

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

BEYİNDE DEMİR BİRİKİMİ İLE NÖRODEJENERASYON
HASTALIĞINDAN SORUMLU YENİ GEN
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI

NİHAN HANDE AKÇAKAYA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL AYLİN UĞUR İŞERİ

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Nihan Hande AKÇAKAYA tarafından Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ'nin danışmanlığında hazırlanan "Beyinde Demir Birikimi İle Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Yeni Gen Varyantlarının Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 02/04/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



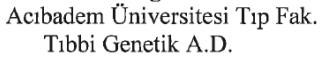
Doç. Dr. Sibel UĞUR İŞERİ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik A. D.



Prof. Dr. Uğur ÖZBEK
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fak.
Tıbbi Genetik A.D.



Doç. Dr. Yelda T. ARGÜDEN
İ.Ü. Cerrahpaşa Rek. Cerrahpaşa Tıp Fak.
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün saffhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nihan Hande Akçakaya



İTHAF

Eşim Mehmet Osman Akçakaya'ya ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora döneminin en başından itibaren her zaman yol gösteren, içtenlikle vaktini ve tecrübesini paylaşarak doktora sürecini anlamamı sağlayan hocam Prof. Dr. Uğur Özbek'e,

Her türlü desteği sunan ve her zaman bakış açımı genişleten danışman hocam Doç. Dr. Sibel A. Uğur İşeri'ye,

Nöroloji uzmanlık döneminde beni nadir nörolojik hastalıklarla tanıştıran genetik doktora sürecinin ilk tohumlarını atan hocam Prof. Dr. F. Yeşim Gülşen Parman'a,

Çalışmalarımın her aşamasında zamanının ayırarak yararlı geri bildirimlerle bana destek olan hocam Prof. Dr. Esra Battaloğlu'na,

Her zaman büyük destek ve motivasyon veren hocam Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na,

Tez izleme komitemde yer alarak bana zaman ayıran hocam Doç. Dr. Yelda Tarkan Argüden'e,

Laboratuvar sürecinde beni sıfırdan yetiştiren ve güzel bilimsel tartışmaları paylaştığımız sevgili arkadaşlarım Dr. Emrah Yücesan, Uzm. Bio. F. Yeşim Kesim, Dr. Özkan Özdemir, Dr. Yücel Erbilgin ve Doç Dr. Özden Hatırnaz Ng'ya,

Bitmeyen MPAN macerasını benimle paylaşan Bio. Garen Haryanyan'a, "Data Guru" Mol. Bio. S. Barış Salman'a, tüm yardımları için Dr. Sinem Fırtına, Uzm. Bio. Sevcan Mercan, Dr. Zeliha Emrence, Dr. Gamze Güven ve Dr. Aris Çakırıs'e,

Güleryüzünü ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Müge Sayitoğlu'na,

Bana destek olan tüm aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TDK-2017-26646, ÖNAP No:51985 ve TSA-2018-27512) ve İstanbul Kalkınma Ajansı (Proje No: TR10/15/YNK/0093) tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v, vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix, x, xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii, xiii, xiv
<u>ÖZET.....</u>	<u>xv-xvi</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1, 2
2.GENEL BİLGİLER.....	3-19
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	20-34
<u>4.BULGULAR.....</u>	<u>35-66</u>
<u>5:TARTIŞMA.....</u>	<u>67-74</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>75-85</u>
FORMLAR	877-89
ETİK KURUL KARARI	900-92
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	93
ÖZGEÇMİŞ	94

TABLULAR LİSTESİ

	sayfa
Tablo 2.1: NBIA ilişkili genler, protein isimleri ve hastalık alt tipleri.....	4
Tablo 2.2: NBIA alt tiplerinin klinik ve MRG özellikleri.....	7
Tablo 3.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların kodları ve temel özellikleri	20, 21, 22
Tablo 3.2: Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	22
Tablo 3.3: Kullanılan kitler	23
Tablo 3.4: Kullanılan cihazlar	23
Tablo 3.5: Hizmet alınan firma ve kurumlar	24
Tablo 3.6: Kullanılan veritabanları	24, 25
Tablo 3.7: Kullanılan analiz programları	26
Tablo 3.8: Sanger dizilemede kullanmak için tasarlanan primerler ve hedeflenen bölgeler	29, 30
Tablo 4.1: Çalışmadaki örneklere ait çalışmaların ve sonuçların genel dökümü.....	63, 64, 65
Tablo 4.2: Çalışmada <i>C19orf12</i> mutasyonu saptanan hastaların başlıca fenotipik özellikleri	65, 66, 67

ŞEKİLLER LİSTESİ

	sayfa
Şekil 2.1: Başlıca NBIA alt tiplerinde ana MRG bulguları	6
Şekil 2.2: Hücre içi demir dengesi yolakları ve bunların nörolojik hastalıklarla ilişkisi	9
Şekil 2.3: NBIA ile ilişkili genlerin hücrede ilişkili olduğu yolakların şematik gösterimi..	10
Şekil 2.4: Sanger dizileme metodunun şematik gösterimi	16
Şekil 2.5: Yeni nesil dizileme metodunun şematik gösterimi	19
Şekil 3.1: DNA izolasyon basamakları.....	28
Şekil 3.2: Ekzom dizilemede ham veriden analize temel basamakların şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.3: Ekzom datasında X heterozigotluğu yüzdesinin hesaplanması.....	34
Şekil 4.1: Trizomi 21 patolojisi bilinen bireyin pedigri ve MRG'si	36
Şekil 4.2: ND14-17 kodlu örnekte 21 ve 20. kromozoma ait Genome Studio programından BAF ve LRR görselleri	37
Şekil 4.3: ND17-168 nolu örnekte tespit edilen birleşik heterozigot <i>PANK2</i> mutasyonlar.....	38
Şekil 4.4: PKAN fenotipinde olan ND16-154 ve ND17-169 nolu örneklerin aile ağaçları.....	39

Şekil 4.5: <i>PANK2</i> geni Sanger dizileme ile elde edilen Yeni mutasyonların dizileme görüntüleri.....	40
Şekil 4.6: ND14-41 kodlu hastaya ait MRG kesitleri	42
Şekil 4.7: <i>C19orf12</i> geni Sanger dizileme ile elde edilen yeni mutasyonların dizileme görüntüleri ve ND16-160 kodlu hastanın MRG kesiti	43
Şekil 4.8: ND15-94 kodlu bireyin pedigrisi ve <i>FBXO7</i> geninde mutasyonun hastada ve sağlıklı kardeşte dizi görüntüleri	44
Şekil 4.9: Aile 1'de <i>PANK2</i> geninde saptanan birleşik heterozigotluğun IGV'de görünümü.....	46
Şekil 4.10: Aile 1'de saptanan varyantların Sanger dizileme görüntüleri	47
Şekil 4.11: Aile 2'de <i>PANK2</i> geninde saptanan varyantın IGV'de ve Sanger dizilemede görünümü.....	49
Şekil 4.12: ND15-83 ve ND15-84 kodlu kardeşlerde <i>C19orf12</i> 'de homozigot c.32C>T mutasyonunun IGV görüntüsü	51
Şekil 4.13: ND14-58 kodlu hasta bireyde <i>C19orf12</i> mutasyonunun IGV görüntüsü ..	52
Şekil 4.14: ND15-66 kodlu hasta bireyin MR görüntüleri ve aday varyantların IGV görüntüleri.....	54

Şekil 4.15: ND15-66 kodlu bireyin ailesinde <i>SLCA16A2</i> varyantına yönelik enzim kesimi ile segregasyon çalışması	55
Şekil 4.16: <i>HEXB</i> (NM_000521) c.1538T>C varyantının Sanger dizileme ile aile içinde segregasyonu	56
Şekil 4.17: ND15-69 kodlu hasta bireyde <i>PANK2</i> mutasyonunun IGV görüntüsü	57
Şekil 4.18: ND14-18 kodlu bireyin MR görüntüleri.....	59
Şekil 4.19: ND14-18 kodlu bireyde <i>WDR45</i> genindeki mozaik mutasyonun IGV görüntüsü.....	60
Şekil 4.20: <i>WDR45</i> genindeki (NM_007075.3) c.873C>G mutasyonun aile içinde kan ve tükürük örneklerinden elde edilen DNA'da Sanger dizileme ile araştırılması	61
Şekil 4.21: Laboratuvarımızdaki toplam 129 bireye ait ekzom datasında kadın ve erkek bireylerde X kromozomal heterozigotluk dağılımı	62

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A: Adenin

BAF: B alel frekansı

bç: baz çifti

BPAN: “*Beta-propeller*” proteine bağlı nörodejenerasyon

BWA: “*Burrows-Wheeler Aligner*”

C: Sitozin

CNV: “*copy number variation*”, copy sayısı değişiklikleri

CoPAN: CoA sentaz proteinine bağlı nörodejenerasyon

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ddNTP: di-deoksinükleotid triposfatlar

dNTP: deoksinükleosid triptosfatlar

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

F: “*forward*”

FAHN: Yağ asidi 2 hidrosilaza bağlı nörodejenerasyon

Fe: Demir

FISH: Flüoresan in situ hibridizasyon

G: Guanin

GATK: “*Genome Analysis Toolkit*”

HSP: Herediter spastik paraparezi

IGV: “*Integrative Genomics Viewer*”

INAD: İnfantil nöroaksonal distrofi

indel: küçük insersiyon ve delesyonlar

µl: mikrolitre

LOH: “*copy neutral loss of heterozygosity*”, kopya nötr heterozigotluk kaybı

LRR: LogR kesiri

MAF: Minör alel frekansı

MPAN: Mitokondrial membran proteinine bağlı nörodejenerasyon

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

NBIA: “*Neurodegeneration with brain iron accumulation*”, Beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon

nm: nanometre

OD: Otozomal dominant

OGT: “*Oxford Gene Technology*”

OR: Otozomal resesif

R: “*revers*”

PKAN: pantotenat kinaza bağlı nörodejenerasyon

PLA2G6: “*Calcium-independent phospholipase A₂ group VIa (iPLA2VIa)*”, Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A₂.

PLAN: Fosfolipaz A₂'ye bağlı nörodejenerasyon

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

S: Sülfür

SNP: “*single nucleotide polymorphism*”, tek nükleotid polimorfizm

SSCP: “*single strand conformation polymorphism*” tek iplik polimorfizm konfirmasyonu

T: Timin

Tm: “*Melting temperature*”

WT: Yabanıl tip

XLD: X kromozomuna bağlı dominant

VCF: “*Variant Call Format*”

YND: Yeni nesil dizileme

ÖZET

Akçakaya, N.H. Beyinde Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Gen Varyantlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon (NBIA), basal gangliyalarda demir birikimi nedeniyle ilerleyici distoni, spastisite, parkinsonizm, nöropsikiyatrik değişiklikler ve optik atrofi veya retinal dejenerasyon ile seyreden nadir görülen bir grup kalıtsal hastalık grubunun ortak adıdır. Hastalığın başlangıç yaşı infant dönemden geç erişkinlik dönemine kadar değişkenlik gösterir. Klinik ve genetik olarak heterojen bu hastalık grubunda her gene ait fenotipin tanımlanmış belirgin özellikleri olmakla birlikte çoğu zaman klinik olarak birbirinden ayırt etmek güçtür. Klinik bulgular doğrultusunda moleküler genetik test ile özgül hastalık alt türünün tanısını koymak mümkündür.

Bu çalışma hastalık ile ilişkili genlerde klasik ve yeni nesil moleküler yöntemler kullanılarak dizi analizi ile patojenik varyasyonların tespiti yapmak hedeflenmiştir. Bu amaçla klinik olarak iyi karakterize hasta gruplarında uygun aday genler taranmıştır. Aday genlerde hastalık ile ilişkili varyasyon tespit edilemeyen seçilmiş olgularda aday genlerin sayısının çokluğundan dolayı ekzom dizileme yöntemi uygulanmıştır. Tüm genleri bir arada daha hızlı ve yüksek çıktı olarak ekzom dizileme yöntemi ile incelenmesiyle hastalıkla birebir ilişkili patojenik varyasyon tespit edilirken, hem de fenotipi etkileyici özelliğe sahip diğer varyasyonların araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışma sonucunda 21 hastada *PANK2*, 9 hastada *C19orf12*, birer hastada ise *WDR45*, *PLA2G6*, *FBXO7* ve *HEXB* varyasyonları saptanmıştır. Bunlardan 8 tanesi daha önce klinik ile ilişkisi bilinmeyen yeni patojen varyantlardır. Bu çalışmada genetik tanı ve fenotipik yeni tanımlamaların yanı sıra bir erkek hastada X kromozomunda yer alan *WDR45* genine ait yeni *de novo* mozaik bir varyasyonun erkeklerde ekzom datasında X kromozomuna ait heterozigot birçok varyantla birlikte oluşu dikkatimizi çekmiştir. Yeni nesil dizileme verisinde X kromozom heterozigotluğu olarak adlandırılan bu durum tarafımızdan ilk defa yeni bir amaç doğrultusunda kullanılarak, cinsiyet kromozomu mozaiklik tespitini veri güdümlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nörodejenerasyon, Beyin, Demir, Hareket bozukluğu, Nöropsikiyatrik bozukluk, Patojenik varyasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TDK-2017-26646, ÖNAP No:51985 ve TSA-2018-27512) ve İstanbul Kalkınma Ajansı (Proje No: TR10/15/YNK/0093) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Akçakaya, N.H. Investigation of new gene variants responsible for neurodegeneration with brain iron accumulation. Istanbul University, Institute of Health Science, İstanbul 2019.

Neurodegeneration with brain iron deposition accumulation (NBIA), is a rare group of hereditary diseases which is characterized by progressive dystonia, spasticity, parkinsonism, neuropsychiatric changes and optic atrophy or retinal degeneration due to iron accumulation in basal ganglia. The age of onset varies from infancy to late adulthood. Although, there may be some distinct phenotypic features associated with these genetically heterogeneous diseases, it is often difficult to distinguish each phenotype solely on clinical findings. Molecular genetic testing has been a useful method to diagnose specific disease sub-type in the light of clinical findings.

This study has aimed to determine pathogenic variations associated with NIBA subtypes by utilizing classical and new generation molecular methods. For this purpose, appropriate candidate genes were screened in clinically well-characterized patient groups. Due to the high number of candidate genes, whole exome sequencing (WES) method was applied in selected cases. WES is a fast and high-throughput method to screen for all variations in exonic regions that may have a direct effect on phenotype.

As a result of the study pathogenic variations in *PANK2* for 21 patients, *C19orf12* in 9 patients have been detected. Additionally, variations in *WDR45*, *PLA2G6*, *FBXO7* and *HEXB* were also detected in individual families with rare subtypes of NIBA. Of these, 8 were new pathogenic variants, which have not been related to the NBIA phenotype before. Along with variations and new phenotypic definitions, a novel *de novo* mosaic variation in *WDR45* gene has attracted our attention due to other heterozygous variants on X chromosome in male exome data. This phenomenon known as X chromosome heterozygosity level in next generation sequencing data was used by our group for the first time to detect data-driven analysis of sex chromosome mosaicism.

Key Words: Neurodegeneration, Brain, Iron, Movement disorder, Neuropsychiatric disorder, Pathogenic variation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TDK-2017-26646, ÖNAP No:51985 and TSA-2018-27512) and Istanbul Developmental Agency (Project No: TR10/15/YNK/0093).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon (NBIA), basal gangliyalarda demir birikimine bağlı, ilerleyici distoni, spastisite, parkinsonizm, nöropsikiyatrik değişiklikler ve optik atrofi gibi bulgular ile seyreden nadir görülen bir grup kalıtsal nörolojik hastalık grubunun ortak adıdır. NBIA'de basal gangliyalarda; özellikle globus pallidus ve / veya substantia nigra da anormal demir birikimi görülür. Demir birikiminin etiyojisi net olarak anlaşılamamış olmakla birlikte demir birikiminin başlıca hareket bozukluğu ile kendini gösteren ilerleyici bir nörodejenerasyona yol açtığı kabul görmektedir (Schneider ve ark. 2012).

NBIA ile ilişkili fenotiplerin en az %85'inden sorumlu genler *PANK2*, *PLA2G6*, *C19orf12*, *FA2H*, *ATP13A2*, *WDR45*, *COASY*, *FTL*, *CPL*, *CRAT*, *REPS1*'dir (Hayflick ve ark. 2018; Drecourt ve ark. 2018). Gelişimsel sendromik özelliklerle seyreden *C2orf37*, *GTPBP2* gen patolojilerinde de demir birikimi gözlenir (Alazami ve ark. 2008; Jaber ve ark. 2016; Drecourt ve ark. 2018). Genetik olarak henüz tanımlanmamış ve fonksiyonu araştırılmamış gen varyantlarına bağlı NBIA alt türleri vardır (Dusek ve Schneider 2012). Ek olarak *PSENI*, *FXN*, *AP4MI*, *DDHD1*, *PLP1* gibi birçok gen mutasyonlarında da beyinde demir birikimi olduğu bilinmektedir (Stevenson ve ark. 2009; Schneider ve ark. 2012; Carecchio ve ark. 2017; Dard ve ark. 2017; Roubertie ve ark. 2018). Bazılarında tartışmalı olmakla birlikte bu hastalıklarda nörodejenerasyona ikincil demir birikimi olduğu düşünülmektedir. Ayırıcı tanıya giren en önemli hastalıklar lizozomal ve atipik parkinson hastalıklarıdır (Paisán-Ruiz ve ark. 2010; Dusek ve Schneider 2012). Bu hastalıklar zaman zaman yanlış olarak NBIA olarak tanımlanabilirler.

Her gene ait fenotipin tanımlanmış belirgin özellikleri olmakla birlikte çoğu zaman klinik olarak birbirinden ayırt etmek güçtür. Klinik ilerleme hızı çok değişkendir; hızlı ilerleyici veya uzun durağan dönemlerle giden yavaş ilerleyici hastalık seyri olabilir. Hastalığın başlangıç yaşı da süt çocukluğu döneminden geç erişkinlik dönemine kadar değişkenlik gösterir. Fenotipik örtüşmeler sıkça gözlenir. En sık gözlenen semptom başlıca bazal ganglia tutulumuna bağlı ortaya çıkan hareket bozukluğudur. Hareket bozukluğu en sık distoni ve tremor gibi hiperkinetik tiptedir ancak rijidite ve akinezi gibi hipokinetik bulgular da eşlik edebilir. Ek olarak piramidal

bulgular, kognitif ve psikiyatrik tutulum beyindeki nörodejenerasyonun yaygın olduğuna işaret eder (Hayflick ve ark. 2018).

Tarıya genellikle anormal demir birikimi gösteren beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile yönlendirilir (Kruer ve ark. 2012). Globus pallidusta izlenen yoğun demir birikimin yanı sıra *PANK2* mutasyonlarında sıkça gözlenen kaplan gözü belirtisi, *WDR45* mutasyonlarında substantia nigra da santral hipointens bant gibi ek bulgular hastalığın alt tipi açısından ip ucudur. Klinik bulgular doğrultusunda moleküler genetik test ile özgül hastalık alt türünün tanısını koymak mümkündür. Moleküler genetik inceleme dışında hastalık tanısına özgü başka bir test yoktur (Hayflick ve ark. 2018).

Bu çalışmada hastalık ile ilişkili genlerde klasik ve yeni nesil yöntemler kullanılarak dizi analizi ile mutasyon tespiti yapmak hedeflenmiştir. Bu amaçla klinik olarak iyi karakterize hasta gruplarında uygun aday genler taranmıştır. Aday genler klinik bulgular göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Aday genlerde mutasyon tespit edilemiş seçilmiş olgularda aday genlerin sayısının çokluğundan dolayı ekzom dizileme yöntemi uygulanmıştır. Tüm genleri bir arada daha hızlı ve yüksek çıktılı olarak ekzom dizileme yöntemi ile incelemesi ile hastalıkla birebir ilişkili mutasyon tespit edilirken, hem de fenotipi etkileyici özelliğe sahip diğer varyasyonların araştırılması hedeflenmiştir. Bu yaklaşımlar ile yeni mutasyonlar tanımlanmış ve fenotipik bulgular ayrıntılı olarak dökümente edilmiştir. Nörodejenerasyonla yeni gen varyantlarının tespiti ve genotip fenotip ilişkisinin ayrıntılı olarak incelenmesi tanısal ve etiyolojik açıdan önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyinde Demir Birikimi ile Nörodejenerasyon (NBIA)

NBIA terimi, tek gen bozukluklarına bağlı basal ganglialarda yüksek demir düzeylerini gösteren hastalıkları tanımlar (Hayflick ve ark. 2003). NBIA alt tiplerinin çoğu, demir homeostazında bilinen bir doğrudan role sahip olmayan proteinlerdeki bozukluklardan kaynaklanır. Seçici olarak belirli beyin bölgesinde benzer patofizyolojik değişim gösteren bu hastalıklarda genetik etioloji göz önüne alındığında farklı yolların tutulumu söz konusudur. Bunların başlıcaları yağ asidi metabolizması, palmitilasyon ve hücrel süreçler ile ilgili otofajidir (Drecourt ve ark. 2018; Hayflick ve ark. 2018). Dolayısıyla yolak farklılıklarına rağmen bu hastalıklar hem biyolojik/patolojik son nokta, hem de klinik açıdan NBIA başlığı altında birlikte değerlendirilir (Hayflick ve ark. 2018).

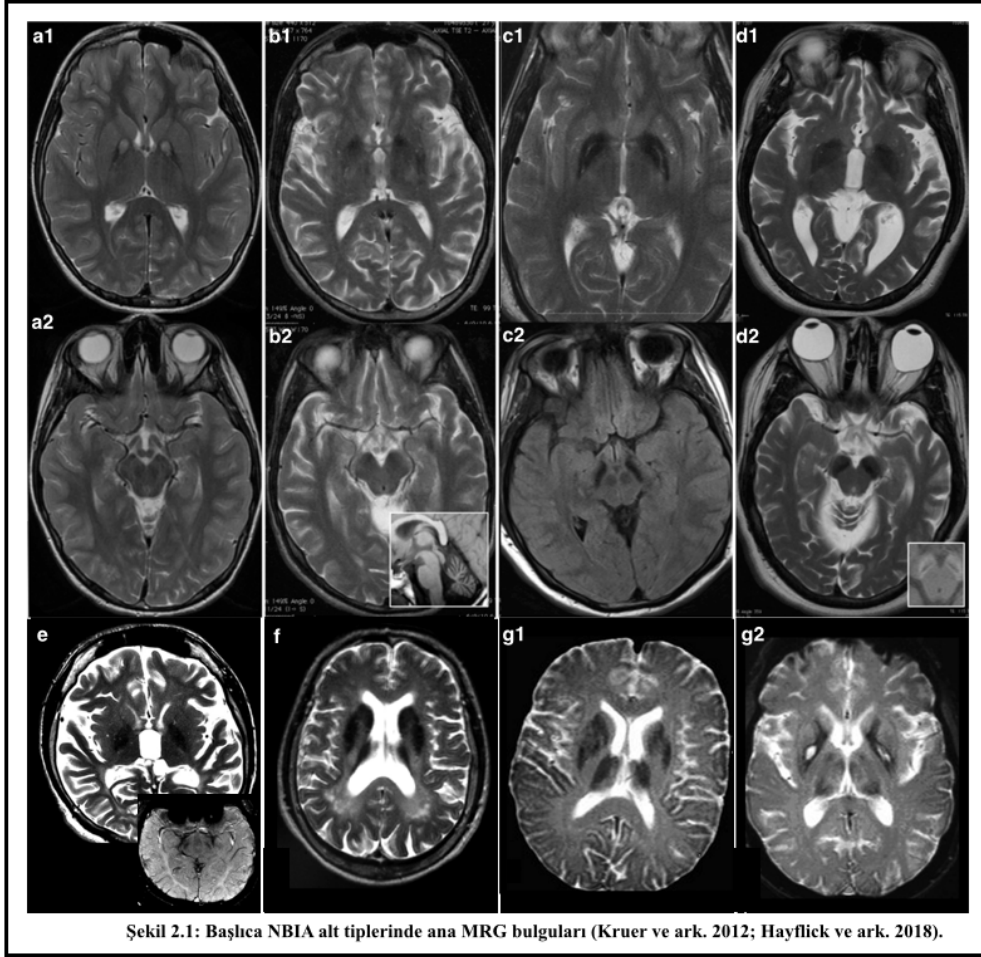
NBIA ilk olarak 1922'de Julius Hallervorden ve Hugo Spatz tarafından pantotenat kinaza bağlı nörodejenerasyon (PKAN) hastalarında Hallervorden–Spatz sendromu olarak tarif edilmiştir. Başlangıçta Hallervorden–Spatz sendromu, NBIA'ya eş değer olarak kullanılmıştır (Zhou ve ark., 2001). Bu durum tıbbi literatürde alt tiplerin tanımlanması ile tutarsızlaşmış ve karmaşıklaşmıştır. Nazi Almanyası döneminde sistematik olarak öldürülen engelli çocukların ve yetişkinlerin beyinlerinde yaptıkları çalışmalarla bu hastalığı tanımlayan Hallervorden ve Spatz etik dışı tutumları nedeniyle Hallervorden–Spatz sendromu ismi kullanılmamaktadır (Shevell 1992 ve 2012). NBIA'nın bir başka alt tipi olan infantil nöroaksonal distrofiyi (INAD) tanımlayan Franz Seitelberger bilimsel olarak Nazi programlarından faydalandığı için Seitelberger hastalığı ismi kullanılmamaktadır (Kondziella 2009). Günümüzde bu hastalıkları etiyojisi ile ilişkilendiren gen veya protein ismine referans veren bir hastalık isimlendirmesi kullanılmaktadır (Hayflick ve ark., 2003). Tablo 2.1'de NBIA alt tiplerine neden olan gen ve hastalık isimleri verilmiştir.

Tablo 2.1: NBIA ilişkili genler, protein isimleri ve hastalık alt tipleri (Drecourt ve ark. 2018; Hayflick ve ark. 2018)		
GEN	PROTEİN	NBIA alt tipi
<i>PANK2</i>	Pantotenat-kinaz 2	Pantotenat kinaza bağlı nörodejenerasyon (PKAN)
<i>PLA2G6</i>	Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2-grup VIa (iPLA2VIa)	Fosfolipaz A2'ye bağlı nörodejenerasyon (PLAN) ve infantil nöroaksonal distrofiyi (INAD)
<i>C19orf12</i>	C19orf12	Mitokondriyal membran proteinine bağlı dejenerasyon (MPAN)
<i>WDR45</i>	WD40-tekrar protein 45	"Beta-propeller" proteine bağlı nörodejenerasyon (BPAN)
<i>CoASY</i>	Coenzim A sentetaz	CoA sentaz proteinine bağlı nörodejenerasyon (CoPAN)
<i>FA2H</i>	Yağ asidi 2 hidroksilaz	Yağ asidi 2 hidrosilaza bağlı nörodejenerasyon (FAHN)
<i>ATP13A2</i>	Katyon taşıyıcı ATPaz 13A2	Kufor-Rakeb hastalığı
<i>REPS1</i>	RALBP1 ilişkili EPS domain içeren protein 1	Beyinde demir birikimine bağlı nörodejenerasyon tip 7
<i>CRAT</i>	Karnitine asetil transferaz	Beyinde demir birikimine bağlı nörodejenerasyon tip 8
<i>CPL</i>	Serüloplazmin	Aserüloplazminemi
<i>FTL</i>	Ferritin hafif zincir	Ferritinopati

NBIA nadir bir hastalıktır, ancak kesin prevalans verileri bilinmemektedir. Olguların yaklaşık yarısını oluşturan PKAN için verilmiş prevalans değerine dayanarak, NBIA'nın dünya çapında yaklaşık 500.000 kişide 1 görüldüğü söylenebilir (Hayflick ve ark. 2018). NBIA'nın alt bir tipi belirli bir mutasyonun toplum içinde sık görülmesine bağlı olarak bazı coğrafi bölgelerdeki belirli popülasyonlarda (örn., Dominik Cumhuriyeti'nde PKAN) nispeten yüksek prevalansa sahip olabilir (Delgado ve ark. 2012).

Klinik özellikler ve MRG'de basal gangliyalarda demir birikimi kombinasyonu NBIA tanısını akla getirir. X'e bağlı dominant (XLD) kalıtılan *WDR45* genindeki mutasyonlara bağlı oluşan tipi dışında tümü otozomal resesif (OR) geçiş gösterir (Hayflick ve ark. 2013; Drecourt ve ark. 2018; Hayflick ve ark. 2018). Herhangi bir

fonksiyonel alanda gerileme olan tüm çocukların nörolojik muayenesi, oftalmolojik muayenesi ve MR incelemesi birlikte değerlendirilmelidir. Periferik sinir tutulumu, ayrıntılı bir aile öyküsü ile elde edilen veri kümesi genellikle bir NBIA alt tipi için ön tanı sağlar (Kruer ve Boddaert 2012). Her bir NBIA alt tipinin baskın klinik özellikleri, karakteristik MRG değişiklikleriyle birlikte Tablo 2.2’de özetlenmiştir. NBIA’da MRG bulguları tipik olarak mevcut olduğunda tanı açısından en değerli bilgileri içerir. Şekil 2.1 başlıca NBIA alt tiplerinde ana MRG bulgularını göstermektedir. Tüm veriler spesifik bir tanıyı gösterdiğinde, şüphelenilen gende mutasyonları tanımlamak için hedeflenen genetik testler gereklidir. Bununla birlikte, genellikle klinik özellikler non-spesiftir. MRG bulguları zaman içinde değişim gösterebilir ve tek bir genin testini göstermek için yeterince spesifik bulgular içermeyebilir. Bu durumlarda, NBIA genlerinin yeni nesil dizileme yöntemleri kullanarak topluca değerlendirilmesi en verimli ve uygun maliyetli yaklaşımı sağlar (Hayflick ve ark. 2018).

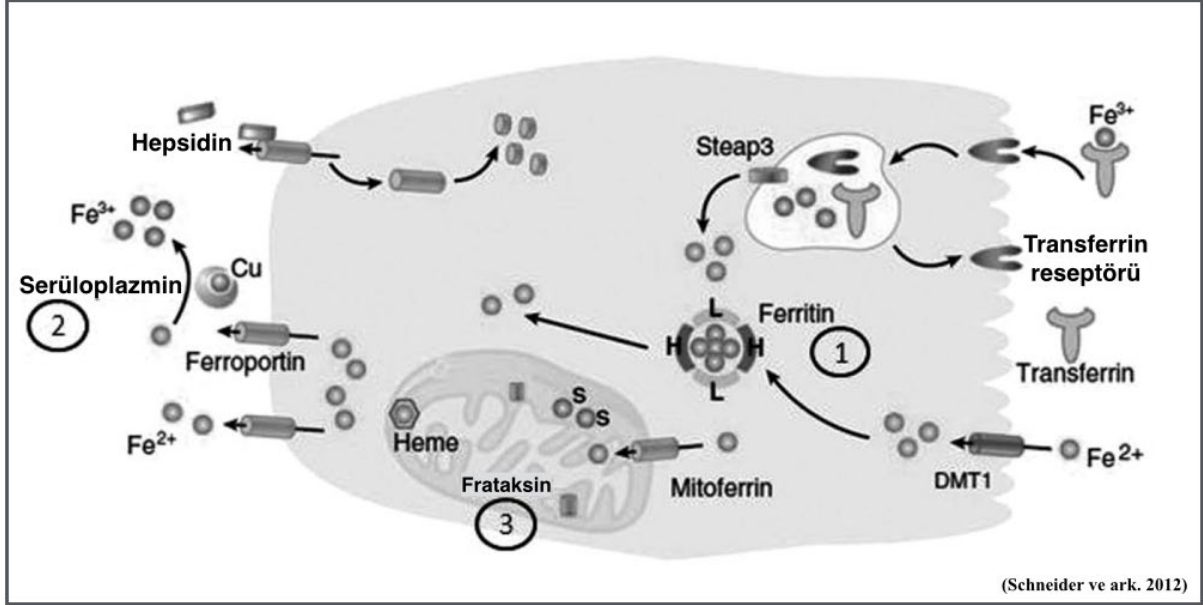


Şekil 2.1: Başlıca NBIA alt tiplerinde beyinde görülen demir birikimi ve atrofiye ait MRG bulguları gösterilmiştir. **a1:** PKAN hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, globus pallidusun antero-medialinde hiperintensiteyi çevreleyen hipointensite ile karakterize "kaplan gözü" görünümü. **b1:** PLAN hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, globus pallidusun hipointens görünümü. **c1:** MPAN hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, globus pallidusun hipointens görünümü ile medial kısımda izlenen tipik çizgilenme. **d1:** BPAN hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, globus pallidusun hipointens görünümü. **a2:** PKAN hastasının MRG'sinde, substantia nigra düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, substantia nigranın hipointens görünümü. **b2:** PLAN hastasının MRG'sinde, substantia nigra düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, substantia nigranın hipointens görünümü ve küçük resimde T1 ağırlıklı sagittal kesitte serebellar atrofi görünümü. **c2:** MPAN hastasının MRG'sinde, substantia nigra düzeyinden geçen FLAIR ağırlıklı kesitte, substantia nigra ve nükleus ruberlerin hipointens görünümü. **d2:** BPAN hastasının MRG'sinde, substantia nigra düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, substantia nigranın hipointens görünümü ve küçük resimde T1 ağırlıklı kesitte izlenen substantia nigrada "halo" görünümü. **e:** FAHN hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte, globus pallidusun hipointens görünümü ve serebral atrofi ile küçük resimde substantia nigrada daha geri planda izlenen hipointensite. **f:** Aserüloplazminemi hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte basal gangliyalarda izlenen yaygın hipointensite ve ak madde hiperintensiteleri görülmektedir. **g1:** Nöroferritinopati hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte basal gangliyalarda izlenen yaygın yama tarzında hipointensiteler görülmektedir. **g2:** Nöroferritinopati hastasının MRG'sinde, globus pallidus düzeyinden geçen T2 ağırlıklı kesitte basal gangliyalarda izlenen yaygın yama tarzında hipointensitelere ek olarak kavitasyon oluşumuna bağlı hiperintensiteler görülmektedir.

Tablo 2.2: NBIA alt tiplerinin klinik ve MRG özellikleri (Drecourt ve ark. 2018; Hayflick ve ark. 2018)		
Hastalık-Gen	Belirgin klinik özellikler	Beyin MRG özellikleri
PKAN- <i>PANK2</i>	Distoni, parkinsonizm, spastisite, pigmenter retinopati, akantositoz, nöropsikiyatrik bulgular	Globus pallidusta T2 hiperintense sinyalin hipointense sinyal ile çevrelendiği “ kaplan gözü belirtisi ”, Substantia nigranın tutulumu daha geri plandadır.
PLAN- <i>PLA2G6</i>	Psikomotor regresyon, ataksi, otistik özellikler, distoni, parkinsonizm, optik atrofi	Hastalığın ilerleyen döneminde ortaya çıkan globus pallidus ve substantia nigrayı eşit etkileyen demir birikimi, serebellar atrofi ve gliosis
MPAN- <i>C19orf12</i>	Spastisite, distoni, demans, periferik sinir tutulumu	Globus pallidus ve substantia nigrayı eşit etkileyen demir birikimi, T2 sekansta globus pallidus’un medullar laminasında çizgi görünümü
BPAN- <i>WDR45</i>	Zihinsel yetmezlik, nöbetler, juvenil parkinsonizm	Substantia nigrada globus pallidustan daha baskın T2 hipointensite, T1 sekansta serebellar pedunküllerde izlenen parlak “halo” görünümü
CoPAN- <i>CoASY</i>	Zihinsel yetmezlik, distoni, spastisite, davranışsal sorunlar	Globus pallidusta belirgin T2 hipointens sinyal
FAHN- <i>FA2H</i>	Spastisite, ataksi, distoni, optik atrofi, demans ve nöbetler	Globus pallidusta T2 hipointens sinyal, yaygın serebral atrofi ve ak madde değişiklikleri
Kufor-Rakeb hastalığı- <i>ATP13A2</i>	Jüvenil parkinsonizm ve demans	Striatumda T2 hipointens sinyal ve global atrofi
Beyinde demir birikimine bağlı nörodejenerasyon tip 7- <i>REPS1</i>	hipotoni, ilerleyici serebellar ve piramidal sendrom	Globus pallidus ve substantia nigrada demir birikimi ve ilerleyici cerebral ve cerebellar atrofi
Beyinde demir birikimine bağlı nörodejenerasyon tip 8- <i>CRAT</i>	Nöromotor gelişim geriliği, hipotoni, ilerleyici serebellar ve piramidal bulgular, duysal nöropati	Globus pallidus ve substantia nigrada demir birikimi, serebellar atrofi ve hiperintensiteler
Aserüloplasminemi- <i>CPL</i>	Eriskin başlangıçlı retinal dejenerasyon, diyabet ve kore, distoni ya da ataksi	Dentat nükleus, substantia nigra, globus pallidus, putamen, kaudat ve talamusta kaviter lezyonlar olmaksızın T2 hiperintens sinyal
Nöroferritinopati- <i>FTL</i>	Erişkin başlangıçlı hafif kognitif problemlerle birlikte kore ya da distoni	Dentat nükleus, substantia nigra, globus pallidus, putamen, kaudat ve talamusta kaviter lezyonlarla beraber T2 hiperintens sinyal

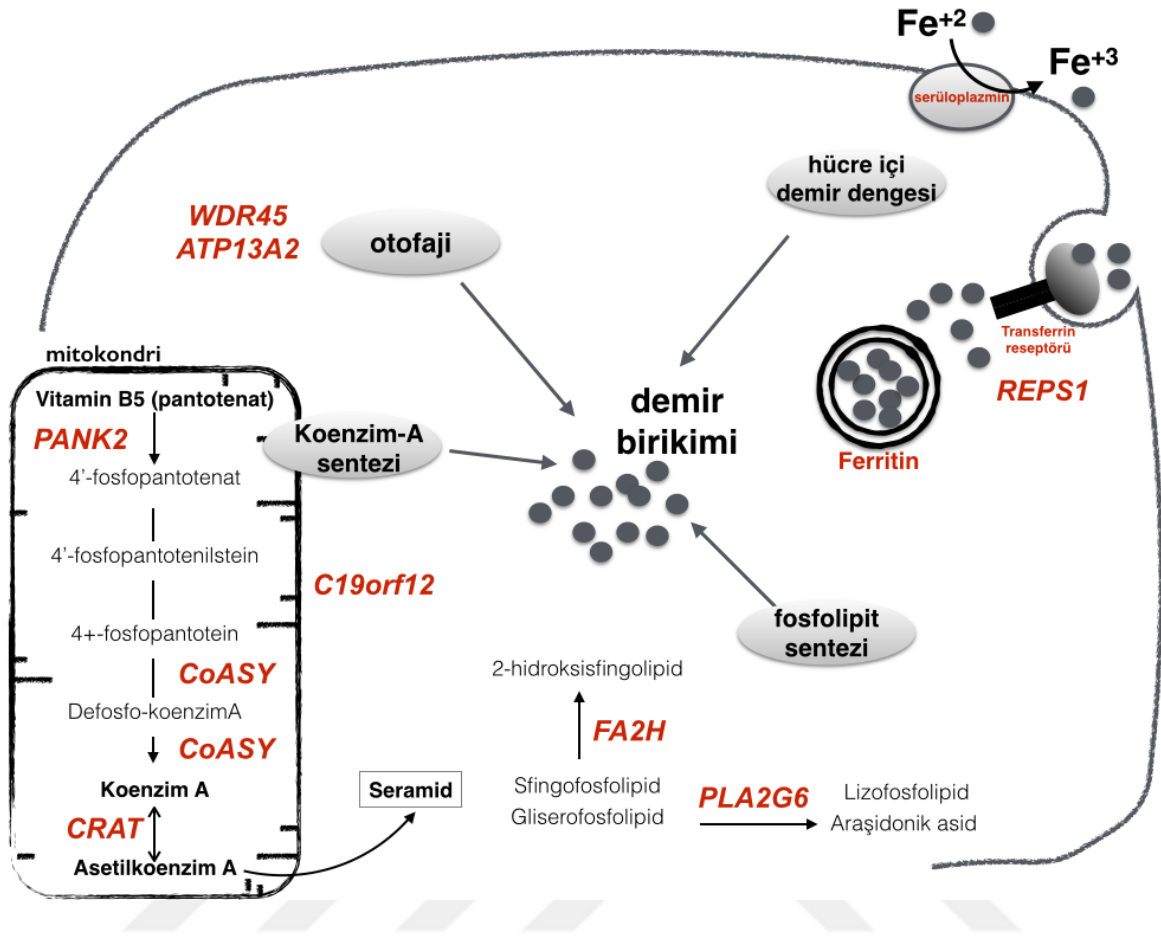
NBIA genetik ve klinik heterojenite gösterse de, alt tiplerin hepsi demir birikimine yol açan globus pallidus ve substantia nigra'nın dejenerasyonu ile kendini gösterir (Kruer ve ark. 2012). Globus pallidus ve substantia nigra normal beyindeki en zengin demir yapıları arasındadır.

Normalde demir açısından zengin bu yapıların tutulumunun temeli belirsizdir. Demir homeostazında sadece iki alt tipe ait genin rolü vardır: *FTL* ve *CP*. Diğer NBIA proteinleri demir metabolizmasında bilinen bir işleve sahip değildir ve beyin dışında başka sistemik demir trafiğini değiştirmemiştir (Schneider ve ark. 2012). Her ne kadar bu yolların kesin kesişimi belirsiz olsa da, mitokondriyal membran bütünlüğü, lipid metabolizması ve ilişkili enerji yolları ile otofaji yolları üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hücre içi demir dengesi, demir metabolizması ile ilişkili nörolojik hastalıklar ve bu yollarla ilişkiler Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'te özetlenmiştir (Schneider ve ark. 2012, Drecourt ve ark. 2018).



Şekil 2.2: Hücre içi demir dengesi yolları ve bunların nörolojik hastalıklarla ilişkisi (Schneider ve ark.2012).

Hücre içine demir alımı divalent taşıyıcı DMT1 (alt sağda gösterilen ferröz demir, Fe^{+2}) veya transferrin reseptörünün endositozu (üst sağda gösterilen ferrik demir, Fe^{+3}) yoluyla olabilir. Steap3, hücre içine transferrin aracılı demir taşıyan bir ferriredüktazdır. Ferritin, ağır zincirler ve hafif zincirlerden oluşan etkin bir depolama proteinidir. Ferritin hafif zincirlerini kodlayan gendeki mutasyonlar **nöroferritinopati** ile ilişkilidir (1). Demir homeostazisi hücre içinde ferroportine bağlanan hepsidin tarafından düzenlenir. Serüloplazmin, feroksidaz aracılı etkin bir hücrel demir salımından sorumlu proteindir. Serüloplazmin kodlayan gendeki mutasyonlar, **aserüloplazminemiye** neden olur (2). Demir mitokondriye mitoferrin yoluyla girer, Frataksin Fe-S küme formasyonuna ve heme biyosentezine aracılık eden bir mitokondriyal proteindir. Frataksin mutasyonları **Friedreich ataksisine** neden olur (3).



Şekil 2.3: NBIA ile ilişkili genlerin hücrede ilişkili olduğu yolların şematik gösterimi.

WDR45 ve *ATP13A2* hücre içinde otofaji yolağında yer alır. Bu yolağın doğrudan demir ile ilişkisi bilinmemekle birlikte bu genlerin mutasyonlarına bağlı aksama demir birikimi ile sonuçlanır. *PANK2*, *CoASY*, *CRAT* ve *C19orf12* gen ürünleri mitokondride yerleşim gösterir (Schneider ve ark 2012; Drecourt ve ark 2018). *PANK2*, *CoASY* ve *CRAT*'ın vitamin B5'ten asetilkoenzim A sentezinde yer aldıkları bilinmektedir. Asetilkoenzim A seramid sentezinde kullanılarak hücre içinde lipid yolağına katılır. Lipid yolağında görevli diğer iki gen *FA2H* ve *PLA2G6*'dır. Bu genlerin demir ile bilinen doğrudan ilişkisi yoktur (Schneider ve ark 2012). Demir ile doğrudan ilişkisi bilinenler sadece serüloplazmin, transferrin, ferritin ve *REPS1*'dir. *REPS1* hücre içine endositoz ile transferrin aracılığı ile demir taşınımı sırasında endozom fonksiyonu için gerekli proteinlerden biridir. *REPS1* mutasyonlarında endozomdan demir salınımı bozulur (Drecourt ve ark 2018).

2.1.1. Pantotenat Kinaza Bağlı Nörodejenerasyon (PKAN)

PKAN, NBIA olgularının yaklaşık yarısını oluşturan en yaygın alt tipidir. *PANK2* geni mutasyonlarına bağlı ortaya çıkan otozomal resesif bir hastalıktır (Zhou ve ark. 2001). Prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte 1 milyonda 1 ile 3 sıklıkla görüldüğü tahmin edilmektedir (Gregory ve Hayflick 2013). *PANK2* mutasyonların nasıl seçici bir şekilde globus pallidustaki nöronlarda demir birikimine yol açtığı bilinmemektedir. Mitokondriyal membran üzerinde yerleşen PANK2 enzimi asetilkoenzim A sentezinin ilk basamağında görev alır (Leonardi ve ark. 2007; Schneider ve ark. 2012). Asetilkoenzim A yağ asidi oksidasyon ve sentezinde kullanılır. *PANK2* mutasyonunun yağ asidi oksidasyonu ve sentezini etkilediği düşünülmektedir.

PKAN ayırt edici klinik ve radyografik özellikleri ile tanınabilir. Başlangıç yaşı erken çocukluktan yetişkinliğe değişebilir (Hayflick ve ark. 2003). Başlangıç yaşı ve hastalık ilerlemesi oranı genel olarak korelasyon göstermektedir. Erken başlangıçlı hastalık daha hızlı bir ilerleme hızını gösterirken, daha geç başlangıçlı hastalık tipik olarak daha sinsi bir şekilde ilerler ancak bu bir kural değildir. PKAN'da fenotip ve genotip arasındaki net bir korelasyon tanımlanmamıştır ancak genel olarak protein kaybına ya da proteinin erken sonlanmasına neden olan mutasyonlar klasik hastalığa yol açar (Akçakaya ve ark. 2017).

Klasik PKAN, pantotenat-kinaz 2 proteininin işlev kaybından kaynaklanan erken başlangıçlı, hızlı ilerleyici distoni baskın hastalık fenotipine verilen addır. Bu fenotip hastalar arasında oldukça homojendir; başlangıçtaki ortalama yaş 3 yıldır, en sık görülen başlangıç özelliği ise, alt ekstremitte distonisine bağlı yürüyüş anormalliği ve sakarlıktır. Klasik PKAN fenotipindeki pek çok çocuğun distoni ve spastisite ortaya çıkmadan önce gelişimsel gecikme öyküsü vardır. Nöbetler nadirdir (Akçakaya ve ark. 2017). Klasik PKAN'da pigmenter retinopati yaygın olarak saptanır. Olguların bir grubunda periferik yaymada akantositler görülür (Hayflick ve ark. 2003).

Atipik PKAN, pantotenat-kinaz 2 proteininin kısmi işlev kaybının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülen, geç başlangıçlı fenotipi eder. Atipik PKAN'nın fenotipik spektrumu çok geniştir ve yetişkin başlangıçlı parkinsonizm'e kadar pek çok farklı bulguyu kapsar. Atipik PKAN'nın erken belirtileri nöropsikiyatrik özellikler, oromandibular distoni veya parkinsonizm olabilir. Konuşma kusurları sıklıkla hastalığın

erken döneminde kendini gösterir ve dizartriya, hipofoni, palilalia veya garip kekemeyi içerebilir. Nöropsikiyatrik problemler arasında en yaygın olanları dürtüsellik ve obsesif kompulsif bozukluktur (Hayflick ve ark. 2003; Akçakaya ve ark. 2017).

PKAN'da beyin MRG bulguları ayırt edici ve genellikle tanısaldır (Hayflick ve ark. 2003). T2 ağırlıklı sekanslarda globus pallidus, hipointens sinyali ile çevrili bir merkez hiperintens sinyal bölgesi gösterir. Bu görünüm “kaplanın gözü” işareti olarak adlandırılır (Şekil 2.1-a1) (Sethi ve ark. 1988). Her ne kadar istisnai olarak, MRI'da benzer paterne yol açan diğer tanılar ya da bu karakteristik paterne sahip olmayan PKAN hastaları bildirilmiştir (Delgado ve ark. 2012). SWI gibi demir-duyarlı sekanslar basal ganglialarda T2 ağırlıklı sekanslarda görülen MRG bulguları ortaya çıkmadan önce saptanabilir. Bu sekanslar kullanılarak demir seviyelerinin hastalığın en erken evrelerinde bile arttığı gösterilmiştir. PKAN'da substantia nigra tutulumu geri plandadır (Şekil 2.1-a2) ve ilerleyen evrede globus pallidusa oranla daha az demir birikimi ile görülür (Hayflick ve ark. 2006).

2.1.2. Mitokondrial Membran Proteinine Bağlı Nörodejenerasyon (MPAN)

MPAN ilk olarak Doğu Avrupa kökenli hasta grubunda tanımlanmıştır. Bu hasta grubunda tespit edilen *C19orf12* genindeki 11 bazlık homozigot delesyon Doğu Avrupa popülasyonunda bulucu etkisine işaret etmektedir. MPAN, bilinmeyen fonksiyona sahip bir mitokondriyal membran proteinini kodlayan *C19orf12* genindeki mutasyonlara bağlı oluşan otozomal resesif bir hastalıktır (Hartig ve ark., 2011). *C19orf12* proteininin işlevi bilinmemektedir ve yapısı çalışılmamıştır. MPAN hastalarının postmortem beyin dokusunda yapılan çalışmalarda alfa-sinüklein boyanma, demir, aksonal sferoidler ve Lewy cisimcikleri izlenmiştir (Hartig ve ark., 2011). Alzheimer hastalığı ile MPAN'ın ortak histopatolojik özellikleri kadar MPAN'da izlenen klinik nöropsikiyatrik tutulum da benzerlik göstermektedir.

MPAN hareket ve davranış bozukluğu ile genellikle çocukluk veya erken yetişkinlikte başlar (Hartig ve ark. 2011; Hogarth ve ark. 2013). Spastisite, parkinsonizm ve distoni görülür. Spastisite ön plandadır. Erken dönemde halüsinasyonlar, depresyon, anksiyete, obsesyon ve dürtüsellik gibi nöropsikiyatrik problemler yaygındır. Ek erken bulgular optik atrofi, motor aksonal nöropati ve gayta/idrar kaçırma dır. PKAN'da olduğu gibi geç başlangıçlı MPAN formu genellikle 5-10 yıl içinde ölümle sonuçlanan agresif ve hızlı seyir gösterir (Dogu ve ark. 2013;

Hogarth ve ark. 2013). C19orf12, MPAN dışında herediter spastik paraparezi tablosuna da yol açar. Herediter spastik parapareziler ekstrapiramidal hareket bozukluğu olmaksızın alt ekstremitelerde spastisite ile seyreden ilerleyici nörodejeneratif hastalık grubuna verilen addır. Beyinde demir birikimi olmaksızın herediter spastik paraparezi tip 43'e yol açtığı bildirilmiştir (Landouze ve ark. 2013).

Genellikle hastalığın erken döneminde MRG'da artmış basal ganglia demirine ait bulgular izlenir (Landouze ve ark. 2013). T2 ağırlıklı sekanslarda globus pallidus ve substantia nigra eşit oranda hipointens sinyal ile karakterizedir (Şekil 2.1-c1 ve c2). MPAN'ı diğer NBIA alt tiplerinden ayırt etmede yardımcı olabilecek radyolojik bulgu globus pallidus eksterna ve interna arasındaki medial medullar laminada izlenen T2-hiperintens lineer çizgilerdir (Şekil 2.1-c1) (Hogarth ve ark. 2013).

2.1.3. “Beta-Propeller” Proteine Bağlı Nörodejenerasyon (BPAN)

BPAN, X'e bağlı dominant kalıtım gösteren tek NBIA alt tipidir. *WDR45* genindeki mutasyonlar otofajide görev alan bir protein kodlar (Haack ve ark. 2012). Bugüne kadar, çoğu vaka *de novo* mutasyonlar sonucu ortaya çıkmıştır. Bildirilmiş 11 erkek olgu vardır ve fenotip dişilere göre daha ağırdır (Haack ve ark. 2012; Abidi ve ark. 2016; Nakasima ve ark. 2016; Spiegel ve ark. 2016; Zarate ve ark. 2016; Redon ve ark. 2017; Takano ve ark. 2017). Dişilerde X inaktivasyonuna bağlı ortaya çıkan mozaiklik durumuna göre fenotip değişkenlik gösterebilir (Haack ve ark. 2012).

BPAN'ın tipik olarak iki basamaklı bir hastalık seyri vardır. Birinci evrede; bebeklik ve çocukluk döneminde nörogelişimsel gecikme, zihinsel yetmezlik ve bazen nöbetlerle seyreder (Haack ve ark. 2012; Hayflick ve ark. 2013). Dil becerileri sınırlıdır ve verici dil iyi gelişmez. İkinci evrede; hastalar ergenlik veya yetişkinlik döneminden başlayarak çoğunlukla distoni veya parkinsonizm gibi bir hareket bozukluğu geliştirir. Bu dönemde mevcut zihinsel yetmezliğe ek olarak bir kognitif yıkım da eşlik eder (Hayflick ve ark. 2013). Ciddi tutulumlu erkek hastalarda infantil epileptik ensefalopati tablosu bildirilmiştir (Nakasima ve ark. 2016; Zarate ve ark. 2016).

BPAN'da MRG erken çocukluk döneminde normal olabilir ancak hareket bozukluğu ortaya çıktığı zaman hastalığa özgü bulgular izlenir. Karakteristik değişiklikler, substantia nigra ve globus pallidus'ta T2 ağırlıklı hipointensitedir (Şekil 2.1-d1 ve d2). Substantia nigra tutulumu ön plandadır ve T1 ağırlıklı sekansta serebellar

pedinküllerde hiperintens “halo” görünümü BPAN için tipiktir (Şekil 2.1-d2) (Hayflick ve ark. 2013).

2.1.4. İdiyopatik NBIA

NBIA alt tipi belirlenememiş hastalar vardır. Farklı NBIA kohortlarında bu grup yaklaşık % 5 ile % 15 arasında değişir. İdiyopatik NBIA heterojen bir grubu temsil ettiğinden, klinik ve radyolojik özellikler çok farklıdır. Demir-duyarlı MRG sekansları ve genom boyu dizileme yöntemleri klinik pratikte daha yaygın olarak kullanıldıkça yeni genler tanımlanmaktadır. Nadir NBIA alt tiplerini açıklayan non-genetik etiyolojilerin de tanımlanması olasıdır (Dusek ve ark. 2012; Hayflick ve ark. 2018).

2.2. DNA Dizileme Yöntemleri

Nükleotid dizisi, genomun en yüksek çözünürlük seviyesidir. Bu DNA dizisi bir bireyin genetik kökenli özelliklerinin şifresidir. Günümüzde nükleotid dizisinin okunması dizileme yöntemlerinin gelişmesi ile hız kazanmıştır. Yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri kullanılarak kısa sürede daha uzun genomik bölgeler okunabilmekte ve fenotip üzerine etkili olabilecek daha çok varyantın araştırılabilmesine olanak sağlamaktadır. DNA dizileme yöntemleri klinik pratikte nadir varyantların neden olduğu tek gen hastalıklarının ve genetik olarak aydınlatılamamış multifaktöriyel hastalıklarda genetik risk faktörlerinin aydınlatılmasının önünü açmaktadır (Steward ve ark. 2017).

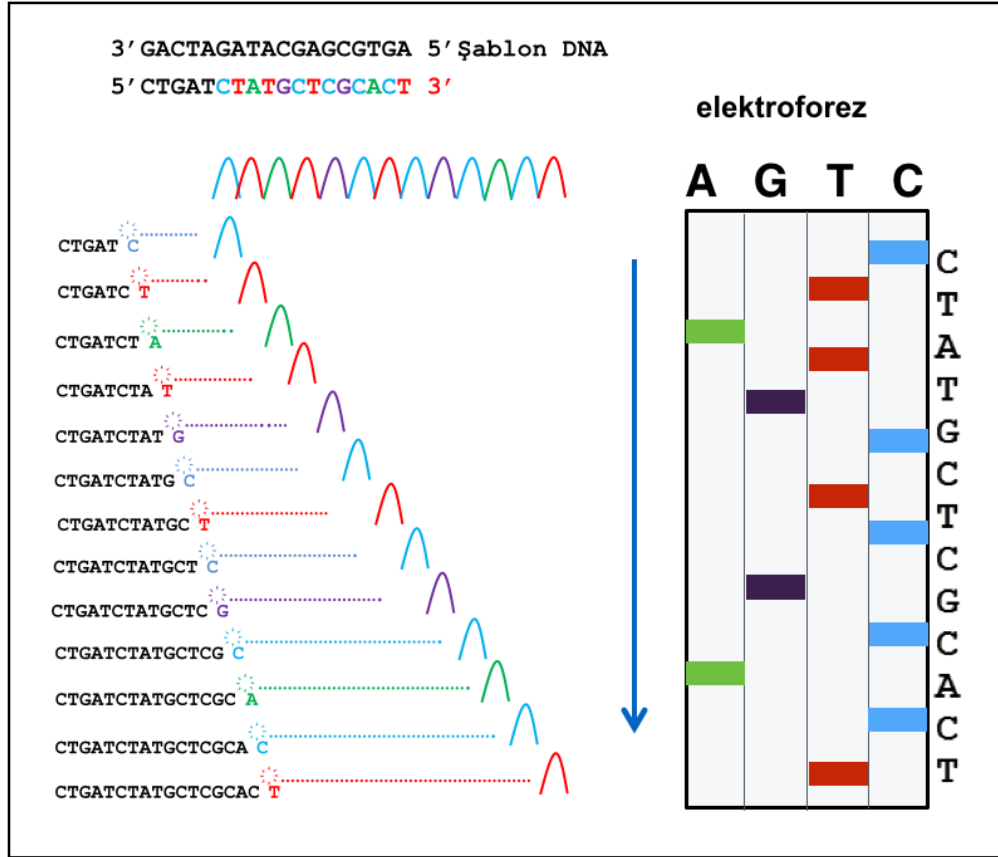
2.2.1. Klasik Dizileme (Sanger dizileme)

1977 yılında Frederick Sanger ve meslektaşları tarafından geliştirilen ve yaklaşık 40 yıldır en çok kullanılan dizileme metodudur. Halen ticari olarak kısa dizilemeler için ve yeni nesil dizileme sonuçlarının validasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Akçakaya ve ark 2017a; Akçakaya ve ark 2017b). Sanger yönteminde en büyük kısıtlılıklar dizinin ilk 15-40 bazında ve 700-900 bazından sonra dizileme kalitesinin kötüleşmesidir. Bu yöntem, *in vitro* DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz tarafından zincir sonlandırıcı dideksinükleotidlerin seçici olarak dahil edilmesine dayanır (Sanger ve ark. 1977).

Bu yöntemde klasik olarak tek iplikli DNA şablonu bir DNA primer, DNA polimeraz, normal deoksinükleotidtrifosfatlar (dNTP'ler) ve değiştirilmiş di-deoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP'ler) kullanılır. İki nükleotid arasında bir fosfodiester

bağının oluşturulması için gerekli olan bir 3'-OH grubundan yoksun ddNTP'ler DNA ipliği uzamasını sonlandırır. Günümüzde ddNTP'ler floresan olarak etiketli olarak kullanılır (Smith ve ark. 1986). Şekil 2.4'te bu yöntem şematik olarak gösterilmiştir.





Şekil 2.4: Sanger dizileme metodunun şematik gösterimi

DNA örneği dört ayrı reaksiyona ayrılır. Her reaksiyon ddNTP'den (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sadece birini içerir. Diğerleri dNTP'lerden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) üçüdür. DNA örneği, DNA polimeraz aracılığıyla uzatma reaksiyonlarının ardından elde edilen DNA fragmanları ısı denatüre edilir ve jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrılır. Bu dört ayrı şeridin (şerit A, T, G, C) birinde çalışan dört reaksiyon jelde yürütülür. 3' uçları flüoresan işaretli DNA bantları daha sonra jel görüntüsünden okunabilir. Günümüzde otomatize sistemlerde 5' ucunda bir flüoresan boya ile işaretlenmiş bir primer kullanılarak optik sistemde okumayı kolaylaştırmak ve kapiller jel sistemleri daha hızlı, ekonomik dizileme sağlar.

2.2.2. Yeni Nesil Dizileme

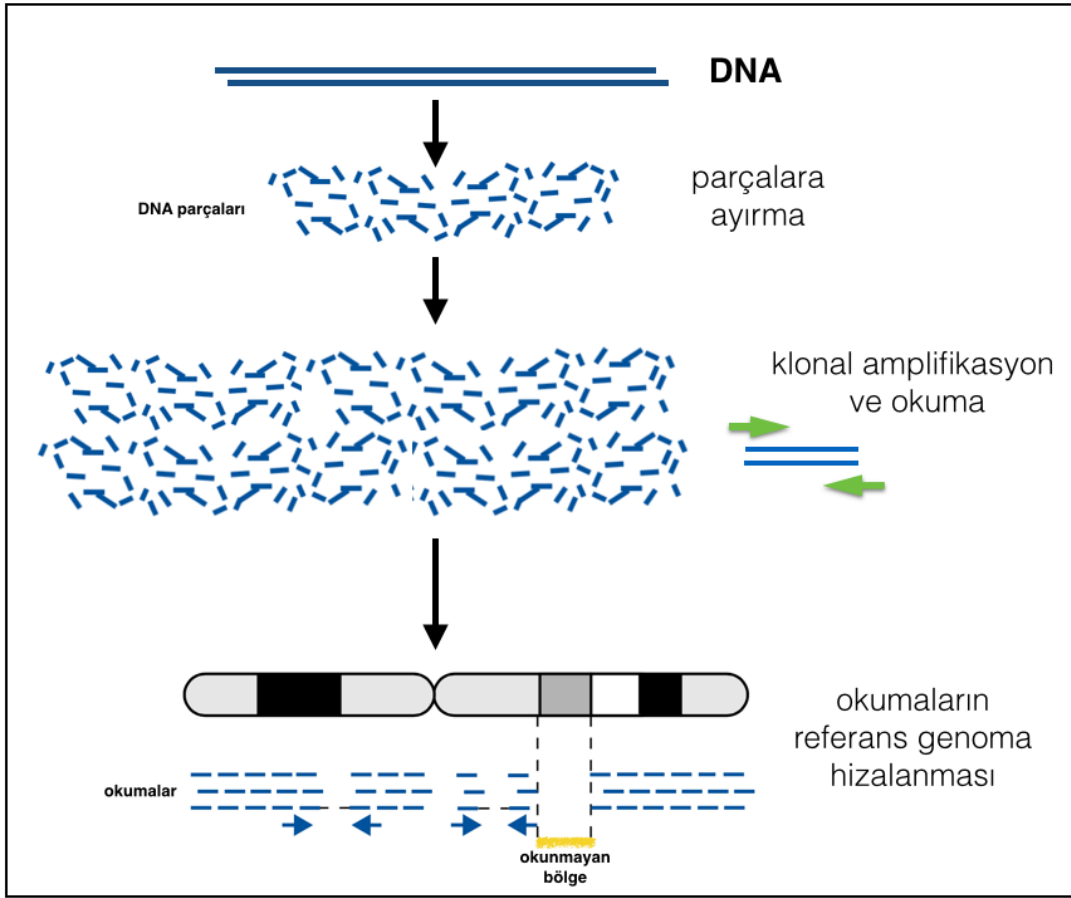
İnsan genom projesi ile düşük maliyetli dizileme teknolojilerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu teknolojiler daha çok genomik materyalin hızlı bir şekilde okunduğu yüksek çıktılı ve nispeten ucuz olan yöntemlerdir. Ancak hata payı klasik yöntemlere göre fazladır. Bu yöntem genomun kısa parçalara ayrılarak çoğaltılması esasına dayanır (Şekil 2.5). Parçaların bir ucuna takılan adaptör moleküllerle parçacıklar bir yüzey üzerinde çoğaltılır ve okunur. Böylece genomun bir bölgesi çoğaltılarak birden fazla kez okunmuş olur. Okunan dizilerin referans genoma hizalanması (*alignment*) ve referans genomdan farklılıklarının adlandırılması (*annotation*) gerekir. Okumalar bu işlemlerden sonra anlam kazanır ve analiz edilebilir. Okuma sayısına derinlik (*deep*) adı verilir ve derinlik ortalama okuma sayısına göre adlandırılır (örn. 50X, 90X). Genom üzerinde dizilemenin hedeflendiği bölgenin ne kadarının okunduğu ise kapsama (*coverage*) olarak adlandırılır.

Bu yöntem ile tüm genom ya da genomun seçilen belli bir kısmı dizilenebilir. Genomun transkripsiyona uğrayan kısmının dizilenmesine ekzom dizileme denir. Ekzom dizileme ile okunan dizi insan genomun yaklaşık %1'lik kısmına karşılık gelir (Choi ve ark. 2009) Ancak ekzom dizileme Mendelyan hastalıkların büyük kısmının çözülmesine olanak sağlar (Ng ve ark. 2009). Her ne kadar genomun küçük bir kısmı okunsa da elde edilen varyantlar arasından hastalıkla ilişkili varyantı bulmak için mantık çerçevesinde kalıtım modellerine göre filtreleme yapmak gerekir. Örneğin OR kalıtım modeli için, homozigot varyantlar arasında toplum frekansı düşük olan ve protein yapısında önemli derecede bozulmaya yola açan varyantlara öncelik verilir.

Genomun fenotipe göre seçilen çeşitli büyüklüklerdeki kısmı uygun dizileme yöntemleri kullanarak okunabilir. Genetik etiyolojisi bilinen belirli bir fenotipteki tek gen hastalıklarında, genetik etiyolojiyi küçük insersiyon ve delesyonlar (indel) dahil mutasyonları klasik dizileme yöntemleri ile tespit etmek mümkündür. Fenotipin net olmadığı genetik etiyolojisi net olarak tahmin edilemeyen durumlarda ise yeni nesil yaklaşımlar daha hızlı ve maliyeti düşük bir yaklaşım sağlamaktadır (Steward ve ark. 2017). Genetik yöntem mutlaka klinik özellikler ve aranan genetik patoloji göz önüne alınarak seçilmelidir. Temelde genetik yöntemlerin bir diğerine mutlak üstünlüğü yoktur.

Günümüzde genetik materyalin tüm patolojilerini tek bir yöntem ile tespit etmek mümkün değildir. İlerleyen yıllarda tüm genom dizileme yöntemlerinin gelişmesi bu açıdan umut vaat etmektedir. Bunlar dışında kromozomal sayı anomalileri, kromozomların yapısal anomalilerinin tespiti için kullanılan birçok teknik mevcuttur. Klasik sitogenetik yöntemler kadar gerekli durumlarda kromozom boyu tarama yöntemleri olan “array”ler sıkça kullanılmaktadır. Bu çalışmada da gerekli görülen durumlarda klasik ve moleküler sitogenetik yöntemler kullanılmıştır.

Bu çalışma esas olarak laboratuvarımızın maddi imkanları içerisinde uygun teknolojiler kullanılarak yapılan fenotip-genotip araştırması ve bir öğrenme sürecidir. Bu çalışma sürecinde; DNA varyantlarının biyolojik/nörolojik etkilerinin, başlıca DNA dizileme yöntemleri imkan ve kısıtlılıkları çerçevesinde araştırılması önemli bir tecrübe olmuştur.



Şekil 2.5: Yeni nesil dizileme metodunun şematik gösterimi

Dizilenmek istenen DNA molekülü parçalara ayrılır. Bu parçalar 50-400 baz çifti (bç) arasında olabilir. DNA probları olarak adlandırılan kısa tek iplikli DNA molekülleri (oligonükleotitler), “**kütüphane**” adı verilen bir hedef DNA dizisini yeniden oluşturmak için bu parçalara bağlanır. Spesifik olmayan hibritler yıkama ile uzaklaştırılır ve hedef DNA elde edilir. Hibritler, DNA dizisinin yeniden çoğaltılabileceği şekilde yeniden düzenlendikten sonra polimeraz ile klonal olarak amplifiye edilerek okunur. Okumalar genellikle flüoresan işaretli nükleotidler kullanılarak alınır. Kısa okumalar daha derin okuma sağlarken referans genomla hizalanması daha zordur (Morey ve ark. 2013). Dizilemeden sonra referans genomla hizalanmak, varyantları adlandırmak için yazılım algoritmaları kullanılır. Hizalama için “Burrows-Wheeler Aligner” (BWA), diziyi tanımak ve varyantları çağırmak için “Genome Analysis Toolkit” (GATK) kullanılır (Daaneck ve ark. 2011; Li ve ark 2009; Li ve ark 2010; McKenna ve ark. 2010). Şekilde gösterilen **okunmayan bölge** kütüphanede hedeflenmemiş bir bölge ya da eğer hedeflenmişse homozigot bir delesyona işaret eder.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar

Bu tezde klinik ve radyolojik bulguları doğrultusunda beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon ön tanısı ile çeşitli nöroloji kliniklerinden yönlendirilen 43 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların bilgileri Tablo 3.1’de özetlenmiştir. Hastalardan ve aile bireylerinden EDTA’lı tüplere alınan kandan izole edilen DNA örnekleri kodlanmış olarak -20⁰C derin dondurucu özelliği olan buzdolabında saklanmıştır. Çalışmamız İstanbul Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından 10/02/2017 tarih ve 133 sayı ile onaylanmıştır.

Tablo 3.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların kodları ve temel özellikleri			
Hasta kodu	Akrabalık	Radyoloji (Demir birikimi görülen bölgeler)	Klinik Ön Tanı
ND14-1	yok	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND14-4	yok	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND14-10	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND14-11	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND14-15	yok	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND14-17	var	Globus pallidus ve substantia nigra	Trizomi 21 sekonder
ND14-18	yok	Globus pallidus ve substantia nigra	NBIA
ND14-27	yok	Globus pallidus geri planda ve substantia nigra ile nukleus ruber’de belirgin	Parkinson sekonder
ND14-34	var	Globus pallidus ve substantia nigra	PLAN
ND14-35	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND14-41	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND14-53	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND14-58	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND15-66	var	Talamus dahil tüm basal ganglialar	FAHN

Tablo 3.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların kodları ve temel özellikleri			
Hasta kodu	Akrabalık	Radyoloji (Demir birikimi görülen bölgeler)	Klinik Ön Tanı
ND15-69	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-70	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-72	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-73	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-81	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND15-82	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-83	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND15-84	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND15-91	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-94	var	Globus pallidus	FBXO7 patolojisi
ND15-106	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-107	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND15-112	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND16-113	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND16-114	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND16-118	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND16-124	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND16-134	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND16-138	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND16-140	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND16-141	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND16-142	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN
ND16-153	var	Globus pallidus ve substantia nigra	MPAN

Tablo 3.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların kodları ve temel özellikleri			
Hasta kodu	Akrabalık	Radyoloji (Demir birikimi görülen bölgeler)	Klinik Ön Tanı
ND16-154	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND17-159	yok	Globus pallidus ve substantia nigra (belirgin medial çizgilenme)	MPAN
ND17-160	yok	Globus pallidus ve substantia nigra (belirgin medial çizgilenme)	MPAN
ND17-164	var	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (klasik)
ND17-168	yok	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)
ND17-169	yok	Globus pallidus ve substantia nigra, “kaplan gözü”	PKAN (atipik)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Tablo 3.2.’de çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler verilmiştir.

Adı	Firma / Ülke
Agaroz	İnvitrogen, İsviçre
Betain	Promega, ABD
DMSO	Sigma, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Etil Alkol	Merck, Almanya
MgCl ₂	Roche, Almanya
dNTP seti (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	Roche, Almanya
Taq Polimeraz	Roche, Almanya
Taq Polimeraz	HighQu, Almanya

3.1.3. Kullanılan Kitler

Tablo 3.3.'te çalışmada kullanılan kitler verilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan Kitler		
Kit Adı	Kullanım Amacı	Firma/Ülke
Qiagen DNA maksı izolasyon kiti	DNA izolasyonu	Qiagen, Almanya
Qiagen DNA mini izolasyon kiti	DNA izolasyonu	Qiagen, Almanya

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.4.'te çalışmada kullanılan cihazlar verilmiştir.

Tablo 3.4: Kullanılan Cihazlar	
Cihaz Adı	Firma
Hassas terazi	Shimadzu
Otomatik pipetler	Gilson, Eppendorf
Distile su cihazı	Millipore
Buzdolabı +4°C	Sanyo
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Heraeus Sepatech
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Masa üstü mini santrifüj	Hettich, Eppendorf
Elektroforez aleti	Thermo
Güç kaynağı	Stratagene
PCR cihazı	BioRad
Vorteks	Kermanlar, Yellowline
Flow kabin	Thermo Scientific
Spektrofotometre	Nanodrop
Hibridizasyon fırını Jel görüntüleme sistemi	Heraeus UVP Imaging System

3.1.5. Çalışma Kapsamında Hizmet Alınan Firmalar/Kurumlar

Tablo 3.5: Hizmet alınan firma ve kurumlar	
Firma / Kurum Adı	Hizmet Alım Gerekçesi
Oxford Gene Technology, İngiltere	Tüm ekzom dizileme
Macrogen, Kore	Dizileme (Klasik ve Ekzom)
DONE Genetik	ND14-17 numaralı örnek için tüm genom genotipleme (SNP array-300K)

Tablo 3.5.'te çalışmada hizmet alınan firma ve kurumlar verilmiştir.

3.1.6. Kullanılan Elektronik Veritabanları

Tablo 3.6: Kullanılan veritabanları	
Genomik Dizi Veritabanları	
Ensembl veritabanı	http://www.ensembl.org/
NCBI veritabanı	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/
UCSC veritabanı	http://genome.ucsc.edu/
GeneCards veritabanı	http://genecards.org
Populasyon Veritabanları	
Exome Aggregation Consortium (ExAC)	http://exac.broadinstitute.org/
Genome Aggregation Database (GnomAD)	http://gnomad.broadinstitute.org
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/
Fenotip Veritabanları	
ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/

Online Mendelian Inheritance in Man	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/
Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/
Varyantın Olası Etkisi için Tahmin Araçları	
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
Polymorphism Pheotyping (PolyPhen-2)	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
SIFT	http://sift.jcvi.org/
Variant Effect Predictor	http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/
Diğer	
GeneDistiller	http://www.genedistiller.org/
Mutalyzer	https://mutalyzer.nl/
Swissmodel	http://swissmodel.expasy.org
Primer3plus	http://primer3plus.com
Oligonucleotides Properties Calculator	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
NCBI Map Viewer	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
BrainSpan	http://www.brainspan.org

Tablo 3.6.'te çalışmada kullanılan veritabanları verilmiştir.

3.1.7. Kullanılan Analiz Programları ve Yazılımlar

Tablo 3.7.'de çalışmada kullanılan analiz programları verilmiştir.

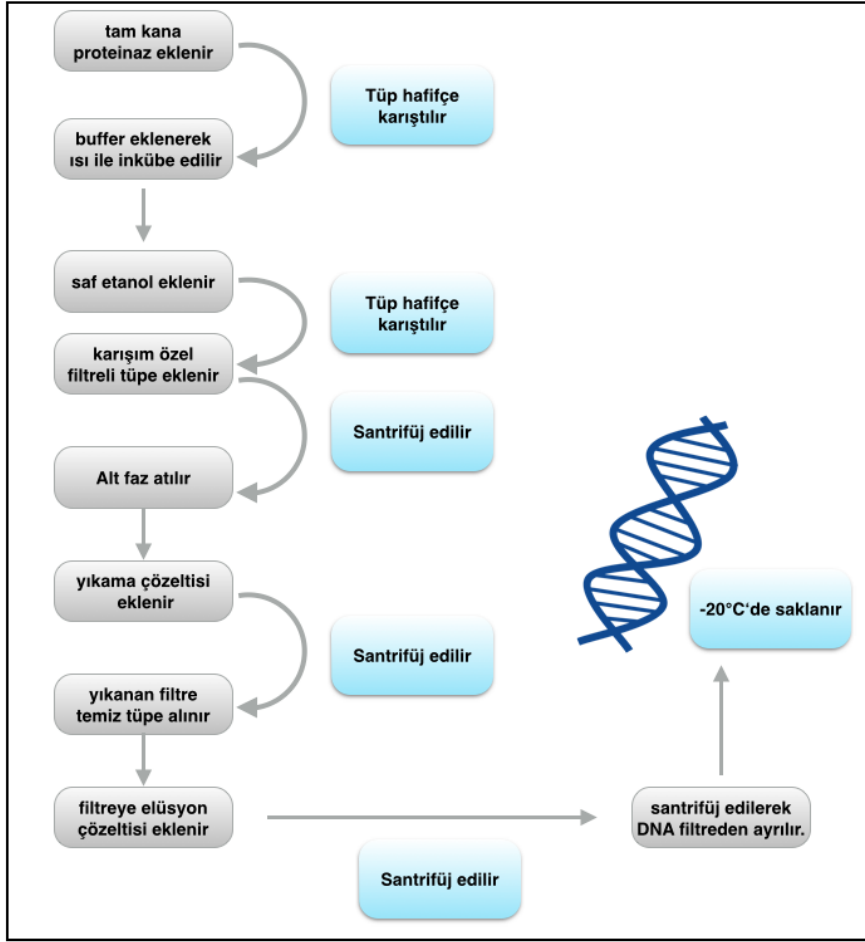
Tablo 3.7: Kullanılan analiz programları	
Program Adı	Açıklama
HaploPainter v1.043 (Thiele ve Nürnberg 2005)	GeneHunter, Allegro gibi bağlantı analizi programlarının çıktılarını kullanarak pedigri ve haplotip görselleri oluşturan bir açık yazılımdır.
CLC Main Workbench v5.02 ve 4Peaks (https://nucleobytes.com/4peaks/index.html)	Sanger dizileme işlemi sonrası, dizilenen alanın referans diziye hizalanmasını ve görsel olarak incelenmesini sağlayan programlardır.
OGT (Oxford Gene Technology) ekzom dizileme arayüzü v.1.0.1	Tüm ekzom dizileme işlemi sonucu elde edilen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan ticari bir ara yüzdür.
Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.3.5 (Robinson ve ark. 2011)	Genom dizileme verilerinin görsel olarak değerlendirilmesinde kullanılan bir programdır.
GenomeStudio v1.9.4	Tüm genom genotip verisinin analizinde kullanılan ticari (Illumina) bir programdır.

Bu analiz programlarına ek olarak tüm ekzom dizileme ham datası laboratuvarımızda bağımsız olarak “*in-house pipeline*” bir dizi yazılım algoritması ile sırasıyla; “*Burrows-Wheeler aligner*” kullanılarak hizalama “*alignment*” ve “*Picard*” kullanılarak bam dosyası oluşturma (Li ve Durbin, 2016), “*GATK Haplotypecaller*” ve “*Ensembl Variant Effect Predictor API*” kullanılarak varyant adlandırma “*annotation*” (Van der Auwera ve ark. 2013, McLaren ve ark. 2016) basamaklarından geçirilerek varyantlara ait “*Variant Call Format*” (VCF) dosyası oluşturulmuştur. Bu dosya tüm ekzom datası analizi için filtreleme işleminde kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu ve Kalite Ölçümü

Kandan DNA izolasyonu Qiagen maksı ve mini kiti ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon adımları ana hatları ile Şekil 3.1’de özetlenmiştir. İzolasyonun ardından elde edilen DNA’ların konsantrasyon ve kalite değerlendirmesi spektrofotometre (nd-1000, NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA) cihazı ile gerçekleştirildi. Ölçümde 2 µl DNA; 260, 230 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik değerlendirildi. Sonuçlar 260 nm/280 nm oranının değer aralığı 1,8-2,0 ve 260 nm/230 nm oranının değer aralığı 2,0-2,2 olacak şekilde değerlendirildi. Ek olarak, ekzom dizileme yapılacak DNA’ların yapısı %1’ lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, jel görüntüleme sisteminde izlendi. Degrade olmadığı tespit edilen DNA’lar çalışmaya katıldı.



Şekil 3-1: DNA izolasyon basamakları

Qiagen maxi ve mini kit için temel DNA izolasyon basamakları gösterilmiştir. İnkübasyon süreleri, santrifüj hızları ve solüsyon miktarları değişmekle birlikte, her iki kit bu temel basamaklar üzerinden ilerlemektedir.

3.2.2. Dizileme ve Analizleri

Çalışma kapsamında tüm dizileme işlemleri hizmet alımı ile yapıldı. Elde edilen veriler laboratuvarında ilgili programlar ve yazılımlar kullanılarak gerçekleştirildi. Klinik ve radyolojik bulgular doğrultusunda tüm hastalarda fenotipe uyabileceği ön görülen en az bir gen dizilendi. Dizileme sonucunda fenotip öngörüsünü açıklayacak mutasyon bulunamamış ya da fenotip öngörüsü bulunmayan seçilen adaylar doğrudan ekzom dizileme ile analiz edildi. Ekzom dizilemede elde edilen aday varyantlar Sanger dizileme ile yeniden gösterildi. Aile içi segregasyonun gösterilmesi gereken durumlarda da ulaşılabilen aile bireylerinde varyantlar Sanger dizileme ile araştırıldı. Tespit edilen varyantların genomik adlandırılması hg38/GRCh38'ye göre yapıldı.

3.2.2.1. Sanger Dizileme Analizi

Sanger dizileme yapılacak örneklerin hedef genomik dizileri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması öncesi primerlerin seçimi *primer3plus* programı ile yapıldı. PZR ile çoğaltılacak hedef dizi, *oligo nucleotide properties* elektronik veritabanı kullanılarak GC içerikleri ve UCSC'nin "*in silico PCR*" içeriği kullanılarak genomik bölge belirlenerek PZR uygunluğu araştırıldı. Çalışma kapsamında Sanger dizileme ile incelenen tüm varyantların gösterilmesi için tasarlanan primerlerin bilgisi Tablo 3.8' de gösterilmiştir. Örneklerin hedef bölgelerinin Sanger dizileme sonrası elde edilen ab1 dosyaları kromatogramda görselleştirilmesi için CLC Workbench ve 4Peaks programları kullanıldı. Belirlenen varyantların olası etkileri tablo 3.6'da belirtilen MutationTaster, PolyPhen-2, Sift gibi *in silico* tahmin araçları ile değerlendirildi.

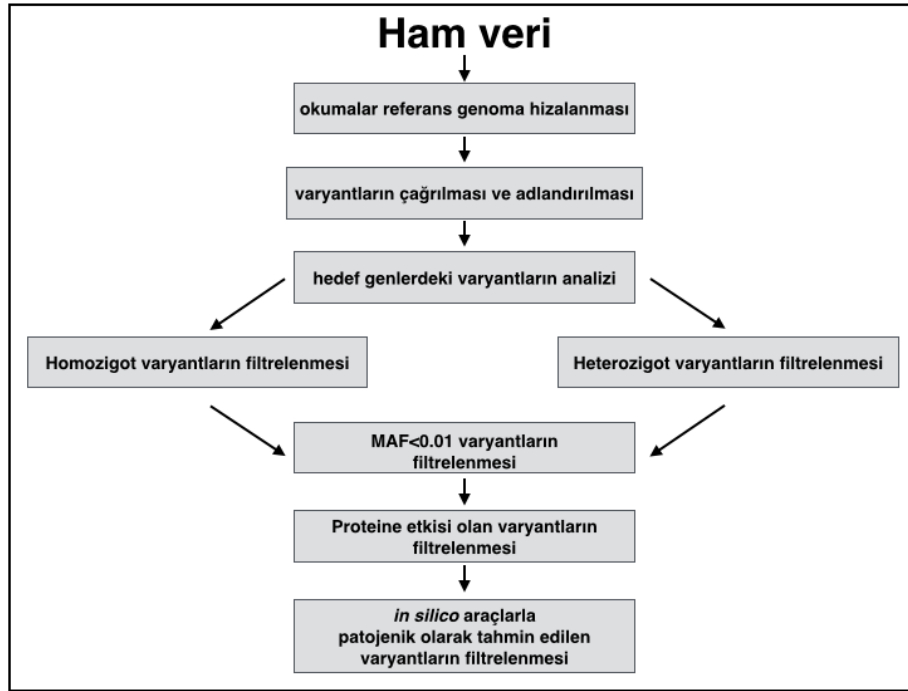
Tablo 3.8: Sanger dizilemede kullanmak için tasarlanan primerler ve hedeflenen bölgeler					
Gen adı	Hedeflenen	NM Kodu	Tasarlanan primerler (F / R)	Fragman uzunluğu (bç)	GC oranı (%)
<i>C19ORF12</i>	ekzon 1 ve intron 1-2 ekzon 1 komşuluğu	NM_031448	CGCTCCCCAGGTAAGG / GTGGTGGATGTGGTGGGAG	344	69

<i>C19ORF12</i>	ekzon 2 ve intron komşulukları	NM_031448	GAGTGGCATTGTGATGGAAA / TTCAACGGCCCTTTTATGAC	298	57
<i>C19ORF12</i>	ekzon 3 ve intron komşulukları	NM_031448	CTGCTCATGGTGTGGTGGT / CTCCAAGCCACCTCTTCAG	431	58
<i>PANK2</i>	ekzon 1 ve intron 1-2 ekzon komşuluğu	NM_153638	GGCAGAGGCATGCACAAGT / CACCAACGAGGGACCACC	799	73
<i>PANK2</i>	ekzon 2 ve intron komşulukları	NM_153638	AAGTTGCTACTGTGGTAAGGGTAAA / CACCACTTGCTACTGGCATT	500	41
<i>PANK2</i>	ekzon 3 ve intron komşulukları	NM_153638	GGGATGCCTTATTGAATGGA / TGAAAACCTCAGCCCGTTAGG	388	37
<i>PANK2</i>	ekzon 4 ve intron komşulukları	NM_153638	TGAATATGGTTTTGGGGTTCA / GAACACACATGCCCCCTTAC	286	40
<i>PANK2</i>	ekzon 5 ve intron komşulukları	NM_153638	GGCTTTGTGCTGTTGGTTT / ATGGGGCCCACTTAAGTTCA	236	44
<i>PANK2</i>	ekzon 6 ve intron komşulukları	NM_153638	TTTGGGGTAGCTTTTATGAGAA / GTGACCCACAAGCCCTCTG	250	40
<i>PANK2</i>	ekzon 7 ve intron 6-7 ekzon komşuluğu	NM_153638	GTATGCTGTGTGTGGGCAGT / ACAGATCCCATTTGTGGAAGG	206	43
<i>PLA2G6</i>	ekzon 8 ve intron komşulukları	NM_00356	GGCCCTTTGTTCTTCACTT / TGTATCCACCCAACCCTCAC	223	55
<i>WDR45</i>	ekzon 7 ve intron komşulukları	NM_007075	GTGAGTACCCCTCCCCAC / TCCAGTCTCTCAGGCATCT	402	59
<i>FBOX7</i>	ekzon 7 ve intron komşulukları	NM_012179	CCTAGCTCCCGCCTTCT / TAAAAGGTTTCTGGGAGTGCA	401	50
<i>HEXB</i>	ekzon 7 ve intron komşulukları	NM_000521	TTCATTGGTGGAGAAGCTTGTC / TTACTIONGACCATCCTGCAGC	301	43
<i>SLC16A2 (MCT8)</i>	ekzon 7 ve intron komşulukları	NM_006517	GAAGGGCTGGGGAGAAGAG / CAGAGGAGCCGCTTTGTG	286	68

3.2.2.2. Ekzom Dizileme Analizi

Çalışmada 8 hasta (ND14-1, ND14-04, ND14-18, ND14-58, ND15-66, ND15-69, ND15-83, ND15-84) ekzom dizileme yöntemi ile çalışılmıştır. Bunlardan ND14-1 ve ND14-4 isimli hastalar analizleri kolaylaştırmak için ebeveynleri ile “trio” olarak, iki kardeş olan ND15-83 ve ND15-84 ortak homozigot varyantları araştırabilmek amacıyla birlikte dizilendi.

Yeni nesil dizileme *capture* olarak adlandırılan hedef bölgelerin seçimi ve dizilenmesi ile istenen bölgeye özgü (amplikon, ekzon vb.) geliştirilmiş çeşitli ticari kitlerle yapılır. *Capture* işlemi için genomik DNA çeşitli yöntemlerle rastgele fragmente edilmekte ve rastgele parçaların uçlarına adaptör moleküller yerleştirilmektedir. Saflaştırma işlemi sonrası bir kütüphane oluşturulmuş olur. Oluşturulan bu kütüphane hibridizasyon esasına dayanan yöntem sonrası bu fragmanlar dizilenir (*capture* işlemi). Ekzom dizileme işlemi OGT (*Oxford Gene Technology*) firmasından hizmet alınarak Illumina HiSeq2000 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme işlemlerinde Agilent Technologies firmasının geliştirdiği *Sure Select Target Enrichment System capture* kiti kullanılarak gerçekleştirildi. ND-14-1, ND14-04, ND15-66 ve ND15-69 kodlu örneklerde ham verilerin işlenmesi ve analizinin gerçekleştirilmesi OGT tarafından sağlanan arayüz ile tarafımızdan gerçekleştirilmiştir. ND14-4, ND15-83 ve ND15-84 kodlu örneklerde ekzom dizileme analizi ise hem OGT arayüzü, hem de ham veri işleme basamakları tarafımızdan laboratuvarında yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan basamaklar ve analiz metodolojisi Şekil 3.2’de özetlenmiştir.



Şekil 3.2: Ekzom dizilemede ham veriden analize temel basamakların şematik gösterimi

Çift- taraflı okunmuş ham veri insan genomuna (hg19) BWA kullanılarak hizalanır ve elde edilen bam dosyaları için işlemler *Picard* araçları kullanılarak yapılır (Li ve Durbin 2016). Varyantlar *GATK Haplotypecaller* ile çağrılır ve *Ensembl Variant Effect Predictor API* kullanılarak adlandırılır (Van der Auwera ve ark. 2013; McLaren ve ark. 2016). Veriler OD ve OR kalıtım modelleri için filtreleme işlemi gerçekleştirilir.

3.2.3. Tüm Genom Genotipleme Analizi

SNP array yöntemi ile mikroçipe yerleştirilmiş oligonükleotid parçaları kullanılarak istenen örnekteki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tespit etmek mümkündür. Her bir SNP'nin genotipini gösteren frekans dağılımı ve toplam sinyal yoğunluğu verisi bulunabilmektedir. Böylece hem tüm genom genotip verisi, hem de SNP'lere ait CNV değeri bulunabilir (McCarroll ve ark. 2008).

Trizomi 21 ve anne babası arasında akrabalık olduğu bilinen ND14-17 kodlu örnek sitogenetik ileri inceleme ve homozigot bölgelerin tespiti için yaklaşık 700.000 belirteç içeren Illumina HumanOmniExpress BeadChip ile tüm genom genotiplenmiştir. Genotipleme işlemi için hizmet alınmıştır. IScan cihazı ile okunarak çipten gelen veriler GenomeStudio v2011.1 (Illumina) programı ile analiz edilmiştir. Kopya sayısı değişiklikleri (CNV) analizi GenomeStudio içinde cnvPartition 3.1.6 programı ile homozigot bölgelerin tespiti ise Homozygosity Detector programı gerçekleştirildi. CNV analizinde anlamlı sıralı prob sayısı en az 5 ve güvenilirlik alt sınırı değeri 35 olarak alındı. B alel frekans (BAF) değeri ve LogR kesiri (LRR) değerleri kullanılarak analizler yapıldı. LRR değerindeki sıfırdan sapmalar CNV analizinde kullanıldı. LRR değeri sıfır olan ancak heterozigotluk göstermeyen bölgeler ise (*copy neutral loss of heterozygosity* -LOH-) homozigot bölgeler olarak değerlendirildi (Iseri 2016).

3.3. Ekzom Datasından X Heterozigotluğu Yüzdesinin Hesaplanması

VCF formatındaki datadan sadece X kromozomuna ait varyantlar arasından kalite skoru 30 ve üzeri olanlar seçilmiştir. Bu varyantlar arasından heterozigot olanlarının ortalaması hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar Şekil 3.3'te gösterildiği gibi vcftools v0.1.14, tabix v1.2.1, python3.5.1 ve pandas v0.22.0 yazılımları kullanılarak yapılmıştır. X kromozomuna ait heterozigotluk değerleri “in-house” veritabanımızdaki 129 bireye (75 kadın ve 54 erkek) ait tüm ekzom datasında bu yöntemle hesaplandı.

```

Vcftools programı tüm vcf dosyalarını birleştirmek için kullanıldı.

vcf-merge my_variants_0.vcf.gz my_variants_1.vcf.gz > merged.vcf

Laboratuvardaki dataseti içinden X kromozomuna ait kalitesi en az 30 olan varyantlar seçildi.

vcftools -vcf merged.vcf -chr chrX -minQ 30 -extract-FORMAT-info GT -out merged_Genotypes
vcftools -gzvcf in-house.vcf.gz -chr chrX -minQ 30 -extract-FORMAT-info GT -out in-house_Genotypes

Diğer hesaplamalar aşağıda gösterildiği gibi python3 ve pandas kullanılarak yapıldı.

import pandas as pd

# Read vcftools output with read table function
dfM = pd.read_table('merged.GT.FORMAT')
dfIH = pd.read_table('in_house.GT.FORMAT')
''' We can merge on position since there is only X chromosome.
By merging we get only the variants which present
in both dataset this way we can compare them.'''
dfm = pd.merge(dfM, dfIH[['POS']], on='POS')
dfih = pd.merge(dfIH, dfM[['POS']], on='POS')
# Creates a list containing dataframes
dfs = [dfm, dfih]

# Loop over data frames
for df in dfs:
    # Loop over samples. If statement is there to exclude CHROM and POS columns.
    for col in [cols for cols in list(df) if 'SAMPLE' in cols]:
        df_sample = df[[col]]
        # Only variants with 0/1 and 1/1 genotypes are used.
        df_sample = df_sample[(df_sample[col] == '0/1') | (df_sample[col] ==
'1/1')]
        # Write percentages to a new file
        with open('{}_x_het_percent.tsv'.format(df), 'a') as f:
            f.write('{}\t{}\n'.format(col,
                                     df_sample[col].value_counts().loc['0/1'] /
                                     sum(df_sample[col].value_counts()))
            f.close()

```

Şekil 3.3: Ekzom Datasından X Heterozigotluğu Yüzdesinin Hesaplanması (Akçakaya ve ark., 2019).

4. BULGULAR

4.1. Genel Bakış

Çalışma sonucunda 22 hastada *PANK2*, 9 hastada *C19orf12*, 1'er hastada ise *WDR45*, *PLA2G6*, *FBXO7* ve *HEXB* mutasyonu saptanmıştır. Bunlardan 8 tanesi daha önce hastalıkla ilişkisi bilinmeyen yeni patojen varyantlardır. Çalışmada elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Genetik sonuçların yanı sıra bu çalışmada ayrıca erkeklerde ekzom datasında X kromozomuna ait heterozigot varyantların izlendiği fark edilmiştir ve laboratuvarımıza ait X kromozomal heterozigotluk değerleri de en son bölümde ortaya konmuştur.

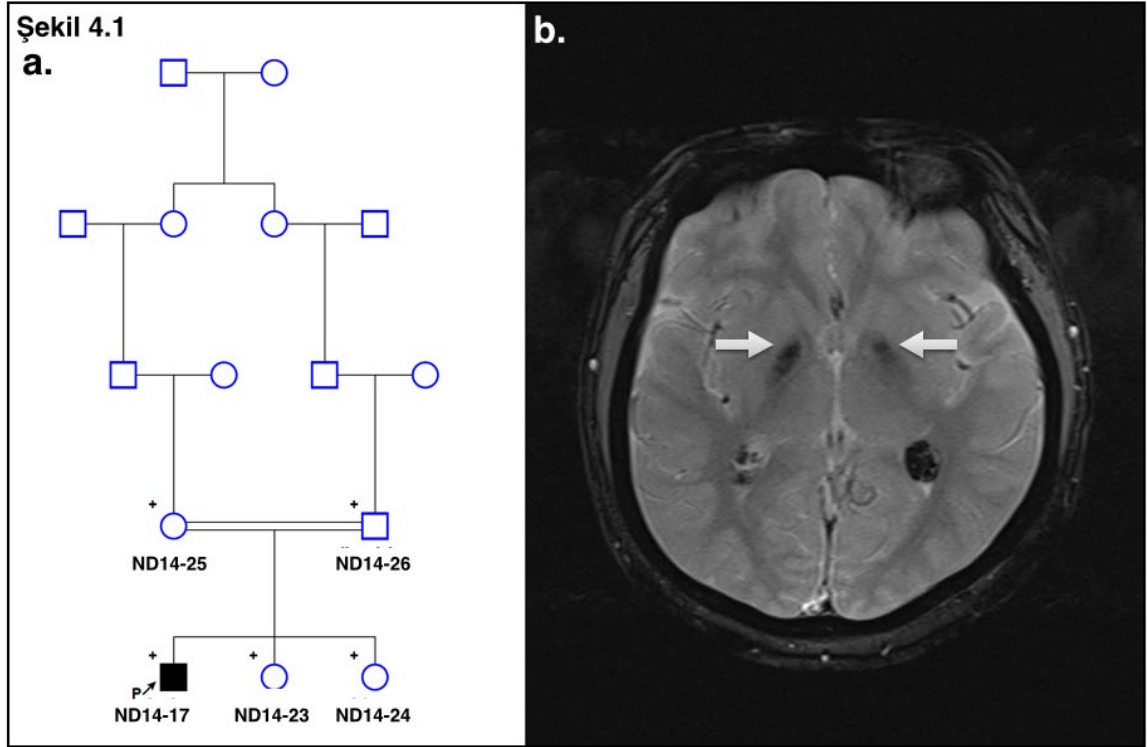
4.2. Sanger Dizileme ile Elde Edilen Bulgular

4.2.1. *PANK2* Geni Taranan Hastalarda Elde Edilen Bulgular

19 indeks olguda *PANK2* geni Sanger dizileme yöntemi ile taranmıştır. Bu hastaların fenotip olarak ortak bulguları distoni baskın bir tutuluma ve / veya globus pallidusta “kaplan gözü”ne işaret eden görünüme sahip olmalarıydı. Bu bulgulara sahip olmayan ancak aşırı ajitasyon ve agresyon nedeniyle MRG’de demir birikimi saptanmış hastaya SNP array analizi yapıldı. MR görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bu analizde Şekil 4.2’te görüldüğü gibi 20. kromozomda *PANK2* genini de içine alan homozigot bölge tespit edilmesi nedeniyle bu taramaya dahil edildi.

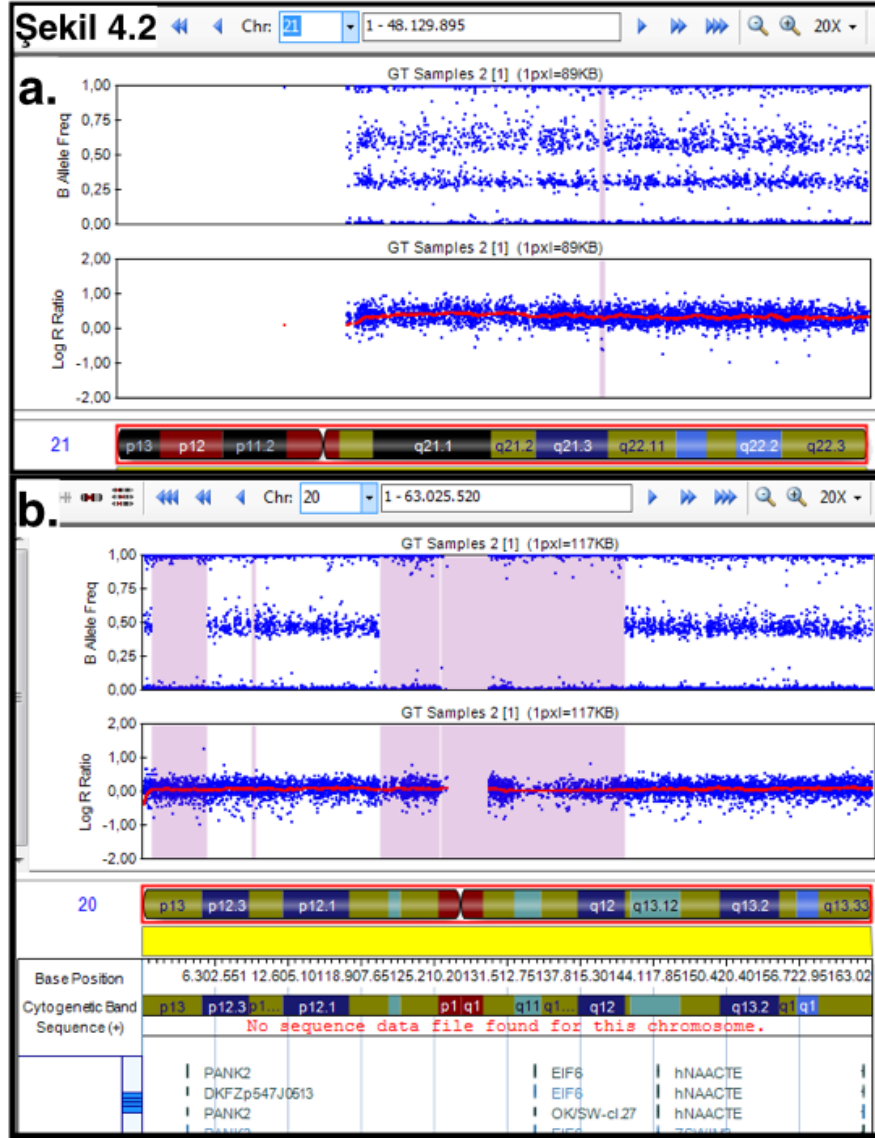
Bu tarama sonucunda 13 hastada hastalığı açıklayacak nitelikte varyasyonlar bulundu. Ebeveynleri arasında akrabalık öyküsü bulunmayan ND17-168 kodlu hasta dışında tespit edilen tüm varyantlar homozigot olarak izlendi (Şekil 4.3). Klasik dizileme yöntemiyle *PANK2* geninde mutasyon tespit edilemeyen örnekler ND14-4, ND14-15, ND14-17, ND16-154, ND17-159 ve ND17-169’dır. Bu örneklerden ND14-4, ND16-154 ve ND17-169 tamamen PKAN fenotipi ile uyumlu olarak değerlendirilmesine rağmen mutasyon bulunamamıştır ve ekzom dizileme için aday olarak not edilmiştir. Sonraki çalışmalara aday olan ND16-154 ve ND17-169’un aile ağaçları Şekil 4.4’te gösterilmiştir.

Tespit edilen 11 farklı patojenik varyantın 4 tanesi daha önce literatürde yer almayan yeni mutasyonlar olarak tanımlandı. Bu yeni varyantların tümü *in silico* tahmin araçları ile patojenik olarak tespit edildi. Bu varyantlara ait dizi görüntüleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



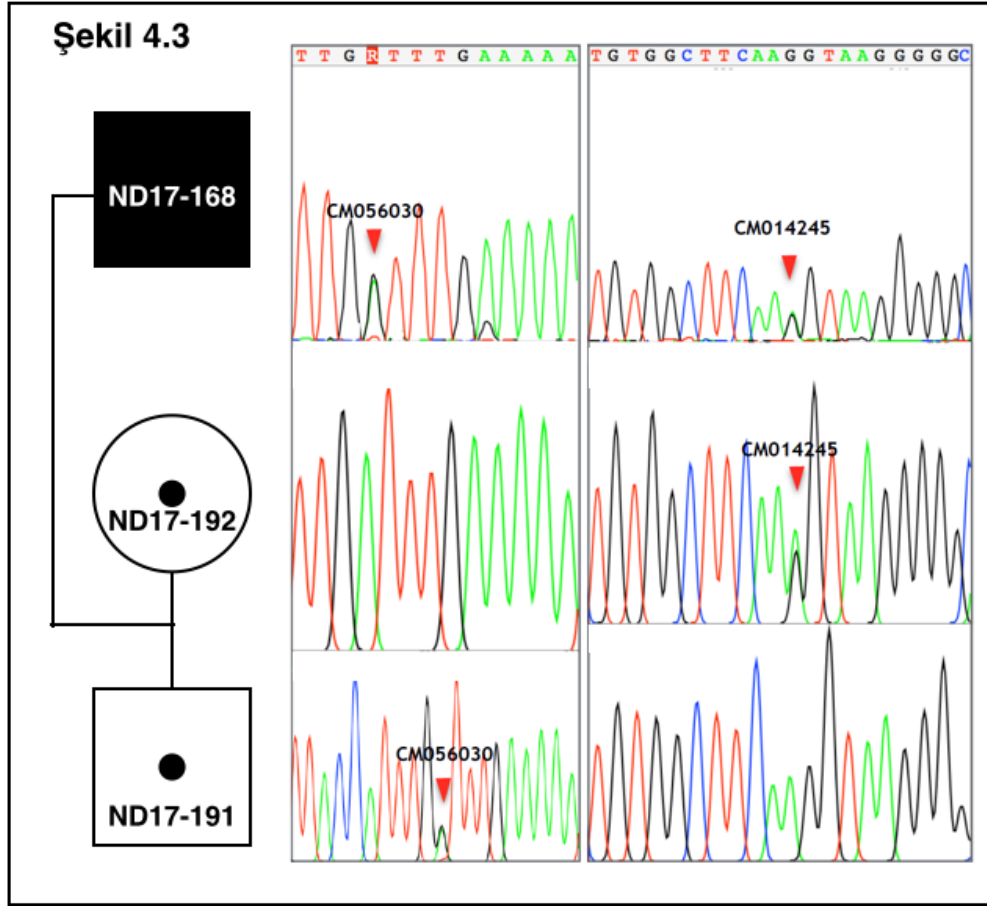
Şekil 4.1: Trizomi 21 patolojisi bilinen bireyin pedigrisi ve MRG kesiti

a. Pedigrisi 1. derece kuzen evliliği görülmektedir. **b.** Globus pallidustan geçen aksiyel SWI kesitlerinde globus pallidusta izlenen hipointensiteler (oklar) görülmektedir.



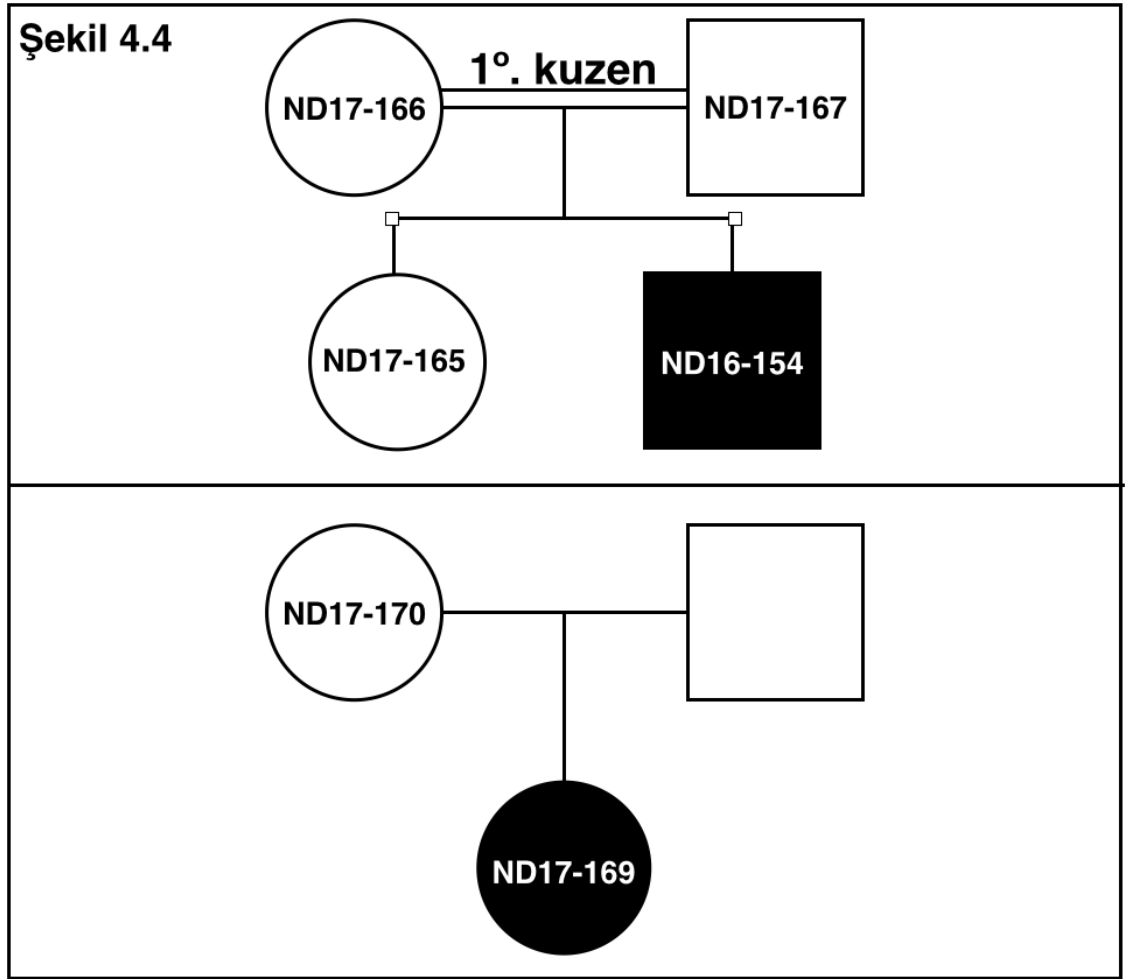
Şekil 4.2: ND14-17 kodlu örnekte 21 ve 20. kromozoma ait Genome Studio programından BAF ve LRR görselleri

a. 21. kromozom boyunca 3 farklı haplotip ile ilişkili 4 farklı BAF dağılımı ile 0 değerinin üzerinde konumlanan LRR değeri Trizomi 21'i işaret eder. **b.** 20. kromozomda pembe ile işaretli geniş alanlar BAF parametresi açısından heterozigotluk kaybını işaret eder. Bu alanlarda LRR değeri 0 olduğundan kopya sayısı açısından nötraldir. Dolayısı ile bu alanlar özellikle akrabalığa evliliğine bağlı geniş homozigot bölgelerdir.



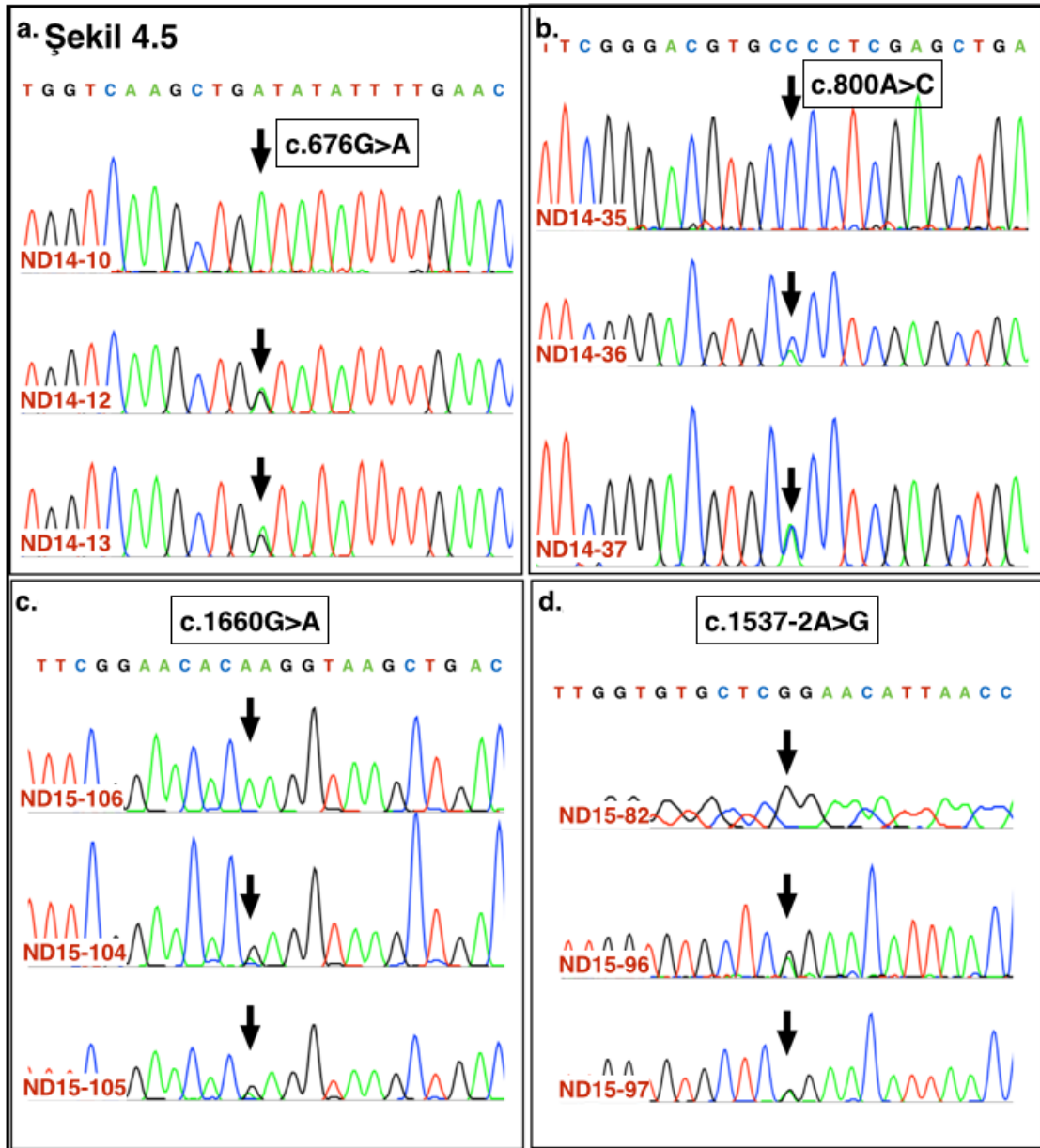
Şekil 4.3: ND17-168 nolu örnekte tespit edilen birleşik heterozigot *PANK2* mutasyonları

ND17-168 numaralı hasta örneğinde *PANK2* geninin (NM_153638) 3. ekzonu ve 4. ekzonunda 2 ayrı hastalıkla ilişkisi daha önce bildirilmiş heterozigot varyasyon tespit edilmiştir. Bulunan varyantlar sırasıyla ekzon 3'te c.1133A>G;p.D378G (CM056030) ve ekzon 4'te c.1412G>A; p.S471N (CM014245) varyantlarıdır. Bu varyantların aile içinde allelik segregasyonu aralarında akrabalık olmadığı belirtilen anne ND17-192 ve baba ND17-191'de yine Sanger dizileme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda annenin sadece CM014245 için, babanın ise sadece CM056030 varyantı için taşıyıcı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.4: PKAN fenotipinde olan ND16-154 ve ND17-169 nolu örneklerin aile ağaçları.

ND16-154 numaralı örnek klasik tipte PKAN ve ND17-169 numaralı örnek atipik seyirli PKAN fenotipi olarak değerlendirilmiş ancak *PANK2* geni (NM_153638) Sanger dizileme sonuçları ile mutasyon bulunamamıştır.



Şekil 4.5: *PANK2* geni Sanger dizileme ile elde edilen yeni mutasyonların dizileme görüntüleri

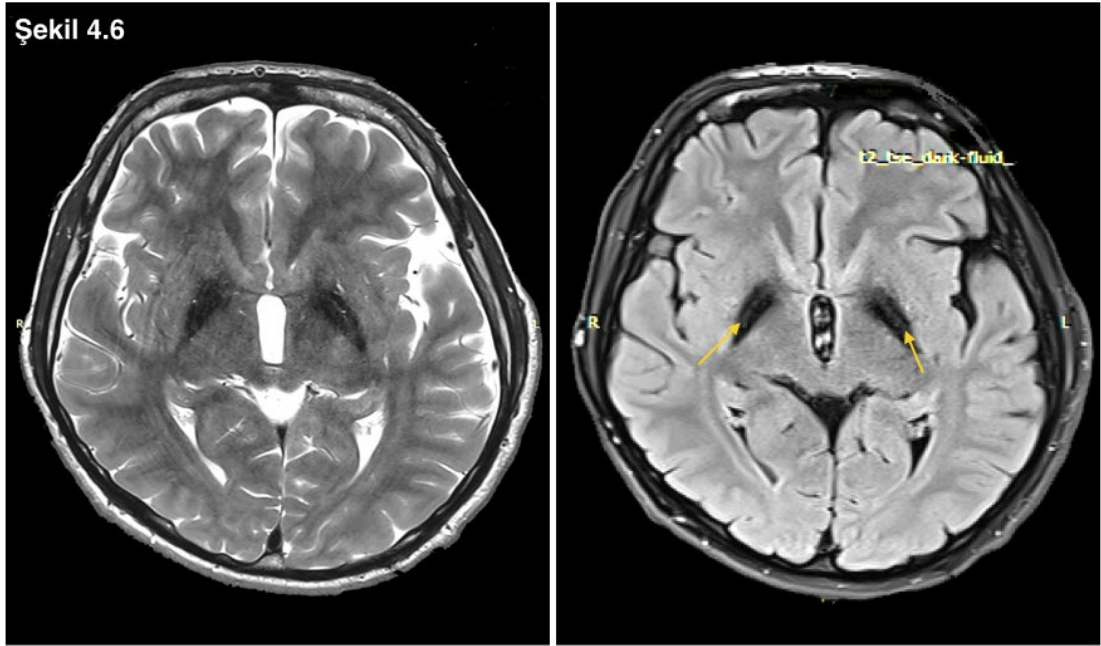
Hastaların mutasyonları homozigot durumda üst sıra, heterozigot durumda babaları orta sırada ve yine heterozigot durumda anneleri alt sırada verilmiştir.

a. Mutasyon c.676G> A **b.** Mutasyon c.800A> C **c.** Mutasyon c.1660G> A **d.** Mutasyon c.1537-2A> G.

4.2.2. *C19orf12* Geni Taranan Hastalarda Elde Edilen Bulgular

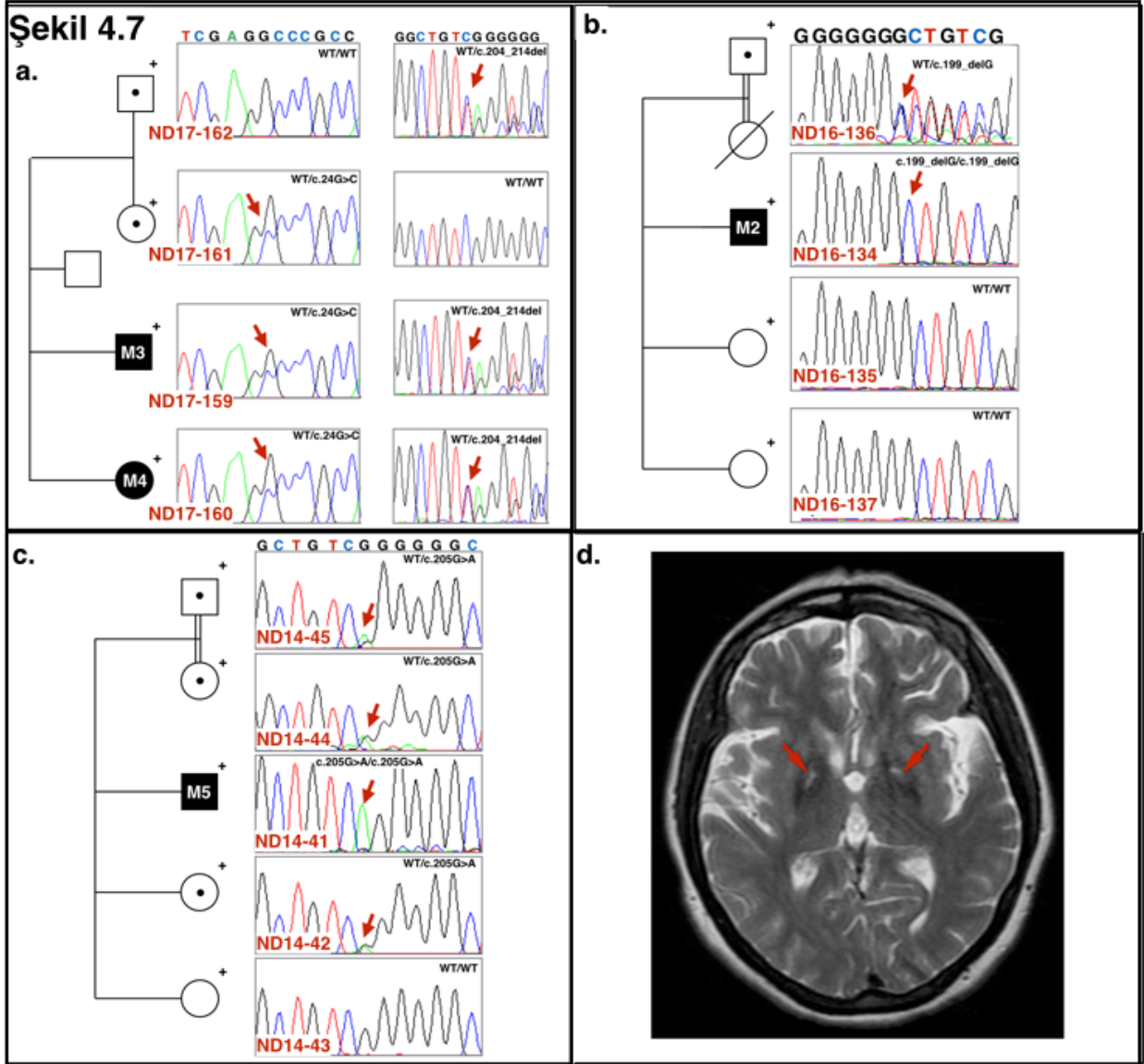
12 olguda *C19orf12* geni Sanger dizileme ile taranmıştır. Bu hastaların fenotip olarak ortak bulguları globus pallidus ve substantia nigra demir birikimi izlenmesi yanı sıra distoni-parkinsonizm ve spastisite ile seyreden bir tutulumuna sahip olmalarıydı. Hastalar arasında sadece ND14-41 kodlu hastanın distoni ya da parkinsonizmi yoktu, sadece spastisite ile seyreden bir kliniği vardı. Ancak Şekil 4.6'da gösterilen hastanın MRG'si MPAN için tipik olarak değerlendirildi.

Bu tarama sonucunda 6 hastada hastalığı açıklayacak nitelikte varyasyonlar bulundu. ND17-159 ve ND17-160 kodlu iki kardeş ve ND16-153 kodlu hasta dışında tespit edilen tüm varyantlar homozigot olarak izlendi. Bu hastalarda farklı varyantlar birleşik heterozigotluk yoluyla hastalığa yol açmıştı. Tespit edilen 7 farklı patojenik varyantın 2 tanesi daha önce literatürde yer almayan yeni mutasyonlar olarak tanımlandı. Bu varyantların segregasyonu dizi görüntüleriyle birlikte Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Ayrıca Şekil 4.7'de ND17-160 kodlu kardeşin MRG'sinde globus pallidusta "kaplan gözü" görünümü ile karışabilecek nitelikteki medial çizgilenme görülmektedir. Sanger dizileme yöntemiyle *C19orf12* geninde mutasyon tespit edilemeyen 5 örnek ND14-15, ND14-27, ND15-81, ND15-112, ND15-114 ve ND16-142 idi. Bu bulgulara ek olarak MPAN tanısı alan hastaların erken (9-12) ve geç (22-27) yaşlarda başlayan iki ayrı gruba ayrıldığı dikkati çekmiştir. Erken başlangıçlı olgularda tespit edilen c.24G>C ve c.194G>A mutasyonları sırasıyla *C19orf12* ekzon 2 ve ekzon 3'ün ilk nükleotidlerine ait değişimlerdir. Erken başlangıçla birlikte tespit edilen c.205G>A mutasyonu ise ekzon 3'ün 12. bazıdır. Bu mutasyonun yaratabileceği kırılma bölgesi değişimlerini araştırmak için Human Spice Finder kullanıldı ve çerçeve kayması yaratabileceği tespit edildi. *In silico* olarak yapılan bu tahmin ile kırılma bölgesi değişiminin yaratacağı çerçeve kaymasının klinik olarak erken başlangıçlı hastalık ile sonuçlanabileceğini gösterdi.



Şekil 4.6: ND14-41 kodlu hastaya ait MRG kesitleri

Globus pallidus seviyesinden geçen T2 aksiyel kesitlerde, globus pallidusta yoğun demir birikimi ile uyumlu hipointens görüntü izlenmektedir. Ek olarak T2-tse kesitinde globus pallidusun medialinde yer alan bant görünümü oklarla işaretlenmiştir.

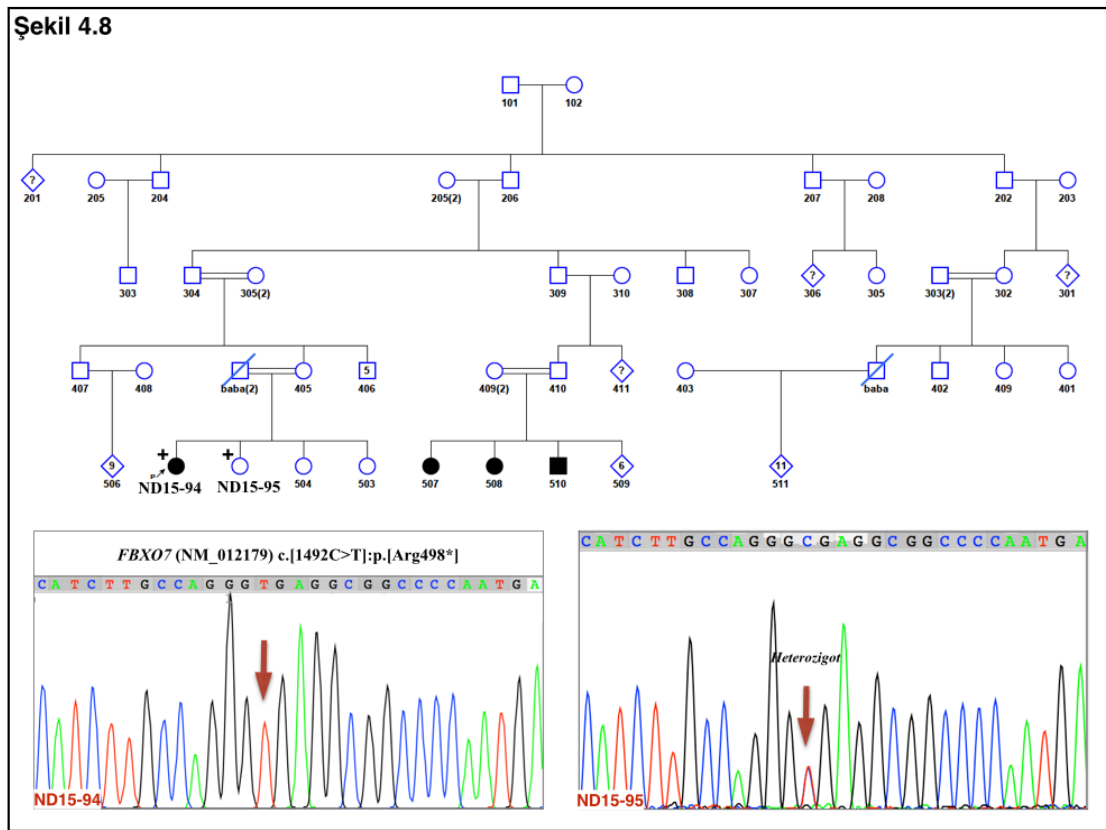


Şekil 4.7: *C19orf12* geni Sanger dizileme ile elde edilen yeni mutasyonların dizileme görüntüleri ve ND16-160 kodlu hastanın MRG kesiti

a. ND17-159 ve ND17-160 kodlu iki kardeşte anne ve baba da segregasyon eden birleşik heterozigotluk görülmektedir. **b.** ND16-134'te yeni homozigot c.199delG varyantının aile içinde segregasyonu görülmektedir. **c.** ND14-41'te homozigot c.205G>A varyantının aile içinde segregasyonu görülmektedir. **d.** ND17-160 kodlu bireyin globus pallidumdan geçen aksiyel T2 kesitinde medial çizgilenmenin kalın olarak görülmesi sonucu "kaplan gözü" belirtisi ile benzerliği görülmektedir.

4.2.3. Diğer Hastalar

ND15-94 kodlu parkinsonizm ve nöropsikiyatrik yakınmalarla seyreden bir hastalık öyküsü vardı. Beyinde demir birikimi rastlanmayan iki hasta kuzeninde aynı yakınmalarla seyreden yakınmalar olduğu öğrenildi. Bu hastalar literatürde demir birikimi olmaksızın aynı klinik bulgularla Çakmaklı-Yalçın ve arkadaşları tarafından bildirilmişti. Bu hastalarda *FBXO7* (NM_012179) geninde bulunan c.1492C>T:p.Arg498* mutasyonun hastamızda da mevcut olduğu bulundu. Pedigri ve mutasyonun segregasyonu Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: ND15-94 kodlu bireyin pedigri ve *FBXO7* geninde mutasyonun hastada ve sağlıklı kardeşte dizi görüntüleri

Pedigride 507, 508 ve 509 kodlu bireyler literatürde daha önce bildirilmiş hastalardır. *FBXO7* (NM_012179) geninde ND15-94 kodlu hasta bireyde homozigot olarak c.1492C>T değişimi ve ND15-95 kodlu sağlıklı kardeşinde heterozigot olarak bu değişim görülmektedir (oklar).

PLAN fenotipi ile uyumlu bulunan ND14-44 bireyde *PLA2G6* (NM_003560) geninde optimizasyon için bakılan ekzonlardan ilki olan ekzon 8'de c.1117G>A:p.Gly373Arg bilinen mutasyonu saptandı. Bu hastada fenotipine başka gen adayları olmaması ve genin büyüklüğünden dolayı diğer ekzonlar çalışılmadı.

4.3. Ekzom Dizileme ile Elde Edilen Bulgular

Ekzom dizileme işleminin ham veri eldesine kadar laboratuvar işlemleri OGT firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Ekzom dizileme işlemi her birey için dizilenen bölgenin en az %90'ını kapsamakta, derinlik 20X ve ortalama derinlik ise 50X olarak gerçekleşmiştir. Ekzom dizileme veri analizi tımdengelim yaklaşımıyla Şekil 3.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

4.3.1. Trio Analizi Uygulanan Aileler

ND14-1 kodlu indeks bireyin ailesi (aile 1) ve ND14-4 kodlu indeks bireyin ailesi (aile 2) radyolojik ve klinik olarak tipik PKAN fenotipine rağmen klasik yöntemlerle yapılan çalışmalarda mutasyon saptanamamıştı. Bu hastalar hastalıktan sorumlu farklı bir gen tespit olasılığı nedeniyle analizleri kolaylaştırmak için trio olarak çalışıldı.

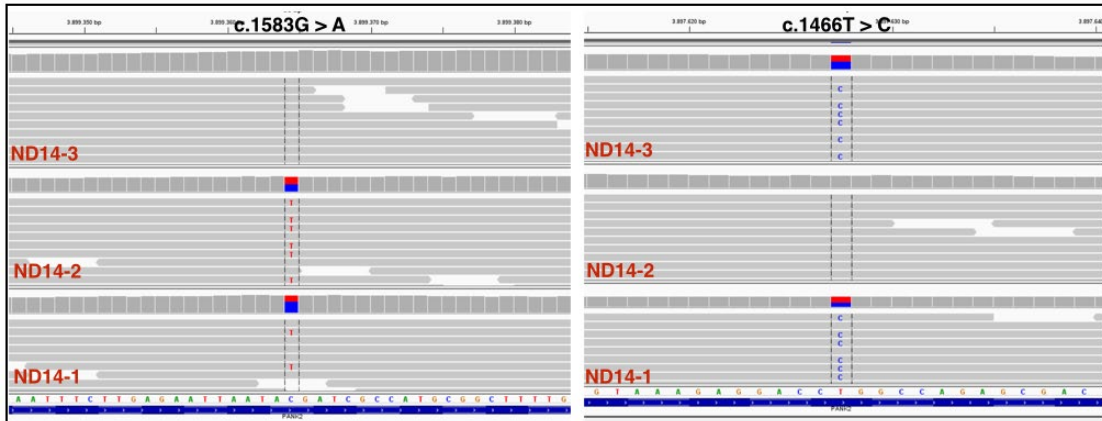
4.3.1.1. Aile 1

ND14-1 kodlu birey daha önce başka bir merkezde *PANK2* geni için incelenmiş ve bir sonuca ulaşamadığı raporlanmıştı. Kliniğinde ise yıllarca sadece oromandibular distoni ile seyreden bir olgu olması dikkat çekiciydi. Bu nedenle Aile 1 ekzom trio için seçildi. Analizler OGT tarafından sağlanan bir bilgisayar arayüzü ile laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonucunda aday gen *PANK2* (NM_15363) ekzon 5'te c.1466T>C:p.Leu489Pro ve ekzon 6'da c.1583C>T:p.Thr528Met varyantları elde edilmiştir. Kullanılan ara yüzün birleşik heterozigotluk için sağladığı analizde bu varyantlar elde edilemedi. Bunun nedeni kullanılan ara yüzün patojenite skoru olarak temelde SIFT skorlarını kullanması ve ilk kez tespit edilen varyantın SIFT ile patojenite skorunun düşük tahmin edilmesiydi. Ancak Şekil 4.9'da gösterildiği gibi IGV üzerinden yapılan aday gen analizinde babadan sadece c.1466T>C, anneden ise sadece

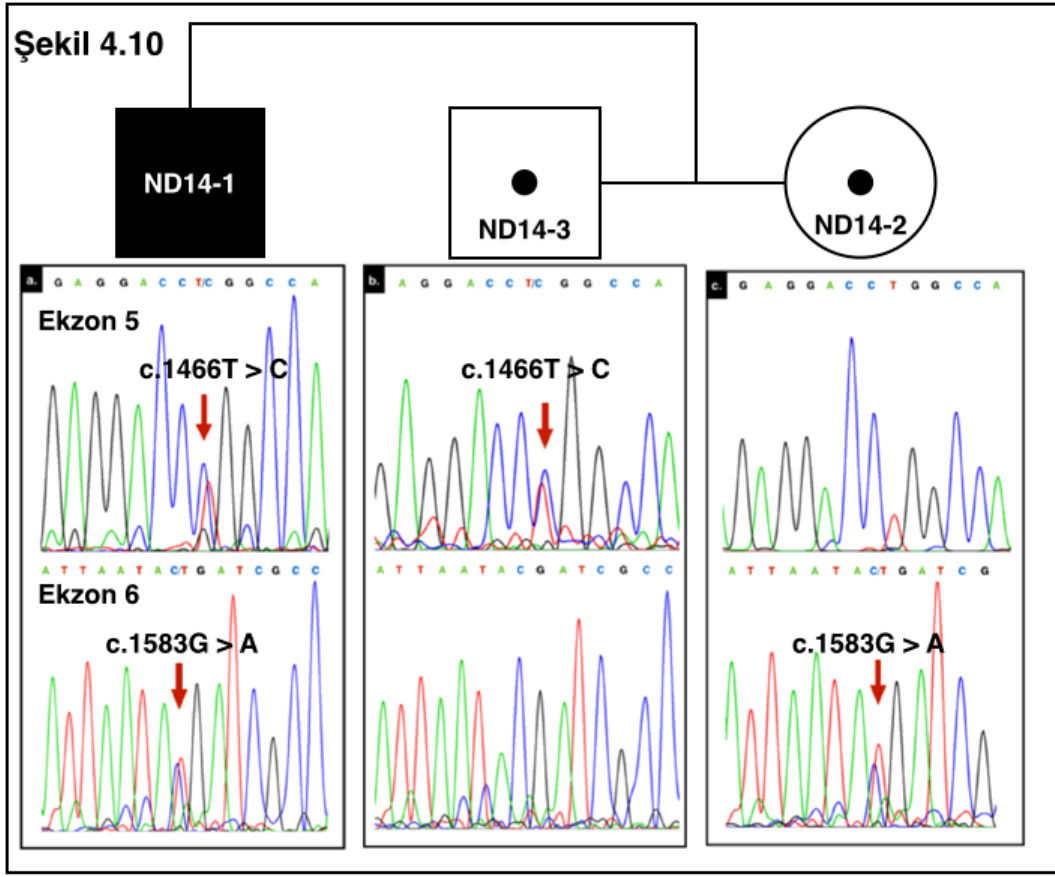
c.1583C>T kalıtılmakta olduğu görüldü. Ekzom dizilemede, diğer genlerde fenotipi açıklayacak nitelikte başka varyanta rastlanmadı. *PANK2* geninde bulunan birleşik heterozigotlu Şekil 4.10'da gösterildiği gibi Sanger dizileme ile de ayrıca teyid edildi. Bu varyantlardan ekzon 5'teki c.1466T>C varyantı literatürde olmayan bir yeni bir varyanttı. Bu varyant veri tabanlarında yer almamasının yanısıra SIFT dışındaki *in silico* tahmin araçları ile patojen etkiye sahip olarak tahmin edildi. Bu bireye ait genetik ve klinik bulgular literatüre kazandırıldı (Yapıcı ve ark. 2016).

Şekil 4.9



Şekil 4.9: Aile 1'de *PANK2* geninde saptanan birleşik heterozigotluğun IGV'de görünümü

PANK2 (NM_15363) c.1466T>C ve c.1583C>T varyantlarının hasta ve ebeveynlerde IGV görünümleri. ND14-2 kodlu anne ve ND14-3 kodlu baba varyantlardan sadece birini taşımaktadır.

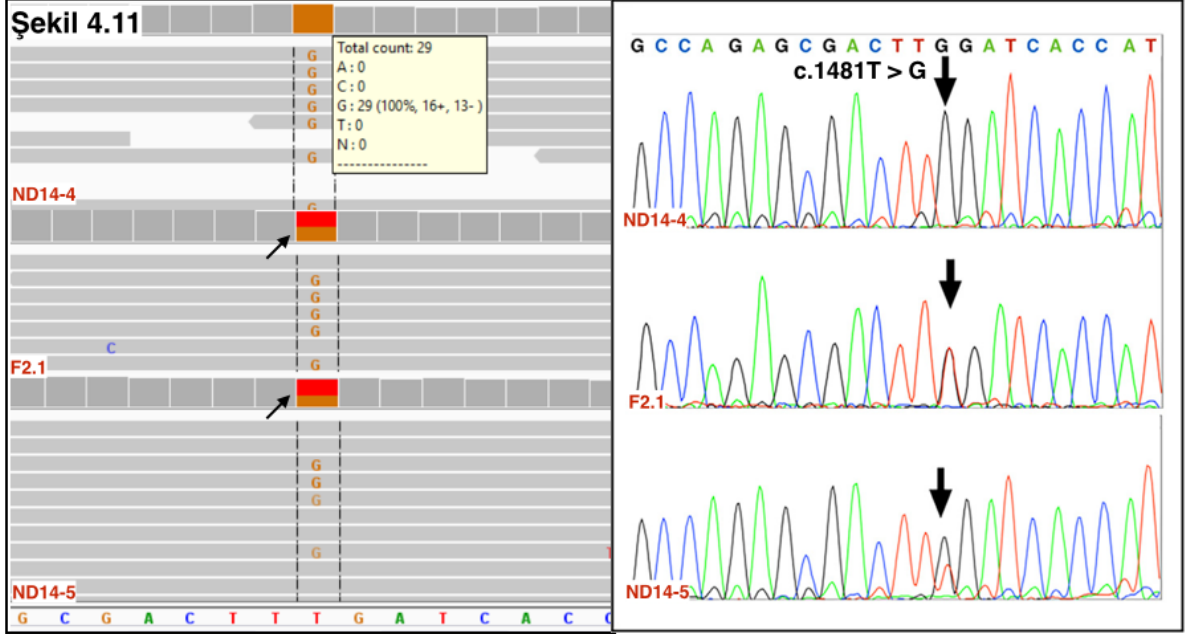


Şekil 4.10: Aile 1’de saptanan varyantların Sanger dizileme görüntüleri

Pedigrisi görülen Aile 1’de varyantlardan c.1466T>C babadan, c.1583C>T ise anneden kalıtıldığı Sanger dizileme ile tekrar gösterilmiştir.

4.3.1.2. Aile 2

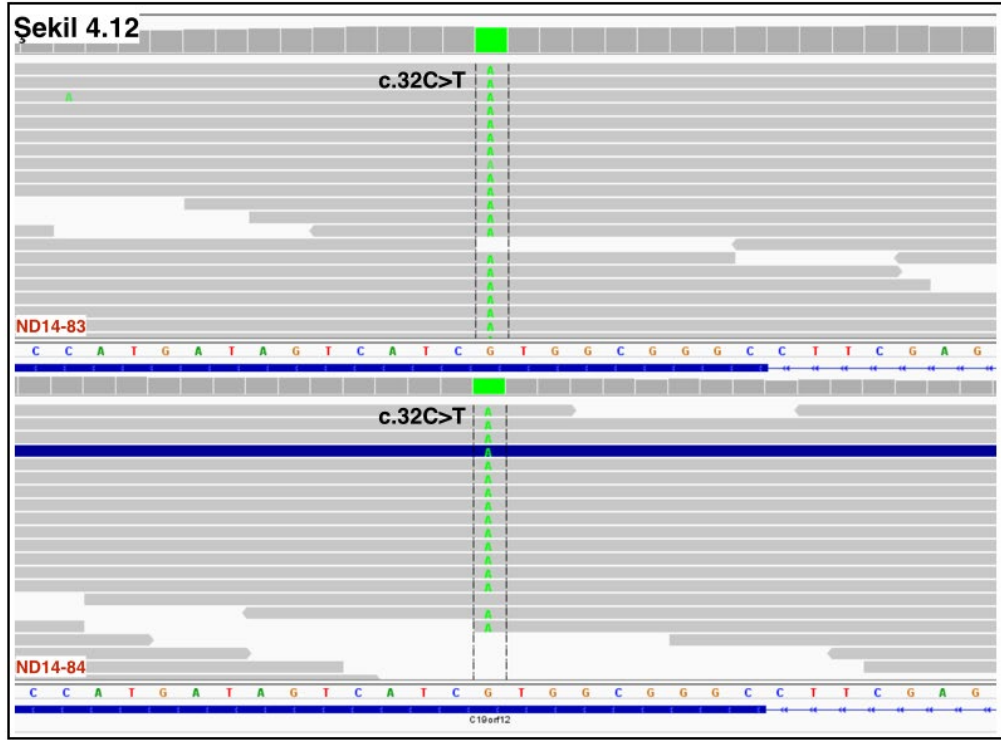
ND14-4 kodlu bireyde *PANK2* incelendi ve rs111863748 kodlu c.1481T>C:p.Leu494Ser homozigot polimorfizm (MAF:0.5) dışında bir sonuca ulaşılamadı. Bu nedenle Aile 2 ekzom trio için seçildi. Ekzom dizileme veri analizleri hem laboratuvarımızda manuel olarak yazılan bir yazılımla (*in-house pipeline*) hem de OGT ara yüzü kullanılarak Şekil 3.2’de belirtilen prensiplerle gerçekleştirildi. Analiz sonucunda aday gen *PANK2*’de (NM_15363) rs111863748 ile aynı pozisyonda olan c.1481T>G:p.Leu494Trp varyantı elde edilmiştir. Şekil 4.11’da gösterildiği gibi anne ve babadan heterozigot olarak kalıtılmaktaydı. Veri tabanlarında olmayan bu yeni varyant Sanger dizileme ile teyid edildi. Ekzom dizilemede fenotipi açıklayacak başka varyanta rastlanmadı.



Şekil 4.11'de Aile 2'de *PANK2* geninde saptanan varyantın IGV'de ve Sanger dizilemede görünümü: *PANK2* (NM_15363) yeni homozigot c.1481T>G mutasyonunun sırasıyla yukarıdan aşağıya ND14-4 kodlu hasta, F2.1 kodlu baba ve ND14-5 kodlu annede IGV ve Sanger dizileme görüntüleri verilmiştir. ND14-4'e ait IGV görüntüsünde varyantın 29 okumanın tümünde G olarak okunduğu görülmektedir. F2.1 ve ND14-5'te IGV'de okumaların yarı yarıya T ve G olarak dağıldığı izlenmektedir (küçük oklar).

4.3.2. İki Kardeşe Uygulanan Ekzom Analizi

Klinik bulgularından MPAN ile uyumlu olabileceği belirtilen ancak başlangıç yaşı açısından uyumsuz olan ND15-83 ve ND15-84 kodlu iki kardeş ekzom dizilemeye için seçildi. Ekzom dizileme veri analizleri hem laboratuvarımızda manuel olarak yazılan bir yazılımla hem de OGT arayüzü kullanılarak Şekil 3.2’de belirtilen prensiplerle gerçekleştirildi. Analiz sonucunda her iki kardeşte aday genlerden *C19orf12*’de (NM_001031726) homozigot c.32C>T:p.Thr11Met varyantı elde edilmiştir. ND15-83 kodlu bireyde bu nokta 57 okumanın 56’sında T, sadece 1’inde G olarak; ND15-84 kodlu bireyde ise 26 okumanın tamamında T olarak okunmuştu. Şekil 4.12’de kardeşlerde bu mutasyonun IGV görüntüleri verilmiştir. Ekzom dizilemedenotipi açıklayacak başka varyanta rastlanmadı.

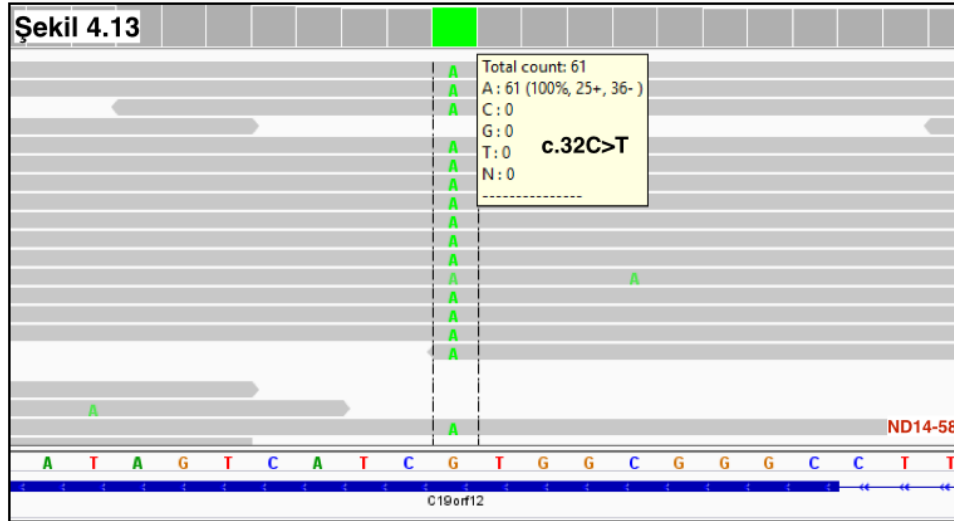


Şekil 4.12: ND15-83 ve ND15-84 kodlu kardeşlerde *C19orf12*'de homozigot **c.32C>T** mutasyonunun IGV görüntüsü *C19orf12*'de (NM_001031726) homozigot **c.32C>T:p.Thr11Met** varyantının IGV görüntüsü verilmiştir. Ters oryantasyonlu bir gen olduğu için değişim IGV'de G'den A'ya olarak izlenmektedir.

4.3.3. Tek Hasta Bireye Yapılan Ekzom Analizleri

4.3.3.1. ND14-58 Kodlu Örneğin Analizleri

Klinik bulgularından fenotipi netleştirilemeyen, katatonik psikiyatrik bulgular ve dopa cevaplı parkinsonizmi olan ND14-58 kodlu hasta ekzom dizilemeye için seçildi. Ekzom dizileme veri analizleri laboratuvarımızda OGT ara yüzü kullanılarak Şekil 3.2’de belirtilen prensiplerle gerçekleştirildi. Analiz sonucunda hastada aday genlerden *C19orf12*’de (NM_001031726) homozigot c.32C>T:p.Thr11Met varyantı elde edilmiştir. Şekil 4.13’te mutasyonun IGV görüntüsü verilmiştir. Ekzom dizilemede fenotipi açıklayacak başka varyanta rastlanmadı.



Şekil 4.13: ND14-58 kodlu hasta bireyde C19orf12 mutasyonunun IGV görüntüsü

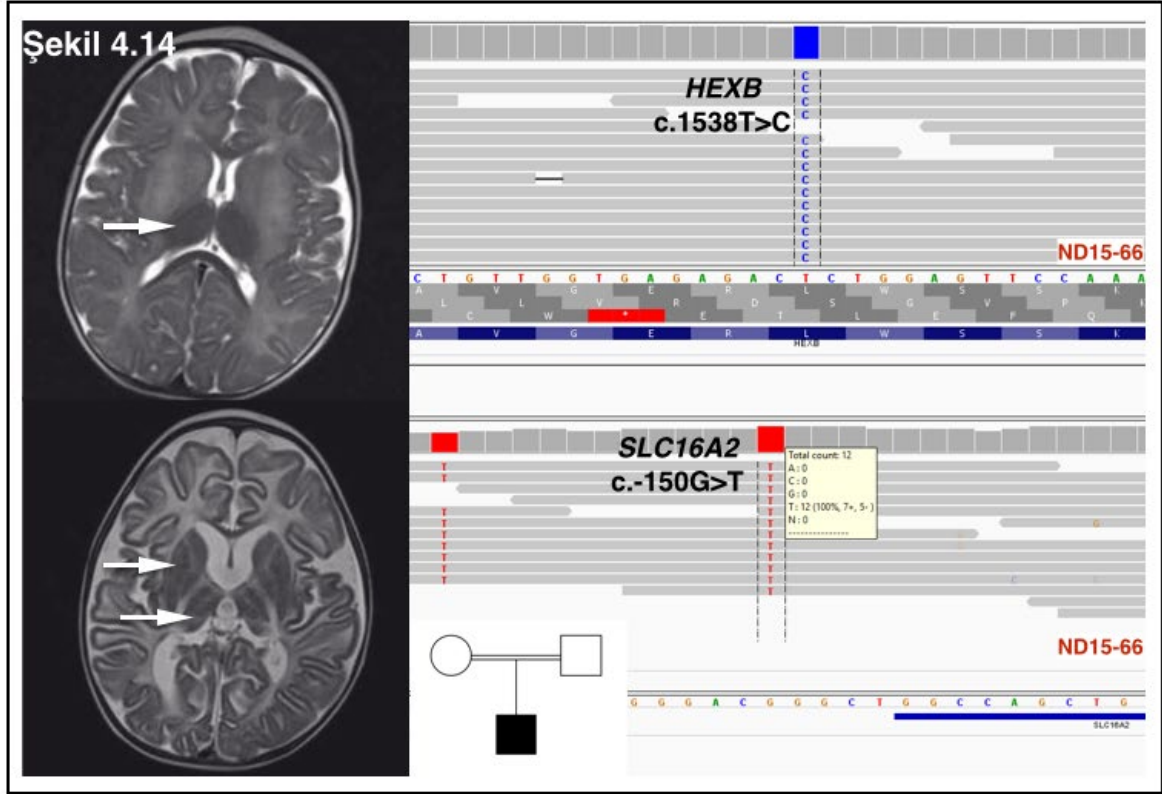
C19orf12’de (NM_001031726) homozigot c.32C>T:p.Thr11Met varyantının IGV görüntüsü verilmiştir. 61 okumanın tamamında G olması gereken pozisyon A olarak okunmuştur. Ters oryantasyonlu bir gen olduğu için değişim IGV’de G’den A’ya olarak görülmektedir.

4.3.3.2. ND15-66 Kodlu Örneğin Analizleri

Klinik bulgularından fenotipi netleştirilemeyen 18 aylık erkek bebek metabolizma bölümünden yönlendirilmişti. Gelişim geriliği, hipotoni ve nöbetleri yanı sıra MRI görüntülemesinde talamus'ta hipodansite izleniyordu. Talamus tutulumu açısından FAHR hastalığını düşündürmekle birlikte net bir fenotip belirlenemedi. Hastanın MR görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir. Anne babası birinci derece kuzen olan ND15-66 kodlu hasta ekzom dizilemeye için seçildi.

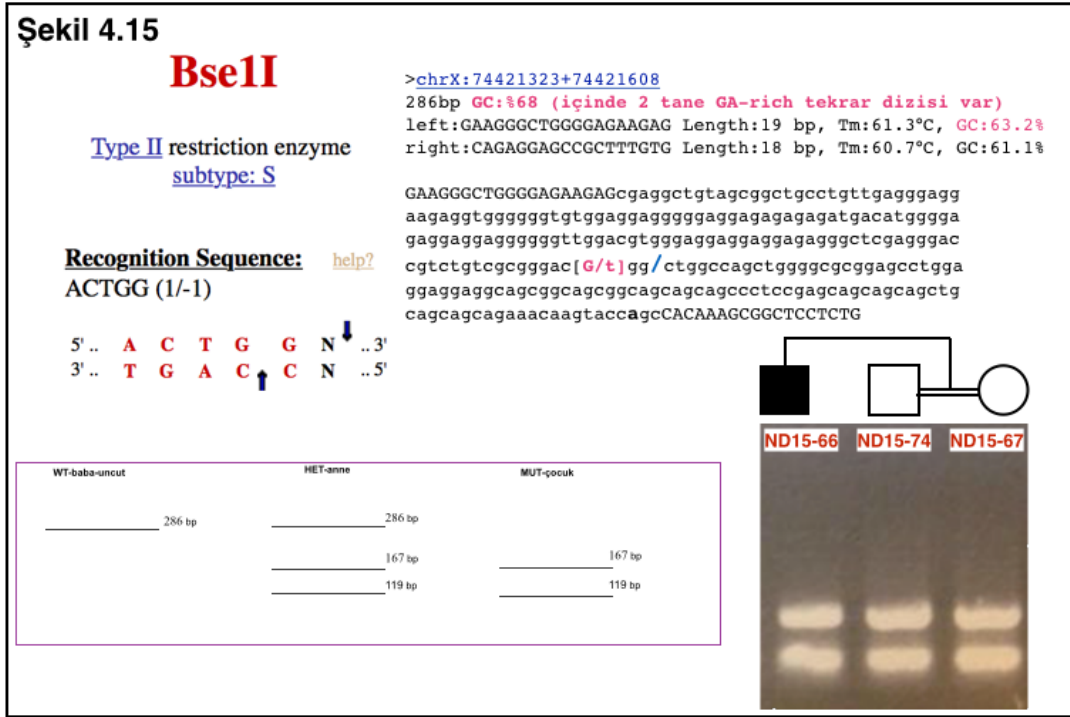
Ekzom dizileme veri analizleri OGT ara yüzü kullanılarak Şekil 3.2'de belirtilen prensiplerle gerçekleştirildi. Analiz sonucunda hastada NBIA aday genlerinde hastalıkla ilişkili olabilecek varyanta rastlanmadı. Diğer genlerden *SLC16A2* ve *HEXB* geninde homozigot iki ayrı aday varyant tespit edildi. Hastanın ekzom dizilemesi sonucunda bu aday varyantların IGV görüntüleri Şekil 4.14'te gösterilmiştir. *SLC16A2* genindeki (NM_006517) c.-150G>T varyantı ana transkriptin 5'UTR bölgesinde yeni bir varyanttı. Hastamızdaki klinik bulgularla uyumlu özellikler gösteren *SLC16A2* mutasyonlarında ortaya çıkan OR Allan-Herdon_Dudley sendromunda (OMIM: 300523) bildirilmişti. Bu varyantın segregasyonu için primer tasarlandı. Ancak dizilencek hedef bölgedeki GA tekrar dizileri nedeniyle Sanger dizileme başarısızlıkla sonuçlandı. Bu varyantın segregasyonunu göstermek için indirekt bir yöntem olan enzim kesimi yöntemi kullanıldı. Enzim kesimi ile annede homozigot ve babada hemizigot olarak mevcut olduğu sonucuna varılarak bu varyant genetik olarak elendi. Enzim kesimi çalışmaları Şekil 4.15'te açıklanmıştır. Bu sendromda beklenen tiroid hormon reseptör duyarsızlığına bağlı yüksek TSH değerleri de hasta da mevcut değildi.

HEXB genindeki (NM_000521) c.1538T>C; p.Leu513Pro varyantın Sanger dizileme ile segrege ettiği gösterildi. Aile içinde segregasyona ait dizileme görüntüsü Şekil 4.16'da verilmiştir. Eş zamanlı olarak metabolizma laboratuvarında total heksozaminidaz 27,2 (N: 333-775 nmol/ml) ve heksozaminidaz A: % 55,4 (N: %49-68) aktiviteleri çalışıldı. Bu sonuçlarla bu mutasyonun patojenliği doğrulanmış oldu. NBIA hastalık grubu ile ayırıcı tanıya giren bir hastalık bu hastada yeni bir mutasyon ile gösterildi ve yayınlandı (Akçakaya ve ark. 2017b).



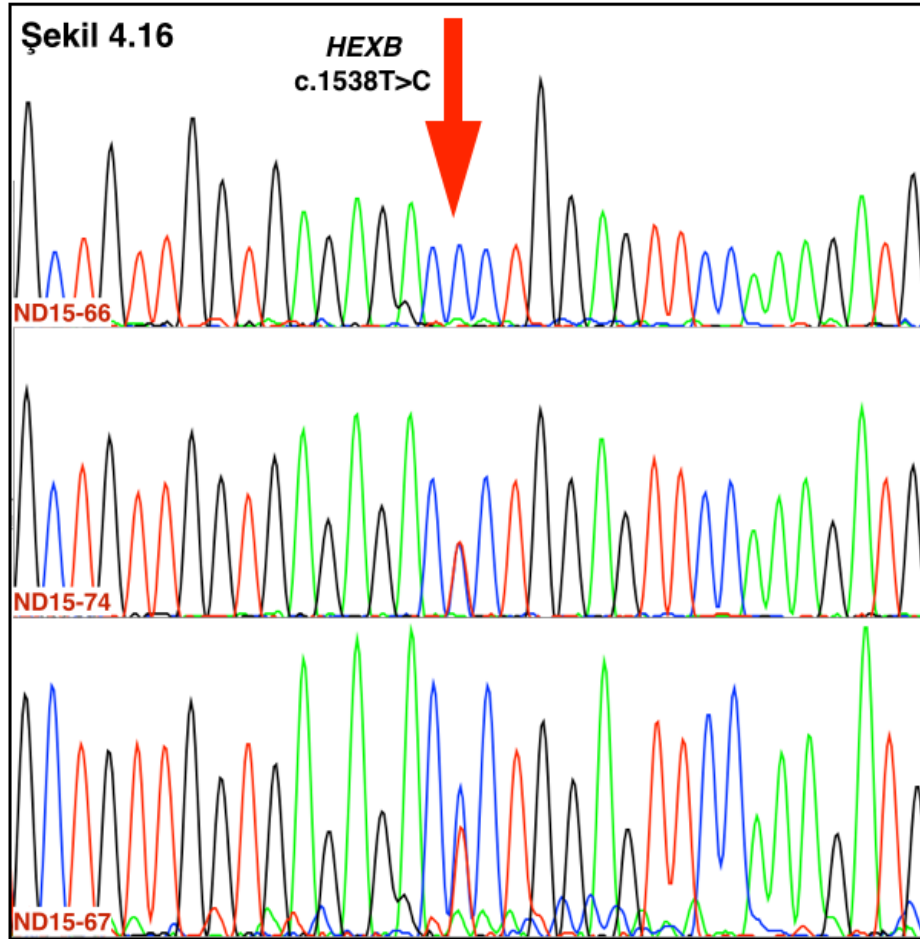
Şekil 4.14: ND15-66 kodlu hasta bireyin MR görüntüleri ve aday varyantların IGV görüntüleri

Aksiyel kesitli FLAIR (üst) ve T2 (alt) ağırlıklı MR kesitlerinde talamus dahil olmak üzere bazal ganglialarda izlenen hipointensiteler görülmektedir (beyaz oklar). IGV görüntülerinden üstte *HEXB* geni üzerindeki (NM_000521) c.1538T>C varyantı ve altta *SLC16A2* geni 5'UTR bölgesinde (NM_006517) c.-150G>T varyantı görülmektedir. Her iki değişimde homozigot olarak izlenmektedir.



Şekil 4.15: ND15-66 kodlu bireyin ailesinde *SLCA16A2* varyantına yönelik enzim kesimi ile segregasyon çalışması

Mutant diziyi tanıyan BseI enzimi çalışma için seçildi. PZR ile çoğaltılan 286 bazlık dizi bu hastalığı açıklayacak patern olan babanın yabancı tip, annenin taşıyıcı ve hasta çocuğun mutant hemizigot olacağı şekilde hesaplandı. Ancak bu segregasyon paterni yerine, jel görüntüsünde izlendiği gibi tüm bireylerdeki X alelinin bu varyantı taşıdığı görüldü.

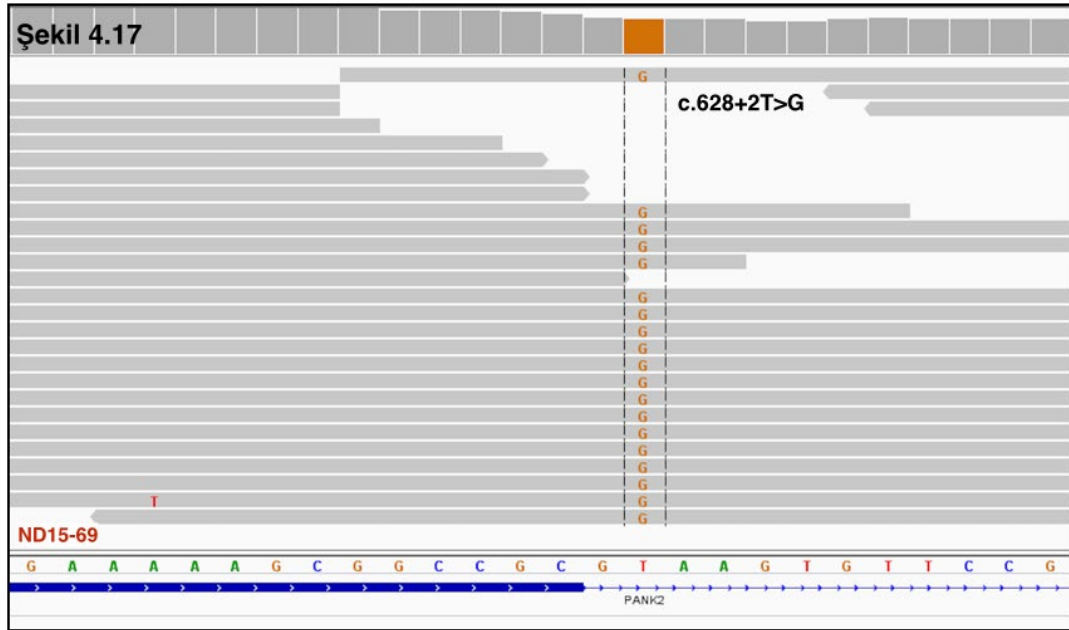


Şekil 4.16: *HEXB* (NM_000521) c.1538T>C varyantının Sanger dizileme ile aile içinde segregasyonu (Akçakaya ve ark. 2017b)

Değişim üst sırada hasta bireyin (ND15-66) dizilemesinde homozigot olarak görülmektedir. Orta sırada baba (ND15-74) ve alt sırada annede (ND15-67) dizilemelerinde ise değişimin heterozigot olduğu görülmektedir.

4.3.3.3. ND15-69 Kodlu Örneğin Analizleri

ND15-69 kodlu birey daha önce başka bir merkezde *PANK2* geni için incelenmiş ve bir sonuca ulaşılamadığı raporlanmıştı. Kliniği klasik tip PKAN ile uyumluydu. Hasta birey ekzom dizileme incelemesi için seçildi. Analizler OGT tarafından sağlanan bir bilgisayar arayüzü ile laboratuvarımızda gerçekleştirildi. Analiz sonucunda hastada aday gen *PANK2*'de (NM_15363) c.628+2T>G homozigot kırılma bölgesi varyantı elde edilmiştir. Şekil 4.17'te mutasyonun IGV görüntüsü verilmiştir. Ekzom dizilemede fenotipi açıklayacak başka varyanta rastlanmadı.



Şekil 4.17: ND15-69 kodlu hasta bireyde *PANK2* mutasyonunun IGV görüntüsü

PANK2 (NM_15363) c.628+2T>G homozigot kırılma bölgesi mutasyonunun IGV görüntüsü verilmiştir. okumaların tamamında T olması gereken pozisyon G olarak okunmuştur.

4.3.3.4. ND14-18 Kodlu Örneğin Analizleri ve Ekzom Datasında X Heterozigotluğu

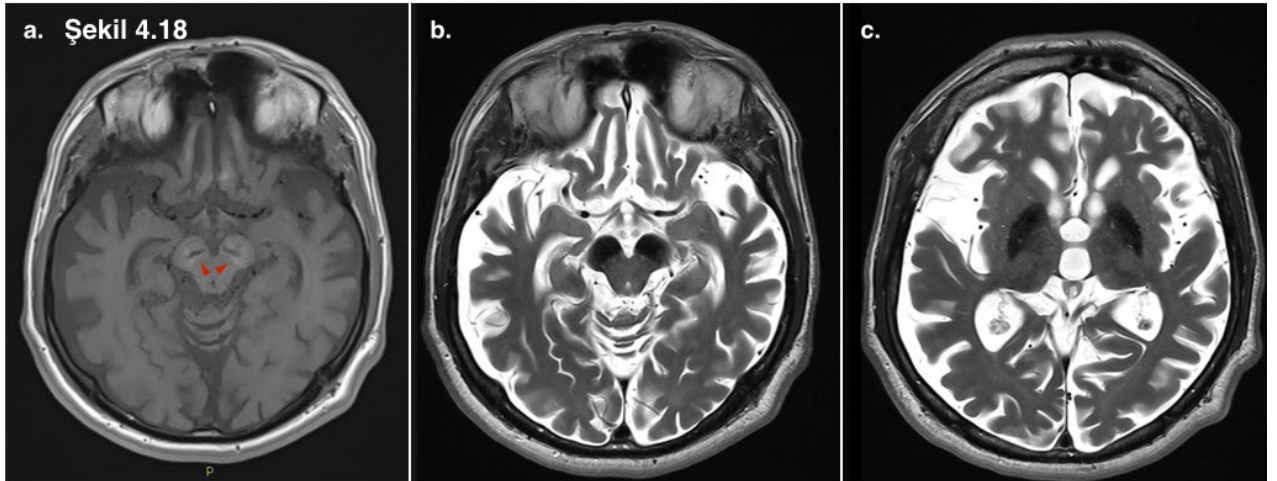
Klinik bulgularından gelişim geriliği ve zihinsel yetmezliği olduğu bilinen, 20'li yaşlarından itibaren kognitif yıkım ve parkinsonizm eklenen hastanın MR'ında BPAN ile uyumlu bulgular vardı. Hastanın MR görüntüleri Şekil 4.18'ge gösterilmiştir. Aday gen *WDR45*'in büyüklüğü ve diğer adaylarında incelenmesi için ND14-18 kodlu hasta ekzom dizileme için seçildi. Ekzom dizileme veri analizleri laboratuvarımızda OGT arayüzü kullanılarak Şekil 3.2'de belirtilen prensiplerle gerçekleştirildi. Analiz sonucunda hastada aday genlerden *WDR45*'te daha önce bildirilmemiş NM_007075.3:c.873C>G; p.(Tyr291*) varyantı tespit edildi. Şekil 4.19'de mutasyonun IGV görüntüsü verilmiştir. Bu varyant 30 okumanın %30'unda mevcuttu. Bu gene ait psödogenin olması nedeniyle okumaların ekzon içi mi yoksa introndan introna mı olduğu incelendi. 30 okumanın tümü introndan intronaydı. Ekzom dizilemede fenotipi açıklayacak başka varyanta rastlanmadı.

Hastadan tekrar alınan bağımsız bir kan örneğinde introndan introna olacak şekilde tasarlanan primerler ile bu varyant tekrar çalışıldı. Sanger dizilemede de üçte bir oranında olan mozaiklik görüldü. Ayrıca bu bölge aileden alınan tükürük ve kan örneklerinden elde edilen DNA'larda Sanger dizileme ile çalışıldı. Hastanın kanı dışında varyanta rastlanmadı. Kan ve tükürükten yapılan aile içi segregasyon sonuçları Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Bu sonuçlarla bu mutasyonun *de novo* olarak gerçekleştiği sonucuna varıldı.

Hastanın fenotipinde böyle bir şüphe olmamasına rağmen X kromozomundaki varyantlarda mozaiklik/heterozigotluk yaratabilecek sitogenetik patolojileri dışlamak üzere sitogenetik inceleme yapıldı. Karyotip ve flüoresan *in situ* hibridizasyon (FISH) incelemeleri sonucunda hastanın normal karyotipe sahip olduğu gösterildi. Erkek bireylerde ekzom dizilemede izlenen heterozigot varyantların belirli sınırlar içinde normal karyotipte de olabileceği sonucuna varıldı.

Bu erkek hastada ekzom datasında X kromozomuna ait mozaik bir varyantın tespit edilmesi ve birçok başka varyantında olduğunun fark edilmesi üzerine X kromozomuna ait mozaiklik oranlarının tespit edilmesi ve bunun pratik olarak kullanımı açısından ayrıntılı olarak araştırılmasına karar verilmiştir. Normal karyotipe sahip erkek

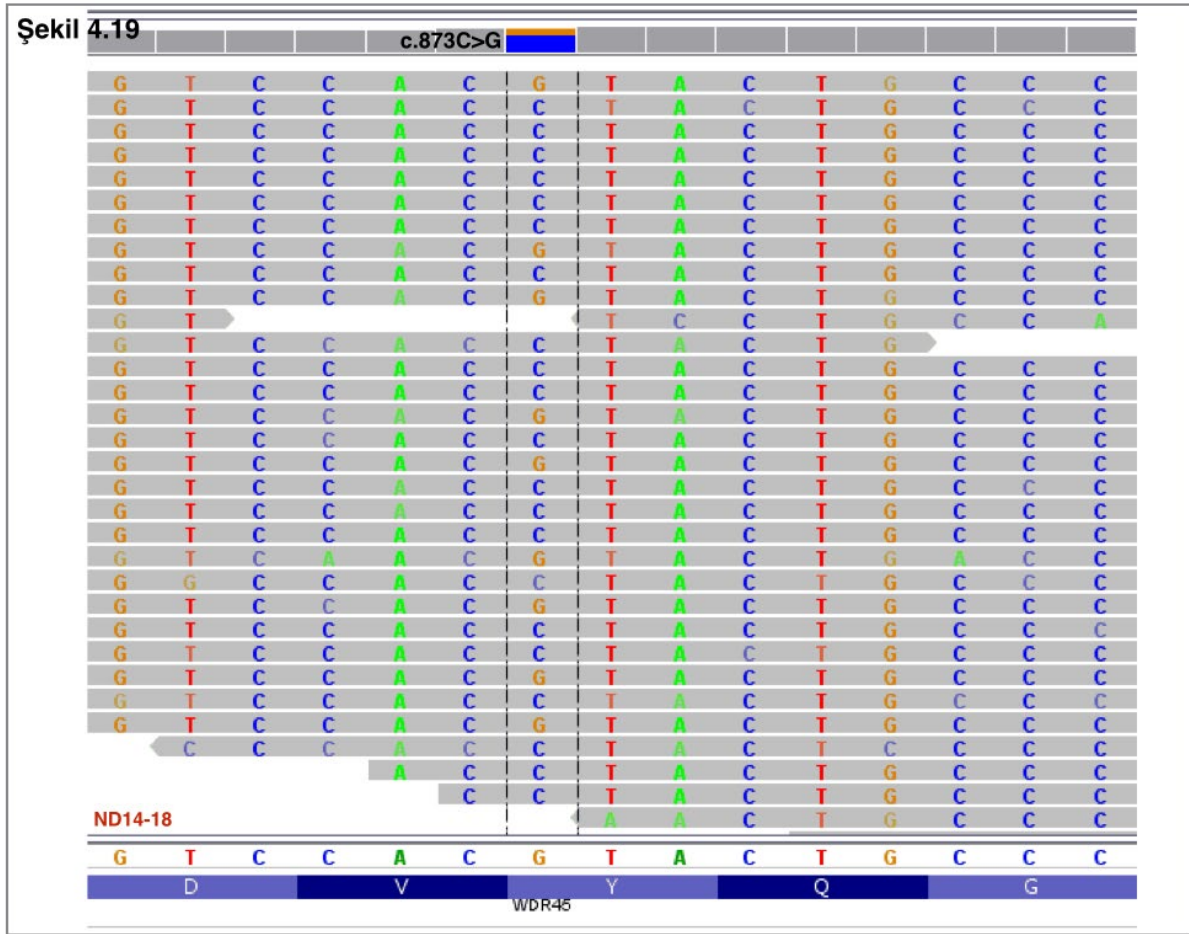
bireylerde teorik olarak heterozigot varyant beklenmez. Ancak ekzom dizilemede belli bir oranda heterozigot varyantların varlığı kendi ekzom datamızdaki diğer erkek bireylerde kontrol edilerek saptanmıştır. Bu varyantların PAR bölgelerinden gelip gelmediği kontrol edilmiş ve PAR bölgelerinden bağımsız olduğu görülmüştür. ND14-18 kodlu hastamızda olduğu gibi bu varyantlar içinde patojenik varyantlar da saptanabilmektedir. Laboratuvarımızdaki 75 erkek ve 54 kadın ekzom datası kullanılarak X heterozigotluğu ortalama değerleri kadın ve erkek için sırasıyla 0.58 ± 0.03 ve 0.11 ± 0.02 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.18: ND14-18 kodlu bireyin MR görüntüleri (Akçakaya ve ark. 2019)

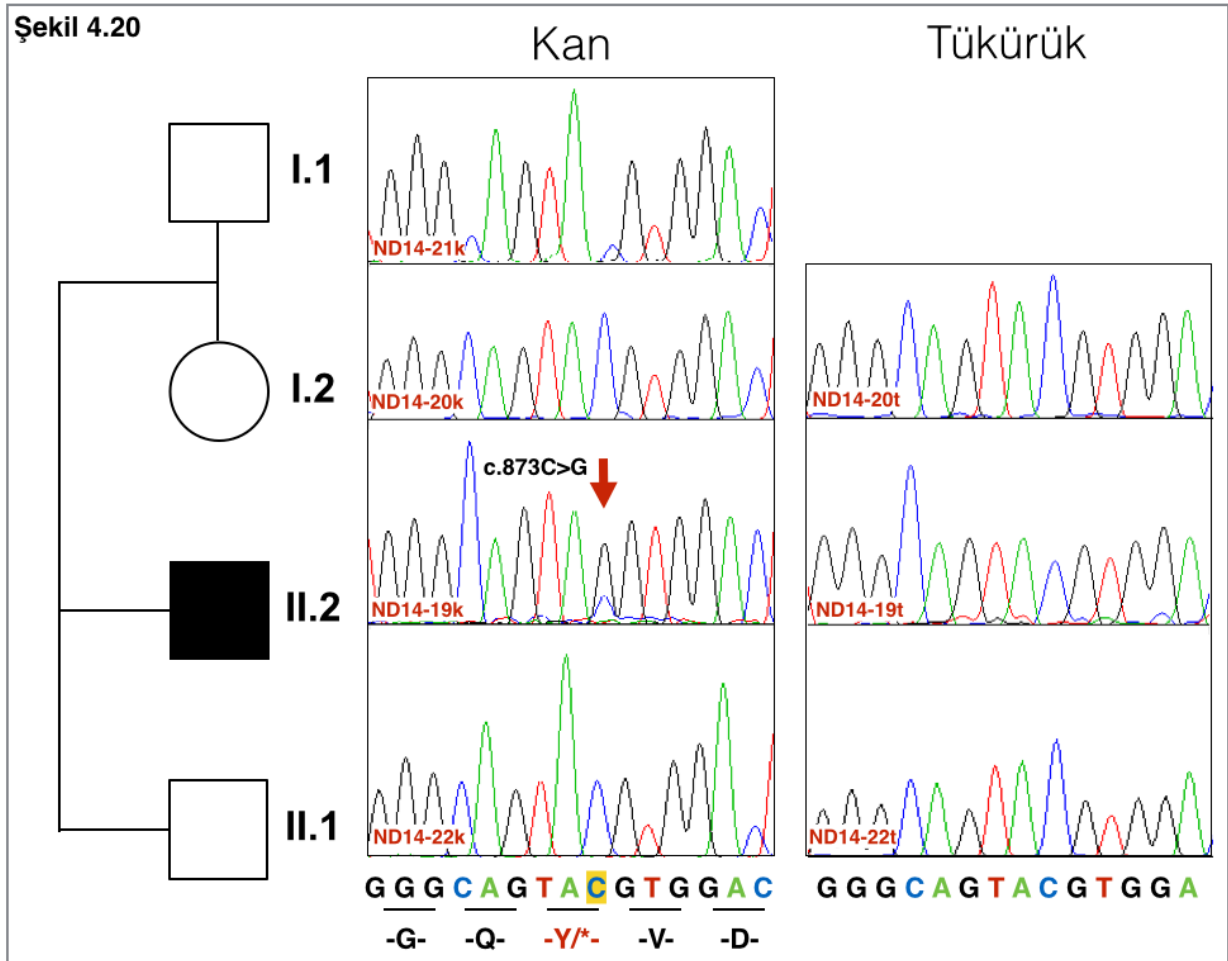
a. Substantia nigra düzeyinden geçen T1 ağırlıklı aksiyel kesitte hastalık için tipik bulgu olan substantia nigra “halo” görünümü izlenmektedir (kırmızı oklar).

b ve c. T1 ağırlıklı aksiyel kesitlerde globus pallidus ve substantia nigra hipointensite ile karakterize demir birikimi izlenmektedir. Tüm kesitlerde genel atrofik görünüm dikkati çekmektedir.



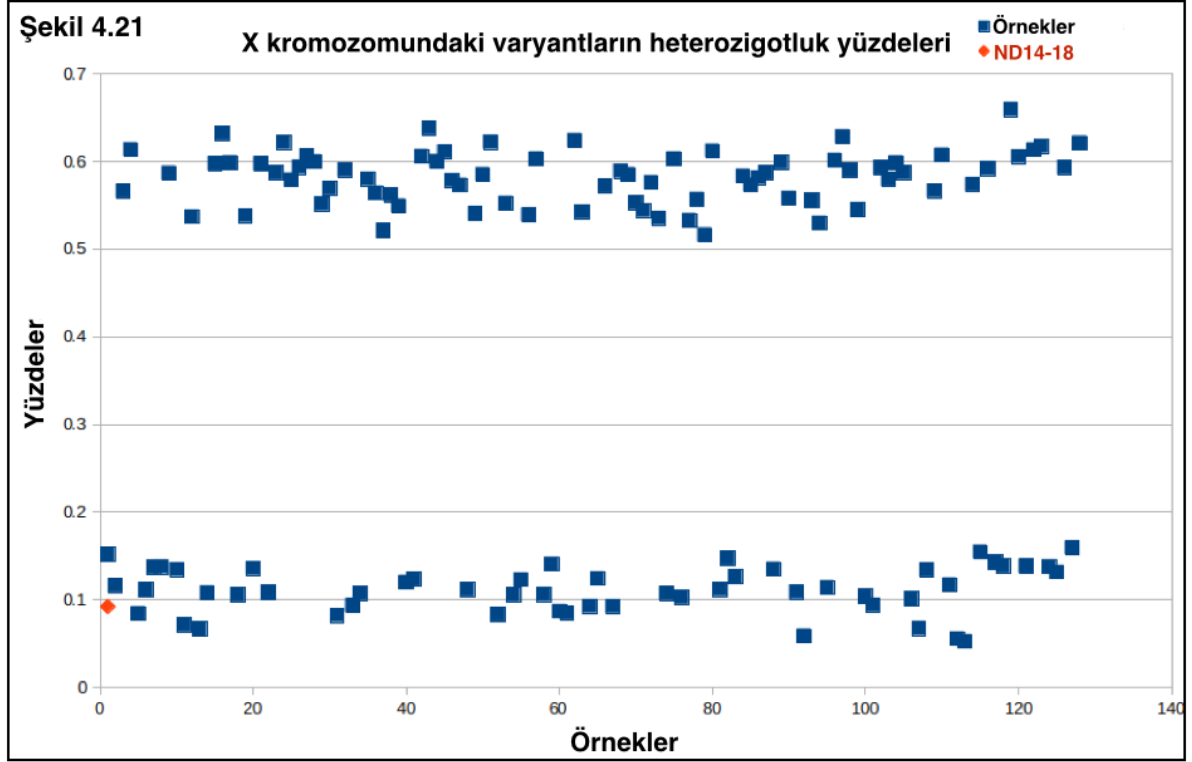
Şekil 4.19: ND14-18 kodlu bireyde *WDR45* genindeki mozaik mutasyonun IGV görüntüsü (Akçakaya ve ark. 2019)

Kandan DNA izolasyonu sonrasında yapılan ekzom dizilemede okumaların 3'te birinde saptanan *WDR45* (NM_007075.3) c.873C>G değişiminin IGV'de görünümü verilmiştir.



Şekil 4.20: *WDR45* genindeki (NM_007075.3) c.873C>G mutasyonun aile içinde kan ve tükürük örneklerinden elde edilen DNA'da Sanger dizileme ile araştırılması

Pedigrisi verilen ailede mutasyonun sadece hasta bireyin kanında mozaik olarak var olduğu görülmektedir (ok).



Şekil 4.21: Laboratuvarımızdaki toplam 129 bireye ait ekzom datasında kadın ve erkek bireylerde X kromozomuna ait heterozigotluk oranlarının dağılımı (Akçakaya ve ark. 2019)d

75 erkek ve 24 kadına ait ekzom datasında hastaların X kromozomal heterozigotluk oranları görülmektedir. Kadınlarda bu oran 0,5'in üzerinde görülürken, erkeklerde 0,2'nin altında izlenmektedir. ND14-18 kodlu birey kırmızı olarak gösterilmiştir ve heterozigotluk yüzdesi 0,09 olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmalar sonucu örneklerden elde edilen genetik sonuçlar Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmadaki örneklere ait çalışmaların ve sonuçların genel dökümü			
Hasta kodu	Yayımda hasta kodu	Yapılan çalışmalar	Sonuç
ND14-1	Olgu sunumu	Ekzom dizileme ve trio analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1466T>C]:p.[Leu489Pro] (Yeni heterozigot) ve c.[1583C>T]:p.[Thr528Met] (Heterozigot, rs137852967) (Yapıcı ve ark. 2016)
ND14-4	P09	<i>PANK2</i> dizi analizi ve ekzom trio dizileme analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1481T>G]:p.[Leu494Trp] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND14-10	P19-j	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[676G>A]:p.[val226Ile] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND14-11	P18-j	segregasyon ile mutasyon teyidi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[676G>A]:p.[val226Ile] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND14-15	-	<i>PANK2</i> ve <i>C19orf12</i> dizi analizi	-
ND14-17	-	SNP array ve <i>PANK2</i> dizi analizi	-
ND14-18	Yayımda kullanılan tek olgu	Ekzom dizileme ve segregasyon analizleri	<i>WDR45</i> (NM_007075) c.[873C>G]: p.[Tyr291*] (Yeni <i>de novo</i> mozaik) (Akçakaya ve ark. 2019).
ND14-27	-	<i>C19orf12</i> dizi analizi	-
ND14-34	-	<i>PLA2G6</i> ekzon 8 dizi analizi	<i>PLA2G6</i> (NM_003560) c.[1117G>A]:p.[Gly373Arg] (Homozigot, CM090235)
ND14-35	P20-k	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[800A>C]:p.[His267Pro] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND14-41	M5	<i>C19orf12</i> dizi analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[205G>A]: p.[Gly69Arg] (Homozigot) (yayın aşamasında)
ND14-53	P21-i	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[833G>T]:p.[Arg278Leu] (Homozigot, CM033423) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND14-58	M7	Ekzom dizileme analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[32C>T]:p.[Thr11Met] (Homozigot)
ND15-66	Olgu sunumu	Ekzom dizileme ve segregasyon analizleri	<i>HEXB</i> (NM_000521) c.1538T>C; p.Leu513Pro (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017b)
ND15-69	P01-a	Ekzom dizileme ve segregasyon analizleri	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[628+2T>G] (Homozigot-kırılma bölgesi) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-70	P04-c1	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[994C>T]:p.[Gln332*] (Homozigot, HM040132) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-72	P05-c2	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[994C>T]:p.[Gln332*] (Homozigot, HM040132) (Akçakaya ve ark. 2017a)

Tablo 4.1: Çalışmadaki örneklerle ait çalışmaların ve sonuçların genel dökümü			
Hasta kodu	Yayında hasta kodu	Yapılan çalışmalar	Sonuç
ND15-73	P06-c2	segregasyon ile mutasyon teyidi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[994C>T]:p.[Gln332*] (Homozigot, HM040132) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-81	-	<i>C19orf12</i> dizi analizi	-
ND15-82	P08-e	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1537-2A>G] (Yeni homozigot-kırılma bölgesi) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-83	-	Ekzom dizileme analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[32C>T]:p.[Thr11Met] (Homozigot)
ND15-84	-	Ekzom dizileme analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[32C>T]:p.[Thr11Met] (Homozigot)
ND15-91	P03-b	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[628+2T>G] (Homozigot-kırılma bölgesi) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-94	-	segregasyon ile mutasyon teyidi	<i>FBXO7</i> (NM_012179) c.[1492C>T]:p.[Arg498*] (Homozigot)
ND15-106	P10-g	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1660G]>A:p.[Glu554Lys] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-107	P11-g	segregasyon ile mutasyon teyidi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1660G]>A:p.[Glu554Lys] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND15-112	-	<i>C19orf12</i> dizi analizi	-
ND16-113	P07-d	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1325_1328delATAG]:p.[Asp442Alafs*7] (Homozigot, CD033552) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND16-114	-	<i>C19orf12</i> dizi analizi	-
ND16-118	P17-i	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[676G>AG>A]:p.[Val226Ile] (Yeni homozigot) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND16-124	M1	<i>C19orf12</i> dizi analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[194G>A]: p.[Gly65Glu] (Homozigot) (Yeni homozigot-klinik ile ilk kez ilişkili)
ND16-134	M2	<i>C19orf12</i> dizi analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[199_delG]: p.Ala67Leufs*6)
ND16-138	P14-h	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[655G>A]:p.[Gly219Ser] (Homozigot, CM107052) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND16-140	P15-h	segregasyon ile mutasyon teyidi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[655G>A]:p.[Gly219Ser] (Homozigot, CM107052) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND16-141	P16-h	segregasyon ile mutasyon teyidi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[655G>A]:p.[Gly219Ser] (Homozigot, CM107052) (Akçakaya ve ark. 2017a)
ND16-142	-	<i>C19orf12</i> dizi analizi	-

Tablo 4.1: Çalışmadaki örneklere ait çalışmaların ve sonuçların genel dökümü			
Hasta kodu	Yayında hasta kodu	Yapılan çalışmalar	Sonuç
ND16-153	M8	<i>C19orf12</i> dizi analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[c.424A>G]; p.[p.Lys142Glu] (Heterozigot) (yayın aşamasında)
ND16-154	-	<i>PANK2</i> dizi analizi	-
ND17-159	M3	<i>PANK2</i> ve <i>C19orf12</i> dizi analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[24G>C]; p.[Lys8Asn] (Yeni heterozigot),c.[c.204_214del]; p.[Gly69Argfs*10] (Heterozigot)
ND17-160	M4	<i>C19orf12</i> dizi analizi	<i>C19orf12</i> (NM_001031726) c.[24G>C]; p.[Lys8Asn] (Yeni heterozigot),c.[c.204_214del]; p.[Gly69Argfs*10] (Heterozigot)
ND17-164	-	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1537-2A>G] (Yeni homozigot-kırılma bölgesi)
ND17-168	-	<i>PANK2</i> dizi analizi	<i>PANK2</i> (NM_15363) c.[1133A>G];p.[Asp378Gly] (Heterozigot, CM056030) ve c.[1412G>A];p.[Ser471Asn] (Heterozigot, CM014245)
ND17-169	-	<i>PANK2</i> dizi analizi	-

Tablo 4.2’de *C19orf12* mutasyonu saptanan hastaların fenotipik bulguları özetlenmiştir.

Tablo 4.2: <i>C19orf12</i> mutasyonu saptanan hastaların başlıca fenotipik bulguları									
Hasta	ND16-124 YD	ND16-134 KT	ND17-159 BF	ND17-160 FF	ND14-41 UG	ND16-153 AH	ND14-58 MK	ND15-83	ND15-4
Cinsiyet	kadın	erkek	erkek	kadın	erkek	erkek	kadın	erkek	erkek
akrabalık	var	var	yok	yok	var	var	var	var	var
Başlangıç yaşı	9	9	12	12	9	27	22	36	35

Tablo 4.2: C19orf12 mutasyonu saptanan hastaların başlıca fenotipik bulguları

Hasta	ND16-124 YD	ND16-134 KT	ND17-159 BF	ND17-160 FF	ND14-41 UG	ND16-153 AH	ND14-58 MK	ND15-83	ND15-4
Başlangıç semptomları	Alt ekstremitelerde spastisite ve distoni	uyuklama ve kognitif yıkım	Alt ekstremitelerde spastisite ve distoni, dengesizlik	Alt ekstremitelerde spastisite ve distoni, dengesizlik	Alt ekstremitelerde spastisite	Alt ekstremitelerde spastisite ve distoni, dengesizlik ve nöbetler	Psikoz, rijidite, tremor ve dizartri	Psikoz, parkinsonizm	Psikoz, parkinsonizm
Piramidal bulgular	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Distoni	++	++	+++	++	-	+++	+	+	+
Parkinsonizm	+	+	+	+	-	++	+++	++	++
Optik atrofi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nöropati	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Psikiyatrik semptomlar	-	-	-	-	-	-	Halüsinasyon insomni ve küfür etme	Halüsinasyon	Halüsinasyon
Kognitif tutulum	+	+++	+++	+++	+	-	+++	++	++
Gelişim geriliği	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Yatağa bağımlılık yaşı	16	15	16	16	19	28	26	37	36
MR bulguları	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi ve global atrofi	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi ve global atrofi (medial çizgilenme)	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi ve global atrofi (medial çizgilenme)	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi (medial çizgilenme)	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi (medial çizgilenme)	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi ve global atrofi (medial çizgilenme)	Globus pallidus ve substantia nigra da esit düzeyde demir birikimi ve global atrofi (medial çizgilenme)
Mutasyonlar	c.194G>A; c.194G>A	c.199_de IG; c.199_de IG (novel)	c.204_21 4del; c.24G>C (novel)	c.204_21 4del; c.24G>C (novel)	c.205G>A; c.205G>A	c.424A>G;-	c.32C>T; c.32C>T	c.32C>T; c.32C>T	c.32C>T; c.32C>T

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez geniş bir NBIA hasta grubu çalışılmıştır. Hasta grubumuz mümkün olduğu kadar klinik olarak sınıflandırılarak hedef genler tespit edilmeye çalışılmıştır. Hedef genlerde mutasyon tespiti yüksek oranda gerçekleşmiştir. Ülkemizde özellikle akraba evliliğinin görece yüksek bir oranda görülmesi nedeniyle hasta grubumuzda sıkça homozigot varyantlara ulaşılmıştır. Bu durum mutasyon bazında fenotip genotip ilişkilendirilmesi açısından avantaj sağlamıştır. Yeni nesil dizileme ise her ne kadar analiz süreci ve varyantların yorumlanması çok zor bir süreç olsa da klinik açıdan geniş bir bakış açısı sunmaktadır. Aşağıda hasta grubumuzda tespit edilen genetik patolojiler gruplanarak sırayla tartışılacak ve yeni nesil dizilemenin getirileri vurgulanacaktır. Nörolojik fenotiplerin ayrıntıları ise genetik bulgularla anlamlandırılabilirdiği sürece anlatılacaktır.

5.1. *PANK2* Geninde Mutasyon Saptanan Örnekler

17 farklı aileden toplam 21 hastada *PANK2* gen mutasyonu tespit edilmiştir. En sık, hastaların yaklaşık yarısında, izlenen alt tip olarak PKAN bizim grubumuzda da bu oranda görülmüştür (Zhou ve ark. 2001). Bu grupta en önemli özellik klinik olarak diğer NBIA alt gruplarına göre kolay tanılabilmesidir. Bu hastalıkta distoni baskın bir tutulum vardır. Distoni oromandibular bölge başta olmak üzere tüm vücudu etkiler (Yapıcı ve ark. 2016; Akçakaya ve ark. 2017a). Atipik PKAN’larda başlangıçta psikiyatrik bulgular, ses kısıklı, denge bozuklukları baskın olabilsede hastalık ilerledikçe distoni baskın bir tutulum karşımıza çıkar (Akçakaya ve ark. 2017a). Özellikle “kaplan gözü” olarak adlandırılan globus pallidustaki dejenerasyonun oluşturduğu görüntü radyolojik olarak en önemli ipucudur. Serimizde MR kesitlerinde “kaplan gözü” görünümü izlenen ND16-154 ve ND17-169 kodlu hastalar hariç tümünde bu tanı genetik olarak doğrulanmıştır. Özellikle ND16-154 kodlu hastada ekzonik bölge dışında *PANK2* genini etkileyen mutasyon, benzer fenotipe yol açan yeni bir gene ait mutasyon ya da genetik patolojiye sahip olma olasılığı vardır. Bazı hastalarda klinik fenotip olarak MPAN düşünülmesine rağmen “kaplan gözü” ile karışabilecek yoğunlukta globus pallidustaki medial çizgilenme nedeniyle ya da başka NBIA alt tipi öngörüsüne rağmen

mutasyon saptanmayan olgularda en sık genotipi taramak amacıyla *PANK2* geni taranan hastalarımız (ND14-15, ND17-159, ND17-160) olmuştur. Bu tartışmaları ortadan kaldırmak amacıyla yapılmıştır ve bu nedenlerle *PANK2* taranmış olan hiçbir hastaya genetik tanı açısından katkı sağlamamıştır. Dolayısıyla NBIA alt grubunu ön görmeden hastaları taramaya yönlendirmek dizileme maliyeti açısından uygun değildir.

PANK2 geninde tespit edilen mutasyonlar üç hasta dışında homozigot değişimler olarak bulunmuştur. Bu durum coğrafyamızdaki akraba evliliğinin bir yansımasıdır ve literatürdeki diğer serilerden ayırmaktadır. Ayrıca bu gende ilk kez bu çalışma ile ortaya konan hastalıkla ilişkili 6 yeni varyant, değişik etnik grupların sahip olduğu varyasyonların farklılığının bir sonucudur. Çalışma sonucunda *PANK2* genine ait patojenik yeni varyantlardan tümünün aile içinde hastalığı açıklayacak şekilde kalıtıldıkları, düşük toplum sıklığına sahip olduğu ve korunmuş bölgelerde yer aldıkları gösterilmiştir (Akçakaya ve ark. 2017a ve Yapıcı ve ark. 2016). *PANK2* hücrede dimerik bir protein olarak bulunur (Kotzbauer ve ark. 2005). Dimerik bir proteini kodlayan gendeki birleşik heterozigot varyantlar, teorik olarak proteinde 3 farklı varyant proteine yol açar. Dolayısıyla fenotipik etkisini tahmin etmek de zorlaşır.

Hasta grubumuzda klasik ve atipik PKAN ayrımı açısından mutasyon dağılımına bakıldığında, proteinin erken sonlanmasına ya da protein oluşumuna engel olan mutasyonların erken başlangıçlı ve hızlı progresyonla seyreden klasik tipe yol açtığı saptanmıştır (Akçakaya ve ark. 2017a). Bunlar anlamsız ve dur kodonu oluşumuna yol açan mutasyonlar ile küçük indel'ler ve kırılma bölgesi mutasyonlarıdır. Bunun dışındaki mutasyonlarda belirgin bir fenotip ilişkisi izlenmemiştir. Bu durum enzimatik aktivite açısından da araştırılmış ancak net bir ilişki bulunamamıştır (Hartig ve ark. 2006).

Yanlış anlamlı mutasyonların ise genel olarak atipik seyirli PKAN fenotipine yol açtığı izlenmiştir (Akçakaya ve ark. 2017a). Aynı homozigot mutasyona sahip kardeşler arasında bile hastalık seyrinin çok farklı olabileceği gözlenmiştir. Hem başlangıç yaşı ve progresyon hızı, hem de baskın semptomun değiştiği izlenmiştir (Akçakaya ve ark.2017a). Bu durum diğer genlerdeki varyasyonların etkisi olabileceği gibi, mitokondride görevli bir enzim olan *PANK2*'yi etkileyecek başka genetik ve epigenetik faktörlere bağlı olabilir.

5.2. C19orf12 Geninde Mutasyon Saptanan Örnekler

NBIA'nın üçüncü sık alt tipi MPAN'dır (Hartig ve ark. 2011). Serimizde 9 hastada mutasyon saptanarak sık izlenen ikinci alt tip olmuştur. Hasta grubumuzda ikinci sıklıkla MPAN izlenmesinin sebebi bebek yaş grubundan az hasta olmasıdır. Patojenik varyantlar iki aile dışında homozigot durumda bulunmuştur. Bu çalışmada MPAN ile ilgili yeni varyantlar; c.24G>C ve c.205G>A'dır ve bunların tümü ailede hastalıkla ilişkili bir kalıtımla birlikte gözlenmiştir.

NBIA alt tipinin belirlenmesi klinik ve genetik heterojenite nedeniyle zor olabilir. MPAN'ın başlıca klinik özellikleri spastisite, distoni, periferik nöropati ve demanstır. MPAN'ın öne çıkan klinik özelliklerine bağlı olarak ciddi periferik motor aksonal nöropati veya amiyotrofik lateral skleroz taklit eden hastalar gibi büyük bir değişkenlik gösterebilir (Hartig ve ark. 2011, Schottmann ve ark. 2014, Deschauer ve ark. 2012).

MPAN'da başlangıç yaşı çok değişkendir; 3 ile 36 yaş arasında değişir (Olgıati ve ark. 2016, Deschauer ve ark. 2012). MPAN'da hastalığın progresyon hızı açık bir şekilde tanımlanmamıştır ancak erişkin başlangıçlı olgular yıllar içinde ölümle sonuçlanan agresif bir ilerleme gösterebilir (Dogu ve ark. 2013; Hogarth ve ark., 2013; Olgıati ve ark. 2016). İlerleme hem motor kötüleşmeyi hem de kognitif yıkımı içerir. c.32C>T mutasyonu erişkin başlangıçlı MPAN'da en sık görülen değişimdir. Yetişkin başlangıçlı üç hastadaki varyantlar c.32C>T ve c.424A>G idi. Farklı bir merkezde daha çalışılarak yayınlanan ND15-83 ve ND15-84 kodlu kardeşler literatürde en geç başlangıçlı hastalardır (Olgıati ve ark. 2016). Bu kardeşleri dışlayarak baktığımızda serimizdeki başlangıç yaşı 9 ile 27 arasında değişmektedir. Başlangıç yaşı 15.1 ± 6 idi. Serimizde 18 yaşından önce başlayan hastalar yoğunluktadır (5/7).

Başlangıç yaşı açısından hasta grubumuzda gözlenen gruplaşmanın mutasyonların etkisini araştırmak için kullanılan *in silico* tahmin çalışması ile kırılma bölgesine etkisine bağlı olabileceğini göstermiştir. Erken başlangıçlı olarak adlandırılabilir 9-12 yaş grubu başlangıçlı gösteren hastalarda tespit edilen mutasyonlar c.24G>C, c.194G>A ve c.205G>A'dır bunların proteinin erken sonlanmasına ya da "nonsense mediated decay" mekanizması ile proteinin degrade olmasına yol açması muhtemeldir.

Hastalıkta ilk belirtiler hareket ve davranış bozuklukları, kognitif tutulum, optik atrofi, motor aksonal nöropati ve idrar inkontinansdır (Hogarth ve ark. 2012). Yürüyüş sorunları ve alt ekstremitelerde spastisite çoğunlukla MPAN'ın erken belirtileridir. Erken başlangıçlı MPAN'da distoni ve spastisite en sık görülen motor semptomlardır. NBIA'lı hastalarda, özellikle alt ekstremitelerde spastisite ve distoni MPAN için önemli bir ipucudur. Serimizde de en belirgin klinik tablo alt ekstremitelerde başlangıçlı spastisite baskın distoniydi (5/7). ND14-41 kodlu hasta dışında tüm hastalarda distoni vardı.

ND14-41 kodlu hasta bu seri içinde önemli bir yere sahiptir. NBIA grubunda allelik heterojenite yaygındır ve MPAN'da da bilinmektedir. MPAN ve herediter spastik paraparezi (HSP) *C19orf12* mutasyonlarında bilinen iki ayrı klinik tablodur. Landouré ve arkadaşları HSP fenotipinde ve beyin demir birikimi olmayan hastalarda *C19orf12* mutasyonu bildirmişlerdir (Landouré ve ark. 2013). ND14-41 kodlu hasta ekstrapiramidal bulgu olmadan yavaş ilerleyen spastik parapareziden muzdaripti. Hafif zihinsel yetmezlik ve optik atrofi vardı. EMG'de ileti çalışmaları normaldi. Ancak iğne EMG'de birinci motor nöron bulguları vardı. Hastanın klinik tablosu komplike HSP ile uyumluydu. Bu hasta beyin MR görüntülerinde MPAN ile uyumlu tipik demir birikimi bulguları nedeniyle çalışıldı ve c.205G>A mutasyonu tespit edildi. Bu hasta fenotipik olarak HSP ve MPAN'ın bir karmasıdır.

Çocukluk ve adolesan başlangıçlı hastalıkta distoni ve piramidal semptomlar daha sık görülen motor semptomlardı. Ancak erişkin başlangıçlı hastalarda psikiyatrik belirtiler ve parkinsonizm başlıca özelliklerdir (Hogarth ve ark. 2012; Olgıati ve ark. 2017). Tablo 4.2'de belirtildiği gibi serimizde de benzer klinik özellikler gözlemlendi. Optik atrofi, EEG bozukluğu ve periferik duyuşal motor aksonal nöropati diğer klinik bulgular olarak görülmektedir. Tüm hastalarda optik atrofi saptanmasına rağmen görme şikayeti olan hasta yoktu.

MPAN'da beyin MRG'sindeki demir birikimi bulgularının yanı sıra, serebral ve serebellar atrofi hastalığın geç dönemlerinde ortaya çıkabilir. Nadiren "kaplan gözü" bulgusu bazı olgularda bildirilmiştir (Hogarth ve ark. 2012; Skowronska ve ark. 2015). T2-ağırlıklı kesitlerde globus pallidusun anteromedial alanında izlenen hiperintensite "kaplan gözü" işareti olarak adlandırılır. Bu bulgu bahsedildiği gibi PKAN için tipiktir (Hartig ve ark. 2011; Akçakaya ve ark. 2017a). Tüm hastalarımızda globus pallidus ve substantia nigra demir birikimini vardı. Bunlardan dördünde ek olarak medial

medüller laminada hiperintens çizgiler vardı. Bu radyolojik özellik belirli bir klinikte tutulum ya da mutasyonla birlikte gözlenmedi. ND17-160 kodlu hastada globus pallidusun medial çizgisi oldukça belirgin ve “kaplan gözü”ne benzemektedir (Şekil 4.7-d). Bu nedenle yapılan *PANK2* taraması ise negatif sonuçlandı. MPAN’da PKAN’dan farklı olarak atrofi izlenebilir (Hartig ve ark. 2011). Serimizde altı hastada global beyin atrofi mevcuttu. Bilişsel gerileme olan tüm hastalarda atrofi gözlemlendi. Atrofi gözlenen hastalarda c.204_214del; c.24G>C ve c.199_delG mutasyonları vardı.

C19orf12, 3 ekzon içeren küçük bir gen ve protein kodlayan 3 transkriptte sahiptir. NM_001031726 transkriptinin kodlama bölgesi üzerindeki mutasyonlar, hastalığa neden olarak rapor edilmektedir (Hartig ve ark. 2011). PolyPhen tarafından tahmin edilen hafif etkime rağmen c.424A>G varyasyonunu hastalıkla ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Hartig ve ark. 2011; Tschentscher ve ark. 2015). Serimizde c.24G>C ve c.424A>G varyantlar *in silico* öngörülerinde patojenik olmamasına rağmen MPAN fenotipi ile uyumlu olarak gözlenmiştir. Her iki varyant birleşik heterozigot olarak hastalarda mevcuttu. Bu varyantları taşıyan hastalardan ND17-159 32 yaşında ve ND166-153 kodlu hasta 27 yaşında hastalık bulgularının ilerlemesi nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Görüldüğü gibi *in silico* tahminler *C19orf12* proteini için yeterince hassas değildir. *C19orf12*'nin esansiyel lipidlerin transferinden sorumlu olan mitokondride ve endoplazmik retikulumda yerleşen bir membran proteindir. Kalsiyum ve magnezyum metabolizmasında, otofagozom oluşumunda görev aldığı bilinmektedir (Landouere ve ark. 2013). Bu küçük proteindeki *in silico* tahmin problemleri nöral dokuda yağlı asidi metabolizmasının bilinmeyen noktalarına işaret etmektedir.

5.3. Saptanan Diğer Mutasyonlar ve Ekzom Dizileme

5.3.1. *FBXO7* Mutasyonu Tespit Edilen Hasta

FBXO7 mutasyonları NBIA alt grubunda yer almamaktadır. Hastamız kuzenlerindeki klinik ile aynı seyri göstermesi nedeniyle bu gene odaklanılmış ve kuzenlerindeki mutasyon bulunmuştur. Ancak radyolojik olarak hastamız demir birikimi ile seyretmektedir. Hafif düzeyde zihinsel yetmezlik olan hastada adölesan çağda başlayan parkinsonizm ve psikiyatrik hastalık tablosu yıllar içinde ilerlemiştir. Piramidal tutulumu yoktu. L-dopa tedavisi hareket bozukluğunu iyileştirmekle birlikte psikiyatrik tablosunu kötüleştirdiği için kullanılamıyordu. *FBXO7* gen patolojilerinde demir birikimi olabileceği literatürde henüz yer almamaktadır. Bu hastamızda ki

kısıtlılığımız ekzom dizileme gibi bir yöntem ile demir birikimi ile ilgili bilinen genlerin ve başka patolojilerin elenmemiş olmasıdır. Kuzenlerinde aynı klinik tabloya yol açabilecek *PLA2G6* geni de taranmış ve mutasyon saptanmamıştı (Yalcın-Cakmaklı ve ark. 2004).

5.3.2. *WDR45* Mutasyonu Tespit Edilen Hasta

BPAN X'e-bağlı dominant kalıtılır. Oldukça nadir görülen bir NBIA alt tipidir. *WDR45*'deki mutasyonlar erkeklerde muhtemelen ölümcül olmasından dolayı neredeyse sadece kadınlarda görülür (Haack ve ark. 2012). Bugüne kadar *WDR45* mutasyonu sadece 11 erkek hasta da bildirilmiştir. (Abidi ve ark. 2016; Haack ve ark. 2012; Nakasima ve ark. 2016; Redon ve ark. 2017; Spiegel ve ark. 2016; Takano ve ark. 2017; Zarate ve ark. 2016).

34 yaşında erkek hastamızın klinik ve radyolojik özellikleri klasik BPAN ile uyumluydu. Ekzom dizilemede mozaik yeni mutasyon tespit edildi. X kromozomu üzerinde bulunan *WDR45* geninin mozaikliğinin sitogenetik bir patolojiye bağlı olmadığı ve *de novo* gerçekleştiği gösterildi. Bu noktadan sonra X kromozomu üzerinde heterozigot varyantlara odaklanılmıştır. Ekzom dizilemede özellikle erkek bireylerde olması beklenmeyen heterozigot varyantların belli bir sınır içinde olması ekzom dizilemenin kalitesini ya da bireye ait X kromozomuna ait sitogenetik patolojilerin kontrolü için kullanılabileceğini akla getirmiştir. Bu amaçla kadın ve erkekler için ekzom dizilemede laboratuvarımız için sınır değerler belirlenmiştir. Hastadaki varyantın ise X kromozom anormalliği nedeniyle değil mozaik olduğu bir kez daha gösterilmiştir.

BPAN kadınlarda erkeklere oranla daha sık gözlenen bir hastalıktır. Bunun nedeni X dominant hastalığın erkeklerde ölümcül etkiye sahip olması ve kadınlarda ise X inaktivasyonu nedeniyle patojen etkinin kısmen azalması olarak açıklanmıştır. Ancak yaşayan erkeklerde de hemizigot mutasyon taşıyıcıları bildirilmiştir (Nakashima ve ark. 2016; Zarate ve ark.2016). İnfantil epileptik ensefalopati gibi erken başlangıçlı ve fenotipik tutulumun ağır olduğu olguların erkek olduğu bilinmekle birlikte bunun genetik sebebini ortaya koymak güçtür. Özellikle mozaik olgularda mozaisizmin nöral dokuda hangi oranda bulunduğunu tespit etmek mümkün olmadığı için bu fenotipin klinik etkisini anlamak mümkün değildir (Akçakaya ve ark. 2019).

5.3.3. *HEXB* Mutasyonu Tespit Edilen hasta

Bu hasta temelde klinik olarak tanılamamış bir hastadır. Bulgular yanlış yorumlanarak demir birikimi olduğu düşünülmüş ve ekzom dizilemeye yönlendirilmiştir. Sonuç olarak bu hasta “revers phenotyping” olarak adlandırılan bir şekilde tanılanmıştır. Bu terim günümüzde yeni nesil dizileme ile klinik olarak tanılanamayan hastalarda genetik olarak bilinen genlerde fenotipi açıklayacak bir varyantın tespit edilmesi ile tanılama sürecine verilen addır (Schulze ve McMahon 2004).

HEXB mutasyonunun sebep olduğu Sandhoff hastalığı ak madde tutulumunun basal gangliyalarda görece bir hipodansite yaratması nedeniyle demir birikimi grubu ile ayırıcı tanıya girmesine neden olmaktadır. Sandhoff hastalığı nadir ve otozomal resessif bozukluktur. Genetik testler rutin olarak yapılmaz. Tanı için şüphe halinde enzimatik tanısal testler yapılır. Hastamızda da izlenen bitalamik hipointensite (Şekil 4.14) Sandhoff hastalığının iyi bilinen bir özelliğidir ve bu özellik MR ile ayırıcı tanıda çok yardımcıdır (Autti ve ark. 2007). Hastamızda bu bilgiler çerçevesinde ayırıcı tanıya giren hastalıkların tartışıldığı bir yazı ile literatüre kazandırılmıştır (Akçakaya ve ark. 2017b).

5.4. Sonuç ve Öneriler

Çalışmaya alınan 43 hastanın ön tanıları doğrultusunda gerçekleştirilen analizlerde 9 hastada mutasyon saptanmamıştır. Bu 9 hastanın ikisinde (ND14-17 ve ND14-27) sekonder demir birikimi düşünüldüğü için, diğer 7'sinde (ND14-15, ND15-81, ND15-112, ND16-114, ND14-142, ND16-154, ND17-169) demir birikimi ile ilgili bir fenotip öngörüsü olmasına rağmen ise bütçe kısıtlılığı nedeniyle araştırmalar derinleştirilmemiştir. Bu 7 hastadan ND14-15 ve ND17-169 dışında tümünde akraba evliliği de olduğu göz önüne alındığında henüz tespit edilememiş homozigot varyantların olduğu ve ekzom dizileme ile daha ayrıntılı incelenmesi gerektiği sonucu çıkmaktadır. Bu hastaların yanı sıra *FBXO7* mutasyonlu hasta da demir birikiminin araştırılması için benzer şekilde ekzom dizileme ile incelenmeli ve literatüre kazandırılmalıdır.

Ekzom dizileme tek gen hastalıklarında tüm kalıtım tiplerinde üstün bir analiz imkanı sağlamaktadır. Nörolojik birçok fenotipin adlandırılması ve anlaşılmasında önemli bir yöntemdir. Yüksek çıktılı bu yöntem sadece bireye ait varyantların analizinde değil aynı zamanda sitogenetik patolojilerin araştırmasında da fikir verebilir.



KAYNAKLAR

Abidi A, Mignon-Ravix C, Cacciagli P, Girard N, Milh M, Villard L. Early-onset epileptic encephalopathy as the initial clinical presentation of WDR45 deletion in a male patient. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(4):615-8.

Akcakaya NH, Iseri SU, Bilir B, et al. Clinical and genetic features of PKAN patients in a tertiary centre in Turkey. *Clin Neurol Neurosurg.* 2017a;154:34–42.

Akcakaya NH, Özdemir Ö, Gökçay FG, Iseri SAU, Yapıcı Z. Differential Diagnosis of Bithalamic and Pallidal Hypointensity – a Case of HEXB Mutation. *Cesk Slov Neurol N* 2017b; 80/ 113(3): 343– 345.

Akcakaya NH, Ozdemir O, Iseri SAU, Yapici Z. Differential Diagnosis of Bithalamic and Pallidal Hypointensity – a Case of HEXB Mutation *Cesk Slov Neurol N* 2017b; 80/ 113(3): 343– 345

Akcakaya NH, Salman B, Görmez Z, Tarkan Argüden Y, Cırakoğlu A, Çakmur R,

Dönmez Çolakoğlu B, Hacıhanefioğlu S, Özbek U, Yapıcı Z, Uğur İşeri SA. A Novel and Mosaic WDR45 Nonsense Variant Causes Beta-Propeller Protein- Associated Neurodegeneration Identified Through Whole Exome Sequencing and X chromosome Heterozygosity Analysis. *Neuromol Med* 2019: Mar;21(1):54-59.

Alazami AM, Al-Saif A, Al-Semari A, Bohlega S, Zlitni S, Alzahrani F, Bavi P, Kaya N, Colak D, Khalak H, Baltus A, Peterlin B, Danda S, Bhatia KP, Schneider SA, Sakati N, Walsh CA, Al-Mohanna F, Meyer B, Alkuraya FS. Mutations in C2orf37, encoding a

nucleolar protein, cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83:684–91.

Autti T, Joensuu R, Aberg L. Decreased T2 signal in the thalami may be a sign of lysosomal storage disease. *Neuroradiology* 2007;49(7):571– 8.

Carecchio M, Picillo M, Valletta L, Elia AE, Haack TB, Cozzolino A, Vitale A, Garavaglia B, Luso A, Bagella CF, Pappatà S, Barone P, Prokisch H, Romito L, Tiranti V. Rare causes of early-onset dystonia-parkinsonism with cognitive impairment: a de novo *PSEN-1* mutation. *Neurogenetics* 2017;18: 175.

Yalcin-Cakmakli G, Olgiati S, Quadri M, Breedveld GJ, Cortelli P, Bonifati V, Elibol B. A new Turkish family with homozygous *FBXO7* truncating mutation and juvenile atypical parkinsonism. *Parkinsonism and Related Disorders* 2014; 20:1248e1252.

Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloğlu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106(45):19096-101.

Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCF tools. *Bioinformatics*. 2011;27:2156–8.

Dard R, Meyniel C, Touitou V, Stevanin G, Lamari F, Durr A, Ewenczyk C, Mochel F. Mutations in *DDHD1*, encoding a phospholipase A1, is a novel cause of retinopathy and neurodegeneration with brain iron accumulation. *Eur J Med Genet*. 2017 Dec;60(12):639-642.

Delgado RF, Sanchez PR, Speckter H, Then EP, Jiminez R, Oviedo J, et al. Missense PANK2 mutation without “eye of the tiger” sign: MR findings in a large group of patients with pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN) *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2012;35:788–794.

Deschauer M, Gaul C, Behrmann C, Prokisch H, Zierz S, Haack TB. C19orf12 mutations in neurodegeneration with brain iron accumulation mimicking juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2012;259:2434–9.

Drecourt A, Babdor JI, Dussiot M, Petit F, Goudin N, Garfa-Traoré M, Habarou F, Bole-Feysot C, Nitschké P, Ottolenghi C, Metodiev MD, Serre V, Desguerre I, Boddaert N, Hermine O, Munnich A, Rötig A. Impaired Transferrin Receptor Palmitoylation and Recycling in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *Am J Hum Genet* 2018; 102, 266–277.

Dogu O, Krebs CE, Kaleagasi H et al. Rapid disease progression in adult-onset mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration. *Clin Genet* 2013;84: 350–355.

Dusek P, Schneider SA. Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Curr Opin Neurol* 2012, 25:499–506.

Gregory A, Hayflick SJ. Pantothenate kinase-associated neurodegeneration. In: RA Pagon, MP Adam, HH Ardinger et al. (Eds.), *GeneReviews* (R). University of Washington, (2002) (updated 2013) Seattle, Seattle, WA

Haack TB, Hogarth P, Kruer MC, Gregory A, Wieland T, Schwarzmayr T, Graf E, Sanford L, Meyer E, Kara E, et al. Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am J Hum Genet.* 2012;91: 1144

Hayflick SJ, Westaway SK, Levinson B et al. Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden- Spatz syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 33–40.

Hayflick SJ, Hartman M, Coryell J et al. Brain MRI in neurodegeneration with brain iron accumulation with and without PANK2 mutations. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:1230–1233.

Hayflick SJ, Kruer MC, Gregory A Haack TB, Kurian MA, Houlden HH, Anderson J, Boddaert N, Sanford L, Harik SI, Dandu VH, Nardocci N, Zorzi G, Dunaway T, Tarnopolsky M, Skinner S, Holden KR, Frucht S, Hanspal E, Schrandt-Stumpel C, Mignot C, Héron D, Saunders DE, Kaminska M, Lin JP, Lascelles K, Cuno SM, Meyer E, Garavaglia B, Bhatia K, Silva R, Crisp S, Lunt P, Carey M, Hardy J, Meitinger T, Prokisch H, Hogarth P. Beta-Propeller protein-associated neurodegeneration: a new X-linked dominant disorder with brain iron accumulation. *Brain* 2013;136: 1708–1717.

Hayflick SJ, Kurian MA, Hogarth P. Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Handbook of Clinical Neurology, Neurogenetics, Part I, Vol. 147 (3rd series)* 2018; 293-305.

Hartig MB, Hortnagel K, Garavaglia B, Zorzi G, Kmiec T, Klopstock T. Genotypic and phenotypic spectrum of PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation, *Ann. Neurol.* 2006;59:248–256.

Hartig MB, Luso A, Haack T et al. Absence of an orphan mitochondrial protein, C19orf12, causes a distinct clinical subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Am J Hum Genet* 2011;89: 543–550.

Hogarth P, Gregory A, Kruer MC et al. New NBIA subtype: genetic, clinical, pathologic, and radiographic features of MPAN. *Neurology* 2013;80: 268–275.

Horvath R, Holinski-Feder E, Neeve VC et al. A new phenotype of brain iron accumulation with dystonia, optic atrophy, and peripheral neuropathy. *Mov Disord* 2012; 27: 789–793.

Iseri SAU. Kopya sayısı değişikliklerinin SNP array ile tespiti. 2016 Türkiye klinikleri-2. Ulusal Çocuk Genetik Sempozyumu Özel sayısı.

Jaberi E, Rohani M, Shahidi G A, Nafissi S, Arefian E, Soleimani M, Rasooli P, Ahmadi H, Daftarian N, KaramiNejadRanjbar M, Klotzle B, Fan J-B, Turk C, Steemers F, Elahi E. Identification of mutation in GTPBP2 in patients of a family with neurodegeneration accompanied by iron deposition in the brain. *Neurobiol. Aging* 2016, 38: 216.e11-216.e18.

Kondziella D. Thirty neurological eponyms associated with the Nazi era. *Eur Neurol* 2009;62: 56–64.

Kruer MC, Boddaert N. Neurodegeneration with brain iron accumulation: A diagnostic algorithm. *Seminars in Pediatric Neurology*, 2012;19, 67–74.

Kruer MC, Boddaert N, Schneider SA, Houlden H, Bhatia KP, Gregory A, Anderson JC, Rooney WD, Hogarth P, Hayflick SJ. Neuroimaging Features of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *Am. J. Neuroradiol.* 2012; 33, 407–14.

Kotzbauer PT, Truax AC, Trojanowski JQ, Lee VM. Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2, *J. Neurosci.* 2005; 25:689–698.

Landouere G, Zhu PP, Lourenco CM et al. Hereditary spastic paraplegia type 43 (SPG43) is caused by mutation in C19orf12. *Hum Mutat* 2013;34: 1357–1360.

Leonardi R, Rock CO, Jackowski S et al. Activation of human mitochondrial pantothenate kinase 2 by palmitoylcarnitine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1494–1499.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25:1754–60.

Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26:589–95.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;15;25(14):1754-60.

McCarroll SA et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat. Genet.* 2008;40(10):307-12.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing nextgeneration DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20:1297–303.

McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016;6;17(1):122.

Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. "A glimpse into past, present, and future DNA sequencing". *Molecular Genetics and Metabolism.* 2013;110 (1–2): 3–24.

Nakashima M, Takano K, Tsuyusaki Y, Yoshitomi S, Shimono M, Aoki Y, Kato M, Aida N, Mizuguchi, T, Miyatake S. et al. WDR45 mutations in three male patients with West syndrome. *J Hum Genet.* 2016;61(7):653-61.

Ng SB. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature,* 2009;461(7261):272-6.

Olgiati S, Doğu O, Tufekcioglu Z, Diler Y, Saka E, Gultekin M, Kaleagasi H, Kuipers D, Graafland J, Breedveld GJ, Quadri M, Sürmeli R, Sünter G, Doğan T, Yalçın AD, Bilgiç B, Elibol B, Emre M, Hanagasi HA, Bonifati V, The p.Thr11Met mutation in C19orf12 is frequent among adult Turkish patients with MPAN, Parkinsonism and Related Disorders (2017).

Paisán-Ruiz C, Guevara R, Federoff M, Hanagasi H, Sina F, Elahi E, Schneider SA, Schwingenschuh P, Bajaj N, Emre M, Singleton AB, Hardy J, Bhatia KP, Brandner S,

Lees AJ, Houldenn H. Early-Onset L-dopa-Responsive Parkinsonism with Pyramidal Signs Due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and Spatacsin Mutations. *Mov Disord*. 2010 September 15; 25(12): 1791–1800.

Redon S, Benech C, Schutz S, Despres A, Gueguen P, Le Berre P, Le Marechal C, Peudener S, Meriot P, Parent P et al. Intragenic deletion of the WDR45 gene in a male with encephalopathy, severe psychomotor disability, and epilepsy. *Am J Med Genet Part A*. 2017;9999:1–3.

Robinson JT et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-26.

Roubertie A, Hieu N, Roux JC, Leboucq N, Manes G, Charif M, Echenne B, Goizet C, Guissart C, Meyer P, Marelli C, Rivier F, Burglen L, Horvath R, Hamel CP, MD, Lenaers G. AP4 deficiency; A novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation? *Neurol Genet* 2018;4:e217.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1977;74 (12): 5463–7.

Saito H, Nishimura T, Muramatsu K et al. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 2013;45 (445–9): 449e1.

Schneider SA, Hardy J, Bhatia KP. Syndromes of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA): an update on clinical presentations, histological and genetic underpinnings, and treatment considerations. *Mov Disord* 2012; 27: 42–53.

Schottmann G, Stenzel W, Lutzkendorf S, Schuelke M, Knierim E. A novel frameshift mutation of C19ORF12 causes NBIA4 with cerebellar atrophy and manifests with severe peripheral motor axonal neuropathy. *Clin Genet* 2014;85:290-292.

Schulze TG ve McMahon FJ. Defining the Phenotype in Human Genetic Studies: Forward Genetics and Reverse Phenotyping. *Hum Hered* 2004;58:131–138.

Sethi KD, Adams RJ, Loring DW, Gammal TE. Hallervorden- Spatz syndrome: clinical and magnetic resonance imaging correlations. *Ann Neurol* 1988;24: 692–694.

Shevell M. Racial hygiene, active euthanasia, and Julius Hallervorden. *Neurology* 1992;42: 2214–2219.

Shevell M. The declining use of the Hallervorden-Spatz eponym. *J Child Neurol* 2012;27: 1308–1309.

Skowronska, M., Kmiec, T., Kurkowska-Jastrzębska, I., & Czlonkowska, A. (2015). Eye of the tiger sign in a 23 year patient with mitochondrial membrane protein associated neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 352, 110–111.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986;321 (6071): 674–9.

Spiegel R, Shalev S, Bercovich D, Khayat M, Shaag A, Elpeleg O. Severe infantile male encephalopathy is a result of early post-zygotic WDR45 somatic mutation. *Clin genet*. 2016;90(6):560-562.

Stevenson RE, Tarpey P, May MM, Stratton MR, Schwartz CE. Arena syndrome is caused by a missense mutation in PLP1. *Am J Med Genet A* 2009 May;149A(5):1081.

Steward CA, Parker APJ, Minassian BA, Sisodiya SM, Frankish A, Harrow J. Genome annotation for clinical genomic diagnostics: strengths and weaknesses. *Genome Medicine* 2017;9:49.

Takano K, Goto K, Motobayashi M, Wakui K, Kawamura R, Yamaguchi T, Fukushima Y, Kosho T. Early manifestations of epileptic encephalopathy, brain atrophy, and elevation of serum neuron specific enolase in a boy with beta-propeller protein-associated neurodegeneration. *Eur J Med Genet.* 2017;60(10):521-526.

Thiele H ve Nürnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics*, 2005;21(8):1730-2.

Tschentscher A, Dekomien G, Ross S, Cremer K, Kukuk GM, Epplen JT, Hoffjan S. Analysis of the C19orf12 and WDR45 genes in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation *J Neurol Sci.* 2015 Feb 15;349(1-2):105-9.

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. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2013; 43:11

Venco P, Bonora M, Giorgi C, Papaleo E, Iuso A, Prokisch H, Pinton P and Tiranti V (2015) Mutations of C19orf12, coding for a transmembrane glycine zipper containing

mitochondrial protein, cause mis-localization of the protein, inability to respond to oxidative stress and increased mitochondrial Ca²⁺ Front. Genet. 6:185.

Yapıcı Z & Akcakaya NH, Tekturk P, Iseri SAU, Ozbek U. A novel gene mutation in PANK2 in a patient with severe jaw-opening dystonia. Brain & Development 38 (2016) 755–758.

Zarate YA, Jones JR, Jones AM, Millan F, Juusola J, Vertino-Bell A, Schaefer GB, Kruer MC. Lessons from a pair of siblings with BPAN. Eur J Hum Genet. 2016;24(7):1095.

Zhou B, Westaway SK, Levinson B et al. A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. Nat Genet 2001;28: 345–349.



FORMLAR

Onam Formu

Çalışmanın Adı: “**Beyinde Demir Birikimi ile Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Yeni Gen Varyantlarının Araştırılması**”

Size (ve hastanıza/çocuğunuza) bu araştırmaya katılmanız önerilmektedir. Önerilme nedeni sizde (hastanızda/çocuğunuzda) beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon hastalığı olmasıdır.

Bu araştırmanın amacı olan beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon hastalığı olan hastalarda hastalığa yol açan kalıtsal (genetik) temelleri aydınlatmaktır. Bu hastalığa yol açan kalıtsal nedenlerin aydınlatılması ile hastalığın sonraki kuşaklarda görülme olasılığının tespiti ve ilerleyen dönemde olası tedavi olanaklarının keşfedilmesine ışık tutacağını öngörüyoruz.

Bu araştırmada size ya da hastanıza/çocuğunuza kapsamlı nörolojik muayene nöroloji uzmanı tarafından yapılacak, hastalıkla ilgili nörolojik bulgular ayrıntılı olarak kaydedilecektir. Bu kişilerden hastalığa yönelik genetik inceleme yapmak için 10 ml kan örneği alınacaktır. Bu araştırmanın süresi 1 yıl olarak öngörülmüştür, araştırmada yer alacak hasta sayısı yaklaşık 20 olup, kalıtsal (genetik) araştırma için hasta olmayan ancak hasta ile kan bağı olan gönüllü akrabalar da kan örneği alınacaktır. Kan örnekleri Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (ASDETAE), Genetik Anabilim Dalında incelenecek ve uygun şartlarda saklanacaktır. Alınan kan örneğinde DNA materyaliniz izole edilerek +4C° ve -20C °’de saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır. Hastalığınıza neden olduğu düşünülen genlerde mutasyon ve polimorfizm taraması yapılacaktır. Hastalığınıza neden olan yeni genlerin bulunması için DNA örneğinizde genetik haritalama çalışmaları yapılacaktır. Araştırma kapsamında yapılan çalışmaların süresi kesin değildir (belirtilen süreden daha uzun sürebilir) ve sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz. DNA’dan elde edilen genetik bilgi sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup, sadece size ve hekiminize bildirilecek, üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Bu araştırma kapsamında sizden beklenenler hastanız/çocuğunuz ile birlikte araştırmaya katılmanız, muayene olmanız ve genetik araştırma için 10 ml kan örneği vermenizdir. Araştırma kapsamında herhangi bir ilaç ya da tedavi yöntemi size ya da hastanıza/çocuğunuza önerilmeyecektir. Beyinde demir birikimi ile nörodejenerasyon hastalığının tedavisi için kullanmakta olduğunuz bir ilaç varsa herhangi bir değişiklik yapılmayacaktır.

Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0.212 4142000-33318 no.lu telefondan Dr. N. Hande Akçakaya’ya başvurabilirsiniz. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca bu araştırma kapsamındaki

bütün muayene ve testler için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin (ve hastanızın/çocuğunuzun) isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da hiçbir şekilde sizin zararınıza yol açmayacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır. Hastanıza/çocuğunuza ve size ait tüm veriler gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlandığında kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde (hastanıza/çocuğunuza) ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr. Nihan Hande Akçakaya tarafından ASDETAE, Genetik Anabilim Dalında tıbbi ve genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. N.Hande Akçakaya'yı, 0 (212) 4442000/33318'den, ASDETAE, 2. kat, Genetik Anabilim Dalın Çapa/İstanbul adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendimin/hastamın/çocuğumun çalışmaya katılmasını isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, aktarılması ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın gönüllü olarak kabul ediyorum.

“Beyinde Demir Birikimi ile Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Yeni Gen Varyantlarının Araştırılması” araştırması kapsamında alınan kan örneğimin yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilmiştir. (Bu form 3 sayfadan oluşmaktadır.)

Bu çalışmadan elde edilecek bilgileri

Öğrenmek istiyorum: () Öğrenmek istemiyorum: ()

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Hasta Yakınının (Ebeveynin/Vasinin) Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

TARİH

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 133

Konu : Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ hk.

Tarih : 13.02.2017

Sayın Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ
Genetik

İlgi: Genetik Anabilim Dalının 06/01/2017 gün ve 18606 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Uzm. Dr. Nihan Hande AKÇAKAYA' nın yürüteceği 2017/111 dosya numaralı "Beyinde Demir Birikimi ile Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Yeni Gen Varyantlarının Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 10/02/2017 gün ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Beinde Demir Birikimi ile Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Yeni Gen Varyantlarının Araştırılması"		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	06/02/2017		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:03	Tarih: 10/02/2017		
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ' nin sorumluluğunda ve Uzm. Dr. Nihan Hande AKÇAKAYA' nin yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Beyinde Demir Birikimi ile Nörodejenerasyon Hastalığından Sorumlu Yeni Gen Varyantlarının Araştırılması"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, TÜBİTAK			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz :				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLAR ARASI <input type="checkbox"/>	

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Beinde demir birikimi ile nörodejenerasyon hastalığından sorumlu yeni gen

ORJİNALLİK RAPORU

% 2	% 1	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	www.qca.org.au İnternet Kaynağı	% 1
3	Nihan Hande Akçakaya, Barış Salman, Zeliha Görmez, Yelda Tarkan Argüden et al. "A Novel and Mosaic WDR45 Nonsense Variant Causes Beta-Propeller Protein-Associated Neurodegeneration Identified Through Whole Exome Sequencing and X chromosome Heterozygosity Analysis", NeuroMolecular Medicine, 2019 Yayın	<% 1
4	mediatum.ub.tum.de İnternet Kaynağı	<% 1
5	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	Kleffner, Ilka, Caroline Wessling, Burkhard	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nihan Hande	Soyadı	Akçakaya
Doğ.Yeri	İzmit	Doğ.Tar.	23 Ocak 1981
Uyruğu	TC	TC Kim No	12832914998
Email	nhakcakaya@gmail.com	Tel	5335413633

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İÜ, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı	2010
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Nöroloji Uzmanı	Adli Tıp Kurum Başkanlığı	2018-halen
2.	Müdür ve Tıbbi Danışman	Türkiye Spastik Çocuklar Vakfı	2016-2018
3.	Nöroloji Uzmanı	Acıbadem Maslak Hastanesi	2011-2013
4.	Nöroloji Uzmanı	Arnavutköy Devlet Hastanesi	2010-2011
5.	Nöroloji Uzmanlık Öğrencisi	İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji ABD	2005-2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	65	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			

Yayınları

- Akcakaya NH, Tekturk P, Cagatay A, Tur EK, Yapici Z. Atypical Enterovirus Encephalitis Causing Behavioral Changes and Autism-like Clinical Manifestations: Case Report. Acta Neurol Belg 2016;116(4):679-681. (DOI: 10.1007/s13760-016-0614-5)
- Yapici Z & Akcakaya NH, Tekturk P, Iseri SU, Ozbek U. A Novel Gene Mutation in PANK2 in a Patient Presented with Severe Jaw-Opening Dystonia. Brain Dev. 2016;38(8):755-8. (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2016.02.010>)
- Akçakaya NH, Gökmen MH, Parman Y, Deymeer F, Oflazer P. Bir Olgu Sunumu Eşliğinde Bilateral Periferik Fasiyal Paralizde Ayırıcı Tanı Yaklaşımı - Differential

Diagnosis Approach to Bilateral Peripheral Facial Paralysis; a Case Report. Turk J Neurol 2016;22:196-198 (DOI:10.4274/tnd.02212)

- Akçakaya NH, Akçakaya MO, Sencer A, Yapıcı Z. İdiyopatik İntrakraniyal Hipertansiyon: Tanı ve Tedavi Yaklaşımı - Idiopathic Intracranial Hypertension: Diagnosis and Therapeutic Approach. Turk J Neurol 2017;23:43-50 (DOI:10.4274/tnd.97820)
- Akçakaya NH, Iseri SU, Bilir B, Battaloglu E, Tekturk P, Gultekin M, Akar G, Yigiter R, Hanagasi H, Alp R, Cagirci S, Eraksoy M, Ozbek U, Yapici Z. Clinical and Genetic Features of PKAN Patients in a Tertiary Centre in Turkey. Clin Neurol Neurosurg. 2017;154:34-42. (DOI: 10.1016/j.clineuro.2017.01.011)
- Akçakaya NH, Özdemir Ö, Gökçay FG, İşeri SAU, Yapıcı Z. Differential Diagnosis of Bithalamic and Pallidal Hypointensity: A Case of HEXB Mutation. Cesk Slov Neurol N 2017; 80/113(3): 343–345. (DOI: 10.14735/amcsnn2017343)
- Akçakaya NH, Çapan ÖY, Schulz H, Sander T, Çağlayan SH, Yapıcı Z. 5 De Novo 8p23.1 Deletion in a Patient with Absence Epilepsy. Epileptic Disord. 2017 May 22. (DOI:10.1684/epd.2017.0906)
- Kılınçaslan A, Aydın S, Kök BE, Akçakaya H, Yapıcı Z. Pallidal Stimulation in a 11-Year-Old Boy with Treatment-Resistant Tourette Syndrome. J Child Adolesc Psychopharmacol 2017 Mar 30. (DOI: 10.1089/cap.2017.0008)
- Akçakaya NH, Altunalan T, Dogan T, Konuk O, Yilmaz A, Yurtsever OD. “Erken Müdahale Ünitesi- Early Intervention Unit” Riskli Bebek Aile Rehberi ISBN: 978-975-23-1216-6
- Aktan Z & Akçakaya NH et al. A case with CMTX1 disease showing transient ischemic-attack-like episodes. Neurol Neurochir Pol (2017) (DOI:10.1016/j.pjnns.2017.10.016)
- A New Splice-site Mutation in *SLC12A6* Causing Andermann Syndrome with Motor Neuronopathy (DOI:10.1136/Jnnp-2017-317319)
- Life-threatening parkinsonism-hyperpyrexia syndrome following bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. Neurol Neurochir Pol (2017)
- Akçakaya NH, Yapici Z, Özbek U. Cerebral Palsy and Genetics. Turk J Neurol 2018;24:1-2 (DOI:10.4274/tnd.67864)
- Akçakaya NH, Salman B, Görmez Z, Tarkan Argüden Y, Cırakoğlu A, Çakmur R, Dönmez Çolakoğlu B, Hacıhanefioğlu S, Özbek U, Yapıcı Z, Uğur İşeri SA. A Novel and Mosaic WDR45 Nonsense Variant Causes Beta-Propeller Protein- Associated Neurodegeneration Identified Through Whole Exome Sequencing and X chromosome Heterozygosity Analysis. Neuromol Med 2019: Mar;21(1):54-59.

