



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJENİTAL MYOPATİLERDEN SORUMLU MAJOR  
GENLERDE MUTASYON YÜK KARAKTERİZASYONU VE  
KLİNİK YAKLAŞIMLAR İÇİN KULLANIŞLI HOTSPOT  
BÖLGELERİN TANIMLANMASI**

**Huriye DOĞRU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)  
ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Doç. Dr. Sarp KAYA**

**BURDUR-2022**



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJENİTAL MYOPATİLERDEN SORUMLU MAJOR  
GENLERDE MUTASYON YÜK KARAKTERİZASYONU VE  
KLİNİK YAKLAŞIMLAR İÇİN KULLANIŞLI HOTSPOT  
BÖLGELERİN TANIMLANMASI**

**Huriye DOĞRU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)  
ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Doç. Dr. Sarp KAYA**

**BURDUR-2022**

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamda, çalışmalarım süresince beni hep destekleyip, cesaretlendiren ve donanımlarını hiçbir zaman sakınmayarak benimle paylaşan bilimsel, toplumsal her konuda hayata başka bir açıdan bakmamı sağlayan öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum danışmanım Doç. Dr. Sarp KAYA'ya, verilerimi elde etmeme katkı sağlayan bu alanda çalışmış tüm bilim insanlarına ve hayatım boyunca arkamda olan tüm fikir ve düşüncelerime saygı duyup beni cesaretlendiren anne ve babama teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                    |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| İÇ KAPAK SAYFASI                                                                                                   | <i>i</i>    |
| KABUL ve ONAY SAYFASI                                                                                              | <i>ii</i>   |
| TEŞEKKÜR                                                                                                           | <i>iii</i>  |
| ETİK BEYAN                                                                                                         | <i>iv</i>   |
| İÇİNDEKİLER                                                                                                        | <i>v</i>    |
| ŞEKİLLER                                                                                                           | <i>viii</i> |
| TABLolar                                                                                                           | <i>xix</i>  |
| SİMGELER ve KISALTMALAR                                                                                            | <i>xxii</i> |
| TÜRKÇE ÖZET                                                                                                        | <i>xxiv</i> |
| İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)                                                                                          | <i>xxv</i>  |
| 1. GİRİŞ                                                                                                           | 1           |
| 2. GENEL BİLGİLER                                                                                                  | 4           |
| 2.1. İskelet Kas Yapısı ve Biyomekaniği                                                                            | 4           |
| 2.2. Konjenital Myopatiler                                                                                         | 7           |
| 2.3. Konjenital Myopati Tipleri                                                                                    | 10          |
| 2.3.1. Nemalin Myopati                                                                                             | 10          |
| 2.3.2. Kor Myopati                                                                                                 | 10          |
| 2.3.3. Sentronükleer Myopati                                                                                       | 11          |
| 2.3.4. Konjenital Lif Tipi Uyumsuzluğu                                                                             | 13          |
| 2.3.5. Miyozin Depolama Myopatisi                                                                                  | 14          |
| 2.4. Konjenital Myopatilerden Sorumlu Genler ve Patofizyolojik Mekanizmalar                                        | 14          |
| 2.5. Konjenital Myopatilerden Sorumlu Olan ve Yapısal Fonksiyonları Etkileyen Proteinler ve Sentezledikleri Genler | 16          |
| 2.5.1. Nebulin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu                                                                       | 16          |
| 2.5.1.1. <i>NEB</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                                     | 17          |
| 2.5.2. Titin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu                                                                         | 20          |
| 2.5.2.1. <i>TTN</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                                     | 23          |
| 2.6. Konjenital Myopatilerde Fonksiyonel Mekanizmaları Etkileyen Proteinler ve Sentezledikleri Genler              | 25          |
| 2.6.1. Enzimatik Aktivite Mekanizması                                                                              | 25          |
| 2.6.1.1. Miyotübülerin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu                                                               | 25          |
| 2.6.1.1.1. <i>MTM1</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                                  | 27          |
| 2.6.1.2. Dinamin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu                                                                     | 29          |
| 2.6.1.2.1. <i>DNM2</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                                  | 30          |
| 2.6.1.3. Kofilin Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu                                                                    | 31          |
| 2.6.1.3.1. <i>CFL2</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                                  | 33          |
| 2.6.1.4. Amfifizin Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu                                                                  | 34          |
| 2.6.1.4.1. <i>BIN1</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                                  | 36          |
| 2.6.2. Kalsiyum Homeostazi                                                                                         | 37          |

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.6.2.1. Ryanodin Reseptör Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu                                           | 37  |
| 2.6.2.1.1. <i>RYR1</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                   | 39  |
| 2.6.2.2. Selenoprotein N Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu                                           | 41  |
| 2.6.2.2.1. <i>SEPN1</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                  | 43  |
| 2.6.3. Miyofibriler Kuvvet Defektleri                                                               | 44  |
| 2.6.3.1. Aktin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu                                                        | 44  |
| 2.6.3.1.1. <i>ACTA1</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                  | 48  |
| 2.6.3.2. Miyozin Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu                                                     | 50  |
| 2.6.3.2.1. <i>MYH7</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                   | 52  |
| 2.6.3.3. Tropomiyozin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu                                                 | 53  |
| 2.6.3.3.1. <i>TPM2</i> ve <i>TPM3</i> Genleri Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi | 56  |
| 2.6.3.4. Troponin Proteinin Yapısı Fonksiyonu                                                       | 58  |
| 2.6.3.4.1. <i>TNNT1</i> Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi                  | 61  |
| 2.7. Mutasyon Yoğun Bölgelerin Genetik Testlerde Kullanım Potansiyeli                               | 63  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM                                                                                  | 64  |
| 3.1. Genlere Ait Mutasyon Verilerinin Veri Tabanlarından Elde Edilmesi                              | 64  |
| 3.2. Mutasyonların Genlerin Ekzon-İntron Organizasyonuna Göre Yerleştirilmesi                       | 64  |
| 3.3. Veri Analizi                                                                                   | 65  |
| 3.3.1. Tanımlayıcı İstatistikler, Kümeleme ve Isı-Harita Analizleri                                 | 65  |
| 3.3.2. Outlier Analizleri ve Klinik Potansiyeli Olan Belirteç Bölgelerin Belirlenmesi               | 66  |
| 3.3.3. Mutasyon Yükünün Öne Çıkardığı Myopatilerle İlişkili Ekzon Gruplarının Belirlenmesi          | 66  |
| 4-BULGULAR                                                                                          | 68  |
| 4.1. Yapısal Proteinlerin Sentezlandıkları Genler                                                   | 68  |
| 4.1.1. <i>NEB</i> Geni                                                                              | 68  |
| 4.1.1.1. <i>NEB</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları          | 69  |
| 4.1.2. <i>TTN</i> Geni                                                                              | 82  |
| 4.1.2.1. <i>TTN</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları          | 84  |
| 4.2. Fonksiyonel Mekanizmalardan Sorumlu Proteinlerin Sentezlandıkları Genler                       | 102 |
| 4.2.1 Enzimatik Aktivite Mekanizması                                                                | 102 |
| 4.2.1.1. <i>MTM1</i> Geni                                                                           | 102 |
| 4.2.1.1.1. <i>MTM1</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları       | 104 |
| 4.2.1.2. <i>DNM2</i> Geni                                                                           | 114 |
| 4.2.1.2.1. <i>DNM2</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları       | 116 |

|                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.1.3. <i>CFL2</i> Geni                                                                       | 124 |
| 4.2.1.3.1. <i>CFL2</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları   | 126 |
| 4.2.1.4. <i>BIN1</i> Geni                                                                       | 131 |
| 4.2.1.4.1. <i>BIN1</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları   | 133 |
| 4.2.2. Kalsiyum Homeostazı                                                                      | 142 |
| 4.2.2.1. <i>RYR1</i> Geni                                                                       | 142 |
| 4.2.2.1.1. <i>RYR1</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları   | 144 |
| 4.2.2.2. <i>SEPNI</i> Geni                                                                      | 155 |
| 4.2.2.2.1. <i>SEPNI</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları  | 157 |
| 4.2.3. Miyofibriler Kuvvet                                                                      | 166 |
| 4.2.3.1. <i>ACTA1</i> Geni                                                                      | 166 |
| 4.2.3.1.1. <i>ACTA1</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları  | 168 |
| 4.2.3.2. <i>MYH7</i> Geni                                                                       | 175 |
| 4.2.3.2.1. <i>MYH7</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları   | 177 |
| 4.2.3.3. <i>TPM2</i> Geni                                                                       | 187 |
| 4.2.3.3.1. <i>TPM2</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları   | 189 |
| 4.2.3.4. <i>TPM3</i> Geni                                                                       | 196 |
| 4.2.3.4.1. <i>TPM3</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları   | 198 |
| 4.2.3.5. <i>TNNT1</i> Geni                                                                      | 205 |
| 4.2.3.5.1. <i>TNNT1</i> Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımı     | 207 |
| 5. TARTIŞMA                                                                                     | 217 |
| 5.1. Konjenital Myopatilerden Sorumlu Genlerin Mutasyon Yük Profilleri ve Klinik Potansiyelleri | 217 |
| 5.1.1. Sarkomer İçerisinde Yapısal Koordinasyondan Sorumlu Genler                               | 217 |
| 5.1.2. Kas Kasılmasında Fonksiyonel Rol Üstlenen Genler                                         | 221 |
| 5.1.2.1. Enzimatik Aktivite                                                                     | 221 |
| 5.1.2.2. Kalsiyum Homeostazı                                                                    | 226 |
| 5.1.2.3. Miyofibriler Kuvvet                                                                    | 230 |
| 5.2. Mutasyon Yükleri                                                                           | 236 |
| 5.3. Mutasyonların Protein Yapı ve Fonksiyonuna Etkisi                                          | 238 |
| 5.4. Mutasyon Toleransı                                                                         | 239 |
| 5.5. Alternatif Eklemenin Etkisi                                                                | 240 |
| 5.6. Konjenital Myopatilerin Poligenik Doğası ve Pleiotropik Etkisi                             | 240 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER                                                                            | 244 |
| KAYNAKLAR                                                                                       | 246 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                        | 265 |

## ŞEKİLLER

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1.  | Kas yapısı içerisindeki miyofibril, sarkomer yapısı ve kontraktıl proteinler (Oliver ve ark., 2016)                                                                                                                                                                                                                        | 5  |
| Şekil 2.2.  | İskelet kaslarında gerçekleşen kasılma ve gevşeme süreci (Fusto ve ark., 2019)                                                                                                                                                                                                                                             | 7  |
| Şekil 2.3.  | Konjenital myopati hastalarında görülen klinik bulgular (Neto ve ark., 2017; Dilaver ve ark., 2017; North ve ark., 2014)                                                                                                                                                                                                   | 8  |
| Şekil 2.4.  | Konjenital myopatiler görülen kas biyopsilerinde gözlenen patolojik özellikler (Cassandri ve ark., 2017; Gonzalez ve ark., 2019; , Oldfords ve ark., 2017'dan modifiye edildi.)                                                                                                                                            | 9  |
| Şekil 2.5.  | Konjenital myopati tiplerine sebep olan genler ve hastalıkların ortaya çıkardığı fenotipler                                                                                                                                                                                                                                | 15 |
| Şekil 2.6.  | Nebulin proteininin sarkomer içerisindeki konumu (Yuen ve ark., 2020)                                                                                                                                                                                                                                                      | 16 |
| Şekil 2.7.  | Nebulin proteini yapısı ve diğer proteinler ile bağlanma noktaları (Yuen ve ark., 2020)                                                                                                                                                                                                                                    | 18 |
| Şekil 2.8.  | Nebulin proteinine ait bölgelerin <i>NEB</i> geninin ekzonları üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                                           | 19 |
| Şekil 2.9.  | Sarkomerler içerisinde titin proteinin konumu (Guo ve ark., 2010)                                                                                                                                                                                                                                                          | 22 |
| Şekil 2.10. | Titin proteinin fonksiyonel bölgeleri ve sarkomerler üzerinde bulundukları kısımlar (Krüger, 2015'den modifiye edilmiştir).                                                                                                                                                                                                | 22 |
| Şekil 2.11. | Titin geninde alternatif ekleme ile farklılaşan izoformları (Ge ve ark., 2019)                                                                                                                                                                                                                                             | 23 |
| Şekil 2.12. | <i>TTN</i> geninin çeşitli bölgelerinin ekzonlar üzerine dağılımı                                                                                                                                                                                                                                                          | 24 |
| Şekil 2.13. | Miyotübülerin protein ailesine ait proteinler, bu proteinlere ait domainler ve <i>MTMR1</i> proteininin ait üç boyutlu yapısı (Begley ve ark., 2003; Min Bong ve ark., 2016 modifiye edilmiştir.)                                                                                                                          | 26 |
| Şekil 2.14. | <i>MTM1</i> geni ekzonları ve proteinde yer alan fonksiyonel kısımları                                                                                                                                                                                                                                                     | 28 |
| Şekil 2.15. | <i>DNM2</i> geninin çeşitli bölgelerinin ekzonlar üzerine dağılımı                                                                                                                                                                                                                                                         | 30 |
| Şekil 2.16. | İnsanda <i>CFL2</i> genine ait transkriptler. Gen üzerinde kodlama yapan bölgeler gri renkteyken, kodlama yapmayan bölgeler siyah renkte gösterilmektedir (Thirion ve ark., 2001).                                                                                                                                         | 33 |
| Şekil 2.17. | <i>BIN1</i> geni üzerinde yer alan fonksiyonel kısımlar ve alternatif splicing ile farklı dokularda ifade edilen izoformlar                                                                                                                                                                                                | 36 |
| Şekil 2.18. | Ryanodin reseptörün üç bölgeden oluşan yapısı. Sitoplazma içerisinde yer alan sitoplazmik bölge, aktivasyon merkezi ve transmembran bölge içerisinde yer alan pore bölgesi (a). Ryanodin reseptör 1 proteinine ait bölgeler ve hücre içerisinde bulundukları konumlar (b) (Williams ve ark., 2018; Santulli ve ark., 2018) | 39 |
| Şekil 2.19. | Selenoprotein N proteinine ait bölgelerin <i>SEPNI</i> geninin ekzonları üzerine dağılımı                                                                                                                                                                                                                                  | 42 |
| Şekil 2.20. | Selenoprotein N proteinine ait domainler (Castets ve ark., 2012)                                                                                                                                                                                                                                                           | 42 |



|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 2.21.</b> | <i>SEPNI</i> çalışma prensibi (Chernorudskiy ve ark., 2020)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>43</b> |
| <b>Şekil 2.22.</b> | Aktin proteini 3 boyutlu yapısında yer alan domainler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>46</b> |
| <b>Şekil 2.23.</b> | Aktin polimerizasyonunun gerçekleştiği üç evre (Diana ve ark., 2020)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>48</b> |
| <b>Şekil 2.24.</b> | Aktin bağlanma proteinlerinin polimerizasyon-depolimerizasyon sürecindeki görevleri (Diana ve ark., 2020; Nonaka ve ark., 2011'den modifiye edildi.)                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>49</b> |
| <b>Şekil 2.25.</b> | Miyozin protein ailesine ait proteinler, bu proteinlere ait domainler (Batters ve Veigel, 2016)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>51</b> |
| <b>Şekil 2.26.</b> | Miyozin proteini üzerinde S1, S2 ve LMM yapılanmalarının şematik gösterimi (Fiorillo ve ark., 2016'dan alınmıştır.)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>52</b> |
| <b>Şekil 2.27.</b> | İnsanda <i>TPM2.2</i> genindeki aktin bağlanma periyotları (P1-P7). Yeşil renk ile gösterilen aktin bağlanma periyodu 3'deki 89 ve 123.aminoasitlerin pozisyonları ve heptapeptit tekrarlarındaki aminoasit tekrarlarının gösterimi (a-g). (Sliwinska ve ark., 2021)                                                                                                                                                                 | <b>55</b> |
| <b>Şekil 2.28.</b> | Tropomiyozinin sarmal bobin yapısı (a). Sarmal bobin yapısının bir arada kalabilmesindeki etkili moleküller arası etkileşimler (b)                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>55</b> |
| <b>Şekil 2.29.</b> | <i>TPM</i> genlerine ait ekzonlar ve farklı izoformlarda yer alan ekzon yerleşimleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>56</b> |
| <b>Şekil 2.30.</b> | Troponin kompleksinin 3 boyutlu yapısı ve TnT proteininin fonksiyonel alanları (Mondal ve ark., 2017'den uyarlanmıştır.)                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>59</b> |
| <b>Şekil 2.31.</b> | <i>TNNT1</i> Geni ekzonları ve bu ekzonların proteindeki görev aldıkları bölgeler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>60</b> |
| <b>Şekil 4.1.</b>  | <i>NEB</i> geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.) Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir. | <b>69</b> |
| <b>Şekil 4.2.</b>  | <i>NEB</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.                                                                                                                                                 | <b>71</b> |
| <b>Şekil 4.3</b>   | <i>NEB</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir                                                                                                                                                   | <b>73</b> |
| <b>Şekil 4.4</b>   | <i>NEB</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.                                                                                                                                 | <b>75</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.5.</b>  | <i>NEB</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.        | <b>76</b>  |
| <b>Şekil 4.6.</b>  | <i>NEB</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.    | <b>78</b>  |
| <b>Şekil 4.7.</b>  | <i>NEB</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.   | <b>80</b>  |
| <b>Şekil 4.8.</b>  | <i>NEB</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                    | <b>81</b>  |
| <b>Şekil 4.9.</b>  | <i>TTN</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları                                                                                                                                                                                               | <b>83</b>  |
| <b>Şekil 4.10.</b> | <i>TTN</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                        | <b>86</b>  |
| <b>Şekil 4.11.</b> | <i>TTN</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                         | <b>88</b>  |
| <b>Şekil 4.12.</b> | <i>TTN</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                        | <b>92</b>  |
| <b>Şekil 4.13.</b> | <i>TTN</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı.                                                                                                                                                                                                                       | <b>94</b>  |
| <b>Şekil 4.14.</b> | <i>TTN</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                    | <b>98</b>  |
| <b>Şekil 4.15.</b> | <i>TTN</i> geninde intronlarda gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                       | <b>100</b> |
| <b>Şekil 4.16</b>  | <i>TTN</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi                                                                                                                                                                                             | <b>102</b> |
| <b>Şekil 4.17.</b> | <i>MTM1</i> geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları                                                                                                                                                                                      | <b>104</b> |
| <b>Şekil 4.18.</b> | <i>MTM1</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>105</b> |
| <b>Şekil 4.19.</b> | <i>MTM1</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.  | <b>107</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.20.</b> | <i>MTM1</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                                                             | <b>108</b> |
| <b>Şekil 4.21.</b> | <i>MTM1</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>110</b> |
| <b>Şekil 4.22.</b> | <i>MTM1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                                                                         | <b>111</b> |
| <b>Şekil 4.23.</b> | <i>MTM1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmekte (b).                                                                       | <b>112</b> |
| <b>Şekil 4.24.</b> | <i>MTM1</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>113</b> |
| <b>Şekil 4.25.</b> | <i>MTM1</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>114</b> |
| <b>Şekil 4.26.</b> | <i>DNM2</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>116</b> |
| <b>Şekil 4.27.</b> | <i>DNM2</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                                                                             | <b>117</b> |
| <b>Şekil 4.28.</b> | <i>DNM2</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                                                                              | <b>118</b> |
| <b>Şekil 4.29.</b> | <i>DNM2</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı. Kırmızı boyalı noktalarla hotspot ekzonları gösterilmiştir (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>119</b> |
| <b>Şekil 4.30.</b> | <i>DNM2</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                                                                         | <b>121</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.31.</b> | <i>DNM2</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.         | <b>122</b> |
| <b>Şekil 4.32.</b> | <i>DNM2</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                   | <b>123</b> |
| <b>Şekil 4.33.</b> | <i>DNM2</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi                                                                                                                                                                                                           | <b>124</b> |
| <b>Şekil 4.34.</b> | <i>CFL2</i> geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları                                                                                                                                                                                                     | <b>126</b> |
| <b>Şekil 4.35.</b> | <i>CFL2</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir                 | <b>127</b> |
| <b>Şekil 4.36.</b> | <i>CFL2</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                  | <b>128</b> |
| <b>Şekil 4.37.</b> | <i>CFL2</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>129</b> |
| <b>Şekil 4.38.</b> | <i>CFL2</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>130</b> |
| <b>Şekil 4.39.</b> | <i>CFL2</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir              | <b>131</b> |
| <b>Şekil 4.40.</b> | <i>BIN1</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları                                                                                                                                                                                                             | <b>133</b> |
| <b>Şekil 4.41.</b> | <i>BIN1</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>134</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.42.</b> | <i>BIN1</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.           | <b>135</b> |
| <b>Şekil 4.43.</b> | <i>BIN1</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                               | <b>136</b> |
| <b>Şekil 4.44.</b> | <i>BIN1</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                               | <b>137</b> |
| <b>Şekil 4.45.</b> | <i>BIN1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.      | <b>139</b> |
| <b>Şekil 4.46.</b> | <i>BIN1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir. | <b>140</b> |
| <b>Şekil 4.47.</b> | <i>BIN1</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                           | <b>141</b> |
| <b>Şekil 4.48.</b> | <i>BIN1</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi                                                                                                                                                                                                     | <b>142</b> |
| <b>Şekil 4.49.</b> | <i>RYR1</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları. (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlarda aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                                       | <b>143</b> |
| <b>Şekil 4.50.</b> | <i>RYR1</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                               | <b>145</b> |
| <b>Şekil 4.51.</b> | <i>RYR1</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                                | <b>147</b> |
| <b>Şekil 4.52.</b> | <i>RYR1</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                               | <b>149</b> |
| <b>Şekil 4.53.</b> | <i>RYR1</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                               | <b>150</b> |
| <b>Şekil 4.54.</b> | <i>RYR1</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                | <b>152</b> |
| <b>Şekil 4.55.</b> | <i>RYR1</i> geninde intronlarda gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                              | <b>153</b> |
| <b>Şekil 4.56.</b> | <i>RYR1</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                           | <b>154</b> |
| <b>Şekil 4.57.</b> | <i>SEPNI</i> geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                              | <b>156</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.58.</b> | <i>SEPNI</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                | <b>158</b> |
| <b>Şekil 4.59.</b> | <i>SEPNI</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>159</b> |
| <b>Şekil 4.60.</b> | <i>SEPNI</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b).Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>160</b> |
| <b>Şekil 4.61.</b> | <i>SEPNI</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                | <b>161</b> |
| <b>Şekil 4.62.</b> | <i>SEPNI</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmekte (b).              | <b>163</b> |
| <b>Şekil 4.63.</b> | <i>SEPNI</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.       | <b>164</b> |
| <b>Şekil 4.64.</b> | <i>SEPNI</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                 | <b>165</b> |
| <b>Şekil 4.65.</b> | <i>SEPNI</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi                                                                                                                                                                                                          | <b>166</b> |
| <b>Şekil 4.66.</b> | <i>ACTAI</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları. (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                                            | <b>167</b> |
| <b>Şekil 4.67.</b> | <i>ACTAI</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları benzerliğe işaret etmektedir.                              | <b>169</b> |
| <b>Şekil 4.68.</b> | <i>ACTAI</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları benzerliğe işaret etmektedir.                               | <b>170</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.69.</b> | <i>ACTA1</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                     | <b>171</b> |
| <b>Şekil 4.70.</b> | <i>ACTA1</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                                     | <b>172</b> |
| <b>Şekil 4.71.</b> | <i>ACTA1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları bezerliğe işaret etmektedir.                                    | <b>173</b> |
| <b>Şekil 4.72.</b> | <i>ACTA1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları benzerliğe işaret etmektedir.                                 | <b>174</b> |
| <b>Şekil 4.73.</b> | <i>ACTA1</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                 | <b>174</b> |
| <b>Şekil 4.74.</b> | <i>ACTA1</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi                                                                                                                                                                                                           | <b>175</b> |
| <b>Şekil 4.75.</b> | <i>MYH7</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                                             | <b>177</b> |
| <b>Şekil 4.76.</b> | <i>MYH7</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>178</b> |
| <b>Şekil 4.77.</b> | <i>MYH7</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>180</b> |
| <b>Şekil 4.78.</b> | <i>MYH7</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>181</b> |
| <b>Şekil 4.79.</b> | <i>MYH7</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.               | <b>182</b> |
| <b>Şekil 4.80.</b> | <i>MYH7</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.            | <b>183</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |            |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.81.</b> | <i>MYH7</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.            | <b>185</b> |
| <b>Şekil 4.82.</b> | <i>MYH7</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyon ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                        | <b>186</b> |
| <b>Şekil 4.83.</b> | <i>MYH7</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi                                                                                                                                                                                                              | <b>187</b> |
| <b>Şekil 4.84.</b> | <i>TPM2</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                                                 | <b>188</b> |
| <b>Şekil 4.85.</b> | <i>TPM2</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                    | <b>190</b> |
| <b>Şekil 4.86.</b> | <i>TPM2</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                    | <b>191</b> |
| <b>Şekil 4.87.</b> | <i>TPM2</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                         | <b>192</b> |
| <b>Şekil 4.88.</b> | <i>TPM2</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                                         | <b>193</b> |
| <b>Şekil 4.89.</b> | <i>TPM2</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı gösterilmiştir (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>194</b> |
| <b>Şekil 4.90.</b> | <i>TPM2</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a).Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.            | <b>194</b> |
| <b>Şekil 4.91.</b> | <i>TPM2</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                     | <b>195</b> |
| <b>Şekil 4.92.</b> | <i>TPM2</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi                                                                                                                                                                                                               | <b>196</b> |
| <b>Şekil 4.93.</b> | <i>TPM3</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                                                 | <b>198</b> |



|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.94.</b>  | <i>TPM3</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>199</b> |
| <b>Şekil 4.95.</b>  | <i>TPM3</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                   | <b>200</b> |
| <b>Şekil 4.96.</b>  | <i>TPM3</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>201</b> |
| <b>Şekil 4.97.</b>  | <i>TPM3</i> geninde nonsense mutasyonlarının ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                | <b>202</b> |
| <b>Şekil 4.98.</b>  | <i>TPM3</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.             | <b>203</b> |
| <b>Şekil 4.99.</b>  | <i>TPM3</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.          | <b>204</b> |
| <b>Şekil 4.100.</b> | <i>TPM3</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                   | <b>204</b> |
| <b>Şekil 4.101.</b> | <i>TPM3</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi                                                                                                                                                                                                             | <b>205</b> |
| <b>Şekil 4.102.</b> | <i>TNNT1</i> geninde ekzon ve intronlarda tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)                                                                                              | <b>207</b> |
| <b>Şekil 4.103.</b> | <i>TNNT1</i> geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                | <b>209</b> |
| <b>Şekil 4.104.</b> | <i>TNNT1</i> geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.                 | <b>210</b> |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Şekil 4.105.</b> | <i>TNNT1</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir. | <b>211</b> |
| <b>Şekil 4.106.</b> | <i>TNNT1</i> geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı                                                                                                                                                                                                                                      | <b>212</b> |
| <b>Şekil 4.107.</b> | <i>TNNT1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.             | <b>214</b> |
| <b>Şekil 4.108.</b> | <i>TNNT1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.       | <b>215</b> |
| <b>Şekil 4.109.</b> | <i>TNNT1</i> geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi                                                                                                                                                                                                                  | <b>215</b> |
| <b>Şekil 4.110.</b> | <i>TNNT1</i> geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi                                                                                                                                                                                                            | <b>216</b> |

## TABLÖLAR

|                    |                                                                                                                                                                                                     |           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tablo 2.1.</b>  | Konjenital myopatiden sorumlu genlerin ortaya çıkardıkları patolojik mekanizmaların özeti                                                                                                           | <b>15</b> |
| <b>Tablo 4.1.</b>  | <i>NEB</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri                                                | <b>67</b> |
| <b>Tablo 4.2.</b>  | <i>NEB</i> geninde missense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                        | <b>71</b> |
| <b>Tablo 4.3.</b>  | <i>NEB</i> geninde sinonim mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                         | <b>74</b> |
| <b>Tablo 4.4.</b>  | <i>NEB</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar        | <b>75</b> |
| <b>Tablo 4.5.</b>  | <i>NEB</i> geninde nonsense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                        | <b>77</b> |
| <b>Tablo 4.6.</b>  | <i>NEB</i> geninde görülen tüm mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                     | <b>78</b> |
| <b>Tablo 4.7.</b>  | <i>NEB</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar | <b>81</b> |
| <b>Tablo 4.8.</b>  | <i>TTN</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.                                               | <b>82</b> |
| <b>Tablo 4.9.</b>  | <i>TTN</i> geninde missense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                        | <b>87</b> |
| <b>Tablo 4.10.</b> | <i>TTN</i> geninde sinonim mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                         | <b>89</b> |
| <b>Tablo 4.11.</b> | <i>TTN</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar        | <b>93</b> |
| <b>Tablo 4.12.</b> | <i>TTN</i> geninde nonsense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                        | <b>95</b> |
| <b>Tablo 4.13.</b> | <i>TTN</i> geninde görülen tüm mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar                   | <b>97</b> |

|                    |                                                                                                                                                                                                              |            |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tablo 4.14.</b> | <i>TTN</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar          | <b>101</b> |
| <b>Tablo 4.15.</b> | <i>MTM1</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri                                                        | <b>103</b> |
| <b>Tablo 4.16.</b> | <i>DNM2</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri                                                        | <b>115</b> |
| <b>Tablo 4.17.</b> | <i>CFL2</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.                                                       | <b>125</b> |
| <b>Tablo 4.18.</b> | <i>BINI</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.                                                       | <b>132</b> |
| <b>Tablo 4.19.</b> | <i>RYR1</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.                                                       | <b>142</b> |
| <b>Tablo 4.20.</b> | <i>RYR1</i> geninde missense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                                | <b>146</b> |
| <b>Tablo 4.21.</b> | <i>RYR1</i> geninde sinonim mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                                 | <b>148</b> |
| <b>Tablo 4.22.</b> | <i>RYR1</i> geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar.               | <b>149</b> |
| <b>Tablo 4.23.</b> | <i>RYR1</i> geninde stop kodon oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar | <b>151</b> |
| <b>Tablo 4.24.</b> | <i>RYR1</i> geninde görülen tüm mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar                             | <b>152</b> |
| <b>Tablo 4.25.</b> | <i>RYR1</i> geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar         | <b>154</b> |
| <b>Tablo 4.26.</b> | <i>SEPNI</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.                                                      | <b>155</b> |
| <b>Tablo 4.27.</b> | <i>ACTA1</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.                                                      | <b>167</b> |

|                    |                                                                                                                                                         |            |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tablo 4.28.</b> | <i>MYH7</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.  | <b>176</b> |
| <b>Tablo 4.29.</b> | <i>TPM2</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.  | <b>187</b> |
| <b>Tablo 4.30.</b> | <i>TPM3</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.  | <b>197</b> |
| <b>Tablo 4.31.</b> | <i>TNNT1</i> geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri. | <b>206</b> |
| <b>Tablo 5.1.</b>  | Çalışılan 13 gende saptanan hotspot bölge, pozisyonlar ve protein üzerindeki olası etki mekanizmaları                                                   | <b>242</b> |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                   |                                          |
|-------------------|------------------------------------------|
| <b>ACh</b>        | Asetilkolin                              |
| <b>ACTA1</b>      | İskelet kası $\alpha$ aktin              |
| <b>ACTB</b>       | Aktin beta                               |
| <b>ACTC1</b>      | Kalp sası $\alpha$ aktin 1               |
| <b>ADF</b>        | aktin depolimerize edici faktör          |
| <b>ADP</b>        | Adenozin difosfat                        |
| <b>ATP</b>        | Adenozin trifosfat                       |
| <b>ATPaz</b>      | Adenin trinükleotidaz                    |
| <b>B-sol</b>      | Köprü solenoidi (bridge solenoid)        |
| <b>BIN1</b>       | Amfifizin 1                              |
| <b>CFL2</b>       | Kofilin 2                                |
| <b>CK</b>         | Kreatin kinaz                            |
| <b>CLAP</b>       | Klatrin ve AP2 bağlanma alanı            |
| <b>C-terminal</b> | Karboksi terminal                        |
| <b>D</b>          | Aspartik asit                            |
| <b>DHPR</b>       | Dihidropiridin reseptörü                 |
| <b>DNA</b>        | Deoksiribo nükleik asit                  |
| <b>DNM2</b>       | Dinamin 2                                |
| <b>EF</b>         | EF-hand motifs                           |
| <b>EKM</b>        | Elektromyografi                          |
| <b>FAD</b>        | Nikotinamid adenin dinükleotid           |
| <b>FN3</b>        | fibronektin tip 3 benzeri                |
| <b>FYVE</b>       | Fab1p, YO1B, Vac1p, EEA1                 |
| <b>G</b>          | Glisin                                   |
| <b>GED</b>        | GTPaz efektör alanı                      |
| <b>GRAM</b>       | Glukoziltransferaz                       |
| <b>GTP</b>        | Guanozin trifosfataz                     |
| <b>I</b>          | İzolösin                                 |
| <b>IP3R</b>       | İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörler     |
| <b>Ig</b>         | immünoglobulin                           |
| <b>Jsol</b>       | Bağlantı solenoidi (junctional solenoid) |
| <b>K</b>          | Potasyum                                 |
| <b>KLHL40</b>     | Kelch benzeri protein-40                 |
| <b>L</b>          | Lösin                                    |
| <b>LMM</b>        | Hafif meromiyozin                        |
| <b>MBD</b>        | Myc bağlanma alanı                       |
| <b>MTM1</b>       | Miyotübülerin 1                          |
| <b>MYH7</b>       | Miyozin ağır zincir 7                    |
| <b>Mg</b>         | Magnezyum                                |
| <b>Mrna</b>       | Mesajcı ribonükleik asit                 |
| <b>N-BAR</b>      | BIN-amfifizin/Rvs                        |
| <b>NADP</b>       | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat    |
| <b>NEB</b>        | Nebulin                                  |
| <b>NTD-A</b>      | N terminal A                             |
| <b>NTD-B</b>      | N terminal B                             |
| <b>Na</b>         | Sodyum                                   |

|                     |                                                                |
|---------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Nsol</b>         | N-terminal solenoid                                            |
| <b>PEVK</b>         | Yüksek prolin glutamat valinden lizin kalıntıları              |
| <b>PH</b>           | Pleckstrin homoloji                                            |
| <b>PI</b>           | Fosfoinositid                                                  |
| <b>PRD</b>          | Prolin zengini bölge                                           |
| <b><i>RYR1</i></b>  | Ryanodin reseptörü 1                                           |
| <b>S</b>            | Serin                                                          |
| <b><i>SEPN1</i></b> | Selenoprotein 1                                                |
| <b>SERCA</b>        | Sarko/endoplazmik retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase pompaları |
| <b>SH3</b>          | Src homoloji 3                                                 |
| <b>SMA</b>          | Spinal musküler atrofi                                         |
| <b>SR</b>           | Sarkoplazmik retikulum                                         |
| <b>T-tübül</b>      | Transvers Tübül                                                |
| <b>TK</b>           | Serin/treonin kinaz                                            |
| <b>TM</b>           | Transmembran                                                   |
| <b>TMOD</b>         | Tropomodulin                                                   |
| <b><i>TNNT1</i></b> | İskelet kası yavaş troponin T                                  |
| <b><i>TPM2</i></b>  | $\beta$ -tropomyozin                                           |
| <b><i>TPM3</i></b>  | Yavaş $\alpha$ -tropomyozin                                    |
| <b><i>TTN</i></b>   | Titin                                                          |
| <b>TS</b>           | Transisyon                                                     |
| <b>TV</b>           | Transversiyon                                                  |
| <b>Y</b>            | Tirozin                                                        |
| <b>W</b>            | Triptofan                                                      |

## ÖZET

### Konjenital Myopatilerden Sorumlu Major Genlerde Mutasyon Yük Karakterizasyonu ve Klinik Yaklaşımlar İçin Kullanışlı Hotspot Bölgelerin Tanımlanması

Konjenital myopatiler kas fiberlerinin yapısında ve fonksiyonunda görev alan proteinlerdeki anomalilere bağlı olarak ortaya çıkan genetik temelli nadir kas hastalıklarıdır. Hastalık doğumda ya da doğum sonrası süreçte kaslarda zayıflık ve hipotoni şeklinde kendini gösterir. Hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada kas iskelet sistemi hareketleri ve fizyoterapik yaklaşımlarla olumlu sonuçlar alınmakla birlikte erken tanı ve tiplendirme hastalığın ilerleyişinin kontrolünde önemli bir yer tutmaktadır. Hastalığın temelinde moleküler mekanizmalar yatmakla birlikte konjenital myopati hastaların yaklaşık 2/3'üne genetik tanı yapılabilmektedir. Hastalıktan sorumlu temelde 13 gen (*ACTA1*, *NEB*, *MTM1*, *MYH7*, *DNM2*, *RYR1*, *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2*, *SEPN1*, *BIN1*, *TTN*) olduğu bilinmektedir ve bu genlerdeki mutasyonlar konjenital myopatilerin teşhisinde klinik genetik-belirteçler olarak kullanılmaktadır. Literatürde mevcut çalışmalarda hastalığa sebep olan genlerdeki mutasyonların fazla olduğu ortaya konmuş olmasına karşın bu mutasyonların genlerin hangi bölgelerinde yoğunlaştığına, bu bölgelerin proteinde hangi bölgelerini etkilediğine dair yeterli çalışma bulunmadığı görülmüştür. Bu çalışma kapsamında yukarıda bahsi geçen 13 gende görülen ve konjenital myopatilerle ilişkisi bulunan tüm DNA mutasyonları literatür ve veri tabanlarından taranarak konjenital myopati hastalarının teşhisi ve tiplendirilmesinde klinikte belirteç olarak kullanılabilecek bölgeler belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla mutasyonların genin hangi bölgesinde yoğunlaştığı, olası hotspot mutasyon pozisyonları, hedef ekzonlar ve intronlar ile mutasyonların protein üzerinde yarattığı etkiler belirlenmeye çalışıldı. Tez kapsamında literatürden ve veri tabanlarından toplamda 13 gende 4 mutasyon tipine ait 68695 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonlar filtrelenip gen üzerinde ekzon-intron yerleşimine uygun olarak yerleştirildikten sonra outlier, kümeleme ve multivariate analiz metodları ile konjenital myopatilerin teşhisi ve tiplendirilmesi için klinikte kombine kullanılabilecek mutasyon yoğun hotspot bölgeler belirlenmeye çalışıldı. Elde edilen sonuçlarda 13 gende mutasyonların gen boyunca heterojen şekilde dağıldığı ve hastalıktan sorumlu mutasyonların çoğunlukla proteinlerin katalitik ve allosterik kontrolden sorumlu bölgelerinde yoğunlaştıkları saptandı. Elde edilen sonuçlar çalışılan genler için klinik tanılamada kullanılabilecek mikroçipler için hedef ekzon, intron bölgeleri ve pozisyonlar ortaya koymuştur.

**Anahtar Sözcükler:** DNA, Genetik Tanı, Hotspot, Konjenital Myopati, Mutasyon



## ABSTRACT

### Mutation Load Characterization of Major Congenital Myopathy Genes and Identification of Their Potential Hotspot Sites For Clinical Approaches

Congenital myopathies are rare genetic-based muscle diseases that occur due to anomalies in the proteins involved in the structure and function of muscle fibers. The disease shows itself in the form of muscle weakness and hypotonia at birth or in the postnatal period. Positive results might be observed with musculoskeletal system movements and physiotherapeutic approaches to attenuate the progression of the muscle disorders. However, early diagnosis is important place in controlling the progression of the disease and choosing the appropriate treatment process for the patient. Although molecular mechanisms that lie behind the disease, approximately 2/3 of patients with congenital myopathy can be diagnosed with genetic testing. It is known that there are 13 major genes (*ACTA1*, *NEB*, *MTM1*, *MYH7*, *DNM2*, *RYR1*, *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2*, *SEPNI*, *BIN1*, *TTN*) responsible for the disease. Although many mutations have been identified in these genes that cause congenital myopathies in previous studies, there are not enough studies on which regions of the genes these mutations are concentrated in and which regions of the protein these regions affect. In this study, all DNA mutations belonging to the 13 genes which are considered causes of congenital myopathies obtained from literature and databases were evaluated on the bases of potential clinical usage in the diagnosis and typing of congenital myopathy patients. For this purpose, missense nonsense, synonym, frameshift, and intron mutations were studied to determine possible hotspot mutation positions, target exons, and intron regions that are causing congenital myopathies. A total of 68695 mutations that are correlated with congenital myopaties from 4 mutation types in 13 genes were obtained from the literature and databases. After mutation filtering and nesting of exon-intron location in genes, mutation-dense hotspot locations and regions were determined using outlier, clustering and multivariate statistical analyses. The distribution of mutations throughout each gene showed heterogeneous and region-specific patterns. The mutations that are responsible for the disease were detected mostly in the regions of proteins' catalytic and allosteric control regions. The results revealed that each gene has potential target exons, intron regions and positions for microchip screening panels that can be used for clinical diagnosis.

**Keywords:** DNA, Genetic Diagnosis, Hotspot, Congenital myopathies, Mutation

## 1. GİRİŞ

Lokomotor sistem olarak da bilinen kas-iskelet sistemi; kemik kas, kıkırdak, tendon ve diğer bağ dokulardan meydana gelen ve vücuda hareket etme yeteneği sağlayan bir organ sistemidir. Bu sistemin ana işlevi hareket ve destek olsa da bunların yanında organların sağlıklı bir şekilde çalışabilmesinde önemli rol oynar. Özellikle kaslar kardiyovasküler sistemin etkin çalışmasından respirasyonun sağlıklı gerçekleştirilmesine, gastrointestinal sistemin etkinliğinden, immün sistemin fonksiyonlarına kadar organizmanın hayati aktivitelerinin gerçekleşebilmesinde önemli görevleri vardır.

Kas lifleri pek çok hücrede bulunan ana organelleri içermesi, çok çekirdekli yapısı, uyarılma, kasılma, iletkenlik, esneklik gibi özellikler barındırması ile vücudun diğer dokularından farklı olmasının yanında kendi içlerinde de yer aldıkları dokuya göre farklılaşmış tipleri bulunmaktadır (Cardinet, 1997). Vücutta; kalp kası, düz kas ve iskelet kasları olmak üzere 3 tip kas yapısı bulunur. Kalp kası ve düz kaslar istemsiz çalışacak şekilde organize olurken, iskelet kasları istemli çalışmaktadır ve ayakta durmak, yürümek gibi aktivitelerde vücudun uyum içerisinde çalışmasını sağlayan mekanik uyaranları algılamaktan görevli ince bir propriyoseptif sistem ile donatılmıştır (Schiaffino ve ark., 2011). Kas sisteminin bu özgün yapısını oluşturan herhangi bir proteinde meydana gelen bozukluk tolere edilememekle birlikte çeşitli kas iskelet sistemi anomalilerine yol açabilmektedir. Bu bozukluklar büyük oranda kas proteinlerinin sentezlenme aşamasında meydana gelen genetik koddaki bozulmalardan kaynaklanmaktadır (Ravenscroft ve ark., 2018). Moleküler düzeyde kas proteinlerindeki bozukluklar hücrelerin iskelet yapısını ve fonksiyonlarını etkilemesi nedeniyle organizmanın topyekün sağlığını etkileyen fenotipler oluşturabilmektedir. Sarkomerik proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların yaklaşık 20 farklı kas hastalığına sebep olduğu bilinmektedir. Bu hastalıklara sebep olan genlerin bazıları tespit edilmiş olsa da bunların çoğunun patofizyolojik mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır (Laing ve Nowak, 2005).

Sarkomerik proteinlerdeki bozukluklar sonucu ortaya çıkan kas hastalıklarından birisi olan konjenital myopatiler, embriyonel gelişimden başlayarak

yaşamın farklı dönemlerinde ortaya çıkabilen hafiften-şiddetliye kadar değişen geniş bir yelpazede kendini gösteren genetik temelli kas hastalıklarıdır (North ve ark., 2014). Konjenital myopati hastalarında ortaya çıkan fenotiplerin gerek myopatiler gerekse diğer başka kas hastalıkları ile benzer olması myopatilerin teşhisinde ve tiplendirilmesinde fenotipi kullanışsız kılmaktadır. Günümüzde kas biyopsisi konjenital myopatilerin teşhisinde ve tiplendirilmesinde klinik uygulamalarda başvuru başlıca yöntemdir (Cassandrini ve ark., 2017). Bununla birlikte hastalığın teşhisinde fiziksel ve nörolojik değerlendirmeler, elektromyografi (EKM), kan testleri ve genetik testler de kullanılmaktadır. Hastaların fenotipinden yola çıkarak konjenital myopatilerin teşhisinin zor oluşu, kas biyopsilerinin invaziv yöntemler olması, EKM'lerin bilgi vericiliğinin sınırlı olması konjenital myopatilerin teşhisinde ve tiplendirilmesinde genetik markırları ön plana çıkarmaktadır. Her ne kadar genetik çalışmalar myopati tipleri ile belirli genler arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu gösterse de hastaların çoğunda birden fazla gende mutasyon gözlenmesi ve benzer patolojik özellikler sergileyen hastalarda farklı genlerde mutasyonların varlığı hastalığın pleiotropik ve poligenik doğasına işaret etmektedir. Bu hastalıklar için belirlenmiş bir tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır (Lawal ve ark., 2018). Ancak erken evrelerde başlayan fizyoterapi ve rehabilitasyon metotları hastaların yaşam standartlarını arttırmakta ve hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılmasında etkili işlev görmektedir (Finsterer ve ark., 2011). Ancak hastalığın genetik ve sitolojik arka planının tam olarak anlaşılamaması bu hastalara yönelik özel tedavi ve rehabilitasyon yöntemlerinin geliştirilmesinin önünde önemli bir engel olduğu da bilinmektedir. Bu bakımdan konjenital myopatilerin karmaşık genetik arka planını anlamak hastalığın erken teşhisi ve tedavisine yönelik yöntemler geliştirebilmek için büyük önem taşımaktadır.

Geçtiğimiz yirmi yılda dizileme (sekanslama) teknolojilerindeki gelişmeler (ekzon sekanslama, tüm genom sekanslama vb.) insan genomundan büyük oranda dizin elde edilmesine imkân sağlamıştır. DNA (deoksiribonükleik asit) dizi temelli çalışmaların sayısının artması ile birlikte ekzon ve intron bölgelerinden elde edilen mutasyon bilgilerinin artması, hastalıkların teşhisi ve tiplendirilmesinde DNA temelli biyomarkırların geliştirilme potansiyelini de arttırmıştır. Bu durum fetal evrede ya da

doğum sonrası dönemde hastalıklara karşı mikroçiplerle genomik taramaların yapılabilmesine yönelik genomik bilgi birikimine ivme kazandırmıştır. Bu tez çalışmasında konjenital myopati ile ilişkili olduğu bilinen 13 gene ait mutasyon verileri literatür ve veri tabanlarından elde edilerek genler üzerindeki bölgelerin hastalıklarla ilişkili mutasyon yük yoğunluğu ve bu mutasyonların proteinlerin işlevleri üzerindeki etkileri istatistiksel yöntemler ile tespit edilmeye çalışıldı. Elde edilen sonuçlar ile klinik aşamada konjenital myopati riski taşıyan gebeliklerin erken teşhisi, hastaların tiplendirilmesi, tedavi sürecinin takibi ve olası yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için genler üzerinde potansiyel biyomarkır alanları tespit edilmesi amaçlanmıştır.

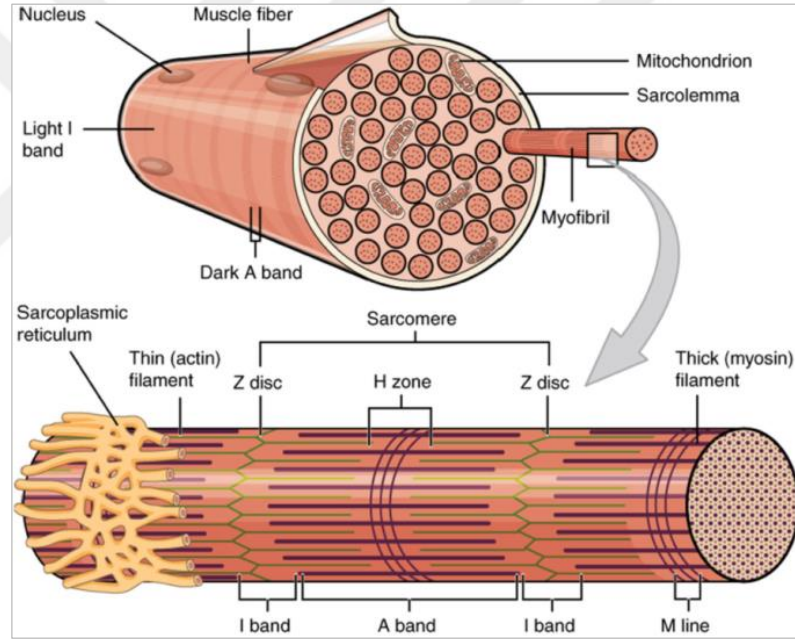


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İskelet Kas Yapısı ve Biyomekaniği

Kaslar; kasılma, uyarılma, esneyebilme özelliğine sahip vücudun hareket sistemini oluşturan dokulardır. Vücudumuzda İskelet kası, kalp kası ve düz kas olmak üzere 3 tip kas yapısı bulunur. Kalp kası yalnızca kalpte lokalize olurken, düz kaslar bağırsak mide gibi iç organlarımızın yapısında bulunmaktadır ve 2'si de istemsiz olarak çalışır. Bunların aksine vücudun büyük bir bölümünü oluşturan ve tendonlar aracılığı ile kemiklere bağlanan iskelet kasları istemli olarak çalışmaktadır (Frontera ve ark., 2015; Walker, 2020). Vücudun hareket sistemi, ısı üretimi ve postürün korunmasını sağlarlar. İskelet kasları binlerce kas lifinden meydana gelmektedir. Bu lifler sarkolemma olarak isimlendirilen plazma zarı ile çevrilidir. Zar içerisinde yer alan kas lifleri miyofibril adı verilen çok daha küçük liflerden oluşur ve miyofibriller de miyofilament adı verilen aktin, miyozin, tropomiyozin ve troponin gibi kontraktıl proteinlerden meydana gelir (Şekil 2.1). İskelet kasları uzun silindirik görünüme sahiptir ve görüntülerinden dolayı çizgili kaslar olarak da adlandırılmaktadır. Kas yapısı içerisindeki miyofibrillerin boyuna kesitinin elektron mikroskobu ile incelenmesi ile koyu ve açık renkli bölgeler görülmektedir. Açık renkli bölgeler ince filamentlerden oluşup I bandı olarak isimlendirilirken, koyu renkli bölgeler de miyozin filamentleri yer almaktadır ve A bandı olarak isimlendirilir. A bandının ortasında yer alan ve daha açık renkli olan bölge H bandı ve I bandının ortasında yer alan kısma ise Z bandı adı verilir (Squire ve ark., 1997). İki Z çizgisinin arası kalan bölge sarkomer olarak isimlendirilir ve kasılmadan sorumlu temel birimi oluşturur (Şekil 2.1). Sarkomerler temelde aktin ve miyozin filamentlerinden oluşmakla birlikte bunun yanında titin ve nebulin gibi yapısal ve troponin, tropomiyozin gibi fonksiyonel olarak görev alan proteinler bulundurmaktadır. Aktin ve miyozinler sarkomerlerin merkezinde yer alıp, sarkomerler boyunca uzanmaktadır (Lange, 2006). Aktin molekülleri globüler olup, polimerizasyonu ile F-aktinler meydana gelir. F-aktinlerin meydana gelmesindeki polimerizasyon-depolimerizasyon süreçlerinin yönetilmesinde kofilin ve daha pek çok protein rol oynar (Povarova, 2012). F-aktin moleküllerini baştan sona saran ve de Z-diskine bağlanmalarını sağlayan protein nebulin iken, miyozin

proteinlerinin de aynı şekilde merkezde konumlanabilmesi ve Z-diskine bağlanmalarını sağlayan protein ise titindir (Sanger ve ark., 2002; Trinick , 1994). Bu iki protein de vücutta bilinen en büyük proteinlerdendir. Ayrıca aktin proteinleri nebulin dışında tropomiyozin molekülleri ile de sarılmaktadır. Nebulinin aktin proteini üzerindeki görevi daha çok yapısal olarak proteinin stabilitesinin sağlanması iken, tropomiyozin ise üzerinde troponin kompleksi ile birlikte yer alan fonksiyonel bir proteindir (Keller, 1995). Tropomiyoziler üzerinde yer alan troponin kompleksi troponin-T, troponin-I ve troponin-C olmak üzere 3 alt birimden oluşur. Troponin ve tropomiyozin bağlantısı troponin-T ile gerçekleşirken, troponin-I istirahat halindeyken aktin-miyozin arasında bağlantı kurulmasını bloklar. Kompleksin son parçası olan troponin-C ise kalsiyumu bağlamakla görevlidir (Farah ve ark., 1995).



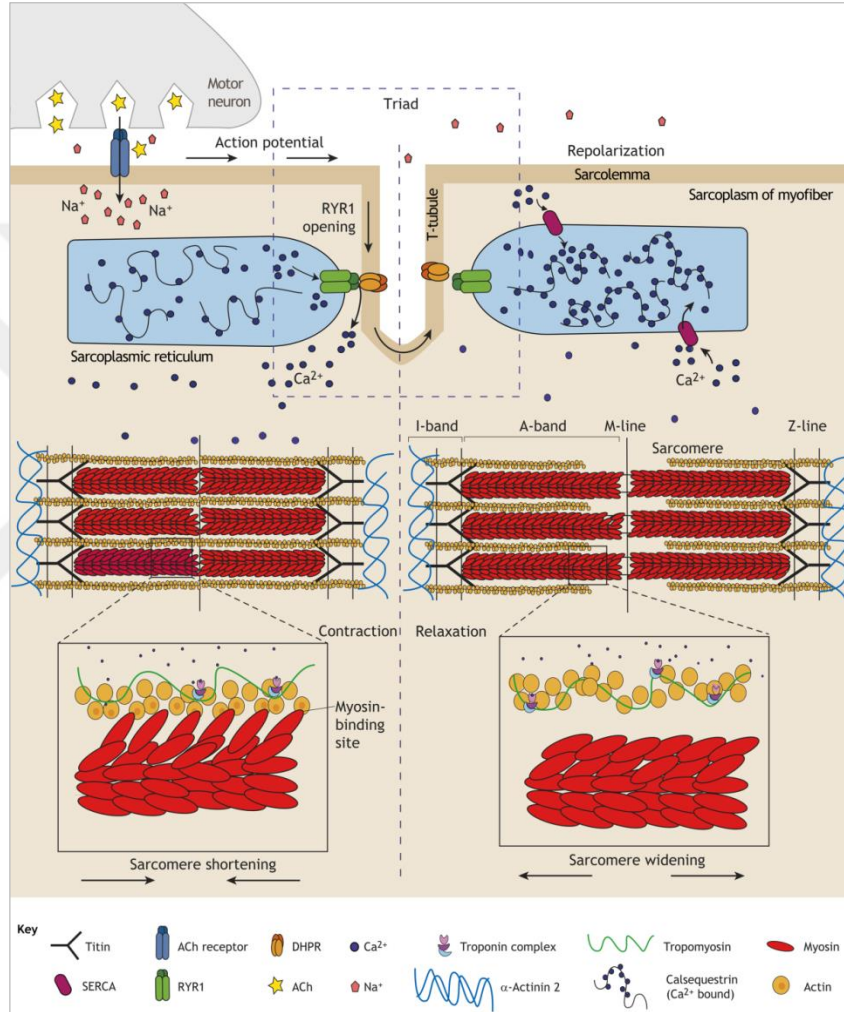
**Şekil 2.1.** Kas yapısı içerisindeki miyofibril, sarkomer yapısı ve kontraktıl proteinler (Oliver ve ark., 2016)

Kas kasılmasını hücre içi ve hücre dışında gerçekleşen süreçler şeklinde 2 bölümde incelenebilir. İlk bölümde iskelet kaslarının uyarılması ile birlikte bu uyarı alfa motor sinir ucuna ulaşır. Bununla birlikte sinir uçlarında yer alan voltaj duyarlı kalsiyum kanalları açılır ve içeriye kalsiyum girişi gerçekleşir. Kalsiyumun hücre içerisine girmesi ile birlikte içerisinde ACh (asetilkolin) bulunan salgı keseleri hareketlenir ve sinir-kas arası sinaptik aralığa asetilkolin salgırlar. Boşluktaki

asetilkolin motor uç plaktaki reseptörlere bağlanarak onun aktif hale gelmesini sağlar. Bununla birlikte Na (sodyum) ve K (potasyum) kanalları açılır. Sarkolemada artan Na geçirgenliği ile hücre içerisine Na girişi gerçekleşir ve K (potasyum) hücre dışına çıkar. Buna bağlı olarak kas fiberlerinin zarında yük değişimi gerçekleşir ve aksiyon potansiyeli oluşur. Aksiyon potansiyeli kas hücre zarının uzantısı olan T-tübüller (transvers tübül) aracılığı ile hücrenin iç kısımlarına membran boyunca dağılır (Şekil 2.2) (Krebs ve ark., 2015). Uyarının iletimini sağlayan T-tübül yapısı kasılma mekanizmasının en önemli parçalarından birisidir. Bu yapının membran tübüllasyon ve fisyonu gibi süreçlerden sorumlu oldukları bilinen amfifizin 1, miyotübülerin 1, dinamin 2 proteinleri tarafından oluştukları düşünülmektedir. Bu proteinlerin görevi yalnızca membran düzenlenmesi ile sınırlı olmayıp, farklı hücresel süreçlerde de rol oynamaktadırlar (Toussaint ve ark., 2011). T-tübüllerin uyarıyı membran boyunca iletmesinden sonra voltaj bağımlı kapılardan birisi olan DHPR (dihidropiridin reseptörü) reseptörleri etkilenir. Bu reseptörler de hücre içindeki kalsiyum deposu olan sarkoplazmik retikulum (SR) üzerindeki kalsiyum kanallarından Ryanodin reseptörleri (RYR) etkiler (Şekil 2.2). Etkileşim sonrası RYR kanalı açılır, hücre içerisine kalsiyum salınımı gerçekleşir ve ortamdaki kalsiyum seviyesi artar (Franzini, 1999). Kalsiyum troponin alt birimlerinden birisi olan troponin-C'ye bağlanır. Troponin-C'de kalsiyum bağlanmasına bağlı olarak konformasyonel değişimler meydana gelir. Sonrasında tropomiyozinler de bu durumdan etkilenerek gerçekleşen konformasyonel değişim ile aktin üzerindeki miyozin bağlanma bölgelerini açar. Kalsiyumun ATPazı (Adenin trinükleotidaz) aktive etmesi ile miyozin baş üzerindeki ATP (Adenozin trifosfat) parçalanır. Açığa çıkan enerji ile miyozin başlar aktine bağlanır ve kas kasılma süreci gerçekleşmiş olur. Miyozin başlarına tekrar ATP ve Mg (magnezyum) iyonu bağlanması ile birlikte de aktin-miyozin arasındaki bağlantı kopar ve tüm filamentler eski haline geri döner. Ortamdaki kalsiyum endoplazmik retikulum üzerindeki SERCA ve SEPNI1 kanalları ile tekrar sarkoplazmik retikulum içerisine alınır. Böylece kas gevşemesi sağlanır (Şekil 2.2) (Odermatt ve ark., 1998).

Kas hücrelerinde gözlenen bu yapısal özgünlükten dolayı, kas kasılmasının gerçekleşmesinde görev alan proteinlerde meydana gelen yapısal ve fonksiyonel

bozukluklar kas aktivitelerini önemli derece etkiler. Bu yüzden kas iskelet sistemini etkileyen tüm hastalıklarda hastalığın nedenleri, etki mekanizmaları ve olası tedavi yöntemlerinin değerlendirilebilmesi için kasılmada temel rol oynayan sarkomerlerin yapısı, içerisinde yer alan proteinlerin görevleri, kasılma ve gevşeme sürecindeki işlevlerini ayrıntılı şekilde bilinmesi oldukça önemlidir.



**Şekil 2.2.** İskelet kaslarında gerçekleşen kasılma ve gevşeme süreci (Fusto ve ark., 2019)

## 2.2. Konjenital Myopatiler

Konjenital myopatiler kas miyofiberlerindeki bazı histopatolojik bozukluklar ile kendini gösteren kas iskelet sistemi bozukluklarıdır. Konjenital terimi ile doğumdan itibaren ortaya çıkan hastalıklar olduğu belirtilmek istense de yaşamın



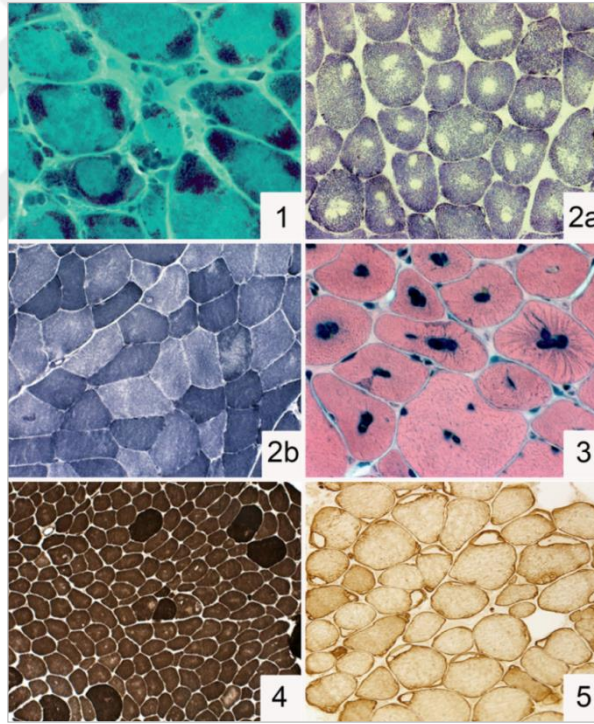
ilerleyen dönemlerinde de ortaya çıkan tablolar görülebilmektedir. Erken başlangıçlı olgularda klinik tablo daha şiddetli ilerlemekle birlikte hastalığın başladığı yaşa göre bile patolojilerde değişiklik gözlenebilmektedir. Kesin olarak insidansı bilinmemekle birlikte konjenital myopatilerin görülme sıklığı her 25.000 doğumda 1 olarak belirtilmekte ve tüm neo-natal dönemdeki hipotoni vakalarının %14'ünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cassandrini ve ark., 2017; Bassett ve Currie, 2003). Konjenital myopatiler kas kasılmasında görev alan yapısal proteinler ve bunlarla etkileşim içerisinde olan kas liflerindeki bozukluklardan meydana gelir. Sarkomer proteinlerinde gözlenen bu anomaliler kalıtsal temelli olup, kas hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirememelerine neden olur ve bu durum konjenital myopatiли kişilerde ilerleyen derecelerde kas güçsüzlüklerinin ortaya çıkması ile sonuçlanır. Konjenital myopatiler otozomal ve eşey kromozomlarına bağlı olarak dominant veya resesif olarak kalıtılabilmektedir (Treves ve ark., 2008). Genel olarak hastalarda doğum öncesi dönemde azalmış fetal hareketler ve doğum sonrası dönemde ise myopatik bir yüz, hipotoni, artrogripozis, çarpık ayak (clubfoot), pitozis, kalça çıkığı, oftalmopleji ve skolyoz görülebilmektedir (Şekil 2.3). Bunlarla birlikte gecikmiş motor gelişim ve şiddetli olgularda ise gebelikte düşüklükler, ölü doğumlarla karşılaşılabilir (Tang ve ark., 2020).



**Şekil 2.3.** Konjenital myopati hastalarında görülen klinik bulgular (Neto ve ark., 2017; Dilaver ve ark., 2017; North ve ark., 2014)

Klinik bulguları ve seyri oldukça varyasyonel olan konjenital myopatilerde hastalık hafif ya da stabil bir seyir gösterebildiği gibi zamanla ağırlaşan şiddetli bir tablo da çizebilmektedir. Şiddetli olgularda hastalığın ileri aşamalarında kas kitlesinde azalma ve dejenerasyon, hastanın mobilitesinde azalma, kalp ve solunum yetmezliklerine (ventilasyona bağımlı respirasyon) bağlı ölümler görülebilmektedir (Treves ve ark., 2008).

Günümüzde sarkomerlerin histopatolojik yapılarına bağlı olarak 5 ana konjenital myopati tipi tanımlanmıştır. Bunlar: i- nemalin myopati, ii- kor myopati ii-a santral kor hastalığı ii-b multiminikor hastalığı iii- sentronükleer myopati iii-a miyotübüler myopati iii-b otozomal sentronükleer myopati iv- konjenital lif tipi uyumsuzluğu ve v- miyozin depolama myopatisidir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Konjenital myopatiler görülen kas biyopsilerinde gözlenen patolojik özellikler. 1- Kas liflerinin çevresinde ve içerisinde görülen çubuk benzeri (rod) yapıların birikimi. 2a-2b Kas liflerinin merkezinde kümelenmiş boyutları değişiklik gösteren çekirdek benzeri (kor) yapılar. 3-Kas liflerinin merkezine konumlanmış çekirdek ve kas liflerinin boyutundaki varyasyonlar 4- Tip 1 ve 2 lifler arasındaki oranın bozulması. 5- Kas lifleri içerisinde hyalin body görünümündeki yapıların birikimi (Cassandri ve ark., 2017; Gonzalez ve ark., 2019; Oldfors ve ark., 2017'dan modifiye edildi.)

### 2.3. Konjenital Myopati Tipleri

#### 2.3.1. Nemalin Myopati

Konjenital myopatilerin yaklaşık olarak %17'sini oluşturur ve görülme sıklığı yeni doğanda 50.000'de 1'dir (Lawlor ve ark., 2011). Klinik spektrumu hafiften şiddetliye kadar geniş bir yelpazede kendini gösterir. Kas biyopsisinde kas liflerinin periferlerinde ya da sitoplazmada alfa aktinden oluşmuş çubuk benzeri/rod yapılar görülmektedir (Şekil 2.4). Bu yapılar ilk olarak 1960'larda hipotoni görülen çocuklardan alınan kas biyopsi örneklerde tespit edilmiştir (Conen ve ark., 1963). Hücre içerisinde bu çubuk benzeri yapıların nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemekle birlikte, nemalin myopati miyofibrillerin düzenlenmesi esnasında Z çizgilerinde çeşitli anormallerle kendisini gösterir (Sewry ve ark., 2019). Çubuk benzeri bu yapılar kas kasılması sırasında aktin ve miyozin arasındaki kaymaya engel olarak kas kasılmasını zorlaştırır ya da engel olurlar (Gonzalez ve ark., 2018; Nowak ve ark., 2007). Fakat her kasta farklı bir biçimde kendisini gösterdiği bilinmektedir ve hastalığın şiddeti ve prognozu konusunda bilgi verici görülmemektedir (Sewry ve ark., 2019). Sarkomer içerisinde rod görülen bölgelerde mitokondriden ve oksidatif enzimlerden yoksun çekirdek benzeri bir görünüm ortaya çıkardıkları görülmüştür (Şekil 2.4). Bu myopati tipinde hastalarda genel olarak hipotoni, proksimal kaslarda zayıflık, şiddetli vakalarda solunum yetmezlikleri görülebilmektedir (Donner ve ark., 2004). *NEB*, *ACTA1*, *RYR1*, *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2* genlerinin nemalin myopati ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cassandrini ve ark., 2017).

#### 2.3.2. Kor Myopati

Prevelansı tam bilinmemekle birlikte myopatilerin en yaygın görülen tiplerinden olduğu tahmin edilmektedir. Kas biyopsisi sonucu histopatolojik yöntemlerle tanısı rahatlıkla konulabilmektedir. Kas biyopsilerinde kas liflerinde oksidatif ve glikolitik enzimler bakımından yoksun çekirdek benzeri bölgeler yer almaktadır (Şekil 2.4). Bu çekirdek benzeri yapıların nasıl ve ne şekilde oluştuğu tam olarak bilinmemekle birlikte miyofibrillerin düzenli bir şekilde organize olmalarını

engellediği bilinmektedir. Kendi içerisinde santral kor ve multiminikor myopati olarak adlandırılan iki ayrı alt tipi bulunmaktadır. Santral kor myopati, hastalığın en sık görülen ve en çok çalışılmış formudur. Santral kor myopatide sarkomerin merkezinde büyük çekirdek benzeri yapılar görülürken, multi-minikor myopatide ise sarkomer içerisine dağılmış şekilde çok sayıda küçük çekirdek benzeri yapılar görülmektedir (Şekil 2.4). Multiminikor hastalığına en sık *RYR1*, *SEPNI* genlerindeki resesif mutasyonlar neden olmaktadır, santral kor hastalığına iskelet kaslarındaki ana kalsiyum pompası olan *RYR1* genindeki mutasyonlar sebep olur (Topaloglu, 2020). Hastalık genellikle yavaş çalışan tip 1 kaslarda görülen hipotrofi ile karakterizedir (Neto ve ark., 2017). Proksimal kaslarda zayıflıklar gözlenirken, özellikle kalça ve omuz kaslarının hastalıktan etkilendiği görülmektedir. Bebeklik döneminde hipotoni ve motor gelişim geriliği ile kendisini gösterir. Bu hastalığa sahip kişilerde özellikle Ryanodin proteininde görülen konformasyonel değişikliklerden dolayı hücre içi kalsiyum homeostazı korunamaz ve buna bağlı olarak kas kasılma sürecinin işleyişindeki düzen bozulur. Kor myopatiye sahip kişilerde farmakogenetik temelli ölümcül kas hastalıklardan biri olan malign hipertermi duyarlılığı söz konusudur ve bu duyarlılık sitoplazmaya çok miktarda kalsiyum salınımına neden olur. Tanı koyulmaz ise malign hipertermi duyarlılığı olan kişilerin herhangi bir genel anestezi alma durumunda yaşamı tehdit eden çeşitli komplikasyonlarla yüz yüze kalması olasıdır (Treves ve ark., 2008). Kor myopatinin ortaya çıkmasında *MYH7*, *RYR1*, *SEPNI* genlerinin etkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.4).

### 2.3.3. Sentronükleer Myopati

Kas histopatolojisinde normal bir sarkomer hücresinde çekirdek hücrenin periferinde yer alırken, sentronükleer myopatili hastalarda çekirdek hücrenin merkezinde bulunur (Şekil 2.4). Mitokondri, sarkotübüler elementler ve diğer organellerin yerleşimi de normal kaslardaki gibi değildir (Laporte ve ark., 2000; Lawlor ve Dowling, 2021). Tip 1 liflerde daha baskın olmak üzere atrofi görülmektedir. Sentronükleer myopati, myopatilerin en ağır seyreden formudur. İlk bulguları anne karnındayken amniyon sıvısının artması ve fetal hareketlerde azalma ile kendisini gösterir ve doğum sonrası dönemde klinik bulguları arasında yüz

kaslarında meydana gelen zayıflık, oftalmoparezi ve pitozis yer almaktadır (North ve ark., 2014). Aynı zamanda egzersizle birlikte görülebilen myalji de bulgular arasında yer alabilmektedir. Hastalığın kesin bir başlama dönemi olmamakla birlikte hayatın her döneminde çeşitli bulgularla ortaya çıkabilir. Hastalığın X kromozomuna bağlı kalıtımı nedeniyle erkekleri etkiler ve insidansı 100.000/2'dir. Bu hastalığa sahip kişilerde CK (kreatin kinaz) seviyesi normal ya da hafif artmıştır fakat bu da klinik tanı açısından yeteri derecede bilgi verme potansiyeline sahip değildir.

Sentronükleer myopati altında histopatolojik özelliklerine ve kalıtım şekillerine göre miyotübüler ve otozomal sentronükleer olmak üzere 2 alt tip tanımlanmıştır. Miyotübüler myopatiler X bağlantılı ve otozomal olarak ayrılırlar ve hastalık şiddeti tiplere göre değişkendir. Miyotübüler myopati hakkındaki ilk bilgiler Spiro ve ark. (1996) tarafından ortaya atılmıştır. Genel kas güçsüzlüğü bulunan çocukların kas histopatolojisinin incelenmesi sonucunda kas lifi görünümünün fetal miyotüplere benzemesi nedeni ile miyotübüler myopati olarak tanımlanmıştır (Jungbluth ve ark., 2008). X bağlantılı miyotübüler myopatiler en yaygın tip myopati ve genellikle yeni doğanda iki yıl içerisinde ölümle sonuçlanır. Miyotübüler myopatilerde hastalarda kas kasılmasında sinirsel impuls iletiminde görev alan T-tübüller tam olarak oluşamaz. Bunun sonucunda sinirsel uyarımlar sarkoplazmik retikuluma iletilemez ve hücre içi kalsiyum metabolizmasında düzensizlikler ortaya çıkar ve kas kasılma süreci doğru bir şekilde işlemez (Gonzalez ve ark., 2018).

Hastalığın bir diğer formu olan otozomal sentronükleer myopati genelde ortaya çıkma yaşı ergenlik dönemi olup, erken dönemde de (neonatal-çocukluk) görülebilmektedir. Kas biyopsilerinde hücre merkezinde çok sayıda çekirdek benzeri yapılar görülür. Otozomal sentronükleer myopatinin insidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte hastalığın ortaya çıkmasında daha birçok genin etkili olduğu düşünülmektedir. Çocukluk döneminde başlayan vakalarda solunum yetmezliğine kadar ilerleyen bir tablo ortaya çıkarırken, yetişkinlik döneminde ise hafif dereceli kas zayıflığı görülür. Otozomal sentronükleer myopatinin ortaya çıkmasında *MTM1*, *DNM2*, *RYR1*, *BINI*, *TTN* genlerinin etkili olduğu bilinmektedir. *MTM1* genindeki mutasyonların ciddi fenotipler ortaya çıkardığı görülürken, *DNM2* ve *BINI*

genindeki mutasyonları ise daha hafif ve orta seyirli fenotipler ortaya çıkarmaktadır (Romero, 2010).

#### 2.3.4. Konjenital Lif Tipi Uyumsuzluğu

Hastalığın prevalansı tam olarak bilinmemektedir ve doğuştan ya da yaşamın ilk dönemlerinde hipotoni ve kas güçsüzlüğü ile kendisini gösterir. Otozomal çekinik, baskın ve X'e bağlı olarak kalıtım görülebilmektedir (De Haro-Hernandez, 2015). Özellikle omuz, kalça ve uyluk kaslarında belirgin olarak kas güçsüzlüğü görülürken lordoz, skolyoz gibi eklem deformiteleri de görülebilmektedir (Şekil 2.3). Bu deformitelerin görülmesi ile birlikte düzgün çalışamayan solunum kaslarından dolayı kişiler şiddetli solunum problemleri yaşayabilmektedir. Aynı zamanda da bu kişilerde yutmada çeşitli problemlerin yaşandığı için beslenme problemleri görüldüğü de çeşitli çalışmalarda not edilmiştir. Kas biyopsisinde tip I ve tip II lifler arasındaki oranın bozulduğu ve tip 1 kas liflerinin hipotrofiye uğrayarak boyutlarının küçüldüğü, tip II kas liflerinde ise hipertrofiye uğrayarak boyutlarının arttığı görülür (Şekil 2.4) (Clarke, 2011).

Hastalığın tanısını koymak oldukça zor olduğu gibi tip I ve tip II kas lifleri arasındaki %30-40 oranında bir farklılık olması, tip I kas liflerinin boyutlarının küçülmesi, konjenital lif tipi uyumsuzluğu hastalığının patolojik tanısında gözlenen bulgular arasında yer almaktadır (Şekil 2.4) (Cassandrini ve ark., 2017). Fakat bu bulgular başka nörolojik hastalıklarda da ortaya çıkabildiği için kesin tanıda kullanılma potansiyeli taşımamaktadır. Bu hastalığa sahip kişilerde lordoz, skolyoz, kalça çıkıkları gibi ortopedik problemler de görülebilmektedir (North ve ark., 2014). Hastalığın ortaya çıkmasında *ACTA1*, *MHY7*, *RYR1*, *TPM2*, *TPM3*, *SEPNI* genlerinin etkili olduğu bilinmektedir. *ACTA1* geninde otozomal dominant kalıtım görülürken, *RYR1* geninde otozomal resesif, *TPM3* geninde ise hem dominant hem de resesif kalıtım görülebilmektedir.

### 2.3.5. Miyozin Depolama Myopatisi

Oldukça nadir görülen bir myopati tipidir. Kas kasılmasında görevli kalın filamentlerden biri olan miyozin ağır zincirinin  $\beta$  formunda görülen bozukluklar sonucu hastalık ortaya çıkar. Hastalık genel olarak kalp rahatsızlıkları olarak kendisini gösterse de tip I iskelet kas liflerinin de etkilendiği görülür (Cassandrini ve ark., 2017). Hastalığın ilerleyişi durgun ya da yavaş seyirli olabilir. Klinik bulguları arasında gecikmiş motor gelişim, kalp kaslarında yalancı hipertrofi (pseudo-hypertrophy), düşük ayak (foot drop) ve ilerleyen zamanlarda nefes almada zorluk görülmektedir. Kas biyopsisinde sub-sarkolemmal bölgede hiyalin cisimcikleri olarak görülebilen beta miyozin birikimleri görülür (Şekil 2.4). *MYH7* geni ile miyozin depolama myopatisi hastalığı arasında bağlantı olduğu bildirilmiştir.

### 2.4. Konjenital Myopatilerden Sorumlu Genler ve Patofizyolojik Mekanizmaları

Konjenital myopatilerden sorumlu genlerden sentezlenen proteinlerin bir kısmı sarkomerler içerisindeki temel yapısal kısımları oluştururken, diğerleri fonksiyonel olarak görev almaktadırlar. Yapısal görev alan proteinlerdeki bozukluklar sarkomer yapısının devamlılığını bozarken, fonksiyonel görev alan proteinlerdeki bozukluklar çeşitli enzimatik aktiviteleri, kalsiyum homeostazını ve kas kasılması sırasındaki enerji verimliliğini bozmaktadır (Tablo 2.1). Bu proteinlerdeki bozuklukların moleküler alt yapısına bakıldığında konjenital myopati tipleri ile bu proteinlerin sentezinden sorumlu genler arasında belirgin bir korelasyon görülmektedir (Cassandrini ve ark., 2017). Fakat birden fazla gendeki mutasyonlar aynı hastalık fenotipini ortaya koyarken, aynı gendeki mutasyonlar da aynı fenotipe sahip farklı hastalıklara yol açabilmektedir (Şekil 2.4).

**Tablo 2.1.** Konjenital myopatiden sorumlu genlerin ortaya çıkardıkları patolojik mekanizmaların özeti

| <b>Genler</b> | <b>Yapısal</b> | <b>Enzimatik Aktivite</b> | <b>Fonksiyonel Kalsiyum Homeostazı</b> | <b>Miyofibriler Kuvvet</b> |
|---------------|----------------|---------------------------|----------------------------------------|----------------------------|
| <i>ACTA1</i>  |                |                           |                                        | ✓                          |
| <i>NEB</i>    | ✓              |                           |                                        |                            |
| <i>MTM1</i>   |                | ✓                         |                                        |                            |
| <i>MYH7</i>   |                |                           |                                        | ✓                          |
| <i>DNM2</i>   |                | ✓                         |                                        |                            |
| <i>RYR1</i>   |                |                           | ✓                                      |                            |
| <i>TPM2</i>   |                |                           |                                        | ✓                          |
| <i>TPM3</i>   |                |                           |                                        | ✓                          |
| <i>TNNT1</i>  |                |                           |                                        | ✓                          |
| <i>CFL2</i>   |                | ✓                         |                                        |                            |
| <i>SEPN1</i>  |                |                           | ✓                                      |                            |
| <i>BIN1</i>   |                | ✓                         |                                        |                            |
| <i>TTN</i>    | ✓              |                           |                                        |                            |

| Klinik Bulgular                 | GENLER       |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
|---------------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|------------|
|                                 | <i>ACTA1</i> | <i>NEB</i> | <i>MTM1</i> | <i>MYH7</i> | <i>DNM2</i> | <i>RYR1</i> | <i>TPM2</i> | <i>TPM3</i> | <i>TNNT1</i> | <i>CFL2</i> | <i>SEPN1</i> | <i>BIN1</i> | <i>TTN</i> |
| Nemalin Myopati                 |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Kor Myopati                     |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Sentronükleer Myopati           |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Miyotübüler Myopati             |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Konjenital Lif Tipi Uyumsuzluğu |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Miyozin Depolama Myopatisi      |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Kas Gücsüzlüğü                  |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Hipotoni                        |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Malign Hipertermi               |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Arthrogiphozis                  |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Pitozis                         |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Atrofi                          |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |
| Kalp Hastalıkları               |              |            |             |             |             |             |             |             |              |             |              |             |            |

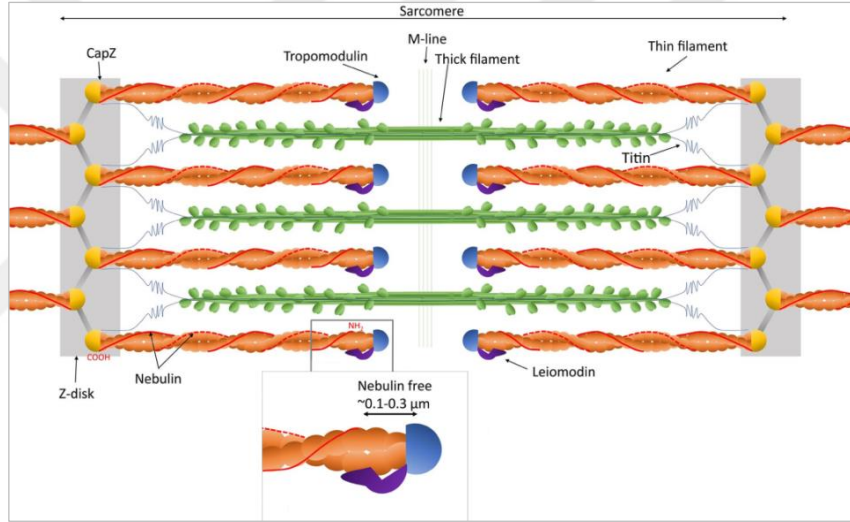
**Şekil 2.5.** Konjenital myopati tiplerine sebep olan genler ve hastalıkların ortaya çıkardığı fenotipler



## 2.5. Konjenital Myopatilerden Sorumlu Olan ve Yapısal Fonksiyonları Etkileyen Proteinler ve Sentezlendikleri Genler

### 2.5.1. Nebulin Proteinini Yapısı ve Fonksiyonu

Nebulin proteini sarkomerler içerisinde yer alan büyük yapısal proteinlerden biridir (Chu ve ark., 2016). Aktin filamentlerin uzunluğunun regülasyonu, stabilitelerinin sağlanması, Z bantlarının oluşumu, kas kasılma-gevşemesinde, hücre içi kalsiyum homeostazının korunmasında ve kas kasılması sırasında aktin-miyozin bağlanmasında görev almaktadır (Şekil 2.6.) (Bertini ve ark., 2011; Scoto ve ark., 2011).



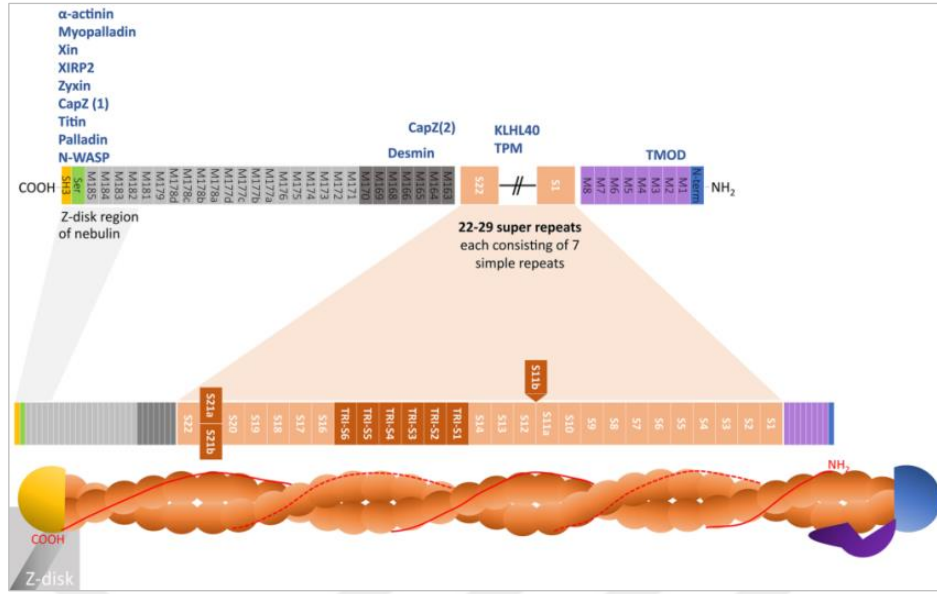
**Şekil 2.6.** Nebulin proteininin sarkomer içerisindeki konumu (Yuen ve ark., 2020'dan)

Nebulin proteini aktin iplikçikleri etrafına boylu boyunca sarılı bir şekilde C-terminal bölgeden Z diskine, N-terminal bölgeden ise aktinin terminasyonunda sorumlu tropomodulin (TMOD) protein kompleksine bağlanır (Şekil 2.6). Nebulin proteinin %97'si tekrarlayan aminoasit dizilerinden oluşmaktadır. Bu bölgeler süper tekrar ve basit tekrar bölgeleri olarak adlandırılır (Donner ve ark., 2004). Süper tekrar bölgeleri başta tropomiyozin ve Kelch benzeri protein-40 (*KLHL40*) olmak üzere kas kasılmasından sorumlu birçok protein ile bağlantı kurar (Şekil 2.7).

Proteinin N-terminal bölgesine yakın yer alan S1 ve S22 olarak adlandırılan süper tekrar bölgeleri *NEB* geninin 13. ve 152. ekzonlar arasında yer alır ve her biri 7 basit aminoasit tekrardan oluşur (Şekil 2.8). Her bir süper tekrar dizisi içerisinde WLKGIGW motifi korunumlu bir şekilde yer alır ve bu motif tropomiyozin proteini ile bağlantı kurar (Chu ve ark., 2016). Yine sürekli tekrarlardan oluşan ve proteinin N-terminal ve C-terminal kısımlarında bulunan basit tekrar bölgeleri de aktin ile bağlantı kurulmasında görev alır. M1-M8 ve M163-M185 olarak adlandırılan bu bölgeler 6-12 ve 153-180 ekzonları arasında yer alır (Şekil 2.8). İçerisinde SDXXYK motifinden oluşan aktin bağlanma motifi barındırırlar ve kas kasılması sırasında nebulin proteini ile aktin filamentleri arasında bu motifler ile bağlantı kurulduğu tahmin edilmektedir (Şekil 2.7) (Donner ve ark., 2004). Proteinin C-terminal kısmını ise Z-disk, Ser ve Sh3 bölgeleri oluşturmaktadır. C-terminal bölgenin (M163-M183) M182'den itibaren Z diski içerisinde bulunduğu düşünülmekte olup, Z disk bölgeleri ifade edildikleri dokulara göre boyut açısından farklılık gösterebilmektedir. Proteinin C-terminal bölgesinde yer alan Ser (Serin) ve Sh3 (Src homoloji 3 alan) bölgeleri de 181-183. ekzonlar arasında yer alır ve aminoasit dizileri bakımından oldukça korunumludur (Şekil 2.8). Nebulin proteini titin gibi birçok filamentle bu bölge aracılığı ile bağlantı kurmaktadır (Şekil 2.7) (Yuen ve ark., 2020).

#### **2.5.1.1. *NEB* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi**

*NEB* geni 2. kromozomun 2q23.3 lokusunda yer alır ve 249 kb uzunluğunda, 183 ekzondan oluşur. En kısa ekzon 42 bç uzunluğu ile ekzon 4, en uzun ekzon 596 bç ile ekzon 183'dür. En uzun intron 9232 bç uzunluğu ile intron 13, en kısa intron 83 bç uzunluğu ile intron 59'dur (Donner ve ark., 2004). Genel olarak ekzon uzunlukları 93 ile 312 bç arasında değişmektedir. Gen 6669 aminoasitlik nebulin proteini kodlamaktadır ve protein sentezinde ekzon 1 ve 2 ifade edilmemektedir. Genin alternatif ekleme/splicing ile yaşa ve zamana göre değişen en az 43 izotipi bulunmaktadır (Kazmierski ve ark., 2003).



**Şekil 2.7.** Nebulin proteini yapısı ve diğer proteinler ile bağlanma noktaları (Yuen ve ark., 2020’den)

*NEB* geninde meydana gelen mutasyonlar nemalin myopatiye yol açmakta olup, nemalin myopatilerin yaklaşık %50’sinden bu mutasyonlar sorumludur (Moreau Le Lan ve ark., 2018). Bugüne kadar *NEB* geninde belirlenen en yüksek frekanslı mutasyon süper tekrar bölgesi (S1-S11) içerisinde yer alan ekzon 55’deki (p.Arg2478\_Asp2512del) delesyondur. Meydana gelen bu mutasyon kısa ve fonksiyonel olmayan protein sentezine neden olarak kasılma regülasyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Fareler üzerinde yapılan çalışmada bu durumu destekler nitelikte mutasyonu taşıyan bireylerde ciddi fenotipik anomalilerin ortaya çıktığı gözlenmiştir (Lehtokari ve ark., 2014). *NEB* genindeki mutasyonların nemalin myopati ile ilişkilendirilmesinde genel olarak aktin ve tropomiyozin bağlanma bölgelerine yakın olan bölgelerdeki mutasyonların patolojik olabileceği düşünülmüş ve bu bölgelere yoğunlaşmıştır (Marttila ve ark., 2014). Ancak yapılan çalışmalar bu bölgelerde gözlenen mutasyonların farklı fenotipler ortaya koyabildiğini nebulin proteini üzerinde çok sayıda aktin ve tropomiyozin bağlanma bölgesi olduğu için mutasyonun konumuna göre hastalığın fenotipe etkisini yorumlamanın oldukça zor olduğu ileri sürülmüştür (Lehtokari ve ark., 2014). Ancak genin büyük oluşu ve genetik çalışmaların yetersizliği gen üzerindeki mutasyon yükünün konjenital myopatiler üzerindeki etkisinin anlaşılmasını güçleştirmektedir.

|       |                                 |     |                       |     |                              |                            |     |     |     |     |     |     |                             |                              |     |     |          |                  |           |                              |     |                                 |     |     |     |     |               |     |           |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|---------------------------------|-----|-----------------------|-----|------------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------------|------------------------------|-----|-----|----------|------------------|-----------|------------------------------|-----|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|---------------|-----|-----------|----------------------------|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Ekzon | 1                               | 2   | 3                     | 4   | 5                            | 6                          | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13                          | 14                           | 15  | 16  | 17       | 18               | 19        | 20                           | 21  | 22                              | 23  | 24  | 25  | 26  | 27            | 28  | 29        | 30                         | 31  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | 5'UTR                           |     | GLUTAMİK ASİT BÖLGESİ |     |                              | BAŞİT TEKRAR BÖLGESİ M1-M8 |     |     |     |     |     |     | SÜPER TEKRAR BÖLGESİ S1-S11 |                              |     |     |          |                  |           |                              |     |                                 |     |     |     |     |               |     |           |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ekzon | 32                              | 33  | 34                    | 35  | 36                           | 37                         | 38  | 39  | 40  | 41  | 42  | 43  | 44                          | 45                           | 46  | 47  | 48       | 49               | 50        | 51                           | 52  | 53                              | 54  | 55  | 56  | 57  | 58            | 59  | 60        | 61                         | 62  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | SÜPER TEKRAR BÖLGESİ S1-S11     |     |                       |     |                              |                            |     |     |     |     |     |     |                             |                              |     |     |          |                  |           |                              |     |                                 |     |     |     |     |               |     |           |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ekzon | 63                              | 64  | 65                    | 66  | 67                           | 68                         | 69  | 70  | 71  | 72  | 73  | 74  | 75                          | 76                           | 77  | 78  | 79       | 80               | 81        | 82                           | 83  | 84                              | 85  | 86  | 87  | 88  | 89            | 90  | 91        | 92                         | 93  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | ALTERNATİF SÜPER TEKRAR S11     |     |                       |     | SÜPER TEKRAR BÖLGESİ S11-S15 |                            |     |     |     |     |     |     |                             |                              |     |     |          |                  |           |                              |     | ALTERNATİF SÜPER TEKRAR BÖLGESİ |     |     |     |     |               |     |           |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ekzon | 94                              | 95  | 96                    | 97  | 98                           | 99                         | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106                         | 107                          | 108 | 109 | 110      | 111              | 112       | 113                          | 114 | 115                             | 116 | 117 | 118 | 119 | 120           | 121 | 122       | 123                        | 124 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | ALTERNATİF SÜPER TEKRAR BÖLGESİ |     |                       |     |                              |                            |     |     |     |     |     |     |                             | SÜPER TEKRAR BÖLGESİ S15-S21 |     |     |          |                  |           |                              |     |                                 |     |     |     |     |               |     |           |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ekzon | 125                             | 126 | 127                   | 128 | 129                          | 130                        | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137                         | 138                          | 139 | 140 | 141      | 142              | 143       | 144                          | 145 | 146                             | 147 | 148 | 149 | 150 | 151           | 152 | 153       | 154                        | 155 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | SÜPER TEKRAR BÖLGESİ S15-S21    |     |                       |     |                              |                            |     |     |     |     |     |     |                             |                              |     |     |          | ALTERNATİF EKZON |           | SÜPER TEKRAR BÖLGESİ S21-S22 |     |                                 |     |     |     |     |               |     |           | BAŞİT TEKRAR M163-M177/178 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ekzon | 156                             | 157 | 158                   | 159 | 160                          | 161                        | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168                         | 169                          | 170 | 171 | 172      | 173              | 174       | 175                          | 176 | 177                             | 178 | 179 | 180 | 181 | 182           | 183 |           |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|       | M163 M177/178                   |     |                       |     |                              |                            |     |     |     |     |     |     |                             | M177/178                     |     |     | M178/179 |                  | M179 M185 |                              |     |                                 |     |     |     |     | SERİN BÖLGESİ |     | SH3 3'UTR |                            |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Şekil 2.8. Nebulin proteinine ait bölgelerin *NEB* geninin ekzonları üzerinde dağılımı

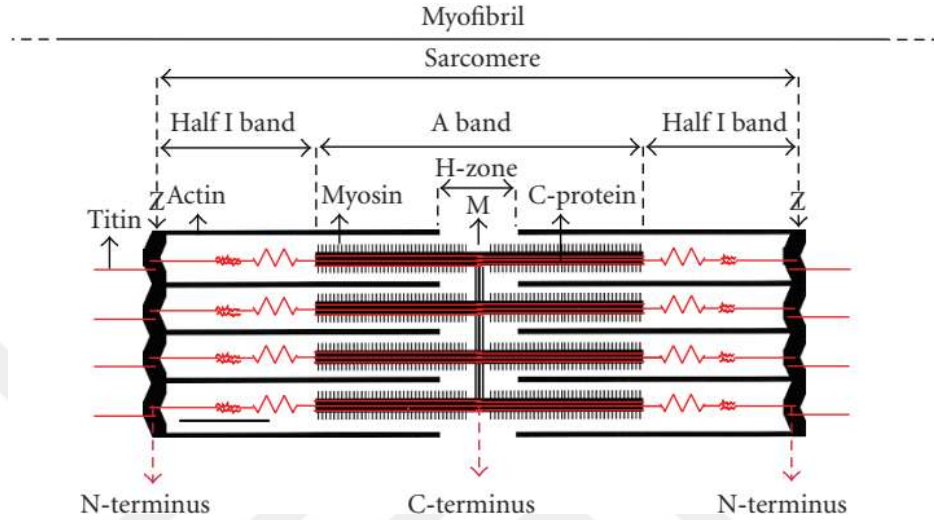
### 2.5.2. Titin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu

Kasların kasılması süreci için kayan filamentler teorisinin ortaya atılması ile birlikte sarkomerler içerisinde aktin ve miyozinlerin birbirleri üzerinde kayarak kasılmasını gerçekleştirdikleri keşfedildi. Bu teoriye göre iki komşu Z diski arasındaki bölümü oluşturan sarkomerler merkezlerinde aktin ve miyozin proteinleri bulundurmaktadırlar. Yapısal olarak sarkomer yapısının sürekliliğinin sağlanması, aktin ve miyozinlerin merkezde konumlandırılabilmesi için iskele görevi gören, Z diskler arasında uzanan yapısal büyük bir proteinin var olabileceği düşünüldü. Sonrasında 1970'li yılların sonlarına doğru Maruyama ve ark. (1977) tarafından bu görevi yapan bir protein keşfedilip, ismine bağlantı (connection) proteini ismi verildi ve sonrasında ismi titin olarak değiştirildi. Başlangıçta bu proteinin yalnızca yapısal bir görevi olduğu düşünüldü. Fakat sonrasında fonksiyonel olarak da görevlerinin olabileceği ortaya çıktı. Görevlerinden bir tanesi sarkomerin düzenini sağlamak yani kas kasılması sırasında miyozinler aktinler üzerinde kayarken bu proteinleri sarkomerin merkezinde tutmakken diğer görevinin ise bir yay gibi davranarak sarkomerlere esneklik sağlayıp, esnemeye karşı pasif direnç göstermek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kasılma sırasında tropomiyozinin ince filamentler üzerinde yer alan bağlanma bölgelerini açabileceği de düşünülmektedir (Bennet ve ark., 1996; Linke, 2018; Power ve ark., 2016).

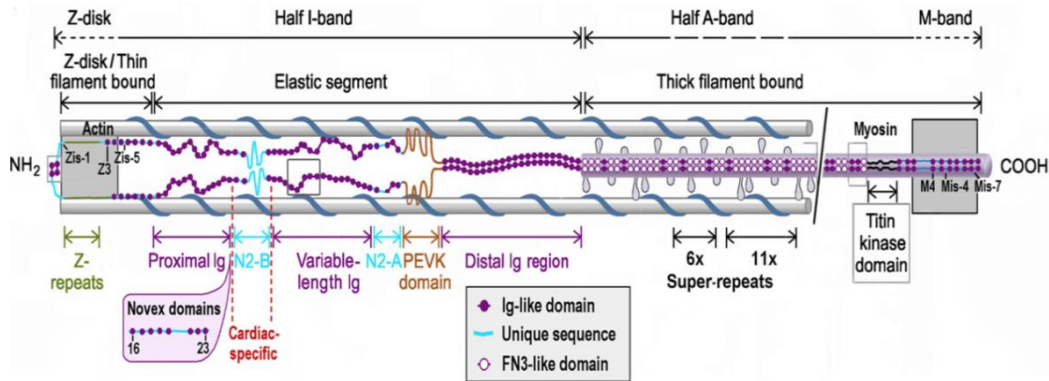
Titin proteini omurgalılarda aktin ve miyozinden sonra yaygın bulunan protein olup aynı zamanda da oldukça büyüktür. Yetişkin bir kişinin vücudunun yaklaşık 0,5 kg'ını titin proteini oluşturmaktadır. Vücutta yer alan bu büyük protein sarkomerlerde Z diskinden sarkomerin merkezinde bulunan M bandına kadar uzanmakta olup yapısal ve işlevsel olarak N-terminal Z diski, I bandı, A bandı ve C-terminal M bandı bölgeleri olmak üzere 4 bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.9) (Kellermayer 2019; Krüger ve ark., 2011; Matsuo ve ark., 2019). Titinin C-terminal bölgesi A bandına bağlanmaktadır ve bu bölgedeki miyozin ile bağlanmasını sağlayan bağlantı bölümleri yer almaktadır. Miyozinler titin sayesinde Z diskine ulaşabilmekte olup, dinlenme durumunda kastaki pasif gerilimden ve aktif kasılma durumunda da sarkomerin merkezinde yer alan kalın filamentleri koruma görevini üstlenmektedir (Guo ve ark., 2010). İki yarım sarkomerin uçları merkezde yer alan

M çizgisinde üst üste gelip bir sarkomer yapısını oluşturmaktadır. Bu bölgede titin üzerinde serin/treonin kinaz (TK) bölgesi yer almaktadır, hücreler arası sinyalden sorumlu olan birçok protein buraya bağlanmaktadır ve bu bölge 359. ekzon tarafından kodlanmaktadır (Centner ve ark., 2001). A bandı içerisinde (distal Ig bölgesi hariç) Ig ve FnIII alanlarının tekrarından oluşan bölgeler içermektedir. Ig ve FN3 bölgelerinin atasal ortak bir diziden köken almış olabilecekleri düşünülmektedir (Amodeo ve ark., 2001). İki yarım sarkomerin birleşme kısmında yer alan A ve I bantları birbirini ardında yer almaktadır (Şekil 2.9). Bu iki bölge arasındaki birleşme noktası oldukça karmaşık bir yapıya sahip olup, titin-miyozin etkileşiminden sorumludurlar. Proteinin N-terminal bölgeleri ise Z bandına sabitlenmiştir (Trinick ve Tskhovrebova, 1999). Bu kısım mekanosensör görevi görmekte olup; yapısal ve mekanik algı, güç aktarımı gibi fonksiyonlara katkıda bulunmaktadır (Matsuo ve ark., 2019). Proteinin elastikiyetini yani uzama, sıkışma ve bükülme fonksiyonlarını sağlayan kısım ise I bandı bölgesidir. Bu bölgenin ana kısmı içerisinde esneyebilen elementleri barındıran Ig, PEVK, N2A ve N2B bölgelerini içermektedir (Şekil 2.10) . Ig bölgeleri rastgele şekilde düzenlenen proksimal ve distal Ig alanları şeklinde ayrılmaktadır. Distal Ig bölgeleri bağlanmadan sorumlu olup, filamentin uç kısmını oluşturmaktadırlar. Yay görünümünde olan kısım ise PEVK alanı olarak adlandırılmaktadır (yüksek prolin (P), glutamat (E), valin (V) ve lizin (K) kalıntıları bakımından zengindir.). Sarkomerlerin gerilmemiş yani pasif konumda olduğu durumda Ig ve PEVK bölgeleri çökmüş durumdadır (Li ve ark., 2012). Kasılmanın başlaması ile birlikte Ig alanlarının bir kısmı uzamış durumdayken bazı kısımları hala eski durumunu korumaktadır, gerilme düzeyinin artması ile birlikte de PEVK alanı da devreye girmekte olup bu kısım da düzleşmektedir (Şekil 2.10). Bu bölgeler titinin esnekliğini sağladığı için oldukça kritik öneme sahip olup, ayrıca sinyal proteinler olarak da görev almakta ve post-translasyonel modifikasyonlar ile de düzenlenerek çeşitli özellikler kazanmaktadırlar (Granzier ve ark., 2006; Kellermayer ve ark., 2019). Titin proteini 364 ekzondan oluşan tek bir genden sentezlenmekte ve bu ekzonların farklı alternatif eklemeleri ile birlikte 1 milyondan fazla izoformunun olduğu düşünülmektedir. Özellikle I bandı içerisinde yoğun alternatif eklemeler gerçekleşmektedir. Bazı kısımlar dokuya özgün olarak düzenlenmekte ve her izoformda yer almamakla birlikte PEVK ve Ig bölgelerinin

bugüne kadar bilinen tüm izoformlarda yer aldığı bilinmektedir. I bandı dışında alternatif eklemeye uğrayan kısımlardan birisi de N-terminal kısımda yer alan 7'li Z-tekrar bölgesidir. Bu bölge kas tipine göre farklı alternatif eklemelere uğramaktadır (Li ve ark., 2012; Savarese ve ark., 2020; Sorimachi ve ark., 1997).



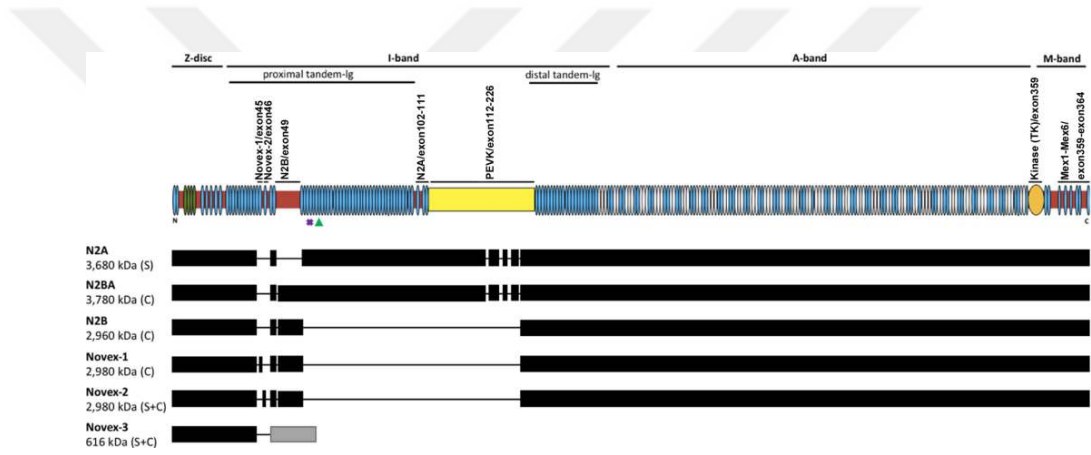
**Şekil 2.9.** Sarkomerler içerisinde titin proteinin konumu (Guo ve ark.,2010).



**Şekil 2.10.** Titin proteinin fonksiyonel bölgeleri ve sarkomerler üzerinde bulundukları kısımlar (Krüger, 2011'den modifiye edilmiştir).

N2A yalnızca iskelet kaslarında yer almakta olup, 102 ve 109. ekzonlar arası bölge bu bölümü oluşturmaktadır. N2B bölgesi ise yalnızca kardiyak kaslarda bulunmakta olup 49. ekzon tarafından kodlanmaktadır. Kardiyak kaslarda neredeyse titinin tüm kısımları ifade edilmekte olup, yaşamın farklı dönemlere göre ifade edilen, fetal kardiyak titin (3,5–3,6 MDa), yetişkin N2BA (~ 3,3 MDa) ve yetişkin

N2B (~ 3,0 MDa) olmak üzere 3 farklı izoformu vardır (Granzier ve Labeit, 2007). Bunların dışında novex 1, novex 2 ve novex 3 olmak üzere 3 farklı izoform daha bulunmaktadır (Bang ve ark., 2001). Novex 1 yalnızca kalp kaslarında ifade edilmekteyken, novex 2 ve novex 3 hem iskelet hem de kalp kaslarında ifade edilmektedirler. Bu izoformların bazıları tam uzunluğa sahipken, bazıları ise daha kısadır. Kısa olan izoformlardan bir tanesi novex 3'tür ve yaklaşık 700kDa uzunluğundadır. Bu izoformun 3' bölgesinde bir durdurma kodonu yer almakta ve bu da proteinin kısa olmasına ve A bandına ulaşamamasına neden olmaktadır. Bu nedenle novex 3 oluşan en kısa izoformlar arasında yer almaktadır (Şekil 2.11) (Kellermayer ve ark., 2019; Krüger ve Linke, 2011).



**Şekil 2.11.** Titin geninde alternatif ekleme ile farklılaşan izoformları (Ge ve ark., 2019).

### 2.5.2.1. *TTN* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

İnsanda 2. kromozom üzerinde 2q31.2 lokusunda yer alan *TTN* geni 308 kb uzunluğunda olup 364 ekzondan oluşmaktadır ve yaklaşık 35991 aminoasit kodlamaktadır (Fernandez ve ark., 2017) (Şekil 2.12). Geni oluşturan ekzonlar içerisinde en uzun ekzon 48 olup, 6455 bp uzunluğundayken; en kısası ekzon 110 olup, 27 bp uzunluğundadır. Gen üzerinde en uzun intron 42 olup 11193 bp uzunluğundadır. Protein sentezinde gen üzerinde yer alan ekzon 1 ifade edilmemektedir. *TTN* çok büyük bir gen olduğu için NGS (yeni nesil sekanslama) yöntemlerinden önce bu gendeki hastalıkların saptanması ve yorumlanması oldukça zordu. Dizileme teknolojisindeki gelişmeler sayesinde *TTN* geninin kalıtsal hastalıklarla



olan ilişkisine yönelik çalışmalar artmıştır. Yapılan çalışmalar *TTN* geninde meydana gelen mutasyonların sarkomerik düzeni bozarak çeşitli kalp ve kas hastalıklarına neden olduğunu göstermektedir (Birsoy ve ark., 2013; Hackman ve ark., 2017). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda gen ekspresyonundan ve proteinin yapılandırılmasından sorumlu TK bölgesinde görülen mutasyonların embriyonel gelişim döneminde abortusa neden olabileceği gösterilmiştir (Chauveau ve ark., 2014). Genin son kısımlarında yer alan Mex1-Mex3 (ekzon 358-360) arası ekzonlarda görülen delesyonlar sarkomer hattında çeşitli bozukluklara neden olmakta ve M bandının düzeni bozulmaktadır. İki sarkomerin birleşme noktasında bulunan M bandı üzerinde daha ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır fakat az sayıda mutasyon ile hastalıklar arasında bağlantı kurulabilmiştir. Ge ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada gen üzerinde proksimal I bandında Ig bandı görülen mutasyonların genelde kardiyak kaslarda etkilenim olmaksızın iskelet kaslarını etkilediği ortaya çıkmıştır. *TTN* geni ve hastalıklar arasındaki bağlantının çözülebilmesi için ayrıntılı araştırılması gereken konulardan bir tanesi de post-translasyonel modifikasyon süreçleridir. Z, I ve M bantları gen üzerinde fosforilasyona uğramakta olan bölgelerdir. NH2 bölgesindeki fosforilasyon ile birlikte Zis1 ve Zis2'nin eklenmesinin ardından XSPXR motifleri oluşmaktadır. Bu motifin bulunduğu bölgelerde de yetişkinlik dönemine kıyasla gelişme dönemlerinde daha çok fosforilasyonun olduğu görülmektedir. Bundan dolayı da Z ve I bantlarının fosforilasyonu ile miyogenez sırasında gerekli sinyallerin oluşup iletilmesi için bu fosforilasyon mekanizmasının anahtar rolü olduğu düşünülmektedir (Krüger, 2015; Sebestyen ve ark., 1995). I bandının fosforilasyonu ile birlikte de sarkomerlerdeki pasif gerilim sağlayan yapılara ait özellikler etkilenmekte ve bölge içerisinde yer alan N2A bölgesinin de protein-protein ilişkisinde temel rol oynamakta olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 2.12.** *TTN* geninin çeşitli bölgelerinin ekzonlar üzerine dağılımı

## 2.6. Konjenital Myopatilerde Fonksiyonel Mekanizmaları Etkileyen Proteinler ve Sentezlendikleri Genler

### 2.6.1. Enzimatik Aktivite Mekanizması

#### 2.6.1.1. Miyotübülerin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu

Miyotübülerinler hemen hemen tüm ökaryotik canlılarda bulunan tirozine spesifik fosfotaz ailesi içerisinde yer alan proteinlerdir. Maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'in iskelet yapısında bile miyotübülerin bulunması bu genlerin evrimsel süreçte canlılarda oldukça korumuş olduğunu göstermektedir. Miyotübülerin 1 (*MTM1*) ve miyotübülerin ilişkili protein 1-13 (*MTMR1-13*) olmak üzere 14 adet miyotübülerin geni insanlarda farklı kromozomlar üzerinde kodlanmaktadır. Bu genlerden 8 tanesi aktif iken, geri kalanları inaktif proteinler sentezlemektedir ve bu gen bölgelerinin en az 2'sinin pseudogen olduğu düşünülmektedir (Laporte ve ark., 2003). Evrimsel süreçte aktif olan genlerden inaktif olanların duplikasyonlar sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Begley ve ark., 2003). İnaktif olanların kökenlerinin paralog mu yoksa ortolog mu oldukları hala bilinmemekle birlikte inaktif olan proteinlerin aktif miyotübülerin proteinleri ile bağlantılar kurabildikleri bilinmektedir. *MTM1*, *MTMR2-5*, *MTMR7-9*, *MTMR12* genlerinin birbirleri ile birlikte görev aldıklarına dair görüşler vardır. Fakat bu etkileşimlerin nasıl ve ne şekilde gerçekleştiklerine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu ailenin keşfedilen ilk üyesi olan *MTM1*'den yaklaşık olarak 500 milyon yıl önce *MTMR1* geninin, sonrasında ise *MTMR2* geninin bu genlerden ayrıldığı düşünülmektedir (Laporte ve ark., 2001). Gen ailesi içerisinde özellikle *MTM1*, *MTMR1* ve *MTMR2* gen yapılarının ve dizilerinin birbirlerine oldukça benzer olduğu görülmektedir (Laporte ve ark., 2003).

Özellikle *MTMR1* geni *MTM1* geninin 20 kb'lık aşağısında yer alması ve yüksek sekans benzerliği göstermesi nedeniyle *MTM1* geninin duplikasyonu ile oluştuğu varsayılmaktadır (Kioschis ve ark., 1998). Miyotübülerinler; hücreler arası sinyal iletimi, hücre iskeletinin düzenlenmesi, kas hücrelerinin başkalaşması, T-tübül



Bu domainden sonra gelen ve proteinlerin aktif ya da inaktif olmasını belirleyen kısım ise PTP'dir. Bu bölge içerisinde katalitik aktifiteye sahip miyotübülerinlerde (MTMR1-4 ve MTMR6-8) yer alan C(X)5R motifi bulunmaktadır (Begley ve ark., 2005). Bu motifin bulunmadığı ya da dejenere olduğu miyotübülerinler (MTMR9-13) katalitik olarak inaktiftirler (Raess ve ark., 2017). C(X)5R motifi PTP domaininde 11. ekzonda yer alır ve membranda bulunan fostaflanmış fosfatidilinositol molekülünden fosfatın uzaklaştırılmasında görev alır. PTP domaini içerisinde yer alan bir alt domain olarak SET domaini (SID domain) proteinin diğer MTMR proteinleri ile etkileşiminde rol oynar. MTMR10 hariç miyotübülerin ailesi proteinlerin tümünde bulunan CC domaini ise miyotübülerinlerin birbirine bağlanmasında görev alır. Bu bölge ile aktif ve inaktif olan miyotübülerinler birbirlerine bağlanabilir (Laporte ve ark., 2000; Laporte ve ark., 2003) (Şekil 2.13). Yalnızca MTMR3 ve 4 proteinlerinde yer alan FYVE (Fab1p, YO1B, Vac1p ve EEA1) bölgesi ise spesifik olarak fosfatidilinositol-3 fosfata bağlanır. Yalnızca MTMR5 (SBF1) ve MTMR13 (SBF2) proteinlerinde bulunan PH domaini ise fosfolipidlerin bağlanma kapasitesi ve afinitesinden sorumlu olan kısımdır. MTMR1, MTMR1 ve MTMR2'de görülen PDZ-bağlanma motifi ise enzimin allosterik kontrolünden sorumlu bölge olarak kabul edilir.

#### **2.6.1.1.1. *MTM1* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi**

İnsanda X kromozomu üzerinde Xq28 lokusunda yer alan *MTM1* geni 104 kb uzunluğunda olup 15 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 2.14). Bu ekzonlar içerisinde en uzun ekzon 11 olup, 207 bç uzunluğundayken; en kısası ekzon 2 olup, 63 bç uzunluğundadır. Gen üzerinde en uzun intron 6 olup, 19676 bç uzunluğunda; en kısa intron ise intron 11 olup, 615 bç uzunluğundadır. Protein sentezinde gen üzerinde yer alan ekzon 1 ifade edilmezken, ekzon 2'nin ise bir kısmı kodlanmaktadır. Ekzon 1 her ne kadar kodlanmıyor olsa da bu bölgede görülen mutasyonların mRNA sentezinin etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Miyotübülerinlerin genel olarak tüm vücutta ifade edilmektedir ve fareler üzerinde yapılan çalışmada *MTM1* geni yokluğunda hayvanlarda kas farklılaşmasının normal geliştiği fakat ömürlerinin ciddi şekilde kısaldığı ve anormal fenotipik olguların meydana gelmesine neden olduğu

gözlenmiştir (Buj-Bello ve ark., 2002). Gende meydana gelen mutasyonlar özellikle kalıtsal kas hastalıkları ile ilişkili olduğu görülmektedir (Jungbluth ve ark., 2008). Konjenital myopati hastalığı gözlenen ve birbirinden farklı 198 aile ile yapılan çalışmada konjenital myopati ile ilişkili olduğu düşünülen 133 mutasyon *MTM1* geninde saptanmıştır (Laporte ve ark., 2000).



**Şekil 2.14.** *MTM1* geni ekzonları ve proteinde yer alan fonksiyonel kısımları

*MTM1* genindeki mutasyonların X kromozomu geçişli sentronükleer myopati ve miyotübüler myopati ile ilişkili olduğu görülmektedir (Fujimura-Kiyono ve ark., 2008). Genin X kromozomu üzerinde yer alması nedeniyle ilişkili konjenital myopatilerin erkek çocuklarını etkileme olasılığı da yüksektir. *MTM1* genindeki hastalık yapıcı mutasyonların çoğunun yüksek oranda korunumlu bölgelerde meydana geldiği görülmektedir. Gen üzerinde mutasyonun görüldüğü bölge ve mutasyon çeşidine göre hastalığın görülme zamanı, şiddeti ve prognozu değişmektedir. *MTM1* kaynaklı mutasyonlarda hayatının erken dönemlerinde ya da fetal evrede ölümle sonuçlanan vakalar olduğu gibi ileri yaşlarda görülen vakalara da rastlanmaktadır (Laporte ve ark., 2003). Bugüne kadar hastalıkla ilişkili elde edilen mutasyonların ağırlıklı olarak genin PTP bölgesinde yoğunlaştığı bildirilmiştir (Pierson ve ark., 2005). Özellikle PTP içerisinde yer alan ekzon 11 ve bu ekzonun etrafında yer alan ekzon 8 ve 9'da gerçekleşen mutasyonların şiddetli hastalıklara yol açtığı bildirilmektedir (Bosco ve ark., 2022). Ekzon 11'in katalitik olarak aktif bölgeyi içermesi, ekzon 8 ve 9'un post-translasyonel modifikasyonlar için önemli olması bu bölgelerdeki mutasyonları önemli oranda hastalıkla ilişkili kılmaktadır. Bu bölgeler dışında görülen mutasyon yoğunluğunun çoğunlukla intron bölgelerinde yer aldığı ve bu bölgelerdeki mutasyonların ise daha hafif fenotipli hastalıklara yol açabileceği bildirilmektedir (Herman ve ark., 2002). Ancak *MTM1* geni üzerinde mevcut mutasyon yük durumu, bunların ekzonlara ve intronlara dağılımı ile ilgili verilerin sınırlı olmasından dolayı gen üzerinde yer alan mutasyonların klinik

tanılama ve hastalık prognozunda kullanılabilirliğinin önünde engel teşkil etmektedir.

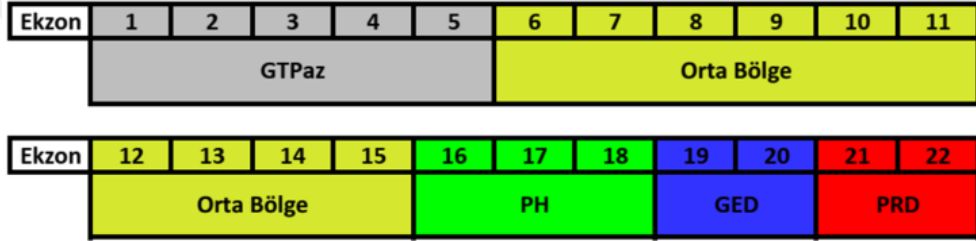
#### **2.6.1.2. Dinamin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu**

Dinaminler ilk kez yaklaşık 30 yıl önce hücre iskeleti elemanlarını ile yakın ilişkili olan ve onları indükleyen 100 kDa'luk bir protein olarak ortaya çıktı. Daha sonrasında yapısının ayrıntılı incelenmesi ile birlikte bu proteinin GTP bölgesinin bulunduğu ve bu bölgelerde GTP ile ilişkili aktiviteleri düzenlediği keşfedildi. (Gonzalez Jamett ve ark., 2013). Dinamin proteinleri GTPaz ailesinin üyesidirler ve şu ana kadar memelilerde keşfedilen 3 farklı dinamin proteini farklı kromozomlar üzerinde kodlanmaktadır. Bu proteinler yüksek oranda homoloji göstermelerinin yanında ifade edildikleri dokular farklıdır. *DNM1* nöronlarda, *DNM2* tüm vücutta, *DNM3* ise beyin, kalp, akciğerler ve testislerde ifade edilmektedir (Zhao ve ark., 2018).

Hücre iskeletinin temel elemanlarındaki mekano-enzimlerden birisi olan dinaminlerin en önemli görevlerinden biri endositoz-ekzositoz için hücre zarındaki değişikliklerin gerçekleşmesinde rol oynamasıdır. Proteinin bu görevinin ilk keşfedilmesi memelilerdeki dinaminin *Drosophila*'daki homoloğu olan shibire geninin karakterizasyonuna dayanmaktadır. Shibire geninde mutasyon taşıyan *drosophila*'larda endositotik süreçlerde aksaklıkların ortaya çıktığı fark edilmiştir (Gonzalez Jamett ve ark., 2013). Endositoz ve ekzositozun yanında membran füzyonunda, salgılama süreçlerinde farklı rolleri olup, hücre membran trafiği, aktin ağlarının oluşumu-düzenlenmesinde ve net olmamakla birlikte sentrozom birleşmesinde de görevi olduğu bilinmektedir (Nicot ve ark., 2007).

Hücre membran transportunda dinamin proteinlerinin hepsinin görev almasının yanında özellikle dinamin 2 proteini klatriin aracılı endositozda aktif olarak rol oynamaktadır. Özellikle kaveola kaplı çukurların kenarlarına bağlanarak membran fisyonunu düzenleyen önemli proteinlerden biridir (Lopergolo ve ark., 2021; Massana ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2018). Dinamin proteinin aktivitesi de post-translasyonel faktörlerle düzenlenmektedir (Durieux ve ark., 2010).

Dinamin proteinlerinin tümü temelde GTPaz, orta bölge, PH, GED, PRD olmak üzere 5 bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.15). N-terminal bölgede yer alan GTPase domain GTP'yi bağlayıp hidrolize etmekten sorumludur. Fosfatidilinositol ile etkileşime geçen ve onları tanıyıp bağlanan kısım ise PH bölgesidir. Proteinin yapısal olarak var olmasını sağlayan ve sap kısmını oluşturan bölgeler ise GED alanı ve orta bölgeleridir. İkisi birlikte proteinin regülasyonundan sorumludur. Ayrıca orta bölge GTP hidrolizi sonrası gerçekleşecek olan konformasyonel değişikliklerden sorumludur. Dinamin proteininin başka proteinler ile etkileşime geçebilmesini sağlayan arginin amino asidi açısından zengin ve içerisinde çeşitli motifler içeren PRD alanı da proteinin C-terminal kısmında yer almaktadır (Şekil 2.14).



Şekil 2.15. *DNM2* geninin çeşitli bölgelerinin ekzonlar üzerine dağılımı

#### 2.6.1.2.1. *DNM2* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

*DNM2* geni 19. kromozomda 19p13.2 lokusunda yer alır ve 114 kb uzunluğundadır. Genin 22 ekzonu bulunmaktadır ve bunların sadece 20'si kodlanmaktadır (Züchner ve ark., 2005). Temelde 4 temel izoform ve 2 alternatif ekleme ile kombine bir biçimde ifade edilmektedir. Ekzonları içerisinde ekzon 10-10 bis (139 bp) ve ekzon 13-13 bis (12 bp) olmak üzere uzunluklarının da birbiri ile oldukça benzer olan alternatif 4 tane ekzon bulunmaktadır.

*DNM2* genindeki mutasyonlar CNM ve CME hastalığına neden olduğu bilinirken, gendeki mutasyonların CNM vakalarının %50'sinden sorumludur (Dabby ve ark., 2014). Mutasyonların mikrotübüllerin yapısını bozduğu, hücre içi taşımalarda çeşitli problemler ortaya çıkardığı ve aynı zamanda hücre mimarisini de etkilediği görülmektedir. CNM'li hastalarda bundan dolayı anormal yerleşimli

çekirdeklerin var olduğu bilinmektedir. Bu zamana kadar tespit edilen mutasyonlarda CNM ve CMT'ye spesifik olarak ekzon ya da gen bölgesi tespit edilememiştir. Bu iki hastalığın da patomekanizmalarının benzer olup olmadığı bilinmemektedir ve genelde hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda mutasyonların PH bölgesinde yoğunlaştığı görülmüştür. Bu bölgedeki mutasyonların da CMT ve şiddetli neonatal dönem başlangıçlı ortaya çıkan CNM'ye sebep olduğu düşünülmektedir.

*DNM2*'nin GTP'yi hidrolize etmesi, membran lipidlerini oligomerize etme yeteneğine bağlıdır. Bununla ilgili olarak da CNM hastalarında lipid bağlanmalarında bir problem yokken, GTPaz aktivitesinin oldukça yüksek olduğu, CMT hastalarında ise lipidlerin bağlanamadığı ve düşük GTPaz aktivitesinin var olduğu öne sürülmüştür (Massana ve ark., 2019). Buradan yola çıkarak da *DNM2* genindeki mutasyonların çok farklı fenotipler ortaya çıkarması ile birlikte hastalığın oluşmasında altta yatan birçok farklı mekanizmanın var olabileceği düşünülmektedir.

#### **2.6.1.3. Kofilin Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu**

İskelet kaslarının oluşum ve gelişiminde aktin proteinlerinin doğru şekilde yapılandırılması oldukça önemlidir. Aktin proteinleri globüler ve filamentler halinde bulunmakta olup; hücre hareketi, sitokinez ve endositoz gibi birçok süreçten sorumludur. Bu görevlerin bazılarını globüler halde yapabiliyorken, bazılarını ise polimerizasyona uğrayarak F-aktinler halinde gerçekleştirmektedir. Aktinin bu polimerizasyon ve depolimerizasyonun sürecinde birçok protein görev almaktadır (Ockeloen ve ark., 2012; Tondeleir ve ark., 2009). Mayalarda bu süreçlerden sorumlu bir gen bulunurken, nematodlarda iki, memelilerde ise üç gen bulunur. Memelilerde bu görevi üstlenen en önemli düzenleyiciler ADF (aktin depolarize edici faktörler) ailesinin üyesi olan kofilin 1, kofilin 2 ve destrin proteinleridir. Bu proteinler %70 oranında birbirlerine benzerlik göstermektedirler ve mayalardan insanlara kadar neredeyse tüm canlılarda oldukça korunumludurlar. Memeliler ile bitkilerde yer alan ADF proteinlerinin karşılaştırılmasında %31 oranında bu proteinlerin amino asit diziliminde benzerlikler olduğu görülmüştür (Agrawal ve ark., 2007; Galkin ve ark., 2001). Kofilinler 13–19 kDa büyüklüğünde oldukça küçük proteinlerdir (Maiti ve ark., 2013). Kofilin 1 ve destrin hemen hemen tüm

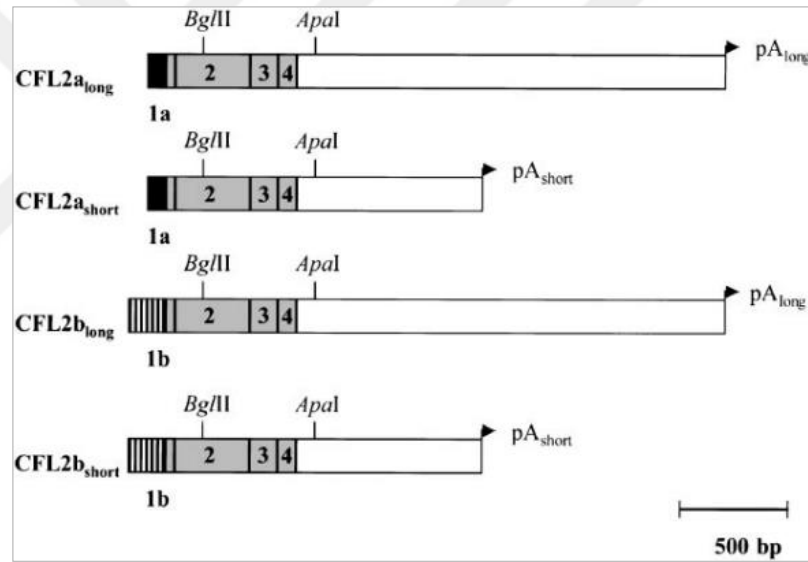


vücutta ifade edilirken, kofilin 2 ise yoğun olarak iskelet ve kalp kaslarında sentezlenir, bunun yanında testis, akciğer, beyin, akciğer, böbrek, pankreas, beyin, karaciğer ve plasenta dahil diğer dokularda da düşük miktarlarda bulunur. Aktin filamentler üzerinde yer alan bu proteinlerden kofilin 2'nin aktinler üzerindeki yoğunluğu daha fazladır (Nakashima ve ark., 2005; Ohashi, 2015). Sarkomerlerde birbirlerine oldukça yakın pozisyonda bulunan bu proteinlerin nerede bulundukları ile ilgili de çeşitli tartışmalar söz konusudur. Tavuk sarkomerlerinde I bandında bulunurken, fare ve insan sarkomerlerinde yayılmış durumda ya da Z bandında lokalize oldukları tahmin edilmektedir (Gurniak ve ark., 2014; Nakashima ve ark., 2005).

Kofilin 1 ve 2 ile yapılan çalışmalarda birbirleri arasında yüksek oranda benzerlikten dolayı bazı durumlarda birbirlerinin yerine ifade edildikleri görülmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada kofilin 2'nin yokluğunda kofilin 1'in bu durumu telafi edebildiği bu yolla canlının hayatta kalabildiği bildirilmiştir. Ancak bu farelerde kornea yapılarındaki değişiklik nedeniyle körlük gözlenmiştir (Agrawal ve ark., 2007; Bamburg ve ark., 2010). Bu iki proteinin amino asit dizilimleri her ne kadar yüksek oranda birbirlerine benzer olsa da farklı dokularda sentezlenmeleri ve bu örnekteki gibi durumlar her iki proteininde farklı görevleri olabileceğine işaret etmektedir. Kofilin proteinlerinin birçok doku ve organda görev alması işlevsel farklılıkların ne olduğunu tahmin etmeyi zorlaştırmaktadır. McGough ve ark. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada kofilin ailesinden bir proteinin aktin filamentlerin F-aktin arasındaki bağları zayıflattığı ve bundan kaynaklı olarak depolimerizasyona neden olabileceği göstermiştir. Proteinin aktinin polimerizasyonu gerektiğinde bu süreci gerçekleştirmek için G-aktinlerde dikenli uç meydana getirdiği tahmin edilmektedir. Aktiviteleri Ser3'ün fosforilasyonu ile kontrol edilmektedir. Bu fosforilasyon kofilinin inaktivasyonuna yol açar. Fakat görevlerini yerine getirmelerinde ortamın pH'sı ve diğer proteinlerle olan etkileşimleri önemli rol oynamaktadır (Menon ve Gupton 2016; Narita, 2020).

ADF proteinleri arasında iskelet kaslarında oldukça yoğun bulunan kofilin 2 üzerinde birbirlerinin alternatifleri olan ekzon 1a, 1b ve 2, 3, 4 olmak üzere 5 ekzonu

bulunmakta olup 4 tanesi ifade edilmektedir (Şekil 2.16). Ekzon 1a ve 1b'nin alternatif ekleme sonucunda CFL2a ve CFL2b olmak üzere 2 farklı izoformu ortaya çıkmaktadır. Bunlar aynı kodlama dizisine sahiptirler fakat 5' UTR bölgeleri farklılık göstermektedir. Bu durumda ifade edildikleri dokuya göre farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. CFL2b ağırlıklı olarak kalp ve iskelet kaslarında ifade edilirken, CFL2a ise birçok çeşitli dokuda ifade edilmektedir (Sun ve ark., 2015; Thirion ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2009) (Şekil 2.16). Kofilin 'nin 2. ekzonunda yer alan 30 ve 35. aminoasitler arası bölge nükleer lokalizasyon sinyalinden sorumludur. Aynı ekzonun 60-65. aminoasitleri arası bölge ise aktin bağlanma bölgesi olarak görev yapar ve genin fonksiyonel ve korunumlu bölgelerini oluştururlar.



**Şekil 2.16.** İnsanda *CFL2* genine ait transkriptler. Gen üzerinde kodlama yapan bölgeler gri renkteyken, kodlama yapmayan bölgeler siyah renkte gösterilmektedir (Thirion ve ark., 2001).

#### 2.6.1.3.1. *CFL2* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

İnsanda 14. kromozom üzerinde 14q13.1 lokusunda yer alan *CFL2* geni 5 kb uzunluğunda olup 5 ekzondan oluşmaktadır. Bu ekzonlar içerisinde en uzun ekzon 2 olup, 308 bp uzunluğundayken; en kısası ekzon 1 olup, 3 bp uzunluğundadır. Gen üzerinde en uzun intron 2 olup, 117 bp uzunluğunda; en kısa intron ise intron 3 olup,

79 bç uzunluğundadır. Ekzon 1 yalnızca başlatma kodonu olan metiyonin aminoasidini kodlamaktadır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *CFL2* genindeki mutasyonların nemalin myopatiye yol açtığı gösterilmiştir (Fattori ve ark., 2018; Gurniak ve ark. 2014). Gurniak ve ark. (2014) tarafından bu genin görevini saptamak için fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada genin yokluğunda miyofiberler ve sarkomerik yapılar yaşamın ilk dönemlerinde düzgün olsa da sonraki dönemlerinde bunlarda düzensizlikler ortaya çıktığı görülmektedir. Fattori ve ark. (2018) tarafından aralarında herhangi bir akrabalık bağlantısı olmayan 3 nemalin myopati hastası üzerinde yapılan çalışmada ekzon 2’de yer alan 3 mutasyon gözlenmiştir. Bunlar arasında yer alan p.Asp79Tyr, p.Asp86His mutasyonları proteinin doğru şekilde katlanmasında problemler yaratırken, p.Ser94LeufsTer6 mutasyonunun da kofilinin büyük bir bölümünde kayıp olduğu gözlenmiştir. Yapılan başka çalışmalarda saptanan p.Ala35Thr mutasyonunun kofilin 2’nin ifadesinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Agrawal ve ark., 2007; Rosen ve ark., 2020). Mutasyonlar sonucunda sarkomer yapısında çeşitli değişiklikler ortaya çıkmakta ve kas fiberlerinde alfa aktin birikimleri meydana gelmektedir. Gurniak ve ark. (2014) bu birikiminin sebebi olarak iki olası mekanizma öne sürmüşlerdir. Birincisi fetal dönemde ifade edilen alfa aktinlerin doğum sonrasında kastan temizlenememesi, ikincisi ise kofilin 2 mutantlarında alfa aktinin ifadesinin değişmesinin bu duruma neden olabileceğidir.

#### **2.6.1.4. Amfifizin Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu**

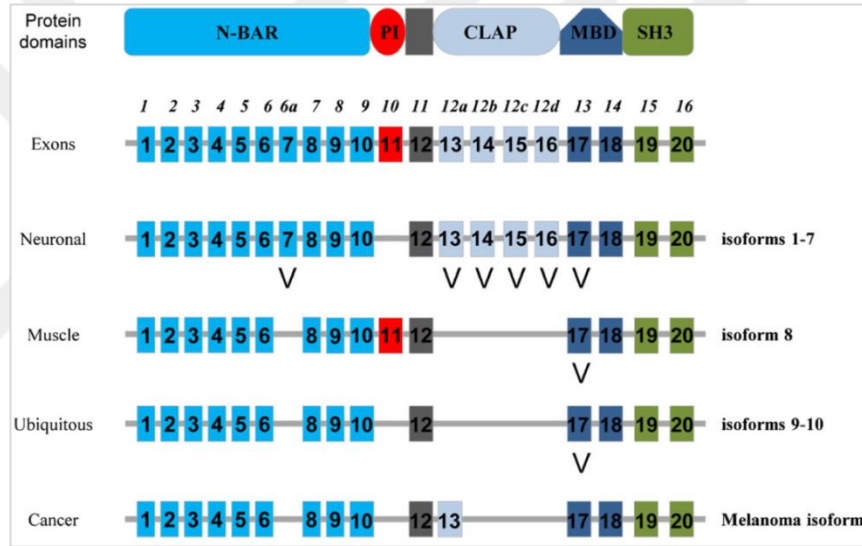
*BIN1*(amfifizin 2) N-BAR protein ailesine ait olan endositik bir proteindir ve yine hücredeki endositik süreçlerden sorumlu proteinlerden birisi olan amfifizin 1’in homoloğu olup, %54 benzerlik taşıdığı için amfifizin 2 olarak adlandırılmaktadır (Sakamuro ve ark., 1996). Vücutta hemen hemen her yerde yaygın olarak ifade edilmesi ile birlikte en fazla beyin ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. Sarkolemmada başlayan depolarizasyonun hücre içine iletilmesinde rol oynayan ve yayılmasına izin veren T-tübüllere yakın bir konumda yer almaktadır. Endositoz, aktin dinamikleri, apoptozis ve DNA onarımı gibi hücresel süreçlerden sorumlu kompakt bir proteindir (Toussaint ve ark., 2011).

*BIN1* geni tarafından kodlanan amfifizin 2 proteinin alternatif eklemeler yoluyla oluşan 14 farklı izoformu bulunmaktadır. Fakat bu izoformların yalnızca 12 tanesi (1,-12, -11 hariç) farklı dokularda ifade edilmektedir. Protein temelde N-BAR, fosfoinositid (PI) bağlanma motifi, bir CLAP (klatrin ve AP2) bağlanma alanı, Myc bağlanma alanı (MBD) ve Src homoloji 3 (SH3) alanı olmak üzere 5 bölgeden oluşmaktadır. Ekzon 1-10 N-BAR alanını, ekzon 11'i fosfoinositid (PI) bağlanma motifini, ekzon 12 prolin-serin bakımından zengin bölgeyi (PS), ekzon 13, 14, 15 ve 16 CLAP (klatrin ve AP2) bağlanma alanını, ekzon 17 ve 18 myc (köprü entegratör-1) bağlanma alanını (MBD) ve 19-20. ekzonlar ise src homoloji 3 (SH3) alanını oluşturmaktadır. N-BAR, PS, MBD ve SH3 bölgeleri tüm izoformlarda bulunmaktayken, PI bölgesi yalnızca kasa özgü olan izoformlarda bulunmaktadır (Şekil 2.17) (Prokic ve ark., 2004; Toussaint ve ark. 2011; Laporte ve ark., 2001). N-terminal kısımda yer alan N-BAR bölgesi membran transportu sırasında meydana gelen membran hareketlerinin düzenlenmesinin yanında amfifizin 1 ile birlikte homo ve heterodimerizasyonda da görev alır, hilal şeklinde dimerlerden oluşmaktadır. Bu bölgenin iç bükey bölgesinde yer alan pozitif alan ile negatif yüklü lipitlere bağlanmaktadır ve içerisinde 15–30 aminoasitlik alfa helikal yapısında amfipatik sarmal yer almaktadır (Hohendahl ve ark., 2016; Kojima ve ark., 2004). MBD bölgesi histon asetilasyonunda görev alan transkripsiyon faktörlerinden birisi olan c-Myc'nin regülasyonundan sorumludur. C-terminal kısımda yer alan SH3 bölgesi ise amfifizin 2'nin diğer proteinler ile özellikle de dinamin 2 ile etkileşimden önemli rol oynamaktadır. Proteinin bu 3 bölgesi tüm izoformlar içerisinde yer almaktadır. Oldukça az izoformda yer alan CLAP bölgesi endositozda görev almaktadır fakat bu sürecin indüklenmesi için AP2 adaptör kompleksleri, klatrin, sinaptojanin ve endofilin/SH3GL2 ile amfifizin 1 gibi birçok protein ile etkileşime geçmesi gerekmektedir (Prokic ve ark., 2004; Taga ve ark., 2020). Yalnızca kasa özel izoformlarda yer alan PI bölgesi iskelet kaslarındaki T-tübül yapısının oluşmasında ve proteinin kas yapısı içerisinde doğru konumlandırılmasında görev almaktadır (Lee ve ark., 2002). Spesifik olarak PI (4,5)P<sub>2</sub> ve PI(4)P'a bağlanır ve bu yüzden fosfoinositid (PI) alan olarak isimlendirilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada bu alanın SH3 ile bağlantı olabileceğini ortaya koymuştur (Kojima ve ark., 2004). Amfifizin1 ve 2'de ortak olan bu bölge, diğer proteinlerde bulunan SH3

bölgesinden negatif elektrostatik potansiyeli ile farklılaşmaktadır (Prokic ve ark., 2014).

#### 2.6.1.4.1. *BIN1* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

İnsanda 2. kromozom üzerinde 2q14.3 lokusunda yer alan *BIN1* geni 59 kb uzunluğunda olup, 20 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 2.17). Bu ekzonlar içerisinde en uzun ekzon 12 olup, 145 bç uzunluğundayken; en kısası ekzon 15 olup, 24 bç uzunluğundadır. Gen üzerinde en uzun intron 1 olup 30148 bç uzunluğundayken, en kısa intron 3 olup 113 bç uzunluğundadır.



**Şekil 2.17.** *BIN1* geni üzerinde yer alan fonksiyonel kısımlar ve alternatif splicing ile farklı dokularda ifade edilen izoformlar (Prokic ve ark., 2014)

*BIN1* genindeki mutasyonların sentronükleer myopati ve miyotonik distrofi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu genin spesifik görevini ve mutasyonların olası sonuçlarını ortaya koyabilmek için *Drosophila melanogaster* ile yapılan çalışmalarda bu canlılarda tek bir amfizisin geninin olduğu ve bu gen üzerinden sentezlenen proteinin, hem endositik işlevlerden sorumlu olup, hem de T-tübüllerin oluşmasında görev aldığı görülmüştür. *D. melanogaster*'de homozigot bir mutasyon sonucunda yaşayabildikleri fakat uçamadıkları görülmüştür. Bu mutasyon varlığında sineklerde T-tübül sistemleri vardı fakat oldukça düzensiz yapıya sahiptiler. Bu çalışmalar

amfizinin proteinin T-tübül yapısını oluşturmakta görev alan temel proteinler biri olduğu görüşünü desteklemektedir (Razzaq ve ark., 2001).

*BIN1* geni üzerindeki tespit edilen mutasyonların çoğunun N-BAR alanı ve onun içerisinde yer alan amfipatik sarmalda, PI motifi ve SH3 bölgelerinde olduğu görülmüştür (Prokic ve ark., 2014). CNM'ye yol açan mutasyonların genel olarak PI motifinde lokalize olması gerektiği düşünülürken, bu hastalığa yol açan mutasyonların da genelde tüm izoformlarda bulunan N-BAR ve SH3 domainlerde yoğunlaştığı görülmüştür (Hohendahl ve ark., 2016). Mutasyonun gözlemlendiği bölgeye göre etkileri değişmektedir. N-BAR ve amfipatik sarmalda gözlenen mutasyonlar sonucunda aminoasitlerde yük değişiminin olmasına yol açmakta ve membran tübülasyonu özelliğini azaltmaktadır. Böhm ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada gözlenen mutasyonların (DK21, R24C, K35N) membranın polar yüzünde ve birbirine yakın olduğu görülmekte olup, bu durumundan kaynaklı olarak da membran zarının hareketini etkilediği düşünülmektedir. Yine N-BAR bölgesinde görülen D151N, R154Q mutasyonları sonucunda yüklü aminoasitlerin yüksüzler ile yer değiştirmesine sebep olduğu görüldü. PI motifinde görülen mutasyonlar sonucunda membran tübülasyonunun oldukça azaldığı gözlenirken, bu durumun kas gelişimini olumsuz etkileyeceği tahmin edilmektedir. SH3 domaininde görülen mutasyonların ise proteinler arası etkileşimi özellikle de dinamin- amfizinin arasındaki bağlantıyı olumsuz etkileyeceği düşünülmektedir.

## **2.6.2. Kalsiyum Homeostazi**

### **2.6.2.1 Ryanodin Reseptör Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu**

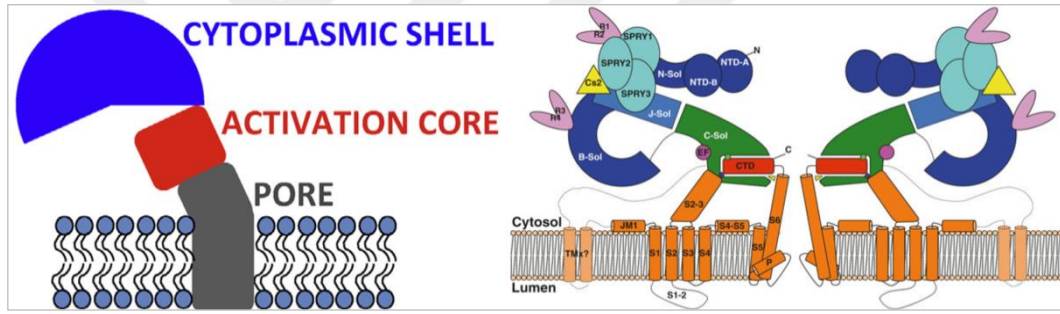
Kas kasılma sürecinde  $Ca^{+2}$  iyonunun sarkoplazmik retikulumdan (SR) sitozole serbest bırakılması kas kasılma ve gevşemesinde en kritik noktalardan biridir. Dinlenmekte olan bir kas hücresinde  $Ca^{+2}$  sarkoplazmik retikulumda depolanır. Sinirsel uyarı ile zarda oluşan aksiyon potansiyeli T- tübüller boyunca kasın iç kısımlarına kadar ilerleyerek voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından birisi olan dihidropiridin (DHPR) reseptörlerini etkiler ve bu reseptörler de RYR proteinini

uyarır ve kanalın açılmasını sağlar. Kanalın açılması ile  $Ca^{+2}$  iyonları kanaldan geçerek sitoplazma içerisine yayılır ve kas kasılması süreci başlar (Clarke ve Hendrickson, 2016). Ryanodin reseptörler SR zarlarında bulunan hücre içi  $Ca^{+2}$  kanal protein ailesinin üyesidir ve sarkoplazmik retikulum ve T-tübülünden oluşan triad yapısı içerisinde yer alırlar. Bu görevi yapan inositol 1,4,5-trifosfat reseptörler (IP3R'ler) gibi farklı proteinler de vardır ve bunlar Ryanodin reseptörler ile yüksek oranda homoloji göstermektedir. Ryanodin reseptörler bilinen en büyük kalsiyum kanallarıdır (Lawal ve ark., 2018). Canlı yaşamı için önemli olan bu proteinler oldukça korunumlu olup, *Caenorhabditis elegans*'dan insanlara kadar birçok canlıda ifade edilmektedir (Zalk ve ark., 2017). *RYR1*, *RYR2*, *RYR3* olmak üzere aralarında %70 homoloji gösteren 3 izoformu bulunmaktadır. *RYR2* kalp, *RYR3* beyinde ifade edilirken, *RYR1* iskelet kaslarında ifade edilmesinin yanında düşük seviyede purkinje hücreleri, B-lenfositler ve dendritik hücrelerde de yer almaktadır (Beaufils ve ark., 2022; Rossi ve ark., 2002)

*RYR1* proteini 3 kısımdan oluşan mantar benzeri bir görünüme sahip, 4 adet birbirinine eşit alt ünitelerden oluşan homotetramerik bir proteindir (Şekil 2.18) (Chen ve Kudryashev, 2020; Williams ve ark., 2018). Temelde N-terminal 'shell' bölgesi, merkezi (core) bölge ve transmembran bölge (pore) olmak üzere 3 alandan oluşmaktadır (Şekil 2.18a). Shell bölgesi sitoplazma içerisinde kalan kısımdır ve temelde 3  $\alpha$ -solenoid tekrarından meydana gelmektedir. N terminal A (NTD-A) (amino asit 1–208) ve NTD-B (209–392), N-terminal solenoid (Nsol) (393–627), SPRY1, 2 ve 3 alanları (amino asit 628–1656), RYR alanları (RY1 ve 2, amino asit 850–1054; RY3 ve 4, amino asit 2735–2938), Jsol (amino asit 1657–2144) ve Bsol (amino asit 2145–3613) alanlarından oluşmaktadır (Şekil 2.18b) (Zalk ve ark., 2017). Ryanodin reseptörünün diğer proteinler ile etkileşiminde Bsol ve NTD-C bölgeleri görev almaktadır ve Jsol aracılığı ile diğer bölgelere bağlanmaktadır. SPRY1, SPRY3, EF1-2, RY1-2, RY3-4 ve N-terminal bölgede yer alan NTD-A ve NTD-B bölgeleri de yine shell domaini oluşturan diğer kısımlardır. SPRY2 ile BSOL, NTD-A ile NTDB ve NTD-A ile Bsol bölgeleri arasındaki etkileşimler kanalın açılıp kapanmasını ve kalsiyum geçişini kontrol etmektedir. Pore bölgesinin büyük kısmı transmembran bölge içerisinde yer almakta olup, altı transmembran (S1-

S6) ve bir yalancı voltaj sensör bölgesi yer almaktadır (Santulli ve ark., 2018; Des Georges ve ark., 2016).

Proteininin önemli bir bölgesi de aktivasyon alanı yani core bölgesidir bu bölgede sitoplazmik alan içerisinde yer almakta olup, Csol kısmından oluşmaktadır ve shell bölgesini pore bölgesine bağlamaktadır. Transmembran ve shell bölgeleri arasındaki etkileşim ve allosterik kontrolden sorumlu olmasının yanında DHPR reseptörleri ile etkileşim kurarak kalsiyum regülasyonundan sorumlu olan EF-hand bölgesi de yine bu kısım içerisinde yer almaktadır. Bu bölgenin en önemli özelliklerinden birisi de bölgenin C-terminal bölgeyi bu alan içerisinde sabitleyen baş ve işaret parmak alanı (thumb and forefingers -Taf) içermesidir (Fusto ve ark., 2022) (Şekil 2.18b).



**Şekil 2.18.** Ryanodin reseptörün üç bölgeden oluşan yapısı. Sitoplazma içerisinde yer alan sitoplazmik bölge, aktivasyon merkezi ve transmembran bölge içerisinde yer alan pore bölgesi (a). Ryanodin reseptör 1 proteinine ait bölgeler ve hücre içerisinde bulundukları konumlar (b) (Santulli ve ark., 2018; Williams ve ark., 2018)

#### 2.6.2.1.1. *RYR1* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

*RYR1* geni 19. kromozomda 19q13.1 lokusunda yer alır ve 159 kb uzunluğunda 106 ekzondan oluşur (Clarke ve Hendrickson, 2016). Bu ekzonlar içerisinde en uzun ekzon 91 olup, 813 bç uzunluğundayken; en kısası ekzon 70 olup, 15 bç uzunluğundadır. Gen üzerinde en uzun intron 12680 bç uzunluğu ile intron 89, en kısa intron ise 79 bç uzunluğu ile intron 40'dır. *RYR1* geninde mutasyon görülme sıklığı yaklaşık olarak 1/50000 olduğu bildirilmiştir (Treves ve ark., 2008). Ryanodin molekülü birçok sinyal yolunda görev almasından dolayı bu gen bölgesinde meydana gelen mutasyonların SR'dan kalsiyum salınım



mekanizmasını bozarak malign hipertermi, kor myopati, konjenital lif tipi orantısızlığı ve sentronükleer myopati gibi şiddetli iskelet sistemi hastalıklarına neden olduğu bildirilmiştir (North ve ark., 2014). Gende meydana gelen mutasyonlar, oluşum yerlerine ve mutasyon çeşitlerine göre farklı tip ve şiddette konjenital myopatilerin oluşmasına neden olmaktadır. Hastalıklarla ilişkili olarak *RYR1* geninde 4 farklı mutasyon sınıfı tanımlanmıştır (Pelin ve Wallgren Pettersson, 2019; Todd ve ark., 2018; Treves ve ark., 2008). Birinci sınıf *RYR1* mutasyonları kanalın uyarılara karşı hassas hale gelmesine ve sitoplazmaya aşırı kalsiyum salınımına neden olmaktadır. Bu durum farmakogenetik temelli ölümcül kas hastalıklardan biri olan malign hipertermi ve sentronükleer myopatinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Kollmann Camaiora ve ark., 2017). İkinci sınıf mutasyonların sonucu olarak kanalda sızıntılar meydana gelmektedir bu da SR'da kalsiyum miktarının azalmasına yol açmaktadır. Üçüncü sınıf mutasyon sonucunda ise uyarının doğru şekilde kanala ulaşmasını engellenmektedir. İkinci ve üçüncü sınıf mutasyonlar sonucunda santral kor myopati ortaya çıkmaktadır. Dördüncü ve son mutasyon sınıfında ise mutasyonlar sonucunda proteinin ifadesi azalmaktadır (Treves ve ark., 2008). Bu durumun multiminikör myopatiye yol açtığı düşünülmektedir. Otozomal dominant kalıtım sonucu genelde daha şiddetli bir fenotip ortaya çıkmakta ve malign hipertermi vakalarının çoğunda bu kalıtım şeklinin olduğu görülmektedir (Santulli ve ark., 2018).

Literatürde *RYR1* geninde 200'den fazla mutasyon varlığı belirtilirken gen üzerinde 3 adet hotspot bölge varlığı belirtilmiştir (Pelin ve Wallgren Pettersson, 2019). Birinci bölge proteinin N-terminal bölgede yer alan 35 ve 614. aminoasitler arasında (ekzon 2 ve 17), ikinci bölge proteinin ortasına yakın 2163-2458. aminoasitler arası (ekzon 39 ve 46) ve üçüncü bölge C-terminal uca yakın 4550-4940. aminoasitler arasında (ekzon 93-103) yer almaktadır. Bunlarda N-terminal ve merkezi bölgede yer alan mutasyonlar genelde malign hipertermi fenotipi ile sonuçlanırken, C-terminal bölgede meydana gelen mutasyonların santral kor hastalığına sebep olduğu belirtilmektedir (Leao ve ark., 2020).

#### 2.6.2.2. Selenoprotein N Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu

Selenyum canlı yaşamı için gerekli bir elementtir (Moghadaszadeh ve ark., 2001). Canlılarda ise en çok selenosistein aminoasidinin yapısında yer alır. Bakteri, arkelerde ve ökaryotlarda selenoproteinlerin içerisinde aminoasit formunda bulunur. Selenoproteinler evrimsel süreç boyunca organizmalarda oldukça korunmuş ve ökaryotlarda hücre içerisinde hemen hemen her yerde ifade edilen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında görev yapan proteinlerdir. Bu proteinlerin insanlarda farklı dokulara özgü izoformları bulunmakta ve farklı kromozomlar üzerinden memelilerde 25 selenoprotein ifade edilmektedir (Shchedrina ve ark., 2010). Hücre içerisinde hepsi farklı bölgelerde ve yapılarla bulunan selenoproteinler hücresel süreçlerde aktif rol almaktadırlar. Farklı izoformlar arasındaki temel özelliklerinden bir tanesi memelilerde bulunan tüm selenoproteinlerin (selenoprotein P hariç) selenosistein elementinin bulunduğu alan proteinin katalitik bölgesini oluşturmaktadır (Lescure ve ark., 2009; Zito ve Ferreira 2021).

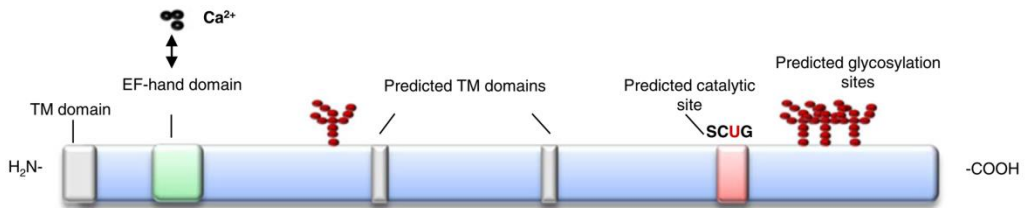
Farklı 25 selenoproteinden 7 tanesi (tip 2 DI (D2), SelK, SelS, Sep15, SelM, SelN ve SelT) ER üzerinde yerleşik bir biçimde bulunmaktadır. Bunlar arasında yer alan Selenoprotein N diğerlerinden farklı olarak hem ER lümeni, hem de sitozolik alan içerisine yayılmış bir konuma sahiptir (Shchedrina ve ark., 2010). Selenoprotein ailesinin bir üyesi olan selenoprotein N, *SEPN1* geni tarafından kodlanan yaklaşık 590 aminoasitten oluşan, 68 kDa büyüklüğünde bir tip II glikoproteindir (Castets ve ark., 2012). Temelde transmembran (TM), EF-hand (EF) ve SCUG motifini içeren thioredoxin bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 2.19). Sitolozik alanda kısa bir aminoasit kuyruğu yer alırken, ER lümeninde ise proteinin büyük kısmını oluşturan EF-hand (EF) ve thioredoxin bölgeleri yer almaktadır. EF-hand bölgesi kalsiyum varlığında çeşitli konformasyonel değişimler geçirerek kalsiyum regülasyonunu düzenlemekten sorumluyken, thioredoxin bölgesinde Sec aminoasidi bulunmaktadır. Bu aminoasit ökaryotlarda UGA kodunu tarafından kodlanmakta olup cis ve trans faktörler aracılığı ile polipeptit zincirine eklenip, yüksek olasılıkla proteinin katalitik bölgesini oluşturmaktadır (Fan ve ark., 2022). Ekzon 10'da yer alan ve enzimatik aktivitelerden sorumlu olduğu düşünülen bu bölge ve çevresindeki dizilerin oldukça korunumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 4 adet glikozilasyon bölgesi ve diğer

proteinler ile etkileşim kurmasını sağlayan sekiz adet PXXP motifinde prolin aminoasidi bulunmaktadır (Şekil 2.20). Genelde elektron transferinden sorumlu olan FAD ve NADPH bağlanma bölgeleri selenoprotein N’de yer almamaktadır bu durum aktivitelere katılan farklı bölgelerin olabileceğine fakat henüz bu bölgelerin keşfedilmemiş olabileceğine işaret etmektedir.



**Şekil 2.19.** Selenoprotein N proteinine ait bölgelerin *SEPNI* geninin ekzonları üzerine dağılımı

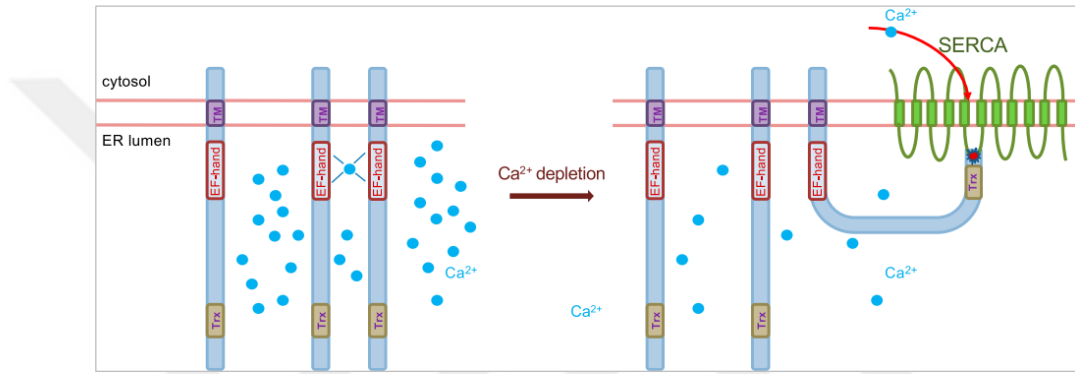
Saf olarak selenoprotein N elde edilmesi zor olduğundan işlevi hala tam olarak belirlenememiş olsa da, yapılan çalışmalar canlılarda fetal dönemden yetişkinliğe kadar birçok metabolik aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Castets ve ark., 2012; Zito ve Ferreira, 2021). Petit ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada fetal dönemde canlılarda *SEPNI* geninin ifadesinde aşırı artış görülürken ve miyotüp oluşumundan sonra miktarındaki azalma olduğu görülmektedir. Bu durum *SEPNI*’in kas oluşumunda temel rol alan proteinlerden birisi olabileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 2.20.** Selenoprotein N proteinine ait domainler (Castets ve ark., 2012)

Kas kasılma ve gevşemesi sırasında büyük oranda ATP ihtiyacı ortaya çıkar. Bu ihtiyacın karşılanabilmesi mitokondri ve ER arasındaki bağlantıya bağlıdır. Mitokondrinin yüzey alanının yaklaşık olarak 1/4’ü kalsiyum alınımindan sorumlu

olan zar sistemleri ile etkileşim halindedir (Filipe ve ark., 2021). Selenoproteinler hücreleri oksidatif strese veya ER stresine karşı korumanın yanında ER’da bulunan kalsiyum pompalarından birisi olan SERCA’nın oksidasyonunu önleyerek hücrede kalsiyum dengesini sağlamada işlev görür (Chernorudskiy ve ark., 2020; Lescure ve ark., 2011). ER kalsiyum depolarını yeniden doldurulmasına da yardımcı olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.21). Tüm bu görevlerinin yanı sıra hücre proliferasyon-rejenerasyonunda reaktif oksijen türlerini nötralize ederek ve hasarlı molekülleri onanarak oksidatif strese karşı hücreyi korumaktadır (Marino ve ark., 2015).



**Şekil 2.21.** *SEPNI* çalışma prensibi. Selenoproteine ait olan EF-hand bölgesi ER içerisindeki kalsiyum seviyesini algılar. Kalsiyum kontrasyonu düşünce konformasyonel değişim gerçekleşir ve SERCA’ya doğru bir kayma gerçekleşir. SERCA’nın tekrar aktive olmasıyla birlikte kalsiyum ER içerisine pompalanır ve ER deposu tekrar dolar (Chernorudskiy ve ark., 2020).

#### 2.6.2.2.1. *SEPNI* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

İnsanda 1. kromozomda 1p36.11 lokusunda yer alan *SEPNI* geni 18 kb uzunluğunda olup, 13 ekzondan oluşmaktadır. Bu ekzonlar içerisinde en uzun 210 baz uzunluğunda olup ekzon 5 iken, en kısası 82 baz uzunluğunda olan ekzon 8’dir. En kısa intron 83 baz uzunluğunda olup intron 11’dir. En uzun ise intron 4 olup, 3304 bp uzunluğundadır (Fan ve ark., 2022).

*SEPNI* genindeki mutasyonlar multiminikör myopati, konjenital lif tipi uyumsuzluğu, sert omurga kas distrofisi hastalıklarına sebep olmaktadır (Allamand ve ark., 2006; Dastgir ve ark., 2017; Ferreira ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda gen üzerinde görülen aynı mutasyonların farklı şiddetteki hastalıklara yol açıyor

olması oldukça dikkat çekicidir. Bu durumun hastalıkların oluşmasından henüz keşfedilmemiş farklı gen ve mekanizmaların olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Çalışmalardan elde edilen mutasyonların çoğu korunumlu bölgelerde gerçekleşen missense mutasyonlar olup, delesyon ve insersiyonlara da rastlanmaktadır. Nonsense mutasyonların ise daha çok Sec aminoasidinin bulunduğu bölgede gözlemlendiği ve trunkat proteinlerin oluşmasına neden olduğu belirtilmektedir (Rederstorff ve ark., 2011). Genel olarak hastalardan elde edilen kas biyopsilerinde tip 1 ve 2 lifler arasındaki oranın bozulduğu, tip 1 liflerin daha baskın olduğu görülürken; kaslarda genel olarak miyofibriller bir düzensizlik, mitokondriden yoksun trunkat proteinlerin biriktiği bölgeler görülmektedir. (Scoto ve ark., 2011).

Fan ve ark. (2022), tarafından 8 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada mutasyonların ekzon 3 hariç gen üzerine yayılım gösterdiği; ekzon 1, 10 ve 11’de mutasyon yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir. Ekzon 1’de GC dizisinin yoğun bir şekilde tekrarladığı ve bu ekzonun gen üzerinde en çok mutasyonun görüldüğü hotspot ekzon olduğu çalışmada belirtilmektedir. Mutasyon yoğunluğunun da genel olarak genin 5’ başlangıç bölgesindeki transmembran ve thioredoxin (Trx) bölgelerinde olduğu görülürken, missense mutasyonların genelde Trx domainini etkilediği belirtilmektedir. Ayrıca bu bölge içerisinde yer alan c.1384T>A mutasyonunun selenosistein kaybına sebep olduğu da belirtilmiştir.

### **2.6.3. Miyofibriler Kuvvet Defektleri**

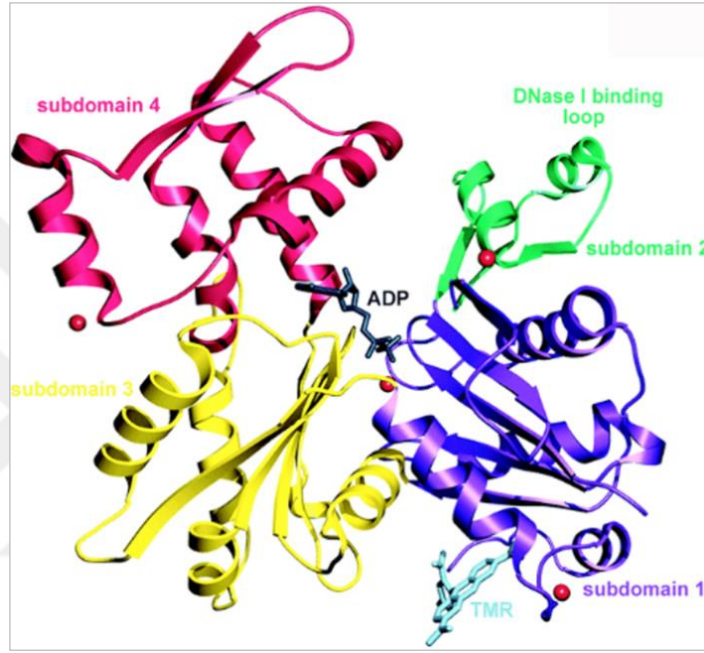
#### **2.6.3.1. Aktin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu**

Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan aktin proteinleri globüler proteinler olup, ATPaz ailesinin bir üyesidir. Hücre içi proteinlerin %5’ini oluşturan globüler aktin proteinleri kas hücrelerinin ise %20-25’ini oluşturmaktadır (Ünlü, 2014). Hücre iskeletinin yapısında, hücre bölünmesinde, hücreler arası iletişimde, hücre hareketinde, sinyal iletiminde ve gen ifadelerinin düzenlenmesine kadar birçok biyokimyasal yolakta görev alan aktin proteini evrimsel süreçte canlılar arasında oldukça korunmuştur (Marston, 2018; Parker ve ark., 2020; Povarova, 2012; Kyheröinen ve Vartiainen 2020). Bitki ve hayvanlarda bulunan aktinlerin

insandakinden yalnızca 55-65 aminoasitler arasında farklılık olduğu saptanmıştır (Glyakina, 2020). İnsanlarda *ACTC1* (kalp kası  $\alpha$  aktin 1), *ACTA1* (iskelet kası  $\alpha$  aktin), *ACTA2* (düz kas  $\alpha$  aktin), *ACTG1* (aktin  $\gamma$ 1), *ACTG2* (aktin  $\gamma$ 2), *ACTB* (aktin  $\beta$ ) olmak üzere altı farklı aktin geni kodlanmakta ve bunlar iskelet kasları, kalp kasları ve düz kaslarda ifade edilmektedir (Parker ve ark., 2020). Bu altı farklı gen tarafından kodlanan aktin izoformları arasında amino asit dizilimi bakımından büyük oranda homoloji görülmektedir. Yalnızca N-terminal bölgede birkaç amino asitlik fark ile birbirlerinden ayrılan bu izoformların post-translasyonel modifikasyonlar sonucu birçok farklı aktin yapısı ortaya koyduğu belirtilmektedir (Herman ve ark., 1993). Aktinin bu çok fonksiyonel yapısı ve birçok proteinle olan allosterik etkileşimi onun yapısını ve işlevlerini nasıl gerçekleştirdiğini anlamayı zorlaştırmaktadır. Aktin proteinleri hücre içerisinde monomer ve polimerler halinde iki farklı formda bulunurlar. G-aktin olarak adlandırılan monomer halindeki globular protein sahip olduğu allosterik bölgelerle etkileşime geçen aktive edici moleküllerle polimerizasyona uğrayarak filamentler halindeki F-aktin yapılarını meydana getirirler (Povarova ve ark., 2012).

Aktin proteininin iki büyük birimi ve bu birimlere bağlı iki alt birimi bulunmaktadır (Şekil 2.22). Küçük alt birim domain 1 ve 3'ü içerirken, büyük alt birim domain 2 ve 4'ü içermektedir. Domain 1 ve 3 arasındaki etkileşim az iken, birbirlerine aralarında yer alan bir menteşe bölgesi ile bağlanmaktadır. Protein bu büyük ve küçük birimlerin katlanması sonucunda 3 boyutlu yapısını kazanır. Aktin molekülünde iki büyük alt birim arasında bir boşluk bulunur, bu alana nükleotit bağlanma yarığı adı verilir ve çoğunlukla ATP molekülü bağlıdır. Bu yolla aktin molekülünün aktivasyonu sağlanır (Splettstoesser ve ark., 2011). ATP, yerleştiği nükleotit bağlanma bölgesinde yer alan ATPaz tarafından ADP'ye dönüştürülür (Schüler ve ark., 2006). Aktin molekülünde uç bölgeler aktinler arasında bağlantı kurmayı sağlayıp, polimerizasyonu sağlarken; iç bölgelerde yer alan alanlar, allosterik kontrol için regülatör moleküllerin bağlanma alanlarını içerir. G-aktinlerin kas hücrelerinde görev alabilmesi için polimerizasyona uğrayarak F-aktin haline gelmeleri gerekmektedir. Polimerizasyon çift taraflı olarak gerçekleşebilmektedir. Bir uca bir monomer eklenirken, diğer uçtan bir monomer de ayrılır. Bu işlemin

gerçekleşmesinde birçok aktin bağlayıcı protein rol oynamakla birlikte ortamda ATP ve K, Mg iyonlarının olması gereklidir (Bearer, 1993). G-aktinler içerisinde nükleotit bağlanma bölgesinde yer alan ATP'nin ADP'ye dönüşmesi ile birlikte polimerizasyon başlamış olur. Aktin monomerlerinin + ve – olmak üzere 2 farklı ucu vardır. Bu uçların polariteleri farklıdır ve polimerizasyonu yönlendiren unsurlardan bir tanesi de budur.



**Şekil 2.22.** Aktin proteini 3 boyutlu yapısında yer alan domainler (Otterbein ve ark., 2001)

Her aktin molekülü üzerinde diğeriyle bağlanmasını sağlayacak özel bağlantı bölgeleri bulunur. Polimerizasyon sırasında + ucta gerçekleşen polimerizasyon – uca göre çok daha hızlı bir biçimde ilerler. Polimerizasyon sırasında tropomiyozin ve kofilin birbirinin tersi görevler yaparlar. Tropomiyozinler aktinleri stabilize etmek ve bir arada tutmak ile görevliken, kofilinler aktinlerin birbirlerinden ayrılmasını tetikler. Yani birisi polimerizasyonu devam ettirmeye çalışırken, diğeri durdurmaya çalışır. Thymosin  $\beta$ 4 proteini de kofilin ile aynı göreve sahiptir ve polimerizasyonu durduran proteinlerden bir tanesidir (Povarova ve ark., 2012). Polimerizasyonun başlaması için G-aktinler dimer ve trimerler halinde birleşerek bir çekirdek bölge oluştururlar (Şekil 2.23). Bu süreçte birçok aktin bağlayıcı protein rol oynamaktadır.

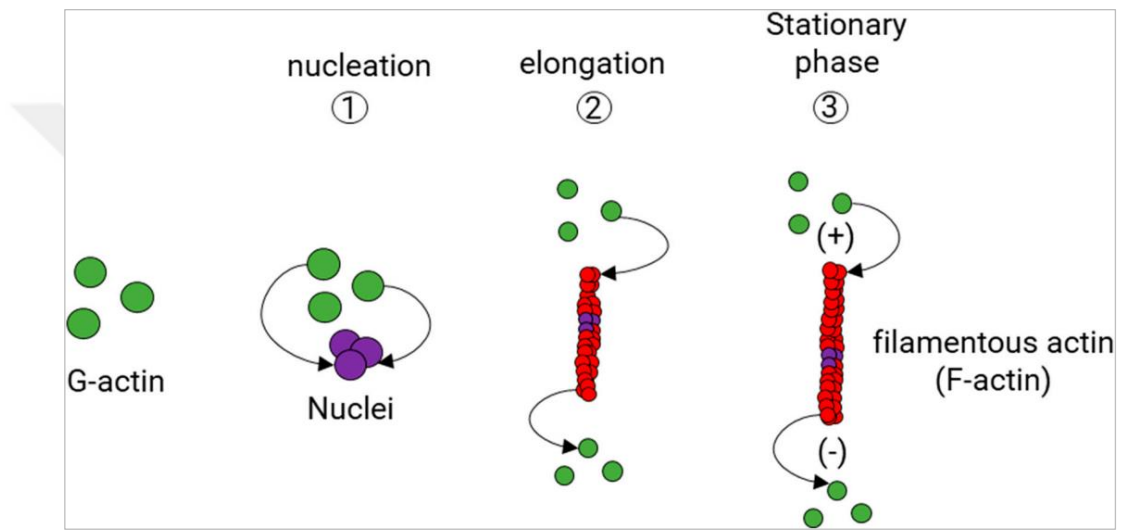
Polimerizasyonun en önemli evresi 3G-aktin monomerinin bir araya gelerek çekirdek oluşturmastır. Bu aşamadaki en önemli rol Arp2/3 kompleksidir (Şekil 2.24). Bunun yanında CapZ proteini çekirdek oluşumuna katılır ve F-aktinin dikenli yani (–) ucuna bağlanarak polimerizasyon zincirinin uzamasını sağlar. Bu yolla birbirlerinin üzerinde sarılmış şekilde F-aktin filamentleri meydana gelir. G-aktinler F-aktin formunu aldıktan sonra herhangi bir uyarım olmadığı sürece depolimerizasyona uğramazlar (Winder ve Ayscough, 2005). Canlılar hayatında ciddi öneme sahip bu proteinin, tüm görevlerini eksiksiz yerine getirebilmesi için polimerizasyon ve depolimerizasyonun süreçlerinin eksiksiz bir şekilde işlemesi gerekmektedir. Aktin filamentlerinin büyümesinin kontrolünden sorumlu proteinler gelsolin ve tensin proteinleridir (Povarova ve ark., 2012). Bu proteinler aktinlerin uç kısmına bağlanarak uzamayı kontrol ederler. Aktinlere bağlanan proteinlerin en önemlilerinden birisi de tropomiyozinlerdir, bu proteinler aktin filamentlerin etrafını sarmakta ve bu yolla olası bir depolimerizasyonu önlemektedir. Aktinlere bağlanan proteinlerin çoğu aynı zamanda hücreler arası sinyal iletiminde de görevlidir. Bunlar özellikle F-aktinin oluşması gerektiğinde polimerizasyonun gerçekleşmesinde görev alırlar. Bu proteinlerin büyük bir kısmı kofilin ailesine aittir ve en iyi örneklerinden biri ise büyük bir protein olan nebulindir (Ochala, 2008). Aynı zamanda aktine bağlanan proteinlerden birisi olan timozin ve prolin, ADP-aktinin ATP-aktine dönüşümünü kolaylaştırır. Bu yolla polimerizasyonun hızlı ve sorunsuz şekilde devam edebilmesi için diğer aktin monomerlerinin dikenli uca gelmesine yardımcı olurlar (Şekil 2.24).

Aktin proteinin önemli bölgelerinden biride DNase-1 loop bölgesidir (Şekil 2.22). DNA-aktin kompleksinin oluşmasında rol oynadığı için bu şekilde isimlendirilen bölge 39-51 arasında aminoasit içerir ve domain 2'nin baş bölgesinde yer alır. Bu bölge proteindeki en önemli bölgelerden birisidir ve F-aktin filamentlerinde alt birimler arası iletişim kurulmasında ve aktin proteinlerinin transkripsiyon faktörü işlevi görmesinden rol oynar (Clarkson ve ark., 2004).



### 2.6.3.1.1. *ACTA1* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

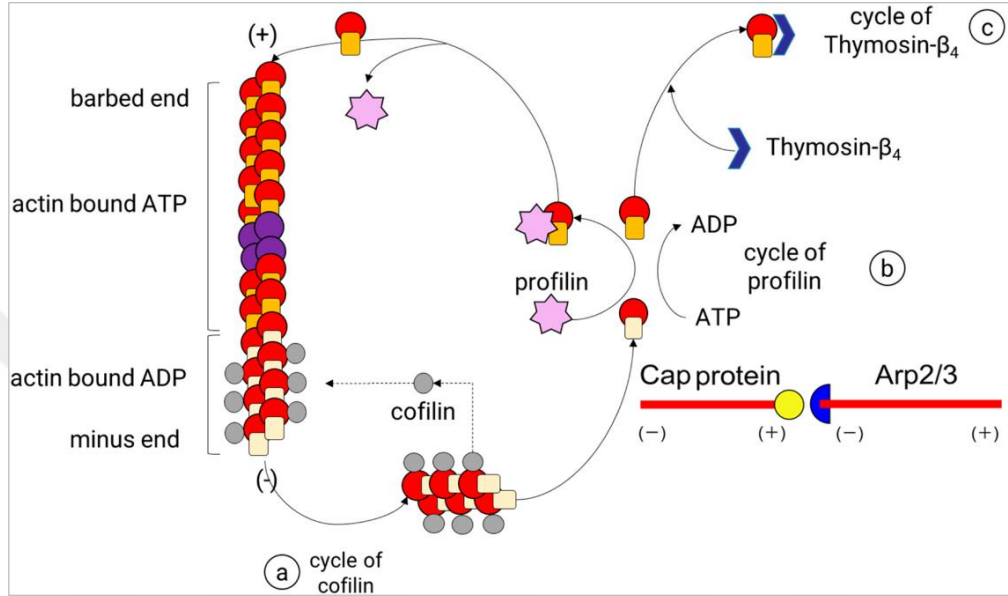
*ACTA1* geni insandaki en büyük kromozomlardan birisi olan 1. kromozomun 1q42.13 lokusunda yer alır ve 7 ekzondan oluşur. Bu ekzonlar içerisinde ekzon 3, 325 bç ile en uzun ekzonken; en kısası ekzon 144 bç ile 6. ekzondur. Gen üzerinde en uzun intron 124 bç uzunluğu ile intron 3 iken, en kısa intron ise 77 bç ile intron 6'dır. Transkripsiyon sırasında ekzon 1'in tamamı, ekzon 2 ve 7'nin ise bir kısmı kodlanmamaktadır. (Hild ve ark., 2010).



**Şekil 2.23.** Aktin polimerizasyonunun gerçekleştiği üç evre. Evre 1, 3 G-aktin monomerlerinin bir araya gelerek polimerizasyona hazırlık süreci. Evre 2, G-aktinlerin bir araya gelerek F-aktinleri oluşturmak için çekirdeklenme evresi Evre 3, pozitif uçtan eklenen ve negatif uçtan eksilen monomer hızının eşit hale geldiği statik faz süreci (Munoz Lasso ve ark., 2020).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *ACTA1* geninde 200 farklı mutasyon saptanmış olup bunların %90'ı dominant geçişli iken, %10'u resesif kalıtımla hastalıklara sebep olmaktadır (Nowak, 2013). *ACTA1* geninde meydana gelen mutasyonlar, aktin ve miyozin filamentlerin oluşumu, kas kasılma yeteneği ve kas kasılması ile birlikte kuvvet üretimi ile ilişkili mekanizmalar üzerinde etkili olmaktadır. *ACTA1* geninde görülen mutasyonlardan kaynaklı vakaların %20'sinin nemalin myopatiye yol açtığı bilinmektedir (Sparrow ve ark., 2003). Bunun yanında konjenital lif tipi uyumsuzluğu ve core myopatiye de sebep olduğu bildirilmiştir (Nowak ve ark., 2007). Aktin geninde görülen mutasyonlar fetal dönemde ölümcül

sonuçlar ortaya çıkaracağı için popülasyonda insidansları düşüktür. Öte yandan aktin izoformları arasında yüksek oranda homoloji görülmesinden dolayı nadir de olsa farklı aktin genlerinin birbirinin yerine ifade edilmesi gibi durumlarının da olası olduğu belirtilmektedir (Marston, 2018).



**Şekil 2.24.** Aktin bağlanma proteinlerinin polimerizasyon-depolimerizasyon sürecindeki görevleri (Munoz Lasso ve ark., 2020; Nonaka ve ark., 2011'den modifiye edildi.)

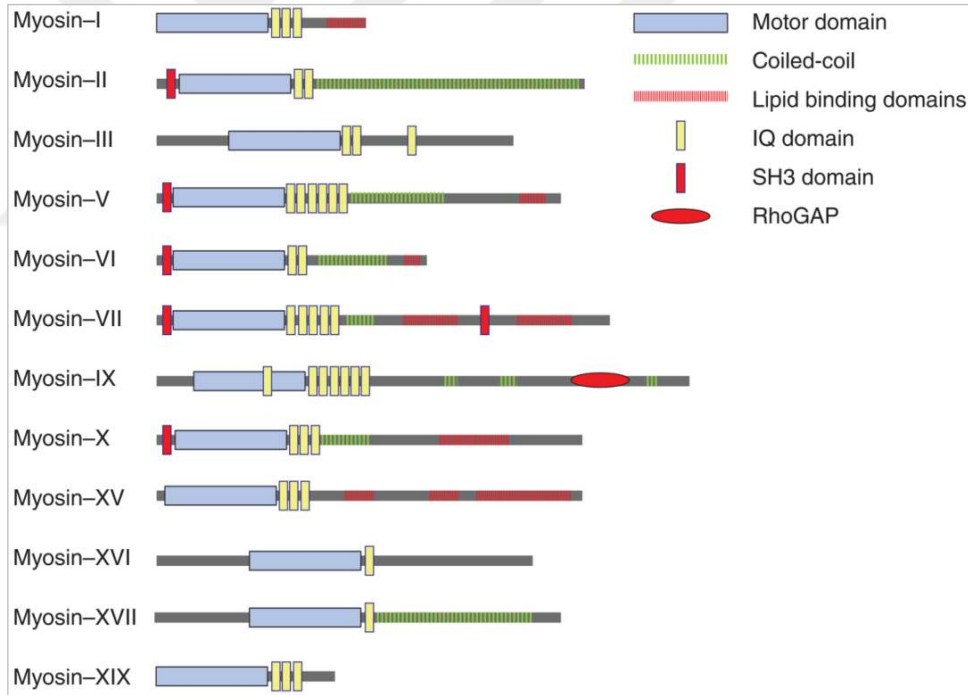
*ACTA1* geninde görülen mutasyonların genelde nükleotit bağlanmasını ve aynı zamanda da menteşe yapısının açılıp kapanmasını etkileyeceği düşünülmektedir. Bu gende çoğunlukla proteinde amino asit değişimlerine neden olan missense mutasyonlara rastlanmaktadır (Parker ve ark., 2020; Sparrow ve ark., 2003). Mutasyonlar genin ifadesinde azalmaya yol açabildiği gibi aktin monomerinde yük değişimine neden olarak aktinin uzamasına/polimerizasyonuna etkileyebilmektedir (Sparrow ve ark., 2003). Gen üzerindeki ekzonlarda stop kodon oluşumu ise ekzon-intron sınırının bozulmasına trunkat proteinlerin oluşmasına neden olmaktadır (Marston, 2018). *ACTA1* geninde gerçekleşen mutasyonların çoğunlukla polimerizasyonu etkilediği tahmin edilse de proteininin yapısına ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır.

### 2.6.3.2. Miyozin Proteinin Yapısı ve Fonksiyonu

Miyozinler hücre iskeleti içerisinde yer alan ve ATP ya da GTP gibi nükleotid trifosfatların hidrolize uğraması yolu ile elde ettikleri kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çeviren aktinler ile birlikte işleyen bir çeşit moleküler motorlardır (Batters ve Veigel, 2016; Li ve ark., 2016). Kas kasılması, hücre hareketi, sitokinez ve hücre iskeleti gibi süreçlerde aktif olarak görev yapan miyozinler hekzamerik yapıda olup, tüm ökaryotik canlılarda ifade edilmektedirler. Miyozin protein ailesi 39 farklı miyozin proteinini sentezleyen 12 sınıf altında kategorilendirilmiştir (Şekil 2.25) (Foth ve ark., 2006). Temelde tüm miyozinler konvensiyonel miyozin II ve konvansiyonel olmayan miyozinler olarak 2'ye ayrılmıştır. Konvansiyonel miyozin olarak bilinen miyozin II proteinleri ilk kez 1864'de Heidelberg'de Willy Kühne (1864) tarafından kas hücrelerinde keşfedilmiştir. Kas ve kas dışı hücrelerde hareketi sağlamak için kasılma aparatı olarak bulunmaktadır (Batters ve Veigel, 2016; Kendrick Jones ve Buss, 2016). Titin proteini ve daha birçok protein ile sarkomerlerin merkezinde yer alıp, kalın filamentleri meydana getirirler ve miyofibril yapısının yaklaşık %30'unu oluştururlar (Craig ve Woodhead, 2006; Harrington ve Rodgers, 1984). Miyozin II grubunun dışındakiler ise endositoz-ekzositoz gibi taşıma ve hücreler arası sinyal görevlerinden sorumludurlar. Hepsinde baş boyun ve kuyruk kısımları bulunurken genellikle baş ve boyun bölgelerinin benzer ve korunmuş olduğu görülmektedir. Kuyruk bölgelerinin görev aldıkları yapı ve etkileşim içerisinde oldukları proteinlere özel olarak farklılaştığı belirtilmektedir (Thompson ve Langford, 2002). Her bir miyozin molekülü yapısında N-terminal bölgede yer alan 80 kDa'luk bir motor bölge barındırmaktadır. Bu bölge ATP'yi hidrolize etme (ATPaz özelliği) ve aktin ile bağlanma yeteneğine sahiptir (Boda ve ark., 2009). Aktin ve miyozinlerin etkileşime geçmesi ile çapraz köprü döngüsü oluşmaktadır. Bu döngü sırasında miyozinin aktine bağlanma süresi farklı miyozin tiplerinde farklılık gösterir. Kas kasılması oldukça hızlı gerçekleşen biyokimyasal bir süreçtir bu durum kaslarda ifade edilen tip II miyozinlerin bağlanma-ayrılma kapasitelerinin oldukça hızlı olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer miyozin tiplerinde ise bu süreç çok daha yavaştır. Motor bölgenin bitiminde boyun bölgesinde IQ tekrarlı motif (izolösin-glutamin motifleri) bulunmaktadır. Bu motifin dizisi

izoformlara göre değişmemektedir fakat tekrar sayısı değişiklik gösterir ve ATPaz döngüsü sonrasında oluşan konformasyonel değişiklikleri takiben motor alanı desteklemek için bir kol görevi görmektedir (Şekil 2.26) (Köhler ve ark., 2005).

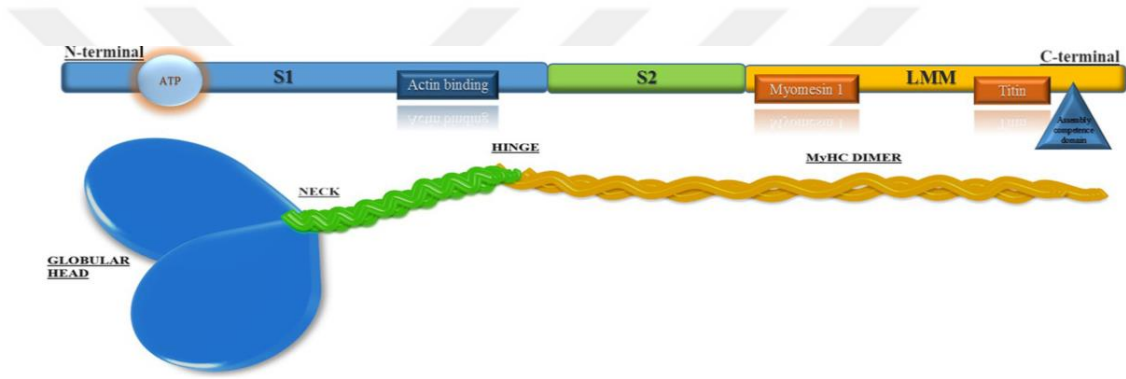
Her bir miyozin molekülü 4 hafif (2'si düzenleyici), 2 ağır olmak üzere 6 polipeptit zincirinden oluşmaktadır. C-terminal bölgeden başlayan ağır zincirin yaklaşık olarak yarısı coiled-coil kuyruk yapısını oluşturmak üzere katlanmaktadır (Parker ve Peckham, 2020). Bu bölge miyozin-miyozin ve diğer proteinlerle etkileşime geçip uzayarak, sarkomerlerin merkezinde yer alan kalın filamentleri oluştururlar. Ağır zincirin geri kalan kısmı hafif ve düzenleyici zincir ile birleşerek alt parça 1 (S1) bölgesini oluşturmak üzere katlanmaktadır (Şekil 2.26). Her bir S1 bölgesi yaklaşık 850 aminoasitten oluşur (Van Driest ve ark., 2004).



**Şekil 2.25.** Miyozin protein ailesine ait proteinler, bu proteinlere ait domainler (Batters ve Veigel, 2016)

Molekülün kuyruk bölgesi coiled-coil olarak isimlendirilir ve her biri yaklaşık 1100 aminoasitten oluşmaktadır. Yapısı heptat tekrarı ile yapılanmıştır. Her biri 7 aminoasit tekrar (a, b, c, d, e, f ve g) dizilerinden oluşmaktadır. a ve d aminoasitleri hidrofobik olup, sarmal bobinin stabilizasyonunda görev alırken g ve e

aminoasitleri ile de stabilizasyon daha da güçlenir. Kuyruk kısımları arası bağlantılar da b, c, e ve f aminoasitleri tarafından düzenlenir (Armeli ve Leinwand, 2009; Tajsharghi ve ark., 2003). Kaslarda kuvvet oluşumu, kuvvet iletimi, kısalma-uzama gibi mekanizmalarda rol oynamaktadır. Coiled-coil kuyruk yapısının N-terminal kısmı alt parça 2 (S2) olarak isimlendirilir ve boyun bölgesini oluşturur. Baş-kuyruk arasındaki bağlantıyı kurar (Şekil 2.26). C-terminal kısmın büyük bölümünü LMM (hafif meromyozin) bölgesi oluşturur. Miyozin moleküllerinin tümü birbirlerine kuyruk kısımlarından bağlanarak birleşmektedirler ve C terminal bölgeye yakın kısımda myomesin, titin ve miyozin bağlanma proteininin C gibi çeşitli proteinler ile bağlanma bölgeleri yer almaktadır (Şekil 2.26) (Blair ve ark., 2002).



**Şekil 2.26.** Miyozin proteini üzerinde S1, S2 ve LMM yapılanmalarının şematik gösterimi (Fiorillo ve ark., 2016)

#### 2.6.3.2.1. *MYH7* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

İnsanda 14. kromozom üzerinde 14q11.2 lokusunda yer alan *MYH7* geni 22 kb uzunluğunda olup 40 ekzondan oluşmaktadır ve yaklaşık 1935 aminoasit kodlamaktadır (Cullup ve ark., 2012). Geni oluşturan ekzonlar içerisinde en uzun ekzon 16 olup, 310 bç uzunluğundayken; en kısası ekzon 110 olup, 27 bç uzunluğundadır. Gen üzerinde en uzun intron 24 olup, 1221 bç uzunluğundayken; en kısası intron 7 olup, 83 bç uzunluğundadır. Protein sentezinde gen üzerinde yer alan ekzon 1 ve 2 ifade edilmezken, ekzon 3 ve 40'ın bir kısmı kodlanmaktadır.

*MYH7* genindeki mutasyonlar kalıtsal kalp hastalıklarından iskelet kas hastalıklarına kadar geniş bir yelpazede hastalıklara sebep olmaktadır (Colegrave ve Peckham, 2014; Liew ve ark., 1990). N-terminal bölgede yer alan baş ve boyun

kısımında yer alan mutasyonlar hipertrofik kardiyomyopatiye, kuyruk kısmında ekzon 25-39 arasında gözlenen mutasyonlar dilate kardiyomyopatiye, yine kuyruk kısmında yer alan ekzon 32-36 arasındaki bölgede gözlenen mutasyonların distal myopatiye, C-terminal kısımdaki görülen mutasyonların ise iskelet kası hastalıklarından birisi olan miyozin depolama myopatisine yol açtığı düşünülmektedir (Uro Coste ve ark., 2009; Dye ve ark., 2006; Ravenscroft ve ark., 2015). Gen üzerinde gözlenen mutasyonların genelde kuvvet aktarım mekanizmasını zayıflattığı ve ATP kullanımındaki verimi düşürmektedir. Şimdiye kadar 200'den fazla mutasyonun S1 bölümünün işlevsel bölgeleri içerisinde yer alan ATP ve aktin bağlanma bölgelerinde saptandığı ve bunların kardiyomyopatiye yol açan missense mutasyonlar olduğu belirtilmiştir (Cullup ve ark., 2012). Baş bölgesinde görülen mutasyonların yaklaşık %79'u kalp hastalıkları ile ilişkiliyken, kuyruk kısmında gözlenen mutasyonların yalnızca %20'sinin kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu tahmin edilmekte olup, bu bölgenin daha çok iskelet kası hastalıkları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kuyruk kısmında yer alan mutasyonların genelde miyozinlerin birleşmesinde sorun çıkararak sarmal-bobin yapısının bozulmasına yol açtığı görülmektedir. Fakat bu bölge birçok protein ile etkileşim içerisinde olduğu için mutasyonun gözlemlendiği bölge ve hastalıklar arası ilişki mekanizması hala net değildir (Van Driest ve ark., 2004).

### **2.6.3.3. Tropomiyozin Proteini Yapısı ve Fonksiyonu**

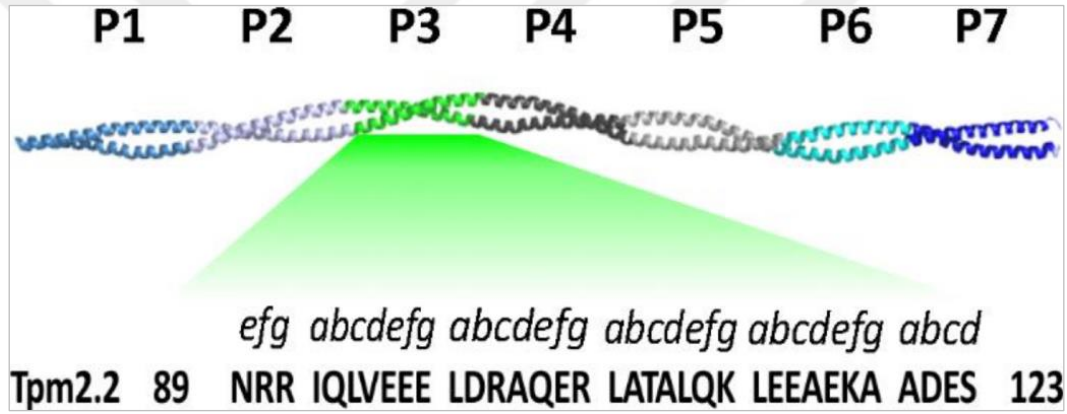
Tropomiyozinler aktin bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. Kas kasılması sırasında troponin kompleksi ile birlikte aktin ve miyozin arasındaki düzenden sorumlu alfa-heliks yapısına sahip proteinlerdir. Başlangıçta sadece düz kaslarda var olduğuna dair kanıtlar elde edilmiş olup, sonrasında yapılan çalışmalar kas dışındaki birçok hücrede var olduğunu desteklemiştir (Laing ve ark., 1995).

Tropomiyozinler bitki ve protistalar hariç tüm ökaryotik hücrelerde ifade edilmektedirler (Barua ve ark., 2011). Aktini baştan sona sararak stabilitesini sağlamasının yanı sıra çizgili kaslarda troponin proteinleri ile birlikte kalsiyuma bağımlı kasılma mekanizmasında yer alırlar. Kas kasılması sırasında aktin ve miyozin arasındaki etkileşim açık, kapalı ve kapalı durumun orta düzeyde olduğu B-

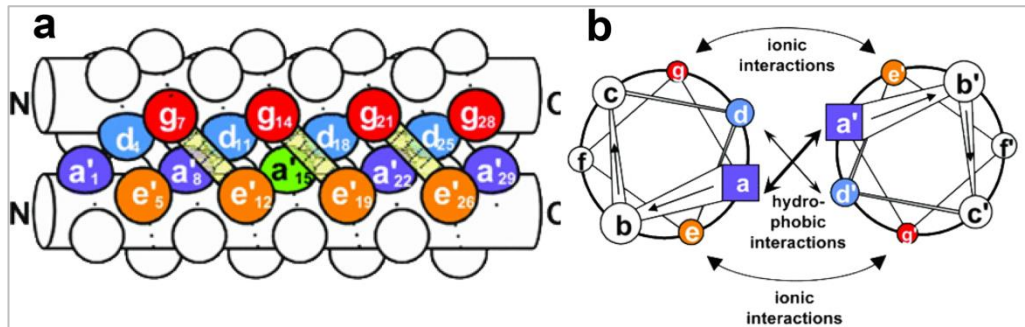
C-M olarak adlandırılan 3 fazda gerçekleşir. Tüm pozisyonlarda tropomiyozin zincirinin konumu farklıdır. Kapalı durumda sarkoplazmada kalsiyum miktarı düşüktür ve troponin kompleksinin alt biriminden birisi olan troponin I (TnI) aktine bağlanır ve tropomiyozini bloke eder. Kas liflerine gelen uyarı ile birlikte sarkoplazmaya kalsiyum salınımı artar ve hücre içerisinde kalsiyum miktarındaki yükselişin sonucu olarak da kalsiyumun troponin C (TnC)'ye bağlanması ile birlikte tropomiyozinin konformasyonel yapısı değişir (B durumundan C'ye geçiş olur). Bir sonraki aşamada ise tropomiyozin iplikçileri bulunduğu yerden kayarak aktin üzerindeki miyozin bağlanma bölgelerini açar, aktin ve miyozinler birbirine bağlanarak aktomiyozin etkileşimi gerçekleşmiş olur (M durumu). Kas kasılması birçok proteinin görev aldığı oldukça karmaşık bir süreçtir bu süreçte tropomiyozinler aktin, miyozin ve troponinler arasında bağlantılarda öne çıkan önemli proteindir (Doran ve ark., 2020; Sliwinska ve ark., 2021; Marston ve Zamora, 2020).

Memelilerde tropomiyozin proteinleri *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* ve *TPM4* olmak üzere 4 farklı gen üzerinden sırası ile Tm1 ( $\alpha$ -tropomiyozin-hızlı), Tm2 ( $\beta$ -tropomiyozin), Tm3 ( $\alpha$ -tropomiyozin yavaş) ve Tm4 ( $d$ -tropomiyozin) olarak iskelet kaslarında ifade edilmektedirler (Sliwinska ve ark., 2021). Tm2 hem hızlı hem de yavaş iskelet kaslarında ifade edilirken, Tm3 yalnızca yavaş iskelet kaslarında ifade edilir (Marttila ve Lehtokari, 2014; Geeves ve ark., 2015). Alternatif splicing ve farklı promotor bölgelerin kullanılması ile birlikte 40'dan farklı mRNA sentezlenmektedir, bunlardan 18'i kas dışı hücrelerde bulunur ve görevlerine göre hücrelerin farklı bölümlerinde ifade edilir (Vindin ve Gunning, 2013). Genin 5' ucunda yer alan ekzonlardan alternatif ekleme ve 2 farklı promotorün kullanılması sonucunda tüm tropomiyozin izoformlarından temelde 2 ana tip tropomiyozin üretilir. Bunlardan birisi 7 aktin bağlanma bölgesine sahip olan 284-285 aminoasitten oluşan yüksek moleküler ağırlığa sahip bir molekül iken, diğeri 6 bağlanma bölgesine sahip olan ve 245-248 aminoasit uzunluğundaki düşük moleküler ağırlığa sahiptir. Bu izoformlar 36 ya da 41 aminoasit uzunluğuna sahip homo ve heterodimerler şeklinde farklı polipeptit zincirleri oluşturabilmektedirler (Lin ve ark., 2008; Wang ve Coluccio 2010).

İskelet kaslarında çoğunlukla *TPM1* geninden ifade edilen alfa dimerlerinin birleşmesinden oluşan alfa-alfa homodimerleri ve *TPM1-TPM2* genlerinden ifade edilen alfa-beta dimerlerinin karışımından oluşan alfa-beta heterodimerleri ifadeedilmektedir. Bu şekildeki oluşumlar aktine bağlanma afinitelerini değiştirmektedir. Tropomiyozin proteini N-terminal uçtan C-terminal uca doğru a-b-c-d-e-f-g motifinin tekrar etmesi ile oluşan heptapeptit tekrarlarından oluşan bir yapı sergiler. Polimerizasyon sonrasında birbirleri üzerinde dönerek hidrofobik mekanizmalar ve iyonik etkileşimler ile sarmal stabil bir yapı kazanırlar (Şekil 2.27). Proteinin a ve d bölgeleri apolardır ve sırası ile Glu218-Asp137 pozisyonlarına denk gelmekte olup, yapının esnekliğinden sorumludurlar.



**Şekil 2.27.** İnsanda *TPM 2.2* genindeki aktin bağlanma periyotları (P1-P7). Yeşil renk ile gösterilen aktin bağlanma periyodu 3'deki 89 ve 123. aminoasitlerin pozisyonları ve heptapeptit tekrarlarındaki aminoasit tekrarlarının gösterimi (a-g). (Sliwinska ve ark., 2021).



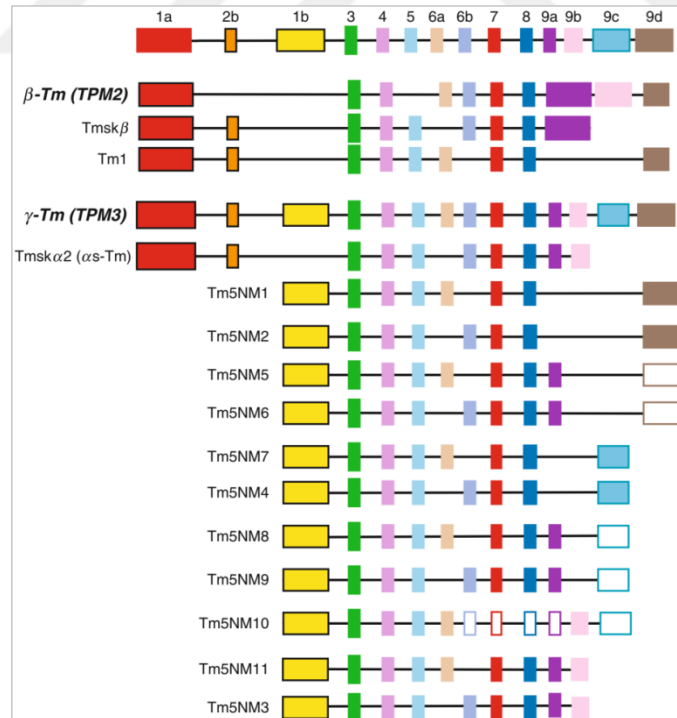
**Şekil 2.28.** Tropomiyozinin sarmal bobin yapısı (a). Sarmal bobin yapısının bir arada kalabilmesindeki etkili moleküller arası etkileşimler (b) (Mason ve ark., 2008'den modifiye edildi.)



### 2.6.3.3.1. *TPM2* ve *TPM3* Genleri Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

*TPM2* geni insanda 9. kromozom üzerinde 9p13.3 lokusunda bulunur 8 kb uzunluğundadır. Gen 11 ekzona sahiptir fakat protein sentezinde yalnızca 10 ekzon kodlama yapmaktadır. Gen üzerinde en uzun ekzon 3 olup, 134 bç uzunluğundayken; en uzun intron 2 olup, 3365 bç uzunluğundadır. Ekzon üzerinde C-terminal bölgede yer alan 1a-b (1b insanda kodlanmamaktadır.), orta bölgede 6a-b, ve C terminal bölgede yer alan 9a-d olmak üzere farklı alternatif ekzonları vardır. Bu durum çok çeşitli izoformların ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Lin ve ark., 2008) (Şekil 2.29).

*TPM3* geni insanda 1. kromozom üzerinde 1q21.3 lokusunda yer alır, 42 kb uzunluğundadır ve 14 ekzona sahiptir. Gen üzerinde en uzun ekzon 4 olup, 134 bç uzunluğundayken; en kısa ekzonu ise 4 baz uzunluğunda olan ekzon 12'dir ve en uzun intron 13 olup yaklaşık 8755 bç, en kısa intron 5 yaklaşık 105 bç uzunluğundadır (Kiiski ve ark., 2015).



**Şekil 2.29.** *TPM* genlerine ait ekzonlar ve farklı izoformlarda yer alan ekzon yerleşimleri (Wang ve Coluccio 2010).

*TPM2* ve *TPM3* genindeki mutasyonların escobar sendromu, distal artrogipozis ve konjenital myopati (nemalin myopati ve konjenital lif tipi uyumsuzluğu) gibi iskelet kas liflerinde çeşitli varyasyonlara sebep olan hastalıklara yol açmaktadır (Marttila ve ark., 2014). Nemalin myopati hastalardan yapılan bir çalışmada kas fiberlerinde alfa-beta dimerlerinden çok, alfa-alfa dimerlerinin bulunduğu saptanmıştır (Corbett ve ark., 2005). Bu durum alternatif eklemeyi etkileyebilecek mutasyonların nemalin myopatinin ortaya çıkmasında etkili olabileceğine işaret etmektedir. İskelet ve fibroblast hücrelerinde farklılık göstermek üzere tropomiyozinler üzerinde birisi C-terminal, diğeri ise Cys-190 (ekzon 7)'a yakın pozisyonda troponin T bağlanma bölgeleri bulunmaktadır ve bu bölgedeki mutasyonların troponin T ve tropomiyozin arasındaki bağlantıyı etkileyeceği düşünülmektedir (Wang ve Coluccio 2010).

İskelet ve düz kaslarda ifade edilen tropomiyozin proteinlerinin sentezlendikten sonra post-translasyonel modifikasyonlar yoluyla asetillenmesi gerekir bu modifikasyon tropomiyozinlerin aktivasyonu ve zincir halini alabilmesinde önemlidir. Tropomiyozinlerin globüler halde aktine bağlanma afiniteleri düşüktür. Tropomiyozinlerin polimerizasyona uğraması aktine daha kolay bağlanabilmelerini sağlamaktadır. Asetillenen bölgelerde ortaya çıkacak mutasyonların da tropomiyozinlerin polimerizasyonunu etkilediği düşünülmektedir (Moraczewska ve ark., 2000; Palm ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada *TPM2* geni üzerinde yaklaşık olarak ekzon 3'te yer alan Q93H ve E97K missense mutasyonlarının sırası ile hiperkontraktıl ve hipokontraktıl fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (Sliwinska ve ark., 2021). Q93H mutasyonu olan hastalarda kalsiyum duyarlılığının azaldığı ve buna bağlı olarak da aktin ve miyozinler arasındaki etkileşim düzeyinin düştüğü, E97K mutasyonunun görüldüğü hastada ise kalsiyum aktivitesinin oldukça arttığı görülmektedir. Bu missense mutasyonların aynı ekzonda ve birbirine oldukça yakın olmasına rağmen ortaya çıkardıkları fenotiplerin farklı olması tropomiyozin zinciri boyunca mutasyonların görüldüğü bölgeler bazında hastalığın ve fenotipin tahminin zor olabileceğine ortaya koymaktadır (Tajsharghi ve ark., 2012). Öte yandan bu

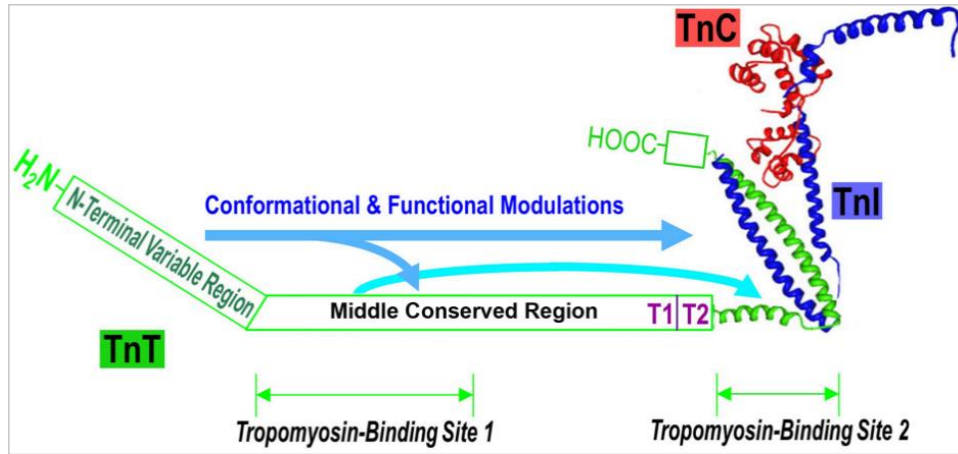
durum hastalıkların poligenik doğası ve genler arası pleiotropik etkileşimlerinde hastalıklarda önemli olabileceğine işaret etmektedir.

Marttila ve ark. (2014) tarafından konjenital myopatiye sahip 93 hasta ve aileleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada *TPM2* geninde 53 ve *TPM3* geninde ise 40 mutasyon saptanmıştır. *TPM2* geni üzerinde tespit edilen mutasyonların çoğunlukla hiperkontraktıl bir fenotip ortaya koyduğu görülürken, *TPM2* geninde mutasyon görülen hastaların *TPM3*'deki hastalara göre hastalık şiddetinin daha hafif seyirli olduğu izlenmiştir. Mutasyonların çoğunun tropomiyozin-aktin arasındaki bağlama kinetiğini etkilediği görülmektedir. Bu mutasyonların bazılarının hiperkontraktıl fenotip ortaya koyduğu az sayıda mutasyonun ise tropomiyozinlerin birleşerek polimerler haline gelmesini etkilediği tespit edilmiştir.

#### **2.6.3.4. Troponin Proteinin Yapısı Fonksiyonu**

Kas kasılması, kalp fonksiyonu ve hareket kabiliyeti için canlılarda hayati öneme sahip bir aktivitedir (Wong ve ark., 2019). Sarkomerlere ulaşan uyarının miyofilament hareketine dönüşebilmesi için troponin kompleksi, tropomiyozin ve aktin filamentlerinin eş güdümlü olarak çalışması gerekmektedir. Troponin kompleksi ve tropomiyozinin kalsiyum varlığındaki konformasyonel değişiklikleri, F-aktin ve miyozin arasındaki çapraz köprülerin kurulmasına olanak sağlar (Şekil 2.2). Kasılma fonksiyonunun gerçekleşebilmesindeki en önemli evre olan kalsiyum regülasyonu troponin proteini tarafından gerçekleşmekte ve bu protein sarkomerlerde kalsiyum reseptörü olarak görev yapmaktadır (Mondal ve Jin 2016; Ohtsuki ve Morimoto 2008). Troponin proteini ortamdaki kalsiyum varlığına göre farklı görevleri olan TnI, TnC ve TnT olmak üzere 3 alt birimden oluşmaktadır (Şekil 2.30) (Vinogradova ve ark., 2005). Bu birimler çeşitli allosterik değişiklikler yolu ile bu süreçte aktif olarak rol alırlar (Fox ve ark., 2018). Troponin proteini ortamda kalsiyum olmadığında tropomiyozin ile birlikte kas kasılma sürecini baskıladığı görülürken, ortamdaki kalsiyum miktarı arttığında, kalsiyumun troponine bağlanarak bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır (Ohtsuki ve Morimoto 2008).

Troponinin alt birimlerinden birisi olan troponin I, tropomiyozin ile birlikte görev alarak aktin ve miyozin arasındaki bağlantıyı bloke edici bir rol oynamaktadır (Katus ve ark., 1992). Tropomiyozinin varlığı bu proteinin rolünü oldukça artırmaktadır. Troponin I'nın N-terminal bölgesi ile troponin C'ye bağlanıp troponin T ile birleşerek sarmal bir yapı oluşturmaktadır. TnT ve TnI arasında oluşan bu sarmal-bobin yapısı literatürde 'IT kolu' isimlendirilmektedir. Troponinin diğer alt birimlerinden birisi olan troponin C ise kalsiyum bağlayıcı alt birim olarak görev almakta ve aktin-miyozin arasında nötrleştirici bir etki yaratmaktadır. Ayrıca üzerinde I, II, III ve IV olarak isimlendirilen 4 adet kalsiyum bağlanma bölgesine sahiptir. I ve II bölgeleri yalnızca kalsiyuma bağlanırken, III ve IV bölgelerine hem kalsiyum hem de magnezyuma bağlanmaktadır. Troponin kompleksinin bu 3 alt birim içerisinden en büyük olan kısmı ise troponin T proteinidir. Tropomiyozin bağlayıcı alt birime sahip olan bu protein hem TnI hem TnC hem de tropomiyozin ile etkileşim içerisindedir. Direkt olarak kalsiyum regülasyonundan sorumlu olmasa da Troponin C ve Troponin I ile bağlantılı olması bu alt birimi kalsiyum düzenlemesinde rol oynamasına neden olmaktadır.

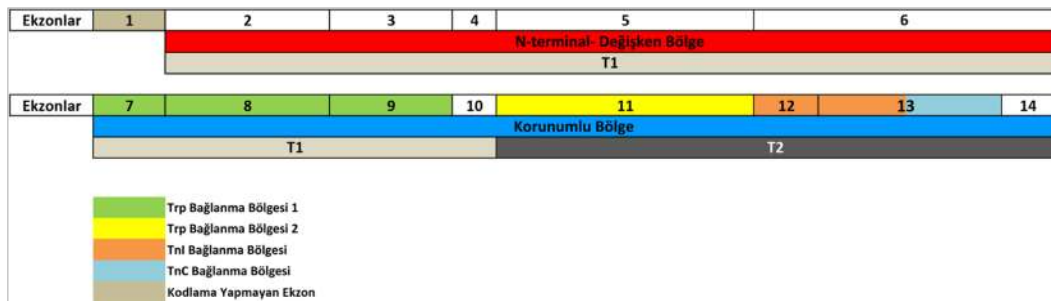


**Şekil 2.30.** Troponin kompleksinin 3 boyutlu yapısı ve TnT proteininin fonksiyonel alanları (Mondal ve ark., 2016'den uyarlanmıştır.)

Troponin proteininin farklı izoformları yavaş-hızlı iskelet kaslarında ve kalp kasında farklı genler tarafından kodlanmaktadır. Omurgalılarda iskelet kaslarında kas

tipine ve yaşa göre ifade edilen 3 homolog gen evrimleşmiştir. *TNNT1* (iskelet kası troponin T1) yavaş iskelet kaslarında ifade edilirken, *TNNT2* (kalp kası troponin T2) kalp kasında, *TNNT3* (hızlı iskelet kası troponin T3) ise hızlı iskelet kaslarında ifade edilmektedir (Van de Loch ve ark., 2021; Wei ve Jin 2016). Bu izoformlar hemen hemen yapısal olarak birbirleriyle çok benzer olup, N-terminal bölgede yer alan küçük farklılıklar ile birbirlerinden ayrılırlar. Bunun yanında alternatif ekleme ve post-translasyonel modifikasyonlar ile kazanılan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler bu genlerinin ürünlerinin işlevselliğinde önemli rol oynar. Örneğin *TNNT1* geninde ekzon 5'in alternatif ekleme yoluyla yüksek ve düşük moleküler ağırlığa sahip iki TnT tipi kodlanmaktadır.

Troponin T1 ve T2 olmak üzere 2 alt birime sahiptir. T1 bölgesi yaklaşık olarak 158 aminoasitten oluşmakta olup, 80 aminoasitlik sarmal yapısı ile tropomiyozine bağlanmaktadır. Ekzon 7, 8 ve 9 tropomiyozin bağlanma bölgesi 1'i oluşturmaktadır (Şekil 2.31). C terminal bölgenin de içerisinde bulunduğu T2 birimi yaklaşık 47 aminoasitten oluşmakta olup, troponin I'nın N-terminal bölgesi ile sarmal bobin yapısı oluşturmaktadır. Ekzon 11 tropomiyozin bağlanma bölge 2'yi, ekzon 12 ve 13 TnI bağlanma bölgesini ve 13. ekzon ise TnC bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. İlk 6 ekzon N-terminal değişken bölgeyi kapsamakta ve buradaki değişiklikler farklı izoformların ortaya çıkmasından sorumludur. Ekzon 7 ve 14 arası ise korunumlu bölgeler olarak adlandırılmaktadır (Ohtsuki ve Morimoto, 2008; Wei ve Jin, 2016). Bu bölge tüm izoformlarda genelde aynıdır ve milyonlarca yıldır aminoasit dizileri değişmeden kalmıştır (Şekil 2.31).



**Şekil 2.31.** *TNNT1* Geni ekzonları ve bu ekzonların proteindeki görev aldıkları bölgeler

#### 2.6.3.4.1. *TNNT1* Geni Yapısı Fonksiyonu ve Konjenital Myopatilerle İlişkisi

İnsanda 19. kromozomda 19q13.42 pozisyonunda yer alan *TNNT1* geni 16 kb uzunluğunda olup, 14 ekzondan oluşmaktadır (Mondal ve Jin 2016). Bu ekzonlar içerisinde en uzun 117 baz uzunluğunda olup, ekzon 8 iken; en kısası 17 baz uzunluğunda olup, ekzon 4'tür. En kısa intron 104 baz uzunluğunda olup, intron 2 iken; en uzun ise intron 5 olup, 3623 baz uzunluğundadır. Ekzon-1 translasyonda ifade edilmezken, ekzon 2 ve 14'ün ise bir kısmı kodlanmaktadır (Geraud ve ark., 2021).

*TNNT1* geni üzerindeki mutasyonlar otozomal çekinik nemalin myopatiye sebep olmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda Pennsylvania'da yaşayan Amish'ler de ekzon 11'de c.538G>T pozisyonunda stop kodon mutasyonun yaygın olduğu görülmüştür (Johnston ve ark., 2000). Bu mutasyon C-terminal bölgeye yakın olan T2 bölgesinde yer alan TnI, TnC ve tropomiyozin bağlanma bölgesi 2'nin kaybına neden olmaktadır. Van der Pol ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada Amish popülasyonunda görülenin dışında *TNNT1* geninde nemalin myopatiye sebep olan bir mutasyon tanımladılar. Ekzon 8'de c.309+1G>A pozisyonunda gözlenen bu mutasyon mRNA'da ekzon 8'in atlanmasına neden olarak tropomiyozin bağlanma bölgesi 1'in kaybına yol açmıştır. Saptanan diğer bir mutasyon ise ekzon 14'ün delesyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu bölgenin kaybı proteinin stabilizasyonunu bozulmasına ve ince filamentler ile olan bağlanma afinitesinin düşmesine neden olmaktadır (Konersman ve ark., 2017; Van der Pol ve ark., 2014).

Bir başka mutasyon ekzon 9'da c.323C>G pozisyonunda görülen bir nonsense mutasyondur ve trunkat protein oluşumu neden olarak C-terminal alanda 155 aminoasitlik bir kayıp ortaya çıkmaktadır. Bu alan içerisinde yer alan Tn1, TnC ve tropomiyozin bağlanma bölgesi 2 ve tropomiyozin-bağlanma bölgesi 1'e de zarar vermektedir. Bu durum tip1 kas liflerinde atrofiye neden olurken, tip 2 liflerde hipertrofiye yol açarak kişilerde yorgunluğa ve hareketlerde kısıtlılığa neden olmaktadır. Şimdiye kadar elde edilen mutasyonların çoğunlukla korunmuş bir bölge

olan C-terminal bölgede gerçekleştiği görülmektedir (Marra ve ark., 2015; Van der Pol ve ark., 2014).

## **2.7. Mutasyon Yoğun Bölgelerin Genetik Testlerde Kullanım Potansiyeli**

DNA üzerinde mutasyonların oluşumu spontan kimyasal reaksiyonların bir sonucudur. Mutasyonların canlıların temel kalıtsal materyali DNA üzerinden meydana gelmesi bu kimyasal değişimlerin zamansal ve mekânsal boyutu aşmasına ve nesiller boyu canlı soy hattında taşınmasına neden olmaktadır. Bu mutasyonların birey ya da onun gelecekteki soy hatları için adaptif ya da selektif olması ise tamamen doğal seçim tarafından belirlemektedir (Sabeti ve ark., 2006). Kimura (1983) tarafından önerilen nötral teori genomda gözlenen mutasyonların çoğunun nötral olduğunu, zararlı mutasyonların güçlü doğal seçim baskısı nedeniyle (bireyin ölümü) popülasyondan elemine edildiğine vurgu yapar ve bu nedenle günümüzde gözlenen mutasyonların büyük oranda nötral ve organizma için zararsız olduğunu savunur (bazı missense ve sinonim mutasyonlar). Ancak Ohta (1973) tarafından önerilen yaklaşık nötral teori ise nispeten zararlı mutasyonların hücrel reaksiyonlar ve genomun plastisitesine bağlı olarak tolere edilebildiği seviyede (hastalıklar) varlıklarını popülasyonda sürdürebildiğini ileri sürmektedir. Ohta tarafından ileri sürülen ve hastalıklara yol açan bu mutasyonlar (bazı missense, nonsense ve çerçeve kayması) kalıtsal (spinal musküler atrofi-SMA, konjenital myopati, musküler distrofi vb.) ve genomik kararsızlık temelli hastalıkların (kanser) teşhisi ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır (Samocha ve ark., 2014). Özellikle hastalık oluşumundan sorumlu bu mutasyonların yoğun olduğu bölgeler mutasyon hotspot (sıcak) olarak tanımlanmakta ve tıp alanında kullanışlı biyomarkırlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Itsara ve ark., 2009).

Gen üzerinde gerçekleşen mutasyonlar tiplerine göre missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması ve intron bölgelerinde gerçekleşen mutasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Temelde bu mutasyon tipleri nokta ve çerçeve kayması mutasyonları olarak 2'ye ayrılmaktadır. Nokta mutasyonları DNA'daki tek nükleotiddeki değişikliklerdir. Missense, sinonim ve stop kodon mutasyonları bu grup içerisinde yer almaktadır (Klug ve ark., 2006). Missense mutasyonlar aminoasit

değişimlerine neden olabildiklerinden proteinin işlevi üzerinde çeşitli değişikliklere yol açabilme potansiyeli taşımaktadırlar. Nonsense mutasyonlar ise stop kodonunun oluşumuna neden olarak işlevsiz, trunkat proteinlerin sentezlenmesine yol açmaktadırlar (Lawlor ve ark., 2011). Sinonim mutasyonların ise aminoasit değişimine yol açmadıkları bilinmekte ve genel kanı olarak nötral oldukları varsayılmaktadır. Çerçeve kayması mutasyonları ise insersiyon ve delesyonlar şeklinde olup, gerçekleştiği pozisyonundan itibaren üçlü kodonda okuma çerçevesinin kaymasına neden olarak genin kodlamasında ve bundan sentezlenen proteinde yıkıcı değişimlerin meydana gelmesine neden olmaktadır (Feng ve Marston, 2009). Sinonim ve intron bölgelerinde görülen mutasyonların hastalıklar üzerindeki etki mekanizmaları hala net değildir. Fakat missense, nonsense ve çerçeve kayması mutasyonları hastalıkların oluşumundan öne çıkan mutasyon tipleridir. Özellikle de stop kodon ve çerçeve kayması mutasyonları işlevsiz trunkat proteinlerin sentezlenmesine yol açmaları nedeniyle şiddetli hastalık fenotipleri ortaya çıkarma potansiyelleri yüksek mutasyon tipleridir (Kimura, 1997).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez kapsamında hedeflenen amaçlara ulaşabilmek amacıyla iş paketleri üç başlık altında gerçekleştirildi; i) konjenital myopatilerden sorumlu 13 gene ait mutasyon verilerinin veri tabanlarından elde edilmesi, ii) elde edilen mutasyon verilerin genin organizasyonuna göre düzenlenmesi ve analizler için hazır hale getirilmesi: veri madenciliği iii) veri analizleri.

#### 3.1. Genlere Ait Mutasyon Verilerinin Veri Tabanlarından Elde Edilmesi

Tez kapsamında konjenital myopatilerden sorumlu *ACTA1*, *NEB*, *MTM1*, *MYH7*, *DNM2*, *RYR1*, *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2*, *SEPNI*, *BINI* ve *TTN* genlerindeki mutasyon yük yoğunluklarının çalışılması hedeflendi. Bu 13 farklı gen literatür taramalarında beş farklı konjenital myopatiden sorumlu major genler olarak görülmektedir (Cassandri ve ark., 2017). Öte yandan bu genler uzun yıllardır çalışılmalarından dolayı literatürde ve veri tabanlarında bu genlerdeki mutasyonlara yönelik yoğun veri bulunmaktadır. Çalışmada GnmAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) veri tabanı başta olmak üzere diğer National Center for Biotechnology Information (NCBI) ve GeneCards (<https://www.genecards.org/>) ile literatürde bu 13 gene ait mutasyonlar toplandı. Hedeflenen genler için farklı kaynaklardan veri çekilmesinden kaynaklı oluşabilecek duplikasyonlar ve çeşitli veri kirlilikleri (belirsiz, pozisyon ve ekzon-intron uyuşmayan vb.) için filtrasyonlar gerçekleştirildi. Güvenilmez ve tekrar eden mutasyonlar veri setinden çıkarıldı.

#### 3.2. Mutasyonların Genlerin Ekzon-İntron Organizasyonuna Göre Yerleştirilmesi

Hedeflenen 13 gene ait başlama ve bitiş pozisyonları ile ekzon ve intron bölgelerini belirlemek amacı ile bu genlere ait haritalanması yapılmış diziler NCBI' dan indirilerek Geneious Prime programına aktarıldı. Mutasyonlar gen üzerindeki pozisyonlarına Geneious Prime programına aktarılmış olan ekzon ve intron

haritalandırılması yapılmış ilgili gene uygun olarak yerleştirildi. Bu aşamada ekzon ve intronların yanlış yerleştirilmesinden dolayı ortaya çıkabilecek hataları önlemek için literatürden elde edilen verilerdeki saptanan pozisyonların hangi ekzon ve intronlarda bulunduklarına dair bilgiler veri setinde yer alan bilgiler ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilerden mutasyon tipi (missense, sinonim, insersiyon-delesyon ve nonsense), sayısı, frekansı, aminoasit değişimleri gibi bilgiler her gen için ayrı ayrı düzenlenmiş başlama ve bitiş kodonu ile intron ekzon pozisyonları kalibre edilmiş excel şablonlarına yerleştirildi. Bu veri şablonları ile analizler gerçekleştirildi.

### **3.3. Veri Analizi**

Veri tabanlarından ve literatürden elde edilerek filtrelenen mutasyon verilerinin genler üzerine yerleştirilmeleri gerçekleştirildikten sonra genler boyunca dağılımları, frekans yoğunlukları ile ekzon ve intronlara dağılımlarını belirlemek için her bir mutasyon tipi ve toplam mutasyon yükleri ile istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

#### **3.3.1. Tanımlayıcı İstatistikler, Kümeleme ve Isı-Harita Analizleri**

Çalışılan genlerde elde edilen mutasyonların tanımlayıcı istatistikleri ve genler üzerinde bu mutasyonların dağılımları ve frekans yoğunluklarının hangi bölgelerde nasıl bir değişim gösterdiğini belirlemek amacıyla dağılım grafikleri SPSS v.20 (IBM Corporation 2021) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm mutasyon verilerinin her bir gendeki ekzon ve intronlara doğru bir şekilde yerleştirilmesinin ardından bu bölgelerdeki missense, sinonim, insersiyon-delesyon, nonsense ve toplam mutasyon tipleri ile dağılım grafikleri oluşturuldu. Genler üzerinde yoğun mutasyon gözlenen bölgelerin genden sentezlenen proteinlerin hangi domainlerine karşılık geldikleri literatür ve veri tabanlarından (<https://www.uniprot.org/>) proteinlere ait yapısal bilgiler elde edilerek belirlendi.

Ekzon ve intron bölgelerinin uzunluklarının artması ile mutasyon sayısında da artış olması olasıdır. Bu durumun yaratacağı verisel eğilimi-bias önlemek amacıyla ekzon ve intron uzunluğu ile gözlenen mutasyon sayısı arasında yüksek

korelasyon gösteren verilerde mutasyon sayısı ekzon ve intron uzunluklarına bölünerek verilerde oransal bir kalibrasyon gerçekleştirildi. Bu amaçla ekzon ve intronlardan elde edilen mutasyon sayıları ile uzunlukları arasında korelasyon analizleri SPSS v.20 (IBM Corporation 2021) programında gerçekleştirildi. Mutasyon sayılarına göre ekzonlar ve intronlar arasındaki gruplanmaları belirlemek amacıyla kümeleme ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Analizler mutasyon yoğunluğunun yüksek ve düşük olduğu bölgelerin saptanması için başlangıçta tüm mutasyon tiplerinde ayrı sonrasında ise mutasyon tipi fark etmeksizin, tüm mutasyon dikkate alınarak gerçekleştirildi. Kümeleme ve ısı-harita analizleri R programı altında çalışan *factoextra* (Maechler ve ark.,2016) ve *apcluster* (Frey ve ark., 2007) paketleri ile gerçekleştirildi. Kümeleme analizleri öklid uzaklık algoritması altında gruplama katsayısı dikkate alınarak gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarına göre mutasyon tipi ve bunların yüklerinin ekzon ve intronlarda nasıl bir gruplandırma oluşturduğu ve bunların işaret ettikleri potansiyel klinik sinyaller belirlenmeye çalışıldı.

### **3.3.2. Outlier Analizleri ve Klinik Potansiyeli Olan Belirteç Bölgelerin Belirlenmesi**

Veride çoğunlukla bir pozisyonda tekil mutasyonlar görülmesine rağmen bazı pozisyonlarda birden fazla mutasyonun var olduğu durumlarda görülmektedir. Aynı pozisyonda birden fazla mutasyonun olması bu bölgelerin myopatiler için hot-spot bölgeler olma olasılıklarını arttırmaktadır. Bu pozisyonları ve bölgeleri tespit etmek için R programı altında çalışan *rstatix* (Navarro ve ark., 2015) paketi kullanılarak Boxplot Dixon testleri ile Cookdistance analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar pozisyonun proteinde hangi domainlere denk geldiği ve bu görevleri dikkate alınarak değerlendirildi.

### **3.3.3. Mutasyon Yükünün Öne Çıkardığı Myopatilerle İlişkili Ekzon Gruplarının Belirlenmesi**

Çalışılan 13 gen tarafından sentezlenen proteinlerde yapısal bozukluklara ve fonksiyon kayıplarına neden olan missense, sinonim, insersiyon-delesyon, nonsense

mutasyonlar dikkate alınarak myopatilerle yüksek ilişkili olabilecek ekzon grupları uzaklık temelli temel bileşenler koordinat analizi (PCoA) ve faktör analizi temelli Temel Bileşenler Analizi (PCA) ile belirlenmeye çalışıldı.

PCoA analizi için genler bazında ekzonlara ait missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense mutasyonlardan R programı altında çalışan *stats* (Odermatt ve ark., 1988) paketi kullanılarak öklid uzaklık metodu ve p değeri bazında uzaklık matrisleri hesaplandı. Elde edilen veri matrisi ile GenAlEx 6.5b3 (Peakall ve ark., 2006) programı kullanılarak PCoA analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucu elde edilen ekzon ve ekzon gruplarının protein üzerinde hangi bölgeleri karşılık geldikleri dikkate alınarak hastalığa neden olma ve klinik-hotspot olma potansiyelleri değerlendirildi.

Veri setindeki tüm genlere ait ekzonlarda görülen missense, sinonim, insersiyon-delesyon ve nonsense mutasyon sayıları, her ekzondaki AC, CT dönüşümleri, transisyon (ts) ve transversiyon (tv) sayıları ile veri setleri oluşturuldu. Elde edilen veri seti ile öncelikle faktör analizi sonrasında oluşturulan komponentler temelinde PCA analizi gerçekleştirildi. Faktör analizi çok sayıda değişkenin birbirleri ile korelasyon göstermeyen ve parametrik analizlerin varsayımlarına sağlayan komponentlere indirgenmesi sağlar. Faktör analizi SPSS v.20 paket programı ile *principal component* metodu altında *varimax* rotasyon ve covariance matrix oluşturularak gerçekleştirildi. Regresyon skorları ile oluşturulan faktörlerden en bilgi verici olan 2'si kullanılarak PCA grafikleri oluşturuldu. Birbirine yakın konumlanan ve mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonların kümelendiği bölgeler klinik-hotspot ekzonlar ya da bölgeler olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yapısal Proteinlerin Sentezlendikleri Genler

#### 4.1.1. *NEB* Geni

Genin ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 10695 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 6035 tanesi ekzon, 4660 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 4232 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken; bunu 1548 değişim ile sinonim, 162 indel ile çerçeve kayması ve 93 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.1).

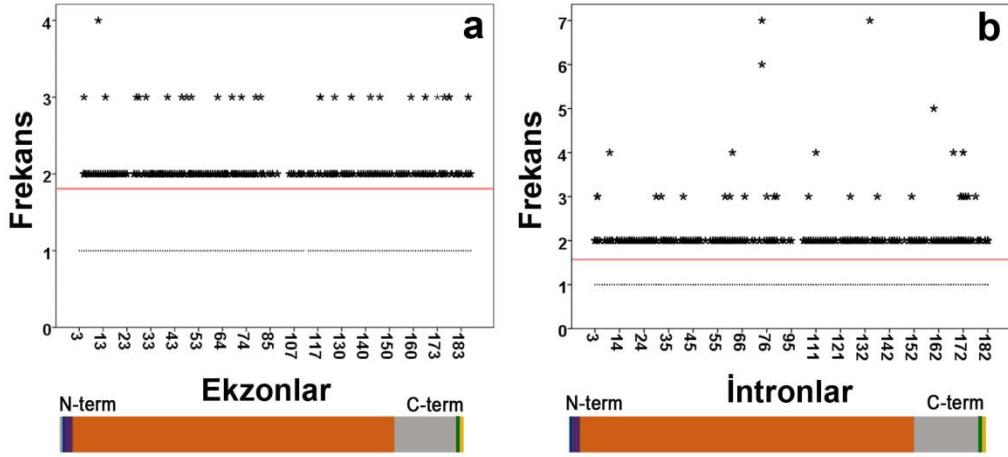
**Tablo 4.1.** *NEB* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N    | Ort.  | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|------|-------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 4232 | 23.38 | 0                | 77               |
| Sinonim Mutasyon            | 1548 | 8.5   | 0                | 30               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 162  | 0.8   | 0                | 6                |
| Nonsense Mutasyon           | 93   | 0.5   | 0                | 4                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 4660 | 25.6  | 10               | 65               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*NEB* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *NEB* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 7 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.1). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem ekzon hem de intron bölgesi için aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu görülürken, analiz sonuçlarına göre aynı pozisyonda görülen 2 ve üstü aşırı mutasyonlardır. Aynı pozisyonda 2 mutasyon neredeyse tüm ekzonlarda gözlenirken, aynı pozisyonda 3 mutasyonun varlığı 25 ekzon (ekzon 5, 14, 27, 28, 31, 40, 46, 48, 50, 68, 72, 80, 119, 120, 126, 134, 142, 146, 159, 168, 172, 173, 176, 178, 183'de), 4 mutasyonun

varlığı yalnızca ekzon 11’de gözlemlendi (Şekil 4.1a). İkili mutasyonların ekzon 90-100 hariç gen boyunca homojen dağıldığı, 3’lü mutasyonların ekzon 80-120 hariç bir dağılım gösterdiği görülmektedir. İntronlarda aynı pozisyonda 2 mutasyonun varlığı neredeyse genin tamamında gözlenirken, aynı pozisyonda 3 mutasyonun varlığı 20 intronda (intron 4, 31, 32, 41, 58, 61, 67, 74, 76, 80, 81, 108, 126, 134, 137, 151, 171, 173, 174, 177), 4 mutasyonun varlığı 5 intronda (10, 62, 11, 168, 172), 5 mutasyon yalnızca intron 160’da, 7 mutasyon intron 74 ve 134’de gözlemlendi (Şekil 4.1b). Hotspot pozisyon varlığı bakımından intronlarda durumun ekzonlara göre daha fazla olduğu ve gen boyunca da daha yaygın bir dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.1b).



**Şekil 4.1.** *NEB* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.). Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

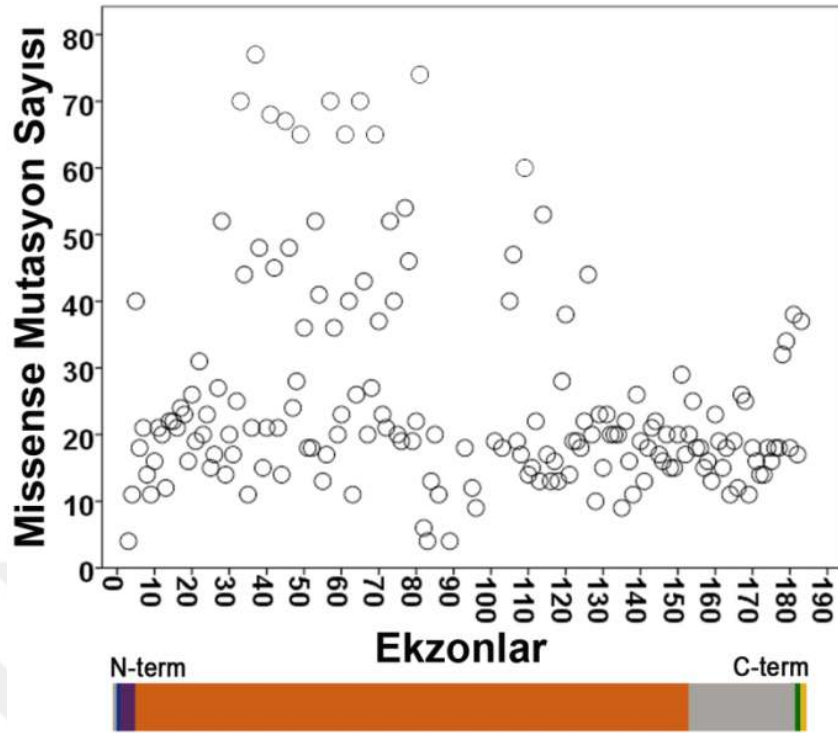
#### 4.1.1.1. *NEB* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*NEB* geni 2. kromozomda yer alır, 183 ekzona sahip ve 249.152 baz uzunluğundadır. Gen üzerinde yer alan 183 ekzondan ekzon 1 ve 2 kodlama yapmadığı için bu gen bölgesinden veriler analizlerde kullanılmadı. Çalışma kapsamında genin 181 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler

gerçekleştirildi. Çalışmada *NEB* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{\text{Pearson}}$ : 0.41, n: 181, P: 0.00).

Missense mutasyonlar: *NEB* geninde 181 ekzonda toplam 4232 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 23 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 99 ile ekzon 81 ve 77 mutasyon ile ekzon 37’de, en az mutasyon ise 4 ile ekzon 3, 83 ve 89’da görülmektedir (Şekil 4.2). Missense mutasyon sayısı bakımından basit tekrar bölgesinde ortalama 18 (min: 19, maks: 34), süper tekrar bölgesinde ortalama 25 (min: 4, maks: 77) mutasyon olduğu gözlemlendi. Missense mutasyon dağılımı bakımından gen üzerinde N-terminal bölgeye yakın ekzon 30-80 arası bölgede mutasyonların yoğunlaştığı, ekzon 80-110 arasındaki bölgede en düşük seviyeye ulaştığı, ekzon 110-130 arasında tekrar yükseldiği görülmektedir (Şekil 4.2). Gen üzerinde C-terminal bölgeye yakın 130-180 arasındaki bölgede mutasyon yükünde genel bir düşüş görünürken, ekzon 180 etrafından düşüğe olsa bir artış göstermektedir.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Fakat ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilememektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında dört kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.2). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 19 ekzondan oluşurken, II. ve III. kümedeki ekzonlar genin herhangi bir bölgesinde kümelenmeyip, tekil ekzonları işaret etmektedir. IV. küme mutasyon yükünün yüksek olduğu 33 ekzondan oluşmaktadır. I. kümede genellikle yoğun alternatif eklemelerden kaynaklı olarak veri tabanlarında yeterli veri olmamasından dolayı toplanan mutasyon sayısının az olduğu ekzonlar yer almaktadır. En çok mutasyon yüküne sahip olan küme III ve IV’deki ekzonlar genel olarak tropomiyozin ile bağlantı kurulmasında görev alan süper tekrar bölgesinde yer almaktadır (Tablo 4.2).



**Şekil 4.2.** *NEB* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

**Tablo 4.2.** *NEB* geninde missense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 82, 83, 85-94, 97-102, 104                                                                                                                                                                                                                                         |
| Küme 2  | 3, 8-10, 13, 19, 25, 29, 35, 39, 44, 55, 63, 84, 95, 96, 105, 110, 111, 113, 116-118, 121, 128, 130, 135, 137, 138, 141, 146, 148, 149, 152, 157-159, 162, 164, 166, 169, 172, 173                                                                                 |
| Küme 3  | 5-7, 11, 12, 14-16, 21, 23, 26, 30, 31, 36, 40, 43, 49-54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 69, 70, 72-77, 79, 80, 103, 107-109, 114, 115, 120, 122-125, 127, 132-134, 136, 140, 142-145, 147, 150, 153, 155, 156, 160, 161, 163, 165, 170, 171, 174-177, 179, 180, 182 |
| Küme 4  | 4, 17, 18, 20, 22, 24, 27, 28, 32-34, 37, 38, 41, 42, 45-48, 57, 60, 64, 65, 68, 71, 78, 81, 106, 112, 119, 126, 129, 131, 139, 151, 154, 167, 168, 178, 181, 183                                                                                                  |

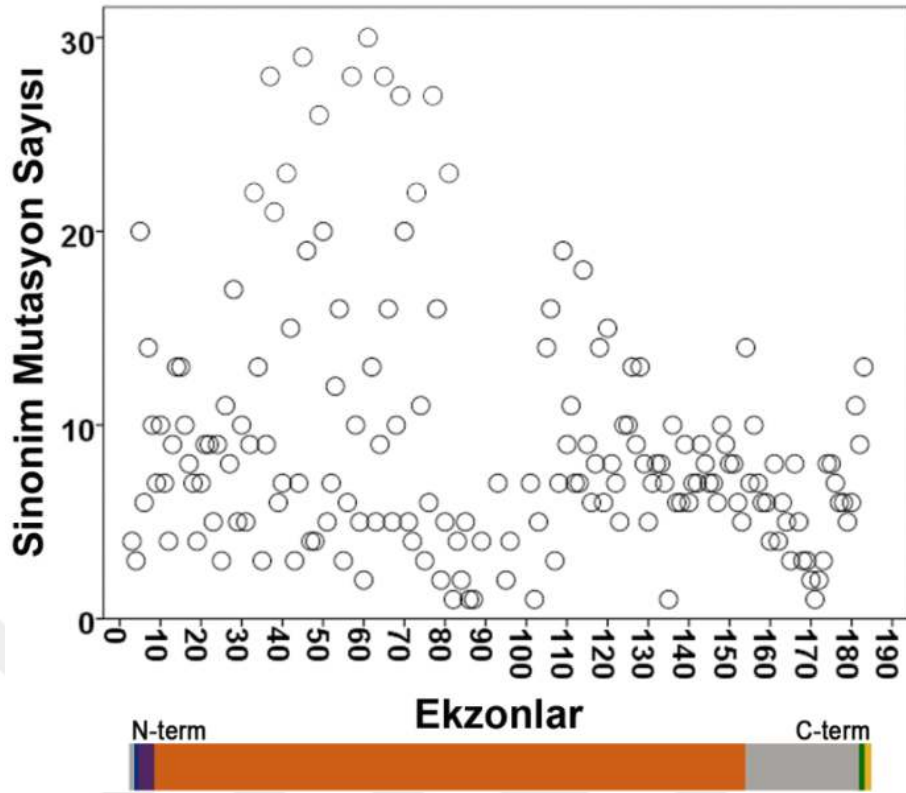
Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme IV'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.



Kümeleme analizi genin N-terminal kısmına yakın yer alan ekzon 30-81 (ekzon 35, 39, 44, 55 ve 63 hariç) arası bölgeyi birlikte gruplamaktadır. Bu bölge gen üzerinde missense mutasyon yükünün en fazla olduğu bölge olup süper tekrar bölgelerinin olduğu kısımdır. Genel olarak C- terminal bölgeye doğru mutasyonların azalmaya eğimli olduğu ancak diğer proteinler ile etkileşiminden sorumlu Ser ve SH3 bölgelerin bulunduğu ekzonların da IV. küme ile gruplandığı görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal ucuna yakın orta kısımlarda yoğunlaştığı ve ekzon 37, 81’de ise en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.2). *NEB* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ekzon 37, 48, 68, 81, 119, 139, 167, 168 ve 178’i diğer ekzonlardan farklı ve aşırı mutasyona sahip ekzon olarak tanımlamaktadır.

Sinonim mutasyonlar: *NEB* geninde 181 ekzonda toplam 1548 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 8 sinonim mutasyon gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 30 ile ekzon 61 ve 67 ile ekzon 45’de, en az mutasyon ise 1 ile ekzon 86, 87, 102, 135 ve 171’de görülmektedir (Şekil 4.3). Sinonim mutasyon sayısı bakımından basit tekrar bölgesinde ortalama 6 (min: 1, maks: 14), süper tekrar bölgesinde ortalama 9 (min: 0, maks: 30) mutasyon olduğu gözlemlendi. Sinonim mutasyonlarında gen üzerinde missense mutasyonlara benzer bir dağılım sergilediği görülmektedir. Buna göre N-terminal bölgeye yakın 30-80 aralığında mutasyonların yoğunlaştığı görülmektedir.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.3). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 47 ekzondan oluşurken, II. kümede yer alan ekzonların genin herhangi bir bölgesinde kümelenmediği ve daha çok tekil ekzonları işaret etmekte olduğu ve III. kümede ise mutasyon yükünün yüksek olduğu 49 ekzonun yer aldığı görülmektedir. En çok mutasyon yüküne sahip ekzonlar III. kümede olup bu ekzonlar da genel olarak basit ve süper tekrar dizilerinin olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.3.** *NEB* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

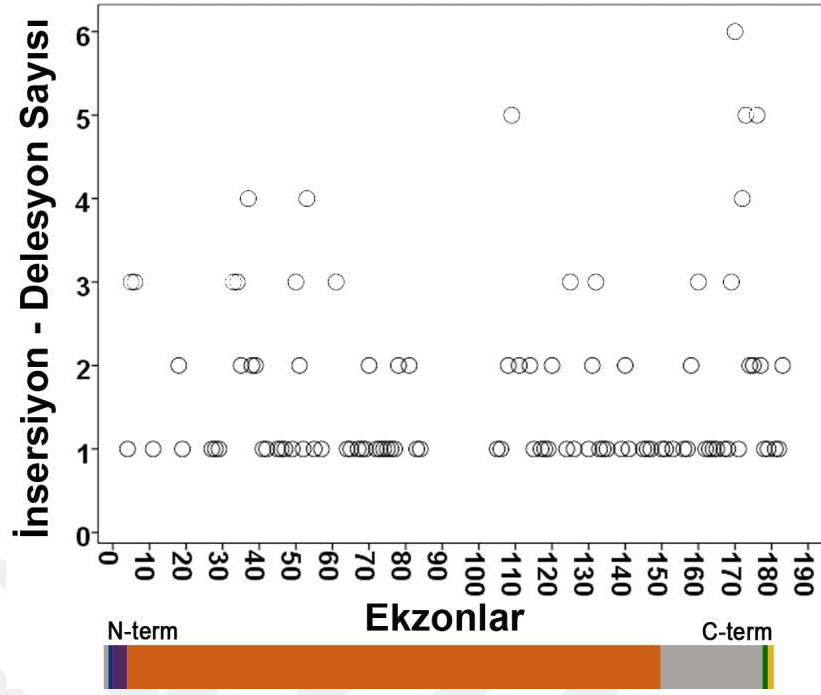
Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan süper tekrar bölgelerinde iken diğer proteinler ile etkileşiminden sorumlu olan C-terminal kısımlarında mutasyon yoğunluğunun yüksek olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal uçta yoğunlaştığı, ekzon 65 ve 67’de ise en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.3). *NEB* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ekzon 30, 38 ve 111’i diğer ekzonlardan farklı ve aşırı mutasyona sahip ekzonlar olarak tanımlamaktadır.

**Tablo 4.3.** *NEB* geninde sinonim mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 12, 19, 25, 35, 43, 47, 48, 53, 55, 60, 72, 75, 79, 82-102, 104, 107, 135, 160, 162, 165, 168-173, 179                                                                                                                                                                                                      |
| Küme 2  | 4, 6, 9, 11, 13, 17, 18, 20, 23, 27, 29, 31, 33, 34, 39- 42, 44, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 62, 63, 66, 67, 71, 73, 74, 76, 78, 80, 81, 103, 105, 106, 108, 109, 112-114, 116, 117, 119-123, 126, 129-134, 137, 138, 140, 141, 142, 144-147, 150-153, 155, 157-159, 161, 163, 164, 167, 176-178, 180, 181, 183 |
| Küme 3  | 3, 5, 7, 8, 10, 14-16, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36-38, 45, 46, 49, 50, 57, 61, 64, 65, 68-70, 77, 110, 111, 115, 118, 124, 125, 127, 128, 136, 139, 143, 148, 149, 154, 156, 166, 174, 175, 182                                                                                                          |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme III'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Çerçeve kayması mutasyonları: *NEB* geninde 181 ekzonda toplamda 162 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyonların ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına nonsinonim mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla indelin 6 ile ekzon 170'de ve 5 ile ekzon 109, 173 ve 176'da olduğu görülmektedir. Toplamda 86 ekzonda hiç indel olmadığı görülürken, 61 ekzonda ise yalnızca 1 indel saptandı. (Şekil 4.4). İndel sayısı bakımından basit tekrar ve süper tekrar bölgelerinde ortalama 1 (min: 0, maks: 5), indel mutasyon olduğu gözleendi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etti (Tablo 4.4). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 141 ekzondan oluşurken, II. kümedeki ekzonların herhangi bir bölgede kümelenmeyip çoğunlukla tekil ekzonları işaret etmektedir ve III. küme ise mutasyon yükünün yüksek olduğu 5 ekzondan oluşmaktadır. En çok mutasyon yüküne sahip olan ekzonlar III. kümede yer almakta olup, C-terminal kısımda yoğunlaşmaktadır. Bu bölgede diğer proteinler ile etkileşimde görev alan Ser ve SH3 domainleri yer almaktadır. *NEB* geninde gözlenen çerçeve kayması mutasyonları ile gerçekleştirilen outlier analizi ekzon 4, 6, 111, 125, 132, 160, 169, 170, 172, 173, 174, 175, 176, 177'yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı mutasyon gözlenen ekzonlar olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.4.** *NEB* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

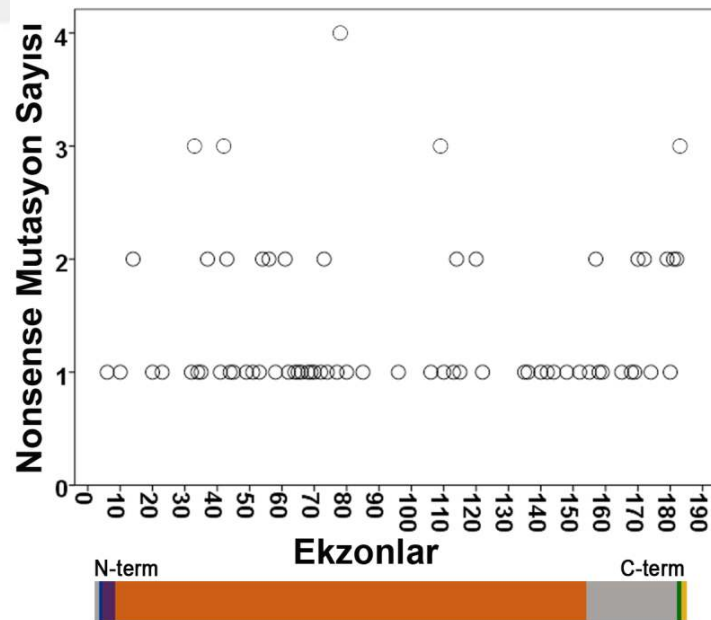
**Tablo 4.4.** *NEB* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 3, 7-17, 19-32, 36, 40-49, 52, 54-60, 62-69, 71, 72-77, 79-107, 110, 112-119, 121-124, 126-130, 133, 135-139, 141-159, 161-166, 178-182      |
| Küme 2  | 4-6, 18, 33-35, 37-39, 50, 51, 53, 61, 70, 78, 108, 109, 111, 120, 125, 131, 132, 134, 140, 158, 160, 165, 167, 168, 171, 174, 175, 177, 183 |
| Küme 3  | 169, 170, 172, 173, 176                                                                                                                      |

I. küme mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsarken, III. kümede en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Nonsense mutasyonlar: *NEB* geninde 181 ekzonda toplamda 93 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 0,5 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği, en fazla nonsense mutasyonun 4 ile ekzon 78’de olduğu görülmektedir. Toplamda 116 ekzonda hiç

nonsense mutasyon gözlenmezken, 47 ekzonda da yalnızca 1 nonsense mutasyon saptandı (Şekil 4.5). Stop kodonu oluşturan nonsense mutasyon sayısı bakımından basit tekrar bölgelerinde ortalama 0,5 (min: 0, maks: 2), süper tekrar bölgelerinde ortalama 0,4 (min: 0, maks: 4) mutasyon gözlemlendi. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığını desteklemiştir (Tablo 4.5). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 122 ekzondan oluşurken, II. küme genelde tekil ekzonları işaret etmekte ve III. küme ise mutasyon yükünün yüksek olduğu 11 ekzondan oluşmaktadır. En çok nonsense mutasyon yüküne sahip olan III. kümedeki ekzonların indel tipi mutasyonlardan farklı olarak belirli bir bölge yoğunlaşmadığı görülmektedir (Şekil 4.5). *NEB* geninde gözlenen nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ekzon 14, 42, 43, 56, 78, 120, 157, 165, 168, 169, 170, 172, 174, 179, 180, 181, 182, 183'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı nonsense mutasyon sergileyen ekzon olarak tanımlamaktadır. Bu ekzonlardan N-terminal bölgeye yakın olanlar trunkat proteinlerin oluşmasına neden olmaları dolayısıyla hastalık oluşumundan daha etkili olma olasılıkları daha muhtemeldir.



**Şekil 4.5.** *NEB* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

**Tablo 4.5.** *NEB* geninde nonsense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

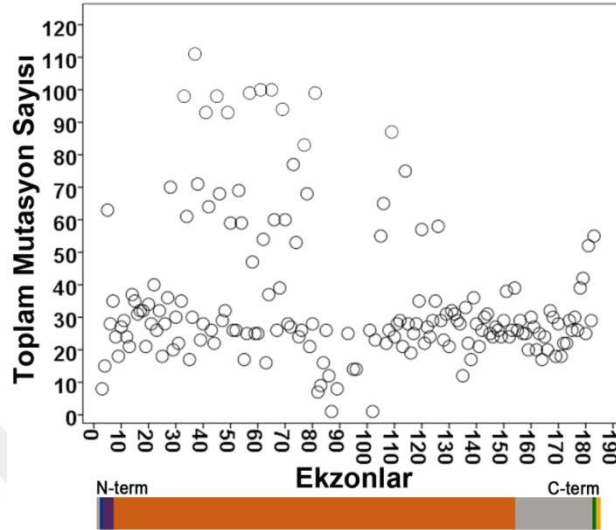
| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 3-5, 7-9, 11-13, 15-19, 21, 22, 24-31, 36, 38-41, 45-50, 52, 53, 55, 57, 59, 60, 63, 65, 67, 69, 71, 75, 76, 77, 79, 81-95, 97--105, 107, 108, 111, 112, 116-119, 121, 123-134, 137-139, 141, 143, 145-147, 149-151, 153, 154, 156, 160-164, 166, 167, 171, 173, 175-178 |
| Küme 2  | 6, 10, 20, 23, 32-35, 37, 44, 51, 54, 58, 61, 62, 64, 66, 68, 70, 72-74, 80, 96, 106, 109, 110, 113-115, 120, 122, 135, 136, 140, 142, 144, 148, 152, 155, 158, 159, 165, 168, 169, 174, 179, 180                                                                        |
| Küme 3  | 14, 42, 43, 56, 78, 157, 170, 172, 181-183                                                                                                                                                                                                                               |

I. küme mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, III. kümede en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 122 ekzondan oluşurken, II. küme 48 ekzondan oluşup genelde tekil ekzonları işaret etmektedir. III. küme ise mutasyon yükünün yüksek olduğu 11 ekzondan oluşmaktadır. En çok nonsense mutasyon yüküne sahip olan III. kümedeki ekzonların indel tipi mutasyonlardan farklı olarak belirli bir bölge yoğunlaşmadığı görülmektedir (Şekil 4.5). *NEB* geninde gözlenen nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ekzon 14, 42, 43, 56, 78, 120, 157, 165, 168, 169, 170, 172, 174, 179, 180, 181, 182, 183'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı nonsense mutasyon sergileyen ekzon olarak tanımlamaktadır. Bu ekzonlardan N-terminal bölgeye yakın olanlar trunkat proteinlerin oluşmasına neden olmaları dolayısıyla hastalık oluşumundan daha etkili olma olasılıkları daha muhtemeldir.

Toplam mutasyon sayısı: *NEB* geninde 181 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 6034 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 33 mutasyonun ekzonlarda olduğu görülmektedir. Gen üzerinde en fazla mutasyon sayısı 111 ile ekzon 37'de, en az mutasyon ise 1 ile ekzon 87 ve 102'de yer almaktadır. Mutasyonların özellikle genin N-terminal bölgesine yakın orta kısma doğru yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.6). Toplam mutasyon sayısı bakımından basit tekrar bölgesinde ortalama 26 (min: 17, maks: 42), süper tekrar bölgesinde ortalama 35 (min: 0, maks: 111) mutasyon gözlemlendi. Gen üzerinde horizontal ve

vertikal ekseninde mutasyonların dağılımı üç mutasyonel bölge varlığına işaret etmektedir. Vertikal ekseninde en az mutasyonun ekzon 90-100 arasında olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.6.** *NEB* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

**Tablo 4.6.** *NEB* geninde görülen tüm mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 82, 83, 85-94, 97-102, 104                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Küme 2  | 9, 13, 19, 25, 29, 35, 44, 55, 63, 79, 84, 95, 96, 105, 107, 113, 116, 121, 130, 135, 137, 138, 141, 159, 162, 164, 166, 169, 171                                                                                                                                               |
| Küme 3  | 3, 6, 8, 10-12, 20, 21, 23, 26, 31, 36, 39, 40, 43, 47, 50-53, 56, 58-60, 62, 67, 71-77, 80, 103, 108-112, 114, 115, 117, 118, 120, 122-124, 127-129, 133, 134, 140, 142, 143, 145, 146, 147-150, 152, 153, 155, 156-158, 160, 161, 163, 165, 172, 173, 175, 177, 179, 180, 182 |
| Küme 4  | 4, 5, 7, 14-18, 22, 24, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 37, 38, 41, 42, 45, 46, 48, 49, 54, 57, 61, 64-66, 68-70, 78, 81, 106, 119, 125, 126, 131, 132, 136, 139, 144, 151, 154, 167, 168, 170, 174, 176, 178, 181, 183                                                                 |

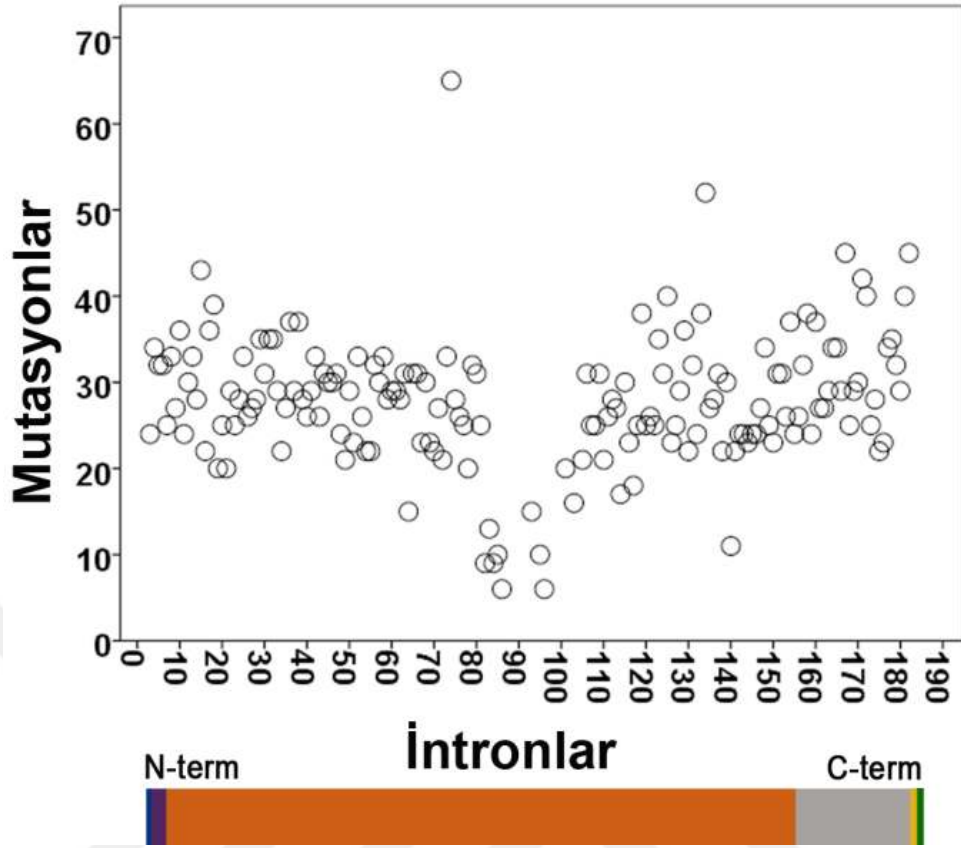
I. küme mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, IV. kümede en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Tüm mutasyonlar bazında gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında 4 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.6). I. küme mutasyon

yükünün düşük olduğu 19 ekzondan oluşurken, II. kümedeki ekzonlar herhangi bir bölgede yoğunlaşmayıp, genellikle tekil ekzonlara işaret etmektedir ve IV. küme ise mutasyon yükünün yüksek olduğu 54 ekzondan oluşmaktadır. En çok mutasyon yüküne sahip olan III. ve IV. kümelerdeki ekzonlar genel olarak tropomiyozin ile bağlantı kurulmasında görev alan süper tekrar bölgesinde yer almaktadır. Öte yandan toplam mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.6). Kümeleme analizi genin N-terminal kısmına yakın yer alan 30-81 ekzonların (31, 35, 44, 55, 63 ve 79. ekzonlar hariç) hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan süper tekrar bölgelerinde iken, diğer proteinler ile etkileşiminden sorumlu olan C-terminal kısımlarında mutasyon yoğunluğunun oldukça düşük olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal uca doğru yoğunlaştığı ekzon 37 ve 81’de ise en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. *NEB* geninde gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ekzon 4, 7, 14, 15, 22, 27, 28, 32, 37, 38, 64, 68, 78, 139, 151, 154, 167, 178 ve 181’i diğer ekzonlardan farklı ve aşırı mutasyona sahip ekzonlar olarak tanımlamaktadır.

*NEB* geninde intron mutasyonları: *NEB* geninde bulunan 180 introndan toplamda 4660 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 25 mutasyonun intronlarda gözlendiği, en fazla mutasyonun 65 ile intron 65’de, en az mutasyonun ise 6 ile intron 86 ve 96’da olduğu görülmektedir (Şekil 4.7). Mutasyon sayısı bakımından basit tekrar bölgesinde ortalama 31 (min: 22, maks: 45), süper tekrar bölgesinde ortalama 19 (min: 15 maks: 25) mutasyonun olduğu gözlendi.





**Şekil 4.7.** *NEB* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Gen haritası üzerinde mor ve gri ile gösterilen basit tekrar bölgesi, turuncu ile gösterilen süper tekrar bölgesi, yeşil ile gösterilen ser bölgesi ve sarı ile gösterilen de SH3 bölgesini temsil etmektedir.

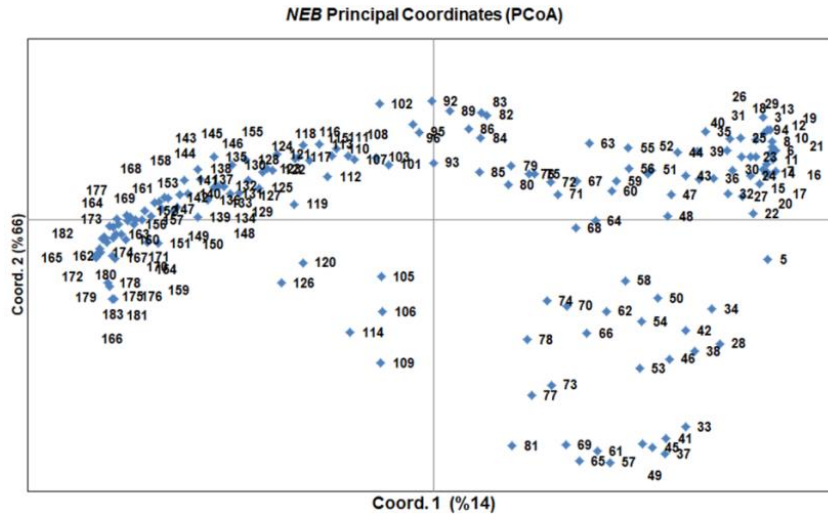
İntronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 3 kümenin varlığına işaret etti (Tablo 4.7). I. küme mutasyon yükünün en az olduğu 23 intronu kapsarken, en fazla intron küme II’de yer almaktadır. II. kümede yer alan intronların gen boyunca dağılım gösterdiği ve herhangi bir bölgede yoğunlaşmadığı görülmektedirken, bu bölgedeki intronların süper tekrar bölgesinde yer aldığı gözlemlendi. En yüksek mutasyon yükünün gözlemlendiği III. kümede ise 23 intron yer almaktadır. Bu kümede yer alan intronların genelde genin C-terminal kısmında yer aldığı gözlenirken, mutasyon yükünün en az olduğu intronların yer aldığı I. kümede olduğu görülmektedir. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde 15, 18, 36, 38, 74, 119, 125, 133, 134, 154, 158, 160, 167, 171, 172, 181 ve 182. intronları diğer intronlardan farklı ve aşırı varyasyonel intron olarak tanımlamaktadır.

**Tablo 4.7.** *NEB* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar

| Kümeler | İntronlar                                                                                                                                                          |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 64, 82-100, 102-104                                                                                                                                                |
| Küme 2  | 3-9, 11-14, 16, 19-28, 30, 31, 33-35, 37, 39-63, 65-73, 75-81, 101, 105-118, 120-124, 126-128, 130-132, 135-153, 155-157, 159, 161-166, 168-170, 173-177, 179, 180 |
| Küme 3  | 10, 15, 17, 18, 29, 32, 36, 38, 74, 119, 125, 129, 133, 134, 154, 158, 160, 167, 171, 172, 178, 181, 182                                                           |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu intronları kapsamaktayken, küme III'de en yüksek mutasyon yüküne sahip intronlar yer almaktadır.

PCoA analizi: *NEB* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu göstermektedir. Analiz gen içerisinde temelde dörtlü bir gruplanmanın olduğu ve bu gruplar içerisinde çok sayıda alt grubun varlığını desteklemektedir (Şekil 4.8). Genin çoğunlukla C-terminal kısmında yer alan ekzonların bir arada bulunduğu gözükmemektedir ve bu ekzonlardaki mutasyon yükleri düşüktür. Ekzon 30 ve 81 arasındakiler de kendi aralarında 2 gruba bölünmüştür ve mutasyon yükünün en fazla olduğu ekzonlar bu iki grupta yer almaktadır.



**Şekil 4.8.** *NEB* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör analizi: *NEB* geninde 181 ekzon ile gerçekleştirilen faktör analizinden tek bir faktör elde edildiği için grafik oluşturulamadı.

#### 4.1.2. *TTN* Geni

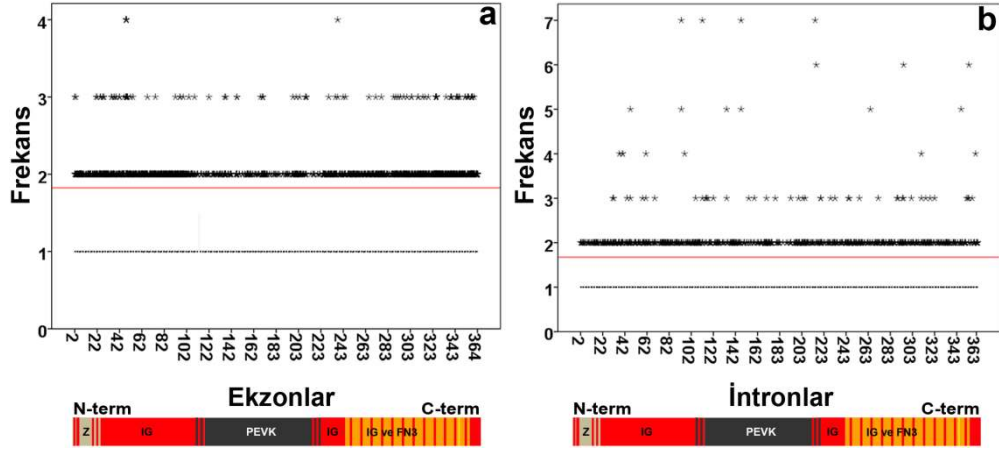
*TTN* geninden ekzon ve intron bölgeler dâhil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 42258 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 33011 tanesi ekzon, 9247 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 20877 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken, bunu 7391 değişim ile sinonim, 780 indel ile çerçeve kayması ve 372 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** *TTN* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N     | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-------|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 20877 | 57,6 | 18               | 3118             |
| Sinonim Mutasyon            | 7391  | 20,6 | 1                | 1112             |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 780   | 3,25 | 0                | 126              |
| Nonsense Mutasyon           | 147   | 2,5  | 0                | 71               |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 9247  | 25,6 | 6                | 48               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*TTN* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *TTN* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 7 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgelerinde 2 ve üstünde görülen mutasyonları aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Buna göre aynı pozisyonda 2 mutasyonun gözlemlendiği 326 ekzon, 3 mutasyonun gözlemlendiği 69 ekzon görülmektedir (Şekil 4.9a).



**Şekil 4.9.** *TTN* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları

Genin 5' başlangıç bölgesinden ve 3' bitiş bölgesinde aşırı varyasyonel pozisyonların diğer bölgelere göre daha yoğun olduğu görülürken, PEVK ve A bandında yer alan Ig-FN3 bölgelerinde aşırı varyasyonel pozisyonların daha az olduğu görülmektedir. Aynı pozisyonda 4 mutasyonun/aşırı varyasyonel bölgenin gözlemlendiği 2 ekzon bölgesi görünmekte olup, bu ekzonlar proksimal Ig bölgesinde yer alan ekzon 48 ve distal Ig bölgesinde yer alan ekzon 248'dir. Ekzon 248 kümeleme analizleri sonucunda mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonlar arasında yer almaktadır. İntron bölgelerinde bir noktada en fazla 7 mutasyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9b). İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölgeler 292 intron bölgesinde görülmektedir. İki mutasyonun gözlemlendiği 326, 3 mutasyonun pozisyonun gözlemlendiği 42, 4 mutasyonun gözlemlendiği 6, 5 mutasyonun pozisyonun gözlemlendiği 6, 6 mutasyonun gözlemlendiği 3, 7 mutasyonun gözlemlendiği 4 intron bölgesi görülmektedir. Ekzon 62 ve 102 arasında aynı pozisyonda varyasyonel pozisyonun bulunduğu bölgelere rastlanmadı. Ekzonlarda olduğu gibi intronlarda da mutasyonların genin baş ve son kısmında yoğunlaştığı görülmekte olup, PEVK bölgesinin bir kısmında hiç aşırı varyasyonel pozisyon gözlenmezken, bir kısmında ise en yüksek seviyede aşırı varyasyonel pozisyonlar görüldü. Hotspot pozisyon varlığı bakımından intronlarda durumun ekzonlara göre daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.9b).

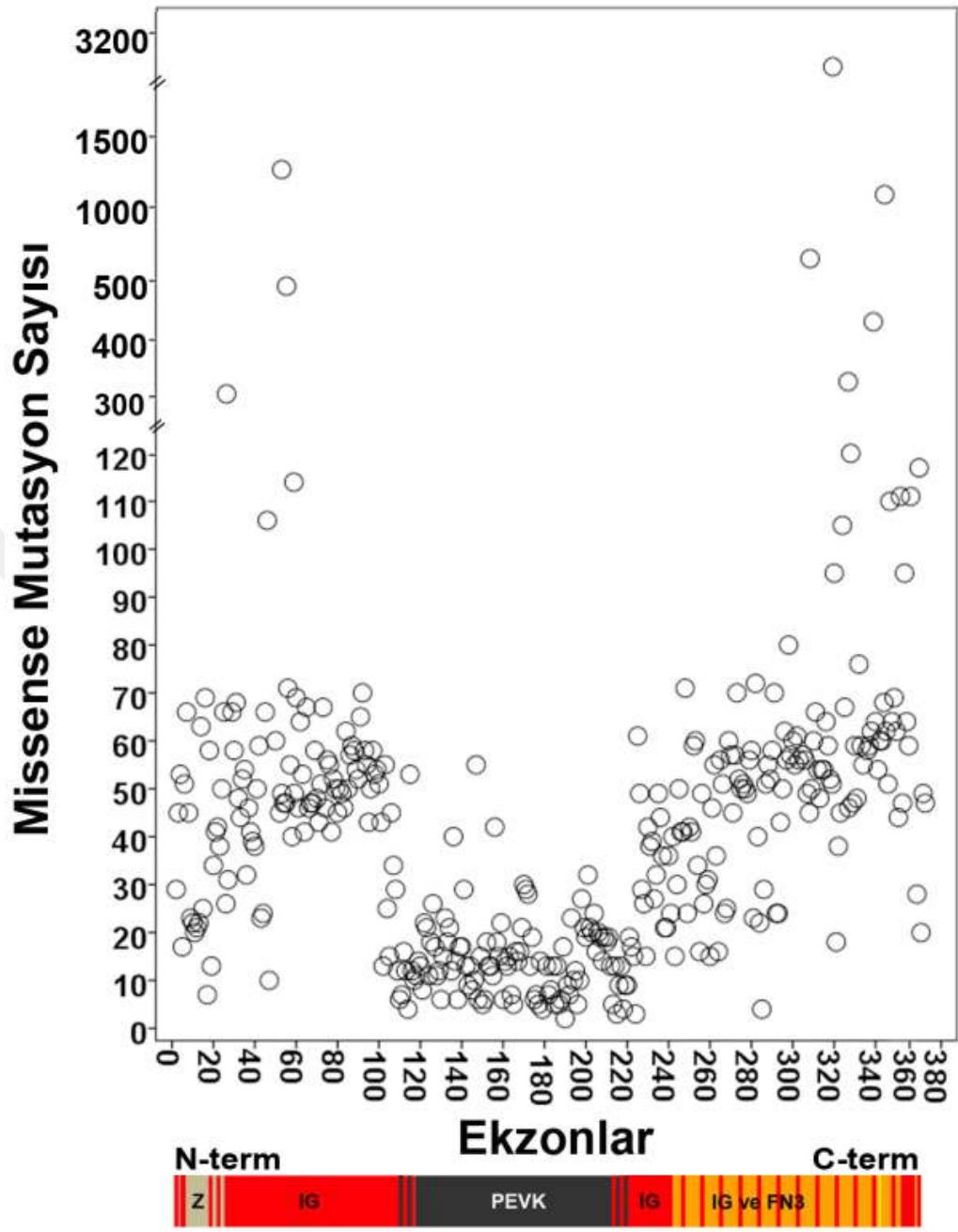
#### 4.1.2.1. *TTN* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*TTN* geni 2. kromozomda yer alır, 364 ekzona sahip ve 304,814 baz uzunluğundadır. Gen üzerinde yer alan 364 ekzondan ekzon 1 kodlama yapmadığı için bu gen bölgesinden veriler analizlerde kullanılmazken, veri tabanlarından topladığımız verilerde ekzon 180 ve 159 bulunamadığı için analizlerde kullanılmadı. Çalışma kapsamında genin 361 ekzonunda gözlenen missense, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *TTN* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{\text{Pearson}}: 0.80, n: 361, P: 0.00$ ).

Missense mutasyonlar: *TTN* geninde 361 ekzonda toplam 20877 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 58 missense mutasyon gözlenirken en fazla missense mutasyon 3118 ile ekzon 327’de, en az mutasyon ise 2 ile ekzon 190’da görülmektedir (Şekil 4.10). Missense mutasyon sayısı bakımından Z diski içerisinde yer alan, Z tekrar bölgesinde ortalama 32 (min: 7, maks: 69), Ig bölgesinde ortalama 44 (min: 17, maks: 66) mutasyon olduğu görülmektedir. I bandı içerisinde yer alan proksimal Ig bölgesinde ortalama 64 (min: 4, maks: 1267), PEVK domaininde ortalama 15 (min:2, maks: 61), distal Ig domaininde ise ortalama 36 (min: 15, maks: 59) mutasyon olduğu gözlemlendi. I bandında proksimal Ig bölümü içerisinde N2A ve N2B bölgeleri yer almaktadır ve bunlar sırası ile iskelet ve kalp kaslarında ifade edilmektedirler. N2B bölgesi yalnızca ekzon 49 tarafından kodlanmakta olup 497 mutasyon görülürken, N2A bölgesi 102 ve 111. ekzonlar bu alanı kodlamakta olup bu alanda ortalama 24 (min:6, maks: 55) mutasyon olduğu gözlemlendi. A bandı içerisindeki Ig ve FN3 domain bölgesinde ortalama 92 (min:16, maks: 3118) mutasyon olduğu gözlemlendi. M bandı içerisinde yer alan TK bölgesi tek bir ekzondan oluşmakta olup 1079 mutasyon görülürken, genin son kısmında bulunan Ig domaininde ortalama 52 (min:20, maks: 117) mutasyon görüldü.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık

parametresi kullanılarak kümeleme analizi gerçekleştirilirken ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilememektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 4 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.9). Genin Z diski içerisinde yer alan Ig bölgesinde mutasyon yükünün genelde yüksek olduğu ekzonlar yer almaktayken, Z tekrar bölgesinde ortalama mutasyon yüküne sahip olan ekzonlar yer almaktadır. Proksimal Ig bölgesinde yer alan ekzonlar genelde küme 2 içerisinde yer almış olup, mutasyon yükleri düşüktür. I bandı içerisinde kasılma sırasındaki uzama ve kısalmadan sorumlu PEVK bölgesinde yer alan ekzonların çoğu küme I ve II'den oluşmakta olup, bu bölgede de genelde mutasyon yükü düşük kümeler yer almaktadır. Yine I bandında yer alan distal Ig bölgesinde diğer bölgelere göre daha fazla mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır. A bandı içerisinde yer alan Ig-FN3 bölgelerinin çoğunu mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonlar oluşturmaktadır. M bandı içerisinde yer alan TK domaini oluşturan 359. ekzon ortalama mutasyon yüküne sahip ekzonların bulunduğu küme II içerisinde yer almaktayken, genin C terminal kısmında bulunan Ig domaininde yer alan ekzonlar da küme II içerisinde yer almaktadır. Tüm gende bakıldığında genin C- terminal kısmında özellikle protein-protein etkileşiminden sorumlu Ig ve FN3 bölgesinde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğu görülmektedir. *TTN* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise ekzon 2, 126, 170, 171, 172, 230, 235, 242, 244, 256, 320, 322, 347, 352, 354 ve 357 'yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır. Bu ekzonların çoğu genin C-terminal kısmına yakın bölgede yer almaktadır.



Şekil 4.10. *TTN* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

**Tablo 4.9.** *TTN* geninde missense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

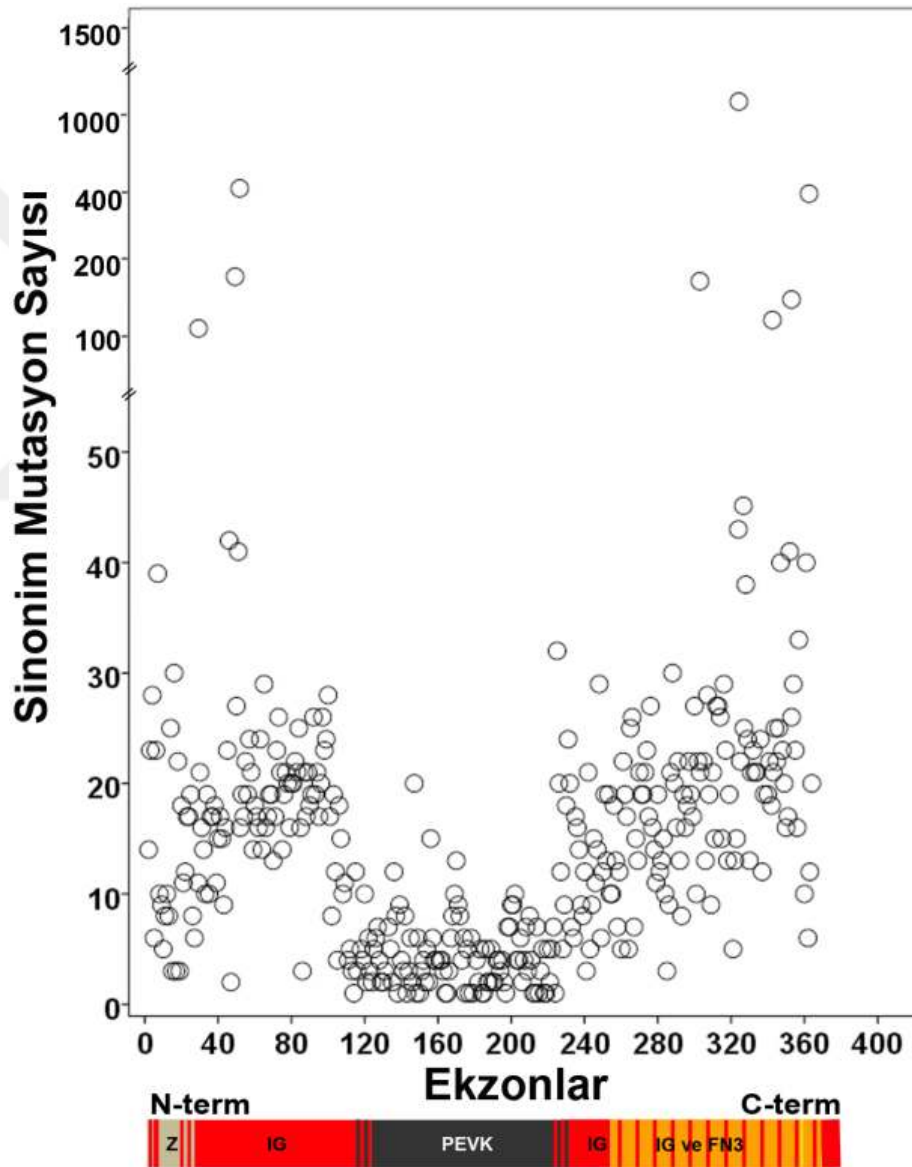
| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 17, 36, 111, 114, 121, 128, 130, 138, 143, 145, 146, 148, 150, 151, 160, 164, 165, 175-177, 179, 180, 182, 183, 185, 187, 188, 190-192, 194, 196, 213, 215, 216, 218, 220, 224, 227-229, 233, 238, 243, 249, 254, 255, 257, 260, 263, 264, 267, 281, 283, 284, 286, 292, 321, 325, 329, 348, 353, 356, 358                                                                                                                                                                                                                                |
| Küme 2  | 4, 9-13, 20, 23, 26-28, 32, 33, 37, 38, 43-49, 52-55, 58, 59, 61, 63, 64, 66-68, 70-72, 74, 77-83, 85, 89, 90, 94, 95, 96, 98-109, 112, 113, 115-120, 124, 127, 129, 131, 135-137, 139, 141, 142, 144, 147, 152-155, 156, 158, 161-163, 166-168, 173, 178, 181, 184, 186, 195, 197, 205, 208, 211, 212, 214, 217, 219, 222, 226, 231, 232, 236, 237, 239, 241, 246, 247, 251, 262, 266, 270-272, 274, 275-280, 285, 288-290, 293, 295, 297, 299, 301, 303-309, 312-315, 317-319, 326, 327, 330, 331, 334-336, 340, 341, 346, 351, 359-364 |
| Küme 3  | 3, 5-7, 14-16, 18, 19, 22, 24, 25, 29, 30, 31, 34, 35, 39-42, 48, 50, 51, 56, 57, 60, 62, 65, 69, 73, 75, 76, 84, 86-88, 91-93, 97, 110, 122, 123, 125, 132-134, 140, 149, 157, 159, 169, 174, 189, 193, 199, 200, 202, 203, 206, 207, 209, 210, 221, 223, 225, 234, 240, 248, 252, 253, 258, 259, 268, 273, 291, 296, 298, 300, 302, 310, 311, 316, 323, 332, 333, 337, 338, 339, 342-345, 349, 350, 355                                                                                                                                 |
| Küme 4  | 2, 8, 21, 126, 170-172, 198, 201, 204, 230, 235, 242, 244, 245, 250, 256, 261, 265, 269, 282, 287, 294, 320, 322, 324, 326, 347, 352, 354, 357                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme IV'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Sinonim mutasyonlar: *TTN* geninde 361 ekzonda toplam 7391 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 21 sinonim mutasyon gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 1112 ile ekzon 326'da en az mutasyon ise 1 olarak görülmekte olup yalnızca 1 sinonim mutasyonun görüldüğü ekzon sayısı oldukça fazladır (Şekil 4.11). Sinonim mutasyon sayısı bakımından Z diski içerisinde yer alan Ig domaininde ortalama 22 (min: 6, maks: 39), Z tekrar bölgesinde ortalama 11 (min: 3, maks: 30) mutasyon olduğu görülmektedir. I bandı içerisinde yer alan proksimal Ig domaininde ortalama 23 (min: 2, maks: 414), PEVK domaininde ortalama 5 (min:0, maks: 32), distal Ig domaininde ise ortalama 13 (min: 3, maks: 29) mutasyon olduğu gözlemlendi. I bandında proksimal Ig bölümü içerisinde N2A ve N2B bölgeleri yer almaktadır ve bunlar sırası ile iskelet ve kalp kaslarında ifade edilmektedirler. N2B bölgesi



yalnızca ekzon 49 tarafından kodlanmakta olup 189 mutasyon görülürken, N2A bölgesi 102 ve 111. ekzonlar bu alanı kodlamakta olup bu alanda ortalama 11 (min:0, maks: 19) mutasyon olduğu gözlemlendi. A bandı içerisinde Ig ve FN3 domain bölgesinde ortalama 33 (min:3, maks: 1112) mutasyon olduğu gözlemlendi. M bandı içerisinde yer alan TK bölgesi tek bir ekzondan oluşmakta olup 399 mutasyon görülürken, genin son kısmında bulunan Ig domaininde ortalama 18 (min:6, maks: 40) mutasyon görüldü.



**Şekil 4.11.** *TTN* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi gerçekleştirilirken ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilememektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 4 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.10). Genin Z diski içerisinde yer alan Ig bölgesinde genelde küme II ve III'deki ekzonlar yer almaktayken, Z tekrar bölgesi de çoğunlukla küme I ve II'den oluşmaktadır. Proksimal Ig bölgesinde yer alan ekzonlar genelde küme I içerisinde yer almış olup, mutasyon yükleri düşüktür. I bandı içerisinde yer alan kasılma sırasındaki uzama ve kısalmadan sorumlu PEVK bölgesinde yer alan ekzonların çoğu küme I ve II'den oluşmakta olup, bu bölgede de genelde mutasyon yükü düşük kümeler yer almaktadır.

**Tablo 4.10.** *TTN* geninde sinonim mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

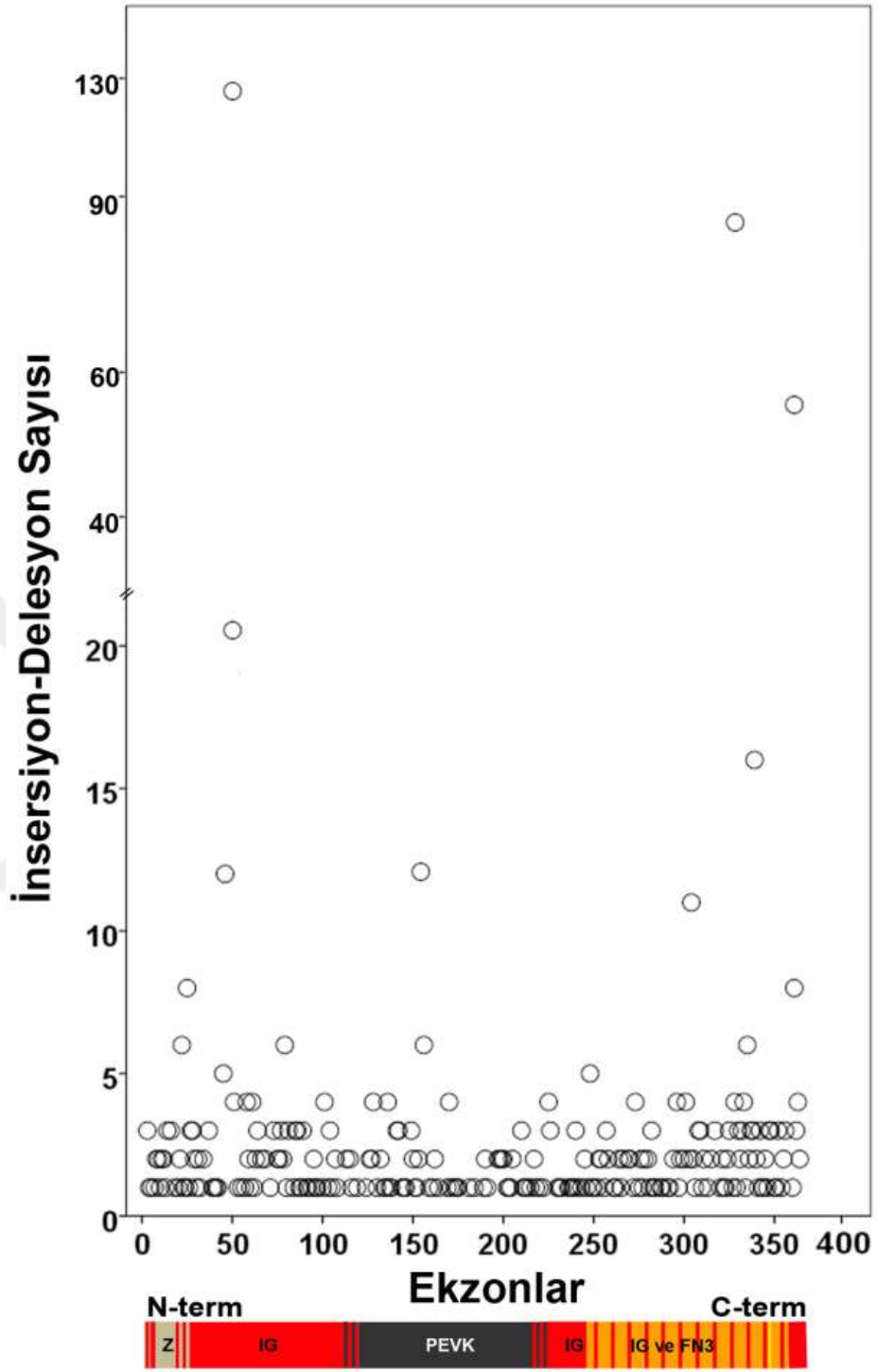
| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 10, 15, 17, 19, 26, 27, 29, 33, 35, 42, 47, 59, 64, 70, 75, 86, 105, 108, 110, 113-117, 119, 121, 123, 124, 128, 129-132, 135, 138, 140, 141, 143, 144, 146, 148, 150-153, 155, 156, 158-166, 173, 175, 177, 179-182, 184, 185, 187, 188, 190-197, 203, 204, 206, 207, 209, 211-213, 215, 216, 218, 219, 221, 224, 227, 228, 233, 234, 237, 238, 241, 243, 246, 247, 249, 252, 254, 257, 258, 260, 264, 267, 278, 279, 281, 283-285, 292, 301, 306, 309, 311, 315, 318, 321, 325, 329, 330, 337, 348, 353, 356, 358, 362, 363                                           |
| Küme 2  | 4-6, 8, 9, 11-14, 18, 20-25, 28, 30-32, 34, 36-41, 43-46, 48-58, 60-63, 65-69, 71-74, 76-85, 87-104, 106, 107, 111, 112, 118, 122, 125-127, 133, 134, 136, 137, 139, 142, 145, 147, 149, 154, 157, 167, 168, 172, 174, 176, 178, 183, 186, 189, 198, 199, 205, 208, 210, 214, 217, 220, 222, 226, 229, 231, 232, 236, 239, 240, 244, 245, 248, 250, 251, 253, 255, 259, 262, 263, 266, 269-277, 280, 282, 288-291, 293, 295-300, 302-305, 307, 308, 310, 312-314, 316, 317, 319, 323, 326, 327, 331-336, 338, 339, 340-346, 349, 350, 351, 354, 355, 359, 360, 361, 364 |
| Küme 3  | 2, 3, 7, 16, 109, 120, 169, 170, 171, 200-202, 223, 225, 230, 235, 242, 256, 268, 287, 294, 320, 322, 324, 328, 347, 352, 357                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Küme 4  | 261, 265, 286                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme IV'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

A bandı içerisinde yer alan Ig-FN3 bölgelerinin çoğunu mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonlar oluşturmaktadır. M bandı içerisinde yer alan TK domaini oluşturan 359. ekzon ortalama mutasyon yüküne sahip ekzonların bulunduğu küme II içerisinde yer almaktayken, genin C-terminal kısmında bulunan Ig domaininde yer alan ekzonlar da küme I ve II içerisinde yer almaktadır. Genin C-terminal kısmında özellikle protein-protein etkileşiminden sorumlu Ig ve FN3 bölgesinde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğu görülmektedir (Tablo 4.10). *TTN* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise gen üzerinde 29 ekzonu (ekzon 2, 3, 4, 7, 16, 65, 86, 109, 120, 137, 169, 170, 171, 200, 201, 230, 242, 261, 265, 268, 286, 287, 294, 307, 320, 322, 328, 347 ve 357) aşırı varyasyonel ekzonlar olarak tanımladı. Bu ekzonların çoğunun genin C-terminal kısmına yakın bölgede yer aldığı görülmektedir

Çerçeve kayması mutasyonları: *TTN* geninde 361 ekzonda toplamda 780 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyonların ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 2.1 nonsinonim mutasyonun gözleendiği en fazla indelin 126 ile ekzon 48’de olduğu görülmektedir. Sayıca oldukça az ekzonda 1 indel mutasyon görüldü ya da hiç görülmeydi (Şekil 4.12). İndel sayısı bakımından Z diski içerisinde yer alan Ig domaininde ve Z tekrar bölgesinde ortalama 2 (min: 0, maks: 3), indel mutasyon saptandı. I bandı içerisinde yer alan proksimal Ig domaininde ortalama 4 (min: 0, maks: 126), PEVK domaininde ortalama 2 (min:0, maks: 13), distal Ig domaininde ise ortalama 2 (min:0, maks: 5) mutasyon gözleendi. I bandında proksimal Ig bölümü içerisinde N2A ve N2B bölgeleri yer almaktadır ve bunlar sırası ile iskelet ve kalp kaslarında ifade edilmektedirler. N2B bölgesi yalnızca ekzon 49 tarafından kodlanmakta olup 19 mutasyon görüldürken, N2A bölgesi 102 ve 111. ekzonlar bu alanı kodlamakta olup bu alanda ortalama 2 (min:0, maks: 3) mutasyon saptandı. A bandı içerisinde Ig ve FN3 domain bölgesinde ortalama 3 (min:0, maks: 84) mutasyon olduğu gözleendi. M bandı içerisinde yer alan TK bölgesi tek bir ekzondan oluşmakta olup 54 mutasyon gözlenirken, genin son kısmında yer alan Ig domaininde ortalama 4 (min:1, maks: 8) mutasyon görüldü.

Ekzonlar arasında çerçeve kayması mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi gerçekleştirilirken ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilmemektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.11). Genin Z diski içerisinde yer alan Ig ve Z tekrar bölgesinde küme II içerisinde yer alan genelde mutasyon yükünün düşük olduğu ekzonlar yer almaktadır. Proksimal Ig bölgesinde yer alan ekzonlar genelde küme I içerisinde yer almış olup mutasyon yükleri düşüktür. I bandı içerisinde kasılma sırasındaki uzama ve kısalmadan sorumlu PEVK bölgesinde yer alan ekzonların çoğu küme I ve II'den oluşmaktadır. Fakat mutasyon yükünün en fazla olduğu ekzonların bulunduğu küme III'de bulunan ekzonların neredeyse tamamı bu bölge içerisinde yer almaktadır. Yine I bandında yer alan distal Ig bölgesinde bulunan mutasyonların neredeyse tamamı mutasyon yükü en az olan ekzonların oluşturduğu küme I'den oluşmaktadır. A bandı içerisinde yer alan Ig-FN3 bölgelerinin çoğunu düşük ve ortalama mutasyon yüküne sahip olan küme I ve II oluşturmaktadır. M bandı içerisinde yer alan TK domaini oluşturan 359. ekzon düşük mutasyon yüküne sahip ekzonların bulunduğu küme I içerisinde yer almaktayken, genin C terminal kısmında bulunan Ig domaininde yer alan ekzonlar da küme I ve II içerisinde yer almaktadır. Tüm gene bakıldığında genin N terminal kısmında özellikle proteinin elastikiyetinden sorumlu PEVK bölgesinde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğu ekzonlar yer almaktadır. *TTN* geninde gözlenen çerçeve kayması mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise 37 ekzonu (ekzon 3, 22, 25, 27, 46, 48, 79, 104, 113, 116, 126, 127, 128, 132, 136, 141, 142, 147, 149, 150, 153, 156, 162, 170, 190, 197, 198, 199, 200, 205, 210, 217, 225, 240, 248, 282 ve 362) aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımladı. Bu ekzonların çoğu genin PEVK bölgesinde yer almaktadır.



**Şekil 4.12.** *TTN* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı

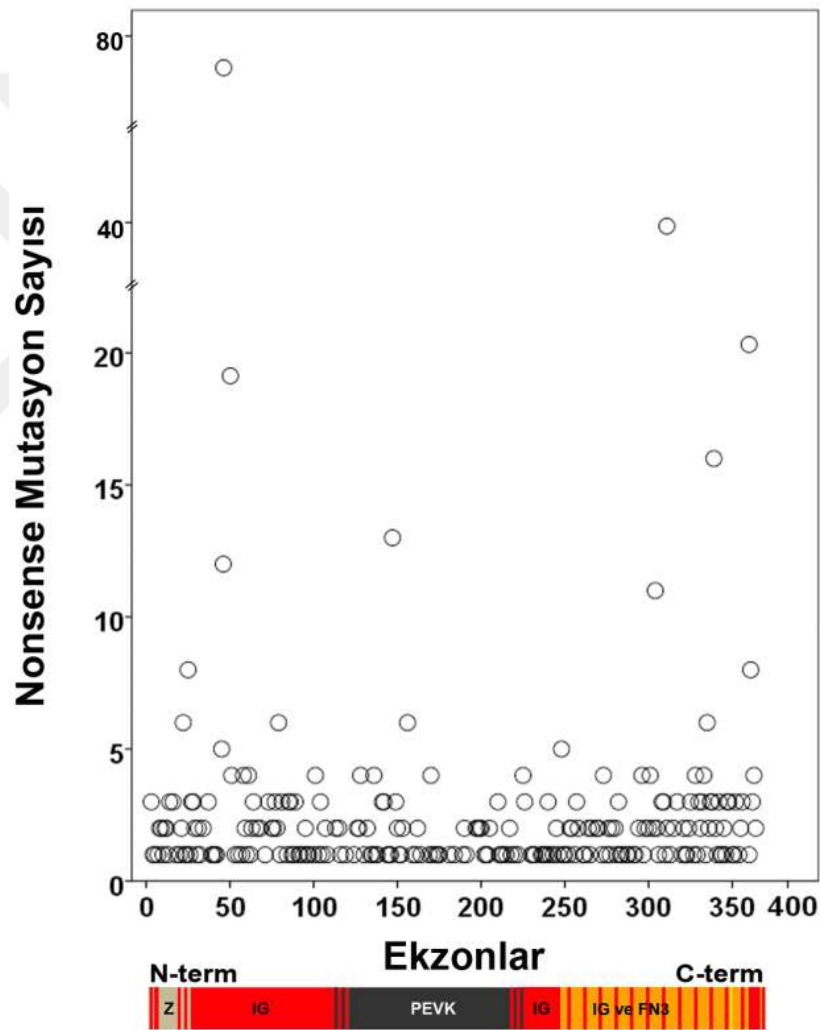
**Tablo 4.11.** *TTN* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar.

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 2, 4, 6, 7, 10, 13-20, 23, 24, 26, 28-36, 38-44, 47, 49-57, 59-78, 80-100, 102, 103, 106-112, 114, 115, 117, 118, 120-123, 125, 129, 131, 133, 139, 140, 143, 148, 152, 154, 155, 157, 158, 160, 163, 165-172, 176-180, 182, 183, 185-188, 192-196, 201, 206-209, 211, 214, 216, 218, 219, 221, 223, 224, 226-239, 241-244, 246, 247, 249-257, 259-272, 274-281, 283-293, 295, 297, 298-300, 302-327, 329-332, 334, 335-360, 364 |
| Küme 2  | 3, 5, 8, 9, 11, 12, 21, 27, 37, 45, 46, 48, 58, 61, 79, 101, 104, 105, 116, 119, 124, 126, 127, 130, 132, 134-138, 141, 144, 145, 146, 150, 151, 153, 156, 159, 161, 162, 164, 169, 171, 173-175, 181, 184, 189-197, 198-200, 202-205, 212, 213, 215, 217, 220, 222, 240, 245, 248, 258, 273, 282, 294, 296, 301, 328, 333, 361-363                                                                                              |
| Küme 3  | 22, 25, 113, 128, 142, 147, 149, 170, 210, 225                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme III'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Nonsense mutasyonlar: *TTN* geninde 361 ekzonda toplamda 147 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 3 nonsense mutasyonun olduğu ve en fazla nonsense mutasyonun ise 71 ile ekzon 48'de olduğu görülmektedir. Tek ya da hiç nonsense mutasyonun olmadığı çok sayıda ekzon bölgesi gen üzerinde yer almaktadır (Şekil 4.13). Stop kodonu oluşturan nonsense mutasyon sayısı bakımından Z diski içerisinde yer alan, Z tekrar bölgesinde ortalama 1 (min: 0, maks: 1), Ig domaininde ortalama 1 (min: 0, maks: 2) mutasyon olduğu görülmektedir. I bandı içerisinde yer alan proksimal Ig domaininde ortalama 4 (min: 0, maks: 71), PEVK domaininde ortalama 1 (min:0, maks: 3), distal Ig domaininde ise ortalama 1 (min: 0, maks: 2) mutasyon olduğu gözlemlendi. I bandında proksimal Ig bölümü içerisinde N2A ve N2B bölgeleri yer almaktadır, bunlar sırası ile iskelet ve kalp kaslarında ifade edilmektedirler. N2B bölgesi yalnızca ekzon 49 tarafından kodlanmakta olup 6 mutasyon görülürken, N2A bölgesini 102 ve 111. ekzonlar kodlamakta olup bu alanda ortalama 2 (min:0, maks: 4) mutasyon olduğu saptandı. A bandı içerisinde Ig ve FN3 domain bölgesinde

ortalama 2 (min:0, maks: 39) mutasyon, M bandı içerisinde yer alan TK bölgesi 22 mutasyon (tek bir ekzondan oluşmakta), genin son kısmında bulunan Ig domainde ise ortalama 3 (min:0, maks: 6) mutasyon görüldü. Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi gerçekleştirilirken ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilmemektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.12).



**Şekil 4.13.** *TTN* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

**Tablo 4.12.** *TTN* geninde nonsense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 3, 8-10, 14, 15, 17, 20, 21, 23-26, 28, 31, 33, 38, 39, 41, 44, 47, 49, 50, 52, 54, 57, 58, 60, 62, 63, 65, 66, 68, 71-73, 75-77, 81, 83-88, 91-94, 97, 98, 101, 102, 105, 108-114, 116-124, 127-135, 137-150, 152, 153, 155, 157-162, 164, 166, 167, 168, 171-177, 179, 180, 182-193, 195-197, 200, 202-210, 212, 214-226, 228, 229, 231-236, 241-245, 247-249, 251, 254-256, 258, 260, 261, 264, 266, 268, 270, 271, 274, 276, 278, 281, 283-287, 289, 292, 293, 296, 299, 300, 303, 312, 313, 315, 321, 323-325, 327, 329, 330, 333, 335, 336, 338, 340, 341, 343-346, 348, 355, 356, 358, 362 |
| Küme 2  | 4, 6, 7, 11-13, 16, 18, 27, 29, 30, 32, 34, -37, 40, 42, 43, 51, 53, 55, 56, 59, 61, 64, 67, 69, 70, 78, 79, 80, 89, 90, 95, 96, 99, 103, 104, 106, 115, 227, 237-239, 246, 250, 252, 253, 257, 259, 262, 263, 267, 272, 273, 275, 277, 280, 288, 290, 291, 294, 297, 298, 301, 302, 304-311, 314, 316-320, 326, 328, 331, 332, 334, 337, 339, 347, 349-354, 357, 359, 360, 361, 363                                                                                                                                                                                                              |
| Küme 3  | 2, 5, 19, 22, 45, 46, 48, 74, 82, 100, 107, 125, 126, 136, 151, 154, 156, 163, 165, 169, 170, 178, 181, 194, 198, 199, 201, 211, 213, 230, 240, 265, 269, 279, 282, 295, 322, 342, 364                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme III'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Genin Z diski içerisinde yer alan Ig bölgesinde yer alan ekzonlar küme II ve III'de yer almaktadır. Yine Z disk içerisinde yer alan Z tekrar bölgesinde küme I içerisinde yer alan genelde mutasyon yükünün düşük olduğu ekzonlar yer almaktadır. Proksimal Ig bölgesinde yer alan ekzonlar genelde küme I içerisinde yer almış olup, mutasyon yükleri düşüktür. I bandı içerisindeki PEVK bölgesinde yer alan ekzonların çoğu mutasyon yükünün düşük olduğu küme I içerisindeki ekzonlar yer almaktadır. Yine I bandında yer alan distal Ig bölgesinde bulunan mutasyonların neredeyse tamamı mutasyon yükü en az olan ekzonların oluşturduğu küme I'den oluşmaktadır. A bandı içerisinde yer alan Ig-FN3 bölgelerinin çoğunu yüksek ve ortalama mutasyon yüküne sahip olan küme II ve III içerisinde yer almaktadır. M bandı içerisinde yer alan ve TK domaini oluşturan ekzon 359 ortalama mutasyon yüküne sahip ekzonların bulunduğu küme II içerisinde yer almaktayken, genin C-terminal kısmında bulunan Ig domaininde yer alan ekzonlar da yine küme II içerisinde yer almaktadır. Tüm gende bakıldığında genin C-terminal kısmında özellikle protein-protein etkileşiminden sorumlu bölgesinde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla



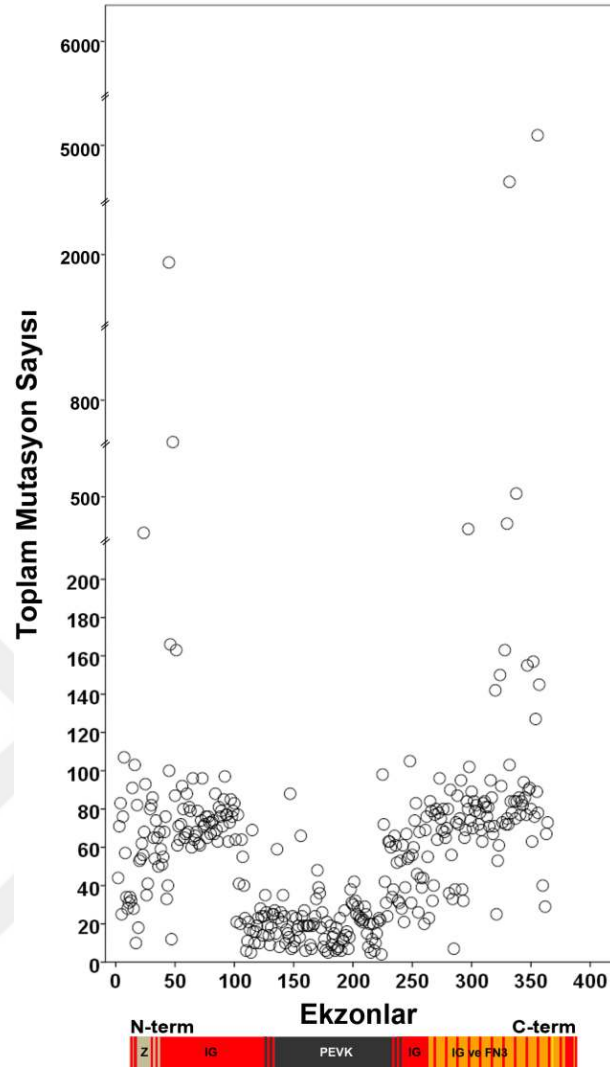
olduğu ekzonlar yer almaktadır (Tablo 4.12). *TTN* geninde gözlenen nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise 37 ekzonu (ekzon 2, 5, 19, 22, 45, 46, 48, 74, 82, 100, 107, 125, 126, 136, 151, 154, 156, 163, 165, 169, 170, 178, 181, 194, 198, 199, 201, 213, 230, 240, 265, 269, 279, 282, 295, 342 ve 364) aşırı varyasyonel ekzonlar olarak tanımladı. Bu ekzonların çoğunluğu genin proksimal-distal Ig ve PEVK bölgesinde yer almaktadır.

Toplam mutasyon sayısı: *TTN* geninde 361 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 33011 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 81 mutasyon ekzonlarda gözlemlendi. En fazla mutasyon sayısı 4353 ile ekzon 326'da gözlenirken, en az mutasyon 4 ile ekzon 224'de saptandı (Şekil 4.14). Toplam mutasyon sayısı bakımından Z diski içerisinde yer alan Z tekrar bölgesinde ortalama 50 (min: 10, maks: 107), Ig domaininde ortalama 60 (min: 25, maks: 83) mutasyon gözlemlendi. I bandı içerisinde yer alan proksimal Ig domaininde ortalama 91 (min: 6, maks: 1878), PEVK domaininde ortalama 21 (min:4, maks: 388), distal Ig domaininde ise ortalama 51 (min: 30, maks: 105) mutasyon olduğu saptandı. I bandında proksimal Ig bölümü içerisinde N2A ve N2B bölgeleri yer almaktadır ve bunlar sırası ile iskelet ve kalp kaslarında ifade edilmektedirler. N2B bölgesi yalnızca ekzon 49 tarafından kodlanmakta olup 711 mutasyon görülürken, N2A bölgesi 102 ve 111. ekzonlar bu alanı kodlamakta olup, bu alanda ortalama 36 (min:6, maks:77) mutasyon vardır. A bandı içerisinde Ig ve FN3 domain bölgesinde ortalama 2 (min:0, maks: 39) mutasyon, M bandı içerisinde yer alan TK bölgesinde 1554 mutasyon (tek bir ekzondan oluşmakta), genin son kısmında Ig domaininde ortalama 76 (min:29, maks: 171) mutasyon görüldü.

**Tablo 4.13.** *TTN* geninde görülen tüm mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 17, 114, 115, 117, 121, 124, 128-130, 138, 143, 146, 148, 150, 151, 155, 160, 164, 165, 175-177, 179, 180, 182-185, 187, 188, 190-192, 194, 196, 197, 213, 215, 216, 218, 219, 224, 227, 229, 233, 238, 243, 249, 254, 255, 257, 260, 264, 267, 281, 283, 284, 285, 292, 321, 325, 329, 348, 353, 356, 358,                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Küme 2  | 9-13, 15, 20, 23, 26-28, 32, 33, 35-38, 42-45, 47, 49, 52-55, 58, 59, 61, 64, 66-68, 70-72, 74-83, 85, 86, 88, 89, 90-, 96, 98, 99, 101-108, 110-113, 116, 118, 119, 127, 131, 135, 140, 141, 144, 145, 152-154, 156, 158, 161-163, 166, 167, 173, 178, 181, 186, 195, 206-208, 211, 212, 214, 217, 220, 222, 226, 231, 232, 234, 236, 237, 239, 241, 246, 247, 251-253, 258, 262, 263, 266, 270-, 272, 274-280, 289, 290, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305-309, 312, 313, 315, 318, 319, 326, 327, 330, 331, 334, 335, 336, 337, 340-342, 346, 350, 351, 360-364 |
| Küme 3  | 3-8, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 29-31, 34, 39, 40, 41, 46, 48, 50, 51, 56, 57, 60, 62, 63, 65, 69, 73, 84, 87, 91, 92, 97, 100, 109, 120, 122, 123, 125, 132-134, 136, 137, 139, 142, 147, 149, 157, 159, 168, 174, 189, 193, 199, 200, 202-205, 209, 210, 221, 223, 248, 259, 268, 273, 288, 291, 296, 298, 300, 302, 304, 310, 311, 314, 316, 317, 323, 332, 333, 338, 339, 343-345, 349, 355, 359                                                                                                                                                          |
| Küme 4  | 2, 126, 169, 171, 172, 198, 201, 230, 240, 242, 244, 245, 250, 269, 282, 294, 320, 322, 324, 352, 354, 357                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Küme 5  | 170, 225, 256, 261, 265, 286, 287, 328, 347                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme V'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.



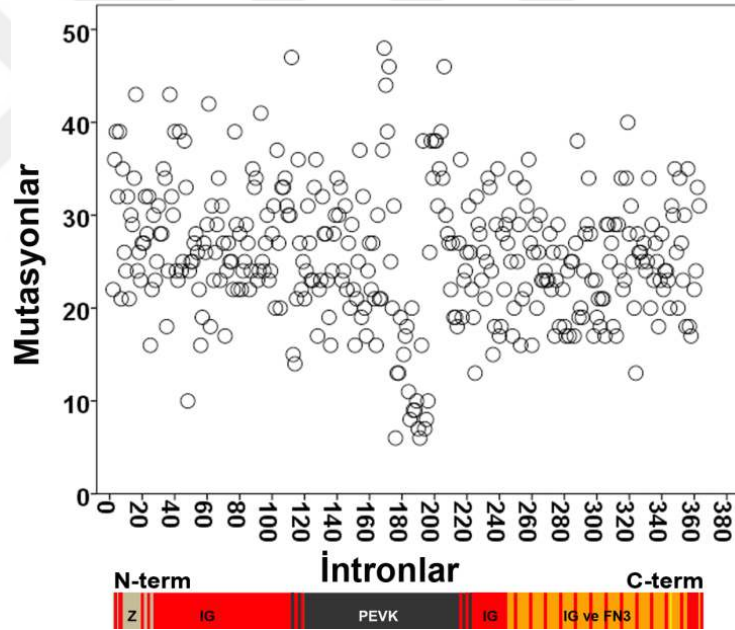
**Şekil 4.14.** *TTN* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

Ekzonlar arasında toplam mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi gerçekleştirilirken ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilmemektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 5 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.13). Genin Z diski içerisinde yer alan Ig bölgesinde yer alan ekzonlar küme III'de, Z disk içerisinde ve Z tekrar bölgesinde yer alan ekzonlar küme II ve III arasında yer almaktadır. Proksimal Ig bölgesinde yer alan ekzonlar genelde küme II ve III içerisinde yer almakta ve yine yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar bu bölgededir.

I bandı içerisindeki PEVK bölgesinde yer alan ekzonların çoğu küme I, II ve III' den oluşmaktadır. Yine I bandında yer alan distal Ig bölgesinde bulunan mutasyonların neredeyse tamamı mutasyon yükü aza yakın olan ekzonların oluşturduğu küme II'de yer alır. A bandı içerisinde yer alan Ig-FN3 bölgeleri içerisinde düşük mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer alsa da mutasyon yükü en fazla olan ekzonların bulunduğu küme V'deki ekzonların neredeyse tamamı bu bölgenin içerisinde yer almaktadır. M bandı içerisinde yer alan TK domaini oluşturan 359. ekzon küme III içerisinde, genin C-terminal kısmında bulunan Ig domaininde yer alan ekzonlar da küme II içerisinde yer alır. Genin C-terminal kısmına yakın bulunan Ig ve FN3 bölgesinde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğu ekzonlar yer almaktadır. *TTN* geninde gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise gen üzerindeki 128 ekzonu diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır. Bu ekzonların çoğunluğu genin distal Ig, PEVK ve C-terminal kısmına yakın bulunan Ig-FN3 bölgelerinde yer almaktadır.

*TTN* geninde intron mutasyonları: *TTN* geninde bulunan 360 introndan toplamda 9247 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 26 mutasyonun intronlarda gözlemlendiği, en fazla mutasyonun 48 ile intron-169'da, en az mutasyonun ise 6 ile intron 176 ve 191'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Toplam mutasyon sayısı bakımından Z diski içerisinde yer alan, Z tekrar bölgesinde ortalama 30 (min: 21, maks: 43), Ig domaininde ortalama 32 (min: 21, maks: 39) mutasyon olduğu görülmektedir. I bandı içerisinde yer alan proksimal Ig domaininde ortalama 27 (min: 10, maks: 47), PEVK domaininde ortalama 24 (min:6, maks:48), distal Ig domaininde ise ortalama 26 (min:17, maks:35) mutasyon olduğu gözlemlendi. I bandında proksimal Ig bölümü içerisinde N2A ve N2B bölgeleri yer almaktadır ve bunlar sırası ile iskelet ve kalp kaslarında ifade edilmektedirler. N2B bölgesi yalnızca intron 49 tarafından kodlanmakta olup 49 mutasyon görülürken, N2A bölgesi 102 ve 111. intronlar bu alanı kodlamakta olup bu alanda ortalama 30 (min:20, maks:34) mutasyon olduğu gözlemlendi. A bandı içerisinde Ig ve FN3 domain bölgesinde ortalama 25 (min:16, maks:36) mutasyon olduğu gözlemlendi. Genin son kısmında bulunan Ig domaininde ortalama 28 (min:22, maks:33) mutasyon saptandı.

İntronlar arasında mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi gerçekleştirilirken intron sayısı çok fazla olduğu için ısı-haritaları gösterilememektedir. Kümeleme analizi intron arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.14). Genin Z diski içerisinde yer alan Ig bölgesinde ve Z tekrar bölgesinde yer alan intronlar küme II ve III’de yer almaktadır ve bu kümeler mutasyon yükünün fazla olduğu kümelerdir. Proksimal Ig bölgesindeki intronlar yüksek mutasyon yüküne sahip küme II ve III içerisinde yer almaktadır. I bandı içerisindeki PEVK bölgesinde yer alan intronların çoğu küme II ve III’den oluşmakta olup, mutasyon yükleri oldukça fazladır. Yine I bandında yer alan distal Ig bölgesinde bulunan mutasyonların neredeyse tamamı küme 2 içerisinde yer almaktadır.



**Şekil 4.15.** *TTN* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı

A bandı içerisinde yer alan Ig-FN3 bölgelerinin çoğu küme 2’den oluşmaktadır. Genin Ig domaininde yer alan intronlar küme 3 içerisinde yer almaktadır. Tüm gene bakıldığında genin C-terminal kısmına yakın bulunan Ig ve FN3 bölgesinde mutasyon yoğunluğu fazla intronların yer aldığı görülmektedir. *TTN* geninde gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise gen üzerindeki 128 intronu aşırı varyasyonel intron olarak tanımlamaktadır. Bu

intronların büyük kısmı genin C-terminal kısmına yakın protein-protein etkileşiminden sorumlu olan Ig-FN3 bölgelerinde yer almaktadır.

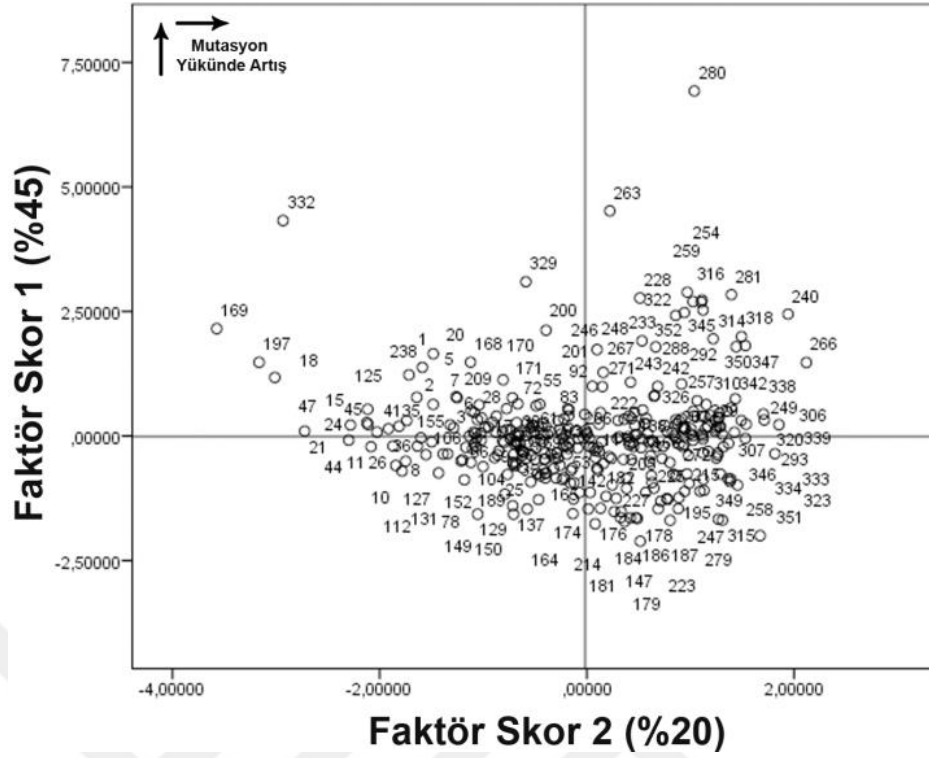
**Tablo 4.14.** *TTN* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar

| Kümeler | İntronlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 25, 48, 56, 71, 113, 114, 128, 136, 151, 158, 164, 176, 177, 178, 180-182, 184, 185, 187-192, 194-196, 225, 236, 240, 248, 253, 260, 274, 281, 283, 286, 298, 305, 312, 324, 358, 359                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Küme 2  | 2, 5, 7, 9-14, 17-24, 26-32, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 49-55, 57-60, 62-66, 68-70, 72-76, 78-87, 91, 92, 94-102, 104, 105, 109-111, 115, 117-125, 129, 130-135, 137-139, 141, 143-150, 152, 153, 155-157, 159, 160-163, 165-167, 173-175, 179, 183, 186, 197, 202, 207-215, 217-224, 226-232, 235, 237, 238, 241-247, 249, 251, 252, 254, 256, 257, 259, 261-273, 275-280, 282, 284, 285, 287, 289-294, 296, 297, 299-304, 306-311, 313, 314, 316, 317, 320-323, 325-331, 333-347, 349, 350, 352-355, 357, 360, 361, 363 |
| Küme 3  | 3, 4, 6, 8, 15, 16, 33, 34, 37, 40, 43, 46, 47, 61, 67, 77, 88-90, 93, 103, 106-108, 112, 116, 126, 127, 140, 142, 154, 168-172, 193, 198-201, 203-206, 216, 233, 234, 239, 250, 255, 258, 288, 295, 315, 318, 319, 332, 348, 351, 356, 362                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu intronları kapsamaktayken, küme III'de en yüksek mutasyon yüküne sahip intronlar yer almaktadır.

PCoA analizi: *TTN* geni ekzon sayısının fazla olmasından kaynaklı olarak PCoA analizi gerçekleştirilemedi.

Faktör (PCA) analizi: *TTN* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğinde gen üzerinde belirgin bir grup bulunmamaktadır. Fakat diğer analizlerde de desteklendiği gibi genin C-terminal kısmına yakın yerde bulunan PEVK, distal Ig ve Ig-FN3 bölgelerini kapsayan bölgede mutasyon yükünün belirgin şekilde yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** *TTN* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi

## 4.2. Fonksiyonel Mekanizmalardan Sorumlu Proteinlerin Sentezledikleri Genler

### 4.2.1 Enzimatik Aktivite Mekanizması

#### 4.2.1.1. *MTM1* Geni

*MTM1* geni X kromozomda yer alır, 15 ekzona sahip ve 104,546 baz uzunluğundadır. *MTM1* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 590 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 323 tanesi ekzon, 267 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 187 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 72 değişim ile sinonim, 38 indel ile çerçeve kayması ve 26 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.15).

**Tablo 4.15.** *MTM1* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

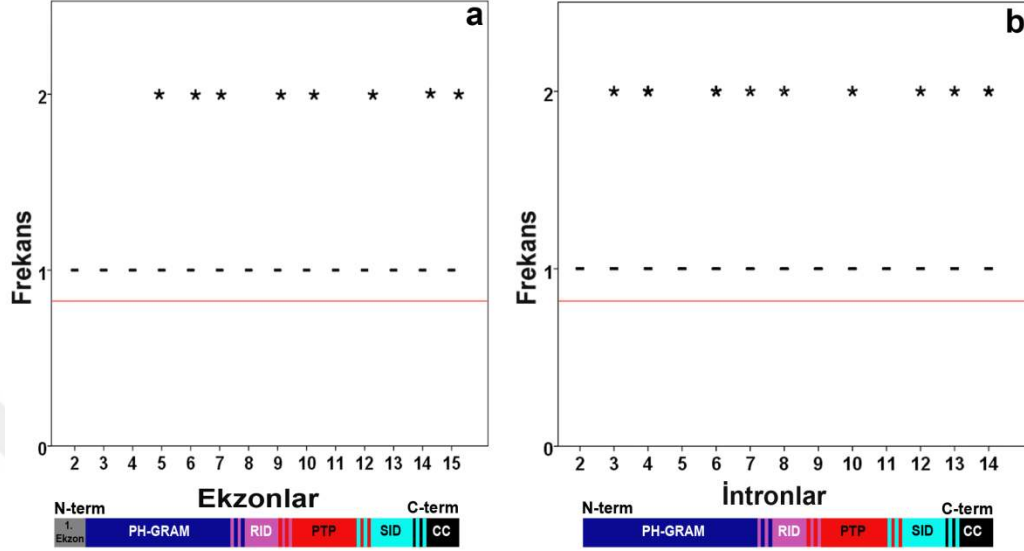
| Mutasyonlar                 | N   | Ort.  | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|-------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 187 | 13,36 | 4                | 27               |
| Sinonim Mutasyon            | 72  | 5,14  | 1                | 10               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 38  | 2,71  | 0                | 6                |
| Nonsense Mutasyon           | 26  | 1,85  | 0                | 3                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 267 | 20,54 | 14               | 28               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*MTM1* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *MTM1* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 2 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.17). Hem ekzonlar hem de intronlarda ikinin üzerinde herhangi bir mutasyon sayısına hiçbir pozisyonda rastlanmadı. Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Analizler aynı pozisyonda gözlenen 2 ve üstü mutasyonların aşırı varyasyonel olduğuna işaret etmektedir. Analizlere göre aynı pozisyonda tekil mutasyon gösteren 7 ekzon (ekzon 2, 3, 4, 8, 9, 11 ve 13) bölgesi varken, aynı pozisyonda 2 mutasyonun/aşırı varyasyonel bölgenin gözlemlendiği 8 ekzon (ekzon 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14 ve 15) bulunmaktadır (4.17a). Bu ekzonlar mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren ekzonlardır. Genin başlangıç bölgesinden 5. ekzona kadar olan bölgede aynı baz pozisyonda tekil mutasyonların dominant olduğu görülmektedir. Ekzonlarda aşırı varyasyonel pozisyonların genin PTP domaininde fazla olduğu görülmektedir. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölgelerin 9 intronda (intron 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13 ve 14) yoğunlaştığı görülmektedir (4.17b). Aynı pozisyonda yalnızca tekil mutasyonların gözlemlendiği 5 intron bölgesi bulunmaktadır (intron 2, 5, 7, 9 ve 11). Hotspot pozisyon varlığı bakımından intronlarda durumun ekzonlara göre daha fazla



olduğu ve gen boyunca da daha homojen bir dağılım gösterdikleri görülmektedir (Şekil 4.17b).



**Şekil 4.17.** *MTM1* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

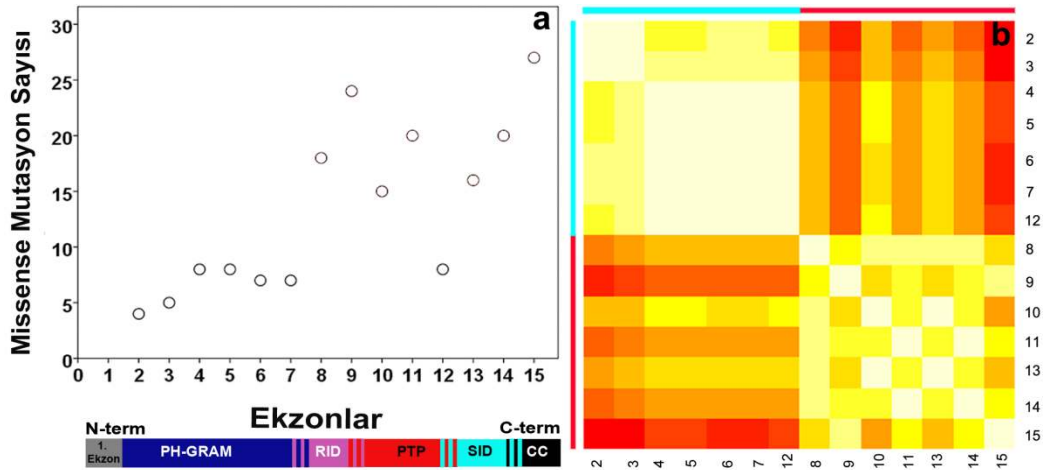
#### 4.2.1.1.1. *MTM1* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*MTM1* geni X kromozomda yer alır, 15 ekzona sahip ve 104,546 baz uzunluğundadır. Gen üzerinde yer alan 15 ekzondan ekzon 1 kodlama yapmadığı için bu gen bölgesindeki veriler analizlerde kullanılmadı. Çalışma kapsamında genin 14 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *MTM1* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.83, n: 14, P: 0.00).

Missense mutasyonlar: *MTM1* geninde 15 ekzonda toplam 187 missense mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 13 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 27 ile ekzon 15’de en az mutasyon ise 4 ile ekzon 2’de görülmektedir (Şekil 4.18a). Missense mutasyon sayısı bakımından PH-GRAM domaininde ortalama 6 (min: 4,

maks: 8), RID domaininde ortalama 16 (min: 7, maks: 24), PTP domaininde ortalama 14 (min: 8, maks: 20), SID + CC domaininde ise ortalama 21 (min: 16, maks: 27) mutasyon olduğu gözlemlendi.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.18b). I. küme mutasyon yükünün az olduğu 7 ekzondan (ekzon 2-7, 12) oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 7 ekzondan (ekzon 8-11, 13-15) oluşmaktadır. I. kümede ağırlıklı olarak substrata bağlanmadan sorumlu olan PH-GRAM ekzonları yer alırken, II. kümede katalitik kısım olan PTP ve protein-protein etkileşiminden sorumlu allosterik kontrol bölgeleri olan SID ve CC domainlerinde yer alan ekzonlar bulunmaktadır. Isı-harita analizi ekzonlar arasında uzaklık bakımından birinci grupta yer alan 2. ve 3. ekzonlar ile ikinci grupta yer alan 9., 11., 14. ve 15. ekzonların ön plana çıktığını göstermektedir. Missense mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonların ekzon 9 ve C-terminal uca yakın yer alan ekzon 15 olduğu görülmektedir.



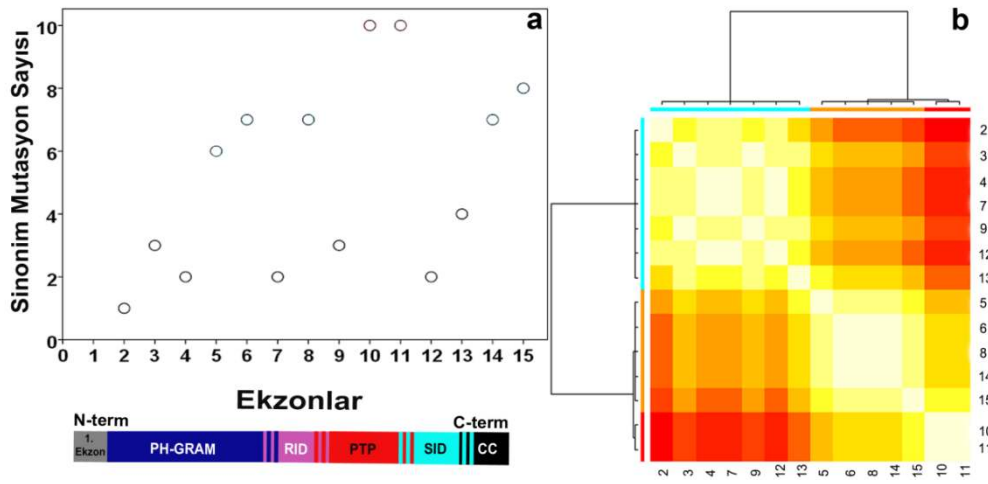
**Şekil 4.18.** *MTM1* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Missense mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.18a). Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan 8.-15. ekzonların (12. ekzon hariç) hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 2 ve 3'te olduğu görülmektedir. Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan PTP domainiyken, PH-GRAM domaininde PTP domaine nazaran daha az mutasyon olduğu görülmektedir. PTP içerisinde yer alan ve katalitik aktiviteden sorumlu ekzon 11'de 20 missense mutasyon ve bu ekzonun etrafında yer alan ekzon 9, 10, 13 ve 14'de mutasyon sayısının 20'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal uca doğru yoğunlaştığı ekzon 15'de ise en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. Bu bölgeler enzimin çalışma kinetiğinden sorumlu protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği allosterik kontrol bölgelerini içermektedir. *MTM1* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi sadece ekzon 15'i diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

Sinonim mutasyonlar: *MTM1* geninde 15 ekzonda toplamda 72 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 5 sinonim mutasyon ekzonlarda gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 10 ile ekzon 10 ve 11'de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 2'de görülmektedir (Şekil 4.19a). Sinonim mutasyon sayısı bakımından PH-GRAM domaininde ortalama 4 (min: 1, maks: 7), RID domaininde ortalama 4 (min: 2, maks: 7), PTP domaininde ortalama 7 (min: 2, maks: 10), SID + CC domaininde ise ortalama 6 (min: 4, maks: 8) mutasyon olduğu gözlemlendi. Öklid uzaklık parametresine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.19). I. kümeyi mutasyon yükünün az olduğu 7 ekzon (ekzon 2-4, 7, 9, 12 ve 13), II. kümeyi 5 ekzon (ekzon 5, 6, 8, 14 ve 15) ve en yüksek mutasyon yüküne sahip olan ekzonların yer aldığı III. kümeyi ekzon 10 ve 11 oluşturmaktadır. Bu kümelerin gen üzerindeki domainlerde dağılımına bakıldığında birinci kümede ağırlıklı olarak substrata bağlanmadan sorumlu olan PH-GRAM domaininde bulunan ekzonların yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.19b). II. kümede PTP ve protein-protein

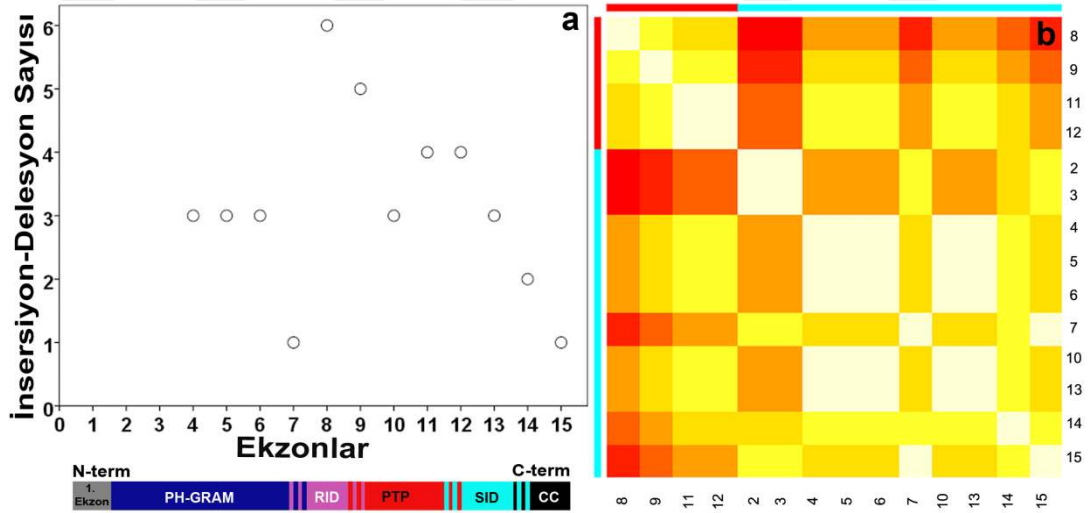
etkileşiminden sorumlu allosterik kontrol bölgeleri olan SID ve CC domainlerinde yer alan ekzonlar yer almaktadır. III. küme PTP domaini içerisinde fosfataz aktiviteden sorumlu olan ekzon 11'i ve onun hemen bitişiğinde bulunan ekzon 10'u içermektedir. Isı haritasına bakıldığında I. kümede en farklı ekzonun ekzon 2 olduğu, II. kümede ekzon 15'in, üçüncü kümede yer alan ekzon 10 ve 11'in ise belirgin şekilde gendeki en farklı ekzonlar olduğu görülmekte (Şekil 4.19b).

Kümeleme analizi gen üzerinde mutasyon yoğunluğuna bağlı üç ekzon tipinin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.19b). Sinonim mutasyonlar bakımından kümeleme analizi ekzon 10 ve 11'i I. derece hotspot bölge, ekzon 5-8 (7 hariç), ekzon 14-15 arasını ise II. derece hotspot bölge olarak saptadı. Analizin önerdiği I. derece hotspot bölgeler enzimin PTP bölgesinde yer alan ve fosfataz aktivitesinden sorumlu ekzon 11 ve yakınındaki ekzon 10'dur. Bu değeri sırasıyla 8 mutasyon ile ekzon 15, 7 mutasyon ile ekzon 6, 8, ve 14 takip etmektedir. Genel olarak sinonim mutasyon yükünün PTP domaininde yoğunlaştığı görülmektedir. Gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından diğer ekzonlardan belirgin fark gösteren bir ekzonun varlığına işaret etmemektedir.



**Şekil 4.19.** *MTM1* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Çerçeve kayması mutasyonları: *MTM1* geninde 15 ekzonda toplamda 38 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyonların ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 3 nonsinonim mutasyonun ekzonlarda gözleendiği en fazla indelin 6 ile ekzon 8’de en az indelin ise 1 ile ekzon 7 ve 15’de olduğu ekzon 2 ve 3’te ise hiç indelin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.20a). İndel sayısı bakımından PH-GRAM domaininde ortalama 2 (min: 0, maks: 3), RID domaininde ortalama 4 (min: 1, maks: 6) PTP domaininde ortalama 4 (min: 3, maks: 4), SID + CC domaininde ise ortalama 2 (min: 7, maks: 8) indelin olduğu gözleendi. Ekzonlar arasında çerçeve kayması mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.20b). I. küme tümü PTP bölgesinde ekzon 11 etrafında bulunan 8.,9., 11. ve 12. ekzonlardan oluşurken, geri kalan 10 ekzon ise II. ekzon kümesini oluşturmaktadır. Ekzonlar arası indel yüküne bağlı uzaklığı gösteren ısı-haritası I. grupta 8. ve 9. ekzonları, II. grupta ise 7. ve 15. ekzonların birbirlerine en uzak ekzonlar olduğunu göstermektedir.



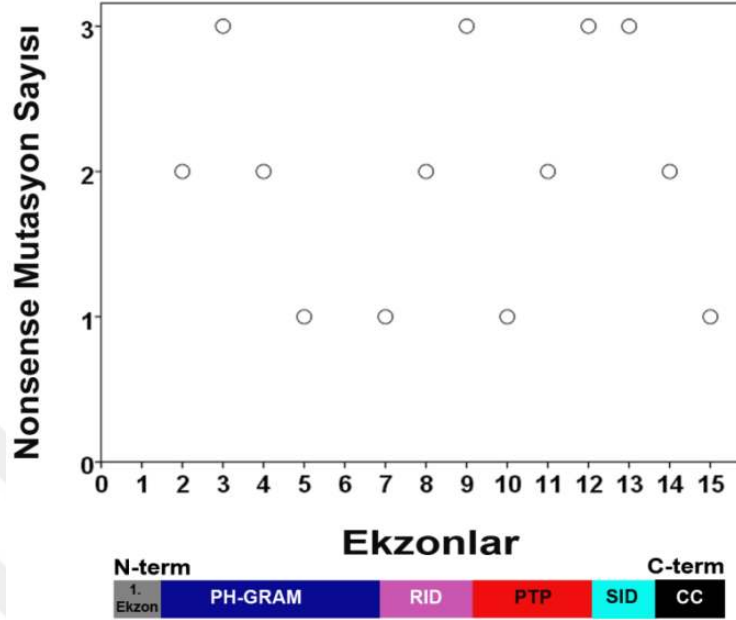
**Şekil 4.20.** *MTM1* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Kümeleme analizi çerçeve kayması mutasyonları bakımından gen üzerinde ekzon 8-12 (ekzon 10 hariç) oluşan bir hotspot bölgenin varlığına işaret etmektedir

(Şekil 4.20b). Gen üzerinde en çok indel 6 ile ekzon 8’de görülürken bunu 5 indelle ekzon 9 takip etmektedir. Genin PTP bölgesinde baş ve orta kısımlarda yoğunlaştığı görülen indellerin N-terminal uca yakın gözlenmediği, C-terminal kısma doğru ise azaldığı görülmektedir. Çerçeve kayması mutasyonları bakımından PTP domaindeki mutasyon yoğunluğunun PH-GRAM domaine göre fazla olduğu ve PTP domainin başlamasıyla indellerin aniden pik yaptığı görülmektedir. İndellerin PTP domain içerisinde özellikle katalitik kısmı içeren ekzon 11 ve onun yakınında yer alan ekzon 8, 9 ve 12’de yoğunlaştığı, C-terminal uca doğru kademeli olarak azaldığı görülmektedir. Çerçeve kaymasından sorumlu indeller ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 8’i hotspot bölge olarak tanımlamaktadır.

Nonsense mutasyonlar: *MTM1* geninde 15 ekzonda toplamda 26 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 2 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla nonsense mutasyonun 3 ile ekzon 3, 9, 12, 13’de, en az nonsense mutasyonun 1 ile ekzon 5, 7, 10 ve 15’de olduğu ekzon 6’da ise hiç nonsense mutasyonun olmadığı görülmektedir (Şekil 4.21). Stop kodonu oluşturan nonsense mutasyon sayısı bakımından PH-GRAM domaininde ortalama 2 (min: 0, maks: 3), RID domaininde ortalama 2 (min: 1, maks: 3) PTP domaininde ortalama 2 (min: 1, maks: 3), SID + CC domaininde ise ortalama 2 (min: 1, maks: 3) nonsense mutasyonun olduğu gözleendi. En yüksek stop kodon mutasyonunun görüldüğü ekzonlar 3 mutasyon ile 3, 9, 12 ve 13. ekzonlardır. Bunları sırasıyla 2 mutasyon ile 2, 4, 8, 11 ve 14. ekzonlar takip etmektedir. PTP domainde PH-GRAM domaine göre nonsense mutasyon yoğunluğunun fazla olduğu görülmektedir. Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir (Şekil 4.21). Ancak nonsense mutasyonlarda genin baş bölgelerinde görülecek stop kodonu oluşumlarının yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde olası hotspot ekzonların en fazla mutasyonun görüldüğü ekzon 3 ve

9 olma olasılığı yüksektir. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir

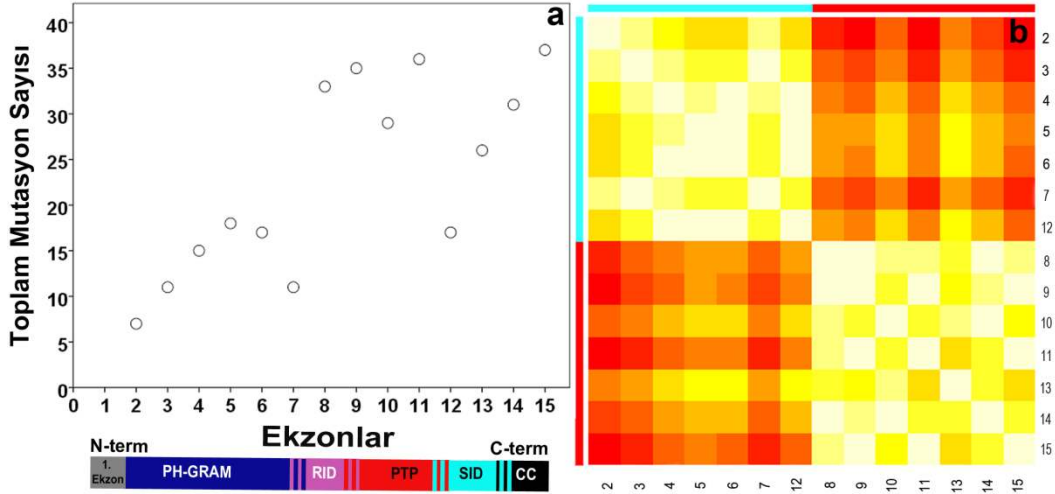


**Şekil 4.21.** *MTM1* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

Toplam mutasyon sayısı: *MTM1* geninde 15 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 323 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 23 mutasyonun ekzonlarda gözlendiği, en fazla mutasyon sayısının 37 ile ekzon 15’de, en az mutasyonun ise 7 ile ekzon 2’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.22a). Toplam mutasyon sayısı bakımından PH-GRAM domaininde ortalama 14 (min: 7, maks: 18), RID domaininde ortalama 26 (min: 11, maks: 35), PTP domaininde ortalama 27 (min: 17, maks: 36) SID + CC domaininde ortalama 31 (min: 26, maks: 37) mutasyonun olduğu gözlendi. Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.22b). I. küme ekzon 2-7 ve 12’yi kapsamakta ve PH-GRAM bölgesinin tümünü ve PTP’nin baştan iki ve 12. ekzonunu içermektedir. II. küme tümü PTP-SID+CC bölgelerini içerecek şekilde ekzon 8-11, 13-15’i kapsamaktadır. Ekzonlar arası mutasyon yüküne bağlı

uzaklığı gösteren ısı-haritası I. grupta 2., 3. ve 7. ekzonların, II. grupta ise 9., 11. ve 15. ekzonların birbirlerine en uzak ekzonlar olduğunu göstermektedir (Şekil 4.22b)

Kümeleme analizi gen üzerinde ekzon 8-15'i (12 hariç) kapsayan bir hotspot bölgenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.22b). Bu bölge içerisinde en yüksek mutasyon sayısı 37 ile ekzon 15'de görülürken, bunu 36 mutasyon ile ekzon 11 ve 35 mutasyon ile ekzon 9 takip etmektedir. Toplamda elde edilen 323 mutasyonun 94'ü SID+CC domaininde, 82'si PTP domaininde, 79'u RID domaininde ve 68'i de PH-GRAM domaininde yer almaktadır. Genin PH-GRAM kısmında mutasyon yükü ekzon 2'den başlayarak ekzon 5'e kadar yükselme eğilimi gösterirken, PTP bölgesinin de başlangıcı olan ekzon 6'da ve 7'de azalma ve ekzon 8'den itibaren ani bir mutasyon yük artışı görülmektedir. SID + CC bölgelerini içeren C-terminal kısma doğru ise mutasyon yükünün hızlı bir artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.22a). Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 15'i hotspot bölge olarak tanımladı.

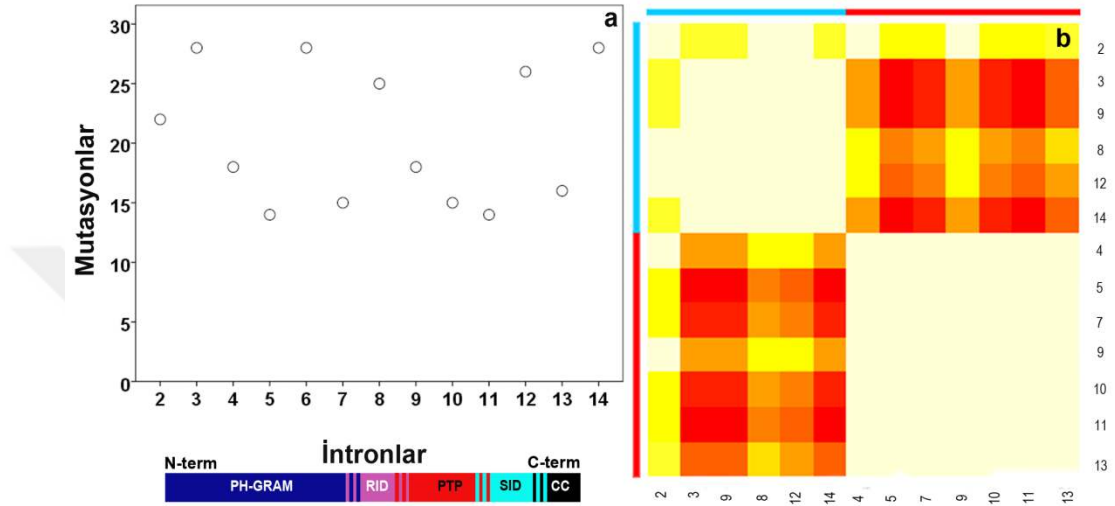


**Şekil 4.22.** *MTM1* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

*MTM1* geninde intron mutasyonları: *MTM1* geninde bulunan 14 introndan toplamda 267 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 20 mutasyonun intronlarda gözlendiği, en fazla mutasyonun



28 ile intron 3, 6, 14'de, en az mutasyonun ise 14 ile intron 5 ve 11'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.23a). Mutasyon sayısı bakımından PH-GRAM domaininde ortalama 22 (min: 14, maks: 28), RID domaininde ortalama 19 (min: 15 maks: 25), PTP domaininde ortalama 18 (min: 14, maks: 26), SID + CC domaininde ise ortalama 22 (min: 16, maks: 28) mutasyonun olduğu gözlemlendi.

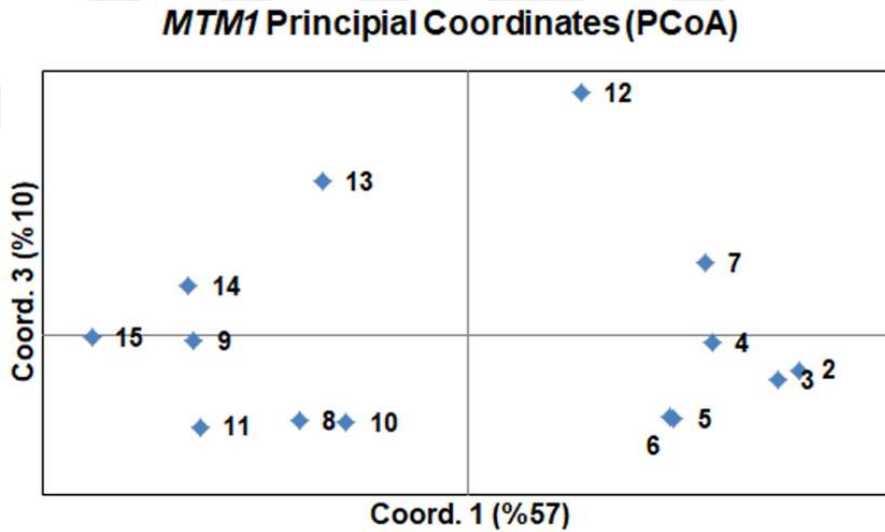


**Şekil 4.23.** *MTM1* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

İntronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.23b). I. küme, ekzon 1-7 ve 12'yi kapsamakta ve PH-GRAM bölgesinin tümünü ve PTP'nin baştan iki ve 12. ekzonunu içermektedir. II. küme tümü PTP-SID+CC bölgelerini içerecek şekilde ekzon 8-11, 13-15'i kapsamaktadır. İntronlar arasında mutasyon yüküne bağlı uzaklığı gösteren ısı-haritası I. grupta 3., 6. ve 14. intronlar ile II. grupta 5., 7., 10. ve 11. intronların birbirlerine en uzak intronlar olduğunu göstermektedir (Şekil 4.23b). Kümeleme analizi gen üzerinde PH-GRAM ve PTP-SID + CC bölgelerine yayılmış bir hotspot bölge varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.23b). Bu bölge içerisinde intron 4 ve 5 ile intron 9 ve 11 arasında mutasyon yoğunluğunun diğer bölgelere göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı

gözlem analizi gen üzerinde intronlar bazında bir hotspot intron bölgesi önermemektedir.

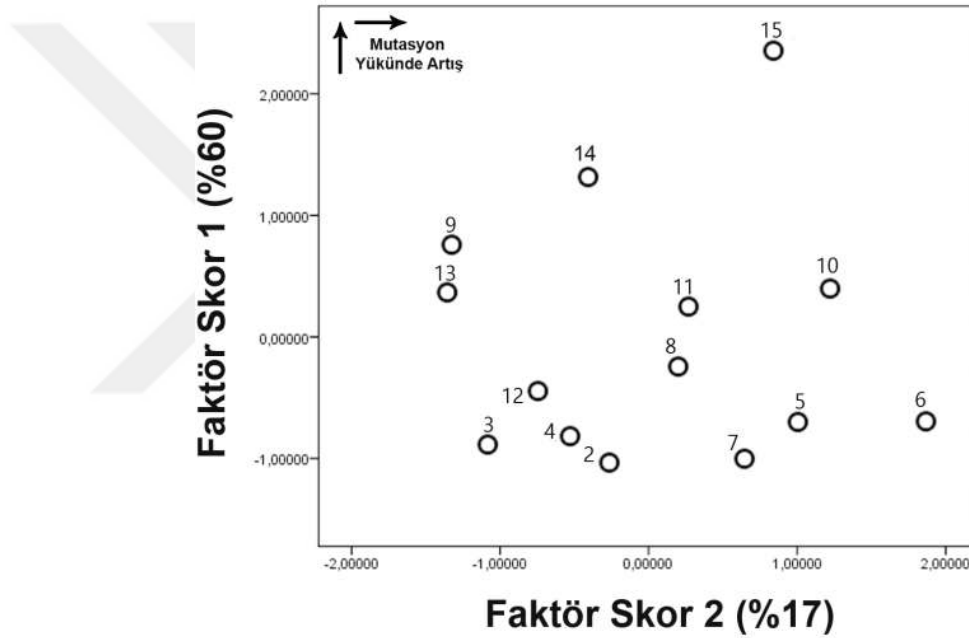
PCoA analizi: *MTM1* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde beş grubun olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.24). Analiz 12. ve 13. ekzonları ayrı ayrı bir grup olarak ele alırken, ekzon 2-7'yi bir grup, ekzon 8-10-11 ve 9, 14, 15'i ayrı bir grup olarak ele almaktadır. Ekzon 2-7 grubu en az mutasyon yüküne sahip ekzonlar olup PH-GRAM ve PTP domainin baş kısmını oluşturmaktadırlar. Ekzon 12 ve 13 ile 14 ve 15 ise protein-protein etkileşimlerinden ve allosterik kontrolden sorumludur. PTP bölgesinde yer alan ekzon 11 ve etrafındakilerin ise proteinin katalitik bölgesini oluşturup enzimin fosfataz aktivitesinden sorumludurlar.



**Şekil 4.24.** *MTM1* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi.

Faktör (PCA) analizi: *MTM1* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk

ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde 4 adet grup bulunmaktadır. Ekzon 15 tek başına diğer iki gruptan uzakta yerleşerek farklı bir grup oluştururken; ekzon 9, 13 ve 14. ikinci grubu; ekzon 2, 3, 4 ve 12 üçüncü grubu; diğer kalan tüm ekzonlar da ayrı bir grup oluşturmaktadır (Şekil 4.25). Faktör (PCA) analizi PH-GRAM ve PTP bölgeleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmezken, SID + CC bölgesini kapsayan C-terminal uca yakın bölge mutasyon yükü bakımından diğerlerinden farklı bir grup oluşturmaktadır. Faktör (PC) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 15 iken II. derece hotspot bölge ise ekzon 9, 13 ve 14'dür.



**Şekil 4.25.** *MTM1* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi.

#### 4.2.1.2. *DNM2* Geni

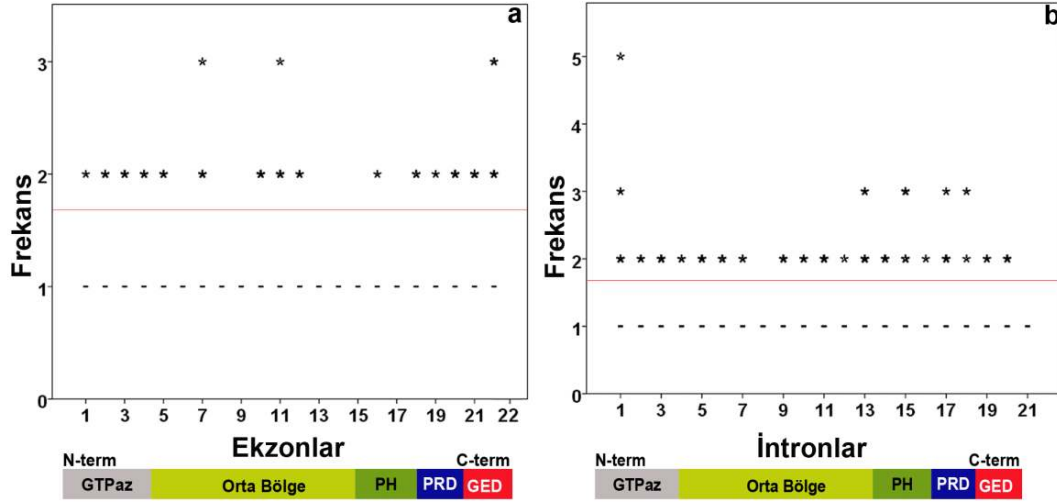
*DNM2* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 1380 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 660 tanesi ekzon, 720 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 355 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken, bunu 293 değişim ile sinonim, 10 indel ile çerçeve kayması ve 2 stop kodonu mutasyonu izledi (Tablo 4.16).

**Tablo 4.16.** *DNM2* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort.  | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|-------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 355 | 16,13 | 1                | 50               |
| Sinonim Mutasyon            | 293 | 13,31 | 1                | 31               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 10  | 0,4   | 0                | 2                |
| Nonsense Mutasyon           | 2   | 0,09  | 0                | 2                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 720 | 33,4  | 11               | 64               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*DNM2* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *DNM2* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 5 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.26). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı varyasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Analizler aynı pozisyonda gözlenen 2 ve üstü mutasyonların aşırı mutasyonel olduğuna işaret etmektedir. Buna göre aynı pozisyonda 2 mutasyonun gözlendiği 15 ekzon bulunurken, aynı pozisyonda 3 mutasyonun gözlendiği 3 ekzon (ekzon 7, 11, ve 21) bulunmaktadır (Şekil 4.26a). Gen üzerinde aynı pozisyonda 2 mutasyonun gözlendiği ekzonlar gen üzerinde homojene yakın bir dağılım göstermektedir. Bu ekzonlar mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot ekzonlardır. Ekzonlarda aşırı varyasyonel pozisyonların genin orta ve GED domaininde fazla olduğu görülmektedir. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölgeler gen üzerinde homojen bir dağılım göstermektedir. Aynı pozisyonda 2 mutasyonun gözlendiği ekzonlar gen üzerinde homojen bir şekilde dağılım gösterirken, 3 mutasyonun gözlendiği 5 intron (intron 1, 13, 15, 17 ve 18), 5 mutasyonun görüldüğü 1 intron bölgesi (intron 5) saptandı. Aynı pozisyondaki tekil mutasyonlar tüm intronlar üzerinde görülmektedir (Şekil 4.26b). İntronlarda aşırı varyasyonel pozisyonların GTPaz, PH ve PRD domaininlerde fazla olduğu görülmektedir.



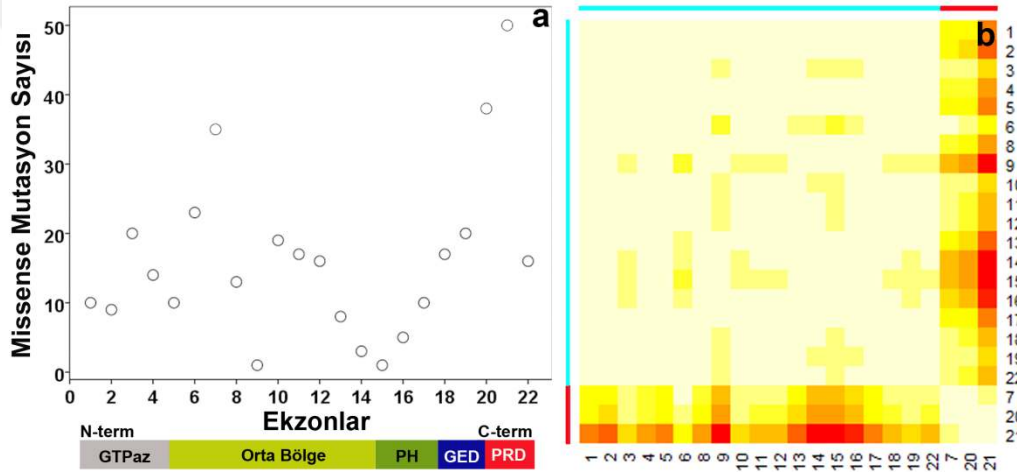
**Şekil 4.26.** *DNM2* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

#### 4.2.1.2.1. *DNM2* Geni Ekzon ve İtronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*DNM2* geni 19. kromozomda yer alır, 22 ekzona sahip ve 113,825 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında genin 22 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *DNM2* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.78, n: 22, P: 0.00).

Missense mutasyonlar: *DNM2* geninde 22 ekzonda toplam 355 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 16 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 50 ile ekzon 21’de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 9 ve 15’de görülmektedir (Şekil 4.27a). Missense mutasyon sayısı bakımından GTPaz domaininde ortalama 12 (min: 9, maks: 20), orta domainde ortalama 13 (min: 1, maks: 21), PH domaininde ortalama 10 (min: 5, maks: 17), GED domaininde ortalama 29 (min: 16, maks: 20), PRD domainde ise ortalama 33 (min: 16, maks: 50) mutasyon olduğu gözlemlendi.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.27b). I. küme mutasyon yükünün az olduğu 19 ekzondan oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 3 ekzondan (ekzon 7, 20 ve 21) oluşmaktadır. I. kümede genin bütün bölgelerinde yer alan ekzonlar yer alırken, II. kümede yer alan ekzonlar ise genin regülasyonundan sorumlu olan orta domain, GED domain ve protein-protein etkileşiminin yanında allosterik kontrolden de sorumlu olan, genin C-terminal kısmında bulunan PRD domainde görülmektedir.

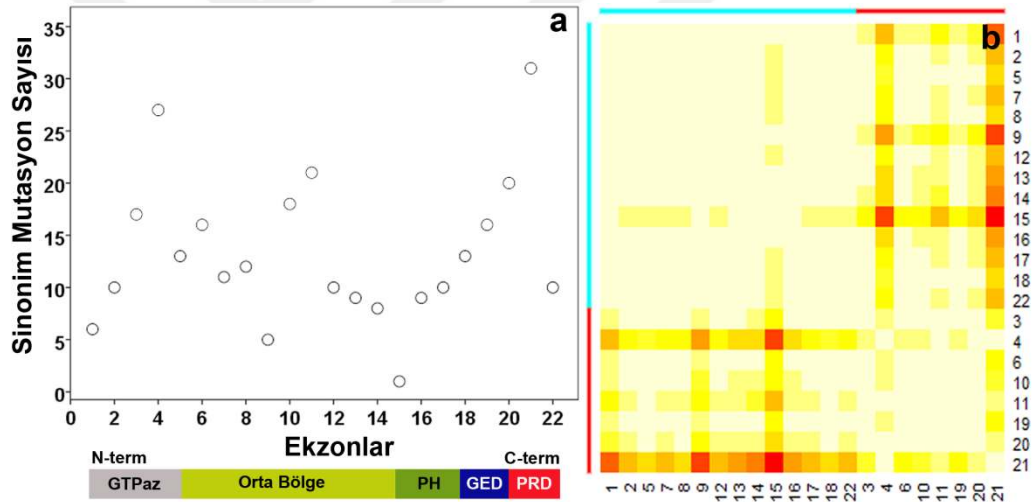


**Şekil 4.27.** *DNM2* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Missense mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik göstermemektedir. Kümeleme analizi genin N-terminal bölgesine yakın olan ekzon 7 ve C-terminal bölgesine yakın olan 20 ve 21. ekzonları hotspot bölgeler olarak hesaplamıştır (Şekil 4.27b). Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgelere rastlanmazken, ekzon 9 ve 15'in en düşük mutasyon yoğunluğuna sahip ekzonlar olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal uca doğru yoğunlaştığı ekzon 20 ve 21'de ise en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. Bu bölgeler de protein-protein etkileşiminden sorumlu olan ekzonları içermektedir. *DNM2* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen

outlier analizi ise ekzon 20 ve 21'i diğer ekzonlardan farklı aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

Sinonim mutasyonlar: *DNM2* geninde 22 ekzonda toplamda 293 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 13 sinonim mutasyon ekzonlarda gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 31 ile ekzon 21'de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 15'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.28a). Sinonim mutasyon sayısı bakımından GTPaz domaininde ortalama 14 (min: 6, maks: 27), orta domainde ortalama 11 (min: 1, maks: 21), PH domaininde ortalama 10 (min: 9, maks: 13), GED domaininde ise ortalama 18 (min: 16, maks: 20), PRD domainde ortalama 20 (min: 10, maks: 31) sinonim mutasyon olduğu gözlemlendi.

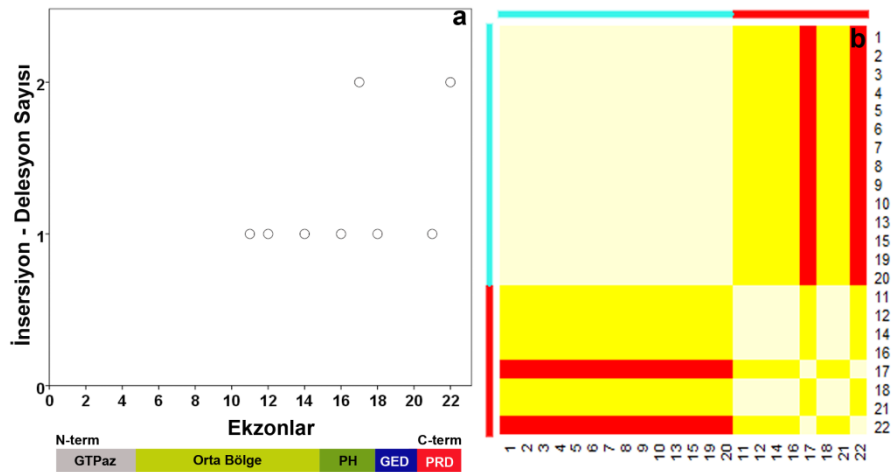


**Şekil 4.28.** *DNM2* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Öklid uzaklık parametresine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.28b). I. küme mutasyon yükünün az olduğu 14 ekzondan oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 8 ekzon bölgesi oluşmaktadır. Bu kümelerin gen üzerindeki domainlerde dağılımına bakıldığında I. kümede yer alan ekzonların hemen hemen tümünün domainlere

dağılmış şekilde olduğu görülürken, II. kümede PH domain haricinde bütün bölgelerde mutasyon görülmektedir. Isı-haritasına bakıldığında ekzon 21'in diğerlerinden farklı olduğu görülmektedir (Şekil 4.28b). Ekzonlarda sinonim mutasyon sayısı 31 ile gen üzerindeki en yüksek değerdir. Genel olarak sinonim mutasyon yükünün PRD domaininde yoğunlaştığı, PH domaininde mutasyon yoğunluğu fazla olmasına rağmen hotspot bölge saptanmamıştır. Sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından ekzon 21'in diğer ekzonlardan belirgin olarak farklı olduğuna işaret etmektedir.

Çerçeve kayması mutasyonları: *DNM2* geninde 22 ekzonda toplamda 10 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. En fazla indelin 2 ile ekzon 17 ve 22'de olduğu görülürken, gen üzerinde çoğunlukla indel gözlenmemiştir (Şekil 4.29a). En çok indel PH ve GED domaininde görülmektedir. Ekzonlar arasında çerçeve kayması mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek için gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.29). I. küme tümü GTPaz ve orta domainin bir kısmını içeren bölgeyi içerisine almaktadır ve bu bölgede hiç mutasyon görülmemektedir.



**Şekil 4.29.** *DNM2* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı. Kırmızı boyalı noktalarla hotspot ekzonları gösterilmiştir (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.



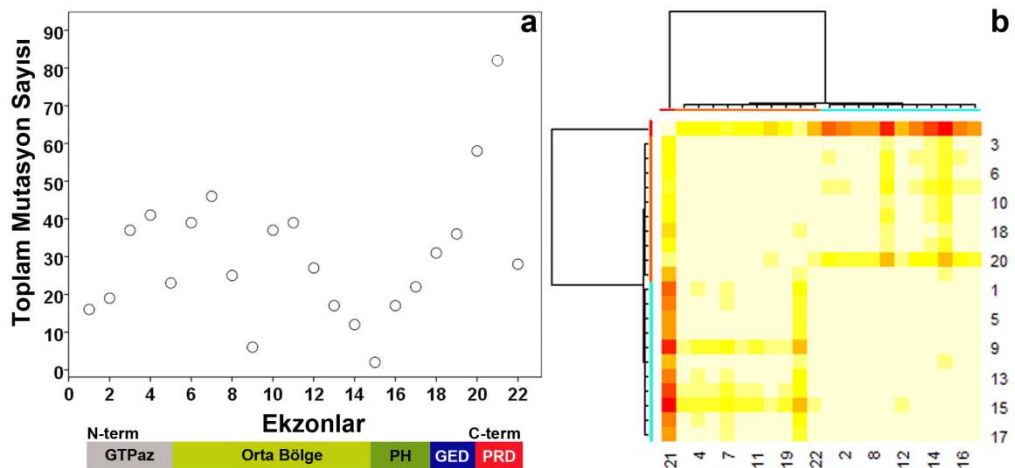
Kümeleme analizi çerçeve kayması mutasyonları bakımından gen üzerinde 11.-22. (ekzon 13, 15, 19, 20 hariç) ekzonlardan oluşan bir hotspot bölgenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.29b) Gen üzerinde en çok indel 2 ile ekzon 17 ve 22’de görülürken bunu 1 indelle ekzon 11-12-14-16-18 ve 21 takip etmektedir. Genin orta, PH, GED ve PRD bölgesinde mutasyonların yoğunlaştığı ve N-terminal uca yakın bölgelerde hiç indele rastlanmadı. İndellerin fosfoisotopları tanıyıp bağlanan PH domainin içerisindeki 16, 17 ve 18. ekzonlarda ve GED-PRD domain içerisinde özellikle allosterik kontrolden sorumlu kısmı içeren ekzon 21 ve 22’de yoğunlaştığı görülmektedir. Çerçeve kayması mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından diğer ekzonlardan belirgin fark gösteren bir ekzonun varlığına işaret etmemektedir.

Nonsense mutasyonlar: *DNM2* geninde 22 ekzonda toplamda 2 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı ve bu mutasyonlar da yalnızca PH domain içerisinde yer alan ekzon 16’da yer aldığı görüldü. Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir. Ancak en fazla mutasyonun görüldüğü ekzon 16’nın olma olasılığı yüksektir. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.

Toplam mutasyon sayısı: *DNM2* geninde 22 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 660 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 30 mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği, en fazla mutasyon sayısının 82 ile ekzon 21’de, en az mutasyonun ise 2 ile ekzon 15’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.30a). Toplam mutasyon sayısı bakımından GTPaz domaininde ortalama 27 (min: 16, maks: 41), orta domainde ortalama 25 (min: 6, maks: 46), PH domaininde ortalama 23 (min: 17, maks: 31) GED domaininde ortalama 47 (min: 36, maks: 58), PRD domaininde ortalama 55 (min: 28, maks: 82) mutasyonun olduğu gözlemlendi. Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını

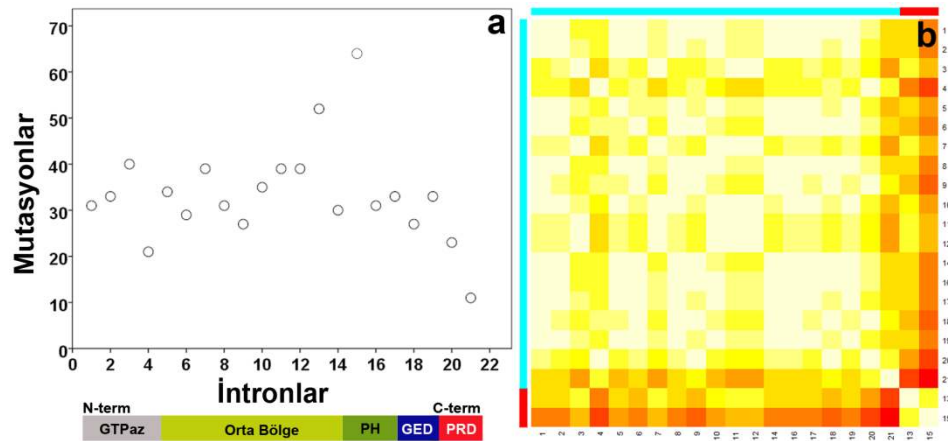
belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.30b). I. küme ekzon 1, 2, 5, 8, 9 12-17'den oluşmakta ve GTPaz domainin 1., 2., ve 5. ekzonunu, orta domainin ise 8., 9., ve 12-15. ekzonlarını kapsamaktadır. I. kümede mutasyon yükünün az olduğu ekzonlar yer almaktayken, II. kümede mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonlar yer almaktadır.

Ekzonlar arası mutasyon yüküne bağlı uzaklığı gösteren ısı-haritası I. grupta 1., 9., 14 ve 15. ekzonların, II. grupta ise 18 ve 22. ekzonların birbirlerine diğerlerinden en uzak ekzonlar olduğunu göstermektedir (Şekil 4.30b). Kümeleme analizi gen üzerinde ekzon 21'i I. derece hotspot bölge olarak işaret etmektedir (Şekil 4.30b). Toplamda elde edilen 660 mutasyonun yaklaşık 250'si orta domainde yer alırken, 136'sı GTPaz domainde, 110'u PRD domainde yer almaktadır. Genin GTPaz kısmında mutasyon yükü ekzon 1'den başlayarak ekzon 5'e kadar yükselme eğilimi gösterirken, ekzon 5'de düşme gözlenmektedir. Orta bölgesinin başlangıcı olan ekzon 6'da ve 7'de mutasyon yükünde artma gözlenirken, 8. ekzonda azalma gözlemlendiği ve ekzon 9'da ani şekilde düştüğü gözlenmektedir. PH ve GED domainin içerisinde yer alan ekzon 16 ve 20 arasında yine artış gözlenmekte ve ekzon 21'de mutasyonun pik yaptığı görülmektedir (Şekil 4.30a). Outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 21'i hotspot bölge olarak tanımladı.



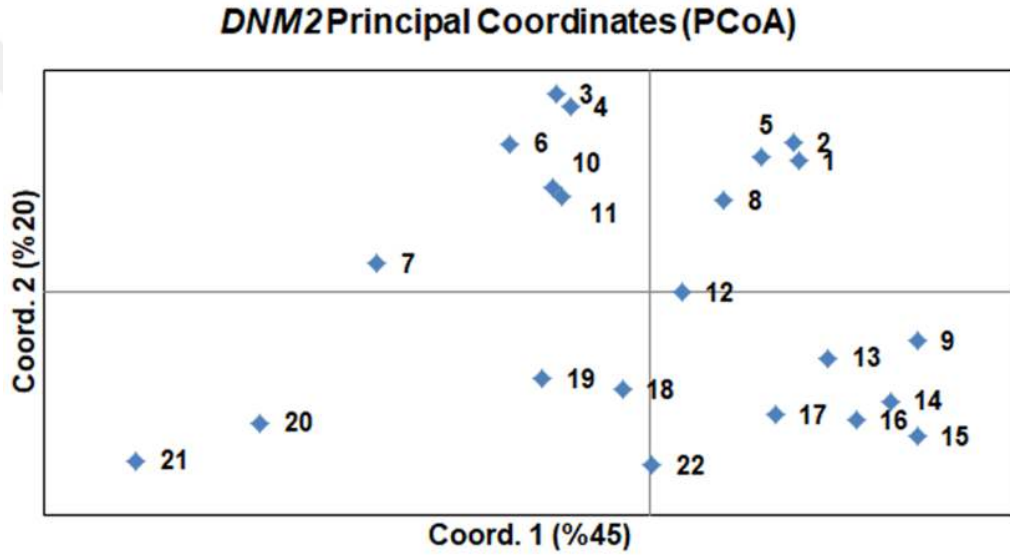
**Şekil 4.30.** *DNM2* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

*DNM2* geninde intron mutasyonları: *DNM2* geninde bulunan 21 introndan toplamda 702 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 33 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 64 ile intron 15’de, en az mutasyonun ise 11 ile intron 21’de olduğu gör÷lmektedir (Şekil 4.31a). Mutasyon sayısı bakımından GTPaz domaininde ortalama 32 (min: 21, maks: 40), orta domainde ortalama 39 (min: 27 maks: 64), PH domainde ortalama 30 (min: 27, maks: 33), GED domaininde ise ortalama 28 (min: 23, maks: 33) mutasyonun olduğu gözleendi. İtronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.31b). I. küme intron 13 ve 15 dışındakileri kapsamaktadır. I. küme mutasyon yükünün az olduğu ekzonlardan oluşmaktayken, II. kümede mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonlar yer almaktadır. İtronlar arasında mutasyon yüküne bağılı uzaklığı gösteren ısı-haritası I. grupta 4., 20., 21. intronlar diğerklerine en uzak intronlar olduğunu göstermektedir (Şekil 4.31). Kümeleme analizi gen üzerinde orta ve PRD domainler içerisinde yer alan bir hotspot bölge varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.31b). İtron 4 ve 21’de mutasyon yoğunluğunun diğerk bölgelere göre oldukça düşük olduğu gör÷lmektedir. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerindeki intron 15’i hotspot bölge olarak önermektedir.



**Şekil 4.31.** *DNM2* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

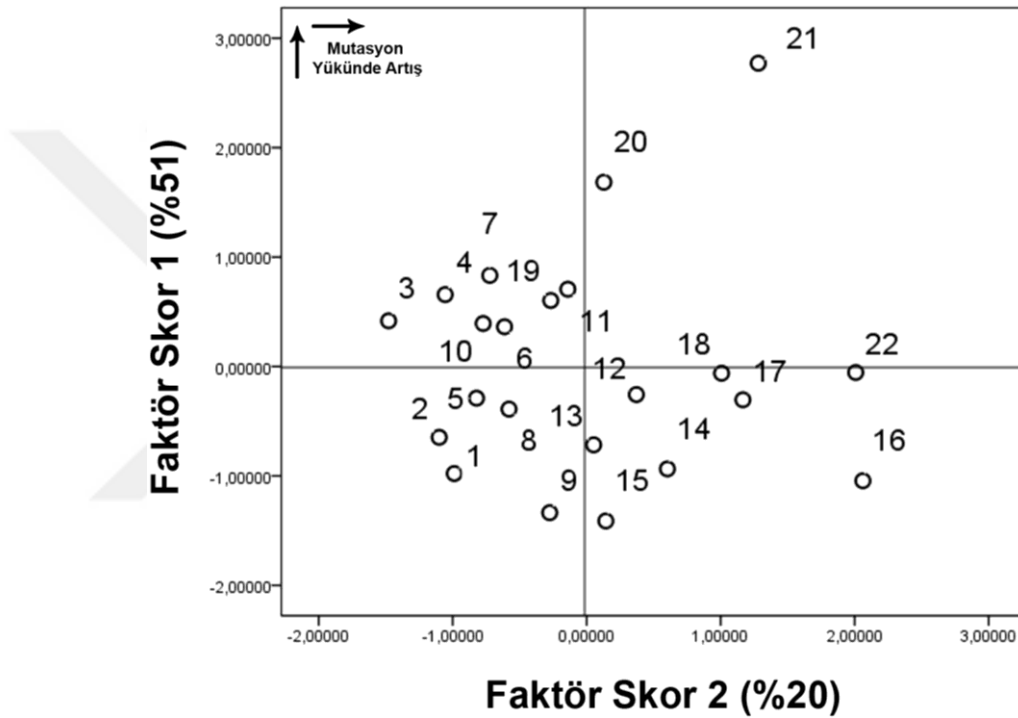
PCoA analizi: *DNM2* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde 3 grubun olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.32). Ekzon 21, 20 bir grup oluştururken, ekzon 7 tek başına bir grup ve diğer kalan ekzonlarda kendi aralarında grup oluşturmaktadır. Ekzon 9-15 (ekzonlar 10-11 ve 12 hariç) grubu ise en az mutasyonun görüldüğü ekzonlardır. Mutasyon sayısının en fazla görüldüğü ekzonlar genin regülasyonundan sorumlu olan orta domain ve allosterik kontrolden soumlu olan GED ve PRD bölgelerinde yer almaktadır.



**Şekil 4.32.** *DNM2* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi.

Faktör (PCA) analizi: *DNM2* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde dört adet grup bulunmaktadır. Ekzon 20 ve 21 ayrı ayrı tek başına diğer iki gruptan uzakta yerleşerek farklı bir grup oluştururken, ekzon 3-10 (ekzonlar 5,8 ve 9 hariç) arası üçüncü grubu, geri kalan ekzonlarda dördüncü grubu oluşturmaktadır (Şekil 4.33).

Faktör (PCA) analizi, GTPaz ve orta domainin bir kısmını kapsayan N-terminal uca yakın bölge mutasyon yükü bakımından diğerlerinden farklı bir grup oluşturmaktayken, C-terminal uca yakın olan bölgeyi de ayrı bir grup olarak vermektedir. Faktör (PC) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 21 iken, II. derece hotspot bölge ise ekzon 20 ve III. derece hotspot bölge ise 3-10 (ekzon 5,8 ve 9 hariç) ekzonların yer aldığı bölgelerdir.



**Şekil 4.33.** *DNM2* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi

#### 4.2.1.3. *CFL2* Geni

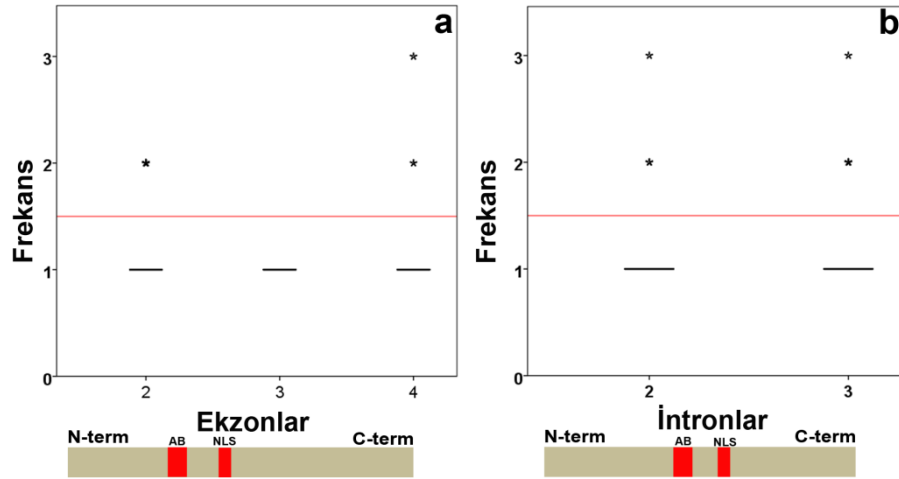
*CFL2* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 144 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 84 tanesi ekzon, 60 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 47 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 24 değişim ile sinonim, 10 indel ile çerçeve kayması ve 3 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.17).

**Tablo 4.17.** *CFL2* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.

| Mutasyonlar                 | N  | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 47 | 16   | 2                | 36               |
| Sinonim Mutasyon            | 24 | 8    | 1                | 15               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 10 | 3    | 0                | 9                |
| Nonsense Mutasyon           | 3  | 3    | 0                | 2                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 60 | 30   | 29               | 31               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*CFL2* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *CFL2* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 3 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.34). Hem ekzonlar hem de intronlar üzerinde 3'ün üzerinde herhangi bir mutasyon sayısına hiçbir pozisyonda rastlanmadı. Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Analiz sonuçlarına göre aynı pozisyonda gözlenen 2 ve üstü aşırı mutasyonlardır. Aynı pozisyonda 2 mutasyonun gözlendiği 2 ekzon (2 ve 4), 3 mutasyonun gözlendiği tek ekzon (ekzon 4) bulunmaktadır (Şekil 4.34a). Bu bölge içerisinde yer alan ekzon 2 mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren ekzondur. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölge olma potansiyeli taşıyan 2 intron bölgesi (2 ve 3) vardır (Şekil 4.34b). Hotspot pozisyon varlığı bakımından intronlarda durumun ekzonlara göre daha fazla olduğu görüldü.



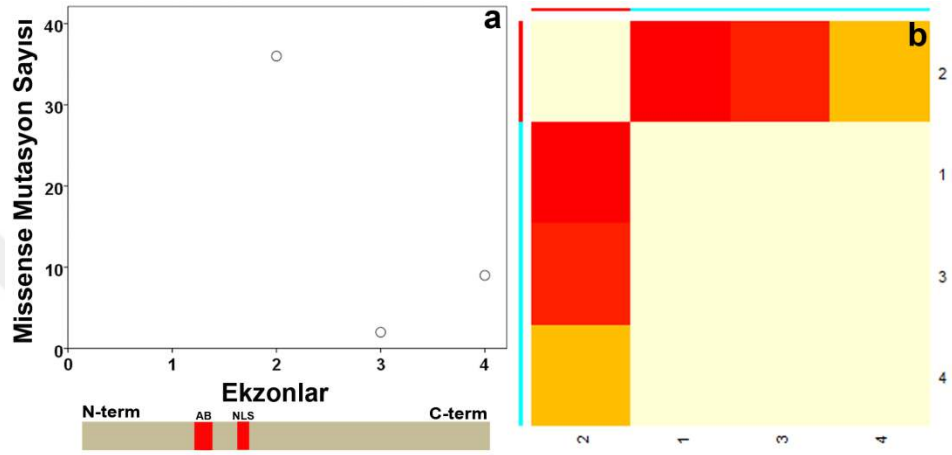
**Şekil 4.34.** *CFL2* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.) AB aktin bağlanma bölgesini temsil ederken, NLS ise nükleer lokalizasyon sinyalini temsil etmektedir.

#### 4.2.1.3.1. *CFL2* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*CFL2* geni 14. kromozomda yer alır, 4 ekzona sahip ve 5711 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında genin 4 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *CFL2* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 1, n: 3, P: <0.05).

Missense mutasyonlar: *CFL2* geninde 4 ekzonda toplam 47 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 16 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 36 ile ekzon 2’de en az mutasyon ise 2 ile ekzon 3’de görülmektedir (Şekil 4.35a). Öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.35b). I. küme 3 ekzondan (1, 3 ve 4) oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu ekzon 2’den oluşmaktadır ve ekzon 2 içerisinde kofilin-aktin arası bağlantı kurulmasını ve hücre içerisinde sinyalden

sorumlu olan bölgeler bulunmaktadır. Kümeleme analizi genin N-terminal kısmına yakın yer alan ekzon 2'nin hotspot bölge olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 3 ve 4'te olduğu görülmektedir. *CFL2* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 2'yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

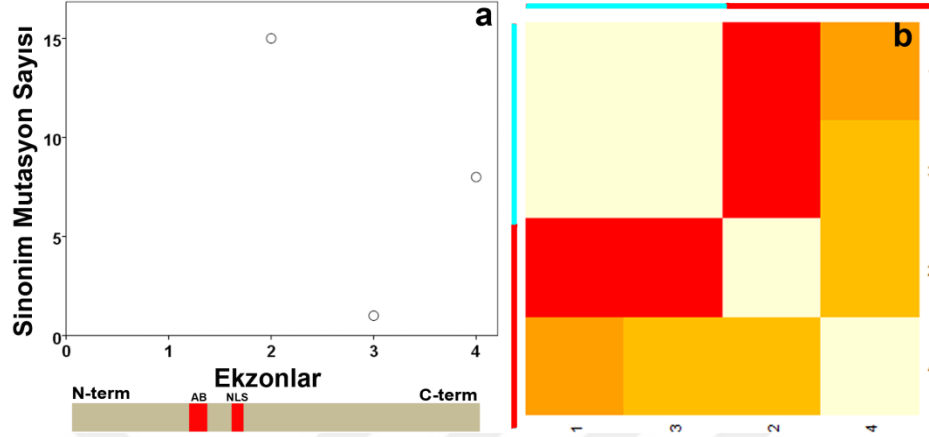


**Şekil 4.35.** *CFL2* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir (b). AB aktin bağlanma bölgesini temsil ederken, NLS ise nükleer lokalizasyon sinyalini temsil etmektedir.

Sinonim mutasyonlar: *CFL2* geninde 4 ekzonda toplamda 24 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 8 sinonim mutasyon ekzonlarda gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 15 ile ekzon 2'de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 3'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.36a). Öklid uzaklık parametresine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.36b). I. kümeyi mutasyon yükünün az olduğu 2 ekzon bölgesi (1 ve 3) oluştururken, II. kümeyi mutasyon yükünün fazla olduğu 2 ekzon bölgesi (2 ve 4) oluşmaktadır. Sinonim mutasyonlar bakımından kümeleme analizi ekzon 2'yi hotspot bölge olarak saptadı. Sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı

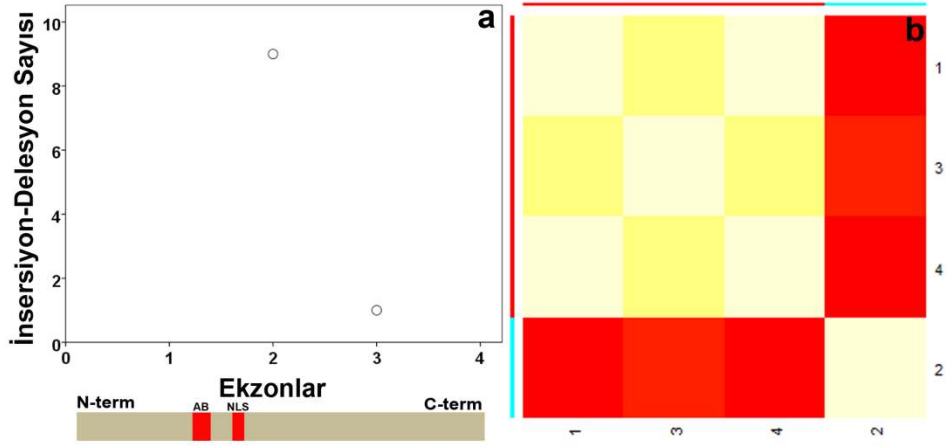


gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından ekzon 2'yi diğer ekzonlardan belirgin fark gösteren bir ekzon varlığına işaret etmektedir.



**Şekil 4.36.** *CFL2* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir (b). AB aktin bağlanma bölgesini temsil ederken, NLS ise nükleer lokalizasyon sinyalinin temsil etmektedir.

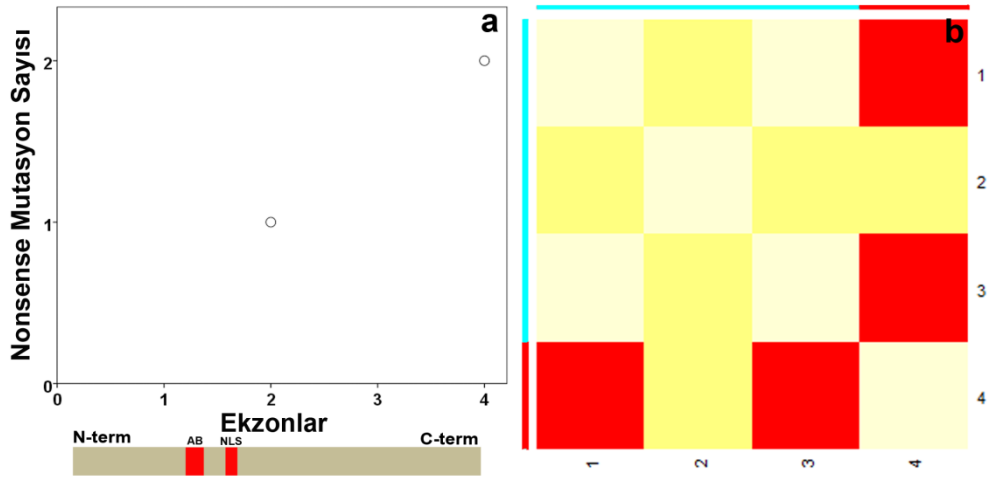
Çerçeve kayması mutasyonları: *CFL2* geninde 4 ekzonda toplamda 10 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyon ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 3 nonsinonim mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği en fazla indelin 9 ile ekzon 2'de, en az indelin ise 1 ile ekzon 3'de olduğu görülürken ekzon 4'de ise hiç indelin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.37a ). Ekzonlar arasında çerçeve kayması mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.37b). I. kümede hiç mutasyon görülmeyen ekzon 4 ve tek mutasyonun görüldüğü ekzon 3 yer alırken, II. kümeyi mutasyon yükünün fazla olduğu ekzon 2 oluşturmaktadır. Çerçeve kaymasından sorumlu indeller ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 2'yi hotspot bölge olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.37.** *CFL2* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir (b). AB aktin bağlanma bölgesini temsil ederken, NLS ise nükleer lokalizasyon sinyalini temsil etmektedir.

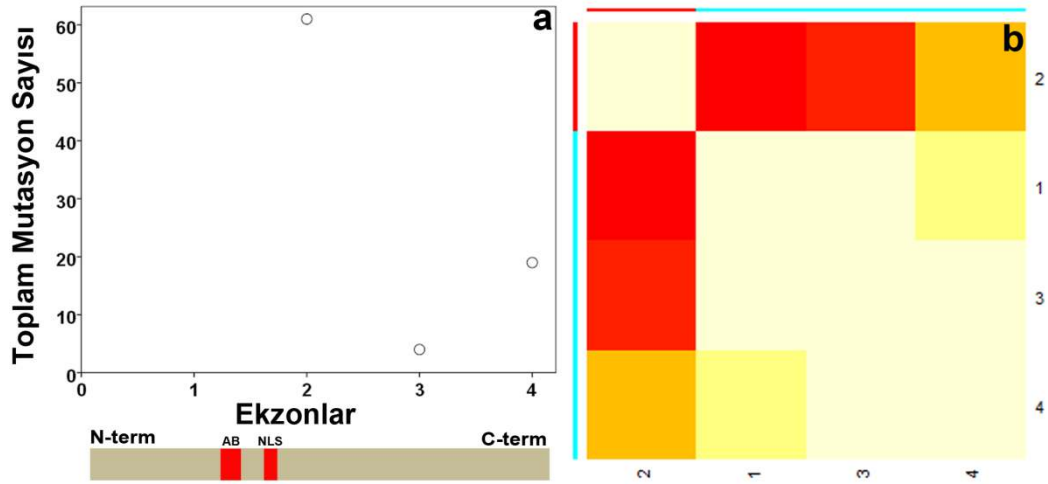
Nonsense mutasyonlar: *CFL2* geninde 4 ekzonda toplamda 3 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği, en fazla nonsense mutasyonun 2 ile ekzon 4’de, en az nonsense mutasyonun 1 ile ekzon 2’de olduğu ekzon 3’de ise hiç nonsense mutasyonunu olmadığı görülmektedir (Şekil 4.38a).

Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizleri 2 kümenin varlığına işaret etmektedir. I. kümeyi hiç mutasyonun görülmediği ekzon 1, 3 ile 1 mutasyonun görüldüğü ekzon 2 oluştururken, II. kümeyi 2 mutasyonun görüldüğü ekzon 4 oluşturmaktadır (Şekil 4.38b). Stop kodon oluşumundan sorumlu nonsense mutasyon ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 4’ü hotspot bölge olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.38.** *CFL2* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir (b). AB aktin bağlanma bölgesini temsil ederken, NLS ise nükleer lokalizasyon sinyalini temsil etmektedir.

Toplam mutasyon sayısı: *CFL2* geninde 4 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 84 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 28 mutasyonun olduğu, en fazla mutasyon sayısının 61 ile ekzon 2’de, en az mutasyonun ise 4 ile ekzon 3’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.39a). Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.39b). I. küme ekzon 1, 3 ve 4’ü kapsamaktayken, II. küme ekzon 2’yi kapsamaktadır. Genin korunumlu bölgelerinden birisi olan ve 30 ve 35. aminoasitler arasında yer alan nükleer lokalizasyon sinyalinden sorumlu bölgede 5 missense, 1 çerçeve kayması olmak üzere 6 mutasyon gözlemlendi. Genin korunumlu bölgesini oluşturan ve aktine bağlanmadan sorumlu 50. ve 60. aminoasitler arasındaki bölgede 8 missense, 2 sinonim, 1 nonsense olmak üzere toplamda 11 mutasyon gözlemlendi. Başlatma kodunu oluşumundan sorumlu metiyonini kodlayan ekzon 1’de bu aminoasidin kaybı ile sonuçlanan 2 mutasyon gözlenirken, ekzon 4’de sonlanma kodunun kaybı ile sonuçlanan 2 mutasyon gözlemlendi. Gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 2’yi hotspot bölge olarak tanımladı.



**Şekil 4.39.** *CFL2* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası. Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir (b). AB aktin bağlanma bölgesini temsil ederken, NLS ise nükleer lokalizasyon sinyalini temsil etmektedir.

*CFL2* geninde intron mutasyonları: *CFL2* geninde bulunan 2 introndan toplamda 60 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 30 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 31 ile intron 3’de, en az mutasyonun ise 29 ile intron 2’de olduğu görülmektedir. İtronlar arasında mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Fakat kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir.

PCoA ve faktör analizi: *CFL2* geni ekzon sayısı az olduğu için faktör ve PCoA analizleri gerçekleştirilmedi.

#### 4.2.1.4. *BIN1* Geni

*BIN1* geninden ekzon ve intron bölgeler dâhil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 1205 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 462 tanesi ekzon, 743 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 275 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 169 değişim ile

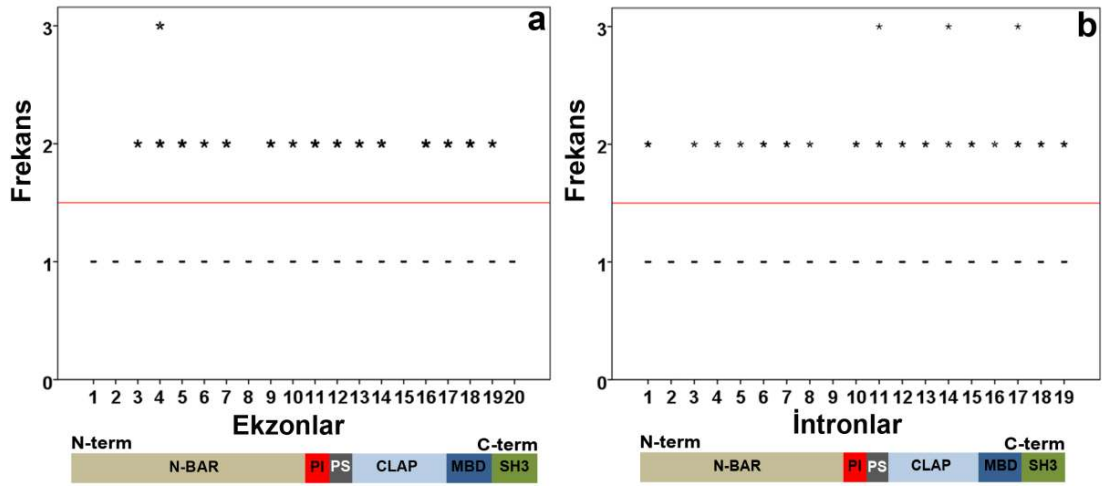
sinonim, 13 indel ile çerçeve kayması ve 5 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.18).

**Tablo 4.18.** *BINI* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 275 | 14   | 2                | 23               |
| Sinonim Mutasyon            | 169 | 8    | 2                | 20               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 13  | 0,6  | 0                | 2                |
| Nonsense Mutasyon           | 5   | 0,25 | 0                | 1                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 743 | 39   | 21               | 52               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*BINI* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *BINI* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 3 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.40). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Analiz sonuçlarına göre aynı pozisyonda görülen 2 ve üstü aşırı mutasyonlardır. Ekzon 1, 2, 8 ve 15 haricinde tüm ekzonlarda aynı pozisyonda 2 mutasyon bulunmaktadır. Aynı pozisyonda 3 mutasyonun bulunduğu tek ekzon ise ekzon 3' dür (Şekil 4.40a). Bu ekzonlar mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren ekzonlardır. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölgeler intron 2 ve 9 hariç gen boyunca tüm gen bölgesine dağıldığı görülmektedir (Şekil 4.40b). Aynı pozisyonda 3 mutasyonun bulunduğu 3 intron (intron 11, 15 ve 17) bölgesi bulunmaktadır. Genin C-terminal bölgesine yakın intronların hotspot bölge olma potansiyeli daha yüksekken ekzonlar için belirgin bir durum görülmemektedir (Şekil 4.40).

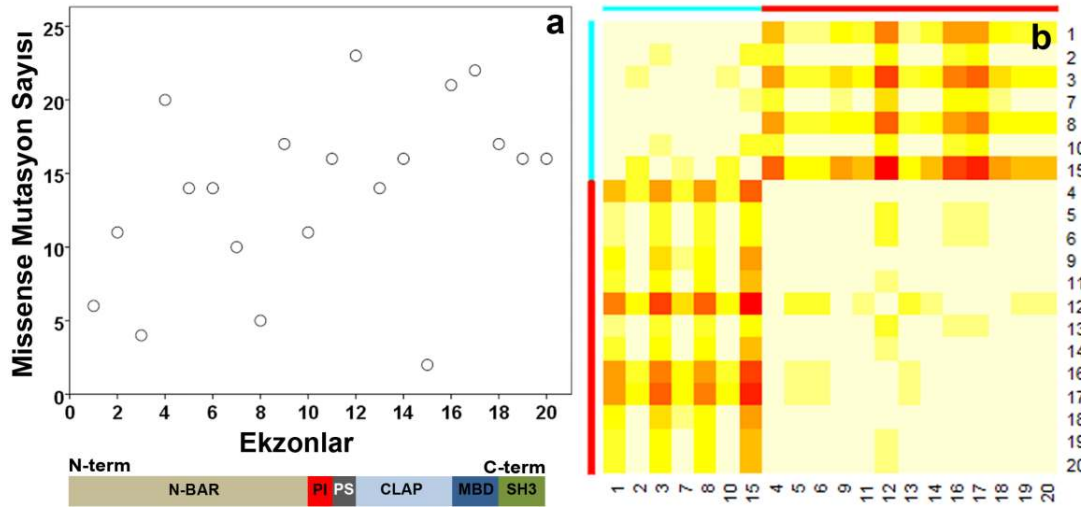


**Şekil 4.40.** *BIN1* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

#### 4.2.1.4.1. *BIN1* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*BIN1* geni 1. kromozomda yer alır, 20 ekzona sahip ve 59,132 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında genin 20 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *BIN1* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.66,  $n$ : 20,  $p$ : 0.00).

Missense mutasyonlar: *BIN1* geninde 20 ekzonda toplam 275 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 14 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 23 ile ekzon 12’de en az mutasyon ise 2 ile ekzon 15’de görülmektedir (Şekil 4.41a). Missense mutasyon sayısı bakımından N-BAR domaininde ortalama 11 (min: 4, maks: 20), PI domaininde (yalnızca ekzon 11’i içermektedir) 16 mutasyon, PS domaininde 23 mutasyon (yalnızca ekzon 12’yi içermektedir.), CLAP domaininde ortalama 13 (min: 2, maks: 21), MBD domaininde ise ortalama 20 (min: 17, maks: 22), SH3 domaininde ortalama 16 mutasyon olduğu gözlemlendi.

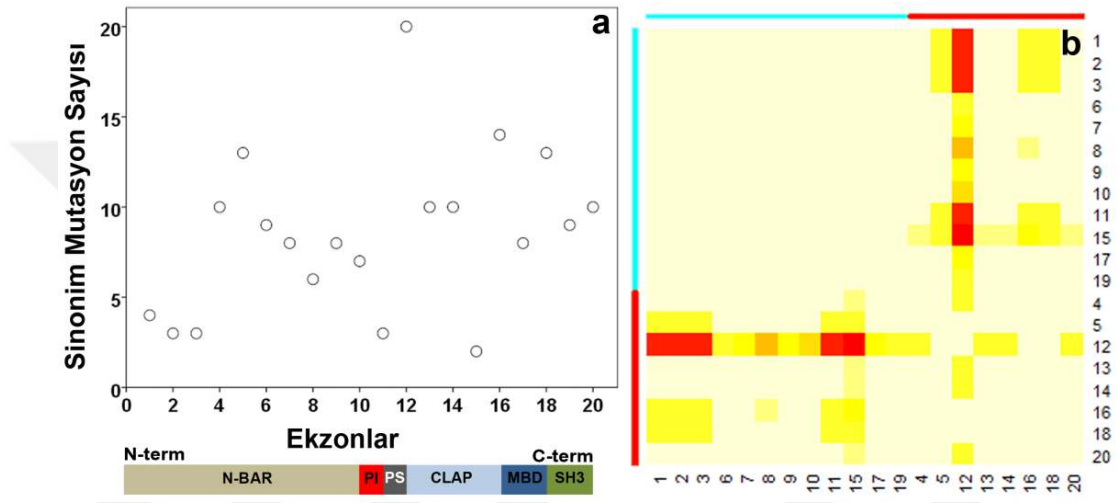


**Şekil 4.41.** *BIN1* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.41b). I. küme mutasyon yükü düşük olan 7 ekzondan (ekzon 1-3, 7, 8, 10 ve 15) oluşurken, II. küme mutasyon yükü fazla olan 13 ekzon oluşturmaktadır (Şekil 4.41). Missense mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonun PS domain içerisinde yer alan ekzon 12 ve MBD domain içerisinde yer alan ekzon 17 olduğu görülmektedir. Bu ekzonların yer aldığı domainler tüm izoformlarda yer almaktadır. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 3 ve 15’de olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal uca doğru yoğunlaştığı PS, CLAP ve MBD domainlerde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğu görülmektedir. *BIN1* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 7 ve 12’yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

Sinonim mutasyonlar: *BIN1* geninde 20 ekzonda toplam 169 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında, en fazla sinonim mutasyon 20 ile ekzon 12’de en az mutasyon ise 2 ile ekzon 15’de görülmektedir (Şekil 4.42a). Sinonim mutasyon sayısı bakımından N-BAR domaininde ortalama 7 (min: 3, maks: 13), PI domainde (yalnızca ekzon 11’i

içermektedir) 3 mutasyon, PS domaininde 20 mutasyon (yalnızca ekzon 12’yi içermektedir.), CLAP domaininde ortalama 9 (min: 2, maks: 14), MBD domaininde ise ortalama 11 (min: 8, maks: 13), SH3 domaininde ortalama 10 (min: 9, maks: 10) mutasyon gözlemlendi. Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi.



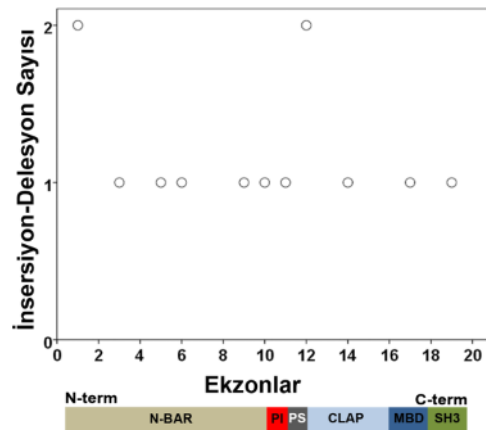
**Şekil 4.42.** *BIN1* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.42b). I. küme mutasyon yükünün az olduğu 12 ekzondan oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 8 ekzondan oluşmaktadır. II. kümede yer alan ekzonların gen boyunca dağılım gösterip PI bölgesi hariç tüm bölgelerden ekzonlar içerdiği görülmektedir. Sinonim mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonun PS domain içerisinde yer alan ekzon 12 ve CLAP domain içerisinde yer alan ekzon 16 olduğu görülmektedir. Bu ekzonların yer aldığı bölgeler tüm izoformlarda yer almaktadır. Sinonim mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.42a). Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 1, 2, 3 ve 15’de olduğu görülmektedir. Tüm gende mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal



ucuna doğru yoğunlaştığı PS, CLAP ve MBD domainlerde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğu görülmektedir. *BIN1* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 12 ve 16'yı diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

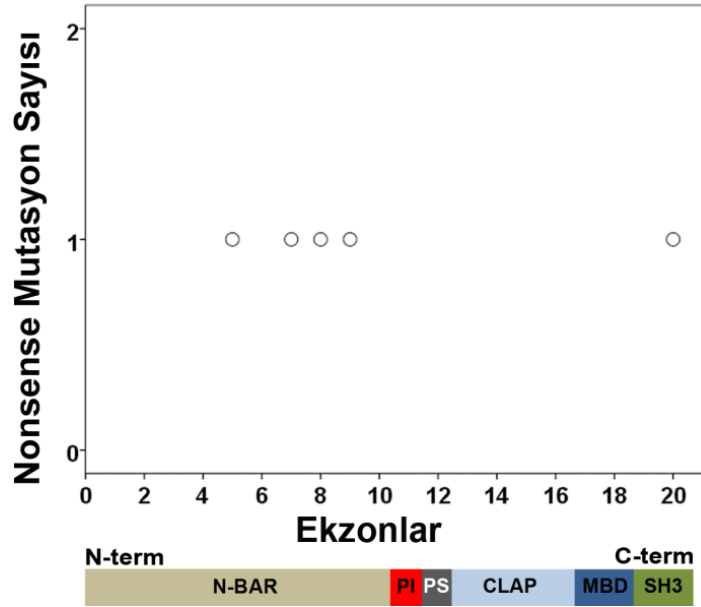
Çerçeve kayması mutasyonları: *BIN1* geninde 20 ekzonda toplam 13 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyon ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında en fazla indelin 2 ile ekzon 1 ve 12'de, en az indelin ise 1 ile ekzon 3, 5-6, 9-11, 14, 17-18'de olduğu kalan ekzonlarda ise hiç indelin olduğu görülmektedir (Şekil 4.43). İndel sayısı bakımından N-BAR domaininde ortalama 0.7 (min: 0, maks: 2), PI domainde (ekzon 11) 1 mutasyon, PS domaininde 2 mutasyon (ekzon 12) CLAP, MBD ve SH3 domainlerde yalnızca 1 mutasyon olduğu gözlemlendi. Mutasyon yüküne bağlı olarak kümeleme analizi gerçekleştirildi. Fakat analiz gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya işaret etmemektedir. Ancak genin baş bölgelerinde görülecek indellerin yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde olası hotspot ekzonların en fazla mutasyonun görüldüğü ekzon 1 olma olasılığı yüksektir. Outlier analizi sadece ekzon 1 ve 12'yi hotspot bölge olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.43.** *BIN1* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı

Nonsense mutasyonlar: *BINI* geninde 20 ekzonda toplam 5 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 0,5 nonsense mutasyon gözlemlendi. Ekzonların genele dağılımına bakıldığında yalnızca ekzon 5, 7, 8, 9 ve 20’de 1 nonsense mutasyon gözlenirken, diğer ekzonlarda hiç mutasyon gözlenmedi. (Şekil 4.44). Görülen mutasyonların 4 tanesi N-BAR domaininde görülürken, 1 tanesinin de SH3 domaininde olduğu görüldü.

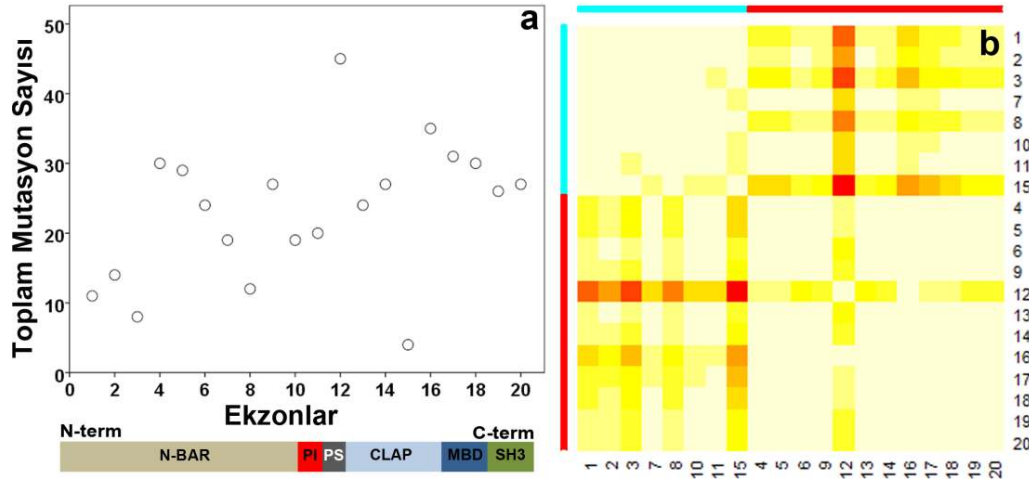
Ekzonlar arasında indel mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir (Şekil 4.44). Ancak genin baş bölgelerinde görülecek nonsense mutasyonların yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde olası hotspot ekzonların en fazla mutasyonun görüldüğü N-BAR domaininde yer alan ekzon 5-9 olma olasılığı yüksektir. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.



Şekil 4.44. *BINI* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

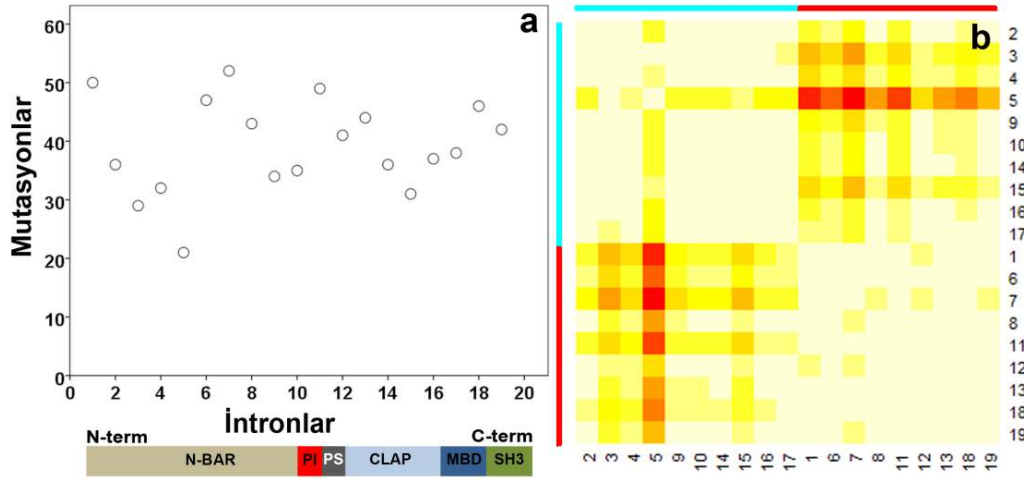
Toplam mutasyon sayısı: *BINI* geninde 20 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 462 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 23 mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla mutasyon sayısının 45 ile ekzon 12’de, en az mutasyonun ise 4 ile ekzon 15’de olduğu görölmektedir (Şekil 4.45a). Toplam mutasyon sayısı bakımından N-BAR domaininde ortalama 19 (min: 8, maks: 20), PI domaininde 20 mutasyon (yalnızca ekzon 11’i içermektedir), PS domaininde 45 mutasyon (yalnızca ekzon 12’yi içermektedir.), CLAP domaininde ortalama 23 (min: 4, maks: 35), MBD domaininde ise ortalama 31 (min: 30, maks: 31), SH3 domaininde ortalama 27 (min:26, maks: 27) mutasyon olduğu gözleendi.

Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağılı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.45b). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 8 ekzondan (ekzon 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11 ve 15) oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 12 ekzondan (ekzon 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 ve 20) oluşmaktadır. II. kümede yer alan ekzonların gen boyunca dağılım gösterip tüm bölgelerden ekzonlar içerdiği görölmektedir. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzon 12-20’yi (15 hariç) kapsayan bir hotspot bölgenin varlığına işaret etmektedir. Toplam mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonun PS domain içerisinde yer alan ekzon 12 ve CLAP domain içerisinde yer alan ekzon 16 olduğu görölmektedir. Bu ekzonların yer aldığı domainler tüm izoformlarda yer almaktadır. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 3 ve 15’de olduğu görölmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal uca doğru yoğunlaştığı PS, CLAP, MBD ve SH3 domainlerde mutasyon yoğunluğunun arttığı görölmektedir. *BINI* geninde gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi sadece ekzon 12 ve 16’yı diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



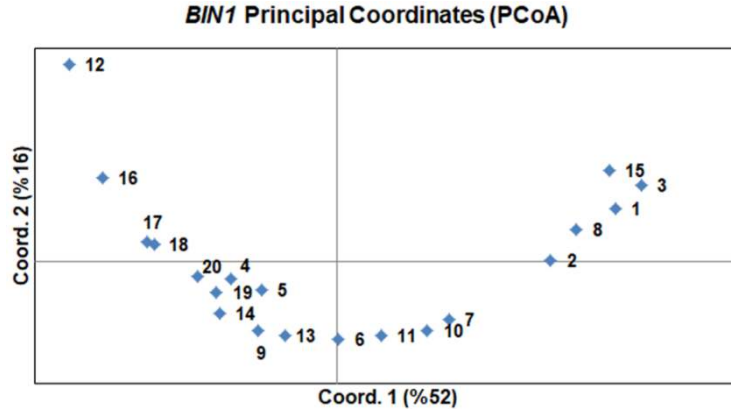
**Şekil 4.45.** *BIN1* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

*BIN1* geninde intron mutasyonları: *BIN1* geninde bulunan 19 introndan toplamda 743 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 39 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 52 ile intron 7’de, en az mutasyonun ise 21 ile intron 5’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.46a). Toplam mutasyon sayısı bakımından N-BAR domaininde ortalama 38 (min: 21, maks: 50), PI domaininde 49 mutasyon (yalnızca intron 11’i içermektedir), PS domaininde 41 mutasyon (yalnızca intron 12’yi içermektedir.), CLAP domaininde ortalama 37 (min: 31, maks: 44), MBD domaininde ise ortalama 42 (min: 38, maks: 46), SH3 domaininde 42 mutasyon olduğu gözleendi. İntronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.46b). Gen üzerinde herhangi bir bölgede yoğunlaşmış bir şekilde hotspot ihtimali taşıyan intronlar bulunmamaktadır. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde intron 1 ve 7’yi bir hotspot intron bölgesi olarak önermektedir.



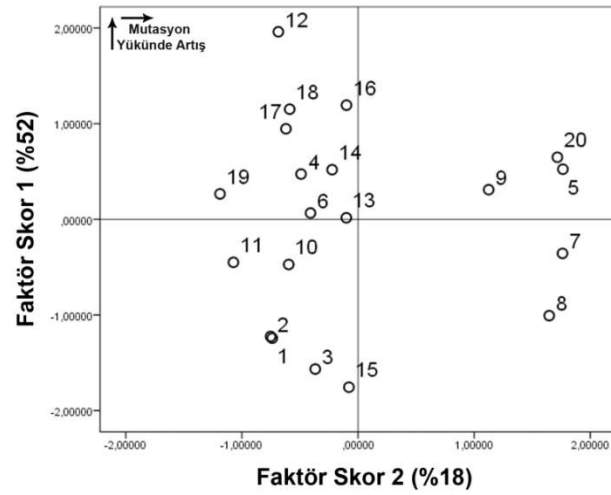
**Şekil 4.46.** *BIN1* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

PCoA analizi: *BIN1* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde üçlü bir gruplanmanın olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.47). Ekzon 1, 2, 3, 8 ve 15. ekzonları bir grup, ekzon 12'yi bir grup ve diğer kalan ekzonları da ayrı bir grup olarak ele almaktadır. Ekzon 1 ve 2'nin bulunduğu grup en az mutasyon yüküne sahip ekzonlar olup zardaki şekil değişikliklerinden sorumlu olan N-BAR domainde yer almaktadır. Ekzon 12'nin kendi başına bir grup oluşturduğu görülürken, yüksek mutasyon yüküne sahip bir ekzondur ve yine bu ekzona yakın konumlanmış olan ekzon 16, 17 ve 18 mutasyon yükünün fazla olduğu ekzonlardır.



**Şekil 4.47.** *BIN1* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: *BIN1* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde iki adet grup bulunmaktadır. İlk grup ekzon 5, 7, 8, 9 ve 20'den oluşurken, diğer kalan tüm ekzonlar ayrı bir grup oluşturmaktadır. İkinci grupta yer alan ekzon 12 en çok mutasyonun gözleendiği ekzon olup; diğerlerinden uzağa yerleşti ve yine mutasyon yükünün yüksek olduğu ekzon 16, 17 ve 18 ise ona yakın olarak konumlandı. (Şekil 4.48). İlk grupta yer alan ekzon 5, 9 ve 20'de mutasyon yükü fazla olan ekzonlar arasında yer almaktadır. Faktör (PCA) analizi PS, CLAP ve MBD bölgelerini kapsayan C-terminal uca yakın bölge mutasyon yükü bakımından diğerlerinden farklı bir grup oluşturmaktadır.



**Şekil 4.48.** *BIN1* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi

#### 4.2.2. Kalsiyum Homeostazı

##### 4.2.2.1. *RYR1* Geni

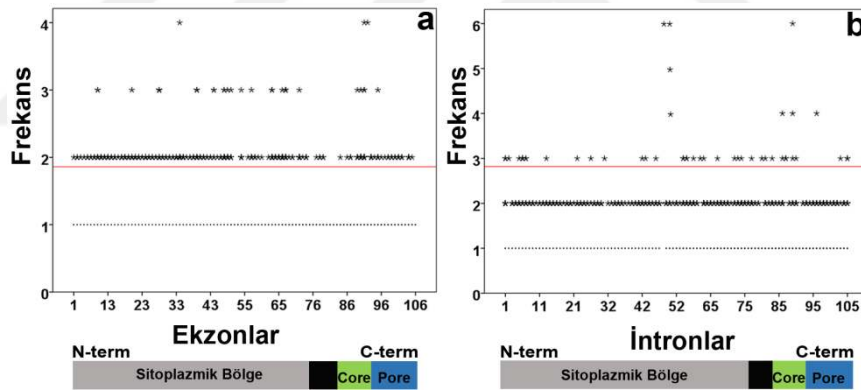
*RYR1* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 8687 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 4648 tanesi ekzon, 4039 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 2943 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 1508 değişim ile sinonim, 142 indel ile çerçeve kayması ve 55 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.19).

**Tablo 4.19.** *RYR1* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N    | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|------|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 2943 | 28   | 3                | 136              |
| Sinonim Mutasyon            | 1508 | 14   | 0                | 96               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 142  | 1.3  | 0                | 30               |
| Nonsense Mutasyon           | 55   | 0.5  | 0                | 5                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 4039 | 38   | 18               | 255              |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*RYR1* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *RYR1* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil ve ikili mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 6 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.49). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron hem de ekzon bölgeleri için aşırı mutasyonel bölgelerin olduğuna işaret etmektedir. Analizler tüm ekzonlarda hotspot bölgelerin varlığına işaret ederken, bir pozisyonda görülen 2 ve üstü mutasyonları aşırı mutasyonel olduğunu göstermektedir. Aynı pozisyonda 3 mutasyonun gözlemlendiği 19 ekzon bölgesi, aynı pozisyonda 4 mutasyonun gözlemlendiği 3 ekzon (ekzon 34, 91 ve 92) bölgesi bulunmaktadır (Şekil 4.49a). Aşırı varyasyonel pozisyonların bulunduğu ekzon 10, 34, 39, 48, 49, 66, 71 ve 92, I. derece hotspot bölge içerisinde yer almaktayken, ekzon 50, 54, 57, 63, 67, 89 ve 90 II. derece hotspot bölge içerisinde yer almaktadır.



**Şekil 4.49.** *RYR1* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlarda aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

Ekzonlarda aşırı varyasyonel pozisyonların genin de bütün kısmını oluşturan sitoplazmik domaininde oldukça yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 4.49a). İtron bölgelerinde de ekzonlarda olduğu gibi aynı pozisyonda çoğunlukla tekil ve ikili mutasyonların olduğu görülmektedir. Aynı pozisyonda 3 mutasyonun görüldüğü 31, 4 mutasyonun görüldüğü 4 (intron 48, 86, 89, 96), 5 mutasyonun gözlemlendiği bir



(intron 48) ve 6 mutasyonun görüldüğü 3 intron (48, 49, 89) görüldü (Şekil 4.49b). Aşırı varyasyonel mutasyonların bulunduğu intronlar çoğunlukla genin C-terminal bölgesinde yoğunlaşmıştır. Hotspot pozisyon varlığı bakımından intronlarda durumun ekzonlara göre daha fazla olduğu ve gen boyunca da daha homojen bir dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.49).

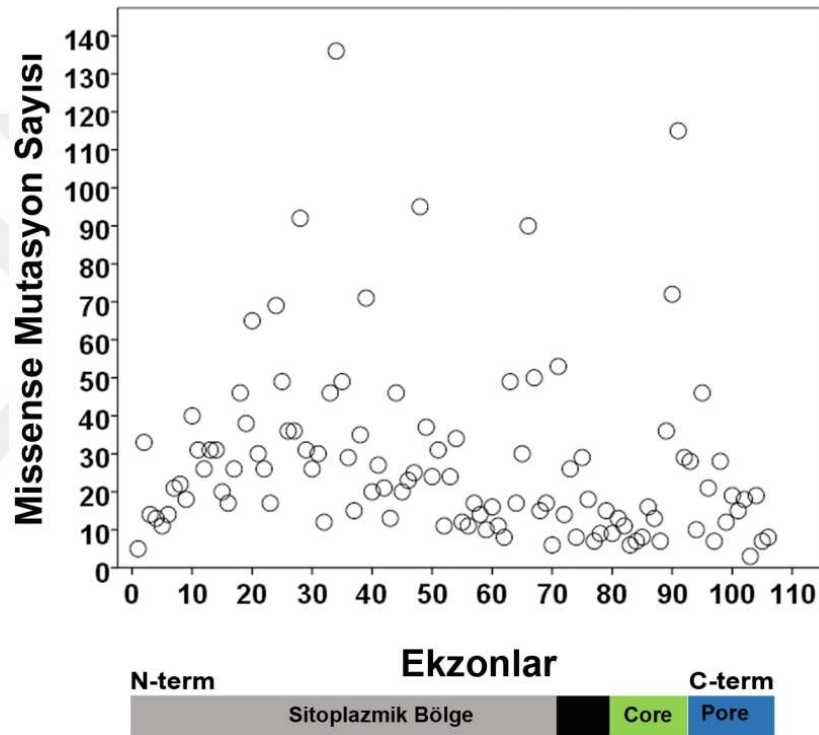
#### **4.2.2.1.1. *RYR1* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları**

*RYR1* geni 19. kromozom üzerinde yer alır, 106 ekzona sahip ve 161,583 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında gen üzerinde yer alan 106 ekzonda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *RYR1* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $\text{Cor}_{\text{Pearson}}: 0.86$ ,  $n: 106$ ,  $p: 0.00$ ).

Missense mutasyonlar: *RYR1* geninde 106 ekzonda toplam 2943 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 28 missense mutasyon gözlenirken; en fazla missense mutasyon 136 ile ekzon 34’de, en az mutasyon ise 3 ile ekzon 103’de görülmektedir (Şekil 4.50). Missense mutasyon sayısı bakımından shell domaininde ortalama 31 (min: 5, maks: 136) mutasyon görülmekte ve bu bölge içerisinde yer alan alt gruplardan SPRY1, SPRY3, Jsol domainlerde mutasyon yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Core (csol) domaininde ortalama 23 (min: 7, maks: 115), pore domaininde ortalama 18 (min: 3, maks: 46) mutasyon olduğu gözlemlendi.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Fakat gendeki ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı haritası gösterilememektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 4 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.20). I. küme mutasyon yükü düşük olan 36 ekzondan oluşurken, II. küme 38

ekzondan, mutasyon yükünün yüksek olduğu III. ve IV. kümeler sırasıyla 27 ve 5 ekzondan oluşmaktadır. Kümelerde yer alan ekzonların herhangi bir bölgede yoğunlaşmadığı görülmektedir. Fakat en yüksek mutasyon yüküne sahip olan ekzonların *RYR1* ile diğer proteinler arasında etkileşimde görev alan bsol ve pore bölgelerinde olduğu görülmektedir. Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan bsol domainiyken, pore domainde daha az mutasyon olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.50.** *RYR1* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

Aktivasyondan sorumlu olan core domainde ise ortalama bir mutasyon yükü görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal uçta yoğun olduğu ve C-terminal bölgeye doğru az da olsa azaldığı görülmektedir (Şekil 4.50). *RYR1* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise ekzon 2, 20, 21, 48, 49, 66, 70, 71, 75, 83 ve 92'yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

**Tablo 4.20.** *RYR1* geninde missense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

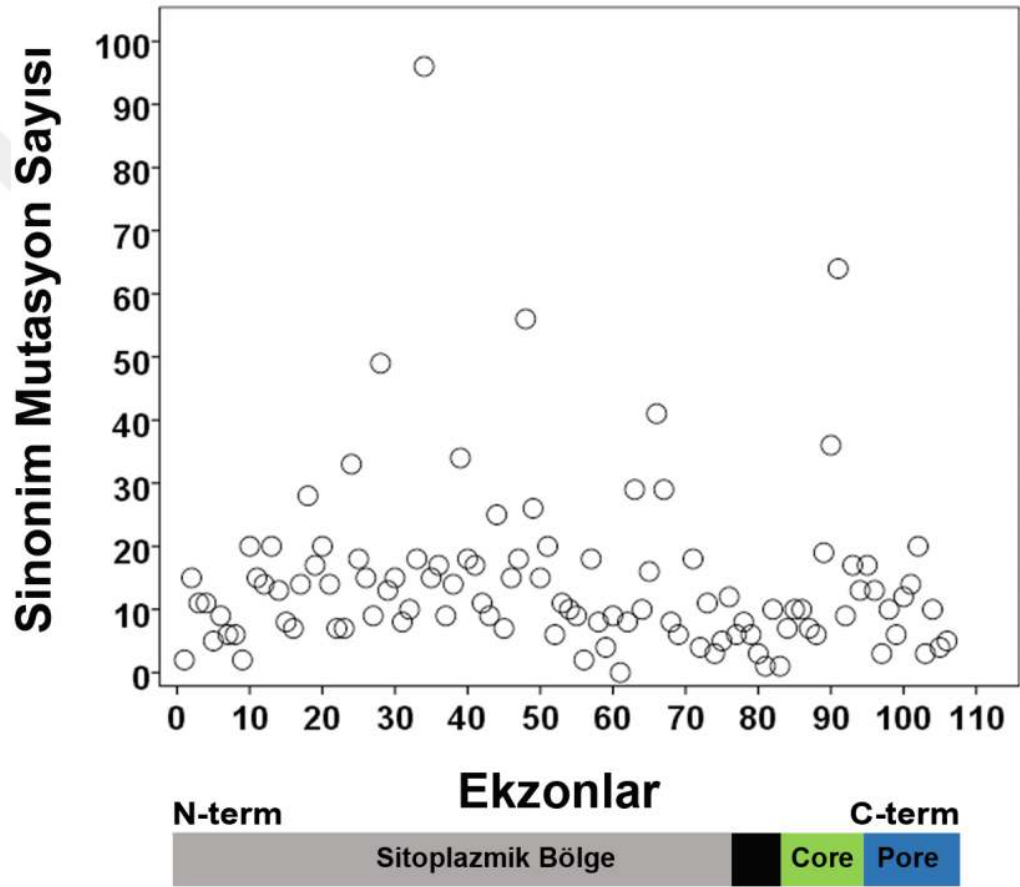
| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                        |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 1, 3, 5, 6, 16, 32, 36, 37, 43, 47, 52, 56-60, 62, 74, 77-80, 82, 84-88, 91, 94, 100- 103, 105, 106                             |
| Küme 2  | 4, 11, 13, 15, 17-19, 23, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 40, 41, 45, 46, 50, 51, 55, 63, 64, 67-69, 73, 76, 81, 89, 90, 93, 95-99, 104 |
| Küme 3  | 2, 7-10, 12, 14, 20-22, 24, 25, 28, 29, 34, 38, 39, 42, 44, 53, 54, 61, 65, 66, 71, 72, 75                                      |
| Küme 4  | 48, 49, 70, 83, 92                                                                                                              |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme IV'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Sinonim mutasyonlar: *RYR1* geninde 106 ekzonda toplam 1508 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 14 sinonim mutasyon gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 96 ile ekzon 34'de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 81 ve 83'de görülmektedir. Ekzon 61 ve 70'de de hiç sinonim mutasyon gözlenmedi (Şekil 4.51). Sinonim mutasyon sayısı bakımından Shell domaininde ortalama 15 (min: 0, maks: 96) mutasyon görülmekte ve bu bölge içerisinde yer alan alt gruplardan SPRY1 ve Jsol domainlerde mutasyon yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu görülmektedir. core (csol) domaininde ortalama 13 (min: 1, maks: 64), pore domaininde ortalama 10 (min: 3, maks: 20) mutasyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4.51).

Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Fakat gendeki ekzon sayısı çok fazla olduğu için ısı haritası gösterilememektedir. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 4 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.21). I. küme mutasyon yükü düşük olan 12 ekzondan oluşurken, II. küme 42 ekzondan ve mutasyon yükünün yüksek olduğu III. küme 45 ekzondan, IV. küme 7 ekzondan oluşmaktadır. Yüksek mutasyon yüküne sahip olan ekzonların *RYR1* ile diğer proteinler arasında etkileşimde görev alan csol ve pore bölgelerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan shell domainiyken, pore domaininde daha az mutasyon

olduğu görülmektedir. Aktivasyondan sorumlu olan core domainde ise ortalama bir sinonim mutasyon yükü görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal uca yoğun olduğu ve C-terminal bölgeye doğru az da olsa azaldığı görülmektedir. *RYR1* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise ekzon 4, 21, 27, 31, 34, 35, 40, 44, 48, 49, 57, 62, 82, 83 ve 94'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



Şekil 4.51. *RYR1* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

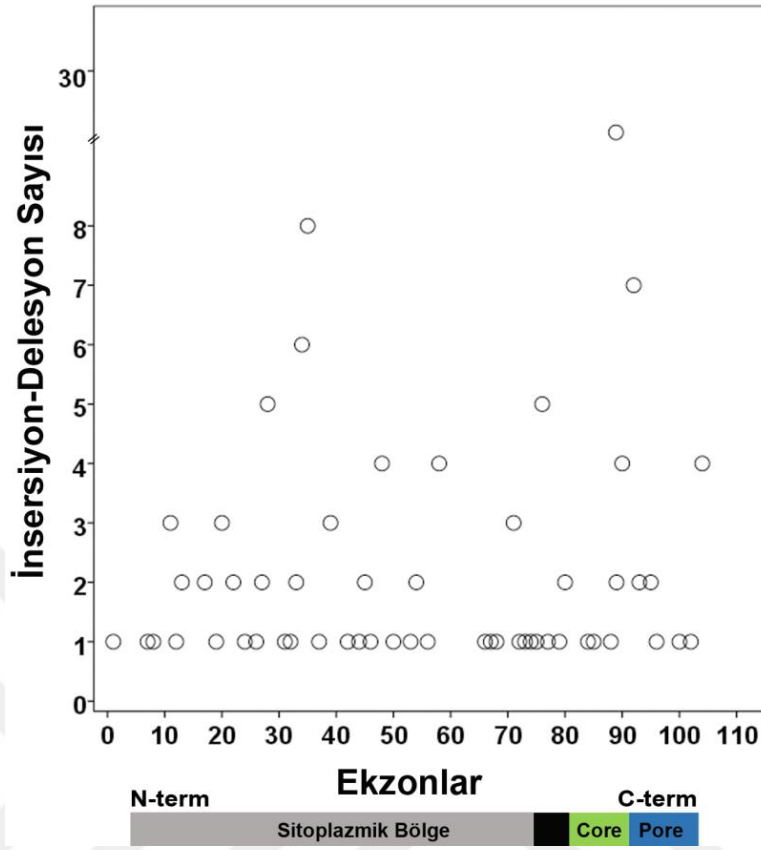
**Tablo 4.21.** *RYR1* geninde sinonim mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                                      |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 1, 9, 27, 31, 56, 61, 70, 74, 80, 81, 88, 103                                                                                                                 |
| Küme 2  | 5-8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 30, 33, 35-37, 43, 45, 52, 54, 58-60, 68, 69, 72, 73, 75, 79, 83, 84, 86, 87, 91, 95, 97, 98, 100, 105, 106          |
| Küme 3  | 2, 3, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 24, 28, 29, 32, 38, 39, 41, 42, 44, 46, 47, 50, 51, 53, 55, 62-67, 71, 76-78, 82, 85, 89, 90, 92, 93, 96, 99, 101, 102, 104 |
| Küme 4  | 4, 34, 40, 48, 49, 57, 94                                                                                                                                     |

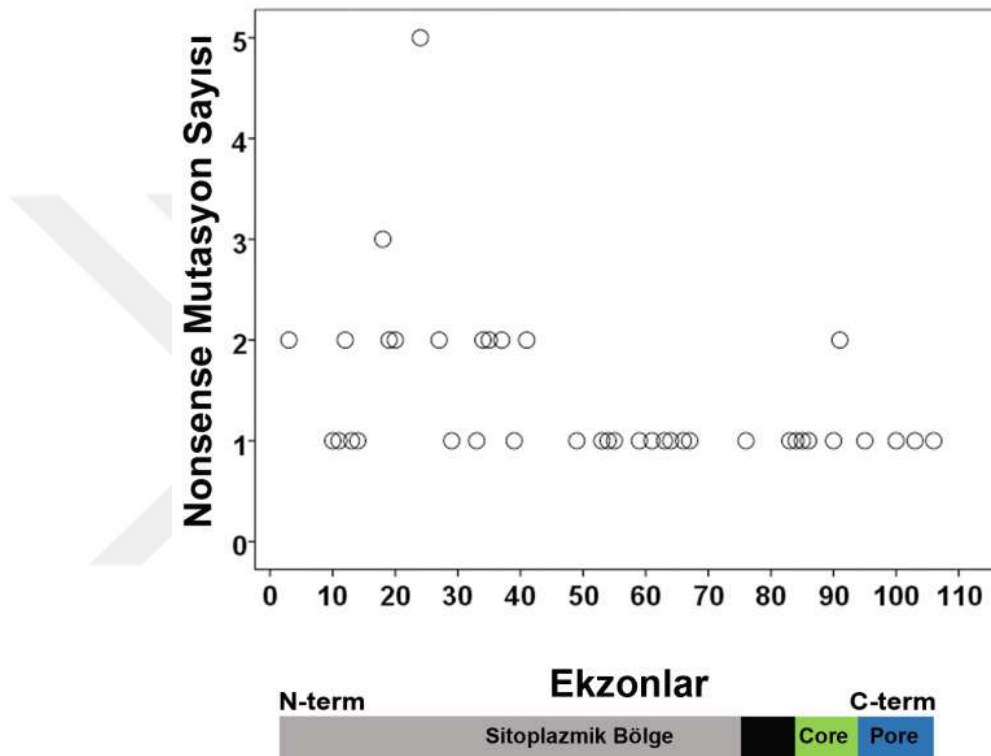
Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme IV'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Çerçeve kayması mutasyonları: *RYR1* geninde 106 ekzonda toplamda 142 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyon ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1.3 nonsinonim mutasyonun ekzonlarda gözleendiği en fazla indelin 30 ile ekzon 91'de, en az indelin ise 1 ile ekzon 31'de bulunduğı ve 50 ekzonda ise hiç indelin olmadığı görölmektedir (Şekil 4.52). İndel sayısı bakımından shell domaininde ortalama 1 (min: 0, maks: 4) mutasyon görölmekte ve bu bölge içerisinde yer alan alt gruplardan SPRY3 ve Jsol domainlerde mutasyon yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu görölmektedir. Core (csol) domaininde ortalama 3 (min: 0, maks: 30), pore domaininde ise ortalama 1.2 (min: 0, maks: 7) çerçeve kayması mutasyonu olduğu gözleendi.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.22). I. küme mutasyon yükü düşük olan 93 ekzondan oluşurken, II. küme 13 ekzondan oluşmaktadır. Yüksek indel mutasyon yüküne sahip olan ekzonların *RYR1* ile diğer proteinler arasında etkileşimde görev alan csol ve pore bölgelerinde yoğunlaştığı görölmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin diğer proteinler ile etkileşime geçtiği C-terminal uçta yoğun olduğu görölmektedir. *RYR1* geninde gözlenen çerçeve kayması mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise ekzon 1, 22, 35, 45, 48, 58, 76, 77, 80, 91, 92 ve 104'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.53). Stop kodonu oluşturan nonsense mutasyon sayısı bakımından shell domaininde ortalama 0.5 (min: 0, maks: 3) mutasyon görülmekte ve bu bölge içerisinde yer alan alt gruplardan SPRY3, Jsol ve RYR1&2 domainlerde mutasyon yoğunluğunun diğer bölgelere nazaran daha yüksek olduğu görülmektedir. Core (csol) domaininde ortalama 0.5 (min: 0, maks: 2), pore domaininde ortalama 0.2 (min: 0, maks: 1) mutasyon olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.53. *RYR1* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.23). I. küme mutasyon yükü düşük olan 85 ekzondan oluşurken, II. küme 21 ekzondan oluşmaktadır. Kümelerde yer alan ekzonların herhangi bir bölgede yoğunlaşmadığı görülmektedir. Fakat en yüksek mutasyon yüküne sahip olan ekzonların *RYR1* ile diğer proteinler arasında etkileşimde görev alan csol ve pore bölgelerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal ucunda daha fazla olduğu görülmektedir. Bu bölgeler proteinin aktivasyonundan sorumludur. *RYR1* geninde gözlenen nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise ekzon 3, 12, 24, 41, 49, 55, 59, 61,

83 ve 103'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

**Tablo 4.23.** *RYR1* geninde stop kodon oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

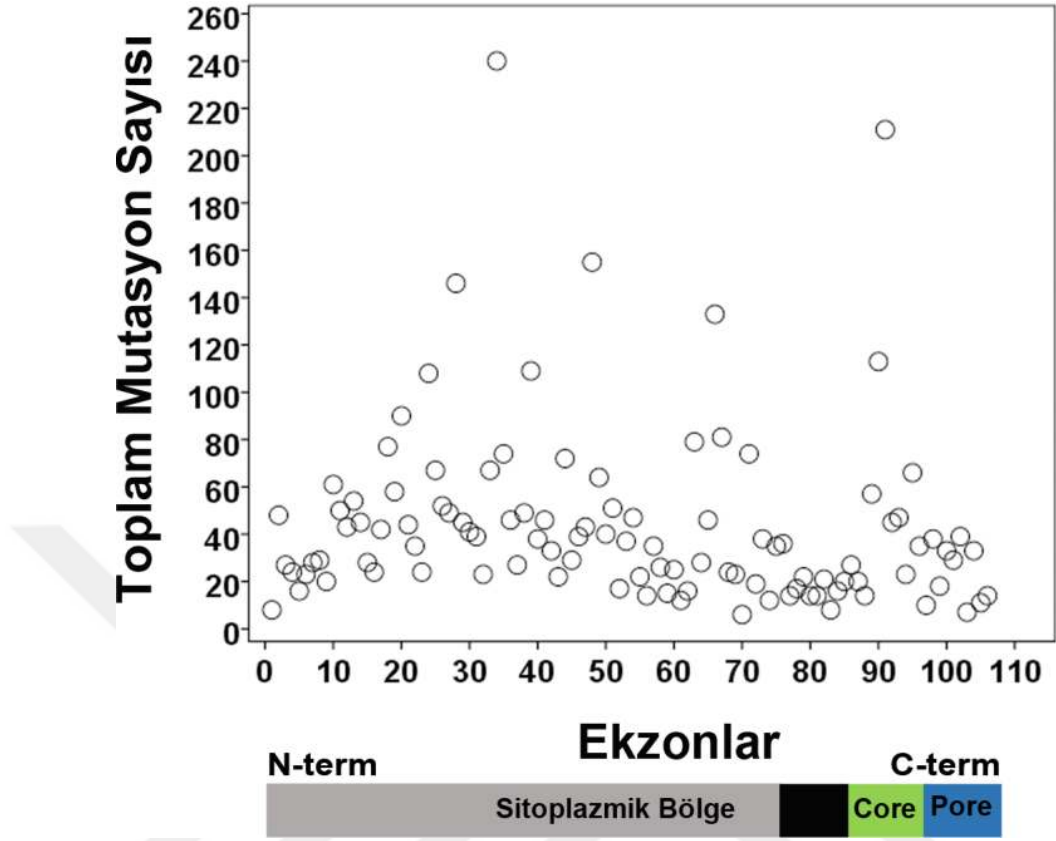
| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                            |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 1, 2, 4-11, 13-17, 21-23, 25, 26, 28-36, 38-40, 42-48, 50-52, 54, 56-58, 60, 62, 63, 65-75, 77-82, 86-102, 104, 105 |
| Küme 2  | 3, 12, 18-20, 24, 27, 37, 41, 49, 53, 55, 59, 61, 64, 76, 83-85, 103, 106                                           |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken, küme II'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

Toplam mutasyon sayısı: *RYR1* geninde 106 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 4648 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 44 mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla mutasyon sayısının 240 ile ekzon 34'de, en az mutasyonun ise 6 ile ekzon 70'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.54). Toplam mutasyon sayısı bakımından shell domaininde ortalama 48 (min: 6, maks: 240) mutasyon saptandı. Bu bölge içerisinde yer alan alt gruplardan SPRY1, SPRY3, Jsol domainlerde mutasyon yoğunluğunun diğer bölgelere nazaran daha yüksek olduğu görülmektedir. Core (csol) domaininde ortalama 39 (min: 8, maks: 113), pore domaininde ortalama 30 (min: 10, maks: 66) mutasyon olduğu gözleendi.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 4 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.24). I. küme mutasyon yükünün oldukça düşük olduğu 9 ekzondan oluşurken, II. küme 35 ekzondan oluşmaktadır ve mutasyon yükünün yüksek olduğu küme III ve IV sırası ile 41 ve 21 ekzondan oluşmaktadır. Yüksek mutasyon yüküne sahip olan ekzonların terminal bölgeye yakın yer alan *RYR1* ile diğer proteinler arasında etkileşimde görev alan csol ve pore bölgelerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal ve C-terminal uçlarda arttığı bu bölgelere nazaran orta kısımda yoğunluğun daha az olduğu görülmektedir. *RYR1* geninde gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise ekzon 2, 20, 21, 48, 49, 53, 66, 70, 71, 83, 92 ve 104'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.





**Şekil 4.54.** *RYR1* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

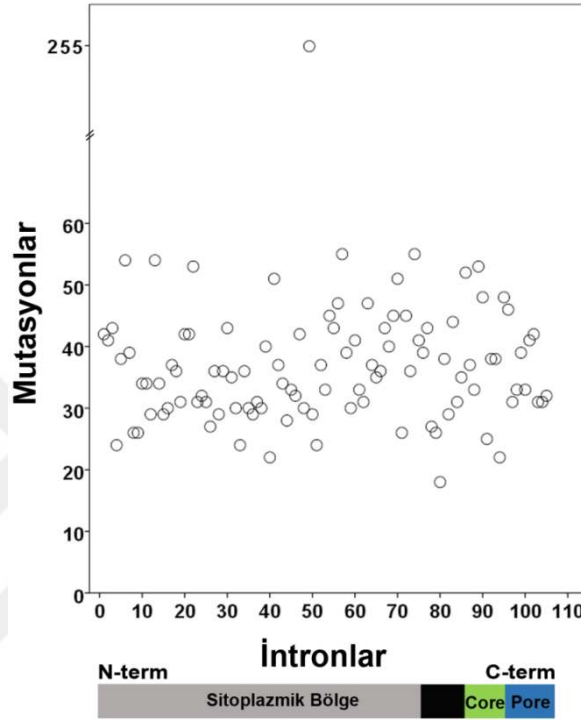
**Tablo 4.24.** *RYR1* geninde görülen tüm mutasyonların öklid uzaklık parametresine göre oluşturulan ekzonlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları ekzonlar

| Kümeler | Ekzonlar                                                                                                                                               |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 1, 43, 56, 74, 80, 81, 88, 103, 106                                                                                                                    |
| Küme 2  | 3, 5, 6, 9, 16, 27, 30-32, 36, 37, 45, 47, 52, 58-62, 69, 78, 79, 84-87, 91, 94-97, 100-102, 105                                                       |
| Küme 3  | 4, 7, 8, 11, 13-15, 17-19, 22, 23, 25, 26, 29, 33, 35, 38, 40, 41, 46, 50, 51, 54, 55, 57, 63, 64, 67, 68, 72, 73, 76, 77, 82, 89, 90, 93, 98, 99, 104 |
| Küme 4  | 2, 10, 12, 20, 21, 24, 28, 34, 39, 42, 44, 48, 49, 53, 65, 66, 70, 71, 75, 83, 92                                                                      |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu ekzonları kapsamaktayken küme IV'de en yüksek mutasyon yüküne sahip ekzonlar yer almaktadır.

*RYR1* geninde intron mutasyonları: *RYR1* geninde bulunan 105 introndan toplamda 4039 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 38 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun

255 ile intron 49’da, en az mutasyonun ise 18 ile intron 80’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.55). Mutasyon sayısı bakımından shell domainindeki intronlarda ortalama 39 (min: 22, maks: 255), core domainde ortalama 36 (min: 18 maks: 53), pore domaininde ortalama 36 (min: 31, maks: 48) mutasyonun olduğu gözlemlendi.



**Şekil 4.55.** *RYR1* geninde intronlarda gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı

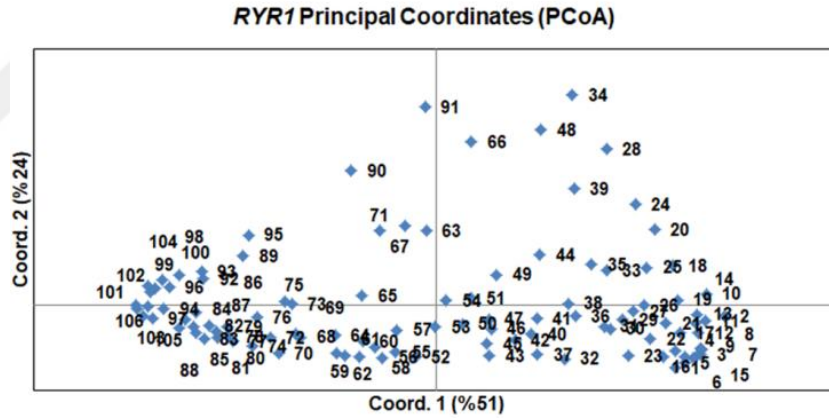
İntronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Tablo 4.25). I. küme düşük mutasyon yüküne sahip 64 introndan oluşurken, II. küme 40 introndan oluşmakta ve yüksek mutasyon yüküne sahip intronların yer aldığı küme III, yalnızca intron 49’dan oluşmaktadır. Gen üzerinde belirli bir bölgede mutasyonun yoğunlaştığı görülmemekle birlikte yalnızca intron 49’da diğerlerinden oldukça farklı şekilde mutasyon yoğunluğunun pik yaptığı görülmektedir. İntron mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece intron 49’u diğer intronlardan farklı ve aşırı varyasyonel intron olarak tanımlamaktadır.

**Tablo 4.25.** *RYR1* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi sonuçları ile oluşan kümeler ve bulundukları intronlar

| Kümeler | İntronlar                                                                                                                              |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Küme 1  | 4, 8-12, 14-19, 23-29, 31-38, 40, 42-46, 48, 50-53, 59, 61, 62, 64-66, 71, 73, 78-82, 84, 85, 87, 88, 91, 93, 94, 97, 98, 100, 103-105 |
| Küme 2  | 1-3, 5-7, 13, 20-22, 30, 39, 41, 47, 54-58, 60, 63, 67-70, 72, 74-77, 83, 86, 89, 90, 92, 95, 96, 99, 101, 102                         |
| Küme 3  | 49                                                                                                                                     |

Küme I mutasyon yükünün en düşük olduğu intronları kapsamaktayken, küme III'de en yüksek mutasyon yüküne sahip intronlar yer almaktadır.

PCoA analizi: *RYR1* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde temelde dörtlü bir gruplanmanın olduğuna ve bu gruplar içerisinde çok sayıda alt grup olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.56).



**Şekil 4.56.** *RYR1* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: Yapılan faktör analizinde değerlere yönelik tek bir faktör elde edildiği için faktör analiz grafiği oluşturulamadı.

#### 4.2.2.2. *SEPNI* Geni

*SEPNI* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 967 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 528 tanesi ekzon, 439 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 317 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken, bunu 160 değişim ile sinonim, 39 indel ile çerçeve kayması mutasyonları ve 12 değişim ile stop kodonu ve izledi (Tablo 4.26).

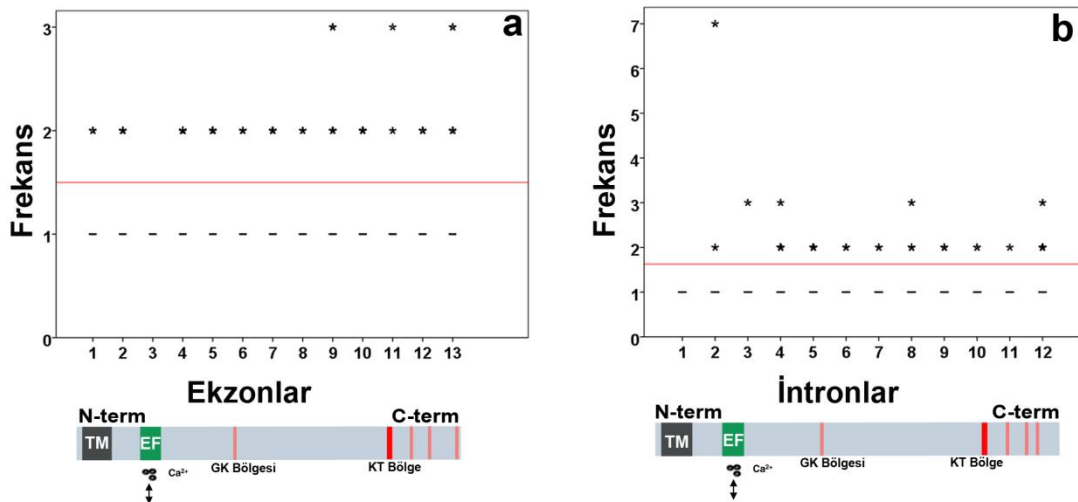
**Tablo 4.26.** *SEPNI* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 317 | 24   | 4                | 46               |
| Sinonim Mutasyon            | 160 | 12   | 3                | 25               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 39  | 3    | 12               | 3                |
| Nonsense Mutasyon           | 12  | 1    | 0                | 2                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 439 | 37   | 22               | 65               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*SEPNI* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *SEPNI* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 7 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.57). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Analiz sonuçlarına göre aynı pozisyonda tüm ekzonlarda tekil mutasyonlar gözlenirken, aynı pozisyonda 2

mutasyonun görüldüğü bölgeler ekzon 3 hariç tüm gen üzerinde dağılım göstermektedir (Şekil 4.57a). Aynı pozisyonda 3 mutasyonun bulunduğu 3 ekzon (ekzon 9, 11, 13) bulunmaktadır. Bu ekzonlardan ekzon 9 ve 13 mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren ekzonlardır. Transmembran ve kalsiyum regülasyonundan sorumlu EF-hand bölgesinde çoğunlukla aynı pozisyonda 2 mutasyonun olduğu gözlemlendi. Selenosistein (Sec) aminoasidinin yer aldığı ekzon 10'da bir pozisyonda maksimum 2 mutasyonun olduğu gözlenirken, bu bölgenin yakınında yer alan ve genin korunumlu olduğu düşünülen ekzon 9 ve 11'de aynı noktada 3 mutasyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4.57a). Mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından genin C-terminal kısmının daha yüksek olasılığa sahip olduğu görüldü. İntronlar üzerinde bir noktada aşırı varyasyonel pozisyonlar gen boyunca dağılım göstermekte olduğu görüldü. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölgeler transmembran bölgede yer alan intron 1 hariç diğer tüm intronlarda yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.57b). Kalsiyum regülasyonunda sorumlu olan EF-hand bölgesinde yer alan intron 2'de bir noktada 7 mutasyonun ile aşırı varyasyonel pozisyonun olduğu saptandı. Aynı noktada 3 mutasyon ile aşırı varyasyonel pozisyonun gözlemlendiği 4 intron (3, 4, 8, ve 12) bölgesi gözlemlendi. İntron bölgelerinde ekzonlara göre daha fazla varyasyonel pozisyonun olduğu görülmektedir (Şekil 4.57b).



**Şekil 4.57.** *SEPNI* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

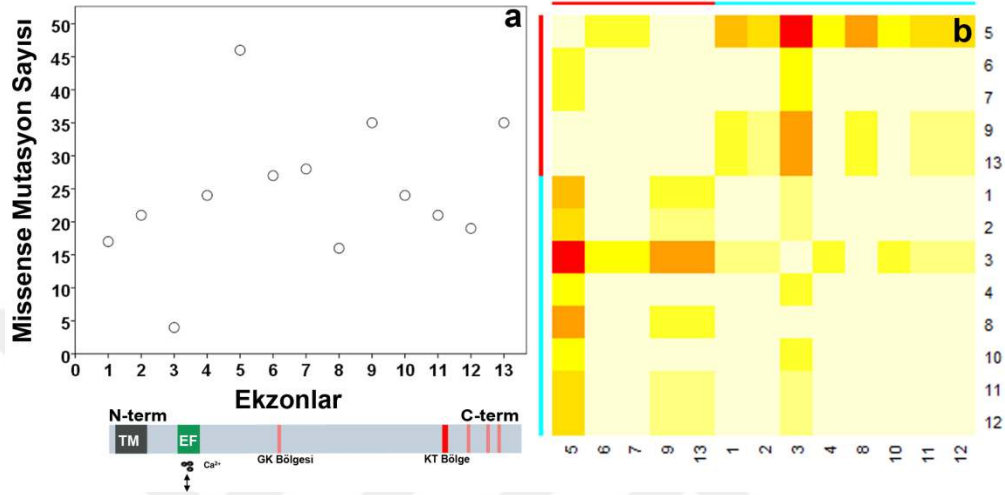
#### 4.2.2.2.1. *SEPNI* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*SEPNI* geni 1. kromozomda yer alır, 13 ekzona sahip ve 18,029 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında genin 13 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *SEPNI* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.82,  $n$ : 13,  $p$ : 0.09).

Missense mutasyonlar: *SEPNI* geninde 13 ekzonda toplam 317 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 24 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 46 ile ekzon 5’de en az mutasyon ise 4 ile ekzon 3’de görülmektedir (Şekil 4.58a). Transmembran bölgenin de içerisinde yer aldığı ekzon 1’de 17 missense mutasyon görülürken, kalsiyum regülasyonundan sorumlu EF-hand domainin de içerisinde yer aldığı ekzon 2’de 21 missense mutasyon gözlenirken, Sec aminoasidinin bulunduğu ve proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10’da 24 missense mutasyon görüldü. Ekzon 10 çevresindeki korunumlu olduğu düşünülen ekzon 9’da 35, ekzon 11’de ise 21 missense mutasyon görüldü.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.58b). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 8 ekzondan oluşurken, II. kümede mutasyon yükünün yüksek olduğu 5 ekzon (ekzon 5, 6, 7, 9 ve 13) bulunmaktadır. Birinci kümede genin transmembran ve EF-hand domain ve Trx domainin yer aldığı ekzonlar oluşturmaktadır. Glikolizasyon bölgeleri olarak görev alan c.1450G>A, c.1517C>T pozisyonlarında 1 tane sinonim mutasyon görüldü. Proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10 hotspot bölge olma ihtimali içeren ekzonlar arasında yer almamaktadır. Kümeleme analizi ekzon 5, 6, 7, 9 ve 13’ün hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 3 ve 8’de olduğu görülmektedir. Mutasyon yoğunluğu genel olarak homojen şekilde dağılım göstermekte olsa da ekzon 3’de aniden düşüş gözlenmekte, ekzon 5’de ise pik yaptığı

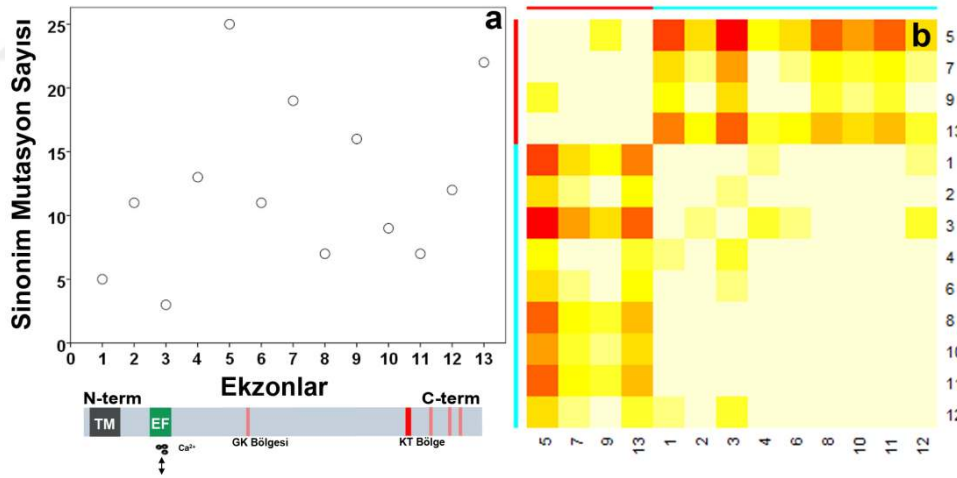
görülmektedir. Gen üzerinde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 5'i diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.58.** *SEPNI* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Sinonim mutasyonlar: *SEPNI* geninde 13 ekzonda toplam 160 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 12 sinonim mutasyon gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 25 ile ekzon 5’de en az mutasyon ise 5 ile ekzon 1’de görülmektedir (Şekil 4.59a). Transmembran bölgenin de içerisinde yer aldığı ekzon 1’de 5 sinonim mutasyon görülürken, kalsiyum regülasyonundan sorumlu olan EF-hand bölgenin içerisinde yer aldığı ekzon 2’de ise 11 sinonim mutasyon ve Sec aminoasidinin bulunduğu ve proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10’da 9 sinonim mutasyon görüldü. Ekzon 10 ve çevresindeki korunumlu olduğu düşünülen ekzon 9’da 16, ekzon 11’de ise 7 sinonim mutasyon görüldü. Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.59b). I. küme mutasyon yükü düşük olan 12 ekzondan oluşurken,

II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 4 ekzondan (ekzon 5, 7, 9 ve 13) oluşmaktadır. I. kümede genin transmembran ve EF-hand domain ve Trx domainin yer aldığı ekzonlar oluşturmaktadır. Ayrıca postranslasyonel modifikasyonda glikolizasyon bölgeleri olan c.1449C>T, c.1455C>T, c.1518G>A, c.1521C>G, c.1596C>T, c.1599C>T pozisyonlarında 1 tane sinonim mutasyon görüldü. Proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10 hotspot bölge olma ihtimali içeren ekzonlar arasında yer almamaktadır. Sinonim mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.59a). Kümeleme analizi 5, 7, 9 ve 13. ekzonların hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 1 ve 3’de olduğu görülmektedir. Mutasyon yoğunluğu genel olarak homojen şekilde dağılım göstermekte olsa da ekzon 3’de aniden düşüş gözlenirken, ekzon 5’de ise pik yaptığı görülmektedir. Gen üzerinde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 5 ve 13’ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzonlar olarak tanımlamaktadır.

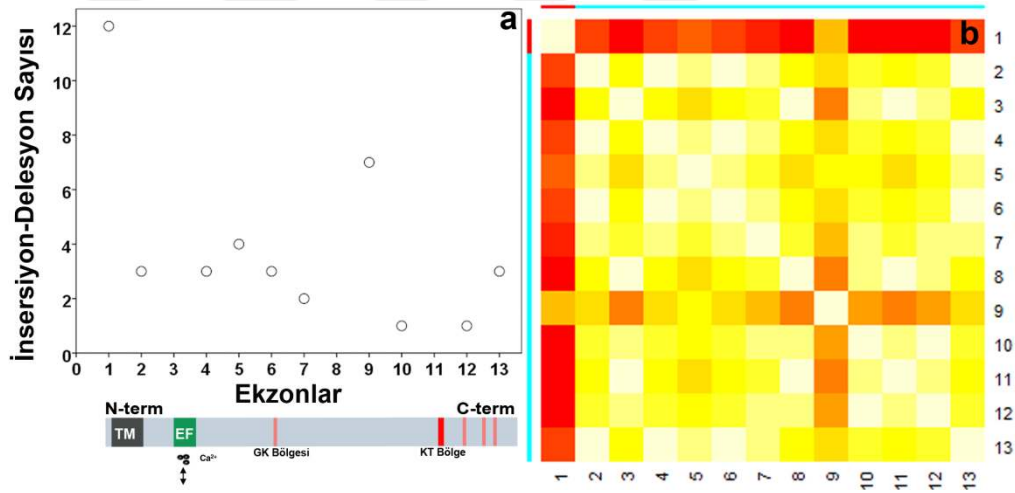


**Şekil 4.59.** *SEPNI* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Çerçeve kayması mutasyonları: *SEPNI* geninde 13 ekzonda toplamda 39 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyon ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 3 nonsinonim



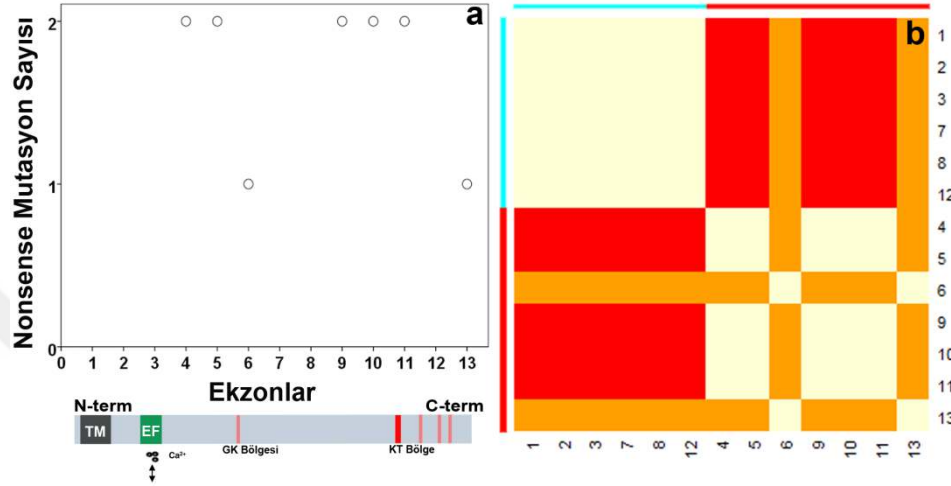
mutasyonun ekzonlarda gözleendiği en fazla indelin 12 ile ekzon 1’de en az indelin ise 1 ile ekzon 10 ve 12’de olduğu ekzon 3, 8 ve 11’de ise hiç indelin olmadığı görölmektedir. Transmembran bölgede yer alan ekzon 1’de 12 indel görölürken, kalsiyum regölasyonundan sorumlu olan EF-hand domainde yer alan ekzon 2’de ise 3 indelin ve Sec aminoasidinin bulunduğu ve proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10’da 1 indel göröldü. Ekzon 10 ve çevresindeki ekzonların korunumlu olduğu düşünölürken çevresindeki ekzon 9’da 7, ekzon 11’de ise hiç mutasyon görölmedi. Ayrıca glikolizasyon bölgelerinde yer alan pozisyonlarında da hiç indel mutasyon gözlenmedi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.60b). I. kümede mutasyon yükünün düşük olduğu 12 ekzondan oluşurken, II. küme ise en çok mutasyonuna sahip olan tek ekzondan (ekzon 1) oluşmaktadır (Şekil 4.60b).



**Şekil 4.60.** *SEPNI* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Nonsense mutasyonlar: *SEPNI* geninde 14 ekzonda toplamda 12 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla nonsense mutasyonun ekzon 4, 5, 9, 10 ve 11’de, en az nonsense mutasyonun 1 ile ekzon 6 ve 13’de olduğu görölmektedir (Şekil 4.61a). Transmembran bölge ve kalsiyum

regülasyonundan sorumlu olan EF-hand domainin de içerisinde yer aldığı ekzon 1 ve 2’de hiç nonsense mutasyon gözlenmedi. Sec aminoasidinin bulunduğu ve proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10’da 2 nonsense mutasyon görüldü. Ekzon 10 ve çevresindeki ekzonların korunumlu olduğu düşünülürken çevresindeki ekzon 9 ve 11’de 2 mutasyon görüldü.

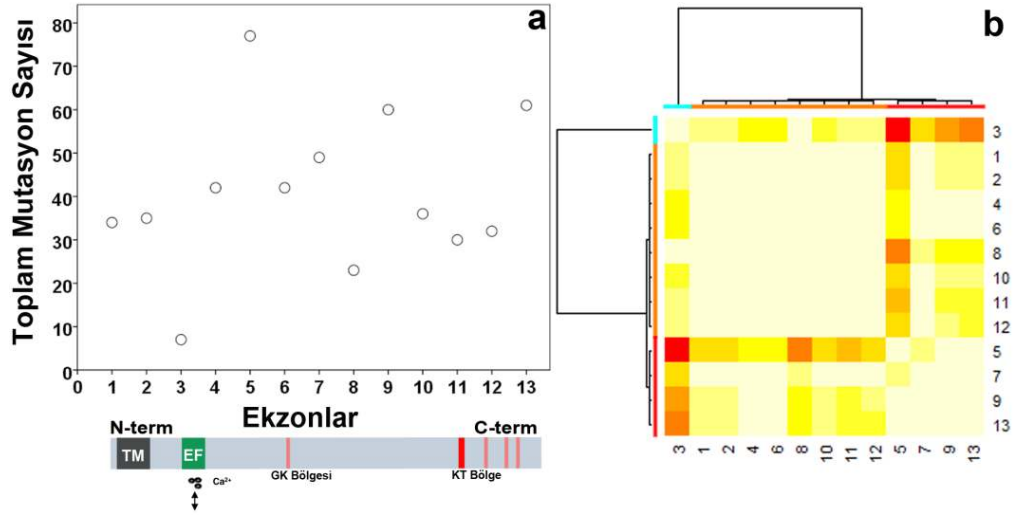


**Şekil 4.61.** *SEPNI* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.61b). I. küme hiç mutasyon görülmeyen 6 ekzondan oluşurken, II. küme mutasyon yükünün daha yüksek olduğu 7 ekzondan oluşmaktadır. Kümeleme analizi 4, 5, 6, 9, 10, 11 ve 13. ekzonların hotspot olabileceğine işaret etmektedir. Mutasyon yoğunluğu genel olarak 1 ile 2 arasında değişmekte olup ekzon 4, 5, 9, 10 ve 11’de en çok mutasyonun olduğu görülmektedir (Şekil 4.61b). Gen üzerinde gözlenen nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon tanımlamadı.

Toplam mutasyon sayısı: *SEPN1* geninde 13 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 528 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 41 mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla mutasyon sayısının 77 ile ekzon 5’de, en az mutasyonun ise 7 ile ekzon 7’de olduğu görölmektedir (Şekil 4.62a). Transmembran bölge ve kalsiyum regölasyonundan sorumlu olan EF-hand domainde yer alan ekzon 1’de 34 mutasyon, ekzon 2’de 35 mutasyon, Sec aminoasidinin bulunduğu ve proteinin katalitik bölgesini oluşturan ekzon 10’da 36 mutasyon saptandı. Ekzon 10 ve çevresindeki ekzonların korunumlu olduğu düşünölürken, çevresindeki ekzon 9’da 60 ekzon 11’de ise 30 mutasyon göröldü. Gen üzerinde yer alan 4 glikolizasyon bölgelerinde toplamda 10 mutasyon gözleendi.

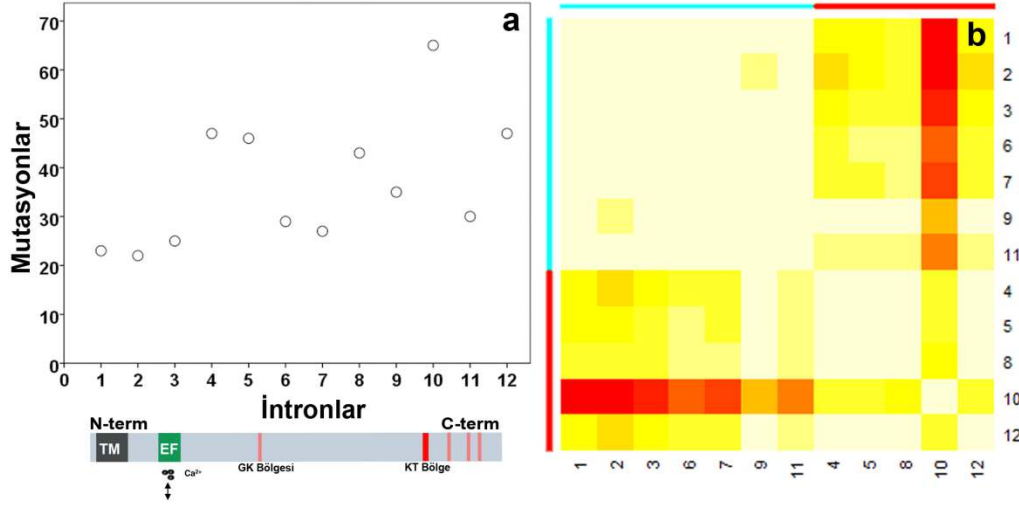
Ekzonlar arasında toplam mutasyon yüküne bağı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.62b). I. küme en az mutasyonun göröldüğü ekzon 3’den oluşurken, II. küme 8 ekzondan (ekzon 1, 2, 4, 6, 8, 10-12), III. kümenin ise mutasyon yükünün yüksek olduğu 4 ekzondan (ekzon 5, 7, 9 ve 13) oluştuğu göröldü. Kümeleme analizi 5, 7, 9 ve 13. ekzonların hotspot olabileceğine işaret etmektedir. Mutasyon yoğunluğu ekzonlarda genel olarak 20 ile 60 arasında değışmektedir (Şekil 4.62a). Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 5 ve 13’ü hotspot bölge olarak tanımladı.



**Şekil 4.62.** *SEPNI* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

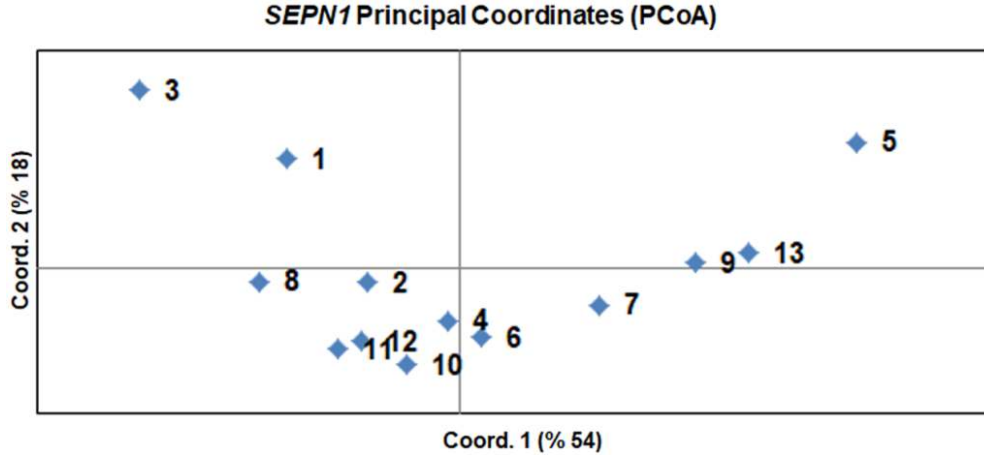
*SEPNI* geninde intron mutasyonları: *SEPNI* geninde bulunan 12 introndan toplamda 439 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 37 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 65 ile intron 10'da, en az mutasyonun ise 22 ile intron 2'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.63a). Transmembran bölgenin içerisinde yer aldığı intron 1'de 23 mutasyon gözlenirken, kalsiyum regülasyonundan sorumlu olan EF-hand bölgenin içerisinde yer aldığı intron 2'de 22 mutasyon gözleendi.

İntronlar arasında toplam mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi intronlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.63b). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 7 introndan (intron 1-3, 6, 7, 9 ve 11) oluşurken, II. küme ise mutasyon yükünün fazla olduğu 5 introndan (intron 4, 5, 8, 10 ve 12) oluşmaktadır (Şekil 4.63b). Mutasyon yoğunluğu genel olarak 20 ile 50 arasında değişmekte olup; intron 4, 5, 8, 10 ve 12. intronlarda en çok mutasyonun olduğu görülmektedir. Gen üzerinde gözlenen intron bölgesi mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi intron 10'u diğer intronlardan farklı ve aşırı varyasyonel intron tanımladı.



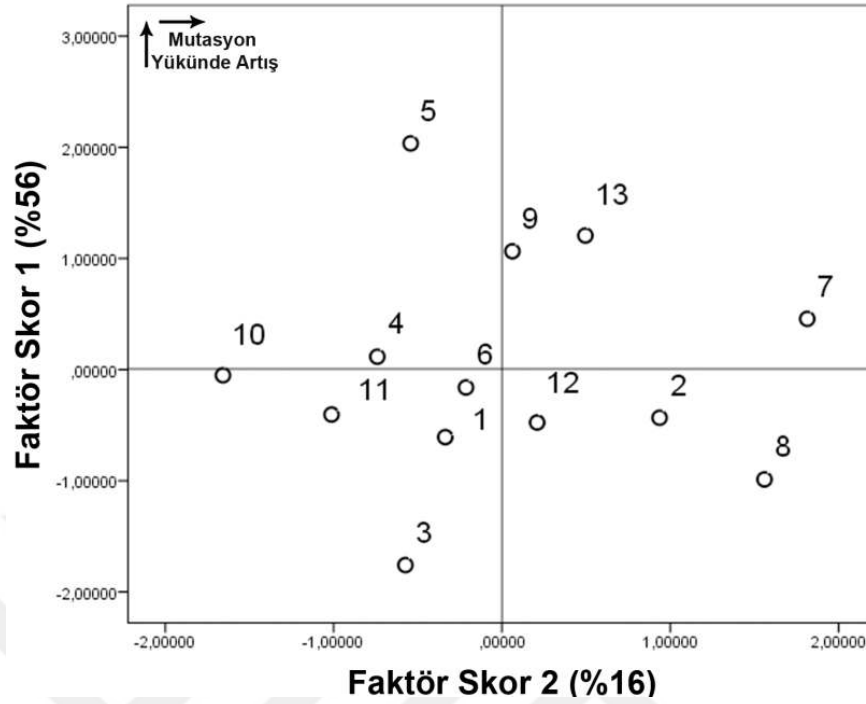
**Şekil 4.63.** *SEPNI* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

PCoA analizi: *SEPNI* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu göstermektedir. Analiz gen içerisinde mutasyon yoğunluğa göre temelde dörtlü bir gruplanma ve bu grubun içerisinde çok sayıda alt grup olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.64). Ekzon 5 en çok mutasyonun görüldüğü ekzon olup, ona en yakın ekzon 9 ve 13 yerleşim göstermektedir. Diğer analizler de dikkate alındığında bu ekzonlar hotspot ekzon olma potansiyeli taşımaktadır. Diğer kalan ekzonlar ise en az mutasyonun görüldüğü ekzonlardır. En az mutasyonun görüldüğü ekzon 3 diğerlerinden oldukça uzakta yer almaktadır.



**Şekil 4.64.** *SEPNI* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: *SEPNI* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde çok sayıda grup bulunmaktadır. Ekzon 1 tek başına diğer iki gruptan uzakta yerleşerek farklı bir grup oluşturmaktadır (Şekil 4.65). Faktör (PCA) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 5 iken, II. derece hotspot bölge ise ekzon 13'dür.



**Şekil 4.65.** *SEPNI* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi

#### 4.2.3. Miyofibriler Kuvvet

##### 4.2.3. 1. *ACTA1* Geni

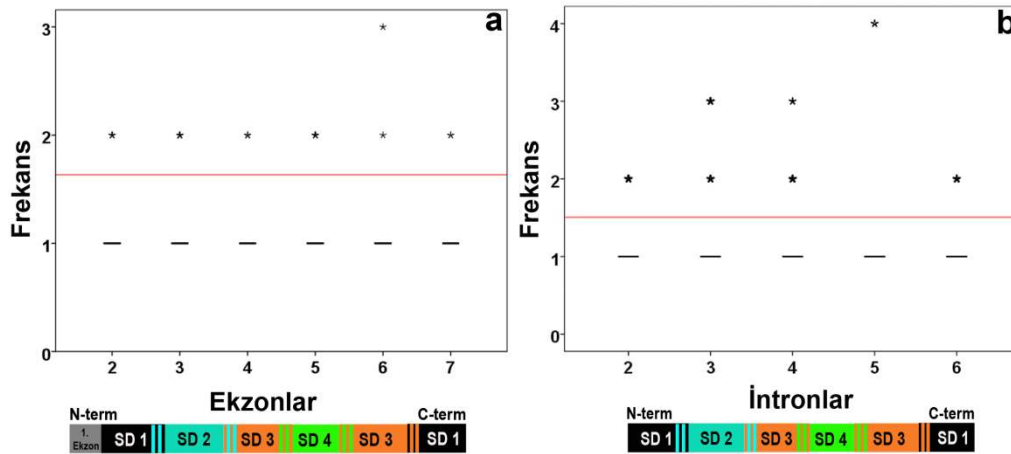
Gen üzerinde ekzon ve intron bölgeleri dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 378 mutasyon elde edildi. Bunlardan 188'i ekzon, 190'ı ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerindeki mutasyonlarda 108 ile en çok sinonim mutasyona rastlanırken bunu 62 ile missense, 10 ile indel ve 8 ile nonsense mutasyonlar izlemektedir (Tablo 4.27). Ekzonlarda gözlenen minimum mutasyon sayısı 13 ile en fazla sinonim mutasyonlardayken en az 0 ile çerçeve kayması ve nonsense mutasyonlarda gözlemlendi. En fazla mutasyon sayısına 25 ile sinonim mutasyonlarda gözlenirken, bunu 19 ile missense mutasyonlar izlemektedir. İntronlarda ise en az 5 mutasyon en fazla 30 mutasyon gözlemlendi. Gen üzerinde sinonim mutasyonların ve intronlarda görülen mutasyonların dominant olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.27.** *ACTA1* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 62  | 10   | 4                | 19               |
| Sinonim Mutasyon            | 108 | 18   | 13               | 25               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 10  | 1,6  | 0                | 4                |
| Nonsense Mutasyon           | 8   | 1,3  | 0                | 3                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 190 | 38   | 5                | 30               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*ACTA1* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *ACTA1* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 4 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.66). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgelerinde aşırı mutasyonların varlığına işaret etmektedir.



**Şekil 4.66.** *ACTA1* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

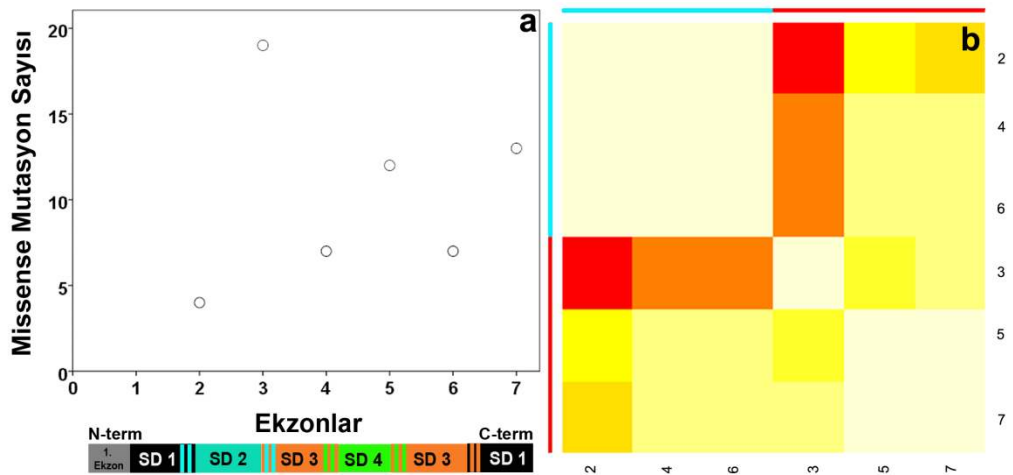


Analiz sonuçlarına göre aynı pozisyonda görülen 2 ve üstü aşırı mutasyonlardır. Tüm ekzonlarda hotspot pozisyonların varlığına işaret ederken, aynı pozisyonda 3 mutasyonun/aşırı varyasyonel bölgenin gözleendiği tek ekzon, ekzon 6'dır (Şekil 4.66a). Aşırı gözlem olarak analizde kabul edilen pozisyonlarda mutasyon gerçekleşme olasılığı diğer pozisyonlara göre daha yüksek olasılığa sahiptir. Mutasyonların genel olarak ekzonlar boyunca homojen bir şekilde dağıldığı gözlenmektedir. Protein yapısında her ne kadar her ekzonda 2 mutasyon pozisyonuna denk gelen hotspot pozisyonlar olsada 3 ile en yüksek mutasyonel pozisyon subdomain 3 bölgesine denk gelmektedir. İntronlarda ise aynı pozisyonda 4 mutasyonun/aşırı varyasyonel bölgenin gözleendiği tek bir intron (intron 5) bölgesi bulunurken 3 mutasyonun gözleendiği 2 (intron 3 ve 4) 2 mutasyonun gözleendiği 4 intron bölgesi (intron 2, 3, 4 ve 6) bulunmaktadır. Hotspot pozisyon varlığı bakımından intronlarda pozisyonların ekzonlara göre daha fazla ve değişim oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Hem ekzonlarda hem de intronlarda hotspot pozisyonlar C-terminal bölgeye yakın özellikle intronlarda aşırı varyasyonel pozisyonların proteinin orta kısımlarında yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.66b). Ekzon 6'da 2 mutasyon içeren pozisyonlar bulunurken, intron 5'de bir pozisyonda 2 ya da 3 mutasyon gözlenmezken, 4 mutasyonun gözlenmiştir (Şekil 4.66). Öte yandan intron 3 ve 4 de aynı anda hem 2 hemde 3 mutasyon içeren pozisyonların varlığı da bu bölgelerin toplam da içerdikleri varyasyon kapasitesi bakımından dikkat çekici bölgeler olduğuna işaret etmektedir.

#### **4.2.3.1.1. ACTA1 Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları**

*ACTA1* geni 1.kromozomda bulunur, 7 ekzona sahip ve 3740 baz uzunluğundadır. Gen üzerinde yer alan 7 ekzondan ekzon 1 kodlama yapmadığı için bu gen bölgesinden veriler analizlerde kullanılmadı. Çalışma kapsamında genin 6 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *ACTA1* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermemiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.77, n: 6, p: 0.069).

Missense mutasyonlar: *ACTA1* geninde 6 ekzonda toplam 62 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 10 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 19 ile ekzon 3’de en az mutasyon ise 4 ile ekzon 2’de görülmektedir (Şekil 4.67a). Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında iki kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.67b). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu üç ekzondan (ekzon 2, 4 ve 6) oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu üç ekzondan (ekzon 3, 5 ve 7) oluşmaktadır. Isı-harita analizinde II. küme içerisinde yer alan ekzon 3’ün diğer ekzonlardan en farklı olanı olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.67b).

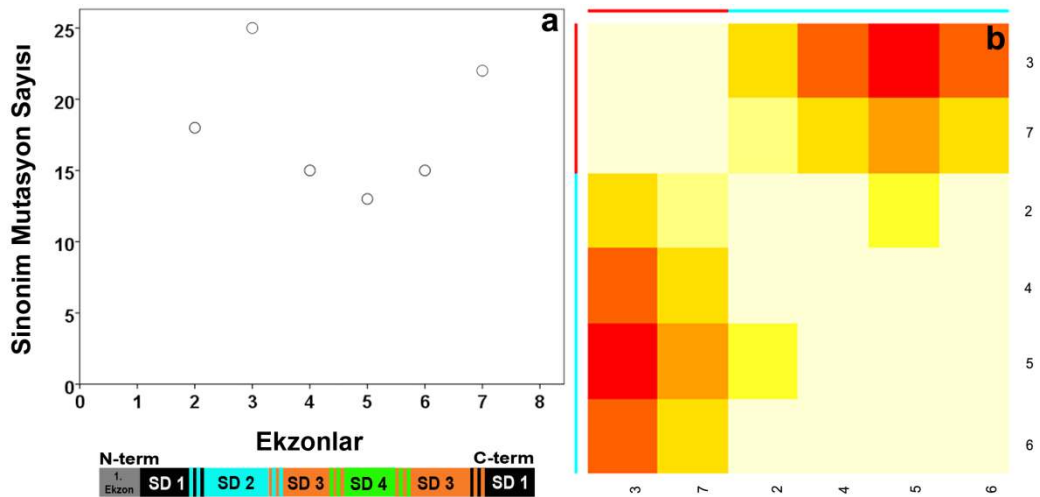


**Şekil 4.67.** *ACTA1* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları benzerliğe işaret etmektedir.

Missense mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturmadığı görülmektedir (Şekil 4.67a). Kümeleme analizi genin orta kısmına yakın bulunan ekzon 3 ve C-terminal kısmına yakın bulunan ekzon 5 ve 7’nin içerdikleri mutasyon sayısı ile hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir.

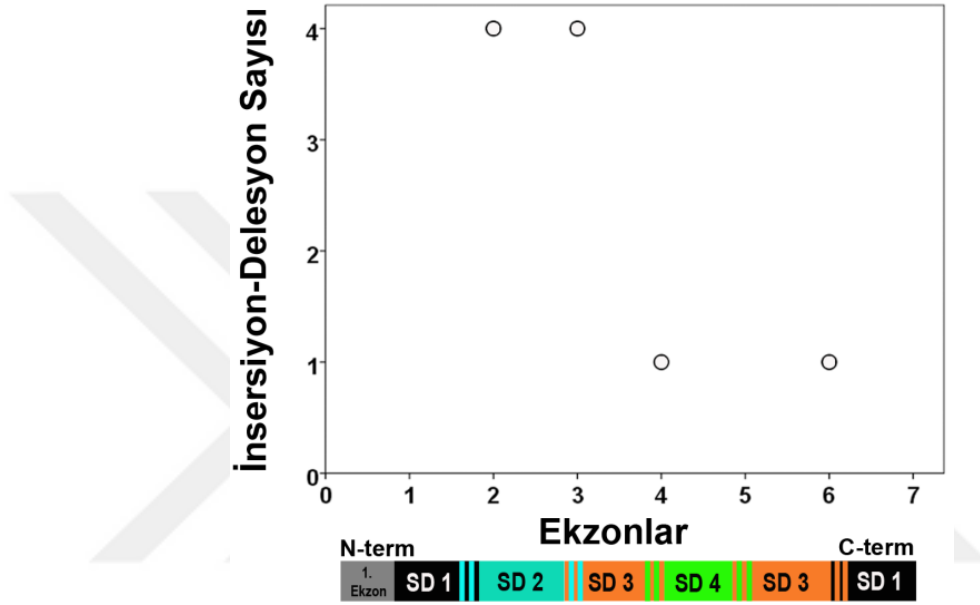
Genin C-terminal kısmının hotspot bölge olma potansiyelinin daha fazla olduğu da görülmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmedi. *ACTA1* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 3'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı mutasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır. Bu durum hastalık oluşturma potansiyeli bakımından ekzon 3 ü ön plana çıkarırken C-terminal bölgede hastalıkların gözlenmesinde etkili bir alan olduğuna işaret etmektedir.

Sinonim mutasyonlar: *ACTA1* geninde 6 ekzonda toplamda 108 sinonim mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 18 sinonim mutasyon ekzonlarda gözlenirken, en fazla sinonim mutasyon 25 ile ekzon 3'te ve en az mutasyon 13 ile ekzon 5'te gözlendi (Şekil 4.68a). Öklid uzaklık parametresine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında iki kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.68b). I. kümeyi mutasyon yükünün düşük olduğu dört ekzon bölgesi (ekzon 2, 4, 5 ve 6) oluştururken, II. kümeyi mutasyon yükünün fazla olduğu iki ekzon bölgesi (ekzon 3 ve 7) oluşturmaktadır. *ACTA1* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ve ısı-haritasıda sadece ekzon 3'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı mutasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.68.** *ACTA1* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları benzerliğe işaret etmektedir.

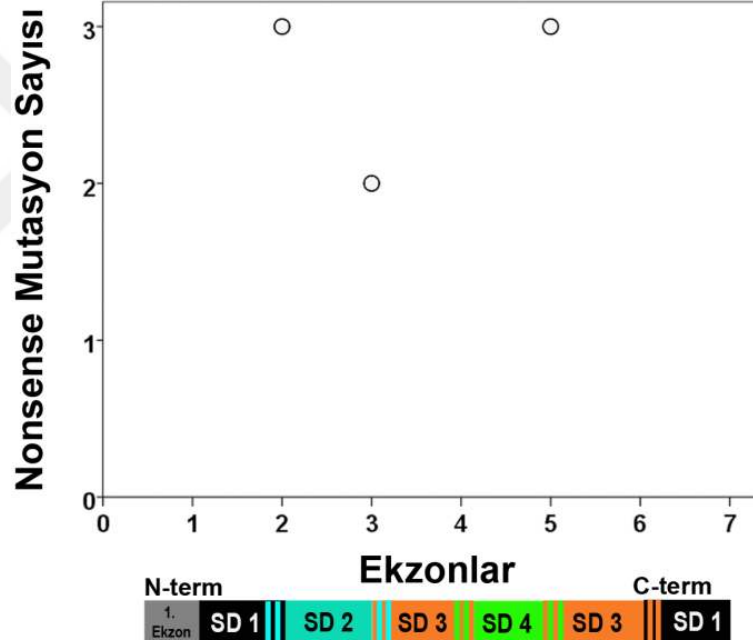
Çerçeve kayması mutasyonları: *ACTA1* geninde 6 ekzonda toplamda 10 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyonlar ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1.6 mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği saptandı. En fazla indelin dört ile ekzon 2 ve 3’de, bir indelin ekzon 4 ve 6’da olduğu gözlemlendi. Ekzon 5 ve 7’de hiç indel gözlenmedi (Şekil 4.69).



**Şekil 4.69.** *ACTA1* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı

Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir. Ancak çerçeve kayması mutasyonlarında genin baş bölgelerinde görülecek mutasyonların yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde olası hotspot ekzonların en fazla mutasyonun görüldüğü ekzon 2 ve 3 olma olasılığı yüksektir. Çerçeve kayması mutasyonları ile gerçekleştirilen outlier analizi muhtemelen veri azlığından gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.

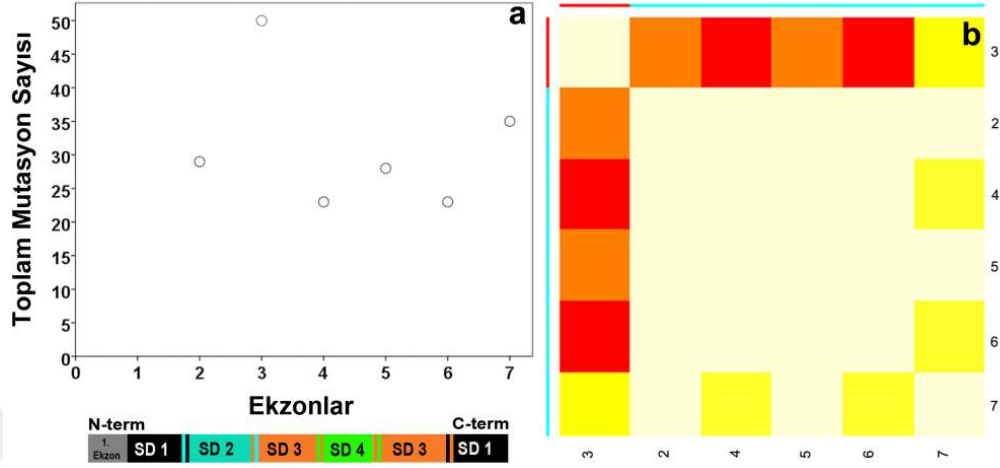
Nonsense mutasyonlar: *ACTA1* geninde 6 ekzonda toplamda 8 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1.3 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla nonsense mutasyonun 3 ile ekzon 2 ve 3’de, en az nonsense mutasyonun 2 ile ekzon 3’de olduğu ekzon 4, 6 ve 7’da ise hiç nonsense mutasyonun olmadığı görölmektedir. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir. Nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir. Stop kodonu oluşumu trunkat proteinlerin oluşmasına neden olduğundan özellikle ekzon 2 bu bakımdan dikkat çeken ekzondur (Şekil 4.70).



**Şekil 4.70.** *ACTA1* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

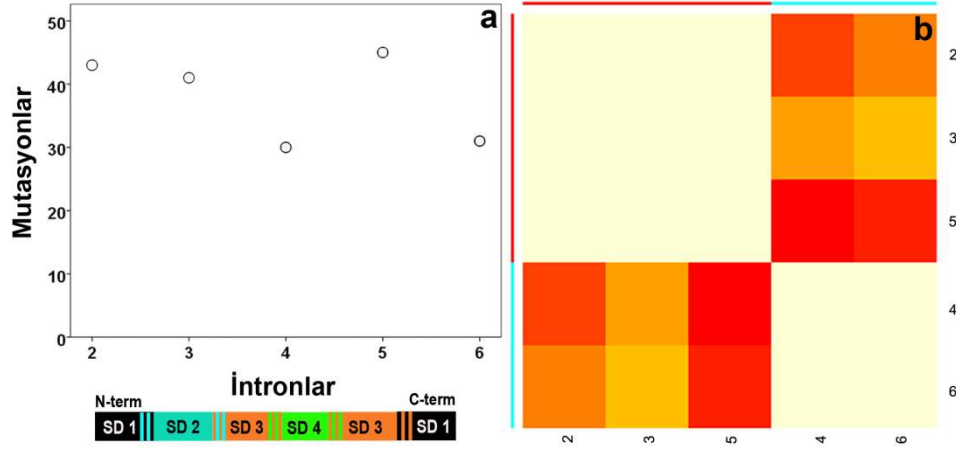
Toplam mutasyon sayısı: *ACTA1* geninde 6 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 188 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 31 mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla mutasyon sayısının 50 ile ekzon 3’de, en az mutasyonun ise 23 ile ekzon 4 ve 6’da olduğu görölmektedir (Şekil 4.71a). Ekzonlar arası mutasyon yüküne bağlı uzaklığı gösteren ısı-haritası I. grupta ekzon 2, 4-7, II. grupta ise yalnızca ekzon 3 bulunmaktadır (Şekil 4.71b).

Tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.



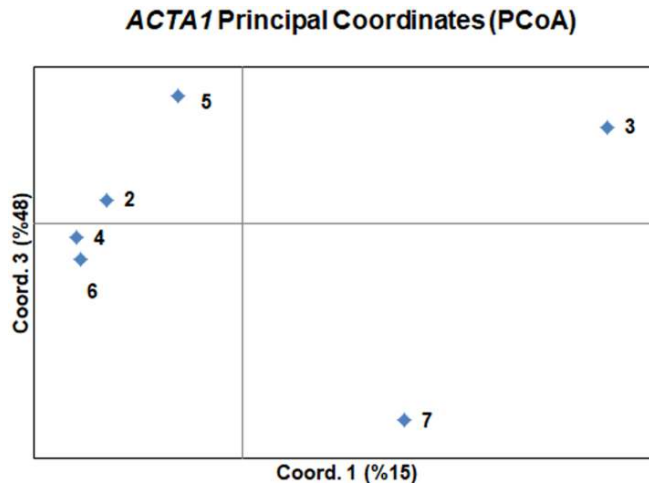
**Şekil 4.71.** *ACTA1* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları bezerliğe işaret etmektedir.

*ACTA1* geninde intron mutasyonları: *ACTA1* geninde bulunan 5 introndan toplamda 190 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 20 mutasyonun intronlarda gözlendiği, en fazla mutasyonun 45 ile intron 5’de, en az mutasyonun ise 30 ile intron 4’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.72a). Yapılan kümeleme analizleri 2 kümenin varlığına işaret etmektedir. Mutasyon yükü az olan intron 4 ve 6 bir grup oluştururken, mutasyon yükünün fazla olduğu 2, 3 ve 5 ayrı bir grup oluşturmaktadır (Şekil 4.72b). İtron bölgelerindeki toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde intronlar bazında bir hotspot intron bölgesi önermemektedir.



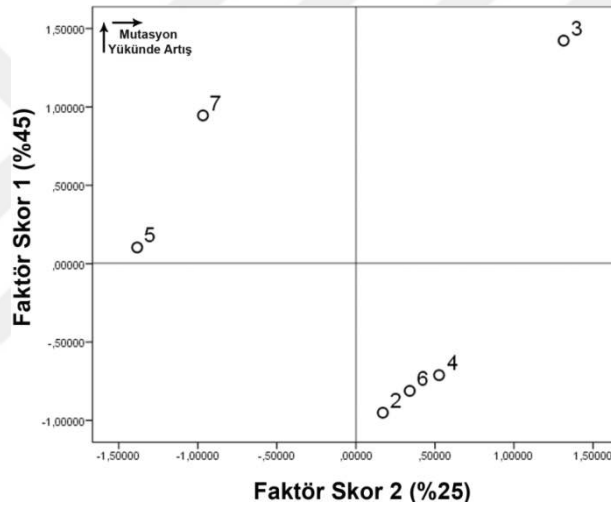
**Şekil 4.72.** *ACTA1* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun renk tonları artan farklılığa beyaz yoğun renk tonları benzerliğe işaret etmektedir.

PCoA analizi: *ACTA1* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde dörtlü bir gruplanmanın olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.73). Analiz ekzon 2, 4, ve 6'yı bir grup olarak alırken; ekzon 3, 5, ve 7'yi ise tek tek bunlardan ayrı bir grup olarak ele almıştır. Ekzon 2,4 ve 6 mutasyon yükünün en az olduğu grup iken, diğer gruplar ise mutasyon yükünün fazla olduğu gruplardır ve mutasyonun pik yaptığı ekzon ise 3. ekzondur.



**Şekil 4.73.** *ACTA1* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: *ACTA1* geninde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde dört adet grup bulunmaktadır. Ekzon 2, 3 ve 7'nin diğer ekzonlardan uzakta yerleştikleri görülmektedir. Geriye kalan ekzon 4, 5 ve 6'nın ise kendi aralarında grup oluşturdıkları görülmektedir. Faktör (PCA) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 3 iken II. derece hotspot bölge ise ekzon 7'dir (Şekil 4.74).



**Şekil 4.74.** *ACTA1* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi

#### 4.2.3.2. *MYH7* Geni

*MYH7* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 2758 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların tanesi 1443 ekzon, 1315 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 788 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken, bunu 597 değişim ile sinonim, 30 indel ile çerçeve kayması ve 27 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.28).



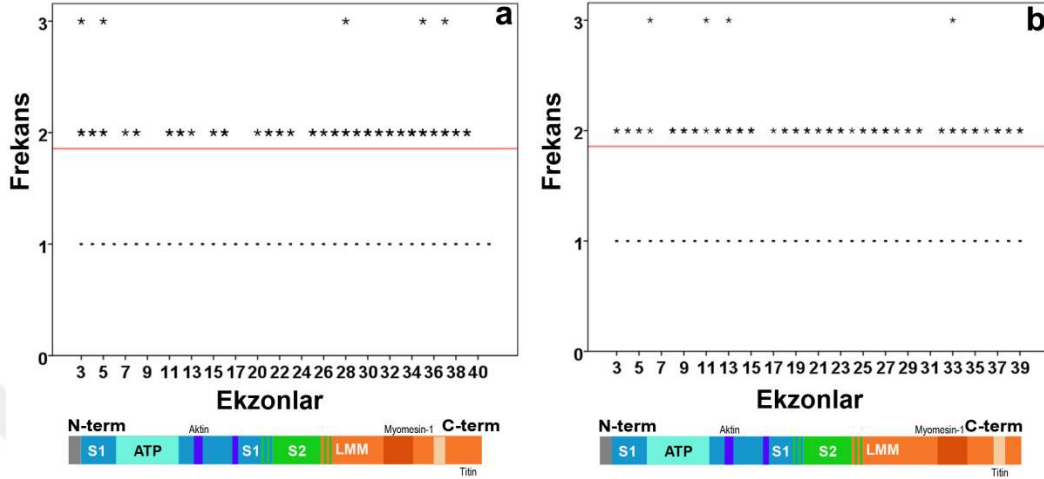
**Tablo 4.28.** *MYH7* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N    | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|------|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 788  | 21   | 1                | 58               |
| Sinonim Mutasyon            | 597  | 16   | 2                | 37               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 30   | 2    | 0                | 4                |
| Nonsense Mutasyon           | 27   | 1.2  | 0                | 3                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 1315 | 36   | 19               | 50               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*MYH7* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *MYH7* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 3 mutasyon varlığı tespit edildi (Şekil 4.75). Hem ekzonlar hem de intronlar üzerinde 3'ün üzerinde herhangi bir mutasyon sayısına hiçbir pozisyonda rastlanmadı. Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için 2 mutasyon ve üzerinde görülen mutasyonların aşırı mutasyonel pozisyonlar olduğuna işaret etmektedir. Buna göre aynı pozisyonda 2 mutasyon 7 ekzon dışındaki tüm ekzonlarda görülmektedir. Aynı pozisyonda 3 mutasyonun bulunduğu 5 ekzon (ekzon 3, 5, 28, 35 ve 37) bölgesi (Şekil 4.75a). Mutasyonların genin 5' başlangıç ve 3' bitiş noktasında yoğun olduğu görülürken, kuyruk kısmında yer alan mutasyon sayısının daha fazla olduğu görülmektedir. S1 ve LMM bölgelerinde mutasyonların genel olarak daha yaygın olduğu görülürken S2 bölgesinde 2'nin üzerinde aşırı varyasyonel pozisyona rastlanmadı. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından aynı pozisyonda 2 mutasyon 2 ekzon (ekzon 7 ve 40) dışındaki tüm ekzonlarda görülmektedir. Aynı pozisyonda 3 mutasyonun görüldüğü 4 intron (intron 3, 5, 28 ve 37) bölgesine rastlandı (Şekil 4.75b). İntronlarda da ekzonlarda olduğu gibi mutasyonların S1 ve LMM bölgesinde var olduğu görülmektedir. İntronlarda S1 bölgesinde aşırı

varyasyonel pozisyonun daha fazladır. Hotspot pozisyon varlığı bakımından intron ve ekzonlarda genelde benzer durumların olduğu görüldü (Şekil 4.75).



**Şekil 4.75.** *MYH7* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

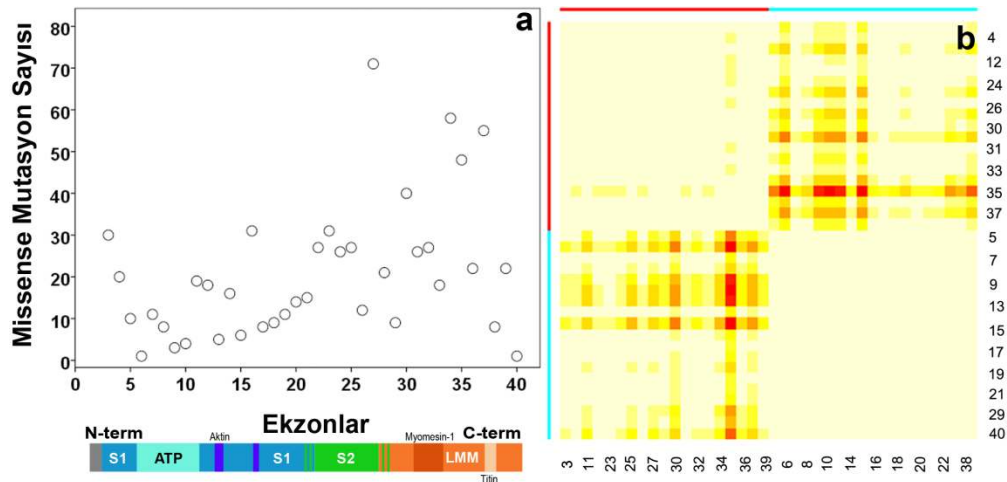
#### 4.2.3.2.1. *MYH7* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*MYH7* geni 14 kromozomda yer alır, 40 ekzona sahip ve 22,921 baz uzunluğundadır. Gen üzerinde yer alan 40 ekzondan ekzon 1 ve 2 kodlama yapmadığı için bu gen bölgesinden veriler analizlerde kullanılmadı. Çalışma kapsamında genin 38 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *MYH7* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.91,  $n$ : 38,  $p$ : 0.00).

Missense mutasyonlar: *MYH7* geninde 38 ekzonda toplam 788 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 21 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 71 ile ekzon 27’de, en az mutasyon ise 1 ile ekzon 6 ve 40’da görülmektedir (Şekil 4.76a).

Missense mutasyon sayısı bakımından miyozin motor domaininde ortalama 11 (min: 1, maks: 31), coiled coil domaininde ortalama 28 (min: 8, maks: 58) mutasyon olduğu gözlemlendi.

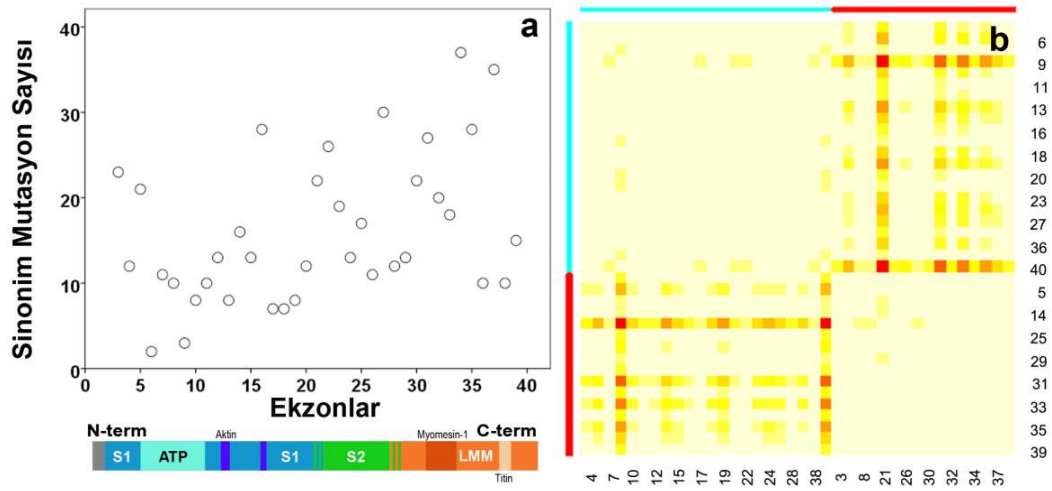
Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.76b). Birinci kümede genelde proteinin enzimatik aktivitesinden ve aktin bağlanmasından sorumlu ve mutasyon yükü düşük olan 19 ekzondan oluşmaktadır. II. küme ağırlıklı olarak miyozin-miyozin ve diğer proteinler ile etkileşimden sorumlu yüksek mutasyon yüküne sahip 19 ekzondan oluşmaktadır. Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan ekzon 30-37 (ekzon 32, 34, 36 hariç) hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, genin büyük kısmını oluşturan miyozin motor domaininde mutasyon yoğunluğunun daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.76b). Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal uca doğru yoğunlaştığı görülmektedir. Bu bölgeler enzimin çalışma kinetiğinden sorumlu protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği allosterik kontrol bölgelerini içermektedir. *MYH7* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 30, 34, 35 ve 37'yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.76.** *MYH7* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Sinonim mutasyonlar: *MYH7* geninde 38 ekzonda toplam 597 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 16 sinonim mutasyon gözlenirken en fazla sinonim mutasyon 37 ile ekzon 34’de, en az mutasyon ise 2 ile ekzon 6’da görülmektedir (Şekil 4.77a). Sinonim mutasyon sayısı bakımından miyozin motor domaininde ortalama 11 (min: 2, maks: 28), coiled coil domaininde ortalama 20 (min: 10, maks: 35) mutasyon olduğu gözlemlendi.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.77b). Birinci küme mutasyon yükü düşük 22 ekzondan oluşurken, bu ekzonların genin herhangi bir bölgesinde yoğunlaştığı görülmemektedir. İkinci kümede mutasyon yükünün fazla olduğu 16 ekzondan oluşmaktadır. Ağırlıklı olarak miyozin-miyozin ve diğer proteinler ile etkileşimden sorumlu ekzonlar bu kümede yer almaktadır. Sinonim mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonların C-terminal uca yakın yer alan ekzon 21 ve 31’in olduğu görülmektedir. Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan ekzonların N-terminal kısımda yer alanlara göre hotspot olma potansiyelinin daha yüksek olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, genin büyük kısmını oluşturan miyozin motor domaininde mutasyon yoğunluğunun daha düşük olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal uca doğru yoğunlaştığı görülmektedir. Bu bölgeler enzimin çalışma kinetiğinden sorumlu protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği allosterik kontrol bölgelerini içerir. *MYH7* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi yalnızca ekzon 21, 33 ve 35’i diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımladı.

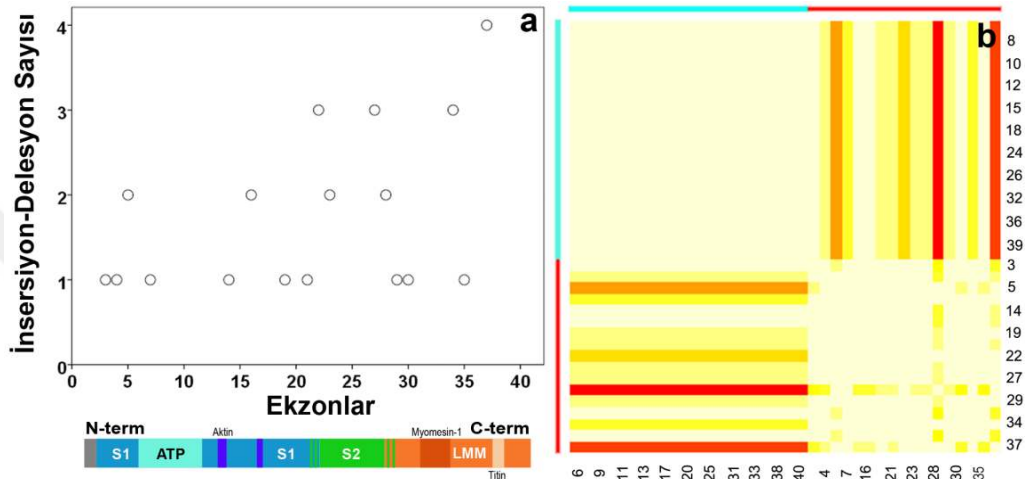


**Şekil 4.77.** *MYH7* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Çerçeve kayması mutasyonları: *MYH7* geninde 38 ekzonda toplamda 30 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyonlar ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 2 nonsinonim mutasyonun ekzonlarda gözleendiği en fazla indelin 4 ile ekzon 37’de olduğu görülürken 9 ekzonda tek indel, 14 ekzonda ise hiç indelin olmadığı görüldü (Şekil 4.78a). İndel sayısı bakımından miyozin motor domaininde (min: 0, maks: 2) ve coiled coil domaininde (min: 0, maks: 4) ortalama 1 mutasyon olduğu gözleendi.

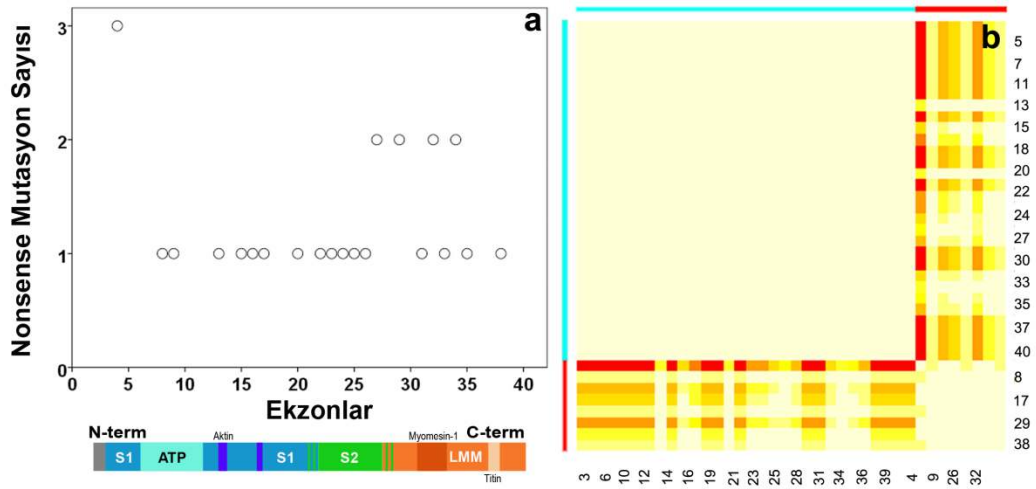
Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.78b). Ekzonların çoğu I. kümede yer almakta ve bu kümeyi mutasyon yükü düşük olan 21 ekzon oluşturmaktadır. I. kümeyi oluşturan ekzonların genin herhangi bir bölgesinde yoğunlaşmadığı görülmektedir. II. kümede de birincide olduğu gibi herhangi bir bölümde yoğunlaştığı görülmemekte olup, mutasyon yükünün yüksek olduğu 17 ekzondan oluşmaktadır. Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan ekzonların N-terminal kısımda yer alanlara göre hotspot olma potansiyelinin daha yüksek olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, genin büyük kısmını oluşturan miyozin motor domaininde mutasyon yoğunluğunun daha düşük olduğu saptandı.

Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin 20. ekzonundan itibaren C-terminal uca doğru yoğunlaştığı görülmektedir. Bu bölgeler enzimin çalışma kinetiğinden sorumlu protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği allosterik kontrol bölgelerini içermektedir. *MYH7* geninde gözlenen çerçeve kayması mutasyonları ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 5, 22, 28 ve 37'yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.78.** *MYH7* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

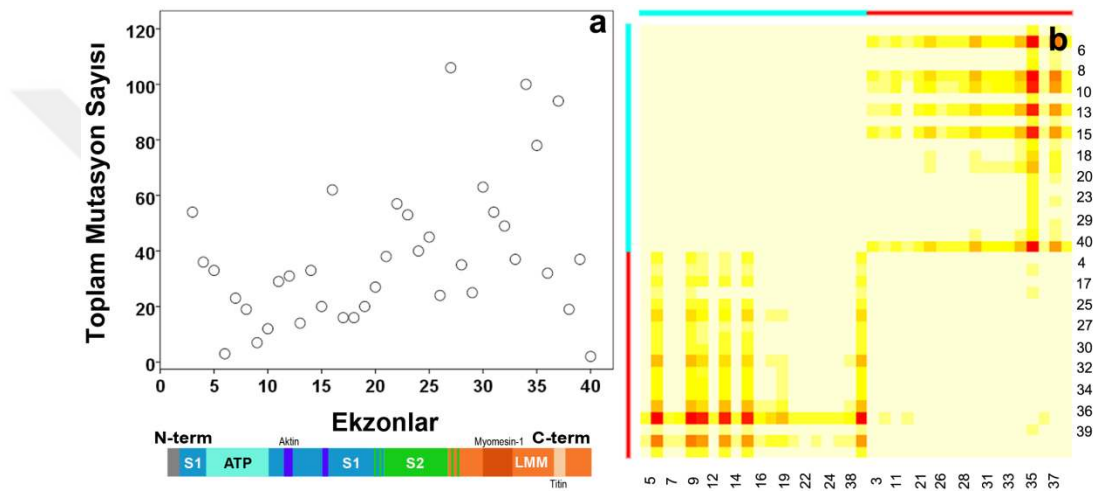
Nonsense mutasyonlar: *MYH7* geninde 38 ekzonda toplamda 27 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla nonsense mutasyonun 3 ile ekzon 4'de olduğu görülürken, 16 ekzonda 1 mutasyon, 18 ekzonda ise hiç mutasyon olmadığı saptandı (Şekil 4.79a). Stop kodonu oluşturan nonsense mutasyon sayısı bakımından hem miyozin motor domaininde (min: 0, maks:3) hem de coiled coil domainde (min: 0, maks: 2) ortalama 1 mutasyon saptandı.



**Şekil 4.79.** *MYH7* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.79b). Ekzonların çoğu I. kümede yer almakta ve bu ekzonlar düşük mutasyon yüküne sahip 30 ekzondan oluşmaktadır. Bu kümedeki ekzonların genelde gen boyunca dağılım gösterdiği ve herhangi bir bölümde yoğunlaşmadığı görülmektedir. II. kümede de birincide olduğu gibi herhangi bir bölgede yoğunlaşma olmayıp, mutasyon yükünün düşük olduğu 8 ekzon yer almaktadır. Stop kodon mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonların N-terminal kısma yakın bölgede yer alan ekzon 4 ve C-terminal uca yakın yer alan ekzon 29 olduğu görülmektedir. Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan ekzonların N-terminal kısımda yer alanlara göre hotspot olma potansiyelinin daha yüksek olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, genin büyük kısmını oluşturan miyozin motor domaininde mutasyon yoğunluğunun daha düşük olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin 25. ekzonundan itibaren C-terminal uca doğru daha yoğunlaştığı görülmektedir. Bu bölgeler enzimin çalışma kinetiğinden sorumlu protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği allosterik kontrol bölgelerini içermektedir. *MYH7* geninde gözlenen nonsense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 4, 9, 17 ve 29'u diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

Toplam mutasyon sayısı: *MYH7* geninde 38 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 1443 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 38 mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla mutasyon sayısının 106 ile ekzon 27’de, en az mutasyonun ise 2 ile ekzon 40’da olduğu görülmektedir (Şekil 4.80a). Toplam mutasyon sayısı bakımından miyozin motor domaininde ortalama 24 (min: 3, maks: 32), coiled coil domainde ortalama 48 (min: 2, maks: 106) mutasyonun olduğu gözleendi.



**Şekil 4.80.** *MYH7* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

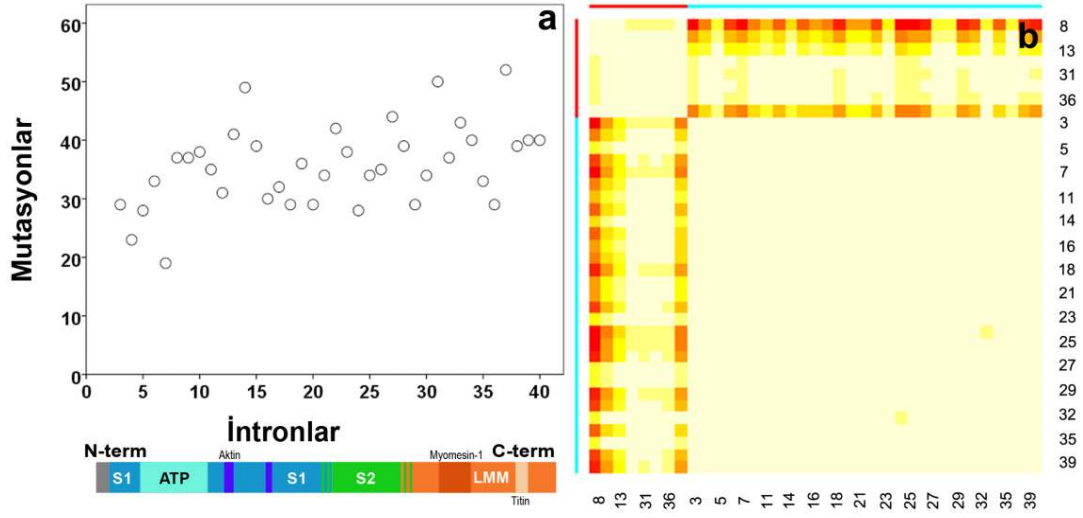
Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.80b). I. kümede genelde N-terminal bölgeye yakın bulunan ve miyozin motor domaindeki yer alan düşük mutasyon yüküne sahip 20 ekzondan oluşurken, II. küme genelde coiled-coil domainde yer alan yüksek mutasyon yüküne sahip 18 ekzondan oluşmaktadır. Ekzonlar arası mutasyon yüküne bağlı uzaklığı gösteren ısı-haritası ekzon 35 ve 37’yi diğer ekzonlar farklı olduğunu ve hotspot bölge olma potansiyeli taşıdığını göstermektedir (Şekil 4.80b). Kümeleme analizi gen üzerinde ekzon 25-39 (29 ve 38 hariç) kapsayan bir hotspot bölgenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.80b).



Bu bölge içerisinde en yüksek mutasyon sayısı 106 ile ekzon 27’de görülürken, bunu 100 mutasyon ile ekzon 34 ve 94 mutasyon ile ekzon 37 takip etmektedir. Toplamda elde edilen 1443 mutasyonun yaklaşık 354’ü miyozin motor domainde yer alırken, 1015’i coiled coil domainde yer almaktadır. Genin S1 bölgesinde itibaren mutasyon yükünde belirgin şekilde artış olduğu ve LMM bölgesi içerisinde pik yaptığı görülmektedir (Şekil 4.80a). Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde ekzon 30, 34, 35 ve 37’yi hotspot bölge olarak tanımladı.

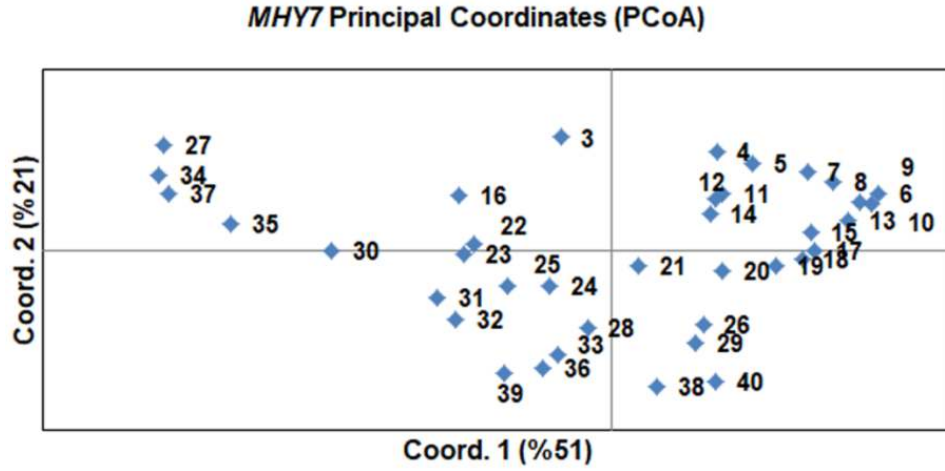
*MYH7* geninde intron mutasyonları: *MYH7* geninde bulunan 37 introndan toplamda 777 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 21 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 52 ile intron 37’de, en az mutasyonun ise 19 ile intron 7’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.81a). Mutasyon sayısı bakımından miyozin motor domaininde ortalama 33 (min: 19, maks: 49), coiled coil domainde ortalama 37 (min: 29, maks: 52) mutasyonun olduğu gözleendi.

İntronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.81b). I. küme genellikle mutasyon yükünün az olduğu 28 ekzondan oluşurken, II. küme mutasyon yükünün yüksek olduğu kümeleri göstermektedir (Şekil 4.81b). Gen üzerinde çoğunluk mutasyon yükünün az olduğu intronlardan oluşmaktadır. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde intronlar bazında bir hotspot intron bölgesi önermemektedir.



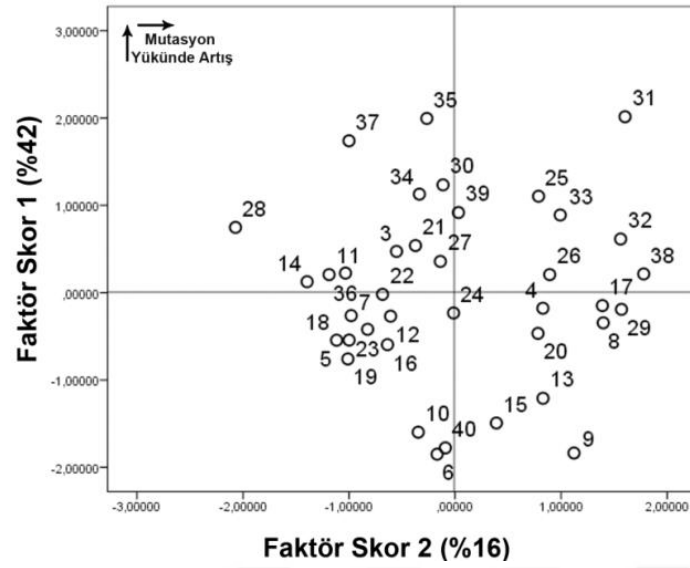
**Şekil 4.81.** *MYH7* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

PCoA analizi: *MYH7* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde dörtlü bir gruplanmanın olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.82). Analiz genin coiled-coil kısmını oluşturan ekzonları çoğunlukla aynı gruba yerleştirirken buradaki ekzonların mutasyon yükünün fazla olduğu görülmektedir. Fakat bu bölgede yer alan ve mutasyon yüklerinin düşük olduğu ekzon 26, 29, 38 ve 40'ı ayrı bir şekilde gruplandığı görülmektedir. Ekzon 27, 34, 35 ve 37 grubu mutasyon yükünün fazla olduğu gruptur, ekzon 30'da bunlara yakın bir pozisyona yerleşmiş olup onun da mutasyon yükü oldukça yüksektir. Bu kümede yer alan ekzonların miyozin ve titin etkileşiminden sorumlu olabilme ihtimali yüksektir. Geride kalan ekzonlar genin motor domain kısmında yer alan ekzonların çoğu ayrı bir grup olarak yerleşmiş olup mutasyon yükleri düşüktür.



**Şekil 4.82.** *MYH7* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyon ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: *MYH7* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre genel olarak bakıldığında dörtlü bir grup var olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.83). Diğer analizlerde de olduğu gibi faktör (PCA) analizi genin miyozin-miyozin ve diğer proteinler ile etkileşim içerisinde olan LMM bölgesinde yer alan ekzonları diğerlerinden ayrı bir grup olarak vermiştir. Faktör (PC) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından belirgin bir ayırım yoktur fakat mutasyon yükünün fazla olduğu ekzon 28, 31, 35 ve 37 diğerlerinden daha perifere yerleşmiştir.



**Şekil 4.83.** *MYH7* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PCA) analizi

#### 4.2.3. 3. *TPM2* Geni

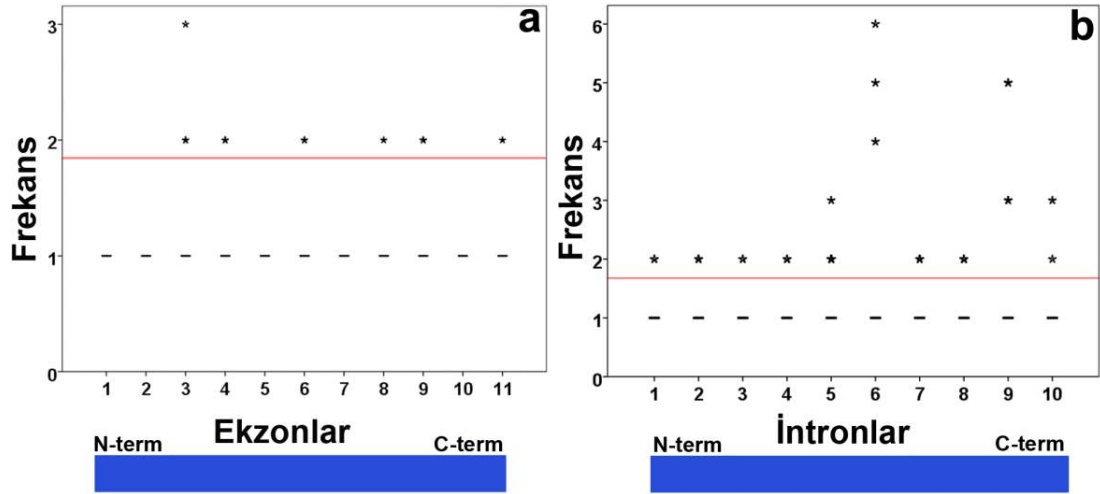
*TPM2* geninden ekzon ve intron bölgeler dâhil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 578 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 199 tanesi ekzon, 379 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 103 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 82 değişim ile sinonim, 8 indel ile çerçeve kayması ve 6 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.29).

**Tablo 4.29.** *TPM2* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 103 | 9    | 1                | 13               |
| Sinonim Mutasyon            | 82  | 7    | 4                | 14               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 8   | 0.7  | 0                | 2                |
| Nonsense Mutasyon           | 6   | 0.5  | 0                | 2                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 379 | 38   | 29               | 67               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*TPM2* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *TPM2* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 6 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.84). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler tüm intron ve ekzonlarda hotspot bölgelerin varlığına işaret etmektedir. Buna göre 2 mutasyonun gözlemlendiği 6 ekzon (3, 4, 6, 8, 9 ve 10) bölgesi varken, aynı pozisyonda 3 mutasyon gözlemlendiği yalnızca tek bölgede (ekzon 3) gözlemlendi (Şekil 4.84a).



**Şekil 4.84.** *TPM2* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

Ekzon 5 hariç olmak üzere bu ekzonlar mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren ekzonlardır. Genin 5' başlangıç bölgesinde yer alan ekzon 1 ve 2'de aşırı varyasyonel pozisyonlara rastlanmamıştır. Bu bölgelerin hotspot bölge içermeye potansiyeli düşüktür. İtron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölgeler 10 intron bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir. İtron bölgelerinde aynı pozisyonda en fazla 6 mutasyon ile intron 6'da gözlemlendi (Şekil 4.84b). İtronlarda da ekzonlarda olduğuna benzer şekilde ilk 3 intron bölgesinde varyasyon görülme olasılığının daha düşük olduğu gözlemlendi ve 3. intronda aşırı varyasyonel pozisyonlara rastlanmadı. Genel olarak genin 3'

bölgesinde varyasyonel pozisyonlara rastlanma olasılığının daha yüksek olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.84).

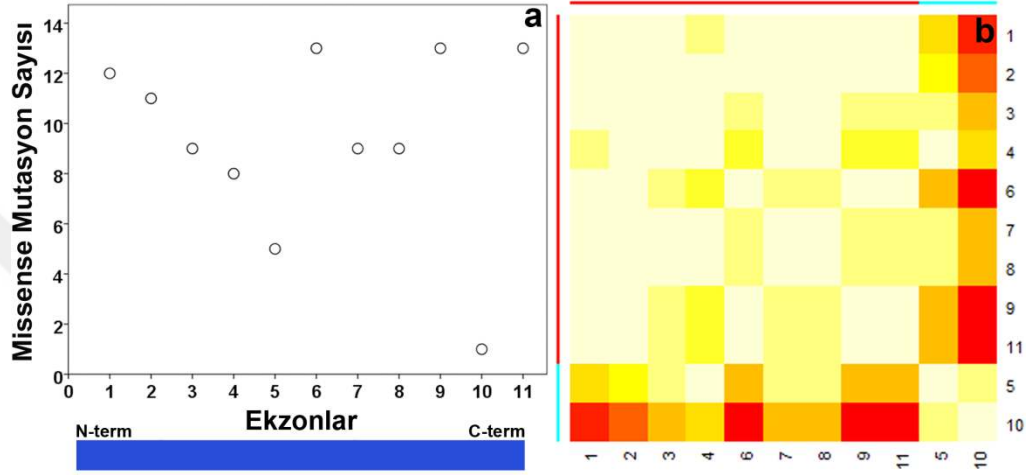
#### 4.2.3.3.1. *TPM2* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*TPM2* geni 9 kromozomda yer alır, 11 ekzona sahip ve 8064 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında genin 11 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *TPM2* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermemiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.50, n: 11, p: 0.11).

Missense mutasyonlar: *TPM2* geninde 11 ekzonda toplam 103 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 9 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 13 ile ekzon 6, 9 ve 11’de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 10’da görülmektedir (Şekil 4.85a). Mutasyonların genin başlangıç kısmında oldukça yüksek olduğu ve 5. ekzona kadar azaldığı ve sonrasında 13 mutasyon ile pik yapıp daha sonra dalgalanmalar olduğu gözlemlendi.

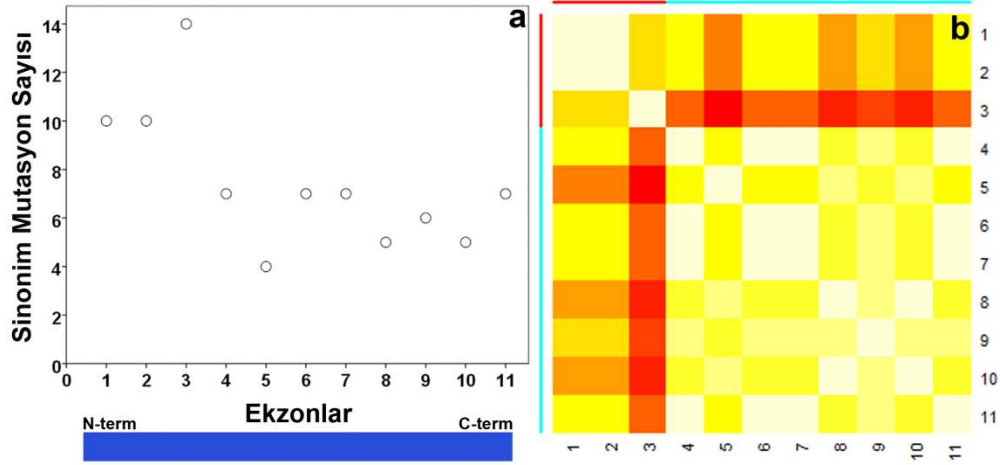
Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.85b). I. küme mutasyon yükü düşük olan 2 ekzondan (5, 10) oluşurken, II. kümeyi mutasyon yükünün fazla olduğu 9 ekzon oluşturmaktadır. Isı-harita analizi ekzonlar arasında uzaklık bakımından ikinci grupta yer alan 1., 6., 9. ve 11. ekzonların ön plana çıktığını göstermektedir. Missense mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonların ekzon 6 ve C-terminal uca yakın yer alan ekzon 9 ve 11 olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin C-terminal ve N-terminal kısımlarında yoğunlaştığı görülmekte ve tropomiyozinler üzerinde yer

alan troponin bağlanma bölgelerinin yer alma olasılığının yüksek olduğu ekzon 7’de hotspot mutasyonlar arasında yer almaktadır. Missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından diğer ekzonlardan belirgin fark gösteren bir ekzonun varlığına işaret etmektedir.



**Şekil 4.85.** *TPM2* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

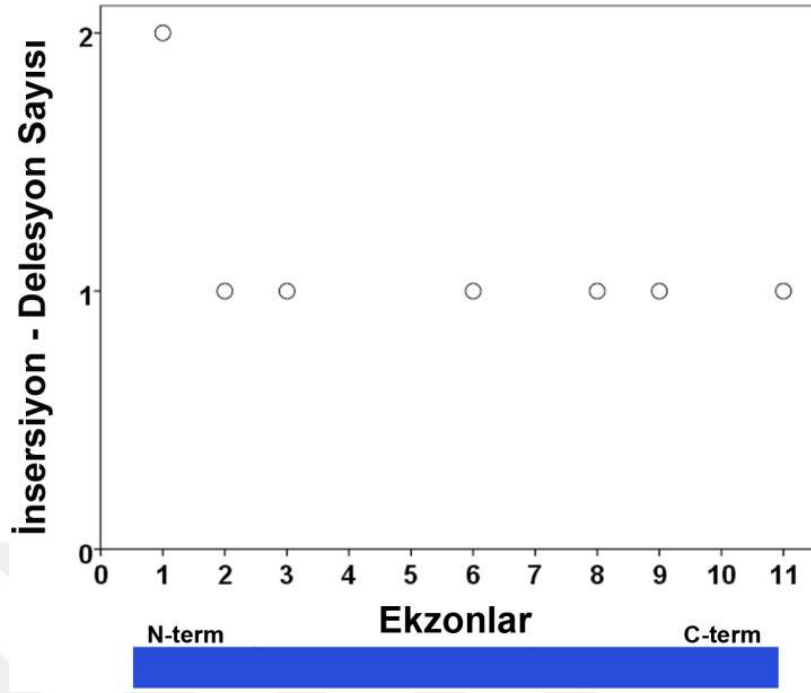
Sinonim mutasyonlar: *TPM2* geninde 11 ekzonda toplamda 82 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 7 sinonim mutasyon ekzonlarda gözlenirken en fazla sinonim mutasyon 14 ile ekzon 3 ’de en az mutasyon ise 5 ile ekzon 8 ve 10’da olduğu görülmektedir (Şekil 4.86a). Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine olan uzaklıklarını belirlemek amacıyla kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.86b). I. kümeyi mutasyon yükü az olan 8 ekzon bölgesi oluştururken, II. kümeyi mutasyon yükü fazla olan 3 ekzon bölgesi (1, 2 ve 3) oluşturmaktadır. *TPM2* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 3’ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.86.** *TPM2* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Çerçeve kayması mutasyonları: *TPM2* geninde 11 ekzonda toplamda 8 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Gen üzerinde en fazla indelin 2 ile ekzon 1’de en az indelin ise 1 ile 6 ekzonda (ekzon 2, 3, 6, 8, 9 ve 11) olduğu görülmekte olup, gen üzerindeki ekzonlardan çoğunda indele rastlanmadı (Şekil 4.87). Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir fakat genin başlangıç bölgesindeki mutasyon yükünün diğer bölgelere göre daha şiddetli fenotipler ortaya koyma ihtimali olacağı için bu bölgelerin hotspot bölge olma olasılığı yüksek olabilir. Çerçeve kayması mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından diğer ekzonlardan belirgin fark gösteren bir ekzonun varlığına işaret etmemektedir.

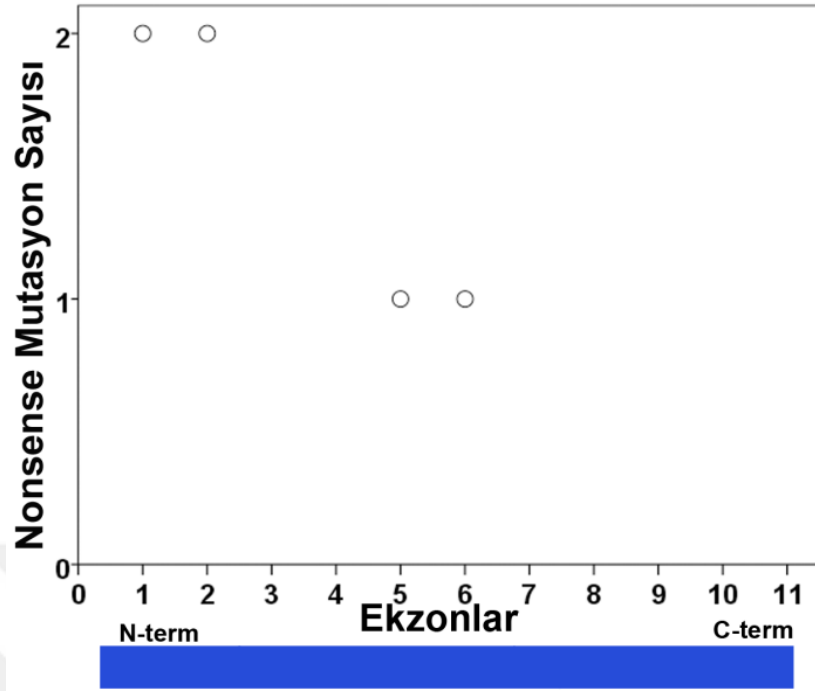




**Şekil 4.87.** *TPM2* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı

Nonsense mutasyonlar: *TPM2* geninde 11 ekzonda toplamda 6 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu en fazla nonsense mutasyonun 3 ile ekzon 1 ve 2’de, en az nonsense mutasyonun 1 ile ekzon 5 ve 6’da olduğu ekzon 3-4 ve 7-11 arasında ise hiç nonsense mutasyonun olmadığı görülmektedir (Şekil 4.88).

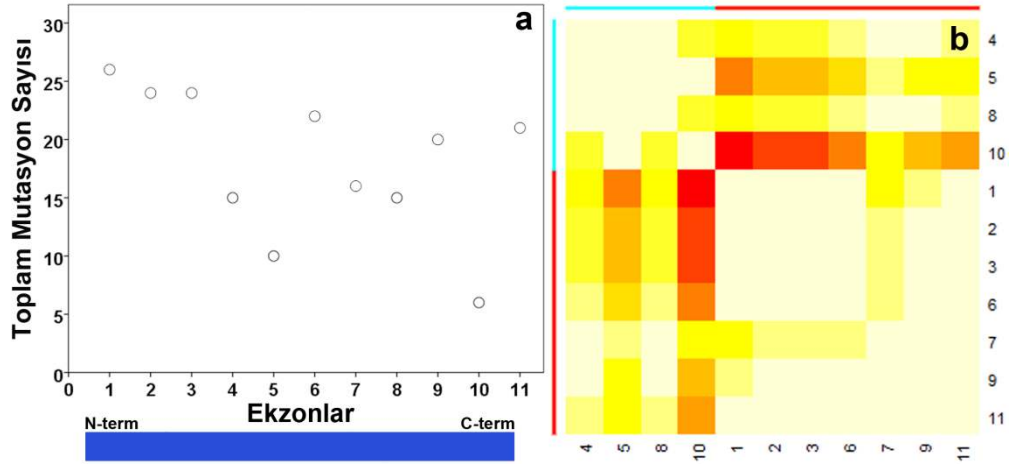
Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir (Şekil 4.87) Ancak nonsense mutasyonlarda genin baş bölgelerinde görülecek stop kodonu oluşumlarının yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde olası hotspot ekzonların en fazla mutasyonun görüldüğü 1 ve 2 olma olasılığı yüksektir. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.



**Şekil 4.88.** *TPM2* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

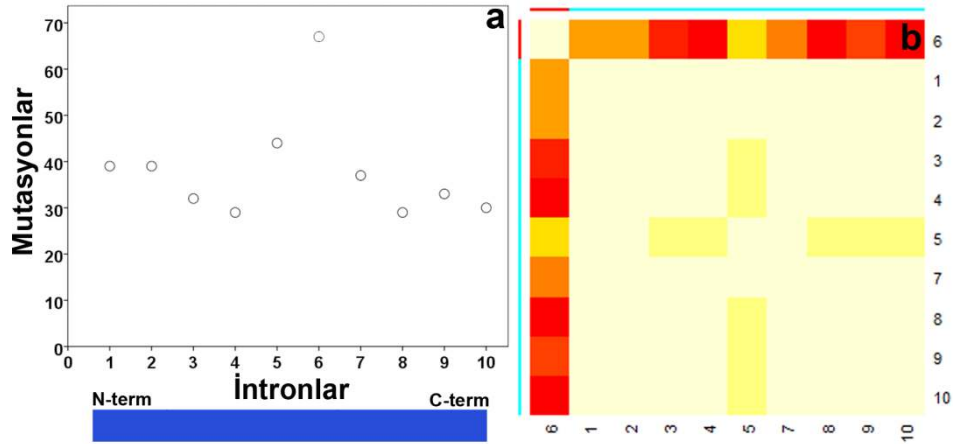
Toplam mutasyon sayısı: *TPM2* geninde 11 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 199 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 18 mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği, en fazla mutasyon sayısının 26 ile ekzon 1’de, en az mutasyonun ise 6 ile ekzon 10’da olduğu görülmektedir (Şekil 4.89a).

Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.89b). I. küme ekzon 4, 5, 8, 10’u II. küme ise 1-3, 6, 7, 9 ve 11’i kapsamaktadır. Gen üzerinde 4. ve 5. ekzonlarının bulunduğu bölge hariç diğer tüm bölgelerin hotspot bölge olma potansiyeli görülmektedir. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.



**Şekil 4.89.** *TPM2* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı gösterilmiştir (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

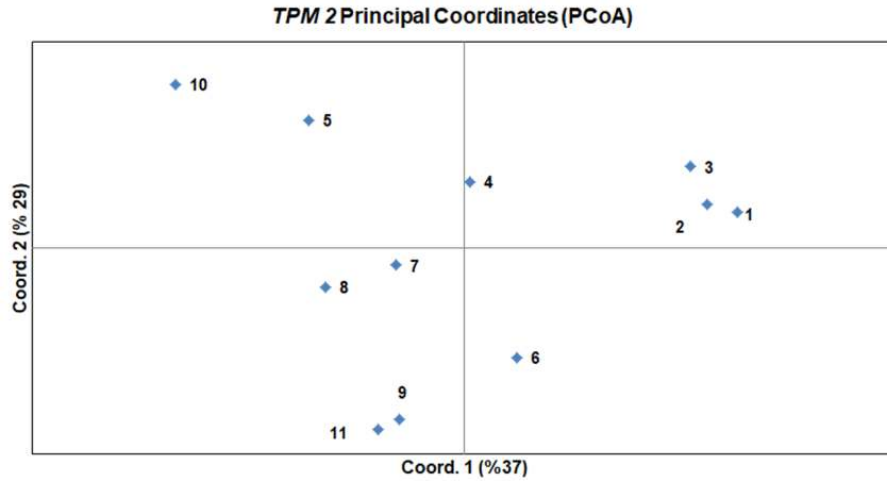
*TPM2* geninde intron mutasyonları: *TPM2* geninde bulunan 10 introndan toplamda 379 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 37 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 67 ile intron 6 da, en az mutasyonun ise 29 ile intron 4 ve 8’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.90).



**Şekil 4.90.** *TPM2* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a).Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

İntronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.90b). I. küme yalnızca 67 mutasyon ile intron 6'yı içermektedir ve gen üzerinde mutasyon yükünün 29-39 arasında dalgalandığı gözlenmektedir. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde intron 6'yı hotspot intron bölgesi önermektedir.

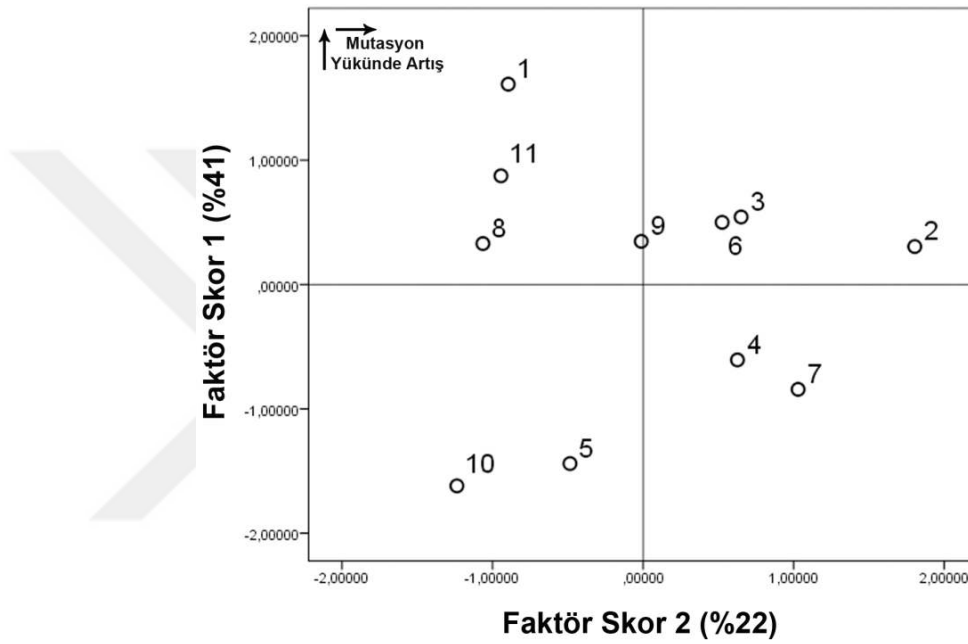
PCoA analizi: *TPM2* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde üçlü bir gruplanmanın olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.91). Analiz 1, 2 ve 3. ekzonları ayrı bir grup olarak ele alırken, ekzon 7-8-9 ve 11'i bir grup, ekzon 5 ve 10'u ayrı bir grup olarak ele almaktadır. Ekzon 5-10 grubu en az mutasyon yüküne sahip ekzonlardır. Mutasyon yükünün en fazla olduğu kısım genin N-terminal kısmında yer alan 1, 2 ve 3. ekzonlardır ve bu bölgenin hotpot bölge olma potansiyeli yüksektir.



**Şekil 4.91.** *TPM2* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: *TPM2* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk

ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde beş adet grup bulunmaktadır. Ekzon 1 tek başına diğer gruplardan uzakta yerleşerek farklı bir grup oluştururken genel olarak grupların 2'ser ekzondan oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.92). Faktör (PC) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 1 iken, II. derece hotspot bölge ise ekzon 2, 3, 6, 9 ve 11'dir.



**Şekil 4.92.** *TPM2* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi

#### 4.2.3.4. *TPM3* Geni

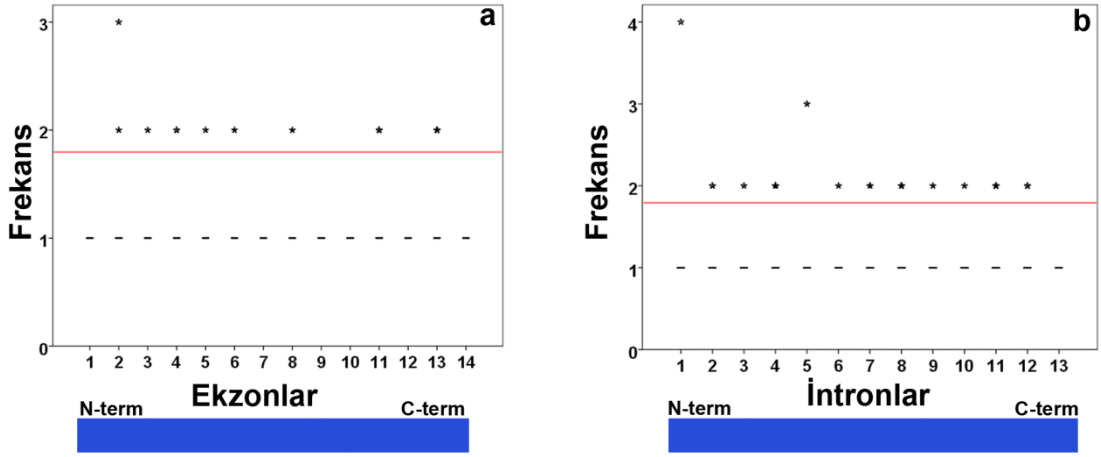
*TPM3* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 565 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 217 tanesi ekzon, 348 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 123 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 82 değişim ile sinonim, 7 indel ile çerçeve kayması ve 5 değişim ile stop kodonu mutasyonları izledi (Tablo 4.30).

**Tablo 4.30.** *TPM3* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 123 | 9    | 1                | 23               |
| Sinonim Mutasyon            | 82  | 6    | 0                | 11               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 7   | 0.5  | 0                | 3                |
| Nonsense Mutasyon           | 5   | 0.3  | 0                | 1                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 348 | 28   | 7                | 38               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*TPM3* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *TPM3* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 4 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.93). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı mutasyonların varlığına işaret etmektedir. Analizlere göre aynı pozisyonda görülen 2 ve üstü aşırı mutasyonlardır. Buna göre 3 mutasyonun/aşırı varyasyonel bölgenin gözlendiği 1 ekzon bölgesi varken, 2 mutasyonun/aşırı varyasyonel bölgenin gözlendiği 8 ekzon gözlendi (Şekil 4.93a). Ekzon 2 mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren bir bölgedir. Genin 5' başlangıç bölgesinde yer alan ekzon 1'in yanı sıra 7., 9., 10., 12 ve 14. ekzonlarda da aşırı varyasyonel pozisyonlara rastlanmamıştır. Ekzon 7'de hiç varyasyonel pozisyona rastlanmamakla birlikte hotspot bölge olma potansiyeli yüksek olan bölgelerden biridir. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından intron 13 hariç tüm bölgelerde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı bakımından hotspot bölge olma potansiyeline sahiptir (Şekil 4.93b). Aynı pozisyonda en fazla 4 mutasyon intron 1'de ve 3 mutasyon intron 5'de görülmektedir. Genel olarak genin 5' başlangıç bölgesinde varyasyonel pozisyonlara rastlanma olasılığının daha yüksek olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.93).



**Şekil 4.93.** *TPM3* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyondaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

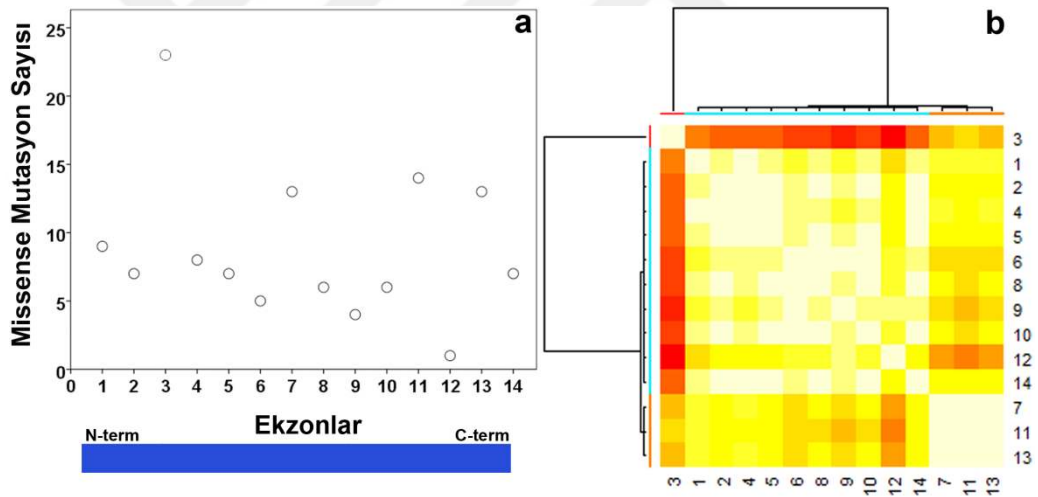
#### 4.2.3.4.1. *TPM3* Geni Ekzon ve İntronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*TPM3* geni 1. kromozomda yer alır, 14 ekzona sahip ve 36,793 baz uzunluğundadır. Çalışma kapsamında genin 14 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsense, çerçeve kayması mutasyonları ve tüm intronlarda gözlenen mutasyonlar ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *TPM3* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermemiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.66,  $n$ : 14,  $p$ : 0.09).

Missense mutasyonlar: *TPM3* geninde 14 ekzonda toplam 123 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 9 missense mutasyon gözlenirken, en fazla missense mutasyon 23 ile ekzon 3'de en az mutasyon ise 1 ile ekzon 12'de görülmektedir (Şekil 4.94a). Mutasyonların yükü genel olarak 4 ile 14 ile değişmektedir. Genin başlangıç kısmındaki mutasyon yoğunluğunun son kısmındakine daha düşük olduğu görüldü.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi.

Kümeleme analizi ekzonlar arasında 3 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.94b). I. küme mutasyon yükü düşük olan 10 ekzondan oluşurken, II. küme mutasyon yükü fazla olan 3 ekzon (ekzon 7, 11, 13) ve III. küme ise yalnızca tek ekzon (3) bölgesini kapsamaktadır. Isı-harita analizi ekzonlar arasında uzaklık bakımından ikinci grupta yer alan 9. ve 12. ekzonların ön plana çıktığını göstermektedir. Missense mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzon N-terminal bölgede yer alan ekzon 3 olduğu görülmektedir. Tüm gene bakıldığında mutasyon yoğunluğunun genin N-terminal kısımlarında yoğunlaştığı görülmekte ve tropomiyozinler üzerinde yer alan troponin bağlanma bölgelerinin yer alma olasılığının yüksek olduğu ekzon 7’de II. derece hotspot bölge içeren mutasyonlar arasında yer almaktadır. Missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından diğerlerinden belirgin fark gösteren ekzonların 3 ve 11 olacağına işaret etmektedir.



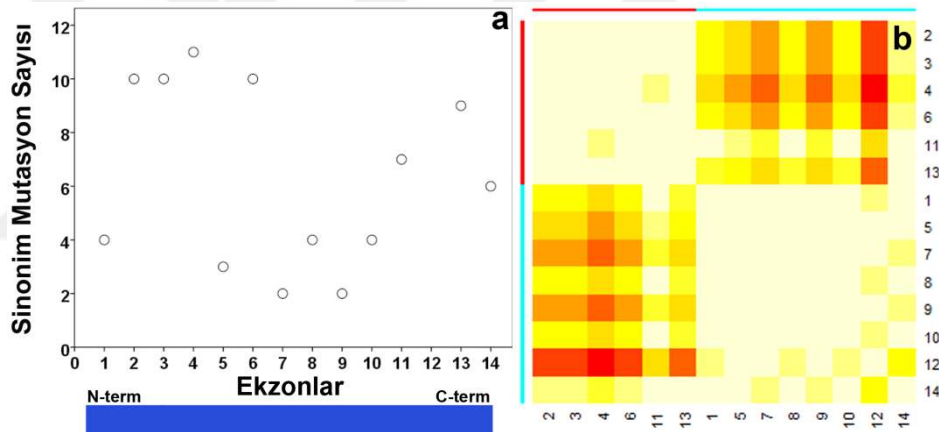
**Şekil 4.94.** *TPM3* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Sinonim mutasyonlar: *TPM3* geninde 14 ekzonda toplamda 82 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 6 sinonim mutasyon ekzonlarda gözlenirken en fazla sinonim mutasyon 11 ile ekzon 4 ’de, en az mutasyon ise 2 ile ekzon 7 ve 9’da olduğu görülmekteyken, ekzon 12’de hiç mutasyon gözlenmedi (Şekil 4.95a). Genin 5’



başlangıç kısmında mutasyon yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu ekzon 5 ve 10 arasında düşük seyir izlediği sonrasında tekrar arttığı gözlemlendi.

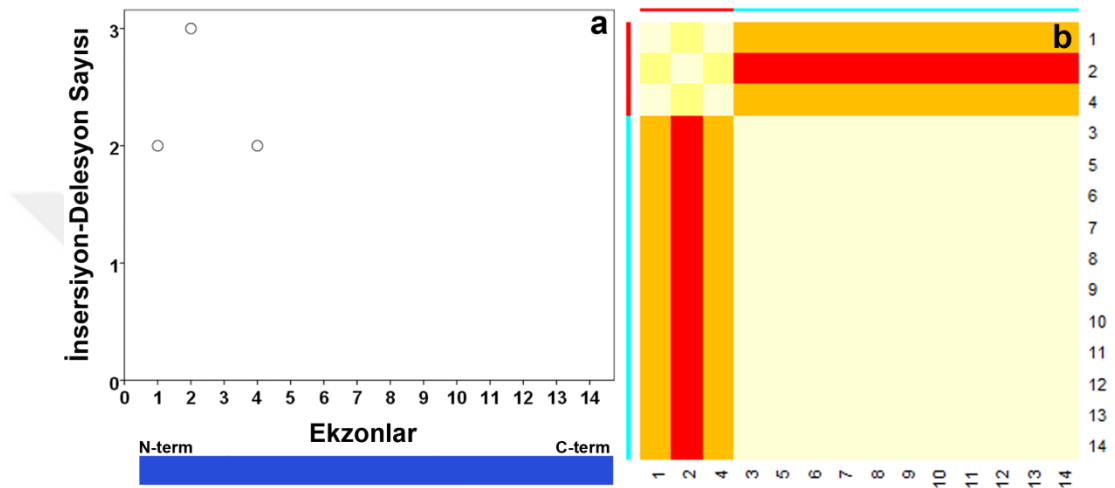
Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine olan uzaklıklarını belirlemek amacıyla kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Öklid uzaklık parametresine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.95b). I. küme mutasyon yükü düşük olan 9 ekzon bölgesinden oluştururken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 5 ekzon bölgesinden (2, 3, 4, 6 ve 13) oluşmaktadır. *TPM3* geninde gözlenen sinonim mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon 4'ü diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.95.** *TPM3* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

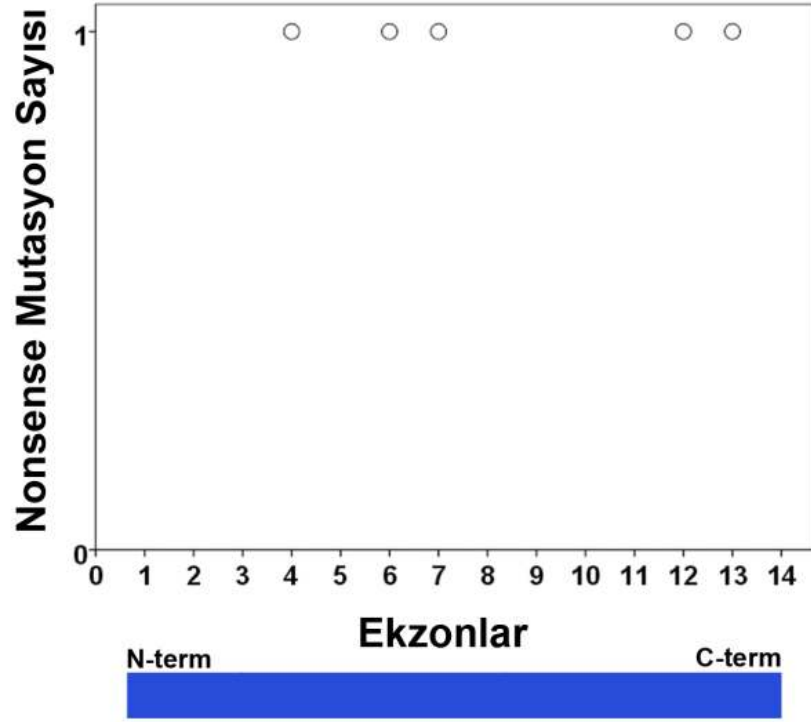
Çerçeve kayması mutasyonları: *TPM3* geninde 14 ekzonda toplamda 7 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Gen üzerinde en fazla indelin 3 ile ekzon 2'de, bunu izleyen 1., ve 4. ekzonlarda ise 2 indel görülmektedir (Şekil 4.96a). Ekzon 1-2 ve 4 dışında diğer ekzonlarda hiç indel görülmedi. Ekzonlar arasında insersiyon-delesyon mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine olan uzaklıklarını belirlemek amacıyla kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.96b). I. kümede hiç mutasyonun görülmediği

ekzonlar yer alırken, II. kümede mutasyon yükü 2 ve 3 arasında değişen 3 ekzon görülmektedir. Genin 5' başlangıç bölgesindeki mutasyon yükünün daha fazla olduğu görüldü ve bu bölgelerdeki mutasyonların diğer bölgelere göre daha şiddetli fenotipler ortaya koyma ihtimali olacağı için oldukça önemlidir. Çerçeve kayması mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından ekzon 2'nin diğerlerinden farklı olduğu görüldü.



**Şekil 4.96.** *TPM3* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı. (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

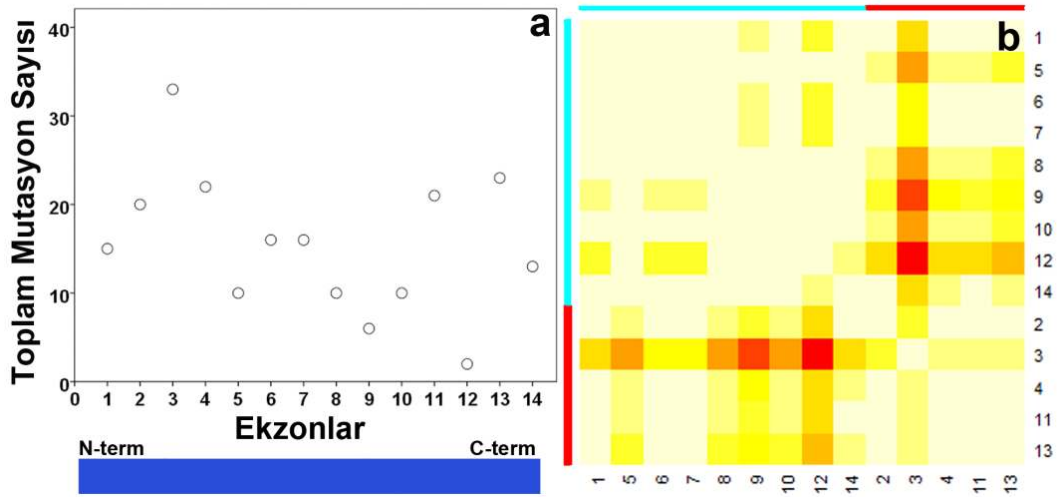
Nonsense mutasyonlar: *TPM3* geninde 14 ekzonda toplamda 5 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonlar 1 ile ekzon 4-6-7-12 ve 13'de görülürken, diğer ekzonlarda hiç mutasyon görülmedi (Şekil 4.97). Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir (Şekil 4.97). Ancak nonsense mutasyonlarda genin baş bölgelerinde görülecek stop kodonu oluşumlarının yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde ekzon 4, 6 ve 7'nin hotspot olma potansiyeli görülmektedir. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.



**Şekil 4.97.** *TPM3* geninde nonsense mutasyonlarının ekzonlar üzerinde dağılımı

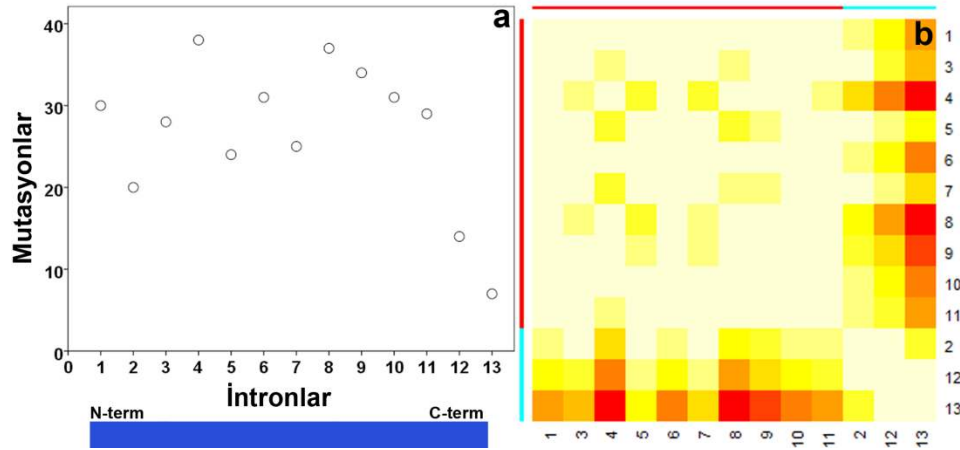
Toplam mutasyon sayısı: *TPM3* geninde 14 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 217 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 16 mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği, en fazla mutasyon sayısının 33 ile ekzon 3’de, en az mutasyonun ise 2 ile 12’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.98a). Ekzon 12’deki mutasyon sayısının az olması bu ekzonun uzunluğunun da az olmasından kaynaklı olabilir.

Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.98b). Isı-harita analizi ekzonlar arasında uzaklık bakımından ikinci grupta yer alan 12’nin diğer ekzonlardan daha farklı olduğu görüldü. I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 9 ekzonu kapsamaktayken, II. kümede ise mutasyon yükünün fazla olduğu ekzon 2, 3, 4, 11 ve 13’ü kapsamaktadır. Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından ekzon 3’ün diğerlerinden farklı olduğu gösterdi.



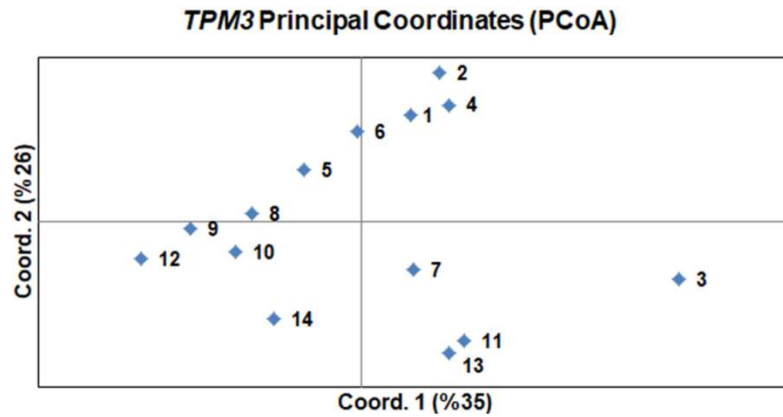
**Şekil 4.98.** *TPM3* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

*TPM3* geninde intron mutasyonları: *TPM3* geninde bulunan 13 introndan toplamda 348 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 26 mutasyonun intronlarda gözleendiği, en fazla mutasyonun 38 ile intron 4' de, en az mutasyonun ise 7 ile intron 13'de olduğu görölmektedir (Şekil 4.99a). İtronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.99b). I. küme mutasyon yükünün az olduğu ile intron 2, 12 ve 13'ü içermektedir. İtron bölgelerinde görölen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi ise gen üzerinde mutasyon yoğunluğu bakımından diğer ekzonlardan belirgin fark gösteren bir ekzonun varlığına işaret etmemektedir.



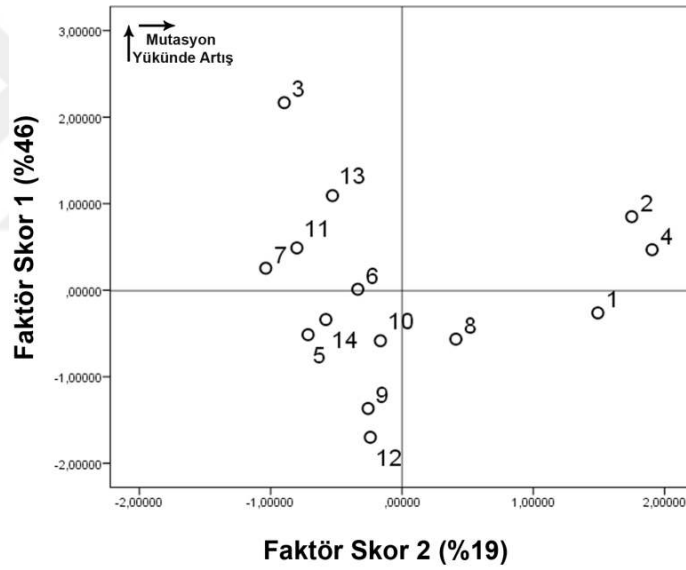
**Şekil 4.99.** *TPM3* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

PCoA analizi: *TPM3* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğu görülmektedir. Analiz gen içerisinde 3'den fazla gruplanmanın olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.100). Analiz 11 ve 13. ekzonları bir grup olarak ele alırken 3, 7 ve 14. ekzonları tekil olarak ayrı gruplandırdı. Ekzon 5-10 grubu en az mutasyon yüküne sahip ekzonlardır. Tüm mutasyon tiplerinde hotspot bölge olarak belirlenen ve en çok mutasyonun görüldüğü N-terminal kısımda yer alan ekzon 3'ü PCoA analizi de hotspot olarak belirledi.



**Şekil 4.100.** *TPM3* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi

Faktör (PCA) analizi: *TPM3* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde dört adet grup bulunmaktadır. Ekzon 1 ve 3 tek başına diğer gruplardan uzakta yerleşerek farklı bir grup oluştururken diğer gruplardan birinin 2. ve 4. ekzonlardan oluşmakta ve hotspot olma potansiyelleri yüksektir (Şekil 4.101). Faktör (PC) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 3 iken, II. derece hotspot bölge ise ekzon 2 ve 4'dür. Dördüncü grupta yer alan ekzonların ise mutasyon yükünün 2 ile 23 arasında değiştiği görülmektedir ve en az mutasyona sahip olan ekzonlar bu grupta yer almaktadır.



**Şekil 4.101.** *TPM3* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi

#### 4.2.3.5. *TNNT1* Geni

*TNNT1* geninden ekzon ve intron bölgeler dahil veri tabanlarından ve literatürden toplamda 784 mutasyon elde edildi. Bu mutasyonların 242 tanesi ekzon, 542 tanesi ise intron bölgelerine aittir. Ekzon bölgelerine ait mutasyonlarda 153 değişim ile en çok missense mutasyona rastlanırken bunu 69 değişim ile sinonim, 12

değişim ile stop kodonu ve 8 indel ile çerçeve kayması mutasyonları izledi (Tablo 4.31).

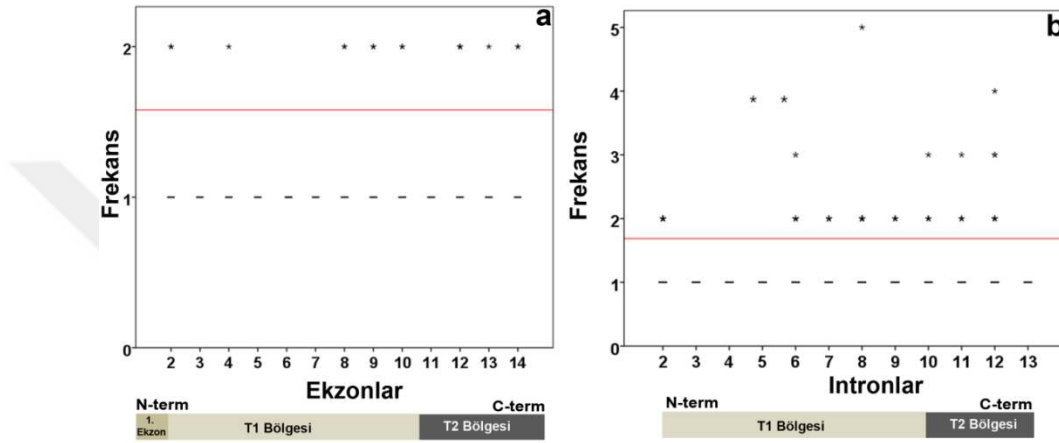
**Tablo 4.31.** *TNNT1* geninde ekzon ve intron bölgelerine ait literatürden ve veri tabanlarından derlenen mutasyon sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri

| Mutasyonlar                 | N   | Ort. | Min. mut. sayısı | Mak. mut. sayısı |
|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
| Missense Mutasyon           | 153 | 12   | 4                | 28               |
| Sinonim Mutasyon            | 69  | 6    | 0                | 14               |
| Çerçeve Kayması Mutasyonu   | 8   | 0,6  | 0                | 3                |
| Nonsense Mutasyon           | 12  | 1    | 0                | 3                |
| İntron Bölgesi Mutasyonları | 542 | 45   | 28               | 86               |

n: mutasyon sayısı, ort: ortalama değer ekzon ve intron başına düşen mutasyon sayısı, min. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen minimum mutasyon sayısı, mak. mut. sayısı: ekzon ve intronlarda görülen maksimum mutasyon sayısını ifade etmektedir.

*TNNT1* geninde ekzon ve intronlarda tek pozisyonda görülen mutasyon yoğunluğu: *TNNT1* geni üzerindeki ekzonlar ve intronlarda aynı pozisyonda çoğunlukla tekil mutasyonların olduğu gözlenirken, aynı pozisyonda en fazla 5 mutasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.102). Gen üzerinde aynı pozisyonda gözlenen mutasyonların outlier/aşırı gözlem olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hem intron bölgesi hem de ekzon bölgesi için aşırı varyasyonel pozisyonların olduğuna işaret etmektedir. Analizler aynı pozisyonda görülen 2 ve üstü mutasyonları aşırı varyasyonel olarak saptadı. Buna göre aynı pozisyonda tüm ekzonlarda tekli mutasyon gözlenirken, aynı pozisyonda 2 mutasyonun gözlemlendiği 8 ekzon (2, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14) bulunmaktadır (Şekil 4.102a). Bu ekzonlar mutasyon gerçekleşme olasılığı bakımından hotspot pozisyonlar içeren ekzonlardır. Tropomiyozin bağlanma bölgesi 1'in yer aldığı ekzon 8 ve 9'da bir noktada aşırı varyasyonel pozisyonlar olduğu görülmektedir. Genin korunumlu bölgesinde yer alan (ekzon 7-14 arası) ve tropomiyozin bağlanma bölgesi 2'nin yer aldığı ekzon 11'de aşırı varyasyonel pozisyona rastlanmazken, troponin C ve troponin I bağlanma bölgesi olan ekzon 12 ve 13'de aşırı varyasyonel pozisyonlara rastlanmıştır. Ekzonlarda aşırı varyasyonel pozisyonların genin korunumlu bölgesi olan 7 ve 14. ekzonlar arasında olduğu görülmekte. İntron bölgelerinde aynı pozisyonda mutasyon olma olasılığı

bakımından hotspot bölgeler intron 3 hariç diğer tüm intronlarda yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.102b). İtron 8’de bir noktada 5 mutasyon gözlenmesi ile en fazla mutasyonun görüldüğü pozisyon olduğu gözlenirken, genin C-terminal kısmında yer alan 10, 11 ve 12. İtronlarda bir noktada görülen aşırı varyasyonel pozisyonların yoğunlaştığı görüldü. İtron bölgelerinde ekzonlara göre daha fazla varyasyonel pozisyonun gözlemlendiği görülmektedir (Şekil 4.102b).



**Şekil 4.102.** *TNNT1* geninde ekzon (a) ve intronlarda (b) tek bir pozisyonadaki aşırı mutasyonlar ve dağılımları (Kırmızı çizgi ortalama mutasyon sayısını bu çizginin üzerinde kalanlar da aşırı gözlemleri ifade etmektedir.)

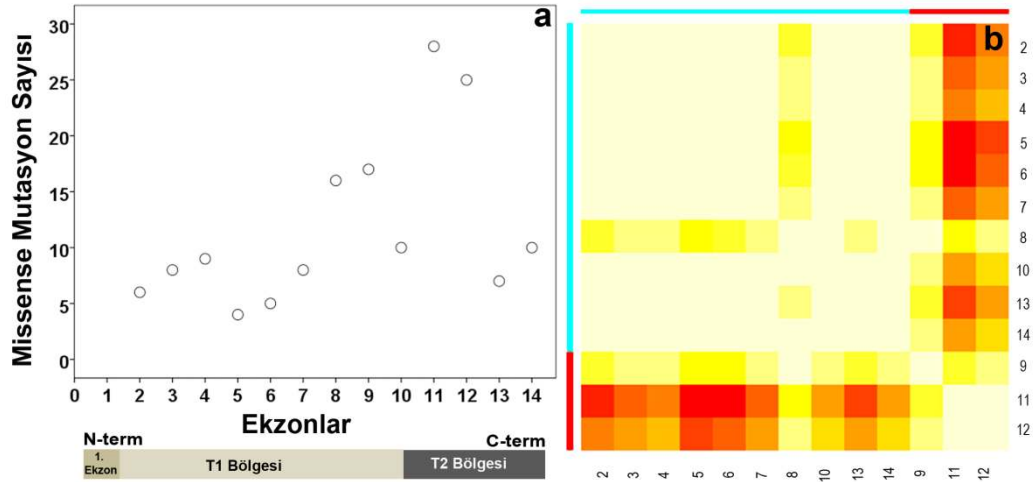
#### 4.2.3.5.1. *TNNT1* Geni Ekzon ve İtronlarındaki Mutasyon Tipleri ve Yoğunluk Dağılımları

*TNNT1* geni 19. kromozomda yer alır, 14 ekzona sahip ve 16,509 baz uzunluğundadır. Ekzon 1 kodlama yapmadığı için bu gen bölgesinden veriler analizlerde kullanılmadı. Çalışma kapsamında genin 14 ekzonunda gözlenen missense, sinonim, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonları ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Çalışmada *TNNT1* geninde ekzon uzunluğu ile mutasyon yükü arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi bu iki değişken arasında anlamlı bir korelasyon vermiştir ( $Cor_{Pearson}$ : 0.86,  $n$ : 13,  $p$ : 0.00).



Missense mutasyonlar: *TNNT1* geninde 14 ekzonda toplam 153 missense mutasyon saptandı. Missense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 12 missense mutasyon gözlenirken en fazla missense mutasyon 28 ile ekzon11’de, en az mutasyon ise 4 ile ekzon 5’de görülmektedir (Şekil 4.103a). Missense mutasyon sayısı bakımından N-terminal değişken domaininde ortalama 6 (min: 4, maks: 9), korunumlu domainde ortalama 15 (min: 7, maks: 28) mutasyon olduğu gözlemlendi. En fazla mutasyon troponin I bağlanma bölgesinin yer aldığı ekzon 11’de görüldü. Genel olarak mutasyonların genin korunumlu bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Ekzonlar arasında missense mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.103b). I. küme mutasyon yükünün düşük olduğu 10 ekzondan (2-8, 10, 13, 14) oluşurken, II. küme mutasyon yükünün fazla olduğu 3 ekzondan (9, 11, 12) oluşturmaktadır. I kümede ağırlıklı olarak genin farklı izoformlarının ortaya çıkmasını sağlayan N-terminal değişken bölgesinde görülürken, II. kümedekiler genin korunumlu bölgelerinde yer alan tropomiyozin, TnI, TnC bağlanma bölgelerindeki ekzonlardır. Missense mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonların C-terminal uca yakın yer alan ekzon 9, 11 ve 12 olduğu görülmektedir. Missense mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.103a). Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan ekzon 9-11 ve 12’nin hotspot bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğu ekzon 5 ve 6’dadır. Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan korunumlu bölgede yer almaktadır. Mutasyonların ekzon 9’a kadar artış gösterdiği ekzon 10’da bir düşüş yaşandığı sonrasında ekzon 11 ve 12’de ise pik yapıp sonra tekrar düşüş olduğu gözlemlendi. *TNNT1* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi ise sadece ekzon11 ve 12’yi diğer ekzonlardan farklı ve aşırı varyasyonel ekzon olarak tanımlamaktadır.

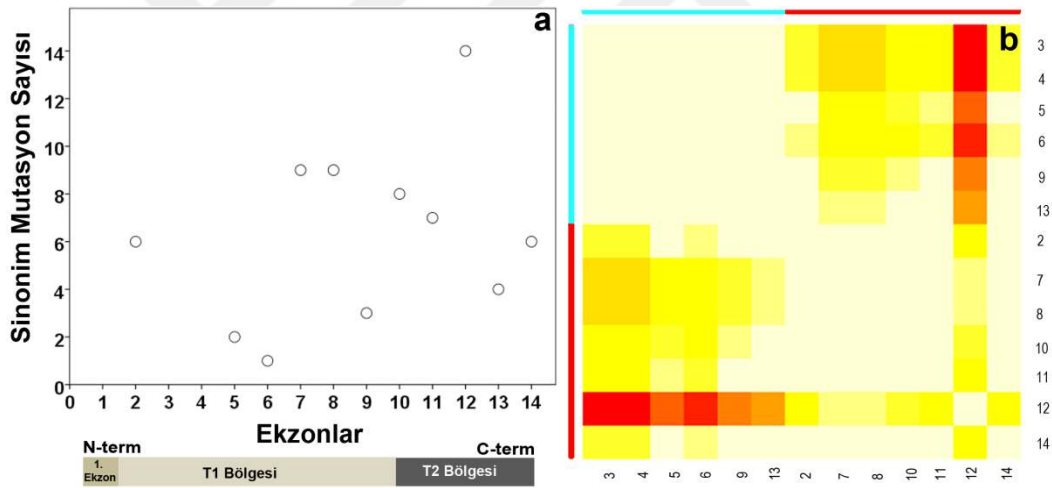


**Şekil 4.103.** *TNNT1* geninde missense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Sinonim mutasyonlar: *TNNT1* geninde 14 ekzonda toplam 69 sinonim mutasyon saptandı. Sinonim mutasyonların ekzonlar üzerindeki ortalaması 5 olup, en fazla sinonim mutasyon 14 ile ekzon 12’de, ekzon 3 ve 4’de ise hiç sinonim mutasyon gözlenmedi (Şekil 4.104a). Sinonim mutasyon sayısı bakımından N-terminal değişken domaininde ortalama 2 (min: 0, maks: 6), korunumlu domainde ortalama 8 (min: 3, maks: 14) mutasyon olduğu gözlemlendi. En fazla mutasyon troponin I’nın bağlandığı ekzon 12’de görüldü. Genel olarak mutasyonların genin korunumlu bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Ekzonlar arasında sinonim mutasyon yüküne bağlı bir gruplanmanın olup olmadığını ve bunların birbirlerine uzaklıklarını belirlemek için öklid uzaklık parametresi kullanılarak kümeleme analizi ve ısı-harita analizleri gerçekleştirildi. Kümeleme analizi ekzonlar arasında 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.104b). I. küme mutasyon yükü az olan 6 ekzondan (ekzon 3-6, 9 ve 13) oluşurken, II. kümeyi mutasyon yükü yüksek olan 7 ekzondan (ekzon 2, 7, 8, 10-12 ve 14) oluşturmaktadır. I. kümede ağırlıklı olarak genin farklı izoformlarının ortaya çıkmasını sağlayan N-terminal değişken bölgesinde görülürken, II. küme genin korunumlu bölgelerinin yer aldığı tropomiyozin, TnI, TnC bağlanma bölgelerindeki ekzonlar yer almaktadır. Missense mutasyon yükü bakımından en sıcak ekzonların

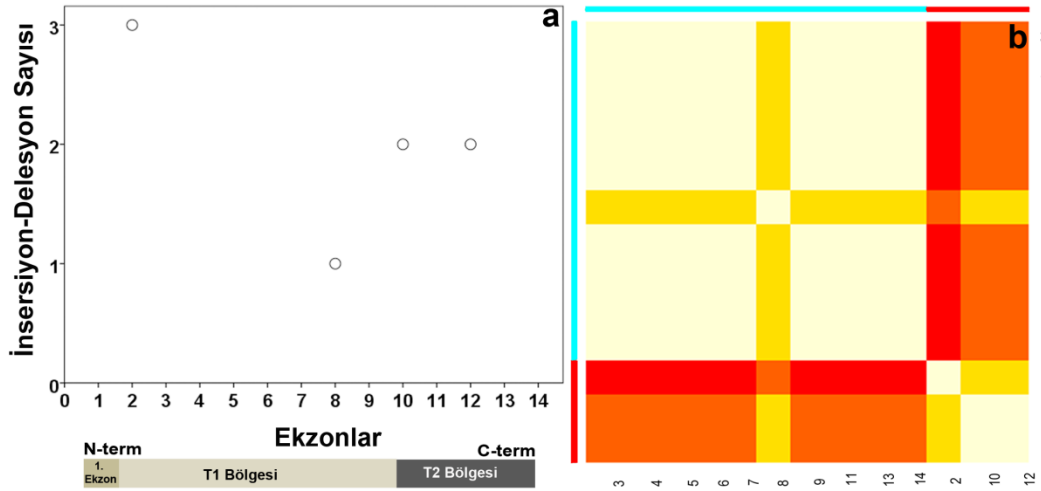
C-terminal uca yakın yer alan ekzon 7, 8 ve 12’de olduğu görülmektedir. Missense mutasyon yük dağılımının ekzonlar arasında belirgin bir kesiklik oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.104a). Kümeleme analizi genin C-terminal kısmına yakın yer alan ekzonların hotspot bölgeler olma potansiyelinin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Gen üzerinde 2. ve 3. derece hotspot bölgeler gözlenmezken, en düşük mutasyon yoğunluğunun ekzon 3 ve 4’de olduğu görülmektedir. Mutasyon yoğunluğunun en fazla olduğu kısım genin de büyük bir bölümünü oluşturan korunumlu bölgede yer aldığı, N-terminal değişken bölgede ise daha az olduğu görülmektedir. Mutasyonların ekzon 9’a kadar artış gösterdiği ekzon 10’da bir düşüş yaşandığı sonrasında ekzon 11 ve 12’de ise pik yapıp sonra tekrar düşüş olduğu gözlenmektedir. *TNNT1* geninde gözlenen missense mutasyonlar ile gerçekleştirilen outlier analizi de sinonim ile benzer şekilde ekzon 11, 12’yi aşırı varyasyonel ekzonlar olarak tanımlamaktadır.



**Şekil 4.104.** *TNNT1* geninde sinonim mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Çerçeve kayması mutasyonları: *TNNT1* geninde 14 ekzonda toplamda 13 çerçeve kayması mutasyonu saptandı. Çerçeve kaymasından sorumlu insersiyon ve delesyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 0.6 nonsinonim mutasyonun ekzonlarda gözleendiği en fazla indelin 3 ile ekzon 2’de en az indelin ise 1 ile ekzon 8’de olduğu ekzon 5, 6, 7, 10, 13 ve 14’de ise hiç indelin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.105a). İndel sayısı bakımından N-terminal değişken

domaininde ortalama 1 (min: 0, maks: 3), korunumlu domainde ortalama 1 (min: 0, maks: 2) indelin olduğu gözlemlendi. Ekzonlar arasında çerçeve kayması mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.105b). I. küme tümü en fazla 1 indelin gözlemlendiği çoğunlukla N-terminal değişken bölgede gözlenirken, II. kümeyi 3 ekzon oluşturmaktadır. Genin PTP bölgesinde baş ve orta kısımlarda yoğunlaştığı görülen indellerin N-terminal uca yakın gözlenmediği, C-terminal kısma doğru ise azaldığı görülmektedir. Çerçeve kayması mutasyonları bakımından genin korunumlu bölgesinde yer alan ekzon 7 ve 14 arasında yoğunlaştığı görüldü. N-terminal değişken bölgede yer alan ekzon 2 ve troponin I bağlanma bölgesinin yer aldığı ekzon 13'ün hotspot bölge olma potansiyeli oldukça yüksektir. Çerçeve kaymasından sorumlu indeller ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 2 ve 12'yi hotspot bölge olarak tanımlamaktadır.

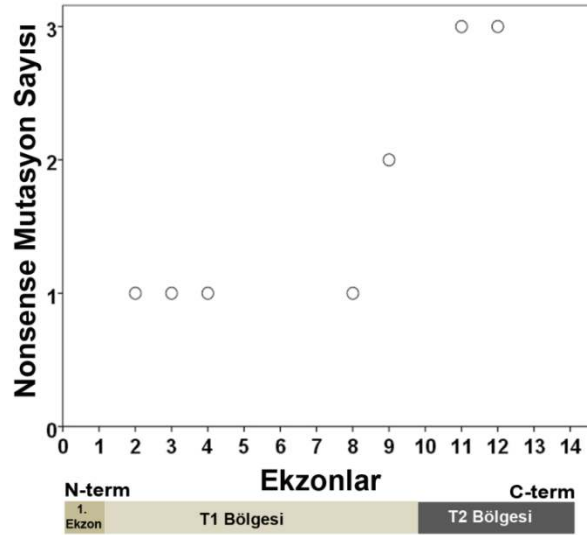


**Şekil 4.105.** *TNNT1* geninde çerçeve kaymasından sorumlu indellerin ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

Nonsense mutasyonlar: *TNNT1* geninde 14 ekzonda toplamda 12 stop kodonu oluşumuna neden olan nonsense mutasyon saptandı. Stop kodonu oluşumundan sorumlu nonsense mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 1 nonsense mutasyonun ekzonlarda gözlemlendiği, en fazla nonsense

mutasyonun 3 ile ekzon 11 ve 12’de, en az nonsense mutasyonun 1 ile ekzon 2, 3, 4 ve 8’de olduğu görülmektedir (Şekil 4.106). Stop kodonu oluşturan nonsense mutasyon sayısı bakımından N-terminal değişken domaininde ortalama 0.6 (min: 0, maks: 1), korunumlu domainde ortalama 1 (min: 0, maks: 3) nonsense mutasyonun olduğu gözlemlendi. En yüksek stop kodon mutasyonunun görüldüğü ekzonlar 2 ve 3 mutasyon ile 9, 11 ve 12. ekzonlardır. Korunumlu bölgede N-terminal değişken bölgede nazaran nonsense mutasyon yoğunluğunun fazla olduğu görülmektedir.

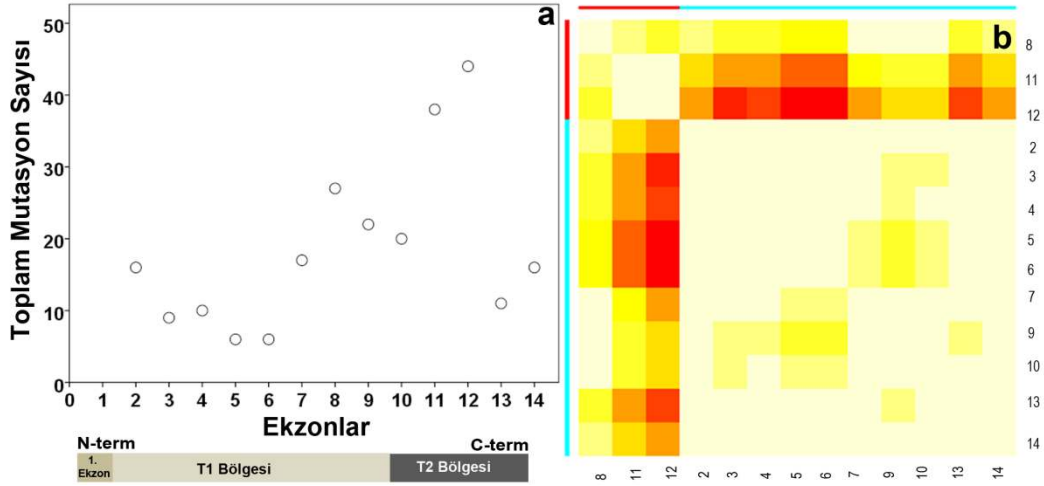
Ekzonlar arasında nonsense mutasyon yüküne bağlı belirgin bir gruplanmanın ve hotspot olarak önerilebilecek bir bölgenin olup olmadığını belirlemek amacıyla kümeleme analizi gerçekleştirildi. Kümeleme analizi gen üzerinde ekzonlar arası bir gruplanmaya ve bir hotspot bölge varlığına işaret etmemektedir (Şekil 4.106). Ancak nonsense mutasyonlarda genin baş bölgelerinde görülecek stop kodonu oluşumlarının yıkıcılığının daha fazla olacağı düşünüldüğünde olası hotspot ekzonların 2, 3 ve 4’ün olma potansiyeli daha yüksek olacaktır. Nonsense mutasyonlarla gerçekleştirilen outlier analizi gen bölgesi için herhangi bir hotspot ekzon varlığına işaret etmemektedir.



Şekil 4.106. *TNNT1* geninde nonsense mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı

Toplam mutasyon sayısı: *TNNT1* geninde 14 ekzonda missense, sinonim, çerçeve kayması, stop kodon mutasyonlarından toplamda 242 mutasyon saptandı. Mutasyonların ekzonlar üzerindeki dağılımlarına bakıldığında ortalama 19 mutasyonun ekzonlarda gözleendiği, en fazla mutasyon sayısının 44 ile ekzon 12’de, en az mutasyonun ise 6 ile ekzon 5 ve 6’da olduğu görölmektedir (Şekil 4.107a). Toplam mutasyon sayısı bakımından N-terminal değışken domaininde ortalama 9 (min: 6, maks: 44), korunumlu domainde ortalama 24 (min: 11, maks: 35) mutasyon olduğu gözleendi. Tropomyozin bağlanma bölgesi 2’nin yer aldığı ekzon 11, TnI bağlanma bölgesi olan ekzon 12’de mutasyonların pik yaptığı görölmürken, TnC bağlanma bölgesinin yer aldığı ekzon 13’de mutasyon yoğunluğunun az olduğu göröldü.

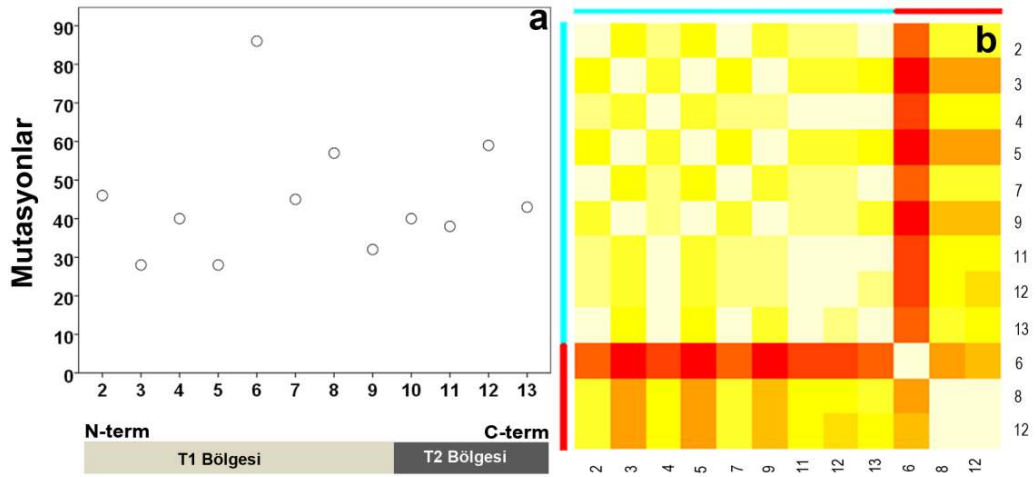
Ekzonlar arasında gende gözlenen tüm mutasyonlara bağlı olarak bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.107b). I. küme genellikle N-terminal değışken bölgeyi içerisine alan 10 ekzonu kapsarken, II. küme ekzon 8-11 ve 12’yi kapsamakta ve N-terminal değışken bölgeyi içermektedir (Şekil 4.107b). Kümeleme analizi gen üzerinde ekzon 8-12’i (9-10 hariç) kapsayan bir hotspot bölgenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.107b). Bu bölge içerisinde en yüksek mutasyon sayısı 44 ile ekzon 12’de görölmürken, bunu 38 mutasyon ile ekzon 11 ve 27 mutasyon ile ekzon 8 takip etmektedir. Toplamda elde edilen 242 mutasyonun yaklaşık 47’si N-terminal değışken domainde yer alırken, 195’i korunumlu domainde yer almaktadır. Genin C-terminal kısmında N-terminal kısmına nazaran mutasyon yoğunluğunun daha fazla olduğu görölmektedir. Ekzon 10’a kadar nispeten mutasyon dağılımı daha düzenli olurken ekzon 11 ve 12’de yoğunluğun pik yaptığı görölmektedir (Şekil 4.107a). Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece ekzon 11 ve 12’yi hotspot bölge olarak tanımladı.



**Şekil 4.107.** *TNNT1* geninde gözlenen tüm mutasyonların ekzonlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre ekzonlar arası kümeleme analizi ve ısı-haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak ekzonları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın ekzonları işaret etmektedir.

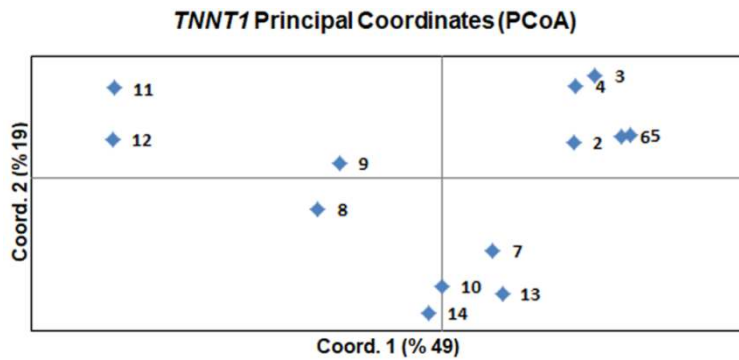
*TNNT1* geninde intron mutasyonları: *TNNT1* geninde bulunan 13 introndan toplamda 542 mutasyon saptandı. Mutasyonların intronlardaki dağılımlarına bakıldığında ortalama 45 mutasyonun intronlarda gözlendiği, en fazla mutasyonun 86 ile intron 6'da, en az mutasyonun ise 28 ile intron-3 ve 5'de olduğu görülmektedir (Şekil 4.108a). Mutasyon sayısı bakımından N-terminal değişken domaininde ortalama 46 (min: 28, maks: 86), korunumlu domainde ortalama 45 (min: 32 maks: 57) mutasyonun olduğu gözlendi.

Intronlar arasında mutasyonlar bakımından bir gruplanmanın olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen kümeleme analizi gen üzerinde 2 kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.108b). I. küme neredeyse geninin tümünü kaplamaktayken, II. küme intron 7, 8 ve 12'yi kapsamaktadır. Kümeleme analizi gen üzerinde korunumlu bölgede yer alan bir hotspot bölge varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.108). Toplam mutasyon sayısı ile gerçekleştirilen outlier/aşırı gözlem analizi gen üzerinde sadece intron 6 ve 12'yi hotspot bölge olarak tanımladı.



**Şekil 4.108.** *TNNT1* geninde gözlenen tüm mutasyonların intronlar üzerinde dağılımı (a). Öklid uzaklık parametresine göre intronlar arası kümeleme analizi ve ısı- haritası (b). Kırmızı yoğun bölgeler birbirinden en uzak intronları, açık renk bölgeler ise birbirine yakın intronları işaret etmektedir.

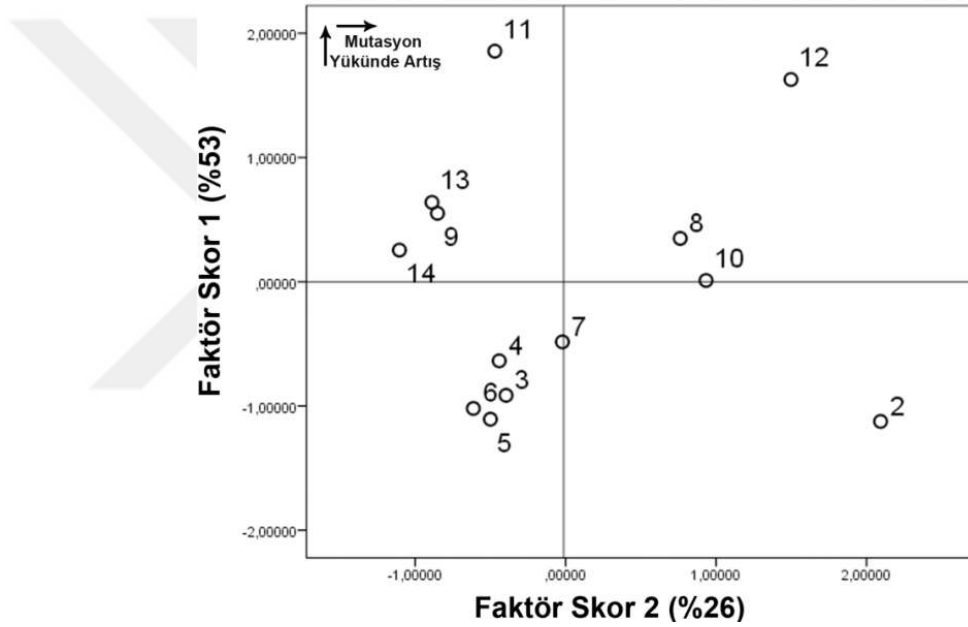
PCoA analizi: *TNNT1* geninden tüm ekzonlarda gözlenen dört mutasyon çeşidi (missense, sinonim, çerçeve kayması, nonsense) ile gerçekleştirilen PCoA analizi gen içerisinde mutasyon yapısı bakımından heterojen bir dağılımın olduğunu göstermektedir. Analiz gen içerisinde dörtlü bir gruplanmanın olduğuna işaret etmektedir (Şekil 109). Bunlardan ekzon 11 ve 12 bir grubu, ekzon 8-9 bir başkasını, ekzon 7-10-13 ve 14'ü ayrı bir grubu ve ekzon 2-3-4-5-6'yı da ayrı bir grup olarak ele almaktadır. Ekzon 2-6 grubu en az mutasyon yüküne sahip ekzonlar olup N-terminal değişken bölgede yer almaktadır. Ekzon 8-9 grubu tropomiyozin bağlanma bölgesi 1'de yer alırken, ekzon 11-12 tropomiyozin bağlanma bölgesi 2 ve TnI bağlanma bölgesinde yer almaktadır.



**Şekil 4.109.** *TNNT1* geninde ekzonlarda gözlenen tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen PCoA analizi



Faktör (PCA) analizi: *TNNT1* geni üzerinde ekzonlar üzerinde gözlenen dört mutasyon tipi (missense, sinonim, indel, nonsense) ile Ts, Tv, C>T, A>G verileri kullanılarak faktör analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda birbiriyle korelatif olmayan 3 faktör skoru elde edildi. Bu faktör skorlarından en bilgi verici olan ilk ikisi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiğine göre gen üzerinde çok sayıda grup bulunmaktadır. Ekzon 11 ve 12 ayrı ayrı iki grup olarak diğerlerinden uzakta yerleşmiştir (Şekil 110). Faktör (PCA) analizine göre gen üzerinde baz değişim eğilimi bakımından I. derece hotspot bölge ekzon 12 iken, II. derece hotspot bölge ise ekzon 11'dir.



**Şekil 4.110.** *TNNT1* geninde ekzonlarda gözlenen sekiz değişken ile gerçekleştirilen Faktör (PC) analizi

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Konjenital Myopatilerden Sorumlu Genlerin Mutasyon Yük Profilleri ve Klinik Potansiyelleri

#### 5.1.1. Sarkomer İçerisinde Yapısal Koordinasyondan Sorumlu Genler

*NEB*: Çalışmada *NEB* geninde toplamda 10694 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 68, 154'de ve intron 74 'de gözlemlendi. Missense mutasyonlarda hotspot ekzon 178 iken, nonsense ve çerçeve kaymasında 170. ekzon olarak saptandı. Gen üzerinde 152.567.035. (ekzon 11) pozisyon hotspot pozisyon iken, intronlarda 152.474.001. (intron 72) ve 152.402.515.(intron 132) pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *NEB* geninde mutasyon yükünün orta (0.04) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 10816/249138) seviyede olduğu gözlemlendi.

*NEB* geni konjenital myopatiden sorumlu genler içerisinde nemalin myopati ile yüksek korelasyon göstermesi ile dikkat çekmektedir (Moreau Le Lan ve ark., 2018). Nebulin proteininin aktin filamentlerinin yapısal stabilitesini sağlamasının yanında troponin ve tropomyozin ile de etkileşim içerisinde olması onu hastalıklarla ilgili olarak aktin merkezli bir konuma oturtmaktadır. Bu nedenle de nebulin proteininde gerçekleşen mutasyonlar özellikle aktin filamentlerinin yapısal ve fonksiyonel işlevlerini sekteye uğratma eğilimindedir. Nitekim kas biyopsilerinde sarkomerde gözlenen rod cisimlerinin düzenli yapılarını yitirmiş aktin filamentlerini temsil etmeleri bu durumu destekler niteliktedir (Lawlor ve ark., 2011). Nebulin proteinin tam anlamıyla işlevini gerçekleştirebilmesi aktin proteinini baştan sona geçmesiyle mümkündür. Bu bakımdan genin herhangi bir yerinde oluşabilecek nonsense mutasyonlar bu etkileşimi büyük oranda bozma potansiyeli taşımaktadır. Kümeleme analizi nonsense mutasyonlarda hotspot ekzonlar olarak N ve C-terminal bölgelere işaret etmektedir. Genellikle genlerin 5' ucuna yakın kısımlarda (proteinde N-terminal) gerçekleşen nonsense mutasyonlar oluşan trunkat proteinler nedeniyle şiddetli prognozlara neden olurlar (Donner ve ark., 2004; Lawlor ve ark., 2011). Nebulin geninde C-terminal bölgenin Z bandı ile bağlantıda önemli rol oynaması bu

bölgeyi etkileyen nonsense mutasyonların proteinde yaratacağı trunkat yapı nedeniyle myopatilere neden olması olasıdır (Şekil 2.7).

Çerçeve kayması mutasyonları da gerçekleştikleri pozisyonlardan itibaren proteinin aminoasit diziliminde farklılıklar yaratması ve hatta nonsense mutasyonlara neden olması bakımından hastalıkların oluşmasında etkili bir mutasyondur. Çerçeve kayması mutasyonları da nonsense mutasyonlar gibi genin 5' kısmına yakın bölgelerde oluşması durumunda daha şiddetli prognozlar yaratma eğilimindedirler. Kümeleme analizi nebulin geninde çerçeve kayması mutasyonları bakımından hotspot bölge olarak C-terminal bölgeye işaret etmesi nonsense ile benzer bir durumu gösterir niteliktedir. Diğer taraftan genin 5' kısmına yakın bölgelerde alternatif eklemeyi etkileyecek intron temelli mutasyonlar da yine proteinin boyutunu etkileyeceği için myopatilerin oluşmasında etkili olabilecek potansiyeldedir.

*NEB* geni üzerinde gözlenen missense mutasyonların proteinin basit lineer yapı nedeniyle proteinin üç boyutlu yapısından çok protein-protein etkileşimini etkilemesi olasıdır. Gen üzerinde missense mutasyon yükü bakımından kümeleme analizi en yüksek mutasyon yükünün proteinin N- ve C-terminal uçlar ile N terminal bölgeye yakın 30-81. ekzonlar arasında olduğuna işaret etmektedir (Tablo 4.2, Şekil 4.2). Nebulin proteinin N-terminal bölgesi F-aktinlerin uzamasını engelleyen ve aktini bir başlık gibi kapatarak aktin filametlerin boyutunu belirleyen tropomodulin proteini ile bağlantı kurar (Şekil 2.7) (Yuen ve ark., 2020). Kümeleme analizi N-terminal bölgeyi oluşturan uç ekzonları hotspot ekzonlar arasında göstermektedir. Bu bölgedeki mutasyonlar tropomodulin ile birlikte aktin boyutunu belirlediğinden aktinlerin uzunluğunu ve stabilitesini bozar. Proteininin gövde kısmı ise aktin filamenti üzerine sarılı olup troponin ve tropomiyozin proteinleri ile bağlantı kurar. Literatürde her ne kadar genin 3' bölgesinde (stop kodonuna yakın ekzonlarda) mutasyon yükünün fazla olduğuna vurgu yapılsa da (Donner ve ark., 2004; Lawlor ve ark., 2011) elde edilen veriler mutasyon yoğunluğunun 5' bölgede yoğunlukla tropomiyozin ile bağlanma bölgesini oluşturan 35-81. ekzonlar arasında yoğunlaştığını göstermektedir (Tablo 4.6). Bu bölgede görülen mutasyonlar kas kasılma mekaniğinde zayıflamaya ve kas güçsüzlüğüne neden olabileceğinden myopatilerle ilişkili olma ihtimali yüksektir (Yuen ve ark., 2020). C-terminal bölge

proteinin Z bandı ile sıkı bağlantılar kurmasını sağlayan birçok bölgeyi içerir (Şekil 2.7). Bu bölgede yer alan Ser ve SH3 domainleri çok sayıda protein için bağlanma noktasına sahiptir. Kümeleme analizi Ser ve SH3 domainlerini oluşturan ekzonları hotspot ekzonlar olarak belirtmektedir. Bu bölgelerde oluşan mutasyonlar nebulin geninin Z diskine bağlanmasını zayıflatacağından sarkomerin yapı destek mekanizmalarını bozacaktır.

Elde edilen sonuçlar şiddetli nemalin myopatiye neden olabilecek nonsense, çerçeve kayması ve splice bölge mutasyonları için başlangıç kodonuna yakın 5' bölgedeki hotspot bölgelerin sekanslama için hedeflenmesinin klinik açıdan kullanışlı olabileceğine işaret etmektedir (Tablo 4.6). Missense mutasyonlar için C-terminal (Z bandı) ve N-terminal bölgede (aktin filamentleri ile etkileşim) proteinlerle yoğun etkileşime geçen ekzonların hedeflenmesi klinik teşhislerde daha bilgi verici olabilir (Tablo 4.6). Bununla birlikte gen boyunca dikkat çeken bir durum da 82-105. ekzonlar arasında mutasyon yoğunluğunun az olmasıdır (Tablo 4.6). Bu durum bu bölgelerdeki ekzonların yüksek derece tekrar içermesinden dolayı sekanslamanın zor olmasından ve çalışmalarda ağırlıklı olarak cDNA'dan dizilerinin elde edilmesi nedeniyle bu bölgelerin yoğun alternatif ekleme bölgeleri olmasından kaynaklanabilir. Öte yandan bu bölgede oluşan mutasyonların embriyonel gelişimde tolere edilmemesi nedeniyle spontan abortusla sonuçlanması sonucu bu bölgedeki mutasyonların yakalanamaması da yine bu bölgedeki mutasyon yükünün az olmasının nedenleri arasında olabilir.

*TTN*: Çalışmada *TTN* geninde toplamda 38667 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 225 ve intron 169'da gözlemlendi. Missense mutasyonlarda hotspot ekzon 225 iken, nonsense ve çerçeve kaymasında sırası ile 19 ve 225. ekzonlar ekzon hotspot olarak saptandı. Gen üzerinden hotspot pozisyonlar ekzonlarda 179.611.899. (ekzon 48) ve 179.495.668. (ekzon 238) pozisyonlarda gözlenirken, intronlarda 179.578.108. (intron 93), 179.563.643. (intron 112), 179.542.062. (intron 147) ve 179.511.767 (intron 215) pozisyonlar olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *TTN* geninde mutasyon yükünün yüksek (0.13) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 38802/281435) seviyede olduğu görülmektedir.

*TTN* genin sentezlediği titin proteini sarkomer fizyolojisinde ve mekaniğinde önemli bir destek proteini olarak işlev görmektedir (Guo ve ark., 2010; Gregorio ve ark., 1999). Titin proteini sarkomerde Z bandı ile M bandı arasında boylu boyunca uzanır ve hem miyozin proteinlerine hem de kasın destek elemanlarına mekanik sabitleyici ve bir iskele olarak görev yapar. İki Z bandı arasında yer alan iki titin proteini sarkomerleri birbirine bağlaması bakımından da önemli bir destek proteinidir. *TTN* geni 281.435 bp uzunluğu ve 364 ekzonu ile insan genomunda en büyük genler arasındadır. Bu durum geni potansiyel bir mutasyon yatağı haline getirmesine rağmen genin fonksiyonel bir proteinden ziyade yapısal bir protein sentezlemesi ve titin genini basit lineer yapısı bu mutasyon yükünün tolere edilmesine yol açabilir. Titin proteininin sarkomerlerde gördüğü iskele görevi nedeniyle nonsense mutasyonlar proteinin boyutunu etkileyeceği için sarkomerlerde yapısal olarak yıkıcı etkiler yaratma potansiyelindedir. Gen üzerinde nonsense mutasyon dağılımının yüksek olduğu görülürken kümeleme analizi nonsense mutasyonların N ve C-terminal bölgelerde yoğunlaştığına işaret etmektedir (Şekil 4.13). Özellikle N-terminal bölgede 19. ekzonda nonsense ve C-terminal bölgeye yakın 225. ekzonda ise çerçeve kayması yükünün fazla olduğu görülmektedir (Tablo 4.12).

Diğer yandan proteinin basit üç boyutlu yapısı tıpkı nebulin proteininde olduğu gibi doğrusal yapıda olması missense mutasyonların hastalık yapıcı etkisinin ağırlıklı olarak protein-protein etkileşimi üzerinde etkili olabileceğine işaret etmektedir. Elde edilen verilerde bu durumu destekler niteliktedir. Titin proteini iki sarkomerin birleşme noktası olan M bandında birbirine bağlanmaktadır (Şekil 2.9) (Ge ve ark., 2019). Tez kapsamından elde ettiğimiz veriler bu bölgede yer alan mutasyonların fazla olduğunu göstermektedir (Tablo 4.13). Kümeleme analizi M bandını oluşturan genin C-terminal kısmında özellikle protein-protein etkileşiminden sorumlu Ig ve FN3 bölgesinde mutasyon yoğunluğunun oldukça fazla olduğunu göstermekte (Şekil 4.14). C-terminal bölgede fazlalaşan mutasyon yoğunluğu genin 359. ekzonu tarafından kodlanan TK domaini içinde geçerlidir. Hücreler arası sinyalden sorumlu birçok protein bağlanma bölgesini barındıran TK domainde meydana gelen mutasyonların myopati ya da kardiyomyopati ile de büyük oranda

ilişkilidir (Hackman ve ark., 2017). Titinin miyozin proteini ile düzgün bağlantı kuramamasında yine C-terminal bölge yakınlarındaki diziler önemli rol oynamaktadır (Freiburg ve Gautel, 1996). Titin ile miyozin kuyruk aralarındaki bağlantıların sıkı olmaması kalın filamentin devamlılığını bozar ve kas kasılma mekanizmasını zayıflatır. Dolayısıyla C-terminal bölgede özellikle Ig-FN3 domaininde gerçekleşen missense mutasyonlar miyozin kuyruk ile titin bağlantısını etkileyeceğinden myopatilerin ortaya çıkmasında etkili olabilir.

Öte yandan genin N-terminal bölgesinde Z diski içerisinde yer Ig domaininde de mutasyon yükünün yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). Bu bölge proteinin Z bandına bağlanıp sarkomer içerisinde stabil kalabilmesi ile ilişkilidir ve Z tekrar bölgesinde ortalama mutasyon yüküne sahip olan ekzonlar yer almaktadır. Titin proteinini Z bandına bağlayan çok sayıda protein-protein etkileşim bölgesi bu bağlanma domaininde bulunmaktadır. Bu bölgede orta şiddette mutasyon yükü bulunması bu genin mutasyonları üzerinde dengeleyici bir seçilimin varlığına işaret ediyor olabilir. Özellikle çok sayıda proteinin Z bandına bağlanmasından dolayı mutasyonlara bağlı protein defektlerinin diğer destek proteinleri tarafından tolere edilmesi ya da bazı mutasyonların ölümcül olmasından dolayı gözlenmemesi orta şiddetteki mutasyon yoğunluğunun nedenleri olabilir. Ayrıca genin N terminal kısmında yer alan Z-tekrar bölgesi kas tipine göre farklı alternatif eklemelere uğradığı için myopatili hastalarda bu bölgenin ayrıca taranması faydalı olabilir.

### **5.1.2. Kas Kasılmasında Fonksiyonel Rol Üstlenen Genler**

#### **5.1.2.1. Enzimatik Aktivite**

*DNM2*, *MTM1* ve *BINI* proteinleri yapısal bir özellik sağlamamakla birlikte sinyal iletimi ve membran zarındaki değişikliklerin algılanması, T-tübül yapısının oluşması, miyogenez, fagositoz-pinositoz ve otofaji gibi hücre membran fonksiyonlarında önemli rol oynarlar. Bu proteinlerin hücredeki sinyal yolları ve membran fonksiyonlarındaki görevleri nedeniyle olası mutasyonların fetal evrede letaliteden kas güçsüzlüklerine varan geniş bir yelpazede şiddetli kas hastalıkları ile ilişkili olması olasıdır.

*DNM2*: Çalışmada *DNM2* geninde toplamda 1362 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 21 ve intron 15’de gözlenirken nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarında 16, 17 ve 22. ekzonlarda mutasyon yükünün yüksek olduğu görüldü. Ekzonlarda 10.893.725. (ekzon 6), 10.941.702. (ekzon 22), 10.941.717. (ekzon 22) ve pozisyonlarının hotspot pozisyonlar olduğu gözlenirken, intronlarda 10.941.640., 10.941.635., 10.941.616., 10.941.617., 10.941.624., 941.605. ve 10.941.604. pozisyonlar (hepsi intron 21’de yer almaktadırlar.) hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *DNM2* geninde mutasyon yükünün düşük (0.01) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 1690/113825) seviyede olduğu gözlemlendi.

*DNM2* geni de *MTMI*’de olduğu gibi membran tübülasyonu ve hücredeki çeşitli enzimatik aktivitelerden sorumlu olan dinamin 2 proteinini sentezler. Hücrede membran sinyal trafiğinde rol oynayan dinamin 2’nin myopati hastalarda GTPaz aktivitesinde yükseklik olduğu gözlenmektedir (Massana ve ark., 2019). Bu durumun proteinin lipid bağlama yeteneği ve sinyal iletim fonksiyonunda çeşitli etkileri olabileceği belirtilmektedir (Dabby ve ark., 2014). Gen üzerinde missense mutasyon yükünün allosterik kontrolden sorumlu olan GED ve PRD domainlerinde yoğunlaştıkları görülürken, az sayıdaki nonsense ve çerçeve kaymasını mutasyonunu ise PH ve PRD domainlerinde yoğunlaştıkları görülmektedir (Şekil 4.27, Şekil 4.29). Bu bölgelerde gerçekleşen mutasyonların diğer sinyal proteinleri ve özellikle de amfifizin 2 proteini ile etkileşimini bozacağından T-tübül oluşumunda anomalilere neden olması olasıdır. Öte yandan proteinin GTPaz aktivitesinden sorumlu bölgede missense mutasyonların nispeten az olduğu görülürken nonsense ve çerçeve kayması mutasyonların olmadığı görülmektedir. Bu yönüyle dinamin 2 proteininin GTPaz aktivitesine yönelik mutasyonların letalitesinin yüksek ve tolere edilebilirliğinin düşük olduğu görülmektedir. Dolayısıyla GTPaz bölgesi proteinin fonksiyonu açısından önemli olması bu bölgeyi klinik amaçlı genetik taramalar için hedef dışı bir duruma getirmektedir.

*MTMI*: Çalışmada *MTMI* geninde toplamda 590 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 15 ile intron 3, 6, ve 14’de gözlenirken çerçeve kayması ve nonsense mutasyonların 3, 8, 9, 12 ve 13. ekzonlarda en yüksek olduğu

saptandı. Diğer genlerle karşılaştırılınca *MTM1* geninde mutasyon yükünün en düşük (0.004) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 498/110491) seviyede olduğu gözlemlendi. Ekzonlarda ve intronlarda tek bir pozisyonda gözlenen çoklu mutasyon sayısının iki ile sınırlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.17). Bu durum da *MTM1* geninde ya yetersiz veriden kaynaklı bir duruma ya da pozisyon başına mutasyon yoğunluğunun sınırlı olduğuna işaret etmektedir.

*MTM1* geninin hücre içerisinde çok sayıda fonksiyonu olmasına rağmen (hücreler arası sinyal iletimi, hücre iskeletinin düzenlenmesi, kas hücrelerinin başkalaşması, T-tübül oluşumu ve kas kasılma-gevşemesi gibi) asıl işlevi moleküllerden fosfat uzaklaştırmaktır (Gonorazky ve ark., 2018). Gen üzerinde missense mutasyonların ekzon 12 hariç ekzon 8-15’de yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.18). Bizim bulgularımızın aksine literatürde *MTM1* geninde görülen hastalık yapıcı mutasyonların genel olarak ekzon 3, 4, 8, 9, 11 ve 12’de yoğunlaştığı belirtilmektedir (Jeon ve ark., 2011). Sonuçlarda özellikle PH-GRAM domaini oluşturan ekzon 2-8 arasında mutasyon yükünün düşük olduğu görülmektedir. N-terminal uca yakın olan PH-GRAM domaini hücre membran sinyal iletiminden ve membran trafiğinden sorumlu fosfatidilinositol moleküllerini tanıyıp, bunlara bağlanmakta görev alır. Bu bölgede mutasyonların düşük olması bu bölgedeki mutasyonların myopatiler bakımından tolere edilebilir olmasından ya da membran fonksiyonları gerçekleştirilmemesine bağlı yüksek letaliteden kaynaklanabilir. Öte yandan ekzon 8’den itibaren missense mutasyonların ani bir artış gösterdiği görülmekte (Şekil 4.18). Bu domainden sonra protein üzerinde diğer MTMR proteinleri ile etkileşimi ve katalitik aktivitede rol oynayan bölgeler yer almaktadır. Bunlardan RID bölgesi MTMR proteinleri ile etkileşiminde rol oynarken PTP bölgesi katalitik aktiviteden sorumludur. PTP bölgesinde C(X)5R motifi bulunmaktadır ve bu motifin bulunmadığı ya da dejenere olduğu miyotübülerinler (MTMR9-13) katalitik olarak inaktiftir. C(X)5R motifi PTP domaininde 11. ekzonda yer alır ve membranda bulunan fostaflanmış fosfatidilinositol molekülünden fosfatın uzaklaştırılmasında görev alır. Elde ettiğimiz sonuçlar ekzon 8’den 11’e kadar mutasyon yükünün yüksek olduğunu göstermektedir. Proteinin C-terminal bölgesine doğru olan bölgeler özellikle diğer MTMR proteinleri ile etkileşiminde rol oynar ve



miyotübülerinlerin birbirine bağlanmasında görev alır. Bu bölge ile aktif ve inaktif olan miyotübülerinler birbirlerine bağlanır. Elde edilen sonuçlar SID bölgesi 13. ekzondan CC domaine ekzon 15'e kadar hızlı bir artış gösterdiğine işaret etmektedir. Bu durum MTMR proteinlerle doğru şekilde etkileşim kurulamamasının konjenital myopatilerde önemli bir etmen olduğuna işaret etmektedir.

Gen üzerinde çerçeve kayması mutasyonlarda RID bölgesini oluşturan 8. ekzondan itibaren ani bir artışın olduğu görülürken missense mutasyonların aksine CC bölgede bunun düştüğü görülmektedir (Şekil 4.20). Bu durum katalitik bölge olan PTP öncesinde gözlenen çerçeve kayması mutasyonların konjenital myopatilerin oluşumunda oldukça etkili olduğuna işaret etmektedir. MTMR proteinleri ile etkileşim bölgesi olan CC domainine doğru çerçeve kayması mutasyonların azaldığı görülmektedir (Şekil 4.20). Bu durum çerçeve kayması mutasyonların bu bölge üzerinde tolere edildiğine ya da letalitede artışa neden olması nedeniyle gözlenme sıklığında azalmanın bir sonucu olduğuna işaret etmektedir. Nonsense mutasyonlarda ise belirgin bir azalma ve gen üzerinde nispeten homojen bir dağılım görülmektedir. Bu durum nonsense mutasyonların şiddetli ve letal mutasyonlar olmasından kaynaklıdır. Tüm verilerle gerçekleştirilen PCoA ve Faktör analizleri özellikle 9., 13., 14 ve 15. ekzonların mutasyon yükü bakımından diğerlerinden farklı olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

*BINI*: Çalışmada *BINI* geninde toplamda 1205 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 12 ve intron 7'de gözlenirken, nonsense mutasyonlar 5, 7, 8, 9, 20. ekzonlarda ve çerçeve kayması mutasyonlarının da 1. ve 12. ekzonlarda yoğunlaştığı gözlemlendi. Gen üzerinde 127.828.158. (ekzon 4) pozisyonun hotspot pozisyon olduğu gözlenirken, intronlarda 127.818.151. (intron 11), 127.811.027. (intron 14), 127.808.684. (intron 17) pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *BINI* geninde mutasyon yükünün düşük (0.02) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 1245/59132) seviyede olduğu gözlemlendi.

*BINI* geni tarafından sentezlenen amfifizin 2 proteini vücutta hemen hemen her yerde yaygın olarak ifade edilmesi ile birlikte en fazla beyin ve iskelet kaslarında bulunmakta ve endositoz, aktin dinamikleri, apoptozis, DNA onarımı gibi hücresel

süreçlerde sinyal iletim proteini olarak rol oynamaktadır. Gen üzerinde missense mutasyonların proteinde N-terminal bölgeden C-terminal bölgeye doğru artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.41). Proteinin N-BAR bölgesi endositoz ve T-tübül oluşumunda önemli olup, hücre zarı ile etkileşimde rol oynamaktadır. Bu bölgede gerçekleşecek olan mutasyonlar proteinin hücre membranına bağlanamamasına yol açacağından kas hücrelerinde T-tübül oluşumunda sorunlara neden olacaktır. PI domaini (ekzon 11) yalnızca kas hücrelerinde ifade edilmesinden dolayı bu bölgede gözlenen mutasyonların myopatilerle ilişkili olması yüksek ihtimaldir. Yalnızca kasa özel izoformlarda yer alan PI bölgesi iskelet kaslarındaki T-tübül yapısının oluşmasında ve proteinin kas yapısı içerisinde doğru konumlandırılmasında görev almaktadır. Bu açıdan ekzon 11 *BINI* geninde myopatiler için önemli bir hedef bölgedir. PS domaini gen üzerinde prolin ve serin aminoasitlerince zengin motifler içeren bir bölgedir ve diğer proteinlerle etkileşimde rol oynamaktadır (Prokic ve ark. 2014). Gen üzerinden özellikle bu bölgede yer alan 12. ekzonda missense mutasyon yükünün pik yaptığı görülmektedir (Şekil 4.41). Bu durum çok sayıda proteinle etkileşimin önemli olduğu ve T-tübül oluşumunda bu bölgenin myopatilerde önemli etkisi olabileceğine işaret etmektedir. Protein üzerinden C-terminal bölgeye doğru gittikçe mutasyon yükünün arttığı görülmektedir. Bu bölgeler özellikle protein-protein etkileşiminde rol oynayan bağlanma ve allosterik kontrol bölgeleridir. Özellikle MBD bölgesinde yer alan 16. ve 17. ekzonlar mutasyon yükündeki fazlalık ile dikkat çekmektedir (Şekil 4.45). Proteinin son kısmını oluşturan MBD ve SH3 bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar özellikle dinamin, aktin proteinleri ile amfifizin proteinin birbirlerine bağlanmasında önemli rol oynamaktadır.

*CFL2*: Çalışmada *CFL2* geninde toplamda 144 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 2 ve intron 3'de gözlenirken çerçeve kayması ve nonsense mutasyonların 2. ve 4. ekzonlarda mutasyon yükünün en yüksek olduğu saptandı. Gen üzerinde ekzonlarda 35.182.131. (ekzon 4) pozisyonun hotspot pozisyon olduğu gözlenirken, intronlarda 35.182.348. (intron 2) ve 35.182.223. (intron 3) pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *CFL2* geninde mutasyon yükünün orta (0.04) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 243/5481) seviyede olduğu gözlemlendi.

Kofilin 2 proteini aktinlerin depolimerizasyonunda rol oynayan proteinlerden birisidir. Proteinin eksikliği aktin proteinin depolarizasyonunda sorunlar meydana gelirken F-aktinlerin uygun boyutlarda filamentler oluşturamamasına neden olur. Genel olarak gen üzerinde mutasyonların proteinin katalitik bölgesinin yer aldığı ekzon 2’de yoğunlaştığı görülmekte (Şekil 4.39). Bu ekzon içerisinde proteinin doğru konumu ve diğer proteinler ile arasındaki sinyali yönlendirecek bağlantı bölgeleri bulunmaktadır. Bundan dolayı buradaki mutasyonlar sonucunda proteinin aktin ile etkileşime girmedi sorunlar ortaya çıkacağı ve katalitik aktivitesini gerçekleştirememesi olasıdır. Çerçeve kayması mutasyonlarının da ekzon 2’de yüksek mutasyon yükü görülebilenken, nonsense mutasyonlarda ekzon 4’ün yüksek olduğu görülmektedir. Genin küçük olması konvansiyonel yöntemlerle de gene ait dizlerin elde edilebileceğine işaret etse de ekzon 2 de yüksek mutasyon yükü bu bölgenin hastalarda yoğun taranmasından da kaynaklanıyor olabilir.

#### 5.1.2.2. Kalsiyum Homeostazi

*RYR1*: Çalışmada *RYR1* geninde toplamda 8687 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 48 ve intron 49 da gözlenirken, nonsense ve çerçeve kayması mutasyonları da sırası ile 83 ve 92. ekzonlarda mutasyon yükünün en yüksek olduğu saptandı. Gen üzerinde ekzonlarda 38.976.634. (ekzon 34), 39.055.762. (ekzon 91) ve 39.057.592. (ekzon 92) pozisyonlar hotspot pozisyonlarken, intronlarda 38.993.391. (intron 48), 38.993.414. (intron 48), 38.993.432., 38.993.436., 38.993.438., 38.993.442., 38.993.450., 38.993.454., 38993491. (hepsi intron 48’de yer almaktadırlar.) 39.051.680. (intron 89), pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *RYR1* geninde mutasyon yükünün orta (0.05) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 8835/153874) seviyede olduğu gözlemlendi.

Ryanodin reseptör 1 (RyR1) genindeki mutasyonların özellikle konjenital myopati tiplerinden birisi olan santral kor hastalığının %90’ından sorumlu olduğu bilinmektedir (Ravenscroft ve ark., 2018). Ryanodin reseptör 1 proteini sarkolemmada gerçekleşen aksiyon potansiyelini sarkoplazma içerisine taşıması ile dikkat çeken bir kavşak proteindir. Protein bir  $Ca^{+2}$  pompası olarak T tübülleri ile

sarkoplazmik retikulum arasında yer alır ve voltaj gradiyentine bağılı olarak sarkoplazmik retikulum içerisinde yer alan  $Ca^{+2}$  iyonlarını sitoplazmaya pompalar. Sarkoplazmik retikulum üzerinde bulunan ve bilinen en büyük iyon kanallardan birisi olan Ryanodin reseptör 1 proteini konjenital myopatilerle ilişkili olarak gözlenen en kompleks yapılı proteindir.

Kümeleme analizleri sonuçları genel olarak mutasyon yükünün core ve pore domainde yoğunlaştıkları görülmektedir (Tablo 4.24). Core bölgesinde yer alan mutasyonların kanalın açılıp kapatılmasındaki düzeni bozarak kalsiyum sızıntısı ya da kanalın aşırı hassas olması gibi tablolar ortaya koyması olasıdır. Bu durumun kas kasılmalarında senkronizasyonu bozması ve kuvvet zayıflamasına yol açması beklenmektedir. Kalp kaslarında görülen Ryanodin reseptör 2 proteininde sitoplazmaya  $Ca^{+2}$  iyon kaçışlarının kalp ritim bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir (Beaufils ve ark., 2022).

Proteinin mutasyon yükünün sitoplazmik domainin yer aldığı N-terminal bölgede yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.54). Sitoplazmik domain altında birçok alt domain içermekte olup bunlar içerisinde özellikle NTD, NSOL, SPRY1, ry1&2, SPRY2, SPRY3, JSOL bölgelerinde mutasyon yükü fazlalaşmaktadır (Şekil 4.54). Proteinin sitoplazmik kısmı T tübüllerde yer alan DHPR proteini ile bağlantılıdır. Sitoplazmik domainde yer alan SPRY1-3 alt birimi DHPR reseptörleri direk etkileşimlidir ve kümeleme analizleri bu bölgedeki ekzonların çoğunlukla yüksek mutasyon yüküne sahip olduklarını göstermektedir (Tablo 4.24). Bu bölgede gerçekleşecek olan mutasyonlar DHPR ve *RYR1* arasındaki sinyal bağlantısını etkileyeceği için sinyal iletiminin düzgün işlememesi sebebiyle hücre içerisine doğru zaman ve miktarda kalsiyum pompalanmamasına neden olacaktır. Nonsense mutasyonlarda hotspot bölgenin stoplazmik domain içerisinde yer aldığı görülürken, çerçeve kayması mutasyonlarının core ve pore domainleri de içerdiği görülmektedir. Nonsense mutasyonların N-terminal bölgede gözlenmesi trunkat protenler oluşturması bakımından şiddetli etkiler yaratırken çerçeve kayması mutasyonların ise gen üzerinde missense benzeri bir örüntü sergilediği görülmektedir. Böylesine kompleks bir proteinde nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarına bireyde rastlanması bozuk *RYR1* geninin işlevinin diğer izoformlar tarafından yüklenilmesi

ya da tek bir *RYR1* geninin aktivitesinin hastalarda telafi edici etkisinden kaynaklanabilir.

Proteininin allosterik kontrolden sorumlu bölgesi olan core bölgesi sitoplazmik alan içerisinde yer alır ve csol kısmından oluşur shell bölgesini pore bölgesine bağlar. Transmembran ve shell bölgeleri arasındaki etkileşim ve allosterik kontrolden sorumlu olmasının yanında DHPR reseptörleri ile etkileşim kurarak kalsiyum regülasyonundan sorumlu olan EF-hand bölgesinin de bu kısım içerisinde yer alması bu domaini proteinin fonksiyonunda ve kontrolünde önemli bir yer yapmaktadır (Şekil 2.18b). Toplam mutasyon yükü bakımından gen üzerinden mutasyonların tekrar yükseldiği alanın core bölgesinde olduğu görülmektedir. Bu bölgenin ryanodin reseptör proteininin allosterik kontrolünden sorumlu çok sayıda proteinin bağlanma bölgesi olması buradaki mutasyonların hastalık yapma ihtimalini güçlendirmektedir. Yine core kısım içerisinde yer alan bölgelerin pore ve sitoplazmik domainlerle de bağlantılı olması bu bölgedeki mutasyonların  $Ca^{+2}$  salınımı ve proteinin SR üzerine konumlanmasında etkili olacağına vurgu yapmaktadır.

*RYR1* geninin kompleks üç boyutlu yapısı ve fonksiyonu missense mutasyonların hastalıkların oluşmasında neredeyse gen boyunca homojen bir dağılım sergilemesine neden olmuştur. Bu durum gen üzerinde mutasyon toleransının tüm gen boyunca aynı olduğuna işaret etmektedir. Zira missense mutasyonların proteinin sekonder, tersiyer, kuaterner yapısını kazanmasında ve fonksiyonunu gerçekleştirmesinde benzer oranda fonksiyon kayıplarına neden olduğunu gösterir niteliktedir. Arka planda farklı missense mutasyonlarda farklı nedenlerle fonksiyon kayıplarına neden olsa da hücresel seviyede sarkoplazma içerisindeki  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunu etkileyeceğinden tümü benzer bir fenotip yaratacak potansiyelde olduğundan benzer bir seçim baskısı altında olacaktır. Bu durumda böylesi homojen bir mutasyon dağılımına neden olacaktır.

*SEPNI*: Çalışmada *SEPNI* geninde toplamda 967 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 5 ve intron 10'da gözlenirken çerçeve kayması ve nonsense mutasyonlar 1, 4, 5, 9, 10 ve 11. ekzonlarda mutasyon yükünün yüksek olarak saptandı. Gen üzerinde 26.138.201., 26.138.264., (ikisi de ekzon 9'da yer

almaktadırlar.) 26.140.411. (ekzon 11), 26.142.098. (ekzon 13) ve 26.142.146. (ekzon 13) pozisyonların hotspot pozisyonlar olduğu gözlenirken, intronlarda 26.128.484. (intron 2), 26.131.609. (intron 3), 26.135.063. (intron 4), 26.138.160. (intron 8) ve 26.140.710. (intron 12) pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *SEPNI* geninde mutasyon yükünün orta (0.05) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 1010/18029) seviyede olduğu gözlemlendi.

Selenoprotein N proteini SERCA ile bağımlı şekilde çalışan endoplazmik retikulum proteinidir. Proteinin hem endoplazmik retikulum hem de sitozol kısımda belirli bölgeleri yer almaktadır. Endoplazmik retikulum içerisinde yer alan kısmı içerideki kalsiyum seviyesini kontrol etmekten sorumludur ve ekzon 2 içerisinde yer almaktadır. Bu ekzon kümeleme analizleri sonucunda ortalama mutasyon yüküne sahip II. küme içerisinde yer almaktadır. Bu ekzonda gerçekleşecek olan mutasyonlar sonucunda kalsiyum duyarlılığı bozulabilir ve endoplazmik retikulum içerisinde kalsiyum seviyesi korunamaz, kas kasılma süreci bittiğinde kalsiyumun endoplazmik retikuluma geri alınması sağlanamaz. Yine bu bölgede nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarının yoğun olarak görülmemesi proteinin önemli bölgelerinden birisi olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.60, Şekil 4.61).

Proteinin katalitik aktivitesinde sorumlu kısmının ekzon 10'da yer aldığı bilinmektedir. Literatürde ekzon 10 ve çevresindeki ekzonların korunumlu olduğu belirtilmektedir (Castets ve ark., 2012). Kümeleme analizleri bu bölgedeki mutasyon yükünün yüksek olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.62). Bu durum proteinin katalitik aktivitesini etkileyebilecek mutasyonların hastalık yapma ihtimalinin yüksek olması ile uyumludur.

Fan ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışma ekzon 1'in hotspot bölge olduğuna vurgu yaparken çalışmadan elde edilen sonuçlar bu bölgede çerçeve kaymasına mutasyonu dışında diğer mutasyon tiplerinde belirgin bir mutasyon yükü göstermemektedir. Toplam mutasyon yükü ile gerçekleştirilen kümeleme analizi ekzon 5'in hotspot ekzon olduğuna işaret etmektedir.

### 5.1.2.3. Miyofibriler Kuvvet

*ACTA1*: Çalışmada *ACTA1* geninde toplamda 378 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükünün ekzon 3’de ve intron 5’de olduğu gözlemlendi (Şekil 4.71). Gen üzerinde 229.567.495. pozisyon (ekzon 6) hotspot pozisyon olduğu gözlemlenirken, intronlarda 229.567.663. pozisyon (intron 5) hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca Diğer genlerle karşılaştırılınca *ACTA1* geninde mutasyon yükünün yüksek (0.16) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 469/2850) seviyede olduğu gözlemlendi.

*ACTA1* proteininin hücre içerisinde çok farklı fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında transkripsiyon faktörü, kromatin ipliklerin oluşması, endositoz, fagositoz, ameboid hareketler ve kas kasılması gelmektedir (Nicot ve ark., 2007). Aktin proteininin hücre içerisindeki bu çok fonksiyonu yapısı bu proteinin başta konjenital myopatiler olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili kılmaktadır. *ACTA1* genindeki mutasyonların konjenital lif tipi uyumsuzluğu ve nemalin myopati ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir (Cassandrini ve ark., 2017). G-aktinler F-aktinler haline gelerek kas liflerini oluştururlar. Proteinin bu formu alabilmesinde kofilin, profilin ve ATP gibi birçok molekül ve  $Ca^{+2}$  gibi iyonlar rol oynamaktadır. Bu durum konjenital myopati gibi çok genli kalıtım ile ortaya çıkan hastalıklar açısından dikkat çekicidir. Çünkü *ACTA1* geninde gözlenen mutasyon tolere edilebilse bile depolimerizasyon-polimerizasyon sürecinde rol oynayan kompakt proteinlerden birisinde gözlenen mutasyon proteinin G-aktinden F-aktin formuna dönüşmesine ket vurabilir. Bu polimerizasyonda aktif rol alan cofilin-2 (*CFL2*) proteininin de nemaline myopatiye yol açıyor olması bu durumu destekler niteliktedir. Her iki gendeki mutasyonların da kas biyopsisinde benzer hücre patolojileri ortaya çıkarması kas biyopsisinden yola çıkarak hastalığın genetik arka planına dair çıkarımlar yapmayı zorlaştırmaktadır. Aktin proteininin aktif dinamik yapısı ve çok sayıda fonksiyonel ve sinyal iletim yollarında görev alması molekül üzerinde çok sayıda allosterik kontrol noktasının varlığına da işaret etmektedir. Bu durum gen üzerinde herhangi bir yerde gözlenecek missense, nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarının protein-protein etkileşimlerini olumsuz etkileyeceği riskini kuvvetlendirmektedir.

İnsanda 6 çeşit bulunan aktin izoformları N-terminal bölgedeki birkaç aminoasit farklılığı ile birbirlerinden ayrılmaktadır (Dominguez ve Holmes, 2011). N-terminal bölgeye yakın kısımlarda gözlenen farklılıkların izoformların karakteristik özelliklerini belirlemede etkili olması nedeniyle bu bölgede yer alan mutasyonların myopatilerin gözlenmesinde önemli rol oynaması olasıdır. Elde edilen verilerde hotspot olarak belirlenen ekzon 3 bu bakımdan *ACTA1* geni ile ilişkili myopatilerin taranmasında önemli bir hedef bölge olması olasıdır. Öte yandan hücrelerde mevcut *ACTA* izoformlarının yeri geldiğinde birbirinin yerine kullanılabilme potansiyeli N-terminal bölgeye yakın ekzonlardaki missense mutasyonların ölümcül olmayan ancak hastalık yapma potansiyeli yüksek mutasyonlar olduğuna işaret etmektedir (Marston, 2018). Laing ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada bu çıkarıma benzer bir duruma işaret etmektedir.

**MYH7:** Çalışmada *MYH7* geninde toplamda 2758 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 35 ve intron 37'de gözlenirken nonsense ve çerçeve kaymasında sırası ile 4 ve 28. ekzonlarda mutasyon yükünün en yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.80). Gen üzerinde ekzonlarda 23.902.759. (ekzon 3), 23.901.954. (ekzon 5), 23.888.756. (ekzon 28), 23.884.925. (ekzon 35) ve 23.884.305. (ekzon 37) pozisyonların hotspot noktalar olduğu gözlenirken, intronlarda 23.901.105. (intron 6), 23.899.745. (intron 11), 23.898.407. (intron 13) ve 23.886.063. (intron 33) pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *MYH7* geninde mutasyon yükünün yüksek (0.12) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 2795/22921) seviyede olduğu gözlemlendi.

Miyozin proteini globüler baş ve lineer yapıda kuyruk kısımdan oluşan fonksiyonel bir proteindir. Baş kısmı enzimatik aktivitelere sahip bir motor protein görevi görürken kuyruk kısmı yapısal olarak proteinin sabitlenmesinde görev alır (Şekil 2.26). Proteinin N-terminal kısmında ATP ve aktin bağlanma bölgeleri yer alırken, C-terminal kısmında titin proteini ve M bandı ile bağlantı kurmasını sağlayan bölgeler bulunmaktadır. N-terminal kısımdaki mutasyonlar ATP'nin ve aktinin bu bölgeye bağlanmasını engelleyebilmesi yanında proteinin ATPaz aktivitesini de etkileyeceğinden proteinin kuvvet oluşturma kapasitesini etkileyecektir. Kümeleme analizleri genelde bu bölgedeki ekzonların düşük



mutasyon yüküne sahip olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.80). Literatürde bu bölgedeki mutasyonların genelde kalp hastalıkları ile ilişkilendirildiği görülmektedir (Ravenscroft ve ark., 2015). Bu durum bu bölgedeki mutasyonların tolere edilme düzeyinin düşük olmasına bağlı olarak yeterli veri elde edilememesinden kaynaklı olabilir. Çerçeve kayması ve nonsense mutasyonlarının da kümeleme analizleri sonuçlarında genin 3' bölgelerinde daha çok yoğunlaştığını görmek bu durumu desteklemektedir. Genin 5' baş kısmında görülebilecek nonsense ve çerçeve kayması gibi yıkıcı mutasyonlar organizmanın hayatını önemli derecede tehdit edeceği için embriyonel gelişim ya da fetal evrede gelişimin sonlanması olasıdır.

Tüm mutasyonlar ile gerçekleştirilen kümeleme analizleri iki kümenin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.80). Mutasyon yükünün çoğunlukla miyozin proteinin C-terminal bölgede yer alan kuyruk kısmında titin proteini, M bandı ve diğer miyozin kuyruklar ile bağlantıların kurulduğu bölgede yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.80). Miyozin proteinin kuyruk kısmı basit lineer yapıda olup, sarkomer içerisinde miyozin başlar için sabitlenme ve güç aktarım noktası sağlayan kısımdır. Dolayısıyla burada gerçekleşecek olan mutasyonlar miyozinin, titin ve M bandı ile bağlantısını koparacak ve sarkomerde kasılma mekaniğini bozacaktır.

Literatürde genelde gen üzerindeki mutasyonların baş bölgesinde yoğunlaştığından bahsedilse de çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarda genin coiled-coil adı verilen kuyruk kısmında daha fazla yoğunlaştığı görülmektedir (Cullup ve ark., 2012) (Şekil 4.80). Elde edilen bu sonuç hücrede hareketten sorumlu tek ve yegane molekül olan miyozinde motor özelliği gösteren baş ve boyun kısımdaki mutasyonların hayati fonksiyon kayıplarına neden olması dolayısıyla tolere edilemeyeceği görüşü ile de uyumludur. Dolayısıyla kuyruk kısımda olası mutasyonların tolere edilebilmesi nedeniyle ve bunların kas zayıflıkları şeklinde kendini hastalarda göstermesi bölgede yoğun mutasyonların gözlenmesi ile uyumludur.

Genin baş ve kuyruk arası bağlantısının kurulmasında boyun yani S2 fragmenti görev almaktadır (Şekil 2.26). Bu bölgede gerçekleşen mutasyonların S1 ve LMM bölgesi arasındaki bağlantının kopmasına yol açarak proteinin

işlevselliğinin kaybı ile sonuçlanabilir. Kümeleme analizleri ile bu bölgede yer alan ekzonların genelde mutasyon yükünün fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, bu bölgedeki mutasyonların yıkıcı ve hastalık yapıcı etkisinin fazla olmasından kaynaklı olabilir.

Hem globüler hem de filamentöz protein özelliklerine sahip olması ile de dikkat çeken *MHY7* hem kalpte hem de iskelet kaslarında ifade edilmesi bu gende meydana gelecek mutasyonların kalp ve iskelet kasları ile ilişkili hastalıklarda genetik temelli klinik taramalarda dikkate alınması gerekmektedir.

*TPM2* ve *TPM3*: Çalışmada *TPM2* ( $\beta$ -tropomiyozin) geninde toplamda 578 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 1 ve intron 6 iken nonsense mutasyonlarda ekzon 1 ve 2, çerçeve kayması mutasyonlarından 1. ekzonda mutasyon yükünün en yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.89). Gen üzerinde 35.685.661. (ekzon 3) pozisyonun hotspot pozisyon olduğu gözlenirken, intronlarda 35.684.822., 35.684.825., 35.684.824. (üçü de intron 6'da yer almaktadırlar.), 35.683.247., 35.683.240. (ikisi de intron 9'da yer almaktadır), pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *TPM2* geninde mutasyon yükünün yüksek (0.09) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 734/8064) seviyede olduğu gözlemlendi.

*TPM3* ( $\alpha$ -tropomiyozin yavaş) geninde ise toplamda 565 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 3, intron 4'de gözlenirken çerçeve kayması ve nonsense mutasyonlarda ise 4, 6, 7, 12, 13 ve 2. ekzonlarda mutasyon yükünün en yüksek olduğu olarak gözlemlendi (Şekil 4.98). Gen üzerinde 154.191.195. (ekzon 2) pozisyonunun hotspot pozisyonlar olduğu gözlenirken, intronlarda 154.191.330. (intron 1) pozisyon hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *TPM3* geninde mutasyon yükünün düşük (0.01) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 674/36793) seviyede olduğu gözlemlendi.

Tropomiyozin aktin üzerinde troponin, nebulin ve aktin molekülleri ile bağlantılı bir şekilde aktinlere sarılı lineer yapıda proteindir. İnce filamentlerin yapısal ve fonksiyonel stabilitesinde önemli rol oynayan tropomiyozin, aktin-miyozin etkileşiminde kilit rol oynar (Hitchcock DeGregori ve ark., 2010). Ortamda

Ca<sup>+2</sup> varlığında troponin-C'ye kalsiyumun bağlanması ile birlikte aktin üzerinde kayarak miyozin bağlanma bölgelerinin açılmasını sağlayarak miyozin ile aktin arasında çapraz köprü bağların oluşmasını ve aktomiyozin kompleksinin oluşmasını sağlar. Bu nedenle *TPM2* ve *TPM3* genlerindeki mutasyonlar kas kasılma mekanizmasında anomalilere neden olabilecek potansiyeldedir. *TPM2*'nin hem hızlı hem de yavaş iskelet kaslarında ifade edilirken, *TPM3*'ün yalnızca yavaş iskelet kaslarında ifade edilmesi bu mutasyonların farklı kas tiplerini etkilemesine neden olmaktadır.

*TPM2* ve *TPM3* genlerinde heterojen bir mutasyon yük dağılımı olduğu görülmektedir (Şekil 4.89 ve Şekil 4.98). *TPM2* geninde missense mutasyonlarda özellikle ekzon 1' den başlayıp 5'e doğru belirgin bir ritimle azalan bir mutasyon yükü olduğu görülmektedir (Şekil 4.85). Özellikle C-terminal bölgede mutasyonların genel olarak yüksek seyrettiği ancak ekzon 10'da belirgin bir mutasyon soğuk bölge varlığı görülmektedir. Bu bakımdan ekzon 5 ve 10 gen üzerinde mutasyon yükündeki azlık bakımından en dikkat çekici ekzonlardır. Bunun yanında ekzon 1, 6, 9 ve 11'de mutasyon yükünün fazla olduğu görülmektedir. *TPM3* geninde ise *TPM2* genine göre nispeten daha homojen bir missense mutasyon yükü görülmektedir (Şekil 4.85, Şekil 4.94). Gen üzerinde C-terminal bölgeye doğru artan bir mutasyon yükü görünmekte ve *TPM2* geninde olduğu gibi bu gende de C-terminal bölgede mutasyon soğuk bölge görülmektedir (ekzon 12). Gen üzerinde özellikle N-terminal bölgeye yakın yer alan ekzon 3 hotspot bölge olarak yer almaktadır. Tropomiyozin proteinleri N-terminal uçtan C-terminal uca doğru a-b-c-d-e-f-g motifinin tekrar etmesi ile oluşan heptapeptit tekrarlarından oluşan basit yapıli lineer proteinlerdir (Mason ve ark., 2008). *TPM2* ve *TPM3* genlerinde görülen nispeten homojen missense mutasyon yükleri proteinin basit yapısından ve telafi edici tekrar dizilerden kaynaklanıyor olabilir. Bu genlerde saptanan düşük mutasyon yoğunlukları da buna işaret ediyor olabilir. Protein üzerinde N ve C-terminal bölgelere yakın ekzonlarda missense mutasyonların yoğunlaşması tropomiyozin birimlerin bu bölgelerden birbirlerine ve diğer proteinlere (aktin, troponinler ve nebulin gibi) bağlanması ile ilişkili olabilir.

*TPM2* ve *TPM3* genlerindeki nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarının yoğun olarak N-terminal kısımda yer aldığı görülmekte (Şekil 4.87, Şekil 4.88 ve

Şekil 4.96, Şekil 4.97). Yıkıcılığı fazla olan bu mutasyonların genin başlatma kodonuna yakın yer alması hastalıkların ortaya çıkması ile doğrudan ilişkilidir. Bu genlerde de başlarda yoğun nonsense ve çerçeve kayması mutasyonu görülmesi, proteinin yapısının herhangi bir durumdan ötürü bozulması durumunda devreye başka mekanizmaların gireceğini kanıtlar niteliktedir. Bu bakımdan genin izoformlarının olması, diploitlik, çok kopyalılık nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarını tolere eden başlıca mekanizmalardır. Ancak bu mekanizmalarında yetersiz olması kişide hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

*TNNT1*: Çalışmada *TNNT1* geninde toplamda 784 mutasyon saptandı. En yüksek mutasyon yükü ekzon 12 ve intron 6 gözlenirken çerçeve kayması ve nonsense mutasyonlar sırası ile 2 ve 11, 12. ekzonlarda mutasyon yükünün en yüksek olduğu saptandı. Ekzonlarda aynı pozisyonda 2 mutasyondan fazlası görülmezken, intronlarda 55.658.008. (intron 4), 55.653.361. (intron 6), 55.652.527. (intron 8), 55.648.589. (intron 10), 55.648.459. (intron 11), 55.645.328., 55.645.300., 55.645.336. (3'ü de intron 12'de yer almaktadır.) pozisyonlar hotspot olarak belirlendi. Diğer genlerle karşılaştırılınca *TNNT1* geninde mutasyon yükünün orta (0.05) (mutasyon sayısı/gen uzunluğu: 884/16509) seviyede olduğu gözlemlendi.

Troponin kompleksinin bir parçası olan ve kas kasılması sırasında kalsiyum reseptörü olarak görev yapan troponin T1 ve T2 olarak adlandırılan iki alt birimden oluşur (Şekil 2.31). T1 bölgesi içerisinde yer alan 7., 8. ve 9. ekzonlar tropomiyozin-bağlanma bölgesi 1'i oluşturmaktadır. C-terminal bölgede yakın yer alan T2 alt-birimi troponin I'nın N-terminal bölgesi ile sarmal bobin yapısı oluşturmaktadır. Gen üzerinde missense mutasyon yüküne bakıldığında korunumlu bölgeler olarak adlandırılan ekzon 7 ve 14 arasında yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.103). Bu bölge tüm izoformlarda genelde aynı olmakla birlikte milyonlarca yıldır aminoasit dizileri değişmeden kalmıştır (Ohtsuki ve Morimoto 2008; Wei ve Jin 2016). Bu bölge içerisinde tropomiyozin bağlanma bölgesi 2, ekzon 11'de TnI bağlanma bölgesi ekzon 12 ve 13'te ve TnC bağlanma bölgesi ise yine ekzon 13'de yer almaktadır (Şekil 2.31). Missense mutasyonların özellikle ekzon 11 ve 12 de pik yaptığı ekzon 13 de ise ani bir düşüş sergilediği görülmektedir (Şekil 4.103). Bu durum konjenital myopatilerin ortaya çıkmasında T2 bölgesindeki korunmuş

alandaki mutasyonların oldukça etkili olduğuna işaret etmektedir. Yüksek mutasyon yüküne sahip olan ekzonlardan 8 ve 11 tropomiyozin bağlanma bölgesi 1 ve 2 içerisinde yer almaktadır ve bu bölgedeki mutasyon tropomiyozin ve troponin-T bağlantısını keserek troponin kompleksinin tropomiyozin ile olan etkileşimini engelleyebilir. Bu mutasyon yoğun bölgeler diğer proteinlerdeki mutasyon sıcak noktalarla uyumlu olarak hastalığın ortaya çıkmasından protein-protein etkileşim alanlarının önemine işaret etmektedir. N-terminal bölgede ise missense mutasyon yükünün genin geri kalanına göre düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.103). İlk 6 ekzondaki değişiklikler farklı izoformların ortaya çıkmasından sorumlu olup yoğun alternatif eklemelerin gerçekleştiği bölgelerdir. Burada gözlenen missense mutasyonların azlığı yüksek letalite özelliklerine bağlı olarak az görülmelerinden kaynaklanabileceği gibi izoformların birbiri yerini almasından kaynaklı mutasyon tolere edici etkisinden kaynaklanabilir. Her iki durumda etkisinin anlaşılması için proteinle ilgili daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlarının gen üzerinde az sayıda gözlemlendiği görülürken çerçeve kaymasında N-terminal bölgede, nonsense ise C-terminal bölgede yoğunlaşmasının olduğu görülmektedir (Şekil 4.105, Şekil 4.106). Yıkıcı olan bu mutasyonların azlığı büyük oranda letaliteden kaynaklanması olasıdır. Bunun yanında mutasyon yoğunluğunun yüksek olduğu yerlerin letalitenin düşük olduğu pozisyonlar olması olasıdır.

## 5.2. Mutasyon Yükleri

Bu tez çalışmasında konjenital myopatilerden sorumlu olan majör 13 gen üzerinde toplamda 30461 missense, 15694 sinonim, 626 nonsense, 1257 çerçeve kayması ve intronlara ait 22881 mutasyon edildi. Genlere dair elde edilen bu mutasyonlar istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek genler üzerindeki mutasyon yoğun alanlar ve hotspot bölgeler tanımlamaya çalışıldı.

Elde edilen verilerde tüm genlerde sinonim mutasyonlar dikkate alınmadığında ekzonlar üzerinde missense mutasyon yükünün diğer mutasyonlara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum verilerin ağırlıklı olarak hasta

bireylerden elde edilmesinden kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan bazı missense mutasyonların aminoasitlerde değişim yaratsa bile protein ve reaksiyon plastisitesinden kaynaklı nötrale yakın etkileri yine bu mutasyonun çok gözlenmesine neden olmuş olabilir. Bunun yanı sıra nonsense ve çerçeve kayması mutasyon sayısının diğer mutasyon tiplerine göre daha az gözlenmesi, bu mutasyonların şiddetli ve letal prognozlara neden olma potansiyelinin olmasından kaynaklanabilir. Çalışılan genler üzerinde ekzonlardan toplamda 48038 mutasyon gözlenirken, intronlarda 22881 mutasyon saptandı. Ekzon bölgelerinde mutasyon yükünün fazla olması intron bölgelerindeki mutasyonların büyük oranda nötral olma ihtimalinden kaynaklanıyor olabilir (Kimura, 1997).

Çalışma kapsamından analizlerle ile genler üzerinde missense mutasyon yükünün fazla olduğu pozisyonlar, ekzonlar ve intronlar hotspot bölgeler olarak tanımlandı (Tablo 5.1). Bu durum missense mutasyonlar için söz konusuysen bu mutasyonların hastalık yapıcı etkileri amino asit değişimlerinin nötral olma olasılıkları, proteinlerin katlanma ve yolakların fonksiyonel plastisitesi nedeniyle net değildir (Klug ve Cummings, 2003). Bu nedenle hotspot bölgeler tanımlanırken bu bölgelerin proteinlerin fonksiyonlarındaki görevleri de dikkate alındı. Çerçeve kayması (indel) ve stop kodonu oluşturan nonsense mutasyonların yarattıkları trunkat proteinlerden dolayı hastalık yapma ihtimalleri ve bunun şiddetinin daha fazla olması yüksek ihtimaldir (Marra ve ark., 2015; Van der Pol ve ark., 2014; Choi ve ark., 2012). Özellikle bu mutasyonların proteinin N-terminal bölgesine yakın olması mutasyon etkisini daha da arttırması olasıdır (Phadke, 2019). Tez kapsamında nonsense ve indel mutasyonlara bağlı hotspot bölgeler belirlenirken mutasyon frekansı yanı sıra pozisyon etkisi daha ön plana çıkarıldı. Örneğin *NEB* geninde nonsense ve çerçeve kayması mutasyonların N-terminal bölgeye yakın olması kısa nebulin proteinlerin oluşturmaya neden olarak aktin filamentlerin yeterli uzunluğa ulaşamamasına ve yapısal olarak şekillerini koruyamamalarına neden olacaktır. Bu durum sarkomer içerisinde rod cisimciklerine neden olurken şiddetli prognozlar gözlenmesine yol açar.

Literatürden ve veri tabanlarından toplanan verilerin en yoğun olduğu genlerin *ACTA1*, *TTN* ve *MYH7* olduğu görülmektedir. Bu üç gende meydana gelen

mutasyonlar konjenital myopatilerin yanı sıra kalp hastalıklarına da yol açması nedeniyle literatürdeki veri birikiminin fazla olması olasıdır. Öte yandan elde edilen veriler arasında en büyük payı *ACTA1* geninin alması da bu genin küçük olmasından dolayı konvensiyonel sekanslama yöntemleri ile de kolayca çalışılabilir olmasının da payı vardır. Bunun yanında elde edilen verilerde sekanslama zorluklarından ve çeşitli yönelimlerden kaynaklanan az mutasyon verisi elde edilme olasılığı olan bölgelerde vardır. Bunlar arasında yüksek derecede motif tekrarı içeren bölgeler, alternatif eklemeye bağlı bazı ekzonların cDNA’da az sekanslanması, genlerde belirli hedef bölgelerin yoğun sekanslanması, bazı mutasyonların yüksek letal etkisi (embriyonel gelişimde spontan abortusa neden olması nedeniyle) nedeniyle hiç rastlanılmaması ve genlerin büyüklükleri bunda etkili olabilir. Örneğin *TTN* geninde literatürde genin M bölgesi iki yarım sarkomerin birleşme noktasında yer almaktadır ve bu kritik öneminden dolayı bu bölgedeki yapılan çalışmaların çok daha fazla olduğu yer almaktadır (Ge ve ark., 2019). Elimizdeki verilerde de bu bölgede yer alan mutasyonlar oldukça fazladır bu durum literatürde söylendiği gibi bu bölgenin çok daha fazla çalışılıyor olmasından kaynaklı olabilir.

### **5.3. Mutasyonların Protein Yapı ve Fonksiyonuna Etkisi**

Çalışılan mutasyonların genelde tüm gen boyunca heterojen şekilde dağıldığı fakat çoğunda protein-protein etkileşiminde temel rol oynayan C-terminal kısımda bulunan allosterik kontrolden sorumlu domainlerde yoğunlaştığı tespit edildi. Proteinlerin allosterik domainlerinde gerçekleşen mutasyonlar proteinlerin inhibitör ve aktivatörler ile iletişimini etkileyerek hücredeki metabolik yolların işleyişini bozabilmektedir (Klug ve Cummings, 2003). Mutasyonların hasta bireylerden elde edilmesi ve bu bölgelerde yoğunlaşması protein-protein etkileşimleri ve allosterik kontrolün hücrenin metabolik süreçlerindeki önemine dikkati çekmektedir. Öte yandan çalışılan genlerin tümünde proteinlerin üç boyutlu yapısını etkileyebilecek mutasyonların olduğu görülmektedir. Özellikle missense mutasyonların bazıları, nonsense ve çerçeve kayması mutasyonları proteinlerin katlanma kinetiklerini etkileyerek konfigürasyon ve konformasyonlarında farklılıklara neden olabilirler (Feng ve Marston, 2009). Bu durum yapısal ve fonksiyonel proteinlerin işlevsel olan üç boyutlu yapılarını kazanamamalarına neden olur (Clarkson ve ark., 2004).

Bunların yanı sıra *BIN1*, *DNM2*, *MTM1* genlerinde substrat bağlanma ve katalitik kısımlarında mutasyonlar tespit edildi. Bu durum ise fonksiyonel işlev gören proteinlerin kas kasılması ve sinyal iletimi sırasında işlevselliğini kaybetmelerine ya da fonksiyon yetersizliğine neden olabilir (Fusto ve ark., 2022). Bu anormal proteinler sarkomer içerisinde diğer proteinler ile iletişimin kesilmesi, tam olarak görev yapacakları yerlere yerleşememeleri ve fonksiyonlarını kazanamamaları nedeniyle hücre içerisinde birikerek sarkomerdeki yapısal ve işlevsel süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır (Gonzalez Jamett ve ark., 2018).

Öte yandan genlerdeki nötral olmayan missense mutasyonlar proteinlerin post-transkripsiyonel modifikasyonlarını etkileyerek onlarda yapısal fonksiyon bozukluklarına neden olabilir.

#### **5.4. Mutasyon Toleransı**

Çalışmada kapsamında literatürde en fazla missense ve sinonim mutasyonlara rastlanırken en az nonsense ve çerçeve kayması mutasyonlar gözlemlendi. Bu durum nonsense ve çerçeve kayması mutasyonların yaratmış olduğu yıkıcı protein defektlerinin sonucu olarak bu mutasyonları taşıyan bireylerde ortaya çıkan yüksek seçim baskısından kaynaklanabilir. Bu seçim muhtemelen embriyonel gelişim ilk evrelerinde ya da fetal gelişim sürecinde spontan abortuslarla kendini gösterdiğinden bu mutasyonlara yoğun olarak rastlanmamaktadır.

Öte yandan proteinlerin kendilerine özgü yapıları bazı yoğun mutasyonların kompanse edilmesine de olanak sağlayabilir. Örneğin *NEB* ve *TTN* gibi basit ve tekrarlı dizileri gibi yüksek derece tekrar motifler içermesi genlerde bu durumun benzerliğe bağlı telafi edilmesine neden olabilir (Laitila ve ark., 2019; Trinick ve ark., 1994). Ayrıca bu yapısal proteinlerin basit konformasyonel yapıları ve allosterik kısımların olmaması da mutasyon toleransında etkili olabilir. Bunların yanında özellikle missense mutasyonların bazılarının nötral olması, nonsense ve indel mutasyonların kör noktalarda (protein katlanması ve fonksiyonunda etkili olmayan pozisyonlar) ve C-terminal bölgeye yakın olması yine mutasyon toleransını sağlayabilecek durumlardır (Pelin ve ark., 1999).



### 5.5. Alternatif Eklemenin Etkisi

Çalışılan genlerin büyük bir kısmının alternatif eklemeye bağlı olarak çok sayıda izoform bulunmaktadır ve bu durum mevcut mutasyonların hastalık oluşturma potansiyelini zamansal ve mekansal olarak değiştirebilmektedir (Ottenheim ve ark., 2009). Ekzonlarda gözlenen mutasyonlar, alternatif eklemeye bağlı olarak hangi izoformlarda bulundukları, gelişim sürecinin hangi evresinde sentezlendiklerine ve kalıtım şekline bağlı olarak (dominant resesif) hastalığın görülme yaşını ve şiddetini de etkileyebilmektedir (Su ve ark., 2022).

### 5.6. Konjenital Myopatilerin Poligenik Doğası ve Pleiotropik Etkisi

İnsanda fenotipik karakterlerin ortaya çıkmasında çoğunlukla poligenik bir etkileşim söz konusudur (Rosenberg ve ark., 2019). Bu durum hastalıklar içinde geçerlidir. İnsanda kanser de dahil birçok hastalıkta çok sayıda genin birlikte etkisi olduğu bilinmektedir (Shin ve ark., 2020). Konjenital myopatilerde de durum benzerdir. Örneğin nemalin myopatili hastada aynı zamanda hem *NEB* geninde hem de *RYR1* geninde mutasyonlar gözlenmiştir (Cassandrini ve ark., 2017). Aynı hastada birden fazla gende mutasyon gözlenmesi bu hastalıkların doğasında poligenik bir yapının olduğuna işaret etmektedir. Bunun yanında hastalıklardan sorumlu genlerin uzun oluşu ve çok sayıda ekzona sahip olmaları her iki ebeveyninden alınan genlerde farklı pozisyonlardan çok sayıda mutasyonun olmasından kaynaklı durumlara da işaret etmektedir. (Wilmschurst ve ark., 2010). Özellikle *NEB*, *TTN*, *RYR1* gibi uzun genlerde ekzon sayısının fazla, mutasyon yükünün ise yüksek olması hastalıklarda birleşik heterozigotluk (compound heterozygote) durumunun olduğunu göstermektedir (Wunderlich ve ark., 2018).

Poligenik kalıtım dışında *RYR1*, *DNM2*, *ACTA1*, *MYH7*, *TTN* gibi genlerin birden fazla konjenital myopati tipinde hatta myopatiler dışında farklı hastalıklar da etkili olması pleiotropik etkileşimlere dikkati çekmektedir (Şekil 2.5). Tez kapsamında elde edilen sonuçlar hem poligenik hem de pleiotropik etkileşimlere dikkat çeken bir şekilde mutasyonların özellikle allosterik kontrolden sorumlu bölgelerde yoğunlaştığına işaret etmektedir. Bu durum özellikle birçok proteinin

allosterik kontrolünden sorumlu olan bir genin farklı hastalık tiplerinin oluşumunda da rol oynayabileceğine işaret eder niteliktedir. Çalışılan genler içerisinde özellikle *ACTA1* geni hücre içerinde transkripsiyon faktörü olmak da dahil birçok biyokimyasal reaksiyonda sinyal ve regülatör protein olarak görev yapmaktadır (Clarkson ve ark., 2004). Örneğin *TTN* geninde 359. ekzon tarafından kodlanan TK domaini hücreler arası sinyalden sorumlu birçok protein için bağlanma bölgeleri barındırmaktadır. Bu ekzonda meydana gelen mutasyonların yalnızca myopati ya da kardiyomyopati dışında daha başka hastalıklarla da ilişkili olması muhtemeldir.



**Tablo 5.1.** Çalışılan 13 gende saptanan hotspot bölge, pozisyonlar ve protein üzerindeki olası etki mekanizmaları

| Genetik Taramalar İçin Yüksek Potansiyel Alanlar |                                                               |                                        |                                                           |                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GENLER                                           | Hotspot Ekzonlar                                              | Protein Üzerinde Bulundukları Bölgeler | Olası Etki Mekanizmaları                                  | Hotspot Pozisyonlar                                                                                                                                                  |
| <i>ACTA1</i>                                     | 3                                                             | -                                      | -                                                         | 229.567.495<br>229.567.663                                                                                                                                           |
| <i>NEB</i>                                       | 30-81                                                         | Süper Tekrar Bölgesi Ser SH3           | Tropomiyozin ve diğer kontraktıl proteinler ile etkileşim | 152.567.035<br>152.474.001<br>152.402.515                                                                                                                            |
| <i>MTM1</i>                                      | 8-15                                                          | RID PTP<br>SID CC                      | Sinyal iletimi ve protein etkileşimi                      | -<br>23.902.759<br>23.901.954<br>23.888.756                                                                                                                          |
| <i>MYH7</i>                                      | 30-34-35-37                                                   | LMM                                    | Myomesin, titin ve miyozin etkileşimi                     | 23.884.925<br>23.884.305<br>23.901.105<br>23.899.745<br>23.898.407<br>23.886.063                                                                                     |
| <i>DNM2</i>                                      | 20-21                                                         | GED PRD                                | Protein etkileşimi                                        | 10.893.725<br>10.941.640<br>10.941.635<br>10.941.616<br>10.941.617<br>10.941.624<br>10.941.605<br>10.941.604                                                         |
| <i>RYR1</i>                                      | 2-10-12-20-21-24-28-34-39-42-44-48-49-53-65-66-70-71-75-83-92 | Core ve Pore                           | Proteinin bölgeleri arası bağlantı ve sinyal iletimi      | 38.976.634<br>39.055.762<br>39.057.592<br>38.993.391<br>38.993.414<br>39.051.680<br>38.993.432<br>38.993.436<br>38.993.438<br>38.993.442<br>38.993.450<br>38.993.454 |

| Genetik Taramalar İçin Yüksek Potansiyel Alanlar (devam) |                                                                                                                       |                       |                                                    |             |  |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|-------------|--|
| <b>TPM2</b>                                              | 1-2-3                                                                                                                 | -                     | Aktin bağlantısı (?)                               | 35.685.661  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 35.684.825  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 35.683.247  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 35.683.240  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 35.684.824  |  |
| <b>TPM3</b>                                              | 3                                                                                                                     | -                     | Aktin bağlantısı (?)                               | 154.191.195 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 154.191.330 |  |
| <b>TNNT1</b>                                             | 8-11-12                                                                                                               | T1 VE T2              | Tropomiyozin ve troponin-I bağlantısı              | 55.652.527  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.645.328  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.658.008  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.653.361  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.648.589  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.648.459  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.645.300  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 55.645.336  |  |
| <b>CFL2</b>                                              | 2                                                                                                                     | -                     | Sinyal iletimi (?)                                 | 35.182.131  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 35.182.348  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 35.182.223  |  |
| <b>SEPNI</b>                                             | 5-9-13                                                                                                                | -                     | -                                                  | 26.138.201  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 26.138.264  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 26.140.411  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 26.142.098  |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 26.142.146  |  |
| <b>BINI</b>                                              | 12-20                                                                                                                 | CLAP MBD SH3          | Transkripsiyon ve taşıma                           | 127.828.158 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 127.811.027 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 127.808.684 |  |
| <b>TTN</b>                                               | 2-126-169-170-171-172-198-201-230-235-240-242-244-245-250-256-261-264-269-282-287-294-320-322-324-328-347-352-354-357 | Distal IG PEVK IG-FN3 | Titin-miyozin etkileşimi ve proteinin elastikiyeti | 179.495.668 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 179.611.899 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 179.578.108 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 179.563.643 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 179.542.062 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    | 179.511.767 |  |
|                                                          |                                                                                                                       |                       |                                                    |             |  |

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Konjenital myopatiler sarkomerik proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan kas iskelet sistemi hastalıklarıdır. Sarkomerik proteinlerde gözlenen bu aksaklıklardan kaynaklı ortaya çıkan 20'den fazla hastalık belirtilmiştir. Bu proteinlerin yapısı oldukça karmaşık olmakla birlikte moleküler mekanizmaları halen tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada literatür ve veri tabanlarındaki genlere ait mutasyonlar taranarak konjenital myopatilerden sorumlu majör 13 gen için klinik tanılama ve tedavi yöntemlerinde non-invaziv bir yaklaşım olarak genetik testler için kullanılacak hedef bölgeler ortaya konulmaya çalışıldı. Çalışmada literatür verisine dayandığı için çeşitli biaslar/yanlılıklar mevcuttur. Bunlar arasında genlerdeki bazı bölgelerin zor sekanslanması (motif tekrar bölgeleri), alternatif eklemeye bağlı bazı ekzonların cDNA'da az sekanslanması, genlerde belirli hedef bölgelerin yoğun sekanslanması, bazı mutasyonlara fetal gelişimde spontan abortusa neden olması nedeniyle hiç rastlanılmaması ve genlerin büyüklükleri bunlar arasında sayılabilir. Ancak yine mevcut veri hastalıkların oluşumu ve moleküler seviyede protein-gen-hastalık ilişkisini anlamaya yönelik kullanışlı sonuçlar sunmaktadır. Öte yandan verilerde yaş cinsiyet gibi bilgilerin olmaması genlerde mutasyona bağlı hastalık zamansallığının çıkarımına izin vermemektedir. Sınırlı da olsa hastalara ait fenotipik klinik verilerin olması mutasyonların fenotiple ilişkilendirilmesine yönelik çıkarımlar bulmaya olanak sağlamıştır.

Çalışmada her ne kadar 13 gen ele alınmış olsa da konjenital myopatilerden sorumlu sinyal yollarında yer alan proteinlerdeki bozukluklarında etkisi olması muhtemeldir. Sekanslama teknolojilerindeki gelişmeler özellikle uzun-sekanslama yöntemleri ile birlikte bu hastalığa sebep olan yeni genlerin ortaya çıkarılması ve bunlara ait dizilerin doğru bir şekilde elde edilmesi olasıdır. Dolayısıyla yakın gelecekte sekanslama teknolojilerindeki gelişmeler bu hastalıkların tespiti ve fenotipe olan etkilerinin saptanmasında hem klinik seviyede hem de araştırma sürecinde önemli bilgilerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Bu hastalıklardan sorumlu olan genlerin yalnızca bu tezde çalışılmış 13 genden daha fazlası olduğunu ve teknolojiye gelişmeler sayesinde sayısının giderek artacağı beklenmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile ortaya konan veriler konjenital myopatiler ile ilgili genetik verilerin en kapsamlı ve derlenmiş sonuçlarını içermektedir. Ortaya konulan sonuçların klinik aşamada klinik tanıların ve myopati alt-tiplendirmelerinin tanımlanabilmesi için bu hastalıktan sorumlu olduğu bilinen 13 gen kapsamında genetik tarama testleri için hedef bölgeleri ve pozisyonları gösterir niteliktedir.



## KAYNAKLAR

- Agrawal PB, Greenleaf RS, Tomczak KK, Lehtokari VL, Wallgren-Pettersson, Wallefeld W, ... & Beggs AH (2007).** Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the *CFL2* gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Hum. Mol. Genet.*, **80(1)**, 162-167.
- Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, ... & Guicheney P (2006).** A single homozygous point mutation in a 3' untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy. *EMBO Rep.*, **7(4)**, 450-454.
- Amodeo P, Fraternali F, Lesk AM, Pastore A (2001).** Modularity and homology: modelling of the titin type I modules and their interfaces. *J. Mol. Biol.*, **311(2)**, 283-296.
- Armel TZ, Leinwand LA (2009).** Mutations in the  $\beta$ -myosin rod cause myosin storage myopathy via multiple mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106(15)**, 6291-6296.
- Bamburg JR, Bernstein BW (2010).** Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol. Rep.*, **2**, 62.
- Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, ... & Labeit S (2001).** The complete gene sequence of titin, expression of an unusual 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ. Res.*, **89(11)**, 1065-1072.
- Barua B, Pamula MC, Hitchcock De Gregori SE (2011).** Evolutionarily conserved surface residues constitute actin binding sites of tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **108(25)**, 10150-10155.
- Bassett DI, Currie PD (2003).** The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum. Mol. Genet.*, **12(suppl\_2)**, 265-270.
- Batters C, Veigel C (2016).** Mechanics and activation of unconventional myosins. *Traffic*, **17(8)**, 860-871.
- Bearer EL (1993).** Role of actin polymerization in cell locomotion: molecules and models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **8**, 582-591.
- Beaufils M, Travard L, Rendu J, Marty I (2022).** Therapies for *RYR1*-Related Myopathies: Where We Stand and the Perspectives. *Curr. Pharm. Des.*, **28(1)**, 15-25.
- Begley MJ, Dixon JE (2005).** The structure and regulation of myotubularin phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15(6)**, 614-620.
- Begley MJ, Taylor GS, Kim SA, Veine DM, Dixon JE, Stuckey JA (2003).** Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, *MTMR2*: insights into

myotubular myopathy and Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Mol. Cell*, **12**(6), 1391-1402.

**Bennett PM, Gautel M (1996).** Titin domain patterns correlate with the axial disposition of myosin at the end of the thick filament. *J. Mol. Biol.*, **259**(5), 896-903.

**Bertini EMD, D'Amico A.M.D, Gualandi F, and Petrini, S. (2011).** Congenital Muscular Dystrophies: A Brief Review. *Semin. Pediatr. Neurol.*, **(18)** 277-288

**Blair E, Redwood C, de Jesus Oliveira M, Moolman-Smook JC, Brink P, Corfield VA, ... & Watkins H (2002).** Mutations of the light meromyosin domain of the  $\beta$ -myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.*, **90**(3), 263-269.

**Boda U, Vadapalli S, Calambur N, Nallari P (2009).** Novel mutations in beta-myosin heavy chain, actin and troponin-I genes associated with dilated cardiomyopathy in Indian population. *J. Genet.*, **88**(3), 373.

**Bong SM, Son KB, Yang SW, Park JW, Cho JW, Kim KT, ... & Lee BI (2016).** Crystal structure of human myotubularin-related protein 1 provides insight into the structural basis of substrate specificity. *PloS one*, **11**(3), e0152611.

**Bosco L, Leone D, Costa Comellas L, Monforte M, Pane M, Mercuri E, ... & Fattori F (2022).** Novel Splicing Mutation in MTM1 Leading to Two Abnormal Transcripts Causes Severe Myotubular Myopathy. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(18), 10274.

**Böhm J, Vasli N, Maurer M, Cowling B, Shelton GD, Kress W, ... & Laporte J (2013).** Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS genet.*, **9**(6), e1003430.

**Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF, & Mandel JL (2002).** The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**(23), 15060-15065.

**Cardinet GH III (1997).** Clinical biochemistry of domestic animals. In: JJ Kaneko, JW Harvey, ML Bruss (eds) Skeletal muscle function. Academic Press, San Diego, California, p: 651-671.

**Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci, J., ... & Santorelli, F. M. (2017).** Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Ital. J. Pediatr.*, **43**(1), 1-16.

**Castets P, Lescure A, Guicheney P, Allamand V (2012).** Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function. *J. Mol. Med.*, **90**(10), 1095-1107.

**Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, ... & Labeit S (2001).** Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.*, **306**(4), 717-726.



**Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, DeChene ET, Swanson LC, ... & Beggs AH (2013).** Recessive truncating titin gene, *TTN*, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology*, **81(14)**, 1205-1214.

**Chauveau C, Rowell J, Ferreira A (2014).** A rising titan: *TTN* review and mutation update. *Hum. Mut.*, **35(9)**, 1046-1059.

**Chen W, Kudryashev M (2020).** Structure of *RyR1* in native membranes. *EMBO Rep.*, **21**, e4989.

**Chernorudskiy A, Varone E, Colombo SF, Fumagalli S, Cagnotto A, Cattaneo A, ... & Zito E (2020).** Selenoprotein N is an endoplasmic reticulum calcium sensor that links luminal calcium levels to a redox activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **117(35)**, 21288-21298.

**Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012).** Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one*, **7**, e46688.

**Chu M, Gregorio CC, Pappas CT (2016).** Nebulin, a multi-functional giant. *J. Exp. Biol.*, **219(2)**, 146-152.

**Clarke NF (2011).** Congenital fiber-type disproportion. *Semin. Pediatr. Neurol.*, **18(4)**, 264-271.

**Clarke OB, Hendrickson WA (2016).** Structures of the colossal RyR1 calcium release channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **39**, 144-152.

**Clarkson E, Costa CF, Machesky LM (2004).** Congenital myopathies: diseases of the actin cytoskeleton. *J. Pathol.*, **204(4)**, 407-417.

**Colegrave M, Peckham M (2014).** Structural implications of  $\beta$ -cardiac myosin heavy chain mutations in human disease. *Anat. Rec.*, **297(9)**, 1670-1680.

**Conen PE, Murphy EG, Donohue WL (1963).** Light and electron microscopic studies of “myogranules” in a child with hypotonia and muscle weakness. *Can. Med. Assoc. J.*, **89(19)**, 983.

**Corbett MA, Anthony Akkari P, Domazetovska A, Cooper ST, North KN, Laing NG, ... & Hardeman EC (2005).** An  $\alpha$ tropomyosin mutation alters dimer preference in nemaline myopathy. *Ann. Neurol.*, **57(1)**, 42-49.

**Craig R, Woodhead JL (2006).** Structure and function of myosin filaments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16(2)**, 204-212.

**Cullup T, Lamont PJ, Cirak S, Damian MS, Wallefeld W, Gooding R, ... & Jungbluth H (2012).** Mutations in *MYH7* cause Multi-minicore Disease (MmD) with variable cardiac involvement. *Neuromuscul. Disord.*, **22(12)**, 1096-1104.

- Dabby R, Sadeh M, Gilad R, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Leshinsky-Silver E (2014).** Myotonia in *DNM2* related centronuclear myopathy. *J. Neural Transm.* **121**(5), 549-553.
- Dastgir J, Gonorazky HD, Strober JB, Chrestian N, Dowling JJ (2017).** Congenital Myopathies. In *Swaiman's Pediatric Neurology*, 1123-1130.
- De Haro Hernandez BJ, Macouzet-Sanchez C, Rodríguez-Balderrama I, de la O-Cavazos, ME (2015).** Congenital fiber-type disproportion myopathy: A case study. *Medicina universitaria*, **17**(66), 42-45.
- Des Georges A, Clarke OB, Zalk R, Yuan Q, Condon KJ, Grassucci RA, ... & Frank J (2016).** Structural basis for gating and activation of *RyR1*. *Cell*, **167**(1), 145-157.
- Dilaver N, Mazaheri N, Maroofian R, Zeighami J, Seifi T, Zamani M, ... & Galehdari H (2018).** Novel homozygous missense mutation in *RYR1* leads to severe congenital ptosis, ophthalmoplegia, and scoliosis in the absence of myopathy. *Mol. Syndromol.*, **9**(1), 25-29.
- Dominguez R, Holmes KC (2011).** Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.*, **40**, 169-186.
- Donner K, Sandbacka M, Lehtokari VL, Wallgren-Pettersson C, Pelin K (2004).** Complete genomic structure of the human nebulin gene and identification of alternatively spliced transcripts. *Eur. J. Hum. Genet.*, **12**(9), 744-751.
- Doran MH, Pavadai E, Rynkiewicz MJ, Walklate J, Bullitt E, Moore J R, ... & Lehman W (2020).** Cryo-EM and molecular docking shows myosin loop 4 contacts actin and tropomyosin on thin filaments. *Biophys. J.*, **119**(4), 821-830.
- Durieux AC, Prudhon B, Guicheney P, Bitoun M (2010).** Dynamin 2 and human diseases. *J. Mol. Med.*, **88**(4), 339-350.
- Dye DE, Azzarelli B, Goebel HH, Laing NG (2006).** Novel slow-skeletal myosin (*MYH7*) mutation in the original myosin storage myopathy kindred. *Neuromuscul. Disord.*, **16**(6), 357-360.
- Fan Y, Xu Z, Li X, Gao F, Guo E, Chang X, ... & Xiong H (2022).** Novel *SEPN1* Mutations in Exon 1 Are Common in Rigid Spine With Muscular Dystrophy Type 1 in Chinese Patients. *Front. Genet.*, **13**.
- Farah CS, Reinach FC (1995).** The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.*, **9**(9), 755-767.
- Fattori F, Fiorillo C, Rodolico C, Tasca G, Verardo M, Bellacchio E, ... & D'Amico A (2018).** Expanding the histopathological spectrum of *CFL2*-related myopathies. *Clin. Genet.*, **93**(6), 1234-1239.

**Feng JJ, Marston S (2009).** Genotype-phenotype correlations in *ACTA1* mutations that cause congenital myopathies. *Neuromuscul. Disord.*, **19(1)**, 6-16.

**Fernandez-Marmiesse A, Carrascosa-Romero MC, Ponce BA, Nascimento A, Ortez C, Romero N, ... & Couce ML (2017).** Homozygous truncating mutation in prenatally expressed skeletal isoform of *TTN* gene results in arthrogryposis multiplex congenita and myopathy without cardiac involvement. *Neuromuscul. Disord.*, **27(2)**, 188-192.

**Ferreiro A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bönnemann C, ... & Guicheney P (2002).** Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am. J. Hum. Genet.*, **71(4)**, 739-749.

**Filipe A, Chernorudskiy A, Arbogast S, Varone E, Villar-Quiles RN, Pozzer, D., ... & Ferreiro A (2021).** Defective endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and bioenergetics in *SEPN1* related myopathy. *Cell Death Differ.*, **28(1)**, 123-138.

**Finsterer J, Strobl W (2011).** Orthopaedic abnormalities in primary myopathies. *Acta Orthop. Belg.*, **77**, 563-582.

**Fiorillo C, Astrea G, Savarese M, Cassandrini D, Brisca G, Trucco F, ... & Bruno C (2016).** *MYH7*-related myopathies: clinical, histopathological and imaging findings in a cohort of Italian patients. *Orphanet J. Rare Dis.*, **11(1)**, 1-14.

**Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006).** New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103(10)**, 3681-3686.

**Fox MD, Carson VJ, Feng HZ, Lawlor MW, Gray JT, Brigatti KW, ... & Strauss K A (2018).** *TNNT1* nemaline myopathy: natural history and therapeutic frontier. *Hum. Mol. Genet.*, **27(18)**, 3272-3282.

**Franzini Armstrong C (1999).** The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J.*, **13(9002)**, 266-270.

**Freiburg A., Gautel M (1996).** A Molecular Map of the Interactions between Titin and Myosin-Binding Protein C: Implications for Sarcomeric Assembly in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Eur. J. Biochem.*, **235(1-2)**, 317-323.

**Frey BJ, Dueck D (2007).** Clustering by passing messages between data points. *Science*, **315**, 972-976.

**Frontera WR, Ochala J (2015).** Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.*, **96(3)**, 183-195.

**Fujimura-Kiyono C, Racz GZ, Nishino I (2008).** Myotubular/centronuclear myopathy and central core disease. *Neurol. India*, **56(3)**, 325.

**Fusto A, Cassandrini D, Fiorillo C, Codemo V, Astrea G, D'Amico A, ... & Pegoraro E (2022).** Expanding the clinical-pathological and genetic spectrum of *RYR1*-related congenital myopathies with cores and minicores: an Italian population study. *Acta Neuropathol. Commun.*, **10**(1), 1-20.

**Fusto A, Moyle LA, Gilbert PM, Pegoraro E (2019).** Cored in the act: the use of models to understand core myopathies. *Dis. Model Mech.*, **12**(12), dmm041368.

**Galkin VE, Orlova A, Lukyanova N, Wriggers W, Egelman EH (2001).** Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J. Cell Biol.*, **153**(1), 75-86.

**Ge L, Fu X, Zhang W, Wang D, Wang Z, Yuan Y., ... & Xiong H (2019).** Recessive mutations in proximal I-band of *TTN* gene cause severe congenital multi-minicore disease without cardiac involvement. *Neuromuscul. Disord.*, **29**(5), 350-357.

**Geeves MA, Hitchcock De Gregori SE, Gunning PW (2015).** A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **36**(2), 147-153.

**Geraud J, Dieterich K, Rendu J, Coste EU, Dobrzynski M, Marcorelle, P, ... & Cances C (2021).** Clinical phenotype and loss of the slow skeletal muscle troponin T in three new patients with recessive *TNNT1* nemaline myopathy. *J. Med. Genet.*, **58**(9), 602-608.

**Glyakina AV, Galzitskaya OV (2020).** Bioinformatics analysis of actin molecules: why quantity does not translate into quality?. *Front Genet.*, **11**, 1591.

**Gonorazky HD, Bönnemann CG, Dowling JJ (2018).** The genetics of congenital myopathies. *Handb. Clin. Neurol.*, **148**, 549-564.

**Gonzalez Jamett AM, Bevilacqua JA, Cardenas Diaz AM (2018).** *Hereditary myopathies*, in: K. Sakuma (Eds), Muscle Cell and Tissue. Current Status of Research Field, IntechOpen, Rijeka, Croatia, p: 252-268.

**Gonzalez Jamett AM, Momboisse F, Haro-Acuna V, Bevilacqua JA, Caviedes P, Cardenas AM (2013).** Dynamin 2 function and dysfunction along the secretory pathway. *Front. Endocrinol.*, **4**, 126.

**Granzier H, Labeit S (2007).** Structure-function relations of the giant elastic protein titin in striated and smooth muscle cells. *Muscle Nerve*, **36**(6), 740-755.

**Granzier HL, Labeit S (2006).** The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **34**(2), 50-53.

**Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S (1999).** Muscle assembly: a titanic achievement?. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**(1), 18-25.

**Guo, W, Bharmal SJ, Esbona K, Greaser ML (2010).** Titin diversity—alternative splicing gone wild. *J. Biomed. Biotechnol.*, 1-8.

**Gurniak CB, Chevessier F, Jokwitz M, Jönsson F, Perlas E, Richter H, ... & Witke, W (2014).** Severe protein aggregate myopathy in a knockout mouse model points to an essential role of cofilin2 in sarcomeric actin exchange and muscle maintenance. *Eur. J. Cell Biol.*, **93(5-6)**, 252-266.

**Hackman P, Udd B, Bönnemann CG, Ferreiro A, Bonnemann C, Beggs A, ... & Frase AR (2017).** 219th ENMC international workshop titinopathies international database of titin mutations and phenotypes, Heemskerk, The Netherlands, 29 April-1 May 2016. *Neuromuscul. Disord.*, **27(4)**, 396-407.

**Harrington WF, Rodgers ME (1984).** Myosin. *Annu. Rev. Biochem.*, **53(1)**, 35-73.

**Herman GE, Kopacz K, Zhao W, Mills PL, Metzenberg A, Das S (2002).** Characterization of mutations in fifty North American patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.*, **19(2)**, 114-121.

**Herman, IM (1993).** Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5(1)**, 48-55.

**Hild G, Bugyi B, Nyitrai M (2010).** Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function. *Cytoskel.*, **67**, 609-629.

**Hitchcock De Gregori SE, Singh A (2010).** What makes tropomyosin an actin binding protein? A perspective. *J. Struct. Biol.*, **170(2)**, 319-324.

**Hohendahl A, Roux A, Galli V (2016).** Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of *BIN1* and dynamin 2. *J. Struct. Biol.*, **196(1)**, 37-47.

**Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, ... & Eichler EE (2009).** Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *The Am. J. Hum. Genet.*, **84(2)**, 148-161.

**Jeon JH, Namgung R, Park MS, Park KI, Lee C, Lee JS, Kim SH (2011).** X-linked myotubular myopathy in a family with two infant siblings: a case with MTM1 mutation. *Yonsei Med. J.*, **52(3)**, 547-550.

**Johnston JJ, Kelley RI, Crawford TO, Morton DH, Agarwala R, Koch T (2000).** A novel nemaline myopathy in the Amish caused by a mutation in troponin T1. *Am. J. Hum. Genet.*, **67(4)**, 814- 821.

**Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J (2008).** Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.*, **3(1)**, 1-13.

**Katus HA, Scheffold T, Remppis A, Zehlein J (1992).** Proteins of the troponin complex. *Lab. Med.*, **23(5)**, 311-317.

**Kazmierski ST, Antin PB, Witt CC, Huebner N, McElhinny AS, Labeit S, Gregorio CC (2003).** The complete mouse nebulin gene sequence and the identification of cardiac nebulin. *J. Mol. Biol.*, **328(4)**, 835-846.

**Keller TC (1995).** Structure and function of titin and nebulin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7(1)**, 32-38.

**Kellermayer D, Smith JE, Granzier H (2019).** Titin mutations and muscle disease. *Pflugers Arch.*, **471(5)**, 673-682.

**Kendrick Jones J, Buss F (2016).** Editorial Overview: Myosins in Review. *Traffic*, **17**, 819-821.

**Kiiski K, Lehtokari VL, Manzur AY, Sewry C, Zaharieva I, Muntoni F, ... & Wallgren-Pettersson C (2015).** A large deletion affecting *TPM3*, causing severe nemaline myopathy. *J. Neuromuscul. Disord.*, **2(4)**, 433-438.

**Kimura M (1977).** Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature*, **267**, 275-276.

**Kimura M (1983).** *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.

**Kioschis P, Wiemann S, Heiss NS, Francis F, Götz C, Poustka A, ... & Rosenthal A (1998).** Genomic organization of a 225-kb region in Xq28 containing the gene for X-linked myotubular myopathy (*MTM1*) and a related gene (*MTMR1*). *Genomics*, **54(2)**, 256-266.

**Klug WS, Cummings MR (2006).** *Concepts of Genetics*, 8<sup>th</sup> Edition; Pearson Education: Upper Saddle River, NJ, USA.

**Kojima C, Hashimoto A, Yabuta I, Hirose M, Hashimoto S, Kanaho Y, ... & Sabe H (2004).** Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *The EMBO J.*, **23(22)**, 4413-4422.

**Kollmann Camaiora A, Alsina E, Domínguez A, Del Blanco B, Yepes MJ, Guerrero JL (2017).** Clinical protocol for the management of malignant hyperthermia. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.*, **64(1)**, 32-40.

**Konersman CG, Freyermuth F, Winder TL, Lawlor MW, Lagier-Tourenne C, Patel SB (2017).** Novel autosomal dominant *TNNT1* mutation causing nemaline myopathy. *Mol. Genet. Genomic Med.*, **5(6)**, 678-691.

**Köhler D, Struchholz S, Bähler M (2005).** The two IQ-motifs and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulate the rat myosin 1d ATPase activity. *FEBS J.*, **272(9)**, 2189-2197.

**Krebs J, Agellon LB, Michalak M (2015).** Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460(1)**, 114-121.

**Krüger M (2015).** Posttranslational Modification of the Titin Springs: Dynamic Adaptation of Passive Sarcomere Stiffness. *Cardiac Cytoarchitecture*, 109-124.

**Krüger M, Linke WA (2011).** The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **286(12)**, 9905-9912.

**Kuruba B, Kaczmarek M, Kesik-Brodacka M, Fojutowska M, Sliwinska M, Kostyukova AS, Moraczewska J (2021).** Structural Effects of Disease-Related Mutations in Actin-Binding Period 3 of Tropomyosin. *Molecules*, **26(22)**, 6980.

**Kühne W (1864).** Untersuchungen über das Protoplasma. Leipzig, 59-64.

**Kyheröinen S, Vartiainen MK (2020).** Nuclear actin dynamics in gene expression and genome organization. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **102**, 105-112.

**Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C (2009).** Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (*ACTA1*). *Hum. Mutat.*, **30**, 1267-1277.

**Laing NG, Nowak KJ (2005).** When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease. *Bioessays*, **27(8)**, 809-822.

**Laing NG, Wilton SD, Akkari PA, Dorosz S, Boundy K, Kneebone C, ... & Haan E (1995).** A mutation in the  $\alpha$  tropomyosin gene *TPM3* associated with autosomal dominant nemaline myopathy. *Nat. Genet.*, **9(1)**, 75-79.

**Laitila J, Lehtonen J, Lehtokari VL, Sagath L, Wallgren-Pettersson C, Grönholm M, Pelin K (2019).** A nebulin super-repeat panel reveals stronger actin binding toward the ends of the super-repeat region. *Muscle Nerve*, **59(1)**, 116-121.

**Lange S, Ehler E, Gautel M (2006).** From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell. Biol.*, **16(1)**, 11-18.

**Lange S, Himmel M, Auerbach D, Agarkova I, Hayess K, Fürst DO., ... & Ehler E (2005).** Dimerisation of myomesin: implications for the structure of the sarcomeric M-band. *J. Mol. Biol.*, **345(2)**, 289-298.

**Laporte J, Bedez F, Bolino A, Mandel JL (2003).** Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 285-292.

**Laporte J, Biancalana V, Tanner SM, Kress W, Schneider V, Wallgren-Pettersson C, ... & Mandel JL (2000).** *MTM1* mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.*, **15(5)**, 393-409.

**Laporte J, Kress W, Mandel JL (2001).** Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Ann. Neurol.*, **50(1)**, 42-46.

**Lawal TA, Todd JD, Meilleur KG (2018)** Ryanodine Receptor 1-Related Myopathies: Diagnostic and Therapeutic Approaches, *Neurotherapeutics*, **15(4)**, 885-899.

**Lawlor MW, Dowling JJ (2021).** X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul. Disord.*, **31(10)**, 1004-1012.

**Lawlor MW, Ottenheijm CA, Lehtokari VL (2011).** Novel mutations in NEB cause abnormal nebulin expression and markedly impaired muscle force generation in severe nemaline myopathy. *Skelet. Muscle*, **1(1)**, 23.

**Leao LG, Souza LS, Nogueira L, Pavanello RDCM, Gurgel-Giannetti J, Reed UC, ... & Vainzof M (2020).** Dominant or recessive mutations in the RYR1 gene causing central core myopathy in Brazilian patients. *Acta Myol.*, **39(4)**, 274.

**Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz O A, Ochoa, GC. ... & De Camilli, P. (2002).** Amphiphysin 2 (*BIN1*) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*, **297(5584)**, 1193-1196.

**Lehtokari VL, Kiiski K, Sandaradura SA, Laporte J, Repo P, Frey JA, ... & Wallgren-Pettersson C (2014).** Mutation update: the spectra of nebulin variants and associated myopathies. *Hum. Mutat.*, **35(12)**, 1418-1426.

**Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, Allamand V (2009).** Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1790(11)**, 1569-1574.

**Li J, Lu Q, Zhang M (2016).** Structural basis of cargo recognition by unconventional myosins in cellular trafficking. *Traffic*, **17(8)**, 822-838.

**Li S, Guo W, Schmitt BM, Greaser ML (2012).** Comprehensive analysis of titin protein isoform and alternative splicing in normal and mutant rats. *Circ. Res.*, **113(4)**, 1265-1273.

**Liew CC, Sole MJ, Yamauchi-Takihar K, Kellam B, Anderson DH, Lin L, Liew JC (1990).** Complete sequence and organization of the human cardiac b-myosin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.*, **18(12)**, 3647-3651

**Lin JJ, Eppinga RD, Warren KS, McCrae KR (2008).** Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 201-222.

**Linke WA (2018).** Titin gene and protein functions in passive and active muscle. *Annu. Rev. Physiol.*, **80**, 389-411.

**Lopergolo D, Bocci S, Pinto AM, Valentino F, Doddato G, Ginanneschi F, ... & Giannini F (2021).** A new mutation in *DNM2* gene in a large Italian family. *Neurological Sciences*, **42(6)**, 2509-2513.

**Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K (2021).** Cluster: *Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 2.1.2.

**Maiti S, Kolkata I, Bamburg IJR (2013).** Actin-Capping and-Severing Proteins. *In Cell Architecture and Function*, **4**, 18-26.



- Marino M, Stoilova T, Giorgi C, Bachi A, Cattaneo A, Auricchio A, ... & Zito, E. (2015).** *SEPNI*, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity. *Hum. Mol. Genet.*, **24**(7), 1843-1855.
- Marra JD, Engelstad KE, Ankala A, Tanji K, Dastgir J, De Vivo DC, ... & Chiriboga CA (2015).** Identification of a novel nemaline myopathy-causing mutation in the troponin T1 (*TNNT1*) gene: a case outside of the old order Amish. *Muscle Nerve*, **51**(5), 767-772.
- Marston S, Zamora JE (2020).** Troponin structure and function: a view of recent progress. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41**(1), 71-89.
- Marston S. (2018).** The molecular mechanisms of mutations in actin and myosin that cause inherited myopathy. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (7), 2020.
- Marttila M, Hanif M, Lemola E, Nowak KJ, Laitila J, Grönholm M, ... & Pelin K (2014).** Nebulin interactions with actin and tropomyosin are altered by disease-causing mutations. *Skelet. muscle*, **4**(1), 1-10.
- Marttila M, Lehtokari VL, Marston S, Nyman T. A, Barnerias C, Beggs AH, Bertini E, Ceyhan-Birsoy Ö , Cintas P, Gerard M (2014).** Mutation update and genotype-phenotype correlations of novel and previously described mutations in *TPM2* and *TPM3* causing congenital myopathies. *Hum. Mutat*, **35**(7), 779-790.
- Maruyama K, S Matsubara, R Natori, Y Nonomura, S Kimura, K Ohashi, F Murakami, S Handa, Eguchi G (1977).** Connectin, an elastic protein of muscle: characterization and function. *J. Biochem.*, **82**, 317-337 .
- Mason JM, Muller KM, Arndt KM (2008).** iPEP: peptides designed and selected for interfering with protein interaction and function. *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 1442-1447.
- Massana Munoz X, Buono S, Koebel P, Laporte J, Cowling BS (2019).** Different in vivo impacts of dynamin 2 mutations implicated in Charcot-Marie-Tooth neuropathy or centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.*, **28**(24), 4067-4077.
- Matsuo M, Awano H, Maruyama N, Nishio H (2019).** Titin fragment in urine: A noninvasive biomarker of muscle degradation. *Adv. Clin. Chem.*, **90**, 1-23.
- McGough A, Pope B, Chiu, W, Weeds A (1997).** Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.*, **138**(4), 771-781.
- Menon S, Gupton SL (2016).** Building blocks of functioning brain: cytoskeletal dynamics in neuronal development. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **322**, 183-245.
- Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, ... & Guicheney P (2001).** Mutations in *SEPNI* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat. Genet.*, **29**(1), 17-18.

- Mondal A, Jin JP (2016).** Protein structure-function relationship at work: learning from myopathy mutations of the slow skeletal muscle isoform of troponin T. *Front. Physiol.*, **7**, 449.
- Moraczewska J, Greenfield NJ, Liu Y, Hitchcock De Gregori SE (2000).** Alteration of tropomyosin function and folding by a nemaline myopathy-causing mutation. *Biophys. J.*, **79(6)**, 3217-3225.
- Moreau Le Lan S, Aller E, Calabria I, Gonzalez-Tarancon L, Cardona GC (2018).** New mutations found by next-generation sequencing screening of Spanish patients with nemaline myopathy. *PLoS One*, **13(12)**, e0207296.
- Munoz Lasso DC, Roma Mateo C, Pallardo FV, Gonzalez Cabo P (2020).** Much more than a scaffold: cytoskeletal proteins in neurological disorders. *Cells*, **9(2)**, 358.
- Nakashima K, Sato N, Nakagaki T, Abe H, Ono S, Obinata T (2005).** Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (MCF) and non-muscle type (NMCF), interact with F-actin with different efficiencies. *J. Biochem*, **138(4)**, 519-526.
- Narita A. (2020).** ADF/cofilin regulation from a structural viewpoint. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41(1)**, 141-151.
- Navarro DJ (2015).** Learning Statistics with R: A Tutorial for Psychology Students and Other Beginners (Version 0.5).
- Neto OA, Moreno CDAM, Malfatti E, Donkervoort S, Böhm J, Guimaraes, JB, ... & Zanoteli E (2017).** Common and variable clinical, histological, and imaging findings of recessive RYR1-related centronuclear myopathy patients. *Neuromuscul. Disord.*, **27(11)**, 975-985.
- Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, ... & Laporte J (2007).** Mutations in amphiphysin 2 (*BINI*) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nature Genet.*, **39(9)**, 1134-1139.
- Nonaka S, Naoki H, Ishii SA (2011).** Multiphysical model of cell migration integrating reaction-diffusion, membrane and cytoskeleton. *Neural Netw.*, **24(9)**, 979-989.
- North KN, Wang CH, Clarke N, Jungbluth H (2014).** Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul. Disord.*, **24**, 97-116.
- Nowak KJ, Ravenscroft G, Laing NG (2013).** Skeletal muscle  $\alpha$ -actin diseases (actinopathies): pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.*, **125(1)**, 19-32.
- Nowak KJ, Sewry CA, Navarro C, Squier W, Reina C, Ricoy JR, ... & Laing, N. G. (2007).** Nemaline myopathy caused by absence of  $\alpha$ -skeletal muscle actin. *Ann. Neurol.*, **61(2)**, 175-184.

**Ochala J (2008).** Thin filament proteins mutations associated with skeletal myopathies: defective regulation of muscle contraction. *J. Mol. Med.*, **86(11)**, 1197-1204.

**Ockeloen CW, Gilhuis HJ, Pfundt R, Kamsteeg EJ, Agrawal PB, Beggs AH, ... & van Alfen N (2012).** Congenital myopathy caused by a novel missense mutation in the CFL2 gene. *Neuromuscul. Disord*, **22(7)**, 632-639.

**Odermatt A, Becker S, Khanna V, Kurzydowski K, Leisner E, Pette D, MacLennan DD (1998).** Sarcoplipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **273(20)**, 12360-12369.

**Ohashi K (2015).** Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation. *Dev. Growth Differ.*, **57(4)**, 275-290.

**Ohta T (1973).** Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature*, **246(5428)**, 96-98.

**Ohtsuki I, Morimoto S (2008).** Troponin: regulatory function and disorders. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369(1)**, 62-73.

**Oldfors A (2007).** Hereditary myosin myopathies. *Neuromuscul. Disorders.*, **17(5)**, 355-367.

**Oliver K, Seddon A, Trask RS (2016).** Morphing in nature and beyond: A review of natural and synthetic shape-changing materials and mechanisms. *J. Mater. Sci.*, **51(24)**, 10663-10689.

**Ottenheijm CA, Knottnerus A, Buck D, Luo X, Greer K, Hoying A, Labeit S, Granzier H (2009).** Tuning passive mechanics through differential splicing of titin during skeletal muscle development. *Biophys. J.*, **97**, 2277-2286.

**Otterbein, LR, Graceffa P, Dominguez R (2001).** The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science*, **293(5530)**, 708-711.

**Palm T, Greenfield NJ, Hitchcock De Gregori SE (2003).** Tropomyosin ends determine the stability and functionality of overlap and troponin T complexes. *Biophys. J.*, **84(5)**, 3181-3189.

**Parker F, Baboolal TG, Peckham M (2020).** Actin mutations and their role in disease. *Int. J. Mol.Sci.*, **21(9)**, 3371.

**Parker F, Peckham M (2020).** Disease mutations in striated muscle myosins. *Biophys. Rev.*, **12(4)**, 887-894.

**Peakall R, Smouse PE (2012).** GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*, **28(19)**, 2537-9.

**Pelin K, Hilpela P, Donner K, Sewry C, Akkari PA, Wilton SD, ... & Wallgren-Pettersson C (1999).** Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **96(5)**, 2305-2310.

**Pelin K, Wallgren-Pettersson C (2019).** Update on the Genetics of Congenital Myopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.*, **29**, 12-22.

**Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, and Guicheney P (2003).** Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1045-1053.

**Phadke R (2019).** Myopathology of congenital myopathies: bridging the old and the new. *Semin. Pediatr. Neurol.*, **29**, 55-70.

**Pierson CR, Tomczak K, Agrawal P, Moghadaszadeh B, Beggs AH (2005).** X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64(7)**, 555-564.

**Povarova OI, Sulatskaya AI, Kuznetsova IM, Turoverov KK. (2012).** Actin folding, structure and function: is it a globular or an intrinsically disordered protein?. *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*, 57-80.

**Powers K, Nishikawa K, Joumaa V, Herzog W (2016).** Decreased force enhancement in skeletal muscle sarcomeres with a deletion in titin. *J. Exp. Biol.*, **219(9)**, 1311-1316.

**Prokic I, Cowling BS, Laporte J (2014).** Amphiphysin 2 (*BINI*) in physiology and diseases. *J. Mol. Med.*, **92(5)**, 453-463.

**Raess MA, Cowling BS, Bertazzi DL, Kretz C, Rinaldi B, Xuereb JM, ... & Laporte J (2017).** Expression of the neuropathy-associated *MTMR2* gene rescues *MTM1* associated myopathy. *Hum. Mol. Genet.*, **26(19)**, 3736-3748.

**Ravenscroft G, Laing NG, Bönnemann CG (2015).** Pathophysiological concepts in the congenital myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus. *Brain*, **138(2)**, 246-268.

**Ravenscroft G, Richardson RJB, Nowak KJ, Laing GN (2018).** Recent advances in understanding congenital myopathies, *F1000Res.*, **7**, 1921.

**Razzaq A, Robinson IM, McMahon HT, Skepper JN, Su Y, Zelhof AC, ... & O'Kane CJ (2001).** Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **15(22)**, 2967-2979.

**Rederstorff M, Castets P, Arbogast S, Laine J, Vassilopoulos S, Beuvin M, ... & Lescure A (2011).** Increased muscle stress-sensitivity induced by selenoprotein N inactivation in mouse: a mammalian model for SEPNI-related myopathy. *PLoS one*, **6(8)**, e23094.

**Romero NB (2010).** Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul. Disord.*, **20(4)**, 223-228.

**Rosen SM, Joshi M, Hitt T, Beggs AH, Agrawal PB (2020).** Knockin mouse model of the human *CFL2* p. A35T mutation results in a unique splicing defect and severe myopathy phenotype. *Hum. Mol. Genet.*, **29(12)**, 1996-2003.

**Rosenberg NA, Edge MD, Pritchard JK, Feldman MW (2019).** Interpreting polygenic scores, polygenic adaptation, and human phenotypic differences. *Evol. Med. Public Health*, **1**, 26-34.

**Rossi D, Sorrentino V (2002).** Molecular genetics of ryanodine receptors  $Ca^{2+}$ -release channels. *Cell. Calcium*, **32**, 307-319.

**Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, ... & Lander ES (2006).** Positive natural selection in the human lineage. *Science*, **312(5780)**, 1614-1620.

**Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC (1996).** *BIN1* is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.*, **14(1)**, 69-77.

**Samocha KE, Robinson EB, Sanders SJ, Stevens C, Sabo A, McGrath LM, ... & Daly MJ (2014).** A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease. *Nat. Genet.*, **46(9)**, 944-950.

**Sanger JW, Chowrashi P, Shaner NC, Spalthoff S, Wang J, Freeman NL, Sanger JM (2002).** Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **403**, 153-162.

**Santulli G, Lewis D, des Georges A, Marks AR, Frank J (2018).** Ryanodine receptor structure and function in health and disease. *Subcell. Biochem.*, **87**, 329-352.

**Savarese M, Johari M, Johnson K, Arumilli M, Torella A, Töpf A, ... & Udd B (2020).** Improved criteria for the classification of titin variants in inherited skeletal myopathies. *J. Neuromuscul. Dis.*, **7(2)**, 153-166.

**Schiaffino S, Reggiani C (2011).** Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, **91(4)**, 1447-1531.

**Schüler H, Karlsson R, Schutt CE, Lindberg U (2006).** The connection between actin ATPase and polymerization. *Advances in Molecular and Cell Biology*, **37**, 49-66.

**Scoto M, Cullup T, Cirak S, (2013).** Nebulin (*NEB*) mutations in a childhood onset distal myopathy with rods and cores uncovered by next generation sequencing *Eur. J. Hum. Genet.*, **(21)**. 1249-1252.

**Scoto M, Cirak S, Mein R, Feng L, Manzur AY, Robb S, ... & Muntoni F (2011).** SEPN1-related myopathies: clinical course in a large cohort of patients. *Neurology*, **76(24)**, 2073-2078.

**Sebestyen MG, Wolff JA, Greaser ML (1995).** Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J. Cell Sci.*, **108(9)**, 3029-3037.

**Sewry CA, Laitila JM, Wallgren-Pettersson C (2019).** Nemaline myopathies: a current view. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **40(2)**, 111-126.

**Shchedrina VA, Zhang Y, Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2010).** Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. *Antioxid. Redox Signal.*, **12(7)**, 839-849.

**Shin HC, Lee HB, Yoo TK, Lee ES, Kim RN, Park B., ... & Han W (2020).** Detection of germline mutations in breast cancer patients with clinical features of hereditary cancer syndrome using a multi-gene panel test. *Cancer Res. Treat.*, **52(3)**, 697-713.

**Sliwinska M, Robaszkiewicz K, Wasag P, Moraczewska J (2021).** Mutations Q93H and E97K in TPM2 disrupt Ca-dependent regulation of actin filaments. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(8)**, 4036.

**Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B, Ishiura S, Stier G, Gregorio CC, ... & Labeit S (1997).** Tissue-specific expression and  $\alpha$ -actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J. Mol. Biol.*, **270(5)**, 688-695.

**Sparrow JC, Nowak KJ, Durling HJ, Beggs AH, Wallgren-Pettersson C, Romero N, ... & Laing NG (2003).** Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (*ACTA1*). *Neuromuscul. Disorder.*, **13(7-8)**, 519-531.

**Spiro AJ, Shy GM, Gonatas NK (1966).** Myotubular myopathy: persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Arch. Neurol.*, **14(1)**, 1-14.

**Splettstoesser T, Holmes KC, Noe F, Smith JC (2011).** Structural modeling and molecular dynamics simulation of the actin filament. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **79(7)**, 2033-2043.

**Squire JM (1997).** Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr. Opin. Struct.*, **7(2)**, 247-257.

**Su Z, Smolnikov A, Khazaal A, Dinger M, Oates E (2022).** VP. 02 Comprehensive characterization of early-onset skeletal muscle disease gene exon usage and splicing patterns across different developmental ages. *Neuromuscul. Disord.*, **32**, 47.

**Sun Y, Lan X, Lei C, Zhang C, Chen H (2015).** Haplotype combination of the bovine CFL2 gene sequence variants and association with growth traits in Qinchuan cattle. *Gene*, **563**(2), 136-141.

**Taga M, Petyuk VA, White C, Marsh G, Ma Y, Klein HU, ... & De Jager PL (2020).** BIN1 protein isoforms are differentially expressed in astrocytes, neurons, and microglia: neuronal and astrocyte BIN1 are implicated in tau pathology. *Mol. Neurodegener.*, **15**(1), 1-19.

**Tajsharghi H, Ohlsson M, Palm L, Oldfors A (2012).** Myopathies associated with  $\beta$ -tropomyosin mutations. *Neuromuscul. Disord.*, **22**(11), 923-933.

**Tajsharghi H, Thornell LE, Lindberg C, Lindvall B, Henriksson KG, Oldfors A (2003).** Myosin storage myopathy associated with a heterozygous missense mutation in MYH7. *Ann. Neurol.*, **54**(4), 494-500.

**Tang J, Ma W, Chen Y, Jiang R, Zeng Q, Tan J, Jiang H, Li Q, Zhang VW, Wang, J (2020).** Novel SPEG variant cause centronuclear myopathy in China. *J. Clin. Lab. Anal.*, **34**(2), e23054.

**Thirion C, Stucka R, Mendel B, Gruhler A, Jaksch M, Nowak KJ, ... & Lochmüller H (2001).** Characterization of human muscle type cofilin (CFL2) in normal and regenerating muscle. *Eur. J. Biochem.*, **268**(12), 3473-3482.

**Thompson RF, Langford GM (2002).** Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.*, **268**(3), 276-289.

**Todd JJ, Sagar V, Lawal TA, Allen C, Razaqyar MS, Shelton MS, ... & Meilleur KG (2018).** Correlation of phenotype with genotype and protein structure in RYR1-related disorders. *J. Neurol.*, **265**(11), 2506-2524.

**Tondeleir D, Vandamme D, Vandekerckhove J, Ampe C, Lambrechts A (2009).** Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, **66**(10), 798-815.

**Topaloglu H (2020).** Core myopathies-a short review. *Acta Myol.*, **39**(4), 266.

**Toussaint A, Cowling BS, Hnia K, Mohr M, Oldfors A, Schwab Y, ... & Laporte, J. (2011).** Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta neuropathol.*, **121**(2), 253-266.

**Treves S, Jungbluth H, Muntoni F, Zorzato F (2008).** Congenital muscle disorders with cores: the ryanodine receptor calcium channel paradigm. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**(3), 319-326.

**Trinick J (1994).** Titin and nebulin: protein rulers in muscle?. *Trends Biochem. Sci.*, **19**(10), 405-409.

**Trinick J, Tskhovrebova L (1999).** Titin: a molecular control freak. *Trends Cell Biol.*, **9**(10), 377-380.

**Uro Coste E, Arne Bes MC, Pellissier JF, Richard P, Levade T, Heitz F., ... & Delisle MB (2009).** Striking phenotypic variability in two familial cases of myosin storage myopathy with a *MYH7* Leu1793pro mutation. *Neuromuscul. Disord.*, **19(2)**, 163-166.

**Ünlü A (2014).** Computational prediction of actin-actin interaction. *Mol. Biol. Rep.*, **41(1)**, 355-364.

**Van de Locht M, Borsboom TC, Winter JM, Ottenheijm CA (2021).** Troponin Variants in Congenital Myopathies: How They Affect Skeletal Muscle Mechanics. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(17)**, 9187.

**Van der Pol WL, Leijenaar JF, Spliet, WG, Lavrijsen SW, Jansen NJ, Braun KP, ... & Van Haelst MM (2014).** Nemaline myopathy caused by *TNNT1* mutations in a Dutch pedigree. *Mol. Genet. Genomic Med.*, **2(2)**, 134-137.

**Van Driest SL, Jaeger MA, Ommen SR, Will M L, Gersh BJ, Tajik AJ, Ackerman MJ (2004).** Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **44(3)**, 602-610.

**Vindin H, Gunning P (2013).** Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **34(3)**, 261-274.

**Vinogradova MV, Stone DB, Malanina GG, Karatzaferi C, Cooke R, Mendelson RA, Fletterick RJ (2005).** Ca<sup>2+</sup>-regulated structural changes in troponin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102(14)**, 5038-5043.

**Walker J (2020).** Skeletal system 2: structure and function of the musculoskeletal system. *Nursing Times*, **116(2)**, 52-56.

**Wang CLA, Coluccio LM (2010).** New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **281**, 91-128.

**Wei B, Jin JP (2016).** *TNNT1*, *TNNT2*, and *TNNT3*: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships. *Gene*, **582(1)**, 1-13.

**Williams A.J, Thomas N.L, George C.H (2018).** The ryanodine receptor: advances in structure and organization. *Curr. Opin. Physiol.*, **1**, 1-6.

**Wilmschurst JM, Lillis S, Zhou H, Pillay K, Henderson H, Kress, W., Jungbluth H (2010).** *RYR1* mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. *Ann. Neurol.*, **68(5)**, 717-726.

**Winder SJ, Ayscough KR (2005).** Actin binding proteins. *J. Cell Sci.* **118(4)**, 651-654.

**Wong S, Feng HZ, Jin JP (2019).** The evolutionarily conserved C-terminal peptide of troponin I is an independently configured regulatory structure to function as a myofilament Ca<sup>2+</sup>-desensitizer. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **136**, 42-52.



