

Vildan ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**DÖRT MAJOR ALS GENİ DIŞLANMIŞ "AİLESEL
AMİYOTROFİK LATERAL SKLEROZ
OLGULARINDA" TÜM EKZOM DİZİLEME
YÖNTEMİ İLE PATOJENİK VARYASYONLARIN
ARAŞTIRILMASI**

Vildan ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DÖRT MAJOR ALS GENİ DIŞLANMIŞ "AİLESEL
AMİYOTROFİK LATERAL SKLEROZ
OLGULARINDA" TÜM EKZOM DİZİLEME
YÖNTEMİ İLE PATOJENİK VARYASYONLARIN
ARAŞTIRILMASI

Vildan ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Nazlı BAŞAK

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-5637 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 15/02/2024

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Hilmi UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Piraye OFLAZER
Koç Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Filiz KOÇ
Çukurova Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. A. Esra MANGUOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 beyan ederim.

Dr. Vildan ÇİFTÇİ

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim-öğretim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında, kıymetli akademik deneyim ve tecrübelerini benim ile paylaşarak sonsuz sevgi, sabır ve anlayış ile bana yol gösteren değerli danışman Hoca'larım Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e ve Prof. Dr. A. Nazlı BAŞAK'a,

Bilime olan heyecanı ve özverili çalışmaları ile örnek aldığım, koşulsuz desteğini her zaman hissettiğim, benim için Hoca'dan çok daha fazlasının karşılığı olan Prof. Dr. Hilmi UYSAL'a ve tezimin değerlendirilmesinde öneri ve katkıları için değerli Hoca'larım Prof. Dr. Piraye OFLAZER, Prof. Dr. Filiz KOÇ, Doç. Dr. Esra MANGUOĞLU'na,

Bu tez çalışması Ekim 2020- Şubat 2024 arasında Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi KUTTAM-NDAL'da yürütülmüştür. Bilimsel çalışmalarımıza sağladıkları imkanlar ve paha biçilmez ve koşulsuz destekleri için Suna ve İnan Kıraç Vakfı'na ve Koç Üniversitesi-KUTTAM'a,

NDAL'a geldiğim ilk günden itibaren tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sorularımı her zaman sabırla yanıtlayan başta Ceren TUNCA, Şeyma TEKGÜL, Elif BAYRAKTAR ve Tuğçe GÜL olmak üzere tüm NDAL ekibine,

Doktora eğitimi ve tez sürecinde yardımlarına ihtiyaç duyduğum her anda desteklerini esirgemeyen Burhan ÇAKMAZ ve Cihan POLAT başta olmak üzere tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne,

Her yorulduğumda elimden tutup yeniden başlama gücünü veren canım annem ve babam Hamide ve Hakkı SANCAKTAROĞLU'na,

En iyi arkadaşım, en güzel motivasyon kaynağım, biricik kızım Ecrin'ime ve tüm eğitim sürecimde beni destekleyen eşim Erhan ÇİFTÇİ'ye TEŞEKKÜR'lerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Konvansiyonel dizileme analiziyle, Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığı ile en sık ilişkilendirilen *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* ve *FUS* genlerinde genomik değişim saptanmayan sekiz ailesel ALS olgusunun tüm ekzom dizileme (WES) yöntemiyle genetik profillerinin çözülmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: ALS-ilişkili olup olgudaki klinik fenotip ile uyumlu görülen nadir varyantlar WES analizi ile tanımlandı. Biyoinformatik algoritmalar aracılığıyla varyantların protein üzerindeki patojenik etkileri belirlendi. Bu varyantlar olguda ve aile bireylerinde PCR-temelli Sanger dizileme yöntemiyle analiz edildi.

Bulgular: Olguların ikisinde otozomal resesif geçişli *OPTN* c.1400A>C: p.Gln467Pro ve *SPG11* c.6759C>G: p.Asp2253Glu gen varyantları homozigot olarak saptandı. Kalan diğer altı olguda ise ALS-ilişkili genlerde dominant kalıtım gösteren genomik değişimler heterozigot olarak tanımlandı. Bir olguda *KIF5A* c.2738delG: p.Gly913AlafsTer135 ve *CAPN3* c.1469G>A: p.Arg490Gln olmak üzere iki ayrı gende aday varyantlar gözlemlendi. Birbirinden bağımsız iki ailede *ANXA11* c.1156C>T: p.Arg386Trp ve c.1211G>A: p.Arg404Gln değişimleri görüldü. Üç olguda ise *FIG4* c.318T>G: p.Tyr106Ter, *CYLD* c.1189C>T: p.Arg397Cys ve *HSPB1* c.139G>A: p.Gly47Ser genlerinde varyantlar saptandı.

Sonuç: Anne-baba akrabalığı olan iki hastada *OPTN* ve *SPG11* genlerindeki homozigot varyantların olgulardaki fenotipi açıkladığı görüldü. İki farklı varyantın belirlendiği olgudaki *KIF5A* gen varyantının ALS'den sorumlu gen olduğu anlaşılırken, *CAPN3* varyantının hastalığın seyrine etkisinin ileri araştırma konusu olduğu sonucuna varıldı. *ANXA11* ve *HSPB1* genlerinde tanımlanan varyantların günümüzdeki bilgiler ışığında hastalık nedeni olarak değerlendirilemeyeceği öngörülmekle birlikte, presemptomatik testlerle varyantı taşıdığı belirlenen asemptomatik aile bireylerinin klinik takibinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: ALS, tüm ekzom dizileme, biyoinformatik, PCR

ABSTRACT

Objective: We aimed to identify using whole exome sequencing (WES) the genetic profiles of eight familial ALS cases in which conventional sequencing analysis revealed no genomic alterations in *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* and *FUS* genes, most commonly associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).

Method: Rare ALS-associated variants consistent with the clinical phenotype of the patient were identified by WES analysis. Bioinformatics algorithms were used to determine the pathogenic effects of the variants on the proteins. The variants were validated by PCR-based Sanger sequencing in the index patient and his/her family members.

Results: *OPTN* c.1400A>C: p.Gln467Pro and *SPG11* c.6759C>G: p.Asp2253Glu gene variants with autosomal recessive inheritance were found in two of the families under investigation. In the remaining six cases, heterozygous genomic alterations in ALS-associated genes (dominant inheritance) were identified. Candidate variants in two different genes, *KIF5A* c.2738delG: p.Gly913AlafsTer135 and *CAPN3* c.1469G>A: p.Arg490Gln were observed in the same patient. *ANXA11* variants (c.1156C>T: p.Arg386Trp and c.1211G>A: p.Arg404Gln) were detected in two unrelated families. Variants in the *FIG4* c.318T>G: p.Tyr106Ter, *CYLD* c.1189C>T: p.Arg397Cys and *HSPB1* c.139G>A: p.Gly47Ser genes were detected in three independent cases.

Conclusion: Homozygous variants in *OPTN* and *SPG11* genes explained the phenotype in two patients with consanguineous parents. In one patient, a *KIF5A* gene variant was found to be responsible for ALS, while the effect of the pathogenic *CAPN3* variant in the same patient, is subject for further research. Although the variants determined in the *ANXA11* and *HSPB1* genes cannot be considered the definite cause of ALS in the light of our current knowledge, clinical follow-up of asymptomatic individuals carrying the variant in the family through presymptomatic tests may be useful.

Keywords: ALS, whole exome sequencing, bioinformatic, PCR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)	2
2.2. Tanı Kriterleri ve Klinik Sınıflandırma	2
2.2.1. El- Escorial Kriterleri	3
2.2.2. Awaji Kriterleri	4
2.2.3. Gold Coast Kriterleri	4
2.2.4. ALS'nin Klinik Fenotipleri	4
2.3. ALS'nin Patofizyolojik Mekanizmaları	6
2.3.1. Protein Homeostazında Bozulmalar	7
2.3.2. RNA Metabolizmasında Bozulmalar	7
2.3.3. Nükleositoplazmik Taşımada Bozulmalar	7
2.3.4. Mitokondriyel Fonksiyon Bozukluğu ve Oksidatif Stres	8
2.3.5. DNA Tamir Mekanizmasında Bozulmalar	8
2.3.6. Aksonal Taşımada ve Hücre İskeleti Yapısında Bozulmalar	9
2.4. Epidemiyoloji	9
2.5. Etiyoloji	10
2.5.1. Çevresel Faktörler	10
2.5.2. Genetik Faktörler	12
2.6. ALS Hastalığında Çok-Basamaklı Süreç Hipotezi	20
2.7. ALS'nin Genetik Açıdan Örtüştüğü Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar	21

2.8. ALS Genlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Dizileme Yöntemleri	24
2.8.1. Birinci-Nesil DNA Dizileme Analizleri	24
2.8.2. İkinci-Nesil DNA Dizileme Analizleri	25
2.8.3. WES Hesaplamalı ve Biyoinformatik Analiz Algoritmaları	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Ailesel ALS Olguları	28
3.2. DNA İzolasyonu ve Genomik DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	31
3.3. Primer Tasarımı	31
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	34
3.5. Agaroz Jel Elektrophorezi	36
3.6. Tüm Ekzom Dizileme Analizleri (WES)	37
3.7. Deneylerde Kullanılan Kitler ve Laboratuvar Araç-Gereçleri	38
3.8. Veri Tabanları ve Biyoinformatik Algoritmaları	40
4. BULGULAR	43
4.1. Aile 1: İndeks olgu ALS-2414/FTD-86, DT: 1971, Köken: Antalya	43
4.2. Aile 2: İndeks olgu ALS-2358, DT: 2004, Köken: Antalya	44
4.3. Aile 3: İndeks olgu ALS-2341, DT: 1973, Köken: Antalya	45
4.4. Aile 4: İndeks olgu ALS-2523, DT: 1955, Köken: Antalya	46
4.5. Aile 5: İndeks olgu ALS-2955, DT: 1956, Köken: Antalya	47
4.6. Aile 6: İndeks olgu ALS-3110, DT: 1974, Köken: Konya	48
4.7. Aile 7: İndeks olgu ALS-3247, DT: 1969, Köken: Antalya	59
4.8. Aile 8: İndeks olgu ALS-2633, DT: 1972, Köken: Antalya	50
5. TARTIŞMA	54
5.1. Tez'de Tanımlanan ALS Genleri ve Proteinleri	55
5.1.1. Optineurin (<i>OPTN</i>)	55
5.1.2. Spataksin (<i>SPG11</i>)	55
5.1.3. Kinesin family member 5A (<i>KIF5A</i>)	56
5.1.4. Fosfoinositid 5-fosfataz (<i>FIG4</i>)	57
5.1.5. Annexin A11 (<i>ANXA11</i>)	58
5.1.6. CYLD lizin-63 deubikitinaz (<i>CYLD</i>)	59

5.1.7. Heat shock protein beta-1 (<i>HSPB1</i>)	60
5.2. ALS Genleri ve Hücresel Mekanizmaları	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
EK-1	
EK-2	
ÖZGEÇMİŞ	97



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. ALS ile İlişkilendirilen Genler, İşlevleri ve Yol Açtıkları Hastalık Mekanizmaları (Tanımlandıkları yıla göre sıralı)	13
Tablo 3.1. Ailesel ALS Olgularının Klinik Bilgileri	30
Tablo 3.2. Validasyon ve Segregasyon PCR bileşenleri	35
Tablo 3.3. Validasyon ve Segregasyon PCR koşulları	36
Tablo 3.4. WES Sonuçlarının Validasyonunda ve Segregasyon Analizlerinde Kullanılan Primer Çiftleri	37
Tablo 3.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	38
Tablo 3.6. DNA İzolasyonunda ve PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Kitler	39
Tablo 3.7. Deneylerde Kullanılan Laboratuvar Araç-Gereçleri	40
Tablo 3.8. Varyant Değerlendirmede Kullanılan Biyoinformatik Araçlar ve Yazılım Programları	41
Tablo 4.1. Ailesel ALS ailelerinde tanımlanan varyantlar ve OMIM bilgileri	52
Tablo 4.2. Tanımlanan varyantların algoritmalar tarafından belirlenen patojenite skorları ve frekansları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ALS patofizyolojik mekanizmaları	6
Şekil 2.2. Yeni-nesil dizileme teknolojisinde biyoinformatik iş akış şeması	27
Şekil 4.1. Homozigot <i>OPTN</i> p.Gln467Pro varyantı tanımlanan ALS-2414/ FTD-86'nın aile ağacı	45
Şekil 4.2. Homozigot <i>SPG11</i> p.Asp2253Glu varyantı tanımlanan ALS-2358'in aile ağacı	46
Şekil 4.3. Heterozigot <i>KIF5A</i> p.Gly913Alafs*135 ve <i>CAPN3</i> p.Arg490Gln varyantı tanımlanan ALS-2341'in aile ağacı	47
Şekil 4.4. Heterozigot <i>FIG4</i> -p.Tyr106Ter varyantı tanımlanan ALS-2523'ün aile ağacı	48
Şekil 4.5. Heterozigot <i>ANXA11</i> -p.Arg386Trp varyantı tanımlanan ALS-2955'in aile ağacı	48
Şekil 4.6. Heterozigot <i>ANXA11</i> -p.Arg404Gln varyantı tanımlanan ALS-3110'un aile ağacı	49
Şekil 4.7. Heterozigot <i>CYLD</i> -p.Arg397Cys varyantı tanımlanan ALS-3247'nin aile ağacı	50
Şekil 4.8. Heterozigot <i>HSPB1</i> -p.Gly47Ser varyantı tanımlanan ALS-2633'ün aile ağacı	51
Şekil 5.1. Ailesel ALS olgularında tanımlanan gen varyantlarının kökenlerine göre dağılımı	55
Şekil 5.2. ALS hastalığında rol oynayan genler, patolojik mekanizmalar ve örtüşen yollar	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD	Alzheimer hastalığı
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
AMN	Alt motor nöron
AMP	Association for Molecular Pathology
ANG	Anjiojenin
ANXA11	Annexin A11
ATN1	Atrophin
ATXN2	ataxin 2
BMAA	β-N-methylamino-L-alanine
C9orf72	Chromosome 9 open reading frame 72
CADD	Combined Annotation-Dependent Depletion
CCNF	Cyclin F
CFAP410	Cilia and flagella associated protein 410
CHCHD10	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10
CMT2	Charcot-Marie-Tooth Tip 2
CYLD	CYLD lizin-63 deubikitinaz
DANN	Deep Learning Approach for Annotation
DCTN1	Dynactin 1
DMPK	Distrofi myotonika protein kinaz

DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMG	Elektromiyografi
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
ExAC	Ekzom Agregasyon Konsorsiyumu
FIG4	Fosfoinositid 5-fosfataz
FMR1	Fragile X messenger ribonucleoprotein
FTD	Frontotemporal demans
FUS	Fused in sarcoma
FXN	Frataxin
gDNA	Genomik DNA
GWAS	Genom-çapında ilişkilendirilme çalışmaları
HD	Huntington hastalığı
hnRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
hnRNPA2/B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
HSPB1	Heat shock protein beta-1
HTT	Huntington
KIF5A	Kinesin Family 5A
MATR3	Matrin3
NEFH	Neurofilament, heavy polypeptide
NEK1	NIMA-related Kinase 1
ng	Nanogram
NGS	Yeni-nesil dizileme
NHLBI	Ulusal Kalp Akciğer ve Kan Enstitüsü

OPTN	Optineurin
PD	Parkinson hastalığı
PHOX2B	Paired-like homeobox 2b
PLS	Primer Lateral Skleroz
PMA	Progresif Müsküler Atrofi
Polyphen2	Polymorphism phenotyping version 2
RBP	RNA-bağlama proteinleri
RNA	Ribonükleik asit
SCA2	Spinocerebellar ataksi tip 2
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
Sigma-1R	Sigma-1 receptor
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SOD1	Süperoksid dismutaz
SPG10	Spastik parapleji Tip10
SPG11	Spataksin
SQSTM1	Sequestosome 1
TAF15	TATA box binding protein-associated factor 15
TARDBP	Tar-DNA bağlama proteini
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TIA-1	T cell-restricted intracellular antigen-1
T_m	Erime sıcaklığı
TUBA4A	Tübülün alfa 4a
UPS	Ubikuitin-proteozom sistemi
ÜMN	Üst motor nöron

VCP	Valosin-Containing Protein
VUS	Anlamı bilinmeyen etki
WES	Tüm ekzom dizileme
WGS	Tüm genom dizileme



1. GİRİŞ

Amiyotrofik lateral skleroz (ALS), motor nöron hastalıkları arasında en sık görülen, klinik ve genetik açıdan oldukça kompleks yapıya sahip ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalıktır. Klinik olarak ALS olgularının çoğunluğu spinal başlangıçlıdır. Kas güçsüzlüğü genelde üst ve alt uzuvlarda tek taraflı olarak ortaya çıkar. ALS olguları aile öyküsüne göre sporadik ve ailesel ALS olarak sınıflandırılır. Hastaların çoğunluğunu ailede sadece bir kişide, izole olarak görülen sporadik ALS olguları oluşturmakta ve hastalık nedeninin çevre-gen etkileşiminden kaynaklı kompleks bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Aile öyküsü olan ailesel ALS olguları ise ALS-ilişkili tek bir gen mutasyonunun genellikle otozomal dominant kalıtımı sonucu ortaya çıkmaktadır.

ALS'nin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, yapılan çalışmalar hastalığın güçlü bir genetik temele sahip olduğunu göstermektedir ve yeni nesil dizileme teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak ALS ile ilişkilendirilen genlerin sayısı giderek artmaktadır. Bulunan genler ve varyantlar ALS'de lokus ve alelik heterojenitenin varlığına işaret ederek genetik yapının öngörülenden daha kompleks olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla ALS'nin tedavisinde tek tip bir ilacın tüm olgular için etkili olmayacağı düşünülmekte ve ALS hastalığına neden olan genetik faktörlerin tanımlanmasının gen-temelli ilaç geliştirme araştırmalarına ışık tutması beklenmektedir.

Günümüzde ALS'nin henüz etkin bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı Riluzole ve Edaravone ilaçları bazı hastaların hayatta kalma sürelerini birkaç ay uzatabilmektedir.

Bu tez çerçevesinde ALS hastalığıyla en sık ilişkilendirilen *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* genlerinde genomik değişim saptanmayan ailesel ALS olgularının tüm ekzom dizileme yöntemiyle genetik profillerinin aydınlatılması ve literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)

ALS (OMIM #105400), motor korteksteki üst motor nöronlar ile beyin sapı ve omurilikteki alt motor nöronların tutulumu sonucu ilerleyici kas güçsüzlüğüne neden olan bir nörodejeneratif hastalıktır (Mead ve ark., 2023). Literatürde ilk ALS vakaları Aran ve Cruveilhier tarafından bildirilmekle birlikte, ALS terimi, günümüzde halen bilinen klinik ve patolojik bulguları ile ilk kez 1869 yılında, modern nörolojinin kurucusu olarak bilinen Fransız nörolog Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanmıştır (Al-Chalabi ve Hardiman, 2013). *Amiyotrofi*; spinal kordun ön kök kısmındaki lezyonlar sonucu oluşan kas kaybı anlamına gelirken, *lateral skleroz*; omuriliğin sütun şeklinde uzanan yan bölümündeki lezyonların kronik olarak yol açtığı ilerleyici felç ve kasın devamlı kasılması (kontraktür) anlamına gelmektedir (Kumar ve ark., 2011). İlk etkilenen kas gruplarına göre bulber ve spinal olarak ikiye ayrılan ALS’de bulber başlangıçlı olgularda güçsüzlük yüz, dil ve boğaz kaslarında başlayarak konuşma ve yutma güçlüğüne neden olmaktadır. Spinal başlangıçlı olgularda ise, semptomlar üst ve alt ekstremitelerde ilerleyici güçsüzlük ve kas kaybı ile kendini göstermektedir. ALS hastalarında semptomların başlangıcı 50-65 yaşları arasında değişkenlik gösterirken, olguların %5’inden daha az bir kısmında 30 yaş altında başlangıç görülmektedir (Reis ve ark., 2023). Hastaların büyük çoğunluğu, tanıyı takiben 3-5 yıl içerisinde diyafram kasının etkilenmesi sebebiyle solunum yetmezliğinden kaybedilirken, olguların yaklaşık %10’unun on yıl ve üzeri hayatta kaldığı bilinmektedir (Goutman ve ark., 2022b; Udine ve ark., 2023)).

2.2. Tanı Kriterleri ve Klinik Sınıflandırma

ALS’nin özellikle erken evrelerinde semptomlarının tam olarak ortaya çıkmaması, diğer nörodejeneratif hastalıklar ile örtüşen klinik bulgularının olması ve fenotipik açıdan oldukça heterojen olması, ALS tanısını zorlaştırmaktadır (Goutman ve ark., 2022a). Semptomlar başladıktan sonra tanı konulmasına kadar geçen sürenin 9.1 ile 27 ay arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bulber başlangıçlı olgularda, ekstremiteler başlangıçlı olgulara kıyasla tanıdaki gecikme daha azdır (Richards ve ark., 2020; Gwathmey ve ark., 2023). ALS olguları klinik açıdan, hastalık başlangıç bölgesine,

üst ve alt motor nöronların tutulumuna, bilişsel ve davranışsal bozukluk başta olmak üzere, diğer sistemlerin etkilenmiş olmasına ve hastalığın ilerleme hızına göre sınıflandırılmaktadır (Couratier ve ark., 2021). Motor kortekste ve kortikospinal yolakta bulunan üst motor nöronların (ÜMN) tutulumu Babinski ve Hoffman eşliğinde hiperrefleksi, spastisite ve psödobulbar etkiye neden olurken; medulla spinalis boyunca yerleşmiş ön boynuzda veya beyin sapındaki motor kranial sinirlerde lokalize alt motor nöronlar (AMN) etkilendiğinde ise, güçsüzlük, hiporefleksi veya arefleksi, fasikülasyon (seyirme) ve hedef kasa giden sinir iletiminin kesilmesi (denervasyon) nedeniyle atrofi meydana gelmektedir (Swinnen ve Robberecht, 2014). ALS olguları detaylı nörolojik muayene sonucu tespit edilen klinik bulgular, serolojik testler ve elektromiyografi (EMG) analizi doğrultusunda tanı almaktadır. ALS'nin teşhisinde kullanılan tanı kriterleri aşağıda özetlenmektedir.

2.2.1. El-Escorial Kriterleri: ALS'nin tanısında kullanılabilecek bir biyobelirteç olmadığından, bilimsel ve ilaç geliştirme araştırmalarında tanının kesinliği açısından ortak görüş birliği gerekliliği nedeniyle 1994 yılında El-Escorial kriterleri yayınlanmıştır (Brooks B Rix, 1994). 2000 yılında, Dünya Nöroloji Federasyonu Motor Nöron Hastalıkları Araştırma Komitesi tarafından düzenlenen konferansta tanıdaki doğruluğun araştırılması amacıyla, 'şüpheli ALS' kategorisi kriterlerden çıkarılarak, 'laboratuvar-destekli muhtemel ALS' kategorisi eklenmiştir. ALS olguları aşağıda belirtilen revize El-Escorial kriterlerine göre sınıflandırılmaktadır (Brooks Benjamin Rix ve ark., 2000).

2.2.1.1. Klinik Kesin ALS: Klinik muayenede bulber ve iki spinal bölgede üst ve alt motor nöron tutulumu veya üç spinal bölgede üst ve alt motor tutulumu tanımlanan olgular.

2.2.1.2. Klinik Olası ALS: Klinik muayenede en az iki bölgede üst ve alt motor nöron tutulumu ve üst motor nöron bulgularının alt motor nöron bulgularına göre rostralde (üst ekstremitede üst motor nöron bulgusu) olduğu tespit edilen olgular.

2.2.1.3. Klinik Laboratuvar destekli olası ALS: Üst ve alt motor nöron bulgularının sadece bir bölgede gözlemlendiği veya bir bölgede yalnızca üst motor nöron bulgularının

veya alt motor nöron bulgularının elektrofizyolojik (EMG) analizi ile tanımlandığı olgular.

2.2.1.4. Klinik ALS mümkün: Klinik muayenede üst ve alt motor nöron bulgularının sadece bir bölgede, üst motor nöron tutulumunun tek başına iki veya daha fazla bölgede veya alt motor nöron bulgularının üst motor nöron bulgularına göre rostralde (üst ekstremitede alt motor nöron bulgusu) olduğu gözlenen olgular.

2.2.2. Awaji Kriterleri: 2006 yılında erken tanıyı kolaylaştırmak için EMG bulguları ile revize El-Escorial kriterlerinin birlikte değerlendirilmesi için yapılan görüş birliği toplantısında etkilenmemiş kaslarda dahi alt motor nöron tutulumunun tespit edilebilmesi için iğneli EMG yönteminin kullanılması önerilerek Awaji kriterleri belirlenmiştir. Awaji kriterlerine göre ALS hastaları klinik ve EMG bulguları doğrultusunda, ‘kesin, mümkün ve olası ALS’ kategorilerine göre değerlendirilmektedir. Revize El-Escorial kriterlerine göre belirlenen ‘laboratuvar destekli olası ALS’ kategorisi çıkarılmıştır (de Carvalho ve ark., 2008).

2.2.3. Gold Coast Kriterleri: 2019 yılında, El-Escorial ve Awaji kriterlerinin karmaşıklığı, olası kısıtlamaları ve primer lateral skleroz olgularının bu kriterlere göre ‘olası ALS’ kategorisinde sınıflandırılması nedenlerinden dolayı sadeleştirilmiş Gold Coast kriterleri geliştirilmiştir (Shefner ve ark., 2020). Bu kriterlere göre ALS tanısı için;

- Aile öyküsüne ve düzenli klinik muayenelere bağlı olarak ilerleyici motor işlev bozukluğu
- Üst ve alt motor nöron tutulumunun bir bölgede tespit edilmesi veya alt motor nöron tutulumunun iki bölgede gözlenmesi
- EMG ve uygun nörolojik görüntüleme (magnetik rezonans) yöntemleri ile diğer hastalıkların dışlanması gerekmektedir.

2.2.4. ALS’nin Klinik Fenotipleri

2.2.4.1. Hastalık Başlangıç Bölgesine Göre Fenotipik Sınıflandırma

a. Spinal (Charcot) Fenotip: ALS olgularında alt veya üst ekstremitelerde asimetrik güçsüzlük ile başlayan ve en yaygın görülen hastalık formudur.

b. Bulber Fenotip: Olguların yaklaşık %20'sinde konuşma (dizartri) ve yutma güçlüğü (disfaji) ile dilde fasikülasyonlar gözlenmektedir (Chiò Adriano ve ark., 2011; Swinnen ve Robberecht, 2014). Olguların bir kısmında psödobulber etki olarak tanımlanan kontrol edilemeyen ağlama ve gülme görülebilmektedir (Swinnen ve Robberecht, 2014). Bulber başlangıçlı olgularda, aspirasyon geliştirme olasılıklarının daha yüksek olması, beslenme problemleri ve solunum yetmezliğinin daha erken ortaya çıkması nedeniyle spinal başlangıçlı olgulara kıyasla prognozun daha hızlı ilerlediği ve hayatta kalma sürelerinin ortalama iki yıl olduğu bilinmektedir (Chiò Adriano ve ark., 2011).

c. Solunum Başlangıçlı Fenotip: ALS'nin en nadir gözlenen formudur ve olguların yaklaşık %3-5'inde bildirilmiştir. Hastalığın oldukça hızlı ilerlediği bu olgularda ortalama hayatta kalma süresi 1.4 yıl olarak bildirilmiştir (Shoesmith ve ark., 2006; Chiò Adriano ve ark., 2011).

2.2.4.2. Motor Nöron Tutulumuna Göre Fenotipik Sınıflandırma

Alt Motor Nöron Tutulumu ile İlişkilendirilen Fenotipler

a. Progresif Müsküler Atrofi (PMA): PMA yetişkin başlangıçlı, alt motor nöron tutulumu ile karakterize edilen ve ALS'nin üst motor nöron bulgusu bulunmayan formu olarak bilinmektedir (Rowland, 2010). *SOD1-Ala4Val* mutasyonu taşıyan ve alt motor nöron tutulumu tespit edilen olgularda ilerleyen süreçte üst motor nöron bulgularının ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Cudkowicz ve ark., 1998).

b. Flail-arm Fenotipi: Bulber ve alt ekstremitte tutulumu olmadan, alt motor nöron tutulumunun en az 12 ay üst ekstremitelerde sınırlı güçsüzlüğe neden olduğu fenotiptir. Literatürde Vulpian-Bernart sendromu, nörogenik 'man-in-a-barrel' sendromu veya ALS'nin skapulohumeral formu olarak da bilinmektedir (Wijesekera ve ark., 2009; Couratier ve ark., 2021).

c. Flail-leg Fenotipi: Flail-arm sendromuna kıyasla daha az sıklıkta gözlenmektedir ve bazı ALS olgularında güçsüzlük lumbosakral spinal kord bölgesi ile sınırlıdır. Alt motor nöron tutulumu sonucu alt ekstremitelerde başlayan semptomların yaklaşık 16

ay sonra üst motor nöron bulguları ile birlikte üst ekstremitelerde ve bulber bölgeye yayılabildiği bildirilmektedir (Wijesekera ve ark., 2009; Chiò Adriano ve ark., 2011).

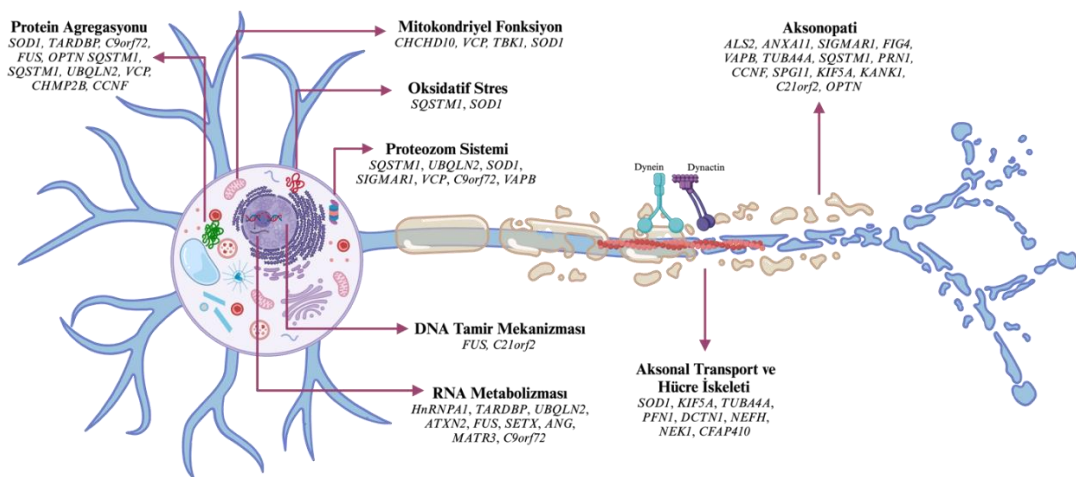
Üst Motor Nöron Tutulumu ile İlişkilendirilen Fenotipler

a. Primer Lateral Skleroz (PLS): PLS olgularında yalnızca üst motor nöron tutulumu bulunmaktadır ve hastaların çoğunluğunda yaklaşık dört yıl sonra alt motor nöron bulguları gözlenmektedir (Finegan ve ark., 2019).

b. Hemiplejik Fenotip: Mill's sendromu olarak bilinen ALS'nin oldukça nadir gözlenen bu formunda alt ekstremitede tek taraflı üst motor nöron tutulumu meydana geldikten sonra semptomlar üst kolda gözlenmektedir. ALS'nin yavaş progresyon gösteren bu formunda olguların 10 yıldan daha fazla hayatta kaldıkları bildirilmektedir (Jaiser ve ark., 2019).

2.3. ALS'nin Patofizyolojik Mekanizmaları

Günümüzde ALS ile ilişkilendirilen genlerin sayısı genom dizileme teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak artmaktadır (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>). Klinik ve patolojik bulgular ile ALS'nin genetiğinin anlaşılmasındaki ilerlemeler ALS patogenezinin ışık tutmaktadır. ALS hastalığı ile ilişkilendirilen çok sayıda risk faktörü/hastalık yapıcı genlerin aynı hücresel yollarda bozulmalara yol açtığı gözlenmiştir. ALS'nin temel moleküler mekanizmaları aşağıda özetlenmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. ALS patofizyolojik mekanizmaları (Ranganathan ve ark., 2020; Mead ve ark., 2023). (Biorender programı kullanılarak tasarlanmıştır)

2.3.1. Protein Homeostazında Bozulmalar

Motor nöronların canlı kalabilmesi ve hücresel fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için proteinlerin doğru hücresel konumda, gereken miktarda ve işlevsel olarak aktif konformasyonda olması gerekmektedir. Nöronlar diğer hücre tiplerine kıyasla protein dengesindeki bozulmalara daha duyarlıdır (Kundra ve ark., 2020). ALS hastalığının yaygın görülen ve üzerine çok sayıda çalışma bulunan patolojik mekanizmalarından birisi mutasyona uğrayan proteinlerin nöronlarda inklüzyon şeklinde agregat oluşturmalarıdır (Ramesh ve Pandey, 2017; Montibeller ve ark., 2020). Hücre içerisinde biriken agregatlar motor nöronların işlevlerini yerine getirmesini engelleyerek nöronların dejenerasyonuna ve nekroza neden olmaktadır. Yanlış katlanan proteinler hücre-içi ubiquitin-proteozom sistemi (UPS) ve otofaji mekanizması ile yıkıma uğramaktadır. ALS’de hastalık yapıcı olarak bilinen birtakım genlerin doğrudan veya dolaylı olarak proteostazının (bir hücrenin içinde ve çevresindeki tüm proteinlerin korunmasında fonksiyonel kompleks yollar) düzenlenmesinden sorumlu olduğu ve majör ALS proteinlerinden süperoksit dismutaz (SOD1) ve Tar-DNA bağlama proteinin (TDP-43) UPS ve otofaji mekanizmalarında substrat olarak rol oynadıkları gösterilmiştir (Mead ve ark., 2023).

2.3.2. RNA Metabolizmasında Bozulmalar

Evrimsel süreçte türler arasında korunmuş olan RNA-bağlama proteinleri (RBP) kırılma (splicing), poliadenilasyon, yeni sentezlenen mRNA moleküllerinin kararlılığı, lokalizasyonu ve translasyon basamaklarında görev almaktadır (Xue ve ark., 2020). RNA-bağlama proteinlerini kodlayan *TARDBP* ve *Fused in sarcoma* (*FUS*) majör ALS genlerinin yanı sıra farklı RBP’lerini kodlayan *ataxin 2* (*ATXN2*), *TATA box binding protein-associated factor 15* (*TAF15*), *ewing sarcoma breakpoint region 1* (*EWSR1*), *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (*hnRNPA1*), *hnRNPA2/B1*, *matrin3* (*MATR3*) ve *T cell-restricted intracellular antigen-1* (*TIA-1*) genlerinde patojenik varyantların tanımlanması RNA metabolizmasındaki bozulmaların ALS patofizyolojisindeki önemini göstermektedir (Zhou ve Xu, 2023).

2.3.3. Nükleositooplazmik Taşımada Bozulmalar

Motor nöronlarda RNA ve protein moleküllerinin çekirdek ve sitoplazma arasında taşınması sitoplazmik importinler (proteinleri sitoplazmadan nükleusa taşıyan) ve

nüklear exportinleri içeren büyük, çok alt-birimli nüklear por kompleksleri tarafından yürütülmektedir (Kim ve Taylor, 2017). Sağlıklı nöronlarda çekirdekte lokalize olan ve işlev gören TDP-43 proteinin sitoplazmada birikmesi ALS olgularının yaklaşık %97'sinde görülen histopatolojik bulgudur. TDP-43 proteinini kodlayan *TARDBP* gen mutasyonları ailesel ve sporadik ALS olgularının az bir kısmında görülmesine rağmen TDP-43 inklüzyonlarının ALS olgularının büyük çoğunluğunda tespit edilmesi, TDP-43'ün çekirdeğe taşınmasındaki bozulmanın ALS'nin yaygın görülen patogenik özelliği olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Winton ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar özellikle *chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72)* ekspansiyonu taşıyan transkriptlerin, TDP-43 agregatlarının ve *FUS* mutasyonlarının nükleositoplazmik taşımadaki morfolojik ve fonksiyonel bozulmalar ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Kim ve Taylor, 2017).

2.3.4. Mitokondriyel Fonksiyon Bozukluğu ve Oksidatif Stres

Oksidatif fosforilasyon mekanizması ile hücre için gerekli adenosin trifosfat üretimi, Ca^{+2} homeostazisi, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve protein kalite kontrolü mitokondri organelleri tarafından düzenlenmektedir. Mitokondri fonksiyonundaki bozulmalar reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda sentezlenmesine yol açarak oksidatif strese neden olur. Reaktif oksijen türleri protein, lipid, DNA ve RNA biyomoleküllerinin yapısını bozarak nöronal dejenerasyona sebep olarak ALS patofizyolojisinde rol oynarlar. *TDP-43*, *FUS*, *SOD1*, *C9orf72* ve *Sigma-1 receptor (Sigma-1R)*, *Sequestosome 1 (SQSTM1)*, *TANK Binding Kinase 1 (TBK1)*, *Valosin-Containing Protein (VCP)* ve *Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10 (CHCHD10)* gibi ALS genlerindeki patojenik varyantların mitokondriyel işlev bozukluğuna ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Mead ve ark., 2023).

2.3.5. DNA Tamir Mekanizmasında Bozulmalar

Nöronlar gelişimin erken dönemlerinde spesifik işlevleri için özelleşip etkin son şekillerini kazanarak uzun yıllar canlı ve fonksiyonel kalırlar. Post-mitotik olarak adlandırılan nöronlar DNA hasarına karşı oldukça duyarlıdır ve DNA molekülünde meydana gelen hata giderilmezse nöronların kaybı ile sonuçlanır (Yu ve ark., 2020).

RBP'ni kodlayan *TARDBP* ve *FUS* (Wang ve ark., 2018) genleri ile *NIMA-related Kinase 1 (NEK1)* (Higelin ve ark., 2018) ve *C9orf72* (Farg ve ark., 2017) genlerindeki ALS-ilişkili mutasyonların DNA molekülündeki hasarın tanınması, sinyalleşme ve hasarın giderilmesini içeren hücresel süreçlerde bozulmalara neden olduğu bilinmektedir (Mitra ve ark., 2019).

2.3.6. Aksonal Taşımada ve Hücre İskeleti Yapısında Bozulmalar

Nöronların özgün polarizasyonlarından dolayı, veziküller, organeller, lipidler, hücre iskeleti bileşenleri ve RNA molekülleri akson boyunca mikrotübüller üzerinde motor proteinleri yardımıyla ileri-geri taşınmaktadır; hücre gövdesinden (soma) distal aksonal bölgeye, sinapsa doğru olan taşımaya anterograd (dynactin motor proteini etkin), distal aksonal bölgeden hücre gövdesine doğru olan taşımaya retrograd transport (dynein motor proteini etkin) denir (De Vos ve ark., 2008). *SOD1*, *Kinesin Family 5A (KIF5A)*, *tubülin alfa 4a (TUBA4A)*, *profilin 1 (PFN1)*, *dynactin 1 (DCTN1)*, *neurofilament, heavy polypeptide (NEFH)*, *NEK1*, *cilia and flagella associated protein 410 (CFAP410)* genlerindeki patojenik varyantların aksonal taşımada ve hücre iskeleti dinamiğinde bozulmalara neden olarak ALS hastalığında rol oynadığı bildirilmiştir (Akçimen ve ark., 2023).

2.4. Epidemiyoloji

ALS, yetişkinlerde en yaygın görülen motor nöron hastalığı olmakla birlikte, nörodejeneratif hastalık olarak Alzheimer (AD) ve Parkinson (PD) hastalıklarına göre daha nadirdir. Epidemiyoloji çalışmaları ALS prevalans ve insidansının coğrafi bölgelere (popülasyonlara), yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterdiğini vurgulamaktadır. Asya kökenli ALS olgularının en yaygın genetik nedeni *SOD1* gen mutasyonları iken, Avrupa kökenli olguların ise *C9orf72* genindeki tekrar sayısı artışıdır (Edgar ve ark., 2021). ALS hastalığının görülme sıklığı erkeklerde kadınlara kıyasla ~1,5 kat daha yüksek olmakla birlikte, yaşla birlikte artarak her iki cinsiyet için de 70-79 yaşlarında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. 2020 yılında yayınlanan 124 popülasyon-temelli bir çalışmanın meta-analiz verileri doğrultusunda ALS'nin prevalansı 4.42/100.000 popülasyon; insidansı ise 1.59/100.000 kişi/yıl olarak bildirilmiştir (Xu ve ark., 2020).

2.5. Etiyoloji

ALS olgularının yaklaşık %90'ını oluşturan sporadik formunda hastalığa neden olan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, kompleks genetik mekanizmaların ve bir takım çevresel faktörlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Olguların geriye kalan %5-10'luk kısmında aile öyküsü mevcuttur ve çoğunlukla otozomal dominant geçiş gözlenmektedir (Van Daele ve ark., 2023). Motor nöron dejenerasyonunun tetiklenmesinde ve ALS hastalığının ortaya çıkmasında etkili olabileceği gösterilen genetik ve çevresel faktörler aşağıda açıklanmaktadır.

2.5.1. Çevresel Faktörler

Guam adasında ve Japonya'nın Kii yarımadasında ALS sıklığının yüksek olmasının yerli halkın beslenme alışkanlıklarıyla ilgili olabileceği ve ALS'nin çevresel temele dayanabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Ancak, çevresel faktörlerin araştırılmasında birtakım kısıtlamalar bulunmaktadır. Çevresel maruziyetlerin genom gibi güçlü temellere dayandırılabilir olmaması ve zaman içerisinde değişkenlik göstermesi, beslenme alışkanlıklarının ancak yakın bir zaman diliminde incelenebilmesi, benzer genetik yapıya sahip yeterli olgu-kontrol sayısına ulaşılamaması, araştırılan faktörlere maruz kalmanın uzun süre takip edilmesi gerekliliği, deneylerin tekrarlanabilir olmaması gibi nedenlerden dolayı ALS patogenezindeki rolünün anlaşılmasını güçleştirmiş ve yapılan çalışmalarda tutarlı sonuçlar elde edilememesi ile sonuçlanmıştır. Bunlara ilave olarak, ALS'nin etiolojisinde çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı göz önünde bulundurularak, çalışmaya dahil edilen olgu ve kontrol gruplarının genetik profillerinin araştırılması önerilmektedir (Al-Chalabi ve Hardiman, 2013). Literatürdeki güvenilir çevresel faktörler aşağıda özetlenmiştir:

a. Ağır metaller: Kurşun, selenyum, cıva, kadmiyum ve demir gibi ağır metallerin motor nöron dejenerasyonunda olası moleküler mekanizmaları uzun süredir araştırılmaktadır ama sonuçların çelişkili olduğu bildirilmektedir. 2009 yılında yayımlanan ve 50 çalışmanın sonuçlarının analiz edildiği derlemede sadece üç çalışmada ağır metal maruziyetinin ALS hastalığının ortaya çıkmasında rolü olabileceği öne sürülmektedir. Bir çalışmada selenyuma maruz kalan kişilerde ALS riskinin önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilirken; diğer bir çalışmada kurşun, cıva,

alüminyum, kadmiyum, krom ve manganez ile ALS arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir (Sutedja ve ark., 2009).

b. Egzersiz ve futbol: Başarılı Amerikalı beyzbol oyuncusu Lou Gehrig'in ALS tanısı alması dolayısıyla ALS Amerika'da Lou Gehrig hastalığı olarak da bilinmektedir. Diğer profesyonel sporcularda da ALS hastalığının ortaya çıkması fiziksel aktivitenin ALS için risk faktörü olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. İtalya'da 24,000 profesyonel futbol oyuncusu ile yapılan retrospektif çalışmada ALS prevalansının yükseldiği tespit edilmiştir (Belli ve Vanacore, 2005).

2005 yılında bildirilen epidemiyolojik çalışmada İtalya kökenli 137,078 profesyonel erkek futbolcunun yıllık takip edilmesiyle beş ALS olgusu tespit edilmiştir. Literatürde bildirilen çalışmalarda, birden fazla risk faktörünün birlikte etkili olabileceğinin göz ardı edilmemesi gerekliliği vurgulanmaktadır (Al-Chalabi ve Hardiman, 2013).

c. Elektromanyetik alanlar ve elektrik çarpmaları: Elektriğin nöromüsküler sistem üzerindeki etkisi ve eksitotoksisiteye yol açması nedeniyle mesleğe bağlı olarak aşırı derecede düşük frekanslı elektromanyetik alanlara maruz kalma ve elektrik çarpmasının ALS riski ile bağlantısı araştırılmıştır. Huss ve arkadaşları tarafından 2015 yılında bildirilen çalışmada, mesleği zorunluluk olarak düşük frekanslı elektrik alana uzun süre maruz kalmanın ALS hastalığı ile ilişkili olabileceği tespit edilirken, düşük frekanslı elektrik alana, meslek dolayısıyla, uzun süre maruz kalmanın ALS hastalığı ile ilişkili olabileceği tespit edilirken, elektrik çarpmasının ALS'nin ortaya çıkmasında etkili olmadığı belirtilmiştir (Huss ve ark., 2015).

d. Siyanotoksinler: Nörotoksik β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) amino asidinin nörodejenerasyonda rolü olabileceği hipotezi ilk kez 1954 yılında Guam adasında ALS ve Parkinsonizm demans kompleksi gözlenen olguların insidansının dünya çapına kıyasla 50-100 kat fazla gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, Chamorro yerli halkının un yapmak için kullandıkları sikad tohumlarında bulunan, *Cycas micronesica* bitkisinin köklerindeki simbiyotik siyanobakteriler tarafından üretilen BMAA'dan şüphelenmişlerdir. Literatürde, BMAA'nın hücre-içi protein yanlış katlanmasına neden olduğu ve bu katlanmanın oksidatif stresi indükleyerek motor nöronlar üzerinde toksik etki yarattığı bildirilmektedir (Banack ve ark., 2010).

2.5.2. Genetik Faktörler

ALS hastalığının genetik temeli ilk kez 30 yıl önce ailesel ALS olgularında, *SOD1* geninde bağlantı analizleri yöntemi kullanılarak patojenik mutasyonların tanımlanmasıyla atılmıştır (Deng ve ark., 1993; Rosen ve ark., 1993). Günümüzde, ALS hastalığı ile farklı patojenite ve yatkınlık riskine sahip 100'den fazla gen ilişkilendirilmektedir (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>). Yüksek penetrasyon gösteren, güçlü patojenik özelliğe sahip genler hastalık yapıcı olarak tanımlanırken, yatkınlık genleri ise çevresel faktörler ile birlikte hastalığın ortaya çıkmasında rol oynayan risk faktörü genleri olarak sınıflandırılır (Goutman ve ark., 2022a). Bu genlerde tanımlanan ALS-ilişkili mutasyonlar otozomal dominant, otozomal resesif ve X kromozomuna bağlı dominant kalıtım gösterir (Renton ve ark., 2014). Veri tabanlarında her gün sayısı değişen ALS genlerinden, kanıta dayalı bilgiler doğrultusunda 30 gen hastalık oluşum mekanizmaları ile birlikte tablo olarak verilmiştir (Tablo 2.1.) (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>) (Goutman ve ark., 2022b). ALS-ilişkili çok sayıda farklı gen tanımlanmakla birlikte, bu genlerin majör ALS genleri ile yapılan çalışmalar sonucunda aydınlatılan ortak patofizyolojik mekanizmalarında örtüşükleri anlaşılmaktadır (Nguyen ve ark., 2018).

Tablo 2.1. ALS ile İlişkilendirilen Genler, İşlevleri ve Yol Açıcıları Hastalık Mekanizmaları (Tanımlandıkları yıla göre sıralı)

ALS-ilişkili genler (yıl)	ALSoD sınıflandırma	Kalıtım şeması	Ailesel ALS (%)	Sporadik ALS (%)	İşlev	Patogenik mekanizma	Örtüştüğü diğer hastalıklar
<i>SOD1</i> (1993)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant; otozomal resesif	%12	%1-2	Hücre içi süperoksit anyonu detoksifikasyonunda görevli enzim	Proteostazis defektleri; oksidatif stres; prion benzeri yayılma; enflamasyon	-
<i>NEFH</i> (1994)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant; risk faktörü	< %1	< %1	Nörofilament proteini	Aksonal transportta bozulma	Charcot-Marie-Tooth disease tip 2 (az sayıda olguda bildirilmiştir)
<i>SETX</i> (1998)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant	< %1	< %1	Helikaz	Ribostazis defektleri	Spinocerebellar ataksi, progresif motor nöropati
<i>ALS2</i> (2001)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal resesif	< %1	< %1	Guanin nükleotid exchange faktörü (GEF)	Veziküler trafikte bozulma	Kalıtsal spastik paraparezi
<i>DCTN1</i> (2003)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant; risk faktörü	< %1	< %1	Dynactin mikrotübül motor protein alt birimi	Aksonal transportta bozulma	Perry sendromu (parkinsonizm)
<i>VAPB</i> (2004)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	< %1	< %1	Plazma ve hücre-içi vezikül membran proteini	Proteostazis mekanizmasında bozulma	Spinal müsküler atrofi, esansiyel tremor
<i>CHMP2B</i> (2006)	Orta destekli ALS geni	Otozomal dominant	< %1	< %1	Transport için gerekli endozomal ayırma (ESCRT-III) kompleks bileşeni	Proteostazis ve veziküler trafikte bozulma	Frontotemporal demans (FTD)
<i>CYLD</i> (2020)	-	Otozomal dominant	< %1	< %1	Protein moleküllerinden lizin-63 bağlı poliubikitin zincirlerini ayırır	Otofaji mekanizması	Frontotemporal demans (FTD)

Tablo 2.1. devam, ALS ile ilişkilendirilen Genler, İşlevleri ve Yol Açıcıları Hastalık Mekanizmaları (Tanımlandıkları yıla göre sıralı)

ALS-ilişkili genler (yıl)	ALSoD sınıflandırma	Kalıtım şeması	Ailesel ALS (%)	Sporadik ALS (%)	İşlev	Patojenik mekanizma	Örtüştüğü diğer hastalıklar
<i>GRN</i> (2008)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant, modifier	< %1	< %1	Gelişimden sorumlu büyüme faktörü, nöronal survival, hücre döngüsü ve hücre hareketi	Nörodejenerasyon, enflamasyon	FTD, Frontotemporal lobar dejenerasyon, Lewy cisimcikli demans
<i>TARDBP</i> (2008)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant; otozomal resesif	%4	%1	RNA-bağlama proteini; transkripsiyon düzenlemesi; splicing; RNA molekülünün lokalizasyonu ve degradasyonu	Ribostazis; proteostazis; nükleositoloplazmik transport defektleri; prion-benzeri yayılma; enflamasyon	Supranükleer göz palsisi
<i>ELP3</i> (2009)	Zayıf destekli ALS geni	Bilinmiyor	< %1	< %1	RNA polimeraz II uzatıcı kompleksin histon asetiltransferaz alt birimi	Ribostazis ve hücre iskeleti defektleri	-
<i>FIG4</i> (2009)	-	Otozomal dominant	< %1	< %1	Endozom-lizozom mekanizması ve otofaji	Hücre-içi vezikül trafiği	Charcot-Marie-Tooth tip 4, Yunis Varon sendromu
<i>FUS</i> (2009)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant; otozomal resesif	%4	%1	RNA-bağlama proteini; transkripsiyon düzenlemesi; splicing; RNA molekülünün lokalizasyonu ve degradasyonu; DNA tamir mekanizması	Ribostazis ve nükleositoloplazmik transportta bozulma	Esansiyel tremor (az sayıda olguda bildirilmiştir)
<i>OPTN</i> (2010)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant; otozomal resesif	< %1	< %1	Hücre membran transportunu düzenleyen coiled-coil yapısı bulunan protein	Otofaji; enflamasyon	Open-angle glaucoma, Paget hastalığı

Tablo 2.1. devam, ALS ile İlişkilendirilen Genler, İşlevleri ve Yol Açıcıları Hastalık Mekanizmaları (Tanımlandıkları yıla göre sıralı)

ALS-ilişkili genler (yıl)	ALSoD sınıflandırma	Kalıtım şeması	Ailesel ALS (%)	Sporadik ALS (%)	İşlev	Patojenik mekanizma	Örtüştüğü diğer hastalıklar
<i>SPG11</i> (2010)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal resesif	< %1	< %1	DNA hasarına bağlı olarak fosforilasyona uğrayan transmembran proteini	DNA tamir mekanizması	Hereditör spastik parapleji
<i>VCP</i> (2010)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	%1	%1	Protein degradasyonundan sorumlu ATPaz enzim; hücre-içi membran füzyonu; DNA tamiri ve replikasyon; NF-κB yolağının aktivasyonu ve hücre döngüsü	Proteostazis defektleri; enflamasyon	Pageet hastalığı bulunan inklüzyon cisimcikli miyoziti, parkinsonizm, skapuloperoneal müsküler distrofi, düşük baş sendromu
<i>C9orf72</i> (2011)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	%40	%7	GEF; endozom mekanizmasının ve otofajinin düzenlenmesi; DNA tamir mekanizması	RNA metabolizmasında; proteostazis/ otofaji; hücre-içi trafikte ve nükleositoloplazmik transport defektleri; enflamasyon	Huntington fenokopisi, parkinsonizm, esansiyel tremor, miyoklonus
<i>SQSTM1</i> (2011)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant	~ %1	< %1	Ubikuitin- bağlayıcı otofaji adaptör proteini (NF-κB transkripsiyon faktörünün düzenleyicisi)	Otofaji; enflamasyon	Pageet hastalığı, FTD, Lewy cisimcikli demans (az sayıda olguda bildirilmiştir)
<i>UBQLN2</i> (2011)	Kesin ALS geni	X'e bağlı, otozomal dominant	< %1	< %1	Ubikuitin benzeri protein (proteozom ve ubikuitin ligazları ile etkileşime girer)	Proteostazis mekanizmasında bozulma	FTD
<i>PFN1</i> (2012)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	< %1	< %1	Aktin polimerizasyonunda görevli aktin- bağlayıcı protein	Hücre iskeleti/ transport defektleri; akson gelişiminde bozulma	-

Tablo 2.1. devam, ALS ile ilişkilendirilen Genler, İşlevleri ve Yol Açıcıları Hastalık Mekanizmaları (Tanımlandıkları yıla göre sıralı)

ALS-ilişkili genler (yıl)	ALSoD sınıflandırma	Kalıtım şeması	Ailesel ALS (%)	Sporadik ALS (%)	İşlev	Patojenik mekanizma	Örtüştüğü diğer hastalıklar
<i>HNRNPA1</i> (2013)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant; risk faktörü	< %1	< %1	RNA-bağlanma proteini	Ribostazis defektleri	İnklüzyon cisimcikli miyopati
<i>HNRNPA2B1</i> (2013)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant; risk faktörü	< %1	< %1	RNA-bağlama proteini	Ribostazis defektleri	İnklüzyon cisimcikli miyopati
<i>CHCHD10</i> (2014)	Kesin ALS geni	Otozomal Dominant	< %1	< %1	Mitokondriyal protein, zarlar arası yüzeyde kristal bağlanmalarına lokalize	Mitokondriyal ve biyoenerji sisteminde bozulma	Serebellar ataksi, miyopati
<i>MATR3</i> (2014)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant	< %1	< %1	Nükleer matrikste lokalize RNA-bağlanma proteini	Ribostazis defektleri	Distal miyopati
<i>NEK1</i> (2015)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	~ %1-2	< %1	Serin-treonin kinaz; hücre döngüsünün regülasyonu; aksonal gelişim ve polarite; DNA tamir mekanizması	DNA hasarında birikme; protein agregasyonu	-
<i>TBK1</i> (2015)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	~ %3	< %1	Serin-treonin kinaz; doğuştan gelen bağışıklık; otofaji ve hücre döngüsü	Otofaji ve inflamasyon mekanizmalarında bozulma	Frontotemporal lobar dejenerasyon, Lewy cisimcikli demans (az sayıda olguda bildirilmiş)
<i>CCNF</i> (2016)	Güçlü destekli ALS geni	Otozomal dominant	~ %1- 3.3	< %1	E3 ubiquitin ligaz kompleks bileşeni, hücre döngüsünün düzenlenmesi	Protein homeostazisinde defekt	-

Tablo 2.1. devam, ALS ile İlişkilendirilen Genler, İşlevleri ve Yol Açıcıları Hastalık Mekanizmaları (Tanımlandıkları yıla göre sıralı)

ALS-ilişkili genler (yıl)	ALSoD sınıflandırma	Kalıtım şeması	Ailesel ALS (%)	Sporadik ALS (%)	İşlev	Patojenik mekanizma	Örtüştüğü diğer hastalıklar
<i>C21orf2</i> (<i>FAP410</i>) (2016)	Güçlü destekli ALS geni	Bilinmiyor	< %1	< %1	DNA tamir mekanizması; aktin yapısı	Hücre iskeletinde bozulma	-
<i>ANXA11</i> (2017)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	~ %1	~ %1.7	Kalsiyuma bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein; veziküler sistem	Annexin 11 inklüzyonları, kalsikline bağlanmada bozulma	Otoimmün hastalıklar, sarkoidoz
<i>TIA1</i> (2017)	Zayıf destekli ALS geni	Otozomal dominant	~ %2.2	< %1	RNA-bağlama proteini	RNA mtabolizmasında bozulma	Lewy cisimcikli demans (az sayıda olguda bildirilmiş)
<i>KIF5A</i> (2018)	Kesin ALS geni	Otozomal dominant	~ %0.5-3	< %1	Kinezin mikrotübül motor proteini	Hücre iskeleti/ hücre-içi trafikte bozulma	Charcot-Marie-Tooth disease tip 2, primer progresif multiple skleroz fenokopisi,herediter spastik parapleji (az sayıda olguda bildirilmiş)
<i>DNAJC7</i> (2019)	Orta destekli ALS geni	Bilinmiyor	< %1	< %1	Isı şoku protein ko-şaperonu	Bilinmiyor	

ALS olgularının %5-10'unu birinci derece (anne ve baba, çocuklar, kardeşler) ve ikinci derece (büyükanne ve büyükbaba, hala, dayı, birinci derece kuzenler) akrabalarında en az bir ALS tanılı bireyin bulunduğu ailesel ALS olguları oluşturmaktadır.

Avrupa kökenli (Caucasian) ailesel ALS olgularının yaklaşık %70'inde en yaygın gözlenen *C9orf72* (%40), *SOD1* (%20), *TARDBP* (%4) ve *FUS* (%3) majör ALS genlerinde yüksek penetrasyon gösteren, çoğunlukla otozomal dominant kalıtmıli hastalık yapıcı varyantlar tanımlanmaktadır (Renton ve ark., 2014; Van Daele ve ark., 2023). *Sporadik görünümlü* ALS olgularının yaklaşık %10'u majör ALS genlerinde tanımlanan patojenik bir varyant ile açıklanmaktadır (Byrne ve ark., 2013; Van Damme Philip ve ark., 2017). Sporadik olgularda ailede ALS tanılı tek birey olmasına rağmen, genomik değişimin *de novo* ortaya çıkması, önceki kuşaklarda hastalığın henüz ortaya çıkmamış olması veya erken ölümler, kişinin biyolojik ebeveyn durumu, aile öyküsü ve klinik bilginin yetersiz olması, aynı gendeki mutasyonların iki farklı nörolojik hastalığa yol açması olarak tanımlanan pleiotropi durumu (*C9orf72* tekrar sayısı artışının hem ALS hem FTD'ye neden olması gibi), düşük penetrasyon olasılıkları göz önünde bulundurularak sporadik olgularda da genetik temelin araştırılması önerilmektedir (Bayraktar ve ark., 2023).

Ailesel olgularda Mendeliyen (monogenik) kalıtım gözlenirken, sporadik olgularda hastalığın ortaya çıkmasında birden fazla genetik varyantın birlikte etkili olabileceği öngörülen kompleks genetik kalıtımın rol oynadığı düşünülmektedir. Monogenik kalıtım ile olguların bir kısmında genetik mekanizma anlaşılırken, genom araştırma teknolojilerindeki son yıllardaki gelişmeler, birkaç gen varyantının birlikte etkili olabileceği düşünülen oligogenik kalıtımın ve birçok genin kümülatif etkisinin gözleendiği poligenik kompleks genetik mekanizmalarının araştırılmasını sağlamıştır (Chia ve ark., 2018; Ryan ve ark., 2019).

2.5.2.1. Oligogenik Kalıtım

Literatürde birden fazla ALS-ilişkili gende nadir patojenik/olası patojenik varyantın birlikte gözleendiği olgular bildirilmiştir (Van Blitterswijk ve ark., 2012). Ancak, yüksek penetrasyon gösteren genlerle birlikte gözlenen nadir varyantların hastalığın ortaya çıkmasından ziyade, hastalık başlangıç yaşı (Cady ve ark., 2015) ve hastalığın

progresyonu üzerine etkileri olabileceği düşünülmektedir (Cooper-Knock ve ark., 2020).

C9orf72 geni pozitif ve negatif ALS olguları ile kontrol grubunda 20 ALS-ilişkili gende oligogenik durum araştırıldığında nadir varyantların sayısının tüm çalışma grubunda benzer olduğu tespit edilerek, *C9orf72* geninin patojenik tekrar sayısı artışının ALS'nin ortaya çıkmasında tek başına yeterli olduğu bildirilmiştir (Ross ve ark., 2020).

SOD1 geninde p.Asp90Ala veya p.Glu101Lys mutasyonu saptanan ailesel ALS ailelerinde bu mutasyonları taşımayan hasta bireyler ile mutasyonu taşıyan sağlıklı bireyler gözlenmiştir (Felbecker ve ark., 2010).

ALS'de *TARDBP* mutasyonun olup olmadığı ve varsa sıklığını belirlemek üzere Almanya kökenli 134 sporadik ALS ve *SOD1* gen mutasyonu negatif 31 ailesel ALS olgusunda yapılan çalışmada, sporadik ALS olgularında *TARDBP* mutasyonu gözlenmezken, ilk kez bu çalışmada *TARDBP* Asn352Ser (novel) mutasyonu tanımlanmış olup (Kühnlein ve ark., 2008); yine aynı yıl Japon kökenli ve *SOD1* gen mutasyonu negatif 30 ailesel ALS olgusunda yapılan çalışmada, *TARDBP* Asn352Ser mutasyonu bir ailesel ALS olgusunda belirlenmiştir (Kamada ve ark., 2009).

Bu bilgilerden yola çıkılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada ailesel ALS olgularında *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *anjiojenin (ANG)* gen mutasyonları taranmıştır. Ailesel ALS olgularında iki gende ALS ilişkili genomik değişim saptanmıştır. Heterozigot durumda hastalığa sebep olan *TARDBP* mutasyonunu homozigot olarak veya *C9orf72* veya *ANG* ile birlikte; *SOD1* mutasyonu *C9orf72* geni ile birlikte; *FUS* mutasyonu *C9orf72* veya *ANG* ile birlikte gözlenmiştir. ALS hastalığının ortaya çıkmasında ikinci genomik değişimin gerekli olabileceği öngörülerek, oligogenik etiyolojiye işaret edilmekte ve ayrıca, otozomal dominant kalıtımın gözlendiği ailesel ALS pedigrilerinde karşılaşılan düşük penetrans durumunun birden fazla gende görülen risk varyantlarının kompleks kalıtımı ile açıklanabileceği önerilmektedir (Van Blitterswijk ve ark., 2012).

Düşük penetrasyon durumunun yanı sıra, ALS olgularının genetik yapılarının bilinmesi, hastalık başlangıç yaşı, progresyon hızı ve klinik bulgulardaki heterojenitenin altında yatan faktörlerin anlaşılması, klinik çalışmalarda hastaların

uygun şekilde fenotipik olarak sınıflandırılması açısından önem taşıdığı düşünülmektedir.

2.5.2.2. Kalıtlabilirlik

Ailesinde ALS tanılı olguların bulunduğu bireylerde bilinen genetik faktöre bağlı ALS hastalığının ortaya çıkma riski ‘kalıtlabilirlik’ olarak tanımlanmaktadır. ALS hastalığının kalıtlabilirliği monozigotik ve dizigotik ikiz çalışmalarına ve popülasyona özgü genom-çapında ilişkilendirilme çalışmalarına (GWAS) göre değerlendirilmektedir. 2010 yılında bildirilen çalışmada ikiz kardeşlerden en az birinin ALS tanılı olduğu 171 monozigotik (49) ve dizigotik (122) ikiz çiftinden yalnızca beş monozigotik ikiz çiftinin ALS ile uyumlu olduğu tanımlanmış, her iki kardeşin de ALS olduğu dizigotik ikiz çifti gözlenmemiştir. Monozigotik ikizlerde genetik materyalin aynı olması ve her iki kardeşin de ALS ile uyumlu olması genetik temele işaret etmektedir (Al-Chalabi ve ark., 2010).

2019 yılında bildirilen, İrlanda kökenli 1117 ALS olgusu ile gerçekleştirilen en geniş popülasyon-temelli çalışmada ALS hastalığının kalıtlabilirliğinde genetik faktörlerin katkısı araştırılmıştır. Genetik sonucu bilinmeyen ALS olgularının birinci derece akrabalarında hayat boyu hastalığın ortaya çıkma riski %52.3 iken, bilinen ALS genlerinde mutasyon taşımadığı saptanan olguların birinci derece akrabalarında hastalığın ortaya çıkma riskinin %40 civarı olması, ALS hastalığının etiolojisinde genetik faktörlerin güçlü etkisini göstermekte ve ALS-ilişkili gen keşfi çalışmalarının önemini ortaya koymuştur (Ryan ve ark., 2019).

2.6. ALS Hastalığında Çok-Basamaklı Süreç Hipotezi

ALS hastalığının genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile çok-adımlı bir süreç sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Yüksek penetrasyona sahip ALS-ilişkili gen mutasyonu taşıyan bireylerin bir kısmı hastalığı geliştirirken, bir kısmında hastalığın ortaya çıkmaması ve mutasyonu bebeklik döneminden itibaren taşıyor iken neden yetişkin dönemde ortaya çıktığı günümüzün araştırma konularıdır.

ALS hastalığına benzer şekilde kanser hücresinin yedi basamaklı karsinogenez süreci sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Kanser epidemiyoloji araştırmalarında kullanılan matematiksel model ALS’nin çok aşamalı süreç sonucu ortaya çıktığı hipotezini araştırmak için kullanılmıştır (Armitage ve Doll, 2004).

Elde edilen bilgiler doğrultusunda ALS-ilişkili gen mutasyonu taşıyan olgularda hastalığın ortaya çıkması için daha az adımın gerekli olduğu öngörülmektedir. İngiltere, İrlanda, Hollanda ve İskoçya toplumlarına ait ALS olgularının yaş ve cinsiyete göre insidans verileri oluşturularak yapılan modelleme çalışmasında ALS'nin altı basamaklı bir süreç olduğu önerilmiştir. *SOD1* mutasyonlarının penetransı değişkenlik göstermekle birlikte, *SOD1* geninde mutasyon taşıyan bireyde hastalığın ortaya çıkması için iki; *C9orf72* geni için üç; *TARDBP* geni için dört basamak gerektiği öngörülmektedir (Chiò A. ve ark., 2018).

2.7. ALS'nin Genetik Açıdan Örtüştüğü Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar

Belirli bir kromozomal lokusta tanımlanan genomik değişimin birden fazla farklı fenotip ile ilişkilendirilmesi durumu 'pleiotropi' olarak tanımlanmaktadır (Stearns, 2010). Gen haritalama ve geniş-çaplı genom ilişkilendirme çalışmaları dört majör nörodejeneratif hastalığın (AD, PD, FTD ve ALS) çok sayıda genetik lokustaki varyantların birlikte katkıları sonucu poligenik olarak ortaya çıktıkları ve birden fazla nörodejeneratif hastalık üzerinde etkileri olduğu üzerinde durmaktadır. Alzheimer veya Parkinson tanılı bir kişide ortak patolojik bulgular sebebiyle, ALS veya FTD riskinin arttığı öngörülmektedir (Ferrari ve ark., 2014; Ruffini ve ark., 2020; Qiao ve ark., 2023).

Rheenen ve ark. (2021) tarafından 29,612 ALS olgusu ile 122,656 kontrol bireyi ile yürütülen en fazla örnek sayısına sahip genom-çapında ilişkilendirme çalışmasında *TSPOAP1-AS1* lokusunda yer alan tek nükleotid değişimlerinin ALS ve Alzheimer; *GAK* lokusunda görülen ortak hastalık yapıcı varyantların ise ALS ve Parkinson hastalıkları için risk oluşturdukları bildirilmektedir (Van Rheenen ve ark., 2021).

Kompleks nörodejeneratif hastalıklar arasındaki pleiotropik durumun anlaşılmasının hastaların genetik yapısının aydınlatılmasına, tanıda ve tedavi geliştirme araştırmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir (Qiao ve ark., 2023). Literatürde bildirilen, ALS ile ortak genetik nedene dayanan diğer nörodejeneratif hastalıklar aşağıda özetlenmektedir.

ALS ve FTD'nin geniş bir nörodejeneratif spektrumun parçası olduğu bilinmektedir. ALS olgularının yaklaşık %50'sinde motor tutulumuna ek olarak, davranışsal ve bilişsel bozulmalar gözlenmekte ve hastaların %15'i ALS'ye eşlik eden FTD tanısı

almaktadır (Nguyen ve ark., 2018). FTD, 65 yaş altı bireylerde, Alzheimer hastalığından sonra ikinci en yaygın görülen presenil demans çeşididir. FTD'nin davranışsal varyant, semantik demans (primer progresif afazi; PPA) ve ilerleyici akıcı olmayan (tutuk) afazi olmak üzere üç klinik alt grubu bulunmaktadır (Dewan ve ark., 2021). Motor nöron hastalıkları ile birlikte en sık görülen formunun davranışsal FTD varyantı olduğu bilinmektedir. Aynı aile içinde ALS ve FTD tanılı bireyler bulunmakla birlikte, ALS hastalarının %40-%50'sinde FTD ilişkili semptomlar; FTD olgularının yaklaşık %30'unda motor sistem işlev bozuklukları tespit edilmiştir (Nguyen ve ark., 2018).

ALS ve FTD'nin en sık gözlenen ortak genetik nedeni *C9orf72* genindeki tekrar sayısı artışı olmakla birlikte; *CHCHD10*, *SQSTM1*, *TBK1*, *cyclin F (CCNF)* gen mutasyonlarının da bu iki fenotiple yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir. MinE (www.projectmine.com) ve GENFI (genfi.org.uk/) gibi dünya çapında gerçekleştirilen projeler aracılığıyla yürütülen, uluslararası ALS ve FTD kohortlarından elde edilen tüm genom dizileme verileri doğrultusunda hastaların ALS-FTD genlerinde belirli bir varyantı taşıyan ALS, FTD veya ALS-FTD fenotiplerinden hangisini geliştireceğinin altındaki genetik mekanizmanın anlaşılması beklenmektedir (Ranganathan ve ark., 2020).

Ubikitinlenmiş TDP-43 inklüzyonları, ailesel ve sporadik ALS olgularının yaklaşık %90'ında gözlenen ALS hastalığının karakteristik patolojik bulgusudur (Kwong ve ark., 2007). ALS'nin patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülen TDP-43 sitoplazmik inklüzyonlarının toksik fonksiyon kazanımı ile mi ya da işlev kaybı yoluyla mı etkili olduğu araştırılmıştır (Chou ve ark., 2018; Ranganathan ve ark., 2020). TDP-43 proteinin genetik düzenleyicileri incelendiğinde ALS olgularının spinal kord nöronlarında ataksin2 proteinin sitoplazmada kompleks ve agregat oluşturduğu tespit edilmiştir. *Ataxin 2 (ATXN2)* genindeki 33 CAG tekrarının üzerindeki poliglutamin (CAG) tekrar sayısı artışının spinoserebellar ataksi tip 2 (SCA2)'ye neden olduğu bilinmektedir. Dokuz yüzden fazla ailesel ve sporadik ALS olgusunda *ATXN2* genindeki CAG tekrar sayısı analiz edildiğinde orta uzunluktaki poliglutamin (29-33 tekrar sayısı artışı) tekrarı ALS için risk faktörü olarak ilişkilendirilmiştir (Van Damme P. ve ark., 2011; Sproviero ve ark., 2017).

Huntington hastalığı (HD) otozomal dominant kalıtmıli hareket bozukluğu (koreik, distonik ve ataksik hareketler), kognitif ve psikiyatrik bulgular ile ortaya çıkan lml bir nörodejeneratif hastalıktır. HD huntington proteinini kodlayan *huntington* (*HTT*) genindeki patojenik CAG tekrar artışı mutasyonu sonucu ortaya çıkar (MacDonald ve ark., 1993). HD olgularının yaklaşık %1'inin *HTT* geninde ekspansiyon taşımadığı tespit edilmiştir ve bu olgular HD fenokopileri olarak adlandırılmaktadır (Wild ve ark., 2008). Literatürde HD fenokopi olguları spinoserebellar ataksi 17; Huntington disease-like 2, Friedreich ataxia ve kalıtsal prion hastalığı açısından araştırılmıştır. Moss ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen İngiltere merkezli 514 Huntington fenokopi kohortunda *C9orf72* ekspansiyonu incelendiğinde, 10 indeks bireyin *C9orf72* pozitif olduğu saptanarak, bu olgularda *C9orf72*'nin Huntington fenokopilerinin genetik nedeninin *C9orf72* genindeki tekrar sayısı artışı olduğu bildirilmiştir (Hensman Moss ve ark., 2014). Diğer taraftan, 2.442 ALS/FTD ile 2.599 Lewy cisimcikli demans tanısı alan olguda ve 3.158 kontrol bireyde *androjen reseptör (AR)*, *atrophin (ATN1)*, *ATXN1*, *ATXN3*, *C9orf72*, *distrofi myotonika protein kinaz (DMPK)*, *fragile X messenger ribonucleoprotein (FMR1)*, *frataxin (FXN)*, *HTT* ve *paired-like homeobox 2b (PHOX2B)* genlerinde tekrar artışı motifleri araştırılmıştır. ALS veya FTD tanısı alan üç olguda *HTT* geninde patojenik tekrar sayısı artışı tespit edilirken, Lewy cisimcikli demans olgularında ve kontrol bireylerinde gözlenmemiştir (Dewan ve ark., 2021).

Kinesin family 5A (KIF5A) genindeki yanlış anlamlı (missense) mutasyonların otozomal dominant kalıtmıli, kalıtsal spastik parapleji Tip 10 (SPG10) ve Charcot-Marie-Tooth Tip 2 (CMT2)'ye yol açtığı bilinmektedir. *KIF5A* geninde tanımlanan mutasyonların lokalizasyonlarına bakıldığında, proteinin N-terminal kinezin motor domainindeki varyantların SPG10 ve CMT2 ile, proteinin C-terminal kargo-bağlanma domainindeki mutasyonların ise ALS ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Nicolas ve ark., 2018).

Nörodejeneratif hastalıklarda genotip-fenotip korelasyonunun kurulması oldukça kompleks bir süreçtir. Aynı gendeki mutasyonların farklı hastalıklara nasıl yol atığıнын yanında, farklı genlerdeki varyantların nasıl aynı klinik fenotipte karşımıza çıktığının anlaşılabilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.8. ALS Genlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Dizileme Yöntemleri

2.8.1. Birinci-Nesil DNA Dizileme Analizleri

1953 yılında Watson ve Crick, Franklin ve Wilkins'in DNA'nın X-ışını kristalografi çalışmalarıyla elde ettikleri bulgular üzerinde çalışarak DNA'nın üç boyutlu yapısını açıkladılar. Ancak, DNA molekülünün çok uzun ve yapısındaki nükleotidlerin birbirine benzer yapıda olması nedeniyle DNA dizisinin okunması ve analizi oldukça zaman aldı (Heather ve Chain, 2016).

Genom dizileme teknolojilerindeki gelişmeler kimya, biyoloji, mühendislik ve bilişim teknolojilerindeki ilerlemeler ile paralel gitti. 1990 yılında başlayan ve 2003 yılında tamamlanan İnsan Genom Projesi ile insan genomunda yaklaşık 20,000-25,000 protein kodlayan genin bulunduğu kesinleşti (Abdellah ve ark., 2005). Hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülen genlerin dizilenmesinde sekanslama teknikleri kullanılmaktadır. DNA fragmentindeki pürin ve pirimidin bazlarının sırasının doğru şekilde belirlenmesindeki ilk araştırmalar sonucu geliştirilen iki dizileme yöntemi bulunmaktadır. 1973 yılında bildirilen Maxam ve Gilbert yönteminde, radyoaktif işaretli DNA molekülünden spesifik pürin ve pirimidin bazlarının kimyasal modifikasyonu sonrasında, şeker-fosfat yapısı kırıldıktan sonra oluşan DNA fragmentleri poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmektedir (Gilbert ve Maxam, 1973). 1977 yılında Coulson ve Sanger, günümüzde altın standart olarak kullanılan ve %99.9 doğrulukla (Udine ve ark., 2023) sonuç veren DNA nükleotid dizisinin belirlenmesinde geliştirdikleri 'dideoksi yöntemi' açıklamışlardır. Bu yeni yöntemde ilgili DNA bölgesinin çoğaltılmasında baz-spesifik olarak sonlanmayı sağlayan ve DNA polimeraz inhibitörleri olan dideksi nükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılmıştır. Günümüzde, majör ALS genlerinin taranmasında ve yeni-nesil dizileme yöntemleri ile tanımlanan varyantların doğrulanmasında kullanılan altın standart Sanger yöntemidir.

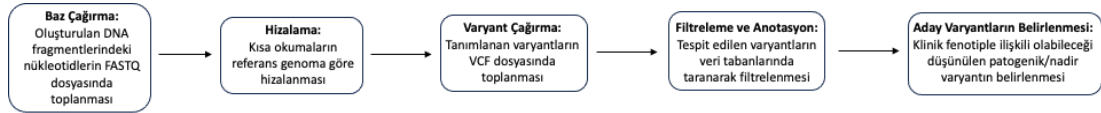
2.8.2. İkinci-Nesil DNA Dizileme Analizleri

Genomun protein kodlayan dizilerinin (tüm ekzom dizileme; WES) ve genomun tamamının (tüm genom dizileme; WGS) yüksek verimli, düşük maliyetli, basit ve hızlı sekanslanmasına ihtiyaç duyulmasıyla, yeni-nesil dizileme (NGS) olarak da bilinen ikinci-nesil dizileme teknolojileri geliştirilmiştir. NGS teknolojilerinin gelişimi DNA'nın solid faza bağlanarak (streptavidin kaplı paramanyetik boncuklar) immobilize hale getirilmesi ve DNA molekülüne polimeraz tarafından bir nükleotidin eklenmesi ile salınan pirofosfatın lusiferaz ile eşleşmesi sonucu ortaya çıkan ışığın luminometer tarafından ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Ronaghi ve ark., 1996). Eş-zamanlı olarak yüksek sayıda DNA örneğinin geniş çaplı analizine (genom veya ekzom) olanak sağlayan, Sanger dizileme ile kıyaslandığında zaman ve maliyet açısından daha uygun olan NGS tekniği ticari olarak ilk kez 2005 yılında 454/Roche platformu ile kullanılmaya başlanmıştır (Margulies ve ark., 2005).

Günümüzde NGS platformlarında kullanılan genel deneysel basamaklar, genomik DNA izole edildikten sonra, kütüphane oluşturulması için DNA çift zincirinin ayrılması, sonikasyon veya enzimatik yöntemler ile DNA'nın fragmentlere ayrılması ve DNA fragmentlerinin uç kısımlarına adaptörlerin ligasyonu, adaptörlerin bağlı olduğu tek zincirli DNA fragmentleri her bir manyetik boncuk üzerinde bir DNA fragmenti olacak şekilde emülsiyon-temelli PCR yöntemi ile veya çip üzerinde amplifiye edilerek milyonlarca DNA molekülü sentezlenmesi prensibine dayanmaktadır. Her bir baza özgü floresan sinyal tespit edilerek hazırlanan ham veriler FASTQ dosyasında toplanır. Elde edilen kısa okumalar referans genomdaki pozisyonları ile eşleştirilerek (hizalanarak) bir dizi yazılım programı/aracı ile hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülen aday varyant(lar) tanımlanır.

2.8.3. WES Hesaplamalı ve Biyoinformatik Analiz Algoritmaları

Yeni nesil dizileme analizleri ile elde edilen verilerin biyoinformatik değerlendirilmesi üç aşamada gerçekleştirilir: Hizalama, varyantların tanımlanması (varyant çağırma) ile filtreleme ve genomik değişimlerin adlandırılması (anotasyon). Bu süreçlerde kullanılan yazılım programlarının algoritmalara dayalı işleyişine genel bakış aşağıda özetlenmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Yeni-nesil dizileme teknolojisinde biyoinformatik iş akış şeması (Dolled-Filhart ve ark., 2013).

a. Hizalama: Ekzom dizileme ile elde edilen masif verinin biyoinformatik analizinin başlangıç aşaması onlardan yüzlerce kadar değişen sayıda baz çifti içeren her bir fragmentin (kısa okuma) FASTQ dosya formatında bir araya getirilmesidir. Hizalamada yeni-nesil dizileme okumaları insan referans genomu ile eşleştirilerek Sequencing alignment/map (SAM) veya Binary alignment/map (BAM) dosyalarında tutulmaktadır. İkinci adımda, referans genom ile kıyaslanarak tanımlanan genomik değişimler Variant Call Format (VCF) dosyasında listelenmektedir.

b. Varyant Çağırma: Tanımlanan tek nükleotid polimorfizmleri, insersiyon/delesyonlar ile daha büyük yapısal değişimler ve anotasyonlar VCF dosyasında depolanmaktadır. Varyant çağırma doğru varyantların tanımlanması ve genotiplenmesinde çalışılan genomun referans genoma haritalanması sırasında karşılaşılan zorlukların iki kaynağı bulunmaktadır. Bunlardan ilki, yanlış pozitif tek nükleotid polimorfizm (SNP) varyantlarının gözlenmesi ile sonuçlanan insersiyon ve delesyonlara bağlı hizalama hatalarıdır. Karşılaşılan diğer zorluk ise, PCR aşamasında çoğaltılan dizinin GC içeriğine bağlı DNA replikasyon hatalarının meydana gelmesi sonucu hatalı okumaların elde edilmesidir (Danecek ve ark., 2011).

c. Filtreleme ve Anotasyon: Hizalama ve varyant çağırma basamaklarından sonraki adım, tanımlanan binlerce genomik değişim arasından hastalık ile ilişkili olabileceği ve patolojik mekanizmalarda rol oynayabileceği düşünülen varyantların

tanımlanmasıdır. Bu aşama, kalıtım şeması, aile ağacı göz önünde bulundurularak, filtreleme ile biyolojik mekanizmalarda görev alan lokuslar ve bu lokuslardaki varyantların belirlenmesi olan anotasyon sürecidir.

d. Varyant Önceliklendirme: Mendeliyen kalıtım gösteren hastalıkların tanımlanması ve tanı konulması aşamalarında uygulanan WES ve WGS analizleri ile saptanan binlerce veya milyonlarca varyant içerisinde gen işlevini etkileme olasılığı en fazla olan ve hastalık fenotipi ile uyumlu varyantların tanımlanması ‘varyant önceliklendirme’ olarak tanımlanmaktadır.

Varyantların değerlendirilmesinde kullanılan veri tabanları ve biyoinformatik algoritmalar Ek-1’de verilmektedir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Ailesel ALS Olguları

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalında ALS tanısı alarak, Koç Üniversitesi Hastanesi, Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (KUTTAM), Suna ve İnan Kıraç Vakfı, Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı'na (NDAL) yönlendirilen hastaların hekimleri tarafından doldurulan 'NDAL- Hasta Bilgi Formu'nda yer alan demografik bilgiler kayıt altına alındı. NDAL-Hasta Bilgi Formu'nda yer alan klinik fenotipik bilgiler doğrultusunda NDAL numarası verildi. Hastalığın sporadik olarak ortaya çıktığının anlaşılması veya genetik geçişli ise, kalıtım modelinin belirlenebilmesi için anne- baba akrabalığı ve köken bilgisi sorgulanarak detaylı aile ağacı çizildi. Sporadik ve ailesel ALS olgularının en yaygın genetik nedeni olarak bilinen *C9orf72* genindeki patojenik hekzanükleotid tekrar sayısı artışları ekarte edildikten sonra ailenin diğer bireylerinde de ALS öyküsü olan, erken yaş başlangıçlı ve anne-baba akrabalığı olan kompleks fenotipli indeks bireylerin tüm ekzom dizileme (WES) analizine alınması planlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Ailesel ALS Olgularının Klinik Bilgileri

Aile No	NDAL No	Doğum Tarihi	Hastalık Başlangıç Yaşı	İlk Semptomlar	Üst/Alt Motor Nöron Tutulumu	Periferik Sinir Sistem Bulgusu	Kognitif & Psikiyatrik Bulgular	Serebellar Bulgular	Ekstrapiramidal Bulgular
1	ALS-2414	1971	49	Konuşma bozukluğu, yutma ve yürümede zorluk	Üst ve alt motor nöron	yok	yok	yok	yok
2	ALS-2358	2004	10	Alt ekstremitelerde ilerleyen kas güçsüzlüğü	Üst ve alt motor nöron	yok	yok	yok	yok
3	ALS-2341	1970	43	Yürüme güçlüğü, düşme	Üst ve alt motor nöron	yok	yok	yok	yok
4	ALS-2523	1955	64	Alt ekstremitelerde tutulumu	Alt motor nöron	yok	yok	yok	yok

Tablo 3.1. devam, Ailesel ALS Olgularının Klinik Bilgileri

Aile No	NDAL No	Doğum Tarihi	Hastalık Başlangıç Yaşı	İlk Semptomlar	Üst/Alt Motor Nöron Tutulumu	Periferik Sinir Sistem Bulgusu	Kognitif & Psikiyatrik Bulgular	Serebellar Bulgular	Ekstrapiramidal Bulgular
5	ALS-2955	1956	64	Sağ distal kas güçsüzlüğü	Üst ve alt motor nöron	yok	yok	yok	yok
6	ALS-3110	1974	42	Alt ve üst ekstremit	Üst ve alt motor nöron	yok	yok	yok	yok
7	ALS-3247	1969	53	Konuşma bozukluğu	Üst motor nöron	yok	yok	yok	yok
8	ALS-2633	1972	44	İlerleyen kas güçsüzlüğü	Üst ve alt motor nöron	var	yok	yok	yok

3.2. DNA İzolasyonu ve Genomik DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

İleri moleküler araştırma için 'NDAL-Katılımcı Bilgilendirme ve Aydınlatılmış Onam Formu'nu imzalayarak araştırmaya onay veren hastaların EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden QIAGEN EZ1 Advanced XL cihazı ile genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirildi.

Tüm Ekzom Dizileme (WES) ve Sanger analizinde kullanılması planlanan genomik DNA'ların saflık ve miktar (ng/μl) tayini NanoDrop 2000c spektrofotometre cihazı ile yapıldı. Spektrofotometrik yöntem ile konsantrasyonun belirlenmesi DNA'nın 260 nm dalga boyundaki absorbans özelliğine dayanır. DNA örneğinden geçen ultraviyole ışık dedektör tarafından algılanmakta ve 260 nm dalga boyuna ait karakteristik sinyal elde edilmektedir. DNA miktarının doğru olarak belirlenmesinde önemli faktörlerden biri de DNA örneğinin saflığı/ kalitesidir. DNA'nın saflığı ve izolasyon sırasında ortamdaki biyolojik kontaminantların, özellikle proteinlerin varlığı 260/280 absorbans oranı ile belirlenir (Simbolo ve ark., 2013). İzole edilen genomik DNA'lar WES analizinde tespit edilen genomik varyantın(ların) validasyonu ve aile-içi segregasyon analizi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ilgili gen bölgesini amplifiye etmek üzere uygun konsantrasyona seyreltildi.

3.3. Primer Tasarımı

PCR ile istenen gen bölgesinin başarılı şekilde amplifikasyonu için genomik DNA'nın hazırlanması, reaksiyon koşulları ve primer çiftinin düzgün tasarlanması önem taşımaktadır (Ye ve ark., 2012).

Primer tasarlanmasında göz önünde bulundurulması gereken hususlar arasında primer uzunluğuna, hedef gen bölgesinin büyüklüğüne, primer çiftinin benzer erime sıcaklığına (T_m) sahip olmasına, G/C içeriğinin dengede olmasına ve primer dimer (sekonder) yapılarının (hairpin, self-dimer, cross dimer) oluşmamasına dikkat edilmesi önem taşır.

a. Primer uzunluğu: Oligonükleotidler olarak da adlandırılan ve DNA sentezinin başlatılabilmesi için gerekli olan tek zincirli kısa nükleik asit dizilerinin ideal uzunluğu 18- 24 bp olarak kabul edilir. Primer dizisinin uzun olması kalıp DNA'ya bağlanma etkinliğinde ve buna bağlı olarak PCR ürününde azalmaya neden

olur. Buna karşın, kısa primerler hedef bölgeye özgün olmayan bağlanmalar sonucu hedef dışı ampliconların oluşumuna yol açar.

b. Hedef gen bölgesinin büyüklüğü: Klasik (standart) PCR ile 100- 3000 bp arasındaki gen bölgeleri çoğaltılabilmektedir. Daha uzun gen bölgelerinin amplifikasyonu için özel enzim ve farklı reaksiyon koşulları gerekmektedir (<https://www.primer3plus.com>, Erişim tarihi: 8 Ocak 2022).

c. Primer erime sıcaklığı (T_m): Primer dizisinin yarısının kalıp DNA'dan ayrılması için gerekli sıcaklık olan T_m derecesini primer uzunluğu ve primer dizisinin baz içeriği (G-C bazlarının T_m 'i A-T baz çiftine göre daha yüksek) etkiler. Düşük T_m spesifitenin azalmasına, yüksek T_m ise zayıf bağların oluşmasına neden olarak PCR döngüsü süresince bağlanmayı zorlaştırır.

d. GC içeriği: G-C baz çifti üçlü bağ içermesi nedeniyle, A-T baz çiftine kıyasla daha güçlü yapıdadır. Primer ve kalıp DNA arasında kararlı bağlanmanın sağlanabilmesi için, primer dizisinin GC içeriğinin %40- 60 aralığında olmasının ve 3' ucunda 2- 3 guanin/sitozin bulundurmasının kalıp DNA'ya spesifik bağlanmayı sağladığı bilinmektedir.

e. PCR sırasında oluşabilecek üç tip primer dimer yapısı bulunmaktadır:

Hairpin yapısı: Aynı primer dizisi içerisinde üç veya daha fazla bazlık homoloji gösteren bölgenin bulunmasından kaynaklanır. Gibbs serbest enerji G (ΔG): Bir reaksiyonun sabit basınç altında kendiliğinden üretebildiği kullanılabilir iş miktarıdır. Hairpin yapısının kararlılığı dimer yapısının kırılması için gerekli olan enerji miktarını ifade eden ΔG değeri ile belirlenir. Bu değerin -10'dan küçük olması istenmeyen kararlı hairpin yapılarının oluşabileceğini gösterir.

Self- dimer: Self-dimer yapısı iki ileri primer dizisinin komplementer bölgeleri arasındaki moleküller arası etkileşimler sonucu oluşur. Polimeraz zincir reaksiyonlarında genomik DNA miktarına kıyasla daha fazla miktarda primer kullanılmaktadır. Primerlerin, moleküller arası dimerleri hedef gen bölgesine bağlanmaya göre daha kolay gerçekleştirmeleri durumunda PCR ürünü veriminde azalma meydana gelmektedir.

Cross- dimer: İleri ve geri primer dizilerindeki homolojiyi gösteren bölgeler arasında moleküller arası etkileşimler ile meydana gelmektedir.

f. Primer Tasarlanmasında Kullanılan Yazılım Programları:

Primer-BLAST: Primer-BLAST programı çoğaltılmak istenen gen bölgesini hedefleyen aday primer çiftlerini Primer3 programı ile entegre olarak tasarlayan ve bu primerlerin hedef bölgeye özgünlüğünü gösteren modüler sistemdir. Primer-BLAST programının ara-yüzü araştırmacıların tek basamakta PCR gen bölgesini FASTA formatındaki raw DNA sekansı olarak veya NCBI RefSeq accession numarası ile girmelerini ve primerlerin hedef bölgeye özgünlüğünün *in silico* analizini sağlamaktadır (Ye ve ark., 2012); <https://www.primer3plus.com>, Erişim tarihi: 8 Ocak 2022).

Oluşturulan aday primer çiftlerinin istenen gen bölgesine bağlanma pozisyonları ve diğer gen(ler) ile eşleşme durumunda oluşabilecek transkript varyantları araştırmacılara ayrı bir sayfada ayrıntılı olarak sunulmaktadır (Ye ve ark., 2012).

UCSC-in Silico PCR: Araştırmacılara tasarlanan primer çifti ile çoğaltılmak istenen bölgenin hedef bölgeye özgünlüğünün ve kromozomal lokalizasyonunun incelenmesi olanağını sunar (<http://genome.ucsc.edu>, Erişim tarihi: 2022).

Ensembl: Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü tarafından gerçekleştirilen Ensemble genom veritabanı projesi, karşılaştırmalı genom, sekans varyantları ve transkripsiyonel düzenleme ile çalışmalarının yürütülmesinde omurgalı ve model organizmalara ait genomik bilgileri sağlayan genom tarayıcısıdır. Genetikçilere, moleküler biyologlara ve diğer araştırmacılara gen ve gen varyantlarının anotasyonunu, regülatör işlevlerinin anlaşılmasını ve hastalıklar ile ilgili verilerin toplanmasını sağlar (<https://www.ensembl.org>, Erişim tarihi: Ocak 2024).

OligoCalc: Tek-zincirli DNA ve RNA oligonükleotidlerinin T_m , moleküler ağırlığı, %GC içeriği gibi fiziksel özellikleri ile self-dimer ve hairpin yapılarını araştırmacıların girdiği primer dizisine göre hesaplayan web-temelli ara-yüzdür (Kibbe, 2007) (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, Erişim tarihi: 30 Aralık 2015).

NetPrimer: Primer analiz algoritmalarını kullanarak primerlerin T_m 'lerinin termodinamik yasalarına göre doğru şekilde hesaplanmasını ve hairpin, self-dimer ve cross-dimer yapılarının oluşma durumunun ΔG değeri ile analiz edilmesini sağlar (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>, Erişim tarihi: 2024).

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Biyoinformatik algoritmalar doğrultusunda indeks olguda tanımlanan aday varyant(lar)'ın sağlanması (validasyonu) PCR-tabanlı Sanger dizileme analizi ile sağlıklı ve etkilenmiş aile bireylerinde segregasyon analizi ile yapıldı. Validasyon ve segregasyon analizinde kullanılan PCR solüsyonları ve koşulları Tablo 3.2 ve 3.3'de listelenmektedir. PCR ürünleri Sanger analizi için MacroGen biyoteknoloji firmasında çalışıldı. Sekans sonuçları FinchTV (Geospiza, A.Ş.) programında in-house analiz edildi.

Tablo 3.2. Validasyon ve Segregasyon PCR bileşenleri

Solüsyonlar	Hacim (μ l)	Stok konsantrasyon	Final konsantrasyon
dH ₂ O	16.8	-	-
Buffer	5	5X	1X
İleri (yönlü) Primer	1	10 μ M	0.4 μ M
Geri Primer	1	10 μ M	0.4 μ M
Mytaq Polimeraz	0.2	5u/ μ L	1 u
gDNA	1	20 ng/ μ L	20 ng
Toplam	25		

Tablo 3.3. Validasyon ve Segregasyon PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denetrasyon	95 °C	1 dk	1
Denetrasyon	95 °C	15 sn	35
Primer bağlanması	Değişken*	15 sn	
Uzama	72	20 sn	
Son uzama	72	8 dk	1
Tutma (saklama)	20	∞	-

* Her bir primer çiftine özgü T_m sıcaklıkları Tablo 3.4'te listelenmiştir.

Tablo 3.4. WES Sonuçlarının Validasyonunda ve Segregasyon Analizlerinde Kullanılan Primer Çiftleri

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
OPTNe13F	CGGCCAGAGCTGATAATTAAA	60°C
OPTNe13R	TCTAAACACCATTGCTTTCCAA	
SPG11e37F	CGTATGCATTTCTGGCCCAA	59°C
SPG11e37R	ACGGTATTCACCCCTTCTGT	
FIG4e4F	GTGAATGGGAGATCACTCATG	57°C
FIG4e4R	CCACCATACATACCTAGCTTC	
ANXA11e13F	CCCTGATTGCTGCTTTCTGC	57.3°C
ANXA11e13R	CAGGGGGCTCTTTTGAGGA	
ANXA11e14F	TCACTGTGCTCACATGGTCTT	61°C
ANXA11e14R	GCAGCCTGAACACTCACGAT	
CYLDe9F	GAGCGAGAACACTGTTGGAG	62.5°C
CYLDe9R	TGGACGGGTGCAGTGTTTAG	
HSPBe1F	GACGTCCAGAGCAGAGTCAG	62.5°C
HSPBe1R	CACGCCATCCTTGGTCTTGA	
KIF5Ae24F	TTAGGGCTACGGCTGAGAGA	64.9°C
KIF5Ae24R	CCCCAGAGAGCAGAGGAAAA	
CAPN3e11F	ACCAACCCTCAGTACCGTCT	61°C
CAPN3e11R	TCAGGACTGCACACCTCGTA	

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin kontrolü %2'lik agaroz jel ile yapıldı. Hassas terazide 2 gr agaroz tartıldı ve 100 ml 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalgada

kaynatılarak çözüldü. DNA fragmentlerinin görüntülenmesinde DNA baz çiftleri arasına interkale olan (bağlanan) gel stain floresan boyası kullanıldı. 100 bç DNA markör eşliğinde 3 µl PCR örneği 2 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılarak 0.5X TBE yürütme tamponunda 120V'da 30' yürütüldükten sonra, UV ışığı altında Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System cihazında görüntülendi.

Tablo 3.5. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Malzeme Adı		Katalog Numarası	Firma
10X Elektroforez tamponu	0.89 M Tris-Base (pH 8.3)	01000258	Sigma, ABD
	0.89 M Boric acid		MP Biomedicals, ABD
	0.5M EDTA		Invitrogen, ABD
AGAROSE LE, 500G MERCK		11685678001	Sigma-Aldrich, ABD
GelRed™ Dropper Bottle		103.302-05	Olerup SSP, İsveç
GeneRuler 100 bp DNA Ladder		00767368	Thermo Scientific, ABD
6X TriTrack DNA Loading Dye		00747349	Thermo Scientific, ABD

3.6. Tüm Ekzom Dizileme Analizleri (WES)

Tez projesi kapsamında WES analizi MacroGen (Kore/Amsterdam) hizmet alımı ile yapıldı. WES analizinin temel aşamaları olan kütüphane hazırlanması, amplifikasyon ve sekanslama için 3 mikrogram (µg) gDNA hazırlandı. Biyoinformatik ham veri okumalarının temizlenmesi, kısa okumaların referans genomu göre (GRCh37/hg19 ve GRCh38/hg38) hizalanması, varyant çağırma ve anotasyon aşamalarından oluşmaktadır ve laboratuvarımızda (in-house) yapılmaktadır.

3.7. Deneylerde Kullanılan Kitler ve Laboratuvar Araç-Gereçleri

KUTTAM-NDAL’da gelişmiş bir moleküler biyoloji-genetik laboratuvarında bulunması gereken alt-yapı fazlasıyla mevcuttur. Bu tezde kullanılan laboratuvar kitleri ve malzemesi Tablo 3.6 ve 3.7’de listelenmiştir.

Tablo 3.6. DNA İzolasyonunda ve PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Kitler

Kit	Katalog Numarası	Firma
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	03730972001	3730964001
QIAquick Gel Extraction Kit	163033035	Qiagen, Almanya
QIAquick PCR Purification Kit (250)	163018180	Qiagen, Almanya
Genomic DNA Clean & Concentrator (25 preps)	ZRC175442	Zymo Research, ABD

Tablo 3.7. Deneylerde Kullanılan Laboratuvar Araç-Gereçleri

Mevcut Altyapı/ Araç-Gereç	Model/ Firma
Otoklav	ASB620T, Astell, UK
Hassas Terazı	TE612, Sartorius, Germany
Santrifüj Cihazları	C1301, Labnet, USA
	Microfuge16, Beckman Coulter, USA
Derin Dondurucular	2021D (-20 °C), Arçelik, Turkey
	HT5786-A (-86 °C), Hettich, Germany
DNA İzolasyon Sistemi	MagNA Pure Compact Instrument, Roche, Switzerland
Jel Dokümantasyon Sistemi	GelDoc Documentation System, BIO-RAD, USA
Elektroforez Tankı	Thermo Scientific, ABD
Güç Kaynağı, EC250-90	Thermo Scientific, ABD
Eppendorf Tüpleri	0.5mL, 1.5mL Biol-proof Tubes, Axygen, USA
Falcon Tüpleri	EasyOpen 50-ml Centrifuge Tubes, JETBIOFIL, USA
Cam Malzeme	Isolab, Germany
Isı Bloku	BBA1, Grant-Boekel, USA
Isıtıcı	MR3001, Heidolph, Germany
Mikrosantrifüj tüpleri	0.5mL Thin-wall Flat Cap Tubes, Axygen, USA
	0.5mL Thin-wall Flat Cap Tubes, Axygen, USA
	0.2mL Flat Cap PCR Tubes, Axygen, USA
	0.2mL 8 Strip PCR Strip Tubes, Starlab, Belgium
Mikrodalga fırın	Intellowave MD554, Arçelik, Turkey

Tablo 3.7. devam, Deneylerde Kullanılan Laboratuvar Araç-Gereçleri

Mevcut Altyapı/ Araç-Gereç	Model/ Firma
Mikropipetler	Rainin Pipet-Lite XLS, Mettler-Toledo International Inc., USA
Çok kanallı pipetler	Finnpipette F2, Thermo Scientific, USA
Pipetler	Finnpipette, Thermo Scientific, USA
Buzdolabı	4250T, Arçelik, Turkey
Spektrofotometre Cihazı	NanoDrop ND-2000c, Thermo Scientific, USA
PCR Cihazı	T100, Biorad, USA
	TC-512, Techne, UK
Pipet uçları/ Filtreli pipet uçları	Axygen
Vorteks Cihazı	FisonsWhirlimixer, Heidolph, Germany

3.8. Veri Tabanları ve Biyoinformatik Algoritmalar

WES analizinde tespit edilen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan web-temelli yazılım programları Tablo 3.8’de yer almaktadır.

Tablo 3.8. Varyant Değerlendirmede Kullanılan Biyoinformatik Araçlar ve Yazılım Programları

Yazılım Programları/ Veri Tabanları	Açıklamalar
CADD (Rentzsch ve ark., 2021)	İnsan genomundaki tek nükleotid değişimleri ve insersiyon/delesyon varyantlarının patojenitelerinin puanlama sistemi ile değerlendirildiği yazılım programı
CLC Main Workbench (QIAGEN Bioinformatics, Germany)	DNA, RNA ve protein sekans analizleri için yazılım programı

Tablo 3.8. devam, Varyant Değerlendirmede Kullanılan Biyoinformatik Araçlar ve Yazılım Programları

Yazılım Programları/ Veri Tabanları	Açıklamalar
ClinVar (Landrum ve ark., 2020)	Literatürde bildirilen çalışmalar ile desteklenen hastalık fenotiplerinin yer aldığı araştırmacılara açık veri tabanı
DANN (Quang ve ark., 2014)	Tanımlanan varyantın patojenite skorunun 0 ile 1 arasında puanlandığı algoritma (DANN skoru 1 olduğunda varyant patojenitesi en yüksek değere ulaşmaktadır)
dbSNP (Sherry ve ark., 2001)	Tek nükleotid değişimlerinin ve küçük insersiyon/delesyon varyasyonlarının bildirildiği veri tabanı
FinchTV	Sanger dizileme analizi sonuçlarının değerlendirildiği program
Franklin by Genoox	ACMG ilkelerine ve popülasyon-temelli veri tabanlarına göre varyantların sınıflandırıldığı yazılım programı
GERP++ (Davydov ve ark., 2010)	Tanımlanan genomik değişim pozisyonunun evrimsel süreçte korunmuşluk skoru
GnomAD	Geniş-çaplı DNA dizileme projelerinden elde edilen ekzom ve genom verilerinin bildirildiği veri tabanı
Integrative Genomics Viewer (IGV)	WES analizinde tespit edilen değişimin yer aldığı DNA dizisinin görüntülediği program
MutationTaster	Varyantın evrimsel korunmuşluk, splice bölge, mRNA, protein düzeyinde patojenitesinin in silico analizlerle değerlendirildiği biyoinformatik araç

Tablo 3.8. devam, Varyant Değerlendirmede Kullanılan Biyoinformatik Araçlar ve Yazılım Programları

Yazılım Programları/ Veri Tabanları	Açıklamalar
NCBI Primer Blast (Ye ve ark., 2012)	Hedef DNA bölgesini amplifiye etmek için primer tasarlanmasında kullanılan program
NetPrimer (Premier Biosoft)	Dizayn edilen primerlerin analizini sağlayan algoritmaların yer aldığı program
OligoCalc (Kibbe, 2007)	Dizayn edilen primerlerin analizini sağlayan algoritmaların yer aldığı program
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine)	Hastalıklarla ilişkilendirilen genlerin ve klinik fenotiplerin bildirildiği veri tabanı
REVEL (Ioannidis ve ark., 2016)	13 farklı biyoinformatik algoritmaların verdiği puanlara göre missense değişimlerin patojenitesinin değerlendirildiği program
RFFlow	Aile ağaçlarının çizildiği yazılım programı
SEQ Platform by Genomize	Ekzom verilerinin depolandığı, paylaşıldığı ve araştırmacılar tarafından analiz edilmesini sağlayan platform
SIFT (Ng ve Henikoff, 2003)	Amino asit değişiminin protein fonksiyonuna etkisinin değerlendirildiği program
UCSC database (Kent ve ark., 2002)	California Santa Cruz Üniversitesi'nin WEB tarayıcısı
Varsome (Kopanos ve ark., 2019)	Varyant ile ilgili genomik bilgilere, yayınlara, ACMG skorlarına ve algoritma tahminlerine ulaşılabilen veri tabanı

4. BULGULAR

Bu tez çerçevesinde, indeks olguların ALS/MNH ön tanısı aldığı sekiz aile araştırmaya alındı. Anne-baba akrabalığı sorgulandı ve yedi ailede ya doğrudan kan akrabalığı olduğu ya da aynı köyden oldukları öğrenildi. Aile ağaçları ve hasta bilgileri toplandıktan sonra, ailelerin ikisinde resesif hastalık öyküsü, altısında dominant geçiş olduğu görüldü ve *SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* ve *FUS* genlerinde mutasyon taşımadığı belirlenen indeks bireylere doğrudan ekzom dizileme ile analize başlandı.

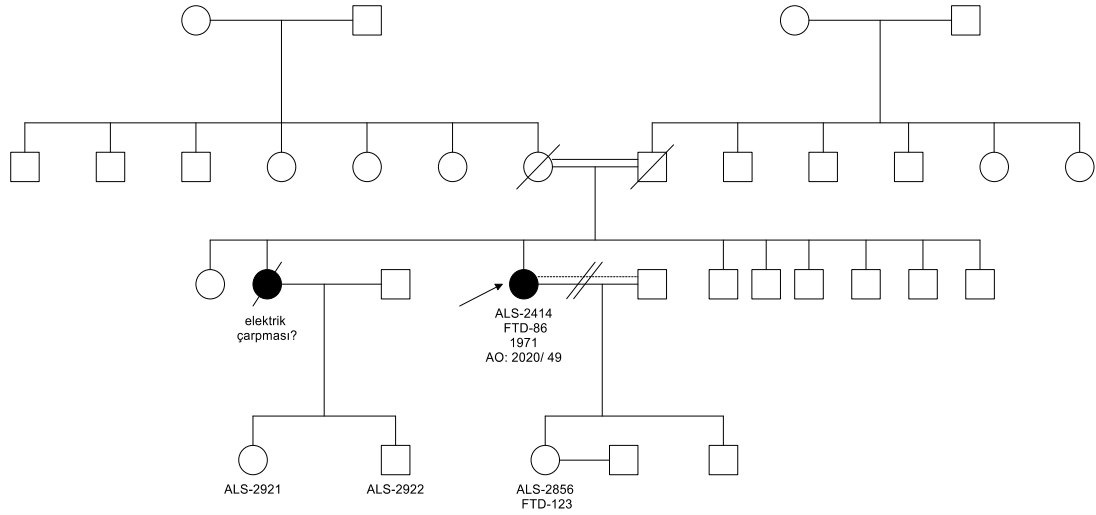
Sekiz ailede WES analizi ile toplam sekiz gen tanımlandı. Bu genlerdeki aday varyantlar Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanmış ve sonuçlar Ek-2’de verilmektedir. *ANXA11* geni birbirinden bağımsız iki ailede, farklı iki varyantla, görüldü. Buna karşılık bir ailede çift gen varyantı tanımlandı. Bulunan genlerin ve varyantların hastalardaki ALS hastalığının kesin nedeni olup olmadıkları, ya da motor nöron dejenerasyonuna nasıl katkıda bulundular, halen araştırma konusu olup, çalışmanın Tartışma kısmında irdelenecektir.

4.1. Aile 1: İndeks olgu ALS-2414/FTD-86, DT: 1971, Köken: Antalya

Şikayetleri 2020 yılında konuşma bozulması, yutma güçlüğü ve yürümede zorluk ile 49 yaşında başlayan olgunun ablasının benzer hastalık nedeniyle kaybedildiği ve ebeveynlerinin kuzen evliliği yaptığı bilgisi alınmıştır.

WES analizinde *OPTN* geninde ClinVar’da ‘olası patojenik’ girdisi olan homozigot c.1400A>C, p.Gln467Pro değişimi tanımlandı. *OPTN* geni OMIM’de ‘Amiyotrofik Lateral Skleroz-12’ ya da ‘ALS’ye eşlik eden Frontotemporal Demans’ ile ilişkilidir. Aile ağacı ALS için kalıtım modelinin otozomal resesif olduğunu göstermektedir (Şekil 4.1).

OPTN c.1400A>C p.Gln467Pro HOM ClinVar (Olası Patojenik)



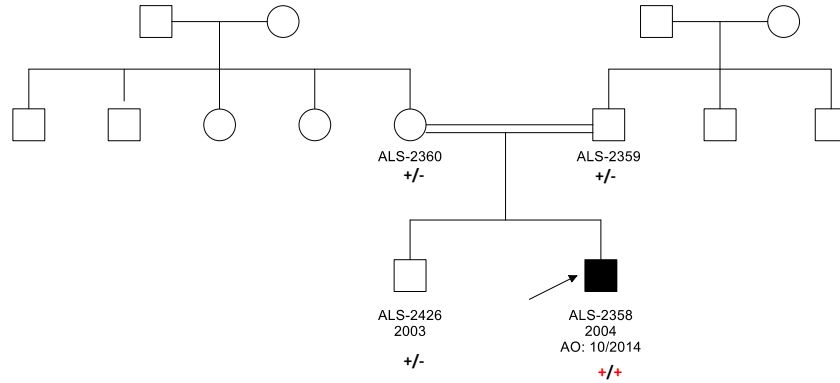
Şekil 4.1. Homozigot *OPTN* c.1400A>C, p.Gln467Pro varyantı tanımlanan ALS-2414/FTD-86'nın aile ağacı.

4.2. Aile 2: İndeks olgu ALS-2358, DT: 2004, Köken: Antalya

Çocukluk çağı (juvenil) ALS ön tanısı ile yönlendirilen hastanın progresif seyirli yakınmaları 10 yaşında oturup-kalkmada zorlanma ile başlamıştır. Anne-baba arasında akrabalık olduğu bilinmektedir. Hastanın elektrofizyolojik bulguları bilateral ulnar tuzak nöropatisi ile uyumlu bulunmuştur. Yaygın ön boynuz tutulumu, üst ve alt motor nöron bulguları bildirilmiştir.

WES analizinde *SPG11* geninde ClinVar'da 'VUS, anlamı bilinmeyen etki' ve 'olası benign' girdileri olan homozigot c.6759C>G, p.Asp2253Glu değişimi tanımlandı. *SPG11* geni OMIM'de 'Amiyotrofik Lateral Skleroz- 5, juvenil' ile ilişkilidir. Aile-içi segregasyon analizi anne (ALS-2360) ile babanın (ALS-2359), beklendiği gibi, varyantı heterozigot olarak taşıdıklarını gösterdi. Asemptomatik ağabey (ALS-2426) de bu mutasyonu heterozigot olarak taşımaktadır. Aile ağacı, kalıtım modelinin otozomal resesif olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2).

SPG11 c.6759C>G p.Asp2253Glu (HOM) ClinVar (VUS; olası benign)



Şekil 4.2. Homozigot *SPG11* c.6759C>G, p.Asp2253Glu varyantı tanımlanan ALS-2358’in aile ağacı.

4.3. Aile 3: İndeks olgu ALS-2341, DT: 1973, Köken: Antalya

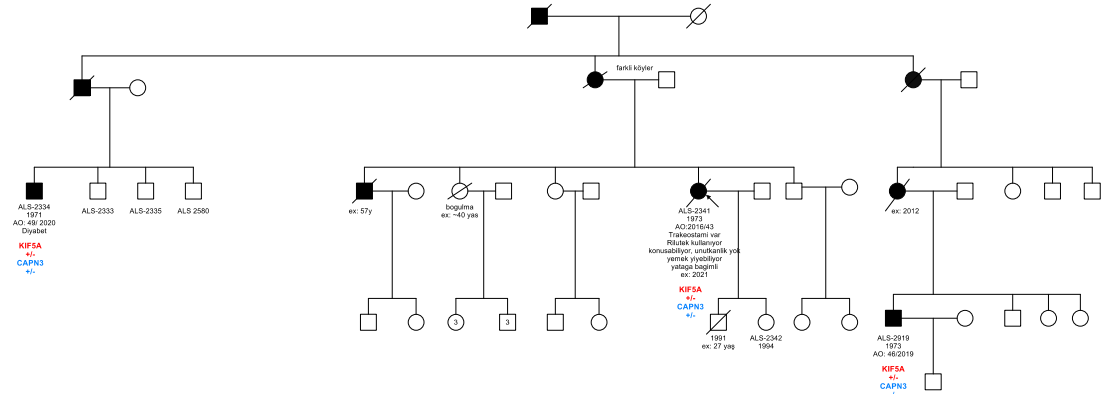
Genetik açıdan yüklü bir aile ağacı olan hastanın semptomları 43 yaşında yürüme güçlüğü ve düşmeler ile başlamıştır. EMG analizinde nörojenik tutulum gözlenerek bu bulgunun motor nöron hastalığını desteklediği söylenmiş, 2021 yılında solunum güçlüğü nedeniyle invaziv ventilatöre bağlanmış ve tetraplejik olduğu bildirilmiştir. Olgunun benzer hastalık bulunan kuzeninde (ALS-2334) 49 yaşında yürüme güçlüğü bilinmektedir, indeks birey ile obezite ve diyabet ortak fenotipik özellikleri gözlenmiştir. Yine benzer hastalık nedeniyle vefat eden diğer kuzenin ALS tanılı oğlunda (ALS-2919) bulgular 46 yaşında denge bozukluğu ile başlamıştır.

İndeks bireyin WES analizinde iki aday gen varyantı tanımlandı. i) *KIF5A* geninde heterozigot novel c.2738delG, p.Gly913AlafsTer135 ve ii) *CAPN3* geninde ClinVar’da ‘patojenik’ girdisi olan heterozigot c.1469G>A, p.Arg490Gln. *KIF5A* geni OMIM’de ‘ALS yatkınlık geni-25’, *CAPN3* ise ‘Limb-Girdle (uzuv-kuşak) müsküler distrofi (LGMD)’ ile ilişkilidir.

Aile-içi segregasyon, olguda görülen *KIF5A* gen varyantını, etkilenmiş kuzenin (ALS-2334) ve benzer hastalık nedeniyle vefat eden diğer kuzenin ALS tanılı oğlunun (ALS-2919) da taşıdığını gösterdi. *CAPN3* değişimi için ALS-2334’ün de, indeks olgu gibi, heterozigot olduğu, ALS-2919’un ise mutasyonu taşımadığı saptandı. Aile ağacı, ALS için kalıtım modelinin otozomal dominant olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3).

KIF5A c.2738delG p.Gly913Alafs*135 (HET) (NOVEL)

CAPN3 c.1469G>A p.Arg490Gln (HET) ClinVar (Patojenik)

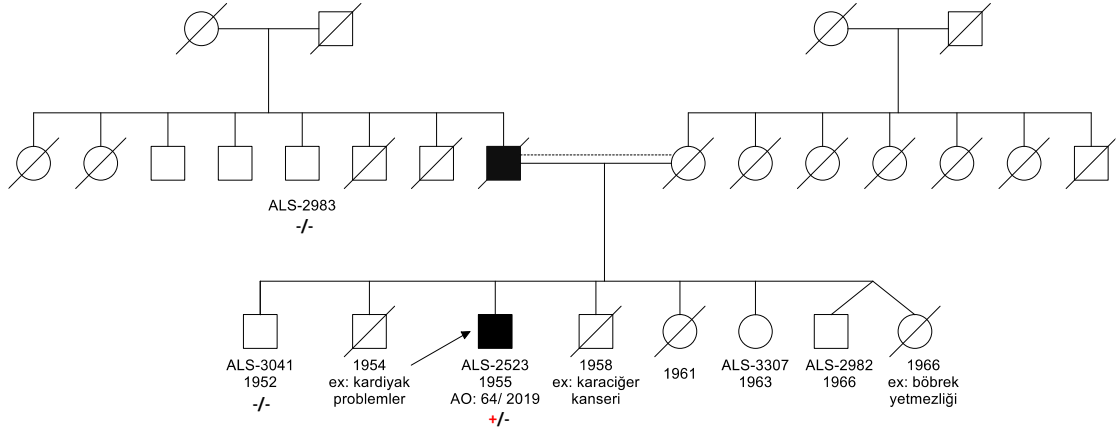


Şekil 4.3. Heterozigot *KIF5A* c.2738delG, p.Gly913Alafs*135 ve *CAPN3* c.1469G>A, p.Arg490Gln varyantı tanımlanan ALS-2341'in aile ağacı.

4.4. Aile 4: İndeks olgu ALS-2523, DT: 1955, Köken: Antalya

Babasında benzer yakınma tarif edilen ve hastalık başlangıç yaşı 64 olan indeks olgunun klinik bulguları alt ekstremitelerde güçsüzlük ile başlamış ve progresif seyir göstermiştir. Ağırlıklı olarak alt motor nöron tutulumu bildirilen olgunun bilişsel bozukluk/ demans, periferik sistem bulgusu, serebellar ve ekstrapiramidal semptomları bulunmamaktadır. WES analizinde, *FIG4* geninin dördüncü ekzonunda ALS geninde daha önce literatürde tanımlanmamış olan (novel), stop kodonu oluşumu ile sonuçlanan protein terminasyon varyantı c.318T>G, p.Tyr106Ter heterozigot olarak gözlemlendi. *FIG4* gen varyantları 'Amiyotrofik Lateral Skleroz-11' ile ilişkilidir. Segregasyon analizi için aileden örnek istendi, anne-baba yokluğunda asemptomatik amca (ALS-2983) ve abi (ALS-3041) örnekleri alındı. Segregasyon analizi, ağabey ve amcanın, beklendiği şekilde, bu mutasyonu taşımadığını gösterdi. Aile ağacı otozomal dominant kalıtım modeline işaret etmektedir (Şekil 4.4).

FIG4 c.318T>G p.Tyr106Ter (HET) (NOVEL)

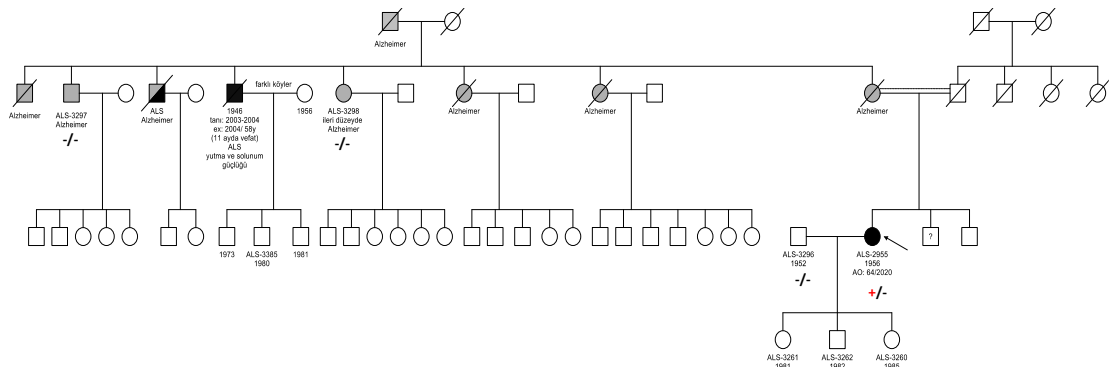


Şekil 4.4. Heterozigot *FIG4* c.318T>G, p.Tyr106Ter varyantı tanımlanan ALS-2523'ün aile ağacı.

4.5. Aile 5: İndeks olgu ALS-2955, DT: 1956, Köken: Antalya

Spinal başlangıçlı olguda yakınmalar 64 yaşında Mill sendromu gibi başlayıp progresif seyretmiştir. Anne tarafında çok sayıda Alzheimer tanılı birey ve hayatta olmayan iki dayısında indeks olguya benzer hastalık olduğu raporlanmıştır. Olguda demans bulgusu yoktur ve klinik fenotip izole sistem tutulumu ile uyumludur. WES analizinde gözlenen, *ANXA11* genindeki heterozigot c.1156C>T, p.Arg386Trp genomik değişimi ClinVar veri tabanında benign (nötral) olarak değerlendirilmektedir. *ANXA11* genindeki düşük frekanslı/patojenik varyantlar OMIM'de 'Amiyotrofik Lateral Skleroz-23' ile ilişkilidir. Aile bireylerine yapılan Sanger segregasyon analizinde; Alzheimer tanılı teyze (ALS-3298) ve dayı (ALS-3297) ile asemptomatik eşinde (ALS-3296) bu varyant gözlenmedi. Aile ağacı, otozomal dominant kalıtım ile uyumludur (Şekil 4.5).

***ANXA11* c.1156C>T p.Arg386Trp (HET) (REPORTED) ClinVar (Benign)**

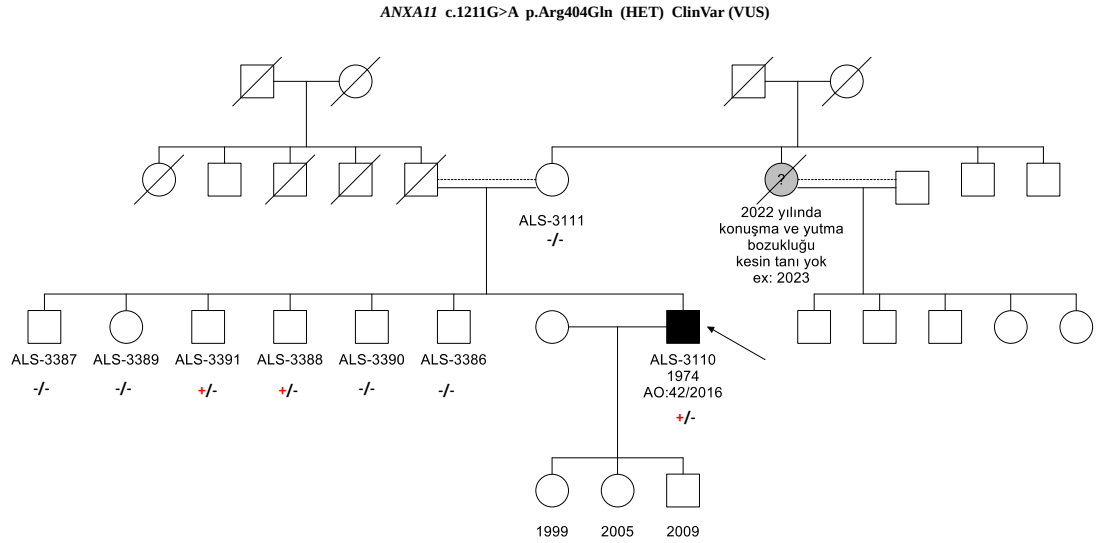


Şekil 4.5. Heterozigot *ANXA11* c.1156C>T, p.Arg386Trp varyantı tanımlanan ALS-2955'in aile ağacı

4.6. Aile 6: İndeks olgu ALS-3110, DT: 1974, Köken: Konya

Hastanın progresif seyirli semptomları 42 yaşında alt ve üst ekstremitelerde başlamıştır. Alt ve üst motor nöron tutulumu tanımlanan hastada, kognitif/ bilişsel bozukluk, periferik sistem, serebellar ve ekstrapiramidal bulgunun olmadığı ve klinik fenotipin izole sistem tutulumu ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. EMG analizi sonucu ALS tanısı kesinleşen olguya trakeostomi açıldığı ve hastanın tetraplejik olduğu bilimiz dahilindedir. Teyzesinde 2022 yılında konuşma ve yutma güçlüğü gözlenmekle birlikte, tanı almadığı ve 2023 yılında kaybedildiği bildirilmiştir.

WES analizinde, *ANXA11* geninde tanımlanan heterozigot c.1211G>A, p.Arg404Gln varyantının ClinVar ‘VUS’ girdisi bulunmaktadır. Segregasyon analizinde, asemptomatik iki ağabeyinin (ALS-3391 ve ALS-3388) varyantı taşıdığı gözlenirken, asemptomatik anne (ALS-3111) ve kendisinden büyük diğer dört kardeşin ise (ALS-3387, ALS-3389, ALS-3390, ALS-3386), normal diziyi taşıdığı gösterildi. Aile ağacı otozomal dominant kalıtım ile uyumludur (Şekil 4.6).



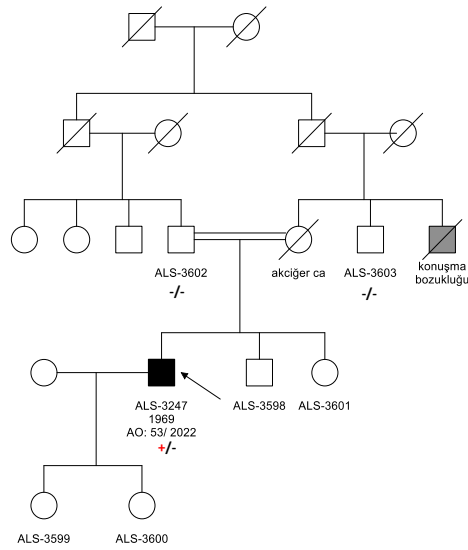
Şekil 4.6. Heterozigot *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln varyantı tanımlanan ALS-3110'un aile ağacı.

4.7. Aile 7: İndeks olgu ALS-3247, DT: 1969, Köken: Antalya

Hastanın bulguları 53 yaşında ilerleyen konuşma bozukluğu ile başlamıştır. Klasik bulber olguda davranışsal kognitif bulgular ve hayatta olmayan dayısında frontal tutulumu destekleyebilecek belirtiler bildirilmiştir. Fiziksel muayenede üst motor nöron ağırlığı tanımlanan bireyin EMG analizi normal olarak değerlendirilmiştir.

WES analizinde, *CYLD* geninde literatürde daha önce tanımlanmamış (novel) c.1189C>T, p.Arg397Cys değişimi heterozigot olarak gözlemlendi. *CYLD* gen mutasyonları OMIM’de ‘Frontotemporal Demans ve/veya ALS-8’ ile ilişkilidir. Asemptomatik baba (ALS-3602) ve dayının (ALS-3603) bu mutasyonu taşımadıkları gösterildi. Aile ağacı, ALS için kalıtım modelinin otozomal dominant olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.7).

CYLD c.1189C>T p.Arg397Cys (HET) (NOVEL)

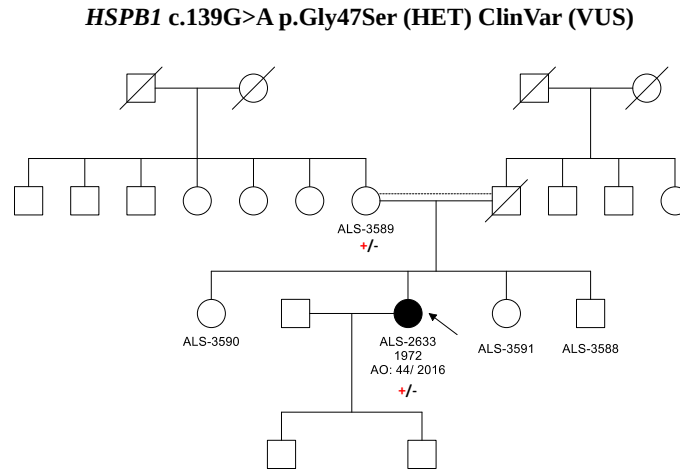


Şekil 4.7. Heterozigot *CYLD* c.1189C>T, p.Arg397Cys varyantı tanımlanan ALS-3247’nin aile ağacı.

4.8. Aile 8: İndeks olgu ALS-2633, DT: 1972, Köken: Antalya

Yakınmaları 44 yaşında ilerleyen kas güçsüzlüğü ile başlamıştır. Olgunun tetraplejik ve invaziv ventilasyona bağlı olduğu, perkütan endoskopik gastrostomi (PEG) açıldığı ve eksternal göz hareketleri ile iletişim kurabildiği bilgisi bulunmaktadır. EMG bulguları ALS ile uyumludur.

WES analizinde, *HSPB1* geninde ClinVar'da VUS girdisi olan ACMG'ye göre de olası benign olarak sınıflandırılma heterozigot c.139G>A, p.Gly47Ser değişimi saptandı. *HSPB1* geni OMIM'de 'Nöronopati, Distal Hereditör Motor-3; HMND-3' ile ilişkilidir. Analiz asemptomatik annenin (ALS-3589) de bu varyantı heterozigot olarak taşıdığını gösterdi. Aile ağacı, *HSPB1* geni için otozomal dominant kalıtım modeline işaret etmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Heterozigot *HSPB1* c.139G>A, p.Gly47Ser varyantı tanımlanan ALS-2633'ün aile ağacı.

Tablo 4.1 tanımlanan gen varyantları ile ilgili OMIM bilgilerini, Tablo 4.2 algoritmalar tarafından belirlenen patojenite skorları ve varyant frekanslarını göstermektedir.

Tablo 4.1 Ailesel ALS ailelerinde tanımlanan varyantlar ve OMIM bilgileri

Aile Numarası	NDAL Numarası	Gen	Varyant			Gen Dozajı	OMIM’de ilişkili Hastalık
			DNA Değişimi	Protein Değişimi	Transkript Numarası		
1	ALS-2414/FTD-86	OPTN (# 613435)	c.1400A>C	p.Gln467Pro	ENST00000378748.3	Hom	ALS-12 / FTD
2	ALS-2358	SPG11 (# 602099)	c.6759C>G	p.Asp2253Glu	ENST00000261866.7	Hom	ALS-5
3	ALS-2341	KIF5A (# 617921)	c.2738delG	p.Gly913AlafsTer135 ⁿ	ENST00000455537.2	Het	ALS-25
		CAPN3 (# 618129)	c.1469G>A	p.Arg490Gln	ENST00000397163.3	Het	LGMD-4
4	ALS-2523	FIG4 (#612577)	c.318T>G	p.Tyr106Ter ⁿ	ENST00000230124.3	Het	ALS-11
5	ALS-2955	ANXA11 (# 617839)	c.156C>T	p.Arg386Trp	ENST00000438331.1	Het	ALS-23
6	ALS-3110	ANXA11 (# 617839)	c.1211G>A	p.Arg404Gln	ENST00000438331.1	Het	ALS-23
7	ALS-3247	CYLD (# 619132)	c.1189C>T	p.Arg397Cys ⁿ	ENST00000427738.8	Het	FTD / ALS-8
8	ALS-2633	HSPB1 (# 608634)	c.139G>A	p.Gly47Ser	ENST00000248553.7	Het	HMND-3

n: daha önce tanımlanmamış novel varyant

Tablo 4.2. Tanımlanan varyantların algoritmalar tarafından belirlenen patojenite skorları ve frekansları

Aile Numarası	Gen	Kromozomal Lokalizasyon	Varyant	ACMG Sınıflandırma (Varsome)	DANN Skoru	CADD Skoru	GERP Skoru	gnomAD	NDAL Frekansı
1	<i>OPTN</i>	10:13169902	p.Gln467Pro	Patojenik (PP3, PP5, PM1, PM2)	0.9952	31.0000	5.4500	-	1/1785
2	<i>SPG11</i>	15:44858499	p.Asp2253Glu	Olası benign (BP4, BP1, PM2)	0.7024	10.3300	5.6600	-	1/1783
3	<i>KIF5A</i>	12:57974934	p.Gly913AlafsTer135 ⁿ	Olası patojenik (PVS1, PM2, PP3)	-	-	-	-	1/1785
	<i>CAPN3</i>	15:42693953	p.Arg490Gln	Patojenik (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	0.9995	28.8000	4.6900	-	2/1132
4	<i>FIG4</i>	6:110048340	p.Tyr106Ter ⁿ	Olası patojenik (PVS1, PM2)	0.9954	34.0000	4.9700	-	1/1792
5	<i>ANXA11</i>	10:81921715	p.Arg386Trp	Olası benign (BS1, BS2, BP4, BP6, BP1)	0.9991	26.1000	5.0700	0.0003199	1/1627

n: daha önce tanımlanmamış novel varyant

Tablo 4.2. devam, Tanımlanan varyantların algoritmalar tarafından belirlenen patojenite skorları ve frekansları

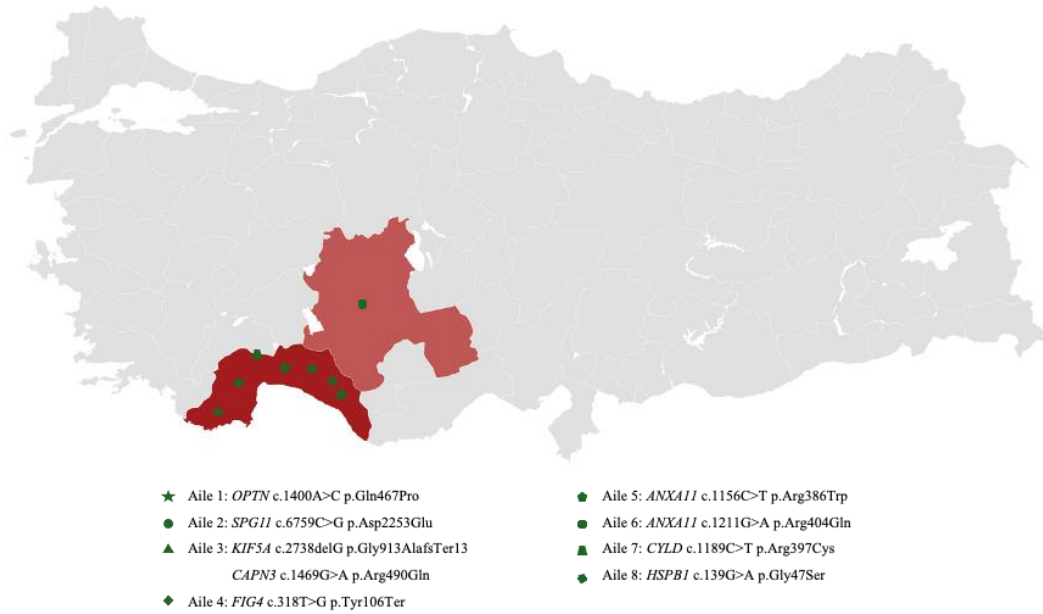
Aile Numarası	Gen	Kromozomal Lokalizasyon	Varyant	ACMG Sınıflandırma (Varsome)	DANN Skoru	CADD Skoru	GERP Skoru	gnomAD	NDAL Frekansı
6	<i>ANXA11</i>	10:81918921	p.Arg404Gln	Etkisi bilinmeyen varyant (PM2, BP1)	0.9994	24.9000	5.1400	0.000003983	1/1669
7	<i>CYLD</i>	16:50779715	p.Arg397Cys ⁿ	VUS (PM2, PP2)	0.9940	21.7000	5.9100	0.00002632	1/1788
8	<i>HSPB1</i>	7:76302851	p.Gly47Ser	Olası benign (BP4, PM2)	0.9477	13.0600	4.7700	-	1/1779

n: daha önce tanımlanmamış novel varyant

5. TARTIŞMA

Anadolu Yarımadası'nda özgün bir coğrafi konum üzerinde yer alan Türkiye, genç ve dinamik bir nüfusa sahip büyük bir ülkedir. Demografik yapısında bir yandan yüksek doğum oranı ve akraba evliliği yayginken, diğer yandan da Türk toplumunun, çok farklı etnik grupların bir arada yaşamasından kaynaklanan yüksek bir genetik heterojenite ile karakterize olduğu bilinmektedir.

Bu tez çerçevesinde, daha önce dört majör ALS geninde (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* ve *FUS*) mutasyon taşımadığı saptanan, kompleks bir klinik öyküye sahip ve birbirinden bağımsız sekiz ailesel ALS olgusu çalışmaya alındı. ALS'den sorumlu tutulan gen sayısı veri tabanlarında gün geçtikçe artmakta olduğundan, bu olgulara daha nadir görülen ALS-ilişkili genleri araştırmak için WES yöntemi uygulandı. Teze dahil edilen sekiz indeks olgunun yedisinde ya doğrudan anne-baba akrabalığı vardı ya da anne-baba aynı köydendiler. Sekiz aileden yedisi Antalya'lı, biri ise Konya'lıydı (Şekil 5.1). Akraba evliliği bulunan iki ailede ALS ile ilişkili iki ayrı gende, otozomal resesif geçişli, homozigot gen varyantı saptanırken, geriye kalan altı ailede otozomal dominant kalıtmımlı hastalıklarla ilişkilendirilen heterozigot gen varyantları tanımlandı (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Ailesel ALS olgularında tanımlanan gen varyantlarının kökenlerine göre dağılımı

5.1. Tez’de Tanımlanan ALS Genleri ve Proteinleri

5.1.1. Optineurin (*OPTN*)

Optineurin proteini hücre-içi veziküler taşımada ve protein inklüzyonlarının ortadan kaldırılmasını sağlayan otofaji mekanizmasında rol oynar. Kromozomal lokalizasyonu 10p13 olan *OPTN* geninde meydana gelen genomik değişimler bir göz hastalığı olan glokom ve ALS ile ilişkilidir (Medchalmi ve ark., 2021). Literatürde ailesel ALS olgularında *OPTN* gen mutasyonlarının görülme sıklığı % 2-3’tür (Ghasemi ve Brown, 2018).

NDAL’da yapılan çalışmalarda Türkiye’deki ALS olgularında *OPTN* geninde homozigot -AA çerçeve kayması ve genelde *OPTN* mutasyonlarının sık olduğu dikkat çekmişti. Klasik ALS fenotipli olgularda erken-başlangıçlı demans bulgusu da vardı (Özoğuz ve ark., 2015; Tunca ve ark., 2020).

Bu tez çerçevesinde, anne-babası arasında birinci derece akrabalık olan, bulber ve spinal başlangıçlı bir ALS olgusunda (ALS-2414/FTD-86) *OPTN* geninde ClinVar veri tabanında olası patojenik olarak değerlendirilen homozigot missense (c.1400A>C) mutasyonu ve buna bağlı *OPTN* proteininde amino asit değişimi (p.Gln467Pro) saptandı. Benzer klinik öyküye sahip olan ablası ALS nedeniyle kaybedildiğinden değerlendirilmeye alınamadı. Olguda motor nöron bulgularına ek olarak demansın da varlığı, *OPTN* genindeki mutasyonların literatür ile uyumlu olarak FTD ile ilişkili olduğunu desteklemektedir (Kacem ve ark., 2023). *OPTN* genindeki bu varyant ClinVar’da olası patojenik ve ACMG’de patojenik olarak sınıflandırıldığından olgudaki klinik tabloyu açıklamaktadır.

5.1.2. Spataksin (*SPG11*)

Kromozom 15q21.1’de lokalize olan *SPG11* geni aksonal taşımadan sorumlu spataksin proteinini kodlar (León-Castillo ve ark., 2023). *SPG11*’deki bialelik (homozigot veya birleşik heterozigot) mutasyonlar resesif geçişli SPG11, CMT2X ve juvenil ALS’ye neden olmaktadır (Chen ve ark., 2022; Santos Silva ve ark., 2023). Ailesel ALS olgularında *SPG11* gen mutasyonlarının prevalansı %1’in altındadır (Ghasemi ve Brown, 2018).

2010 yılında Orlacchio ve ark. tarafından yayımlanan ve aralarında Türk kökenli bir ailenin de bulunduğu juvenil ALS olguları üzerine yapılan çalışmada, erken yaş başlangıçlı motor nöron tutulumu ile birlikte yavaş ilerleyen nöronopati klinik tablosu bildirildi. Olguların bazılarında semptomlar hafif seyrederken, ilerleyen evrelerde tekerlekli sandalyeye bağımlı vakalar da gözlemlendi (Orlacchio ve ark., 2010).

Çakar ve ark. 2020 yılında, Türk toplumunda altı farklı ailede *SPG11* geninin fenotipik spektrumunun geniş bir yelpazede gözlemlendiğini vurguladı (Çakar ve ark., 2020).

Tez çerçevesinde anne-babası akraba olan juvenil ALS ön-tanılı hastanın (ALS-2358) *SPG11* geninde literatürde tarif edilen homozigot c.6759C>G varyantı ve *SPG11* proteininde p.Asp2253Glu değişimi saptandı. İlk şikayetleri 10 yaşında başlayan olgunun fiziki muayenesinde, ilerleyen kas güçsüzlüğü ve alt ekstremitte tutulumu olduğu bildirilmişti. Spinal müsküler atrofi (SMA) dışlanan, EMG analizi sonucu juvenil ALS klinik tanısı konulan hastada ayrıca nöropati belirtileri de gözlemlendi. Bu varyantın ClinVar'da 7 benign, 3 VUS girdisi bulunmakla birlikte olgulara ait klinik bilgi bulunmadığı için indeks birey ile kıyaslanamamıştır. Ancak, olguda hem varyantın homozigot olması hem de hastanın semptomlarının erken başlangıçlı olması hastadaki ALS kliniğini açıkladığından bu varyantın patojenik olabileceği düşünülmekle birlikte, bu varyantın patojenitesinin kanıtlanabilmesi için daha fazla ALS olgusunda bildirilmesine ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.1.3. Kinesin family member 5A (*KIF5A*)

Kinezin protein ailesinin üyesi olan ve ağırlıklı olarak nöronlarda sentezlenen *KIF5A*, hücre-içi proteinlerin, organellerin ve hücre iskeleti bileşenlerinin mikrotübüller aracılığıyla taşınmasında görevlidir (Hirokawa ve ark., 2009). 2018 yılında Nicolas ve ark. tarafından, ALS olguları ve kontrol bireyleri ile yapılan çalışmada, *KIF5A* yeni bir ALS geni olarak tanımlandı. Kromozomal lokalizasyonu 12q13.3 olan *KIF5A* geninin kodladığı proteinin C-terminalinde gözlenen değişimler ALS fenotipine neden olurken, N-terminalinde tanımlanan mutasyonlar *SPG10* ve *CMT2* ile ilişkilendirilmiştir. ALS'ye katkı oranı %1'den daha az olarak belirtilen *KIF5A* varyantlarının missense değişimlerden ziyade, çerçeve kayması ve splice mutasyonlarının, fonksiyon-kayıbı yoluyla ALS hastalığına neden olduğu bildirilmiştir (Brenner ve ark., 2018; Nicolas ve ark., 2018; Akçimen ve ark., 2023).

Tez kapsamında, indeks bireyin (ALS-2341) *KIF5A* geninde daha önce literatürde bildirilmemiş olan ALS için hot-spot bölgedeki heterozigot novel c.2738delG delesyonu ve *KIF5A* proteininde bu delesyonla ortaya çıkan çerçeve kayması p.Gly913Alafs*135 tanımlandı. Olguda, hasta kuzeninde (ALS-2334) ve benzer hastalık nedeniyle kaybedilen diğer kuzeninin ALS tanılı oğlunda (ALS-2919) yürüme güçlüğü ve denge bozukluğu ile başlayan semptomlar tanımlanmıştı. Ailede hastalık başlangıç yaşı yaklaşık 46 olarak bildirildi. Yakınmalar başladıktan beş yıl sonra solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilen indeks olgudaki varyant ailedeki diğer etkilenmiş bireylerde de (ALS-2334 ve ALS-2919) gösterildi.

WES analizinde tanımlanan ikinci nörolojik bulgu literatürde tarif edilmiş, patojenite skorları güçlü olan ve ClinVar'da 'patojenik' girdisi bulunan *CAPN3* genindeki heterozigot missense mutasyon c.1469G>A ve protein düzeyinde p.Arg490Gln değişimidir. *CAPN3* varyantları LGMD ile ilişkilidir. Olgunun fenotipinin LGMD ile değil, ALS ile uyumlu olduğu bilinmektedir. Ailedeki diğer ALS tanılı bireylerden ALS-2334'ün *CAPN3* gen varyantını taşıdığı tanımlanırken, ALS-2919'un bu değişim için normal olduğu gözlemlendi. Bu ailede hastalıktan sorumlu genin *KIF5A* olduğu düşünülmekle birlikte, *CAPN3* gen varyantının hastalığın seyrine katkıda bulunup bulunmadığı da araştırma konusudur.

5.1.4. Fosfoinositid 5-fosfataz (*FIG4*)

Kromozomal lokasyonu 6q21 olan *FIG4* geni fosfoinositid (PI) 5-fosfataz enzimini kodlar. Endozom-lizozom mekanizmasında ve otofaji sisteminde görev alan *FIG4* genindeki bialelik mutasyonlar otozomal resesif kalıtmı CMT4J ve Yunis Varón sendromu ile ilişkilendirilirken, heterozigot değişimler ALS'ye neden olur (Volpicelli-Daley ve De Camilli, 2007; Chow ve ark., 2009).

CMTJ4 ailelerinde *FIG4* geninde heterozigot null varyant taşıyan asemptomatik olguların geç-başlangıçlı ALS için presemptomatik olabilecekleri veya penetrasyon düşüklüğü nedeniyle hastalığın ortaya çıkmayabileceği belirtilmiştir. Bulgu CMTJ4 ailelerinde, patojenik heterozigot *FIG4* gen varyantlarının ALS ve PLS için risk faktörü olabileceğine işaret etmektedir (Chow ve ark., 2009).

Bu tez çalışmasında, babasında benzer hastalık tarif edilen ALS tanılı olguda (ALS-2523) *FIG4* geninde novel heterozigot c.318T>G nonsense mutasyonu ve buna bağlı

olarak proteinde oluşan stop kodonu (p.Tyr106Ter) tanımlandı. Olguda semptomlar 64 yaşında alt ekstremitelerde güçsüzlük ile başlamıştır. Literatürde *FIG4* mutasyonu taşıyan olgularda demans bulgusu bildirilirken (Bergner ve ark., 2020), indeks birey klasik ALS fenotipi göstermekte olup, demans bulgusu yoktur. ALS tanılı babası hayatta olmadığı için değerlendirilmeye alınamazken, asemptomatik amcası (ALS-2983) ve ağabeyi (ALS-3041) bu varyantı taşımamaktadır.

5.1.5. Annexin A11 (ANXA11)

Kromozomal lokasyonu 10q22.3 olan *ANXA11* (*annexin A11*) geni kalsiyum-bağımlı fosfolipid bağlama proteini olan annexin A11'i kodlamaktadır. ANXA11 proteini hormonların, sindirim enzimlerinin, immün sistemde rol oynayan düzenleyicilerin ve nörotransmitter moleküllerin salınımı için gerekli veziküler taşımada ve ekzositoz süreçlerinde görev almaktadır (Gerke ve Moss, 2002).

C9orf72 geninde patojenik ekspansiyon taşımayan Avrupa kökenli 751 ailesel ALS olgusu ile yapılan çalışmada, *ANXA11* genindeki mutasyonların, fonksiyon kaybı ve dominant negatif etki mekanizmalarıyla ALS hastalığının ortaya çıkmasında etkili olabileceği ilk kez Smith ve ark. tarafından 2017 yılında bildirildi (Smith ve ark., 2017).

2020 yılında Nahm ve ark. tarafından bildirilen, Kore kökenli 500 sALS olgusu ile yapılan çalışmada, olası patojenik (p.Asp40Gly) ve VUS (p.Gly38Arg, p.His390Pro, ve p.Arg456His) olarak değerlendirilen varyantlar tanımlandı ve bu varyantlar üzerine bir dizi fonksiyonel çalışma tasarlandı. Elde edilen sonuçlar, *ANXA11* mutasyonlarının, proteinin fonksiyon kaybı yoluyla ALS'ye neden olabileceğinin yanı sıra, ALS'nin temel patolojik mekanizmalarından olan protein agregasyonuna bağlı toksik fonksiyon-kazanımı yoluyla da hastalığın moleküler ilerleyişinde rol oynayabileceğini göstermiştir (Nahm ve ark., 2020).

Bu tez çerçevesinde iki farklı ailede *ANXA11* gen varyantı tanımlandı. Aile5'de tanımlanan *ANXA11* genindeki heterozigot c.1156C>T ve protein düzeyindeki p.Arg386Trp değişimi, Nahm ve ark. tarafından yayımlanan p.His390Pro mutasyonuna yakın pozisyonda olması nedeniyle VUS olarak değerlendirildi (Nahm ve ark., 2020). Spinal başlangıçlı olgunun (ALS-2955) hastalık başlangıç yaşının 64 olduğu bilinirken, hastalık seyrinin progresif olarak ilerlediği bildirildi. İndeks

olgunun anne tarafında çok sayıda Alzheimer tanılı birey olmasına rağmen, olguda demans bulgusu tarif edilmedi. *ANXA11* genindeki p.Arg386Trp varyantının, hem ClinVar’da benign olarak raporlanmasından ötürü, hem de gnomAD’deki nispeten yüksek frekansından dolayı, bugünkü bilgilerimiz ışığında ALS’den sorumlu olmadığı düşünülmektedir.

Aile 6’daki indeks olgunun (ALS-3110) *ANXA11* geninde heterozigot c.1211G>A ve genin ürünü proteinde p.Arg404Gln değişimi saptandı. Hastalık öyküsü alt ve üst ekstremitelerde tutulumu ile başlayan bireyin ALS tanısı kesin olmayan teyzesinde, benzer yakınmalar konuşma ve yutma güçlüğü ile başlamış ve hasta bir yıl içinde kaybedilmiştir. Bu varyant, asemptomatik iki ağabeyinde de heterozigot olarak bulunurken, asemptomatik annesinde (ALS-3111) gözlenmedi. Genetik analize, babanın örneği mevcut olmadığı için dahil edilemedi. Ağabeylerinde aynı varyant bulunmasına rağmen hastalık görülmemesi, ClinVar veri tabanında VUS olarak tanımlanan *ANXA11* genindeki bu varyantın, bugünkü bilgilerimiz çerçevesinde hastalık nedeni olarak değerlendirilemeyeceğini göstermekle birlikte, asemptomatik ağabeylerinin klinik takibi de önem kazanmaktadır.

5.1.6. CYLD lizin-63 deubikitinaz (CYLD)

Kromozomal lokasyonu 16q12.1 olan *CYLD* geni, lizin-63’e bağlı poliubikitin zincirlerini ayırarak hücre proliferasyonunu düzenleyen bir deubikitinazı kodlar. *CYLD* proteini ALS’nin temel patolojik mekanizmalarından biri olan otofajide rol oynamaktadır (Komander ve ark., 2008). 2020 yılında bildirilen çalışmada ilk kez bu gendeki fonksiyon-kazanımı mutasyonları FTD-ALS ile ilişkilendirilmiştir (Dobson-Stone ve ark., 2020).

Gu ve ark.’nın sALS olgusunda tanımladıkları heterozigot c.1189C>A değişimi ile 397.pozisyondaki arjinin amino asidi serin’e dönüşürken, bu tez çalışmasında heterozigot c.1189C>T değişimi ile aynı pozisyondaki arjinin amino asidinin (p.Arg397Cys) sistein amino asidine değiştiği belirlendi. Her iki durumda da genomik değişim ile pozitif yüklü bir amino asit, nötral bir amino aside dönüştüğünden her iki varyantın protein üzerine benzer etkilerinin olduğu öngörülmektedir. Ancak, serin amino asidinin hidroksil yan grubuna sahipken, sistein amino asidini sülfür grubu içeriyor olmasının, proteinin yapısını nasıl etkilediğini gösterebilmek için protein

modelleme çalışmalarına ihtiyaç vardır. Çin kökenli sporadik olgunun semptomları 55 yaşında alt ekstremitelerde başlangıç gösterdiği ve hayatta kalma süresinin yaklaşık altı ay olduğu bildirildi (Gu ve ark., 2021). Ailesel ALS olgusunun (ALS-3247) semptomları konuşma bozukluğu ve kognitif bulgular olarak bildirildi. Asemptomatik babada ve dayıda bu varyant saptanmazken, anne, akciğer kanseri nedeniyle kaybedilmesinden ötürü, değerlendirilmeye alınamadı. Ailede anne tarafında benzer hastalık öyküsü bulunduğu için ALS'nin anne tarafından kalıtıldığı düşünülmekte, ancak olgunun konuşma bozukluğu öyküsü olan dayısı hayatta olmadığı için, dayının aynı varyanta sahip olup olmadığı gösterilemediğinden 'VUS' olarak belirtilen bu varyantın ALS'nin genotip-fenotip ilişkisini açıklamada yetersiz kaldığı düşünülmektedir.

5.1.7. Heat shock protein beta-1 (*HSPB1*)

Kromozomal lokasyonu 7q11.23 olan *HSPB1* geni, ısı-şoku proteini beta-1'i kodlar. Beta1-türü moleküler şaperonlar, oksidatif stres, protein yanlış katlanması gibi hücresel strese karşı motor ve duyuşal nöronların canlı kalabilmesinde aktif rol oynar. *HSPB1* genindeki heterozigot mutasyonlar dominant kalıtmımlı CMT2'nin aksonal formu ve dHMN ile ilişkilendirilmiştir. Bu iki fenotip klinik ve patolojik açıdan ağırlıklı olarak distal motor tutulumu açısından örtüşmektedir (Capponi ve ark., 2011).

İtalya kökenli dHMN ve CMT2 hastalarının bulunduğu kohortta *HSPB1* ve *HSPB8* genlerindeki mutasyonlar araştırılmıştır. İlk klinik muayenesinde üst ve alt motor nöron tutulumu gözlenen dHMN tanılı olguda *HSPB1* proteininin N-terminalinde p.Glu41Lys mutasyonu tanımlandı. İndeks bireyin annesinde de benzer hastalık tarif edilmiş ve annenin de bu mutasyonu taşıdığı gözlenerek segregasyon analizinin uyumlu olduğu bildirildi (Capponi ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında incelenen indeks bireyin (ALS-2633) yakınmaları kas güçsüzlüğü ile başlamış, EMG bulguları ile ALS tanısı kesinleşmiştir. Periferik sinir sistemi tutulumu nedeniyle nöronopati grubunda değerlendirilen olgunun WES analizinde, HMND-3 ile ilişkilendirilen *HSPB1* geninde ClinVar veri tabanında VUS girdisi bulunan heterozigot c.139G>A missense varyantı ve protein düzeyinde p.Gly47Ser değişimi saptandı. Bu varyantın patojenite skorları düşük olup ACMG kriterlerine göre değerlendirilmesi 'olası benign' şeklindedir.

Sanger dizileme analizi ile asemptomatik annenin (ALS-3589) bu mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı gözlemlendi. Annenin *HSPB1* varyantı açısından pozitif olmasına rağmen hastalık göstermemesi ve bu varyantın patojenite skorlarının düşük olup ACMG kriterlerine göre ‘olası benign’ olarak değerlendirilmesi, bu varyantın indeks olgunun ALS fenotipini açıklamadığını düşündürmektedir.

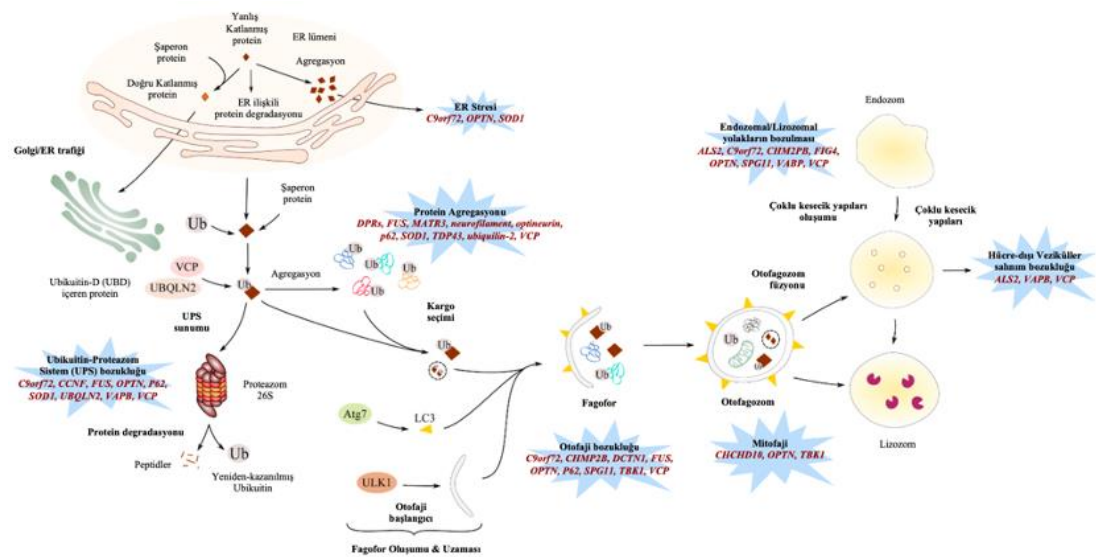


5.2. ALS Genleri ve Hücresel Mekanizmaları

Günümüze ait bilgiler ışığında ALS hastalığı ile ilgili çok sayıda genomik ve fonksiyonel çalışma yapıldı. Bu çalışmalar doğrultusunda, hastalığın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülen birçok patolojik mekanizma tanımlandı. Son yıllarda tanımlanan nadir genlerin de majör ALS genleri ile ortak mekanizmalarda birlikte işlev gördüğü anlaşıldı (Şekil 5.2).

ALS hastalığıyla ilgili her geçen gün tanımlanan farklı genlerin, ALS'de yaygın olarak görülen patolojik mekanizmalar üzerinde örtüştüğü gözlemlenmekte ve ALS'deki patolojik mekanizmalardaki bozulmaların birbiriyle ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Ubikuitin-proteozom sisteminde meydana gelen bozulma, yanlış katlanan proteinlerin hücre içerisinde yıkılmasını engelleyerek, ER lümeninde birikmesiyle ER stresine neden olmaktadır. Nihai olarak, hücresel işleyişin (homeostazisinin) bozulması motor nöronların dejenerasyonu ile sonuçlanmaktadır.

ALS'nin moleküler mekanizmasında aydınlatılan her bir bulgunun, özellikle monogenik kalıtmıli olgularda, kişiye uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutacağı düşünülmektedir (Le Gall ve ark., 2020).



Şekil 5.2. ALS hastalığında rol oynayan genler, patolojik mekanizmalar ve örtüşen yollar

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Amiyotrofik Lateral Skleroz, yetişkinlerde en sık gözlenen motor nöron hastalığıdır. Olguların çoğunluğunu sporadik vakalar oluştururken, hastaların yüzde 5-10'unda aile öyküsü bulunmaktadır. Son yıllarda ALS üzerine çok sayıda genetik ve fonksiyonel araştırma yapılmasına rağmen hastalığın etiyolojisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu tez çerçevesinde, dört majör ALS geninde mutasyon taşımadığı ve anne-babanın yakın akraba veya aynı köyden olduğu bilinen sekiz ailesel ALS olgusu genetik araştırmaya alındı. İndeks bireylere, ALS-ilişkili genlerde aday varyantları tanımlamak üzere WES analizi uygulandı. Hastaların klinik fenotipi ile uyumlu olduğu düşünülen ve biyoinformatik algoritmalar tarafından patojenite skorları güçlü bulunan olası gen varyantları belirlendi ve fenotip-genotip ilişkisi derinlemesine irdelendi. Çalışma sonucu tespit edilen dokuz varyanttan yedisi missense, biri çerçeve kayması, biri terminasyon kodonu oluşumu ile sonuçlanan mutasyonlardır. Bulunan aday genlerden *OPTN*, *SPG11* ve *KIF5A*'a tanımlanan varyantların ailelerde görülen fenotipi açıkladığı düşünülmektedir. *FIG4* ve *CYLD* genleri için daha fazla sayıda hasta ve sağlıklı aile bireyi ile segregasyon analizi ve patojenite incelemesi için işlevsel çalışma analizleri yapılması gerektiği öngörülmüştür. *HSPB1* ve *ANXA11* genlerinde bulunan varyantların ise hastalığı açıklamada yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır.

WES analizi, genom üzerindeki tüm protein kodlayan dizilerdeki değişimlerin tanımlanmasına olanak sağladığı için günümüzde altın standart yöntem olmakla birlikte; ekspansiyon mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeler, büyük delesyon/duplikasyonlar, derin intronik değişimler ve epigenetik modifikasyonlar bu yöntemle analiz edilememektedir. Ailesel ALS olgularının yalnızca üçte ikisi bilinen ALS-ilişkili genler ile açıklanmaktadır. DNA metilasyonu ve DNA molekülünün kromozomlara paketlenmesinde rol oynayan histon modifikasyonlarını içeren epigenetik değişikliklerin nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir. Bunlara ilave olarak, RNA metabolizmasındaki bozulmalar ALS'nin iyi anlaşılan patolojik mekanizmaları arasında yer almaktadır. Kodlamayan RNA moleküllerinin ALS-ilişkili RNA-bağlama proteinleri ile etkileşim içinde olmaları nedeniyle ALS'nin ortaya çıkması ve progresyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. WES'in sağladığı olanaklarla çözüme ulaştırılamayan ailesel olguların WGS yöntemi ile incelenmesi, epigenetik düzenleme mekanizmalarının araştırılması ve kapsamlı RNA

profillemesi ile değerlendirilmeleri yeni moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

ALS hastalığının henüz etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Bunun başlıca nedeni, ALS patogenezinin çok karmaşık ve ALS'nin hem klinik, hem genetik düzeyde çok heterojen olmasındandır. Bugün artık ALS'nin tek tip bir hastalık değil, motor nöron dejenerasyonu paydasında birleşen bir hastalıklar grubu, bir sendrom, olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenden dolayı, hastalığın seyrinin takip edilmesinde ve tanıdaki gecikmeyi önlemede yol gösterebilecek biyomarkör çalışmalarından da halen tatmin edici sonuçlar alınamamıştır. ALS-ilişkili mutasyonların görülme sıklığının toplumlar arasında farklılık göstermesi nedeniyle, olguların etnik kökenleri göz önünde bulundurulmalıdır. ALS olguları arasındaki klinik heterojenitenin anlaşılmasında hastalığın karmaşık genetik yapısının ve etkin patolojik mekanizmalardaki kompleksitenin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

ALS'nin tedavisinde her bireyin kendine özgü genetik arka planının göz önünde bulundurulması gerektiği önerilmektedir. Hastalara uygulanan ileri genetik analizler doğrultusunda vakaların gen-temelli sınıflandırılması bu bağlamda önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdellah Z, Ahmadi A, Ahmed S, Aimable M, Ainscough R. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. 2005.
- Akçimen F, Lopez ER, Landers JE, Nath A, Chiò A, Chia R, Traynor BJ. Amyotrophic lateral sclerosis: Translating genetic discoveries into therapies. *Nature Reviews Genetics*. 2023; 1-17.
- Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, Rijsdijk F. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2010.
- Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of als: A conspiracy of genes, environment and time. *Nature Reviews Neurology*. 2013; 9: 617-628.
- Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British journal of cancer*. 2004; 91: 1983-1989.
- Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin beta-n-methylamino-l-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins (Basel)*. 2010; 2: 2837-2850.
- Bayraktar E, Çiftçi V, Uysal H, Başak AN. Another de novo mutation in the sod1 gene: The first turkish patient with sod1-his47arg, a case report. *Frontiers in Genetics*. 2023; 14.
- Belli S, Vanacore N. Proportionate mortality of italian soccer players: Is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease? *European journal of epidemiology*. 2005; 20: 237-242.
- Brenner D, Yilmaz R, Müller K, Grehl T, Petri S, Meyer T , ve ark. Hot-spot kif5a mutations cause familial als. *Brain*. 2018; 141: 688-697.
- Brooks BR. El escorial world federation of neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on motor neuron diseases/amyotrophic lateral sclerosis of the world federation of neurology research group on neuromuscular diseases and the el escorial" clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *Journal of the neurological sciences*. 1994; 124: 96-107.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders*. 2000; 1: 293-299.
- Byrne S, Heverin M, Elamin M, Bede P, Lynch C, Kenna K , ve ark. Aggregation of neurologic and neuropsychiatric disease in amyotrophic lateral sclerosis kindreds: A population-based case–control cohort study of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 2013; 74: 699-708.

- Cady J, Allred P, Bali T, Pestronk A, Goate A, Miller TM , ve ark. Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes. *Annals of neurology*. 2015; 77: 100-113.
- Cakar A, Gezegen H, Tunca C, Bayraktar E, Basak N, Durmus-Tekce H, Parman FY. (2020). Clinical and genetic features of spg11: A single center experience (4108). In: AAN Enterprises.
- Capponi S, Geroldi A, Fossa P, Grandis M, Ciotti P, Gulli R , ve ark. Hspb1 and hspb8 in inherited neuropathies: Study of an italian cohort of dhmn and cmt2 patients. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2011; 16: 287-294.
- Chen Z, Chai E, Mou Y, Roda RH, Blackstone C, Li X-J. Inhibiting mitochondrial fission rescues degeneration in hereditary spastic paraplegia neurons. *Brain*. 2022; 145: 4016-4031.
- Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: Diagnostic and clinical implications. *The Lancet Neurology*. 2018; 17: 94-102.
- Chiò A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2011; 82: 740-746.
- Chiò A, Mazzini L, D'Alfonso S, Corrado L, Canosa A, Moglia C , ve ark. The multistep hypothesis of als revisited: The role of genetic mutations. *Neurology*. 2018; 91: e635-e642.
- Chou C-C, Zhang Y, Umoh ME, Vaughan SW, Lorenzini I, Liu F , ve ark. Tdp-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in als/ftd. *Nature neuroscience*. 2018; 21: 228-239.
- Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM , ve ark. Deleterious variants of fig4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with als. *The American Journal of Human Genetics*. 2009; 84: 85-88.
- Cooper-Knock J, Zhang S, Kenna KP, Moll T, Franklin JP, Allen S , ve ark. Rare variant burden analysis within enhancers identifies cav1 as an als risk gene. *Cell Rep*. 2020; 33: 108456.
- Couratier P, Lautrette G, Luna JA, Corcia P. Phenotypic variability in amyotrophic lateral sclerosis. *Revue Neurologique*. 2021; 177: 536-543.
- Cudkowicz M, McKenna-Yasek D, Chen C, Hedley-Whyte E, Brown Jr R. Limited corticospinal tract involvement in amyotrophic lateral sclerosis subjects with the a4v mutation in the copper/zinc superoxide dismutase gene. *Annals of neurology*. 1998; 43: 703-710.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA , ve ark. The variant call format and vcftools. *Bioinformatics*. 2011; 27: 2156-2158.

- Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using *gerp++*. *Plos Comput Biol*. 2010; 6: e1001025.
- de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J , ve ark. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of als. *Clinical neurophysiology*. 2008; 119: 497-503.
- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci*. 2008; 31: 151-173.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY , ve ark. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in *cu,zn* superoxide dismutase. *Science*. 1993; 261: 1047-1051.
- Dewan R, Chia R, Ding J, Hickman RA, Stein TD, Abramzon Y , ve ark. Pathogenic huntingtin repeat expansions in patients with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. 2021; 109: 448-460.e444.
- Dobson-Stone C, Hallupp M, Shahheydari H, Ragagnin AM, Chatterton Z, Carew-Jones F , ve ark. *Cyld* is a causative gene for frontotemporal dementia–amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2020; 143: 783-799.
- Dolled-Filhart MP, Lee M, Jr., Ou-Yang CW, Haraksingh RR, Lin JC. Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 730210.
- Edgar S, Ellis M, Abdul-Aziz NA, Goh K-J, Shahrizaila N, Kennerson ML, Ahmad-Annuar A. Mutation analysis of *sod1*, *c9orf72*, *tardbp* and *fus* genes in ethnically-diverse malaysian patients with amyotrophic lateral sclerosis (als). *Neurobiology of Aging*. 2021; 108: 200-206.
- Farg MA, Konopka A, Soo KY, Ito D, Atkin JD. The DNA damage response (*ddr*) is induced by the *c9orf72* repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics*. 2017; 26: 2882-2896.
- Felbecker A, Camu W, Valdmanis P, Sperfeld A-D, Waibel S, Steinbach P , ve ark. Four familial als pedigrees discordant for two *sod1* mutations: Are all *sod1* mutations pathogenic? *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*. 2010; 81: 572.
- Ferrari R, Hernandez DG, Nalls MA, Rohrer JD, Ramasamy A, Kwok JB , ve ark. Frontotemporal dementia and its subtypes: A genome-wide association study. *The Lancet Neurology*. 2014; 13: 686-699.
- Finegan E, Chipika RH, Shing SLH, Hardiman O, Bede P. Primary lateral sclerosis: A distinct entity or part of the als spectrum? *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2019; 20: 133-145.
- Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiological reviews*. 2002; 82: 331-371.

- Ghasemi M, Brown RH. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2018; 8: a024125.
- Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac operator. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973; 70: 3581-3584.
- Goutman SA, Hardiman O, Al-Chalabi A, Chió A, Savelieff MG, Kiernan MC, Feldman EL. Emerging insights into the complex genetics and pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology. 2022a; 21: 465-479.
- Goutman SA, Hardiman O, Al-Chalabi A, Chió A, Savelieff MG, Kiernan MC, Feldman EL. Recent advances in the diagnosis and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology. 2022b; 21: 480-493.
- Gu X, Chen Y, Wei Q, Hou Y, Cao B, Zhang L , ve ark. Rare cyld variants in chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. Frontiers in genetics. 2021; 12: 740052.
- Gwathmey KG, Corcia P, McDermott CJ, Genge A, Sennfält S, de Carvalho M, Ingre C. Diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. European Journal of Neurology. 2023; 30: 2595-2601.
- Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016; 107: 1-8.
- Hensman Moss DJ, Poulter M, Beck J, Hehir J, Polke JM, Campbell T , ve ark. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of huntington disease phenocopies. Neurology. 2014; 82: 292-299.
- Higelin J, Catanese A, Semelink-Sedlacek LL, Oeztuerk S, Lutz A-K, Bausinger J , ve ark. Nek1 loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in als patient-derived motoneurons. Stem cell research. 2018; 30: 150-162.
- Hirokawa N, Nitta R, Okada Y. The mechanisms of kinesin motor motility: Lessons from the monomeric motor kif1a. Nature reviews Molecular cell biology. 2009; 10: 877-884.
- Huss A, Spoerri A, Egger M, Kromhout H, Vermeulen R, Cohort SN. Occupational exposure to magnetic fields and electric shocks and risk of als: The swiss national cohort. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration. 2015; 16: 80-85.
- Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S , ve ark. Revel: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. Am J Hum Genet. 2016; 99: 877-885.
- Jaiser SR, Mitra D, Williams TL, Baker MR. Mills' syndrome revisited. Journal of Neurology. 2019; 266: 667-679.
- Kacem I, Sghaier I, Peverelli S, Abida Y, Ben Brahim H, Ratti A , ve ark. Optineurin in patients with amyotrophic lateral sclerosis associated to atypical

- parkinsonism in tunisian population. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration. 2023; 1-7.
- Kamada M, Maruyama H, Tanaka E, Morino H, Wate R, Ito H , ve ark. Screening for tardbp mutations in japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the neurological sciences. 2009; 284: 69-71.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at ucsc. Genome Res. 2002; 12: 996-1006.
- Kibbe WA. Oligocalc: An online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Res. 2007; 35: W43-46.
- Kim HJ, Taylor JP. Lost in transportation: Nucleocytoplasmic transport defects in als and other neurodegenerative diseases. Neuron. 2017; 96: 285-297.
- Komander D, Lord CJ, Scheel H, Swift S, Hofmann K, Ashworth A, Barford D. The structure of the cyld usp domain explains its specificity for lys63-linked polyubiquitin and reveals a b box module. Molecular cell. 2008; 29: 451-464.
- Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. Varsome: The human genomic variant search engine. Bioinformatics. 2019; 35: 1978-1980.
- Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ. Jean-martin charcot: The father of neurology. Clinical medicine & research. 2011; 9: 46-49.
- Kundra R, Dobson CM, Vendruscolo M. A cell-and tissue-specific weakness of the protein homeostasis system underlies brain vulnerability to protein aggregation. Iscience. 2020; 23.
- Kühnlein P, Sperfeld A-D, Vanmassenhove B, Van Deerlin V, Lee VM-Y, Trojanowski JQ , ve ark. Two german kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to tardbp mutations. Archives of neurology. 2008; 65: 1185-1189.
- Kwong LK, Neumann M, Sampathu DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Tdp-43 proteinopathy: The neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. Acta Neuropathol. 2007; 114: 63-70.
- Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, Chen C, Gu B, Hart J , ve ark. Clinvar: Improvements to accessing data. Nucleic Acids Res. 2020; 48: D835-d844.
- Le Gall L, Anakor E, Connolly O, Vijayakumar UG, Duddy WJ, Duguez S. Molecular and cellular mechanisms affected in als. Journal of personalized medicine. 2020; 10: 101.
- León-Castillo DA, Bertado-Cortés B, Gutiérrez-Guzmán EF, Venegas-Valles GA, Ruvalcaba-Sánchez N. Amyotrophic lateral sclerosis as a phenotypic form of the spg11 gene mutation spectrum. A case report. Revista médica del Hospital General de México. 2023; 86: 151-155.

- MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L , ve ark. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993; 72: 971-983.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA , ve ark. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005; 437: 376-380.
- Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, Marshall F, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: A neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023; 22: 185-212.
- Mitra J, Guerrero EN, Hegde PM, Liachko NF, Wang H, Vasquez V , ve ark. Motor neuron disease-associated loss of nuclear tdp-43 is linked to DNA double-strand break repair defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019; 116: 4696-4705.
- Montibeller L, Tan LY, Kim JK, Paul P, de Belleruche J. Tissue-selective regulation of protein homeostasis and unfolded protein response signalling in sporadic als. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020; 24: 6055-6069.
- Nahm M, Lim SM, Kim Y-E, Park J, Noh M-Y, Lee S , ve ark. Anxa11 mutations in als cause dysregulation of calcium homeostasis and stress granule dynamics. *Science Translational Medicine*. 2020; 12: eaax3993.
- Ng PC, Henikoff S. Sift: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31: 3812-3814.
- Nguyen HP, Van Broeckhoven C, van der Zee J. Als genes in the genomic era and their implications for ftd. *Trends Genet*. 2018; 34: 404-423.
- Nicolas A, Kenna KP, Renton AE, Ticozzi N, Faghri F, Chia R , ve ark. Genome-wide analyses identify kif5a as a novel als gene. *Neuron*. 2018; 97: 1268-1283. e1266.
- Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S , ve ark. Spatacsin mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2010; 133: 591-598.
- Özoğuz A, Uyan Ö, Birdal G, Iskender C, Kartal E, Lahut S , ve ark. The distinct genetic pattern of als in turkey and novel mutations. *Neurobiology of aging*. 2015; 36: 1764. e1769-1764. e1718.
- Qiao J, Wang T, Shao Z, Zhu Y, Zhang M, Huang S, Zeng P. Genetic correlation and gene-based pleiotropy analysis for four major neurodegenerative diseases with summary statistics. *Neurobiology of Aging*. 2023; 124: 117-128.
- Quang D, Chen Y, Xie X. Dann: A deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2014; 31: 761-763.
- Ramesh N, Pandey UB. Autophagy dysregulation in als: When protein aggregates get out of hand. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017; 10: 263.

- Ranganathan R, Haque S, Coley K, Shepherd S, Cooper-Knock J, Kirby J. Multifaceted genes in amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 14: 684.
- Reis AHDO, Figalo LB, Orsini M, Lemos B. The implications of DNA methylation for amyotrophic lateral sclerosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2023; 95: e20230277.
- Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci*. 2014; 17: 17-23.
- Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. Cadd-splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med*. 2021; 13: 31.
- Richards D, Morren JA, Pioro EP. Time to diagnosis and factors affecting diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2020; 417: 117054.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996; 242: 84-89.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A , ve ark. Mutations in cu/zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993; 362: 59-62.
- Ross JP, Leblond CS, Laurent SB, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Camu W , ve ark. Oligogenicity, c9orf72 expansion, and variant severity in als. *neurogenetics*. 2020; 21: 227-242.
- Rowland LP. Progressive muscular atrophy and other lower motor neuron syndromes of adults. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. 2010; 41: 161-165.
- Ruffini N, Klingenberg S, Schweiger S, Gerber S. Common factors in neurodegeneration: A meta-study revealing shared patterns on a multi-omics scale. *Cells*. 2020; 9: 2642.
- Ryan M, Heverin M, McLaughlin RL, Hardiman O. Lifetime risk and heritability of amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA neurology*. 2019; 76: 1367-1374.
- Santos Silva C, Oliveira Santos M, Madureira J, Reimão S, de Carvalho M. Novel compound heterozygous variants of spg11 gene associated with young-adult amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Belgica*. 2023; 123: 1627-1629.
- Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui L-Y, de Carvalho M, Eisen A , ve ark. A proposal for new diagnostic criteria for als. *Clinical Neurophysiology*. 2020; 131.

- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. Dbsnp: The ncbi database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 308-311.
- Shoesmith CL, Findlater K, Rowe A, Strong MJ. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis with respiratory onset. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2006.
- Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G , ve ark. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *Plos One.* 2013; 8: e62692.
- Smith BN, Topp SD, Fallini C, Shibata H, Chen H-J, Troakes C , ve ark. Mutations in the vesicular trafficking protein annexin a11 are associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Science translational medicine.* 2017; 9: eaad9157.
- Sproviero W, Shatunov A, Stahl D, Shoai M, van Rheenen W, Jones AR , ve ark. Atxn2 trinucleotide repeat length correlates with risk of als. *Neurobiol Aging.* 2017; 51: 178.e171-178.e179.
- Stearns FW. One hundred years of pleiotropy: A retrospective. *Genetics.* 2010; 186: 767-773.
- Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K, Kromhout H, Heederik D, Huisman MH , ve ark. Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2009; 10: 302-309.
- Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology.* 2014; 10: 661-670.
- Tunca C, Şeker T, Akcimen F, Coşkun C, Bayraktar E, Palvadeau R , ve ark. Revisiting the complex architecture of als in turkey: Expanding genotypes, shared phenotypes, molecular networks, and a public variant database. *Human mutation.* 2020; 41: e7-e45.
- Udine E, Jain A, van Blitterswijk M. Advances in sequencing technologies for amyotrophic lateral sclerosis research. *Molecular neurodegeneration.* 2023; 18: 1-15.
- Van Blitterswijk M, Van Es MA, Hennekam EA, Dooijes D, Van Rheenen W, Medic J , ve ark. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics.* 2012; 21: 3776-3784.
- Van Daele SH, Moisse M, van Vugt JJ, Zwamborn RA, van der Spek R, van Rheenen W , ve ark. Genetic variability in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2023: awad120.
- Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: Progress and possibilities. *Disease models & mechanisms.* 2017; 10: 537-549.

- Van Damme P, Veldink JH, van Blitterswijk M, Corveleyn A, van Vught PW, Thijs V , ve ark. Expanded atxn2 cag repeat size in als identifies genetic overlap between als and sca2. *Neurology*. 2011; 76: 2066-2072.
- Van Rheenen W, van der Spek RA, Bakker MK, van Vugt JJ, Hop PJ, Zwamborn RA , ve ark. Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nature genetics*. 2021; 53: 1636-1648.
- Volpicelli-Daley L, De Camilli P. Phosphoinositides' link to neurodegeneration. *Nat Med*. 2007; 13: 784-786.
- Wang H, Guo W, Mitra J, Hegde PM, Vandoorne T, Eckelmann BJ , ve ark. Mutant fus causes DNA ligation defects to inhibit oxidative damage repair in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Communications*. 2018; 9: 3683.
- Wijesekera L, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson M, Ganesalingam J , ve ark. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg als variants. *Neurology*. 2009; 72: 1087-1094.
- Wild EJ, Mudanohwo EE, Sweeney MG, Schneider SA, Beck J, Bhatia KP , ve ark. Huntington's disease phenocopies are clinically and genetically heterogeneous. *Mov Disord*. 2008; 23: 716-720.
- Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Disturbance of nuclear and cytoplasmic tar DNA-binding protein (tdp-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 13302-13309.
- Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D , ve ark. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology*. 2020; 267: 944-953.
- Xue YC, Ng CS, Xiang P, Liu H, Zhang K, Mohamud Y, Luo H. Dysregulation of rna-binding proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2020; 13: 78.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134.
- Yu C-H, Davidson S, Harapas CR, Hilton JB, Mlodzianoski MJ, Laohamonthonkul P , ve ark. Tdp-43 triggers mitochondrial DNA release via mptp to activate cgas/sting in als. *Cell*. 2020; 183: 636-649. e618.
- Zhou W, Xu R. Current insights in the molecular genetic pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*. 2023; 17.

EK-1

Varyantların Değerlendirilmesinde Kullanılan Biyoinformatik Algoritmalar

WES ve WGS analizlerinin klinik rutin çalışmalarda ve araştırmalarda kullanımının yaygınlaşması ile birlikte, varyant önceliklendirme gen keşfinde ve tanıda her zamankinden daha önemli hale geldi. İnsan genomunda çok sayıda varyantın gözlenmesi nedeni ile varyant önceliklendirme oldukça kompleks bir süreçtir (Eilbeck et al., 2017).

Varyantlar minör alel frekansına (MAF)<0.01, kalıtım şemasına (homozigot/heterozigot) ve varyant türüne (yanlış anlamlı, anlamsız/stop kodonu oluşturan, çerçeve kayması, yıkıcı/ protein dizisini bozan) göre filtrelenmektedir.

Tanımlanan varyantın hastalık nedeni olma durumu (patojenitesi) ve varyantın belirlendiği genin ürünü olan proteinin yapısı ve işlevi MutationTaster, SIFT, MetaLR, CADD, DANN ve REVEL hesaplamalı (*in silico*) algoritmalar kullanılarak değerlendirilir. Ayrıca tanımlanan varyantın evrimsel korunmuşluk oranı GERP++ skoru ile belirlenir. Evrimsel süreçte organizmalar arasında yüksek oranda korunmuş bölgelerdeki genomik değişimlerin hücre için daha zararlı olması beklenmektedir. Aday genin bilinen hastalık fenotipi ile ilişkisi OMIM veri tabanında ayrıntılı olarak verilmektedir.

Evrimsel Korunmuşluk: Ekzom dizileme analizleri ile en yaygın gözlenen ve sinonim olmayan genomik değişimlerin yanlış-anlamlı varyantlar olması nedeniyle, ilgili proteini kodlayan gen bölgesinin filogenetik açıdan korunmuşluk durumu varyant önceliklendirmede etkin kullanılan bir stratejidir. Korunmuşluğun derecesi insan protein sekansının diğer organizmaların homolog protein dizileri ile kıyaslanmasıyla belirlenir. Birçok eşleşmenin gözlemlendiği homolog protein sekansları içinde evrimsel süreçte en fazla korunduğu saptanan bölgedeki amino asit değişiminin daha fazla zararlı olması beklenirken, daha az korunmuş protein bölgesindeki değişimin tolere edilebileceği düşünülmektedir.

Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD): Çeşitli genom anotasyonlarını entegre ederek, genomda gözlenen tek nükleotid değişimlerinin, küçük insersiyon/ delesyonların (indels) değerlendirildiği puanlama sistemidir

(Kircher, Witten, Jain, O, et al., 2014). CADD skoru; gen dizisinin içeriğini, gen ile ilgili anotasyonları, evrimsel süreçte korunmuşluk derecesini, epigenetik modifikasyonları ve işlevsel etkileri içeren farklı genomik özellikler temel alınarak hesaplanmaktadır (Rentzsch et al., 2019).

1000 Genom Projesi: Yirmi altı farklı toplumdan sağlıklı oldukları belirtilen 2,504 bireye yapılan tüm genom dizileme analizi ile tanımlanan varyantlar ve genom çapındaki frekansları bildirilmektedir (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015).

NHLBI Ekzom Dizileme Projesi: ABD Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü (NHLBI) ekzom dizileme projesi ile kalp, akciğer ve kan hastalıkları fenotipi gözlenen ~6,500 bireyin ekzom analizleri ile protein kodlayıcı bölgelerdeki nadir varyantlara dair ilk verilerin elde edildiği projedir. (Petrovski et al., 2013).

Ekzom Agregasyon Konsorsiyumu (ExAC): ExAC altı büyük popülasyon içerisinde pediatrik olguların dahil edilmediği, 14 hastalık grubunun yer aldığı bir kohort çalışması olup, 60,706 ekzom verisinin değerlendirilmesi sonucu tanımlanan varyantlar klinik ile birlikte değerlendirilmiştir (Lek et al., 2016).

gnomAD: Aralarında akrabalık bulunmayan ve her bireyin örneğinin bir kez çalışıldığı, 125,748 ekzom ve 15,496 genom analizi ile elde edilen varyantlar <https://gnomad.broadinstitute.org> web sitesinde araştırmacılarla paylaşılmaktadır.

MutationTaster: 2008 yılında bildirilen çalışmada, bir kişinin genomunda yaklaşık olarak mega-baz çifti başına 1,000 değişime karşılık gelen 3.5 milyondan fazla varyant bildirilmektedir (Wheeler et al., 2008). Bu yüksek miktardaki genomik varyant arasından, hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülen varyantların ön değerlendirme ile belirlenmesi, detaylı araştırma için yönlendirilmesini kolaylaştırarak zamanın ve kaynakların verimli kullanılmasını sağlar.

Yeni nesil dizileme analizleri kullanılmaya başlandığında sadece amino asit değişimleri değerlendirilebilmekteydi, ayrıca çok sayıda protein sekansının değerlendirilmesi uzun zaman almaktaydı. 2008 yılında, Schwarz ve arkadaşları tarafından geliştirilen web-temelli uygulama olan MutationTaster; sinonim ve intronik değişimler ile tek bir amino asidi etkileyen veya amino asit dizisinde kompleks

değişimlere neden olan varyasyonları değerlendirmek üzere çeşitli algoritmaları kullanmaktadır. Ancak, 12bp'den büyük insersiyon/delesyonlar ile ekzon-intron bağlantı bölgelerindeki değişimlerin analizinde yetersiz kalmaktadır (Schwarz et al., 2010).

Polymorphism phenotyping version 2 (Polyphen2): Polyphen2 algoritması, amino asit değişimlerinin protein yapısı ve işlevi üzerine olası etkilerini, değişimin disülfid bağı oluşum ve molekül bağlanma bölgesi ile enzimin aktif bölgesinde veya transmembran domaini gibi spesifik bir motifte meydana gelmesine göre değerlendirmektedir (Adzhubei et al., 2010).

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT): SIFT doğal seçim sürecinde türler arasında protein işlevi için önemli amino asit rezidülerinin korunduğu bilgisinden yola çıkılarak, türler-arası protein dizilerinin PSI-BLAST ile karşılaştırılması sonucu amino asit değişiminin fenotipe etkisini öngörmeye dayanan programdır (Kumar et al., 2009).

Sekans Varyantlarının Değerlendirilmesinde Standartlar: American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ve Association for Molecular Pathology (AMP) ilkeleri

Klinik-moleküler laboratuvarlar hasta bireylerde genetik hastalıklar ile ilişkili hızla artan sayıda yeni gen varyantları tanımlamaktadır. Bazı hastalık fenotiplerine tek bir gen neden olurken, çoğunluğunda birden fazla gen rol oynar. Tanımlanan sekans varyantlarının klinik önemi patojenik veya benign aralığında değerlendirilir. Sekans varyantlarının sınıflandırılmasında rehberlik eden ve uzman araştırmacı/ klinisyenler ile deneysel/deneyimsel veriler ışığında 2007 yılında bildirilen American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ilkelerinin güncellenmiş içeriği aşağıda özetlenmiştir (Richards ve ark., 2008).

ACMG ve AMP İlkelerinin Oluşturulmasında İzlenen Basamaklar

2013 yılında uzman araştırma gruplarının görüş birliği ve veri tabanlarındaki bilgilere göre oluşturulan sistem doğrultusunda sekans varyantlarının sınıflandırılmasında standart terminoloji kullanılmasını sağlamak üzere, ACMG, Association for Molecular Pathology (AMP) ve College of American Pathologists üyelerini, klinik laboratuvar direktörlerini ve klinisyenleri içeren çalışma grubu oluşturulmuştur (Richards et al., 2015). Sekans analizi yapan klinik laboratuvarların genomik dizi

değişimlerini sınıflandırmada kullandıkları terminoloji ve değerlendirme ölçütleri hakkında bilgi toplamak amacı ile Amerika ve Kanada’ da bulunan ve GeneTests.org’da listelenen 100’den fazla laboratuvara değerlendirme-ölçme anketi gönderilmiştir. Kuzey Amerika’da 45’den fazla laboratuvara ait ilk anket sonuçları ACMG yıllık toplantısında sunulmuştur.

İkinci değerlendirme anketi Ağustos 2013’te, aynı laboratuvarlara ve AMP’nin yaklaşık 2,000 üyesine sınıflandırma sistemi ile birlikte her bir ölçütün nasıl kullanılacağına dair detaylı bilgi gönderilmesiyle başlatılmıştır. Laboratuvarlardan değerlendirme sistemini kullanarak, her bir ölçütün göreceli ağırlığı, kullanım kolaylığı ve böyle bir sistemin kendi laboratuvarlarında uygulanabilirliği ile ilgili geri dönüş istenmiştir. Laboratuvarların çoğunluğu önerilen sınıflandırma sistemini destekleyerek standartların ve ilkelerin geliştirilmesi ile ilgili geri bildirimlerde bulunmuşlardır. 2013 yılının Kasım ayında 50’den fazla katılımcının bulunduğu AMP toplantısında güncellenen sınıflandırma ölçütleri ve olası iki puanlama sistemi sunulmuştur. Bir tanesi burada sunulan yaklaşım ile uyumlu iken, diğer puanlama sisteminde patojenik ölçütler için artı, benign ölçütler için ise eksi puanlar verilerek, toplam puan varyantın beş aşamalı sınıflandırma sistemindeki yerini belirlemektedir. ACMG varyant sınıflandırma yaklaşımının tek gen analizleri, çoklu-gen panelleri, ekzom ve genom dizileme yöntemleri ile tanımlanan tüm Mendeliyen kalıtmalı genlerdeki varyantlara uygulanabilir olması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu varyant sınıflandırma yaklaşımının gelişen teknoloji ve artan bilgi birikimi ile birlikte gelişeceği düşünülmektedir.

DNA’nın nükleotid dizisinde meydana gelen kalıcı değişimler mutasyon, popülasyonda frekansı %1’in üzerinde olan varyantlar ise polimorfizm olarak adlandırılır. ‘Mutasyon’ ve ‘polimorfizm’ terimleri yaygın olarak kullanılmakla birlikte, patojenik ve benign etkileri ile ilgili yanlış varsayımlar sıklıkla karışıklığa yol açmaktadır. Karışıklığı önlemek adına, her iki terim yerine ‘varyant’ ile birlikte (i) patojenik, (ii) olası patojenik, (iii)VUS, (iv) olası benign veya (v) benign tamamlayıcılarının kullanılması önerilmektedir. Kantitatif herhangi bir tanımlama içermemesine rağmen güvenilir varyant sınıflandırma ölçütü olarak düşünülen ‘olası’ teriminin yüksek ihtimalle patojenik veya benign olduğuna dair veriye sahip varyantlar için sınırlandırılması gerektiği düşünülmektedir. ACMG toplantısı süresince

laboratuvarlarda ortak tanımlama kullanılmasını sağlamak üzere ‘olası patojenik’ ve ‘olası benign’ terimlerinin %90’dan daha fazla kesinlikteki hastalık nedeni veya benign varyantlar için kullanılması önerilmiştir.

İsmlendirme (Nomenklatür)

Tanımlanan varyantın anlaşılır biçimde ifade edilebilmesi, genomik bilginin etkin şekilde paylaşılabilmesi ve bir sonraki aşamalara geçilebilmesi için belirli ölçütler ile belirlenen tek tip (aynı dilde) ismlendirme önerilmektedir. Günümüzde Human Genome Variation Society (HGVS) tarafından güncellenen standart (araştırmacılar tarafından kabul edilen) gen varyant nomenklatürü (<http://www.hgvs.org/mutnomen>) kullanılmakta, ve bu rehber varyantların adlandırılmasında temel teşkil etmek üzere önerilmektedir (den Dunnen et al., 2016). Tanımlanan varyantların adlandırılmasında doğru HGVS terminolojisine ulaşabilmek için yazılım programları mevcuttur (<https://mutalyzer.nl>) (Wildeman et al., 2008). Hasta raporları DNA düzeyinde tanımlanan varyantın açık ve anlaşılır olmasını sağlamak ve işlevsel etkilerini değerlendirebilmek için kodlayıcı bölge ve protein adlandırmalarının yanı sıra referans(lar) dizisini de içermelidir (genomik sekans ‘g.’, kodlayıcı DNA sekansı ‘c.’, protein ‘p.’, mitokondri genomu için ‘m.’). Kodlayıcı DNA dizisindeki değişimler bir numaralı pozisyonda yer alan ATG translasyon inisyasyon kodonundaki ‘A’ nükleotidi esas alınarak tanımlanmalıdır. Önceki alternatif terminolojinin kullanılacağı durumda, güncel adlandırma ek gösterimle belirtilmelidir. Referans dizi, versiyon numarası veya Locus Reference Genomic veri tabanı (Macarthur et al., n.d.) bilgisi ile birlikte National Center for Biotechnology Information RefSeq veri tabanından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) (O’leary et al., 2015) tamamını içerecek şekilde alınmalıdır. Genomik koordinatlar referans genom sürümüne (hg19) göre belirlenmeli ve referans dizi 5’ ve 3’ untranslated bölgeleri ve promotör ile birlikte tüm geni içermelidir. Kodlayıcı bölge varyantları raporlanırken, her gen için tanımlanan en uzun ve/ veya klinik ile en çok ilişkilendirilen referans transkript belirtilmelidir. Araştırmacılar tarafından tanımlanan referans transkriptleri Locus Reference Genomic, Consensus CDS Database (Pujar et al., 2017), Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) veya lokus-spesifik veri tabanlarında bildirilmektedir. HGVS rehberi tüm varyant çeşitlerini içermemek ile birlikte, kompleks varyantlar ile ilgili olası tanımlamaları bildirmektedir (Taschner & den

Dunnen, 2011). Ayrıca, HGVS nomenklatürüne istisna olarak ACMG üç tanımlama bildirmektedir: (i) anlamsız/stop kodonu oluşturan varyantlar HGVS terminolojisiindeki ‘*’ ve ‘Ter’ gösteriminin yanı sıra ACMG ilkelerine göre ‘X’ ile gösterilmektedir; (ii) varyant ifade edilirken ekzonlar seçilen transkriptte göre numaralandırılmaktadır; (iii) varyantın klinik önemini değerlendirmede ‘işlevi etkileyen’ tanımlaması yerine ‘patojenik’ terimi önerilmektedir.

Varyantların Sınıflandırılması ile ilişkili Literatür ve Veri Tabanları

İnsan genomunda giderek artan sayıda tanımlanan varyantlar birçok veri tabanında bildirilmektedir. Popülasyon veri tabanları (Tablo 2.2) nüfusu yüksek olan toplumlarda tanımlanan varyantların görülme sıklıklarının tanımlanmasında faydalı olmakla birlikte, bu veri tabanlarında bildirilen frekansların elde edildiği çalışmalarda hangi (hasta/sağlıklı bireyler) kohortun kullanıldığına dikkat edilmelidir ve mümkün ise, aynı aileden yaş aralığı bilinen, birden fazla bireyin dahil edildiği çalışmalar tercih edilmelidir. Hastalarda tanımlanan varyantlar patojenik değerlendirmeleri ile birlikte hastalık veri tabanlarında (Tablo 2.2) bildirilmektedir.

Varyantların değerlendirilmesinde veri tabanlarının yanı sıra, varyant ile ilgili bilimsel ve klinik çalışmaların raporlandığı literatür araştırılmalıdır.

İndeks olgunun farklı klinik merkezler tarafından takip edilmesine, aynı yazarın çalışmalarını farklı makalelerde bildirmesine, laboratuvarlar-arası iş birliklerine bağlı olarak hastada ve aile bireylerinde tanımlanan varyant birden fazla kez rapor edilebilmektedir. Bu durum varyantın frekansının yanlış hesaplanmasına yol açması nedeniyle, yayınlarda hastaların tanı ve klinik bulgularının detaylı açıklanması önem taşımaktadır.

Tablo Ek-1.1. Popölasyon, hastalık-spesifik ve genomik sekans veri tabanları

Popölasyon Veri Tabanları	
Exome Aggregation Consortium	Çeşitli hastalık-spesifik ve popölasyon genetiği çalışmalarında aralarında akrabalık bulunmayan 61,486 kişiye uygulanan ekzom dizileme ile tanımlanan varyantları içeren veri tabanı (pediatrik hastalar dahil edilmemiştir)
1000 Genomes Project	26 farklı toplumda genomda ve belirli bölgelerde tanımlanan düşük ve yüksek okumaya sahip varyantların yer aldığı veri tabanı
dbSNP	Farklı kaynaklar tarafından kısa (≤ 50 bp) genetik varyasyonların bildirildiği veri tabanı (patojenik varyantları da içerebilmektedir)
Hastalık Veri Tabanları	
ClinVar	Tanımlanan varyantların klinik fenotip ile ilişkilendirildiği veri tabanı
OMIM	İnsanda hastalıklarla ilişkilendirilen genleri ve genetik varyantların temsili örneğini içeren veri tabanı
Sekans Veri Tabanları	
NCBI Genome	İnsan genomundaki genlerin tamamının referans dizilerini içeren veri tabanı
RefSeqGene	Klinik ile ilişkilendirilen gen referans dizilerinin kaynağı

Hesaplamalı Prediksiyon Programları

Sekans varyantlarının değerlendirilmesinde araştırmacılara açık olarak sunulan veya ticari olarak ulaşılabilen çeşitli *in silico* araçlar kullanılmaktadır. Her bir varyant değerlendirme programında kullanılan algoritmalar farklı olabilmekle birlikte, nükleotid ve amino asit düzeyindeki sekans varyantlarının protein yapısı, primer ve alternatif gen transkriptleri ile genomik elementler üzerindeki olası etkilerini değerlendirmektedir. *In silico* programlar yanlış anlamlı (missense) ve splicing varyantların değerlendirildiği iki temel grupta toplanmaktadır (Tablo 2.3). Kodlamayan bölgelerdeki varyantların da değerlendirilebilmesi için yeni yazılım araçları geliştirilmeye başlanmıştır (Kircher et al., 2014).

Yanlış anlamlı varyantların etkilerinin değerlendirilmesinde amino asit veya nükleotidin evrimsel korunmuşluk derecesine, protein dizisindeki lokalizasyonuna (örneğin, işlevsel domain) ve amino asit değişiminin biyokimyasal sonuçları esas alınmaktadır. Missense varyant yorumlama algoritmaları bilinen hastalık yapıcı varyantlar ile test edildiğinde çoğunluğunun %65-80 oranında doğru sonuç verdiği tanımlanmıştır (Hicks et al., 2011; Tavtigian et al., 2008; Thompson et al., 2013; Thusberg et al., 2011). PolyPhen2 (Adzhubei et al., 2010), SIFT (Kumar et al., 2009) ve MutationTaster (Schwarz et al., 2010) klinik laboratuvarların yaygın olarak kullandığı missense varyant değerlendirme *in silico* araçlarıdır (Tablo 2.3).

Ekzonik ve intronik splice bölge oluşumu veya kaybı ile sonuçlanan splicing varyantları değerlendirmek için çok sayıda yazılım programı geliştirilmiştir (Jian et al., 2013). Splice bölgesi değişimlerini yorumlama araçları genellikle spesifitesine (~ %60-80) kıyasla daha yüksek sensitiviteye (~ %90-100) sahiptir (Houdayer et al., 2012; Vreeswijk et al., 2009). Splice bölge abnormalitelerini değerlendirmede yaygın olarak kullanılan başlıca yazılım programları Tablo 2.3’de listelenmektedir.

Varyantları değerlendirmede kullanılan farklı yazılım programları farklı algoritmalar ile çalışsa da, temelde benzer işleyişe sahiptirler. Bununla birlikte, her programın kullandığı algoritmaya bağlı olarak kendine özgü güçlü yanları ve limitasyonları olması nedeniyle birden fazla yazılım programının birlikte kullanılması önerilmektedir. Bu yazılım programlarının algoritmalara dayalı prediktif programlar olduğunu unutmamalı ve tanımlanan varyantlar klinik ile ilişkilendirilirken farklı kaynaklar ile desteklenmelidir.

Tablo Ek-1.2. *In silico* prediktif algoritmalar

Kategori	Algoritma	Moleküler Temeli (Değerlendirme Ölçütü)
Yanlış anlamlı varyant algoritmaları	FATHMM (http://fathmm.biocompute.org.uk)	Evrimsel korunmuşluk
	SIFT (http://sift.jcvi.org)	
	MutasyonTaster (http://www.mutationtaster.org)	Protein yapısı/ işlevi ve evrimsel korunmuşluk
	PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2)	
	CADD (http://cadd.gs.washington.edu)	Gen dizisinin içeriği, gen anotasyonlar, korunmuşluk derecesi, epigenetik modifikasyonları ve işlevsel etkileri
Nükleotid korunmuşluk derecesinin değerlendirilmesi	GERP (http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html)	Evrimsel korunmuşluk oranı

Sekans Varyantlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Algoritmalar

Klinik tanı laboratuvarlarında sekans varyantlarının değerlendirilmesinde izlenen yaklaşımlar somatik ve farmakogenomik varyantların değerlendirilmesinin veya birden fazla genin etken olduğu Mendeliyen kalıtım göstermeyen hastalıklardan ziyade Mendeliyen kalıtmıli hastalıklardan sorumlu varyantların yorumlanmasında kullanılmaktadır. Ekzom veya genom araştırma çalışmaları ile tanımlanan ve hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülen yeni aday genlerin keşfinde (genes of uncertain significance), anlamı bilinmeyen etki) bu ölçütler uygulanırken dikkatli olunmalıdır. Varyantların sınıflandırılmasında tek gen, gen paneli, ekzom, genom veya transkriptom analizlerinden hangisiyle tanımlandığına bakılmaksızın bu ölçütlerin kullanılması uygun görülmekle birlikte, hastalık nedeni olan ‘patojenik’ veya her zaman hastalık ile ilişkili olmayabilen ama protein dizisini bozan varyant ayırımına dikkat edilmelidir. Tanımlanan varyantın patojenitesinin belirlenmesinde varyantın gözlemlendiği olguda hastalıktan bağımsız olarak, varyantın tanımlandığı tüm olgulardan elde edilen verilerin (kanıtların) birlikte değerlendirilmesiyle ortak sonuca varılmalıdır.

ACMG ilkelerine göre varyantların (Tablo 2.4 ve 2.5) sınıflandırılmasında iki ayrı ölçüt grubu sunmaktadır. Her bir patojenik ölçüt kendi içerisinde çok güçlü (very strong) (PVS1), güçlü (strong) (PS1-4), orta derecede (moderate) (PM1-6), destekleyici (supporting) (PP1-5); her bir benign ölçüt ise tek başına yeterli (stand-alone support) (BA1), güçlü (BS1-4) veya destekleyici (BP1-6) kategorilerinde değerlendirilmektedir (S. Richards et al., 2015).

Tablo Ek-1.3. Patojenik varyantların sınıflandırılmasında kullanılan ölçütler

Patojenik Etki	Ölçütler: Varyantların genomik ve protein düzeyindeki etkileri
Çok güçlü	İşlev kaybı mekanizmalarının (LOF) hastalığa neden olduğu bilinen bir gendeki PVS1 gen ürünü ile sonuçlanmayan/null varyantlar (Anlamsız=stop kodonu oluşumu, çerçeve kayması, kanonikal ± 1 veya 2 splice bölgesi, başlangıç kodonu, tek veya çoklu ekzon delesyonu varyasyonları) Dikkat edilmesi gereken durumlar: • LOF mekanizmalarının hastalık nedeni olmadığı genler (örneğin; hipertrofik kardiyomiyopati genleri; <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>), • Son veya sondan bir önceki ekzonda son 50 bp'lık bölgesinde meydana gelen ve nonsense- aracılı yıkıma neden olmayan 3' downstream kırılma/ erken sonlanma varyantları, • Splice bölgesi varyantları ekzon atlanmasına, kısalmasına, alternatif donor/ acceptor bölgelerinde meydana gelmiş ise intronik materyalin dahil edilmesine veya yeni splice bölge oluşumuna neden olmaktadır. Kırılan proteinin yapısal bütünlüğünü koruyan kısmının, • Alternatif gen transkriptleri ve bunlardan hangisinin biyolojik olarak işlevsel olduğunun anlaşılması ve hangi dokularda sentezlendiğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Tablo Ek-1.3. devam, Patojenik varyantların sınıflandırılmasında kullanılan ölçütler

Güçlü	PS1; daha önce tanımlanmış patojenik varyantla aynı amino asit değişimine neden olan nükleotid değişimleri. Örnek: Val →Leu aynı kodondaki G>C veya G>T değişimleri Not: Amino asit/ protein düzeyindeki varyantların yanı sıra splicing mekanizmasını etkileyen değişimler gözden kaçırılmamalıdır. PS2; aile öyküsü bulunmayan hastalarda tanımlanan <i>de novo</i> varyantlar (ebeveynlik/ biyolojik anne- baba testi ile konfirme edilmiş olması gerekmektedir) PS3; Gen veya gen ürünü üzerindeki zararlı etkisi <i>in vitro</i> veya <i>in vivo</i> işlevsel çalışmalar ile desteklenen genomik değişimler PS4; Olgularda kontrol bireylere kıyasla prevalansı istatistiksel anlamda yüksek olan varyantlar Not: Olgu- kontrol çalışmaları sonucu varyantın oldukça nadir gözlenmesi nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemediği durumlarda aralarında akrabalık bulunmayan, aynı klinik fenotipe sahip çok sayıda olguda gözlenmesi ile kontrollerde olmadığının gösterilmesinin yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.
Orta Derecede	PM1; hastalık ile ilişkili mutasyonların sıklıkla gözleendiği hot spot bölgede ve/veya proteinin işlevsel domaininde (örneğin; enzimin aktif bölgesi) tanımlanan benign olmayan varyantlar PM2; Exome Sequencing, 1000 Genomes veya Exome Aggregation Konsorsiyum projelerinde kontrollerde saptanmayan veya resesif kalıtmıli hastalıklar için ise oldukça düşük frekansta gözlenen varyantlar (iki resesif varyantın bir araya gelerek homozigot gözlenmesi) Not:Yeni- nesil dizileme yöntemiyle elde edilen popülasyon çalışmalarında insersiyon/delesyonların tanımlanmasındaki limitasyonlar unutulmamalıdır. PM3; patojenite değerlendirilmesinde parental örneklerin analizi ile varyantın <i>cis/ trans</i> konumda meydana geldiğinin belirlenmesi birleşik heterozigot (resesif kalıtmıli hastalıklar) durumu için önem

	taşımaktadır. Örneğin; patojenik olduğu bilinen iki heterozigot varyant bir bireyde tanımlandığında, bu varyantlar cis konumunda ise kesin olmamakla birlikte benign olabileceği düşünülmektedir. PM4; stop kodonunun amino asit kodlayan kodona (stop kaybına neden olan varyant) dönüşümü ile bir veya daha fazla amino asidin delesyonu/ insersiyonu sonucu protein uzunluğunda meydana gelen değişimlerin yanlış anlamlı değişimlere kıyasla protein işlevinin bozulmasında daha etkili olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak, in-frame (okuma çerçevesi içerisinde) delesyon/ insersiyonlar ile stop kaybı varyasyonları orta derece patojenik olarak sınıflandırılmaktadır. PM5; patojenik etkiye neden olduğu gösterilen aynı protein rezidüsünde meydana gelen ve literatürde bildirilmeyen (novel) yanlış anlamlı amino asit değişimleri bu gruptadır (Arg156His, patojenik varyant; Arg156Cys, novel varyant). Bu değişimin daha önce patojenik missense varyant olarak tanımlanan aynı bölgede yine bir missense varyantın saptanması, novel değişimin patojenitesini güçlendirmektedir. PM6; ebeveynlik/ biyolojik anne- babalık durumunun analiz edilmediği <i>de novo</i> varyantlar.
Destekleyici	PP1; çok sayıda etkilenmiş aile bireylerinde varyantın gözlenmesi sonucu hastalık nedeni olarak değerlendirilen varyantlar. Not: Daha fazla sayıda hasta bireyde aile içi segregasyon analizleri yapılarak varyantın patojenitesi güçlendirilebilir. PP2; bir gende tanımlanan yanlış anlamlı varyantların nadir olarak benign etkiye sahip olduğunun bilinmesi ve hastalık nedeni olarak çoğunlukla yanlış anlamlı varyantların gösterilmesi. PP3; gen yapısına/ ürününe zararlı etkisi birçok hesaplamalı algoritma (evrimsel korunmuşluk, splicingi etkileyen vb.) ile desteklenen varyantlar. PP4; aynı genetik etiyolojiye sahip olgularda gözlenen klinik bulguların sadece ilgili hastalığa spesifik olması ve diğer hastalıkların fenotipik spektrumuyla örtüşmemesi beklenmektedir.

	PP5; klinik laboratuvarlar tarafından patojenik olarak bildirilen ancak sınıflandırmada göz önünde bulundurulmuş kanıtın bildirilmediği varyantlar
--	--

Tablo Ek1-4. Benign varyantların sınıflandırılmasında kullanılan ölçütler

Benign Etki	Kategori
Varyantın benign olarak değerlendirilmesinde tek başına yeterli (Stand-alone)	BA1; Exome Sequencing ve 1000 Genom Projeleri ile Exome Aggregation Konsorsiyum çalışmaları sonucu tanımlanan ve alel frekansı % 5'den büyük olan varyantlar
Güçlü	BS1; ilgili hastalığa ait alel frekansının beklenen değerin üstünde olan varyantlar BS2; resesif (homozigot), dominant (heterozigot) veya X'e bağlı (hemizigot) kalıtmı, erken yaşta ortaya çıkan ve tam penetrant olduğu bilinen bir varyantın yetişkin sağlıklı bireyde tanımlanması. BS3; protein işlevi ve splicing mekanizması üzerinde zararlı etkiye neden olmadığı <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> işlevsel çalışmalar ile gösterilen varyantlar BS4; etkilenmiş aile bireylerinin taşımadığı gösterilen varyantlar
Destekleyici	BP1; hastalığa kırılma/ erken sonlanma varyantlarının neden olduğu bilinen gendeki yanlış anlamlı varyantlar

	BP2; dominant kalıtmımlı hastalıklar için <i>trans</i> konumdaki patojenik varyant ile birlikte gözlenen <i>cis</i> varyantlar BP3; repetitif (tekrarlı DNA dizileri içeren) bölgelerde tanımlanan, işlevi bilinmeyen in-frame delesyonlar/ insersiyonlar BP4; çok sayıda hesaplamalı algoritmalar (evrimsel korunmuşluk, splicingi etkileyen vb.) ile gen veya gen ürününe etkisi olmadığı öngörülen varyantlar BP5; hastalığa neden olan ve gözlenen varyant dışında tanımlanan genomik değişimler BP6; ilgili hastalıkla uzun süredir çalışan uzman klinik laboratuvarlar tarafından yetkin veri tabanlarında benign olarak rapor edilen varyantlar BP7; korunmuşluk derecesi yüksek olmayan, splice konsensus dizisini etkilemediği gösterilen ve yeni splice bölge oluşumuna neden olmayan sinonim (sessiz) varyantlar
--	---

Tanımlanan Varyantların Klinik Açıdan Değerlendirilmesi

Sorts Intolerant From Tolerant (SIFT) ve Polymorphism Phenotyping version 2 (PolyPhen2) varyant önceliklendirme programları gözlenen varyantı protein işlevi üzerindeki etkisine göre ‘zararlı’ veya ‘tolere edilebilir’ olarak değerlendirmektedir.

Hastalığa yol açma potansiyeli olan yıkıcı/protein dizisini bozan varyantı tanımlamak için yaygın kullanılan ‘patojenik’ terimi dominant Mendeliyen kalıtmımlı hastalığa neden olan patojenik varyantı net bir şekilde açıklarken, daha komplike resesif geçişli

hastalıklarda klinik fenotipin ortaya çıkabilmesi için her iki alelin de varyantı taşıması gerekmektedir.

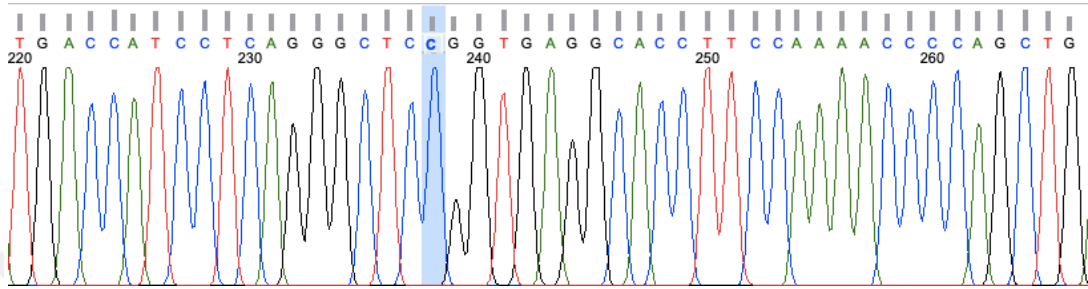
Belirli bir lokusta gözlenen spesifik bir genetik varyantın önceliklendirme sürecindeki ilk basamak; daha önce tanımlanan varyantların yer aldığı veri tabanları ve farklı bilgi kaynakları kullanılarak genomik değişimin doğası ve etkisine göre anotasyonudur.

Genomdaki değişimlerin adlandırılması gen dizilemenin, biyoinformatik analizlerin ve moleküler biyoloji çalışmalarının temelini oluşturur. Bu durum, farklı kaynaklarda araştırmacılar tarafından zaman içerisinde bildirilen genomik değişimlerin tutarlı anotasyonlarının yapılmasını sağlayarak, aynı değişimin farklı varyant olarak anlaşılmasının veya oluşabilecek belirsizliklerin önüne geçilmesi açısından önemlidir. Araştırmacılar varyant anotasyonunda yaygın olarak Sekans Ontoloji terminolojisini kullanmaktadır. Sekans Ontoloji projesi 2003 yılında, model organizmalara ait veri tabanlarının geliştirilmesi ile ilgili çalışmaları yürüten bir grup bilim insanının varyant anotasyonlarını aynı dilde bir araya getirmek üzere gerçekleştirdikleri iş birliği ile başlamıştır (Eilbeck et al., 2005). Sekans Ontoloji terimlerinden yola çıkılarak varyantın etkisi hakkında ön değerlendirme yapılabilmektedir. Örneğin; erken sonlanma kodonu oluşumuna neden olan bir varyantın amino asit değişimi ile sonuçlanan yanlış-anlamlı varyanttan daha zararlı olması beklenmektedir. Ancak, insan genomunun yüzlerce heterozigot ve homozigot formda işlev kaybı değişimi taşıyan alele sahip olduğu göz önünde bulundurulursa bu filtreleme yaklaşımı zayıf kalmaktadır (Lek, Karczewski, Minikel, Samocha, et al., 2016). Evrimsel süreçte daha az korunmuş bir gende meydana gelen stop kodonu, yüksek oranda korunmuş başka bir gendeki missense varyanttan daha fazla tolere edilebilmektedir. Diğer taraftan, amino asit değişimine neden olmayan sinonim değişimlerin splicing mekanizmasında (Sheikh et al., 2013), mRNA moleküllerinin kararlılığında ve proteinlerin üç-boyutlu yapılarında bozulmalara neden olarak (Kimchi-Sarfaty et al., 2007) hastalıkların ortaya çıkmasında etkili oldukları gösterilmiştir. Geleneksel yaklaşımlar ile missense değişiminin protein işlevi üzerindeki etkisini öngörebilmek için ilgili gen bölgesinin evrimsel süreçte korunmuşluğu ve protein yapısı bilgileri kullanılırken, günümüzde missense değişimlerin yanı sıra diğer değişimlerin de değerlendirilebileceği ve elde edilen verilerin doğruluğunun desteklenebileceği daha güçlü skorlama programları kullanılmaktadır (Kircher, Witten, Jain, O’Roak, et al., 2014).

EK-2

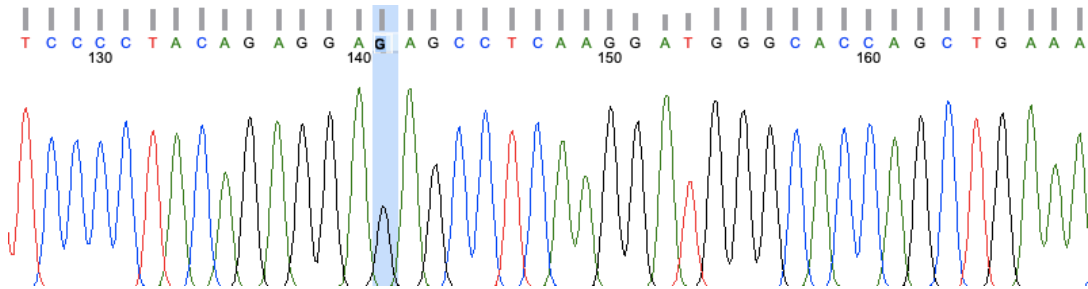
İndeks Bireylerde Tanımlanan Aday Varyantların Aile-içi Segregasyon Sonuçları

Aile 1: ALS-2414/FTD-86 (indeks)

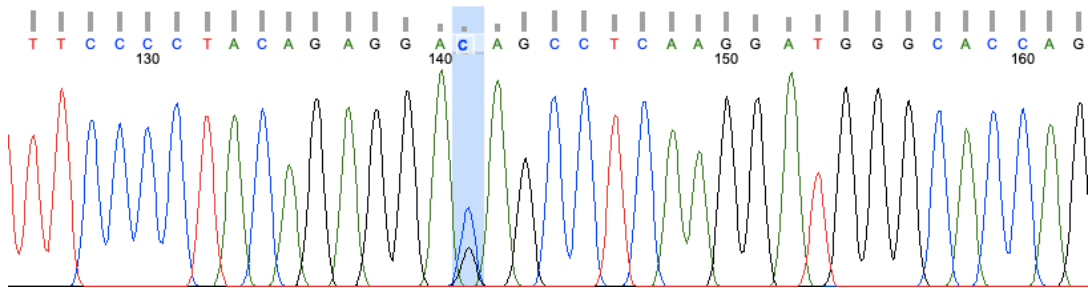


Şekil Ek-2.1. *OPTN* geninde tanımlanan c.1400A>C, p.Gln467Pro homozigot değişimi.

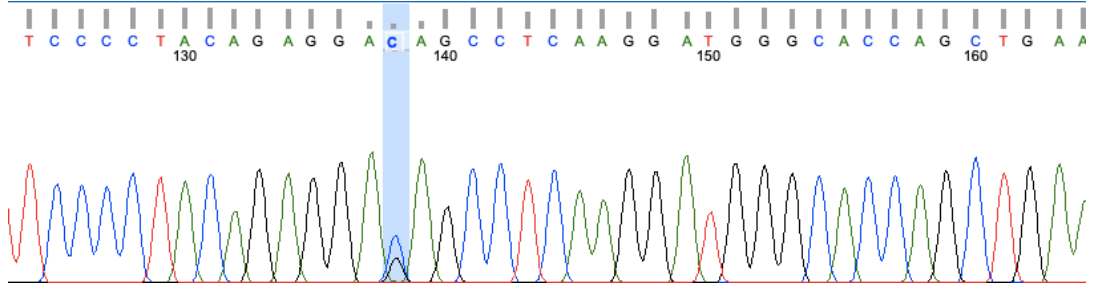
Aile 2: ALS-2358 (indeks)



Şekil Ek-2.2. *SPG11* geninde tanımlanan c.6759C>G, p.Asp2253Glu homozigot değişimi.

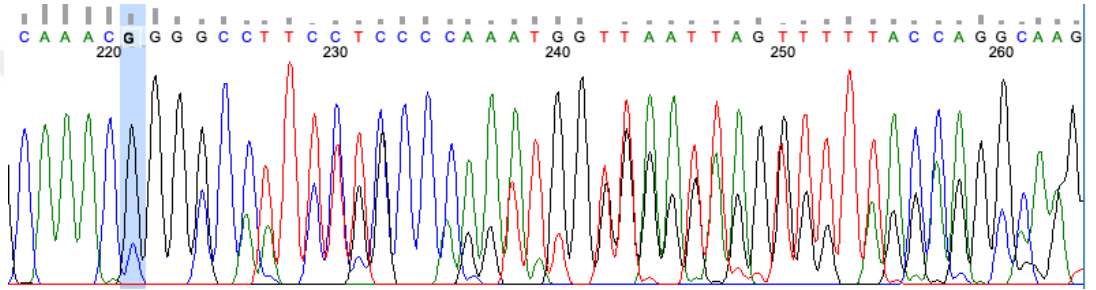


Şekil Ek-2.3. ALS-2359 (baba): *SPG11* c.6759C>G, p.Asp2253Glu değişimi için heterozigot.

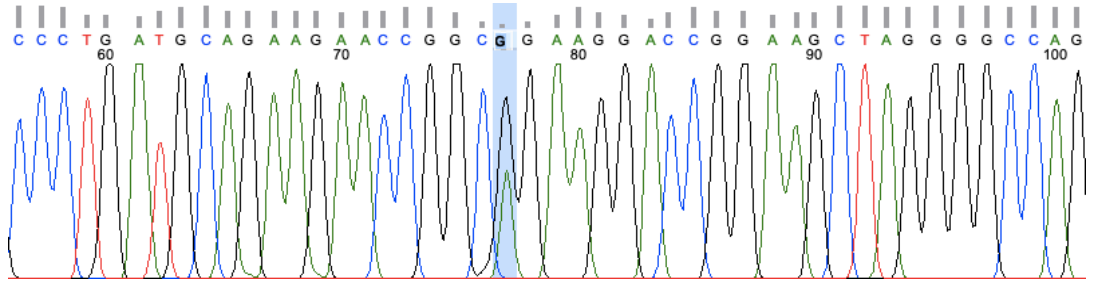


Şekil Ek-2.4. ALS-2360 (anne): *SPG11* c.6759C>G, p.Asp2253Glu değişimi için heterozigot.

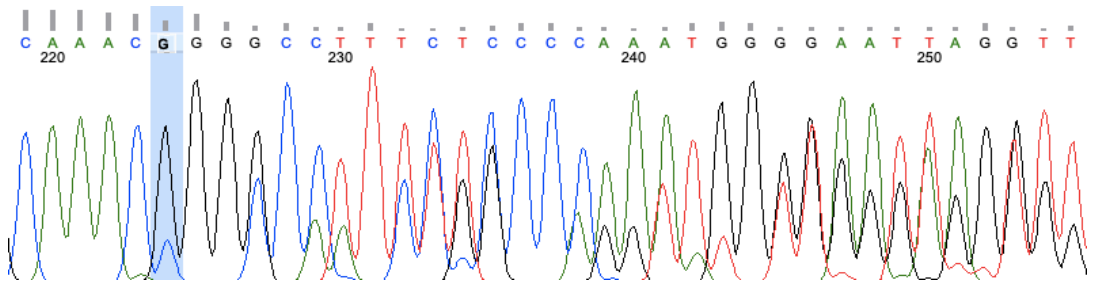
Aile 3: ALS-2341 (indeks)



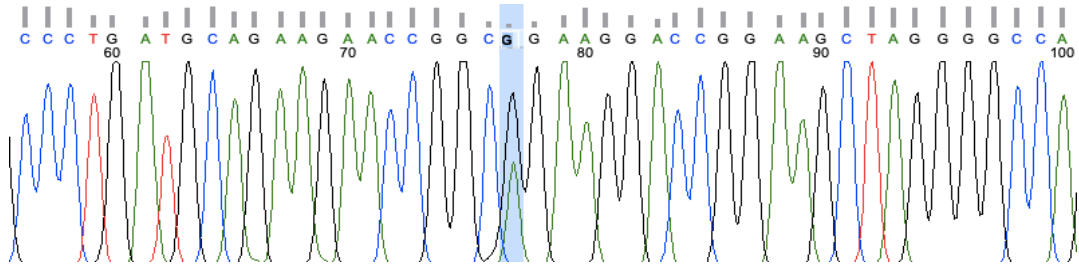
Şekil Ek-2.5. *KIF5A* geninde tanımlanan c.2738delG, p.Gly913AlafsTer135 heterozigot değişimi.



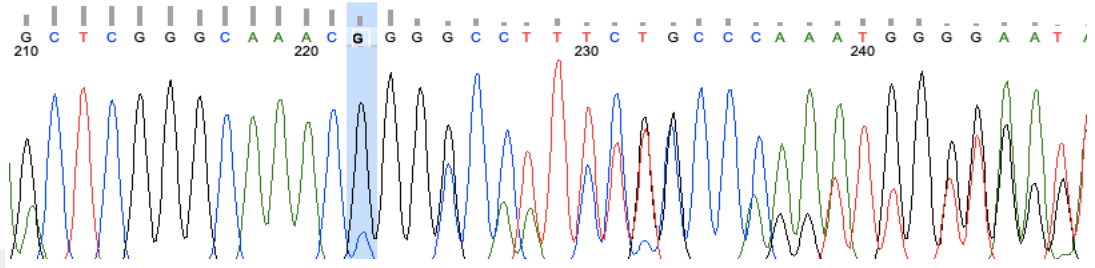
Şekil Ek-2.6. *CAPN3* geninde tanımlanan c.1469G>A, p.Arg490Gln heterozigot değişimi.



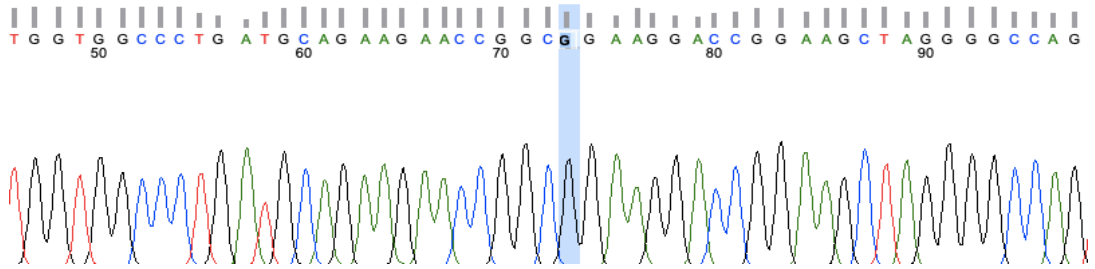
Şekil Ek-2.7. ALS-2334'de (hasta kuzen): *KIF5A* c.2738delG, p.Gly913AlafsTer135 değişimi için heterozigot.



Şekil Ek-2.8. ALS-2334 (hasta kuzen): *CAPN3* c.1469G>A, p.Arg490Gln değişimi için heterozigot.

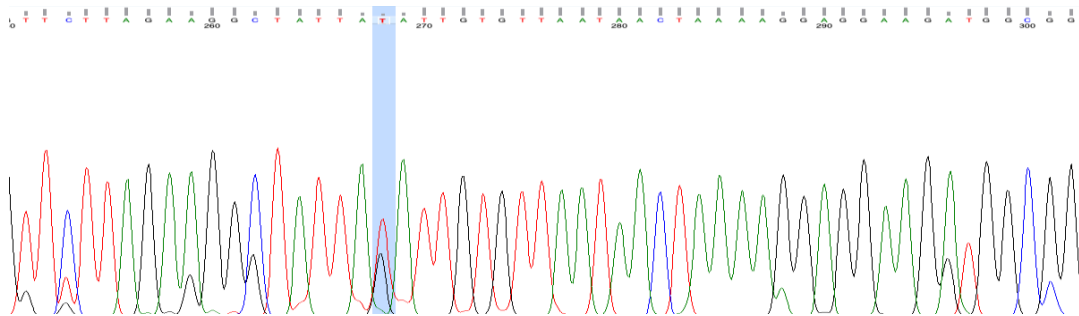


Şekil Ek-2.9. ALS-2919 (etkilenmiş kuzenin ALS tanılı oğlu): *KIF5A* c.2738delG, p.Gly913AlafsTer135 değişimi için heterozigot.

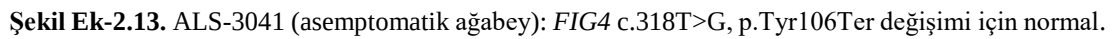


Şekil Ek-2.10. ALS-2919 (etkilenmiş kuzenin ALS tanılı oğlu): *CAPN3* c.1469G>A, p.Arg490Gln değişimi için normal.

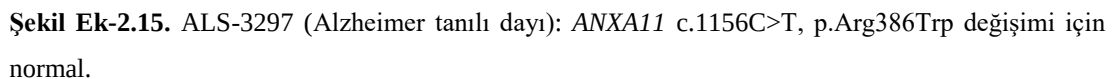
Aile 4: ALS-2523 (indeks)

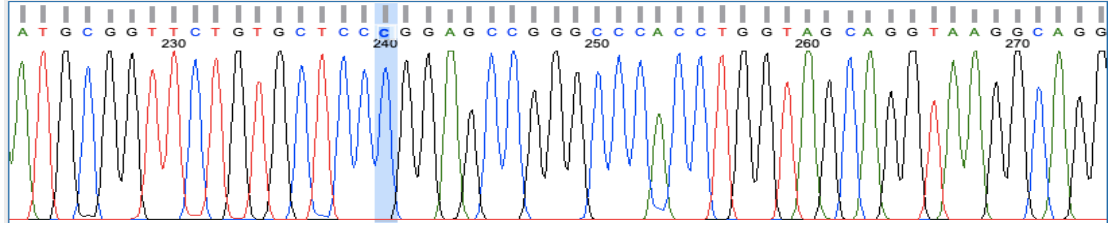


Şekil Ek-2.11. *FIG4* geninde tanımlanan c.318T>G, p.Tyr106Ter heterozigot değişimi.

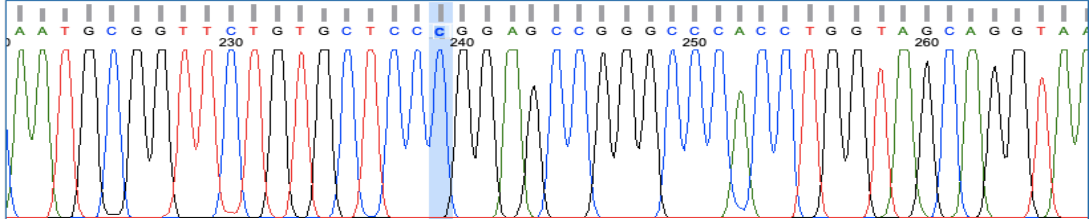


Şekil Ek-2.14. *ANXA11* geninde tanımlanan c.1156C>T, p.Arg386Trp heterozigot değişimi.



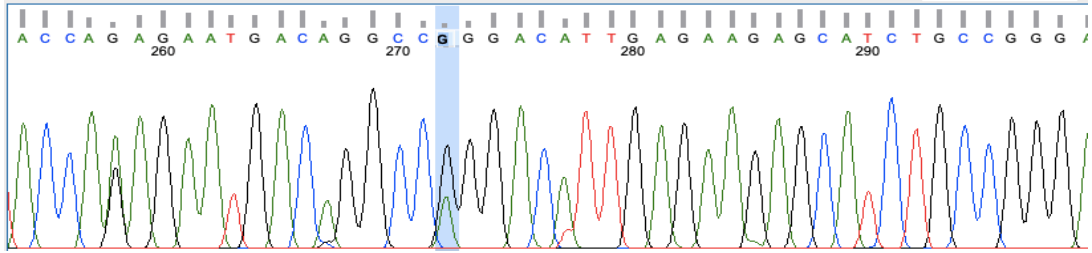


Şekil Ek-2.16. ALS-3298 (Alzheimer tanılı teyze): *ANXA11* c.1156C>T, p.Arg386Trp değişimi için normal.

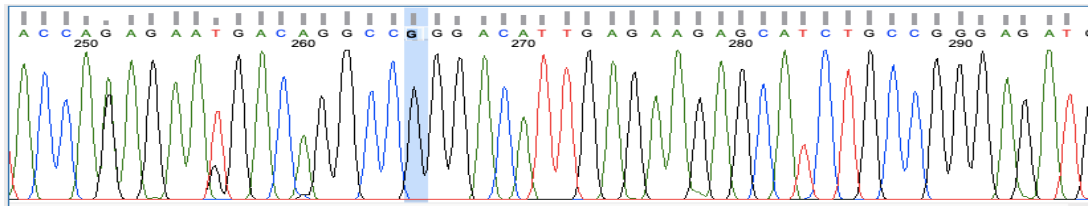


Şekil Ek-2.17. ALS-3296 (asemptomatik eşi): *ANXA11* c.1156C>T, p.Arg386Trp değişimi için normal.

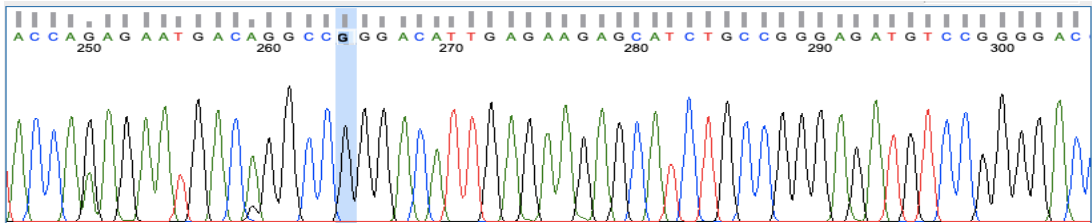
Aile 6: ALS-3110 (indeks)



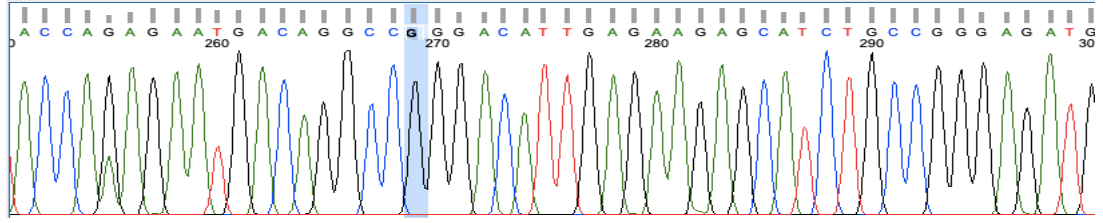
Şekil Ek-2.18. *ANXA11* geninde tanımlanan c.1211G>A, p.Arg404Gln heterozigot değişimi.



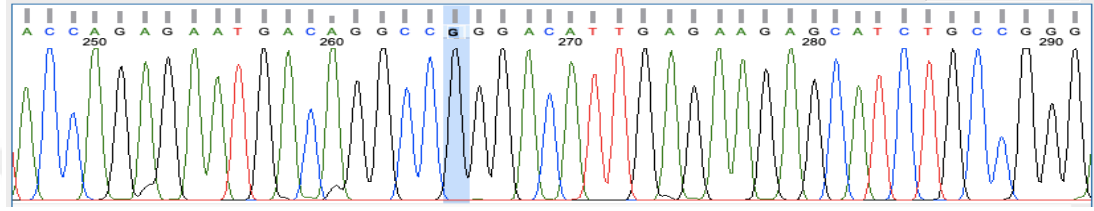
Şekil Ek-2.19. ALS-3111 (asemptomatik anne): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için normal.



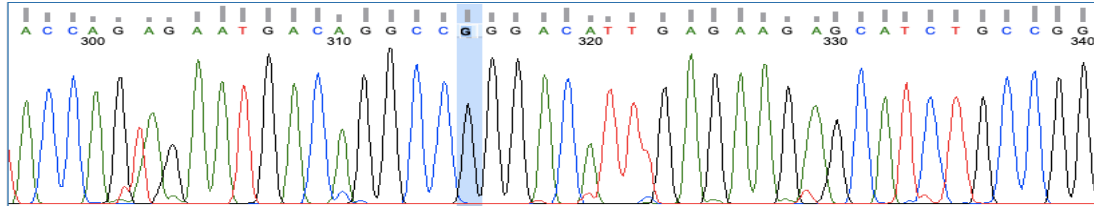
Şekil Ek-2.20. ALS-3387 (asemptomatik ağabey): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için normal.



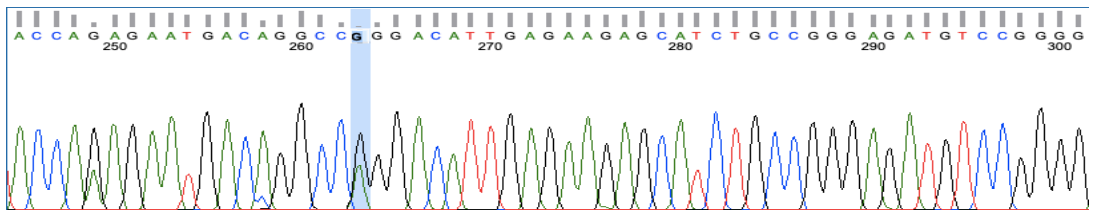
Şekil Ek-2.21. ALS-3389 (asemptomatik ağabey): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için normal.



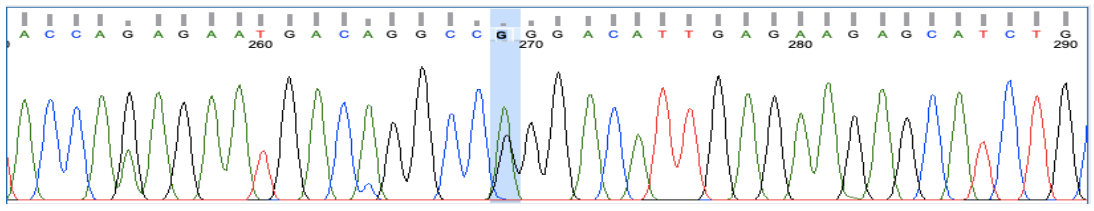
Şekil Ek-2.22. ALS-3390 (asemptomatik ağabey): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için normal.



Şekil Ek-2.23. ALS-3386 (asemptomatik ağabey): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için normal.



Şekil Ek-2.24. ALS-3388 (asemptomatik ağabey): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için heterozigot.



Şekil Ek-2.25. ALS-3391 (asemptomatik ağabey): *ANXA11* c.1211G>A, p.Arg404Gln değişimi için heterozigot.

Chromatogram showing a DNA sequence from position 180 to 220. The sequence is: G A G A T T C T A C A G C T T T G A C C G T T C T T C A C C A C A C T C C T. The peak at position 198 is highlighted in blue, indicating a C-to>T mutation.

A Sanger sequencing chromatogram displaying four lanes labeled A, C, G, and T at the top. The chromatogram shows multiple cycles of DNA sequencing, with peaks representing individual nucleotides. A blue vertical bar highlights a specific position in the sequence, approximately one-third of the way across the image. In this highlighted position, there is a prominent peak in the T (Thymine) lane, while other lanes show minimal signal.

96

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı :
Üniversite : Akdeniz Üniversitesi
Program : Tıbbi Genetik
Telefon numarası :
E-Mail :

Eğitim Bilgileri

Tarih	Üniversite	Program/ Enstitü	Ünvan
2009- 2013	Akdeniz Üniversitesi	Fen Fakültesi	BSc
2014- 2017	Akdeniz Üniversitesi	Tıbbi Genetik	MSc

Yüksek Lisans Tezi

“Sporadik Amyotrofik Lateral Skleroz (sALS) tanısı alan olgularda *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* ve *UBQLN2* gen mutasyonlarının araştırılması”

Yayınlar

Bayraktar, E., Çiftçi, V., Uysal, H., & Başak, A. N. (2023). Another de novo mutation in the SOD1 gene: the first Turkish patient with SOD1-His47Arg, a case report. *Frontiers in genetics*, 14, 1208673. doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1208673>

Ciftci, V., Darbas, S., Bilgen, T., Uysal, H., & Karauzum Berker, S. (2019). Genetic alterations of *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, and *UBQLN2* genes in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cogent Medicine*, 6:1582400. doi: <https://doi.org/10.1080/2331205X.2019.1582400>

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

26-29 Ekim 2017 - Poster sunumu (XV.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Uluslararası Katılımlı) Kongre Kitabı, www.tbğder.org. PS – 019

ALS ile ilişkilendirilen genler ve hücresel fonksiyonları (Genes and cellular functions associated with ALS). Sayfa numarası: 184- 185

Sempozyumda sunulan çalışma

Korkut Yaltkaya XIV. Klinik Nörofizyoloji Sempozyumu, 20-21 Aralık 2019 Konu: “Nadir hastalık olarak ALS” Sunum Başlığı: “Antalya ONTology-based Web Database for Understanding Amyotrophic Lateral Sclerosis (OnWebDUALS) Olgularının Genetik Özellikleri”