NÖRO PSİKİYATRİ ARŞİVİ
ARCHIVES OF NEUROPSYCHIATRY

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Makale No: 12

Arch Neuropsychiatry 2026;63:73–79
https://doi.org/10.29399/npa.29064

Trio-Tüm Ekzom Dizileme Yaklaşımı ile Zihinsel Gelişim Bozukluğunda Genetik Etiyolojinin Araştırılması

Investigation of Genetic Aetiology in Intellectual Developmental Disorder with Trio-Whole Exome Sequencing Approach

Isik GORKER[1], Engin ATLI[2], Leyla BOZATLI[1], Selma DEMİR[2], Sinem YALCINTEPE[2], Emine Ikbal ATLI[2], Can KOSUKCU[3], Hakan GURKAN[2]

[1]Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
[2]Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
[3]Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoinformatik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Zihinsel gelişim bozukluğu (ZGB), heterojen bir durumdur. Genetik araştırmalar, bu bozukluğun etiyolojisinde beyin gelişimi ve işlevi için temel hücresel yolları aydınlatmak açısından çok önemlidir. Bu çalışma, özellikle yeni hastalığa bağlı genlerin keşfine odaklanarak, etkilenmiş bireylerde ve ebeveynlerinde yeni nesil dizileme (NGS) yöntemiyle ZGB'ye katkıda bulunan olası genetik değişiklikleri araştırmayı amaçlamaktadır.

Yöntem: Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı, Beşinci Baskı (DSM-5) kriterlerine göre ZGB tanısı almış, konvansiyonel sitogenetik analizler, dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (arrayCGH) ve Frajil X (FMR1) testleri normal sonuç veren vakalar, Trio-Tüm Ekzom Dizileme (Trio-WES) yöntemiyle analiz edilmiştir. Genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış, amplikon kütüphaneleri oluşturulmuş ve NGS platformunda dizileme gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 7 vakadan 5'inde MANBA, TLK2, NAA15, CSF1R, DRD4 ve TRIO genlerinde patojenik ve/veya muhtemelen patojenik varyasyonlar saptandı. TLK2 genindeki p.(Arg339Gln) varyantı ve TRIO genindeki p.(Asn1406Ser) varyantı için protein kararlılık tahmini analizleri yapıldı. Her iki varyantın da protein kararlılığını azalttığı ve "destabilize edici" olarak sınıflandırıldığı öngörüldü.

Sonuç: Trio-WES, ZGB'nin moleküler tanısına önemli bir katkı sağlamıştır. Bu bulgular, yeni hastalıklarla ilişkili genlerin keşfedilmesinde WES'in güçlü bir araç olarak faydasını vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Trio-WES, tüm ekzom dizilemesi, yeni nesil dizileme, yeni varyasyon, zihinsel gelişim bozukluğu

ABSTRACT

Introduction: Intellectual development disorder (IDD) is a heterogeneous condition, and genetic studies are essential to unravel the underlying cellular pathway for brain development and functioning in its etiology. This study aimed to investigate the possible genetic alterations contributing to IDD by performing next generation sequencing (NGS) in affected individuals and their parents, with a particular focus on the discovery of novel disease-associated genes.

Methods: Cases diagnosed with IDD according to DSM-5 criteria, who had normal results in conventional cytogenetic analyses, array comparative genomic hybridization and Fragile X (FMR1) testing, were analyzed by using Trio-Whole Exome Sequencing (Trio-WES). Genomic DNA was extracted, amplicon libraries were generated, and sequencing was conducted on a NGS platform.

Results: We detected pathogenic and/or likely pathogenic variations in MANBA, TLK2, NAA15, CSF1R, DRD4, TRIO genes in 5 of 7 cases included in the study. Protein stability prediction analysis were performed for the p.(Arg339Gln) variant in TLK2 and p.(Asn1406Ser) variant in TRIO gene. Both variants were predicted to reduce protein stability and classified as "destabilizing."

Conclusion: Trio-WES provided a substantial contribution to the molecular diagnosis of IDD. These findings highlight the utility of whole exome sequencing as a powerful tool for uncovering novel disease-associated genes.

Keywords: Intellectual developmental disorder, next generation sequencing, novel variation, Trio-WES, whole exome sequencing

Cite this article as: Görker I, Atlı E, Bozatlı L, Demir S, Yalçıntepe S, Atlı Eİ ve ark. Investigation of Genetic Aetiology in Intellectual Developmental Disorder with Trio-Whole Exome Sequencing Approach. Arch Neuropsychiatry 2026;**63**:73–79. doi: 10.29399/npa.29064

GİRİŞ

Zihinsel Gelişim Bozukluğu (ZGB), entelektüel ve adaptif işlevselliğin kavramsal, sosyal ve pratik alanlarında önemli bozukluklarla karakterize bir nörogelişimsel bozukluktur. DSM-V'e göre, ZGB tanısı, gelişim döneminde başlayan hem entelektüel işlevsellik hem de adaptif davranış eksiklikleri gerektirir. Küresel yaygınlığının %1-3 olduğu tahmin edilmektedir ve ciddi formlarının kökeni ağırlıklı olarak monogeniktir (1-3).

Genetik olmayan prenatal, perinatal ve neonatal risk faktörleri, ZGB vakalarının yaklaşık %30-50'sine katkıda bulunsa da, ciddi vakaların çoğunluğundan genetik nedenler sorumludur (4). Sitogenetik anormallikler ve kopya sayısı değişiklikleri (CNV'ler), tanıların yaklaşık %30'unu açıklamaktadır ve ZGB vakalarının yaklaşık %60'ının etiyolojisi açıklanmış değildir (3, 5).

Yazışma Adresi: Işık GORKER Trakya University, Faculty of Medicine, Department of Child & Adolescent Psychiatry, Edirne, Türkiye • **E-posta:** isikgorker@gmail.com
Geliş Tarihi: 13.02.2025, **Kabul Tarihi:** 14.09.2025, **Çevrimiçi Yayın Tarihi:** 15.11.2025
©Telif Hakkı 2025 Türk Nöropsikiyatri Derneği - Makale metnine www.noropskiyatriarsivi.com web sayfasından ulaşılabilir

Öne Çıkan Noktalar

- **Trio-WES ve biyoinformatik, zihinsel gelişim bozukluğun genetik nedenlerini belirlemede kullanılır.**
- **WES, sendromik olmayan zihinsel gelişim bozukluğunda yaygın olarak kullanılır.**
- **Literatürde henüz bildirilmemiş iki yeni varyant bulundu.**

Son on yılda, Tüm Ekzom Dizileme (WES),, özellikle de Trio-WES'in uygulanması, ZGB'nin moleküler tanısında devrim yaratmıştır. Sistematik derlemeler, tanı verilerinin %30 ila %50 arasında değiştiğini ve özellikle akraba olmayan ailelerde otozomal dominant genlerdeki de novo varyantların kilit rol oynadığını bildirmektedir. Klinik ekzom dizileme kohortları, tanı oranlarının yaklaşık %34-36 olduğunu rapor etmekte ve bu durum genellikle vaka değerlendirmesinde ve genetik danışmanlıkta değişikliklere yol açmaktadır (6-9).

Bu çalışma, konvansiyonel sitogenetik, Frajil X moleküler testi ve kromozomal mikrodizi testlerinin negatif sonuç verdiği, açıklanamayan gelişimsel gecikme ve ZGB'si olan bireylerde Trio-WES uygulamasını amaçlamaktadır. Amacımız, moleküler etiyolojiyi aydınlatmak, genotip-fenotip korelasyonlarını araştırmak ve yönetimi ve genetik danışmanlığı yönlendirmede moleküler tanının klinik faydasını değerlendirmektir.

YÖNTEM

Çalışma vakalarının belirlenmesi

Çocuk ve Ergen Psikiyatri Kliniği'ne başvuran ve DSM-5'e göre ZGB tanısı alan vakalarımız çalışmaya dahil edildi. Hafif ZGB'li bireyler arasında dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun (DEHB) yüksek yaygınlığı göz önüne alındığında, DEHB komorbiditesi olan vakalar da çalışmaya dahil edildi. Yılmaz ve ark. (2021) tarafından yapılan yakın tarihli bir klinik çalışmaya göre, hafif ZGB'li çocuk ve ergenlerin %64,9'unda eşlik eden DEHB semptomları görülmüştür (10). Bu yüksek komorbidite oranı, gelişimsel bozuklukların etiyolojisini araştıran çalışmalarda DEHB'yi temsili bir komorbid durum olarak değerlendirmenin önemini yansıtmaktadır. Bu nedenle, kohort homojenliğini korumak amacıyla DEHB'yi birincil psikiyatrik komorbidite olarak dahil ederken, diğer psikiyatrik tanıları dışladık. Dışlama faktörleri ise ZGB'yi açıklayacak başka bir hastalığın veya genetik tanının, epilepsi tanısının ve DEHB dışında başka bir psikiyatrik hastalığın varlığıydı.

Çocuğun gelişimsel gecikmesi ve ZGB olan toplam 21 vaka bu çalışmada incelendi. Vaka seçimi, klinik ve genetik değerlendirme protokolündeki belirli dışlama kriterlerine dayandırıldı. Bu kriterler şunlardı: (i) karyotip analiziyle kromozomal anormallik tanısı konan bireyler, (ii) moleküler olarak doğrulanmış Frajil X sendromu olan vakalar ve (iii) array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (arrayCGH) ile patojenik veya muhtemel patojenik kopya sayısı değişiklikleri saptanan vakalar. Bu dışlama kriterlerinden sonra, etiyolojisi geleneksel tanı yöntemleriyle açıklanamayan yedi vakaya, potansiyel monogenik nedenleri belirlemek amacıyla Trio-WES uygulandı.

Bu çalışmada kullanılan NGS analiz yönteminde üç adım izlenmiştir:

1. Çevresel kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılması ve izole edilen örneklerin kalite/miktar kontrolünün sağlanması.
2. Hedeflenen bölgelerin amplifikasyonu ile kütüphanelerin oluşturulması ve dizilimlerin NGS analiz platformu kullanılarak okunması.
3. Verilerin biyoinformatik analizi.

Periferik kandan DNA ekstraksiyonu ve konsantrasyon ölçümü

Çocuk ve Ergen Psikiyatri Anabilim Dalı'na başvuran vaka ve ebeveynlerinden alınan 2 mL periferik kan örneğinden, üreticinin protokolüne göre EZ1 DNA Blood isolation kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile EZ1 Advanced XL automated nucleic acid isolation system (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Vakalar, klinik muayene sonucunda DSM-V tanı kriterlerine göre ZGB tanısı almıştı. İzole edilen genomik DNA'nın son hacmi 100 µL'ye ayarlandı. DNA'nın kalite ölçümleri olan konsantrasyonları ve saflık değerleri NanoDrop cihazı kullanılarak belirlendi. DNA'nın saflığı açısından 260/280 oranı 2'den büyük olan ve konsantrasyonları 20 ng/µL'nin altında olanlar için izolasyon işlemi tekrarlandı. İzolasyon sonrası diğer adımlarda kullanılmak üzere, vakaların hakları ve etik değerler göz önünde bulundurularak her bir DNA'ya özel laboratuvar kodları verildi. DNA, uygun koşullarda -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

NGS analiz platformu kullanılarak hedeflenen bölgelerin amplifikasyonu ve dizi analizi yoluyla kütüphanelerin oluşturulması

Çalışmamızda dizilemeyi hedeflediğimiz insan genomunun 37 Mb'lık ekzonik bölgelerinin kütüphanelerini oluşturma aşaması, izole edilen genomik DNA'lar kullanılarak QIAseq Human Exome Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile gerçekleştirildi. DNA kütüphanesi oluşturulmadan önce, vakaların periferik kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları, Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında tekrar ölçüldü.

Hedef bölgelerin yaklaşık %99'unda 20x ve üzeri minimum okuma derinliği güvenilir kabul edildi. Islak laboratuvar aşamasından sonra, dizileme Illumina NovaSeq 6000 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Kütüphane hazırlığı ve dizilemenin ana adımları, QIAseq Human Exome Kit protokolüne göre yapıldı (fragmantasyon, adaptör ligasyonu, DNA kütüphanelerinin amplifikasyonu, kütüphane havuzlarının oluşturulması, hibridizasyon yakalama ve streptavidin boncuklarına bağlanma, yakalama sonrası amplifikasyon ve dizileme). Bir sonraki adımda ise biyoinformatik süreçler (BCL'den FastQ'ya dönüştürme, kalite değerlendirmeleri, referans genoma eşleme, düşük kaliteli okumaların ve varyantların filtrelenmesi ve vcf dosyası oluşturulması) Qiagen CLC Genomics Workbench 12.0.3 (Qiagen, Hilden, Almanya) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Verilerin biyoinformatik analizi

NGS sonrasında, hedeflenen genlerin dizilerini ve kalite skorlarını içeren, metin formatındaki FastQ ham veri dosyaları elde edildi. Hazır analiz için insan genomu (hg19) referans dizisine hizalanan FastQ dosyalarından dönüştürülen BAM dosyalarının biyoinformatik analizi için Qiagen Clinical Insight (QCI) yazılımı kullanıldı. QCI programı aracılığıyla, kalite skorlamasını ve belirli filtreleri başarıyla geçen genetik varyasyonlar belirlendi ve patojeniteleri saptandı. Verilerin görselleştirilmesi için, hedeflenen nükleotit dizilerini görsel olarak incelemek amacıyla Integrative Genomics Viewer programı (IGV) kullanıldı (11).

Varyantlar filtrelenirken, synonymous varyantlar elendi ve ExAC veritabanı, GenomAD veri tabanı ve tek nükleotid polimorfizm veri tabanı (dbSNP) gibi açık erişimli veritabanlarında ve popülasyon bilgi bankalarında minör alel frekansı %1'den büyük olan varyantlar da filtrelendi. Tespit edilen genetik varyasyonların ve patojenitelerinin vakaların klinik bulgularıyla ilişkili olup olmadığını değerlendirmek için aşağıdaki açık erişimli çevrimiçi veri tabanları kullanıldı: Human Genome Mutation Database (HGMD), National Centre for Biotechnology Information (NCBI), dbSNP, VarSome (The Human Genomics Community) ve Franklin by Genoox (12-15). *In silico* tahmin algoritmaları olarak, Mutation Taster (16), Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen) (17), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (18), DANN

scoring (19), genomic evolutionary rate profiling (GERP) score (20) ve CADD (21) scoring verileri dikkate alındı.

Protein modelleme yöntemi

Protein stabilitesi üzerindeki missense varyantların etkisini tahmin eden ve açılma Gibbs serbest enerjisindeki değişiklikleri (ΔΔG) hesaplayan dört in silico aracı kullanıldı. Hastalıkla ilişkili varyantları içeren protein alanları yalnızca bu pdb yapıları tarafından temsil edildiğinden, protein stabilitesi tahminleri, girdi PDB dosyaları olarak TLK2/Serin/treonin-protein kinaz tousled-like 2'nin (AF-Q86UE8-F1-model_v4.pdb) AlphaFold yapısı ve TRIO/N-terminal DHPH kaseti TRIO'nun nükleotidsiz Rac1 ile kompleksinin (2nz8.pdb) RCSB Protein Data Bank yapısı kullanılarak DynaMut2 (22), INPS-3D (23), PremPS (24) ve FoldX (25) ile hesaplandı.

ΔΔG değerleri, TLK2'deki p.(Arg339Gln) varyantı ve TRIO'daki p.(Asn1406Ser) varyantı için vahşi tip (wild type) protein ile değişmiş amino asit substitüsyonunun sonuçları arasında hesaplandı. Son olarak, vahşi tip ve değişmiş TLK2 ile TRIO protein yapılarının 3 boyutlu yapıları DynaMut2 ile oluşturuldu.

İlgili substitüsyonlar için ΔΔG değerleri (kcal/mol) şu şekilde yorumlandı: ΔΔG<0 tahmini, DynaMut2 ve INPS-3D durumunda destabilize edici olarak değerlendirildi. ΔΔG>0 tahmini ise FoldX 5.0 ve PremPS durumunda destabilize edici olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmada, ZGB tanısı almış vakalar (konvansiyonel sitogenetik, arrayCGH ve Frajil X analiz sonuçları normal bulunan vakalar) ve onların ebeveynleri ile ZGB ile ilişkili novel patojenik varyasyonları, *de novo* patojenik varyasyonları, yeni genleri ve/veya kromozom lokuslarını belirlemek amacıyla WES analizleri yapıldı. Çalışmaya, ZGB'si olan ve akraba olmayan ebeveynlere sahip yedi vaka dahil edildi (Tablo 1). Vakaların üçü kız, dördü erkekti.

Biyoinformatik analizde, üç vakada klinik bulgularıyla ilişkili patojenik ve muhtemelen patojenik varyantlar tespit edildi. Bu varyantlardan ikisi de novo idi. İki vakada ise patojenik veya muhtemelen patojenik varyant saptanmadı. Bu iki vakada, klinik bulgularıyla ilişkili iki muhtemel patojenik varyant bulunmasına rağmen, segregasyon analizi bu varyantların ebeveynlerden miras alındığını gösterdi (Tablo 2). Vakalarda saptanan varyasyonların genotipi, aile segregasyon sonuçları, *in silico* tahmin skorları, dbSNP kayıtları, ACMG skorları, ClinVar verileri ve patojenite bilgileri Tablo 3'te verilmiştir.

Vaka 1: Öğrenme güçlüğü, düşük akademik başarı ve hiperaktivite semptomlarıyla başvuran, ZGB ve DEHB tanısı almış vaka üzerinde yapılan WES analizi sonucunda, ZGB kliniğiyle ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyant tespit edilmemiştir.

Tablo 1. Vakaların klinik özellikleri ve psikiyatrik tanıları

	Yaş	Cinsiyet	İlk kabul şikayetleri	Psikiyatrik Tanı
Vaka 1	15	Kız	öfkeli davranış, ajitasyon, akranlarıyla uyumsuzluk	Hafif ZGB
Vaka 2	15	Erkek	okula uyum sağlayamama	Hafif ZGB
Vaka 3	11	Erkek	konuşma gelişiminde gerilik, hareketlilik, sabırsızlık	ZGB
Vaka 4	8	Erkek	konuşma gelişiminde gerilik	Hafif ZGB
Vaka 5	15	Erkek	konuşma gelişiminde gerilik, sinirlilik, akran uyumsuzluğu	Hafif ZGB
Vaka 6	17	Erkek	sinirlilik, dikkat eksikliği	Hafif ZGB
Vaka 7	14	Kız	konuşma gelişiminde gerilik, sinirlilik, huzursuzluk	Hafif ZGB

DEHB: Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu; ZGB: Zihinsel gelişimsel bozukluk

Tablo 2. Vaka 3, 4, 5, 6 ve 7'de patojenik, muhtemelen patojenik varyantlar tespit edildi

Vaka 3 ve ebeveynlerinde tespit edilen varyant			
Varyant (HGVS)	**Vaka 3**	**Anne**	**Baba**
NM_005908.4(MANBA):c.2158-2A>G	GG	AG	AG
Vaka 4 ve ebeveynlerinde tespit edilen varyant			
Varyant (HGVS)	**Vaka 4**	**Anne**	**Baba**
NM_001330418.2(TLK2):c.569G>A (p.Arg190Gln)	GA	GG	GG
Vaka 5 ve ebeveynlerinde tespit edilen varyant			
Varyant (HGVS)	**Vaka 5**	**Anne**	**Baba**
NM_057175.5(NAA15):c.691+1G>A	GA	GA	GG
Vaka 6 ve ebeveynlerinde tespit edilen varyant			
Varyant (HGVS)	**Vaka 6**	**Anne**	**Baba**
NM_005211.3(CSF1R):c.1349G>A (p.Trp450Ter)	GA	GG	GA
NM_000797.4(DRD4):c.435_436insTG (p.Gln146CysfsTer201)	GG/ GTGG	GG/GG	GG/ GTGG
Vaka 7 ve ebeveynlerinde tespit edilen varyant			
Varyant (HGVS)	**Vaka 7**	**Anne**	**Baba**
NM_007118.4(TRIO):c.4394A>G (p.Asn1465Ser)	AG	AA	AA

HGVS: İnsan genomu varyasyon topluluğu

Tablo 3. Vakalarda saptanan varyasyonların genotipi, aile segregasyon sonuçları, in silico tahmin skorları, dbSNP kayıtları, ACMG skorları, ClinVar verileri ve patojenite bilgileri

Vaka	Gen	Genotip	Segregasyon	Kalıtım	Transkript	HGVSc	HGVSp	dbSNP	ClinVar	ACMG	Patojenite
3	MANBA	Homozigot	Maternal, paternal	O.R	NM_005908.4	c.2158-2A>G	--	rs772852668	Patojenik	PVS1, PM2, PP5	Patojenik
4	TLK2	Heterozigot	de novo	O.D	NM_001330418.2	c.569G>A	p.Arg190Gln	rs1567948287	VUS	PS2, PM2, PP2, PP3	Olası Patojenik
5	NAA15	Heterozigot	Maternal	O.D	NM_057175.5	c.691+1G>A	--	rs1579109565	Olası Patojenik	PVS1, PM2, PP5	VUS
6	CSF1R	Heterozigot	de novo	O.R	NM_005211.3	c.1349G>A	p.Trp450Ter	--	--	PVS1, PM2	VUS
6	DRD4	Heterozigot	de novo	O.D	NM_000797.4	c.435_436insTG	p.Gln146CysfsTer201	--	--	PVS1, PM2	Olası Patojenik
7	TRIO	Heterozigot	de novo	O.D	NM_007118.4	c.4394A>G	p.Asn1465Ser	--	--	PS2, PM1, PM2, PP3, PP5	Patojenik

ACMG: Amerikan Tıp Genetiği Koleji, O.D: Otozomal dominant, O.R: Otozomal resesif, dbSNP: Tek nükleotid polimorfizmi veritabanı, HGVS: İnsan genom varyasyon topluluğu, VUS: Önemi bilinmeyen varyant

Vaka 2: Öğrenme güçlüğü ve dikkat eksikliği semptomlarıyla başvuran, ZGB ve DEHB tanısı almış vaka üzerinde yapılan WES analizi sonucunda, ZGB kliniğiyle ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyant tespit edilmemiştir.

Vaka 3: Konuşma gecikmesi ve hiperaktivite semptomlarıyla başvuran, ZGB ve DEHB tanısı almış vakada, NM_005908.4(MANBA):c.2158-2A>G varyantı homozigot olarak saptanmıştır ve ClinVar veri tabanında patojenik olarak rapor edilmiştir. NM_005908.4(MANBA):c.2158-2A>G varyantı, HGMD veri tabanına CS982260 erişim numarasıyla kaydedilmiş ve mannosidosis, beta, lysosomal fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak yapılan in silico analizde, NM_005908.4(MANBA):c.2158-2A>G varyantı patojenik (PVS1, PM2, PP5) olarak belirlenmiştir. MANBA geninin patojenik ve muhtemel patojenik varyantları, otozomal resesif mannosidosis, beta A fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. Vaka 3'ün ebeveynleri, NM_005908.4(*MANBA*):c.2158-2A>G varyantı için heterozigot bulunmuştur.

Vaka 4: Konuşma gecikmesi semptomlarıyla başvuran, ZGB ve DEHB tanısı almış vakada, NM_001330418.2(TLK2):c.569G>A (p.Arg190Gln) varyantı heterozigot olarak saptandı ve ClinVar veri tabanında 'klinik önemi bilinmeyen' bir varyant olarak rapor edildi. NM_001330418.2(TLK2):c.569G>A (p.Arg190Gln) varyantı, HGMD veritabanında rapor edilmemiştir. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak yapılan in silico analizde, NM_001330418.2(*TLK2*):c.569G>A (p.Arg190Gln) varyantı, klinik önemi bilinmeyen bir varyant olarak belirlendi (PM2, PP2, PP3). Segregasyon analizi sonucunda, NM_001330418.2(TLK2):c.569G>A (p.Arg190Gln) varyantının, Vaka 4'ün ebeveynlerinde homozigot vahşi tip olduğu görüldü. Bu sonuca göre, NM_001330418.2(TLK2):c.569G>A (p.Arg190Gln) varyantı, ACMG-2015 kriterlerine göre 'PS2' skoruna dayanarak 'muhtemelen patojenik' ve 'de novo' olarak değerlendirildi.

Vaka 5: Konuşma gecikmesi, sinirlilik ve akran problemleri semptomlarıyla başvuran, ZGB ve DEHB tanısı almış vakada, NM_057175.5(NAA15):c.691+1G>A varyantı heterozigot olarak saptanmıştır ve ClinVar veri tabanında 'patojenik' olarak rapor edilmiştir. NM_057175.5(NAA15):c.691+1G>A varyantı, HGMD veri tabanında rapor edilmemiştir. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak yapılan *in silico* analizde, NM_057175.5(NAA15):c.691+1G>A varyantı patojenik (PVS1, PM2, PP5) olarak belirlenmiştir. Segregasyon analizi, NM_057175.5(NAA15):c.691+1G>A varyantının Vaka 5'in babasında tespit edilmediğini ve annenin bu varyant için heterozigot olduğunu göstermiştir. NAA15 geninin patojenik ve muhtemel patojenik varyantları, davranışsal anormallikler gösteren otozomal dominant ZGB fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

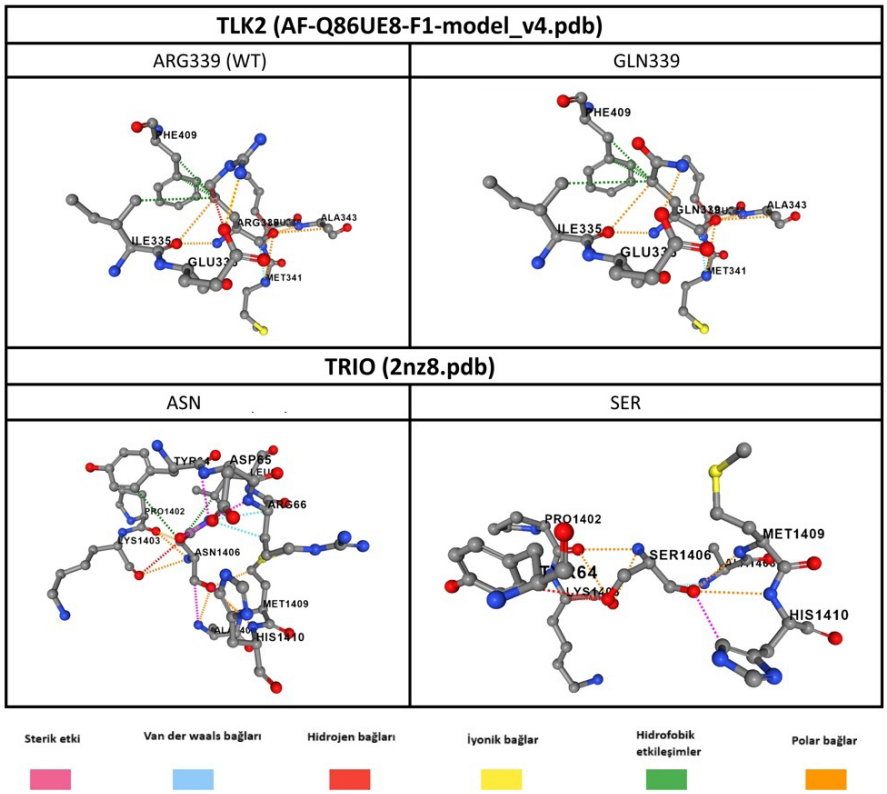
Vaka 6: Sinirlilik ve dikkat dağınıklığı semptomlarıyla başvuran, ZGB ve DEHB tanısı almış vakada, NM_005211.3(CSF1R): c.1349G>A (p.Trp450Ter) ve NM_000797.4 (*DRD4*): c.435_436insTG (p.Gln146CysfsTer201) varyantları heterozigot olarak saptandı ve ClinVar ve HGMD veritabanlarında rapor edilmemişti. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak yapılan in silico analizde, NM_005211.3(CSF1R):c.1349G>A (p.Trp450Ter) ve NM_000797.4 (*DRD4*): c.435_436insTG (p.Gln146CysfsTer201) varyantları muhtemelen patojenik olarak belirlendi (PVS1, PM2). Segregasyon analizi sonucunda, NM_005211.3 (CSF1R): c.1349G>A (p.Trp450Ter) ve NM_000797.4 (DRD4): c.435_436insTG (p.Gln146CysfsTer201) varyantları ebeveynlerde saptanmadı. *CSF1R* geninin patojenik ve muhtemel patojenik varyantları, otozomal resesif kalıtılan beyin anormallikleri, nörodejenerasyon ve disosteoskleroz ile otozomal dominant kalıtılan lökosefalopati, herediter diffüz, sferoidli fenotipleriyle ilişkilidir. DRD4 geninin patojenik ve muhtemel patojenik varyantları ise otozomal dominant kalıtım gösteren dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu; DEHB fenotipiyle ilişkilidir.

Vaka 7: Konuşma gecikmesi ve sinirlilik semptomlarıyla başvuran, ZGB tanısı almış vakada, NM_007118.4(TRIO):c.4394A>G (p.Asn1465Ser) varyantı heterozigot olarak saptandı ve ClinVar ile HGMD veritabanlarında rapor edilmemişti. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak yapılan in silico analizde, NM_007118.4(TRIO):c.4394A>G (p.Asn1465Ser) varyantı muhtemelen patojenik olarak belirlendi (PM1, PM2, PP3, PP5). Segregasyon analizi sonucunda, NM_007118.4(TRIO):c.4394A>G (p.Asn1465Ser) varyantının Vaka 7'nin ebeveynlerinde bulunmadığı görüldü. Bu sonuca göre,

NM_007118.4(TRIO):c.4394A>G (p.Asn1465Ser) varyantı, ACMG-2015 kriterlerine göre PS2 skoruna dayanarak patojenik ve de novo olarak değerlendirildi. TRIO geninin patojenik ve muhtemel patojenik varyantları, makrosefali ile otozomal dominant kalıtılan ZGB ile ilişkili fenotipleri kalıtsal olarak aktarmaktaydı.

Gibbs Serbest Enerjisi Hesaplaması ve Missense Varyantları için 3 Boyutlu Protein Yapılarının Bozulması; *TLK2*:p.(Arg339Gln) ve *TRIO*:p.(Asn1465Ser)

Üç sterik çatışma, iki van der Waals ve altı hidrojen bağı etkileşimi, TLK2'deki 339. pozisyondaki Arjinin'in Glutamin'e dönüşmesinden sonra, iki sterik çatışma, bir van der Waals ve dört hidrojen bağı etkileşimine indirgenmiştir. TLK2'deki p.Arg339Gln değişikliğinden sonra, iki iyonik bağ kaybedilmiş, protein yapısındaki yedi polar bağ ile dört hidrofobik etkileşim ise aynı kalmıştır.



Şekil 1. DynaMut2 ile hesaplanan protein kararlılığı tahmin modelleri.

Tablo 4. *TRIO*:c.4394A>G ve *TLK2*:c.569G>A varyantları için protein modellemesinde hesaplanan ΔΔG skorları.

Araç	Varyant	ΔΔG Skorları (kcal/mol)	Tahmin
DynaMut2	*TLK2*; R339Q	- 0.78	Destabilize edici
	TRIO; N1406S	- 1.3	
INPS-3D	*TLK2*; R339Q	- 0.76	
	TRIO; N1406S	- 0.36	
PremPS	*TLK2*; R339Q	0.83	
	TRIO; N1406S	0.69	
FoldX 5.0	*TLK2*; R339Q	0.48	
	TRIO; N1406S	3.15	

Tahmin edilen ΔΔG<0 değeri DynaMut2 ve INPS-3D durumunda istikrarsızlaştırıcıdır, Tahmin edilen ΔΔG>0 değeri ise PremPS ve FoldX 5.0 durumunda istikrarsızlaştırıcıdır.

Altı sterik çatışma ve üç van der Waals etkileşimi, TRIO'daki 1465. Pozisyonundaki Asparagin'in Serin'e dönüşmesinden sonra üç sterik çatışma ve bir van der Waals etkileşimine indirgenmiştir. TRIO'daki p.(Asn1465Ser) değişikliğinden sonra iki hidrofobik bağ kaybedilmiş, protein yapısındaki yedi polar bağ aynı kalmış ve dört hidrojen bağı altıya yükselmiştir (Şekil 1).

Hem TLK2'deki p.(Arg339Gln) varyantı hem de TRIO'daki p.(Asn1465Ser) varyantı, nokta mutasyonları üzerine protein stabilitesini azaltmış ve dört farklı protein stabilitesi tahmin aracıyla da "Destabilize Edici" olarak tahmin edilmiştir. Varyant için hesaplanan ΔΔG skorları Tablo 4'te gösterilmektedir.

TARTIŞMA

ZGB vakalarının yaklaşık %50'sinde etiyoloji bilinmemektedir. ZGB ile ilişkili çok sayıda gen olduğu göz önüne alındığında, genetik faktörler önemlidir (26). İnsan genetiğindeki son gelişmeler, çeşitli genetik hastalıkların nedensel mutasyonlarının belirlenmesini kolaylaştırmış ve bu durum, belirli mutasyonları olan vakalar için kişiye özel tedaviler sağlama olasılığını ortaya çıkarmıştır. WES analizi, ZGB çalışmalarında de novo mutasyonların belirlenmesine olanak tanımıştır (27). En yaygın kullanılan NGS yaklaşımları, tüm genom dizilemeye kıyasla daha düşük maliyetli ve daha yönetilebilir veri hacmine sahip olan hedeflenmiş panel ve WES'tir (28).

ZGB tanısı almış yedi vakada potansiyel genetik nedenleri belirlemek amacıyla WES ve biyoinformatik analizler gerçekleştirdik. Üç vakada klinik bulgularıyla ilişkili patojenik ve muhtemel patojenik varyantlar saptanırken, iki vakada herhangi bir patojenik veya muhtemel patojenik varyant tespit edilmedi. Diğer iki vakada ise, klinik bulgularıyla ilişkili ancak ebeveynlerden kalıtılan iki muhtemel patojenik varyant saptandı.

Analiz edilen bireyler arasında, ZGB ve DEHB tanısı almış bir vakada, bir lizozomal depo hastalığı olan β-mannosidoz ile ilişkili olduğu bilinen MANBA geninde patojenik bir varyant bulunmuştur. MANBA, N-bağlı oligosakkaritlerin parçalanmasında kritik rol oynayan lizozomal enzim β-mannosidazı kodlar. MANBA'daki homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlardan kaynaklanan fonksiyonel eksiklik, parçalanmamış glikoproteinlerin birikimine yol açarak ilerleyici nörodejenerasyonla

sonuçlanır. Bu bireyde gözlemlenen klinik özellikler (gelişimsel gecikme, konuşma bozukluğu, hiperaktivite ve agresyon) daha önce bildirilen MANBA ile ilişkili fenotiplerle uyumludur (29, 30).

MANBA genindeki c.2158-2A>G varyantı, intron 15'in kanonik kabul edici ekleme bölgesini etkiler ve mRNA eklenmesini bozarak anormal transkriptlere ve β-mannosidaz fonksiyon kaybına yol açtığı için patojenik olarak sınıflandırılmıştır (31). Birden fazla tanı laboratuvarından gelen ClinVar sınıflandırmaları, bu varyantın patojenik doğasını oybirliğiyle desteklemektedir (32). Bu bağlamda, c.2158-2A>G mutasyonu, moleküler düzeyde bir genotip-fenotip korelasyonunu desteklemektedir; güçlü biyoinformatik ve klinik ifade verileri, bu mutasyonu β-mannosidozun etiyolojik bir nedeni olarak açıkça tanımlamıştır. Ancak, bu mutasyona ilişkin fonksiyonel analiz verileri literatürde sınırlıdır; bu nedenle, mRNA düzeyindeki ekleme etkilerini ve enzim aktivitesi eksikliğini doğrulayan deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

ZGB ve DEHB özelliklerini gösteren başka bir bireyde, TLK2 geninde muhtemelen patojenik bir de novo varyant olduğu saptanmıştır. Bu gen, histon şaperonları ASF1A/B ile etkileşimi sayesinde kromatin yeniden modellenmesi ve genomik stabilite için hayati önem taşıyan bir serin/treonin kinazı kodlar. Yapısal protein modellemesi, mutasyon nedeniyle kodlanan proteinde destabilizasyon olduğunu ortaya koymuştur. TLK2 aracılı kromatin düzenlemesindeki bozulmanın nörogelişimsel fenotiplerle ilişkili olduğu bilinmektedir ve bu vakadaki klinik tablo, Mental Retardasyon 57 sendromu ile uyumludur (33). p.Arg190, TLK2'nin N-terminal bölgesinde yer alır; bu bölge nükleer lokalizasyon sinyaliyle ilgili olabilir ve protein dimerizasyonu, nükleer hedefleme ve aktivasyon için kritik öneme sahiptir (34). Arg190'ın pozitif yüklü bir amino asit olduğu ve bu konumda bulunduğu göz önüne alındığında, Arg→Gln substitüsyonu proteinin konformasyonunu, lokalizasyonunu veya etkileşim ağını etkileyebilir; bu nedenle, DNA hasarı yanıtı, kromatin bakımı ve ASF1A/B şaperonlarıyla etkileşimler açısından özel olarak değerlendirilmelidir (35). TLK2 missense varyantlarının klinik etkileri genellikle kinaz aktivitesinin kaybı, bozulmuş hücre içi lokalizasyon ve protein-protein etkileşimlerinin azalmasını (örneğin, CHD7, CHD8, RAD50 ve BRD4 ile) içerir (33). Sonuç olarak, TLK2 p.Arg190Gln varyantı literatürde rapor edilmemiş olsa da, protein yapısının N-terminal bölgesindeki potansiyel fonksiyonel rolü, in silico tahminlerine ve TLK2 varyantları için tanımlanmış mekanizmalara dayanarak olası bir patojenik faktör olduğunu düşündürmektedir.

Ayrı bir vakada, NAA15 geninde muhtemelen patojenik bir varyantın varlığı tespit edilmiştir. Bu gen, yeni sentezlenen proteinlerin translasyon sonrası N-terminal asetilasyonundan sorumlu olan NatA kompleksinin temel bir bileşenini kodlamaktadır. Bu modifikasyon, proteinlerin hücre içerisindeki doğru konumlanması ve işlevleri için kritik bir öneme sahiptir. NAA15'teki haploinsüfisiyansın nöronal gelişimi ve sinaptik düzenlemeyi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu bireydeki gelişimsel ve konuşma gecikmesi, davranış bozuklukları ve epilepsi gibi klinik belirtiler, daha önce literatürde tanımlanmış olan NAA15 ile ilişkili nörogelişimsel bozukluklarla yakın bir benzerlik göstermektedir (36-38). Ancak, vakamızda belirlediğimiz bu varyant, segregasyon analizinde anneden miras alındığının ortaya çıkması nedeniyle, çocuğun tüm klinik tablosunu tek başına açıklayabilecek yeterli bir bulgu olarak değerlendirilmemiştir.

Ayrı bir bireyde, hem CSF1R hem de DRD4 genlerinde yeni, muhtemelen patojenik varyantlar saptanmıştır. CSF1R geni, mikroglial hücre çoğalması ve homeostazı için kritik olan bir reseptör tirozin kinazı kodlar; bu gendeki mutasyonlar, bozulmuş mikroglial fonksiyon nedeniyle beyaz madde anormalliklerine yol açabilir. Bu sırada, DRD4 ise sinaptik iletimi modüle eden bir dopamin reseptörünü kodlar. Özellikle ekzon 3'teki tandem tekrar polimorfizmleri, DRD4'teki varyantlar, değişmiş dopaminerjik sinyalizasyon ile ilişkilendirilmiş ve DEHB gibi dikkat eksikliği fenotiplerinde rol oynamaktadır (39-42).

Vakada saptanan hem CSF1R hem de DRD4 gen varyantları, segregasyon analizinde babadan miras alındığı için, çocuktaki patojenik etkilerini klinik tabloyla açıklamak için yeterli bulgular olarak değerlendirilmemiştir.

Son olarak, vakalardan birinde TRIO geninde de novo muhtemelen patojenik bir varyant saptandı. TRIO, Rac1 ve RhoA'nın aktivasyonu yoluyla aktin sitokeletinin yeniden modellenmesini düzenleyen bir Rho guanin nükleotid değişim faktörünü kodlar. Patojenik varyantların, Rac1 aracılı dendritik diken gelişimini bozduğu, bunun da sinaps oluşumunun ve nörogelişimsel eksikliklerin bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir. Gözlemlenen fenotipik özellikler, TRIO ile ilişkili bozuklukların bilinen bu mekanizmasıyla uyumluydu (43-45).

Saptanan NM_007118.4(TRIO):c.4394A>G mutasyonu de novo'dur ve TRIO'nun Dbl homoloji 1 (DH1) alt alanında yer alan p.Asn1465Ser amino asit değişikliğine karşılık gelir. Bu varyant, ClinVar'da muhtemelen patojenik olarak, bazı kaynaklarda ise patojenik olarak sınıflandırılmıştır ve çoğu çalışma, bu mutasyonun TRIO ile ilişkili genetik bozukluklarda olduğunu doğrulamıştır (46).

Klinik bağlama bakıldığında, literatürdeki geniş kohort çalışmaları ve vaka raporları, TRIO genindeki de novo mutasyonların genellikle gelişimsel gecikme, zihinsel yetersizlik, makrosefali veya mikrosefali, davranışsal sorunlar (DEHB, obsesif-kompulsif davranış vb.), epilepsi, iskelet anomalileri ve diş malformasyonlarını içeren geniş bir fenotipik spektruma yol açtığını göstermektedir.

Trio-WES analizi, ZGB'nin klinik tanısına önemli bir katkı sağlamıştır. Bu çalışmada, literatürde henüz rapor edilmemiş olan bir novel ve iki de novo varyant tespit ettik. Özellikle, TLK2 ve TRIO genlerindeki varyantların, protein modelleme analizlerine dayanarak protein yapısını destabilize edeceği tahmin edilmiştir. Bu bulgular, yeni ve/veya de novo mutasyonların ZGB'nin ana nedenini oluşturduğunu öne süren önceki raporlarla tutarlıdır. Ayrıca, sonuçlarımız, aile temelli WES'in yalnızca sporadik vakalar için değerli bir tanı yaklaşımı olmakla kalmayıp, aynı zamanda yeni, hastalıkla ilişkili genlerin keşfi için de etkili bir strateji olduğunu vurgulamaktadır.

Genel olarak, bulgularımız de novo varyantların patojenik ilişkisini vurgulamakta ve ZGB etiyolojisinde bozulmuş hücre içi sinyalizasyon yollarının, kromatin yeniden modellenmesinin ve protein modifikasyonunun rolüne dikkat çekmektedir. Çalışmanın temel bir sınırlaması, varyant patojenitesini doğrulamak için fonksiyonel testlerin eksikliğidir. *In silico* tahminler ve yapısal modelleme destekleyici kanıtlar sunsa da kesin mekanistik içgörüler elde etmek için deneysel doğrulama esas olacaktır.

Teşekkür: Hastalarımıza, ailelerine ve ilgili hekimlere teşekkürlerimizi sunarız.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışmada kullanılan protokoller Helsinki Bildirgesi'ne uygun olup Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (2019/194) tarafından onaylanmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Çalışma öncesinde katılımcıların ebeveynlerinden/yasal vasilerinden yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Veri ve Materyallerin Kullanılabilirliği: Bu çalışma sırasında oluşturulan veya analiz edilen tüm veriler bu makaleye [ve/veya] ek materyal dosyalarına dahil edilmiştir. Daha fazla bilgi için ilgili yazara başvurabilirsiniz.

Yazar Katkıları: Fikir - IG; Tasarım - HG; Denetleme - EA Kaynaklar - EİA; Malzemeler - LB; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - SD; Analiz ve/veya Yorumlama - CK; Literatür Taraması - SY, IG; Yazım - EA, IG; Eleştirel İnceleme - HG, IG.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Yoktur.

KAYNAKLAR

1. Maia N, Nabais Sá MJ, Melo-Pires M, de Brouwer APM, Jorge P. Intellectual disability genomics: current state, pitfalls and future challenges. BMC Genomics. 2021;22:909. [Crossref]
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Arlington, VA: 2013. [Crossref]
3. Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. Clin Genet. 2011;80:117–126. [Crossref]
4. Huang J, Zhu T, Qu Y, Mu D. Prenatal, perinatal and neonatal risk factors for intellectual disability: a systemic review and meta-analysis. PLoS One. 2016;25:11(4):e0153655. [Crossref]
5. Anazi S, Maddirevula S, Faqeih E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. Mol Psychiatry. 2017;22(4):615–624. [Crossref]
6. Xu J, Su W, Wang Y, Luo Y, Ye F, Xu Y, et al. Genetic analysis of 280 children with unexplained developmental delay or intellectual disability using whole exome sequencing. BMC Pediatr. 2024;24(1):766. [Crossref]
7. Ballesta-Martínez MJ, Pérez-Fernández V, López-González V, Sánchez-Soler MJ, Serrano-Antón AT, Rodríguez-Peña LI, et al. Validation of clinical exome sequencing in the diagnostic procedure of patients with intellectual disability in clinical practice. Orphanet J Rare Dis. 2023;18(1):201. [Crossref]
8. Boyarchuk O, Volianska L, Smashna O, Makukh H. Exome sequencing in 90 children with developmental delay: a single-center experience. Front Genet. 2024;15:15052024. [Crossref]
9. Carvill GL, Mefford HC. Next-generation sequencing in intellectual disability. J Pediatr Genet. 2015;4(3):128–135. [Crossref]
10. Hesapcioglu ST, Ceylan MT, Kasak M, Yavas CP. Psychiatric comorbidities of mild intellectual disability in children and adolescents in a clinical setting. Int J Dev Disabil. 2021;67(2):151–157. [Crossref]
11. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol. 2011;29(1):24–26. [Crossref]
12. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature. 2016;536(7616):285–291. [Crossref]
13. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP: database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. Genome Res. 1999;9(8):677–679. [Crossref]
14. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. Hum Genet. 2017;136(6):665–677. [Crossref]
15. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Welcome to NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov
16. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Methods. 2014;11(4):361–362. [Crossref]
17. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010;7(4):248–249. [Crossref]
18. Ng PC, Henikoff S. SIFT. Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3812–3814. [Crossref]
19. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN. a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. Bioinformatics. 2015;31(5):761–763. [Crossref]
20. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. PLoS Comput Biol. 2010;6(12):e1001025. [Crossref]
21. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. Nat Genet. 2014;46(3):310–315. [Crossref]
22. Rodrigues CHM, Pires DEV, Ascher DB. DynaMut2: assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. Protein Sci. 2021;30(1):60–69. [Crossref]
23. Fariselli P, Martelli PL, Savojardo C, Casadio R. INPS. predicting the impact of non-synonymous variations on protein stability from sequence. Bioinformatics. 2015;31(17):2816–2821. [Crossref]
24. Chen Y, Lu H, Zhang N, Zhu Z, Wang S, Li M. PremPS: predicting the impact of missense mutations on protein stability. PLoS Comput Biol. 2020;16(12):e1008543. [Crossref]
25. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. Nucleic Acids Res. 2005;33(Web Server issue):W382-W388. [Crossref]
26. Gu Y, Xiang B, Zhu L, Ma X, Chen X, Cai T. Three intellectual disability-associated de novo mutations in MECP2 identified by trio-WES analysis. BMC Med Genet. 2020;21:99. [Crossref]
27. Murakami H, Tamura N, Enomoto Y, Shimasaki K, Kurosawa K, Hanada K. Intellectual disability-associated gain-of-function mutations in CERT1 that encodes the ceramide transport protein CERT. PLoS One. 2020;15(12):0243980. [Crossref]
28. Gao C, Wang X, Mei S, Li D, Duan J, Zhang P, et al. Diagnostic yields of Trio-WES accompanied by CNVseq for rare neurodevelopmental disorders. Front Genet. 2019;10:485. [Crossref]
29. Alkhayat AH, Kraemer SA, Leipprandt JR, Macek M, Kleijer WJ, Friderici KH. Human β-mannosidase cDNA characterization and first identification of a mutation associated with human β-mannosidosis. Hum Mol Genet. 1998;7:75–83. [Crossref]
30. Bedilu R, Nummy KA, Cooper A, Wevers R, Smeitink J, Kleijer WJ, et al. Variable clinical presentation of lysosomal beta-mannosidosis in patients with null mutations. Mol Genet Metab. 2002;77(4):282–290. [Crossref]
31. Brozkova SD, Varga L, Meszarosova AU, Slobodova Z, Skopkova M, Soltysova A, et al. Variant c.2158-2A>G in MANBA is an important and frequent cause of hereditary hearing loss and beta-mannosidosis among the Czech and Slovak Roma population-evidence for a new ethnic-specific variant. Orphanet J Rare Dis. 2020;26:222. [Crossref]
32. National Center for Biotechnology Information (NCBI). ClinVar. NM_005908.4(MANBA):c.2158-2A>G. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/590928
33. Pavinato L, Villamor-Payà M, Sanchiz-Calvo M, Andreoli C, Gay M, Vilaseca M, et al. Functional analysis of TLK2 variants and their proximal interactomes implicates impaired kinase activity and chromatin maintenance defects in their pathogenesis. J Med Genet. 2022;59(2):170–179. [Crossref]
34. Töpf A, Oktay Y, Balaraju S, et al. Severe neurodevelopmental disease caused by a homozygous TLK2 variant. Eur J Hum Genet. 2020;28(3):383–387. [Crossref]
35. Simon B, Lou HJ, Huet-Calderwood C, Shi G, Boggon TJ, Turk BE, et al. Tousled-like kinase 2 targets ASF1 histone chaperones through client mimicry. Nat Commun. 2022;13(1):749. [Crossref]
36. Stessman HA, Xiong B, Coe BP, Wang T, Hoekzema K, Fenckova M, et al. Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. Nat Genet. 2017;49(4):515–526. [Crossref]
37. Sugiura N, Patel RG, Corriveau RA. N-methyl-D-aspartate receptors regulate a group of transiently expressed genes in the developing brain. J Biol Chem. 2001;276:14257–14263. [Crossref]
38. Cheng H, Gottlieb L, Marchi E, Kleyner R, Bhardwaj P, Rope AF, et al. Phenotypic and biochemical analysis of an international cohort of individuals with variants in NAA10 and NAA15. Hum Mol Genet. 2019;28(17):2900–2919. [Crossref]
39. Manor I, Tyano S, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, Ebstein RP. The short DRD4 repeats confer risk to attention deficit hyperactivity disorder in a family-based design and impair performance on a continuous performance test (TOVA). Mol Psychiatry. 2002;7(7):790–794. [Crossref]
40. Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. PLoS One. 2011;6(10):e26317. [Crossref]
41. Ridge SA, Worwood M, Oscier D, Jacobs A, Padua RA. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:1377–1380. [Crossref]
42. Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, Rutherford NJ, Finch N, Soto-Ortolaza A, et al. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. Nat Genet. 2011;44(2):200–205. [Crossref]
43. Pengelly RJ, Greville-Heygate S, Schmidt S, Seaby EG, Jabalameli MR, Mehta SG, et al. Mutations specific to the Rac-GEF domain of TRIO cause intellectual disability and microcephaly. J Med Genet. 2016;53(11):735–742. [Crossref]
44. Ba W, Yan Y, Reijnders MR, Schuurs-Hoeijmakers JH, Feenstra I, Bongers EM, et al. TRIO loss of function is associated with mild intellectual disability and affects dendritic branching and synapse function. Hum Mol Genet. 2016;25(5):892–902. [Crossref]
45. Barbosa S, Greville-Heygate S, Bonnet M, Godwin A, Fagotto-Kaufmann C, Kajava AV. et al. Opposite modulation of RAC1 by mutations in TRIO is associated with distinct, domain-specific neurodevelopmental disorders. Am J Hum Genet. 2020;106(3):338–355. [Crossref]
46. Gazdagh G, Hunt D, Gonzalez AMC, Rodriguez MP, Chaudhry A, Madruga M, et al. Extending the phenotypes associated with TRIO gene variants in a cohort of 25 patients and review of the literature. Am J Med Genet A. 2023;191(7):1722–1740. [Crossref]