



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOİSTATİSTİK ve TIP BİLİŞİMİ ANABİLİM DALI

**EPİLEPSİDE KOPYA SAYISI
VARYASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Ezgi ÖZYURT

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Alper Han ÇEBİ

TRABZON-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOİSTATİSTİK ve TIP BİLİŞİMİ ANABİLİM DALI

**EPİLEPSİDE KOPYA SAYISI
VARYASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Ezgi ÖZYURT

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Alper Han ÇEBİ

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ezgi ÖZYURT

İthaf

Bu çalışmayı, bana her zaman “Sen yaparsın” diyerek inancını hiç kaybetmeyen, hayatım boyunca en büyük destekçim olan, öğretmenlik mesleğine adanmış ömrüyle bana ilham veren sevgili babam Mehmet Ali ÖZYURT’un aziz hatırasına ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında emeği geçen ve bana farklı şekillerde destek olan herkese teşekkür etmek isterim. Öncelikle, YÖK 100/2000 Doktora Projesi kapsamında Biyoinformatik/Biyoistatistik tematik alanında sağladığı burs için YÖK’e teşekkür ederim. Bu tez çalışması aynı zamanda TÜBİTAK 1002-A Hızlı Destek Programı (Proje no: 123S381) kapsamında desteklendi. Desteğinden dolayı TÜBİTAK’a teşekkür ederim. Akademik bilgi birikimi, rehberliği ve sabrıyla bu çalışmanın her aşamasında yolumu aydınlatan değerli danışmanım Doç. Dr. Alper Han ÇEBİ’ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Araştırma sürecinde bilimsel desteğini ve yönlendirmelerini esirgemeyen, sorularımı sabırla yanıtlayan ve kıymetli görüşlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Ali CANSU, Doç. Dr. Ayberk TÜRKYILMAZ ve Uzm. Dr. Pınar ÖZKAN KART’a teşekkür ederim. Biyoenformatik analiz aşamalarında bilgi ve desteğini esirgemeyen Dr. Oğuzhan KALYON’a katkılarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sabır ve içtenliğiyle desteğini sunan Doç. Dr. Şükrü ÖNALAN’a şükranlarımı sunarım. Yalnızca akademik rehberliğiyle değil, aynı zamanda bu zorlu süreçte gösterdiği anlayış, destek ve moral ile yanımda olan ve bu süreci dayanılır kılan Prof. Dr. Kemal TURHAN’a ve değerli kuzenim Doç. Dr. Özlem ERGÜL ERKEÇ’e gönülden teşekkür ederim. Doktora tez dönemim boyunca beni sabırla dinleyen ve motivasyonumu en yüksek seviyede tutan arkadaşlarım Cihan AKGÖL ve Duygu ARICAN ÜSTEL’e teşekkür ederim. Hayatım boyunca yanımda olan ve bana her zaman inanan anneme ve kardeşime sonsuz teşekkür borçluyum.

Ezgi ÖZYURT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epilepsi ve Nöbet	4
2.2. Epilepsi Sınıflandırması	4
2.3. Epilepsi Etiyolojisi	5
2.3.1. Yapısal Nedenler	5
2.3.2. Enfeksiyöz Nedenler	6
2.3.3. Metabolik Nedenler	6
2.3.4. İmmun Nedenler	6
2.3.5. Bilinmeyen Nedenler	7
2.3.6. Genetik Nedenler	7
2.4. Epilepsi Etiyolojisinde Kopya Sayısı Varyasyonları	8
2.4.1. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Tanımı	8
2.4.2. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler	8
2.4.3. NGS Verilerine Dayalı CNV Analiz Yaklaşımları	11
2.4.4. Epilepsi Patogenezinde Kopya Sayısı Varyasyonlarının Etkisi	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. Tüm Ekzom Dizileme Verilerinin Biyoenformatik Analiz İçin Hazırlanması	15

3.2. Kopya Sayısı Varyasyonu Tespiti	16
3.2.1. Okuma Derinliğinin Hesaplanması	16
3.2.2. Okuma Derinliğinin Normalizasyonu	16
3.2.3. Segmentasyon	17
3.2.4. Kopya Sayısı Durumu ve B-Alel Frekansı Analizi	17
3.2.5. Filtreleme ve Görselleştirme	18
3.3. Varyantların Anotasyonu ve Patojenite Değerlendirmesi	18
3.4. Varyantların Validasyonu	19
3.4.1. DNA İzolasyonu	20
3.4.2. Primer Tasarımı	20
3.4.3. PCR Protokolü	21
3.4.4. Jel Elektforezi	22
3.4.5. qPCR Prosedürü	22
3.5. İstatistik Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri	24
4.2. Hastalara Ait CNV'lere İlişkin Biyoenformatik ve Moleküler Bulgular	26
4.2.1. Biyoenformatik Analiz Sonuçları ve Moleküler Doğrulama İçin Ön Değerlendirme	26
4.2.2. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Moleküler Doğrulama Sonuçları	30
4.3. İstatistik Analiz Sonuçları	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR	62
EKLER	74
EK 1. Etik Kurul Onayı	75
EK 2. Proje Raporu Kabul Yazısı	78
ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Epilepsiyle ilişkili majör kromozom bölgeleri	14
Tablo 2.	PCR bileşenleri ve kullanılan miktarlar	21
Tablo 3.	qPCR bileşenleri ve kullanılan miktarlar	23
Tablo 4.	CNVRobot aracılığıyla tespit edilen epilepsi ile ilişkili CNV'lerin genomik özellikleri ve doğrulama sonuçları.	28
Tablo 5.	Analiz edilecek genler için primer bilgileri ve PCR ürün özellikleri	29
Tablo 6.	CNV'lerin klinik anlamlılığı	46
Tablo 7.	CNVRobot aracının doğrulama testlerine göre tanı performansı	47
Tablo 8.	Tanı koydurucu CNV varlığı ile nörogelişimsel gecikme arasındaki ilişki (Fisher's Exact Test)	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	ILAE 2017 epilepsi sınıflandırmasının şematik gösterimi	5
Şekil 2.	Epilepsi ile ilişkili CNV'lerin tespiti ve analizine yönelik uygulanan biyoinformatik iş akışı	19
Şekil 3.	Hastaların yaşlarının cinsiyetlerine göre dağılımı	24
Şekil 4.	Nöbet tiplerinin dağılımı	25
Şekil 5.	Epileptik sendromlar ve eşlik eden sendromların frekansları	26
Şekil 6.	Çalışmanın akış şeması ve tespit edilen CNV'lerin dağılımı	27
Şekil 7.	CNVRobot aracı ile tespit edilen SYNJ1 genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması	31
Şekil 8.	SYNJ1 proteininin fonksiyonel yapısı ve tespit edilen CNV'nin etkilediği bölge	31
Şekil 9.	CNVRobot aracı ile tespit edilen RBFOX1 genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması	32
Şekil 10.	CNVRobot aracı ile tespit edilen SCN2A genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması	33
Şekil 11.	CNVRobot aracı ile tespit edilen 17p13.3 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonunun FISH ile doğrulanması	35
Şekil 12.	CNVRobot aracı ile tespit edilen ERMARD genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması	36
Şekil 13.	ERMARD genindeki kopya sayısı kaybının protein düzeyindeki etkisi	36
Şekil 14.	CNVRobot aracı ile tespit edilen 22q11.21 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonunun FISH ile doğrulanması	38
Şekil 15.	CNVRobot aracı ile tespit edilen 17p13.3 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonunun FISH ile doğrulanması	39
Şekil 16.	CNVRobot aracı ile tespit edilen 9p duplikasyonunun SNP-array ile doğrulanması	41
Şekil 17.	CNVRobot aracı ile tespit edilen TCF4 genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması	43

Şekil 18. TCF4 proteininin fonksiyonel yapısı ve tespit edilen CNV'nin etkilediği bölge	43
Şekil 19. CNVRobot aracı ile tespit edilen 15q13.2-q13.3 bölgesindeki delesyonun SNP-array ile doğrulanması	45
Şekil 20. 15q13.2–q13.3 bölgesinde saptanan 1.48 Mb'lık heterozigot delesyonun şematik gösterimi	46
Şekil 21. CNV büyüklüklerinin varyant sınıflarına göre dağılımı	47
Şekil 22. Genetik tanı verimi	49



RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. qPCR öncesi primer özgüllüğü değerlendirmesi için gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	29



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

aCGH	Array Based Comparative Genomic Hybridization Dizi Tabanlı Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CAE	Childhood Absence Epilepsy – Çocukluk Çağı Absans Epilepsisi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
CNV	Copy Number Variation – Kopya Sayısı Varyasyonları
COVE	Childhood-Onset Visual Epilepsy – Çocukluk Başlangıçlı Görsel Epilepsi
DEEs	Developmental and Epileptic Encephalopathies – Gelişimsel ve Epileptik Ensefalopatiler
EE-SWAS	Epileptic Encephalopathy with Spike-Wave Activation in Sleep – Uykuda Diken-Dalga Aktivasyonu ile Seyreden Epileptik Ensefalopati
EIEE	Early Infantile Epileptic Encephalopathy – Erken Bebeklik Başlangıçlı Epileptik Ensefalopati
EMA	Epilepsy with Myoclonic Absences – Miyoklonik Absans Nöbetlerle Seyreden Epilepsi
EMAtS	Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures – Miyoklonik-Atonik Nöbetlerle Seyreden Epilepsi
FIRES	Febrile Infection-Related Epilepsy Syndrome – Ateşe Bağlı Epileptik Ensefalopati
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
GTCA	Generalized Tonic-Clonic Seizures Alone – Yalnızca Jeneralize Tonik-Klonik Nöbetlerle Seyreden Epilepsi
IESS	Infantile Epileptic Spasms Syndrome – Bebeklik Spazm Sendromu
JAE	Juvenile Absence Epilepsy – Juvenil Absans Epilepsisi
JME	Juvenile Myoclonic Epilepsy – Juvenil Miyoklonik Epilepsi

kb	Kilobase – Kilobaz
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
mb	Megabase – Megabaz
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – Çoklu Bağlanma-Tabanlı Prob Amplifikasyonu
NGS	Next Generation Sequencing – Yeni Nesil Dizileme
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction – Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SeLEAS	Self-Limited Epilepsy with Autonomic Seizures – Otonom Belirtilerle Seyreden Kendi Kendini Sınırlayan Epilepsi
SeLECTS	Self-Limited Epilepsy with Centrotemporal Spikes – Santral-Temporal Dikenlerle Seyreden Kendi Kendini Sınırlayan Epilepsi
SeLFEs	Self-Limited Focal Epilepsies – Kendi Kendini Sınırlayan Fokal Epilepsiler
SNP-array	Single Nucleotide Polymorphism array – Tek nükleotit polimorfizm array
UTR	Untranslated region – Çevrilmeyen bölge
vb.	Ve Benzeri
WES	Whole Exome Sequencing – Tüm Ekzom Dizileme
WGS	Whole Genome Sequencing – Tüm Genom Dizileme

ÖZET

Epilepside Kopya Sayısı Varyasyonlarının Araştırılması

Epilepsi, bir nöron grubunda ortaya çıkan anormal, aşırı ve eşzamanlı elektriksel deşarjlara bağlı yineleyici nöbetlerle seyreden yaygın bir nörolojik bozukluk olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde 50 milyondan fazla kişiyi etkilediği ve prevalansının her 1000 kişide yaklaşık 7.6 olgu olduğu bildirildi. Epilepsi genetik, yapısal, enfeksiyöz, metabolik, immün ve bilinmeyen nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmakla birlikte, olguların %40–60'ının genetik kökenli olduğu gösterildi. Mevcut çalışmalar, epileptogenezde doğrudan rol oynadığı değerlendirilen yaklaşık 300 gende insersiyon/delesyon (indel) ve tek nükleotit varyantlarının (SNV) tanımlandığını; ayrıca nörogelişimsel süreçlerle ilişkili 500'den fazla epilepsi geninin rapor edildiğini göstermektedir. Buna ek olarak, kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) epileptogenezde anlamlı bir rol üstlendiği gösterildi ve farklı epilepsi tiplerinde CNV sıklığının %5 ile %12 arasında seyrettiği bildirildi. Bu çalışmada, kısa varyant analizi sonucunda genetik tanı konulamayan 102 epilepsi hastasına ait tüm ekzom dizileme verileri yeniden işlenerek kopya sayısı varyasyonları araştırıldı. Gerçekleştirilen biyoenformatik analizler ve moleküler doğrulama sonrasında 8 hastada kliniği açıklayabilecek kopya sayısı varyasyonları tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, Genetik, Kopya sayısı varyasyonları, Tüm ekzom dizileme

ABSTRACT

Investigation of Copy Number Variations in Epilepsy

Epilepsy is defined as a common neurological disorder characterized by recurrent seizures resulting from abnormal, excessive, and synchronous electrical discharges in a population of neurons. It has been reported to affect more than 50 million people worldwide, with a crude prevalence of approximately 7.6 per 1000 individuals. Although epilepsy arises from genetic, structural, infectious, metabolic, immune, and unknown causes, 40–60% of cases have been shown to be genetic in origin. Current studies have identified insertion/deletion (indel) and single-nucleotide variants (SNVs) in approximately 300 genes directly implicated in epileptogenesis; moreover, more than 500 epilepsy genes related to neurodevelopmental processes have been reported. In addition, copy-number variants (CNVs) have been shown to play a significant role in epileptogenesis, and their frequency has been reported to range between 5% and 12% across different epilepsy subtypes. In this study, whole-exome sequencing (WES) data from 102 epilepsy patients who remained undiagnosed after short-variant analysis were reprocessed to investigate CNVs. Bioinformatic analyses and molecular validation identified CNVs in 8 patients that could account for the clinical phenotype.

Keywords: Epilepsy, Genetics, Copy number variation, Whole exome sequencing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi, dünya genelinde 50 milyondan fazla kişiyi etkileyen ve her 1000 kişiden yaklaşık 7.6'sında görülen nöbetlerle karakterize yaygın bir nörolojik bozukluktur. En sık görüldüğü dönemler erken çocukluk ve 60 yaş sonrası olmakla birlikte, epilepsi her yaşta gelişebilen bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerinde, epilepsi olgularının yaklaşık %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde görüldüğü belirtilmektedir (1, 2).

Epilepsi nöbetlerinin farklı tiplerde olduğunun gözlenmesiyle birlikte epilepsi sınıflandırmasının gerekli olduğu 18.yüzyılda anlaşıldı. İlk epilepsi sınıflandırma çalışmaları Gestaut liderliğinde 1964'te başladı ve 1969'da ILAE (International League Against Epilepsy) genel kurulunun onayladığı sınıflandırma şeması oluşturuldu. Epileptik nöbetlerin tanım ve sınıflandırmasının tek bir çerçevede toplanmasının, hastalığın küresel ölçekte karşılaştırmalı biçimde değerlendirilmesi açısından kritik bir gereklilik olduğunu ilk fark eden isim Gestaut oldu. Bu doğrultuda uzun vadede geçerliliğini koruyacak bir sistem oluşturmak amacıyla kararlı bir biçimde çalışmalar yürüttü. Gestaut'nun bu alandaki yaklaşımı, 1964 yılında Marsilya Kolokiyumu'nda sunduğu taslak sınıflandırma ile bilim çevrelerinde destek görmeye başladı. Süreci takip eden yıllarda, 1969'da New York'ta düzenlenen toplantı sonucunda hem Uluslararası Epilepsi ile Savaş Ligi (ILAE) Genel Kurulu hem de dünya genelindeki nöroloji ve nörofizyoloji toplulukları tarafından kabul edilen bir sınıflandırma şeması ortaya kondu (3).

ILAE tarafından yapılan sınıflandırma çalışmaları 1969'dan günümüze kadar devam etmektedir. ILAE'nin son sınıflandırma raporuna (2017) göre epilepsi üç farklı düzeyde sınıflandırılmaktadır. Nöbet tiplerine (fokal, jeneralize ve bilinmeyen), epilepsi tipleri (fokal, jeneralize, kombine fokal-jeneralize ve bilinmeyen) ve epilepsi sendromlarına (örneğin, çocukluk absans epilepsisi, West sendromu, Dravet sendromu gibi) göre sınıflandırılmaktadır. Epilepsiler genetik, yapısal, enfeksiyöz, metabolik, immun ve bilinmeyen olmak üzere çok çeşitli etiyolojiye sahiptir. Genetik olmayan epilepsilerin çoğu enfeksiyon, travma, beyin tümörü, alkolizm, Alzheimer hastalığı ve felç gibi diğer rahatsızlıkların yarattığı beyin hasarı kaynaklı olup tüm epilepsilerin %20-30'unu kapsamaktadır. Epilepsilerin %40-60'ı genetik nedenlerden kaynaklanmaktadır (4-7).

Epilepsi, klinik belirtileri ve genetik altyapısı bakımından heterojenite gösteren karmaşık bir hastalıktır. Bazı genlerde ortaya çıkan varyasyonlar doğrudan epilepsiye ya da temel bulgu olarak epilepsinin görüldüğü sendromlara yol açmaktadır. Diğer bazı genler ise

beynin gelişimsel bozukluklarıyla ve epilepsiyle ilişkilidir. ILAE'ye göre genetik epilepsiler hem monogenik (kalıtsal ya da *de novo*) hem de kompleks (çevresel faktörlerle birlikte veya çevresel faktörler olmadan poligenik) kalıtım göstermektedir (7). Epilepsilerin büyük çoğunluğu bir ya da birden fazla genin çevresel faktörlerin etkisi olmadan veya çevresel faktörlerin birlikte etkilediği kompleks kalıtım ile açıklanmaktadır. Bununla birlikte, epilepsinin otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı resesif, X'e bağlı dominant ve mitokondriyal kalıtım paternleri bulunmaktadır. Bir gendeki varyasyonun farklı tipte epilepsiye veya farklı genlerdeki varyasyonların aynı tipte epilepsiye sebep olması, birden fazla gendeki varyasyonun çevresel unsurların etkisiyle birlikte epilepsi fenotipini göstermesi, epilepside genetik etiyojolojiyi ortaya çıkarmayı zorlaştırmaktadır (8, 9).

Tanımlanmış epilepsi sendromları ve bu sendromlarla ilişkilendirilen genler genomik teknolojilerin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasıyla her geçen gün artmaktadır. Epilepsiyle ilişkili genetik mekanizmalarda InDel (insersiyon- delesyon) ve tek nükleotit varyasyonlarının dışında kopya sayısı varyasyonları (Copy Number Variation; CNV) da dikkate değer bir rol üstlenmektedir (5, 10). CNV, referans genom ile kıyaslandığında bir DNA segmentinin kopya sayısında görülen olağan dışı değişiklikler (kayıplar veya kazanımlar) olarak ifade edilmektedir (11–13). CNV'ler normal genomik varyasyonun bir parçası olmasına rağmen bazı nadir CNV'ler hastalıklara sebep olmaktadır. Nadir CNV'ler, birçok tek gen hastalığı ve multifaktöriyel hastalıklarda rol oynamaktadır (14). CNV'ler açıklanamayan entelektüel yetersizlik (intellectual disability; ID), doğumsal anomaliler ve nöbetler dahil olmak üzere nöropsikiyatrik bozuklukları olan hastalarda oldukça önemli görülmektedir ve epilepsiyi de içeren kompleks kalıtmımlı nörogelişimsel bozuklukların başlıca etiyojolojik faktörleri arasında yer almaktadır. (15). Çeşitli araştırmalarda kopya sayısı varyasyonlarının epilepsiye yatkınlık yaratan bir faktör ya da doğrudan hastalığın nedeni olduğu ortaya kondu. Epilepsili bireylerde patojenik CNV'lerin oranı yaklaşık %5–12 aralığında bildirildi (10, 16, 17).

CNV'leri tanımlamaya yönelik geleneksel yaklaşımlar, karyotipleme ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi sitogenetik teknolojilerdir (18). 2003 yılından beri dizi tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array based comparative genomic hybridization; arrayCGH) ve tek nükleotid polimorfizm array (single nucleotide polymorphism array; SNP array) yaklaşımları da kullanılarak CNV'lerin genom çapında tespiti sağlanmaktadır (19). Son yıllarda yeni nesil dizileme (NGS), genotipleme amacıyla sık kullanılan bir strateji

haline geldi. Bu teknoloji, tek bir deneyde yüz milyonlarca kısa okuma üretmekte ve CNV'lerin yüksek çözünürlükte analizine olanak sağlamaktadır (20).

NGS tabanlı veriler, yalnızca kısa varyantların değil, aynı zamanda kopya sayısı varyasyonlarının da tespit edilmesine olanak sağlaması sayesinde epilepsinin genetik temeline yönelik araştırmaları önemli ölçüde ilerletti. Bu çalışmada, kısa varyant analizi sonucunda herhangi bir tek nükleotit varyasyonu veya (InDel) varyantı tespit edilemeyen epilepsi hastalarına ait tüm ekzom dizileme verileri kullanılarak biyoenformatik analiz gerçekleştirildi. Bu kapsamda, kopya sayısı varyantlarının tanımlanması, kliniği açıklayabilecek genetik nedenlerin ortaya konulması, epilepsinin genetik etiyolojisinde rol oynayabilecek genomik bölgelerin belirlenmesi ve epilepsi ile ilişkili yeni aday genlerin tanımlanması hedeflendi. Bunun yanı sıra, ek bir genetik test maliyeti oluşturmadan tanı alamayan hastalarda genetik nedenlerin belirlenmesi sağlanarak, hedefe yönelik tedavi seçeneklerine ulaşma potansiyeli artırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi ve Nöbet

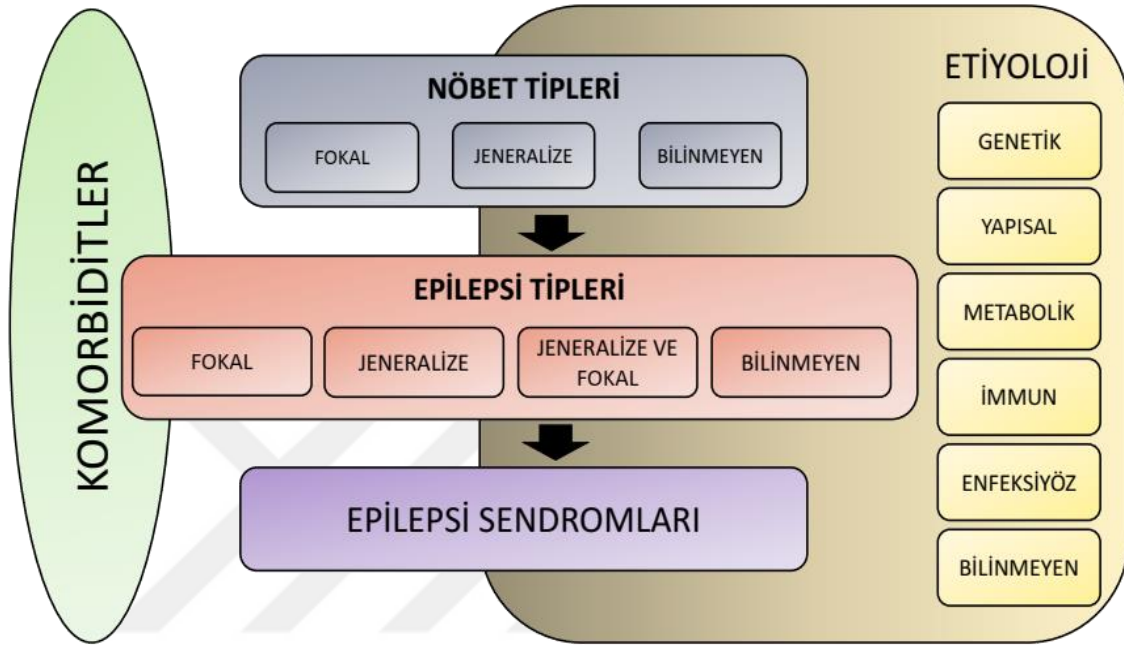
Epilepsi, nöron gruplarının anormal ve aşırı elektriksel deşarjları sonucunda ortaya çıkan tekrarlayıcı nöbetlerle seyreden yaygın bir sinir sistemi bozukluğudur. Nöbetler, vücudun bir bölümünü ya da tamamını etkileyen kısa süreli istem dışı kasılmalarla ortaya çıkmaktadır. Bazı olgularda bilinç kaybına ek olarak mesane ve intestinal kontrolün kaybıyla birlikte seyretmektedir (5). Epilepsi, hem statik hem de ilerleyici özellik gösterebilen bir klinik tablo olmakla birlikte özellikle bilişsel yetersizlikler gibi komorbiditelerle seyretmektedir (21).

Epilepsili bireylerin yaklaşık %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı, Dünya Sağlık Örgütü tarafından rapor edildi. Bu bölgelerde doğum travması, kafa travması ve enfeksiyöz hastalıklar gibi çevresel risk faktörlerinin yaygınlığı epilepsi prevalansını artıran başlıca nedenler arasında yer almaktadır (2). Ayrıca, düşük ve orta gelirli ülkelerde yüksek oranlarda görülen akraba evliliklerinin, genetik etiyolojiye bağlı epilepsi vakalarının artışında önemli bir rol oynadığı literatürde bildirilmektedir (22, 23).

2.2. Epilepsi Sınıflandırması

Epilepsinin doğru sınıflandırılması, klinik yönetim ve tedavi planlaması açısından büyük önem taşımaktadır. Uluslararası Epilepsi Birliği (ILAE), epilepsinin etiyolojisine ve nöbet tipine dayalı olarak zaman içerisinde çeşitli sınıflandırmalar geliştirdi; bu kapsamda 2017 yılında epilepsi tanısında kullanılacak güncellenmiş bir sınıflama sistemi yayımlandı. ILAE 2017 sınıflamasında epilepsi, üç ana basamak üzerinden değerlendirilmektedir: [1] nöbet tipinin belirlenmesi, [2] epilepsi tipinin belirlenmesi ve [3] epilepsi sendromunun tanımlanması. Nöbet tipleri, başlangıç özelliklerine göre fokal, jeneralize veya başlangıcı bilinmeyen olarak kategorize edilmektedir. Fokal nöbetlerin tek bir hemisferde başladığı; jeneralize nöbetlerin ise her iki hemisferi eşzamanlı olarak etkilediği belirtilmektedir. Başlangıcı belirlenemeyen nöbetler, gözlemsel eksiklikler veya teknik kısıtlamalar nedeniyle sınıflandırılmayan nöbetleri içermektedir. İkinci basamakta epilepsi tipi tanımlanmakta; üçüncü basamakta ise klinik bulgular, elektroensefalografi (EEG) ve nörogörüntüleme verileri doğrultusunda mümkünse belirli bir epilepsi sendromu tanısı konulması önerilmektedir. Bununla birlikte, ILAE 2017 sınıflaması altında epilepsinin etiyolojisinin de sistematik olarak tanımlanması gerekliliği vurgulanmakta ve yapısal, genetik, enfeksiyöz, metabolik, immünolojik veya bilinmeyen nedenler olmak üzere altı

temel etiyolojik kategori tanımlanmaktadır (Şekil 1). Genetik nedenlerin, özellikle erken başlangıçlı epilepsilerde önemli bir yer tuttuğu belirtilmektedir. Bu yeni yaklaşımın, epilepsi tanısında daha kesin bir terminoloji kullanılmasını ve genetik araştırmaların epilepsi etiyolojisindeki yerinin daha iyi anlaşılmasını desteklediği ifade edilmektedir (7).



Şekil 1. ILAE 2017 epilepsi sınıflandırmasının şematik gösterimi (Scheffer'dan, 7)

2.3. Epilepsi Etiyolojisi

2.3.1. Yapısal Nedenler

Epilepsinin yapısal etiyolojisi, beyinde doğuştan veya sonradan gelişen anatomik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan ve nöbetlerin oluşumunda doğrudan rol oynayan nedenleri kapsar. Yapısal nedenler, genellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi nörogörüntüleme yöntemleriyle saptanabilen hipokampal skleroz, kortikal gelişimsel malformasyonlar, beyin tümörleri, vasküler lezyonlar ve travmatik beyin hasarı gibi patolojileri içerir. Bu tür lezyonlar, epileptogenez sürecinde nöronal ağların yeniden yapılanmasına, sinaptik dengesizliklere ve epileptik odakların oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Ayrıca, yaygın epilepsi formlarında yapılan büyük ölçekli nörogörüntüleme çalışmaları, hipokampal hacim azalması ve kortikal kalınlıkta düzensizlik gibi yapısal beyin anormalliklerinin sıklıkla eşlik ettiğini göstermektedir (24, 25).

2.3.2. Enfeksiyöz Nedenler

Epilepsinin enfeksiyöz nedenleri, özellikle merkezi sinir sistemini (MSS) etkileyen enfeksiyonların akut ve kronik etkileriyle ilişkilidir. Viral, bakteriyel, fungal ve parazitik etkenlerin MSS'de enfeksiyon oluşturmaları, nöroenflamatuvar yanıtları tetikleyerek epileptogenez sürecine katkıda bulunmaktadır. Literatürde, gelişmiş ülkelerde MSS enfeksiyonu geçiren bireylerde istemsiz nöbet görülme oranının %6.8–8.3 arasında değiştiği, ancak düşük ve orta gelirli ülkelerde bu oranın daha yüksek olduğu bildirilmektedir (26). Özellikle viral ensefalitler gibi MSS'yi doğrudan etkileyen enfeksiyonlar, akut semptomatik nöbet riskini artırmakta, bazı olgularda ise kalıcı epilepsiye neden olabilmektedir (27).

2.3.3. Metabolik Nedenler

Epilepsinin metabolik etiyojisi, doğuştan gelen kalıtsal metabolik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkmakta ve çoğunlukla erken yaşta başlayan, tedaviye dirençli nöbetlerle seyretmektedir. Bugüne dek 600'den fazla metabolik epilepsi tanımlanmış olup, bu bozukluklar kalıtsal metabolik hastalıkların yaklaşık %37'sini oluşturmaktadır. Bu grup içinde enerji metabolizması bozuklukları, glikozilasyon bozuklukları, nörotransmitter sentezi ve katabolizmasıyla ilgili defektler ile sinaptik vezikül döngüsünü etkileyen hastalıklar yer almaktadır. Metabolik epilepsilerin yaklaşık %18'inin özgül tedavilere yanıt verdiği ve bu nedenle erken tanının büyük önem taşıdığı bildirilmektedir. Bu tür epilepsilerde tanıya ulaşmak için klinik bulguların yanı sıra kan ve idrar metabolit analizleri, ileri biyokimyasal testler ve genetik analizler kullanılmaktadır. Uygun tedaviyle birlikte nöbet kontrolü sağlanabilmekte, ilerleyici nörolojik bozulmaların önüne geçilebilmektedir (28, 29).

2.3.4. İmmün Nedenler

Epilepsinin immün etiyojisi, son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte daha iyi anlaşıldı ve "immün aracılı epilepsi" kavramı klinik uygulamalarda yer edinmeye başladı. Otoimmün ensefalitler akut semptomatik nöbetlere neden olabilirken, bazı durumlarda kalıcı epileptik odaklara dönüşen kronik immün süreçler de gelişebilmektedir. Özellikle hücre yüzeyi antijenlerine (örneğin NMDA, LGI1, CASPR2) karşı gelişen otoantikorların yapısal bir beyin lezyonu olmaksızın nöbetlere neden olabildiği; buna karşın hücre içi antijenlere karşı gelişen otoantikorların genellikle immün yanıtın çok sekonder yapısal hasara bağlı epileptogenezle ilişkili olduğu gösterilmektedir. Otoimmün kaynaklı nöbet bozukluklarında tanı, klinik belirtiler, EEG ve görüntüleme bulguları ile birlikte özgül otoantikorların

saptanmasına dayanır. Bu hastalarda immün tedavilere (kortikosteroidler, IVIG, plazmaferez) erken dönemde başlanması, hem nöbet kontrolü hem de sekellerin önlenmesi açısından önem taşımaktadır (30, 31).

2.3.5. Bilinmeyen Nedenler

Bazı epilepsi olgularında, kapsamlı klinik değerlendirme, ileri düzey görüntüleme yöntemleri ve genetik testlere rağmen altta yatan neden belirlenemez. Bu tür durumlar, ILAE'nin 2017 epilepsi sınıflamasında "bilinmeyen nedenli epilepsi" başlığı altında tanımlanır (7). Etiyolojinin belirlenememesi, çoğu zaman mevcut tanı yöntemlerinin duyarlılık sınırlarıyla ilişkilidir. Özellikle genetik geçiş şüphesi bulunan fakat bilinen genetik varyantlarla açıklanamayan olgularda, henüz tanımlanmamış moleküler mekanizmaların varlığı düşünülmektedir. Gelecekte yapılacak ileri nörojenetik, epigenetik ve transkriptomik çalışmaların bu olguların aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir. Bu bağlamda, "bilinmeyen nedenli epilepsi" kavramı yalnızca tanısal bir eksikliği değil, aynı zamanda epilepsinin biyolojik çeşitliliğini ve araştırma gereksinimlerini yansıtmaktadır.

2.3.6. Genetik Nedenler

Epilepsinin genetik temeli, monogenik varyantlardan poligenik yatkınlıklara ve çevre etkileşimlerine kadar uzanan geniş bir spektrum içerisinde değerlendirilmektedir. Genetik epilepsilerde, voltaj kapılı sodyum (SCN1A), potasyum (KCNQ2), kalsiyum (CACNA1A) ve klorür (CLCN2) kanallarını; ligand kapılı gama-aminobütirik asit reseptörleri (GABAR'lar), glutamat ve NMDA reseptörleri gibi sinaptik reseptörleri; HCN kanalları, asetilkolin reseptörleri, bazı metabolik enzimler, taşıyıcı proteinler, hücre iskeleti elemanları ve adezyon molekülleri gibi birçok farklı protein sınıfını kodlayan genlerde patojenik varyantlar tanımlandı. Bu yapılarla ilişkili yaklaşık 300 gende tek nükleotid varyasyonu (SNV) ve küçük insersiyon-delesyon (InDel) varyantları saptandı; ayrıca 500'den fazla nörogelişimsel epilepsi geni, kapsamlı hasta serileri üzerinden ilişkilendirildi (17, 32–34). Bunun yanı sıra, epilepsili bireylerde yapılan genom çapında analizler, genleri tamamen veya kısmen etkileyen delesyon ve duplikasyonların da hastalık etiyolojisinde önemli rol oynayabildiğini göstermektedir.

Kopya sayısı varyasyonları, özellikle şiddetli nörogelişimsel epilepsilerde ve sendromik olgularda tanı değeri taşıyan yapısal varyantlar arasında yer almaktadır (10, 35). Bu genetik varyasyonların bir kısmı gain-of-function (fonksiyon kazanımı) veya loss-of-

function (fonksiyon kaybı) etkilerle protein fonksiyonunu değiştirmekte, bazı mutasyonlar ise aynı gen üzerinden birden fazla epileptik fenotipe neden olabilmektedir (36). Özellikle *de novo* mutasyonlar, epileptik ensefalopatilerin etiyolojisinde belirleyici rol oynamakta; ailesel geçiş gösteren varyantlar ise düşük penetrans ve değişken ekspresivite nedeniyle tanısız yorumlamada zorluk oluşturmaktadır (17, 37). Epilepsinin bu düzeyde genetik heterojenite göstermesi, fenotipik sınıflandırmaları güçleştirmekte ve moleküler tanı yaklaşımlarının önemini vurgulamaktadır.

2.4. Epilepsi Etiyolojisinde Kopya Sayısı Varyasyonları

2.4.1. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Tanımı

Epilepsi etiyolojisinde, tek nükleotid varyantları ve küçük insersiyon/delesyonların yanı sıra, kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) da önemli bir rol oynadığı bildirildi (5, 10). CNV'ler, referans genomla karşılaştırıldığında DNA'nın belirli bir segmentinde meydana gelen kopya sayısı değişiklikleri — kayıp veya kazanç — olarak tanımlanmaktadır (11–13). CNV'lerin boyutları, ilk çalışmalarda 1000 baz çiftinden (1 kbp) büyük segmentler olarak tanımlanırken (12) daha sonraki çalışmalarda yaklaşık 100 baz çiftinden büyük (14) ve son yıllarda ise 50 baz çifti ile birkaç megabaz çifti (Mbp) arasında değişen segmentler olarak tanımlanmaktadır (38, 39). Delesyon, duplikasyon, inversiyon ve translokasyon gibi genomik yapısal yeniden düzenlemeler CNV oluşumuna neden olmaktadır (5). CNV'ler, içerdiği genlerin kopya sayısındaki değişiklikler yoluyla gen ekspresyon düzeylerini etkileyerek, haploid genom başına tek bir gen kopyasından elde edilen transkripsiyon seviyesinin azalmasına veya artmasına yol açmaktadır (13). CNV'ler normal genomik varyasyonun bir parçasını oluşturmakla birlikte, nadir CNV'ler özellikle nörolojik hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır (11).

2.4.2. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Sitogenetik teknikler, kromozomların görüntülerinin incelenmesine dayanan CNV tespiti için ilk yöntemlerdir.

a) Karyotipleme: bir bireyin kromozom yapısının analizini sağlayan ve kromozom sayısındaki veya yapısındaki değişiklikleri tespit eden geleneksel sitogenetik yöntemdir. Karyotipleme süreci, mitozun metafaz evresinde yoğunlaşmış kromozomların mikroskop altında incelenmesiyle gerçekleştirilir. Hücre kültürü yapılarak mitotik faza girmeleri sağlanan hücreler, kolşisin gibi bir madde ile durdurulur ve ardından hipotonik çözelti içinde

şışırılan hücreler yayılıp sabitlenir. Giemsa gibi boyama teknikleriyle kromozomların bant desenleri belirginleştirilip her kromozomun karakteristik yapısı gözlemlenebilir hale gelir. Karyotipleme, büyük ölçekli CNV'lerin (>5 Mb; megabaz) belirlenmesinde kullanılabilir ve özellikle büyük yapısal değişikliklerin gözlemlenmesinde etkilidir (40).

b) FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon, kopya sayısı varyasyonlarını tespit etmek için kullanılan bir moleküler sitogenetik yöntemdir. Bu yöntemde, hücreden izole edilen DNA, kimyasal veya ısıyla denatüre edilerek tek iplikçikli hale getirilir. Ardından, belirli bir kromozom bölgesini hedefleyen floresan işaretli DNA probları örneğe eklenir. Bu problar, ilgili genetik bölgeyle hibridize olur ve mikroskop altında gözlemlenir. İncelenen kromozom bölgesinde ortaya çıkan floresan sinyallerin sayısı ve yoğunluğu referans değerlerle karşılaştırılarak değerlendirme yapılır. Referansa göre daha fazla floresan sinyali görülmesi o bölgedeki genetik materyalin arttığını (duplikasyon), daha az sinyal görülmesi ise kayıp olduğunu (delesyon) göstermektedir. Özellikle hedeflenen bölge ve genler için oldukça hassas olmasına karşın 10 Kb (kilobaz)'dan daha büyük varyasyonları tespit edebilen bu yöntem, genom çapında tarama için uygun değildir (41, 42).

c) Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon: Konvansiyonel sitogenetik ve FISH yöntemlerinin çözünürlük sınırlamaları, CNV tespitine yönelik bir diğer sitogenetik yöntem olan Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (Comparative Genomic Hybridization; CGH)'un geliştirilmesine zemin hazırladı. CGH yöntemi, test edilen ve kontrol örneklerinden elde edilen DNA'nın kromozomlar boyunca hibridize edildiği bölgelerde oluşturduğu floresan sinyallerinin karşılaştırılmasıyla dizilerdeki kopya sayısı artış veya azalışlarını tespit edebilmektedir. İlk olarak katı tümörlerdeki kopya sayısı değişikliklerini belirlemek amacıyla geliştirilen bu yöntemde, farklı işaretlerle etiketlenmiş test ve kontrol genomları kullanılarak metafaz kromozomlarına rekabetçi bir şekilde hibridizasyonu sağlanır. Test DNA'sının floresan sinyal yoğunluğunun referans DNA'ya göre göreceli yoğunluğu, her bir kromozom boyunca çizgisel olarak haritalanabilir, bu da kopya sayısı değişikliklerinin belirlenmesine olanak tanır. Ancak CGH yöntemi yaklaşık 3-10 Mb büyüklüğündeki CNV'leri belirleyebilmektedir (41, 43).

Klasik sitogenetik yöntemler, çözünürlük düzeylerinin sınırlı olması nedeniyle mikroskobik olarak tespit edilemeyen submikroskopik genomik değişiklikleri saptamada yetersiz kaldı; bu gereksinim doğrultusunda, moleküler düzeyde daha hassas analiz yapılabilen yeni nesil sitogenetik teknikler geliştirildi.

d) aCHG: Array tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array Comparative Genomic Hybridization) kopya sayısı değişikliklerini genom çapında yüksek çözünürlükle saptamak amacıyla geliştirilmiş bir moleküler sitogenetik yöntemdir. Bu teknik, klasik CGH'nin prensiplerinin mikroarray yüzeyine uyarlanmasıyla geliştirildi (Solinas-Toldo vd.,1997). Test ve referans DNA'lar farklı floresan boyalarla işaretlenerek sabitlenmiş oligonükleotid problemlerin yer aldığı bir mikroarray üzerine hibritlenir ve oluşan floresan sinyalleri karşılaştırılarak kopya sayısı değişiklikleri değerlendirilir. Yöntem, klasik CGH'ye kıyasla çok daha yüksek çözünürlük sunar. Standart platformlarda yaklaşık 10–25 kb düzeyinde çözünürlük sağlanabilirken, yüksek yoğunluklu diziler kullanıldığında bu sınır 500 bp'ye kadar düşebilmektedir. Bu yüksek çözünürlük ve tüm genomu kapsama yeteneği nedeniyle, aCGH CNV analizinde klinik tanıda sık kullanılan bir yöntem haline geldi (38, 44).

e) MLPA: Çoklu Bağlanma-Tabanlı Prob Amplifikasyonu (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), kopya sayısı değişikliklerini saptamak için yaygın biçimde kullanılan bir prob bazlı PCR yöntemidir. İlk kez 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlandı (45). MLPA, tek bir reaksiyonda 60'a kadar hedef bölgenin eş zamanlı olarak analiz edilmesini sağlayabilir. Bu yöntem, analiz edilecek DNA dizilerine özgü kısa problemlerin hibritlenmesi ve bu problemlerin ligasyon ile birleştirilmesinin ardından amplifikasyonun gerçekleştirilmesine dayanır. Her prob çifti, elektroforezde ayrılabilir farklı uzunluklara sahiptir. Amplifikasyon ürünlerinin yoğunluğu, analiz edilen bölgedeki kopya sayısına dair kantitatif bilgi sağlar. MLPA 1 baz çifti kadar küçük delesyon veya duplikasyonları tespit edebilecek düzeydedir ve uygulama için yüksek kaliteli DNA'ya gerek yoktur. Ancak MLPA yöntemi, yalnızca önceden bilinen bölgelerdeki kopya sayısı değişikliklerini tespit edebilmektedir; bu nedenle, yeni ve bilinmeyen delesyon veya duplikasyonların ya da genom çapında taramaların yapılmasına olanak sağlamamaktadır (40).

f) SNP-array: Single Nucleotide Polymorphism (SNP) array teknolojisi, genom çapında hem kopya sayısı varyasyonlarını (CNV) hem de allelik dengesizlikleri tespit etmeye olanak tanıyan mikroarray tabanlı bir yöntemdir. Bu teknoloji, ilk kez 1996 yılında Affymetrix tarafından geliştirilen ve yaklaşık 1500 SNP içeren HuSNP assay ile ticari olarak uygulanmaya başlandı (46). SNP array'lerin temel prensibi, genomik DNA'nın belirli SNP lokuslarına karşılık gelen binlerce oligonükleotid prob içeren bir çipe hibritlenmesi ve

ardından bu bölgelerdeki genotiplerin floresan sinyal analizleri yoluyla değerlendirilmesidir. Sinyal yoğunluğu (log R ratio) ve B-allel frekansı (BAF) gibi ölçümler sayesinde yalnızca kopya sayısı değil, aynı zamanda heterozigotluk kaybı (loss of heterozygosity, LOH), uniparental disomy (UPD) ve mozaiklik gibi kompleks genomik anomaliler de değerlendirilebilmektedir. Bu yönüyle SNP array, klasik aCGH'e göre daha fazla parametre sağlayarak, özellikle klinik genetik ve onkogenetik uygulamalarda önemli avantajlar sunmaktadır (40, 46).

g) NGS: Son yıllarda Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing; NGS) genotipleme için popüler bir strateji haline geldi. NGS, DNA dizilerinin çok kısa sürede, yüksek verimlilikle ve paralel olarak dizilenmesini sağlayan bir teknolojidir. Bu yöntem, önce hedef DNA moleküllerinin küçük fragmentlere ayrılmasını ve adaptörlerin eklenmesini içerir. Ardından bu fragmanlar, platforma özgü bir yüzeye bağlanarak çoğaltılır (clonal amplification) ve milyarlarca kopya oluşturulur. Dizileme reaksiyonu sırasında, DNA polimeraz enzimi tarafından her yeni nükleotid eklenişinde floresan sinyalleri üretilir ve bu sinyaller bir dedektör tarafından okunarak DNA dizisi belirlenir. NGS teknolojileri, klasik Sanger dizilemeye kıyasla çok daha yüksek hız, daha düşük maliyet ve geniş kapsamlı veri üretimi avantajı sunar (47). NGS teknolojileri, yapısal varyasyonların —özellikle CNV'lerin— yüksek hassasiyetle tespiti için giderek artan biçimde kullanılmaktadır (20). Sınırlı sayıda genomik bölgeyi hedefleyen ve problemlerin önceden belirlendiği dizi tabanlı yöntemlerle kıyaslandığında, NGS platformlarında kısa okumalar tüm genomdan rastgele örneklenmektedir. Bu yaklaşım, daha yüksek kapsam derinliği ve çözünürlük sunmakta; kopya sayılarının daha doğru tahmin edilmesine ve yeni CNV'lerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (38, 48). Baz çifti uzunluğu 50'den büyük ve genellikle 3 ekzonu içine alan CNV'ler tüm ekzom dizileme ile belirlenebilmektedir (49).

2.4.3. NGS Verilerine Dayalı CNV Analiz Yaklaşımları

NGS verileri üzerinde çalışan algoritmalar genellikle dizi okuma verilerini referans genomla hizalayarak, bu hizalamalardaki “uyumsuzlukları” analiz eder ve bu uyumsuzluklardan yapısal varyantlara dair bilgi çıkarır. Yeni nesil dizileme verilerine dayalı CNV analizlerinin dört temel hesaplama stratejisi çerçevesinde gerçekleştirildiği belirtildi (38).

a) Eşlenmiş okuma çifti (read-pair) yöntemleri: NGS teknolojileri genellikle çift uçlu (paired-end) dizileme verisi üretir. Bu veride her DNA fragmentinin her iki ucundan okuma

yapılır ve bu uçlar referans genomu hizalanır. Read-pair tabanlı algoritmalar, bu okuma çiftlerinin beklenen mesafe ve yönelimlerinden sapmaları analiz eder. Eğer okuma çiftleri normalden daha uzak haritalanıyorsa duplikasyon, daha yakın haritalanıyorsa delesyon olarak değerlendirilmektedir. Bu yaklaşım, orta-büyük yapısal varyasyonların tespiti için uygundur. Ancak tekrarlayan bölgelerde hizalama hataları nedeniyle yalancı pozitif sonuçlar üretebilir.

b) Kırık okuma (split-read) tabanlı CNV tespit yöntemleri: Tek bir okumanın iki farklı genom bölgesine hizalanması durumunu analiz eder. Bu tür kırık hizalanmalar, CNV'lerin kırılma noktalarını baz düzeyinde gösterebilir. Split-read algoritmaları genellikle küçük yapısal değişikliklerin, örneğin kısa delesyonların tanımlanmasında etkilidir. Ancak bu yaklaşımın dezavantajı, kısa okuma uzunluklarında etkinliğinin sınırlı olmasıdır; çok kısa diziler bazen tekrarlayan bölgelerde hatalı hizalanabilir.

c) Read-depth (RD) tabanlı CNV tespit yöntemleri: NGS verisinde genomun her bölgesine düşen dizileme okuma yoğunluğunu kullanarak kopya sayısı varyasyonlarını tespit etmeyi amaçlar. Bu yaklaşım, genomu ait dizileme kapsama derinliğinin artması ya da azalması prensibine dayanır. Referans genomda sabit bir kopya sayısına sahip olan bir bölge, dizilendiğinde belirli bir ortalama kapsama (örneğin 30x) sahiptir. Eğer aynı bölge test örneğinde delesyon varsa kapsama azalır; duplikasyon varsa artar. Bu yöntem genellikle tüm genomun sabit uzunluktaki pencerelere (bin) bölünmesiyle başlar. Her pencere için düşen okuma sayısı hesaplanır. Elde edilen okuma yoğunlukları, ya bir referans genomla ya da normal örneklerden oluşturulmuş bir kontrol paneliyle karşılaştırılır. CNV bölgeleri, bu karşılaştırmada sapma gösteren segmentler olarak tanımlanır. Bu yaklaşımının özellikle yüksek kapsama sahip dizileme verilerinde etkili olduğu, düşük kapsama sahip dizileme verilerinde doğru sonuçların elde edilemeyebileceği vurgulanmaktadır.

d) Yeniden Birleştirme (De novo assembly) tabanlı CNV tespit yöntemleri: Okuma verileri referans genomu hizalanmadan bir araya getirilir (assembly), yani bir tür “referanssız genom inşası” yapılır. Daha sonra bu inşa edilen yapı referans genomla karşılaştırılarak yapısal varyasyonlar ortaya çıkarılır. Referans genomdan bağımsız çalışması, karmaşık varyasyonları daha iyi gösterebilme özellikleri ile teorik olarak güçlü bir stratejidir. Ancak mevcut algoritmalar ve donanımlar sınırlı olduğu için henüz yaygın kullanımda değildir. Ayrıca tekrar eden dizilerde birleştirme hataları (assembly collapse) sık görülür.

Tüm ekzom dizileme (Whole Exome Sequencing; WES), Mendeliyen hastalıklar ve yaygın poligenik hastalıkların incelenmesinde etkili bir teknik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, Tüm Genom Dizileme (Whole Genome Sequencing; WGS) yöntemine kıyasla daha düşük maliyetli olmasından dolayı tercih edilmektedir. WES, WGS verilerinden farklı olarak süresiz okumalar üreten ve hedeflenen bölgelerde daha yüksek kapsama derinliği sağlayan bir dizileme tekniğidir. Bu nedenle, okuma derinliğine dayalı bir algılama yaklaşımı kullanmak, CNV'lerin daha doğru tespiti açısından uygun bir teknik olarak değerlendirilmektedir (50, 51).

2.4.4. Epilepsi Patogenezinde Kopya Sayısı Varyasyonlarının Etkisi

Kopya sayısı varyasyonları, genomun bir veya daha fazla bölgesinin delesyon ya da duplikasyon şeklinde yeniden düzenlenmesiyle oluşan yapısal varyantlardır. Bu varyantlar, genetik materyalin miktarını değiştirerek gen dozajını etkileyebilmekte; bunun sonucunda gen ekspresyon düzeylerinde düzensizlikler meydana gelmektedir (52). CNV'lerin epilepsiyle ilişkisi, özellikle yapısal beyin anomalisi olmayan, genetik tabanlı olduğu düşünülen ve klasik genetik testlerle açıklanamayan hastalarda ön plana çıkmaktadır. Nörogelişimsel süreçlerde görev alan genleri etkileyen CNV'lerin, nöronal proliferasyon, migrasyon, sinaptogenez ve ağ organizasyonu gibi temel sinir sistemi işlevlerini bozarak epileptogenezde rol oynayabildiği gösterildi. Bu yapısal varyantlar, hem nöronal devrelerin organizasyonunu hem de kortikal elektriksel stabiliteyi etkileyerek epileptik nöbetlere yatkınlık oluşturmaktadır (32, 35).

Klinik açıdan değerlendirildiğinde, CNV'lerin epileptik fenotipler üzerindeki etkisi yalnızca ilgili genin varlığı veya yokluğuyla açıklanamamaktadır. Varyantın büyüklüğü, içerdiği gen sayısı, genomik lokalizasyonu ve eşlik eden fenotiplerle olan ilişkisi bir bütün olarak ele alınmalıdır (53). Bazı CNV'ler, epileptik ensefalopatiler gibi ağır sendromlarla doğrudan ilişkilendirilmekteyken; bazıları düşük penetrans ve değişken ekspresivite ile daha geniş bir fenotipik spektrum sergilemektedir. Örneğin, 15q11.2, 16p13.11 ve 1q21.1 bölgelerindeki yinelenen delesyon ya da duplikasyonlar hem epilepsi hem de otizm, zihinsel gerilik, dikkat eksikliği gibi nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirildi. CNV içeriğinde yer alan genlerin fonksiyonlarına bağlı olarak, bu varyantlar nöbet tipi ve tedavi yanıtı üzerinde de etkili olabilmektedir (15). Bu nedenle CNV analizi yalnızca etiyolojik değerlendirme amacıyla değil, aynı zamanda bireyselleştirilmiş tedavi planlamasına da ışık tutan önemli bir genetik araç olarak öne çıkmaktadır. Bu çerçevede, epilepsi ile ilişkili kopya

sayısı varyasyonlarının mevcut literatürde en sık bildirilen majör genomik bölgelerine ilişkin bilgiler Tablo 1’de sunulmaktadır.

Tablo 1. Epilepsiyle ilişkili majör kromozom bölgeleri

CNV Bölgesi	CNV Tipi	Referans
1q21.1	Delesyon	(54)
1q31-q41	Duplikasyon	(55)
2q24.1	Delesyon	(32)
2q24.2-q24.3	Delesyon/Duplikasyon	(56)
2q24.3	Delesyon	(57)
5p15.31-p15.2	Delesyon	(57)
5q11.2	Delesyon	(32)
6p12.1	Duplikasyon	(58)
6q14.3	Delesyon	(59)
7q11.22	Delesyon	(15)
7q32.3	Delesyon	(58)
7q35	Delesyon	(15)
14q12	Delesyon	(59)
14q13.2	Delesyon	(59)
15q11.2	Delesyon	(16)
15q13.3	Delesyon	(15)
16p11.2	Duplikasyon	(15)
16p11.2	Delesyon	(32)
16p13.11	Delesyon	(60)
16p13.2	Duplikasyon	(61)
17p11.2	Delesyon	(32)
18q11.2	Duplikasyon	(15)
20q13.33	Delesyon	(59)
20q13.33	Delesyon	(59)
22q11.2	Delesyon	(54)
Xq27-q28	Duplikasyon	(62)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

KTÜ Farabi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı Çocuk Nörolojisi Bilim Dalı'ndaki epilepsi hastalarına ait kayıtlar incelendi. Enfeksiyon, travma, beyin tümörü, immün yetmezlik ve serebrovasküler hastalık gibi sekonder nedenlere bağlı hastalar dışlandı ve etiyolojisi belirsiz 146 epilepsi hastası belirlendi. Bu hastalar, genetik etiyolojinin araştırılması amacıyla Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından tüm ekzom dizileme ile analiz edildi. Çalışmaya, sendromik ya da non-sendromik özellik gösteren ve komorbiditeleri bulunan 146 hasta dahil edildi.

Her örnekten ortalama 200 ng genomik DNA alınarak kütüphane oluşturuldu. Genomik DNA, QIAseq® FX DNA Library Kit (Qiagen) ile yaklaşık 400 bp uzunluğa fragmente edildi. Fragmentasyonun ardından kütüphaneler, üretici protokolü izlenerek QIAseq® Human Exome Kit (Qiagen) ile hazırlandı. Dizileme, NovaSeq 6000 platformunda 150 bp çift uçlu okuma biçiminde ve ortalama 30x okuma derinliğiyle gerçekleştirildi. Bu çalışma için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındı (Tarih:12/2022; Karar No:7). Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan veya yasal temsilcilerinden aydınlatılmış onam alındı.

Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda, 44 hastada epilepsi kliniğini açıklayan tek nükleotit ve InDel varyantları tespit edildi. Epilepsi ile ilişkilendirilmiş genlerde herhangi bir kısa varyant belirlenemeyen 102 hastada genetik tanı konamadı. Genetik tanı alamayan 102 hasta için CNV analizi gerçekleştirildi.

3.1. Tüm Ekzom Dizileme Verilerinin Biyoenformatik Analiz İçin Hazırlanması

Çalışmada yer alan tüm sayısal hesaplamalar için TRUBA (TÜRK ULUSAL BİLİM e-ALTYAPISI) kullanıldı. Kopya sayısı varyasyonlarının keşfi için kullanılan biyoenformatik araçların tümü TRUBA'da kuruldu. KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda mevcut olan BAM (Binary Aligned Map) formatındaki dosyalar CNV tespiti için kullanılan biyoenformatik araç ile uyumlu olmadığından (read group bilgisi eksik olduğundan) veri ön işleme yeniden gerçekleştirildi: GATK (Genome Analysis Tool Kit)) veri ön işleme iş akışı kullanıldı (63). Ham dizileme verilerinin kalite kontrolü FASTQC v0.11.9 aracı ile yapıldı (64). Trimmomatic aracı kullanılarak adaptör dizileri kırıldı ve düşük kaliteli okumalar elendi (65). Ardından BWA-MEM aracı kullanılarak referans genomu hizalama adımı tamamlandı (66). Hizalama sonrası elde edilen BAM dosyalarında, dizilemeye özgü yanlışlıkları (PCR amplifikasyonu vb.) azaltmak amacıyla

Picard/MarkDuplicates aracı kullanılarak duplike okumalar işaretlendi ve kaldırıldı (67). Bu adımların ardından CNV analizinde kullanılmaya hazır BAM dosyaları üretildi.

3.2. Kopya Sayısı Varyasyonu Tespiti

Tüm ekzom dizileme (WES) verilerinden kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) tespiti için GATK tabanlı ve R programlama dili ile yapılandırılmış **CNVRobot** analiz aracı kullanıldı (68). CNVRobot, okuma derinliği (read depth) ve B-allele frekansı (BAF) verilerini birlikte değerlendirerek CNV çağrısı yapan ve grafik çıktısı üreten biyoenformatik araçtır.

3.2.1. Okuma Derinliğinin Hesaplanması

Veri ön işleme ile üretilen BAM dosyaları üzerinden hedef bölgelerdeki okuma sayıları, GATK'nin **CollectReadCounts** aracı kullanılarak hesaplanır. Bu araç, önceden tanımlanmış bir hedef bölgeler listesi (interval list) temel alınarak her genomik bölgeye düşen kısa okuma (read) sayısını belirlemektedir. Hem hasta örnekleri hem de sağlıklı kontrol örnekleri için aynı işlem gerçekleştirilerek her hedef bölgeye ait toplam okuma sayıları elde edilmektedir. Bu işlem sonucunda, her örneğe ait ham okuma sayısı matrisi oluşturulmaktadır.

3.2.2. Okuma Derinliğinin Normalizasyonu

Ham okuma sayıları, teknik kaynaklı varyasyonlardan arındırılarak biyolojik sinyallerin daha net ortaya çıkarılması amacıyla GATK'nin **DenoiseReadCounts** aracıyla iki aşamalı biçimde normalize edilmektedir:

- **GC içerik düzeltmesi:** Her hedef bölgenin GC yüzdesi hesaplanır ve GC içeriğine bağlı sistematik sapmalar düzeltilir.
- **Panel of Normals (PoN) düzeltmesi:** PoN (Bu çalışmada 40 sağlıklı bireyin WES verisinden oluşturuldu) ile her hedef bölgedeki teknik varyasyonlara ait ortalama ve varyans bilgileri elde edilir. İncelenen her örneğin sinyalleri bu referansa göre standartlaştırılarak teknik gürültü ortadan kaldırılır.

Bu işlemler sonucunda elde edilen **denoised read count** değerleri, **log₂ oranına** dönüştürülerek CNV analizinde kullanılacak ana veri haline getirilir:

$$\log_2 = \frac{\text{Gözlenen okuma derinliği}}{\text{Beklenen okuma derinliği (PoN)}} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Bu $\log_2$ oranları, her bölgenin normal (diploid), delesyon veya duplikasyon olup olmadığını gösteren temel ölçüt olarak değerlendirilir:

- $\log_2 \approx 0 \rightarrow$ normal
- $\log_2 \approx -1 \rightarrow$ heterozigot delesyon
- $\log_2 \approx -2 \rightarrow$ homozigot delesyon
- $\log_2 \approx +0.58 \rightarrow$ triplikasyon (duplikasyon)

3.2.3. Segmentasyon

Elde edilen $\log_2$ oranları, CNVRobot'un içinde yer alan kendi segmentasyon algoritması ile analiz edilir. Bu algoritma, $\log_2$ oranındaki ani değişimleri değerlendirerek, benzer sinyal paternine sahip ardışık bölgeleri birleştirir ve olası CNV sınırlarını belirler.

3.2.4. Kopya Sayısı Durumu ve B-Alel Frekansı Analizi

Segmentasyon sonucunda tanımlanan her bölgeye, ortalama $\log_2$ oranına dayanarak bir kopya sayısı durumu (copy number state) atanır. Bu durumlar; $\log_2 \approx 0$ için 2 (diploid), $\log_2 \approx -1$ için 1 (heterozigot delesyon), $\log_2 \approx -2$ veya daha düşük için 0 (homozigot delesyon) ve $\log_2 \approx +0.58$ için 3 (triplikasyon/duplikasyon) olarak sınıflandırılır. Böylece sürekli $\log_2$ değerleri, biyolojik yorumlamaya uygun kategorik CNV etiketlerine dönüştürülür.

CNVRobot, heterozigot SNP'lerden elde edilen **B-alel frekansı (BAF)** verilerini de değerlendirmektedir. BAF verileri, özellikle CNV bölgesindeki alel dengesizliklerini ve homozigotluk kaybı gibi durumları değerlendirilmesinde tamamlayıcı bir parametre olarak kullanılır. BAF değeri ~ 0 veya ~ 1 olan bölgeler, homozigotluk ile uyumlu kabul edilirken; BAF sinyalinin kaybı, homozigot delesyon göstergesi olarak değerlendirilir. Heterozigotluk, normal diploid bölgelerde $BAF \approx 0.5$ olarak gözlenir; bu değer duplikasyon gibi CNV'lerde 0.33 ve 0.66 civarına kayarak üçlü dağılım oluşturur. Bu sapmalar, CNVRobot'un $\log_2$ oranına dayalı analizini destekleyici kanıtlar olarak değerlendirilir. BAF 0 veya 1 değeri civarındaysa homozigotluk, BAF sinyalinin kaybı, homozigot delesyon, BAF 0.5'ten sapmalar gösteren bölgelerde duplikasyon gibi yapısal varyantlara destekleyici olarak yorumlanmaktadır.

3.2.5. Filtreleme ve Görselleştirme

Tespit edilen CNV adayları, analiz sırasında oluşabilecek teknik hataların ve yanıltıcı sinyallerin elenmesi amacıyla çeşitli filtreleme adımlarına tabi tutulur. Bu kapsamda; segmental duplikasyon bölgeleri, haritalanabilirliği düşük genomik alanlar ve Database of Genomic Variants (DGV) veritabanında tanımlanmış yaygın germline CNV bölgeleri ile çakışan varyantlar değerlendirme dışı bırakılır. Bu adımlar, CNV çağrılarının özgüllüğünü artırmak ve yanlış pozitiflikleri azaltmak için kritik önem taşımaktadır.

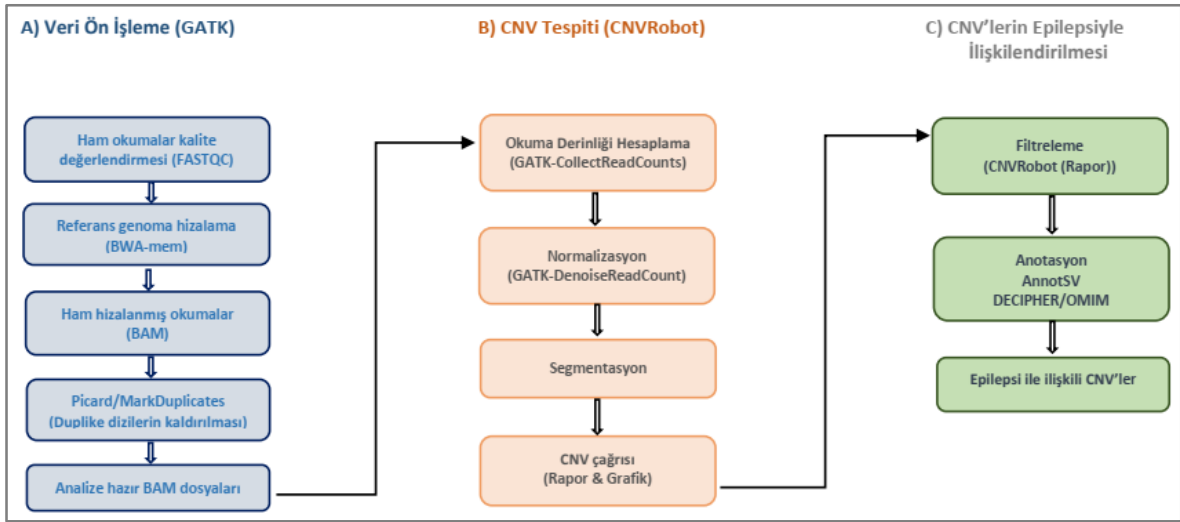
Gerçekleştirilen analizlerin sonunda, her bir hasta için tespit edilen her bir CNV'ye ait genomik özellikler, $\log_2$ oranları, kopya sayısı tahminleri, etkilenen genler, kontrol paneli frekansları ve haritalanabilirlik skorlarını içeren detaylı veriler tablo formatında raporlanır; ayrıca her varyant için $\log_2$ oranı ve BAF dağılımını görselleştiren grafiksel çıktılar da üretilerek yorumlamaya hazır hale getirilir.

3.3. Varyantların Anotasyonu ve Patojenite Değerlendirmesi

Bu çalışmada tanımlanan kopya sayısı varyantlarının klinik önemi, American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ile Clinical Genome Resource (ClinGen) tarafından 2020 yılında yayımlanan yapısal varyant sınıflandırma kılavuzuna göre değerlendirildi (52). Analiz sürecinde delesyon (kayıp) ve duplikasyon (kazanç) varyantları; genomik büyüklük, içerdiği gen sayısı ve nitelikleri, hastalıkla bilinen ilişkileri, fenotip-genotip uyumu, segregasyon bulguları, popülasyon sıklığı ve literatür desteği gibi çok boyutlu kriterler çerçevesinde incelendi.

Klinik açıdan anlamlı yapısal varyantların önceliklendirilmesi amacıyla, AnnotSV (v3.2) aracı (69) kullanıldı. Bu araç; gnomAD, DGV, ClinGen, ClinVar, OMIM, DECIPHER ve 1000 Genomes gibi güvenilir veritabanlarından elde edilen fenotipik, fonksiyonel ve popülasyon düzeyindeki anotasyonları entegre ederek varyantları kapsamlı biçimde değerlendirmektedir. Özellikle epilepsiyle ilişkili genleri içeren CNV'ler önceliklendirildi; popülasyon frekansı %1'in üzerinde olan varyantlar elimine edildi. Değerlendirme kapsamında, fenotiple yüksek özgüllükte eşleşen hastalık genlerinin etkilenmesi, kritik fonksiyonel bölgelerin kaybı, genin bilinen kalıtım paternine (örneğin otozomal resesif ya da dominant) uygunluk göstermesi, loss-of-function (LoF) mekanizmasıyla fonksiyon kaybına yol açabilecek varyantların varlığı ve DECIPHER veritabanında benzer CNV'lere ait epileptik fenotip kayıtlarının bulunması, delesyonlar için patojenite lehine güçlü kanıtlar olarak dikkate alındı. Duplikasyonlar ise gen dozaj

duyarlılığı, genetik içerik ve klinik korelasyon açısından ayrıca analiz edildi. Bu çok yönlü değerlendirme sonucunda, fenotiple uyumlu ve hastalıkla güçlü şekilde ilişkilendirilen varyantlar “patojenik” ya da “muhtemel patojenik” olarak sınıflandırıldı; yeterli klinik veya literatür desteği bulunmayan varyantlar ise “belirsiz öneme sahip (VUS)” kategorisinde değerlendirildi. Öte yandan, popülasyonda sık gözlenen, bilinen hastalık genleriyle ilişkisi bulunmayan ve fenotipik korelasyonu zayıf olan CNV’ler, ACMG/ClinGen kriterleri doğrultusunda “iyi huylu” ya da “muhtemel iyi huylu” olarak yorumlandı (Şekil 2).



Şekil 2. Epilepsi ile ilişkili CNV'lerin tespiti ve analizine yönelik uygulanan biyoinformatik iş akışı.

3.4. Varyantların Validasyonu

Anotasyonu yapılan varyantların validasyonu kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR- Quantitative Polymerase Chain Reaction) ile yapıldı. qPCR, PCR döngüleri sırasında gerçek zamanlı olarak biriken PCR ürününü tespit etmek için floresan veya interkale boyalar ekleyerek hedef DNA miktarını ölçmek için basit bir PCR modifikasyonudur. Kopya sayısı varyasyonunun belirlenmesinde kullanılan qPCR, bilinmeyen kopya sayısına sahip bir test lokusu ve bilinen kopya sayısına sahip bir referans lokusunun amplifikasyonu temeline dayanmaktadır. qPCR veri analizi için yaygın olarak kullanılan yöntemler, PCR sinyalini standart bir eğriyle ilişkilendirerek mutlak niceleme ve bir gruptaki hedef transkriptin PCR sinyalini diğerine bağlayan göreceli nicelemedir. CNV analizi için rölatif niceleme kullanılır. Rölatif nicelemede DNA kopya sayısını ölçmek için ampikon, o gene özgü dizilere sahip bir ekzon veya intron içinde yer alır. İki kopyaya sahip

bir kontrol geni de dahil edilir. Test, bir qPCR cihazında gerçekleştirilir ve veriler gerçek zamanlı olarak toplanır. PCR'ın her döngüsünde floresans miktarı ikiye katlanır ve spesifik bir floresans eşiğine ulaşılan döngü sayısı belirlenerek başlangıçta kullanılan kalıp DNA'nın miktarı saptanabilmektedir. Test lokusunun haploid genom karşılığı başına mutlak kopya sayısına, genin ve referans lokuslarının rölatif kopya sayılarının oranı ile ulaşılmaktadır (70).

3.4.1. DNA İzolasyonu

Biyoinformatik analiz sonucu CNV tespit edilen ve qPCR ile doğrulanması gereken her bir hastanın, bu hastaların ebeveynlerinin ve kontrollerin periferik kan örneklerinden Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA izolasyonu işlemi DiaRex® Whole Blood Genomic DNA Extraction Kit II ile üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi.

DNA İzolasyon Protokolü

- 1.5 ml mikro tüp içerisine 200 µl tam kan, 250 µl lizis tamponu ve 25 µl proteinaz K tamponu eklendi.
- Vorteks cihazında 15 sn karıştırıldıktan sonra 56 °C'de 5 dk inkübe edildi.
- Mikro tüpün içine 4 °C'de muhafaza edilen mutlak etanolden 250 µl eklendi.
- Lizat vorteks ile homojen hale getirildi, tüm içerik spin kolona aktarıldı. 1 dk süreyle 8.000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra atık tüpü değiştirildi.
- Kolona 500 µl yıkama tamponu-1 (WBD-1) eklendi. 1 dk süreyle 8000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra atık tüpü değiştirildi.
- Kolona 500 µl yıkama tamponu-2 (WBD-2) eklendi. 1 dk süreyle 8000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra atık tüpü değiştirildi.
- Kolona tekrar 500 µl yıkama tamponu-2 (WBD-2) eklendi. 1 dk süreyle 8000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra kolon 1.5 ml ependorf tüpüne yerleştirildi.
- 100 µl elüsyon tamponu (EBD) eklendi ve 2 dk bekletildikten sonra 1 dk süreyle 8000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra izole edilen DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

3.4.2. Primer Tasarımı

Biyoinformatik analizle belirlenen kopya sayısı varyasyonlarına ait genomik koordinatlar UCSC genom tarayıcısı (71) ile tarandı. Bölgenin hangi ekzonları kapsadığına dair bilgiler ve bölgenin tamamına ait dizi elde edildi. Ensembl genom tarayıcısı (72)

kullanılarak ekzonların başlangıç bitiş pozisyonları görüldü. Bölgeye ait dizi üzerinde ekzonlar işaretledi. CNVRobot aracılığıyla tespit edilen kopya sayısı varyantlarının büyük bir kısmı birden fazla ekzonu kapsamaktaydı. Ancak bu bölgelerde $\log_2$ oranı değerlerinin homojen seyretmesi ve segmentasyon algoritmasının delesyonun başlangıç ve bitiş noktalarını tutarlı biçimde tanımlaması, bölge boyunca benzer $\log_2$ oranlarının izlenmesi, varyant sınırlarının güvenilir şekilde belirlendiğini göstermektedir. Bu nedenle qPCR doğrulaması, genellikle delesyonun sınır ekzonlarından birine özgü olarak Primer3 (73) yazılımı kullanılarak tasarlanan primerlerle sınırlı tutuldu.

Primer3 yazılımı tarafından önerilen primer çiftleri, UCSC genom tarayıcısının In-Silico PCR aracı kullanılarak hedeflenen bölgeye özgü olup olmadığı test edildikten sonra primer dizileri üreticiye gönderilerek siparişi verildi. Her bir primer çifti için üreticinin belirttiği miktarda nuclease-free su kullanılarak konsantrasyonu 100 μM olan primer stokları elde edildi. Bu stok 1:10 oranında seyreltilerek konsantrasyonu 10 μM olan 100 μl primer stokları hazırlandı. Primer stokları -20°C 'de muhafaza edildi.

3.4.3. PCR Protokolü

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları Qubit 4 Fluorometer ile ölçüldü. Tüm DNA'ların konsantrasyonları 5 ng/ml olacak şekilde elüsyon tamponu ile seyreltildi. Her bir gen bölgesini hedefleyen primer için Tablo 2'de belirtilen miktarlardaki bileşenler 0.2 ml mikro tüplere eklendi. Her bir gen için 2 teknik tekrar yapıldı. Tüpler 10 sn süreyle 1000 rpm'de santrifüjlendikten sonra Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cyclers, 96-well Fast cihazına yerleştirildi.

Tablo 2. PCR bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Bileşen	Miktar
EcoTaq 2x PCR Master Mix	12.5 μL
Forward primer (10 μM)	1 μL
Reverse primer (10 μM)	1 μL
Distile su	5.5 μL
Genomik DNA (5 ng)	5 μL
Toplam	25 μL

DNA amplifikasyonu için kullanılan termal döngü parametreleri

1. Başlangıç Denatürasyonu: 94°C – 5 dakika
2. Ana PCR Döngüsü: Bu aşama 35 döngü (x35) olarak uygulanmaktadır.

Denatürasyon: 94°C – 30 saniye

Bağlanma: 60°C – 30 saniye

Uzama: 72°C – 30 saniye

3. Son Uzama: 72°C – 11 dakika 42 saniye

4. Son Saklama: 8°C

3.4.4. Jel Elektroforezi

Erlen içine 100 mL 1× TAE tamponu ve 2 g agaroz eklenerek karıştırıldı. Karışım mikrodalga fırında 1 dakika ısıtıldı, çıkarılıp yeniden karıştırıldı ve aynı işlem bir dakika daha tekrarlanarak agarozun tamamen erimesi sağlandı.

Eritilen karışım hafifçe soğutulduktan ($\approx 50^{\circ}\text{C}$) sonra 1 μL EtBr eklenerek karıştırıldı ve jel dökme kabına yerleştirilen tarakların üzerine dikkatlice döküldü. Jel oda sıcaklığında 30–40 dakika polimerize edildikten sonra elektroforez tankına alınarak jelin üzerini kapatacak miktarda TAE tamponu eklendi. PCR ürünü, 1 μL loading dye ile karıştırılıp kuyucuklara aktarıldı ve elektroforez 90 V'da yaklaşık 30–40 dakika yürütüldü. Ardından jel UV transilluminatör ile görüntülenerek DNA bantları değerlendirildi.

3.4.5. qPCR Prosedürü

Hedef genin DNA kopya sayısını belirlemek için kantitatif PCR (qPCR) yöntemi kullanıldı. Reaksiyon karışımları Tablo 3'te belirtilen bileşenlerle hazırlanarak her örnek (hasta, ebeveynler ve sağlıklı kontroller) için üç teknik tekrar, 0,1 mL strip tüplerde toplam 20 μL hacim olacak şekilde oluşturuldu. Referans gen (B2M) ve hedef gen için negatif kontroller de hazırlandı; bu tüplerde DNA yerine 1 μL distile su eklenerek hacim 20 μL 'ye tamamlanmıştır. Tüm reaksiyonlar, Rotor-Gene® Q cihazına uygun 72'lik diske yerleştirilerek cihaza aktarıldı.

Tablo 3. qPCR bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Bileşen	Miktar
BIO-RAD SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	10 μL
Forward primer (10 μM)	0.4 μL
Reverse primer (10 μM)	0.4 μL
Distile su	8.2 μL
Genomik DNA (5 ng)	1 μL
Toplam	20 μL

DNA amplifikasyonu için qPCR döngü parametreleri:

- Başlangıç (Pre-inkübasyon):

98 °C – 3 dakika

- Amplifikasyon Döngüsü (40 döngü):

98 °C – 15 saniye (denatürasyon)

60 °C – 1 dakika (hibridizasyon ve uzama – veri toplama aşaması)

Her bir tüpün spesifik bir floresan eşiğini geçtiği döngü numarası (C_t değeri) cihazdan çıktı olarak alındı. Referans DNA bölgesine göre hedef DNA bölgesinin kaç kat değiştiğini hesaplamak için karşılaştırmalı C_t değeri kullanıldı (74).

- Rölatif kantifikasyon eşitliği:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \Delta C_{t(\text{hasta})} - \Delta C_{t(\text{kontrol})};$$

$$\Delta C_{t(\text{hasta})} = C_{t(\text{hedef DNA})} - C_{t(\text{referans DNA})},$$

$$\Delta C_{t(\text{kontrol})} = C_{t(\text{hedef DNA})} - C_{t(\text{referans DNA})}. \quad (\text{Eşitlik 2})$$

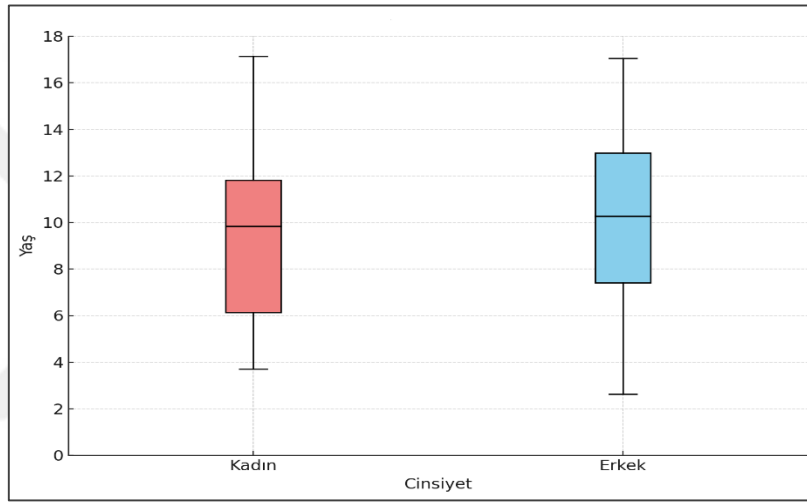
3.5. İstatistik Analiz

Tüm istatistik hesaplamalar ve grafikler Python programlama dili kullanılarak yapıldı. CNVRobot ile elde edilen CNV boyutlarının dağılımı incelendi ve varyant sınıfları arasında fark olup olmadığı değerlendirildi. Tanı koydurucu CNV varlığı ile nörogelişimsel gecikme arasındaki ilişkinin belirlenmesinde Fisher's Exact Test uygulandı. Bu analiz için sıfır hipotezi (H_0), "Tanı koydurucu CNV varlığı ile nörogelişimsel gecikme arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki yoktur." şeklinde; alternatif hipotez (H_1) ise "Tanı koydurucu CNV varlığı ile nörogelişimsel gecikme arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki vardır (tek yönlü, CNV pozitif bireylerde gecikme daha sık görülür)." şeklinde tanımlandı. Test, SciPy kütüphanesinde yer alan fisher_exact fonksiyonu kullanılarak, tek yönlü alternatif hipoteze göre yürütüldü ve anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Analiz sonucunda odds ratio ile p-değeri hesaplandı.

4. BULGULAR

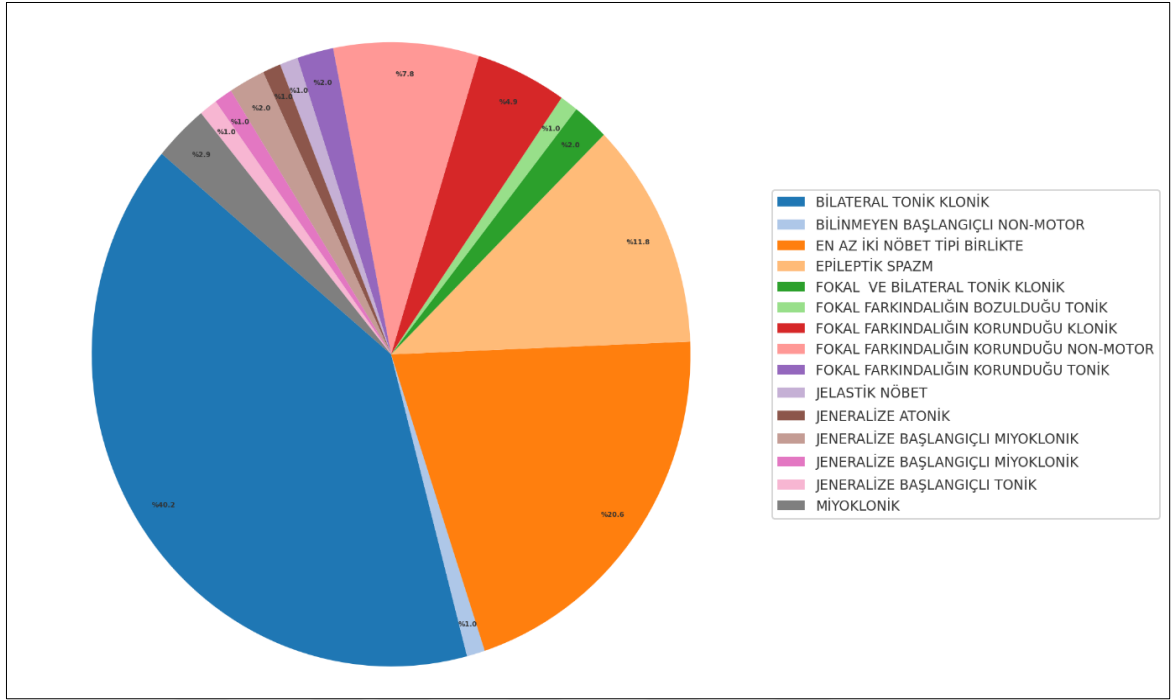
4.1. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 102 epilepsi hastasının %33.3'ü (n=34) kadın, %66.7'si (n=68) erkektir. Hastaların Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvurdıkları sıradaki yaşları 3 ay ile 17 yaş arasında değişiklik göstermekteydi. Kadın hastaların yaşları 4 ile 17 yıl arasında değişmekle birlikte yoğun olarak 6–12 yıl aralığındadır. Ortalama yaş 9, medyan yaş 10 yıl olarak belirlendi. Erkek hastaların yaşları ise 3 ile 17 yıl arasında değişmekte olup ve yoğunluk 7–13 yıl aralığındadır. Ortalama ve medyan yaş 10 yıl olarak belirlendi (Şekil 3).



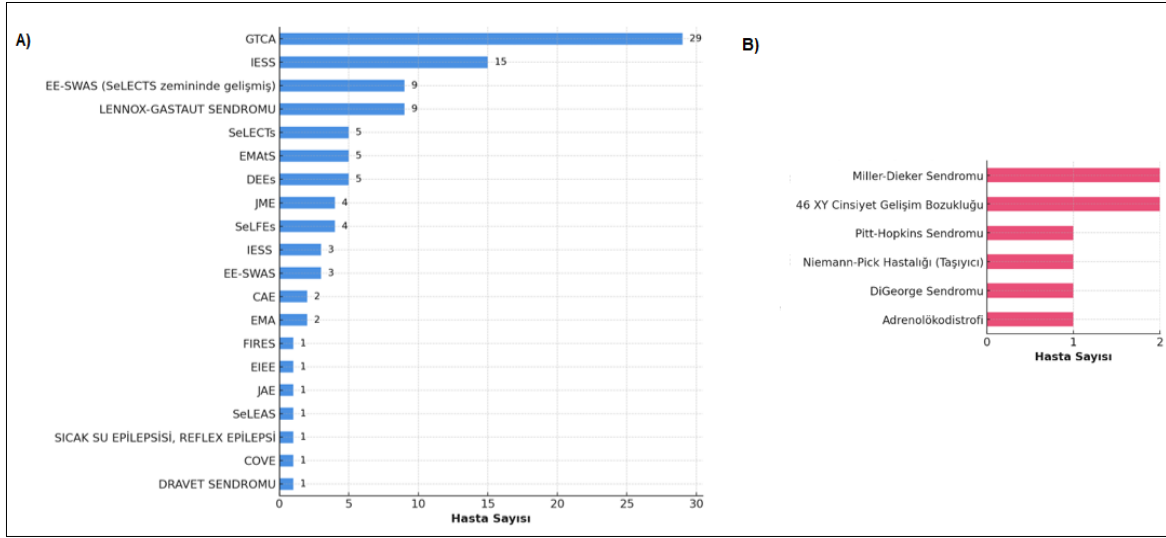
Şekil 3. Hastaların yaşlarının cinsiyetlerine göre dağılımı.

Çalışmada en sık gözlenen nöbet tipi bilateral tonik klonik nöbetler olup, hastaların %40.2'sinde gözlenmektedir. Tüm hastaların %20.6'sında en az iki nöbet tipi birlikte gözlenmektedir. Bunu sırasıyla epileptik spazm (%11.8) ve fokal farkındalığın korunduğu non-motor nöbetler (%7.8) izlemektedir. Fokal farkındalığın korunduğu klonik nöbetler hastaların %4.9'unda, jeneralize başlangıçlı miyoklonik nöbetler ve miyoklonik nöbetlerin her biri %2.9 oranında gözlenmektedir. Daha düşük sıklıkla gözlenen diğer nöbet tipleri arasında fokal ve bilateral tonik klonik (%2.0) ve fokal farkındalığın korunduğu tonik nöbetler (%2.0) yer almaktadır. Az görülen nöbet tipleri olarak bilinmeyen başlangıçlı non-motor, fokal farkındalığın bozulduğu tonik, jelaistik, jeneralize atonik, jeneralize başlangıçlı tonik nöbetlerin her biri %1.0 oranında gözlenmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Nöbet tiplerinin dağılımı. Pasta grafiği hastalarda (n=102) gözlenen nöbet tiplerinin sıklıklarını göstermektedir. Bir den fazla nöbet tipine sahip hastalar "En Az İki Nöbet Tipi Birlikte" başlığı altında birleştirildi.

Toplam 102 hastada tanımlanan epileptik sendromlar incelendiğinde, en sık gözlenen sendrom GTCA olup, tüm hastaların %28.4'ünü (n=29) oluşturmaktadır. Bunu sırasıyla IESS %14.7 (n=15), EE-SWAS (SeLECTS zemininde gelişmiş) %8.8 (n=9) ve Lennox-Gastaut Sendromu %8.8 (n=9) oranlarıyla takip etmektedir. Bunun dışında SeLECTS, EMAtS ve DEEs sendromları her biri %4.9 oranında (n=5) gözlenmektedir. JME ve SeLFES tabloları %3.9 (n=4) oranındadır. CAE, EMA, EE-SWAS, FIRES, EIEE, JAE, SeLEAS, COVE, Dravet Sendromu ve Refleks Epilepsi gibi sendromlar ise daha düşük (< %1, n=1) orandadır (Şekil 5, A). 102 hastanın 8'inde epileptik fenotipe eşlik eden klinik sendromlar mevcuttur. 46 XY Cinsiyet Gelişim Bozukluğu ve Miller-Dieker Sendromuna sahip ikişer hasta, Adrenolökodistrofi, DiGeorge Sendromu, Niemann-Pick Hastalığı (taşıyıcı) ve Pitt-Hopkins Sendromuna sahip birer hasta yer almaktadır (Şekil 5, B).



Şekil 5. Epileptik sendromlar ve eşlik eden sendromların frekansları

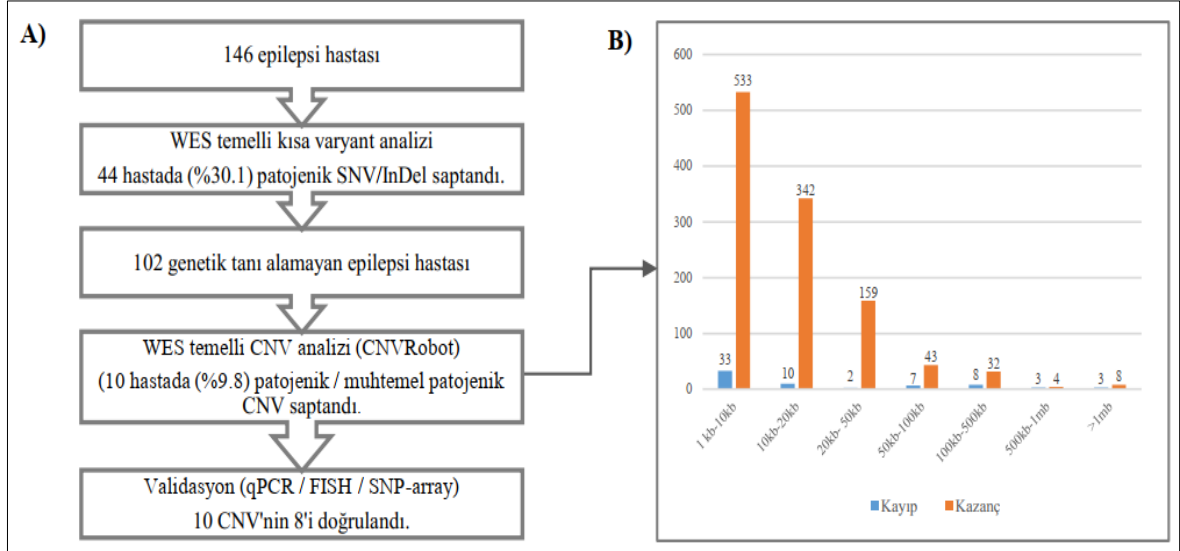
4.2. Hastalara Ait CNV'lere İlişkin Biyoenformatik ve Moleküler Bulgular

4.2.1. Biyoenformatik Analiz Sonuçları ve Moleküler Doğrulama İçin Ön Değerlendirme

Bu çalışmada epilepsi tanılı toplam 146 hastanın WES tabanlı kısa varyant analizi yapıldı ve 44 hastada epilepsi kliniğini açıklayan bulgular elde edildi. Tanı alamayan 102 hasta için WES verileriyle CNV analizi yapıldı; biyoenformatik değerlendirme sonucunda 10 hastada kliniği açıklayabilecek CNV'ler tespit edildi ve 8'i moleküler değerlendirme sonucunda doğrulandı (Şekil 6, A).

Tüm hastalarda CNVRobot ile çağrılan kopya sayısı varyantları ön filtrelemeye tabi tutuldu. Haritalanabilirliğin %75'in altında olduğu bölgeler, prob sayısı 2'nin altında kalan çağrılar ve sağlıklı kontrollerde ya da DGV (Database of Genomic Variants)'de frekansı 0.01'in üzerinde bulunanlar dışlandı. Ayrıca, AnnotSV çıktılarında popülasyon frekansı >0.01 olan varyantlar elendi. Tüm filtrelemelerin gerçekleştirilmesi sonucunda çalışmaya dahil edilen 102 hastada toplam 1185 CNV belirlendi (Şekil 6, B). CNV'lerin büyüklüklerine göre dağılımı incelendiğinde, en yüksek oran % 47.7 ile 1–10 kb aralığında gözlemlendi. Bunu % 29.64 ile 10–20 kb, % 13.56 ile 20–50 kb, ve % 4.21 ile 50–100 kb aralığındaki CNV'ler takip etti. Daha düşük oranlarda ise % 3.37 ile 100–500 kb, % 0.59 ile 500 kb–1 Mb ve % 0.93 ile 1 Mb'dan büyük CNV'ler tespit edildi. Küçük boyutlu CNV'lerin daha yüksek oranda tespit edilmesi, WES verilerinin özellikle küçük boyutlu

genomik değişikliklerin belirlenmesinde daha duyarlı ve etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir.



Şekil 6. Çalışmanın akış şeması ve tespit edilen CNV'lerin dağılımı **(A)** WES temelli kısa varyant ve CNV analizi iş akışı **(B)** CNVRobot ile tespit edilen CNV'lerin dağılımı. X eksenini CNV büyüklüğünü, Y eksenini tespit edilen CNV sayısını göstermektedir.

Tüm hastaların WES verileri ile yapılan biyoenformatik analiz sonucunda elde edilen epilepsi ilişkili CNV'ler ve bu CNV'lerin tipleri, boyutları, sitoband lokalizasyonları, genomik koordinatları, ilgili gen/genler ve moleküler doğrulama sonuçları sunulmaktadır (Tablo 4). Epilepsi kliniğini açıklayabilecek CNV'lerin %90'ı kayıp, %10'u ise kazanç olarak tespit edildi. Boyutları yaklaşık 6 kb ile 5 mb arasında değişen CNV'lerin %50'si tek gende yer alırken %50'si de birden fazla geni içine almaktadır.

Tablo 4. CNVRobot aracılığıyla tespit edilen epilepsi ile ilişkili CNV'lerin genomik özellikleri ve doğrulama sonuçları.

Hasta Numarası	CNV tipi	Boyut (kb)	Sitoband	Genomik Koordinatlar (hg-38)	Gen/Gen sayısı	Doğrulama Yöntemi /Sonucu
1	Kayıp	7.2	21q22.11	21: 32681317-32688546	SYNJ1	qPCR / ✓
7	Kayıp	10.3	16p13.3	16: 7597192-7607517	RBFOX1 (A2BP1)	qPCR / X
31	Kayıp	6.2	2q24.3	2: 165380914-65387195	SCN2A	qPCR / X
35	Kayıp	828.7	17p13.3	17: 2464029-3292761	PAFAH1B1+ 20gen	FISH / ✓
51	Kayıp	6.3	6q27	6: 169773140-69779474	ERMARD	qPCR / ✓
82	Kayıp	2155.4	22q11.21	22: 18906196-21060707	79 gen	FISH / ✓
83	Kayıp	489.6	17p13.3	17: 2638110-3127730	PAFAH1B1+ 12gen	FISH / ✓
95	Kazanç	5146	9p24.3-p24.1	9: 2028844-7174908	51 gen	SNP-array / ✓
99	Kayıp	175.5	18q21.2	18: 55228046-55403569	TCF4	qPCR / ✓
102	Kayıp	1485.4	15q13.2-q13.3	15: 30626642-32112078	20 gen	SNP-array / ✓

Biyoenformatik analiz ile tespit edilen kopya sayısı varyasyonlarının doğrulanmasına yönelik olarak öncelikle varyantların genomik boyutları ve etkiledikleri gen sayıları değerlendirildi. Yalnızca tek bir geni içeren küçük boyutlu CNV'lerin doğrulamasında qPCR yöntemi tercih edildi. Birden fazla geni kapsayan ve geniş genomik bölgelere yayılan CNV'lerin doğrulamasında ise floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya SNP array analizi uygulandı.

qPCR çalışmaları öncesinde, hedef genlere özgü primerler tasarlandı. qPCR için kullanılacak primer çiftlerinin özgüllüğünü ve amplifikasyon etkinliğini değerlendirmek amacıyla konvansiyonel PCR yapıldı ve PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. SCN2A, ERMARD, RBFOX1 ve β 2M (refernas) genlerine ait PCR ürünlerinin yaklaşık 80–100 baz çifti; SYNJ1 ve TCF4 genlerine ait ürünlerin ise 100–150 baz çifti uzunluğunda olması beklendi (Tablo 5).

Tablo 5. Analiz edilecek genler için primer bilgileri ve PCR ürün özellikleri

Gen	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	PCR Ürün Boyutu (baz çifti)
SYNJ1 / ekzon 7	F:CGACTGTGTGTTTCAGCAAAGAA	58	138
	R: TCCCCTTGACATACGGACAC	59	
ERMARD / ekzon 13	F: GTTCTCGCTGTCATCCGGTT	59	82
	R: TCAGAGACATACACGCCCT	59	
RBFOX1 / ekzon 9	F: TGAATTGGGAGCTGGCCCTA	59	83
	R: TCATTACACGTGCTGTGGCA	59	
SCN2A / ekzon 25	F: AAAACCCATACCTCGACCTGC	60	85
	R: TTCGGGCTGTGAAACGGTTAG	60	
TCF4 / ekzon 7	F: AACCCTTTCGCCCACCAAA	57	132
	R: GGCATAATCATCCCTCAGGCA	60	
B2M / ekzon 2	F: ACACCAAGTTAGCCCCAAGTG	60	109
	R:TTCTCTGCTGGATGACGTGAG	60	

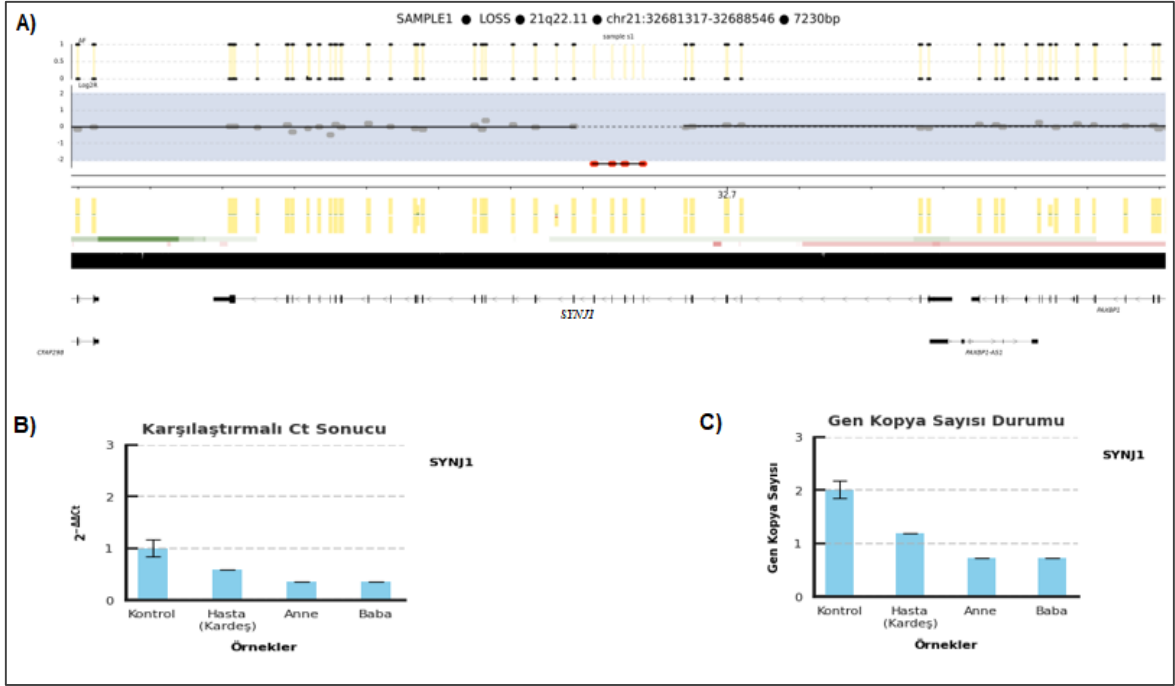
Amplifikasyon, her gen için iki teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Moleküler boyut standardı olarak 50–1000 bp aralığında, yaklaşık 100 bp’lik artışlarla düzenlenmiş bir belirteç (marker) kullanıldı ve ürünlerin konumları bu referanslara göre değerlendirildi. Kontrol bireye ait DNA kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucunda, tüm genlere ait ürünler beklenen boyutlarda ve tekil bantlar halinde elde edildi. Bu sonuçlar, primer çiftlerinin hedef bölgelerine yüksek özgüllükle bağlandığını ve non-spesifik amplifikasyon ya da primer dimeri oluşumu gözlenmediğini gösterdi. Beklenen büyüklükte ve tek bantlı amplifikasyon elde edilen primer çiftleri ile qPCR aşamasına geçildi (Resim 1).

**Resim 1.** qPCR öncesi primer özgüllüğü değerlendirmesi için gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.2.2. Kopya sayısı varyasyonlarının moleküler doğrulama sonuçları

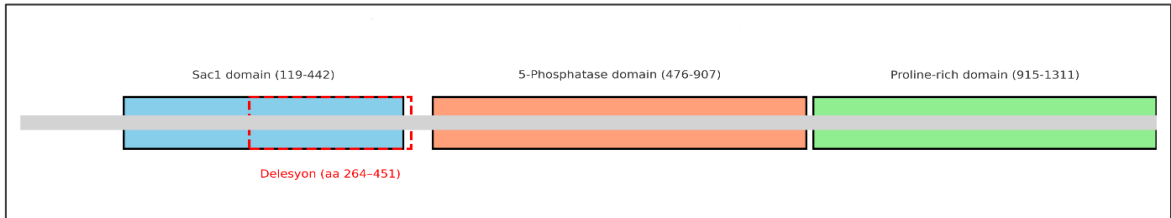
CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 1 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verileriyle yapılan biyoenformatik analiz sonucunda, 1 numaralı hastada 21q22.11 bölgesinde bulunan SYNJ1 geninde, 5 ekzonu (7-11) içine alan 7.2 kb'lik delesyon (kayıp) tespit edildi. Bu bölgede $\log_2$ oranı değerlerinde belirgin bir azalma izlendi. $\log_2$ oranın -2 civarında gözlenmesi homozigot delesyon ile uyumludur. Segmentasyon, delesyonun başlangıç ve bitiş koordinatlarını net bir şekilde tanımladı. Ayrıca, B-alel frekansı (BAF) panelinde, delesyon bölgesine karşılık gelen SNP sinyallerinin kaybolduğu gözlemlendi. Bu bulgu, ilgili bölgede homozigot delesyon (iki kopya kaybı) varlığını desteklemektedir (Şekil 7, A). Hastanın vefatı nedeniyle genetik analiz aile bireyleri üzerinden yürütüldü. Birinci derece akraba olan ebeveynlerden doğan sağlıklı kardeşte, anne ve baba ile birlikte taşıyıcılığın (heterozigot delesyon) tespit edilmesi, hastaya ait homozigot delesyonun segregasyon analizi kapsamında dolaylı olarak doğrulanmasını sağladı (Şekil 7, B ve C).



Şekil 7. CNVRobot aracı ile tespit edilen SYNJ1 genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması **(A)** Biyoenformatik analiz sonucunda, 21q22.11 bölgesinde $\log_2$ oranının yaklaşık -2.25 olarak saptanması, bu bölgede homozigot delesyon ile uyumlu bir kopya kaybına işaret etmektedir. **(B)** Karşılaştırmalı C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi kullanılarak yapılan qPCR analizinde, sağlıklı kontrol bireylerinde bu değer 1 olarak normalize edildi. Anne, baba ve kız kardeşe ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri yaklaşık 0.5 olarak hesaplandı. **(C)** Yapılan analiz sonucunda hesaplanan rölatif gen kopya sayıları değerlendirildi. Kontrol bireylerde 2 kopya tespit edilirken, anne, baba ve kız kardeşte yaklaşık 1 kopya tespit edildi. Bu bulgular, heterozigot delesyon ile uyumludur.

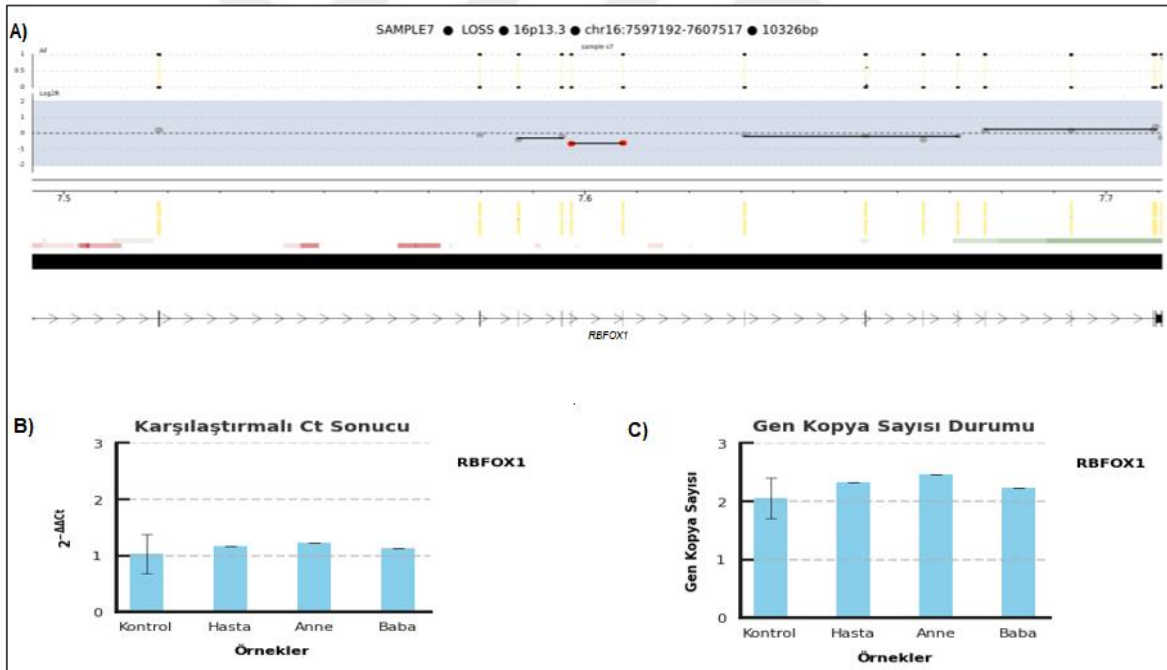
SYNJ1 geninde tespit edilen delesyonun, transkriptin 264–451. amino asitlerini kodlayan bölgeyi içerdiği ve ilgili dizinin Sac1 domaini (119–442 aa) içerisinde yer aldığı belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. SYNJ1 proteininin fonksiyonel yapısı ve tespit edilen CNV'nin etkilediği bölge

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 7 numaralı hasta

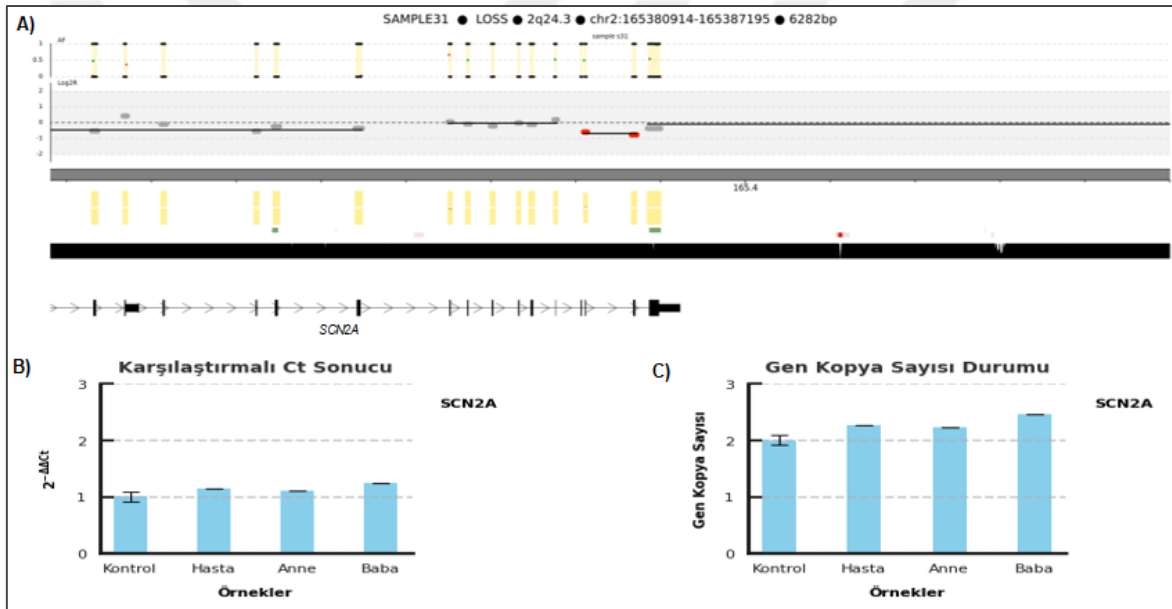
Tüm ekzom dizileme verileri analiz edilen 7 numaralı hastada, 16p13.3 bölgesinde bulunan RBFOX1 geninin 9. ve 10. ekzonlarını içeren 10.3 kb'lik heterozigot delesyon (kayıp) tespit edildi. Bu bölgede $\log_2$ oranı değerlerinde belirgin bir azalma izlendi ve değerlerin yaklaşık -1 civarında seyretmesi, heterozigot delesyon ile uyumlu bulundu. B-alel frekansı (BAF) panelinde, delesyon bölgesine karşılık gelen SNP sinyallerinin yokluğu dikkat çekti. Elde edilen bulgular, ilgili bölgede bir kopya kaybı olduğunu göstermektedir (Şekil 9, A). İlgili CNV'ye yönelik qPCR ile yapılan doğrulama çalışmasında ise hem hastada hem de anne ve babada normal kopya sayıları tespit edildi. Segregasyon analizi uygulanabilmiş olmasına rağmen, CNVRobot tarafından heterozigot delesyon olarak öngörülen bu varyasyon qPCR verileriyle doğrulanmadı. Bu durum biyoenformatik aracın söz konusu bölge için yanlış pozitif CNV çağırısı yaptığını göstermektedir (Şekil 9, B ve C).



Şekil 9. CNVRobot aracı ile tespit edilen RBFOX1 genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması (A) Biyoenformatik analizi sonucunda, 16p13.3 bölgesinde $\log_2$ oranının yaklaşık -0.64 olarak saptanması, bu bölgede heterozigot delesyon ile uyumlu bir kopya kaybına işaret etmektedir. (B) Karşılaştırmalı C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi kullanılarak yapılan qPCR analizinde, sağlıklı kontrol bireylerinde bu değer 1 olarak normalize edildi. Anne, baba ve hastaya ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri yaklaşık 1 olarak tespit edildi. (C) Yapılan analiz sonucunda hesaplanan rölatif gen kopya sayıları değerlendirildi. Kontrol bireylerde 2 kopya tespit edilirken, anne, baba ve hastada da yaklaşık 2 kopya tespit edildi. Bu bulgular, biyoenformatik analizde öngörülen delesyon ile uyumsuzdur.

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 31 numaralı hasta

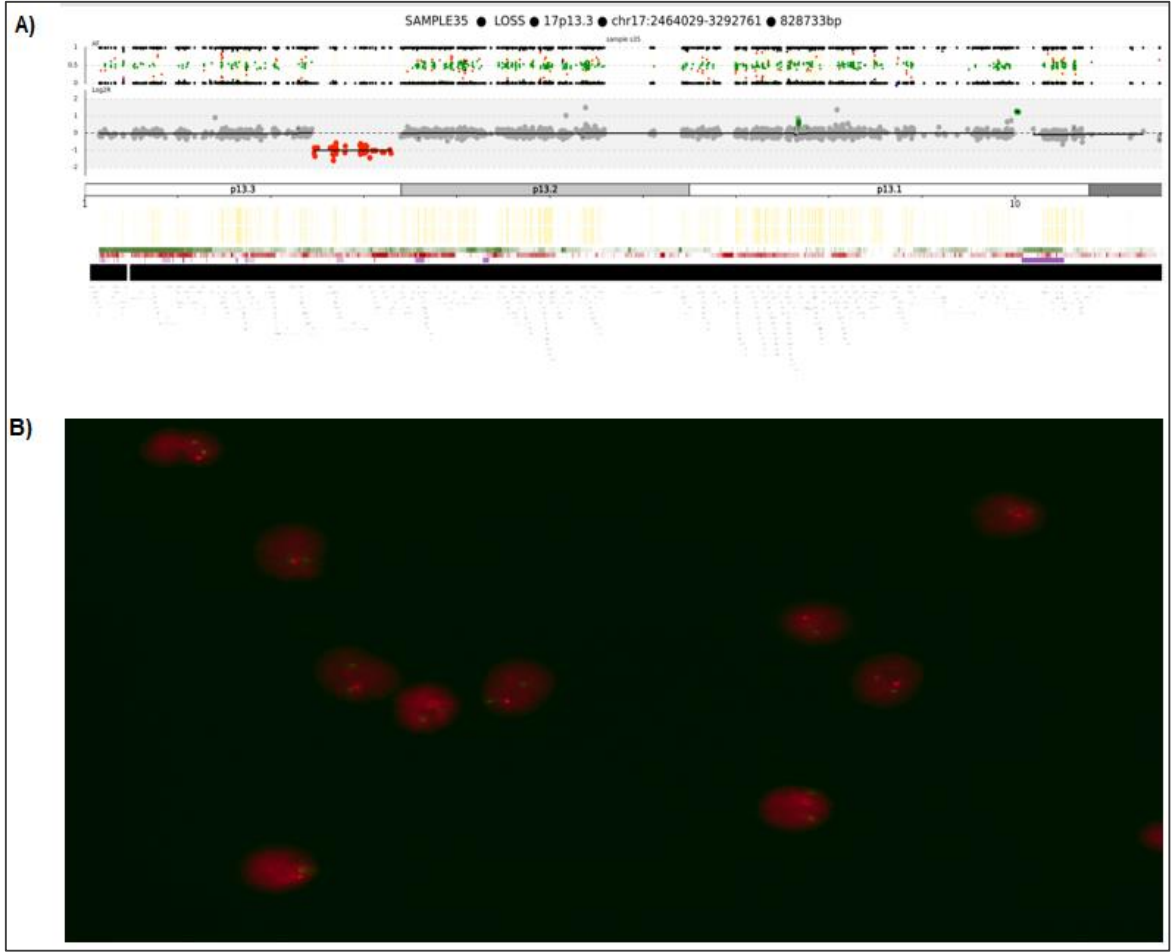
Tüm ekzom dizileme verileriyle yapılan biyoenformatik analiz sonucunda, 31 numaralı hastada 2q24.3 bölgesinde bulunan SCN2A geninde, 2 ekzonu (25 ve 26) içine alan 6.2 kb'lık heterozigot delesyon (kayıp) tespit edildi (Şekil 10, A). Söz konusu CNV'nin qPCR ile doğrulanmasına yönelik yapılan analizlerde, hem hastada hem de ebeveynlerde gen kopya sayısı normal düzeyde bulundu. Segregasyon analizi gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, CNVRobot aracı ile heterozigot delesyon olarak tahmin edilen varyasyon, deneysel verilerle doğrulanmadı. Elde edilen sonuçlar, ilgili bölgedeki CNV çağrısının yanlış pozitif olduğunu göstermektedir (Şekil 10, B ve C).



Şekil 10. CNVRobot aracı ile tespit edilen SCN2A genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması **(A)** Biyoenformatik analiz sonucunda, 2q24.3 bölgesinde log₂ oranının yaklaşık -0.68 olarak saptanması, bu bölgede heterozigot delesyon ile uyumlu bir sinyal azalmasına işaret etmektedir. **(B)** Karşılaştırmalı C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi kullanılarak yapılan qPCR analizinde, sağlıklı kontrol bireylerinde bu değer 1 olarak normalize edildi. Anne, baba ve hastaya ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri yaklaşık 1 olarak tespit edildi. **(C)** Yapılan analiz sonucunda hesaplanan rölatif gen kopya sayıları değerlendirildi. Kontrol bireylerde, anne, baba ve hastada yaklaşık 2 kopya tespit edildi. Bu bulgular, biyoenformatik analizde öngörülen heterozigot delesyon ile uyumlu değildir.

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 35 numaralı hasta

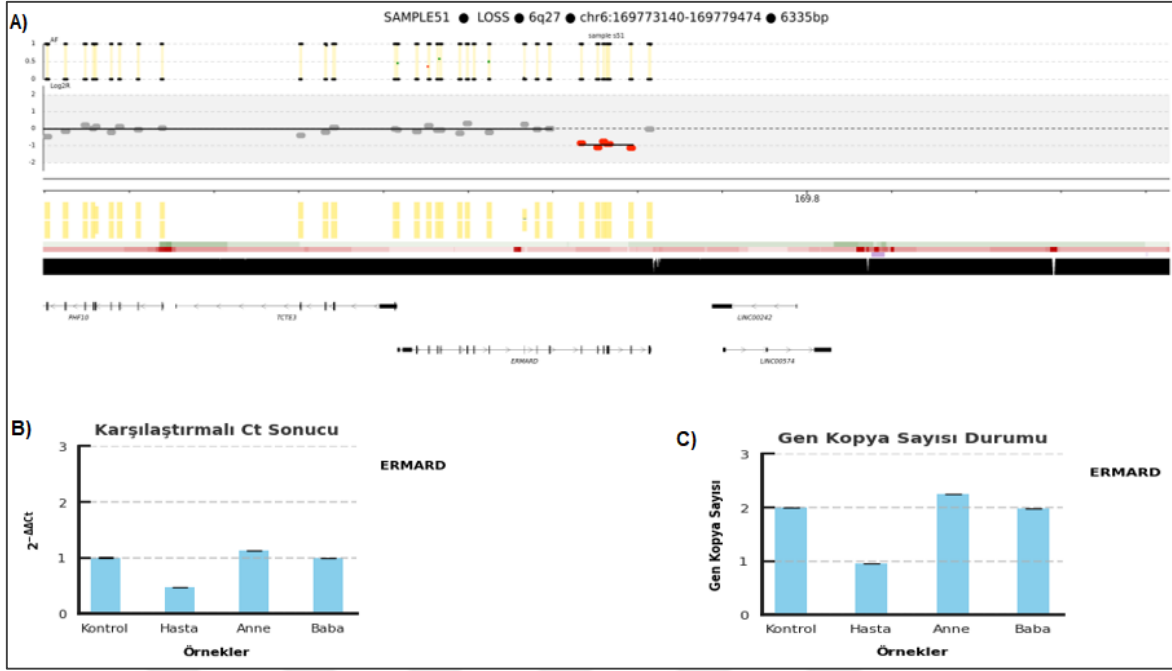
Tüm ekzom dizileme verilerinin biyoenformatik analizi sonucunda, 35 numaralı hastada 17p13.3 bölgesinde yer alan PAFAH1B1 geni ile birlikte toplam 13 geni kapsayan, yaklaşık 828.7 kb büyüklüğünde heterozigot delesyon tespit edildi. Bu bölgede $\log_2$ oranı değerlerinde belirgin bir azalma olup ve değerlerin yaklaşık -1 civarında seyretmesi, heterozigot kopya kaybı ile uyumludur. Segmentasyon analizi, delesyon bölgesinin sınırlarını net bir şekilde belirledi. Ayrıca, B-alel frekansı (BAF) analizinde, kayba işaret eden sinyal sapmaları gözlemlendi. Elde edilen bulgular, 17p13.3 bölgesinde bir kopya kaybının varlığını güçlü bir şekilde desteklemektedir (Şekil 11, A). Söz konusu kopya sayısı varyasyonu FISH yöntemi ile doğrulandı. Aile bireylerine ulaşılamadığı için doğrulama yalnızca hastaya ait DNA örneği üzerinden gerçekleştirildi. Biyoenformatik analizle tespit edilen CNV ile FISH bulgularının uyumlu olduğu belirlendi (Şekil 11, B).



Şekil 11. CNVRobot aracı ile tespit edilen 17p13.3 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonunun FISH ile doğrulanması **(A)** Biyoenformatik analiz sonucunda, 17p13.3 bölgesinde $\log_2$ oranının yaklaşık -1.00 olması, bu bölgede heterozigot delesyon ile uyumlu bir sinyal azalmasını göstermektedir. **(B)** FISH analizi kapsamında incelenen 50 hücrenin tamamında, 17p13.3 bölgesine özgü problemlara karşılık yalnızca tek bir sinyalin izlenmesi, bu kromozomal alanda heterozigot delesyonu işaret etmektedir.

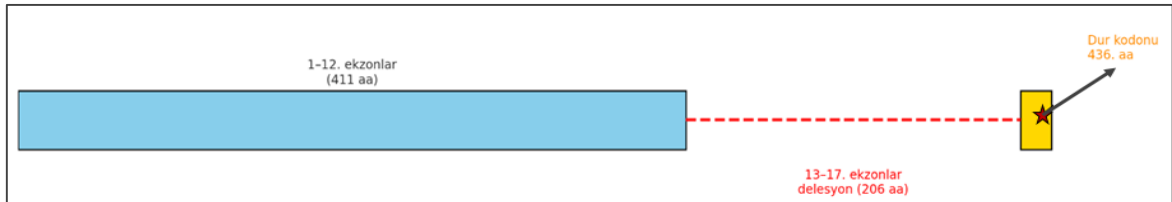
CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulanması: 51 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verileriyle yapılan biyoenformatik analiz sonucunda 51 numaralı hastada 6q27 bölgesindeki ERMARD geninde, 5 ekzonu (13-17) içine alan 6.3 kb'lik heterozigot delesyon (kayıp) tespit edildi (Şekil 12, A). İlgili CNV, qPCR ile değerlendirildi ve elde edilen veriler aile bireyleri arasında karşılaştırılarak segregasyon analizi yapıldı. Bu analiz sonucunda hastada heterozigot delesyon ile uyumlu bulgular elde edilirken, anne ve babada herhangi bir kopya kaybı tespit edilmedi. Segregasyon analizinin bu bulgularla birlikte değerlendirilmesi, söz konusu delesyonun kalıtsal olmadığını, *de novo* olarak ortaya çıktığını göstermektedir (Şekil 12, B ve C).



Şekil 12. CNVRobot aracı ile tespit edilen ERMARD genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması. **(A)** Hastaya ait WES verilerinin CNVRobot aracılığıyla gerçekleştirilen biyoinformatik analizinde, 6q27 bölgesinde log₂ oranının yaklaşık -0.95 olarak saptanması, bu bölgede heterozigot delesyon ile uyumlu bir sinyal azalmasına işaret etmektedir. **(B)** Karşılaştırmalı C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi kullanılarak yapılan qPCR analizinde, sağlıklı kontrol bireylerinde bu değer 1 olarak normalize edildi. Anne ve babaya ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri yaklaşık 1 olarak hesaplanırken bu değer hastada 0.5 olarak hesaplandı. **(C)** Yapılan analiz sonucunda hesaplanan rölatif gen kopya sayıları değerlendirildi. Kontrol bireylerde, anne ve babada 2 kopya tespit edilirken, hastada 1 kopya tespit edildi. Bu bulgular, hasta verilerinde CNVRobot ile tespit edilen heterozigot delesyon ile uyum sağlamaktadır.

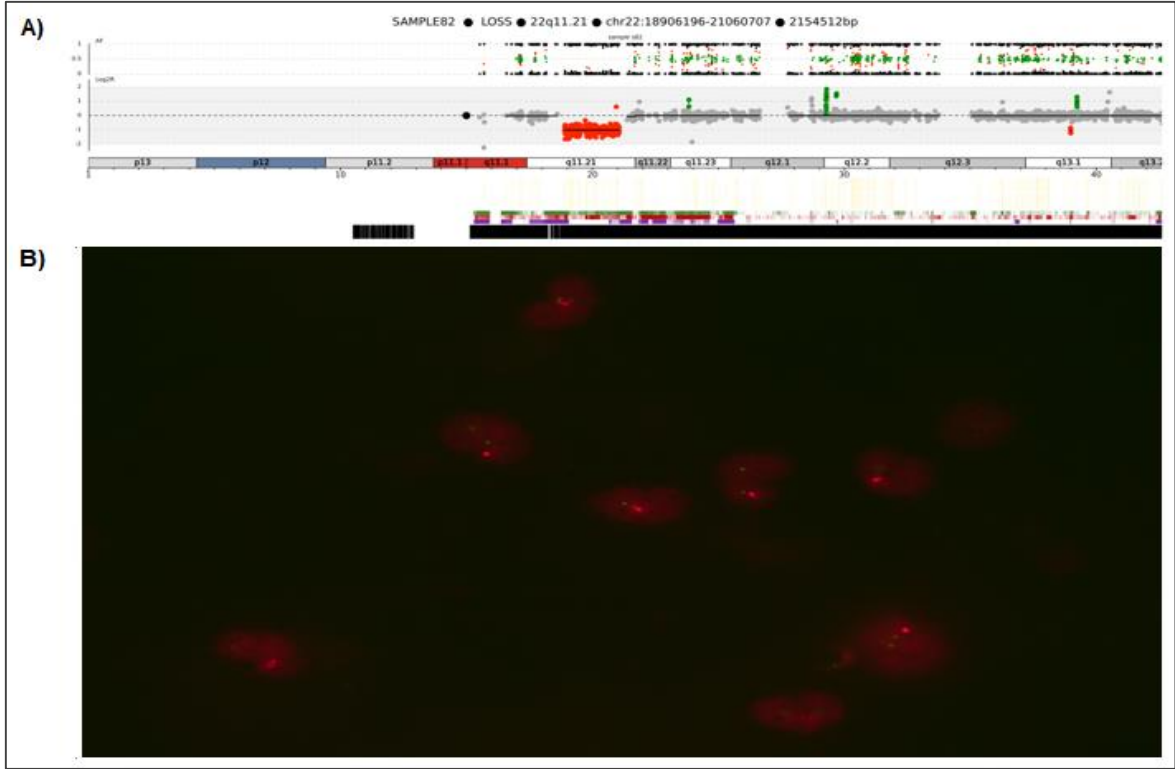
Gerçekleştirilen dizi analizi sonucu, ERMARD geninin 13–17. ekzonlarını kapsayan delesyonun 12. ekzon sonrası okuma çerçevesini bozduğu ve bunun protein dizisinin 436. pozisyonunda erken bir dur kodonuna yol açtığı saptandı (Şekil 10).



Şekil 13. ERMARD genindeki kopya sayısı kaybının protein düzeyindeki etkisi

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 82 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verilerinin biyoenformatik analizi sonucunda, 82 numaralı hastada 22q11.21 bölgesinde yer alan toplam 79 geni kapsayan, yaklaşık 2.1 mb büyüklüğünde heterozigot delesyon tespit edildi. Bu bölgede $\log_2$ oranı değerlerinde belirgin bir azalma gözlemlendi. Bu değerlerin yaklaşık -1 civarında seyretmesi, heterozigot kopya kaybı ile uyumludur. Segmentasyon analizi, delesyon bölgesinin sınırlarını net bir şekilde belirlemektedir. Ayrıca, B-alel frekansı (BAF) analizinde, kayba işaret eden sinyal sapmaları gözlemlendi. Elde edilen bulgular, 22q11.21 bölgesinde bir kopya kaybının varlığını güçlü bir şekilde desteklemektedir (Şekil 14, A). Tespit edilen kopya sayısı varyasyonu (CNV), floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile doğrulandı. Aile bireylerine ulaşamadığı için doğrulama yalnızca hastaya ait DNA örneği üzerinden gerçekleştirildi. Biyoenformatik analizle tespit edilen CNV ile FISH bulgularının uyumlu olduğu belirlendi (Şekil 14, B).

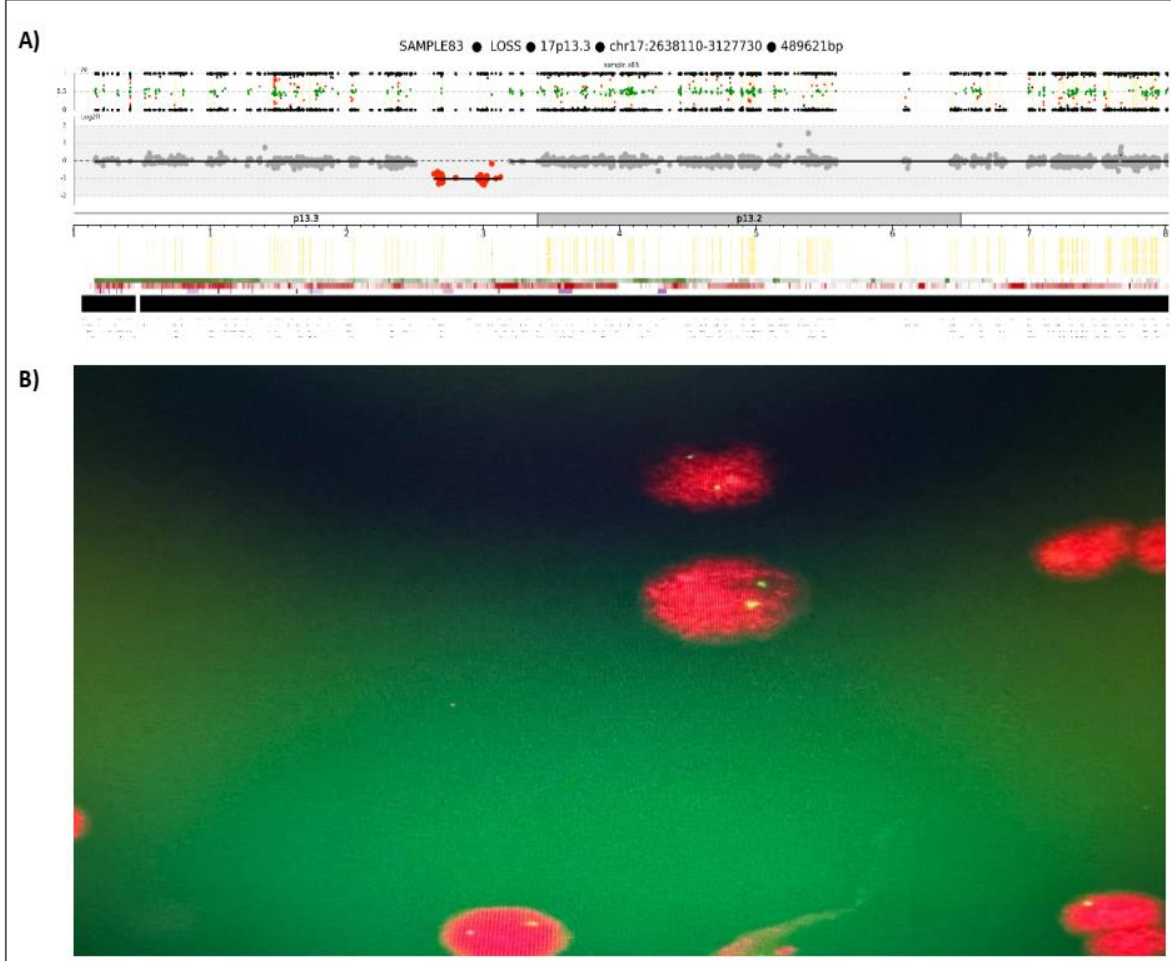


Şekil 14. CNVRobot aracı ile tespit edilen 22q11.21 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonunun FISH ile doğrulanması **(A)** Hastaya ait WES verilerinden CNVRobot aracı kullanılarak yapılan biyoenformatik analizde, 22q11.21 bölgesinde yaklaşık 2.15 Mb uzunluğunda bir kopya kaybı tespit edildi. Log₂ oranı değerlerinin yaklaşık -1.00 düzeyinde seyretmesi, bu bölgede heterozigot delesyon ile uyumlu bulundu. Ayrıca, B-alel frekansı (BAF) panelinde delesyon bölgesine karşılık gelen SNP sinyallerinde kayıp ve heterozigotluk kaybına işaret eden düzensizlikler gözlemlendi. Elde edilen bulgular, 22q11.21 bölgesinde tek kopya kaybı olduğunu desteklemektedir. **(B)** FISH analizi kapsamında incelenen 50 hücrenin tamamında, 22q11.21 bölgesine özgü problemlere karşılık yalnızca tek bir sinyalin izlenmesi, bu kromozom bölgesinde heterozigot delesyonu işaret etmektedir.

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulanması: 83 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verileri ile yapılan biyoenformatik analiz sonucunda, 83 numaralı hastada 17. kromozomun kısa kolunda yer alan 17p13.3 bölgesinde PAFH1B1 geni ile birlikte toplam 13 geni kapsayan, yaklaşık 489 kb uzunluğunda bir heterozigot delesyon tespit edildi. Log₂ oranı -1 seviyesine yakın azalma göstererek kopya sayısındaki kaybı ortaya koymaktadır. AF (allele frequency) panelinde 0.5 seviyesindeki heterozigot sinyallerin kaybolduğu ve uç değerlerde (0.0 ve 1.0) yoğunluk oluştuğu gözlemlendi. Bu bulgular, bölgedeki heterozigot delesyonu ve buna bağlı heterozigotluk kaybını desteklemektedir (Şekil 15, A). Moleküler doğrulama aile bireylerine ulaşamadığından

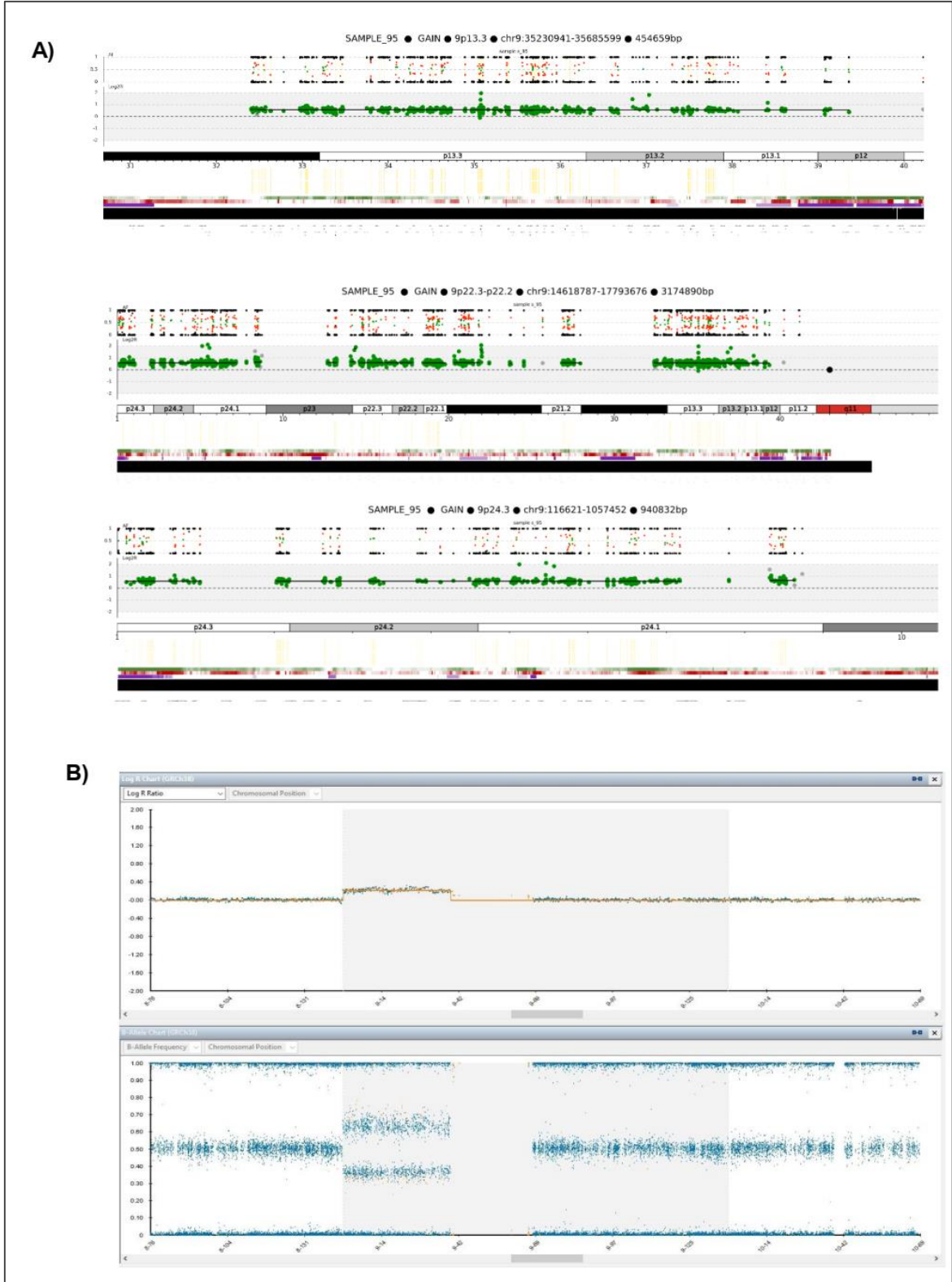
sadece hastaya ait DNA örneği ile gerçekleştirildi, segregasyon analizi yapılamadı. İlgili CNV'nin floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi sonucunda elde edilen bulgularla uyumlu olduğu gözlemlendi (Şekil 15, B).



Şekil 15. CNVRobot aracı ile tespit edilen 17p13.3 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonunun FISH ile doğrulanması **(A)** Biyoenformatik analiz sonucunda 17. kromozomun kısa kolunda yer alan 17p13.3 bölgesinde, kopya kaybı tespit edildi. $\log_2$ oranının -1 seviyesine yakın izlenmesi kopya sayısındaki azalmayı göstermektedir. AF panelinde 0.5 seviyesindeki heterozigot sinyallerin kaybolduğu ve uç değerlerde (0.0 ve 1.0) yoğunluk olduğu gözlemlendi. Bu bulgular, bölgedeki heterozigot delesyonu ve buna bağlı heterozigotluk kaybını desteklemektedir. **(B)** FISH analizi kapsamında incelenen 50 hücrenin tamamında, ilgili bölgeye özgü problara karşılık yalnızca tek bir sinyalin izlenmesi, bu kromozom bölgesinde heterozigot delesyonu işaret etmektedir.

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 95 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verileri ile yapılan biyoenformatik analizde, 95 numaralı hastada kromozom 9'un kısa kolunda (9p) yer alan ve yaklaşık 37.3 Mb uzunluğunda ardışık olmayan birden fazla duplikasyon bölgesi tespit edildi. 9p24.3'ten başlayıp 9p13.3–p12 bölgesine kadar uzanan ve 9p kolunun yaklaşık %83'ünü kapsayan bu CNV 200'den fazla protein kodlayan gen içermektedir. İlgili bölgede tespit edilen CNV'lerdeki $\log_2$ oranı değerlerinde belirgin bir artış gözlemlendi. Bu değerlerin 1'e yakın seyretmesi, kopya kazancı (trizomi) ile uyumludur (Şekil 16, A). Moleküler doğrulama süreci sadece hasta üzerinden gerçekleştirildi. SNP-array ile yapılan doğrulamada, aynı bölgede yaklaşık 38 Mb'lık kesintisiz bir duplikasyon bölgesi olduğu görüldü (Şekil 16, B). Bu farklılık, WES platformunun yalnızca kodlayıcı bölgeleri kapsamaması ve intronik/interjenik alanların yeterince örneklenmemesinden kaynaklanmaktadır. WES'in doğası gereği tespit edilen segmentler ayrı ayrı görünse de bunların bir bütün olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

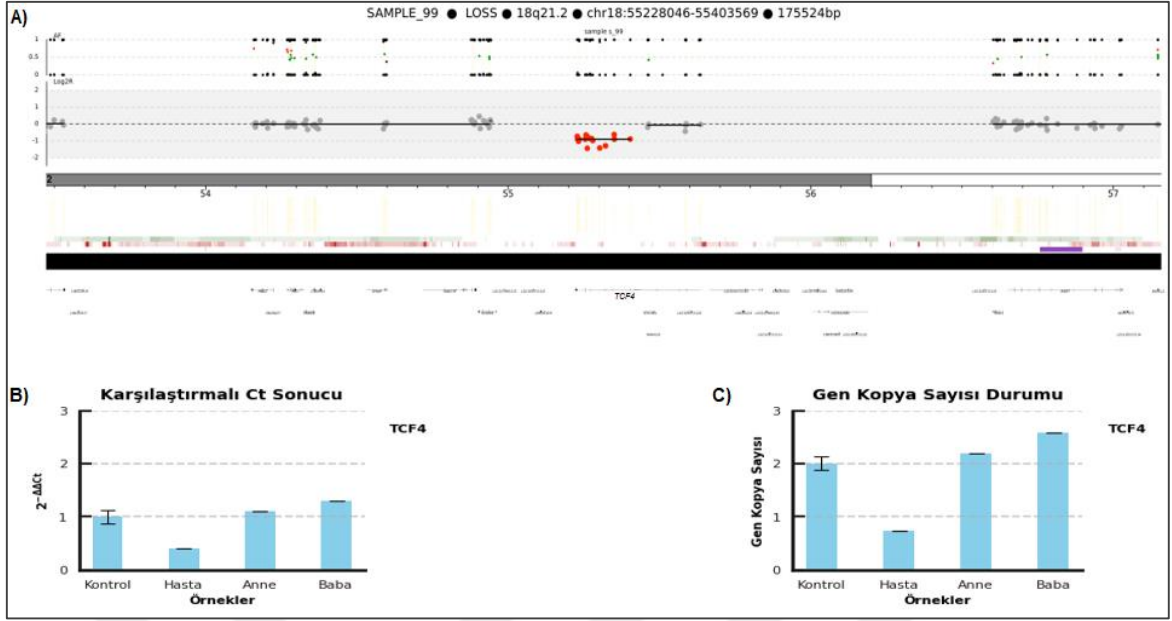


Şekil 16. CNVRobot aracı ile tespit edilen 9p duplikasyonunun SNP-array ile doğrulanması
(A) CNVRobot aracı kullanılarak yapılan analizde 9p24.3–p13.1 bölgesinde 20 adet duplikasyon, kesikli segmentler halinde tespit edildi. İlgili bölgenin başından, ortasından ve sonundan seçilen grafikler sunuldu. log₂ oranı değerlerinde pozitif kaymalar izlenmekte olup, bu bulgular duplikasyonla uyumludur. AF (Allele

Frequency) panelinde allel frekanslarının yaklaşık 0.33 ve 0.66 değerlerine kaydığı izlenmektedir. Bu üç bantlı dağılım paterni, duplikasyon durumlarında beklenen trizomi (x3) örüntüsüyle uyumludur. Her ne kadar bu segmentler ayrı ayrı görünse de, WES verisinin doğası gereği ve CNVRobot çıktılarındaki bu segmentler bir bütün olarak değerlendirilmelidir. **(B)** SNP-array doğrulama analizinde 9p24.3p13.1 bölgesinde kapsayan 38.7 Mb'lık kazanç tespit edildi. İlgili bölgede izlenen $\log_2$ oranı artışı ve üç bantlı BAF paterni, CNVRobot analizinde saptanan çoklu segmentlerin sürekli bir duplikasyonu temsil ettiği doğrulamaktadır.

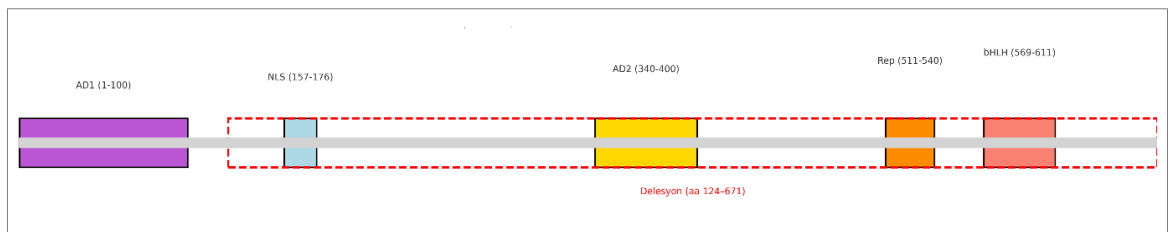
CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 99 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verileriyle yapılan biyoenformatik analiz sonucunda 99 numaralı hastada, 18q21.2 bölgesinde bulunan TCF4 geninde, 13 ekzonu (7-19) içine alan 175.5 kb'lık heterozigot delesyon (kayıp) tespit edildi (Şekil 17, A). İlgili CNV, qPCR ile değerlendirildi ve elde edilen veriler aile bireyleri ile karşılaştırılarak segregasyon analizi yapıldı. Bu analiz sonucunda hastada heterozigot delesyon ile uyumlu bulgular elde edilirken, anne ve babada herhangi bir kopya kaybı tespit edilmedi. Segregasyon analizinin bu bulgularla birlikte değerlendirilmesi, söz konusu delesyonun kalıtsal olmadığını, *de novo* olarak ortaya çıktığını göstermektedir (Şekil 17, B ve C).



Şekil 17. CNVRobot aracı ile tespit edilen TCF4 genindeki kopya sayısı varyasyonunun qPCR ile doğrulanması (A) CNVRobot aracılığıyla gerçekleştirilen biyoenformatik analizde, 18q21.2 bölgesinde log₂ oranının yaklaşık -0.90 olarak saptanması, bu bölgede heterozigot delesyon ile uyumlu bir kopya kaybına işaret etmektedir. (B) Karşılaştırmalı C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi kullanılarak yapılan qPCR analizinde, sağlıklı kontrol bireylerinde bu değer 1 olarak normalize edildi. Anne ve babaya ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri yaklaşık 1 olarak hesaplanırken bu değer hastada 0.5 olarak hesaplandı. C) Yapılan analiz sonucunda hesaplanan rölatif gen kopya sayıları değerlendirildi. Kontrol bireylerde, anne ve babada 2 kopya tespit edilirken, hastada 1 kopya tespit edildi. Bu bulgular, heterozigot delesyon ile uyum sağlamaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, CNV'nin anne veya babadan kalıtılmadığını, *de novo* olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

Yapılan dizi analiziyle bu varyantın, TCF4 proteininin 124–671. aminoasitlerini kodlayan diziyi kapsadığı ve bu bölgenin proteinin büyük bir kısmını oluşturduğu tespit edildi (Şekil 18).



Şekil 18. TCF4 proteininin fonksiyonel yapısı ve tespit edilen CNV'nin etkilediği bölge

CNVRobot ile tespit edilen CNV'nin moleküler doğrulaması: 102 numaralı hasta

Tüm ekzom dizileme verileriyle yapılan biyoenformatik analiz sonucunda, 102 numaralı hastada 15q13.2-q13.3 bölgesinde yer alan, 20 geni kapsayan 1.45 mb'lık heterozigot delesyon tespit edildi (Şekil 19, A). Elde edilen bulgular, ardından SNP-array analiziyle desteklendi; bu doğrulama analizinde aynı kromozomal bölgede yaklaşık 1.49 Mb'lık kopya kaybı gözlemlendi. Delesyonun moleküler düzeyde doğrulaması, yalnızca hastanın kendisine ait DNA örneği üzerinde gerçekleştirilebildi. SNP-array profilinde log2 ratio değerlerindeki belirgin azalma ve B-allel frekans (BAF) paternindeki üç bantlı yapının kaybolması, WES ile tespit edilen CNV'yi desteklemektedir (Şekil 19, B). WES ve SNP-array platformlarının uyumlu çıktıları, 15q13.2–q13.3 bölgesindeki delesyonun varlığını kuvvetle doğrulamaktadır.



Şekil 19. CNVRobot aracı ile tespit edilen 15q13.2-q13.3 bölgesindeki delesyonun SNP-array ile doğrulanması **(A)** Biyoenformatik analiz sonucunda, 15q13.2-q13.3 bölgesinde $\log_2$ oranı değerlerinin yaklaşık -1.00 olarak hesaplanması, heterozigot delesyon ile uyumlu bir kopyanın kaybına işaret etmektedir. Ayrıca, B-alel frekansı (BAF) panelinde delesyon bölgesine karşılık gelen SNP sinyallerinde heterozigotluk kaybını düşündüren sapmalar izlendi. Elde edilen bulgular, 15q13.2-q13.3 bölgesinde bir kopya kaybı olduğunu desteklemektedir. **(B)** SNP-array analizi sonucunda, 15q13.2-q13.3 bölgesinde yaklaşık 1.49 Mb büyüklüğünde bir heterozigot delesyon tespit edildi. Log Ratio grafiğinde, delesyon bölgesinde sinyal değerlerinin -0.5 seviyesine doğru kayması kopya sayısı kaybını yansıtmaktadır. B-allel frekansı (BAF) panelinde ise 0.5 seviyesindeki heterozigot sinyallerin kaybolduğu ve 0.0 ile 1.0 değerlerinde yoğunlaştığı gözlemlendi. Bu bulgular, bölgedeki heterozigot delesyonu ve buna bağlı heterozigotluk kaybını desteklemektedir.

1.45 Mb büyüklüğündeki bu delesyonun çok sayıda geni etkilediği, CHRNA7 geninde ilk dört ekzonu kapsayarak gen içerisinde sonlandığı ve transkripsiyon başlangıç bölgesi, 5' UTR, başlangıç kodonu ile ligand bağlanma bölgesinin bir bölümünü içerdiği tespit edildi (Şekil 20).



Şekil 20. 15q13.2–q13.3 bölgesinde saptanan 1.48 Mb’lık heterozigot delesyonun şematik gösterimi

4.3. İstatistik Analiz Sonuçları

Epilepsi tanısı alan toplam 146 hastanın tüm ekzom dizileme verileri değerlendirildi. Kısa varyant düzeyinde tanı konulamayan 102 hasta için ek olarak CNV analizi gerçekleştirildi ve filtreleme aşamaları sonrasında toplam 1185 CNV belirlendi. Bu analiz sonucunda, 10 hastada klinik açıdan anlamlı olabilecek CNV’ler tespit edildi. Bu varyantlardan 8’i moleküler doğrulama ile desteklendi; doğrulanan CNV’lerin 7’si patojenik, 1’i ise muhtemel patojenik olarak sınıflandırıldı. Doğrulanamayan iki CNV değerlendirme dışı bırakıldı (Tablo 6).

Tablo 6. CNV’lerin klinik anlamlılığı

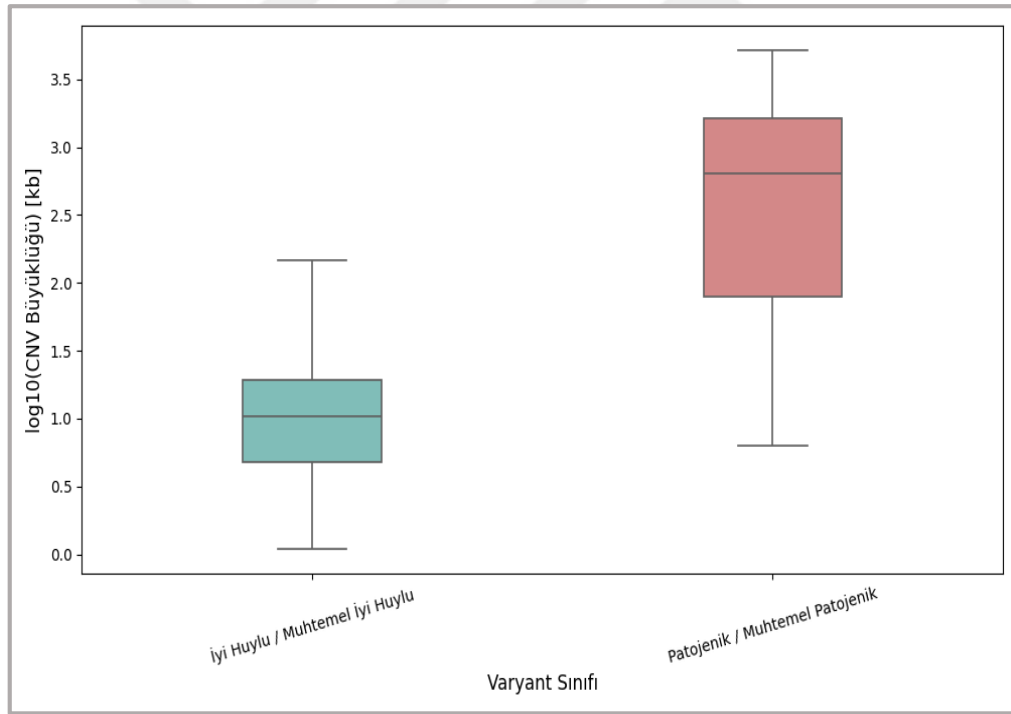
CNV Durumu/ Klinik Anlamlılık	Hasta Sayısı	Açıklama
Doğrulandı – Patojenik	7	Fenotip ile uyumlu
Doğrulandı– Muhtemel Patojenik	1	Fenotip ile büyük ölçüde uyumlu
Doğrulanamadı (Yanlış pozitif)	2	qPCR ile desteklenmedi, değerlendirme dışı

Yapılan moleküler doğrulama çalışması, CNVRobot aracının tanısal güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirildi. Biyoinformatik analizle saptanan 10 CNV’nin 8’i qPCR sonuçları ile uyumluyken, 2’si uyumsuz bulundu. Bu doğrultuda CNVRobot analizinin pozitif prediktif değeri (PPV) %80 olarak hesaplandı (Tablo 7). Bu sonuç, WES tabanlı CNV analizlerinde moleküler doğrulamanın gerekliliğini vurgulamaktadır.

Tablo 7. CNVRobot aracının doğrulama testlerine göre tanı performansı

Sonuç Durumu	Hasta Sayısı	Oran (%)
Doğrulandı (Doğru Pozitif)	8	80
Doğrulanamadı (Yanlış Pozitif)	2	20
Toplam	10	100

CNV'lerin klinik etkisini değerlendirmede, varyantın büyüklüğü önemli bir belirleyici faktör olarak kabul edilmektedir. Literatürde, özellikle büyük boyutlu kayıp ve kazançların patojenite ile daha güçlü ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, CNV büyüklüklerinin patojenik/muhtemel patojenik ve iyi huylu/muhtemel iyi huylu olarak sınıflandırılan gruplar arasında farklılık gösterip göstermediği incelendi. Şekil 21’de bu iki grup arasındaki CNV boyutlarının dağılımı görselleştirilmektedir.



Şekil 21. CNV büyüklüklerinin varyant sınıflarına göre dağılımı

Patojenik veya muhtemel patojenik olarak sınıflandırılan CNV'lerin, iyi huylu ya da muhtemel iyi huylu gruptaki varyantlara kıyasla belirgin şekilde daha büyük boyutlara sahip olduğu gözlemlenmiştir. İyi huylu grupta CNV'lerin çoğu küçük aralıklarda yoğunlaşırken, patojenik gruptaki varyantlar daha yüksek büyüklüklerde toplanma eğilimi göstermektedir.

Özellikle bu gruptaki CNV'lerin medyan uzunluğunun yaklaşık 1269 kb düzeyinde olması, klinik önem açısından dikkat çekicidir. Buna karşılık, iyi huylu grupta bu medyan değer yalnızca yaklaşık 11 kb civarındadır. Bu fark, büyük yapısal varyantların daha fazla sayıda geni veya düzenleyici bölgeyi etkileyerek hastalığa neden olabileceğini belirten literatür bilgileriyle de tutarlıdır (52).

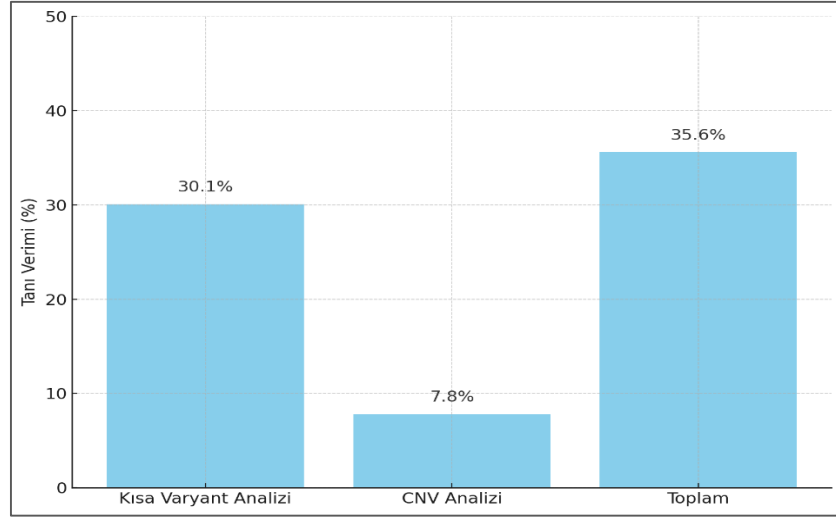
Klinik değerlendirme sonucu tanı koydurucu CNV'lerin tespit edildiği 8 epilepsi hastasının tamamında nörogelişimsel gecikme gözlenmektedir. Buna karşılık, CNV saptanmış olmasına rağmen tanı almayan 94 hastanın yalnızca 22'sinde bu klinik bulgu mevcuttur (Tablo 8). Tanı koydurucu CNV varlığı ile nörogelişimsel gecikme arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırıldı.

Tablo 8. Tanı koydurucu CNV varlığı ile nörogelişimsel gecikme arasındaki ilişki (Fisher's Exact Test)

	Nörogelişimsel Gecikme		Toplam	Fisher's Exact Test Sonucu
	(+)	(-)		
Tanı koydurucu CNV (+) (n=8)	8	0	8	OR= ∞ p = 0.003
Tanı koydurucu CNV (-) (n=94)	22	72	94	
Toplam	30	72	102	

Bulgular, tanı koydurucu CNV varlığının nörogelişimsel gecikme ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu ve bu klinik bulgunun CNV pozitif hastalarda belirgin şekilde daha sık ortaya çıktığını göstermektedir. Literatürde epilepsi hastalarında CNV tespit oranlarının genellikle %5–12 arasında değiştiği, ancak nörogelişimsel gecikme bulgularının eşlik ettiği olgularda bu oranın anlamlı düzeyde arttığı bildirildi (16). Bu çalışma da, söz konusu literatürle örtüşen biçimde, CNV'lerin epilepsi ile birlikte seyreden nörogelişimsel bozuklukların genetik temeline katkıda bulunduğunu ve fenotip ile ilişkili patojenik etkisini desteklemektedir.

Çalışma sonucunda 8 hastada patojenik veya muhtemel patojenik CNV tanımlandı. Buna göre, CNV analizi, kısa varyant analizi ile tanı konulamayan hastaların %7,8'ine ek tanı sağladı. SNV/InDel ve CNV birlikte değerlendirildiğinde, WES tabanlı genetik analizlerle toplam 146 hastanın %35,6'sında tanı koymak mümkün oldu (Şekil 22).



Şekil 22. Genetik tanı verimi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, epilepsi etiyolojisinde genomik varyantların tanısallık katkısını değerlendirmek amacıyla 146 hastaya ait tüm ekzom dizileme verileri kapsamlı biçimde analiz edildi ve kısa varyantlarla açıklanamayan olgularda WES-tabanlı CNV yaklaşımının klinik verimliliği incelendi. CNV'lerin tespiti ve moleküler doğrulanması sonucunda, tanı koydurucu varyantların belirgin bir bölümünün geniş genomik bölgeleri etkilediği ve özellikle nörogelişimsel gecikme fenotipi ile güçlü bir ilişki gösterdiği ortaya kondu. Patojenik/muhtemel patojenik CNV'lerin daha büyük yapısal değişiklikler içermesi ve nörogelişimsel yetersizlik eşlik eden hastalarda daha yüksek oranda saptanması, genomik instabilite ve nörogelişimsel bozukluklar arasındaki bilinen biyolojik ilişki ile uyumludur. Bu kapsamda, kısa varyant ve CNV analizlerinin birlikte değerlendirilmesi tanısallık oranı anlamlı ölçüde artırarak WES'in epilepsi genetiğinde çok boyutlu bir tanısallık araç olarak önemini yeniden ortaya koymaktadır. Bu bölümün ilerleyen kısımlarında, çalışmada tanımlanan CNV'ler hasta bazında ele alınarak, ilgili genlerin bilinen biyolojik rolleri, literatürde bildirilen benzer olgular ve hastalarda gözlenen klinik özellikler doğrultusunda genotip-fenotip ilişkisi ayrıntılı biçimde değerlendirilmektedir.

İnfanıl epileptik spazm sendromu (IESS) tanısı almış olan **1 numaralı hastada**, tipik yüz görünümüve epileptik spazm bulguları mevcuttur. Yapılan genetik analizler sonucunda nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili bir varyantın varlığı araştırıldı. IESS; epileptik spazmların yanı sıra, EEG'de hirsaritmisi veya gelişimsel durgunluk gibi ağır elektrografik bozuklukların eşlik ettiğı, ciddi bir gelişimsel epileptik ensefalopatidir. Bu klinik tablo, genellikle genetik kökenli, erken başlangıçlı ve progresif nörolojik disfonksiyonlarla ilişkilidir (75). Bu bağlamda, SYNJ1 geninde tanımlanan patojenik varyantların gelişimsel ve epileptik ensefalopatilerle ilişkili olduğu ve otozomal resesif kalıtım gösterdiği literatürde bildirildi (76, 77).

Hastaya ait tüm ekzom dizileme verilerinin biyoenformatik analizi sonucunda, 21q22.11 bölgesinde yer alan SYNJ1 geninde 7. ile 11. ekzonları kapsayan yaklaşık 7.2 kb'lik homozigot bir delesyon tespit edildi. log₂ oranında gözlenen yaklaşık -2 düzeyindeki azalma, bu bölgede her iki alelin kaybı ile uyumlu bulundu. Söz konusu CNV, qPCR ile moleküler düzeyde doğrulandı. Hastanın vefatı nedeniyle indeks vakada yeniden örnekleme yapılamamış olmakla birlikte, sağlıklı kardeş, anne ve babada saptanan heterozigot

delesyon, bu delesyonun otozomal resesif bir modelde homozigot olarak aktarıldığını dolaylı olarak gösterdi.

Genomik düzeyde tanımlanan bu delesyon, SYNJ1 transkriptinin 264. ile 451. amino asitlerini kodlayan bölgeyi kapsamaktadır ve bu aralık, proteinin Sac1 domaini (119–442 aa) içerisinde yer almaktadır (Şekil 8). Sac1 domaini, sinaptik vezikül geri dönüşümünde görevli fosfoinozitid fosfataz aktivitesinden sorumlu olup, özellikle PI(3)P ve PI(4)P gibi membran lipidlerinin defosforilasyonunu gerçekleştirerek nöronal sinyal iletiminde kritik bir rol üstlenmektedir (78). Bu domainin ortasından sonlarına kadar uzanan delesyonun, katalitik bölgenin yapısal bütünlüğünü bozarak fosfataz aktivitesinde fonksiyon kaybına (loss-of-function) yol açma olasılığının yüksek olduğu değerlendirildi. Nitekim, Sac1 domainini etkileyen mutasyonların epileptik ensefalopati (77) ve erken başlangıçlı Parkinsonizm (79) ile ilişkilendirildiği bildirildi. SYNJ1 geninde tespit edilen bu bulgu, DECIPHER veritabanındaki benzer klinik fenotiplerle de örtüşmektedir. SYNJ1 genini içeren daha büyük ölçekli kopya sayısı kayıplarının bildirildiği bireylerde gelişimsel gecikme, epilepsi, hipotoni ve nörogelişimsel bozukluklar gibi fenotipler tanımlanmaktadır. Bu bilgiler elde edilen delesyonun nöropatolojik önemini desteklemektedir.

ACMG/ClinGen 2020 kılavuzuna göre yapılan değerlendirmede, bu CNV'nin birden fazla patojenite ölçütünü karşıladığı belirlendi. Hastanın epileptik fenotipi ile yüksek özgüllükte uyum gösteren bir gen bölgesinin etkilenmiş olması ve SYNJ1 geninin OMIM ve literatür verilerine göre nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiş bir gen olarak tanımlanması, varyantın klinik anlamını destekledi. Delesyonun, Sac1 domainini doğrudan etkileyerek proteinin fonksiyonel bütünlüğünü bozduğu ve bu sayede fonksiyonel zarar potansiyeli taşıdığı gösterildi. Varyantın homozigot olarak izlenmiş olması ve aile bireylerinde heterozigot taşıyıcılık tespit edilmesi, otozomal resesif bir kalıtım modeliyle uyumlu segregasyon verileri sundu. Ayrıca, DECIPHER veritabanında SYNJ1 delesyonlarına sahip bireylerde benzer fenotiplerin (epilepsi, hipotoni, gelişimsel gecikme) bildirilmiş olması, klinik korelasyonu daha da güçlendirmektedir. Bu kapsamda, tespit edilen varyantın hastadaki epileptik fenotipin genetik temeliyle ilişkili primer etiyolojik neden olduğu kabul edildi. Tüm bu bulgular bir arada ele alındığında, söz konusu CNV, patojenik sınıfta değerlendirildi.

İki hastada (**35 ve 83 numaralı**) 17p13.3 kromozomal bölgesinde yer alan PFAH1B1 genini içeren mikrolelesyonlar tespit edildi. Biyoenformatik analiz sonucunda

35 numaralı hastada yaklaşık 827 kb büyüklüğünde, 83 numaralı hastada ise yaklaşık 490 kb büyüklüğünde heterozigot delesyonlar gözlemlendi. FISH yöntemiyle yalnızca hastalarda moleküler doğrulama yapıldı; ebeveynlere ise herhangi bir moleküler analiz uygulanmadı. Her iki delesyon da PAFAH1B1 geninin tamamını içermekte olup, sırasıyla 20 ve 12 geni kapsamaktadır. Miller-Dieker Lizensefali Sendromu (MDLS) tanısı almış her iki hastada da, sendromla uyumlu olarak lizensefali (beyin yüzeyinin düzleşmesi), infantil epileptik spazm, mikrosefali ve ağır zihinsel gerilik bulguları mevcuttur.

Miller-Dieker Lizensefali Sendromu, klasik tip lizensefali ile birlikte karakteristik yüz dismorfizmi, mikrosefali, epileptik nöbetler, hipotonik tonus ve ciddi nörogelişimsel gecikme ile seyreden, 17p13.3 bölgesini içeren mikrolelesyonlara bağlı nadir bir genetik bozukluktur (OMIM #247200). Sendromun genetik temelinde, başta PAFAH1B1 (LIS1) olmak üzere 17p13.3'teki genleri içeren daha geniş delesyonların da rol oynayabileceği diğer moleküler sitogenetik çalışmalarda gösterildi (80–83).

PAFAH1B1, hücre iskeletinin mikrotübül dinamiklerini düzenleyerek, embriyonik dönemde nöronların uygun kortikal katmanlara göçünü sağlar. Bu genin haplo yetersizliğine bağlı olarak nöronal migrasyon bozulmakta ve buna bağlı olarak kortikal displazi, lizensefali, mikrosefali ve epilepsi gelişmektedir (82, 84, 85). Her iki hastada da gözlenen mikrosefali ve epileptik ensefalopati, bu genetik bozukluk sonucu ortaya çıkan fizyopatolojik değişikliklerle uyumludur.

Delesyon boyutları farklı olmasına rağmen, her iki hastada da MDLS'nin klasik fenotipi gözlenmektedir. Bu durum, hastalık oluşumunda PAFAH1B1 geninin merkezi rolünü desteklemektedir. Bununla birlikte, birinci hastada saptanan daha geniş delesyon, PAFAH1B1 dışındaki ek genleri de içerdiğinden, fenotipin şiddetinde farklılaşmaya yol açabilecek potansiyel etkiler taşımaktadır (82). DECIPHER veritabanındaki 340175 ve 288735 numaralı hasta kayıtları da, 17p13.3 bölgesindeki benzer mikrolelesyonlarla birlikte mikrosefali, epileptik nöbetler, gelişimsel gecikme ve yapısal beyin anomalileri gibi fenotipik özellikler göstermektedir.

Sonuç olarak, her iki hastada da PAFAH1B1 genini içeren mikrolelesyonlar, epileptik ensefalopati ile seyreden Miller-Dieker Lizensefali Sendromu'nun nedenidir. Delesyonlar her iki olguda da heterozigot olarak saptanmış olup, hastalığın otozomal dominant kalıtım göstermesiyle uyumludur. Bu durum, tek alel kaybının fenotip üzerindeki belirleyiciliğini güçlü biçimde desteklemektedir. Delesyonların büyüklüğü ve kapsadıkları

gen sayısındaki farklılıklara rağmen, benzer fenotiplerin varlığı PAFAH1B1'in hastalık oluşumundaki belirleyici rolünü açıkça ortaya koymaktadır.

PAFAH1B1'in bilinen bir haplo-yetersizlik geni olması (ClinGen- Dosage ID: ISCA-25827), 35 ve 83 numaralı hastalarda gözlenen fenotiplerle güçlü genotip-fenotip uyumu göstermesi ve benzer mikrolelesyonların literatürde ayrıntılı biçimde tanımlanmış olması dikkate alındığında, her iki CNV de ACMG/ClinGen kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırıldı.

Epilepsi (rolandik epilepsi (SeLECTS), EE-SWAS) ve nörogelişimsel bozukluk bulguları (psikomotor gelişim geriliği, konuşma gecikmesi, entelektüel yetersizlik) gösteren **51 numaralı hastada**, 6q27 bölgesinde yer alan ERMARD (C6orf70) geninin 13–17. ekzonlarını içeren yaklaşık 6.3 kb'lik bir heterozigot delesyon tespit edildi. Delesyonun qPCR ile doğrulandığı ve anne-babada bulunmadığı dikkate alındığında, söz konusu varyantın *de novo* olduğu gösterildi.

ERMARD geninin fonksiyonunu aydınlatmak üzere yapılan bazı deneysel çalışmalar bu genin nörogelişimde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Beyin malformasyonları olan 155 hasta üzerinde gerçekleştirilen array-CGH analizinde, ERMARD genini içeren delesyon taşıyan 12 vaka bildirildi. Bu vakaların çoğunda gelişimsel gecikme (12/12), epilepsi (9/12), yüz dismorfizmi ve nöronal migrasyon bozuklukları rapor edildi. Aynı çalışmada, fare embriyosunda ERMARD geninin, nöronların ventriküler bölgede göç edemeyerek heterotopik nodüller oluşturmaya neden olduğu belirlendi. Buna karşılık, aynı bölgedeki diğer genler (örneğin PHF10, DLL1) susturulduğunda bu derece ağır migrasyon bozukluğu gözlenmediği bildirildi (86). Bu sonuçlar, ERMARD geninin nöronal göç için özgül bir işlevi olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, ERMARD proteininin HEPN (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding) süper ailesine ait olabileceği bildirildi. Bu süper aile, ribonükleik asit bozunması ve hücrel stres yanıtı ile ilişkili proteinleri içerir ve birçok üyesi RNA metabolizmasıyla ilişkilidir (87). Bu bilgiler ERMARD genindeki delesyonun yalnızca DNA düzeyinde bir eksiklik oluşturmakla kalmayıp, aynı zamanda gen ürününün fonksiyonunu bozarak nörogelişimsel bozukluklara katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Conti ve arkadaşlarının (86) tanımladığı 12 olgudan sekizinde delesyonun *de novo* olduğu, ikisinde ise etkilenen ebeveynlerden otozomal dominant şekilde kalıtıldığı bildirildi.

Bu çalışmada hastada saptanan delesyonun qPCR ile doğrulanarak *de novo* olduğu netleştirildi (etkilenmemiş anne-babada 2 kopya tespit edildi). Bu bulgu, patojenik varyantın kalıtsal bir geçişten değil, sporadik bir genomik yeniden düzenlenmeden kaynaklandığını göstermektedir. Aynı zamanda, söz konusu delesyonun heterozigot olması ve tek allel kaybının fenotipe neden olması, ERMARD geninde haplo-yetersizlik (haploinsufficiency; tek kopya yetersizliği) mekanizmasının etkili olduğunu desteklemektedir. Bu gendeki tek alelin kaybı ile hastalığın otozomal dominant kalıtım paterni ile ortaya çıkabileceği yönündeki literatür bulgularıyla uyumludur.

Tespit edilen delesyonun proteini nasıl etkileyebileceğine yönelik yapılan biyoenformatik analizde, 13–17. ekzonların çıkarılması sonucunda, 12. ekzonun normal çerçevesiyle sona erdiği; ancak 18. ekzonla birleşim sonrası okuma çerçevesinin bozulduğu belirlendi. Bu çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu, protein dizisinin 436. amino asidinde erken bir dur kodonunun (stop kodon) oluşmasına yol açmaktadır (Şekil 13). Oluşan bu dur kodonu, 18. ekzonun translasyonel olarak çok erken bir pozisyonunda yer aldığından ve son splice birleşim noktasının 50–55 nükleotid yukarısında bulunduğundan, mRNA'nın nonsense-mediated decay (NMD) mekanizması tarafından yıkıma uğraması olasıdır (88).

Bu bulgular, ACMG/ClinGen 2020 yönergelerine göre değerlendirildiğinde, delesyonun fonksiyon kaybına (loss-of-function) neden olmasından dolayı çok güçlü bir patojenite kanıtı olarak ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, sunulan klinik tablo, literatürdeki benzer vakalar ve moleküler analiz bulguları birlikte değerlendirildiğinde, ERMARD geninde saptanan bu *de novo* delesyonun, epileptik ensefalopati ve nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili, muhtemel patojenik bir varyant olduğu düşünülmektedir.

Sendromik yüz görünümü, bilateral tonik-klonik nöbetler ve gelişimsel gerilik bulguları görülen **82 numaralı hasta** genetik değerlendirmeye alındı. Klinik bulgular, DiGeorge Sendromu ile uyumluluk göstermektedir. Bu sendrom, paratiroid bezlerinin hipoplazisine bağlı neonatal hipokalsemi (tetani ya da nöbet şeklinde görülebilen) ve T hücre yetersizliğine bağlı immün yetmezlik gibi bulgularla karakterizedir (22q11.2 delesyon sendromu; OMIM #188400).

Hastada 22q11.21 bölgesinde yaklaşık 2.1 Mb büyüklüğünde heterozigot mikrolelesyon saptandı. Bu delesyon, TBX1, DGCR6, CRKL ve COMT dahil olmak üzere toplam 79 geni kapsamaktadır. Moleküler doğrulama FISH yöntemiyle yalnızca hastada

gerçekleştirildi. Aile bireylerine moleküler test uygulanmadığı için kalıtsal olup olmadığı belirlenememekle birlikte, DiGeorge sendromu çoğunlukla otozomal dominant kalıtsal olup, vakaların yaklaşık %90'ında delesyon *de novo* olarak ortaya çıkmaktadır (89).

Delesyon, fenotipin genetik temelleri açısından değerlendirildiğinde oldukça anlamlıdır. TBX1, embriyonik gelişimde faringeal ark (baş-boyun gelişmesindeki başlangıç noktaları) yapılarının oluşumunu düzenler; kalp, timus, paratiroid ve kraniofasial gelişim için kritik bir gendir (90). CRKL, büyüme ve hücre proliferasyonu sinyalleme yollarında görev almakta ve kalp gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (91). COMT ise dopamin metabolizmasında yer almakta olup, 22q11.2 delesyon sendromlu bireylerde gözlenen nöropsikiyatrik bulgularla ilişkilendirilmektedir (92). Bu genlerin kaybı, sendromun klinik çeşitliliğini açıklamada önemli bir rol oynamaktadır.

Epilepsi, DiGeorge sendromu ile birlikte görülen bir bulgudur. 22q11.2 delesyon sendromlu genç bireylerin %15'inde epilepsi görüldüğü, nöbetlerin genetik veya yapısal kökenli olabileceği bildirildi (93). Bu sendroma sahip hastalarda jeneralize tonik-klonik ve miyoklonik ve fokal nöbetlerin sık görüldüğü, ayrıca genetik jeneralize epilepsi ve juvenil miyoklonik epilepsi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (94–96). Ek olarak 82 numaralı hasta tespit edilen CNV, DECIPHER veritabanında kayıtlı olan 287518, 517509, 503294 ve 487134 numaralı hastalarla genetik ve klinik açıdan yüksek derecede örtüşmektedir. Bu durum, saptanan CNV'nin fenotipik etkilerle güçlü ilişkisini desteklemektedir.

ACMG/ClinGen 2020 kılavuzları temel alındığında, bu delesyon; haplo-yetersizlik geni olarak tahmin edilen TBX1'i içermesi (ClinGen, Dosage ID:ISCA-31275), toplamda 79 geni kapsamaması, klinik fenotip ile güçlü genotip uyumu göstermesi ve literatürde tekrarlayan biçimde tanımlanmış olması nedeniyle patojenik olarak sınıflandırıldı.

Yapılan genomik analizler sonucunda **95 numaralı hastada** kromozom 9'un kısa kolunda (9p) yer alan ve yaklaşık 37.3 Mb uzunluğunda ardışık olmayan birden fazla duplikasyon bölgesi tespit edildi. Bu duplikasyon 9p24.3'ten başlayıp 9p13.3–p12 bölgesine kadar uzanmakta ve 9p kolunun yaklaşık %83'ünü kapsamaktadır. SNP-array ile yapılan doğrulamada, aynı bölgede yaklaşık 38 Mb'lık kesintisiz bir duplikasyon bölgesi olduğu görüldü. Bu farklılık, WES platformunun yalnızca kodlayıcı bölgeleri kapsamaması ve intronik/interjenik alanların yeterince örneklenmemesinden kaynaklanmaktadır. Genetik varyantın, büyük ölçekli oluşu ve içerdiği gen sayısının fazlalığı dikkate alındığında, fenotipik etkiler açısından anlamlı olduğu düşünülmektedir. Hastada gözlenen gelişimsel

gecikme, entelektüel yetersizlik, konuşma bozukluğu ve epileptik nöbetler, daha önce 9p duplikasyonu sendromu ile ilişkilendirilmiş fenotiplerle büyük ölçüde örtüşmektedir.

9p duplikasyon sendromu, kromozom 9'un kısa kolunun tamamının veya bir kısmının duplikasyonu sonucu ortaya çıkan nadir bir kromozomal anomalidir. Klinik tablo heterojen olmakla birlikte; dismorfik yüz bulguları, gelişimsel ve motor gecikme, entelektüel yetersizlik, konuşma ve dil bozuklukları, hipotoni ve epilepsi gibi nörogelişimsel belirtiler sık gözlenmektedir. Duplikasyonun genişliği ve içerdiği genlerin tipine göre fenotipin ağırlığı değişebilmektedir (97, 98).

Literatürde, 9p duplikasyonlarının, epileptik nöbetlerle birlikte görülen klinik tablolarla ilişkili olduğu bildirildi (99). Bir başka çalışmada, 9p duplikasyonu olan 27 yaşında bir erkekte kompleks parsiyel nöbetler, multifokal epileptiform aktivite, korpus kallozum ve serebellum atrofisi ve beyaz cevher hipoplazisi gibi yapısal beyin anomalilerine dikkat çekildi; bu bulgularla epileptogenez arasında güçlü bir ilişki önerildi (100).

Epilepsinin duplikasyonun kapsadığı bazı genlerin dozaj dengesine duyarlılığıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, 9p24.3 bölgesinde yer alan özellikle DOCK8 ve KANK1 gibi genlerin, epileptik fenotipin oluşumunda katkı sağladığı ileri sürülmektedir. DOCK8, aktin sitoskeletonunun düzenlenmesi, sinaptik plastisite ve nöronal göç gibi nörogelişimsel süreçlerde rol oynamaktadır. Protein düzeyindeki artışın, sinaptik bağlantıların aşırı ve düzensiz oluşmasına yol açarak nöral ağ bütünlüğünü bozabileceği; dolayısıyla epileptogenez ve bilişsel işlev kayıplarına zemin hazırlayabileceği düşünülmektedir. DOCK8 duplikasyonları, otizm spektrum bozukluğu, dil bozukluğu, gelişimsel gecikme ve epilepsi ile ilişkili olarak tanımlanmaktadır. Benzer şekilde, KANK1 geni de aktin polimerizasyonu, hücre polaritesi ve nöronal migrasyon gibi süreçlerde görev almakta; aşırı ekspresyonu, serebral yapılar arasında bağlantı bozukluklarına ve epileptik nöbetlere neden olabilmektedir (101–103).

Hastada saptanan CNV, DECIPHER veritabanında kayıtlı bazı hastalarla fenotipik ve genotipik açıdan büyük ölçüde örtüşmektedir. Özellikle epilepsi, gelişimsel gecikme ve konuşma bozukluğu bulgularına sahip olan 337635, 331091, 308282 ve 285781 numaralı hastalarda bildirilen 9p duplikasyonları, 95 numaralı hasta ile benzer büyüklük ve gen içeriğine sahiptir. Bu paralellik, varyantın klinik anlamlılığını güçlendirmektedir.

ACMG/ClinGen, 2020 kılavuzuna göre CNV'lerin değerlendirilmesinde duplikasyonun büyüklüğü, içerdiği gen sayısı ve fenotip-genotip örtüşmesi gibi kriterler

dikkate alınmaktadır. Bu vakada duplikasyonun 37.3 Mb gibi oldukça geniş bir bölgeyi kapsaması ve 200'den fazla protein kodlayan gen içermesi; literatürde benzer genotip-fenotip birlikteliğinin tanımlanmış olması ve DECIPHER'da fenotiple örtüşen klinik olarak anlamlı vakaların mevcut olması dikkate alındığında, CNV'nin patojenik olarak sınıflandırılması uygun görüldü.

Pitt-Hopkins sendromu ile fenotipik olarak uyumlu epileptik bulgular (gelişimsel gecikme, zihinsel engellilik, hiperventilasyon, dismorfik yüz görünümü, epileptik spazm) gösteren **99 numaralı hastada**, TCF4 genine ait 7–19. ekzonlarını kapsayan yaklaşık 175.5 kb'lik heterozigot bir delesyonun varlığı belirlendi. Bu yapısal varyant, tüm ekzom dizileme (WES) verileri üzerinden elde edilen biyoinformatik analizle tanımlandı ve qPCR ile doğrulandı. Aile bireyleriyle yapılan segregasyon analizi sonucunda, delesyonun *de novo* olarak ortaya çıktığı görüldü. Varyant, TCF4 proteininin 124–671. aminoasitlerini kodlayan bölgeyi ortadan kaldırmakta olup, bu alan protein yapısının büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Şekil 18).

TCF4, temel heliks-ilmek-heliks (bHLH) yapısına sahip bir transkripsiyon faktörüdür ve nöral gelişim süreçlerinde geniş bir etki yelpazesine sahiptir. Bu protein, kortikal gelişim, nöronal göç, sinaptogenez ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesi gibi olaylarda kritik roller üstlenmektedir. Yapısal olarak; transkripsiyon aktivasyon domainleri (AD1, AD2), nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), represör domain (Rep) ve DNA'ya bağlanma/dimerizasyonu sağlayan bHLH domaini gibi fonksiyonel bölgeleri içermektedir (104, 105). Şekil 21'de gösterildiği üzere, tespit edilen delesyon, bu fonksiyonel domainlerin çoğunu kapsamakta olup, proteinin çekirdeğe lokalizasyonu, DNA'ya bağlanması ve transkripsiyonel düzenleme fonksiyonlarını engellemektedir.

Pitt-Hopkins sendromu (PTHS), TCF4 genindeki heterozigot patojenik varyantlarla ilişkili, otozomal dominant kalıtılan, nadir görülen bir nörogelişimsel sendromdur. Klinik olarak ağır gelişimsel gerilik, konuşma gecikmesi veya yokluğu, hipotonisite, tipik yüz görünümü, solunum düzensizlikleri (hiperventilasyon ve apne atakları) ve epileptik nöbetlerle karakterizedir (106, 107). PTHS vakalarının %40–60'ında epilepsi bildirilmiş olup; jeneralize tonik-klonik, absans, atonik, fokal nöbetler ve epileptik ensefalopati gibi değişken bir nöbet spektrumu tanımlanmıştır (108). Bu yönüyle, epilepsi Pitt-Hopkins sendromunun fenotipik yelpazesinde önemli bir klinik bulgu olarak öne çıkmaktadır.

ACMG/ClinGen tarafından 2020 yılında güncellenen yapısal varyant değerlendirme kılavuzu doğrultusunda yapılan analizde, bu CNV'nin klinik açıdan anlamlı olduğu değerlendirildi. TCF4 geninin Pitt-Hopkins sendromu ile güçlü biçimde ilişkilendirildiği ve hastanın klinik fenotipinin bu sendromla yüksek özgüllükte örtüştüğü gözlemlendi (106, 108). Tespit edilen delesyonun, TCF4 proteininin transkripsiyonel aktivasyon, çekirdek lokalizasyonu ve DNA bağlanma gibi fonksiyonlarından sorumlu olan yapısal bölgeleri (NLS, AD2, Rep ve bHLH) kapsadığı belirlendi. Bu durum, proteinin fonksiyonel bütünlüğünün ciddi biçimde bozulduğuna işaret etmektedir. Bunlara ek olarak, DECIPHER veritabanında bu vakadaki CNV ile benzer konumda yer alan yapısal varyantlara sahip bireylerde, zihinsel gelişim geriliği, nöbetler (örneğin jeneralize tonik ve absans), mikrosefali ve dismorfik yüz görünümü gibi fenotiplerin bildirildiği ve bu varyantların patojenik olarak sınıflandırıldığı gözlenmektedir (Hasta no: 248721, 265727, 259631). Ayrıca aynı veritabanında TCF4 genine ait pLI skorunun 1.00 olarak raporlanmış olması, bu genin fonksiyon kaybına (loss-of-function) sebep olan varyantlara karşı yüksek düzeyde intolerant olduğunu göstermekte ve delesyonun patojenitesini desteklemektedir. Bu bulgular, TCF4'ün haplo-yetersizlik yoluyla hastalıkla ilişkilendirilebileceğini ortaya koyan genom çapındaki analizlerle de tutarlıdır (109). Genetik analiz bulguları, tespit edilen CNV'nin etkilediği protein bölgeleri ile hastanın klinik fenotipi arasındaki özgül uyum birlikte ele alındığında, TCF4 geninde saptanan yapısal varyant patojenik olarak değerlendirildi.

Jeneralize tonik-klonik nöbetler (GTCA), belirgin entelektüel yetersizlik, konuşma bozukluğu ve dismorfik yüz bulguları ile başvuran **102 numaralı hasta** için yapılan moleküler analizlerde, 15q13.2–q13.3 bölgesinde yaklaşık 1.48 Mb büyüklüğünde bir heterozigot delesyon tespit edildi. Toplam 20 geni kapsayan bu delesyon, özellikle CHRNA7 geninin ilk dört ekzonunu içermektedir. FISH analizi yalnızca proband bireyde gerçekleştirildi ve delesyon doğrulandı; ebeveynlere yönelik herhangi bir moleküler test yapılamadı.

Tespit edilen delesyonun yer aldığı bölge, klinik olarak tanımlanmış 15q13.3 mikrolelesyon sendromu ile örtüşmektedir. Bu sendrom, epilepsi, öğrenme güçlüğü, konuşma gecikmesi, entelektüel yetersizlik, otizm spektrum bozukluğu ve davranışsal sorunlarla karakterize edilen değişken fenotipli bir mikrolelesyon tablosu olarak tanımlanmaktadır (110). Sendromun, bazı olgularda yalnızca hafif nörogelişimsel belirtilerle

sınırlı kaldığı, bazı olgularda ise dirençli epilepsi ve ciddi entelektüel yetersizlik ile birlikte görüldüğü bildirildi. Bu sendromun en temel genetik bileşeni, çoğunlukla CHRNA7 genini içeren heterozigot delesyonlardır (111, 112). Bu hastada gözlenen nörolojik ve gelişimsel bulgular, 15q13.3 mikrodelesyon sendromunun literatürde tanımlanmış fenotipik spektrumu ile yüksek düzeyde örtüşme göstermektedir (110). DECIPHER veritabanında, aynı genomik bölgeyi içeren ve benzer fenotipik özellikler gösteren kayıtlar (hasta no: 369850, 299881, 432942), 102 numaralı hastada tespit edilen genotip-fenotip ilişkisinin tutarlılığını desteklemektedir.

CHRNA7 genini içeren delesyon, hastada gözlenen fenotipin genetik temelini açıklamaya katkı sağlamaktadır. CHRNA7, merkezi sinir sisteminde $\alpha 7$ tipi nikotinik asetilkolin reseptör alt birimini kodlayan bir gendir. Bu reseptörler, nöronal eksitabilite, sinaptik iletim, öğrenme ve bellek gibi nörolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bir iyon kanalı proteinini kodlayan CHRNA7 geni, nöbet fenotiplerinin moleküler temelleri açısından önemli bir aday gen olarak değerlendirilmektedir. Özellikle idiyopatik jeneralize epilepsi (IGE) tanısı alan bireylerin yaklaşık %1'inde CHRNA7 delesyonlarının saptanmış olması, bu genin epileptogenezdeki rolünü desteklemektedir. Bununla birlikte, CHRNA7 geni, 15q13.3 bölgesindeki kopya sayısı varyasyonları (CNV) ile ilişkili olguların çoğunda bildirilen nörogelişimsel ve nöropsikiyatrik belirtilerin etiolojisinde de olası bir katkı sağlayan aday genlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Kalıtım paterni açısından, CHRNA7 delesyonlarının otozomal dominant aktarıldığı bilinmektedir (111, 113). Şekil 20'de kırmızı renkle temsil edilen delesyon, birçok geni kapsamakta olup CHRNA7 geninin yalnızca ilk dört ekzonunu içermektedir. Delesyon, bu ekzonları da kapsayacak şekilde genin içinde sonlanmaktadır. CHRNA7 geninin ilk dört ekzonunu da içeren bu büyük boyutlu delesyon, genin transkripsiyon başlangıç bölgesini, 5' UTR'yi, başlangıç kodonunu ve ligand bağlanma bölgesinin bir kısmını kapsamaktadır. Böylece fonksiyonel protein üretimini engellenmekte ve haplo-yetersizlik yoluyla fenotipe neden olduğu düşünülmektedir.

Bu hastada tespit edilen CHRNA7 delesyonu, fonksiyonel proteinin sentezlenmesini engelleyen bir varyasyondur. Bulgular, CHRNA7 geninin haplo-yetersizlik mekanizması ile epileptogenezdeki rolünü güçlü şekilde desteklemektedir. Tespit edilen CNV, ACMG/ClinGen kriterleri uyarınca hastanın fenotipiyle uyumlu olduğu ve literatürde

tanımlanmış 15q13.3 mikrodelsiyon sendromu ile örtüştüğü için patojenik olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada epilepsi hastalarında CNV tespitine yönelik WES tabanlı yaklaşımın klinik tanıya anlamlı katkı sağladığı gösterildi. Tespit edilen varyantların, fenotipik bilgiler ve kuramsal çerçeve eşliğinde değerlendirilmesiyle elde edilen ve moleküler doğrulama ile desteklenen bulgular, epilepsinin genetik altyapısına güçlü kanıtlar sunmaktadır. 146 hastadan oluşan kohortta kısa varyant analizi 44 hastada (%30.1) tanı ile sonuçlandı; bunu takiben uygulanan CNV analizi 8 hasta için (%7.8) daha tanı sağladı ve bütüncül değerlendirme sonucunda toplam tanı oranı 52/146 (%35.6) düzeyine ulaştı. CNV taramasının yalnızca kısa varyantla tanı alamayan 102 hastaya uygulanması, tanı verimini %5.5 puan artırdı.

Epilepsi, genetik etiyolojisinde belirgin heterojenlik ve karmaşıklık sergileyen bir nörolojik bozukluktur. Bu çalışmada değerlendirilen hastalarda gözlenen fenotipik çeşitlilik, altta yatan genetik nedenlerin çok katmanlı olabileceğine işaret etmektedir. Saptanan CNV'lerin bir bölümü yalnızca epilepsiyle değil, diğer nörolojik bozukluklarla da ilişkili olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, epilepsiye eşlik eden nörogelişimsel gecikme bulguları olan hastalarda CNV saptanma sıklığının daha yüksek olduğu ve bu ilişkinin istatistik olarak anlamlı olduğu gösterildi. Bu bulgular, epilepside genotip-fenotip çeşitliliğinin değerlendirilmesinde kapsamlı genomik testlerin (WES tabanlı CNV analizi dâhil) önemini vurgulamaktadır.

Doğrulama süreçlerinde, qPCR/SNParray/FISH ile incelenen CNV'lerin 8/10'u teyit edildi, iki CNV yanlış pozitif olarak değerlendirildi. Analitik bulgular, patojenik CNV'lerin daha büyük olma eğilimini desteklerken; epilepsiyle ilişkili gen veya dozaj-duyarlı bir bölgeyi kapsayan küçük boyutlu CNV'lerin de klinik tanıya doğrudan katkı sağlayabildiği gözlemlendi. Bu sonuçlar, WES tabanlı CNV analizinin kısa varyant incelemesini tamamlayan ve klinik iş akışında karar desteği sunan bir bileşen olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. WES tabanlı CNV analizi, hedef bölgeler dışındaki genomik alanları kapsamaması nedeniyle ekzon-dışı veya intronik yapısal değişikliklerin değerlendirilmesine olanak vermemektedir. Ayrıca, genomik yeniden düzenlenmelerin tamamını ortaya koyabilecek tüm genom dizileme (WGS) yapılmamış olması da çalışmanın kapsamını sınırlandırmaktadır. Bunun yanı sıra, teorik olarak en az üç prob içeren CNV'lerin daha yüksek doğrulukla tespit edilebildiği bilinmekle birlikte, bu

çalışmada epilepsiyle ilişkili kritik genlerde yer alan bazı iki problu CNV çağrılarını olası klinik önemleri nedeniyle dışlanmayıp qPCR ile doğrulama sürecine alındı. Ancak bu varyantların yanlış pozitif olduğunun gözlenmesi, düşük prob sayısının özellikle sınırlı kapsamaya sahip ekzonlarda CNV çağrılarının güvenilirliğini azaltabileceğini göstermektedir.

Gelecek çalışmalar açısından, daha geniş ve iyi tanımlanmış kohortlarda yürütülecek çok merkezli analizlerin, epilepside yapısal varyant spektrumunu ayrıntılandırarak genotip–fenotip ilişkisinin daha net ortaya konmasına katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Özellikle fenotip derinleştirilmesi, standartlaştırılmış yorumlama ölçütleri (ACMG/ClinGen) ile veri tabanı entegrasyonu ve gerektiğinde yüksek çözünürlüklü/uzun-okuma tabanlı yöntemlerin kullanımı; hem küçük etkili varyantların yakalanmasını hem de kompleks kromozomal yeniden düzenlenmelerinin daha doğru tanımlanmasını mümkün kılacaktır. Bu bütüncül yaklaşımın, epilepsiye eşlik eden nörogelişimsel fenotiplerin genetik temellerinin daha kapsamlı biçimde aydınlatılmasına ve kişiselleştirilmiş klinik yönetim stratejilerinin geliştirilmesine katkı sunması beklenmektedir.

Bu çalışma, epilepside yapısal varyantların tanısal değerlendirmede göz ardı edilemeyecek temel bileşenler arasında yer aldığını göstermektedir. WES tabanlı CNV analizinin kısa varyant incelemelerini tamamlayarak tanı verimini artırdığı ve fenotip–genotip uyumunun yorumlanmasına önemli katkılar sunduğu görülmektedir. Moleküler olarak doğrulanan CNV’lerin klinik bağlamda bütüncül bir yaklaşımla ele alınması, epilepsinin genetik altyapısının daha doğru biçimde anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Elde edilen bulgular, epilepsi tanısında kapsamlı genomik analizlerin gerekliliğini desteklerken, gelecekte uygulanacak yüksek çözünürlüklü yöntemlere dayalı çalışmalar için de güçlü bir referans çerçevesi oluşturmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 88: 296.
2. World Health Organization (2019). WHO | Epilepsy: a public health imperative. *Who* 171.
3. Ilae International Classification Of Epileptic Seizures (1969). 1964.
4. Mefford HC (2014). CNVs in Epilepsy. *Current Genetic Medicine Reports* 2: 162.
5. Chen T, Giri M, Xia Z, Subedi YN, Li Y (2017). Genetic and epigenetic mechanisms of epilepsy: A review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 13: 1841–1859.
6. Şahin E, Bebek N (2017). Epilepsi ' de Genetik. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 10: 11–16.
7. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, *et al.* (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58: 512–521.
8. Rastin C, Schenkel LC, Sadikovic B (2023). Complexity in Genetic Epilepsies: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1–17.
9. Lopriore P, Gomes F, Montano V, Siciliano G, Mancuso M (2022). Mitochondrial Epilepsy, a Challenge for Neurologists. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1–15.
10. Olson H, Shen Y, Avallone J, Sheidley BR, Pinsky R, Bergin AM, Berry GT, Duffy FH, Eksioglu Y, Harris DJ, *et al.* (2014). Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Annals of neurology* 75: 943.
11. Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006). Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics* 7: 85–97.
12. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, *et al.* (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006 444:7118 444: 444–454.

13. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G (2009). Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics* 2009 10:8 10: 551–564.
14. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR (2009). Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10: 451–481.
15. Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, Franke A, Malafosse A, Genton P, Thomas P, *et al.* (2010). Genome-Wide Copy Number Variation in Epilepsy: Novel Susceptibility Loci in Idiopathic Generalized and Focal Epilepsies. *PLOS Genetics* 6: e1000962.
16. Mullen SA, Carvill GL, Bellows S, Bayly MA, Berkovic SF, Dibbens LM, Scheffer IE, Mefford HC (2013). Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology* 81(17): 1507–1514.
17. Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, Brandt T, Richard G, McKnight DA (2018). Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* 59: 1062–1071.
18. Buysse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B (2009). Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: Lessons learned from a 1001 sample experience. *European Journal of Medical Genetics* 52: 398–403.
19. Carter NP (2007). Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature Genetics* 39: S16–S21.
20. Metzker ML (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11: 31–46.
21. Mefford HC, Yendle SC, Hsu C, Cook J, Geraghty E, McMahon JM, Eeg-Olofsson O, Sadleir LG, Gill D, Ben-Zeev B, *et al.* (2011). Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann Neurol* 70: 974–985.
22. Asadi-Pooya AA (2005). Epilepsy and consanguinity in Shiraz, Iran. *European Journal of Paediatric Neurology* 9: 383–386.
23. Alqadi KS, Rammal SA, Alam ME, Alshahrani AM, Baesa SS, Kayyali HR, Babbain

- FA, Al-Said YA (2020). Consanguinity in patients with mesial temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis in a saudi population. *Neurosciences* 25: 276–280.
24. Whelan CD, Altmann A, Botía JA, Jahanshad N, Hibar DP, Absil J, Alhusaini S, Alvim MKM, Auvinen P, Bartolini E, *et al.* (2018). Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study. *Brain* 141: 391–408.
 25. Balestrini S, Arzimanoglou A, Blümcke I, Scheffer IE, Wiebe S, Zelano J, Walker MC (2021). The aetiologies of epilepsy. *Epileptic Disorders* 23: 1–16.
 26. Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux PM, Blümcke I, Sander JW, Löscher W (2016). Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathologica* 131: 211–234.
 27. Zhang P, Yang Y, Zou J, Yang X, Liu Q, Chen Y (2020). Seizures and epilepsy secondary to viral infection in the central nervous system. *Acta Epileptologica* 2.
 28. Almannai M, Al Mahmoud RA, Mekki M, El-Hattab AW (2021). Metabolic Seizures. *Frontiers in Neurology* 12.
 29. Tumiene B, Ferreira CR, van Karnebeek CDM (2022). 2022 Overview of Metabolic Epilepsies. *Genes* 13.
 30. Melzer N, Rosenow F (2024). Autoimmune-associated epilepsy – a challenging concept. *Seizure* 27–30. doi:10.1016/j.seizure.2024.05.017.
 31. Smith KM, Budhram A, Geis C, McKeon A, Steriade C, Stredny CM, Titulaer MJ, Britton JW (2024). Autoimmune-associated seizure disorders. *Epileptic Disorders* 26: 415–434.
 32. Helbig I, Swinkels MEM, Aten E, Caliebe A, Van 'T Slot R, Boor R, Von Spiczak S, Muhle H, Jähn JA, Van Binsbergen E, *et al.* (2014). Structural genomic variation in childhood epilepsies with complex phenotypes. *European Journal of Human Genetics* 22: 896–901.
 33. Guerri G, Castori M, D'agruma L, Petracca A, Kurti D, Bertelli M (2020). Genetic analysis of genes associated with epilepsy. *Acta Biomedica* 91: 1–7.
 34. Zhang M, Liang X, Wang J, Gao L, Liao H, He Y, Yi Y, He N, Liao W (2024). Epilepsy-associated genes : an update. *Seizure: European Journal of Epilepsy* 116: 4–13.

35. Mefford HC, Eichler EE (2009). Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease. *Current Opinion in Genetics and Development* 19: 196–204.
36. Symonds JD, Zuberi SM, Johnson MR (2017). Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment. *Current Opinion in Neurology* 30: 193–199.
37. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, Epstein MP, Glauser T, Goldstein DB, Han Y, *et al.* (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 501: 217–221.
38. Alkan C, Coe BP, Eichler EE (2011). Genome structural variation discovery and genotyping. *Nature Reviews Genetics* 12: 363–376.
39. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RKC, Feuk L, Scherer SW (2014). The Database of Genomic Variants: A curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Research* 42: 986–992.
40. Pös O, Radvanszky J, Styk J, Pös Z, Buglyó G, Kajsik M, Budis J, Nagy B, Szemes T (2021). Copy number variation: Methods and clinical applications. *Applied Sciences (Switzerland)* 11: 1–16.
41. Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, Pinkel D, Kallioniemi OP (1996). Gene copy number analysis by fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 9: 113–121.
42. Trask BJ (2002). Human cytogenetics: 46 Chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews Genetics* 3: 769–778.
43. Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG (2005). Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more? *American Journal of Medical Genetics* 134 A: 259–267.
44. Yoon S, Xuan Z, Makarov V, Ye K, Sebat J (2009). Sensitive and accurate detection of copy number variants using read depth of coverage. *Genome Research* 19: 1586–1592.
45. Jan P Schouten 1, Cathal J McElgunn, Raymond Waaijer, Danny Zwiijnenburg, Filip Diepvens GP (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by

- multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 30: e57.
46. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, *et al.* (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077–1082.
 47. Mardis ER (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387–402.
 48. Meyerson M, Gabriel S, Getz G (2010). Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 11: 685–696.
 49. Balachandran P, Beck CR (2020). Structural variant identification and characterization. *Chromosome Research*. doi:10.1007/s10577-019-09623-z.
 50. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z (2013). Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: Features and perspectives. *BMC Bioinformatics* 14.
 51. Zhao L, Liu H, Yuan X, Gao K, Duan J (2020). Comparative study of whole exome sequencing-based copy number variation detection tools. *BMC Bioinformatics* 21: 1–10.
 52. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, *et al.* (2020). Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine* 22: 245–257.
 53. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW (2015). A copy number variation map of the human genome. *Nature Reviews Genetics* 16: 172–183.
 54. Lal D, Ruppert AK, Trucks H, Schulz H, de Kovel C, Kasteleijn-Nolst Trenité D, Sonsma ACM, Koeleman BPC, Lindhout D, Weber Y, *et al.* (2015). Burden Analysis of Rare Microdeletions Suggests a Strong Impact of Neurodevelopmental Genes in Genetic Generalised Epilepsies. *PLoS Genetics* 11: 1–21.
 55. Wincent J, Kolbjør S, Martin D, Luthman A, Åmark P, Dahlin M, Anderlid BM

- (2015). Copy number variations in children with brain malformations and refractory epilepsy. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 167: 512–523.
56. Goeggel Simonetti B, Rieubland C, Courage C, Strozzi S, Tschumi S, Gallati S, Lemke JR (2012). Duplication of the sodium channel gene cluster on 2q24 in children with early onset epilepsy. *Epilepsia* 53: 2128–2134.
 57. Mefford HC (2015). Copy Number Matters in Epilepsy. *Epilepsy Currents* 15: 180.
 58. Naseer MI, Faheem M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Al-Quaiti MM, Jan MM, Saleh Jamal H, Al-Qahtani MH (2015). Genome wide analysis of novel copy number variations duplications/deletions of different epileptic patients in Saudi Arabia. *BMC Genomics* 16: 1–7.
 59. Tsuchida N, Nakashima M, Kato M, Heyman E, Inui T, Haginoya K, Watanabe S, Chiyonobu T, Morimoto M, Ohta M, *et al.* (2018). Detection of copy number variations in epilepsy using exome data. *Clinical Genetics* 93: 577–587.
 60. Liu JYW, Kasperavičiute D, Martinian L, Thom M, Sisodiya SM (2012). Neuropathology of 16p13.11 deletion in epilepsy. *PLoS ONE* 7: 1–8.
 61. Dimassi S, Labalme A, Lesca G, Rudolf G, Bruneau N, Hirsch E, Arzimanoglou A, Motte J, De Saint Martin A, Boutry-Kryza N, *et al.* (2014). A subset of genomic alterations detected in rolandic epilepsies contains candidate or known epilepsy genes including GRIN2A and PRRT2. *Epilepsia* 55: 370–378.
 62. Boutry-Kryza N, Labalme A, Ville D, de Bellescize J, Touraine R, Prieur F, Dimassi S, Poulat AL, Till M, Rossi M, *et al.* (2015). Molecular characterization of a cohort of 73 patients with infantile spasms syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 58: 51–58.
 63. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, *et al.* (2013). *From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. Current Protocols in Bioinformatics*. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43.
 64. Andrews S, Krueger F, Segonds-Pichon A, Biggins L, Krueger C, Wingett S (2010). Babraham Bioinformatics - FastQC a quality control tool for high throughput sequence data.

65. Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
66. Li H, Durbin R (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26: 589–595.
67. Broad Institute (2019). Picard toolkit.
68. Aneta Mikulasova et al. (2020). CNVRobot is an integrated pipeline for CNVs detection from short-read DNA sequencing data.
69. Geoffroy V, Herenger Y, Kress A, Stoetzel C, Piton A, Dollfus H, Muller J (2018). AnnotSV: An integrated tool for structural variations annotation. *Bioinformatics* 34: 3572–3574.
70. Ma L, Chung WK (2014). Quantitative analysis of copy number variants based on real-time lightcycler PCR. *Current Protocols in Human Genetics* 1–8. doi:10.1002/0471142905.hg0721s80.
71. James Kent W, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research* 12: 996–1006.
72. Dyer SC, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Barrera-Enriquez VP, Becker A, Bennett R, Beracochea M, Berry A, et al. (2025). Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research* 53: D948–D957.
73. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: 1–12.
74. Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3: 1101–1108.
75. Snyder HE, Jain P, RamachandranNair R, Jones KC, Whitney R (2024). Genetic Advancements in Infantile Epileptic Spasms Syndrome and Opportunities for Precision Medicine. *Genes* 15.
76. Dymment DA, Smith AC, Humphreys P, Schwartzentruber J, Beaulieu CL, Bulman DE, Majewski J, Woulfe J, Michaud J, Boycott KM (2015). Homozygous nonsense mutation in SYNJ1 associated with intractable epilepsy and tau pathology. *Neurobiology of Aging* 36: 1222.e1-1222.e5.

77. Hardies K, Cai Y, Jardel C, Jansen AC, Cao M, May P, Djémié T, Hachon Le Camus C, Keymolen K, Deconinck T, *et al.* (2016). Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain* 139: 2420–2430.
78. Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC, Cao M, Makarov V, Darvish H, Di Paolo G, Walker RH, Shahidi GA, Buxbaum JD, *et al.* (2013). The sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive parkinsonism with generalized seizures. *Human Mutation* 34: 1200–1207.
79. Rafiq NM, Fujise K, Rosenfeld MS, Xu P, De Camilli P (2024). Parkinsonism Sac domain mutation in Synaptojanin-1 affects ciliary properties in iPSC-derived dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 121.
80. Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L LD (1991). Clinical and molecular diagnosis of Miller Dieker syndrome. *American Journal of Human Genetics* 48: 584–594.
81. Chong SS, Pack SD, Roschke A V., Tanigami A, Carrozzo R, Smith ACM, Dobyns WB, Ledbetter DH (1997). A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Human Molecular Genetics* 6: 147–155.
82. Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, *et al.* (2003). Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *American Journal of Human Genetics* 72: 918–930.
83. Yoann Saillour, Nathalie Carion, Chloé Quelin, Pierre-Louis Leger, Nathalie Boddaert, Caroline Elie, Annick Toutain, Sandra Mercier, Marie Anne Barthez, Mathieu Milh, Sylvie Joriot, Vincent des Portes, Nicole Philip, Dominique Broglin, Agathe Roubertie, G NB-B (2009). LIS1-Related Isolated Lissencephaly. *Archives of neurology* 66: 1007–1015.
84. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G

- protein β -subunit-like repeats. *Nature* 364: 717–721.
85. Wynshaw-Boris A (2007). Lissencephaly and LIS1: Insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clinical Genetics* 72: 296–304.
 86. Conti V, Carabalona A, Pallesi-Pocachard E, Parrini E, Leventer RJ, Buhler E, McGillivray G, Michel FJ, Striano P, Mei D, *et al.* (2013). Periventricular heterotopia in 6q terminal deletion syndrome: Role of the C6orf70 gene. *Brain* 136: 3378–3394.
 87. Anantharaman V, Makarova KS, Burroughs AM, Koonin E V., Aravind L (2013). Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: Identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biology Direct* 8.
 88. Nagy E, Maquat LE (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: When nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 198–199.
 89. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JAS, Zackai EH, Emanuel BS, Vermeesch JR, Morrow BE, *et al.* (2015). 22Q11.2 Deletion Syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 1.
 90. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, *et al.* (2001). Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410: 97–101.
 91. Moon AM, Guris DL, Seo JH, Li L, Hammond J, Talbot A, Imamoto A (2006). Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Developmental Cell* 10: 71–80.
 92. Gothelf D, Eliez S, Thompson T, Hinard C, Penniman L, Feinstein C, Kwon H, Jin S, Jo B, Antonarakis SE, *et al.* (2005). COMT genotype predicts longitudinal cognitive decline and psychosis in 22q11.2 deletion syndrome. *Nature Neuroscience* 8: 1500–1502.
 93. Eaton CB, Thomas RH, Hamandi K, Payne GC, Kerr MP, Linden DEJ, Owen MJ, Cunningham AC, Bartsch U, Struik SS, *et al.* (2019). Epilepsy and seizures in young people with 22q11.2 deletion syndrome: Prevalence and links with other

- neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* 60: 818–829.
94. Kim EH, Yum MS, Lee BH, Kim HW, Lee HJ, Kim GH, Lee YJ, Yoo HW, Ko TS (2016). Epilepsy and other neuropsychiatric manifestations in children and adolescents with 22q11.2 deletion syndrome. *Journal of Clinical Neurology (Korea)* 12: 85–992.
 95. Strehlow V, Swinkels MEM, Thomas RH, Rapps N, Syrbe S, Dorn T, Lemke JR (2016). Generalized epilepsy and myoclonic seizures in 22q11.2 deletion syndrome. *Molecular Syndromology* 7: 239–246.
 96. Bayat M, Bayat A (2022). Neurological manifestation of 22q11.2 deletion syndrome. *Neurological Sciences* 43: 1695–1700.
 97. Ruiter EM, Koolen DA, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N, Hamel BCJ, Brunner HG, Siistermans EA, de Vries BBA (2007). Pure subtelomeric microduplications as a cause of mental retardation. *Clinical Genetics* 72: 362–368.
 98. Guilherme RS, Meloni VA, Perez ABA, Pilla AL, De Ramos MAP, Dantas AG, Takeno SS, Kulikowski LD, Melaragno MI (2014). Duplication 9p and their implication to phenotype. *BMC Medical Genetics* 15: 9–16.
 99. Capkova Z, Capkova P, Srovnal J, Adamova K, Prochazka M, Hajduch M (2021). Duplication of 9p24.3 in three unrelated patients and their phenotypes, considering affected genes, and similar recurrent variants. *Molecular Genetics and Genomic Medicine* 9: 1–13.
 100. Stern JM (1996). The epilepsy of trisomy 9p. *Neurology* 47: 821–824.
 101. Krgovic D, Kokalj Vokac N, Zagorac A, Gregoric Kumperscak H (2018). Rare structural variants in the DOCK8 gene identified in a cohort of 439 patients with neurodevelopmental disorders. *Scientific Reports* 8: 4–10.
 102. Vanzo RJ, Twede H, Ho KS, Prasad A, Martin MM, South ST, Wassman ER (2019). Clinical significance of copy number variants involving KANK1 in patients with neurodevelopmental disorders. *European Journal of Medical Genetics* 62: 15–20.
 103. Benitez-Burraco A, Fernandez-Urquiza M, Jimenez-Romero MS (2020). Language Impairment with a Partial Duplication of DOCK8. *Molecular Syndromology* 11: 243–263.

104. Forrest M, Chapman RM, Doyle AM, Tinsley CL, Waite A, Blake DJ (2012). Functional analysis of TCF4 missense mutations that cause Pitt-Hopkins syndrome. *Human Mutation* 33: 1676–1686.
105. Forrest MP, Waite AJ, Martin-Rendon E, Blake DJ (2013). Knockdown of Human TCF4 Affects Multiple Signaling Pathways Involved in Cell Survival, Epithelial to Mesenchymal Transition and Neuronal Differentiation. *PLoS ONE* 8: 1–13.
106. Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, Reardon W, Saraiva J, Cabral A, Göhring I, *et al.* (2007). Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *American Journal of Human Genetics* 80: 994–1001.
107. Whalen S, Héron D, Gaillon T, Moldovan O, Rossi M, Devillard F, Giuliano F, Soares G, Mathieu-Dramard M, Afenjar A, *et al.* (2012). Novel comprehensive diagnostic strategy in Pitt-Hopkins syndrome: Clinical score and further delineation of the TCF4 mutational spectrum. *Human Mutation* 33: 64–72.
108. Rosenfeld JA, Leppig K, Ballif BC, Thiese H, Erdie-Lalena C, Bawle E, Sastry S, Spence JE, Bandholz A, Surti U, *et al.* (2009). Genotype-phenotype analysis of TCF4 mutations causing Pitt-Hopkins syndrome shows increased seizure activity with missense mutations. *Genetics in Medicine* 11: 797–805.
109. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, *et al.* (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536: 285–291.
110. Lowther C, Costain G, Stavropoulos DJ, Melvin R, Silversides CK, Andrade DM, So J, Faghfoury H, Lionel AC, Marshall CR, *et al.* (2015). Delineating the 15q13.3 microdeletion phenotype: A case series and comprehensive review of the literature. *Genetics in Medicine* 17: 149–157.
111. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, De Kovel C, Baker C, Von Spiczak S, *et al.* (2009). 15q13.3 Microdeletions Increase Risk of Idiopathic Generalized Epilepsy. *Nature Genetics* 41: 160–162.
112. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, *et al.* (2008). A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nature Genetics* 40: 322–

328.

113. Gillentine MA, Schaaf CP (2015). The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number. *Biochemical Pharmacology* 97: 352–362.





EKLER

Ek 1. (Devam)

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Epilepside Kopya Sayısı Varyasyonlarının Araştırılması"		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2022 /209		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Alper Han ÇEBİ		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Ezgi ÖZYURT, Dr.Öğr.Üyesi Ayberk TÜRK YILMAZ, Prof.Dr.Ali CANSU		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

Ek 1. (Devam)

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU									
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:7	Tarih: 12.12.2022							
	Dr.Öğr.Üyesi Alper Han ÇEBİ'nin sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Ezgi ÖZYURT'a ait "Epilepside Kopya Sayısı Varyasyonlarının Araştırılması" başlıklı 2022/209 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.								
KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU									
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Murat LİVAOĞLU							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. Murat LİVAOĞLU Başkan Yrd.:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer.	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. S. Murat KESİM Raportör:	Tıbbi Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Şafak ERSÖZ Üye:	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Nazım Ercüment BEYHUN Üye:	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Demet SAĞLAM AYKUT Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
* :Araştırma ile İlişki ** :Toplantıda Bulunma									
Sayfa 2									

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ezgi ÖZYURT
Uyruğu :
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) : -

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üniversitesi/ Tıp F. / Biyoinformatik	2025
Yüksek Lisans	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi / Tıp F. / Biyoistatistik	2017
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi / Bilişim Ens. /Sağlık Bilişimi	2016
Lisans	Hacettepe Üniversitesi / İİBF / Sağlık Yönetimi	2016
Lise	Van Milli Piyango Anadolu Lisesi	2013

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
-	-	-

YABANCI DİL

İngilizce (YÖKDİL/Sağlık-77,5)

UZMANLIK ALANI

Biyoenformatik/Biyoistatistik

YAYINLAR (Tez yazım kurallarına göre yazılmalıdır)

1. Tatar, G., Ozyurt, E., Turhan, K. 2021. Computational drug repurposing study of the RNA binding domain of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein with antiviral agents. Biotechnology Progress 37:2 e3110.

BİLDİRİLER

1. Özyurt, E., Tatar, G. SARS-CoV-2 Spike , Main protease ve Nucleocapsid Proteinlerinin Molnupiravir ile Etkileşim Mekanizmasının Moleküler Kenetlenme Yöntemi ile İncelenmesi. 13. Tıp Bilişimi Kongresi, Çevrimiçi, 75-82.
2. Özyurt, E., Çebi, A.H., Cansu, A., Türkyılmaz, A., Turhan, K., Özkan Kart, P. Epilepside Kopya Sayısı Varyasyonlarının Tüm Ekzom Verileri Kullanılarak Araştırılması. 15. Tıp Bilişimi Kongresi, Trabzon, 30-31 Mayıs, 65-73.

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Burs: YÖK 100/2000 Doktora Projesi bursu.
2. Proje: TÜBİTAK 1002-A Epilepside Kopya Sayısı Varyasyonlarının Araştırılması (Proje No: 123S381)