

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



**ÇOMÜ TIBBİ GENETİK TANI MERKEZİ'NDE SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ
ÖN TANISI VEYA TAŞIYICILIĞI AÇISINDAN GENOTİPLENDİRİLEN
OLGULARIN SMN1/SMN2 GENLERİNİN KOPYA SAYILARININ
RETROSPEKTİF ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Menekşe ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatma SILAN

Çanakkale/2020

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ÇOMÜ TIBBİ GENETİK TANI MERKEZİ'NDE SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ
ÖN TANISI VEYA TAŞIYICILIĞI AÇISINDAN GENOTİPLENDİRİLEN
OLGULARIN SMN1/SMN2 GENLERİNİN KOPYA SAYILARININ
RETROSPEKTİF ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Menekşe ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatma SILAN

Çanakkale/2020

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta uzmanlık çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Arş.Gör.Dr Menekşe ÖZTÜRK'ün Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez savunma Tarihi: **16/6/20.20**

TEZ KONU BAŞLIĞI

ÇOMÜ Tıbbi Genetik Tanı Merkezi'nde Spinal Musküler Atrofi Ön Tanısı
Veya Taşıyıcılığı Açısından Genotiplendirilen Olguların SMN1/SMN2
Genlerinin Kopya Sayılarının Retrospektif Analizi

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Fatma SILAN

Tez Jürisi Üyeleri:

Adı Soyadı

Prof. Dr. Fatma SILAN

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Dr. Öğr. Üyesi Sinem ATİK YALÇINTEPE

İmzası

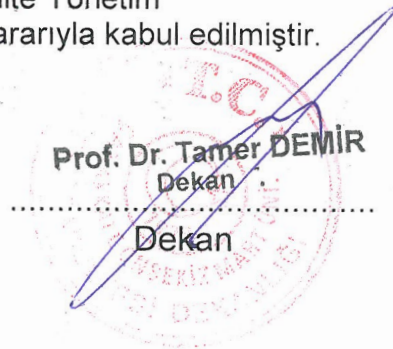
.....
.....
.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulunun **19.06/20...** tarih ve **24/05** sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tamer DEMİR
Dekan

.....
Dekan



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalıőmam sırasında bilgileri, tecrübeleri, hoőgörüleri ve destekleri ile her zaman yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. Fatma SILAN ve Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e; destekleyici ve düşünceli tutumuyla hep yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Dr. Burcu ALBUZ'a; bu süreçte birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım ve çalışma arkadaşlarıma; manevi desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili eşim Ufuk ÖZTÜRK'e, doğumuyla hayatıma yeni bir yön veren oğlum Atlas ınar ÖZTÜRK'e ve aileme teşekkür ederim.

Dr. Menekşe ÖZTÜRK

ÇOMÜ TIBBİ GENETİK TANI MERKEZİ'NDE SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ ÖN TANISI VEYA TAŞIYICILIĞI AÇISINDAN GENOTİPLENDİRİLEN OLGULARIN SMN1/SMN2 GENLERİNİN KOPYA SAYILARININ RETROSPEKTİF ANALİZİ

ÖZET

GİRİŞ ve AMAÇ: Spinal müsküler atrofi (SMA), spinal kord ön boynuz hücrelerinin progresif dejenerasyon ve geri dönüşümsüz kaybı sonucu iskelet kası zayıflığı ve atrofisi ile karakterize bir hastalıktır. Genel popülasyonda SMA'nın prevalansı 1/10000 iken taşıyıcılık oranı 1/40-1/60 'tır. SMA'nın etiolojisinde SMN1 geninde meydana gelen biallelik delesyonlar önemli yer alır. SMN2 geni kopya sayısı ise hastalığın prognozunda önemlidir. Çalışmamızda SMA ön tanısıyla başvuran hastalarda ve sağlıklı kontrollerde hem SMN1 hem SMN2 kopya sayılarının retrospektif analiz edilmesi planlanmıştır.

YÖNTEM: Çalışmamıza, 15 Nisan 2019 tarihine kadar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine "Spinal Musküler Atrofi ön tanısı veya taşıyıcılığı" tanısıyla başvurup SMN1 ve SMN2 gen kopya sayıları MLPA analizi ile değerlendirilmiş olan olgular ile sağlıklı kontroller alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen 214 olgunun sosyodemografik, klinik ve laboratuvar bulguları retrospektif olarak incelenmiş ve bu olguların MLPA ham verileri güncel Coffalyser programı ile yeniden analiz edilmiştir.

BULGULAR: İki yüz on dört olgunun SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayıları değerlendirildiğinde; olguların 188'inde (%87,8) iki kopya saptanırken, 18'inde (%8,4) bir kopya (heterozigot delesyon), dört olguda (%1,9) 3 kopya ve dört (%1,9) hastada sıfır kopya (homozigot delesyon) saptanmış olup bu hastalar SMA tanısı almıştır. Endikasyona göre izole hipotoni kliniği ile başvuran hastaların %22,2'sinde SMN1 geninde homozigot delesyon saptanmıştır. Sağlıklı kontrol olarak değerlendirilen 144 olgu içinde altı (%4,2) olguda SMN1 geninde heterozigot delesyon saptanmış olup, bu olgular taşıyıcı olarak değerlendirilmiştir. Olguların endikasyonuna bakılmaksızın SMN2 7. ve 8. ekzon

kopya sayıları değerlendirildiğinde 135'inde (%63,1) iki kopya; 61'inde (%28,5) bir kopya (heterozigot delesyon), dokuzunda (%4,2) sıfır kopya (homozigot delesyon), sekizinde (%3,7) 3 kopya, bir (%0,5) olguda ise 4 kopya saptanmıştır. SMA Tip I tanısı alan üç hastanın SMN2 kopya sayısı iki olarak saptanırken, SMA Tip III tanısı alan bir hastada SMN2 geni kopya sayısı dört olarak tespit edilmiştir. SMA MLPA, arrayCGH, NGS panelleri ve WES birarada kullanıldığında izole hipotoni kliniği ile gelen hastaların %61,1'i tanı alırken, ek bulguları olan hastaların %26,5'i tanı almıştır

SONUÇ VE TARTIŞMA: Çalışmamıza alınan sağlıklı olgular içinde SMA taşıyıcılığı %4,2 olarak saptanmış olup bu oran literatürden oldukça yüksektir. Taşıyıcılık saptanan 6 bireyin 5'i Çanakkale'li olup, küçük bir populasyon içinden evlilikler ve akraba evliliğinin nadir olması nedeniyle taşıyıcılık sıklığı artmış olabilir; bu durumun netleştirilmesi için daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır. SMA tanısı alan 4 hastanın SMN2 kopya sayıları ise iki ve üzerinde saptanmış olup bu durum hastalığın prognozu ve tedavi planlanmasında önemlidir. Çalışmamızda SMA taşıyıcılığı diğer populasyonlardan yüksek tespit edilmiş olup; SMA hastalığının mortalitesi ve güncel tedavi maliyetinin yüksek olması ile prenatal, preimplantasyon genetik tanının mümkün olması gözönüne alındığında SMA'nın tarama programlarına dahil edilmesi önem kazanmaktadır. Ayrıca çalışmamızdaki yüksek tanı oranı dikkate alındığında hipotoni kliniği ile gelen hastalara tanı konmasında NGS panelleri, arrayCGH ve WES analizi gibi moleküler yöntemlerin birarada kullanımı gözönünde bulundurulmalıdır.

ANAHTAR KELİMELER: SMA, mlpa, SMN1, SMN2, spinal musküler atrofi

**THE RETROSPECTIVE ANALYSIS OF SMN1/SMN2 COPY NUMBERS IN
SMA PRE-DIAGNOSIS PATIENTS AND IN HEALTHY CONTROLS TESTED
AT COMU MEDICAL GENETICS DIAGNOSIS CENTER**

ABSTRACT

INTRODUCTION and AIM: Spinal muscular atrophy (SMA) is characterized by muscle weakness and atrophy resulting from progressive degeneration and irreversible loss of the anterior horn cells in the spinal cord. Prevalence of SMA is one in every 10,000 live births in general population and a carrier frequency of about 1/40-1/60. SMA is caused by biallelic mutations in the survival motor neuron 1 (SMN1) gene, including deletions, gene conversions, and intragenic mutations. SMN2 copy number modify disease severity. In our study; we aimed to analyze both SMN1 and SMN2 copy numbers in patients presenting with SMA pre-diagnosis and in healthy controls.

METHODS: Patients referred to Çanakkale Onsekiz Mart University Medical School Medical Genetics Clinic Department with the diagnosis of SMA and carriers until April 15, 2019 who were tested for SMN1 and SMN2 gene copies using a multiplex ligation-dependent probe amplification assay (MLPA) were included in our study. The sociodemographic, clinical and laboratory findings of the 214 patients included in the study were examined retrospectively and the raw data of MLPA of these patients were retrospectively reanalyzed by Coffalyser. In total, 214 DNA samples from peripheral blood were tested for SMN1 and SMN2 gene copies using a multiplex ligation-dependent probe amplification assay.

RESULTS: In our study among 214 samples 188 (87,8%) patients had two SMN1 copies, four (1,9%) patients had three SMN1 copies and four (1,9%) patients who diagnosed SMA were found to be homozygous deletion of *SMN1* exon 7 and exon 8. Carrier frequency was detected 4.2% in our healthy controls. From the 214 cases, 135 patients (63,1%) had two *SMN2* copies, 61 (28,5%) had a single gene copy, eight patients (3,7%) had three copies, one

(0,5%) patient had four copies and nine (%4,2) patients had homozygous deletion. Three SMA Type I patients had two *SMN2* copies and one SMA Type III patient had four copies. When using SMA MLPA, arrayCGH, NGS panels and WES together, 61.1% of patients with isolated hypotonia clinic and 26.5% of patients with additional findings were diagnosed.

DISCUSSION: In our study, we found the carrier frequency %4,2, which is higher than the current literature. 5 of the 6 individuals who are found to be carriers are from Çanakkale and the difference between studies may be attributed to marriages among a small population and the consanguineous marriages are rare; more comprehensive studies are needed to elucidation of this situation. Four patients diagnosed with SMA had two or more *SMN2* copies which is important in prognosis and treatment planning of the disease. In conclusion; carrier frequency of our population is higher than others; given the high mortality of disease, expensive therapies and possibility of the existence of prenatal tests and PGD, including SMA in the carrier screening program. has become important. In addition, considering the high rate of diagnosis in our study, performing NGS panels, array CGH and WES analysis together should be taken into consideration when evaluating patients with hypotonia clinic

KEYWORDS: SMA, mlpa, *SMN1*, *SMN2*, spinal muscular atrophy

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Hipotoni Tanımı ve Sınıflandırılması	5
2.2 Spinal Musküler Atrofi Hastalığı Tanımı ve Tarihçesi.....	6
2.3 Spinal Musküler Atrofi Epidemiyolojisi.....	8
2.4 Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Kalıtım Tiplerine Göre Sınıflandırılması ve Klinik Özellikleri.....	8
2.4.1 Otozomal Dominant Proksimal SMA, Finkel Tipi (Omim No:182980) .	8
2.4.2 X'e bağlı Resesif SMA2, Lethal İnfantil.....	9
2.4.3 Otozomal Resesif Kalıtılan SMA.....	9
2.4.4 Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Güncel Sınıflaması.....	12
2.5 Diğer Spinal Musküler Atrofi Tipleri	15
2.5.1 SMARD1 (Respiratuvar Distres ile Seyreden İnfantil Spinal Musküler Atrofi).....	15
2.5.2 Spinal Bulbar Musküler Atrofi (SBMA) (Kennedy Hastalığı)	16
2.5.3 Distal Spinal Musküler Atrofi.....	17
2.6 Spinal Musküler Atrofi Moleküler Patogenezi	17

2.7 Spinal Musküler Atrofi Moleküler Genetiği	19
2.8 Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Tanısı ve Moleküler Tanı Yöntemleri	24
2.9 Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Taşıyıcılık Taraması	25
2.10 Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Genotip-Fenotip İlişkisi ve SMN2 Kopya Sayısı.....	27
2.11 Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Tedavi Seçenekleri	30
2.11.1 Farmakolojik Ajanlar	31
2.11.2 RNA Temelli Tedaviler	31
2.11.3 Gen Tedavisi	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1 Hasta Grubu	34
3.2 Gereçler	35
3.2.1 Kullanılan Aletler.....	35
3.2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.3 Yöntem.....	36
3.3.1 DNA İzolasyonu.....	36
3.3.2 DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi.....	37
4.BULGULAR	51
4.1 Olguların Demografik Özellikleri.....	52
4.2 Olguların Klinik Özellikleri	53
4.3 Olguların SMN1 ve SMN2 Kopya Sayılarının Değerlendirilmesi	55
4.4 SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Homozigot Delesyon Saptanan Hastaların Klinik Özellikleri	63
4.5 Olguların Diğer Genetik Testlerinin Değerlendirilmesi.....	69
5.TARTIŞMA.....	76
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86

7.KAYNAKLAR	87
8.EKLER.....	97
EK 1. Etik Kurul Onayı.....	97
9.ÖZGEÇMİŞ.....	98



KISALTMALAR VE SİMGELER

ACMG	Amerikan Tıbbi Genetik Birliği
ACOG	Amerikan Jinekoloji ve Obstetrik Derneği
ArrayCGH	Array tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
ASO	Antisense Oligonükleotitler
ÇOMÜ-SUAH	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi
DEL	Delesyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTR	Derin tendon refleksleri
DUP	Duplikasyon
ESE	Ekzonik Kırpılmayı Arttırıcı (Exonic Splicing Enhancer)
ESS	Ekzonik Kırpılmayı Susturucu (Exonic Splicing Silencer)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (American Food and Drug Administration)
HnRNP	Heteroribonükleroprotein
Kb	Kilobaz
MLPA	Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu
mRNA	Mesajcı RNA (messenger RNA)
MI	Mikrolitre
Ng	Nanogram
NGS	Yeni Nesil Dizileme
Nt	Nükleotit
QF-PCR	Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonükleik asit
SMA	Spinal müsküler atrofi
SnRNP	Küçük Nükleer Ribonükleer Protein
UTR	Translasyona uğramayan bölge
WES	Tüm Ekzom Sekanslama
WGS	Tüm Genom Sekaslama

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.Omurilik ön boynuz hücrelerinin periferik ve santral sinir sistemiyle ilişkisi.....	7
Şekil 2.2 Yeni ve klasik sınıflamaya göre SMA'nın klinik formları ve SMN2 kopya sayısı ile korelasyonu.....	14
Şekil 2.3 SMN protein eksikliğinin aksonal transport, nöromusküler kavşak ve kas dokusunda hastalık mekanizmasına etkileri	19
Şekil 2.4. Kromozom 5q13 lokusunda inverted duplikasyon bölgesinde yer alan SMA lokusu.....	20
Şekil 2.5 SMN1 ve SMN2 genlerindeki 6.intron, 7.ekzon, 7.intron ve 8. ekzondaki nükleotit dizisi farklılıkları,	21
Şekil 2.6 SMN1 ve SMN2 genlerinden üretilen SMN protein miktarı.....	22
Şekil 2.7. SMN1 ve SMN2 pre-mRNA'ların işlenmesi	23
Şekil 2.8 SMA tanısında diagnostik algoritma	24
Şekil2.9 Taşıyıcı ve sağlıklı bireylerde en sık görülen SMA genotipleri.....	26
Şekil 2.10. Sağlıklı birey ve SMA hastalarının genotipleri ve genotiplerine göre üretilen fonksiyonel protein düzeyleri	29
Şekil 2.11 Nusinersen aracılı SMN2 geni kıpılması.....	32
Şekil 3.1 MLPA tekniğinin basamakları	39
Şekil 3.2 MLPA verilerinin karşılaştırılması	40
Şekil 3.3 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile analiz edilen sağlıklı kontrole ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X2,SMN2X2).....	46
Şekil 3.4 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2 ile analiz edilen SMA taşıyıcısı olguya ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X1,SMN2X2)	47
Şekil 3.5 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile analiz edilen SMN1 kopya sayısı 3, SMN2 kopya sayısı 1 olan olguya ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X3,SMN2X1)	48

Şekil 3.6 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile analiz edilen SMN1 geni kopya sayısı 4 olan ve SMN2 geninde homozigot delesyon olan olguya ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X4,SMN2X0)..	49
Şekil 4.1 Olguların polikliniğimize ilk başvurularındaki desimal yaşlarının hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı	52
Şekil 4.2 Olguların köken aldıkları memleketlerin harita üzerinde sayısal dağılımı	53
Şekil 4.3 Çalışmaya alınan olguların endikasyonlarına göre dağılımları	54
Şekil 4.4 Olguların başvuru endikasyonuna göre yaş aralıklarının gruplandırılması	55
Şekil 4.5 Çalışmaya alınan tüm olguların SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının değerlendirilmesi	56
Şekil 4.6 Çalışmaya alınan olguların SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımı	58
Şekil 4.7 Çalışmaya alınan olguların SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının değerlendirilmesi	60
Şekil 4.8 Çalışmaya alınan olguların SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımı	62
Şekil 4.9 SMN1 Ekzon 7/8 homozigot delesyon olup SMN2 Ekzon 7/8 kopya sayısı dört olan hastaya (P54) ait MLPA profillerinin sağlıklı kontrolle karşılaştırmalı kapiller elektroforez(A) ve prob(B) görüntüsü.	65
Şekil 4.10 SMN1 Ekzon 7/8 homozigot delesyon olup SMN2 Ekzon 7/8 kopya sayısı iki olan olguya (P74) ait MLPA profillerinin sağlıklı kontrolle karşılaştırmalı kapiller elektroforez(A) ve prob(B) görüntüsü.....	68

TABLolar

Tablo 2.1. Yüz kırk dört hastayı içeren retrospektif bir çalışmada, hipotoni etiyojisine göre gruplandırılmış vaka sayıları.....	6
Tablo 2.2. Spinal Musküler Atrofi hastalığının sınıflandırılması ve temel klinik özellikleri	10
Tablo 2.3 SMN2 kopya sayısı ve SMA klinik fenotipleri	28
Tablo 3.1 MRC-Holland P060-B2 SMA Carrier kitinde yer alan referans ve hedef problemlerin nükleotid uzunlukları ve kromozomal lokasyonları	41
Tablo 3.2 Sağlıklı, hasta ve taşıyıcı olguların kopya sayılarının	45
Tablo 4.1 Olgularda SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımları	59
Tablo 4.2 Olgularda SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımlar	63
Tablo 4.3 Hipotoni kliniği ile gelip tanı alan olguların yapılan genetik testlerinin değerlendirilmesi.....	69
Tablo 4.4 Hipotoni ve hipotoniye ek dismorfik bulguları olup tanı alan olguların yapılan genetik testlerinin değerlendirilmesi.....	70
Tablo 5.1 Hendrickson ve ark.(118) tarafından sağlıklı olgulardaki SMN1 kopya sayılarının değerlendirildiği derleme ile bizim çalışmamızdaki verilerin karşılaştırılması	80
Tablo 5.2 Fang ve ark.'ları(120) tarafından sağlıklı olgulardaki SMN1 ve SMN2 kopya sayılarının değerlendirildiği derleme ile bizim çalışmamızdaki verilerin karşılaştırılması	82
Tablo 5.3 Mailman ve ark. (25) tarafından yapılan çalışmadaki 142 SMA hastasının SMN2 kopya sayılarının değerlendirilmesi.....	83
Tablo 5.4 Calucho ve ark.(99) tarafından 3459 SMA hastası ile yapılan çalışmada SMA klinik tiplerine göre SMN2 kopya sayılarının değerlendirilmesi84	

Tablo 5.5 Zhang ve ark.(106)'ları tarafından 40 SMA hastası ile yapılan çalışmada SMN2 ve NAIP geni kopya sayılarının SMA klinik tiplerine göre değerlendirilmesi..... 85



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Spinal musküler atrofi (SMA), spinal kord motor nöronlarının dejenerasyonu, iskelet kası atrofisi ve genel güçsüzlük ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır.Hastalık kalıtım şekline göre üç grupta sınıflandırılmaktadır ve hastaların yaklaşık %95'i otozomal resesif kalıtılan SMA grubunda yer alır(1).

Otozomal resesif kalıtılan SMA batı toplumlarında kistik fibrozisten sonra en sık görülen ikinci ölümcül otozomal resesif hastalıktır. Bu toplumlarda insidansı yaklaşık 1/6 000-1/10 000 iken taşıyıcılık 1/40-1/60'tır(2)

Amerikan Jinekoloji ve Obstetrik Derneği (ACOG) SMA'nın evlilik öncesi tarama programına alınmasını önermektedir (3). Ülkemizdeki taşıyıcılık oranıyla ilgili yeterli veri bulunmamakla birlikte batı toplumlarıyla benzer olduğu düşünülmekte ve henüz rutin taşıyıcılık tarama programına alınmamış olsa da bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Otozomal resesif kalıtılan SMA 1991'de Uluslararası Musküler Distrofi Derneği tarafından hastalığın başlama yaşına ve hastanın yapabildiği en üst motor aktiviteye (oturma/ ayakta durabilme) göre 3'e ayrılır (4).Daha sonra yapılan revizyonlarla erişkin başlangıçlı SMA tip IV ve prenatal başlangıçlı form olan tip 0 eklenmiştir. Prenatal başlangıçlı form en ağır form olup yaşamın ilk haftalarında kaybedilir. Tip I (Werding-Hoffmann hastalığı) SMA olan hastalar yardımsız oturamaz ve 2 yaşından önce kaybedilirler. Ara form olan tip II (Intermediate form-subakut form)'de hastalar oturabilir fakat yürüyemezler, tip III (Kugelberg-Welander hastalığı) ise daha hafif klinikle seyreder hastalar yardımla yürüyebilir ancak koşamazlar. Tip 4 erişkin başlangıçlı form olup genellikle 35 yaşından sonra bulgu verir, hafif kas güçsüzlüğü, seğirme ve

titreme ile seyreder, yaşam süresi normaldir, yutma ve solunum kasları nadiren etkilenir (5).

1995 yılında otozomal resesif kalıtılan SMA'nın etiyolojisine yönelik yapılan çalışmalarda 5.kromozom uzun kolu q13 bölgesinde lokalize SMN geni Lefebvre S ve ark. tarafından aday gen olarak bildirilmiştir (6). Genomik uzunluğu 20 Kb olan 9 ekzona sahip SMN geni; 294 amino asitten oluşan 32 kD'luk SMN proteinini kodlamaktadır. Bu genin telomerik (SMN1- SMNt) ve sentromerik (SMN2- SMNc) formlarının bulunduğu ortaya konmuştur. SMN geninin sentromerik ve telomerik dizileri benzer olup sadece ekzon 7 ve 8'de yer alan 5 nükleotide farklılık vardır. Bu farklılıktan dolayı SMN1 geninden tam ve fonksiyonel SMN proteini sentezlenirken, SMN2 geninden %85-90 oranında nonfonksiyonel kısa ömürlü SMNDELTA7 proteini sentezlenir. Hastalığa SMN1 geninde meydana gelen homozigot delesyonlar, homozigot nokta mutasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmesi neden olur (1). SMN2 geni kopya sayısı ise hastalığın kliniğinde ve prognozu belirlemede büyük önem taşır. SMN2 kopya sayısı SMA tip 1 hastalarında genellikle iki, SMA tip 2 hastalarında üç, SMA Tip 3 hastalarında ise genellikle üç-dört kopya şeklindedir.

Tedavide hedeflenen SMN protein miktarını arttırmaktır. Bunun için ilk olarak 2001 yılında SMN protein ekspresyonunu arttıran küçük moleküller hücre kültüründe uygulanmış SMN protein miktarının arttığı görülünce hayvan modellerinde denenmiş aynı başarı elde edilmiştir. Histon deasetilaz inhibitörleri, aminoglikozitler ve kinazolin türevleri gibi küçük moleküllerin SMN2 geni promotor bölgesini aktiveleştirerek tam uzunlukta işlevsel protein miktarını arttırdığı görülmüştür. Ancak klinik çalışmalarda istenen SMN protein miktarı artışı sağlanamamıştır (7).

Tedavide ikinci olarak SMN2 geni ekzon 7'nin mRNA kırılması sırasında çıkarılmasını engelleyerek SMN2 geninden eksprese olan SMN protein miktarını arttırmak hedeflenmiştir. Bunun için RNA temelli antisense oligonükleotitler (ASO) denenmiştir. Hayvan modellerinde istenen başarı sağlanınca 2008 yılında ilk preklinik çalışmalar yapılmış ve 2016 yılında FDA onayı alarak SMA tedavisinde kullanılan ilk ilaç piyasaya sunulmuştur (8-10) . Modifiye bir antisense oligonükleotit olan Nusinersen SMN2 pre-mRNA'da silence of splice bölgesinde 18 merlik spesifik bir bölgeye bağlanarak SMN2 pre-mRNA kırılmasını modüle eder ve böylece ekzon 7'nin çıkarılması engellenir. Sonuçta tam uzunlukta işlevsel SMN proteini miktarı artmakta ve hastanın kliniğinde düzelme görülmektedir. Yapılan çalışmalarda bu tedavinin SMA tip 1 hastalarında daha başarılı olduğu ve tedaviye mümkün olan en kısa zamanda başlanması gerektiği görülmüştür. Ancak uygulanan ilacın fiyatının oldukça yüksek olması, yılda dört doz uygulanması ve süreklilik gerektirmesi nedeniyle ilaca erişim birtakım kısıtlamalara tabidir. Ülkemizde 5 Temmuz 2017'de yayınlanan Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Uygulama Tebliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ'de sadece SMA Tip 1 hastalarında belirli koşulları sağlamak şartıyla ödeme yapılmaktayken 1 Şubat 2019'da resmî gazetede yayınlanan yeni bir tebliğ ile SMA Tip2 ve Tip3 hastaları için de ödeme kapsamına alınmıştır. Bu geri ödeme koşullarından bir tanesi de genetik testlerde homozigot gen delesyonu, homozigot gen mutasyonu veya compound (bileşik) heterozigot gen mutasyonu olması ve SMN2 kopya sayısının en az 2 olduğunun gösterilmesidir.

SMN1 geni ekzon 7 ve ekzon 8 de meydana gelen homozigot delesyonlar hastaların yaklaşık %95'inde görüldüğünden delesyonların tespiti tanıda birinci basamak olarak kullanılır. Delesyonların tespitinde ise kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) veya çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (MLPA) yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemlerden MLPA günümüzde altın standart olarak kullanılmaktadır. SMN2 geni kopya sayısının belirlenmesi hastalığın prognozunu belirlediği ve ilaca verilen yanıtı değiştirdiği

için SMN1 ve SMN2 delesyon/duplikasyonlarının belirlendiği MLPA yöntemini çalışmamızda tercih ettik. MLPA yöntemi teknik olarak hastalardaki ilgili gene ait DNA miktarını kontrollerdeki DNA miktarıyla karşılaştırmaya dayanmaktadır. Her çalışma için üç tane kontrol kullanılmaktadır. Ancak sağlıklı kontrollerde de delesyon duplikasyon olabileceği için analizden önce kontrollerin SMN1 ve SMN2 genlerine ait pik yükseklikleri kitin içindeki referans piklerinin yüksekliği ile karşılaştırılarak delesyon/duplikasyon olup olmadığı analiz edilmektedir.

Ülkemizde evlilik/gebelik öncesi SMA taşıyıcılığının taranması planlanmaktadır ancak normal popülasyonda taşıyıcılıkla ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Literatüre bakıldığında yayınlar genellikle SMN1 kopya sayısına odaklanmakta SMN2 kopya sayıları ile ilgili daha az veri olduğu görülmektedir. Çalışmamız ülkemizde SMA ön tanısıyla ile başvuran hastalarda ve sağlıklı kontrollerde hem SMN1 hem SMN2 kopya sayılarının analiz edildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hipotoni Tanımı ve Sınıflandırılması

Hipotoni, eklemlerin pasif hareketlerine karşı kasın gösterdiği dirençte azalma olup özellikle yenidoğan döneminde pediatri hekimlerinin sık karşılaştığı klinik tablolardan biridir. Hipotoni ile seyreden nöromusküler hastalıklar belirgin kas güçsüzlüğünün tabloya eşlik etmediği non paralitik grup (santral hipotoni) ve kas güçsüzlüğünün klinik tabloya hakim olduğu paralitik grup (periferik hipotoni) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir. Ancak bazı multisistemik hastalıklarda hem santral sinir sistemi hem de periferik yapılar tutularak hipotoni gelişebilir. Preterm doğum, fetal ilaç maruziyeti, enfeksiyon gibi durumlarda ise geçici hipotoni görülebilmektedir.

Fizik muayene bulgularına göre hipotoni nedeninin santral mi yoksa periferik mi olduğu konusunda fikir edinilebilmektedir (11). Derin tendon reflekslerinin (DTR) artmış olması ve yerçekimine karşı hareketlerin varlığı santral kökenli hipotoniye desteklerken; DTR'lerin azalması ya da alınamaması, yer çekimine karşı hareketlerin olmayışı, paralitik bir postür, fasikülasyon, yüz ve diyafram kaslarının tutulması ise periferik nedenli hipotoniye düşündürmelidir (12). Santral ve periferik hipotoni arasındaki farkların bilinmesi doğru değerlendirme ve takip açısından çok önemlidir.

Yapılan çalışmalarda, hipotonik infant etiyolojisinde santral kökenli nedenlerin %66-88 ile ilk sırayı aldığı görülmüştür(13,14). Santral kökenli nedenlerden hipoksik ya da hemorajik beyin lezyonları hastaların 1/3-4'ünde görülür(13-15)(Tablo2.1). Periferik nedenli hipotoni ise olguların 1/3'ünde görülmektedir. Periferik kökenli hipotoni nedenlerinin yaklaşık %50'sini Spinal Musküler Atrofi (SMA) ve musküler distrofiler oluşturmaktadır(15-17).

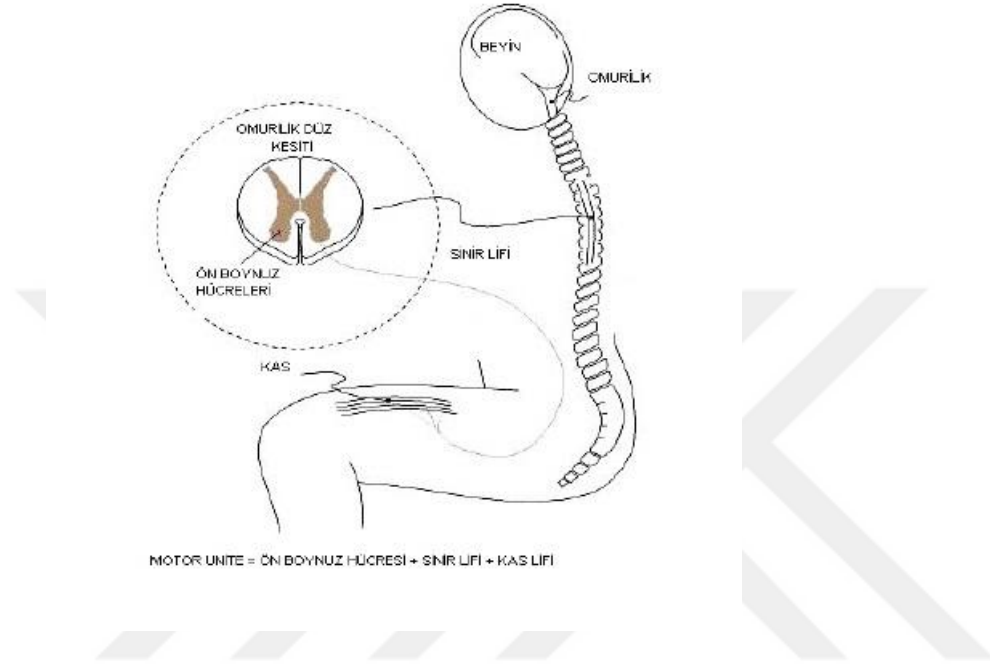
Tablo 2.1. Yüz kırk dört hastayı içeren retrospektif bir çalışmada, hipotoni etiyojisine göre gruplandırılmış vaka sayıları -Laugel ve ark.(15)'dan alınmıştır.

Tanı	Vaka Sayısı
Santral Hipotoni	98
İskemik/Hemorajik Lezyonlar	41
• Hipoksik İskemik Ensefalopati	29
• İntrakraniyal Hemoraji	12
Kromozomal anomaliler/sendromik hastalıklar	31
• Down Sendromu	18
• Diğer Kromozomal anomaliler	6
• Prader-Willi Sendromu	4
• Noonan Sendromu	1
• Diğer sendromik Hastalıklar	2
Beyin malformasyonları	15
• Korpus kallazum agenezisi	5
• Dandy-walker malformasyonu	2
• Joubert sendromu	2
• Lizenşefali	2
• Diğer malformasyonlar	4
Metabolik/endokrin hastalıklar	11
• Solunum zinciri hastalıkları	4
• Peroksizomal hastalıklar	2
• Nonketotik hiperglisinemi	2
• Methemoglobininemi	1
• Hipotroidi	2
Periferel hipotoni	22
Motor nöron hastalıkları	8
• Spinal Musküler Atrofi Tip 1	7
• Konjenital Nöropati	1
Kas Hastalıkları	14
• Miyotonik Distrofi	5
• Konjenital Musküler Distrofi	2
• Konjenital Miyopatiler	2
• Metabolik Miyopatiler	2
• Diğer Miyopatiler	3
Tanı Konulamayan	24
Toplam	144

2.2 Spinal Musküler Atrofi Hastalığı Tanımı ve Tarihçesi

Spinal musküler atrofi (SMA), spinal kord ön boynuz hücrelerinin dejenerasyonu, iskelet kası atrofisi ve genel güçsüzlük ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. İskelet kasları, ancak omurilik ön boynuz

hücrelerinden aldıkları ileti ile kasılabilmekte olup, SMA'da ön boynuz hücrelerinde dejenerasyon olduğu için kasa iletim olmamakta ve bunun sonucunda da istemli kaslarda güçsüzlük ve atrofi meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Mesane ve barsak fonksiyonları gibi istemsiz kasların kontrolündeki işlevler etkilenmez. Görme ve işitme duyuları sağlamdır, zekâ ise normaldir



Şekil 2.1.Omurilik ön boynuz hücrelerinin periferik ve santral sinir sistemiyle ilişkisi -Sel ve ark.(18)'ndan alınmıştır.

SMA, ilk kez Guido Werdnig tarafından 1891'de iki kardeş infantta tanımlanmıştır.1893-1900 yılları arasında ise Johan Hoffman 7 vaka daha tanımlamıştır. Her ne kadar SMA tiplerinden ağır form olan SMA tip 1 Werdnig-Hoffman tipi olarak adlandırılmış olsa da aslında tanımlanan vakalar orta şiddette kliniğe sahiptir. Ağır infantil form SMA, ilk kez 1899'da Sylvestre ve 1903'te Beevor tarafından tanımlanmıştır (7,19). Hastaların ayakta durabildiği ve yürüyebildiği daha hafif form olan geç başlangıçlı SMA ise ilk kez 1950'de Wohlfart, Fez ve Eliasson tarafından tanımlanmış olup Kugelberg ve Welander tarafından detaylandırılmıştır(19).

2.3 Spinal Musküler Atrofi Epidemiyolojisi

SMA, batı toplumlarında kistik fibrozisten sonra en sık görülen ikinci ölümcül otozomal resesif hastalıktır (2). Genel popülasyonda otozomal resesif kalıtılan SMA'nın taşıyıcılık oranı 1/40-1/60 ve hastalığın prevalansı 1/6 000-1/10 000'dir (20,21). Batı toplumlarına baktığımızda İngiltere'de taşıyıcılık 1/90 (22), hastalık görülme sıklığı ise 100 000 canlı doğumda dört, İtalya'da taşıyıcılık 1/57 (23), Almanya'da taşıyıcılık 1/50 (24,25) Amerika'da ise 1/54 (26) olarak bildirilmiştir. Tüm SMA alt tiplerinin insidansı ise yaklaşık 1/10 000 olarak bildirilmiş olup vakaların yaklaşık %60'ını SMA Tip 1 oluşturmaktadır (1,27,28) Türkiye'de SMA prevalansı ile ilgili yeterli veri olmamakla beraber akraba evliliklerinin yüksek olması prevalansın gelişmiş ülkelerden daha fazla olabileceğini düşündürmektedir.

2.4 Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Kalıtım Tiplerine Göre Sınıflandırılması ve Klinik Özellikleri

SMA, hastalığı kalıtım şekline göre otozomal resesif, otozomal dominant ve X'e bağlı resesif olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Hastaların yaklaşık %95'i otozomal resesif kalıtılan SMA grubunda yer alır.

2.4.1 Otozomal Dominant Proksimal SMA, Finkel Tipi (Oim No:182980)

Otozomal dominant kalıtılan SMA 20q13.32 bölgesinde lokalize VAPB (Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein B, Oim No:605704) geninde meydana gelen missens mutasyonlardan kaynaklanır. Hastalığın prevalansı 1-9/1 000 000 olarak bildirilmiştir. Semptomların başlangıcı 10-40 yaşları arasında değişmekte olduğundan geç başlangıçlı SMA olarak da adlandırılır. Hastalığın kliniğinde alt ekstremitelerden üst ekstremitelere ilerleyen nöropatiye bağlı kas güçsüzlüğü, fasikülasyon ve hiporefleksi görülür(29).

2.4.2 X'e bağlı Resesif SMA2, Lethal İnfantil (Omim No:301830)

X'e bağlı resesif kalıtılan SMA ağır konjenital hipotoni, arefleksi ve multipl konjenital kontraktürler (artrogyripozis congenita) ile karakterize olup, Xp11.3-q11.1 bölgesinde lokalize UBA1(Ubiquitin-Like Modifier-Activating Enzyme 1, Omim No:314370) genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanır. Hastalığın patolojisinde spinal kord ve beyin sapı ön boynuz hücrelerinin progresif dejenerasyonu görülür. Zekâ genellikle normalken yaşam süresi solunum kaslarının etkilenmesi sonucu respiratuvar yetmezliğe bağlı olarak kısalır. Kalıtım paterni itibariyle sadece erkeklerde hastalık görülürken kadınlar taşıyıcıdır (30).

2.4.3 Otozomal Resesif Kalıtılan SMA

Otozomal resesif kalıtılan SMA, en sık görülen alt tip olup hastaların yaklaşık %95'i bu grupta yer alır. Hastalığa 5q13.2 bölgesinde lokalize SMN1 geninde meydana gelen homozigot delesyonlar, homozigot nokta mutasyonlar ve bu geni içeren kromozomların yeniden düzenlenmesi neden olur (1,6). Spinal kord ve beyin sapı ön boynuz hücrelerinin progresif dejenerasyonu sonucu kas güçsüzlüğu ve atrofi görülür. Hastalığın başlama yaşı intrauterin dönemden erişkinliğe kadar değişir. Kas güçsüzlüğu simetrik olup proksimalden distale doğru ilerler. Otozomal resesif kalıtılan SMA 1991'de Uluslararası Musküler Distrofi Derneği tarafından hastalığın başlama yaşına ve hastanın yapabildiği en üst motor aktiviteye göre üç gruba ayrılmıştır (4). Daha sonra yapılan revizyonlarla erişkin başlangıçlı SMA Tip IV ve prenatal başlangıçlı form olan Tip 0 bu sınıflandırmaya eklenmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Spinal Musküler Atrofi hastalığının sınıflandırılması ve temel klinik özellikleri -Prior ve ark.(31)' ndan alınmıştır.

FenoTip	Hastalığın Başlama Yaşı	Beklenen Yaşam Süresi	Motor Beceriler	Diğer Bulgular
SMA Tip 0	Prenatal	<6ay	-	Ağır neonatal hipotoni Ağır güçsüzlük Erken dönemde solunum yetmezliği Fasyal dipleji
SMA Tip I	<6ay	Genellikle <2yaş ama daha uzun olabilir	Sadece destekli oturabilir	Hafif eklem kontraktürleri Yüz kaslarında minimal güçsüzlük Emme-yutma güçlüğü
SMA Tip II	6-18 ay	Hastaların yaklaşık %70'i 25 yaşına kadar yaşayabilir	Desteksiz oturabilir	Parmaklarda postural tremor
SMA Tip III	>18 ay	Normal	Desteksiz yürüyebilir	-
SMA Tip IV	Erişkin yaşta	Normal	Normal	-

a)SMA Tip 0 (Konjenital SMA)

Doğumdan itibaren ağır güçsüzlük ve hipotoni görülür. İntrauterin dönemde fetal hareketlerin az olduğu hissedilebilir ve eklem kontraktürleri izlenebilir. Hastalar genellikle ciddi solunum yetmezliği nedeniyle 6 aydan önce kaybedilir (32,33).

b)SMA Tip 1 (Ciddi Spinal Musküler Atrofi, Werdig-Hoffman Hastalığı) (Omim No: 253300)

En ağır ve en sık görülen tip olup hastaların yaklaşık %50-60'ı bu grupta yer alır (1,34). Diğer tiplerden 6.aydan önce bulgu vermesi ve hastaların genellikle ilk 2 yaşta kaybedilmesiyle ayrılır. Bebeklik döneminde ağır kas

güçsüzlüğü tabloya hakimdir, hastalar başını tutamaz, desteksiz oturamaz. Proksimalden başlayan simetrik kas güçsüzlüğü, motor gelişme geriliği ve zayıf kas tonusu majör klinik bulgularıdır. Sıklıkla dizlerde hafif eklem kontraktürleri görülür. Yaşamın ilk aylarında büyüme geriliğine ve tekrarlayan aspirasyona neden olan emme-yutma problemleri görülür. Diyafram kaslarının göreceli olarak korunup interkostal kasların tutulmasına bağlı olarak abdominal solunum ve “bell-shaped” toraks ortaya çıkar. Fasyal kaslar nispeten korunmuştur, diyafram kasları hastalığın sonuna doğru etkilenir. Kalp kası etkilenmez. Hastaların hepsinde olmamakla birlikte çoğunda bulbar denervasyona bağlı dilde fasikülasyon görülür.

Etkilenen olguların yaklaşık %68'i 2 yaşından önce, %82'si ise 4 yaşından önce kaybedilir (4,35). Solunum kaslarının etkilenmesine bağlı olarak meydana gelen aspirasyon pnömonisi önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir (1) Solunum desteği ve nutrisyonel destekle yaşam süresi uzatılabilir. SMA Tip 1'li olgularla yapılan bazı çalışmalarda ortalama yaşam süresi 24 ay olarak gösterilmiş olup, tam zamanlı noninvaziv ventilasyona bağlanma yaşı ise 13,5 ay olarak saptanmıştır(31,36,37).

c)SMA Tip II (Dubowitz Hastalığı) (Omim No:253550)

Hastalık ara form olup 7-18 aylar arası bulgu vermeye başlar. Doğumda kas tonusu zayıftır, motor beceriler yavaş yavaş kazanılır. Yapılabilen en üst motor aktivite desteksiz oturmaktır ve bu beceri ortalama 15-16 yaşlarında kaybedilir. Hastaların bir kısmı destekle ayakta durabilir ancak hiçbiri desteksiz yürüyemez (1). Solunum kaslarında progresif güçsüzlük sonucu restriktif akciğer hastalığı gelişir, bu durum hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Ortalama yaşam süresi ile ilgili net veri olmamakla birlikte Almanya ve Polonya'dan SMA Tip II ve Tip III tanılı 569 olgunun alındığı bir çalışmada vakaların yaklaşık %68'inin 25 yaşının üzerinde olduğu tespit edilmiştir (35).

**d)SMA Tip III (Juvenil Musküler Atrofi, Kugelberg-Welander Hastalığı)
(Omim No:253400)**

Bu hasta grubunda semptomlar çok heterojen olup 18.aydan sonra bulgu vermeye başlar. Alt ekstremitte üst ekstremiteden daha çok etkilenir. Olgular bütün nöromotor basamakları tamamlayabilirler, desteksiz yürüyebilirler, ancak merdiven inip çıkarken zorlanırlar ve sık sık düşerler. 18.aydan önce tanı alan hastalarda nöromotor gelişim devam etse de zamanla kazanılmış becerilerini kaybedebilirler. Hastaların bir kısmı erişkinlikte sadece hafif kas güçsüzlüğü yaşarken bir kısmı çocukluk döneminde tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelir (1). SMA Tip II ve Tip III tanılı bireylerin alındığı retrospektif bir çalışmada SMA Tip III tanılı olguların yaşam süresi popülasyonla aynı bulunmuştur (35).

e)SMA Tip IV (Omim No:271150)

Kas güçsüzlüğü ikinci ya da üçüncü dekatta başlar, klinik bulgular SMA Tip III'e benzer (35,38,39). Hafif motor güçsüzlük tabloya hakimdir, hastalar erişkinlikte desteksiz yürüyebilir. Yaşam süresi normaldir (1).

2.4.4 Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Güncel Sınıflaması

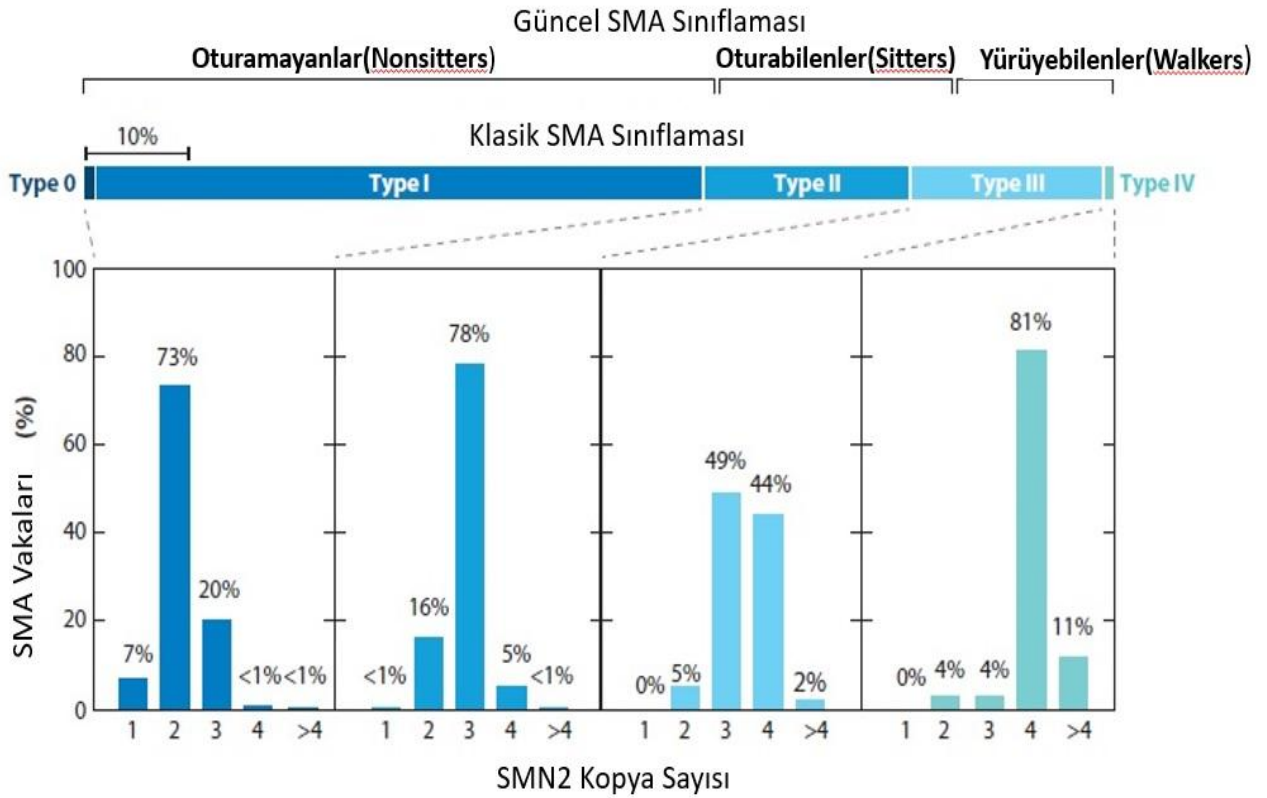
Sadece motor değerlendirmeye dayanan sınıflamanın öngörücü değeri sınırlı olduğundan SMA'nın klasik sınıflandırması mevcut yeni klinik çalışmalar için yeterli olamamaktadır. Bu nedenle tedavi takibi ve hastaları aynı ölçütlerle değerlendirip hastalar arasında tutarlılığı sağlamak için olguların oturamayanlar, oturanlar ve yürüyenler olarak yeniden sınıflandırılması önerilmiştir (40-42). Bununla birlikte, SMA'nın hastalığının seyrini hiçbir sınıflamanın mükemmel şekilde kapsamadığı düşünülmektedir (42).

a) Oturamayanlar (nonsitters); Bu gruptaki hastaların büyük çoğunluğu SMA Tip I olgularından oluşmaktadır. Bununla birlikte SMA Tip II klinik özellikleri gösterip desteksiz oturan ancak daha sonra bu beceriyi kaybedip regrese olan olgular da bu gruba dahil edilmektedir (Şekil2.2). Bulbar ve interkostal kasların etkilenmesiyle solunum yetmezliği ve beslenme zorluğuna neden olan bell-shaped toraks deformitesi oluşur. Dil kaslarının da etkilenmesiyle fasikülasyon görülür. Yüz kasları konjenital başlangıçlı olanlar dışında genelde etkilenmez. Muayene sırasında bebeklerde baş kontrolü olmadığı ve sırtüstü tutulduğunda kurbağa bacağı postürü aldıkları görülür. Beslenme ve solunum desteği son yirmi yılda mortaliteyi önemli ölçüde azaltmıştır. Bu tedavilere rağmen sağ kalım uzasa da etkilenen bebeklerde motor becerilerde artış görülmemektedir(42,43).

b) Oturabilenler (sitters): Bu grupta SMA Tip II ve yürüyemeyen SMA Tip III hastaları yer alır (Şekil2.2). Desteksiz oturabilirler ancak desteksiz yürüyemezler ya da bu becerilerini kaybederler (41,42). Bu hastalarda yaşamın ilk aylarında jeneralize hipotoni ve kas güçsüzlüğü vardır. Zamanla eklem kontraktürleri ve mandibüler ankiloz gelişir. Bu gruptaki hastalar zayıf aksiyel kaslarla sürekli oturdukları için skolyoz gelişir ve interkostal kas güçsüzlüğüne sekonder restriktif akciğer hastalığı görülür(44). Hastalarda solunum problemleri mortaliteyi belirler. Sağkalım oturamayan gruptaki hastalara göre daha uzun seyretmekte olup yapılan bir çalışmada 5 yaşındaki hastaların yaklaşık %98,5'inin, 25 yaşındaki hastaların ise %68,5'inin hayatta olduğu tespit edilmiştir.

c)Yürüeyebilenler (walkers): Bu gruptaki hastalar yürüme yeteneği kazanmış ve bu yeteneğini devam ettiren SMA Tip III ve Tip IV hastalardan oluşur (Şekil2.2). Yürüme yeteneğinin kazanılması hastalığın başlangıç yaşı ve desteksiz oturma becerisinin edinildiği aya bağlıdır. Erken aylarda desteksiz

oturabilen hastaların yaklaşık %95'i 18 aylık olduklarında yürüyebilmekteyken; geç oturabilenlerin yaklaşık %50'si yürüyebilir. Hastalık seyri genellikle stabil seyretmekle birlikte 48 aylık aralıklarla yapılan incelemelerde, hastaların motor fonksiyon ölçümlerinde ve spirometri testlerinde hafif bir azalma görülmüştür(45). Olguların yaşam süresi diğer gruptaki hastalara göre önemli ölçüde etkilenmez(42,44).



Şekil 2.2 Yeni ve klasik sınıflamaya göre SMA'nın klinik formları ve SMN2 kopya sayısı ile korelasyonu -Wirth ve ark.(42)'ndan alınmıştır. Tüm SMA Tip 0, SMA Tip I hastalar ve bağımsız olarak oturamayan bazı SMA tip II hastalar oturamayanlar (nonsitters) kategorisine girmektedir. Diğer SMA tip II hastalar ve bağımsız olarak yürüyemeyen bazı SMA tip III hastalar, oturabilenler (sitters) kategorisine girmektedir. Kalan SMA tip III bireyler ve tüm SMA tip IV bireyler yürüyebilenler (walkers) kategorisine girmektedir. Güncel SMA sınıflaması için korelasyon çalışması bulunmadığından klinik şiddet ile SMN2 kopya sayısı arasındaki korelasyonlar klasik sınıflamaya göre düzenlenmiştir (42)

2.5 Diğer Spinal Musküler Atrofi Tipleri

2.5.1 SMARD1 (Respiratuvar Distres ile Seyreden İnfantil Spinal Musküler Atrofi)

Respiratuvar distres ile seyreden infantil spinal msküler atrofi (SMARD1); diyafragmatik palsi, simetrik distal kas güçsüzlüğü, kas atrofisi, periferel duyusal nöropati, otonom disfonksiyon ile karakterize çok nadir görülen otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır.

Distal Spinal Musküler Atrofi Tip 1/ Diyafragmatik Spinal Musküler Atrofi/ Solunum Yetmezliğı İle Seyreden Ağır İnfantil Aksonal Polinöropati olarak da bilinen bu hastalık 11q13 bölgesinde lokalize immunoglobulin μ -bağlayıcı protein 2 (IGHMBP2) geninde meydana gelen patojenik mutasyonlardan kaynaklanır (46,47).Hastalık ilk olarak 1974 yılında Mellins ve ark tarafından diyafragmatik palsi ile seyreden Werdnig Hoffmann hastalığı (SMA Tip 1) varyantı olarak tanımlanmıştır(48).

1996 yılında SMARD 1 olarak farklı bir isimle adlandırılmış olup şimdiye kadar yaklaşık 51 olguda IGHMBP2 geninde mutasyon saptanmıştır. Hastalığın prevalansı bilinmemekle birlikte erken dönemde diyafragmatik paralizi gelişen SMA hastalarının %1 kadarının SMARD1 tanılı vakalar olduğu düşünülmektedir (49,50). SMA Tip 1 ile arasındaki temel fark SMA Tip 1 hastalığında esas olarak proksimal kaslar etkilenip interkostal kasların etkilenmesine bağlı bell shaped toraks görülürken; SMARD1 hastalığında distal kaslar etkilenir, diyafragmatik paralizi, ayak deformiteleri ve ekstremitte kontraktürleri görülür (51).

Klinik, histopatolojik ve elektrofizyolojik özelliklere dayanan tanı kriterleri Pitt ve ark tarafından 2003 yılında oluşturulmuştur. Bu tanı kriterleri arasında klinik bulguların erken başlangıçlı olması (3 ay içinde), diyafragmatik kaslarda

distal denervasyon, sinir iletim hızında yavaşlama ve sinir biyopsisinde miyelinizasyon kaybı yer alır (52). Hastalığın doğal seyri tam olarak bilinmemekle birlikte tanı konan vakalar genellikle 13. aydan önce yaşamını yitirmektedir (1,53).

2.5.2 Spinal Bulbar Musküler Atrofi (SBMA) (Kennedy Hastalığı)

Hastalık ilk defa 1968 yılında 11 hastada William Kenedy tarafından tanımlanmış olup erişkin başlangıçlı SMA'nın nadir görülen bir formu olarak düşünülmektedir (54). Progresif kas güçsüzlüğü ile karakterize hereditör alt motor nöron hastalığıdır. X kromozomunda lokalize androjen reseptör (AR) genindeki glutamin kodlayan "CAG" tekrar sayısının artmasından kaynaklanır (54,55).

X'e bağımlı resesif kalıtıldığı için kadınlar taşıyıcı iken erkeklerde hastalık görülür (56). Taşıyıcı kadınlar genellikle asemptomatiktir ancak tekrar sayısı arttıkça (CAG>38) kasılma ve kramplar gibi hafif klinik bulgular görülebilir(57). Normal popülasyonda AR geninde "CAG" tekrar sayısı 11-32 arasında iken Kennedy hastalığında "CAG" tekrar sayısı 38-68 arasında değişir(58,59). Klinik bulgular genellikle 30-50 yaşları arasında ortaya çıkar ve "CAG" tekrar sayısı ile hastalığın ortaya çıkma yaşı arasında ters korelasyon vardır(60). Bazı ileri yaş hastalar klinik bulgular ortaya çıkmadan farklı sebeplerle hayatını kaybedebilir.

SBMA prevalansının 1-2/100 000 olduğu tahmin edilmekte olup hastalıkla ilgili farkındalık az olduğu için vakaların gözden kaçtığı düşünülmektedir (57). Hastalığın kardinal bulguları; üst ve alt ekstremitelerde kas güçsüzlüğü ve kas atrofisi, bulbar kas güçsüzlüğüne bağlı dizartri, disfaji, kramplar ile azalmış derin tendon refleksidir. Ekstremitelerdeki kas güçsüzlüğüne bağlı olarak hastalar yürümekte zorlanırlar. Yüz ve dil kaslarının etkilenmesine bağlı olarak hastalar konuşmakta ve yutmakta güçlük çekerler.

Ayrıca etkilenen bireylerde AR genindeki mutasyona bağılı olarak meydana gelen androjenlere duyarsızlık nedeniyle jinekomasti, infertilite, testiküler atrofi, erektil disfonksiyon görülebilir.

Hastalık yavaş progresyon gösterir, hastalığın ileri evrelerine kadar mobilite korunmuştur (59). Olgular altmışlı yaşlarda tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelirler(58). Erken evrelerde disfaji, dizartri gelişebilir (61). Yaşam süresi etkilenmezken bulbar kas güçsüzlüğüne bağılı aspirasyon pnömonisi riski artmıştır (58). Hastalığın tedavisine yönelik çalışmalar devam etmekte olup henüz yüz güldürücü bir sonuç elde edilememiştir. Palyatif tedavi seçenekleri arasında mobilitayı arttırıcı spesifik egzersizler yer almaktadır. Bu egzersizlerin tedavideki rolü net değildir ve yapılan çalışmalarda önemli bir etkisi saptanmamıştır (62).

2.5.3 Distal Spinal Musküler Atrofi

Oldukça nadir görülen bu formda kas güçsüzlüğü alt ekstremitelerde distalinden başlar, yavaş seyirlidir ve yaşam süresi etkilenmez (63). Klinik olarak Herediter Motor Duysal Nöropati Tip I ve Tip II'ye benzer ancak üst ekstremitelerde güçsüzlüğünün daha az görülmesi, derin tendon reflekslerinin korunması ve duyu muayenesinin normal olmasıyla HSMN'den ayrılır. Motor sinir iletim hızı normaldir. Hastalığın otozomal resesif ve X'e bağılı resesif kalıtılan alt tipleri vardır (63).

2.6 Spinal Musküler Atrofi Moleküler Patogenezi

SMN proteini, spinal kord motor nöronlarda daha fazla olmak üzere tüm somatik dokularda eksprese olur ve evrimsel olarak ökaryotlar arasında korunmuş olup tam eksikliği yaşamla bağdaşmamaktadır(64)

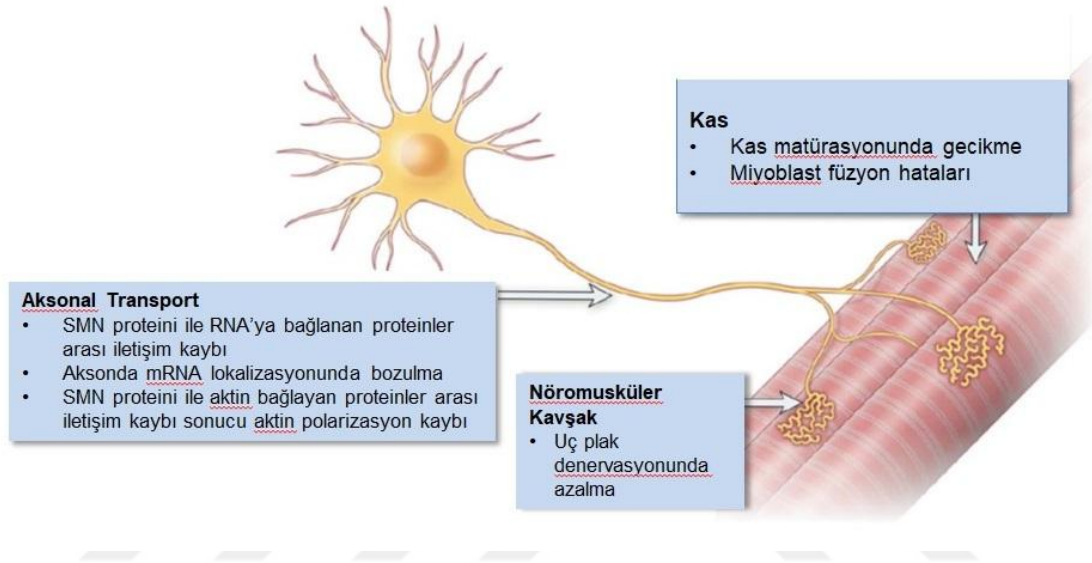
SMN proteini, gemin (gemin2-8) ve unrip proteinleriyle birlikte multiprotein yapıdaki SMN kompleksini oluşturarak sitoplazma ve çekirdekte yer alır (65). SMN proteininin ribozom formasyonu, gen transkripsiyonu, transkripsiyon sonrası kırılma, küçük nükleer ribonükleer protein(snRNP)

biyogenezi gibi çeşitli fonksiyonları vardır (66,67). Motor nöronlarda ise nöronal transport, nöronal büyüme, nörit uzaması, nöronal farklılaşma, aksonal yönelme ve aktin dinamiklerinin düzenlenmesinde rol alırken eksikliği anormal uç plak denervasyonu yaparak nöromusküler kavşakta fonksiyon bozukluğuna yol açar (Şekil 2.3).

Birçok dokuda eksprese olan SMN proteinin eksikliğinin neden sadece kas dokusunda hasara sebep olduğu tam olarak aydınlatılamamış olsa da bu konuda bazı hipotezler sunulmuştur(1) İlk olarak SMN protein eksikliği nedeniyle snRNP biyogenezindeki defektin motor nöronlar için önemli olabilecek bir grup genin işlenmesinde hataya neden olduğu ya da SMN proteininin akson spesifik fonksiyonlarını yerine getirememesi sonucunda motor nöronlarda dejenerasyona neden olabileceği düşünülmektedir (68). Winkler ve ark. tarafından zebra balığı embriyonik modellerde yapılan bir çalışmada snRNP biyogenezindeki bozuklukların motor nöron dejenerasyonunu indüklediği gösterilmiştir(69). Gabanella ve ark. ise SMN1 geninde homozigot delesyon olan farelerde yaptıkları çalışmada, delesyon olmayan farelere göre snRNP aktivitesinin on kat daha az olduğunu göstermişlerdir(70).

SMN proteini motor nöronlarda ve nöritlerde ribonükleoprotein granülleri içerisinde hnRNP R ve Q proteinleri ile de etkileşim içindedir(71) .hnRNP R proteini β -aktin geni mRNA'nın 3'UTR bölgesini etkiler ve β -aktin içeren ribonükleoprotein komplekslerinin transportunda rol alır. SMN proteini azaldığında β -aktin mRNA ve proteinin aksonlarda azaldığı tespit edilmiştir(72). β -aktin proteinin azalması ise aksonal büyüme ve aksonal metabolik yollarda defektlere yol açarak motor nöron dejenerasyonuna neden olur(1,73).

SMN proteini aynı zamanda bir aktin bağlayan protein olan profilin IIa ile de etkileşim içindedir. Profilin IIa aktin monomerlerinin serbest kalmasını düzenler ve aktin dinamiklerini kontrol ederek nöronal büyümede görev alır. SMN protein eksikliğinde profilin IIa ile etkileşim bozulur ve nöronal büyüme inhibe olur(74).

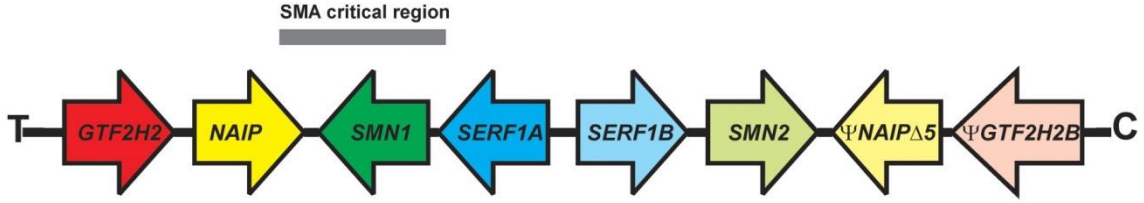


Şekil 2.3 SMN protein eksikliğinin aksonal transport, nöromusküler kavşak ve kas dokusunda hastalık mekanizmasına etkileri -Bricceno ve ark.(75)'ndan alınmıştır.

2.7 Spinal Musküler Atrofi Moleküler Genetiği

1990'lı yıllarda SMA'nın etiyolojisine yönelik yapılan gen haritalama çalışmalarında 5.kromozom uzun kolu q13 bölgesinde SMA lokusu tanımlanmıştır (76,77) (Şekil2.4). SMA lokusu 500 kb'lık inverted segmental duplikasyon bölgesinde yer alır. SMA lokusunda protein kodlayan dört tane gen tanımlanmıştır: SMN1 [survival motor nöron1, telomerik SMN (SMNT) (6), NAIP [nöronal apoptozis inhibitör protein(78), GTF2H2A [general transcription faktör II H, p44(79,80)] ve SERF1A [small EDRK-rich factor 1A, H4F5A (81)] . Bu

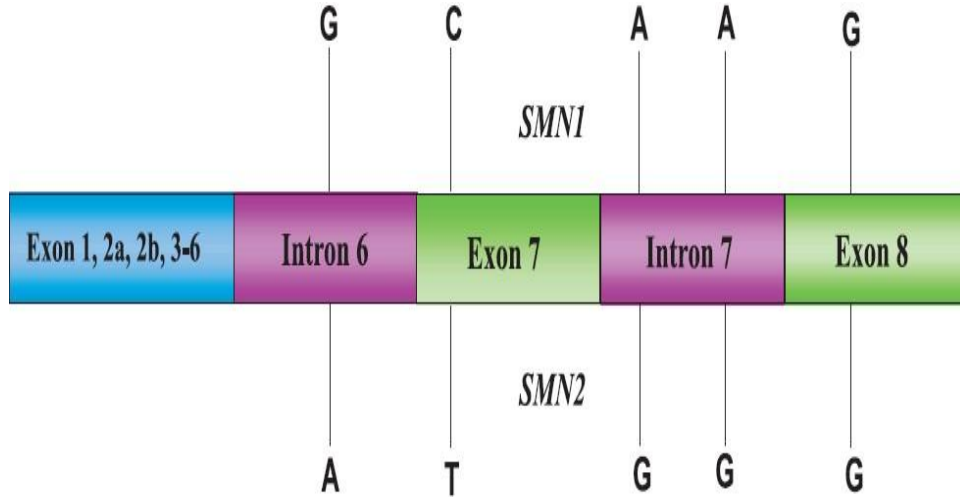
genler ya birbirinin psödogeni (Ψ GTF2H2B ve Ψ NAIP15), ya birbirinin aynısı (SERF1B) ya da SMN2 gibi homologudur.



Şekil 2.4. Kromozom 5q13 lokusunda inverted duplikasyon bölgesinde yer alan SMA lokusu -Butchbach ve ark(82)'ndan alınmıştır.

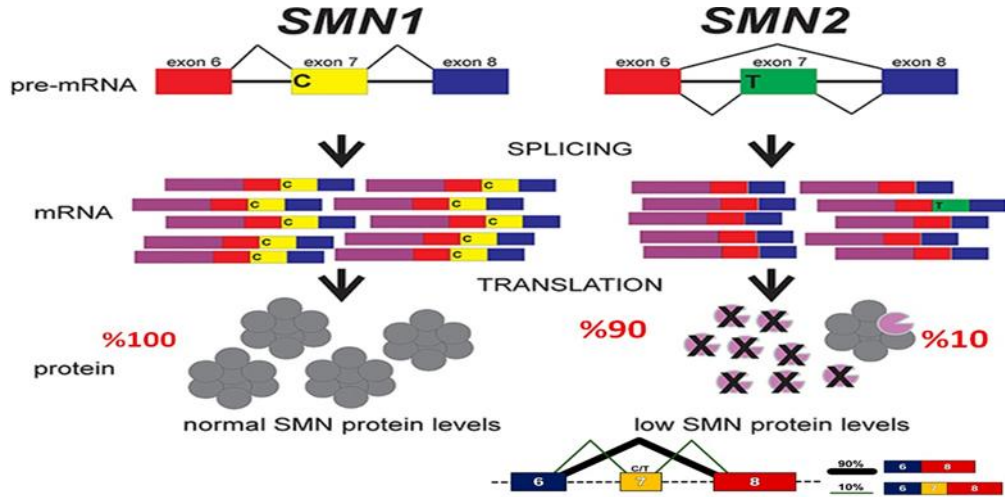
1995 yılında bu bölgede yer alan SMN geni Lefebvre S ve ark tarafından aday gen olarak bildirilmiştir (6). Daha sonraları hastalığın yaklaşık %95'inin SMN geninde meydana gelen homozigot delesyonlar sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir (1,6).

SMA lokusunda meydana gelen duplikasyon sonucu SMN geninin telomerik (SMN1 - SMNt) ve sentromerik (SMN2 - SMNc) olmak üzere iki formu ortaya çıkmıştır(83). SMN1 ve SMN2 genleri birbirinin homologu olup aralarında sadece 5 nükleotitlik (exon 7, exon 8, intron 6 ve intron 7) fark vardır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 SMN1 ve SMN2 genlerindeki 6.intron, 7.ekzon, 7.intron ve 8. ekzondaki nükleotit dizisi farklılıkları, Bu farklardan en önemlisi 7.ekzonda yer alan c. 840 C> T transisyonu olup silent bir değişimdir; ancak ekzonik splice enhancer (ESE) dizisini bozar ve yeni bir ekzonik splice supresör (ESS) dizisi oluşturur -Balraj ve ark.(84)'ndan alınmıştır.

Bu farklılıktan dolayı SMN1 geninden tam ve fonksiyonel SMN proteini sentezlenirken, SMN2 geninden %85-90 oranında nonfonksiyonel kısa ömürlü SMNDELTA7 proteini sentezlenir (6,85,86) (Şekil 2.6). SMN2 geninden üretilen yaklaşık %10-15 kadar fonksiyonel SMN proteini hastalığı engelleyemese de; hastalığın prognozunda önemlidir ve SMN2 geni kopya sayısı arttıkça prognozun iyileştiği görülür.



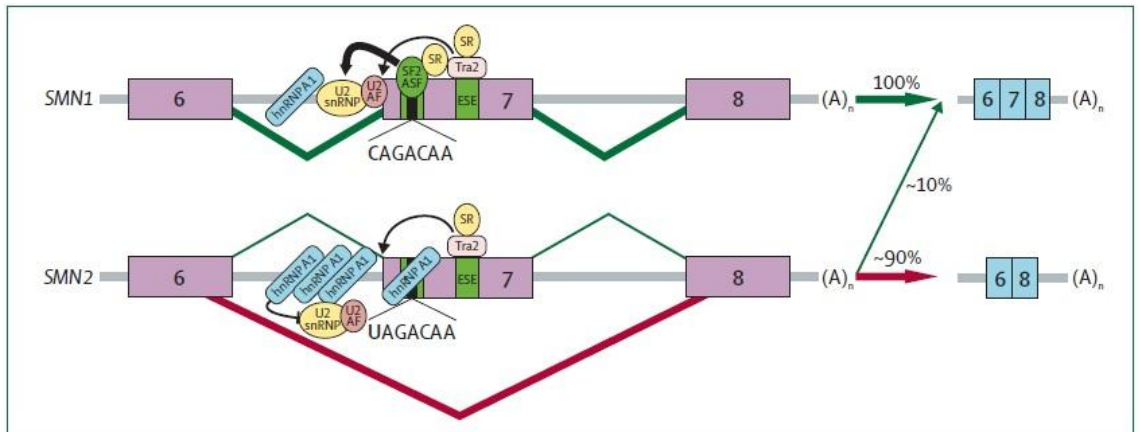
Şekil 2.6 SMN1 ve SMN2 genlerinden üretilen SMN protein miktarı - Butchbach ve ark.(82)'ndan alınmıştır .

SMN1 ve SMN2 genleri arasındaki en önemli yapısal farklılık 7.ekzon 840.pozisyonda SMN1 geninde sitozin bazı bulunurken SMN2 geninde timin bazının bulunmasıdır. Bu farklılık etkisini ekzonik splice enhancer (ESE) üzerinden kırılmayı bozarak gösterir. Ekzonik splice enhancer dizisi, splicing faktör2 (SF2) proteini ile indüklenir. Splicing faktör 2 (SF2) veya diğer adıyla alternatif splicing faktör (ASF); U2snRNP (small nuclear ribonuclear protein) proteini ve onun yardımcı faktörü (U2AF), ile birlikte intron 6 üzerindeki dallanma noktasıyla etkileşerek intronun kırılmasına ve böylece SMN1 geninin transkripsiyonunun tamamlanmasına katkıda bulunurlar. Diğer splice faktörleri (örn Tra2) ekzon 7 ile etkileşerek kırılma işleminin tamamlanmasına aracılık ederler. Serin ve arjinin (SR) zengin proteinler ise splisozom kompleksine katılarak kırılma üzerine katkı sağlarlar (Şekil2.7) (1).

SMN2 geninde 840.pozisyonda timin bazı bulunması sonucu aminoasit dizisi değişmemekte ancak ekzon 7 de yer alan ekzonik splice enhancer (ESE) dizisi değişmekte ve splisozom kompleksi tarafından bu bölgenin tanınarak

kırılması azalmaktadır. Sonuçta SMN2 geni tarafından kodlanan transkriptlerin yaklaşık %90'undan ekzon 7 içermeyen nonfoksiyonel kısa ömürlü SMNDELTA7 proteini sentezlenmektedir (1,7,87). SMN2 geni pre -mRNA'nın küçük bir kısmı ise ekzon 7'yi içerecek şekilde kırılmaya uğrar ve yaklaşık %10-15 kadar tam uzunlukta işlevsel SMN proteini oluşur (6) (Şekil 2.7).

SMN2 genindeki C840T transisyonunun bir diğer etkisi de C>T değişiminin SMN2 geni üzerinde ekzonik splice süpresör (ESS) bölgesi oluşmasına neden olmasıdır. ESS'ye kırılmayı engelleyici protein hnRNPA1 (heterojen nükleer ribonükleer protein/splicing represör protein) bağlanır ve bunun sonucunda ekzon 7'nin kırılması azalır (88,89) (Şekil2.7). Kashima ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda bu transisyonun aynı zamanda hnRNPA1 proteinin ESS bölgesine bağlanmasını arttırdığı ve bu şekilde ekzon 7'nin atlanmasına neden olduğu bulunmuştur (1,89). Cartegni ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise hnRNP A1 proteininin ESE bölgesine etkili SF2/ASF proteinlerinin etkisini antagonize ederek ekzon 7'nin kırılmasını azaltabileceği tespit edilmiştir (90).

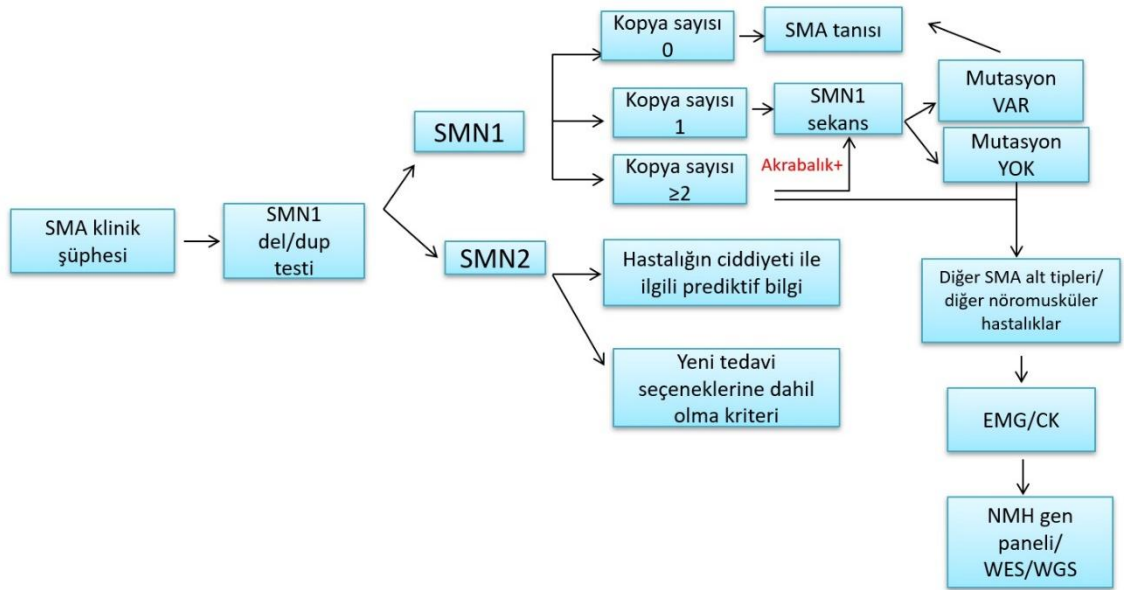


Şekil 2.7. SMN1 ve SMN2 pre-mRNA'ların işlenmesi –Lunn ve ark.(1)'ndan alınmıştır.

2.8 Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Tanısı ve Moleküler Tanı Yöntemleri

SMN1 geni ekzon 7 ve ekzon 8 de meydana gelen homozigot delesyonlar hastaların yaklaşık %95'inde görüldüğünden delesyonların tespiti hastalığın tanısında ve taşıyıcılık belirlenmesinde birinci basamak olarak kullanılmaktadır. SMN2 kopya sayısının belirlenmesi ise hastalığın prognozu, kliniği ve tedaviye cevabı etkilediği için önemlidir.

SMN1 ve SMN2 kopya sayılarının belirlenmesinde kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) veya çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (MLPA) yöntemi kullanılabilir (91-93). Bu yöntemlerden MLPA günümüzde altın standart olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.8 SMA tanısında diagnostik algoritma -Prior ve ark(31)'larından alınmıştır. (Del: delesyon; dup: duplikasyon; EMG:elektromiyografi; CK:kreatin kinaz; NMH:nöromuskuler hastalık; WES:tüm ekzom sekanslama; WGS:tüm genom sekanslama)

Hastaların yaklaşık %1-3'ünde bir allelde delesyon görülürken diğerinde nokta mutasyonlar görülmektedir(25). Bu sebeple SMN1 geni kopya sayısı iki ve üzerinde olup ebeveynleri arasında akrabalık bulunan ya da SMN1 geninde heterozigot delesyon olan hastalarda SMN1 geni sekanslanması önerilmektedir. SMN1 kopya sayısı 2 ve üzerinde, nokta mutasyon saptanmayan hastalarda ise diğer SMA alt tipleri ya da diğer nöromusküler hastalıklar düşünülmelidir. Bu hastalarda tanıya yönelik nöromusküler hastalıklar paneli, WES (tüm exom sekanslama) veya WGS (tüm genom sekanslama) önerilmektedir (Şekil2.8).

2.9 Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Taşıyıcılık Taraması

Spinal Musküler Atrofi, otozomal resesif bir hastalık olduğu için aileler çoğu zaman etkilenmiş bir çocuk sahibi olana kadar taşıyıcı olduklarının farkında olmamaktadırlar (2). Taşıyıcılığın 1/40-60 gibi oldukça yüksek olduğu bu hastalıkta özellikle ülkemiz gibi akraba evliliklerinin çok olduğu ülkelerde taşıyıcılık taraması önem arz etmektedir.

SMA taşıyıcılık taraması, SMN1 kopya sayısının değerlendirilmesi ile yapılmaktadır (2) Sağlıklı bireylerde, SMN1 geninden her iki allelde de birer tane olacak şekilde en az 2 fonksiyonel kopya bulunurken, SMN2 geni kopya sayısı değişkendir. Taşıyıcılarda ise başlıca dört ana genotip görülür; en sık görüleni 1+0 genotipidir (bir fonksiyonel normal allel, diğer allelde delesyon). Daha nadir olarak 2+0 genotipi görülür; bu genotipte iki fonksiyonel gen aynı kromozomda yer alırken diğer kromozomda delesyon vardır. Son olarak çok nadir de olsa 1+ 1^D ve 2+1^D genotipleri görülebilir; bu genotiplerde bir kromozomda fonksiyonel bir veya iki allel varken diğer kromozomda nokta mutasyon ya da mikrodelesyon vardır (28,82,94) (Şekil2.9).

2+0 genotipi taşıyıcılık taramasında yanlış negatif sonuçlara yol açmaktadır. Bu konuda Luo ve ark tarafından Askenazi yahudilerinde yapılan çalışmalarda 2+0 genotipi olan bireylerde SMN1 geni 7.intronda g.27134 T > G ve 8.ekzonda g.27706_27707delAT varyantının daha sık görüldüğü tespit edilmiştir(95) Alías ve ark'larının 2018'de 270 İspanyol olguda yaptığı çalışmada ise bu iki varyant 2+0 taşıyıcılarının %21.8'inde tespit edilmiştir (96). SMN1 genindeki nokta mutasyonlar da standart taşıyıcılık taramasıyla tespit edilemediğinden yanlış negatif taşıyıcı test sonuçlarının başka bir potansiyel nedenidir (27)

Sağlıklı bireylerin genotipleri



Taşıyıcı bireylerin genotipleri



* nokta mutasyon ya da mikrolelesyon

Şekil2.9 Taşıyıcı ve sağlıklı bireylerde en sık görülen SMA genotipleri - Verhaart ve ark.(27)'ndan alınmıştır

Şimdiye kadar SMA taşıyıcılarında klinik bulgu bildirilmemiştir ancak SMN1 kopya sayısındaki değişikliklerin (delesyon ya da duplikasyon) ALS (amyotrofik lateral skleroz) riskini ve ciddiyetini arttırabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (82). Amerikan Tıbbi Genetik Birliği [American College of Medical Genetics (ACMG)] 2010 yılında etnik köken ve ırka bakılmaksızın tüm çiftlere SMA taşıyıcılık testi yapılmasını öneren bir klavuz yayınlamıştır (97). ACMG hastalığın klinik şiddeti, yüksek taşıyıcı sıklığı ve prenatal tanı için güvenilir testlerin varlığı nedeniyle SMA'da taşıyıcılık taramasının yapılmasını önermektedir. Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği Mart 2018'de spinal musküler atrofinin tarama programına alınmasına dair bir klavuz yayınlamıştır(3). Ülkemizde de SMA henüz tarama programına alınmamış olsa da bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Taşıyıcılık taramasında dikkat edilmesi gereken bir konu SMA'da genotip-fenotip korelasyonunu etkileyen faktörlerin hepsinin henüz saptanmamış olmasıdır; örneğin prenatal tanıda homozigot delesyon saptanan fetüsün fenotipi tam olarak tahmin edilemez(2). SMA'da risk değerlendirmesi (ciddiyetine bakılmaksızın), SMN kopya sayısı, küçük intragenik mutasyonlar, %2 gibi nispeten yüksek bir de novo mutasyon oranı ve yanlış negatif taşıyıcı taraması riski nedeniyle karmaşıktır(95). Taşıyıcı taramasının uygulandığı diğer hastalıklarda olduğu gibi, genotip-fenotip korelasyonunu daha iyi tanımlamak için sürekli araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır(2).

2.10 Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Genotip-Fenotip İlişkisi ve SMN2 Kopya Sayısı

SMN2 geni tarafından üretilen az miktardaki tam uzunluktaki fonksiyonel SMN proteini SMA Tip II ve Tip III fenotiplerinde hastalığın kliniğinin hafiflemesine katkıda bulunur. İnsan genomunda SMN2 geni kopya sayısı 0 ile 8 arasında değişmektedir (82). Sağlıklı popülasyonun %10-15'inde SMN 2 kopya sayısı 0 olarak bildirilmiştir(98). SMN 2 kopya sayısının iki olduğu hastalarda %79 olasılıkla SMA tip I fenotipi görülürken dört ve üzeri kopya

sayısı olan hastalarda %88 olasılıkla kliniğin daha hafif olduğu SMA Tip III/IV fenotipleri bildirilmiştir(99) (Tablo2.3).

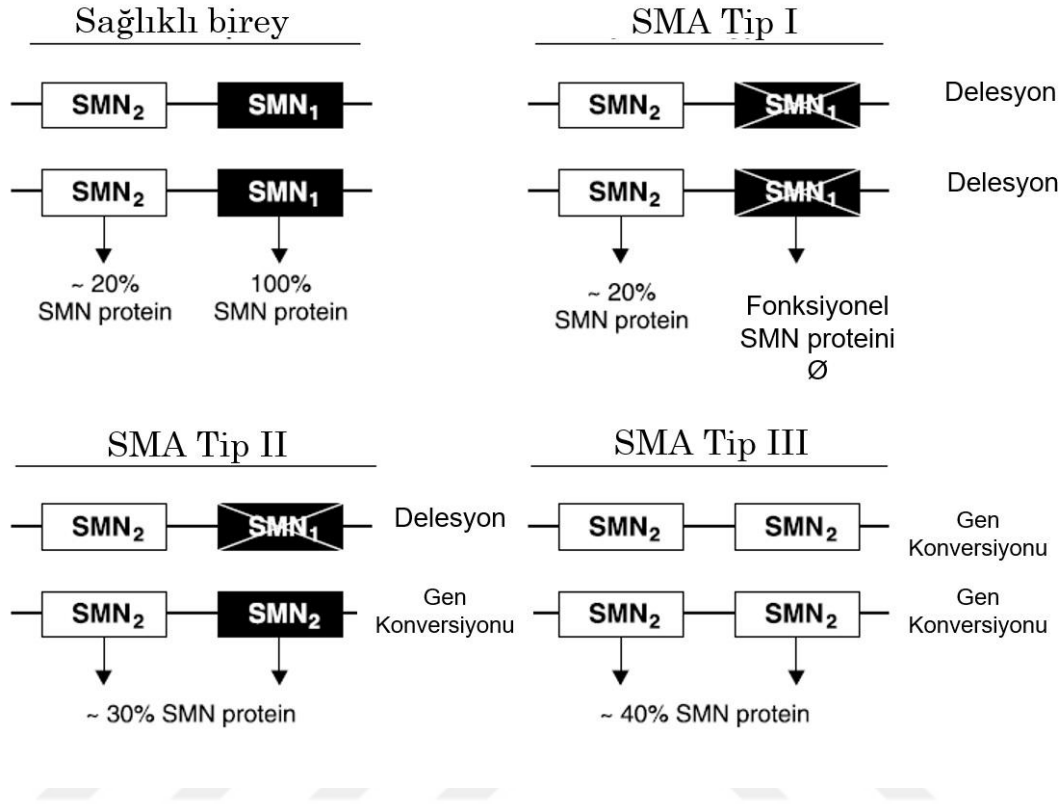
Tablo 2.3 SMN2 kopya sayısı ve SMA klinik fenotipleri -Prior ve ark.(31)'ndan alınmıştır.

SMN2 Kopya Sayısı	SMA Klinik Fenotipi		
	SMA I	SMA II	SMA III/IV
1	%96	%4	%0
2	%79	%16	%5
3	%15	%54	%31
≥4	%1	%11	%88

Bu konuda farelerde yapılan çalışmalarda, farelerde SMN geni ortoloğunun sadece bir tane bulunan 'mSmn' geni olduğu tespit edilmiştir(100). mSmn geninin kaybı ise embriyonik dönemde letal seyretmektedir. Transgenik SMN2 insersiyonu yapıldığında mSmn geninde delesyon olan embriyolarda gelişmenin devam ettiği gösterilmiştir. mSmn geninde delesyon olan farelere iki kopya SMN2 verildiğinde farelerde ağır SMA fenotipi görülmüş ve doğduktan sonra 8 gün içerisinde ölmüşlerdir(82,101). Bu farelere üç-dört kopya SMN2 verildiğinde daha hafif klinik görülmüş, kopya sayısı daha da arttırıldığında farelerin tamamen sağlıklı olduğu görülmüştür(82) . Prior ve ark. da SMN2 kopya sayısı beş olup, SMN1 geninde homozigot delesyon olan asemptomatik üç olgu bildirmiştir. Bu durum SMN2 kopya sayısı arttıkça yeterli SMN proteini üretilebileceğini göstermektedir(98).

SMA hastalarında SMN2 kopya sayısını arttıran mekanizmalardan bir tanesi gen konversiyonudur. Bu mekanizmaya göre SMA Tip I hastalarında her iki allelde SMN1 geninde delesyon varken, SMA Tip II hastalarda bir allelde

delesyon diğ erinde konversiyon, SMA TipIII hastalarda ise her iki allelde SMN1 geninde gen konversiyonu vardır(Ş ekil2.10).



Ş ekil 2.10. Sağlıklı birey ve SMA hastalarının genotipleri ve genotiplerine göre üretilen fonksiyonel protein düzeyleri - Baioni ve ark. (20)'larından alınmıştır.

SMN2 kopya sayısı ile hastalığın kliniği arasında ters korelasyon olsa da bazı istisnalar ve hastalığı modifiye edici başka faktörler de tanımlanmıştır. Bernal ve ark. tarafından SMA Tip II ve Tip III kliniği olan ancak SMN2 kopya sayısı iki olan olgular bildirilmiştir. Bu olgulardaki SMN2 geni sekanslandığında SMN2 geni ekzon 7'de c.859G>C varyantı tespit edilmiştir. Bu varyant SMN2 geni pre-mRNA kırılmasını düzenleyerek ekzon 7'nin olgun mRNA'ya dahil edilmesini sağlar, böylece SMN2 geninden daha fazla fonksiyonel SMN proteini sentezlenir. Bu durum olgulardaki hafif fenotipi açıklamaktadır (82,102).

Aynı aile içinde etkilenen olgularda SMN2 kopya sayısı aynı olmasına rağmen klinik variabilite bildirilmiştir(68,82,103). Bu olgulara bakıldığında kliniği daha hafif olan olgularda Plastin-3(PLS3) mRNA seviyesinin kliniği ağır olanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır(82,104,105). Bununla birlikte, bazı ailelerde, daha şiddetli SMA fenotipine sahip dişi olgular, yüksek PLS3 mRNA seviyesi göstermektedir(102). Bu durumda PLS3'ün modifiye edici özelliğinin, yaşa ve cinsiyete bağlı olabileceği ya da PLS3'ün SMA fenotipinde etkili olmayabileceği düşünülmüştür. SMA'da SMN2 dışında hastalığın fenotipinde etkili moleküllerin saptanması SMA için mevcut ve gelecekteki klinik çalışmaların planlanmasının yanı sıra SMA için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi açısından da önemlidir (42,82).

SMN genlerinin fonksiyonel domainin yanında yer alan NAIP geni 17 ekzondan oluşmakta olup, 56 kb uzunluğundadır ve 5. kromozom üzerinde SMN genleri gibi farklı kopya sayılarında bulunur(106). NAIP geni memeli hücrelerinde apoptozisi inhibe eden, SMA genleri için regülatuar bir genidir. SMA hastalığı üzerindeki rolü henüz net olmamakla birlikte, NAIP geni 5.ekzon homozigot delesyonunun klinik seyirle ilişkili olduğuna dair yayınlar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda SMN1 ve NAIP geninin birlikte homozigot delesyon olduğu olgularda daha ağır klinik seyir görülmekte olup, SMA Tip I fenotipinde olan hastaların yaklaşık %45'inde, SMA Tip II hastaların %12'sinde ve SMA Tip III hastaların %18'inde NAIP geni homozigot delesyonu saptanmıştır(33,106,107).

2.11 Spinal Musküler Atrofi Hastalığında Tedavi Seçenekleri

Tedavide, 1990'lı yıllara kadar hastalığın sekonder komplikasyonlarına yönelik palyatif destekleyici çözümler kullanılmıştır. SMA'nın genetik ve moleküler temelini aydınlatılmasıyla birlikte SMN proteinini arttırmaya yönelik terapötik yaklaşımlar uygulanmaya başlanmıştır.

Bu amaçla SMN2 gen ekspresyonunu arttırmak için farmakolojik ajanlar, antisens oligonükleotitler ve gen tedavisi kullanılmıştır.

2.11.1 Farmakolojik Ajanlar

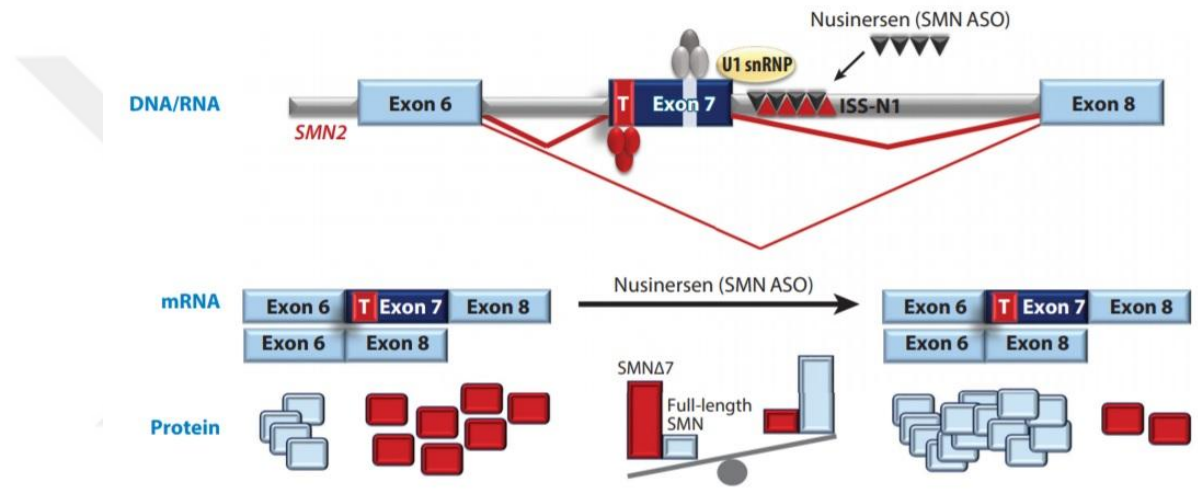
SMN protein seviyesini yükseltmeye yönelik histon deasetilaz inhibitörleri, aminoglikozitler ve kinazolin türevleri içeren çeşitli bileşikler hayvan modellerinde kullanılmıştır. Valproik asit sodyum bütirat, fenil bütirat gibi histon deasetilaz inhibitörlerinin SMN2 geninde promotor bölgeyi aktive ederek SMN protein seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Ancak bu ajanlar hayvan deneylerinde başarılı olmasına rağmen klinik çalışmalarda herhangi bir etki elde edilemediği için günümüzde kullanılmamaktadır.(7)

2.11.2 RNA Temelli Tedaviler

Tedavide ikinci olarak terapötik RNA molekülleri olan antisens oligonükleotitler (ASO) kullanılmıştır. Antisens oligonükleotitler komplementer sekanslarına bağlanarak hedeflenen intronun ya da ekzonun kırılmasını indükleyebilirler veya baskılayabilirler.

İlk olarak SMN2 geni pre-mRNA'sının ekzon 7'yi içerecek şekilde kırılmasını sağlamak için ekzon 8 3'splice site inhibitörü kullanılmıştır (108) Daha sonraları yeni splice site düzenleyicileri keşfedilmiş ve antisens oligonükleotitlerde stabilizeyi arttıracak çeşitli iyileştirmeler yapılmıştır. Başka bir splice site düzenleyicisi olan ve SMN2 pre-mRNA intron 7'de intronik splice inhibitör bölgesi olan N1'in antisens oligonükleotitler tarafından blokajının fibroblast kültürlerinde ve daha sonra yapılan hayvan deneylerinde ekzon 7'nin SMN2 pre-mRNA' ya dahil edilmesini arttırdığı gösterilmiştir (109). İlk hayvan deneylerinde sistemik uygulamanın kan beyin bariyerini geçemediği tespit edilince ilacın intraserebroventriküler enjeksiyon şeklinde verilmesiyle bu sorun çözülmüştür (110).

Hayvan modellerinde istenen başarı sağlanınca 2008 yılında ilk prelinik çalışmalar yapılmış ve 2016 yılında FDA onayı alarak SMA tedavisinde kullanılan ilk ilaç piyasaya sunulmuştur (8,9,41) Modifiye bir antisense oligonükleotit olan Nusinersen SMN2 pre-mRNA' da silence of splice bölgesinde 18 merlik spesifik bir bölgeye bağlanarak SMN2 pre-mRNA kırılmasını modüle eder ve böylece ekzon 7 nin çıkarılması engellenir (Şekil 2.11)



Şekil 2.11 Nusinersen aracılı SMN2 geni kırılması- Wirth ve ark.(42)'larından alınmıştır. Nusinersen (siyah üçgen) intron 7'de yer alan ISS-N1(kırmızı üçgen) bölgesine bağlanarak hnRNPA1/2 nin bölgeyi tanımasını engeller ve SMN2 pre-mRNA'da ekzon 7'yi tanıyan U1 snRNP proteinini stabilize eder. Bunun sonucunda ekzon 7'yi içeren SMN2 transkriplerinin miktarı artar. (ASO; antisens oligonükleotid, hnRNP; heterojen nükleer ribonükleoprotein, ISS-N1; intronik kırılma baskılayıcı N1, snRNP;küçük nükleer ribonükleoprotein).

Sonuçta tam uzunlukta işlevsel SMN proteini miktarı artmakta ve hastanın kliniğinde düzelme görülmektedir. İlaç SMN2 pre-mRNA üzerinden etkili olduğu için SMN2 kopya sayısı arttıkça ilacın etkinliği de artmaktadır.

2.11.3 Gen Tedavisi

Bu yöndeki ilk çalışmalar Foust ve ark. tarafından ağır SMA kliniği oluşturulan hayvan modellerinde denenmiştir. Bu çalışmada denek fare yavrusuna postnatal 1.gün SMN1 geni taşıyan partiküller adeno ilişkili virüs serotip 9 aracılığıyla intravenöz enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası spinal kord motor nöronlarında SMN1 ekspresyonunun tedavi edilmeyen yavru farelere göre %60 arttığı, motor fonksiyonlarda düzelme olduğu gösterilmiştir (111). Ancak enjeksiyon sonrası etki 1.gün maksimum iken zamanla etkinin azaldığı 10.gün ise etkinin tamamen yok olduğu saptanmıştır. Süregelen çalışmalar sonucu Mayıs 2019'da FDA tarafından Zolgensma® (onasemnogene abeparvovec-xioi) molekülü 2 yaş altı SMA tip 1 hastalarında ilk gen tedavisi olarak onaylanmıştır. Adenoilişkili virüs vektörü aracılığıyla tam fonksiyonel SMN geni intravenöz olarak uygulandıktan sonra motor nöronlarda SMN protein ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. İnfantil başlangıçlı SMA hastalarının alındığı bir çalışmada Zolgensma® ile tedavi edilen hastalarda başını tutma desteksiz oturma gibi nöromotor basamaklarda gelişme görülmüştür.

Hastalığın moleküler patogenezinin anlaşılmasıyla araştırmacılar yeni ümit verici ajanları öncelikle in vitro hayvan modellerinde test etmekte sonraları hastalığın erken evresinde veya presemptomatik dönemdeki hastalara uygulamaktadırlar. Hedefe yönelik bu tedavilerin etkinliği erken başladığında artmakta ve hastalığın progresyonunu yavaşlatmaktadır; ancak uzun vadeli etkilerinin ne olacağı veya tedavi edilen bireylerde daha hafif de olsa yeni fenotipler ortaya çıkıp çıkmayacağı hala açık değildir ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir(7)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hasta Grubu

Bu araştırmada, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMÜ) Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Genetik Tanı Merkezi'nde 2014-2019 yılları arasında Spinal Musküler Atrofi ön tanısı veya taşıyıcılığı açısından genotiplendirilen toplam 214 olguya ait SMN1 ve SMN2 gen kopya sayılarının retrospektif analizlerinin yapılması hedeflenmiştir. Bu amaçla 25.03.2014-08.05.2019 tarihleri arasında SMA ön tanısı veya taşıyıcılığı açısından Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi (ÇOMÜ-SUAH) Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran hastaların MLPA yöntemi ile analiz edilip raporlandırılan verileri güncel Coffalyser MLPA analiz programıyla tekrar analiz edilerek ve kitin internal referansları ile karşılaştırılarak SMN 1/ SMN2 genlerinin delesyon ve duplikasyonları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. MLPA analizi için her çalışmada 2 veya 3 sağlıklı kontrol çalışılması gerektiğinden, kendisinde SMA tanısı veya şüphesi nedeniyle test yapılan hastalar yanında teknik gereği çalışmaya konulan sağlıklı bireylerin de SMN1 ve SMN2 genleri için ham veriler laboratuvarımızda mevcuttur. Bu bireylere ait ham veriler sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak sağlıklı kontrollerde de delesyon duplikasyon olabileceği için analizden önce kontrollerin SMN1 ve SMN2 genlerine ait pik yükseklikleri kitin içindeki referans piklerinin yüksekliği ile karşılaştırılarak delesyon/duplikasyon olup olmadığı analiz edilmektedir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 24.05.2019 tarihinde 2019-11 karar no'lu etik kurul kararı ile onaylanmıştır (Bkz. EK 1). Araştırmaya dahil edilen hastaların klinik verileri; Tıbbi Genetik polikliniği hasta dosyaları ve ÇOMÜ-SUAH MİA-MED sistemindeki verilerden elde edilmiştir.

Aynı zamanda retrospektif olarak hastalara ait anamnezler ve aile ağaçları değerlendirilmiş ve varsa anne-baba-kardeş MLPA verileri de incelenmiştir. Diğer yandan, SMA ön tanılı hastaların yine ÇOMÜ-SUAH Genetik Tanı ve Tedavi Merkezi'nde tanı amaçlı farklı tekniklerce elde edilmiş sonuçları (kromozom analizi, arrayCGH, FISH,...vs) diğer analizlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Hastalarımıza yapılan tüm tanısal testler için bilgilendirilmiş onam formları mevcuttur. Bu çalışma için hastalara ek test yapılmamıştır.

3.2 Gereçler

3.2.1 Kullanılan Aletler

- ✓ Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 3130)
- ✓ Mikro Pipet takımı (Gilson)
- ✓ Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- ✓ Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)
- ✓ Vorteks
- ✓ Derin dondurucu
- ✓ Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)
- ✓ PCR tüpleri (0,2 ml)
- ✓ ABI 3130 yükleme tüpleri (ABI)
- ✓ ABI 3130 36, 50 cm Kapiller (ABI)

3.2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ✓ Probemix P060-B2 SMA Carrier (MRC-Holland, HOLLANDA)
- ✓ SALSA MLPA Buffer (MRC-Holland, HOLLANDA)
- ✓ Ligase Buffer A (MRC-Holland, HOLLANDA)
- ✓ Ligase Buffer B (MRC-Holland, HOLLANDA)
- ✓ Ligase-65-Buffer enzim (MRC-Holland, HOLLANDA)

- ✓ SALSA PCR-Primer Mix FAM (MRC-Holland, HOLLANDA)
- ✓ SALSA Polimeraz (MRC-Holland, HOLLANDA)
- ✓ PCR suyu
- ✓ Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)
- ✓ Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)
- ✓ Hi-Di Formamide (ABI)

3.3 Yöntem

3.3.1 DNA İzolasyonu

Her hastanın periferik kan örneğinden, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda İnvitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit® ile DNA izole edildikten sonra kayıt altına alınmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır

DNA İzolasyon Protokolü

1. Heat Block 55°C'ye ayarlanmıştır.
2. 1,5 mL'lik eppendorf tüplere 200 µl kan örneği, 20 µl proteinaz K, 20 µl RNAaz eklendikten sonra pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır.
3. Ardından örnekleri içeren eppendorf tüpler yüksek hızda vortekslenmiştir.
4. Daha sonra bu karışım, 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyondan sonra her bir tüpe 200 µl Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer eklenmiş ve vortekslenmiştir.
6. Ardından bu karışım 55°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
7. 200 mikrolitre etanol (%96-100) eklenmiş ve 5 saniye boyunca vortekslenmiştir.
8. Tüpün içindeki karışım filtreli kolona aktarılıp 10000rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Kolonun dibindeki filtratlı tüp atıldıktan sonra filtre yeni bir tüpe aktarılmıştır.

10. Filtreye Wash Buffer 1'den 500 µl miktarında konulduktan sonra 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
11. Kolonun dibindeki filtrat atılıp filtre yeni bir tüpe alınmıştır.
12. Bu filtreye Wash Buffer 2 500 µl konulup 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
13. Kolonun dibindeki filtrat atılıp kolon 1,5 mL'lik eppendorfun içine konulmuştur
14. Her birine 100 µl PureLink Genomic Elution Buffer eklenmiştir ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra 2 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
15. Eppendorfun içindeki DNA -20°C'de muhafaza edilmiştir.

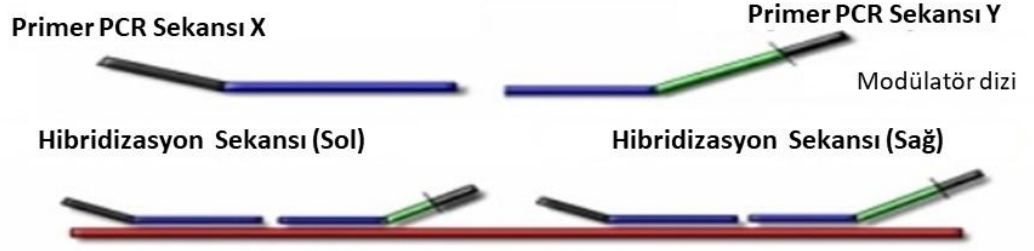
3.3.2 DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA), multipleks PCR yöntemlerinden birisidir. Kopya sayısı değişikliklerini saptayarak, genomda bir bölgede, bir/birden fazla gende ya da bir genin bazı bölgelerinde olan delesyon ya da duplikasyonları tespit edebilir. Yöntem ilk kez Schouten tarafından 2002 yılında tanımlanmıştır(112) .MLPA yöntemi kolay uygulanabilir olduğu ve sadece termal döngü cihazı ile kapiller elektroforez gerektirdiği için birçok laboratuvarında tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır.

MLPA tekniğinde standart bir multipleks PCR'ın aksine, MLPA amplifikasyonu için tek bir çift PCR primeri kullanılır. Bu yöntem hedef DNA denatürasyonu ve problemlerin hibridizasyonu, ligasyon (bağlanma) reaksiyonu, PCR reaksiyonu, amplifiye ürünün elektroforez ile ayrıştırılması ve son olarak verilerin analizi olmak üzere beş temel aşamadan oluşur (Şekil 3.1). Birinci basamakta DNA denatürasyonu gerçekleşir ve denatüre olmuş DNA MLPA prob karışımı ile bir gece inkübasyona bırakılır. MLPA problemleri her biri PCR primer sekanslarından birini içeren iki farklı oligonükleotitten oluşmaktadır. Bu iki prob hedef dizilere hibridize olur (Şekil 3.1-1.Basamak). Hibridizasyon işlemi

sonrasında ligasyon basamağı gelmektedir. Hibritleşmesi başarı ile gerçekleşen problemlerin ligasyonu gerçekleşecek, hibritleşmesi olmayan problemlerin ligasyonu gerçekleşemeyecektir (Şekil 3.1-2.Basamak). Üçüncü basamakta PCR reaksiyonu sırasında sadece bağlı problemler çoğaltılacağından prob bağlı ürünün sayısı, örnekteki hedef dizi sayısı için bir ölçü teşkil eder. PCR basamağında hedef DNA probdan uzaklaştırılır ve problemler uygun primerler yardımıyla amplifiye edilir. Bu aşamada hibritleşme ve ligasyon işlemleri başarısız olan problemler amplifiye edilmezler (Şekil 3.1-3. Basamak). Dördüncü basamakta kapiller elektroforez kullanılarak çoğaltılmış ürünler ayrıştırılır (Şekil 3.1-4.basamak). Son basamakta çalışılan problemlerden elde edilen sinyaller, kontrol grubundan elde edilen sinyallerle karşılaştırılarak fragman analizi yapılır(113).

1. Denatürasyon ve Hibridizasyon



2. Ligasyon



3. Evrensel X ve Y primerleri ile PCR

(sadece bağlı probler amplifiye olur)



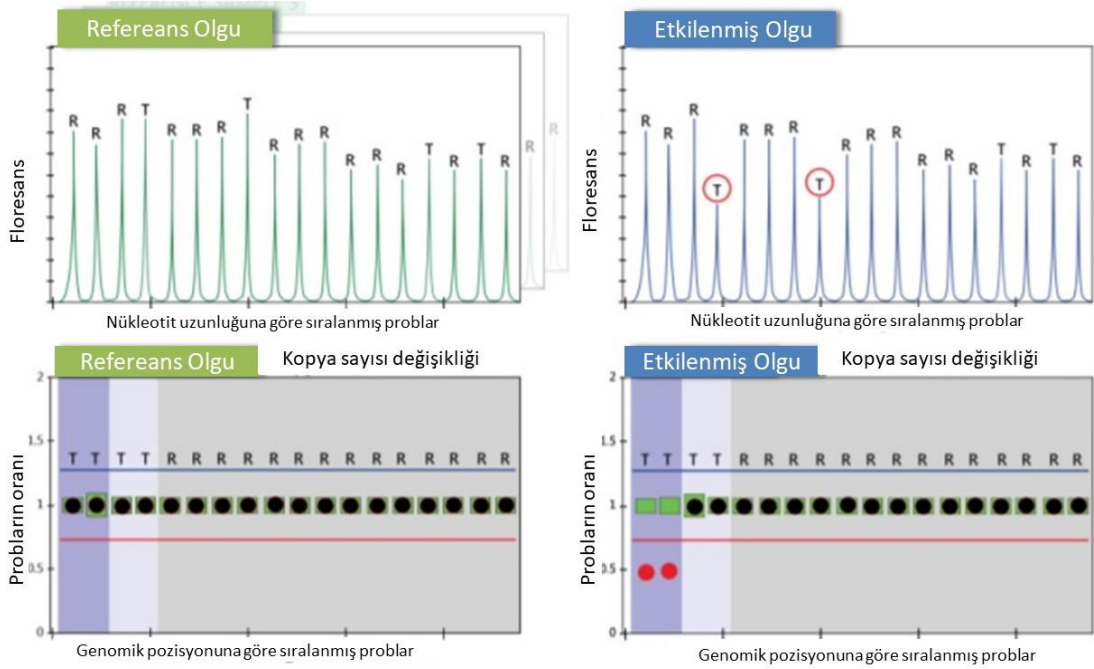
4. Fragman analizi



Şekil 3.1 MLPA tekniğinin basamakları - MRC Ms MLPA 2007(113)'den alınmıştır.

MLPA göreceli bir tekniktir: DNA örneklerinin MLPA pik yükseklikleri karşılaştırılarak yalnızca göreceli farklılıklar tespit edilebilir. Çeşitli referans DNA numunelerindeki prob tepe yükseklikleri ile karşılaştırıldığında her bir ayrı prob tepe noktasının yüksekliği, bir örnekteki karşılık gelen hedef sekansın nispi kopya sayısını yansıtır. Dolayısıyla referans örneklerin aynı çalışmaya dahil edilmesi esastır. Hedef dizide delesyon olması, tepe yüksekliğinde göreceli bir

azalma olarak görülürken, tepe yüksekliğindeki artış kopya sayısı artışını yansıtır (Şekil3.2).



Şekil 3.2 MLPA verilerinin karşılaştırılması. -MRC Ms MLPA 2007(113)'den alınmıştır.Etkilenmiş olgunun (sağ üst) elektroferogramı, referans olgu (sol üst) ile karşılaştırılır. Etkilenmiş olgunun elektroferogramında (kırmızı daire içine alınmış) iki probun göreceli olarak azaldığı görülmektedir (T: hedef prob, R: referans prob) Etkilenmiş olgunun prob oranları (sağ alt) referans olguyla karşılaştırıldığında (sol alt) 0.5'e düştüğü görülmektedir, bu oran heterozigot bir delesyonu gösterir.

MLPA tekniğinin bazı limitasyonları vardır;

- MLPA yöntemi ile hedef sekans dışındaki değişimler ve dengeli translokasyonlar, inversiyonlar saptanamaz.
- Hedef dizideki değişiklikler (SNP, nokta mutasyonlar, küçük indeller) prob bağlanma noktasından >20nt uzaklıkta bile olsa probun bağlanmasını engelleyerek prob sinyalini azaltabilir ve bu da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir.

- Son olarak her iki SMN1 kopyası aynı kromozomda olduğu zaman MLPA bunu tespit edemez ve bu durum yanlış negatif sonuca neden olabilir.

Çalışmamızda MRC-Holland P060-B2 SMA Carrier MLPA® kiti kullanılarak çalışılmış toplam 214 örnek Coffalyser MLPA analiz programı ile analiz edildi. P060-B2 SMA Carrier kiti 154 ile 342 nt arasında amplifikasyon ürünü içeren 21 MLPA probu içerir. Bu problemler SMN1/SMN2 genleri ekzon 7/8 ve ek olarak 17 referans bölgeye spesifik dizayn edilmiştir (Tablo 3.1)

Tablo 3.1 MRC-Holland P060-B2 SMA Carrier kitinde yer alan referans ve hedef problemlerin nükleotit uzunlukları ve kromozomal lokasyonları -MRC SALSA® MLPA® 2019'dan (114) alınmıştır.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position (hg18) ^(a)	
		Reference	SMN1 SMN2
64-105	Control fragments – see table in probemix content section for more information		
154	Reference probe 02595-L17085	5q35	
163	Reference probe 02291-L17086	3p14	
172	Reference probe 02978-L17087	4q25	
183	SMN1 probe 14919-L17081		Exon 7
191	Reference probe 00559-L17088	11q22	
200	Reference probe 00976-L17298	11p13	
208	Reference probe 12490-L17096	1q32	
218	SMN1 probe 14881-L17082		Exon 8
228	Reference probe 14498-L17101	20p12	
237	Reference probe 02334-L17301	12q23	
245	Reference probe 14293-L17100	15q13	
255	Reference probe 13128-L17099	9q34	
264	Reference probe 07630-L17091	10q26	
272	Reference probe 14361-L17098	4q35	
282	SMN2 probe 14921-L17083		Exon 7
292	Reference probe 00824-L17097	3q25	
301	SMN2 probe 14878-L17084		Exon 8
311	Reference probe 06425-L17092	6p22	
321	Reference probe 01042-L17093	8q24	
331	Reference probe 01043-L17094	8q13	
342	Reference probe 13399-L17297	6q12	

Bu problemlerden SMN1 ekzon 7 probu 183 nt'lik olup SMA tanısında ve taşıyıcılığında belirleyici olan SMN1 kopya sayısını belirlemedeki en önemli probdur. Bu prob SMN1 spesifik olup SMN2 üzerinde sinyal vermez.

SMN1 ekzon 8 probu 218 nt'lik olup SMN1 ve SMN2 genlerini ekzon 8 de yer alan G>A transisyonuyla ayırt eder. Bu probun sinyali SMN1 ekzon 8'in kopya sayısını gösterir. Örneklerin yaklaşık%95'inde SMN1 ekzon 7 ve ekzon 8

probları tarafından tespit edilen kopya sayısı aynıdır. Bu prob, SMN1 ekzon 8'de mutasyon olduğunda yine de fonksiyonel bir proteine neden olacağından SMN1 kopya sayısını değerlendirmek için kullanılamaz. SMN1 kopya sayısını belirlemek için sadece SMN1 ekzon 7 probu kullanılmalıdır.

SMN2 ekzon 7 (282nt) ve ekzon 8 (301nt) problemleri SMN2 ekzon 7 ve ekzon 8 kopya sayılarını belirlemede kullanılır. SMN2 kopya sayısının SMA taşıyıcılığı üzerinde etkisi yoktur.

3.3.2.1 DNA Denatürasyonu ve SALSA MLPA Probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile Hibridizasyonu

Periferik kandan izole edilmiş olan DNA örnekleri öncelikle denatürasyona bırakıldı. 5 µl DNA örneği (20-250 ng) 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı. 98°C'de 5 dakika Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra Thermal Cycler 25°C'ye gelince durduruldu. 5'er µl DNA örneği (20-250 ng) ayrılarak 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı. Hibridizasyon öncesi saflaştırma amacıyla PCR strip tüpleri manyetik stant üzerinde birkaç dakika bekletildi. Daha sonra nanofotometre ile ölçülerek 10 ng konsantrasyonda olacak şekilde saf su ile dilüe edildi. 25°C'deki DNA örneğinin üzerine SALSA MLPA Probemix P060 SMA Carrier ve 1,5 µl MLPA Buffer'dan oluşan hibridizasyon karışımından 3 µl ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi. PCR strip tüplerinde buharlaşmayı kontrol etmek için çalışma grubunun yanına başka bir PCR tüpünde 20 µl steril su konuldu. Böylece 17 saat sonra hibridizasyon sona erdiğinde buharlaşma olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra 95°C'de 1 dk inkübe edilip örnekler 60°C'de 17 saat hibridizasyona bırakıldı.

3.3.2.2 Ligasyon

Hibridizasyon sonrası basamak için Ligaze-65 karışımı hazırlandı. Bu karışım; 3 µl Ligaz-Buffer A, 3 µl Ligaz-Buffer B, 25 µl su ve 1 µl Ligaz-65 enzimden meydana gelmektedir. Bir gece önceden 60°C'de olan Thermal

Cycler, 54°C'ye getirildi. Örnekler 54°C'de iken hazırlanan mixten 32 µl şeklinde tüplere aktarıldı ve pipetaj ile karıştırıldı. 54°C'de 15 dakika inkübe edildi, 98°C'de 5 dakika bekletildi.

3.3.2.3 PCR

PCR basmağı için Polimeraz master karışımı hazırlandı. Bu karışım için 2 µl SALSA PCR-primer mix, 7,5 µl distile su, 0,5 µl SALSA Polimeraz kullanıldı. Hazırlanan karışım 10 µl olacak şekilde ligasyon tüplerine eklendi. Pipetaj ile karıştırıldı ve hava kabarcıkları kontrol edilerek oda sıcaklığında Thermal Cycler'a konuldu. PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

95°C 30 sn Denatürasyon
60°C 30 sn Bağlanma
72°C 60 sn Uzama
72°C 20 dk Son Uzama

} 35 döngü

3.3.2.4 ABI 3130 Cihazına Yükleme

Amplifikasyonu gerçekleştiren örnekleri fragment analizi için kapiller jel elektroforez cihazına aşağıda verilen yol izlenerek yüklemesi yapıldı.

1. Internal size standart (Liz 500) ve formamidden oluşan karışım hazırlandı. 9 µl formamid ve 0,2 µl internal size standart (Liz 500) ependorf tüpüne konuldu, pipetaj yapıp 9 µl şeklinde ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.
2. Üç basamaktan oluşan MLPA tekniğinin son basamağından elde edilen PCR ürünlerden 1,8 µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine eklendi ve iyi bir şekilde homojenize olana kadar pipetaj yapıldı, hava kabarcıkları kontrol edildikten sonra örnekler 86°C de 3 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı. Daha sonra 4°C'de 2 dakika beklendi.
3. ABI 3130 cihazına yükleme yapıldıktan sonra Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
4. Sonuçları değerlendirmek için Coffalyser MLPA analiz programı kullanıldı.

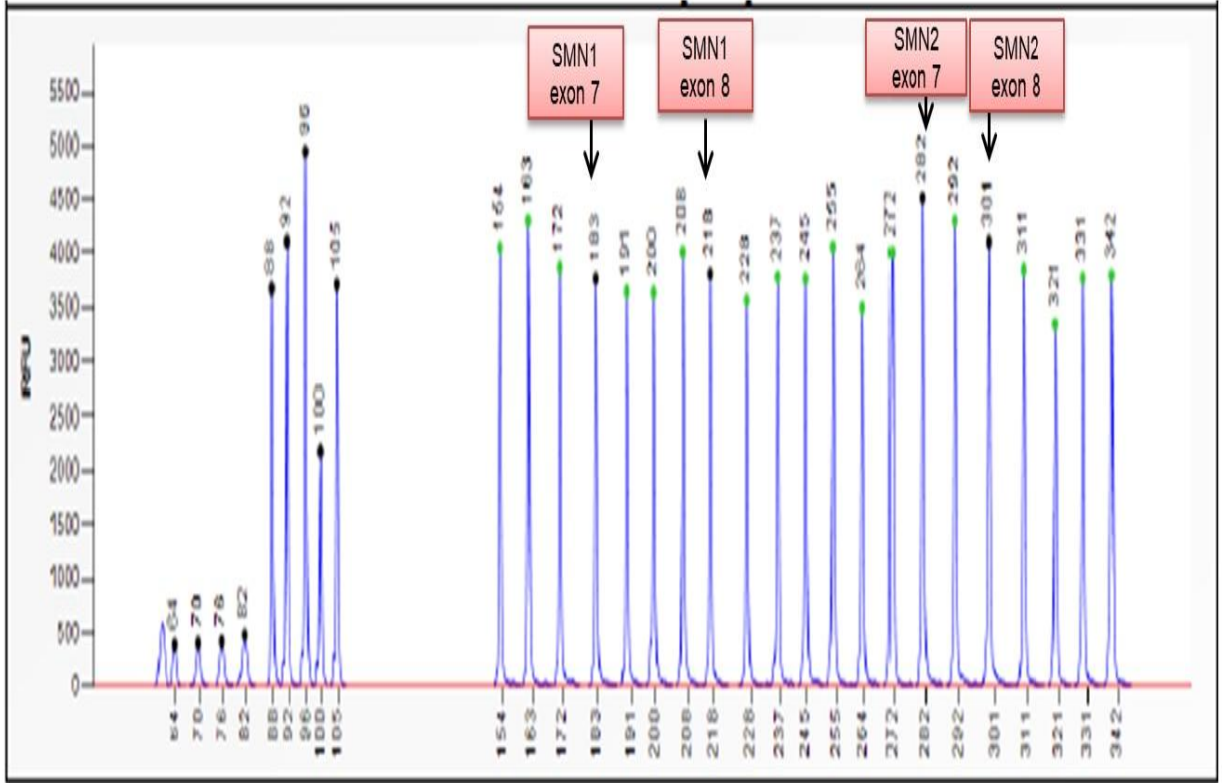
3.3.2.5 Değerlendirme

Değerlendirme yapılırken, çalışılan problardan elde edilen sinyaller ile kontrol grubundan elde edilen sinyallerin oranına bakıldı. SMN1 ve SMN2'ye özgü MLPA probları için beklenen sonuçlar 2 kopya (normal), 0 kopya (homozigot delesyon), 1 kopya (heterozigot delesyon), 3 kopya ve bazen 4 kopya sayısındır (şekil3.2-3.5).

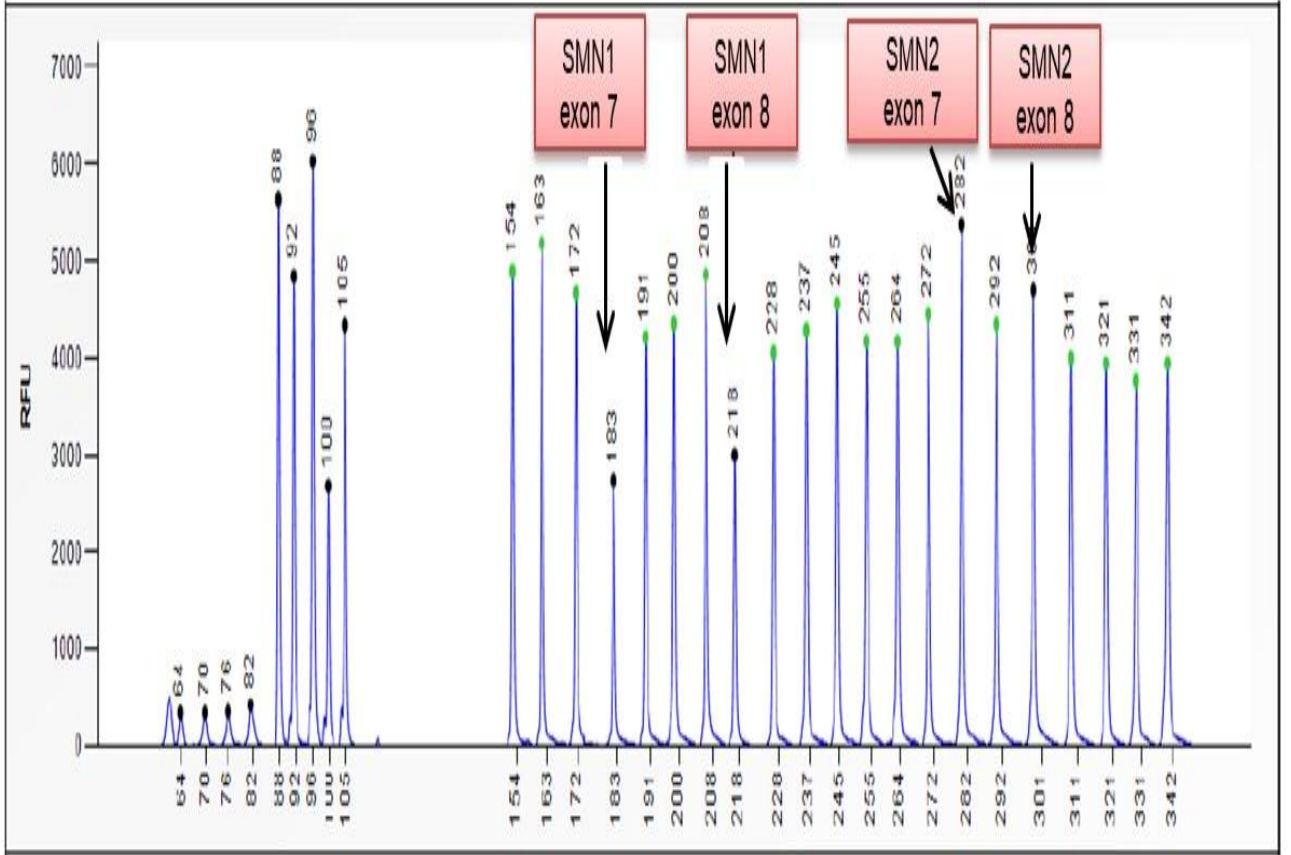
Çalışmamızın MLPA rnlerindeki problardan elde edilen boyut ve pik alanları güncel Coffalyser MLPA analiz programıyla yapıldı. Ratio değeri $<0,7$ olan değerlerde heterozigot delesyon olduğu, ratio değeri 0 olan olgularda homozigot delesyon olduğu, ratio değeri $1,3 < DQ < 1,65$ olan olgularda heterozigot duplikasyon olduğu, atio değeri $1,75 < DQ < 2,15$ olan olgularda heterozigot triplikasyon/homozigot duplikasyon olduğu şeklinde değerlendirme yapıldı. Diğer değerler şüpheli olarak görülüp değerlendirme dışı bırakıldı. Referans numunelerdeki tüm problemlerin standart sapmasının <0.10 olmasına ve sağlıklı numunelerdeki referans problemlerin oranının (DQ) 0.80 ile 1.20 arasında olmasına dikkat edildi (Tablo3.2).

Tablo 3.2 Sağlıklı, hasta ve taşıyıcı olguların kopya sayılarının referans problemlerinin oranına göre değerlendirilmesi -MRC SALSA® MLPA® 2019'dan (114) alınmıştır.

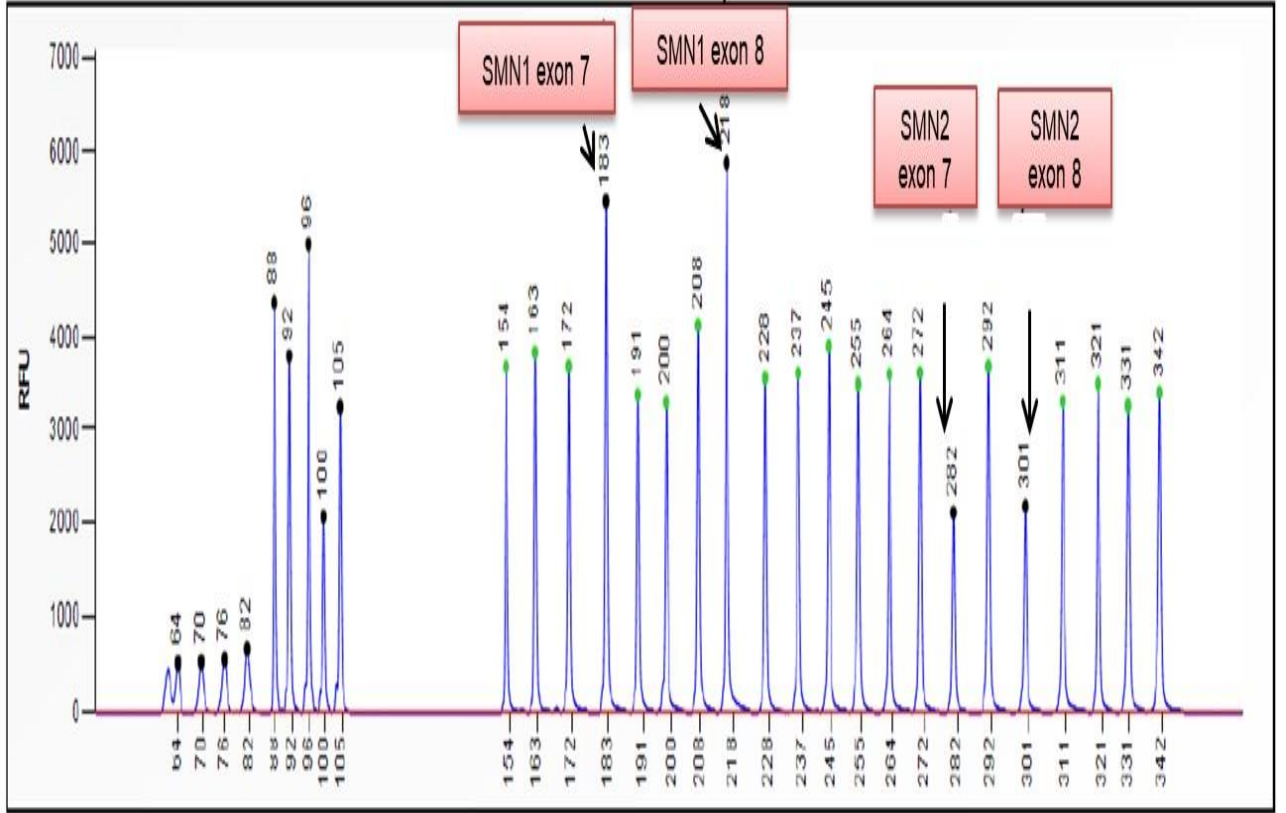
Copy Number status	Dosage quotient
Normal	$0.80 < DQ < 1.20$
Homozygous deletion	$DQ = 0$
Heterozygous deletion	$0.40 < DQ < 0.65$
Heterozygous duplication	$1.30 < DQ < 1.65$
Heterozygous triplication / homozygous duplication	$1.75 < DQ < 2.15$
Ambiguous copy number	All other values



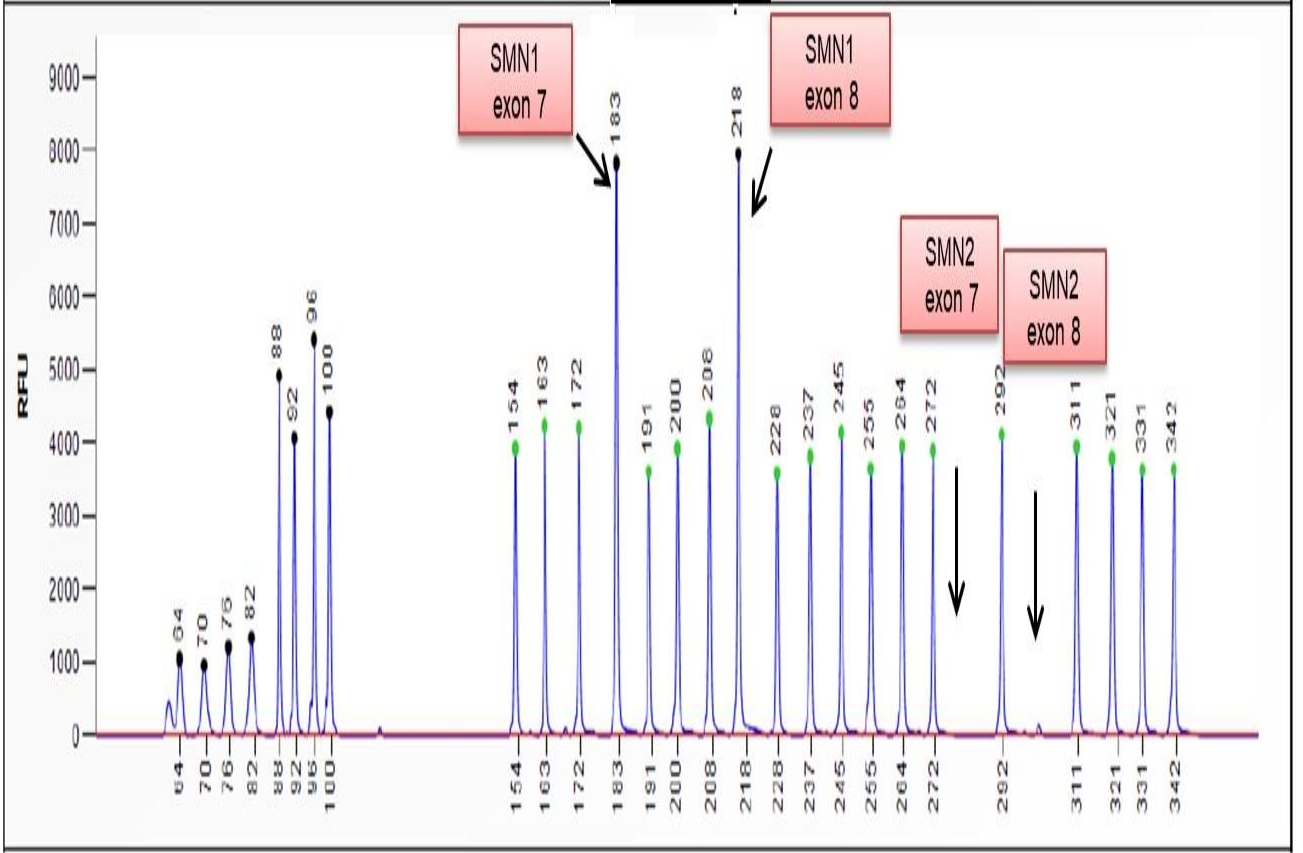
Şekil 3.3 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile analiz edilen sağlıklı kontrole ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X2,SMN2X2) - MRC SALSA® MLPA® 2019'dan (114) alınmıştır.



Şekil 3.4 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2 ile analiz edilen SMA taşıyıcısı olguya ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X1,SMN2X2) - MRC SALSA® MLPA® 2019'dan (114) alınmıştır.



Şekil 3.5 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile analiz edilen SMN1 kopya sayısı 3, SMN2 kopya sayısı 1 olan olguya ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X3,SMN2X1) - MRC SALSA® MLPA® 2019'dan (114) alınmıştır.



Şekil 3.6 SALSA MLPA probemix P060 SMA Carrier (version B2) ile analiz edilen SMN1 geni kopya sayısı 4 olan ve SMN2 geninde homozigot delesyon olan olguya ait DNA'nın kapiller elektroforez görüntüsü (SMN1X4,SMN2X0) - MRC SALSA® MLPA® 2019'dan (114) alınmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesinde şu noktalara dikkat edilmiştir;

- 1) SMN1 ve SMN2 geni ekzon 7 probu, bu iki gen arasındaki klinik olarak anlamlı olan tek prob olarak alınmıştır.
- 2) SMN2 kopya sayısının SMA taşıyıcılığında belirleyici olmadığı kabul edilmiştir.
- 3) Kompleks sonuçların doğru yorumlanması için eğer yapılmışsa ebeveyn çalışması da değerlendirilmiştir.
- 4) Olguların yaklaşık % 5-10'unda, SMN1 (218 nt) ve SMN2 (301 nt) ekzon 8 problemleri; SMN1 (183 nt) ve SMN2 ekzon 7 (282 nt) problemlerine kıyasla farklı kopya sayısı tespit edebileceğinden bu durumda, SMN1 kopya sayısını belirlemede ekzon 7 probu esas alınmıştır.
- 5) SMA taşıyıcılığında SMN1 geni tek kopya sayısının gösterilmesi esastır ancak nadiren de olsa iki kopya varlığında taşıyıcılık olabilir(2+0).Eğer SMA hastası bir olgunun ebeveyn analizinde ebeveynlerde iki kopya SMN1 tespit edilirse ;
 - a) hastada bir allelde delesyon diğerinde nokta mutasyon olabileceği
 - b) ya da ebeveynlerde her iki SMN1 kopyasının aynı kromozomda yer alabileceği, bu 2+0 genotipi sıklığının her toplumda değiştiği ve MLPA yöntemi ile tespitinin mümkün olmadığından yanlış negatiflik riski doğurabileceği göz önünde bulundurulmuştur.

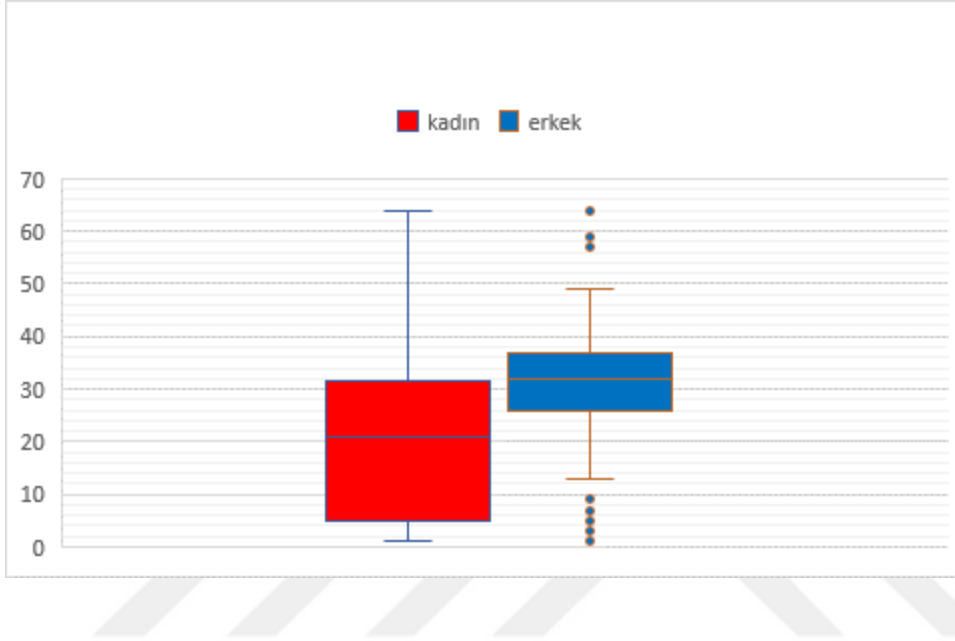
4.BULGULAR

Çalışmamız; 25.03.2014-08.05.2019 tarihleri arasında Çanakkale Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi (ÇOMÜ-SUAH) Tıbbi Genetik polikliniğine Spinal Musküler Atrofi ön tanısı veya taşıyıcılığı açısından başvurup MLPA yöntemi ile analiz edilip raporlandırılan hastalardan ve sağlıklı kontrollerden oluşmaktadır. Çalışmamıza, retrospektif hasta dosyaları ve kayıtların incelenmesi ile toplam 214 olgu dahil edilmiştir.

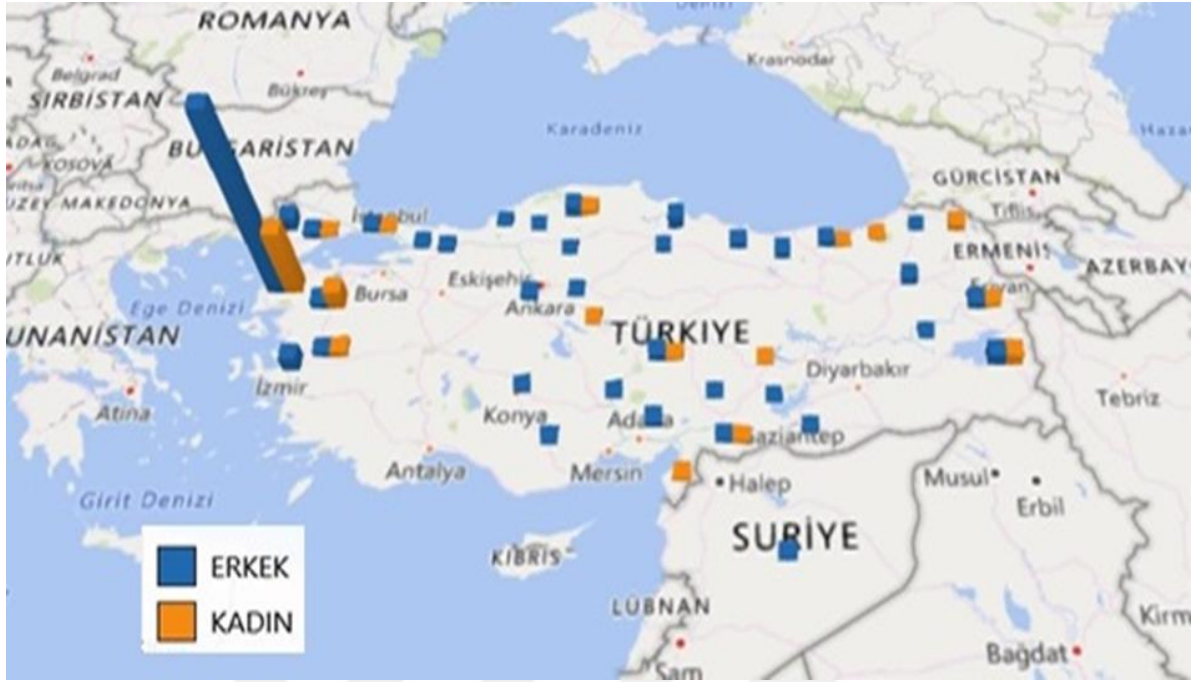
Hastaların MLPA yöntemi ile elde edilen ham verileri güncel Coffalyser yazılımı ile tekrar analiz edilmiştir. Aynı zamanda hastaların sosyodemografik bilgileri, klinik ve laboratuvar bulguları için Tıbbi Genetik polikliniği hasta dosyaları ve ÇOMÜ-SUAH hastane Mia-Med sistem kayıtları incelenmiştir. Hastaların ÇOMÜ-SUAH Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda çalışılmış olan diğer genetik test sonuçları da kayıt edilmiştir. Olgular 1-214 arası P1, P2.....P214 şeklinde numaralandırılmıştır.

4.1 Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen 214 olgunun 53'ü kadın (%24,76), 161'i (%75,24) erkektir. Olguların polikliniğimize başvuru sırasındaki yaş aralığı 1 yaş ile 64 yaş arasında değişmekte olup hastaların yaş ortalaması 28,01 ve ortancası 31,5 (min. 1,0; maks.64,0)'tir.



Şekil 4.1 Olguların polikliniğimize ilk başvurularındaki desimal yaşlarının hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı



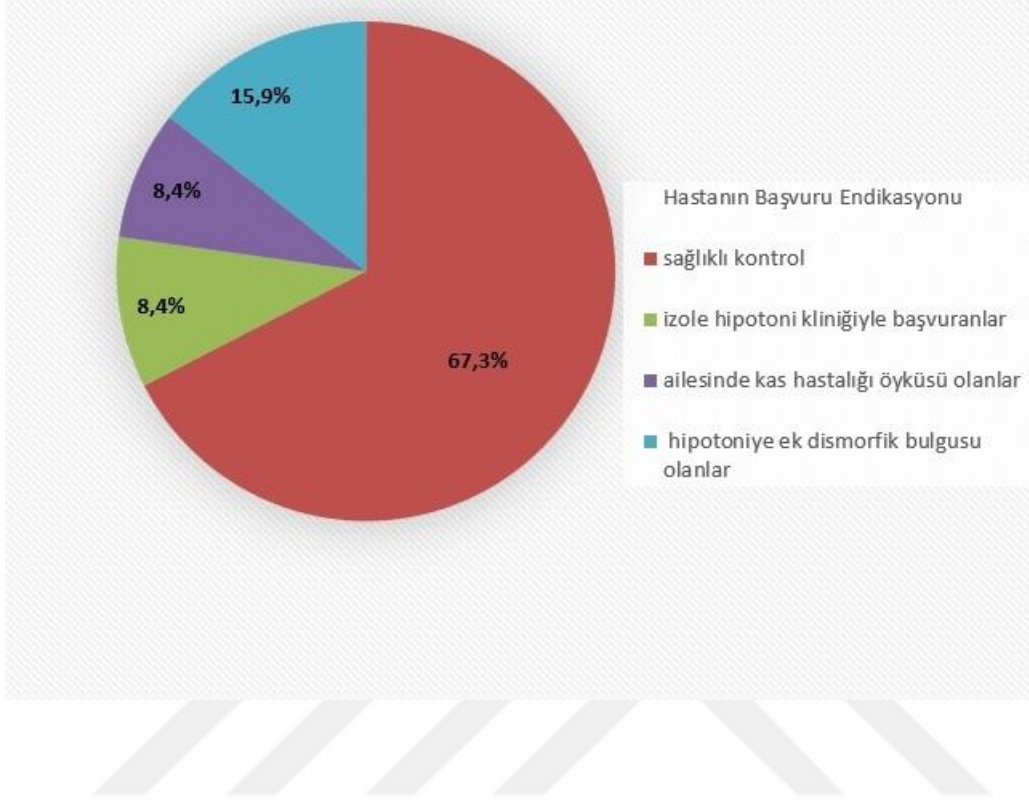
Şekil 4.2 Olguların köken aldıkları memleketlerin harita üzerinde sayısal dağılımı Turuncu renk, o lokasyon kökenli kadın olgu sayısını; mavi renk, o lokasyon kökenli erkek olgu sayısını göstermektedir.

Hastalarımızın memleket bilgilerine bakıldığında; büyük çoğunluğun memleketi Çanakkale olmasına rağmen yurt genelinden ve bir tane de yurtdışından hastamız mevcuttu Hastalarımızın 21'inde (%9,7) ebeveynleri arasında akrabalık mevcutken, 23'ünde (%10,69) ebeveynler aynı veya yakın köyden köken almaktadır.

4.2 Olguların Klinik Özellikleri

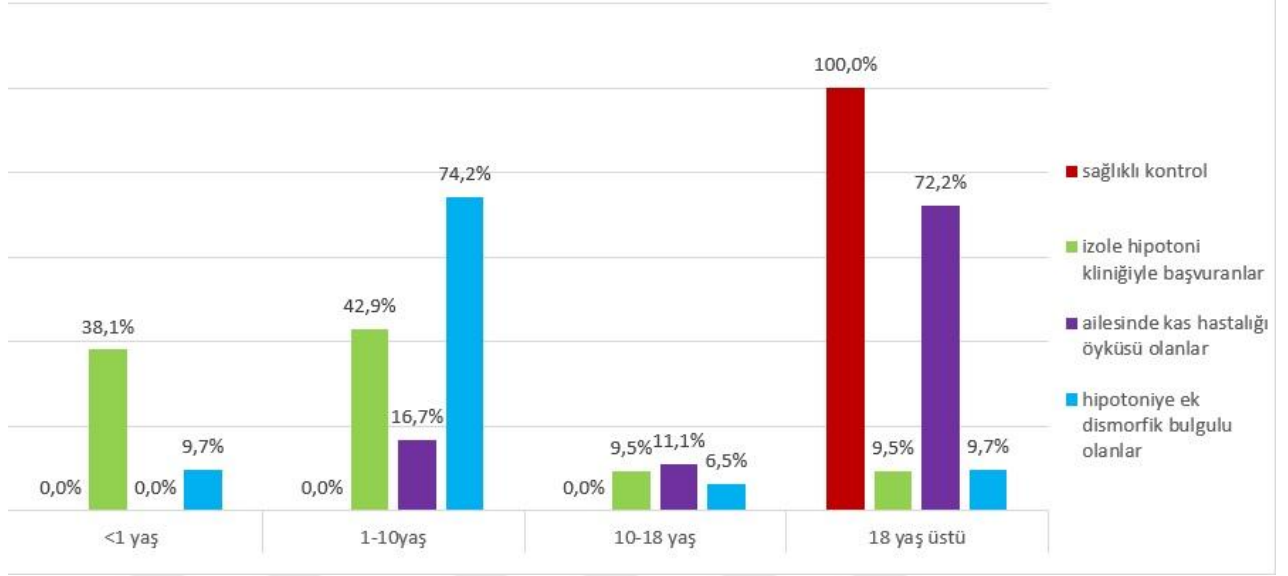
Çalışmaya alınan 214 olgu klinik özelliklerine göre dört gruba ayrılarak incelenmiştir. Olgular izole hipotoni kliniğiyle gelen 18 olgu (%8,4), hipotoniye ek olarak dismorfik bulgusu olan 34 olgu (%15,9), ailesinde kas hastalığı

öyküsü olan 18 olgu (%8,4), ve sağlıklı kontrol olarak alınan 144 olgu (%67,3) şeklinde gruplandırılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Çalışmaya alınan olguların endikasyonlarına göre dağılımları

Olguların başvuru endikasyonuna göre yaşlarına bakıldığında sağlıklı kontrol grubunun hepsi 18 yaş üstü iken, izole hipotoni kliniğiyle gelen olguların %38,1'i <1 yaş, %42,9'u 1-10 yaş aralığında, %9,5'u 10-18 yaş aralığında ve %9,5'u ise 18 yaş üstüdür. Ailesinde kas hastalığı öyküsü olanların %72,2'si 18 yaş üstü, %11,1'i 10-18 yaş aralığında, %16,7'si ise 1-10 yaş aralığındadır. Hipotoniye ek dismorfik bulguları olan hastaların %74,2'si 1-10 yaş aralığında %9,7'si <1yaş altı, %9,7'si 18 yaş üstü ve %6,5'i 10-18 yaş aralığındadır (Şekil4.4).

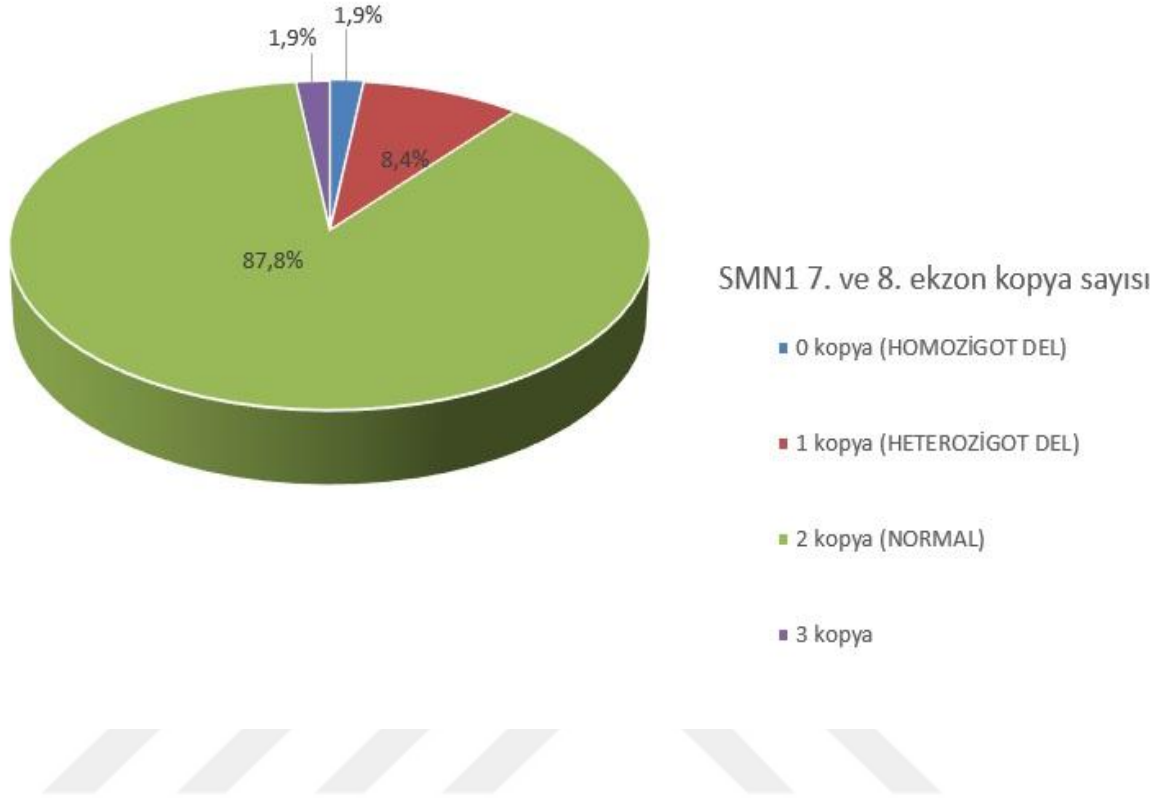


Şekil 4.4 Olguların başvuru endikasyonuna göre yaş aralıklarının gruplandırılması

4.3 Olguların SMN1 ve SMN2 Kopya Sayılarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızdaki 214 olgunun SMA MLPA ham verileri güncel Coffalyser programı ile yeniden analiz edilerek retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

214 olgunun endikasyona bakılmaksızın SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayıları değerlendirildiğinde 188 olguda (%87,8) iki kopya saptanırken, 18 olguda (%8,4) bir kopya (heterozigot delesyon) saptanmış olup bu olgular taşıyıcı olarak değerlendirilmiştir. 4 olguda (%1,9) ise sıfır kopya (homozigot delesyon) saptanmış olup bu hastaların hepsi polikliniğimize izole hipotoni kliniğiyle başvurmuşlardır. Çalışmaya alınan dört olguda (%1,9) SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5).



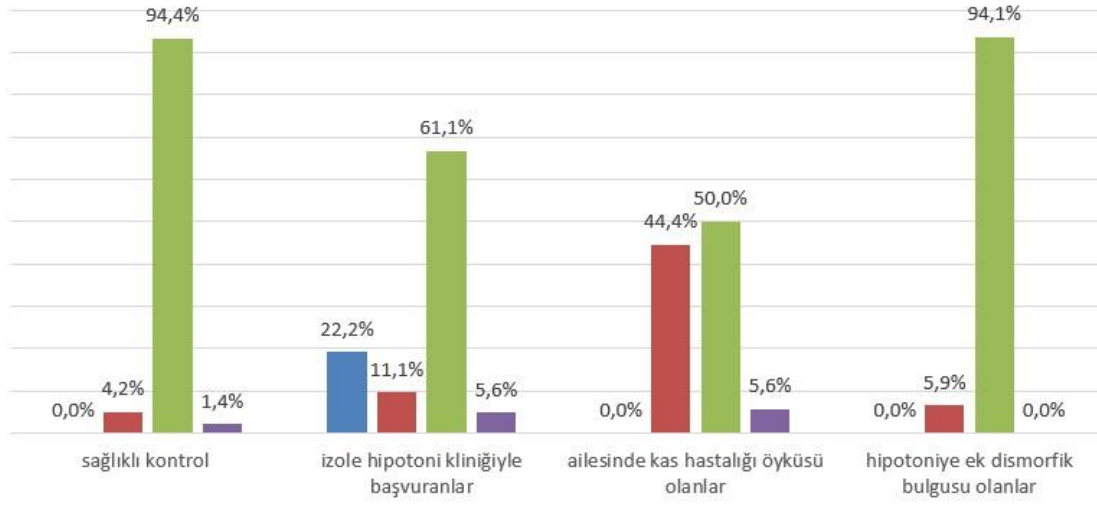
Şekil 4.5 Çalışmaya alınan tüm olguların SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının değerlendirilmesi

Taşıyıcılığın yüksek saptanmış olması ailesinde kas hastalığı öyküsü bulunan aynı aileden bireylerin çalışmaya alınmış olmasına bağlanmış olup endikasyona göre sağlıklı kontrol olarak değerlendirilen 144 olgu içinde taşıyıcılığa bakıldığında; 6 olguda (%4,2) SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayısı bir (heterozigot delesyon) olarak saptanmış olup, sağlıklı bireyler içinde taşıyıcılık %4,2 olarak tespit edilmiştir. Bu gruptaki olguların 136'sında (%94,4) SMN1 7.ekzon ve 8.ekzon kopya sayısı 2, ikisinde (%1,4) SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir.

İzole hipotoni kliniğiyle başvuran olguların SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayılarına bakıldığında olguların dördünde (%22,2) sıfır kopya (homozigot delesyon) saptanırken, ikisinde (%11,1) bir kopya (heterozigot delesyon) saptanmıştır. Olguların 11'inde (%61,1) SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayısı 2, birinde ise (%5,6) 3 olarak değerlendirilmiştir.

Ailesinde kas hastalığı öyküsü olan olguların SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayılarına bakıldığında ise sekizinde (%44,4) bir kopya (heterozigot delesyon) saptanmıştır. Olguların dokuzunda (%50) SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayısı 2, birinde ise (%5,6) SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir.

Hipotoniye ek dismorfik bulgusu olan olguların SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayılarına bakıldığında ikisinde (%5,9) bir kopya (heterozigot delesyon) saptanırken, olguların 32'sinde (%94,1) SMN1 7. ve 8.ekzon kopya sayısı 2 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.6, Tablo 4.1).



SMN1 7. ve 8.Ekzon Kopya Sayısı

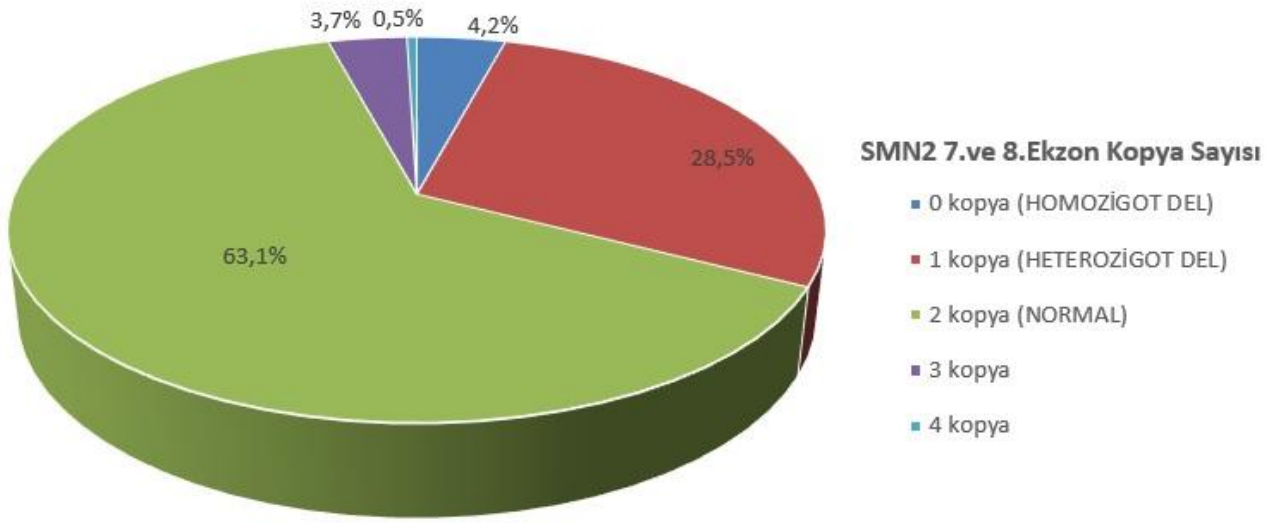
- SMN1 7 ve 8. ekzon kopya sayısı 0 kopya (HOMOZİGOT DEL) ■ SMN1 7 ve 8. ekzon kopya sayısı 1 kopya (HETEROZİGOT DEL)
- SMN1 7 ve 8. ekzon kopya sayısı 2 kopya (NORMAL) ■ SMN1 7 ve 8. ekzon kopya sayısı 3 kopya

Şekil 4.6 Çalışmaya alınan olguların SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımı

Tablo 4.1 Olgularda SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımları

HASTANIN BAŞVURU ENDİKASYONU		0 KOPYA (HOMOZİGOT DEL)		1 KOPYA (HETEROZİGOT DEL)		2 KOPYA (NORMAL)		3 KOPYA (NORMAL)	
		SMN1-7	SMN 1-8	SMN1-7	SMN1-8	SMN1-7	SMN1-8	SMN1-7	SMN1-8
sağlıklı kontrol	SAYI	0	0	6	6	136	136	2	2
	%	0,0%	0,0%	4,2%	4,2%	94,4%	94,4%	1,4%	1,4%
izole hipotoni kliniğiyle başvuranlar	SAYI	4	4	2	2	11	11	1	1
	%	22,2%	22,2%	11,1%	11,1%	61,1%	61,1%	5,6%	5,6%
ailesinde kas hastalığı öyküsü olanlar	SAYI	0	0	8	8	9	9	1	1
	%	0,0%	0,0%	44,4%	44,4%	50,0%	50,0%	5,6%	5,6%
hipotoniye ek dismorfik bulgusu olanlar	SAYI	0	0	2	2	32	32	0	0
	%	0,0%	0,0%	5,9%	5,9%	94,1%	94,1%	0,0%	0,0%
TOPLAM	SAYI	4		18		188		4	
	%	1,90%		8,40%		87,80%		1,90%	

214 olgunun endikasyonuna bakılmaksızın SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayıları değerlendirildiğinde 135 olguda (%63,1) iki kopya saptanırken, 61 olguda (%28,5) bir kopya (heterozigot delesyon) saptanmıştır. 9 olguda (%4,2) ise SMN2 7. ve 8. ekzonlarında homozigot delesyon saptanmıştır. Çalışmaya alınan 8 olguda (%3,7) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı üç olarak değerlendirilmiştir. Olguların bir tanesinde ise SMN2 7. ve 8. ekzonlarında (%0,5) dört kopya saptanmıştır (Şekil 4.7).



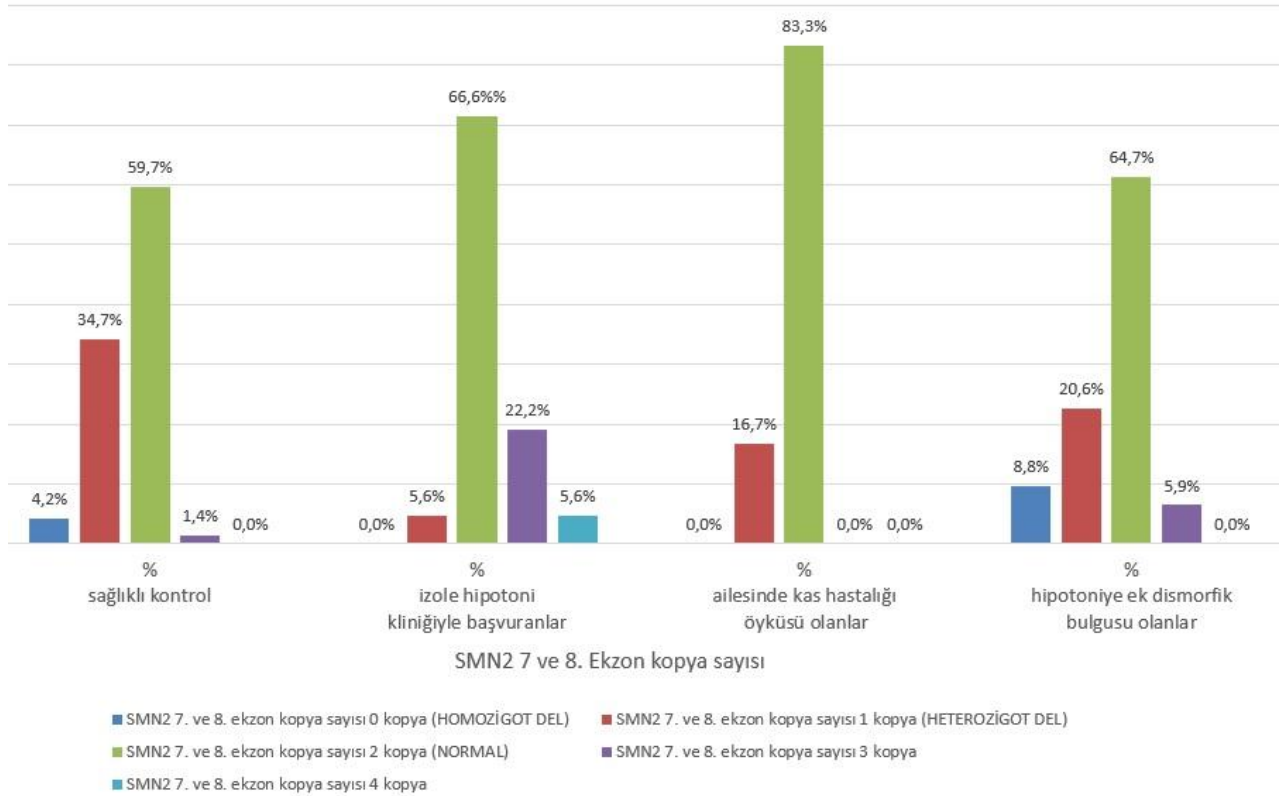
Şekil 4.7 Çalışmaya alınan olguların SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının değerlendirilmesi

Endikasyona göre sağlıklı kontrol olarak değerlendirilen 144 olgu içinde SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarına bakıldığında ise olguların 86'sında (%59,7) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı iki kopya, 50'sinde (%34,7) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı bir kopya (heterozigot delesyon), ikisinde (%1,4) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı üç kopya olarak değerlendirilmiştir. Olguların altısında (%4,2) ise SMN2 7. ve 8. ekzonda homozigot delesyon saptanmıştır.

İzole hipotoni kliniğiyle başvuran olgulara bakıldığında olguların 12'sinde (%66,6) SMN2 7. ve 8. ekzon iki kopya, birinde (%5,6) bir kopya (heterozigot delesyon) olarak saptanmıştır. Olguların dördünde (%22,2) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı 3, birinde (%5,6) ise 4 kopya olarak değerlendirilmiştir.

Ailesinde kas hastalığı öyküsü olan olgulara bakıldığında ise 15'inde (%83,3)SMN2 7. ve 8. ekzon iki kopya saptanmış olup, üçünde (%16,7) bir kopya (heterozigot delesyon) saptanmıştır

Hipotoniye ek dismorfik bulgusu olan olgulara bakıldığında 22'sinde (%64,7) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı 2, yedisinde (%20,6) SMN2 7. ekzon ve 8.ekzon kopya sayısı bir (heterozigot delesyon), ikisinde (%5,9) SMN2 7.ve 8. ekzon kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir. Olguların üçünde (%8,8) ise SMN2 7. ve 8. ekzon sıfır kopya (homozigot delesyon) olarak saptanmıştır (Şekil 4.8, Tablo 4.2).



Şekil 4.8 Çalışmaya alınan olguların SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımı

Tablo 4.2 Olgularda SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarının endikasyona göre dağılımlar

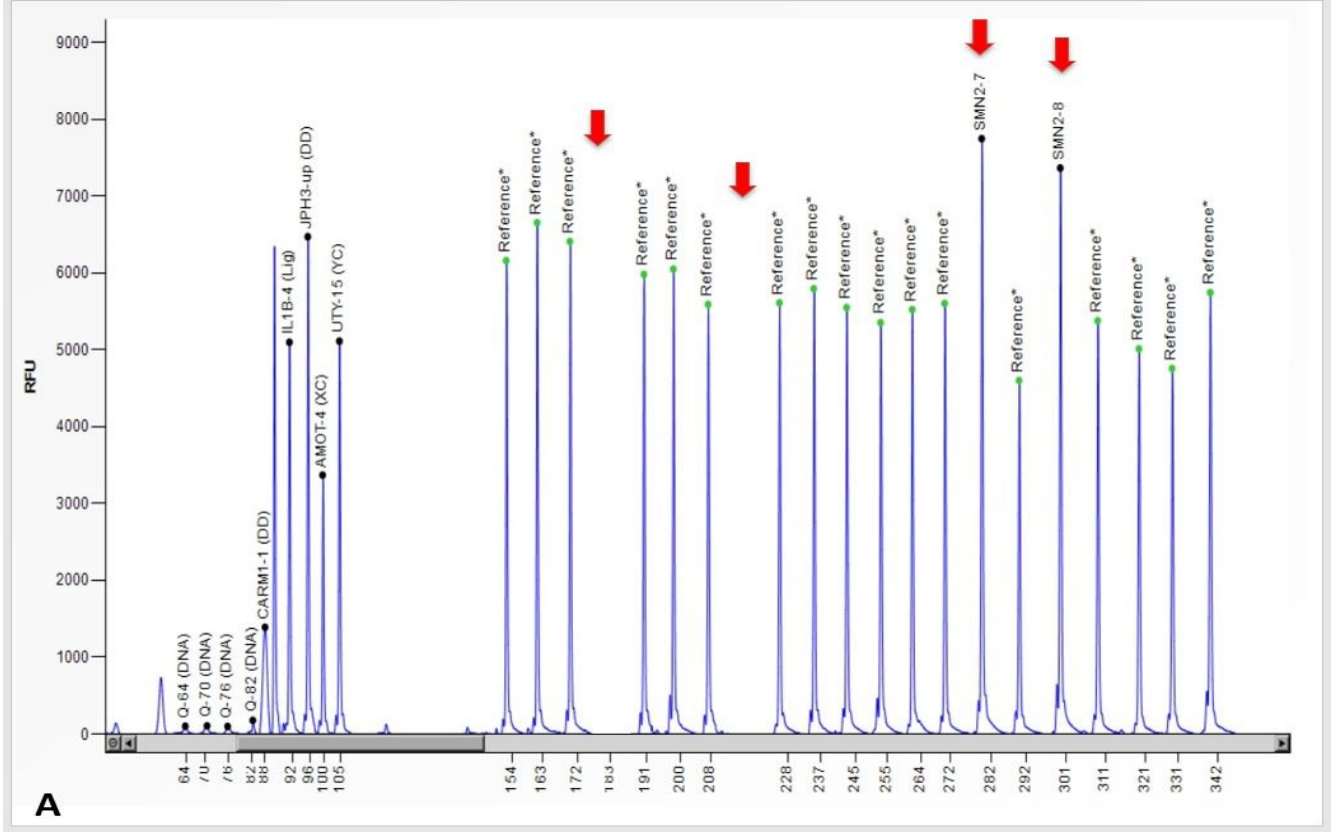
HASTANIN BAŞVURU ENDİKASYONU		0 KOPYA (HOMOZİGOT DEL)		1 KOPYA (HETEROZİGOT DEL)		2 KOPYA (NORMAL)		3 KOPYA (NORMAL)		4 KOPYA (NORMAL)	
		SMN 2-7	SMN 2-8	SMN 2-7	SMN 2-8	SMN 2-7	SMN2-8	SMN2-7	SMN 2-8	SMN2-7	SMN2-8
sağlıklı kontrol	SAYI	6	6	50	50	86	86	2	2	0	0
	%	4,2%	4,2%	34,7%	34,7%	59,7%	59,7%	1,4%	1,4%	0,0%	0,0%
izole hipotoni kliniğiyle başvuranlar	SAYI	0	0	1	1	12	12	4	4	1	1
	%	0,0%	0,0%	5,6%	5,6%	66,6%	66,6%	22,2%	22,2%	5,6%	5,6%
ailesinde kas hastalığı öyküsü olanlar	SAYI	0	0	3	3	15	15	0	0	0	0
	%	0,0%	0,0%	16,7%	16,7%	83,3%	83,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
hipotoniye ek dismorfik bulgusu olanlar	SAYI	3	3	7	7	22	22	2	2	0	0
	%	8,8%	8,8%	20,6%	20,6%	64,7%	64,7%	5,9%	5,9%	0,0%	0,0%
TOTAL	SAYI	9		61		135		8		1	
	YÜZDE	4,20%		28,50%		63,10%		3,70%		0,50%	

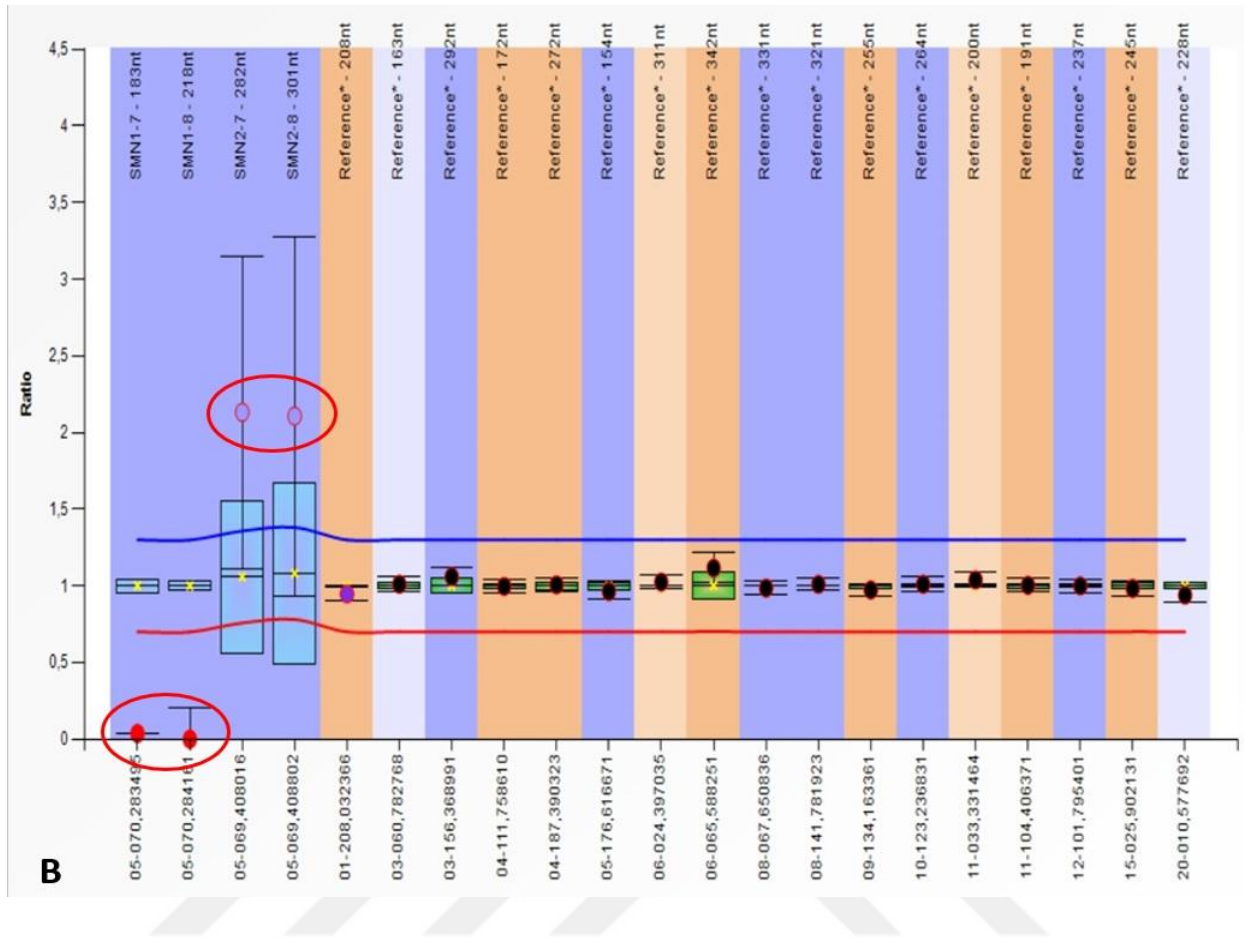
4.4 SMN1 Ekzon 7 ve Ekzon 8 Homozigot Delesyon Saptanan Hastaların Klinik Özellikleri

Çalışmamıza alınan 214 olgunun dört tanesinde (%1,9) SMN1 7. ve 8. ekzonlarında homozigot delesyon saptanmış olup bu olguların tamamı izole hipotoni kliniğiyle değerlendirilmiştir. Bu olgulardan 3 tanesi <1 yaş altında iken bir tanesi 18 yaş üstüdür.

18 yaş üstü tarafımıza başvuran hasta (P54) SMA Tip III klinik özelliklerini taşımaktaydı. Ebeveynleri aynı köyden olan olgunun ailesinde kas hastalığı öyküsü olan yoktu. Hastanın SMA MLPA analizinde SMN1 ekzon 7/8

homozigot delesyon saptanırken SMN2 ekzon 7/8 kopya sayısı 4 olarak değerlendirildi (Şekil 4.9 A,B), aile çalışması planlandı.



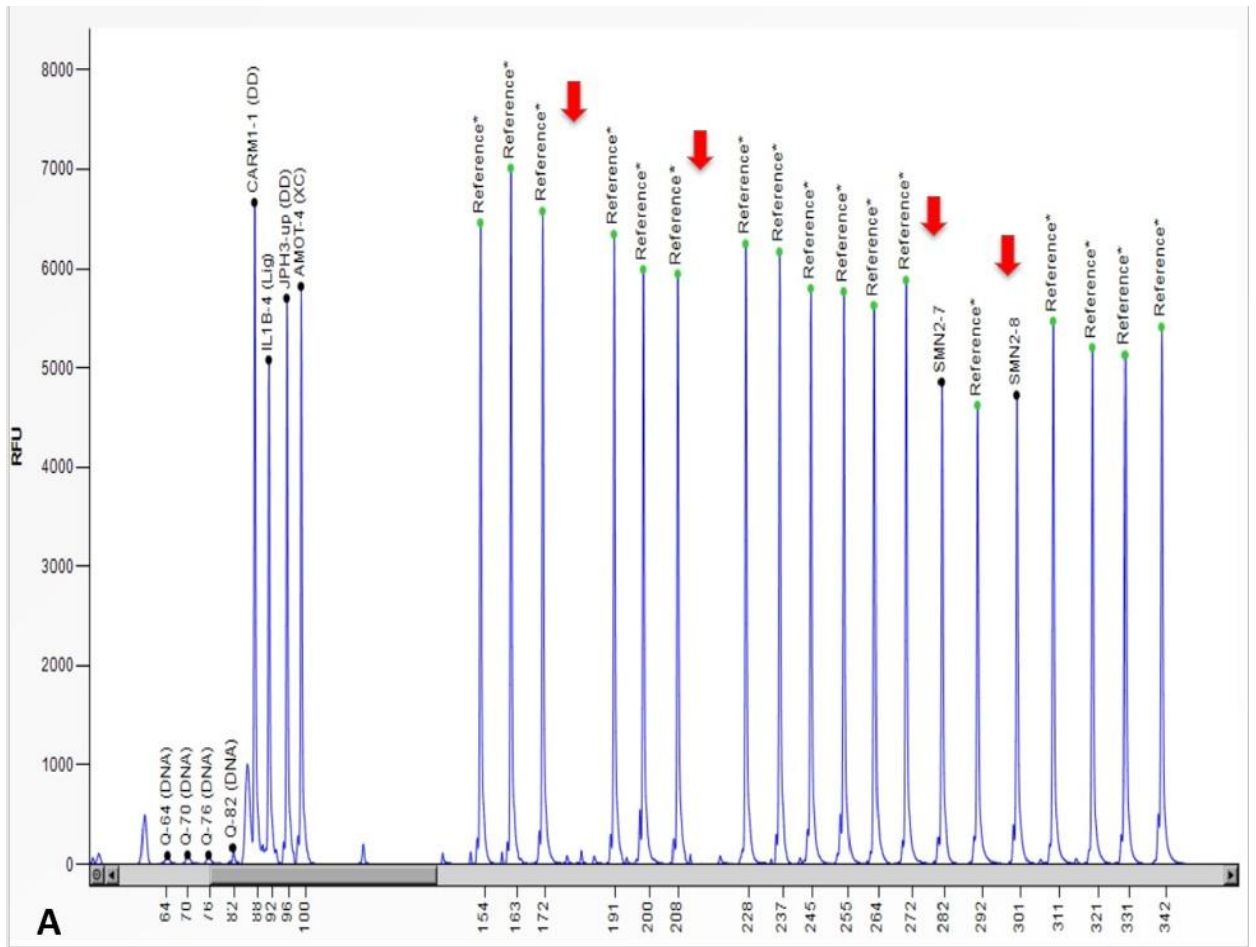


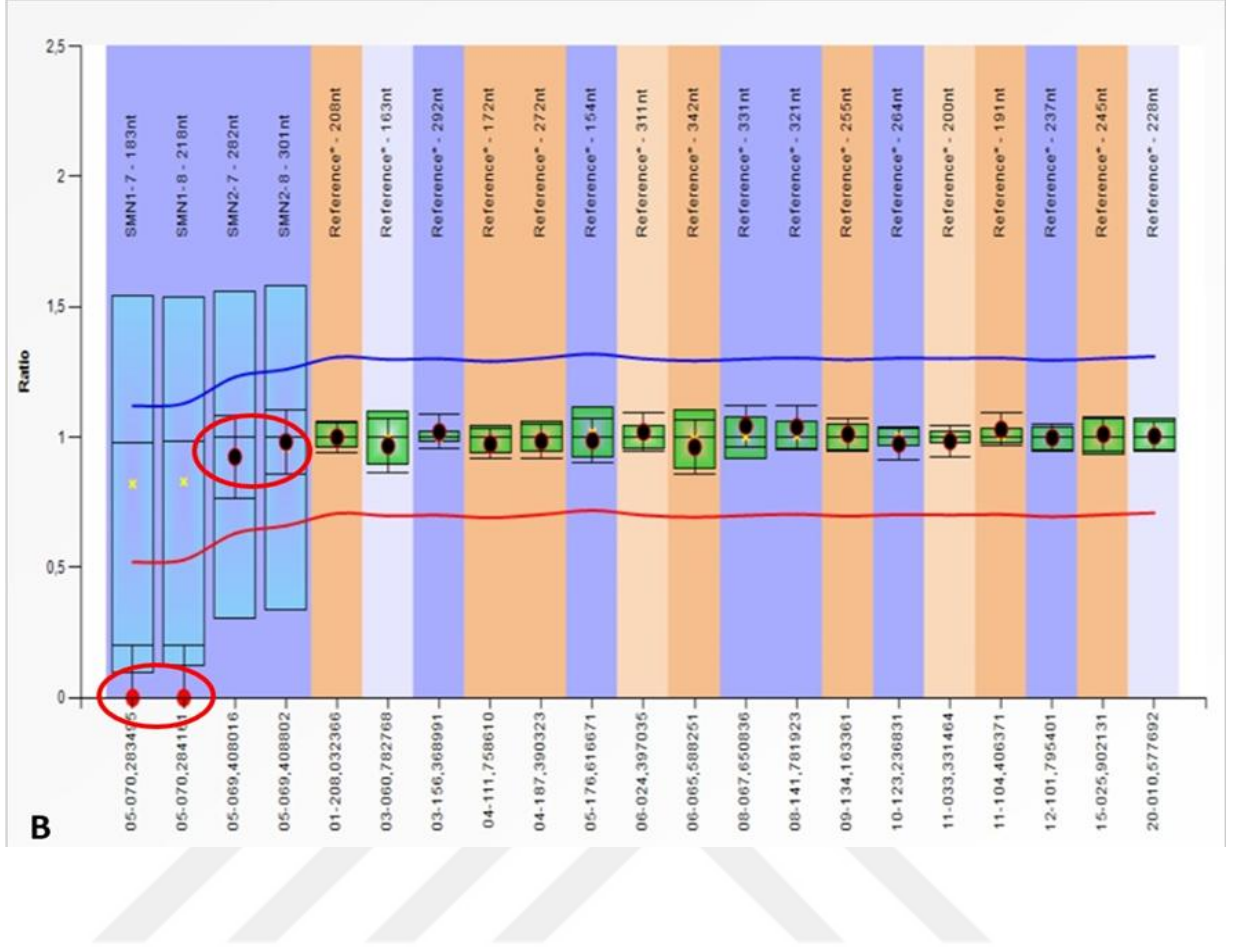
Şekil 4.9 SMN1 Ekzon 7/8 homozigot delesyon olup SMN2 Ekzon 7/8 kopya sayısı dört olan hastaya (P54) ait MLPA profillerinin sağlıklı kontrolle karşılaştırmalı kapiller elektroforez(A) ve prob(B) görüntüsü. Etkilenmiş olgunun elektroferogramında (A) SMN1 ekzon7/8 'e ait iki probun homozigot delesyonu, SMN2 ekzon 7/8'e ait problemlerin ise duplikasyonu (kırmızı ok) görülmektedir. Olgunun prob oranları (B) referans olguya karşılaştırıldığında SMN1 ekzon7/8 problemlerinin 0'a düştüğü, SMN2 ekzon 7/8 problemlerinin 2'ye çıktığı (kırmızı daire) görülmektedir, bu oran SMN1 için homozigot delesyonu gösterirken SMN2 için 4 kopya sayısını göstermektedir.

1 yaş altı başvuran hastalardan iki tanesi ikiz bebekler (P39, P40) olup; izole hipotoni kliniğiyle tarafımıza refere edilmişlerdi. İkiz olguların bir tanesinde

sağ elde tek palmar çizgi varken diğerinde dismorfik bulgu yoktu. Ebeveynler arası 1.kuzen akrabalığı olan olguların kromozom analizi 46,XX/46,XX olarak saptanmıştır. SMN1 ekzon7/8 homozigot delesyon saptanan hastaların SMN2 ekzon7/8 kopya sayısı 2 olarak saptandı, aile çalışması planlandı.

Kliniğimize başvurup SMA Tip I tanısı alan son olgumuz(P74) 3 aylıkken tarafımıza hipotoni öyküsüyle başvurmuştur. Prenatal öyküsünde özellik olmayan hastanın dismorfik bulgusu yoktu. Ebeveynler arası akrabalık olmayan olgunun kromozom analizi 46, XX olup; SMN1 ekzon7/8'de homozigot delesyon görüldü. SMN2 ekzon7/8 kopya sayısı ise 2 olarak saptandı (Şekil 4.10 A,B), yapılan aile çalışmasında ebeveynlerde ve iki kardeşinde SMA taşıyıcılığı tespit edilmiştir.





Şekil 4.10 SMN1 Ekzon 7/8 homozigot delesyon olup SMN2 Ekzon 7/8 kopya sayısı iki olan olguya (P74) ait MLPA profillerinin sağlıklı kontrolle karşılaştırmalı kapiller elektroforez(A) ve prob(B) görüntüsü. Etkilenmiş olgunun elektroferogramında (A) SMN1 ekzon7/8 'e ait iki probun homozigot delesyonu, SMN2 ekzon 7/8'e ait problemlerin oranının bir olduğu (kırmızı ok) görülmektedir. Olgunun prob oranları (B) referans olguya karşılaştırıldığında SMN1 ekzon7/8 problemlerinin 0'a düştüğü, SMN2 ekzon 7/8 problemlerinin bir olduğu (kırmızı daire) görülmektedir, bu oran SMN1 için homozigot delesyonu gösterirken SMN2 için 2 kopya sayısını göstermektedir.

4.5 Olguların Diğer Genetik Testlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda izole hipotoni kliniği ve hipotoniyle beraber ek bulguları olan toplam 52 hasta retrospektif olarak değerlendirilmiştir. İzole hipotoni kliniği olan 18 hastadan dört tanesi SMA tanısı alırken, kalan hastalardan 7 tanesi (%61,1) farklı tanılar almıştır. Kliniğimizde değerlendirilen hipotoniyle beraber ek bulguları olan 34 hastanın 9 tanesi (%26,5) tanı almıştır (Tablo 4.3, Tablo 4.4).

Tablo 4.3 Hipotoni kliniği ile gelip tanı alan olguların yapılan genetik testlerinin değerlendirilmesi-SMA tanısı alan olgular kırmızı daire içinde belirtilmiştir

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Aile öyküsü	Kromozom Analizi	SMA MLPA	Array CGH	WES/CES/NGS
P4	16 AYLIK	K	A-B 2.KUZEN	46,XX	SMN1 2 KOPYA SMN2 2 KOPYA	YOK	PPT1 geni OR Nöronal Seroid Lipofüsinoz Tip 1
P20/21	16YAŞ/28YAŞ	K/E	A-B YAKIN KÖYDEN	46,XX/46,XY	SMN1 1 KOPYA SMN2 3 KOPYA	YOK	MFN2 geni CMT Aksonal Tıp2A2B ile ilişkili
P39/P40	2 AYLIK İKİZ BEBEK	K	A-B 1.KUZEN 6 aylıkken ex olan kardeş öyküsü	46,XX/46,XX	SMN1 HOM DEL SMN2 2 KOPYA	YOK	YOK
P43	25 GÜNLÜK	E	A-B AKRABALIK YOK	46,XY	SMN1 2 KOPYA SMN2 2 KOPYA	N	DMPK geni Myotonik Distrofi Tıp1 (DM1)
P45	2 YAŞ	E		46,XY	SMN1 2 KOPYA SMN2 3 KOPYA	N	DMD geni Duchene Musküler Distrofi
P49	2 YAŞ	E	A-B AKRABALIK YOK	YOK	SMN1 3 KOPYA SMN2 2 KOPYA	N	COL12A1 geni OD Miyopatik Tıp Ehler-Danlos Sendromu
P54	33 YAŞ	E	A-B AYNI KÖY	YOK	SMN1 HOM DEL SMN2 4 KOPYA	YOK	YOK
P74	3 AYLIK	K	A-B AKRABALIK YOK	46,XX	SMN1 Hom Del SMN2 2 Kopya	YOK	YOK
P87	3 YAŞ	E		46,XY	SMN1 2 Kopya SMN2 Het DEL	N	Limb Girdle NGS panelinde MYOT geninde OR Limb-Girdle Musküler Distrofi ve OD Myofibril Miyopati

Tablo 4.4 Hipotoni ve hipotoniye ek dismorfik bulguları olup tanı alan olguların yapılan genetik testlerinin değerlendirilmesi

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Aile öyküsü	Kromozom Analizi	SMA MLPA	Array CGH	WES/CES/NGS
P29	1 YAŞ	K	A-B AKRABALIK YOK	46,XX	SMN1 2 Kopya SMN2 2 Kopya	N	MTHFR geni OR MTHFR Eksikliğine Bağlı Homosistinüri ve Nöral Tüp Defektlerine Yatkınlık
P31	1 YAŞ	K	A-B AKRABALIK YOK	46,XX,del(14)(q12)?,del(14)(q13)?	SMN1 2 Kopya SMN2 2 Kopya	14q13 delesyon sendromu	
P33	8 YAŞ	E		46,XY	SMN1 2 Kopya SMN2 2 Kopya	N	DHX30 geni Ağır Motor Bozukluk ile Giden Nörogelişimsel Bozukluk ve Konuşmama
P35	4 YAŞ	K	A-B 1 İLERİ 1.KUZEN	46,XX	SMN1 2 KOPYA SMN2 2 KOPYA	N	KCNMA1 geni OR kalıtılan Serebellar atrofi,gelişme geriliği ve Nöbetler OD Paroksizmal Nonkinesjenik Diskinezi
P44	3YAŞ	E		46,XY,15p+	SMN1 2 Kopya SMN2 2 Kopya	N	ASH1L geni OD Mental Retardasyon Tip 52 CHD1 geni OD Pilarowski-Bjornsson Sendromu (PILBOS) NR2F1 geni OD Bosch-Boonstra-Schaaf Optik Atrofi Sendromu (BBSOAS)
P64	1 YAŞ	E	A-B AKRABALIK YOK	46,XYqh+	SMN1 2 KOPYA SMN2 2 KOPYA	16p12.2 Delesyon Sendromu	
P68	2 YAŞ	E		46,XY	SMN1 2 Kopya SMN2 2 Kopya	N	ARID1B geni OD Coffin-Siris sendromu
P96	1 YAŞ	E	A-B AKRABALIK YOK Annesinin 4 gebeliği iuex, 1 kardeşi 10 günlük ex		SMN1 2 Kopya SMN2 1 Kopya	N	MEGF8 geni Carpenter Sendromu
P140	1 yaş	e	A-B AKRABALIK YOK		SMN1 2 Kopya SMN2 2 Kopya	X q12 bölgesinde 391 kbazlık delesyon OPHN1 geni Serebellar Hipoplazi ve belirgin Fasyal Bulgular ile Seyreden Xlinked MR	

P4 numaralı olgu kliniğimize 16 aylık iken hipotoni, yürümede gecikme şikayetiyle refere edildi. Dismorfik muayenesinde özellik olmayan olgunun ebeveynleri arası akrabalık vardı. Kromozom analizi 46, XX olan olgunun SMA MLPA sonucu SMN1 geni ekzon7/8 2kopya ve SMN2 geni ekzon 7/8 2 kopya olarak değerlendirilmiştir.WES analizinde *PPT1* geninde c.541G>T (p. Val181Leu) patojenik varyantı homozigot olarak saptanmıştır. *PPT1* geninde

saptanan patojenik mutasyonlar OMIM’de otozomal resesif kalıtmıllı “Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 1” ile ilişkilendirilmiş olup ebeveynler taşıyıcı olarak tespit edilmiş ve hastaya klinik izlem planlanmıştır.

P20 ve P21 numaralı olgular iki kardeş olup kliniğimize progresif kas gúcü kaybı ile başvurmuşlardır. Ebeveynleri yakın köyden olan olguların kromozom analizleri normal olup SMA MLPA analizinde her ikisinde de SMN1 geni kopya sayısı bir, SMN2 geni üç kopya olarak tespit edilmiştir. Olguların moleküler karyotiplemesinde etiyolojiye yönelik patojenik CNV saptanmaması üzerine WES planlanmıştır. WES analizinde *MFN2* geninde c.677T>A (p.V226E) ve c.1085C>T (p.T362M) patojenik varyantları compound (bileşik) heterozigot pozisyonda saptanmıştır. *MFN2* genindeki patojenik varyantlar, OMIM ‘de otozomal resesif kalıtmıllı “Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2A2B” ile ilişkilendirilmiş olup hastaların kliniği ile uyumlu bulunmuştur. Ebeveynler taşıyıcı olarak tespit edilmiş olup iki kardeşe klinik izlem planlanmıştır.

P29 numaralı olgu apne, hidrosefali, infantil musküler hipotoni bulguları ile kliniğimize konsülte edilmiş olup hastanın kromozom analizinde normal karyotip saptanmıştır. SMA MLPA analizi taşıyıcılık ile uyumlu hastanın, moleküler karyotip analizinde kliniğini açıklayacak patojenik CNV saptanmaması üzerine WES planlanmıştır. Olgunun WES analizinde *MTHFR* geninde c.1072 C>T (p. Arg358*) mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır. *MTHFR* geni OMIM ‘de otozomal resesif kalıtmıllı ‘Homocystinuria due to MTHFR deficiency’ ile ilişkilendirilmiş olup hastanın kliniği ile uyumludur. Ebeveyn analizinde anne-baba taşıyıcı olarak saptanmıştır ve olguya klinik izlem planlanmıştır

P31 numaralı olgu kliniğimize hipotoni, fasyal dismorfizm, hipotiroidi nedeniyle refere edilmiş olup SMA MLPA sonucu SMN1 geni ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 geni ekzon 7/8 2 kopya olarak saptanmıştır. Karyotip analizinde

46,XX,del(14)(q12)?,del(14)(q13)? saptanan olguya moleküler karyotipleme yapılmış olup hasta 14q13 delesyon sendromu olarak değerlendirilmiş ve klinik takip planlanmıştır.

P33 numaralı olgu kliniğimize kas güçsüzlüğü, mental motor retardasyon, konuşma bozukluğu nedeniyle yönlendirilmiş olup karyotip analizi 46, XY saptanmıştır. Olgunun SMA MLPA analizinde SMN1 geni ekzon7/8 2kopya ve SMN2 geni ekzon 7/8 2 kopya olarak değerlendirilmiş, moleküler karyotip analizinde hastanın kliniğini açıklayacak patojenik CNV saptanmaması üzerine WES planlanmıştır. Olgunun WES analizinde *DHX30* geninde c.385_386del (p. R130Efs*1) patojenik varyantı heterozigot olarak saptanmıştır. *DHX30* geni OMIM'de otozomal dominant kalımlı "Neurodevelopmental disorder with severe motor impairment and absent language" ile ilişkilendirilmiştir. Olguya klinik izlem planlanmıştır.

P35 numaralı olgu kliniğimize hipotoni ve febril konvülsiyon öyküsü ile başvurmuştur. Ebeveynleri arası akrabalık olan olgunun kromozom analizi 46, XX olup SMA MLPA analizinde SMN1 geni ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 geni ekzon 7/8 2 kopya olarak tespit edilmiştir. Olgunun moleküler karyotiplemesinde etiyojolojiye yönelik patojenik CNV saptanmaması üzerine WES planlanmıştır. WES analizinde *KCNMA1* geninde c.761C>T (p.T254M) varyantı homozigot olarak saptanmıştır. *KCNMA1* genindeki patojenik varyantlar; OMIM'de otozomal resesif kalımlı "Cerebellar atrophy, developmental delay, and seizures (CADEDS) ve" Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia-3 with or without generalized epilepsy" ile ilişkilendirilmiştir. Ebeveynler taşıyıcı olarak tespit edilmiş olup olguya klinik izlem planlanmıştır.

P43 numaralı olgu 25 günlük olup kliniğimize izole hipotoni öyküsü ile refere edilmiştir. Ebeveynleri arası akrabalık olmayan olgunun kromozom analizi 46,

XY olup SMA MLPA analizinde SMN1 geni ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 geni ekzon 7/8 2 kopya olarak tespit edilmiştir. Myotonik Distrofiye yönelik yapılan *DMPK* geni analizinde CTG tekrar sayısı 13 CTG / >50 CTG olarak tespit edilmiş olup hasta Myotonik Distrofi Tip1 (DM1) tanısı almıştır. Olguya klinik izlem planlanmıştır.

P44 numaralı 3 yaş olgu kliniğimize anomal beyin MRI (anormal miyelinizasyon) bulguları ve ağır hipotoni öyküsü ile refere edilmiştir. SMA MLPA analizinde SMN1 geni ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 geni ekzon 7/8 2 kopya olarak tespit edilen olgunun moleküler karyotiplemesinde etiyojolojiye yönelik patojenik CNV saptanmaması üzerine WES planlanmıştır. WES analizinde *ASH1L* geninde c.926G>A (p.G309E) varyantı heterozigot, *CHD1* geninde c.4681C>T(p.H1561Y) varyantı heterozigot, *NR2F1* geninde c.861G>A(p.M287I) varyantı heterozigot olarak tespit edilmiş olup her üç varyant da VUS (A variant of uncertain (or unknown) significance-Klinik Önemi Belirsiz Varyant) olarak değerlendirilmiştir. *ASH1L* geni OMIM 'de OD Mental Retardation-52 hastalığı ile, *CHD1* geni OMIM'de OD Pilarowski-Bjornsson syndrome (PILBO) ile, *NR2F1* geni OMIM'de OD Bosch-Boonstra-Schaaf optic atrophy syndrome (BBSOAS) ile ilişkilendirilmiştir. Olguya aile analizi, klinik değerlendirme ve takip planlandı.

P45 numaralı 2 yaş olgu yürümede zorlanma şikayetiyle kliniğimize yönlendirilmiş olup kromozom analizi 46, XY tespit edilmiştir. SMA MLPA analizinde SMN1 ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 ekzon 7/8 3 kopya olarak tespit edilmiştir. Olgunun moleküler karyotiplemesinde patojenik CNV saptanmamış olup *DMD* NGS panellinde VUS olarak değerlendirilen derin intronik iki varyant hemizigot olarak saptanmıştır. Olguya aile analizi ve klinik takip planlanmıştır.

P49 numaralı 2 yaş olgu hafif kas güçsüzlüğü, eklemlerde esneklik, çabuk yorulma nedeniyle kliniğimize refere edilmiş olup SMA MLPA analizinde SMN1 ekzon7/8 3 kopya ve SMN2 ekzon 7/8 2 kopya olarak tespit edilmiştir. Moleküler karyotiplemesinde kliniği açıklayabilecek patojenik CNV olmayan olgunun WES analizinde *COL12A1* geninde c.T294A(p. D98E) varyantı heterozigot olarak saptanmıştır. *COL12A1* genindeki patojenik varyantlar, OMIM'de otozomal dominant kalımlı 'Bethlem myopathy-2 (BTHLM2), myopathic-type Ehlers-Danlos syndrome' ile ilişkili olup hastanın kliniği ile uyumludur. Olgunun annesinde de benzer şikayetler mevcut olup annede de aynı varyant heterozigot olarak saptanmıştır. Olgulara klinik izlem planlanmıştır.

P64 numaralı olgu 15 aylık iken yürümeme ve öğürme şikayetiyle tarafımıza yönlendirildi. Dismorfik muayenesinde belirgin kirpikler ve kepece kulak olan olgunun kromozom analizi 46, XYqh+ olarak değerlendirilmiştir. SMA MLPA sonucu SMN1 ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 ekzon 7/8 2 kopya olarak saptanmıştır. Olgunun moleküler karyotiplemesinde 16p12.2 Delesyon Sendromu saptanmış olup, olguda klinik takip planlanmıştır.

P68 numaralı 2 yaş olgu hipotoni ve gelişme geriliği şikayetiyle kliniğimize yönlendirilmiş olup kromozom analizi 46, XY tespit edilmiştir. SMA MLPA analizinde SMN1 ekzon7/8 2 kopya ve SMN2 ekzon 7/8 2 kopya olan olgunun moleküler karyotiplemesinde patojenik CNV saptanmamış olup CES (Clinical Exome Sequencing) analizinde *ARID1B* geninde c.2987-1G>A varyantı heterozigot olarak tespit edilmiştir. *ARID1B* genindeki patojenik varyantlar OMIM'de otozomal dominant kalımlı "Coffin-Siris syndrome" ile ilişkilendirilmiş olup klinik uyumlu bulunmuştur ve klinik izlem planlanmıştır.

P87 numaralı 3 yaş olgu yürümede zorlanma şikayetiyle kliniğimize refere edilmiş olup kromozom analizi 46, XY saptanmıştır. Olgunun SMA MLPA analizinde SMN1 ekzon7/8 2 kopya, SMN2 ekzon 7/8 heterozigot delesyon olan olgunun moleküler karyotiplemesinde patojenik CNV saptanmamış olup Limb Girdle NGS panelinde *MYOT* geninde p. S55P (c.163T>C, p.Ser55Pro) heterozigot varyantı saptanmıştır. *MYOT* genindeki patojenik varyantlar OD Myofibril Myopati ile ilişkilendirilmiş olup olguda aile çalışması ve klinik izlem planlandı.

P96 numaralı 1 yaş olgu hipotoni, mikrosefali, dismorfik yüz bulguları ve bradikardi bulgularıyla tarafımıza yönlendirilmiş olup SMA MLPA analizinde SMN1 geni 2 kopya, SMN2 geninde heterozigot delesyon tespit edilmiştir. Moleküler karyotiplemesinde kliniğe yönelik patojenik CNV saptanmayan olgunun aile öyküsünde annesinin 4 gebeliği intrauterin ex ve 10 günlük iken ex kardeş öyküsü vardı. WES analizinde *MEGF8* geninde c.8284 G>A (p.G2762R) varyantı homozigot olarak saptandı. *MEGF8* genindeki patojenik varyantlar OMIM'de OR Carpenter syndrome-2 (CRPT2) ile ilişkili olup anne baba taşıyıcı saptanmıştır. Olguda klinik izlem planlandı.

P140 numaralı 1 yaş olgu kliniğe hipotoni, gelişme geriliği ve İUGR ile refere edilmiş olup SMA MLPA analizinde SMN1 geni 2 kopya, SMN2 geni 2 kopya olarak saptanmıştır. Ebeveynler arası akrabalık olmayan olgunun aile öyküsünde dayıda MR öyküsü vardı. Moleküler karyotiplerede Xq12 bölgesinde 391 kbazlık delesyon saptanmış olup bu bölgedeki lokalize *OPHN1* genindeki delesyon MLPA yöntemi de konfirme edilmiştir. *OPHN1* genindeki delesyonlar OMIM'de "Mental Retardation, X-Linked, With Cerebellar Hypoplasia And Distinctive Facial Appearance" ile ilişkilendirilmiş olup annede de aynı delesyon saptanmıştır. Aile analizi ve klinik takip planlandı.

5.TARTIŞMA

Spinal muskuler atrofi (SMA), spinal kordun ön boynuz hücrelerinde progresif dejenerasyonla karakterize pediatrik nöromusküler bir hastalıktır. Dejenerasyon sonucu proksimal kaslarda güçsüzlük ve atrofi ile kendini gösteren SMA nadiren sporadik olarak oluşabilse de hastaların %95'inde otozomal resesif, geri kalan %5'inde ise otozomal dominant veya X'e bağlı kalıtım göstermektedir (1). SMA kistik fibrozisten sonra batı toplumlarında en sık görülen ikinci ölümcül otozomal resesif hastalıktır. Bu toplumlarda insidansı yaklaşık 1/6000-1/10000 iken taşıyıcılık 1/40-1/60'dır (2)

Hastalığa SMN1 geninde meydana gelen homozigot delesyonlar, homozigot nokta mutasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmesi neden olurken, SMN2 geni kopya sayısındaki değişiklikler hastalığın prognozunda ve güncel tedavilere verilen yanıtta önem taşımaktadır(1) Sağlıklı bireylerde SMN2 geni kopya sayısı genellikle bir veya iki olarak değişmekle birlikte klinik önemi bulunmamaktadır(6,25)

Çalışmamızda SMA ön tanısı veya taşıyıcılığı açısından genotiplendirilen hastaların ve sağlıklı bireylerin SMN1 ve SMN2 gen kopya sayılarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 214 olgunun SMA MLPA verileri retrospektif olarak yeniden analiz edilmiştir.

Çalışmaya alınan tüm olgularda endikasyona bakılmaksızın SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayıları değerlendirildiğinde 188 olguda (%87,8) iki kopya saptanmıştır. Sağlıklı kontroller içinde bakıldığında ise olguların 136'sında(%94,4) iki kopya saptanmış olup bu durum literatürle uyumludur.

Araştırmamızda 18 olguda (%8,4) SMN1 7/8. ekzon bir kopya (heterozigot delesyon), olarak saptanmış olup bu olgular taşıyıcı olarak değerlendirilmiştir. Taşıyıcılığın yüksek saptanmış olması ailesinde kas hastalığı öyküsü bulunan aynı aileden bireylerin çalışmaya alınmış olmasına bağlanmış olup endikasyona göre sağlıklı kontrol olarak değerlendirilen 144 olgu içinde taşıyıcılığa bakıldığında; 6 olguda (%4,2) SMN1 7. ve 8. ekzonlarda heterozigot delesyon saptanmış olup bu oran literatürdeki bildirimlerden yüksektir. Taşıyıcılık saptanan 6 bireyin 5'i Çanakkale'li olup, küçük bir popülasyon içinden evlilikler ve akraba evliliğinin nadir olması nedeniyle taşıyıcılık sıklığı artmış olabilir; bu durumun netleştirilmesi için daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır

Taşıyıcılarda nadir olarak görülen; 2+0 genotipi taşıyıcılık taramasında yanlış negatif sonuçlara yol açmaktadır Ayrıca SMN1 genindeki nokta mutasyonlar da standart taşıyıcılık taramasıyla tespit edilemediğinden yanlış negatif taşıyıcı test sonuçlarının başka bir potansiyel nedenidir (27). Taşıyıcılıkla ilgili bu iki durum da göz önüne alındığında çalışma grubumuzda SMA taşıyıcılığı daha yüksek olabilir.

Hipotoni endikasyonu ile test edilen olgular arasında 4 olguda (%22,2) SMN1 7. ve 8. ekzonlarında homozigot delesyon saptanmıştır. Hipotoniye ek olarak dismorfik bulguları olan olgularda ise homozigot delesyon saptanmamıştır; kliniğinde dismorfik bulguları ve ek anomalileri olan olgularda ilk planda SMA MLPA analizi yerine NGS, WES, WGS gibi daha kapsamlı moleküler tetkiklerin planlanması daha doğru bir yaklaşım gibi görünmektedir.

Hipotoni kliniği ile gelen olguların %61,1'i(11/18) tanı alırken, ek bulguları olan olguların %26,5'i (9/34) tanı almıştır. İzole hipotoni kliniği ile değerlendirilen hastalardan tanı konmayan 7 hastanın 4 tanesinin hem array hem wes analizi

yapılmamışken, 3 tanesinin ise array analizi normalken wes analizi yapılmamıştır. İzole hipotoni kliniği ile müracaat eden hastalarda SMA MLPA array CGH, NGS panel ve WES analizi yapıldığında olguların tümüne tanı konmuştur.

Hipotoniye ek bulguları olan olgulardan 7 tanesine WES analizi yapılmış olup 6 tanesi WES analizi ile tanı almıştır. Üç hasta ise arrayCGH ile tanı almıştır. Bu hasta grubunda SMA MLPA array CGH, WES analizi yapılan olguların %88'i tanı almıştır. WES analizinin bu hasta grubunda tanı koyduruculuğu (%66) arrayCGH analizinden (%22) belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmaya alınan tüm olgular içinde 4 olguda (%1,9) SMN1 7. ve 8. ekzon kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiş olup, bunların 2'si sağlıklı kontrollerdir. Bu oran literatürdeki bildirimlerden düşük olup bu durum popülasyonların farklı olmasından kaynaklanabilir.

Endikasyona göre sağlıklı kontrol olarak değerlendirilen 144 olgu içinde SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayılarına bakıldığında ise olguların 86'sında (%59,7) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı 2, 50'sinde (%34,7) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı bir (heterozigot delesyon), 2'sinde (%1,4) SMN2 7. ve 8. ekzon kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir. Olguların 6'sında, (%4,2) ise SMN2 7. ve 8. ekzonda homozigot delesyon saptanmış olup sağlıklı kontrollerin SMN2 kopya sayıları literatürle benzerlik göstermektedir.

Park Je ve ark.'nın 2019 yılında Kore'de SMA taşıyıcılığına yönelik yaptığı çalışmada 1581 kordon kanı örneği MLPA yöntemi ile analiz edilmiş ve 29 (%1,81) yenidoğanda SMA taşıyıcılığı tespit edilmiştir, olguların hiçbirinde homozigot delesyon saptanmamıştır. Bu verilere dayanarak SMA taşıyıcılığının

Kore nüfusunda nadir olmadığını ve Kore'de tarama programı başlatmak için bu verilerin referans olabileceğini bildirmişlerdir(115).

Li C. ve ark.'nın Çin'de SMA taşıyıcılığını belirlemek amacıyla retrospektif olarak 2005'den 2016'ya kadar Çin'de SMA taşıyıcılığı ile ilgili yayınlanan literatürleri tarayarak yaptıkları retrospektif çalışmada; içinde sağlıklı kişilerin, gebe olguların ve kordon kanının bulunduğu yaklaşık 120 000 olgunun SMA analizleri değerlendirilmiş olup taşıyıcılık %2 olarak tespit edilmiştir ve bu oranın yurtiçinde ve dünyada ihmal edilemeyeceği vurgulanmıştır (116). Ayrıca bu araştırmanın sonucuna göre taşıyıcılığın 2005'den 2016'ya doğru artma eğiliminde olduğunu saptamışlardır ve zamanında prenatal tanı, genetik danışma önermektedirler.

Dejsuphong ve ark.'nın 2018 yılında Tayland'da 505 sağlıklı yetişkin olguyu kapsayan çalışmasında; vakaların %1,78'inde(9 olgu) taşıyıcılık tespit edilmiştir. Aynı çalışmada vakaların %90,5'inde (457 olgu) SMN1 kopya sayısı iki, %5,94'ünde (30 olgu) SMN1 kopya sayısı üç, %1,78'inde ise SMN1 kopya sayısı dört ve üzeri olarak bulunmuştur (117). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontrollerin %94,4'ünde iki kopya, %1,4'ünde ise üç kopya bulunmuş olup dört ve üzeri kopya sayısı olan birey yoktur

Taşıyıcılıkla ilgili Hendrickson ve ark.'nın 2009'da Kuzey Amerika'da yaptıkları bir çalışmada 5 farklı ırkta taşıyıcılığa bakılmıştır. Bu çalışmada Kafkas ırkında taşıyıcılık %2,7 (1/37), Askenazi yahudilerinde %2,2 (1/46), Asyalılarda %1,8(1/56), siyahi Amerikalılarda %1,1 (1/91), İspanyollarda%0,8(1/125) tespit edilmiştir(118). Bu çalışmada en yüksek taşıyıcılık bizim çalışmamıza (%4,2) da en yakın olan Kafkas ırkında saptanmıştır.

Aynı çalışmada SMN1 kopya sayıları da değerlendirilmiş olup Kafkas ırkının %90,95'inde SMN1 kopya sayısı iki, %6,3'ünde üç kopya, Askenazi Yahudileri'nin %82,53'ünde iki kopya, %15,26'sında üç kopya, Asyalıların %87,34'ünde iki kopya, %10,90'nında üç kopya, siyahi Amerikalıların %52,11'inde iki kopya, %46,79'ında üç kopya, ispanyol ırkının %84,44'ünde iki kopya, %14,79'unda üç kopya saptanmıştır (118). Diğer çalışmalara benzer şekilde bizim olgu grubumuzda da iki kopya baskın olarak saptanmıştır (Tablo 5.1).

Tablo 5.1 Hendrickson ve ark.(118) tarafından sağlıklı olgulardaki SMN1 kopya sayılarının değerlendirildiği derleme ile bizim çalışmamızdaki verilerin karşılaştırılması

Etnik Köken	SMN1 Kopya Sayısı			Toplam (n)
	1 kopya	2 kopya	3 kopya	
Kafkas	28(%2,72)	935(%90,95)	65(%6,3)	1028
Askenazi Yahudileri	22(%2,2)	827((%82,53)	153(%15,26)	1002
Asya	18(%1,8)	897((%87,34)	112(%10,90)	1027
Afrika kökenli Amerikan	11(%1,1)	529(%52,11)	475(%46,79)	1015
İspanyol	8(%0,8)	870(%84,4)	152(%14,7)	1030
Bizim Çalışmamız	6(%4,2)	136(%94,4)	2(%1,4)	144

Mevcut literatür verileri; Güneydoğu ve Doğu Asya nüfusunun (%1,6-2,1) ve Kafkasların (%2,7) taşıyıcı sıklığının benzer olduğunu gösterirken, siyah ırkta (%1,1) ve İspanyol (% 0,8) ırkında oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Tan J. ve ark. tarafından 2018 yılında Çin'in Liuzhou kentinde yapılan bir çalışmada 4931 sağlıklı gebe olguda SMA taşıyıcılığı taranmış ve taşıyıcılık oranı %1,2 olarak bulunmuştur(119). Kendisi taşıyıcı olan vakaların eşleri de analiz edilmiş, bir olgunun eşinin de taşıyıcı olması nedeniyle prenatal tanı yapılarak bir bebekte homozigot delesyon saptanmıştır. SMA'nın tarama programlarına dahil edilmesi çiftlere prenatal tanı ve PGD imkanı sunduğu için dikkate alınmalıdır.

Lefebvre ve ark.'nın 1995'te yaptıkları bir çalışmada sağlıklı kontrollerin %4,4'ünde SMN2 geninde homozigot delesyon saptanmıştır (6). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde sağlıklı kontrol olarak alınan olguların %4,2'sinde SMN2 geninde homozigot delesyon saptanmıştır.

Fang ve ark. tarafından 42 SMA hastası ve 212 sağlıklı kontrol üzerinde SMN1/SMN2/NAIP geni kopya sayıları değerlendirilmiştir(120). Sağlıklı kontrollerin SMN2 kopya sayılarına bakıldığında 10 olguda (%4,7) 0 kopya , 70 olguda(%33) 1 kopya, 130 olguda(%61,4) 2 kopya ,2 olguda (%0,9) 3 kopya saptanmış olup bu değerler bizim çalışmamıza yakındır (Tablo 5.2) Sağlıklı grubun SMN1 kopya sayılarına bakıldığında ise 4 olguda (%1,9) 1kopya, 203 olguda (%95,7) 2 kopya, 5 olguda (%2,4) 3 kopya saptanmış olup bizim çalışmamızda taşıyıcılık daha yüksek saptanmıştır.

Tablo 5.2 Fang ve ark.'ları(120) tarafından sağlıklı olgulardaki SMN1 ve SMN2 kopya sayılarının değerlendirildiği derleme ile bizim çalışmamızdaki verilerin karşılaştırılması

GEN	KOPYA SAYISI	Fang ve ark. n=212	Bizim çalışmamız n=144
SMN1	1	4(%1,9)	6(%4,2)
	2	203(%95,7)	136(%94,4)
	3	5(%2,4)	2(%1,4)
SMN2	0	10(%4,7)	6(%4,2)
	1	70(%33,1)	50(%34,7)
	2	130(%61,3)	87(%59,7)
	3	2(%0,9)	2(%1,4)

Mailman ve ark. tarafından 2002 yılında yapılan 97 sağlıklı kontrolün alındığı bir çalışmada; olguların %14,4'ünde SMN2 geninde homozigot delesyon saptanmıştır, %4'ünde ise SMN1 geni kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir(25). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontrol olarak alınan olguların %4,2'sinde, tüm olguların da %4,2'sinde SMN2 geninde homozigot delesyon saptanmış olup, %1,3'ünde SMN1 kopya sayısı 3 olarak değerlendirilmiştir. Bunun nedeninin hasta grubuyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Aynı çalışmada 142 SMA hastası hastalığın başlangıç yaşına ve hastaların kliniğine göre sınıflandırılmış ve SMN2 kopya sayıları değerlendirilmiştir(25). Hepsi 6 aylıktan önce tanı almış 52 SMA tip1 hastasının %82,7'sinde SMN2 kopya sayısı iki, %13,5'unda bir, %3,9'unda ise dört olarak saptanmıştır. Hepsi 18 yaşından sonra tanı alan 90 SMA Tip 3 hastasının ise %77,8'inde SMN2 kopya sayısı üç, %22,2'sinde dört olarak tespit edilmiştir. SMA Tip III hastalarının %100'ünde SMN2 kopya sayısı 3 ve üzerinde iken SMA Tip I hastalarının sadece %3,8'inde SMN2 kopya sayısı üç olarak tespit edilmiştir. Üçün üzerinde SMN2 kopya sayısı olan SMA Tip I hastası yokken, SMA Tip III tanılı hastalar arasında da bir veya iki SMN2 kopya sayısı olan da tespit edilmemiştir (25) (Tablo 5.3).

Tablo 5.3 Mailman ve ark. (25) tarafından yapılan çalışmadaki 142 SMA hastasının SMN2 kopya sayılarının değerlendirilmesi

SMN2 Kopya Sayısı	SMA Tip I	SMA Tip III	TOTAL
1 Kopya SMN2	7 (13.5%)	0 %0	7 (4.9%)
2 Kopya SMN2	43 (82.7%)	0 (0%)	43 (30.3%)
3 Kopya SMN2	2 (3.9%)	70 (77.8%)	72 (50.7%)
4 Kopya SMN2	0 (0%)	20 (22.2%)	20 (14.1%)
Total	52	90	142

Calucho ve ark. tarafından 625 ispanyol olgu ve retrospektif olarak dünya genelinden 2834 olgunun alındığı 1999'dan 2018'e kadar yayınlanan SMN2 kopya sayısı ile SMA tiplerinin kıyaslandığı çalışmaların değerlendirildiği bir derlemede 3459 SMA hastasının verileri analiz edilmiştir(99). Bu derlemede SMA tip 1 hastalarının %73'ünde SMN2 kopya sayısı iki, %7'sinde bir, %20'sinde üç, %1'inden azında dört ve %1'inden azında beş olarak saptanmıştır. SMA Tip 2 hastalarının %78'inde SMN2 kopya sayısı üç,

%16'sında iki, %5'inde dört, %1'inden azında beş olarak bulunmuştur. SMA Tip 3 hastalarında ise %49'unda SMN2 kopya sayısı üç, %44'ünde dört, %5'inde iki olarak bulunmuştur. Bu hastaların %2'sinde SMN2 kopya sayısı beş, <%1'inden az bir kısmında ise altı olarak tespit edilmiştir (Tablo 5.4) (99)

Tablo 5.4 Calucho ve ark.(99) tarafından 3459 SMA hastası ile yapılan çalışmada SMA klinik tiplerine göre SMN2 kopya sayılarının değerlendirilmesi

SMN2 kopya sayısı	SMA Tip I n:1256	SMA TipII n:1160	SMA Tip III n:1043
1 kopya SMN2	88 (%7)	4(<%1)	0(%0)
2 kopya SMN2	919(%73)	190(%16)	54(%5)
3 kopya SMN2	245 (%20)	902(%78)	515(%49)
4 kopya SMN2	3(<%1)	59(%5)	455(%44)
5 kopya SMN2	1(<%1)	3(<%1)	16(%2)
6 kopya SMN2	0	0	3(<%1)

Zhang ve arkadaşları tarafından 2020 Ocak ayında yayınlanan bir çalışmada 40 SMA hastasında SMN2 kopya sayısı ve NAIP gen kopya sayısı ile hastaların klinik fenotipi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir(106). Çalışmaya 13 SMA Tip I,16 SMA Tip II ve 11 SMA Tip III hastası dahil edilmiştir.SMA Tip I hastalarının %61,5'unda (n:8) SMN2 kopya sayısı iki, %38,5'inde (n:5) SMN2 kopya sayısı üç; SMA Tip II hastaların %12,5'unda(n:2) SMN2 kopya sayısı iki, %75'inde (n:12) SMN2 kopya sayısı üç, %12,5'unda(n:2) SMN2 kopya sayısı dört, SMA Tip III hastaların ise %72,7'sinde (n:8) SMN2 kopya sayısı üç, %27,3'ünde(n:3) SMN2 kopya sayısı dört olarak değerlendirilmiştir.NAIP kopya

sayılarına bakıldığında ise SMA Tip I hastalarının %30,8'inde (n:4) homozigot delesyon, %53,8'inde (n:7) NAIP geni kopya sayısı bir, %15,4'ünde (n:2) ise NAIP geni kopya sayısı iki ; SMA Tip II hastaların %68,8'inde(n:11) NAIP geni kopya sayısı bir, %31,2'sinde (n:5) NAIP geni kopya sayısı iki, SMA Tip III hastaların ise %45,5'inde (n:5) NAIP kopya sayısı bir, %54,5'inde(n:6) NAIP kopya sayısı iki olarak değerlendirilmiştir(Tablo 5.5).

Tablo 5.5 Zhang ve ark.(106)'ları tarafından 40 SMA hastası ile yapılan çalışmada SMN2 ve NAIP geni kopya sayılarının SMA klinik tiplerine göre değerlendirilmesi

GEN	KOPYA SAYISI	HASTA SAYISI	KLİNİK SINIFLAMA		
			SMA Tip I	SMA Tip II	SMA Tip III
SMN2	2	10(%25)	8(%61,5)	2(%12,5)	0
	3	25(%62,5)	5(%38,5)	12(%75)	8(%72,7)
	4	5(%12,5)	0	2(%12,5)	3(%27,3)
NAIP	0	4(%10)	4(%30,8)	0	0
	1	23(%57,5)	7(%53,8)	11(%68,8)	5(%45,5)
	2	13(%32,5)	2(%31,2)	5(%31,2)	6(%54,5)

Bizim çalışmamızda da SMA tanılı dört hasta mevcut idi ve SMA Tip I tanılı 3 hastanın SMN2 kopya sayısı iki iken SMA Tip III tanılı bir hastanın SMN2 kopya sayısı 4 olarak değerlendirilmiştir. Diğer çalışmalarda da SMA Tip I hastalarında SMN2 geninde iki kopya baskın iken SMA Tip III hastalarında üç, dört kopya görülebilmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

SMA'da, hastalığının şiddeti ve genel nüfusta yüksek taşıyıcılık oranı göz önüne alındığında, Amerikan Jinekoloji ve Obstetrik Derneği (ACOG) ile Amerikan Tıbbi Genetik Deneği (ACMG) çiftlerde doğum öncesi ırk ya da etnik köken gözetmeksizin SMA taramasını önermektedir (3). Hastalığın morbiditesinin yüksek olması, küratif bir tedavisinin olmaması, mevcut tedavi maliyetinin yüksek olması nedeniyle gebelik öncesi tarama önem kazanmaktadır. Ayrıca SMA tipleri arasında fenotip tahmini, SMN2 kopya sayısının ve diğer genlerin modifiye edici etkileri nedeniyle karmaşıktır. Ek olarak, fenotip ve modifiye edici faktörler arasında tamamen öngörücü bir korelasyon yoktur. Değişken fenotipleri olan diğer otozomal hastalıklara benzer şekilde SMA tarama sonuçları taşıyıcı çiftlerin hasta doğabilecek çocuklarında fenotipik tahmini zorlaştırmaktadır.

Ülkemizde de taşıyıcılıkla ilgili daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmakla birlikte bizim çalışmamızda diğer ırklardan daha yüksek çıkmıştır. Çalışmamız nispeten küçük ölçekli bir çalışma olsa da taşıyıcılık konusunda yol gösterici olup SMA taşıyıcılık taramasının evlilik öncesi tarama programına eklenmesi veya gebelik planlama aşamasında taramanın yapılarak preimplantasyon veya prenatal tanı yöntemleri hakkında genetik danışma verilmesi uygun olacaktır.

Çalışmamızdaki hastaları değerlendirirken SMA MLPA, arrayCGH, NGS panelleri ve WES birarada kullanıldığında izole hipotoni kliniği ile gelen hastaların %61,1'i tanı alırken, ek bulguları olan hastaların %26,5'i tanı almıştır. Çalışmamızdaki yüksek tanı oranı dikkate alındığında hipotoni kliniği ile gelen

hastalara tanı konmasında NGS panelleri, arrayCGH ve WES analizi gibi moleküler yöntemlerin birarada kullanımı gözönünde bulundurulmalıdır.

7.KAYNAKLAR

1. Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *The Lancet*. 2008;371(9630):2120-2133.
2. Muralidharan K, Wilson RB, Ogino S, Nagan N, Curtis C, Schrijver I. Population carrier screening for spinal muscular atrophy a position statement of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2011;13(1):3-6.
3. Gregg AR. Expanded Carrier Screening. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018;45(1):103-112.
4. Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscular Disorders*. 1992;2(5):423-428.
5. Farrar MA, Kiernan MC. The genetics of spinal muscular atrophy: progress and challenges. *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):290-302.
6. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-165.
7. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol*. 2011;68(8):979-984.
8. Ottesen EW. ISS-N1 makes the First FDA-approved Drug for Spinal Muscular Atrophy. *Transl Neurosci*. 2017;8:1-6.
9. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, Yamashita M, Rigo F, Hung G, Schneider E, Norris DA, Xia S, Bennett CF, Bishop KM. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet*. 2016;388(10063):3017-3026.
10. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, Iannaccone ST, Kirschner J, Kuntz NL, Saito K, Shieh PB, Tulinius M, Mazzone ES, Montes J, Bishop KM, Yang Q, Foster R, Gheuens S, Bennett CF, Farwell W, Schneider E, De Vivo DC, Finkel RS, Group CS. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2018;378(7):625-635.

11. Aydınli N, Baslo B, Çalışkan M, Ertaş M, Özmen M. Muscle ultrasonography and electromyography correlation for evaluation of floppy infants. *Brain and Development*. 2003;25(1):22-24.
12. Sender P, Jayawant S. Evaluation of the floppy infant. *Current Paediatrics*. 2003;13(5):345-349.
13. Darja Paro-Panjan M, MSc; David Neubauer M, PhD. Congenital Hypotonia: Is There an Algorithm? *Journal of Child Neurology*. 2004;19:439-442.
14. Lawrence P, Richer M, Michael I, Shevell M, Steven P, Miller M. Diagnostic Profile of Neonatal Hypotonia: An 11-Year Study. *PEDIATRIC NEUROLOGY*. 2001;25:32-37.
15. Laugel V, Cossee M, Matis J, de Saint-Martin A, Echaniz-Laguna A, Mandel JL, Astruc D, Fischbach M, Messer J. Diagnostic approach to neonatal hypotonia: retrospective study on 144 neonates. *Eur J Pediatr*. 2008;167(5):517-523.
16. Vasta I, Kinali M, Messina S, Guzzetta A, Kapellou O, Manzur A, Cowan F, Muntoni F, Mercuri E. Can clinical signs identify newborns with neuromuscular disorders? *J Pediatr*. 2005;146(1):73-79.
17. Erhan BAYRAM, Uluç YiŞ, KURUL SH. Hipotonik İnfant: Klinik Ve Etiyolojik Değerlendirme. *Deü Tip Fakültesi Dergisi*. 2012;26:219-228.
18. Sabriye Kocatürk Sel , Halil Kasap , Filiz Koç , Güzel Al. Spinal Müsküler Atrofi ve Moleküler Genetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2012;21.
19. Dubowitz V. Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. *Neuromuscular disorders*. 2009;19(1):69-73.
20. Baioni MT, Ambiel CR. Spinal muscular atrophy: diagnosis, treatment and future prospects. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(4):261-270.
21. L. M. BRZUSTOWICZ, * P. W. KLEYN, F. M. BoYcE, t L. L. Lm, t A. P. MONACO, G. K. PENCHASZADEH, K. DAS, * C. H. WANG, MUNSAT TL, JO, * L. M. KuNw, t AND T. C. GILLIAM*. Fine-Mapping of the Spinal Muscular Atrophy Locus to a Region Flanked by MAPIB and D5S6. *Genomics*. 1992;13:991-998
22. Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *Journal of medical genetics*. 1978;15:409-413.
23. Mostacciuolo M, Danieli G, Trevisan C, Müller E, Angelini C. Epidemiology of spinal muscular atrophies in a sample of the Italian population. *Neuroepidemiology*. 1992;11(1):34-38.
24. Thieme A, Mitulla B, Schulze F, Spiegier AW. Epidemiological data on Werdnig-Hoffmann disease in Germany (West-Thüringen). *Human genetics*. 1993;91(3):295-297.
25. Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, Burghes AH, Prior TW. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genetics in Medicine*. 2002;4(1):20-26.
26. Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlf's EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical

- laboratory analysis of > 72 400 specimens. *European journal of human genetics*. 2012;20(1):27-32.
27. Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmuller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):124.
 28. Ogino S, Leonard DG, Rennert H, Ewens WJ, Wilson RB. Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet*. 2002;110(4):301-307.
 29. OMIM, Man OMI. Spinal Muscular Atrophy, Late-Onset, Finkel Type; SMAFK. 2015, March 20.
 30. GeneReviews. Spinal Muscular Atrophy, X-Linked Infantile. 2012, September 13.
 31. Prior TW, Finanger E. GeneReviews: Spinal Muscular Atrophy. Seattle NCBI; 2000.
 32. Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 1999;3(2):49-51.
 33. Macleod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *European Journal of Paediatric Neurology*. 1999;3(2):65-72.
 34. Markowitz JA, Tinkle MB, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy in the neonate. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2004;33(1):12-20.
 35. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *Journal of the neurological sciences*. 1997;146(1):67-72.
 36. Oskoui M, Levy G, Garland C, Gray J, O'hagen J, De Vivo D, Kaufmann P. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. *Neurology*. 2007;69(20):1931-1936.
 37. Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P, Darras BT, Chung WK, Sproule DM, Kang PB, Foley AR, Yang ML, Martens WB. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*. 2014;83(9):810-817.
 38. Brahe C, Servidei S, Zappata S, Ricci E, Tonali P, Neri G. Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet (London, England)*. 1995;346(8977):741-742.
 39. Clermont O, Burlet P, Lefebvre S, Bürglen L, Munnich A, Melki J. SMN gene deletions in adult-onset spinal muscular atrophy. *The Lancet*. 1995;346(8991-8992):1712-1713.
 40. Finkel RS, Mercuri E, Meyer OH, Simonds AK, Schroth MK, Graham RJ, Kirschner J, Iannaccone ST, Crawford TO, Woods S, Muntoni F, Wirth B, Montes J, Main M, Mazzone ES, Vitale M, Snyder B, Quijano-Roy S, Bertini E, Davis RH, Qian Y, Sejersen T, group SMAC. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute

- care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(3):197-207.
41. Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, Wirth B, Montes J, Main M, Mazzone ES, Vitale M, Snyder B, Quijano-Roy S, Bertini E, Davis RH, Meyer OH, Simonds AK, Schroth MK, Graham RJ, Kirschner J, Iannaccone ST, Crawford TO, Woods S, Qian Y, Sejersen T, Group SMAC. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(2):103-115.
 42. Wirth B, Karakaya M, Kye MJ, Mendoza-Ferreira N. Twenty-Five Years of Spinal Muscular Atrophy Research: From Phenotype to Genotype to Therapy, and What Comes Next. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2020.
 43. De Sanctis R, Coratti G, Pasternak A, Montes J, Pane M, Mazzone ES, Young SD, Salazar R, Quigley J, Pera MC, Antonaci L, Lapenta L, Glanzman AM, Tiziano D, Muntoni F, Darras BT, De Vivo DC, Finkel R, Mercuri E. Developmental milestones in type I spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(11):754-759.
 44. Oskoui M, Darras BT, De Vivo DC. Spinal Muscular Atrophy. *Spinal Muscular Atrophy* 2017:3-19.
 45. Kaufmann P, McDermott MP, Darras BT, Finkel RS, Sproule DM, Kang PB, Oskoui M, Constantinescu A, Gooch CL, Foley AR, Yang ML, Tawil R, Chung WK, Martens WB, Montes J, Battista V, O'Hagen J, Dunaway S, Flickinger J, Quigley J, Riley S, Glanzman AM, Benton M, Ryan PA, Punyanitya M, Montgomery MJ, Marra J, Koo B, De Vivo DC, Muscle Study G, Pediatric Neuromuscular Clinical Research Network for Spinal Muscular A. Prospective cohort study of spinal muscular atrophy types 2 and 3. *Neurology.* 2012;79(18):1889-1897.
 46. Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Hubner C. Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet.* 2001;29(1):75-77.
 47. Wilmshurst JM, Bye A, Rittey C, Adams C, Hahn AF, Ramsay D, Pamphlett R, Pollard JD, Ouvrier R. Severe infantile axonal neuropathy with respiratory failure. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine.* 2001;24(6):760-768.
 48. Mellins RB, Hays AP, Gold AP, Berdon WE, Bowdler JD. Respiratory distress as the initial manifestation of Werdnig-Hoffmann disease. *Pediatrics.* 1974;53(1):33-40.
 49. Rudnik-Schöneborn S, Forkert R, Hahnen E, Wirth B, Zerres K. Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics.* 1996;27(01):8-15.
 50. Giannini A, Pinto AM, Rossetti G, Prandi E, Tiziano D, Brahe C, Nardocci N. Respiratory failure in infants due to spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Intensive Care Med.* 2006;32(11):1851-1855.

51. Kaindl AM, Guenther U-P, Rudnik-Schöneborn S, Varon R, Zerres K, Schuelke M, Hübner C, von Au K. Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Journal of child neurology*. 2008;23(2):199-204.
52. Pitt M, Houlden H, Jacobs J, Mok Q, Harding B, Reilly M, Surtees R. Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness and its relationship to SMARD1. *Brain*. 2003;126(Pt 12):2682-2692.
53. Messina MF, Messina S, Gaeta M, Rodolico C, Salpietro Damiano AM, Lombardo F, Crisafulli G, De Luca F. Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type I (SMARD 1): an atypical phenotype and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012;16(1):90-94.
54. Breza M, Koutsis G. Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy): a clinically oriented review of a rare disease. *J Neurol*. 2019;266(3):565-573.
55. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding A, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. 1991;352(6330):77-79.
56. Kennedy WR, Alter M, Sung JH. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset: a sex-linked recessive trait. *Neurology*. 1998;50(3):583-583.
57. Mariotti C, Castellotti B, Pareyson D, Testa D, Eoli M, Antozzi C, Silani V, Marconi R, Tezzon F, Siciliano G. Phenotypic manifestations associated with CAG-repeat expansion in the androgen receptor gene in male patients and heterozygous females: a clinical and molecular study of 30 families. *Neuromuscular Disorders*. 2000;10(6):391-397.
58. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G. Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain*. 2006;129(Pt 6):1446-1445.
59. Grunseich C, Kats IR, Bott LC, Rinaldi C, Kokkinis A, Fox D, Chen KL, Schindler AB, Mankodi AK, Shrader JA, Schwartz DP, Lehky TJ, Liu CY, Fischbeck KH. Early onset and novel features in a spinal and bulbar muscular atrophy patient with a 68 CAG repeat. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(11):978-981.
60. Kuhlenbäumer G, Kress W, Ringelstein E, Stögbauer F. Thirty-seven CAG repeats in the androgen receptor gene in two healthy individuals. *Journal of neurology*. 2001;248(1):23-26.
61. Finsterer J, Soraru G. Onset Manifestations of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (Kennedy's Disease). *J Mol Neurosci*. 2016;58(3):321-329.
62. Dahlqvist JR, Vissing J. Exercise Therapy in Spinobulbar Muscular Atrophy and Other Neuromuscular Disorders. *J Mol Neurosci*. 2016;58(3):388-393.
63. Harding A, Thomas P. Hereditary distal spinal muscular atrophy: a report on 34 cases and a review of the literature. *Journal of the neurological sciences*. 1980;45(2-3):337-348.
64. Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate

- gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(18):9920-9925.
65. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *The EMBO journal*. 1996;15(14):3555-3565.
 66. Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G. Molecular functions of the SMN complex. *Journal of child neurology*. 2007;22(8):990-994.
 67. Will CL, Lührmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current opinion in cell biology*. 2001;13(3):290-301.
 68. Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(8):597-609.
 69. Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Laggenbauer B, Fischer U. Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev*. 2005;19(19):2320-2330.
 70. Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One*. 2007;2(9):e921.
 71. Rossoll W, Kröning A-K, Ohndorf U-M, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M. Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Human molecular genetics*. 2002;11(1):93-105.
 72. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*. 2003;163(4):801-812.
 73. McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE. Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol*. 2003;162(5):919-931.
 74. Sharma A, Lambrechts A, Hao le T, Le TT, Sewry CA, Ampe C, Burghes AH, Morris GE. A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res*. 2005;309(1):185-197.
 75. Bricceno KV, Fischbeck KH, Burnett BG. Neurogenic and myogenic contributions to hereditary motor neuron disease. *Neurodegener Dis*. 2012;9(4):199-209.
 76. Brzustowicz L, Kleyn P, Boyce F, Lien L, Monaco A, Penchaszadeh G, Das K, Wang C, Munsat T, Ott J. Fine-mapping of the spinal muscular atrophy locus to a region flanked by MAP1B and D5S6. *Genomics*. 1992;13(4):991-998.
 77. Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot M, Burette P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere J, Fardeau M. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*. 1990;344(6268):767-768.

78. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutter G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*. 1995;80(1):167-178.
79. Bürglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly J-M, Melki J. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *American journal of human genetics*. 1997;60(1):72.
80. Carter TA, Bönnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Human molecular genetics*. 1997;6(2):229-236.
81. Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nature genetics*. 1998;20(1):83-86.
82. Butchbach ME. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci*. 2016;3:7.
83. Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet*. 2001;108(3):255-266.
84. Mittal B. Rapid molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(1):6.
85. Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*. 1996;32(3):479-482.
86. Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, Brahe C, Saugier-veber P, Bonnefont JP, Melki J. Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol*. 2007;171(4):1269-1280.
87. Cho S, Dreyfuss G. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev*. 2010;24(5):438-442.
88. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature genetics*. 2003;34(4):460-463.
89. Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet*. 2007;16(24):3149-3159.
90. Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet*. 2006;78(1):63-77.
91. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 2002;70(2):358-368.

92. Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat.* 2003;22(1):74-78.
93. Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, Tulinius M, Nordling M. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2006;16(12):830-838.
94. Prior TW, Nagan N, Sugarman EA, Batish SD, Braastad C. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. *Genet Med.* 2011;13(7):686-694.
95. Luo M, Liu L, Peter I, Zhu J, Scott SA, Zhao G, Eversley C, Kornreich R, Desnick RJ, Edelman L. An Ashkenazi Jewish SMN1 haplotype specific to duplication alleles improves pan-ethnic carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2014;16(2):149-156.
96. Alias L, Bernal S, Calucho M, Martinez E, March F, Gallano P, Fuentes-Prior P, Abuli A, Serra-Juhe C, Tizzano EF. Utility of two SMN1 variants to improve spinal muscular atrophy carrier diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(10):1554-1557.
97. Prior TW, Professional P, Guidelines C. Carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2008;10(11):840-842.
98. Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet A.* 2004;130A(3):307-310.
99. Calucho M, Bernal S, Alias L, March F, Vencesla A, Rodriguez-Alvarez FJ, Aller E, Fernandez RM, Borrego S, Millan JM, Hernandez-Chico C, Cusco I, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(3):208-214.
100. DiDonato CJ, Chen X-N, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome research.* 1997;7(4):339-352.
101. Hsieh-Li HM, Chang J-G, Jong Y-J, Wu M-H, Wang NM, Tsai CH, Li H. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nature genetics.* 2000;24(1):66-70.
102. Bernal S, Alias L, Barcelo MJ, Also-Rallo E, Martinez-Hernandez R, Gamez J, Guillen-Navarro E, Rosell J, Hernando I, Rodriguez-Alvarez FJ, Borrego S, Millan JM, Hernandez-Chico C, Baiget M, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. The c.859G>C variant in the SMN2 gene is associated with types II and III SMA and originates from a common ancestor. *J Med Genet.* 2010;47(9):640-642.
103. Cobben J, Van der Steege G, Grootsholten P, De Visser M, Scheffer H, Buys C. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *American journal of human genetics.* 1995;57(4):805.

104. Yanyan C, Yujin Q, Jinli B, Yuwei J, Hong W, Fang S. Correlation of PLS3 expression with disease severity in children with spinal muscular atrophy. *J Hum Genet.* 2014;59(1):24-27.
105. Stratigopoulos G, Lanzano P, Deng L, Guo J, Kaufmann P, Darras B, Finkel R, Tawil R, McDermott MP, Martens W. Association of plastin 3 expression with disease severity in spinal muscular atrophy only in postpubertal females. *Archives of neurology.* 2010;67(10):1252-1256.
106. Zhang Y, He J, Zhang Y, Li L, Tang X, Wang L, Guo J, Jin C, Tighe S, Zhang Y, Zhu Y, Zhu B. The analysis of the association between the copy numbers of survival motor neuron gene 2 and neuronal apoptosis inhibitory protein genes and the clinical phenotypes in 40 patients with spinal muscular atrophy: Observational study. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(3):e18809.
107. Cusco I, Barcelo MJ, del Rio E, Martin Y, Hernandez-Chico C, Bussaglia E, Baiget M, Tizzano EF. Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases. *Hum Genet.* 2001;108(3):222-229.
108. Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coovert DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E. Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Human Molecular Genetics.* 2001;10(24):2841-2849.
109. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet.* 2008;82(4):834-848.
110. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, Krainer AR. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010;24(15):1634-1644.
111. Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR, Klinger KW, Shihabuddin LS, Cheng SH. CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1253-1264.
112. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research.* 2002;30(12):e57-e57.
113. Holland M. Mlpa® General Protocol. 2020.
114. HOLLAND M. Product Description SALSA® MLPA® Probemix P060-B2 SMA Carrier 2020.
115. Park JE, Yun SA, Roh EY, Yoon JH, Shin S, Ki CS. Carrier Frequency of Spinal Muscular Atrophy in a Large-scale Korean Population. *Ann Lab Med.* 2020;40(4):326-330.
116. Li C, Geng Y, Zhu X, Zhang L, Hong Z, Guo X, Xia C. The prevalence of spinal muscular atrophy carrier in China: Evidences from epidemiological surveys. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(5):e18975.
117. Dejsuphong D, Taweewongsounton A, Khemthong P, Chitphuk S, Stitchantrakul W, Sritara P, Tunteeratum A, Sura T. Carrier frequency of spinal muscular atrophy in Thailand. *Neurol Sci.* 2019;40(8):1729-1732.

118. Hendrickson BC, Donohoe C, Akmaev VR, Sugarman EA, Labrousse P, Boguslavskiy L, Flynn K, Rohlf s EM, Walker A, Allitto B, Sears C, Scholl T. Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J Med Genet.* 2009;46(9):641-644.
119. Tan J, Zhang X, Wang Y, Luo S, Yang F, Liu B, Cai R. Screening for spinal muscular atrophy mutation carriers among 4931 pregnant women from Liuzhou region of Guangxi. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese journal of medical genetics.* 2018;35(4):467-470.
120. Fang P, Li L, Zeng J, Zhou WJ, Wu WQ, Zhong ZY, Yan TZ, Xie JS, Huang J, Lin L, Zhao Y, Xu XM. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:11.



8.EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 18920478-050.01.04-E.1900075322 24/05/2019
Konu : Başvuru İncelemesi(Prof. Dr.
Fatma SILAN)

Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğumuz "ÇOMÜ Tıbbi Genetik Tam Merkezi'nde Spinal Musküler Atrofi Ön Tanısı veya Taşıyıcılığı Açısından Genotiplendirilen Olguların SMN1/SMN2 Genlerinin Kopya Sayılarının Retrospektif Analizi" başlıklı 2011-KAEK-27/2019-E.1900064841 nolu projemiz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulumun almış olduğu 22.05.2019 tarih ve 11-04 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi: 22.05.2019
Karar No :2019-11

Karar04:2011-KAEK-27/2019-E.1900064841 no'lu araştırma Etik Kurul üyeleri tarafından değerlendirilmiştir. Proje araştırmacılarından Arş. Gör. Dr. Menekşe ÖZTÜRK'ün sunumunun dinlenmesinin ve raporünün hazırladığı değerlendirmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR." Kararı verilmiştir. Doç. Dr. Coşkun SILAN projede yer alan Prof. Dr. Fatma SILAN'ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamıştır.

e-İmzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

[Belge Doğrulamak İçin: https://abya.comu.edu.tr/ERMS/Recon/Confirmation/Page/Index](https://abya.comu.edu.tr/ERMS/Recon/Confirmation/Page/Index) adresinden THMF/ET kodu girerek belgeyi doğrulayabilirsiniz.

Adres : Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesi Çanakkale
Bilgi İçin İletişim : Fatma Otuzan - Sekreter
e-posta : bilizotuzan@comu.edu.tr

Telefon :
Belge Geçer No :
İnternet Adresi :



1900075322 numaralı belge, 8070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince Öztürk Öztürk tarafından 24/05/2019 tarihinde güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

9.ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. Dr. Menekşe ÖZTÜRK	
mbaglar@hotmail.com menekse.ozturk@comu.edu.tr	
0 (286) 218 00 18/2412	
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 17100- Çanakkale	
Website: http://aves.comu.edu.tr	

DİPLOMALAR

LİSANS	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi/SİVAS
---------------	---

ÖĞRENİM

	Doktora Öncesi	Tezler
LİSANS (2004-2010)	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi/SİVAS	-
Tıpta Uzmanlık Eğitimi (2015-2018)	Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı DENİZLİ	-
Tıpta Uzmanlık Eğitimi (2018-2020)	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ÇANAKKALE	ÇOMÜ Tıbbi Genetik Tanı Merkezi'nde Spinal Musküler Atrofi Ön Tanısı Veya Taşıyıcılığı Açısından Genotiplendirilen Olguların Smn1/Smn2 Genlerinin Kopya Sayılarının Retrospektif Analizi Danışman Öğretim Üyesi: Prof Dr. Fatma SILAN

GÖREVLER

Hekim (Pratisyen) 2010	İskenderun Ana Çocuk Sağlığı Merkezi
Hekim (Pratisyen) 2010	İskenderun Devlet Hastanesi Acil Servis
Araştırma Görevlisi Doktor 2013-2014	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Kardiyoloji Anabilim Dalı / ÇANAKKALE
Araştırma Görevlisi Doktor 2015-2018	Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı / DENİZLİ
Araştırma Görevlisi Doktor 2018-2020	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ÇANAKKALE

RUTİN HİZMETLER		2016-2020 Yılları Arasında Tanı Laboratuvarı Olarak (Sitogenetik ve Moleküler) Verdiği Hizmetler ve Tanı Raporları
A- Sitogenetik	Adet	
Lenfosit Hücre Kültürü	1000	Karyotip – karyogram analiz
FISH	340	Metafaz-interfaz analiz
Prenatal Tanı	40	Prenatal Karyotip – karyogram analiz
B- Moleküler Genetik	Adet	
FMF	3000	Moleküler tanı
CVD	1000	Habituel Abortus, PTE, SVH, Behçet Sendromu, DVT, MI, Atherosklerozis
Farmakogenetik	30	Warfarin, Klopidoğrel, Mikofenolat Mofetil vb. ve kompleks ilaç detoksifikasyon profil analizleri
Prenatal Tanı (QF-PCR)	200	Kromozom 13,18,21,X ve Y STR fragment analizi
MLPA	850	Mikrodelesyon sendromları, Subtelomerik, CFTR, BRCA1/2, DMD,SMA vb.
Array-CGH (60K ve 180K)	200	Delesyon/duplikasyon analizi
Yeni Nesil Dizileme (NGS)	350	CFTR, Otoinflamatuvar hastalıklar, Male/Female İnfertilite, BRCA1/2, Ailevi Kanser paneli, SMA, DMD, NF1/2 Osteogenezis İmperfekta, Marfan Sendromu, vb.
Diğer	1750	Talasemi, TRAPS, CAPS, MVK, Frajil X, Çölyak, JAK2,HLAB27
Poliklinik hasta sayısı	3000	

İLGİ ALANLARI

A-Sitogenetik

- A1- Periferik kandan lenfosit hücre kültürü ve kromozom analizi
- A2- Seks kromatin analizi
- A3- Manuel ve otomatik karyotip, karyogram ve ideogram analizler
- A4- GTG, C, NOR, HRB bantlama teknikleri
- A5- Prenatal kültür ve karyotip analizi
- A6-FISH analizi

B- Moleküler Sitogenetik

- B1- Direkt, indirekt hibridizasyon teknikleri
- B2- Kromozomal mikrodiseksiyon
- B3- Preimplantasyon Genetik Teşhis (PGT) ve IVF
- B4- In situ hibridizasyon, strip, line-assay hibridizasyon ve genetik hastalıklarda tarama

C- Moleküler Genetik

- C1- Elektroforetik teknikler (agaroz, acrilamide)
- C2- Western blot analiz
- C3- PCR, Multiplex PCR, RT-PCR, Real-Time PCR teknikleri
- C4- RFLP mutasyon ve polimorfizm taramaları
- C5- Genomik DNA izolasyonu (solid, kan ve diğer dokular) ve DNA dizi analizi
- C6- Epigenetik, DNA metilasyon analizi, gen ekspresyonu ve modifikasyon analizi
- C7- MLPA, Strip-Assay
- C8- QF PCR, Direkt sekanslama
- C9- MikroArray-CGH
- C10- Yeni nesil dizileme analizi (NGS)

MERKEZİ KURULUŞ ÜYELİKLERİ

Tıbbi Genetik Derneği/ANKARA

BİLİMSEL ÇALIŞMALARI

A-Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

A1. ALBUZ BURCU, ÇETİN GÖKHAN OZAN,ÖZHAN BAYRAM,SARIKEPE BİLGE,ANLAŞ ÖZLEM,ÖZTÜRK MENEKŞE,ZEYBEK SELCAN,A. SABİR AKKOYUNLU NURAN,BAĞCI GÜLSEREN,SEMERCİ GÜNDÜZ CAVIDAN NUR (2019). A novel nonsense mutation in CHST3 in a Turkish patient with spondyloepiphyseal dysplasia, Omani type. Clinical Dysmorphology, 1, Doi: 10.1097/MCD.0000000000000295 (Yayın No: 5498419)

B. Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler

B1.Türkiye Klinikleri Tıbbi Genetik- Özel Konular Genetik ve Multidisipliner Yaklaşımlar, Bölüm adı:(OTOİNFLAMATUAR HASTALIKLAR VE GENETİK) (2019). ÖZTÜRK MENEKŞE, ALBUZ BURCU,SILAN FATMA, <http://www.turkiyeklinikleri.com>, Editör:Prof Dr C. Nur SEMERCİ GÜNDÜZ, Basım sayısı:1, ISBN:978-605-7650-05-4, Türkçe(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 5183283)

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

BİLDİRİLER

A-Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

A1. ALBUZ BURCU, SILAN FATMA, ÖZTÜRK MENEKŞE, YILDIZ ONUR,ÖZDEMİR ÖZTÜRK (2019). BCL11B gene may be a candidate gene for mastocytosis in a patient with partial trisomy of distal 14q. 13th Balkan Congress of Human Genetics, 22(Supplement 1), 156-1156. (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:5183256)

A2. ÖZTÜRK MENEKŞE, ALBUZ BURCU, ÖZDEMİR ÖZTÜRK, SILAN FATMA (2019). Transitional p. Arg802His point mutation in A2ML1 gene in two sisters of Noonan-like syndrome with various clinical findings. Balkan Journal of Medical Genetics, 22(Supplement 1), 149-149. (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Vaka Takdimi) (Yayın No: 5183240)

A3. ALBUZ BURCU, SILAN FATMA,ÖZTÜRK MENEKŞE,KARAKAYA TANER,ÖZDEMİR ÖZTÜRK (2019). A rare heterochromatin polymorphism of chromosome 6 associated with recurrent miscarriage: a case report. Balkan Journal of Medical Genetics, 22(Supplement 1), 187-187. (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Vaka Takdimi) (Yayın No: 5183235)

A5. ALBUZ BURCU,ÇETİN GÖKHAN OZAN,ÖZTÜRK MENEKŞE,CANER VİLDAN,SEMERCİ GÜNDÜZ CAVIDAN NUR,BAĞCI GÜLSEREN (2018). Fetus with partial trisomy 4 and t(2;16) due to maternal complex rearrangement involving three chromosomes: a case report. European Human Genetics Conference 2018 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4310544)

A6. ÖZLEM ANLAŞ, BİLGE SARIKEPE, SELCAN ZEYBEK, MENEKŞE ÖZTÜRK, GÜLSEREN BAĞCI, GÖKHAN OZAN ÇETİN (2018). The Co-Existence Of Nablus Mask-Like Facial Syndrome And Klinefelter Syndrome. European Human Genetics Conference 2018 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4310545)

<p>A8. ÖZTÜRK MENEKŞE, ZEYBEK SELCAN, DURSUN BELDA, ALBUZ BURCU, BOZ ÖZLEM, GÜRKAN HAKAN, ÇETİN GÖKHAN OZAN (2018). A novel nonsense mutation in the EYA1 gene found in a patient with BOR syndrome. European Human Genetics Conference 2018 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4310524)</p>
<p>A9. ZEYBEK SELCAN, FARRE GENİS, ÖZTÜRK MENEKŞE, ALBUZ BURCU, BELTRAN SERGİ, BOWCOCK ANNE, ÇETİN GÖKHAN OZAN (2018). Further delineation of ACPHD syndrome and a novel mutation in DNAJC3. European Human Genetics Conference 2018 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4310528)</p>
<p>A10. CANER VİLDAN, ÇETİN GÖKHAN OZAN, TEPELİ EMRE, SARIKEPE BİLGE, ANLAS ÖZLEM, BAĞLAR MENEKŞE, ALBUZ BURCU, ATMACA MÜNEVVER, HACIOĞLU SİBEL (2017). Molecular cytogenetic profile of complex/variant translocations in chronic myeloid leukemia. 6th International Congress on Leukemia – Lymphoma – Myeloma (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3814122)</p>
<p>A11. ALBUZ BURCU, ALAY MUSTAFA TARIK, ÖZTÜRK MENEKŞE, ÇETİN GÖKHAN OZAN, BAĞCI GÜLSEREN, AKÇA HAKAN, KARAGENÇ NEDİM A Novel Splice Site Mutation in TRAPPC2 Gene Caused X-Linked Spondyloepiphyseal Dysplasia Tarda in Two Males from a Turkish Family. Gazi Medical Journal, 30(1) (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4706341)</p>
<p>A12. MENEKŞE ÖZTÜRK , GİZEM OLGU KORKMAZ , SELCAN ZEYBEK , CAVİDAN NUR SEMERCİ , MARCELLA ZOLLİNO , GÜLSEREN BAĞCI Pitt Hopkins sendromlu bir olgu Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi</p>
<p>A13. SELCAN ZEYBEK , MENEKŞE ÖZTÜRK , GÖKHAN OZAN ÇETİN , TAE JOON CHO Maroteaux Tipi Akromezomelik Displazi Olgusu ve Yeni Mutasyon Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi</p>

<p>B. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:</p>
<p>B1. ALBUZ BURCU, KOCAMAZ HALİL, ÖZTÜRK MENEKŞE, SARIKEPE BİLGE, TEPELİ EMRE, BAĞCI GÜLSEREN, SEMERCİ GÜNDÜZ CAVİDAN NUR (2017). A case with vascular anomalies: Differential diagnosis and management. ERCİYES MEDICAL GENETICS DAYS 2017 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3950953)</p>
<p>B2. ÖZTÜRK MENEKŞE, ÇETİN GÖKHAN OZAN, ALBUZ BURCU, CANER VİLDAN, SEMERCİ GÜNDÜZ CAVİDAN NUR, BAĞCI GÜLSEREN (2017).</p>

Unbalanced chromosomal rearrangement in fetus with congenital anomaly:a case report. ERCİYES MEDİCAL GENETİCS DAYS 2017 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3981659)

B3. ALBUZ BURCU, ÇETİN GÖKHAN OZAN,ÖZTÜRK MENEKŞE,CANER VİLDAN,SEMERCİ GÜNDÜZ CAVİDAN NUR,BAĞCI GÜLSEREN (2017). fetus with partial trisomy 4 and t (2;16) due to maternal complex rearrangement involving three chromosome: a case report. ERCİYES MEDİCAL GENETİCS DAYS 1017 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3981929)

