

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**POMPE HASTALIĞI TANILI OLGULARDA
GLUKOZİDAZ ALFA ASİT GEN MUTASYONLARININ
İNCELENMESİ**

Ümmü Rana GÖKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023-ANTALYA

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

**POMPE HASTALIĞI TANILI OLGULARDA
GLUKOZİDAZ ALFA ASİT GEN MUTASYONLARININ
İNCELENMESİ**

Ümmü Rana GÖKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından

TYL-2021-5575 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Bitirme tezi olarak kabul edilmiştir. 12/07/2023

İmza

Tez Danışmanı: Doç. Dr Ayşe Esra MANGUOğLU

Akdeniz niversitesi

ye: Prof. Dr. Sibel Berker Karaöz¼m

Akdeniz niversitesi

ye: Doç. Dr. ığdem Aydın Acar

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Ümmü Rana GÖKMEN

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel desteği, tecrübesi ve sabrı ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. AYŞE ESRA MANGUOĞLU'na;

Tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım MERVE SULTAN EMBEL'e;

Hayatımın her alanında bana inanan ve güvenen canım aileme sevgi ve saygıyla sonsuz teşekkür ederim.



ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Pompe hastalığı ön tanıli proksimal kas güçsüzlüğü, egzersiz intoleransı ve solunum güçlüğü bulunan dokuz olguda, Sanger dizileme yöntemi kullanılarak 17. kromozom üzerinde bulunan GAA genindeki, daha önceden bildirilmiş veya yeni (novel) mutasyonların saptanması amaçlanmıştır. Mutasyon bölgelerinin ve çeşitliliğinin saptanmasının, hastalığın tanısı, tedavisi ve ilerideki çalışmalar için faydalı olacağı düşünülmektedir.

Yöntem: Akdeniz Üniversitesi Nöroloji polikliniğine başvuran ve çalışmayı kabul eden Pompe hastalığı ön tanıli dokuz hastadan imzalanmış onam formu ve K3-EDTA'lı tüplere 10ml periferik kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu sonrasında primer tasarımı ve Sanger sekanslama ile mutasyon analizi yapılmıştır.

Bulgular: Hastaların biyokimyasal analiz sonuçlarına göre AST, ALT, LDH ve total CK seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre karaciğer ile ilişki enzimlerden AST, ALT ile total CK seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Hastalarda toplamda beş farklı heterozigot patojenik mutasyon saptanmıştır. Hastalardan altısında heterozigot c.-32-13T>G varyantı saptanmıştır. Ayrıca altı hastada da c.2662G>T varyantı saptanmıştır. Hastalarda birinde heterozigot c.1064T>C (p.Leu355Pro) ve bir diğerinde heterozigot c.670C>T (p.Arg224Trp) varyantları saptanmıştır. Bir hastada ise yeni (novel) bir patojenik heterozigot c.2417_2418insG (p.Leu807AlafsTer77) varyantı saptanmıştır. Hastalardan birinde herhangi bir patojenik varyant saptanmamıştır.

Sonuç: GAA için dünya genelinde en yüksek prevalansa sahip c.-32-13T>G varyantı dokuz hastadan altısında saptanmıştır. Bu durum, c.-32-13T>G varyantının ülkemizde de yüksek prevalansa sahip olabileceğini düşündürmektedir. Analiz sonucunda klinik önemi bilinmeyen ve oldukça nadir görülen iki varyant saptanmıştır. Bu varyantlardan c.1438G>A (p.Val480Ile)'nin splicing ile ilişkilendirilmesi, patojenik bir varyant olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asit alfa glukozidaz, otozomal resesif, Pompe hastalığı, Sanger sekanslama

ABSTRACT

Objective: This study aims to detect known or novel mutations in GAA using Sanger sequencing method in nine patients who were pre-diagnosed with Pompe disease, having proximal muscle weakness, exercise intolerance and respiratory difficulties. It is thought that the detection of mutation sites and diversity will be beneficial for the diagnosis, treatment and future studies of the disease.

Method: A signed informed consent form were obtained from nine Pompe patients who applied to the Neurology outpatient clinic of Akdeniz University and agreed to participate to the study. Peripheral blood samples were taken from the patients and DNA isolation, primer design and mutation analysis were performed by using Sanger sequencing technology.

Results: AST, ALT, LDH and total CK levels of the patients were evaluated. According to these results, a significant increase was observed in the liver-related enzymes AST, ALT and total CK levels. A total of five different heterozygous pathogenic mutations were detected in the patients. The c.-32-13T>G variant was detected in six of the patients in compound heterozygous state. In addition, the c.2662G>T variant was detected in six patients. Heterozygous c.1064T>C variant was found in one of the patients and heterozygous c.670C>T variants were detected in one patient. A novel pathogenic heterozygous c.2417_2418insG variant was detected in patient 8. No pathogenic variant was detected in one patient.

Conclusion: The c.-32-13T>G variant with the highest prevalence worldwide for GAA was detected in six of nine patients. This suggests that the c.-32-13T>G variant may have a high prevalence in our country as well. As a result of the analysis, two variants of unknown clinical significance and extremely rare were detected. One of these two, c.1438G>A variant is estimated have a splicing effect and this supports the possibility that it may be a pathogenic variant.

Key words: Acid alpha glucosidase, autosomal recessive, Pompe disease, Sanger sequencing

İçindekiler	
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Glikojen Depo Hastalıkları	2
2.1.1. Glikojen Depo Tip II – Pompe Hastalığı	7
2.1.1.1. Klinik Belirtiler	8
2.1.1.1.1. Klasik İnfantil Başlangıçlı Pompe-LOPD	9
2.1.1.1.2. Klasik Olmayan İnfantil Başlangıçlı Pompe	10
2.1.1.1.3. Geç Başlangıçlı Pompe-LOPD	10
2.1.1.1. Hastalığın Prevalansı	11
2.1.1.2. Enzimin Görevi ve İşleyişi	11
2.1.1.3. Hastalığın Genetik Mekanizması	12
2.1.1.4. Mutasyon çeşitliliği	13
2.1.1.5. Hastalığın Teşhisi	14
2.1.1.6. Hastalığın Tedavisi	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Enzimatik Yöntem ile Manuel gDNA İzolasyonu	17
3.2. Primer Dizayn	19
3.3. PCR	21
3.4. Sanger Sekanslama	23
4. BULGULAR	27
4.1. Jel Elektroforez Sonuçları	27
4.2. Klinik Bulgular	28
4.3. Hastalarda Saptanan Patojenik Varyantlar ve Polimorfizmler	31
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	49
ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	49
ÖZGEÇMİŞ	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Glikojen depo hastalıkları (GDH) Sınıflaması

Tablo 2.2. Pompe hastalığında yürürlükte olan veya düşünülen güncel tedavi stratejileri

Tablo 4.1. Hastaların klinik özellikleri ve tedavi süreleri

Tablo 4.2. Hastalarda izlenen biyokimyasal analiz sonuçları

Tablo 4.3. Hastalarda gözlenen klinik bulgular

Tablo 4.4. Analiz sonucu saptanan patojenik varyantlar

Tablo 4.5. Analiz sonucu saptanan ancak klinik önemi bilinmeyen mutasyonlar

Tablo 4.6. Analiz sonucu saptanan Polimorfizimler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glikojen depo hastalık tiplerinin glikogenolisis ve glikolizis yollarındaki görev aldıkları tepkime yerleri

Şekil 2.2. Genetik çaprazlama

Şekil 2.3. Sağlıklı ve hasta bireyde İskelet kası karşılaştırması

Şekil 2.4. İnfantil başlangıçlı Pompe de hipotoni

Şekil 2.5. Hücre içi glikojen birikimi

Şekil 4.1. PCR ürünlerinin (Ekzonlar ve negatif kontrol ekzonlar) jel elektroforez görüntüsü

Şekil 4.2. PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü

Şekil 4.3. Kardeş olan H-1, H-2, H-3, ve H-4'ün aile pedigrisi

Şekil 4.4. Hasta 6'nın aile pedigrisi

Şekil 4.5. Klinik önemi bilinmeyen heterozigot c.1438G>A (p.Val480Ile) varyantının bulunduğu intron ve ekzon birleşim yerinin gösterimi

Şekil 4.6. Heterozigot c.-32-13 T>G mutasyonunun sekans görüntüsü (ekzon-2 Forward)

Şekil 4.7. Heterozigot c.2662G>T (p.Glu888Ter) mutasyonunun sekans görüntüsü(ekzon-19 Forward)

Şekil 4.8. Heterozigot c.1064T>C (p.Leu355Pro) mutasyonunun sekans görüntüsü(ekzon-6 Reverse)

Şekil 4.9. Heterozigot c.670C>T (p.Arg224Trp) mutasyonunun sekans görüntüsü(ekzon-3 Forward)

Şekil 4.10. Heterozigot c.2417_2418insG (p.Leu807AlafsTer77) mutasyonunun sekans görüntüsü(ekzon-17 Forward)

SİMGELER ve KISALTMALAR

GAA: Asit Alfa Glukozidaz

GDH: Glikojen Depo Hastalığı

IOPD: İnfantil Başlangıçlı Pompe Hastalığı

LOPD: Geç Başlangıçlı Pompe Hastalığı

AST: Aspartat Aminotransferaz

ALT: Alanin Aminotransferaz

LDH: Laktat Dehidrogenaz

CK: Serum Kreatin Kinaz

1. GİRİŞ

Glikojen depo hastalıkları (GDH), glikojen metabolizmasındaki enzimlerden birinin eksikliği sebebiyle dokularda glikojen birikimi ile karakterize edilen geniş bir kalıtsal metabolik hastalık grubudur. Glikojen metabolizmasında rol alan çeşitli enzimlerin gen bölgelerinde görülen mutasyonlar, enzim etkinliğinin azalmasına veya yokluğuna neden olur. Glikojen metabolizmasındaki bu değişiklikler genellikle karaciğer, kas, kalp, böbrek ve beyinde işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Semptom yelpazesi oldukça geniş ve etkilenen enzime bağlı olarak değişiklik göstermektedir [1,2]. Glikojenin glikoza parçalanmasında görevli olan asit alfa glukozidaz enziminin kodlandığı GAA genindeki patojenik mutasyonlar glikojen depo tip II ([Pompe] hastalığına yol açmaktadır [3]. Pompe hastalığı, başlangıç yaşı, hastalığın ilerleme hızı ve organ tutulumunun boyutuna göre değişen klinik spektrumda kendini gösteren metabolik bir hastalıktır. Lizozomal glikojen, iskelet, kalp ve düz kas olmak üzere birçok dokuda birikmekte ve bu dokularda hasara yol açmaktadır [9]. Pompe hastalığı genellikle başlangıç yaşına göre yaşamın ilk aylarında ortaya çıkan klasik infantil (IOPD-süt çocuğu formu), klasik olmayan infantil ve ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan geç başlangıçlı (LOPD) olmak üzere üç şekilde sınıflandırılmaktadır [4,5].

Hastalığın tanısında; klinik bulgular ve biyokimyasal bulguların yanı sıra, etkilenen dokulardan alınan biyopsi örneğinde anormal lizozomal glikojen birikiminin gösterilmesidir. Hastalığın teşhisindeki altın standart ise enzim tayini ve prenatal tanı olanağı da sağlayabilen mutasyon analizidir [6].

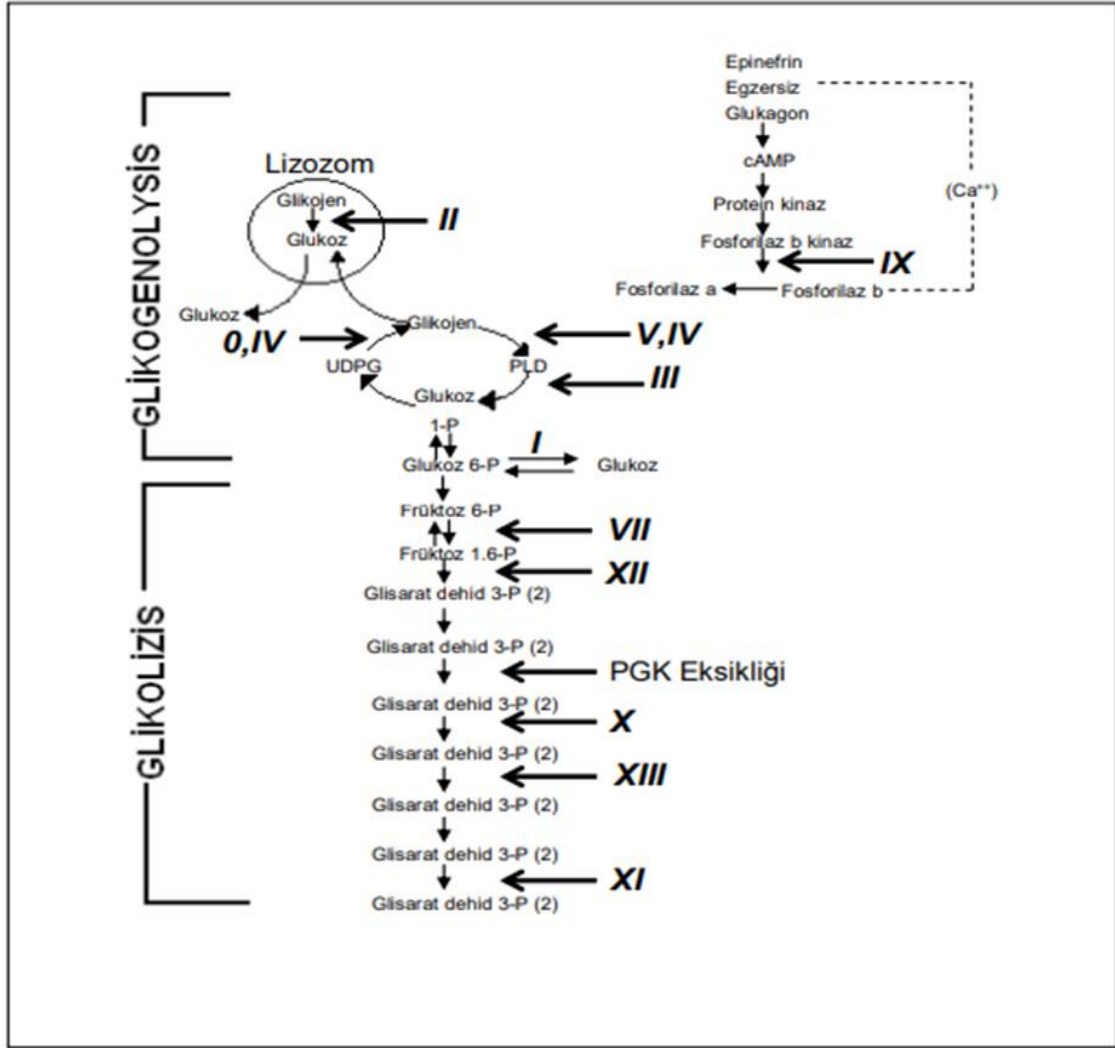
Bu çalışmada, Akdeniz Üniversitesi Nöroloji, çocuk nöroloji ve çocuk metabolizma polikliniklerinde takibe alınan, aile öyküsü, klinik ve biyokimyasal bulguları ile Pompe hastalığı ön tanılı dokuz hastada mutasyon taraması yapmak amaçlanmıştır. Bu şekilde hem hastalığa neden olan gen mutasyonları saptanabilecek hem de ülkemizdeki mutasyon çeşitliliği hakkında fikir sahibi olunabilecektir. Bu amaç ile hastalardan K3-EDTA'lı tüplere 10ml periferik kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu sonrasında primer tasarımı ve Sanger sekanslama yapılmıştır. Bu şekilde hem hastalığa neden olan gen mutasyonları saptanması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Glikojen Depo Hastalıkları

Glikojen depo hastalıkları (GDH), glikojen metabolizmasındaki enzimlerden birinin eksikliği sebebiyle dokularda glikojen birikimi ile karakterize edilen geniş bir kalıtsal metabolik hastalık grubudur. Farklı klinik tablolara neden olabilen glikojen depo hastalıkları (GDH) glikojenin yapımı ya da yıkımındaki problemler sonucu ortaya çıkan doğumsal metabolik hastalıklardır. Glikozun depo formu bir polisakkarit zinciri olan glikojen, başta karaciğer ve kas olmak üzere farklı dokularda depo edilir. Glikojen sentezi, egzersiz sırasında ve ihtiyaç duyulan koşullarda enerji sağlamak için glukozun kullanılmasında anahtar yolaktır. Glikojen metabolizmasında rol alan çeşitli enzimlerdeki mutasyonlar genetik deformasyonlara neden olur. Glikojen metabolizmasındaki değişiklikler genellikle karaciğer, kas, kalp, böbrek ve beyinde işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Semptom yelpazesi oldukça geniştir ve etkilenen enzime bağlı olarak değişiklik göstermektedir [1,2].

Glikojen depo hastalıklarının bazı tiplerinde benzer klinik bulgular görülse de genellikle karaciğer tutulumlu form, kas tutulumlu form ve ayrıca jeneralize form olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Glikojen depo hastalıklarında sınıflandırma ve numaralandırma, enzimatik defektin tanımlandığı kronolojiye göre romen rakamlarıyla verilmiştir. Ayrıca isimleri eksik enzim veya ilk tanımlayan otöre göre de verilmektedir [7,8].



Şekil 2.1. Glikojen depo hastalık tiplerinin glikogenolisis ve glikolizis yollarındaki görev aldıkları tepkime yerleri [2].

Glikoliz, glikozun enzimler yardımıyla pirüvik asite kadar yıkılması olayıdır. Glikoliz, altı karbonlu şekerlerin, ADP'yi ATP'ye dönüştürmek için kullanılan enerjinin serbest bırakılmasıyla, üç karbonlu bileşiklere bölündüğü karbohidratların katabolizmasının merkezi bir yolağıdır. Glikoliz hem anaerobik hem de aerobik koşullar altında ilerleyebilir. Glikoliz, glikozu iki pirüvat molekülüne dönüştüren 10 aşamalı bir yolak olup bunlardan ilk beşi hazırlık fazını oluşturur. Son beş basamak enerji kazancının olduğu hizmet fazını oluşturur. Glukozun C-6'daki hidroksil grubu fosforlanır ve D-glukoz 6- fosfat oluşur. D-glukoz 6-fosfat, D-fruktoz 6-fosfata çevrilir. D-fruktoz 6-fosfat C-1'de tekrar fosforlanarak D-fruktoz 1,6-bifosfat oluşur. Her iki fosforillenme için fosforil grubu vericisi ATP'dir.

Fruktoz 1,6-bifosfat iki üç-karbonlu moleküle; dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfata ayrılır. Dihidroksiaseton fosfat, ikinci bir gliseraldehit 3-fosfata dönüşür [9,10].

Son beş basamakta ise, gliseraldehit 3-fosfatın her bir molekülü oksitlenir ve 1,3-bifosfogliserat oluşturmak üzere inorganik fosfatla (ATP ile değil) fosforlanır. Bu arada iki mol NADH oluşur. İki molekül 1,3-bifosfogliserat 3-fosfogliserata dönüşürken 2 mol ATP oluşur. İki molekül 3-fosfogliserat 2-fosfo gliserata çevrilir. İki molekül 2-fosfogliseratdan fosfoenolpirüvat oluşur. İki molekül fosfoenolpirüvatdan fosfat ayrılarak pirüvat oluşur. Bu arada 2 mol ATP oluşur [9,10].

Glikolizdeki her tepkime, kendine ait bir enzim tarafından katalize edilir. Bu enzimlerden herhangi birinin yokluğu durumunda glikojenin glikoza parçalanması veya glikoz yolağı ile enerji üretiminde problemler meydana gelir. Her enzim defekti bir glikojen depo hastalığını işaret etmektedir. Bu glikojen depo hastalığı tipleri farklı veya ortak organ tutulumları ile kendini göstermektedir [9,10].

Tablo 2.1. Glikojen depo hastalıkları (GDH) Sınıflaması [2].

TİP	HASTALIK	GEN	TUTULAN DOKU	ENZİM DEFEKTİ
0		GYS2	Karaciğer	Glikojen Sentetaz eksikliği
Ia	Von Gierke(1a)	G6PC	Karaciger, Böbrek	Ia: glukoz-6-fosfataz
Ib		SLC37A4	Karaciger, Böbrek, lökosit	Ib(non-a): glukoz-6-fosfat translokaz (transporter)
II	POMPE	GAA	Jenaralize tüm lizozomlarda	Asit Alfa Glukozidaz
III	Cori-Forbes	AGL	Karaciğer, Kas	Glikojen debranş enzimi a-d subtipleri
IV	Andersen	GBE1	Karaciğer	Glikojen branş enzimi

V	McArdle	PYGM	Kas	Kas glikojen fosforilaz
VI	Hers	PYGL	Karaciğer	Karaciğer glikojen fosforilaz
VII	Tarui	PFKM	Kas, Eritrositler	Kas fosfofruktokinaz
IX	-	HKA2		IXa: Fosforilaz kinaz ($\alpha 2$ subunit)
	-	PHKB	Karaciğer	IXb: Fosforilaz kinaz (β subunit)
	-	PHKG2	ve/veya Kas	IXc: Fosforilaz kinaz (γ subunit)
	-	PHKA1		IXd: Fosforilaz kinaz ($\alpha 1$ subunit)
X	-	PGAM2	Kas	Kas fosfogliserat mutaz
XI	Fanconi- Bickel	SLC2A2	Kas	Glukoz transporter 2
XII	-	ALDOA	Kas	Aldolaz A
XIII	-	ENO3	Kas	B-enolaz
XIV	-	PGM1	Kas	Phosphoglukomutase 1 eksikliği
XV	-	GYG1	Kalp, Kas	Glikogenin-1
	Danon	LAMP2	Kalp, Kas	Lizozom ile ilişkili membran proteini 2
	Lafora	EPM2A NHLRC1	Tüm organlarda Poliglukozan granüller	2A: Laforin 2B: Malin

Karaciğeri etkileyen GDH'lar tip I, tip III'ün hepatik formu, tip IV, tip VI, tip IX'un hepatik formu ve tip 0'dır. GDH'ı tip I, III, VI ve IX çocukluk çağında benzer semptomlarla kendini göstermektedir. Bu semptomlar hipoglisemi, ciddi hepatomegali ve büyüme geriliğidir. Tip I bu formlar arasında en ağır prognoza sahiptir, çünkü sadece glikojen yıkımı değil, glukoneogenez de bozulmuştur. Tip III'de birçok hasta hepatopati, miyopati ve kardiyomiyopati içeren bir sendrom ile belirti vermektedir. Tip IV süt çocuğu veya çocukluk döneminde karaciğer yetmezliği, siroz ve çeşitli karaciğer hastalıklarına neden olmaktadır. Tip 0 süt çocuğu veya çocukluk döneminde hipoglisemisi ve ketozisle aynı zamanda şaşırtıcı olarak postprandiyal hiperglisemi ve laktik asit yüksekliği ile belirti vermektedir [2,11].

Kası etkileyen glikojen depo hastalıklarının ana belirtileri kas güçsüzlüğü, egzersiz intoleransı, rabdomiyoliz atakları ve kardiyomiyopati'dir. İnsülin glikojen sentezini uyarırken, glukagon ve stres hormonları glikogenolisis'i uyarmaktadır. Glikojen depo hastalıklarının tipine göre kas ve karaciğer tutulumu birlikte görülebileceği gibi izole tutulumla da ortaya çıkabilmektedir ve böbrek ya da nörolojik tutulum gibi farklı sistem tutulumları da eşlik edebilmektedir [2,13,14]. Kas glikojenazları; tip V, VII, IX, X, XII, XIII, XI ve Tip 0 'dır. Tip V miyofosforilaz enzim defekti ile kas tutulumuna yol açar. Klinik tablo da Miyalji, egzersiz intoleransı ve güçsüzlük görülmektedir. Tip VII, Kas ve eritrositlerde fosfofruktokinaz 1 eksikliği sonucu gözlenir ve klinik tabloda Tip V ile benzerlik göstermektedir. Bu hastalarda büyüme geriliği ve Hemolitik anemi gözlenen belirtilerdir. Tip IX de Karaciğer, kas ve lökositlerde fosforilaz kinaz aktivasyonunda azalma ile hepatomegali gözlenir. Glut2 eksikliği ile gelişen tip XI'da gelişme geriliği, abdominal distansiyon, hepatomegali, renomegali, Glukoz intoleransı, hipoglisemisi (hafif) ve hiperlipidemi gözlenmektedir. Tip 0'da ise glikojen sentaz eksikliğiyle, hipoglisemisi ve ketozis ayrıca postprandial laktik asidoz gelişmektedir [2,12].

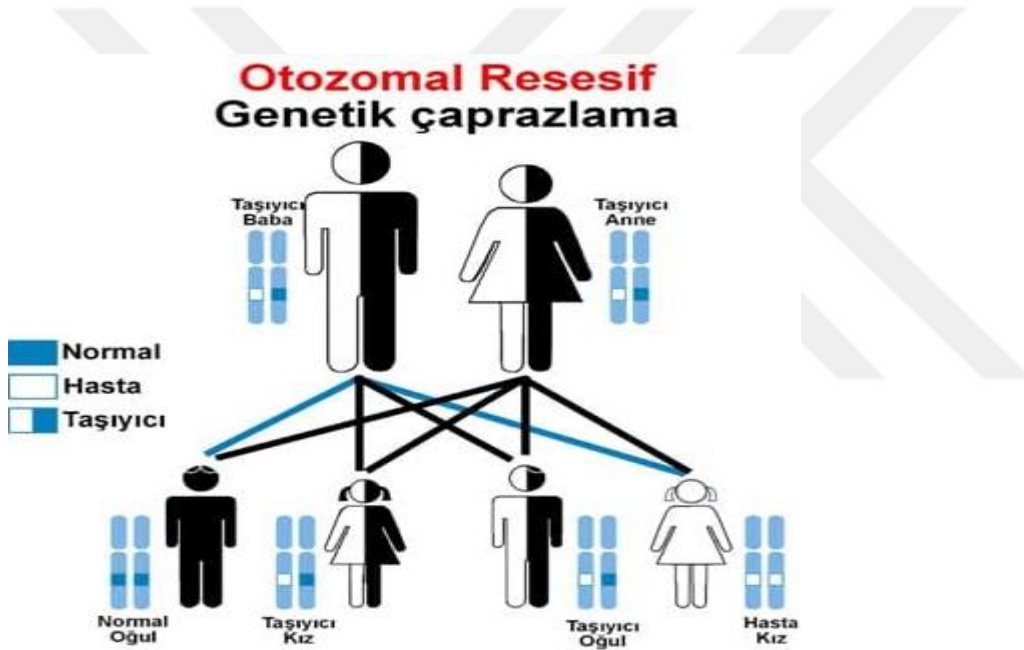
Glikojen depo hastalıklarının jeneralize formu ise Pompe, Danon ve Lafora hastalıklarını kapsamaktadır. Tip II asit maltaz eksizliği ile gelişen lizozomal glikojen birikimi ile karakterize edilir. Genel semptomları hepatomegali, miyopati ve kardiyomiyopati'dir. Danon hastalığı, diğer adıyla GDH tip II b veya psödopompe hastalığı X'e bağlı dominant kalıttır. Eksik enzim lizozomal membran proteini 2'dir. Hastalığın semptomları genellikle 10 yaş civarı başlamaktadır. Bu hastalarda kardiyak ve kas tutulumu gözlenir. Bazı hastalarda mental retardasyon görülebilmektedir. Hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur. Lafora hastalığı, miyoklonik epilepsi ve demansla karakterize edilmektedir. Ergenlik dönemlerinde başlar ve hızlı progresif bir seyirle 20–30 yaş öncesi ölümle sonuçlanmaktadır [2,12].

Glikojen depo hastalıklarının tanısında, klinik bulgular ve yakınmaların dışında laboratuvar bulguları, etkilenen dokulardan alınan biyopsi örneklerinde anormal formda glikojen depolanmasının gösterilmesi uygulanan yöntemlerdendir. En önemlisi ise enzim tayinidir ve eğer mümkünse prenatal tanı olanağı da sağlayabilen mutasyon analizidir [15].

Glikojenin glikoza parçalanmasında görevli olan asit alfa glukozidaz enziminin kodlandığı GAA genindeki patojenik mutasyonlar glikojen depo tip II (Pompe) hastalığına yol açar. Lizozomal bir enzim olan asit alfa glukozidazın eksikliği hastalığa sahip bireylerin yaşamını oldukça zorlaştırmaktadır.

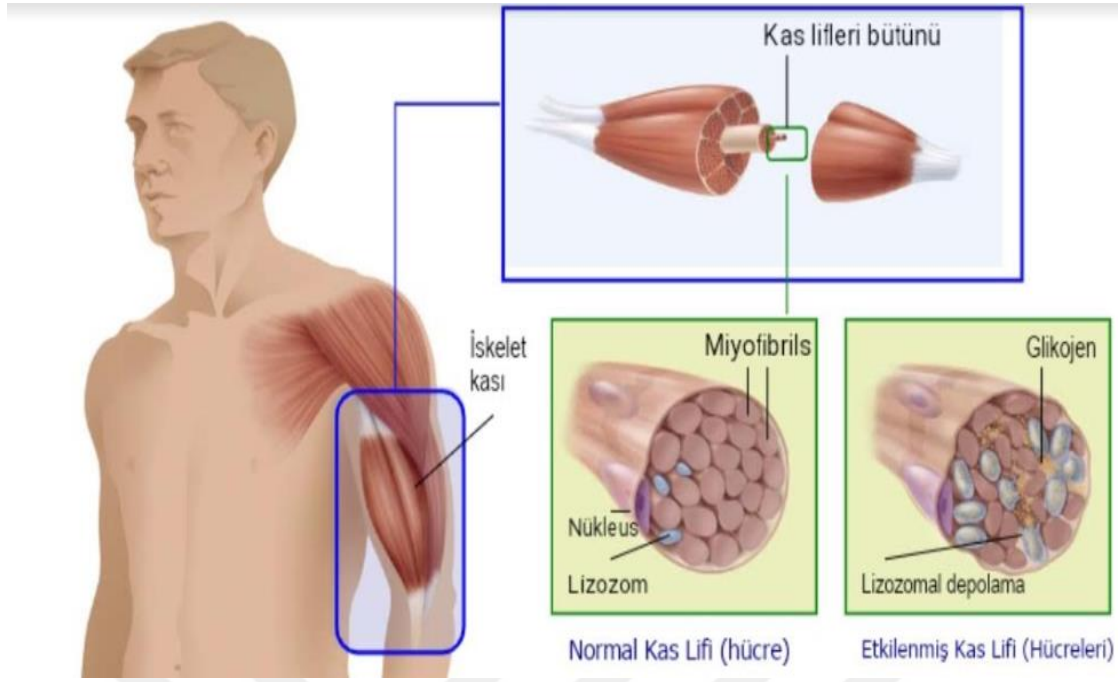
2.1.1. Glikojen Depo Tip II – Pompe Hastalığı

Pompe hastalığı, lizozomal enzim asit- α -glukosidaz (GAA) eksikliğinin neden olduğu, yaygın olarak kalpte, iskelette ve düz kasta lizozomal glikojen birikimine yol açan otozomal resesif bir hastalıktır. Otozomal resesif geçişli bu hastalıkta mutasyon taşıyıcısı olan bireylerin çocuklarının %25 ihtimal ile Pompe hastası olması söz konusudur.



Şekil 2.2. Genetik çaprazlama [16].

İlk olarak Johannes Casianus Pompe tarafından 1932 yılında tanımlanan ve adını alan hastalık, etkilenen bireylerin dokusunda çok sayıda lizozomal glikojen birikimi ile karakterize edilmektedir (Şekil-3) [17]. Kaslardaki zayıflık ve hipotoninin varlığı sebebiyle nöromusküler hastalık veya metabolik miyopati olarak da adlandırılmaktadır [3].



Şekil 2.3. Sağlıklı ve hasta bireyde İskelet kası karşılaştırması [18].

2.1.1.1. Klinik Belirtiler

Klinik durum ve hastalığın ciddiyeti birincil olarak GAA enzim aktivitesinin miktarı ile belirlenir ve klinik bulguları ciddi düzeyde olan hastalarda genellikle saptanabilir bir enzim aktivitesi gözlenmemektedir [17].

Pompe hastalığı, başlangıç yaşı, hastalığın ilerleme hızı ve organ tutulumunun boyutuna göre değişen klinik spektrum da kendini gösteren bir hastalıktır. Lizozomal glikojen, iskelet, kalp ve düz kas olmak üzere birçok dokuda birikmektedir [3]. Pompe hastalığı genellikle başlangıç yaşına göre yaşamın ilk aylarında ortaya çıkan klasik infantil (IOPD-süt çocuğu formu), klasik olmayan infantil ve ilerleyen yaşlar da ortaya çıkan geç başlangıçlı (LOPD) olmak üzere üç şekilde sınıflandırılır [4,5].

Genel olarak Pompe tanılı hastalarda; baş ve boyun bölgesinde büyüme, işitme kaybı, makroglosi ve kardiyovasküler sistemde kardiyomegali görülmektedir. EKG’de P-R aralığında kısalma, QRS komplekslerinde genişleme, Wolf-Parkinson-White Sendromu ve serebral arter anevrizması görülmektedir. Solunum sisteminde kas güçsüzlüğüne bağlı solunum güçlüğü ve dispne, solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Kaburgalar,

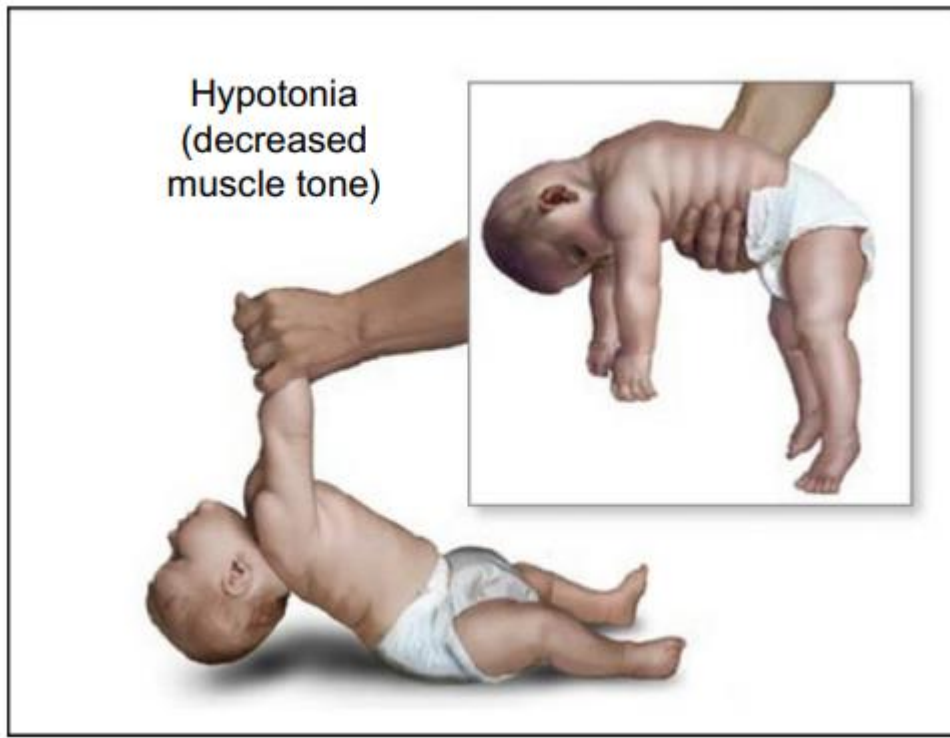
göğüs kafesi, köprücük kemikleri ve kürek kemiklerini kapsayan göğüs bölgesinde diyafragmatik paralizi oluşabilmektedir. Karın bölgesinde karaciğer büyümesi (hepatomegali) ve dalak büyümesi (splenomegali) de gözlenen semptomlar arasındadır [1,19,20]. Kas ve yumuşak dokularda güçsüzlük, proksimal kas güçsüzlüğü, EMG’de miyopatik patern ve kaslarda sertleşme meydana gelmektedir. Nörolojik olarak merkezi sinir sisteminde hipotoni, anormal beyin miyelinizasyonu ve periferik sinir sistemi kaynaklı olarak derin tendon reflekslerinin kaybı görülmektedir. Laboratuvar testlerinde, serum kreatin kinazda (CK), AST ve LDH de yükseliş görülmektedir [19].

Pompe hastalığının da gözlenen organa özgü tutulumunun nedeni, genellikle “genetik arka plan” olarak adlandırılan yaklaşık 25.000 genin bazılarının farklı, hücre tipine özgü ifadesinde aranmaktadır. Pompe hastalığında, lizozomal glikojen depolanmasına bağlı kardiyomiyopatinin neredeyse hiç GAA aktivitesi olmayan vakalar da ortaya çıktığı öne sürülmektedir [1,20,21].

Pompe hastalığında solunum tutulumu, diğer kalıtsal nöromusküler hastalıklardan, özellikle Duchenne kas distrofisinden farklıdır. Pompe hastalığında, solunum yetmezliğinin ortaya çıktığı diğer kas hastalıklarının aksine, solunum semptomları hastalığın ilk klinik belirtilerinden biri olabilir ve hastalar hala yürümelerine rağmen solunum güçlüğü gösterebilirler [17,22].

2.1.1.1.1. Klasik İnfantil Başlangıçlı Pompe-IOPD

Klasik infantil başlangıçlı formda, doğumdan birkaç ay sonra semptomlar görülmeye başlar. Hasta bebekler tipik olarak kas güçsüzlüğü (miyopati), hipotoni, hepatomegali ve kardiyomegali ile karakterize edilmektedir. IOPD’de, bebekler doğumdan itibaren oldukça zayıf bir kas sistemine sahiptirler ve bu durum, başını dik tutamamaları, sağa-sola dönememeleri ve emmede güçlük çekmeleri ile karakterizedir. Nefes darlığı yaşarlar ve solunum yolu enfeksiyonlarına karşı oldukça hassastırlar. Ayrıca IOPD de genellikle dil, kalp ve karaciğerde de büyüme görülmektedir [22]. Etkilenen bebeklerin kilo alımı yavaştır ve beklenen hızda büyüyemezler. Hastalık hızlı ilerler ve bu nedenle yaşamın ilk yılın da kalp-solunum yetmezliğine bağlı ölüm ile sonuçlanmaktadır [1,3,17,23].



Şekil 2.4. İnfantil başlangıçlı Pompe de hipotoni [24].

2.1.1.1.2. Klasik Olmayan İnfantil Başlangıçlı Pompe

Hastalık sıklıkla bir yaş civarında ortaya çıkmaktadır. Motor becerilerde gecikme (oturma ve yuvarlanma gibi) ve ilerleyici kas güçsüzlüğü ile karakterizedir. Beraberinde kardiyomegali gözlense de genellikle kalp yetmezliği görülmemektedir. Bu hastalıktaki kas güçsüzlüğü ciddi solunum problemlerine yol açmakta ve hastaların çoğu erken çocukluk dönemine kadar yaşayabilmektedir [23].

2.1.1.1.3. Geç Başlangıçlı Pompe-LOPD

Geç başlangıçlı form (LOPD), çocukluk, gençlik ve yetişkinlik dönemlerinin herhangi birinde ortaya çıkan ve tipik olarak şiddetli kardiyomiyopati içermeyen heterojen gruptur. Hastalığın prognozu, genellikle infantil başlangıçlı formlardan daha yavaş ve ılımlıdır. LOPD, ağırlıklı olarak iskelet kasını tutan ve yaşamın ikinci veya altıncı dekadına kadar ortaya çıkabilen, yavaş ilerleyen bir miyopati ile karakterize edilmektedir [3,25]. LOPD’de, hareket ve solunum ile ilgili problemler daha yavaş gelişmektedir. Ayrıca çocuklarda bazen motor gelişiminde gecikme olabilmektedir. Erişkinlerde ilk şikayetler genellikle bacaklarda

ve kalçalarda kas güçsüzlüğü olmaktadır. Bacak ve kalçalardaki güçsüzlük hastalarda yürüme bozukluğuna, kas ve sırt ağrısı çekmesine ve sıklıkla düşmeye neden olmaktadır. LOPD'ye sahip çocuklarda ve ergenlik dönemindeki hastalarda omurga eğri büyüyebilmektedir. Hastalar hareket etmekte ve merdiven çıkmakta güçlük çekerler ve gittikçe artan kas güçsüzlüğü nedeniyle tekerlekli sandalyeye ve solunum desteğine ihtiyaç duymaktadırlar [1,17,22].

2.1.1.1. Hastalığın Prevalansı

Pompe hastalığının prevalansının coğrafi ve etnik kökenlere bağlı olarak 40.000'de bir ile 600.000'de bir arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Vakaların yaklaşık 3/4'ü LOPD ve 1/4'ü IOPD'dir. Pompe hastalığının dünyadaki tahmini insidansı ise 40.000 doğumda bir vaka veya bir milyon doğumda 25 olduğu tahmin edilmektedir. California'dan yenidoğan taraması (NBS) 1/25.200 doğum prevalansı göstermiştir [26]. Illinois, Pennsylvania ve Missouri'deki NBS, sırasıyla 1/23.596, 1/16.095 ve 1/10.152 insidans göstermiştir [27,28,29]. Japonya'da NBS verilerinin analizi, 2013'ten 2020'ye kadar ~ 1/37.000 genel insidans göstermiştir [30]. Tayvan'dan yapılan araştırmalar, doğum yaygınlık oranlarını LOPD için 1/26.466 veya 1/20.114 ve IOPD için 1/67.047 olarak göstermiştir [31,32].

Hastalığın Türkiye'deki insidansı tam olarak bilinmemektedir. Ancak otozomal resesif geçiş ile kuşaktan kuşağa aktarımda etkisi büyük olan akraba evliliklerinin yaşadığımız coğrafyada yaygın olması sebebi ile Pompe hastalığının ülkemizde, yüksek prevalansda olabileceği düşünülmektedir.

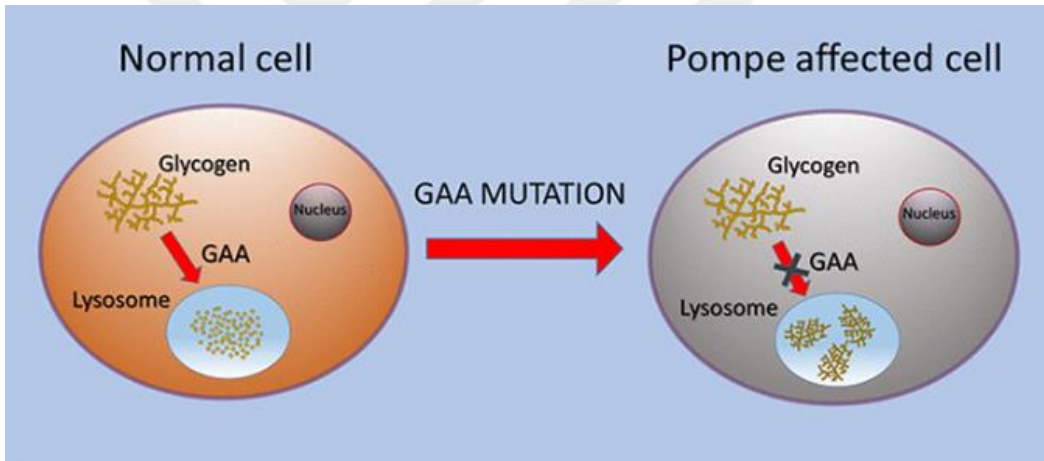
2.1.1.2. Enzimin Görevi ve İşleyişi

Pompe hastalığından sorumlu olan Asit Alfa-1,4-Glukozidaz (Asit Maltaz) enzimi, kromozom 17 üzerinde bulunan GAA geni tarafından kodlanmaktadır. Bu enzim lizozomlarda aktiftir ve hücrelerde geri dönüşüm merkezi gibi görev yapan yapılardır. Enzim normalde glikojeni glikoza parçalar ve glikoz çoğu hücrenin ana enerji kaynağıdır. GAA genindeki mutasyonlar glikojeni etkili bir şekilde parçalayan asit alfa glikosidazın oluşturulmasını engeller. Lizozomal bir enzim olan ve glikojenin 1,4 ve 1,6 alfa glikozidik bağlarını ayırarak serbest glikoza dönüşümün de görevli asit alfa-1,4-glukozidaz enziminin

defekti hücre içerisinde aşırı glikojen birikimine yol açmaktadır [4,5,23]. Bu birikim özellikle kas sistemi ile ilişkili organlar ve dokulara zarar vermektedir [33].

2.1.1.3. Hastalığın Genetik Mekanizması

Lizozomal sistemin ana işlevi hücre ve doku birleşenlerinin yenilenmesidir. GAA, diğer lizozomal genler gibi her hücre tipinde ifade edilen tipik bir temizlik genidir [3]. Genom da 17q25.2-q25.3'te lokalize olan bu gen Asit alfa-1,4-glukozidaz enzimini kodlar. Asit alfa-1,4-glukozidaz, glikojenin 1,4 ve 1,6 alfa glikozidik bağlarını ayırarak serbest glikoza dönüştürür. GAA genindeki bir dizi varyasyonu, hatalı transkripsiyon ürünü (mRNA) ile sonuçlanır. Bu baz değişimleri sonucu oluşan enzim eksikliği veya hatalı enzim, lizozomal glikojenin depolanmasına, lizozomal fonksiyon kaybına ve hücre-doku hasarına yol açabilmektedir [3,22,23].



Şekil 2.5. Hücre içi glikojen birikimi [34].

GAA geni, 20 ekzondan oluşur ve 19 kodlama ekzonu içerir; ilk amino asit ekzon 2'de ve son amino asit ekzon 20'de kodlanmaktadır [21]. Enzimin varlığı ve etkinliği, mutasyonun yeri ve çeşitliliğine göre farklılık göstermektedir. Protein kodlayan 20 ekzondan oluşan gendeki missense, nonsense, splice bölge mutasyonu ve delesyonlar olmak üzere 450'den fazla mutasyon tanımlanmış olup, en sık c.-32-13T> G mutasyonu bildirilmiştir [35,36].

Hücre hasarının birincil sebepleri lizozomal yırtılma ve otofajidir. 1970 yılında Engel, Pompe hastalarının otofajik fonksiyonunda anormallik olduğunu göstermiştir [37]. Otofaji,

yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinlerin yıkımında, hasarlı organellerin temizlenmesinde ve hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. [38]. Hücrede organellerin veya bileşenlerin yıkımı lizozomlar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Materyalin parçalanma veya geri dönüşüm için lizozomlara nasıl verildiğine bağlı olarak üç otofaji alt çeşidi tanımlanmıştır. Makrotofajide, kargo çift membranlı bir yapı ("otofagozom") içinde tutulur ve daha sonra lizozomlarla birleşir. Mikrotofajide, kargo lizozomal zarın yayılmasıyla (invajinasyonla) yutulur. Şaperon aracılı otofajide ise maddeler, ısı şoku kognat proteinler tarafından lizozomlara verilir.

Otofaji, lipid çift tabakasından türetilen ve bir fagofor olarak da bilinen izolasyon membranı ile başlamaktadır. Bu fagofor, protein birikimleri ve hasarlı organeller gibi hücre içi kargoları yutmak için genişler ve böylece kargoyu çift membranlı bir otofagozomun içine alır. Kargoyu içine almış otofagozom, lizozom ile birleşerek (füzyon) otofagozomal içeriğin lizozomal asit proteazlar tarafından yıkılmasını sağlamaktadır. Otofajinin bozulması sonucu, glikojen birikmesinden genişleyen lizozomlar ve bu lizozomların parçalanarak içeriklerinin sarkoplazmaya dökülmesiyle birlikte kasta işlev bozukluğuna ve yaralanmaya neden olabilmektedir [38].

Pompe hastalığında, lizozomal glikojen depolanmasına bağlı kardiyomiyopatinin neredeyse hiç GAA aktivitesi olmayan vakalarda ortaya çıktığı öne sürülmektedir. IOPD (klasik infantil pompe) hastalarında genellikle saptanabilir bir enzim aktivitesi yoktur ve bu durum kardiyomiyopatinin gelişimi ile doğrudan ilişkilidir. LOPD (geç başlangıçlı Pompe)'de ise düşük veya hatalı bir enzim aktivitesi söz konusudur [17,22,39].

2.1.1.4. Mutasyon çeşitliliği

Pompe hastalığının da geniş bir varyasyon çeşitliliği söz konusudur. Var olan varyasyonun yeri ve heterojenitesi hastalığın klinik seyrini de değiştirmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'nın yanı sıra küresel olarak dünya genelinde bildirilen en yaygın patojenik mutasyon c.-32-13C>T'dir. Çin'de en sık görülen GAA patojenik varyant, c.1935C>A (p.Asp 645Glu)'dır. c.1935C>A varyantı, küresel olarak en yaygın ikinci ve Asya-Pasifik'te en yaygın patojenik varyanttır. c.2560C>T varyantı hem Kuzey Amerika hem de Latin Amerika'da en sık görülen ve Avrupa'da en yaygın beş patojenik varyant arasında yer almaktadır [40,41].

2.1.1.5. Hastalığın Teşhisi

Pompe hastalığının teşhisi, ek testlerin sonuçlarıyla birlikte kas güçsüzlüğü şikayetleri temelinde koyulmaktadır. Belirtiler SMA, Becker musküler distrofi, Duchenne musküler distrofi, polimiyozit ve ekstremit-kemer musküler distrofi gibi diğer kas hastalıklarının semptomlarına benzediğinden bazen teşhis konması biraz zaman alabilmektedir. Teşhis için belirleyici olan kan testleri, DNA testleri ve muhtemelen bir deri biyopsisi veya kas biyopsisidir. Kan testi ile asit alfa-glukozidaz'ın enzim aktivitesini ölçülebilmektedir. Kültürlenmiş deri hücrelerinde (fibroblastlar), asit alfa-glukozidazın enzim aktivitesi ölçülebilmektedir. Kas dokusundaki glikojen birikimini saptamak için kas biyopsisi yapılmaktadır. Kas biyopsisinde lokal anestezi altında kas dokusundan parça alınır ve mikroskop altında incelenir. Ancak kas biyopsisi uygulama zorluğu ve bebekten almanın güçlüğü düşünüldüğünde çok tercih edilmemektedir, onun yerine DNA testi ile, GAA genindeki hastalığa neden olan varyasyonlar belirlenebilmekte ve kesin tanı koyulabilmektedir [20,22,42].

Pompe hastalığının teşhisi ile ilgili diğer bir büyük zorluk GAA yalancı eksikliğidir. Testlerde düşük enzim aktivitesi olarak ortaya çıkmakta ancak herhangi bir klinik etkisi görülmemekte ve hastalığa yol açmamaktadır. Bu yalancı eksiklik alleli (c.1726A; 2065A), Pompe hastalığından daha yaygın görünmektedir. Bu sebeple enzim tahlillerini tek başına kullanmak, ilk tarama adımlarında birçok yanlış pozitifte yol açabilmektedir [43].

2.1.1.6. Hastalığın Tedavisi

Tedavi, destek amaçlı olup solunum desteği, yüksek oranda karbonhidrat içeren diyetler ve aerobik egzersizleri kapsamaktadır. Pompe hastalığında, hastalığı modifiye edici tedavilere ek olarak, bu durumun genel yönetimi, özellikle LOPD'de, tercihen fizik tedavi, konuşma terapisi dahil olmak üzere yardımcı sağlık uzmanlarından oluşan bir ekibe izin veren multidisipliner bir klinik aracılığıyla semptomatik yönetim ve komplikasyonlar için kapsamlı bir çalışma gerektirmektedir. Solunum tedavisi, diyetisyenler ve genetik danışmanlar, hasta bakımının tüm yönlerinin ele alınmasını sağlar. Ek olarak, nöroloji, genetik, göğüs hastalıkları, gastroenteroloji ve kardiyoloji gibi farklı tıbbi ekipler arasındaki koordinasyon ve iletişim, uygun yönetim için çok önemli olabilir [44].

Pompe hastalığının tek etkili tedavisi, hastaların yaşamları boyunca ihtiyaç duydukları Myozyme ilacı ile enzim replasman tedavisidir (ERT). Enzim replasman tedavisi (ERT), insan rekombinant GAA'sı (rhGAA) olarak damar yoluna uygulanır. ERT, 1970'lerin başlarında Pompe hastalığında ilk olarak IOPD için çalışılmıştır [44,45]. 2006'da IOPD için yapılan randomize kontrollü bir çalışma, nihayetinde tüm Pompe hastalığı formları için rhGAA'nın [44] FDA tarafından onaylanmıştır. 2006'daki çalışma IOPD'de yapıldı ve ERT'nin hastalarda genel sağkalımı ve ventilatörsüz sağkalımı iyileştirdiği görülmüştür [46]. Tedavi, nispeten hastalığın semptomlarını durdurur ve fiziksel durumu iyileştirir. Hastalığın klasik formuna (IOPD) sahip çocuklarda, hayatta kalma üzerinde de çok net bir etkisi söz konusudur. Bu durum erken tanı ve tedaviyle kalp fonksiyonundaki iyileşmeden kaynaklanmaktadır. Ancak tedavi, hasta kliniklerinde net bir iyileşme sağlayamamakta ve hastalığın prognozu üzerine yeterli etkisi bulunmamaktadır [22,42].

Yerine koyma tedavisinin hasta klinikleri üzerinde yeteri kadar başarı sağlanamaması yeni tedavi arayışı veya var olan tedaviyi geliştirici çalışmalara yol açmaktadır. Çalışılan veya ön görülen birçok alternatif tedavi düşüncesi çizelge 2'de sıralanmıştır.

Tablo 2.2. Pompe hastalığında yürürlükte olan veya düşünülen güncel tedavi stratejileri [46].

1. Enzim replasman tedavisi (ERT) ve enzim geliştirme yoluyla enzim ikmali
a. BisM6P zenginleştirme
i. Sentetik bağlayıcıların kimyasal konjugasyonu yoluyla
ii. CHO hücresinden türetilmiş M6P ve bis-M6P kısımları ile rhGAA'nın klonal seçimi yoluyla
b. IGF-2 reseptörü ile ilgili GILT etiketleme
c. CD63 ve ITGA7 kullanılarak kasa monoklonal antikor yönlendirmeli giriş

2. Küçük molekülü enzim stabilizatörü ile dolaşımdaki rhGAA inaktivasyonunu en aza indirme

3. Endojen GAA'nın üretimi için tam uzunluktaki genin viral dağıtım yoluyla iletilmesi

a. Karaciğer yaklaşımı

b. Kas yaklaşımı

c. İntratekal veya intraventriküler yaklaşım

4. GILT etiketli GAA enzimini ifade etmek için lentiviral bir yaklaşımla hematopoietik (CD34 +) kök hücrelerin (HSC'ler) ex-vivo genetik modifikasyonu

5. IVS birleştirme varyantını iyileştirmek için antisens yaklaşımı

6. Substrat Azaltma tedavisi (SRT)

a. Small molecule approach

b. Antisense approach

Gen tedavisi, Pompe hastalığı için ufukta görünen bir tedavi yöntemidir. Endojen olarak enzimi üretecek olan transgenin aktarımı ile, iki haftada bir kronik ERT tedavisi ihtiyacını ortadan kaldıracağı tahmin edilmektedir. Gen terapilerinin çoğu, transgeni taşıyan entegre olmayan bir vektörün tek seferlik iletimi için adeno ilişkili virüs vektörlerini (AAV) kullanmakta olup bir grup otolog hematopoietik kök hücrelerin lentivirüs güdümlü düzenlemesini içermektedir [47].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Nöroloji polikliniğine başvuran ve çalışmayı kabul eden Pompe ön tanıli dokuz hastadan imzalanmış onam formu ve K3-EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan örneği alınmıştır. Çocuk Nörolojide tedavi gören 2 kardeş Juvenil form Pompe hastası ebeveynlerinin katılmak istememesi sebebiyle çalışmaya dahil edilmemiştir. Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu sonrasında primer tasarımı ve Sanger sekanslama yapılmıştır.

3.1. Enzimatik Yöntem ile Manuel gDNA İzolasyonu

1. 10 ml'lik EDTA'lı tüpe alınan hasta kanları 50 ml'lik falkon'lara aktarıldı.
2. 10 ml kan için her falkona 30 ml liziz tamponu eklendi.
3. Vortexlendi.
4. 15 dakika -20 °C' de inkübe edildi.
5. Tekrar vortexlendi.
6. 1500 rpm'de +4 °C' de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, pellet homojenize edildi.
8. 25 ml liziz tamponu eklenip tekrar vortexlendi.
9. 1500 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant atıldı, pellet homojenize edildi.
11. Sırasıyla; 9,4 ml WBL, 100 µl Proteinaz K(10mg/ml) ve en son 500 µl %10 SDS eklendi.
12. İki faz haline gelen karışım alt üst edilerek yavaşça karıştırıldı.

13. Falkonların ağızı parafin ile kapatıldıktan sonra, 37 °C' de etüvde O/N (bir gece) inkübe edildi.
14. İnkübasyon sonrası karışıma 3,70 ml 9,5M Amac (amonyum asetat) eklendi.
15. İki faz oluşumu gözlenir, el ile vurarak beyaz köpük oluşana kadar karıştırıldı (bu aşamada kesinlikle vortex yapılmaz).
16. 5000 rpm'de 25 °C' de 30 dakika santrifüj edildi.
17. Süpernatant yeni bir falkona alındı ve pellet atıldı.
18. Üzerine 1:2 oranında % 96 (absolute) soğuk EtOH eklendi ve alt-üst edilerek yavaşça karıştırıldı (bu aşamada DNA görünür hale geldi, gelmeyen falkon -20 °C' de 30dk bekletildi).
19. Görünür haldeki DNA, içinde %70' lik soğuk EtOH bulunan ependorfa alındı.
20. 13000 rpm' de RT' da 10 dk santrifüj edildi.
21. Ependorf baş aşağı edilerek alkol döküldü,dipte kalan alkol pellete yaklaşımadan pipetle uzaklaştırıldı.
22. 37 °C' de etüvde ağızı açık halde 5 dakika kurutuldu.
23. 200 µl dH₂O (distile su) ile çözüldü.
24. Nanodrop cihazı ile yoğunlukları ölçüldü.
25. Ependorf'ların parafinle sarıldı ve -20 °C' de muhafaza edildi.

3.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı

1. 4M NACI

23,4 NACI tartılır ve üzerine 100 ml'ye kadar distile su eklenir.

2. EDTA-PH 8

18,60 gram EDTA üzerine 300 ml distile su eklenir ve çözünmesi için tablet NAOH kullanılır

3. Liziz Tamponu

2 litrelik cam kavanoza 16,56 gram amonyum klorit koyulur. Üzerine 2 gram potasyum bikarbonat ilave edilir. Sonrasında 0,5 M 8 ml EDTA (PH:8) eklenir. Bu karışım 2 litreye kadar distile su ile tamamlanır. Şişenin ağzı parafin ile sarılır ve otoklavlanır.

4. WBL

25 ml NACI üzerine 50 ml EDTA eklenir ve bu karışım 925 ml'ye distile su ile tamamlanır.

5. Amonyum Asetat

36,613 gram Amonyum Asetat tartılır ve üzeri 50 ml'ye kadar distile su ile tamamlanır.

6. 10X TBE

216 gram Tribase, 110 gram Borik asit ve 18,6 gram EDTA tartılır. Hazırlanan karışım distile su ile 2 litreye tamamlanır.

3.2. Primer Dizayn

Toplamda 19 kodlama ekzonundan oluşan GAA geni için forward ve reverse olmak üzere 32 primer tasarlanmıştır. Primer tasarımı için NCBI (National Center for Biotechnology Information)' dan yararlanılmıştır. Tasarlanan primerlerden; 2. 3. 4. 5. 9. 12. 13. 16. 17. 18. 19. 20. ekzonlar ayrı olarak, 6-7, 7-8, 10-11, 14-15. ekzonlar birlikte çalışılmıştır.

3.1.1. Primerler

	Primer Adı	Primer Dizisi 5' → 3'
1	GAA_EX2F	CAG CCG CGG TTG ATG TCT C
2	GAA_EX2R	GCC ATT GTC TGC TCA CAC CTC
3	GAA_EX3F	TGA AAAGGT GGG TCA GGT AGA G
4	GAA_EX3R	GGC AAA TCC AAG TGC TGT CG

5	GAA_EX4F	GGT GCG CCT CTT CTG ATA TG
6	GAA_EX4R	TTA GCA GGA ACA CCC CGT G
7	GAA_EX5F	TTT GCG GAC CAG TTC CTT CAG
8	GAA_EX5R	CGG AAA GAT ATG TGG TGC CAG
9	GAA_EX6&7F	GCT GGC ACC ACA TAT CTT TCC
10	GAA_EX6&7R	CGA TCA TCA TGT AGC GCC G
11	GAA_EX7&8F	GTA CCT GGA CGT TGT GGG TA
12	GAA_EX7&8R	ACA GAA CCC TGA GTA GCA CC
13	GAA_EX9F	GCA GGA GTG GAA ACA CAG ACT T
14	GAA_EX9R	GGG CCA TTC CTT GTA GGA GC
15	GAA_EX10&11F	GGG TGA CCC CTC GTT TTC C
16	GAA_EX10&11R	TAG GTC TCC GCT GCA TGG T
17	GAA_EX12F	AGA TGA TTA CCC AGG TTC CCG
18	GAA_EX12R	AGC GGG AGA TCA CAA ATG GG
19	GAA_EX13F	CAC CAG TTT CTC TCC ACA CAC TA
20	GAA_EX13R	GTT CCG CAT GAA GGG GTA GA
21	GAA_EX14&15F	CCC ATT TGT GAT CTC CCG CT
22	GAA_EX14&15R	CTC CTC GTG TGT ACT ACG GC
23	GAA_EX16F	ACC GGA GGA TAA GTG AGC GA
24	GAA_EX16R	TTG AGG ATT CTG GGC CGT G
25	GAA_EX17F	CGT ATG TGT TGA GTC CCG GC
26	GAA_EX17R	GAT AAC CTA CAC TGC GGG GG
27	GAA_EX18F	CCC CGC AGT GTA GGT TAT CAA
28	GAA_EX18R	TGT GTA CAC GAA AGG GCA GAG

29	GAA_EX19F	GGA GCT GTT CTG GGA CGA TG
30	GAA_EX19R	CGG CTC AGA GGT CGT CAT TG
31	GAA_EX20F	ACA ATG ACG ACC TCT GAG CC
32	GAA_EX20R	CTC TCC TAG ACA CGT TGG GG

3.3. PCR

3.3.1. Sequline Touchdown-PCR

1. İlk olarak bir PCR mix hazırlandı

1.1. PCR Mix

1X		
PCR MIX	2x Master Mix	5 µl
	PCR Optimizer	1 µl
	dH ₂ O	1 µl

2. Mix hazırlandıktan sonra çalışılan örnek sayısı kadar pcr tüpüne 7 µl'den dağıtıldı.
3. Sonrasında primerleri aynı tüpe (F ve R) 1'er µl dağıtıldı.
4. Her tüpe 1 µl dilüe DNA eklendi. (Yoğunluğu 350-400 ng olan DNA 1/10 oranında distile su ile dilüe edilmiştir)
5. Ardından altta belirtilen koşullarda PCR cihazına yüklendi. (Total 10 µl)

Evre	Sıcaklık	Zaman	Döngü
1	95 °C	2 dakika	1
	95 °C	30 saniye	
2	70 °C	1 dakika	20
	72 °C	50 saniye	
3	95 °C	20 saniye	20
	55 °C	30 saniye	
	72 °C	25 saniye	
4	72	7 dakika	1
5	4 °C	∞	1

3.3.2. Jel Elektroforezi

PCR örneklerinin amplifikasyon'unu teyit etmek için jel elektroforezi yapıldı.

- 1 Bir cam beher içerisine 100 µl 1 x TBE Buffer (Tris Borate-EDTA) koyuldu.
- 2 Üzerine 3 gram toz agaroz eklendi.
- 3 Yaklaşık 4 dakika (karışım berrak bir hal alana kadar) mikro dalgada eritildi.
- 4 Karışıma 10 µl EtBR (Etidyum Bromür) eklendi.
- 5 Tanka döküldü ve 40 dakika donması beklendi.
- 6 Donan jel üzerine; 1 µl Bromophenol blue boya ve 2 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi.
- 7 120 volt da 12 dakika yürütüldü.
- 8 Örnek görüntüleme cihazında analiz edildi.

3.3.3. Exosap -PCR

1. PCR örneklerine tüp değişikliği yapılmadan 1,5 µl exosap eklendi (her örnekte pipet ucu değiştirilir).
2. Spin ve vorteks yapıp PCR cihazına yüklendi.

EVRE	SICAKLIK	ZAMAN	DÖNGÜ
1	37 °C	30 dakika	1
2	85 °C	15 dakika	1
3	4 °C	∞	1

3.4. Sanger Sekanslama

3.4.1. Bigdye-PCR

1. Bu aşama da her tüp F ve R olmak üzere ikiye ayrıldı (Her ekzon için F ve R olmak üzere 2 PCR tüpü hazırlanır).
2. Master mix hazırlandı ve 6 µl'den tüplere dağıtıldı.

1X		
MASTER MIX	dH ₂ O	3 µl
	5x Terminatör Buffer	2 µl
	Terminatör Mix	1 µl

3. Primerler 2 µl'den tüplere dağıtıldı (her tüpte farklı pipet ucu kullanılır).
4. Exosap'dan çıkan PCR ürünleri 2 µl'den her tüpe ayrı ayrı dağıtıldı.
5. Vorteks ve spin yapıp PCR cihazına yüklendi.

EVRE	SICAKLIK	ZAMAN	DÖNGÜ
1	96	1 Dakika	1
2	96 °C	10 Saniye	25
	50 °C	5 Saniye	
	60 °C	4 Dakika	
3	4 °C	∞	1

3.4.2. Pürifikasyon

1. Bigdye'dan çıkan ürünler strip tüplere alındı.
2. 10 µl Clean-DTR (EYS CDTR-0005) eklendi.
3. 42 µl % 85'lik etanol eklendi.
4. Pipetaj yapılarak homojenize edildi ve 1 dakika beklendi.

5. Strip tüpleri manyetik rak üzerine alındı ve 2 dakika bekletildi.
6. Manyetik rak üzerinde pellet'e zarar vermeden süpernatant (alkol) çekilip atıldı.
7. Pelletin üzerine 95 µl %85'lik etanol eklendi.
8. Manyetik rak üzerinde 7 tekrar sağ-sol yaparak yıkama yapıldı.
9. 15 saniye rak üzerinde beklettikten sonra alkolü çekip atıldı.
10. Tekrar 95 µl %85'lik etanol eklendi.
11. Manyetik rak üzerinde 7 tekrar sağ-sol yaparak yıkama yapıldı.
12. 15 saniye rak üzerinde beklettikten sonra alkolü çekip atıldı.
13. Dipte kalan alkol 10'luk pipet ile temizlendi.
14. Manyetik stanttan alınıp her kuyucuğa 35 µl dH₂O eklenip pipetaj yapıldı.
15. Oda ısısında 5 dakika bekletildi.
16. Manyetik stant'a alınıp 3 dakika bekletildi.
17. Manyetik stant üzerinde süpernatant, multichannel ile MicroAmp 96 kuyucuklu optik plaklara (Applied Biosystems) 35 µl'den aktarıldı.
18. Optik plak, 16 kapillerli ABI 3130xL Genetik Analyzer cihazına tanıtıldı ve kapiller elektroforez işlemi başlatıldı.

Cihazın Modeli	Yürütme e tamponu	Kullanılan Polimer	Kapiller	Yürütülen Program
ABI3130xLGenetikAnalizer	EDTA	Pop7TM	36 cm	Rapidseq3 6 Sekans Analizi

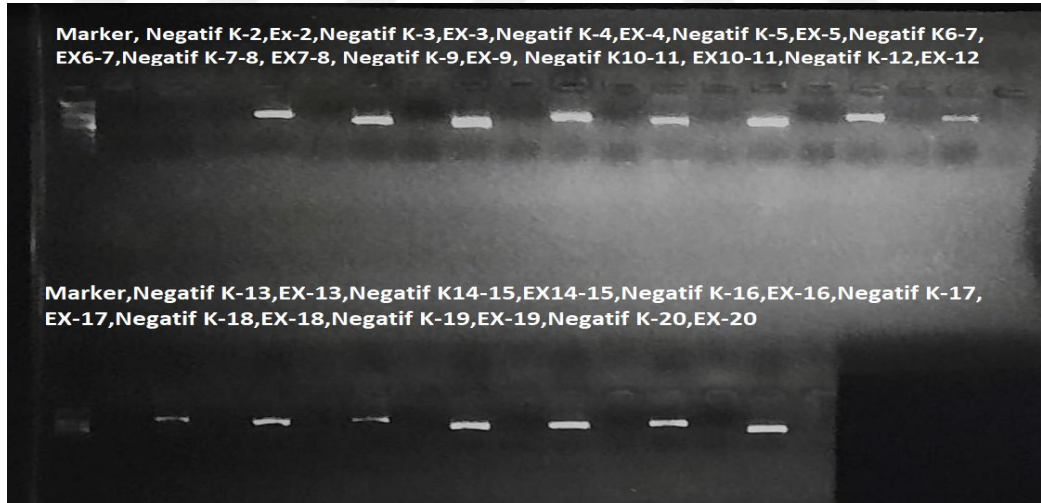
Alınan sekans sonuçları, Chromas Lite 2.5 programında görüntülendi ve değerlendirildi. NCBI (National Center For Biotechnology Information) veri tabanı baz alınarak blast ve analiz işlemleri yapıldı. Bulunan varyasyonların patojenite durumları ClinGen, Clinvar, Varsome, Fraklin, Ensembl, dpSNP ve OMIM de incelendi, ACMG kriterleri de göz önüne alınarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Araştırmada, GAA gen mutasyonları sonucu asit- α -glukosidaz enzim eksikliğine bağlı gelişen Pompe ön tanılı 9 hastada Sanger sekanslama yapılmıştır. Çalışmaya mutasyon analizleri ile tanı anında ve hastalığın takibi süresince kaydedilen cinsiyet, yaş, aile öyküsü, Biyokimyasal testler (CK, AST, ALT, LDH) ve klinik bulgular dahil edilmiştir.

4.1.Jel Elektroforez Sonuçları

PCR aşaması süresince DNA'nın doğru bir şekilde çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek amacı ile agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Hastalarda 19 ekzon çalışılmış ve toplamda forward ve reverse olmak üzere 32 primer kullanılmıştır. Çalışılan bu 19 ekzondan ekzon-6&7, 7&8, 10&11 ve 14&15 beraber çalışılmış ve her biri için tek primer kullanılmıştır. Şekil 1 ve şekil 2 de bazı hastaların jel elektroforez sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.1: PCR ürünlerinin (Ekzonlar ve negatif kontrol ekzonlar) jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.2: PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.

4.2.Klinik Bulgular

Tablo 4.1: Hastaların klinik özellikleri ve tedavi süreleri.

HASTA	YAŞ	CİNS	AKRABA EVLİLİĞİ	AİLE ÖYKÜSÜ	POMPE FORMU	TEDAVİ SÜRESİ (YIL)
HASTA 1	47	K	Var	Pompe	LOPD	5
HASTA 2	44	E	Var	Pompe	LOPD	9
HASTA 3	42	E	Var	Pompe	LOPD	3
HASTA 4	41	E	Var	Pompe	LOPD	9
HASTA 5	9	E	Yok	Yok	IOPD	9
HASTA 6	49	K	Var	Pompe	LOPD	10
HASTA 7	4	K	Yok	Yok	IOPD	4
HASTA 8	21	E	Yok	Yok	LOPD	2
HASTA 9	73	K	Var	Yok	LOPD	12

Çalışılan hastaların altısında akraba evliliği ve aile öyküsünde Pompe tanısı bulunmaktadır. Hastalardan hasta 1, hasta 2, hasta 3 ve hasta 4 geç başlangıçlı Pompe (LOPD) tanısı alan kardeş hastalardır (**Tablo 4.1**). Bu hastaların anne ve babasında mutasyon taşıyıcılığı teyit edilmiştir. Hastalık dört kardeşte de 30 yaş sonrası ortaya çıkmıştır. Pompe tanılı hastalardan hasta 5 ve hasta 7 üç aylıkken tanı almış İnfantil

başlangıçlı Pompe (IOPD) hastalarıdır. Benzer olarak bu hastalarda akraba evliliği olmamak ile aile öyküsünde herhangi bir genetik hastalık bulunmamaktadır (**Tablo 4.1**).

Tablo 4.2: Hastalarda izlenen biyokimyasal analiz sonuçları.

Hasta	AST (Asspartat Aminotransferaz)	LDH (Laktat Dehidrogenaz)	CK (Serum Kreatin Kinaz)	ALT (Alanin Aminotransferaz)
Hasta 1	-	-	↑	↑
Hasta2	↑	↑	↑	↑
Hasta 3	-	-	-	↑
Hasta 4	↑	-	↑	↑
Hasta 5	↑	-	↑	↑
Hasta 6	↑	-	↑	↑
Hasta 7	↑	-	↑	↑
Hasta 8	↑	-	↑	↑
Hasta 9	↑	-	↑	-

Hastaların biyokimyasal analiz sonuçlarına göre karaciğer ile ilişki enzimlerden AST, ALT ile birlikte total CK seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (**Tablo 4.2**). Laktat Dehidrogenaz enzimi birçok hastada normal değerde olmasına rağmen hasta 2 de artış gözlemlenmiştir (‘↑’: Normal değerın üzerinde, ‘-’: Normal değer aralığında) (**Tablo 4.2**).

Tablo4.3: Hastalarda gözlenen klinik bulgular.

Hasta	Proksimal Kas Güçsüzlüğü	Hepatomegali	Kardiyomegali	Solunum Güçlüğü	Yaş
Hasta 1	+	-	+	-	47
Hasta 2	+	-	-	+	44
Hasta 3	+	-	-	+	42
Hasta 4	+	-	-	-	41
Hasta 5	+	-	+	+	9
Hasta 6	+	-	-	+	49
Hasta 7	+	-	+	+	4
Hasta 8	+	-	-	-	21
Hasta 9	+	+	+	-	73

Hastalara ait klinik bulgulara, proksimal kas güçsüzlüğünün tüm hastalarda gözlemlendiği görülmektedir (**Tablo 4.3**). Kardiyomegali infantil başlangıçlı (IOPD) hastalar ile (Hasta 5, Hasta 7) Hasta 1 ve Hasta 9 olmak üzere iki LOPD hastasında da belirti vermektedir. Solunum güçlüğü şikâyeti beş hastada kaydedilmiştir. Bu hastalardan Hasta 6 trakeostomi 'ye bağlı yaşamakta ve hastalık prognozu diğer hastalara nazaran ağır seyretmektedir. Hepatomegaliye ait belirtiler sadece Hasta 9 da kaydedilmiştir ('+': Klinik bulgu var, '-': Klinik bulgu yok) (**Tablo 4.3**).

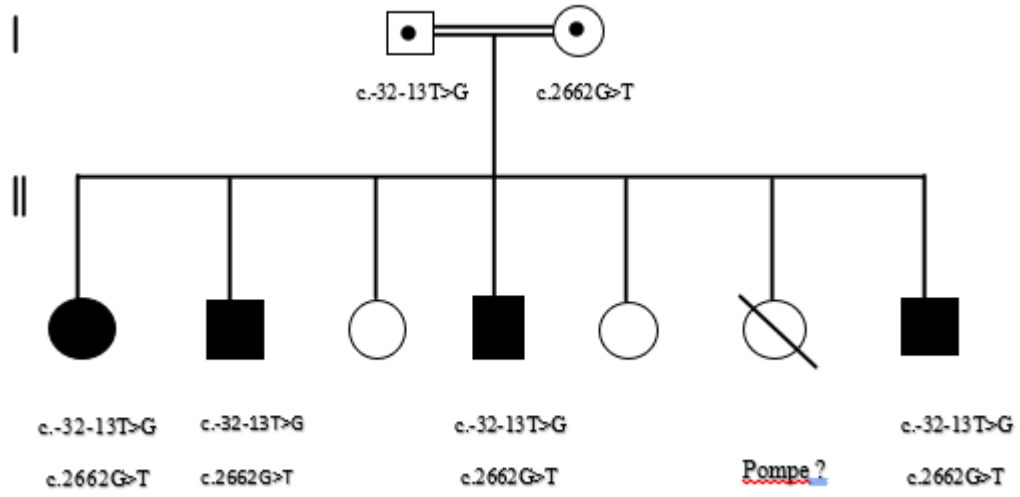
4.3.Hastalarda Saptanan Patojenik Varyantlar ve Polimorfizmler

Tablo 4.4: Analiz sonucu saptanan patojenik varyantlar.

HASTA	VARYANT	AMİNOASİT DEĞİŞİMİ	EKZON /İNTRON	HETEROZİGOT / HOMOZİGOT	RS NUMARASI
Hasta 1	c.-32-13T>G	-	İntron-1	Heterozigot	386834236
Hasta 1	c.2662G>T	p.Glu888Ter	Ekzon-19	Heterozigot	765718882
Hasta 2	c.-32-13T>G	-	İntron-1	Heterozigot	386834236
Hasta 2	c.2662G>T	p.Glu888Ter	Ekzon-19	Heterozigot	765718882
Hasta 3	c.-32-13T>G	-	İntron-1	Heterozigot	386834236
Hasta 3	c.2662G>T	p.Glu888Ter	Ekzon-19	Heterozigot	765718882
Hasta 4	c.-32-13T>G	-	İntron-1	Heterozigot	386834236
Hasta 4	c.2662G>T	p.Glu888Ter	Ekzon-19	Heterozigot	765718882
Hasta 5	c.1064T>C	p.Leu355Pro	Ekzon-6	Heterozigot	766074609
Hasta 5	c.2662G>T	p.Glu888Ter	Ekzon-19	Heterozigot	765718882
Hasta 6	c.-32-13T>G	-	İntron-1	Heterozigot	386834236
Hasta 6	c.2662G>T	p.Glu888Ter	Ekzon-19	Heterozigot	
Hasta 7	c.670C>T	p.Arg224Trp	Ekzon-3	Heterozigot	757700700
Hasta 8	c.-32-13T>G	-	İntron-1	Heterozigot	386834236
Hasta 8	c.2417_2418insG	p.Leu807AlanfsTer77	Ekzon-17	Heterozigot	879255207
Hasta 9	BULUNAMADI	-	-	-	-

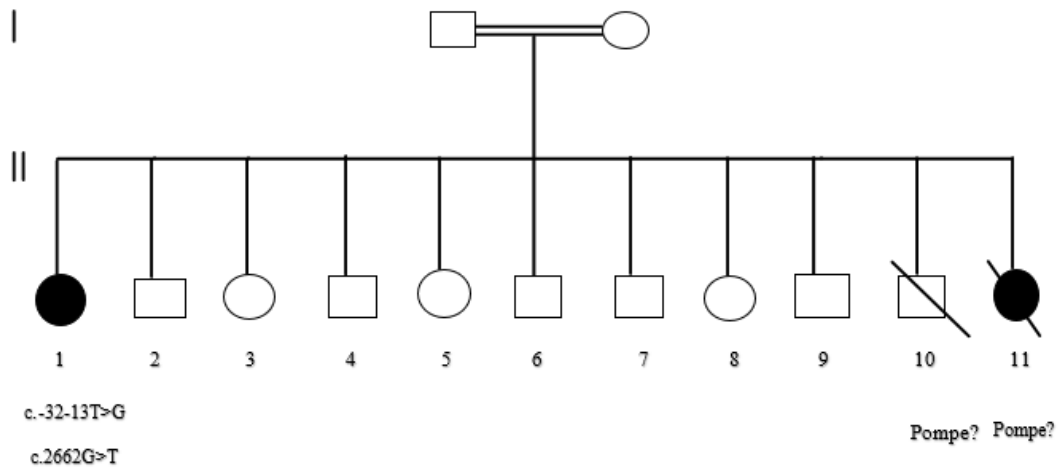
Hastalardan altısında heterozigot c.-32-13T>G varyantı saptanmıştır. Bu hastalardan beşinde ortak olmak üzere altı hastada da heterozigot c.2662G>T varyantı saptanmıştır. İnfantil başlangıçlı hastalardan Hasta 5 de c.1064T>C, Hasta 7 de c.670C>T heterozigot varyantları saptanmış ancak Hasta 7 de başka varyant bulunamamıştır (**Tablo 4.4**).

Hastalardan Hasta 8 de c.-32-13T>G ile homozigot c.2417_2418insG varyantı saptanmıştır. Hastalardan Hasta 9 da herhangi bir varyant saptanmamıştır (Tablo 4.4).



Şekil 4.4: Kardeş olan Hasta 1, Hasta 2, Hasta 3, ve Hasta 4’ün aile pedigrisi.

Hastalardan Hasta 1, Hasta 2, Hasta 3, ve Hasta 4 Pompe tanısı almış dört kardeşdir. Anne ve babası akraba ve Pompe mutasyon taşıyıcısı olan yedi kardeşten (Anne- c.-32-13T>G, baba- c.2662G>T) biri sebebi bilinmeyen bir nedenden bir yaşına gelmeden kaybedilmiştir (Şekil 4.4).



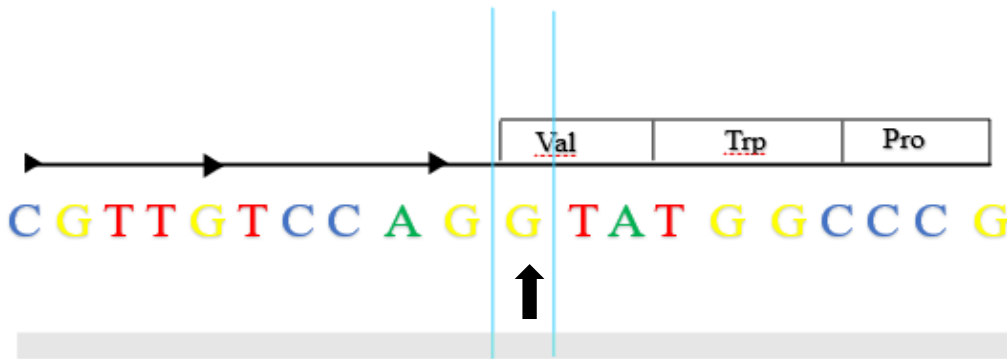
Şekil 5: Hasta 6’nın aile pedigrisi.

Ebeveynleri akraba olan hasta 6'nın Pompe tanılı kardeşlerinden bir tanesi II.11 40'lı yaşlarında, olası Pompe olabileceği düşünülen bir kardeşi ise II.10. dokuz yaşlarında kaybedilmiş. Ailede başka Pompe tanısı bulunmamaktadır.

Tablo 4.5: Analiz sonucu saptanan ancak klinik önemi bilinmeyen mutasyonlar.

HASTA	VARYANT	EKZON/ İNTRON	HETEROZİGOT/ HOMOZİGOT	RS	KLİNİK ÖNEM
HASTA 5	c.1438G>A (p.Val480Ile)	Ekzon-10	Heterozigot	769574574	Uncertain Significance
HASTA 7	c.2069C>T (p.Pro690Leu)	Ekzon-15	Heterozigot	532624326	Uncertain Significance

Analiz sonucunda; infantil başlangıçlı Pompe hastası olan Hasta 5 de iki heterozigot patojenik varyant dışında, klinik önemi bilinmeyen heterozigot c.1438G>A (p.Val480Ile) varyantı saptanmıştır. Hasta 7 de, saptanan tek heterozigot c.670C>T varyantı dışında bir tane de klinik önemi bilinmeyen c.2069C>T (p.Pro690Leu) varyantı saptanmıştır (Tablo 4.5).

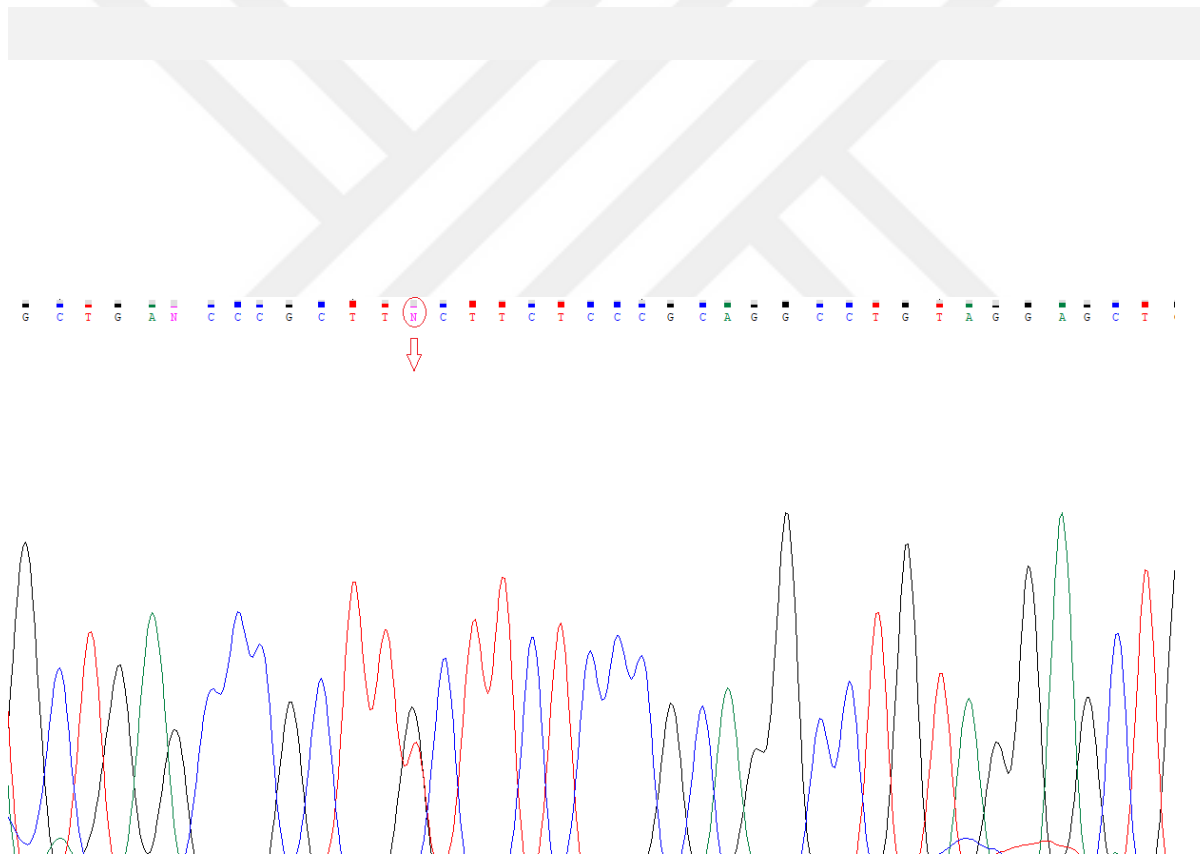


Şekil 4.6: Klinik önemi bilinmeyen heterozigot c.1438G>A (p.Val480Ile) varyantının bulunduğu intron ve ekzon birleşim yerinin gösterimi.

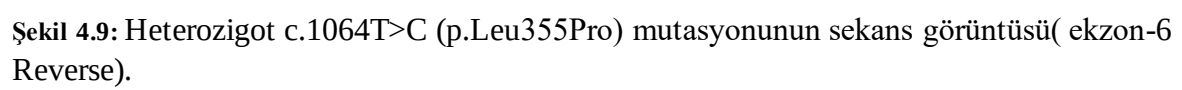
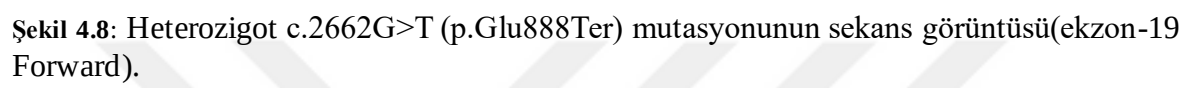
Tablo 4.6: Analiz sonucu saptanan Polimorfizmler.

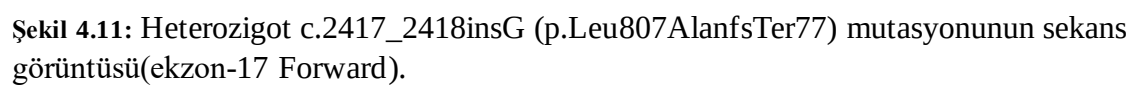
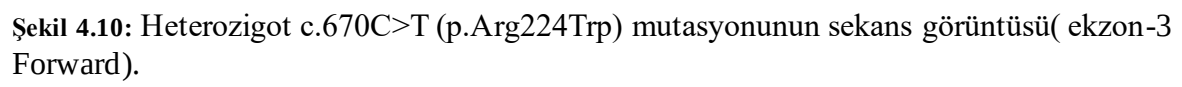
Varyantlar	RS	Klinik Önem	Ekzon/İntron	Hasta
c.324T>C (p.Cys108=)	1800300	benign	EX-2	1,2,3,6,7,8
c.547-67C>G	8069491	benign	İNT-3	1,2
c.547-39T>G	12452721	benign	İNT-3	1,2,4,6
c.547-4C>G	3816256	benign	İNT-3	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.596A>G(p.His199Arg)	1042393	benign	EX-3	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.642C>T (p.Ser214=)	1800301	benign	EX-3	8,9
c.668G>A (p.Arg223His)	1042395	benign	EX-3	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.692+144A>G	2304847	benign	İNT-3	1
c.801G>T(p.Leu267=)	novel	Likely benign	EX-4	7
c.858+7_858+8insA	372331052	Likely benign	İNT-4	4,8
c.858+8G>A	5822325	Likely benign	İNT-4	1,4,6,7,8
c.858+23_858+24insC	768125567	Likely benign	İNT-4	6,8
c.858+30T>C	2304845	benign	İNT-5	1,4,8
c.955+12G>A	2252455	benign	İNT-5	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.956-107G>A	2241888	benign	İNT-5	1
c.956-84C>T	2241887	benign	İNT-5	1
c.1203G>A (p.Gln401=)	1800304	benign	EX-8	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.1327-18A>G	2278619	benign	İNT-8	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.1438-32G>A	199897967	benign	İNT-10	9
c.1438-19G>C	2304844	benign	İNT-10	7
c.1551+49C>A	2304843	benign	İNT-10	7
c.1581G>A (p.Arg527=)	1042396	benign	EX-11	7
c.1636+43G>T	2304842	benign	İNT-11	1,2,4
c.2040+20A>G	2304836	benign	İNT-14	1,2,3,4,6,8,9
c.2041-64G>A	2304833	benign	İNT-14	8,9
c.2067G>A	2039287419	benign	EX-15	7
c.2133A>G (p.Thr711=)	1800310	benign	EX-15	8,9
c.2190-53C>G	190988996	benign	İNT-16	9

c.2331+20G>A	2304832	benign	İNT-16	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.2331+24T>C	2304831	Likely benign	İNT-16	1,2,4,6,9
c.2332-198A>T	2304830	benign	İNT-16	1,4
c.2332-16C>T	2039383167	benign	EX-17	7
c.2338G>A (p.Val780Ile)	1126690	benign	EX-17	1,2,3,4,5,6,7,8,9
c.2446G>A (p.Val816Ile)	1800314	benign	EX-17	1,2,3,4,5,6,8,9
c.2553G>A (p.Gly851=)	1042397	benign	EX-18	5,7,8,9
c.2647-71G>C	4889821	Likely benign	İNT-18	1,2,3,4,9
c.2780C>T (p.Thr927Ile)	1800315	benign	EX-19	9
c.*3G>A	1800317	benign	EX-20	1,2,3,4,5,6,9



Şekil 4.7: Heterozigot c.-32-13 T>G mutasyonunun sekans görüntüsü (ekzon-2 Forward).





5. TARTIŞMA

Pompe hastalığı, lizozomal enzim asit- α -glukosidaz (GAA) eksikliğinin neden olduğu, yaygın olarak kalpte, iskelette ve düz kasta lizozomal glikojen birikimine yol açan otozomal resesif bir hastalıktır. GAA genindeki mutasyonlar glikojeni parçalayan asit alfa glukosidazın azalmış aktivitesi veya yokluğu ile sonuçlanır. Klinik durum ve hastalığın ciddiyeti birincil olarak GAA enzim aktivitesinin miktarı ile belirlenir ve klinik bulguları ciddi düzeyde olan hastalarda genellikle saptanabilir bir enzim aktivitesi gözlenmemektedir [8,9]. Çalışmamızda dördü kardeş olmak üzere dokuz hastada Sanger sekanslama yöntemi kullanılarak mutasyon analizi yapılmıştır.

Bu hastalardan ikisi IOPD (İnfanıl form) ve yedisi LOPD (Geç başlangıçlı form)'dir (Tablo-1). LOPD'li hastalar polikliniğe genellikle merdiven çıkmada zorluk, kas ağrıları, çabuk yorulma ve solunum güçlüğü şikayetleri ile başvurmuşlardır. IOPD'li iki hasta yaklaşık üç aylıkken başını dik tutamama, sağa-sola dönememe ve emmede güçlük şikayetleri ile polikliniğe başvurmuşlardır.

Çalışmada beş farklı patojenik heterozigot mutasyon saptanmıştır. Altı hastada intron-1 de c.-32-13T>G heterozigot varyantı saptanmıştır. Dünya genelinde Pompe hastalığında en sık c.-32-13T >G(IVS1) varyantı bildirilmiştir. Bu varyant, asit alfa glukozidaz'ın eksik ifadesi ile sonuçlanmakta ve geç başlangıçlı Pompe (LOPD) ile ilişkilendirilmektedir. Sıklıkla daha ağır gen mutasyonu ile kombine bileşik heterozigot formda görülmektedir [48]. Varyant c.-32-13T>G, altı LOPD hastamızda saptanmış olup beş hastada heterozigot c.2662G>T varyantı ile birleşik heterozigot olarak görülmektedir. Altı hastada c.2662G>T(p.Glu888Ter) heterozigot varyantı saptanmıştır (Çizelge 4). Varyant c.2662G>T, genin 19. ekzonun da yer almakta ve mRNA'nın erken sonlanması ile sonuçlanmaktadır. Bu erken sonlanma sonucu işlevsiz bir protein oluşmaktadır ve bu sebep ile varyant genellikle IOPD ile ilişkilendirilmektedir. Ülkemiz de 2020 yılında yapılan bir çalışmada GAA mutasyon analizi ve asit alfa-glukozidaz enzim düzeyleri ile tanı alıp takibe giren 42 infanıl Pompe hastasından sekizinde p.L299P c.896T>C varyantı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ayrıca Supraventriküler taşikardi ile ilişkilendirilen c.2662G>T varyantı saptanmıştır [49]. Bu varyant çalışmamızda beş LOPD hastasına ek olarak bir IOPD (hasta-5) hastamız da saptanmıştır. Benzer olarak bu IOPD hastasında da kardiyak anomalisi görülmektedir. Bir IOPD hastamızın 6. ekzonunda c.1064T>C(p.Leu355Pro) heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Varyant c.1064T>C (p.Leu355Pro), lösin aminoasitini prolin ile değiştirmekte

ve hatalı gen ürünü ile sonuçlanmaktadır. Bu varyant bir IOPD hastamızda c.2662G>T ile birleşik heterozigot olarak görülmekte ve IOPD ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hastalardan birinin ise 17. Ekzonunda c.2417_2418insG(p.Leu807AlafsTer77) adında daha önce tanımlanmamış yeni (novel) bir patojenik varyanta rastlanmıştır(Çizelge 4). Bu çerçeve kayması varyantı, daha küçük bir gen ürünü ile sonuçlanmaktadır. Hasta 7’de heterozigot c.670C>T(p.Arg224Trp) varyantı saptanmıştır. Varyant c.670C>T (p.Arg224Trp), GAA enzimatik aktivitesini engellemektedir ve bir IOPD hastasında tek heterozigot patojenik varyant olarak görülmektedir. Hasta 9’da ise herhangi bir varyant saptanamamıştır (bu olguda ekzon 2 sekans sonuçları okunamadı). Klinik açıdan Pompe tanısı almış olmasına rağmen çalışmamızda herhangi bir patojenik varyant tanımlanamamış olması varyantın kullanılan primerler tarafından kapsanmayan bir bölgede örneğin genin ekzon 2 bölgesinde, promotör bölgesinde ya da derin intronik bölgede olabileceğini düşündürmektedir. Mutasyon bulunamayan hastalar ayrıca, PCR’a dayalı yöntemlerle saptanamayan büyük boyutlu değişimler (CNV) bakımından da değerlendirilmelidir. Bu tür değişimler Multipleks Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) gibi bir yöntemle saptanabilir. Olgulardaki mutasyonların belirlenmesi ailelerde de taşıyıcı bireylerin belirlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Taşıyıcı bireyler tanımlanması çocuk sahibi olmak istediklerinde preimplantasyon genetik tanı ve prenatal genetik tanı seçenekleri ile genetik danışma verilebilmesi bakımından önem taşımaktadır.

İki infantil Pompe hastası olan hasta 7 de ve hasta 5 de klinik önemi bilinmeyen iki varyant saptanmıştır (Tablo-5). Bu varyantlardan c.1438G>A (p.Val480Ile), çok nadir görülmek ile birlikte Varsome verilerine göre PP3 skoru 11’dir (scSNV-ADA=0,99856-0,957813). Ayrıca bu varyantın intron ve ekzon birleşme bölgesinde olduğu için splicing’i etkilediği düşünülmektedir. Bu varyant için fonksiyonel çalışmaların yapılması ve aile içi segradasyon’un gösterilmesi gerekmektedir. Bir diğer klinik önemi bilinmeyen ve oldukça nadir görülen c.2069C>T varyantı ise, varsome verilerine göre muhtemel benign olarak Franklin’de ise VUS olarak bildirilmiştir. Bu iki varyantın da çok nadir gözlenmesi ise olası patojeniteyi desteklemektedir [50]. Bu durum ekzon 10 da c.1438G>A (p.Val480Ile) ve ekzon 15 de görülen c.2069C>T (p.Pro690Leu) görülen ve klinik önemi bilinmeyen iki varyantın, enzim defektine yol açabilecek bir patojeniteye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada analiz sonucunda 38 farklı polimorfizm saptanmıştır (Çizelge 6).

Özellikle İnfantil başlangıçlı Pompe hastalığında (IOPD) gözlenen kardiyomiyopatinin, neredeyse hiç GAA aktivitesi olmayan vakalarda ortaya çıktığı öne sürülmektedir [20,21]. LOPD'li hastalar sıklıkla azalmış A α Glu aktivitesi geliştirirler, bu olgularda iskelet kası zayıflığı ilerlemesi daha yavaştır ve nadiren kalp kası tutulumu gösterirler [1,51]. Genellikle İnfantil Pompe ile ilişkilendirilen kardiyomegali, hastalarımızdan IOPD (İnfantil Pompe formu) olan iki hasta haricinde LOPD'li iki hastada da gözlenmiştir. Bu durumun, hastalığın tanıda ilerlemiş olmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu hastalardan hasta 6 trakeostomi'ye bağlı yaşamakta ve hastalık prognozu diğer hastalara nazaran ağır seyretmektedir. Hepatomegaliye ait belirtiler sadece hasta 9 da kaydedilmiştir (Çizelge 3). Hastalarımızdan hasta 9, 12 yıldır enzim replasman tedavisi almakta ve klinik bulgularında proksimal kas güçsüzlüğü, hepatomegali ile kardiyomegali de gözlenmektedir. Hasta da gözlenen biyokimyasal ve klinik bulgular, Pompe hastalığının yanı sıra hastanın yaşı (73) ile de ilişkilendirilebilir.

Hastaların %90'ında karaciğer ile ilişkili enzimlerden AST (Aspartat Aminotransferaz), CK (Serum Kreatin Kinaz), ALT (Alenin Aminotransferaz) değerlerinde artış görülmüştür. LDH (Laktat Dehidrogenaz) değeri hasta iki hariç normaldir. Hastalar iki ile 12 yıl arasında değişen sürelerdir iki haftada bir olmak üzere enzim replasman (ERT) tedavisi almaktadırlar (Tablo 2). Serum Kreatin Kinaz (CK) düzeyi Pompe hastalarının tanı ve takibinde kullanılan önemli bir laboratuvar parametresidir [52]. Çalışmada hastaların CK (Serum Kreatin Kinaz) düzeylerinin tanıda ve son kontroldeki değerleri karşılaştırıldığında herhangi bir gerileme olmadığı görülmüştür. ERT alan hastaların tedaviye rağmen CK seviyelerindeki yüksekliğin devam etmesi, iskelet kasında tam bir iyileşme olmadığını ve etkilenim sürecinin hala devam ettiğini düşündürmektedir (Çizelge-2). IOPD (Klasik infantil form) ve LOPD (geç başlangıçlı form) hastalarının biyokimyasal sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo-2). Tedavi özellikle IOPD hastalarında yaşam süresini uzatmış ve klinik bulguları nispeten hafifletmiş olsa da uzun sürelerdir alınan bu yere koyma tedavisi tam bir iyileşme sağlayamamıştır.

Enzim Replasman tedavisi (ERT), hem IOPD hem de LOPD tedavisi için mevcut olan tek tedavidir. Hastalar erken tanı ve tedaviden ciddi oranlarda fayda görmüş, yaşam süreleri uzamış ve komplikasyon görülme sıklığı azalmıştır. Ancak ne yazık ki, ERT'ye rağmen bazı hastalar yaşamın ilk yıllarında kaybedilmektedirler. ERT, kardiyak patolojisinde hayatta kalmak üzerine etkili olsa da iskelet ve düz kas üzerinde daha az etkili ve merkezi sinir sistemi üzerinde ise iyileştirici herhangi bir etkisi bulunmamaktadır [22,42]. ERT'nin

merkezi sinir sistemini (CNS) etkileme yeteneği başta olmak üzere hala önemli eksiklikleri bulunmaktadır. Pompe hastalığı, merkezi sinir istemi dahil olmak üzere vücutta dağılmış daha büyük miktarlarda fonksiyonel rekombinant insan GAA proteini gerektirmektedir. Tedavinin hasta klinikleri ve hastalığın prognozu üzerinde yetersiz kalması alternatif tedavi arayışını gündeme getirmektedir. Pompe hastalığı için birçok tedavi yöntemi üzerinde araştırmalar yapılsa da en çok beklenti gen terapisi üzerinedir. Hastalığın önlenmesi, durdurulması veya tersine çevrilmesi için potansiyel çözümün, gen tedavisi olduğu düşünülmektedir. AAV (Adeno-ilişkili Virüs) vektörleri veya LV HSPC aracılı gen terapisi ile, etkinliği arttırmak için transgen ürününün iyileştirilmiş biyoyararlanımını sağlayabileceği öngörülmektedir. [20,53].

Gen terapisinin Pompe hastalığı için umut vadeden bir tedavi olduğu düşünülmektedir. Ancak, şimdiye kadar yapılan prelinik ve klinik çalışmalar ümit verici olsa da Pompe hastalığı için gen terapisinde ele alınması gereken önemli engeller mevcuttur. Daha iyi bir hedefleme için yeni kapsitler geliştirilmeli ve optimize edilmiş DNA vektörleri gibi engeller üzerinde çalışılmalıdır [54].

GAAaktivitesinin eksikliği, özellikle iskelet kası ve kalp dokusu olmak üzere tüm dokularda intra-lizozomal glikojen depolanması ile sonuçlanmakta ve ayrıca, iskelet kası liflerinde otofajik materyal artışı gözlenmektedir. Otofaji, hücre içi bileşenlerin bozulmasına yol açan, evrimsel olarak korunmuş bir katabolik süreçtir. Otofajik süreç, lizozomal bozulma için hücre içi sitozolik bileşenleri hedefler ve bu sebep ile Pompe hastalığı için oldukça önemlidir [55].

Glikofaji modifikasyonunun, Pompe hastalığında ve diyabetik kardiyomiyopatide önemli bir yer aldığı bildirilmiştir. Glikofaji, IOPD (İnfanfil Pompe form) hastalarında endoplazmik retikulumun stres kaynaklı otofajisinin, fibroblastlarda AKT'nin etkisizleştirilmesiyle indüklendiği 2012 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [38,51]. İki yıl sonra, Shemesh ve meslektaşları, IOPD hastalarının derisinden izole edilen GAA yıkımlı miyoblastlarda (C2C12) ve GAA eksikliği olan fibroblastlarda mTORC1 aktivasyonunda önemli bir düşüş gözlemlemişlerdir. Bu veriler, mTORC1 aktivasyonundaki azalmanın glikofaji'yi indükleyebileceğini göstermektedir. Buradan yola çıkarak Pompe hastalığı için alternatif tedavi veya ERT'nin geliştirilmesi konusunda otofajinin dikkate alınması oldukça önemlidir [52, 55]. Olgularda mutasyonların belirlenmesi ve böylelikle toplumun mutasyon profillerinin ortaya çıkarılması da daha sonra üretilecek gen tedavisi yaklaşımlarına fayda

sağlayacaktır. SMA hastalığında olduğu gibi mutasyon tipine özgü olarak tasarlanabilecek gen tedavi yaklaşımlarında olguların mutasyonlarının önceden bilinmesi ve buna göre tedavi planlarının oluşturulması değerlendirilebilir.

Ülkemizde Pompe hastalığının sıklığını gösteren herhangi bir toplum tabanlı çalışma bulunmamaktadır. Otozomal resesif kalıtım gösteren Pompe'nin görülme sıklığı kız ve erkeklerde benzer oranlardadır. Çalışmamız kısıtlı sayıda olguyu içermekle birlikte, çalışmaya katılan dokuz hastamızdan dördü kadın, beşi erkek olmak üzere cinsiyete göre hastalığın görülme sıklığının benzer oranlarda olduğu düşünülmektedir [49]. Ülkemizde akraba evliliğinin yüksek oranlara sahip olduğu düşünüldüğünde Pompe Hastalığının Türkiye genelinde nispeten daha sık bir prevalansa sahip olduğu ve akraba evliliğinin düşük olduğu ülkelere kıyasla daha sık görülebileceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle de toplumda ailelerin ve mutasyonların belirlenmesi ve genetik danışma verilmesi önem oluşturmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmaya dahil edilen 9 hastada toplam beş heterozigot patojenik varyant saptanmıştır. Bu varyantlardan biri yeni (novel) bir varyanttır. IOPD tanılı hastalarda klinik önemi bilinmeyen iki varyant saptanmıştır. Bu varyantlardan biri intron ve ekzon birleşim bölgesinde yer almakta ve splicing ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca varyantların oldukça nadir görülmesi olası patojeniteyi düşündürmektedir. Aynı zamanda bu varyantlar hiçbir LOPD hastasında saptanmamıştır.

Hastaların 2 ile 12 yıl arasında değişen enzim replasman tedavi (ERT) süreleri göz önüne alındığında; tedavi özellikle IOPD hastalarında yaşam süresini uzatmış ve klinik bulguları nispeten hafifletmiş olsa da uzun sürelerdir alınan bu yerine koyma tedavisi tam bir iyileşme sağlayamamıştır. Bu sebep ile Pompe hastalığı için enzim replasman tedavisinin (ERT) geliştirilmesi veya alternatif tedaviler üzerinde çalışılması önem arz etmektedir.

Ülkemizde Pompe hastalığına ilişkin bir veri tabanı ve yeni doğan taraması çalışması bulunmamaktadır. Hastalığın teşhisindeki zorluklar, ülkemizdeki akraba evliliği oranları ve IOPD (infantil Pompe formu)'li hasta prognozları göz önüne alındığında yeni doğan taraması ve Pompe hastalığı veri tabanı oluşturulmasının bir gereklilik olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma, ülkemizde yapılması muhtemel GAA gen mutasyonlarının incelenmesi temelli çalışmalar için bir kaynak oluşturabilir.

KAYNAKLAR

1. “Nadir Hatalıklar Raporu”. TÜSEB (Türkiye Halk Sağlığı ve Kronik Hastalıklar Enstitüsü),2019 eylül. Satman İlhan, Güdük Özden, Yemenici Merve, Ertürk Nazlı.
2. Önenli-Mungan Neslihan, Glikojen Depo Tanılı Hastalarımızdaki Klinik ve Laboratuvar Bulguları ile Biyopsi ve Enzim Tayini Sonuçları. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, 2010.
3. Kishnani, P., Steiner, R., Bali, D. et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 8, 267–288 (2006).
<https://doi.org/10.1097/01.gim.0000218152.87434.f3>
4. van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, et al. İnfantil Pompe hastalığının doğal seyri: Literatürdeki 133 vaka ile karşılaştırıldığında 20 orijinal vaka. *pediatri* 2003; 112 :332–40.
5. Vaka LE, Beckemeyer AA, Kishnani PS. ERT'de İnfantil Pompe hastalığı: klinik sunum, kas-iskelet sistemi yönetimi ve egzersizle ilgili hususlar hakkında güncelleme. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012; 160C :69–79.
6. Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, et al. Pompe hastalığı yenidoğan tarama pilot programında genetik heterozigotluk ve yalancı eksiklik. *Mol Genet Metab.* 2010;99(4):379–83.
7. Chen, Y.-T. Glycogen storage disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D WS, Sly, Childs, Kinzler, Vogelstein. *The Metabolic Bases and Molecular Bases of Inherited Diseases* 8 th ed. Philadelphia: Mcgrav-Hill, 2001: 1521–1552
8. Smit APG, Rake JP, Akman HO, DiMauro S. The glycogen storage diseases and related disorders. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe G, Walter JH. *Inborn Metabolic Diseases* 4 th ed. Germany: Springer, 2006: 101–116
9. Reece, J. B., L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky ve R. B. Jackson. "Cellular respiration and fermentation." *Campbell biology*. 10. baskı (San Francisco, CA: Pearson, 2011), 180.
10. Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko ve Lubert Stryer. "The Glycolytic Pathway Is Tightly Controlled." *Biochemistry*. 5. baskı New York: W. H. Freeman, 2002.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22395/>.

11. Smit APG, Rake JP, Akman HO, DiMauro S. The glycogen storage diseases and related disorders. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe G, Walter JH. Inborn Metabolic Diseases 4 th ed. Germany: Springer, 2006: 101–116
12. Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases, Second Edition. Bhagavan NV, Ha C-E, Academic Press, 2015; Chapter 14
13. Karaca M, Aslan H. a rare cause of both hypo and hyperglycemia; glycogen storage disease type 0: a case report. J Ist Faculty Med 2021;84(3):454-6. doi:10.26650/IUITFD.2020.0040
14. Gökçay G, Karaca M. Karaciğer tutulumu ile giden glikojen depo hastalıkları. Kendirci M, editör. Karbonhidrat Metabolizması Bozuklukları: Güncel Bir Bakış. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.8-15.
15. Nyhan WL, Özand PT. Disorders of carbonhydrate metabolism. In: Nyhan WL, Özand PT. Atlas of Metabolic Diseases 1st ed. Spain: Chapman Hall; 1998: 321–356
16. <http://nadirgenetik Hastaliklar.com/tr/nadir-genetik-hastaliklar-otozomal-resesif-hastaliklar>
17. Uwe Mellie, Frédéric Lofaso. (April 2009). Pompe disease: A neuromuscular disease with respiratory muscle involvement. Respiratory Medicine, 103;4, 477-484.
18. <https://oscarpd.ro/wp-content/uploads/2021/09/Pompe-Disease-Good-to-know.pdf>
19. <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/5714/glycogen-storage-disease-type-2>
20. Hers H. (1963). Genelleştirilmiş glikojen depolama hastalığında (Pompe hastalığı) a-Glukosidaz eksikliği. Biyokimya J. 86 11–16 . 10.1042/bj0860011.
21. Marian Kroos, Marianne Hoogeveen-Westerveld, Ans van der Ploeg, Arnold JJ.(17 January 2012). The genotype–phenotype correlation in Pompe disease. American Journal Of Medical Genetics(AJMG), 160C;1.
22. www.pompecenter.nl.
23. van der Ploeg AT, Reuser AJ Pompe hastalığı. Lancet. 2008; 372 :1342–1353. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61555-X.
24. Lott, I. T. (2012). Neurological phenotypes for Down syndrome across the life span. Down Syndrome: From Understanding the Neurobiology to Therapy, 101–121. doi:10.1016/b978-0-444-54299-1.00006-6.
25. Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, et al. Geç başlangıçlı Pompe hastalığı için fikir birliği tedavi önerileri. Kas Siniri. 2012; 45 :319–33.
26. Tang H, Feuchtbaum L, Sciortino S, Matteson J, Mathur D, Bishop T, et al. The first year experience of newborn screening for Pompe disease in California. Int J Neonatal

- Screen. 2020;6(1):9. The experience from California, the largest state in the United States, about newborn screening for Pompe disease, with appreciably higher incidence of Pompe disease and pseudodeficiency.
27. Burton BK, Charrow J, Hoganson GE, Fleischer J, Grange DK, Braddock SR, et al. Newborn screening for Pompe disease in Illinois: experience with 684,290 infants. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(1):4.
 28. Ficicioglu C, Ahrens-Nicklas RC, Barch J, Cuddapah SR, DiBoscio BS, DiPerna JC, et al. Newborn screening for Pompe disease: Pennsylvania experience. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(4):89.
 29. Klug TL, Swartz LB, Washburn J, Brannen C, Kiesling JL. Lessons learned from Pompe disease newborn screening and follow-up. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(1):11.
 30. Sawada T, Kido J, Sugawara K, Momosaki K, Yoshida S, Kojima-Ishii K, et al. Current status of newborn screening for Pompe disease in Japan. *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):516.
 31. Chien YH, Lee NC, Huang HJ, Thurberg BL, Tsai FJ and Hwu WL. Later-onset Pompe disease: early detection and early treatment initiation enabled by newborn screening. *J Pediatr*. 2011;158(6):1023–27.e1. This paper details the efforts made by investigators in Taiwan to introduce NBS for a number of lysosomal disorders, including Pompe Disease. Taiwan was the first country in the world to introduce NBS for Pompe Disease and had to contend with issues with false positives from pseudodeficiency, that has a much higher prevalence in South East Asian populations.
 32. Yang CF, Liu HC, Hsu TR, Tsai FC, Chiang SF, Chiang CC, et al. A large-scale nationwide newborn screening program for Pompe disease in Taiwan: towards effective diagnosis and treatment. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(1):54–61.
 33. <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/5714/glycogen-storage-disease-type-2>
 34. Simona Taverna, Giuseppe Cammarata, Paolo Colomba, Serafina Sciarrino, Carmela Zizzo, Daniele Francofonte, Marco Zora, Simone Scalia, Chiara Brando, Alessia Lo Curto, Emanuela Maria Marsana, Roberta Olivieri, Silvia Hayati, Giovanni Duro. Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis. July 14, 2020. Volume 12, Issue 15 pp 15856—15874. <https://doi.org/10.18632/aging.103794>.
 35. Y, Zhou X. Manganelli F, Ruggiero L. Clinical features of Pompe disease. *Acta Myol* 2013; 32: 82–4.
 36. Dasouki M, Jawdat O, Almadhoun O, Pasnoor M, McVey AL, Abuzinadah A, et al. Pompe disease: literature review and case series. *Neurol Clin*. 2014; 32: 751–76.

37. Engel AG. Yetişkinlerde asit maltaz eksikliği: kas distrofisini veya diğer miyopatileri taklit edebilen bir sendromun dört vakasında yapılan çalışmalar. *Beyin*. 1970;93(3):599–616.
38. Lim JA, Li L, Raben N. Pompe hastalığı: patofizyolojiden tedaviye ve tekrar geriye. *Ön Yaşlanma Nörobilim*. 2014;6:177.
39. Dasouki M., Jawdat O., Almadhoun O., Pasnoor M., McVey AL, Abuzinadah A., et al. (2014). Pompe hastalığı: literatür taraması ve vaka serileri. *Nörol. klinik* 32 751–776. 10.1016/j.ncl.2014.04.010
40. Reuser AJJ, Hirschhorn R., Kroos MA Pompe Hastalığı: Glikojen depo hastalığı tip II: Asit α -glukosidaz (asit maltaz) eksikliği. İçinde: Valle D., Antonarakis S., Ballabio A., editörler. *Kalıtsal Hastalığın Çevrimiçi Metabolik ve Moleküler Temelleri*. McGraw-Hill; New York, NY, ABD: 2018.
41. Arnold J. J. Reuser, PhD, Department of Clinical Genetics, Center for Lysosomal and Metabolic Diseases, Erasmus MC University Medical Center, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GE Rotterdam, The Netherlands
42. Kohler, L., Puertollano, R. & Raben, N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics* 15, 928–942 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0655-y>
43. Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, et al. Pompe hastalığı yenidoğan tarama pilot programında genetik heterozigotluk ve yalancı eksiklik. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):379–83.
44. Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, Rogers RC, Tsai AC, Waterson J, et al. İnfantil başlangıçlı Pompe hastalığında Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinden türetilmiş rekombinant insan asidi alfa-glukosidaz. *J Pediatr*. 2006;149(1):89–97.
45. Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, et al. İnfantil glikojen depo hastalığı tip II için rekombinant insan asidi alfa-glukosidaz enzim tedavisi: bir faz I/II klinik deneyinin sonuçları. *Gene Med*. 2001;3(2):132–8.
46. Stevens, D., Milani-Nejad, S. & Mozaffar, T. Pompe Disease: a Clinical, Diagnostic, and Therapeutic Overview. *Curr Treat Options Neurol* 24, 573–588 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11940-022-00736-1>
47. Ronzitti G, Collaud F, Laforet P, Mingozzi F. Pompe hastalığı için gen terapisinin ilerlemesi ve zorlukları. *Ann Transl Med*. 2019;7(13):287.

48. Huie ML, Chen AS, Tsujino S., Shanske S., DiMauro S., Engel AG, Hirschhorn R. Erişkin başlangıçlı glikojen depo hastalığı tip II'de (GSDII) anormal ekleme: Bir IVS1'in moleküler tanımlaması (-13T--) Hastaların çoğunda >G) mutasyonu ve yeni bir IVS10 (+1GT-->CT) mutasyonu. *Himm. Mol. Genet.* 1994; 3 :1.
49. [HacıoğluC.2020.](#) İNFANTİL POMPE HASTALIĞI TANISI İLE ÇOCUK METABOLİZMA VE BESLENME POLİKLİNİĞİ'NDE TAKİP EDİLEN VE ENZİM REPLASMAN TEDAVİSİ ALAN HASTALARIN YAŞAM KALİTELERİNİN, KAS, KALP TUTULUM BULGULARI İLE NÖROLOJİK GELİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ. Tablo (20).sf:48.
50. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
51. Huang, Wenjun. Zhang, Yanmin. Zhou, Rui."Induced pluripotent stem cell for modeling Pompe disease" <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9815144/>
52. Tarnopolsky M, Katzberg H, Petrof BJ, Sirrs S, Sarnat HB, Myers K, Dupré N, Dodig D, Genge A, Venance SL, Korngut L, Raiman J, Khan A. Pompe hastalığı: teşhis ve yönetimi. *Can J Neurol Sci.* 2016; 43 :472–85. 10.1017/cjn.2016.37
53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8869611/>
54. Roger AL, Sethi R, Huston ML, Scarrow E, Bao-Dai J, Lai E, Biswas DD, El Haddad L, Strickland LM, Kishnani PS, ElMallah MK. What's new and what's next for gene therapy in Pompe disease? *Expert Opin Biol Ther.* 2022 Sep;22(9):1117-1135. doi: 10.1080/14712598.2022.2067476. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35428407; PMCID: PMC10084869.
55. Farah BL, Yen PM, Koeberl DD. Otofaji ve glikojen metabolizması bozuklukları arasındaki bağlantılar - patogenezi ve olası tedaviler üzerine bakış açıları. *Mol Genet Metab.* 2020; 129 :3–12. 10.1016/j.ymgme.2019.11.005

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. Araştırmanın Adı:

- i. Pompe Hastalığı Tanılı Olgularda Glukozidaz Alfa Asit (GAA) Gen Mutasyonlarının İncelenmesi

b. Araştırmanın İçeriği:

Pompe hastalığı, lizozomal asit α -glukozidaz (GAA) enzim eksikliğine bağlı gelişen ve ilk kez 1932 yılında tanımlanan metabolik bir hastalıktır. Enzim eksikliğinde hücre içi lizozomlar da glikojen birikmekte, kas dokusu başta olmak üzere biriktiği organ ve dokularda bozukluklara neden olmaktadır. Hastalık otozomal resesif geçiş göstermektedir. Görülme sıklığı 30.000 ile 150.000’de bir olarak bölgeye ve yıla göre değişiklik göstermektedir.

Hastalık genetik olarak 17q25.2-q25.3 bölgesinde glukozidaz alfa asit (GAA) geninin her iki allelin de meydana gelen değişimlerle ortaya çıkmakta ve klinik bulgu vermektedir. Kromozom 17(q25.2-q25.3) üzerinde bulunan GAA geni, dallanmış glikojen birleşiklerinin içindeki ‘glikoz-6-fosfat’a’ hidrojenasyonu katalize eden enzim “alfa glukozidaz”ı kodlar.

GAA, biyokimyasal reaksiyonları tetikler ve hücre lizozomun da depolanan kompleks şeker moleküllerinin yıkımını sağlar. Gendeki mutasyonlar, GAA enzim aktivitesinin eksikliğine veya yokluğuna neden olur, bu da öncelikle kas hücrelerinde intrazosomal glikojen birikimine neden olur. Kısacası, Pompe'den etkilenen bireyler, lizozomda depolanan glikojeni parçalayamaz ve bu da lizozomal depolama boşluklarında glikojen birikmesine yol açar. Morfolojik olarak bu, hücredeki lizozomların boyutunda ve sayısında bir artışa neden olur. Uygulanan diyet ve egzersiz programları dışında enzim

replasman tedavisi olarak adlandırılan (ERT) tek bir tedavi yöntemi mevcuttur. ERT, lizozomlardaki glikojeni parçalamakla görevli asit alfa glukozidaz enziminin görevini üstlenen bir yerine koyma tedavisidir. Ancak bu var olan tek tedavi yöntemi şu an hastalığın iyileşmesinde yetersizdir ve çoğu hasta da tedaviye yeterli yanıt alamamaktadır.

Bu yüzden bu çalışmada; Projeye dahi edilen 10 hastada Sanger Dizileme yöntemi kullanılarak mutasyon analizi yapılacaktır. İlk olarak hastalardan EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınacaktır. Alınan kan örnekleri ile saf DNA elde edebilmek için DNA izolasyonu, PCR uygulamaları ve sonrasında da mutasyon analizleri için Sanger Dizileme yöntemi kullanılacaktır. Sonuçta, aynı hastalığa sahip farklı yaş grubundaki olgularda gözlenen çeşitli mutasyonların saptanması amaçlanmaktadır. Dolayısıyla olgularda gen anomalilerinin saptanması ile doğru genetik tanı ve tedavinin uygulanması ve hastalığın genetik etiyolojisi açısından literatüre katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

c. Araştırmanın Amacı:

Pompe hastalığı için ön tanıli proksimal kas güçsüzlüğü, egzersiz intoleransı ve solunum güçsüzlüğü bulunan 10 olguda, Sanger dizileme yöntemi kullanılarak 17(q25.2-q25.3) GAA gen bölgesi üzerinde bulunan mutasyonların saptanması amaçlanmaktadır. Sanger yöntemi kullanılacağı için hem daha önceki çalışmalar da var olduğu bilinen mutasyonların saptanması hem de bunların dışında olası yeni (novel) mutasyonların saptanması mümkün olabilecektir. Mutasyon bölgelerinin ve çeşitliliğinin saptanması hastalığın tanısı, tedavisi ve ilerideki çalışmalar için faydalı olacağı düşünülmektedir.

d. Araştırmanın Nedeni:

() Bilimsel araştırma

(X) Tez çalışması

e. Araştırmanın Öngörülen Süresi: Satın alma işlemleri tamamlandıktan sonra 1 yıl.

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 10 Olgu.

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

Akdeniz Üniversitesi Nöroloji polikliniğine başvuran Pompe ön tanılı 10 olgudan K3-EDTA'lı tüpe kan örnekleri alınacaktır. Alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyon kiti ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilecek ve nanodrop cihazı ile DNA konsantrasyonu ve kalitesi belirlenecektir.

Hedef gen bölgesi (GAA) spesifik primerler kullanılarak klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilecek (Denaturing-Annealing-Extension) ve amplifikasyonu gerçekleşen gen ürünlerinin exosap-ıt ile pürüfikasyonu yapılacaktır.

Dizi analizi reaksiyonu için floresan işaretli ddNTP'ler kullanılacak ve son saflaştırma aşamasından sonra otomatik kapiler jel elektroforezi gerçekleştirilecektir.

Elde edilen sonuçlar referans diziye göre kıyaslanarak olası mutasyonlar tanımlanacaktır.

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Diğer kan alma işlemlerinde olduğu gibi, kan alınan yerde kızarma, şişme ve ağrı oluşabilir. Bunun dışında bu işlemin katılımcıya herhangi bir zararı olmayacaktır.

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ile Pompe klinik özelliklerini taşıyan 10 olguda hastalığa sebep olan mutasyonların belirlenmesidir. Böylece doğru tanı ile doğru tedavi uygulanabilmesi sağlanacaktır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

5. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımıntarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- a. Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- b. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- c. Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

9. Gizlilik:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu

araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı		Uyruğu	
Soyadı		Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: