ilişkili nörodejenerasyon *PLA2G6* genindeki mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. *PLA2G6* genindeki mutasyonlar çocukluk çağı başlangıçlı NBIA'nın yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (123). Bugüne kadar veritabanlarında 91 yanlış anlamlı/anlamsız, 9 splicing, 16 küçük delesyon, 4 küçük insersiyon, 5 büyük delesyon, 2 büyük insersiyon olmak üzere 127 mutasyon bildirilmiştir. Kesin prevalansı bilinmemekle birlikte 1:1,000,000 olduğu tahmin edilmektedir (123). *PLA2G6* ile ilişkili hastalıklar fenotipleri birbirine ile örtüşen 3 durumda karşımıza çıkmaktadır: klasik infantil nöroaksonal distrofi (INAD), atipik nöroaksonal distrofi (NAD), yetişkinlikte başlayan *PLA2G6* ilişkili distoni-parkinsonizm. Bu fenotipler patolojik olarak karakterize aksonal sferoidler, beyinde ilerleyici demir birikimi ve klinik olarak ilerleyici motor disfonksiyonu ve bilişsel gerileme ile gitmektedir (122).

Klasik infantil nöroaksonal distrofi PLAN olgularının büyük çoğunluğunu oluşturmakta ve nispeten bulguları olgular arasında homojendir (122). INAD fenotipli

olguların yaklaşık %80-90'ında PLA2G6 geninde mutasyon saptanabilmektedir (124). Etkilenen çocuklar genellikle normal bir gebelik sonrasında doğarlar ve gelişme basamakları normal bir şekilde ilerler. Hastalığın başlangıç yaşı genellikle 6 ay ile 2 yaş arasında olmaktadır (ortalama yaş 14 ay) ve hastalığın ilerlemesi genellikle hızlıdır (125). Çocukların çoğunda başlangıç olarak aksiyel hipotoni ve ilerleyici psikomotor gerileme mevcuttur. Yürüme bozukluğu (ataksi ve instabilite) ve gecikmiş yürüme de erken gözlemlenen bulgulardan olup nistagmus ve şaşılık hastalığın erken safhalarında sıklıkla bildirilen bulgulardandır. Oftalmolojik muayenede optik diskin solukluğu erken başlangıçlı optik atrofinin göstergesi olabilmektedir (119, 125). İlk on yılda çocuklar simetrik piramidal yolu işaretleri (başlangıçta reflekslerde artış ve sonrasında refleks kaybı) ile spastik tetraparezi geliştirmektedir. Çocukların çoğunda kifoskolyoz ve ekstremitte kontraktürleri gibi spinal deformiteler gelişir. Bulber disfonksiyon olguların çoğunda 5 yaşına kadar ortaya çıkmaktadır (125). Distoni gibi ekstrapiramidal bulgular ilk on yılın sonlarına doğru daha yaygın olmak üzere rapor edilmiştir. Bazı toplumlarda epileptik nöbet erken bir aşamada belirgin olabilmesine rağmen, jeneralize nöbetler hastalığın seyri boyunca sıklıkla daha sonraları ortaya çıkmaktadır (126). Zamanla bu bulgular kötüleşmekte ve olgular bitkisel hayata girmektedir. Genellikle ilk on yılın sonlarında hayatlarını kaybederler (125).

Klasik infantil nöroaksonal distrofinin tanısının konulmasında MR bulguları yardım etmektedir. Serebellar atrofi MR'da en yaygın ve en erken gözlenen bulgudur (125). Serebellar gliosis olguların çoğunda gözlemlenmektedir ve yaşla birlikte ciddiyeti artmaktadır. Serebellar atrofi sekonder corpus callosum anormallikleri ile birliktelik göstermektedir. Çocukların %40-50'sinde beyinde globus pallidus (özellikle medial kısmında), dentate nükleus, substantia nigra kısımlarında yaşla birlikte artan demir birikimi görülmektedir. Ayrıca serebral beyaz cevher kısmında da atrofi bildirilmiştir (119, 125).

Klasik infantil nöroaksonal distrofinin nörolojik incelemesinde ortaya çıkan birçok anomaliler de tanının konulmasında yardımcı olmaktadır (127). EEG de yüksek amplitüdü hızlı aktivite çoğunlukla tespit edilen bulgudur. Elektrofizyolojik incelemelerde EMG'de denervasyon, sinir ileti çalışmalarında distal aksonal tip sensorimotor nöropati ve görsel uyarılmış potansiyellerin yokluğu ya da azalmış

amplitüd gözlemlenmektedir. Histolojik olarak deri, konjonktival, rektal ya da kas biyopsisinde aksonal şişme ve sferoid body formasyonu saptanmaktadır (125). Son zamanlarda moleküler genetik testlerinin uygulanabilir olması ile olguların çoğunda invasive biyopsi ihtiyacını ortadan kaldırmıştır.

Atipik nöroaksonal distrofi (NAD) 'çocukluk çağı başlangıçlı PLAN' olarak da adlandırılmaktadır. Atipik nöroaksonal distrofi INAD'a göre çok daha nadir olarak görülmekte ve olguların fenotipik bulguları heterojenite gösterdiğinden dolayı tanı konulmasında zorlanılmaktadır. 2011 yılında yayımlanan bir derlemede sadece 8 olgu tanımlandığı belirtilmiştir. Atipik nöroaksonal distrofili olgular INAD'a göre hastalığın başlangıç yaşları daha ileride (1 yaş 6 ay- 6 yaş 6 ay, ortalama yaş 4 yaş 3 ay) ve hastalığın ilerlemesi daha yavaş olmaktadır. Hafif yürüme bozukluğu (ataksi ve instabilite), dispraksi, konuşmada gerileme yaygın görülen erken bulgulardandır (120). Azalmış sosyal iletişim ve akranları ile etkileşimi bu fenotipin belirgin özelliklerindedir. Bu yüzden yanlışlıkla otizm tanısı alabilmektedirler. Zamanla INAD ile seyreden çocuklara benzer şekilde optik atrofi, nistagmus, tetraparezi, nöbetler gözlemlenebilmektedir. Bununla birlikte INAD'da gözlemlenen diğer bulgular (erken trunkal hipotoni ve şaşılık gibi) NAD'da bildirilmemiştir. Bu fenotip adölesan / yetişkin NBIA fenotipleri ile önemli fenotipik örtüşme göstermektedir. İlerleyen zamanlarında ekstrapiramidal bulgular (distoni, disartri) ve nöropsikiyatrik bozukluklar (emosyonel labilite, kompulsivite, hiperaktivite) hastalığın majör bulguları haline gelmektedir (120). Bizim olgumuzda da aynen literatürde belirtildiği gibi nöromotor gelişimi normal ilerlerken 17 aylık iken çömeldiği yerden kalkamama ve dengesini kaybederek düşmesi ile bulguları başlamıştır. İlerleyen dönemlerde tespit edilen bulguları ise ID, spastik diparezi, sadece 2-3 kelimelik cümleler kurabilmesi, pes ekinovarus ve distoniden oluşmaktadır.

NAD'da radyolojik olarak serebellar atrofi ve gliosis görülmesi bu grupta belirgin bir bulgu olabilmektedir. Beyinde globus pallidus ve substantia nigrayı içeren demir birikimi yaygın bir bulgudur (119, 120). Bizim olgumuzun kranial MR incelemesinde de bilateral serebellar atrofi görülmektedir.

NAD'ın nörolojik değerlendirilmesinde bazı çocuklarda EEG'de epilepsi ile uyumlu bulgular görülmesine rağmen, EEG'de hızlı ritim saptanması rapor edilmemiştir. VEP'de gecikmiş veya azalmış amplitüd olabilmektedir. EMG, sinir iletim

çalışmaları ve elektoretinogram normal olarak rapor edilmiştir. Doku biyopsisi yapılan bireylerde histopatolojik bulgular INAD ile benzer olarak bulunmaktadır.

Yetişkinlikte başlayan *PLA2G6* ilişkili distoni-parkinsonizm otozomal resesif distoni-parkinsonizmlı olguların küçük bir grubunu oluşturmaktadır (121). Bu güne kadar tarif edilen olguların hepsi akraba evliliği yapmış ebeveynlerin çocuğu olmakta ve hepsinde homozigot yanlış anlamalı *PLA2G6* mutasyonları saptanmıştır. Etkilenmiş bireyler normal bir gebelikten sonra doğarlar ve gelişme basamakları normal bir şekilde olmaktadır. Semptomlar geç adolesan / erken yetişkinlik döneminde (18-26 yaş) piramidal bulgularla ilişkili subakut distoni-parkinsonizm ile kendini göstermektedir. Göz hareketlerinde anormallikler gelişebilmektedir. Entelektüel fonksiyon, görsel bellek gibi bilişsel fonksiyonlarda hızlı bir gerileme olmaktadır. Kişilik değişiklikleri rapor edilmiştir. Serebellar semptomlar ve bulgular bu olgularda görülmemektedir. Bütün olgular L-dopa ya da dopamin agonistlere başlangıçta duyarlıdır. Radyolojik olarak bu olgularda spesifik değişiklikler çok azdır. MR'da spesifik olmayan hafif düzeyde yaygın hacim kaybı ya da beyaz cevherde sinyal artışı görülmektedir. Serebellar ve basal gangliada ilk görüntülemelerde herhangi bir anomali tespit edilmemiştir. Beyinde demir birikimi nadiren hastalığın ilerleyen dönemlerinde görülebilmektedir. EEG, EMG, sinir iletim çalışmaları ve deri biyopsisi bulguları normal olarak tespit edilmektedir (122).

Olgumuz değerlendirildiğinde semptomların başlama yaşı (17 aylık) ve klinik bulguların daha yavaş ilerlemesi (tetraparezi yerine diparazi olması, göz muayenesi normal olması, 12 yaşında olması gibi) nedeniyle *PLA2G6* ile ilişkili hastalıklar içerisinde atipik nöroaksonal distrofi alt grubuna girdiği düşünülmektedir. Olgumuzun ilerleyen zamanlarında ekstrapiramidal bulgular, nöropsikiyatrik bozukluklar, tetraparezi ve optik atrofi, nistagmus gibi göz bulguların gelişebilmesi açısından takip edilmesi planlanacaktır.

PLAN geri dönüşümsüz, ilerleyici bir hastalık olup günümüzde hastalığın tedavisi mevcut değildir. Ancak multidisipliner yaklaşımla bazı tedavi stratejileri bu olgularda uygulanmaktadır. Farmakolojik ajanlar gastro-özofageal reflü (anti-reflü ajanlar), aşırı salgı (glikopirolat), distoni / spastisite (triheksifenidil / baklofen) gibi semptomların giderilmesinde kullanılmaktadır (122). Kontraktürlerin tedavisi oldukça zor olmaktadır. Bazen botulinum toksini ve tendon uzatma gibi invaziv girişimler

gerekebilmektedir. TIRCON (Treat Iron Related Childhood Onset Neurodegeneration) tarafından deferipron gibi demir şelasyon tedavilerin potansiyel etkisini değerlendirdiğinde bu grup hastalarda yararlı olabileceği belirtilmiştir (123). *PLA2G6*'nin fonksiyonun ve yolaklardaki etkileşiminin tam olarak çözülmesi ile spesifik moleküler temelli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca olgumuz literatürde bahsedilen tedavi seçenekleri açısından değerlendirilip uygun tedavi yöntemleri önerilecektir.

Mutasyon saptanan 3. hastamız olan olgu 5'de tanımlanan mutasyon *AGTR2* geninin 1. ekzonunda yer alan hemizigot Tyr189X değişikliği idi. Bu değişiklik 567. nükleotidin sitozinden guanine yer değiştirmesi ile 189. pozisyondaki amino asit olan triptofan yerine dur kodonu geçmesine (p.Tyr189X) sebep olmaktadır. Bu değişiklik annede heterozigot, baba da normal olarak gösterilmiştir. Olgunun 1 yaşındaki erkek kardeşinde mutasyon bakılamamıştır. Ancak annesi tarafından nöromotor gelişiminin normal olduğu söylenmiştir. Veri tabanlarında yer almayan bu varyasyon modelleme programlarıyla değerlendirildiğinde proteinin erken sonlanmasına sebep olarak fonksiyonel olmayan bir protein oluşturmaktadır. Bu bulgularla değişikliğin patojenik bir mutasyon olduğu düşünülmüştür.

AGTR2 geni Xq22-q23 bölgesinde yer almakta olup, 3 ekzondan oluşmaktadır. *AGTR2* geni 363 aminoasitten oluşan protein kodlamaktadır. Bu protein G-protein coupled reseptör 1 ailesine ait gen tarafından kodlanmaktadır. Bu protein Anjiyotensin II'nin reseptörü olarak fonksiyon göstermektedir. Fetusda yüksek derece eksprese olan ancak beyin, adrenal medulla ve atreziye uğramış over haricinde yetişkin dokularda çok az eksprese olan integral membran proteindir. Bu reseptörün programlanmış hücre ölümünü aracılık ettiği gösterilmiştir ve bu apoptotik fonksiyonu gelişimsel biyoloji ve patofizyolojisinde önemli rol oynayabildiği düşünülmektedir (128, 129). *AGTR2* geninde meydana gelen mutasyonlar nsXLID'ye neden olmaktadır. Günümüze kadar çok az sayıda *AGTR2* geninde mutasyon bildirilmiştir.

AGTR2 geninde oluşan mutasyonların nsXLID'ye neden olduğu ilk defa Vervoort ve ark.'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada dengeli X;7 kromozomal translokasyon taşıyıcısı olan ID'li kadın olgu da *AGTR2* geninde ekspresyonun

bozulduğunu ve genin diğer kopyasının dengesiz X inaktivasyonu ile sessizleştiğini göstermişlerdir. Ek olarak ID'li 590 erkek olguyu taradıklarında *AGTR2* geninde 1 frameshift (395/402 delT) ve 3 yanlış anlamlı mutasyon (G21V, R324Q ve I337V) olmak üzere 8 mutasyon tanımlamışlardır (%1.4). *AGTR2* mutasyonları sonucu hastalarda nöbet, otistik belirtiler ve hafif ile ciddi ID arasında değişkenlik gösteren ID gibi bulgular belirtilmiştir (128). Mutasyon saptanan olguların bazılarında ise mikrosefali, optik atrofi ve kifoskolyoz gibi klinik bulgular da saptanmıştır. Daha sonra yapılan bir çalışmada Ylisaukko-oja ve ark.'ı tarafından Finlandiya'lı sendromik olmayan ID'li 57 erkek olguda *AGTR2* geninde mutasyon taraması yapılmış ve iki tane yanlış anlamlı mutasyon (G21V, I53F) tanımlanmıştır. Ancak başka çalışmalarda *AGTR2* genindeki G21V mutasyonunun ID'ye neden olmadığı belirtilmiştir. Belirtilen çalışmada diğer bir mutasyon olan I53F saptanan olgunun annesinin de bu mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir. Olgunun klinik bulguları değerlendirilince doğumda hipotonisite saptanmış olup 2 yaşında yürümeye başlamıştır. Hiperaktivitesi, agresif davranışları ve uyku problemleri belirtilmiştir. Olgunun hiç konuşmadığı ancak el işaretleri ile ihtiyaçlarını belirtebildiği ve basit konuşma dilini anladığı belirtilmiştir. Nöbetleri 6 yaşında başlamış ve ağır ID olarak tanımlanmıştır. Olgunun fizik muayenesinde arkası basık (düz) kafatası, kısa parmaklar, geniş ağız ve geniş aralıklı dişlerden oluşan hafif dismorfik özellikleri saptanmıştır. Anormal EEG bulguları olan olguya BT ya da MR uygulanmamış ancak 8 yaşında yapılan pneumoencephalography'de hafif dilate ventriküller saptanmıştır (129).

Takeshita ve ark.'ları tarafından ID'li 221 hastada (203 erkek;18 kadın) *AGTR2* geni taranmış ve 6 yaşında bir erkek olguda *AGTR2* geninde yanlış anlamlı mutasyon (G191E) tanımlanmıştır. Bu mutasyon olgunun sağlıklı annesinde de gösterilmiştir. Olguda gelişim basamakları 1 yaşa kadar normal olarak değerlendirilmiştir. 1 yaşında bazı kelimeleri söylemeye başlamış ancak anlamsız sözleri üst üste tekrarlama olduğu (ekolali) ve sonrasında konuşmasında ilerleme olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca göz temasından kaçınma, iletişim problemleri, hiperaktivite ve konsantrasyon yeteneği zayıf olarak belirtilmiştir. Yaygın gelişme geriliği ve ciddi ID mevcut olan olgunun ilave dismorfik ve nörolojik anomalisi belirtilmemiştir. Çekilen kranial MR'da herhangi bir

patoloji saptanılmamıştır. Ancak VEP ve AEP testlerinde görsel ve işitsel bozukluğun olabileceği düşünülmüştür. Olgunun 3 yaşında epilepsisi başlamıştır (130).

Bizim olgumuzun klinik bulgularına baktığımızda ise nöro-motor gelişim basamaklarında gecikme olup yürüyememekte, konuşamamakta ve katı besinleri çiğneyememektedir. Ayrıca ID, epileptik nöbet, otistik belirtiler (kendi kendine gülme ve bağırma atakları), hiperaktivite, göz temaslarından kaçınma gibi klinik bulgularıyla literatürdeki olgularla benzerlik göstermektedir. Olgumuzda ayrıca Kranial MR incelemesinde bilateral serebral ve serebellar ensefalomalazi ve atrofi saptanmıştır. Bu bulgu daha önce literatürdeki olgularda belirtilmemiştir.

AGTR2 geninde meydana gelen mutasyonların ID'ya sebep olması arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bazı çalışmalar *AGTR2* geninde saptanan mutasyonların polimorfizm olabileceğini göstermektedir. Çünkü bu yerdeğiştirme mutasyonları normal kohortlarda da saptanmıştır. Bu yüzden *AGTR2* de meydana gelen mutasyonların direk olarak ID'ye neden olamayacağı belirtilmektedir (131, 132). Bununla birlikte p. G191E mutasyonun patojenik olduğuna dair deliller mevcuttur. Bu mutasyonun düşük sıklıkta olması, kontrol popülasyonunda gözlenmemesi ve evrimsel süreçte korunmuş bir bölge de yer alması patojenik olduğunu gösteren deliller arasında sıralanabilir. Ayrıca mutasyonun yer aldığı domain *AGTR2* ligandının bağlandığı önemli bir bölgede yer almaktadır (133).

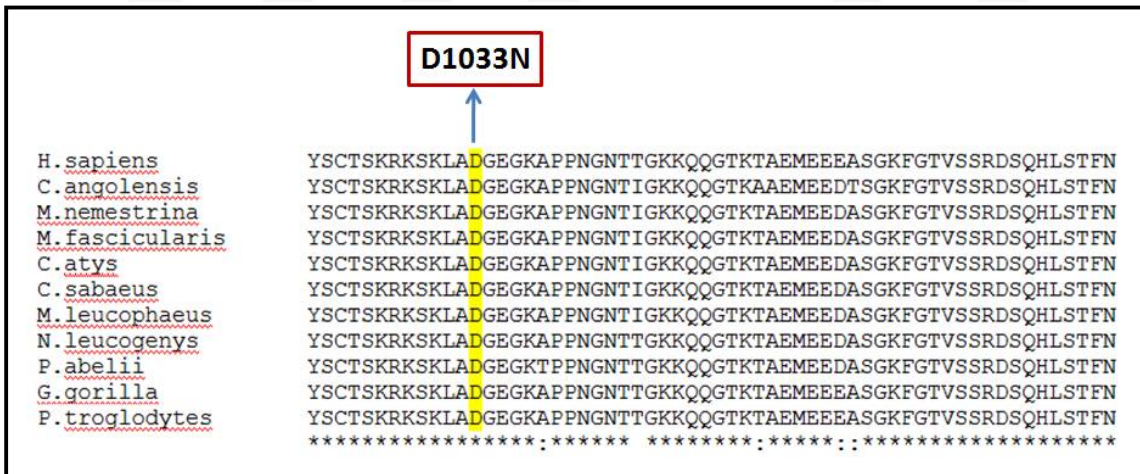
Sonuç olarak, *AGTR2* geninde oluşan mutasyonların patojenik rolünün aydınlatılmasında ilave fonksiyonel doğrulamalar gerekebilir. *AGTR2* geninde mutasyonlar nadir olmakla birlikte, bu gendeki mutasyonlar ID ile birlikte otistik davranışlar, epilepsi, hiperaktivite gibi bulguların sebebi olabilmesi açısından şüphelenilmelidir (130). Bizim çalışmamız *AGTR2* geninin insan beyninin gelişiminde ve bilişsel fonksiyonlardaki rolünün aydınlatılmasına bulduğumuz yeni mutasyon ve olgumuzun klinik bulgularıyla literatüre katkı sağlamaktadır. Ayrıca ID ile ilişkisi çok nadir olgularda tanımlanmış olan bu gende bulunan ilk anlamsız mutasyon olması ve bu mutasyonun olgumuzdaki klinik bulgularla literatürdeki olguların klinik bulguları karşılaştırıldığında olgumuzdaki klinik bulguların daha ağır seyretmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu da genotip-fenotip korelasyonu açısından yol gösterici olabilmektedir. Ayrıca literatürde belirtilen bazı olgularda optik atrofi tespit edildiğinden dolayı olgumuzun göz muayenesi planlanacaktır.

Olgumuzda ayrıca rastlantısal bulgu olarak *MSH2* geninde de değişiklik saptanmıştır. *MSH2* geni 3. ekzonunda homozigot 290'uncu pozisyonda yer alan timin nükleotidinin yerini sitozin nükleotidinin aldığı saptanmıştır. Bu değişiklik proteinin 97'nci amino asidi olan valin yerine alanin geçmesine (p.Val97Ala) sebep olmaktadır. Bu değişiklik anne-babada heterozigot olarak gösterilmiştir. Bu değişiklik veri tabanlarında yer almamakla birlikte aynı noktada nükleotid değişiklikleri bildirilmiştir. Bildirilen değişiklikler rs63750214 numarası ile veritabanlarında geçmektedir. Aynı noktada yer alan c.290T>A değişikliği (p.Val97Asp) patojenik olarak bildirilirken, bir diğer değişiklik c.290T>G (p.Val97Gly) önemi bilinmeyen varyasyon olarak bildirilmiştir. Bizim olgumuzda bulduğumuz değişiklik, hem daha önce aynı noktada bir mutasyon bildirilmiş olması hem de modelleme programı sonuçlarında hastalık yapıcı olarak geçmesi nedeniyle patojenik bir mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

MSH2 geni 2. kromozomun kısa kolunun 21 bölgesinde tanımlanmıştır. *MSH2* ilk tanımlanan MMR (mismatch repair) genidir. *MSH2*, 16 ekzonlu ve 934 aminoasit kodlayan bir genidir. Bugüne kadar veritabanlarında 337 missense/nonsense, 217 büyük delesyon, 204 küçük delesyon, 107 splicing, 101 küçük insersiyon, 26 büyük insersiyon 18 küçük indel, 10 kompleks ve 2 düzenleyici olmak üzere 1022 tane mutasyon tanımlanmıştır. MMR genlerindeki monoallelik germline mutasyonları özellikle kolorektal ve endometriyum kanserlerinin görülme riskinin arttığı otozomal dominant kalıtım gösteren Lynch sendromuna (herediter nonpolipozis kolorektal kanser) sebep olmaktadır. MMR genlerindeki biallelik germline mutasyonlar ise erken çocukluk döneminde hematolojik malignitelere, beyin tümörlerine, gastrointestinal sistem tümörlerine yatkınlığa ve Nörofibromatozis tip 1 bulgularına neden olmaktadır (134). Olgumuzun soygeçmişi daha ayrıntılı sorgulandığında babasının dayısının ve amcasının oğlunun beyin ca nedeniyle ex olduğu öğrenildi.

Olgumuz ve ailesi bu gen açısından ayrıca taranıp olası kanser gelişimleri açısından gerekli yönlendirmeleri yapılacaktır. Ayrıca hem *AGTR2* hem de *MSH2* geninde mutasyon saptadığımız olgu literatürde ilk defa bu iki genin birlikteliği açısından da önem taşımaktadır.

Mutasyon saptanan 4. hastamız olan olgu 8’de tanımlanan mutasyon *FRMPD4* geninin 16. ekzonunda yer alan hemizigot p.Asp1033Asn değişikliği idi. Bu değişiklik 3097. nükleotidin guaninden adenine yer değiştirmesi ile 1033. pozisyondaki amino asit olan aspartat yerine asparajin geçmesine sebep olmaktadır. Bu değişiklik annede ve sağlıklı kız kardeşinde heterozigot, baba da normal olarak gösterilmiştir. Bu varyasyon 1000 Genomes Project ve NHLBI Exome Sequencing Project (ESP6500, Exome Variant Server) veritabanlarında mevcut değildir. ExAC Browser veritabanında ise allel frekansı 0.00006845 olarak verilmiştir. Mutasyonun etkisini değerlendirmek için yaptığımız analizlerde bu amino asidin evrimsel süreçte iyi korunmuş olduğu (Şekil 30) ve modelleme programı sonuçlarında hastalık yapıcı olarak belirlenmiş olduğundan bu değişikliğin patojenik bir mutasyon olduğu düşünülmüştür. Mutasyonun klinik etkinliğinin gösterilebilmesi için fonksiyonel çalışmalar gereklidir.



Şekil 30. Farklı türlerde *FRMPD4* geni amino asit dizilimi (1033. pozisyonda aspartat)

FRMPD4 geni 17 ekzondan oluşmaktadır ve Xp22.2 bölgesinde yer alır. *FRMPD4* geni 1322 aminoasitten oluşan ve birden çok domaini (WW, PDZ, FERM) içeren protein kodlar. *FRMPD4* proteini PSD95 ve ARHGEF7 gibi diğer proteinlerle

etkileşimi sayesinde omurgadaki dendritik hücrelerin yoğunluğunun ve morfogenezinin düzenlenmesinde rol alır ve eksitator sinaptik iletimin sürdürülmesinde gereklidir (8).

Shoza Honda ve arkadaşları tarafından 2010 yılında ID'li bireylerin olduğu 144 olguya X kromozomu üzerindeki CNV'leri saptamak amacıyla aCGH yapılmıştır. Hafif ID ve otizm bulguları olan erkek bir hastada *FRMPD4* geninin bir kısmını içeren Xp22.2 bölgesinde bir duplikasyon saptanmıştır. Daha sonrasında bu değişikliğin hasta çocuğun annesinin taşıdığı ve sağlıklı kızkardeşinin ise taşımadığı gösterilmiştir. Ayrıca taşıyıcı annenin rastgele bir X inaktivasyon paterni gösterdiği saptanmıştır. Bu değişikliği yeni tanımlanan patojenik CNV'ler kategorize koymuşlardır (135).

H Hu ve arkadaşları tarafından nedeni açıklanamamış XLID'li 405 aile araştırılmıştır. X kromozomunda yer alan bütün ekzonlar indeks erkek olgularda massive paralel dizileme ile araştırılmıştır. Bu erkek hastaların çoğunluğu CNV açısından ve bilinen XLID genleri açısından önceden testleri yapıp mutasyon bulunmayan olgulardan oluşturulmuştur. Toplamda X kromozomu üzerindeki 745 gen taranmış olan bu çalışmada klinik bulgularıyla ilişkili varyasyonların segregasyon analizi sonucu 80 ailede (% 20) patojenik varyant ortaya çıkarılmıştır. 19 ailede, yeni ve doğrulanmış 7 XLID geninde (*CLCN4*, *CNKSR2*, *FRMPD4*, *KLHL15*, *LAS1L*, *RLIM* ve *USP27X*) zarar verici yanlış anlamlı ve protein yapısını bozan varyantlar ile yeni aday 2 XLID geninde (*CDK16* ve *TAF1*) hasar verici varyantlar tespit edilmiştir. 2015 yılında yayınlanan bu çalışmada şuna kadar ID ile ilişkili varyant saptanmayan *FRMPD4* geninde ilk kez mutasyon saptanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen varyantlardan biri aynı ailede 5 etkilenmiş erkek bireyde protein yapısını bozan bir mutasyon (p.Cys618Valfs*8)'dur. Bu olguların klinik bulguları hafif-ciddi düzeyde ID, değişken nöbetler, konuşmanın yetersiz ya da zayıf olması ve davranışsal problemler olarak belirtilmiştir. *FRMPD4* geninde saptanan bir diğer varyant ise 17 yaşındaki farklı bir erkek bireyde de-novo yanlış anlamlı p.Cys553Arg mutasyonudur. Bu olgunun klinik bulguları ise önemli derecede gelişme geriliği, konuşma yokluğu ve otizm spektrum bozukluğudur (8).

Bizim olgumuz da gelişme geriliği, ID, nöbet geçirme ve davranışsal problemler gibi klinik bulgular ile literatürde belirtilen olgularla örtüşmektedir. Olgumuzda ayrıca

mikrosefali, sol gözde lateral deviasyon (20°), her iki alt ekstremite kaslarında atrofi ve spastikte, osteoporoz, ciddi rotoskolyoz ve bilateral konjenital kalça çıkığı mevcuttur. Kranial MR'da asimetrik görünümde kranium, mikrosefali sağ hemikranium, sağ serebral hemisferde beyaz cevherde kronik iskemik değişikliklere sekonder gliosis alanları saptanmıştır. Bu bulgular açısından yayınlanan olgulara ek olarak hastalığın klinik bulgu spektrumu bu çalışma ile genişletilmiş olabilmekte olup ya da olguda tespit edilemeyen bir gende meydana gelen mutasyon olgumuzun klinik bulgularını ağırlaştırmış da olabilmektedir.



ID ve/veya MCA'lı 4 olguda mutasyon saptanamamıştır. Bu durumu açıklayabilecek sebepler;

- WES'de filtreleme yapılırken okuma sayısı az alan (düşük kalitede) varyantların çıkartılması sonucu olası varyantın elenmesi
- WES yapılmadan önce olgulara array-CGH yapılmamış olması. Nedeni açıklanamamış MR/MCA'lı olgularda array-CGH olguların yaklaşık %16,7'sinde CNV (Copy Number Variants) saptanmaktadır.
- WES ile genomun sadece protein kodlayan bölgeleri (%1.5) hedef alınmaktadır. Geriye kalan intronik ve genin dışındaki düzenleyici bölgeler değerlendirilememiştir.
- Olası epigenetik mekanizmalar da tanı konulamayan olguların etiolojisinde yer alabilmektedir.

Bu çalışma, Türkiye’de tanısı konulamamış ID ve/veya multipl konjenital anomalisi olan olguların tüm ekzom dizileme ile etiyolojilerini aydınlatmaya yönelik yapılmış ilk çalışmadır. Bu çalışma ile mutasyonu belirlenmiş %50 olguda hastalığın kesin tanısı konmuş, hastalıkla ilişkili komplikasyonların erken dönemde tespit edilebilmesi, uygun tedavi seçenekleri belirlenebilmesi ve ailelerinde sonraki kuşaklarda hastalığın ortaya çıkmasının önüne geçilebilmesi açısından gerekli genetik danışma verilebilmesi sağlanmıştır. Ayrıca çalışma sonucunda olguların moleküler genetik etiyolojinin aydınlatılması, hastalıkla ilişkili genlerdeki yeni mutasyonların belirlenmesi ve fenotip-genotip ilişkisinin ortaya konmasına yardımcı olmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



6. Sonuç

Bu çalışmada tanısı konulamamış ID ve/veya multipl konjenital anomalisi olan 8 olgunun tüm ekzom dizileme ile genetik analizi yapılmıştır. Çalışmada 3 tanesi X'e bağlı kalıtım paterni, 1 tanesi otozomal resesif kalıtım paterni gösteren toplamda 4 olguda (%50) tanı konulmuştur. Tanı konulan olgularda saptanan mutasyonların hepsi ilk defa çalışmamızda saptanmış olup bunu çok nadir görülen ve günümüze kadar bu genlerde çok az mutasyon tespit edilmiş olmasına bağlanmıştır. Ayrıca rastlantısal olarak 2 olgu ve ebeveynlerinde ACMG tarafından bildirilmesi önerilen genlerde mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar da ilk defa çalışmamızda saptanmıştır. Bu çalışma ile olgularda ve ebeveynlerinde ileride çıkabilecek olası maligniteler için erken tanı imkanı sağlanmıştır. Böylece hem olguların kesin tanısı konulmuş ve moleküler genetik etiyolojisi belirlenmiş hem de dünya literatürüne 6 yeni mutasyon kazandırılmıştır.

Sonuç olarak, hastaların altta yatan genetik etiyolojisi aydınlatılmış olup hastalara etkin bir genetik danışma seçeneği sunulabilmiştir. Bu sayede uygun tedavi seçenekleri belirlenebilecek, hastalıkla ilişkili komplikasyonlar erken dönemde tespit edilebilecek ve tekrarlama riski ile sonraki gebelikler hakkında aileler bilgilendirilebilecektir.

7. Kaynaklar

1. Salvador-Carulla L, Reed GM, Vaez-Azizi LM et al. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability" in ICD-11. *World Psychiatry* 2011; 10: 175-180.
2. Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med* 2013; 64: 441-450.
3. Shea SE. Intellectual disability (mental retardation). *Pediatr Rev* 2012; 33: 110-121; quiz 120-111.
4. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 117-134.
5. Strømme P. Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42: 76-86.
6. van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 81-104.
7. Rauch A, Hoyer J, Guth S et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 2063-2074.
8. Hu H, Haas SA, Chelly J et al. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 133-148.

9. Lundvall M, Rajaei S, Erlandson A et al. Aetiology of severe mental retardation and further genetic analysis by high-resolution microarray in a population-based series of 6- to 17-year-old children. *Acta Paediatr* 2012; 101: 85-91.
10. Bauters M, Van Esch H, Marynen P et al. X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet* 2005; 48: 263-275.
11. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD et al. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil* 2011; 32: 419-436.
12. Patel DR, Greydanus DE, Calles JL et al. Developmental disabilities across the lifespan. *Dis Mon* 2010; 56: 304-397.
13. Chelly J, Khelifaoui M, Francis F et al. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 701-713.
14. Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J et al. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 422-434.
15. Moog U. The outcome of diagnostic studies on the etiology of mental retardation: considerations on the classification of the causes. *Am J Med Genet A* 2005; 137: 228-231.
16. Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM et al. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet A* 2007; 143A: 1850-1857.
17. Ledbetter DH, Martin CL. Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 327-334.
18. Embleton ND, Wyllie JP, Wright MJ et al. Natural history of trisomy 18. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996; 75: F38-41.
19. Wyllie JP, Wright MJ, Burn J et al. Natural history of trisomy 13. *Arch Dis Child* 1994; 71: 343-345.
20. Rovet J, Netley C, Keenan M et al. The psychoeducational profile of boys with Klinefelter syndrome. *J Learn Disabil* 1996; 29: 180-196.
21. Carvill GL, Mefford HC. Microdeletion syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23: 232-239.
22. Sharkey FH, Maher E, FitzPatrick DR. Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child* 2005; 90: 1264-1269.
23. Zahir F, Friedman JM. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clin Genet* 2007; 72: 271-287.
24. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011; 43: 838-846.
25. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012; 367: 1921-1929.
26. Rauch A, Wiczorek D, Graf E et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 2012; 380: 1674-1682.
27. Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M et al. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *J Med Genet* 2006; 43: 203-210.
28. Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ et al. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 2004; 63: 1927-1931.
29. Molinari F, Rio M, Meskenaitė V et al. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 2002; 298: 1779-1781.
30. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010; 11: 161-187.
31. Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 46-57.
32. Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M et al. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet* 2007; 121: 43-48.

33. Motazacker MM, Rost BR, Hucho T et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 792-798.
34. Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H et al. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1158-1164.
35. Mir A, Kaufman L, Noor A et al. Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 909-915.
36. Hu H, Eggers K, Chen W et al. ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 407-414.
37. Pak C, Garshasbi M, Kahrizi K et al. Mutation of the conserved polyadenosine RNA binding protein, ZC3H14/dNab2, impairs neural function in Drosophila and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 12390-12395.
38. Çalışkan M, Chong JX, Uricchio L et al. Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 1285-1289.
39. Ropers F, Derivery E, Hu H et al. Identification of a novel candidate gene for non-syndromic autosomal recessive intellectual disability: the WASH complex member SWIP. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 2585-2590.
40. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 2011; 478: 57-63.
41. Iqbal Z, van Bokhoven H. Identifying genes responsible for intellectual disability in consanguineous families. *Hum Hered* 2014; 77: 150-160.
42. Mandel JL, Chelly J. Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 689-693.
43. Coffee B, Keith K, Albizua I et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 503-514.
44. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66: 817-822.
45. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-1058.
46. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.
47. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 454-464.
48. Merenstein SA, Sobesky WE, Taylor AK et al. Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. *Am J Med Genet* 1996; 64: 388-394.
49. Engbers HM, Berger R, van Hasselt P et al. Yield of additional metabolic studies in neurodevelopmental disorders. *Ann Neurol* 2008; 64: 212-217.
50. Corsello G, Giuffrè M. Congenital malformations. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25 Suppl 1: 25-29.
51. Gijsbers AC, Lew JY, Bosch CA et al. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 1394-1402.
52. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 606-616.
53. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.

54. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 335-345.
55. Menten B, Maas N, Thienpont B et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 2006; 43: 625-633.
56. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006; 43: 180-186.
57. Fan YS, Jayakar P, Zhu H et al. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* 2007; 28: 1124-1132.
58. Kirov G, Gumus D, Chen W et al. Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 458-465.
59. Altug-Teber O, Dufke A, Poths S et al. A rapid microarray based whole genome analysis for detection of uniparental disomy. *Hum Mutat* 2005; 26: 153-159.
60. Friedman JM, Baross A, Delaney AD et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 500-513.
61. Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J et al. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet* 2009; 46: 123-131.
62. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-454.
63. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-5467.
64. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 560-564.
65. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-945.
66. Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-380.
67. Xuan J, Yu Y, Qing T et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013; 340: 284-295.
68. Gilles A, Megléc E, Pech N et al. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* 2011; 12: 245.
69. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 434-439.
70. Wommack KE, Bhavsar J, Ravel J. Metagenomics: read length matters. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1453-1463.
71. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008; 456: 53-59.
72. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31-46.
73. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014; 30: 418-426.
74. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 2005; 309: 1728-1732.
75. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 228-237.

76. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E et al. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 2011; 48: 580-589.
77. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K et al. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 2012; 57: 621-632.
78. Marian AJ. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res* 2012; 159: 64-79.
79. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI et al. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 7-24.
80. Tennessen JA, O'Connor TD, Bamshad MJ et al. The promise and limitations of population exomics for human evolution studies. *Genome Biol* 2011; 12: 127.
81. Huyghe JR, Jackson AU, Fogarty MP et al. Exome array analysis identifies new loci and low-frequency variants influencing insulin processing and secretion. *Nat Genet* 2013; 45: 197-201.
82. Yan XJ, Xu J, Gu ZH et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 43: 309-315.
83. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006-1014.
84. Liu P, Morrison C, Wang L et al. Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1270-1276.
85. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; 7: 575-576.
86. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7: 248-249.
87. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3812-3814.
88. Wang JL, Yang X, Xia K et al. TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain* 2010; 133: 3510-3518.
89. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2220-2227.
90. Stenson PD, Ball EV, Mort M et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003; 21: 577-581.
91. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010; 68: 857-864.
92. O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* 2011; 43: 585-589.
93. Roach JC, Glusman G, Smit AF et al. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. *Science* 2010; 328: 636-639.
94. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 961-968.
95. Cooper DN, Chen JM, Ball EV et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat* 2010; 31: 631-655.
96. Hoischen A, van Bon BW, Gilissen C et al. De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet* 2010; 42: 483-485.
97. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 2012; 485: 237-241.
98. Iossifov I, Ronemus M, Levy D et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 2012; 74: 285-299.
99. Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 2010; 42: 1109-1112.
100. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat* 2011; 32: 358-368.

101. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 2010; 42: 30-35.
102. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 308-311.
103. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467: 1061-1073.
104. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010; 467: 52-58.
105. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 745-755.
106. Pelak K, Shianna KV, Ge D et al. The characterization of twenty sequenced human genomes. *PLoS Genet* 2010; 6: e1001111.
107. Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S et al. XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 572-579.
108. Robinson PN, Krawitz P, Mundlos S. Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clin Genet* 2011; 80: 127-132.
109. Ng SB, Turner EH, Robertson PD et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009; 461: 272-276.
110. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405-424.
111. (CDC) CfDCaP. Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53: 57-59.
112. Yang Y, Muzny DM, Reid JG et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013; 369: 1502-1511.
113. Need AC, Shashi V, Hitomi Y et al. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 2012; 49: 353-361.
114. Shoubridge C, Tarpey PS, Abidi F et al. Mutations in the guanine nucleotide exchange factor gene IQSEC2 cause nonsyndromic intellectual disability. *Nat Genet* 2010; 42: 486-488.
115. Tran Mau-Them F, Willems M, Albrecht B et al. Expanding the phenotype of IQSEC2 mutations: truncating mutations in severe intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 289-292.
116. Suthers GK, Turner G, Mulley JC. A non-syndromal form of X-linked mental retardation (XLMR) is linked to DXS14. *Am J Med Genet* 1988; 30: 485-491.
117. Gandomi SK, Farwell Gonzalez KD, Parra M et al. Diagnostic exome sequencing identifies two novel IQSEC2 mutations associated with X-linked intellectual disability with seizures: implications for genetic counseling and clinical diagnosis. *J Genet Couns* 2014; 23: 289-298.
118. ten Broeke SW, Brohet RM, Tops CM et al. Lynch syndrome caused by germline PMS2 mutations: delineating the cancer risk. *J Clin Oncol* 2015; 33: 319-325.
119. Gregory A, Westaway SK, Holm IE et al. Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2). *Neurology* 2008; 71: 1402-1409.
120. Gregory A, Polster BJ, Hayflick SJ. Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation. *J Med Genet* 2009; 46: 73-80.
121. Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009; 65: 19-23.
122. Kurian MA, McNeill A, Lin JP et al. Childhood disorders of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Dev Med Child Neurol* 2011; 53: 394-404.

123. Illingworth MA, Meyer E, Chong WK et al. PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN): further expansion of the clinical, radiological and mutation spectrum associated with infantile and atypical childhood-onset disease. *Mol Genet Metab* 2014; 112: 183-189.
124. Crompton D, Rehal PK, MacPherson L et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis is an effective tool for the detection of novel intragenic PLA2G6 mutations: implications for molecular diagnosis. *Mol Genet Metab* 2010; 100: 207-212.
125. Kurian MA, Morgan NV, MacPherson L et al. Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN). *Neurology* 2008; 70: 1623-1629.
126. Wu Y, Jiang Y, Gao Z et al. Clinical study and PLA2G6 mutation screening analysis in Chinese patients with infantile neuroaxonal dystrophy. *Eur J Neurol* 2009; 16: 240-245.
127. Carrilho I, Santos M, Guimarães A et al. Infantile neuroaxonal dystrophy: what's most important for the diagnosis? *Eur J Paediatr Neurol* 2008; 12: 491-500.
128. Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS et al. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 2002; 296: 2401-2403.
129. Ylisaukko-oja T, Rehnström K, Vanhala R et al. Identification of two AGTR2 mutations in male patients with non-syndromic mental retardation. *Hum Genet* 2004; 114: 211-213.
130. Takeshita E, Nakagawa E, Nakatani K et al. Novel AGTR2 missense mutation in a Japanese boy with severe mental retardation, pervasive developmental disorder, and epilepsy. *Brain Dev* 2012; 34: 776-779.
131. Erdmann J, Dähmlow S, Guse M et al. The assertion that a G21V mutation in AGTR2 causes mental retardation is not supported by other studies. *Hum Genet* 2004; 114: 396; author reply 397.
132. Huang D, Sun W, Strom CM. Sequence variations in AGTR2 are unlikely to be associated with X-linked mental retardation. *Am J Med Genet A* 2005; 139: 243-244.
133. Kurfis J, Knowle D, Pulakat L. Role of Arg182 in the second extracellular loop of angiotensin II receptor AT2 in ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 816-819.
134. Woo HI, Woo YM, Kim S et al. Challenges in assessing pathogenicity based on frequency of variants in mismatch repair genes: an extreme case of a MSH2 variant and a meta-analysis. *Gene* 2014; 546: 421-424.
135. Honda S, Hayashi S, Imoto I et al. Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet* 2010; 55: 590-599.