

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PSÖDOGENİ OLAN GENLERİN UZUN OKUMALARLA
DEĞERLENDİRİLMESİ: *GBA1* GENİ VARYANTLARININ
NANOPOR İLE DİZİLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yağmur KÜÇÜMEN KILCI

İZMİR-2024

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

PSÖDOGENİ OLAN GENLERİN UZUN OKUMALARLA
DEĞERLENDİRİLMESİ: *GBA1* GENİ VARYANTLARININ
NANOPOR İLE DİZİLENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yağmur KÜÇÜMEN KILCI

0000-0002-9644-2844

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:

Prof. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN

İZMİR-2024

Bu çalışma 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı
tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 223S702

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	III
TEŞEKKÜR.....	İ
TABLolar DİZİNİ	İİ
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	İV
KISALTMALAR	Vİİ
ÖZET	Vİİİ
ABSTRACT.....	X
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.PSÖDOGEN NEDİR?	4
2.1.1.PSÖDOGEN SINIFLANDIRMASI	4
2.1.2.PSÖDOGEN İFADESİ	7
2.2.GBA1 GENİNİ TANIMAK.....	9
2.2.1.GLUKOZİL SERAMİD METABOLİZMASI.....	9
2.2.2.GBA1 GENİ YAPISI VE İŞLEVİ.....	11
2.2.3.GBA1 GENİ MUTASYONLARI.....	14
2.2.4.GBA1 DİZİLEMESİ İÇİN KULLANILAN TEKNİKLER.....	16
2.3.GBA1 GENİ MUTASYONLARIYLA İLİŞKİLİ FENOTİPLER	19
2.3.1.GAUCHER HASTALIĞI	19
2.3.2.PARKİNSON HASTALIĞI	21
2.3.3.LEWY CİSİMCİKLİ DEMANS.....	25
2.4.NANOPOR DİZİLEME.....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1.HASTA SEÇİMİ	30

3.2.OLGULARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE VERİLERİN TOPLANMASI	31
3.3.PERİFERİK KANDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU	31
3.4.DNA MİKTARLARININ FLOROMETRE İLE ÖLÇÜLMESİ.....	32
3.5.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	33
3.6.KÜTÜPHANE HAZIRLAMA VE OXFORD NANOPOR MINION™ DİZİLENMESİ	35
3.6.1.DNA UÇLARININ HAZIRLANMASI.....	35
3.6.2.BARKODLARIN DNA UÇLARINA BAĞLANMASI	36
3.6.3.DİZİLEME ADAPTÖRLERİNİN DNA UÇLARINA BAĞLANMASI	37
3.6.4.FLOW CELL'İN HAZIRLANMASI VE DNA KİTAPLIĞININ FLOW CELL'E YÜKLENMESİ	38
3.7.BİYOİNFORMATİK	40
3.7.1.HARİTALAMA VE HİZALAMA.....	40
3.7.2.VARYANT ÇAĞIRMA.....	40
4.BULGULAR.....	42
4.1.OLGULARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	46
4.2.NANOPOR KALİTE PARAMETRELERİ	49
4.3.YND İLE SAPTANAN VARYANTLARIN NANOPOR VARYANTLARI İLE KARŞILAŞTIRILMASI.....	52
4.4.NANOPOR İLE SAPTANAN TÜM EKZONİK VARYANTLAR	59
4.5.11 OLGUYA AİT ANAMNEZ, SOYAĞACI, YND VE NANOPOR IGV GÖRÜNTÜLERİ	62
4.5.1.OLGU 2.....	62
4.5.2.OLGU 4.....	65

4.5.3.OLGU 5.....	67
4.5.4.OLGU 6.....	71
4.5.5.OLGU 7.....	73
4.5.6.OLGU 12.....	77
4.5.7.OLGU 13.....	79
4.5.8.OLGU 14.....	82
4.5.9.OLGU 16.....	84
4.5.10.OLGU 17.....	86
4.5.11.OLGU 18.....	88
5.TARTIşMA.....	90
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	103
7.KAYNAKLAR.....	105
8.EKLER.....	130
EK-1. ETİK KURUL ONAYI.....	130
EK-2- AYDINLATILMIş ONAM FORMU	132
EK-3 VERİ KAYIT FORMU.....	135

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamlanmasında emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

Öncelikle, bu çalışma ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve önerileri ile her zaman bana ilham kaynağı olan tez danışmanım kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet Okay Çağlayan'a, bana sunduğu değerli rehberlik ve bana olan güveni için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman bana destek olan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp'e ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, derslerimdeki katkıları ve akademik gelişimimdeki yönlendirmeleri için minnettarım.

2020 yılından beri üyesi olduğum Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik ve Çocuk Genetik ailesine, laboratuvar ekibimize, karşıma çıkan her engelde beni sabırla dinleyen ve bana destek olan asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her daim yanımda durarak, bugün olduğum kişi olmamı sağlayan Uzm. Dr. Serdar Şen'e, Arş. Gör. Dr. Dilde Hayriye Şerbetçi'ye, Arş. Gör. Dr. İzal Deniz Pehlivan Çakıcı'ya, Arş. Gör. Dr. Merve Berfin Aktan Karaca'ya hayatı daha anlamlı kıldıkları için sonsuz teşekkürler.

Hayatta her koşulda beni destekleyen ve sevgilerini esirgemeyen canım aileme özellikle Elif Küçümen, Şükrü Küçümen ve Çınla Küçümen'e en büyük teşekkürü borçluyum. Hayatımın anlamı, iyi günde ve kötü günde hep yanımda olan en büyük dayanağım, biricik eşim Burak Kılıcı'ya teşekkür ederim.

Son olarak, bu tezin ortaya çıkmasında emeği geçen tüm katılımcılara ve kaynaklara teşekkür ederim. Onların katkıları bu çalışmayı benzersiz kıldı.

Dr. Yağmur KÜÇÜMEN KILCI

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: İşlenmiş ve işlenmemiş psödogenlerin özellikleri (Xiao ve ark)	6
Tablo 2: Ciddiyetine göre <i>GBAI</i> Varyantları	15
Tablo 3: Demans YND paneli gen içeriği ve transkriptleri	30
Tablo 4: Çalışmaya dahil edilme ve dışlama kriterleri	31
Tablo 5: Periferik kandan genomik DNA izolasyonu	32
Tablo 6: DNA İzolatları Miktarlarının Florometre ile Ölçülmesi	33
Tablo 7: PZR için kullanılan primer çiftleri, ampikon uzunlukları ve Tm değerleri	34
Tablo 8: PZR karışımı içeriği	34
Tablo 9: PZR koşulları	34
Tablo 10: Her bir örnek için hazırlanacak karışımın bileşenleri	35
Tablo 11: Barkod ligasyonu için gerekli bileşenler	36
Tablo 12: AMPure XP ile saflaştırma basamakları	37
Tablo 13: Adaptör ligasyonu için gerekli bileşenler	37
Tablo 14: Olgulardaki <i>GBAI</i> geni varyantlarının transkriptleri	42
Tablo 15: <i>GBAI</i> varyantı taşıdığı saptanan olgular ve özellikleri	43
Tablo 16: Saptanan <i>GBAI</i> geni varyantlarının GH ciddiyetine göre sınıflaması	44
Tablo 17: Nanodrop ve Qubit Florometre ile yapılan konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları	45
Tablo 18: Çalışmaya dahil edilen PH tanılı olguların klinik özellikleri	48
Tablo 19: Her bir olguya atanan barkodlara göre baz çağırma ve okuma sayıları	51

Tablo 20: Barkodlara göre hizalama oranları	51
Tablo 21: Olgularda YND ve Sanger dizileme sonucu saptanan varyantlar ve Nanopor dizileme ile varyant çağırma algoritmaları sonucunu saptanan varyantlar	54
Tablo 22: 11 hastaya ait 12 varyantın nanopor dizilemede saptanan okuma sayıları ve oranları	55
Tablo 23: Varyantlara ait değişimlerin tipleri ve alel fraksiyonları.....	56
Tablo 24: Nanopor dizilemede IGV’de saptanan tüm varyantlar.....	57
Tablo 25: Olgu 6 dışındaki olgularda saptanan bu 65 varyant.....	59
Tablo 26: <i>GBA1</i> genine hizalanan okumaların GBAP1 üzerinde homoloji gösterdiği bölgeler.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Önemli psödogen sınıfları (Cheetam ve ark. 2020)	7
Şekil 2: Psödogenlerin ifade edilme mekanizmaları (Troskie ve ark.).....	8
Şekil 3: GlcCer'i oluşturan yapılar (Gan ve ark.2021).....	10
Şekil 4: <i>GBAI</i> , <i>MTXI</i> ve bunların psödogenlerinin ölçekli gösterimi. (Woo ve ark. 2021)	11
Şekil 5: pH 5,5'ta Glukoserebrosidazın Yapısı ve Sık Rastlanan Mutasyonlar (Smith ve ark.)	13
Şekil 6: PH motor ve motor dışı semptomlar (De Rui ve ark. 2020)	23
Şekil 7: Nanopore teknolojisi özeti (Chen ve ark.).....	27
Şekil 8: Çeşitli nanogözenek türleri (van Dijk ve ark.)	28
Şekil 9: Kütüphane hazırlanma aşamasının ana basamakları	35
Şekil 10: Hazırlama portu açılımı(üst) ve hazırlama karışımı yükleme işlemi(alt)...	39
Şekil 11: SpotON numune bağlantı noktasının kapağının açılması(üst) ve örnek kütüphanesinin yüklenmesi(alt)	40
Şekil 12: PZR sonrası yapılan agaroz jel kontrolü	46
Şekil 13: Total baz çıktısı (Mavi: Tahmin edilen baz sayısı, Yeşil: Kalite skorlarını geçen bazlar, Kırmızı: Kalite skorlarını geçemeyen bazlar)	49
Şekil 14: Total okuma çıktısı (Mavi: total okuma sayısı, Yeşil: Kalite skorlarını geçen okumalar, Kırmızı: Kalite skorlarını geçemeyen okumalar).....	49
Şekil 15: Okuma uzunluğu grafiği.....	50
Şekil 16: Okumalara ait Q skoru değerleri	51

Şekil 17: GBA1 ve GBAP1 dizisi arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanan varyantlar (Zampieri ve ark.).....	61
Şekil 18: Olgu 2'e ait soyağacı	63
Şekil 19: Olgu 2'ye ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	64
Şekil 20: <i>GBA1</i> : c.708C>G varyantının bölgesi ve homoloji gösterdiği GBAP1 bölgesi	65
Şekil 21: Olgu 4'e ait soyağacı.....	66
Şekil 22: Olgu 4'e ait muhtemel patojenik varyantın Sanger görüntüsü	66
Şekil 23: Olgu 4'e ait muhtemel patojenik varyantın nanopor IGV görüntüsü	67
Şekil 24: Olgu 5'e ait soyağacı	68
Şekil 25: Olgu 5'e ait varyantların YND IGV görüntüsü.....	69
Şekil 26: Olgu 5'e ait varyantların nanopor IGV görüntüsü	70
Şekil 27: Olgu 5'ye ait <i>GBA1</i> : c.1342G>C varyantı ve GBAP1 üzerinde homoloji gösterdiği bölge üzerindeki görüntüsü	71
Şekil 28: Olgu 6'e ait soyağacı	72
Şekil 29: Olgu 6'ya ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	73
Şekil 30: Olgu 7 'e ait soyağacı	74
Şekil 31: Olgu 7'ye ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	75
Şekil 32: Olgu 7'ye ait <i>GBA1</i> :c.928A>G ve <i>GBA1</i> :c.921G>A varyantı ve GBAP1 üzerinde homoloji gösterdiği bölge üzerindeki görüntüsü.....	76

Şekil 33: Olgu 12'a ait soyağacı	77
Şekil 34: Olgu 12'ye ait patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	78
Şekil 35: Olgu 13'a ait soyağacı	80
Şekil 36: Olgu 13'e ait patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	81
Şekil 37: Olgu 14'e ait soyağacı	82
Şekil 38: Olgu 14'e ait klinik önemi bilinmeyen varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü.....	83
Şekil 39: Olgu 16,17 ve 18'e ait soyağacı	84
Şekil 40: Olgu 16'ya ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	85
Şekil 41: Olgu 17'ye ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	87
Şekil 42: Olgu 18'e ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü	89

KISALTMALAR

ACMG	Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji
AH	Alzheimer hastalığı
BAM	Binary Alignment Map (İkili Hizalama Haritası)
bç	Baz Çift
ceRNA	Rekabetçi endojen RNA
CLEAR	Koordineli Lizozomal İfade ve Düzenleme
ER	Endoplazmik Retikulum
FAPP2	Dört Fosfat Adaptörlü Protein-2
FTD	Frontotemporal Demans
GBA-PH	<i>GBA1</i> Geni Taşıyıcısı Parkinson Hastaları
GENCODE	Genler ve Gen Varyantları Ansiklopedisi
GCase	Glukoserebrosidaz
GH	Gaucher Hastalığı
GSL	Glikosfingolipid
GlcCer	Glukozilseramidin
IGV	Integrative Genomics Viewer (Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici)
Kb	Kilobaz
LC	Lewy Cisimcikleri
LCD	Lewy Cisimcikli Demans
LIMP-2	Lizozomal İntegral Membran Proteini Tip-2
M6P	Mannoz-6-fosfat
MRG	Manyetik Rezonans Görüntülemesi
MSA	Multisistem atrofi
OH	Ortostatik Hipotansiyon
PH	Parkinson Hastalığı
PHD	Parkinson Hastalığı Demansı
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RDB	Hızlı Göz Hareketi Uykusu Davranış Bozukluğu
REM	Rapid Eye Movement (Hızlı Göz Hareketi)
SMRT	Single-molecule real-time(Tek molekülü gerçek zamanlı dizileme)
SN	Substantia nigra
TFEB	Transkripsiyon Faktörü EB
VCF	Variant Call Format (Varyant Çağrı Formatı)
YND	Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

GBAI geni, lizozomal enzim olan glukoserebrosidazı kodlar ve biallelik *GBAI* mutasyonları, Gaucher hastalığına (GH) neden olurken, heterozigot taşıyıcılık Parkinson hastalığı (PH) ve Lewy cisimcikli demans (LCD) gibi nörodejeneratif hastalıklar için risk faktörüdür. GH'lı ailelerde yapılan çalışmalar, *GBAI* varyantlarının PH ve LCD ile ilişkilendirilebileceğini göstermiştir.

Psödogenler, aktif genlerden evrimleşmiş ve mutasyonlar sonucu işlevini yitirmiş DNA dizileridir. *GBAI* geninin işlevsiz psödogeni olan *GBAPI* ile %96 homolojisi bulunur. Yeni nesil dizileme (YND) teknolojisi, genetik hastalıkların araştırılmasında önemli bir araç olsa da *GBAI* gibi psödogeni olan genlerde doğrulama gerektirir. *GBAI* varyantlarının doğrulanması için Sanger dizileme, uzun menzilli PCR ve yeni nesil nanopore teknolojisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Nanopor, YND'nin eksik kaldığı tekrar bölgeleri ve uzun okuma gerektiren yerlerde daha başarılıdır ve *GBAI-GBAPI* ayrımını yapmada etkili bir çözüm sunar.

Bu çalışma, Türkiye'de nanopore teknolojisi ile *GBAI* geninin dizilenmesini hedefleyen ilk araştırma olup, PH ve demans hastalarında *GBAI* varyantlarının doğrulanmasına odaklanmaktadır. Bu yeni teknoloji, *GBAI-GBAPI* ilişkisinin daha iyi anlaşılmasına ve genetik hastalıkların tanısında önemli bir adım olmayı amaçlamaktadır.

Bu amaçla Haziran 2019 ile Temmuz 2024 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniklerine PH ve Demans ön tanısı ve ya aile taraması amacıyla ile başvuran danışanların Tıbbi Genetik hasta dosyaları ve Probel HBYS sistemi kayıtları geriye dönük olarak incelendi. Bu hastalar içerisinde *GBAI* geni varyantı taşıyan hastalar ile iletişime geçilerek nanopor dizileme çalışmasına katılmak isteyen on bir hasta tespit edildi. On bir hastada yeni nesil dizileme paneli ve Sanger ile saptanan on iki varyant için nanopor dizileme aşamasına geçildi. *GBAI* geni ve *GBAPI* psödogeni polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak, kütüphane hazırlığı, nanopor dizileme ve biyoinformatik analizler yapıldı.

On iki varyantın sadece 2 tanesi varyant çağırma basamaklarını geçti ve 16,67%'lik varyant saptama oranına ulaşıldı. Varyant çağırma basamağını geçemeyen ancak IGV'de görülebilen varyantlar da bu orana dahil edilirse tespit edilen varyant sayısı on bire ulaşmakta ve 91.67%'lük bir saptama oranı elde edilmektedir.

Sonuçlarımız, düşük tespit oranına rağmen, nanopore teknolojisinin uzun dizileri başarıyla dizileyebildiğini göstermektedir. Ancak, cihazın yaygın kullanıma sunulmadan önce biyoinformatik adımlarının ele alınarak geliştirilmesi gerekmektedir. Ülkemizde *GBAI* geni ve *GBAPI* psödogeni uzun okumalar ile ilk defa bizim çalışmamızda nanopor ile dizilenmiştir ve bu çalışma sonraki çalışmalara öncü olacak niteliktedir

Anahtar Kelimeler: *GBAI*, *GBAPI*, Nanopor, Uzun okuma, , Parkinson Hastalığı, Psödogen

ABSTRACT

The *GBA1* gene encodes the lysosomal enzyme glucocerebrosidase, and biallelic mutations in *GBA1* cause Gaucher disease (GD), while heterozygous carriers are at increased risk for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) and Lewy body dementia (LBD). Studies on families with GD have shown that *GBA1* variants can be associated with PD and LBD.

Pseudogenes are DNA sequences that have evolved from active genes and lost their function due to mutations. The *GBA1* gene has a non-functional pseudogene, *GBAP1*, with 96% homology. Although next-generation sequencing (NGS) technology is a significant tool for investigating genetic disorders, genes like *GBA1*, which have pseudogenes, require additional validation. Methods such as Sanger sequencing, long-range PCR, and nanopore sequencing technology are used to confirm *GBA1* variants. Nanopore sequencing is particularly successful in regions requiring long reads and in distinguishing between *GBA1* and *GBAP1* where NGS falls short.

This study is the first in Turkey to target *GBA1* gene sequencing using nanopore technology, focusing on validating *GBA1* variants in patients with PD and dementia. This new technology aims to enhance understanding of the *GBA1*-*GBAP1* relationship and represents an important step in the diagnosis of genetic disorders.

For this purpose, between June 2019 and July 2024, patient files from the Medical Genetics outpatient clinics of Dokuz Eylül University Faculty of Medicine and records from the Probel HBYS system were retrospectively reviewed for individuals referred for PD and dementia pre-diagnosis or family screening. Eleven patients carrying *GBA1* variants were identified and invited to participate in the nanopore sequencing study. The next-generation sequencing panel and Sanger identified twelve variants in these eleven patients, and nanopore sequencing was performed. *GBA1* gene and *GBAP1* pseudogene were amplified via polymerase chain reaction (PCR), followed by library preparation, nanopore sequencing, and bioinformatic analyses.

Only two out of twelve variants passed the variant calling steps, resulting in a 16.67% detection rate. When including variants visible in IGV but not passing the variant calling step, the number of detected variants increased to eleven, achieving an 91.67% detection rate.

Our results demonstrate that despite the low detection rate, nanopore technology successfully sequences long reads. However, bioinformatics steps must be improved and refined before the device is widely adopted. In our country, *GBAI* and its pseudogene *GBAPI* were sequenced using long reads for the first time in our study, which serves as a pioneering effort for future research.

Keywords: *GBAI*, *GBAPI*, Long Read, Nanopore, Parkinson's Disease, Pseudogene

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psödogenler, evrimsel süreçte aktif genlerden türemiş olan ancak çeşitli mutasyonların birikmesi sonucu fonksiyonel protein ürünü oluşturmayan DNA dizileridir(1). İnsan genomunda yaklaşık 15.000 psödogen vardır(2). Psödogen tanım olarak çeşitli mutasyonlar sonucu işlevselliğini yitirmiş ve artık protein kodlamayan “genomik fosiller”dir. Ancak psödogenlerin transkripsiyonel aktivitesi olduğunu hatta protein kodlama kapasitesini yeniden kazanan psödogenlerin varlığını gösteren çalışmalar mevcuttur(2–4).

Psödogenler işlenmiş ve işlenmemiş ya da diğer adıyla duplike psödogenler olarak ikiye ayrılır. İşlenmiş psödogenler genellikle intron yapısını içermezler ve çoğunluğu mRNA’ların retrotranspozisyon yoluyla genoma tekrar entegre olması sebebiyle oluştuğu için tıpkı mRNA’lardaki gibi 3' ucunda poliadenin dizisi içerir(5). İşlenmemiş ya da duplike psödogenler bir genin tam veya bir kısmının duplikasyonu ile oluşan psödogenlerdir. Bu psödogenlerin iki homolog kromozom arasındaki eşit olmayan çaprazlanması ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan psödogenler işlevini yitirmesine neden olan bir mutasyon içerir.

GBAI (“glukozilseramidaz beta 1”) geni 1q21 bölgesinde yer alır ve kodlayan bölgelerde 96% homoloji gösteren *GBAP1* isimli psödogeni vardır. *GBAI* geninin 16 kb aşağı (downstream) bölgesinde yer almaktadır. *GBAI* ve *GBAP1* dizilerindeki en büyük farklılık *GBAP1*’in ekzon 9’unda yer alan 55 baz çiftlik bir delesyondur(6,7). *GBAI* glukoserebrosidaz (GCase) enzimini kodlar ve bu enzim glukozilseramid (GlcCer) ve glukozilsfingosinin (GlcSph) yıkımından sorumludur(8). *GBAI* genindeki bialelik mutasyonlar Gaucher hastalığına (GH) neden olur. GH, karaciğer ve dalak büyümesi, kemik ağrıları ve deformiteleri, anemi, trombositopeni ve nörolojik belirtiler ile giden bir lizozomal depo hastalığıdır(9). *GBAI*’deki heterozigot mutasyonlar ise Parkinson hastalığı (PH) ve Lewy cisimcikli demans (LCD) için risk oluşturmaktadır(10). Bu çalışma özellikle PH ve LCD hastalarında bulunan *GBAI* varyantlarının değerlendirilmek için planlanmıştır.

PH, Alzheimer hastalığından sonra ikinci sıklıkta görülen ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalıktır ve istirahat tremoru, bradikinezi, postüral instabilite ve

rijidite ile karakterize parkinsonizmin en sık sebebidir(11). PH prevelansı genel popülasyonda 3:1000 iken 60 yaş üstü hasta grubuna bakıldığında prevelans %1, 80 yaş üstü hasta grubunda %3 olarak karşımıza çıkar(12). 1996 yılında Neudorfer ve ark. Tip I GH tanılı hastada görülen parkinsonizm bulgularını saptamışlar ve *GBA1* varyantları ile PH arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır(13). GH tanılı hastaların ailelerinde yapılan çalışmalarda heterozigot *GBA1* taşıyıcılığının PH için risk faktörü olabileceği belirtilmiştir(14,15). Erken PH başlangıç yaşı hem homozigot *GBA1* hem heterozigot *GBA1* hastalarında görülen diğer bir özelliktir.(16)

Frederick Lewy, Lewy cisimciklerini (LC) 1912'de tarafından ilk defa PH tanılı hastalarda saptamıştır. Bu intrasitoplazmik inklüzyonların majör komponenti α -synucleindir. Lewy cisimcikli demans(LCD), Parkinson hastalığı demansı(PHD), multiple sistem atrofi ve PH'nın histopatolojik özellikleri arasında LC vardır(17–19). LCD toplumda sık görülen nörodejeneratif demanslardan biridir ve bilişsel semptomlar tanı için ana kriterdir. Görsel halüsinasyonlar, dikkat ve uyanıklıkta bozulma ve parkinsonizm diğer klinik bulgulardır(17). PHD parkinson tanısı olan hastalarda bir yıl veya daha sonra gelişen demans tablosunu tanımlar ve bir meta-analizde parkinson tanısına sahip hastalarda PHD tanısı oranı %26,3 olarak saptanmıştır(20). LCD ve PHD, lewy demansları (LD) spektrumu altında incelenebilir ve ikisi birlikte tüm demansların %4,6'sını oluşturur(21). *GBA1* varyantları yapılan çalışmalarda LCD için risk faktörü olarak saptanmıştır(22).

LCD ve PH için önemli bir risk faktörü olan *GBA1* geni varyantı taşıyıcılığının özellikle demans ve PH tanısı olan hastalarda taranması oldukça önemlidir. Özellikle PH 60 yaş üstü hasta grubunda 1% gibi bir sıklıkla görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Yeni nesil dizileme (YND) tekniklerinin gelişmesiyle bu hastalıkların genetik etiyolojilerine yönelik cevaplanmamış sorular hızla aydınlanmaya başlamıştır. Dizileme verisi üretimini son derece hızlandıran yüksek verimli teknolojiler sayesinde pek çok hasta ucuz ve hızlı bir şekilde hastalıklarına yönelik hedefli dizileme ve sonuç alma olanağına ulaşmıştır(23). Ancak bu yöntemin bazı sınırlamaları vardır. Özellikle psödogeni olan genlerde, tekrar bölgelerinde ve yapısal varyantları tanımlarken eksik kalmaktadır. *GBA1* geninde kısa okumalı YND yöntemi ile saptanan varyantların, psödogeni *GBA1* nedeniyle ikinci bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Sanger

dizileme ya da uzun menzilli PCR kullanılabilen doğrulama yöntemleri arasındadır. Son yıllarda uzun okumalar yapan üçüncü nesil dizileme yöntemi olarak nanopor cihazının da *GBAI* varyantlarını tanımlamak için kullanılması hız kazanmaya başlamıştır(24,25). Bu çalışmada ülkemizde ilk defa nanopore ile *GBAI* geni dizilemesi yapılması planlanmıştır ve ileriki çalışmalar için öncü olması hedeflenmiştir.

1980’lerde başlayan nanopore dizileme teknolojisi, ince bir membrana gömülmüş olarak bulunan ve biyosensör görevi gören nanopor yani nano-gözeneklerden DNA ve RNA gibi biyolojik moleküllerin geçmesi sırasında oluşan akım değişikliklerinin saptanmasına dayanır. Bu teknoloji 2014 yılında MinION adıyla Oxford Nanopore Technologies (ONT) tarafından piyasaya sunulmuştur(26). MinION’un en önemli özelliği en fazla birkaç yüz baz çiftine kadar uzayan ikinci nesil dizileme araçlarının okumalarının yerine onlarca kilobaza hatta 1 mb'a uzanan okumalara sahip olmasıdır(27).Bu özelliği ile kısa okumalı YND teknolojilerinin eksik kaldığı noktada devreye girmektedir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik polikliniklerine PH ve demans şikayetleriyle başvuran ve *GBAI* geninde patojenik/muhtemel patojenik varyantlar saptanan hastaların üçüncü nesil dizileme yöntemi olan uzun okumalı nanopor yöntemi ile doğrulanması amaçlanmaktadır. Bu çalışma nanopor yöntemi ile *GBAI* dizilemesi açısından Türkiye’de öncü niteliği taşımaktadır. Çalışmamın *GBAI* ve *GBAPI* genlerinin yapısını daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. YND ile saptanan *GBAI* varyantlarının doğrulanması için yeni bir yöntem oluşturan bu çalışma, homozigot ve heterozigot *GBAI* varyantı taşıyıcılarının taranmasını ve *GBAI-GBAPI* ilişkisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ileri çalışmalara da öncü olacaktır

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Psödogen nedir?

Bilinen bir fonksiyonel genin mutasyona uğramış veya kırılmış, fonksiyonel protein ürünü oluşturmeyen kopyasına psödogen denir(28). Psödogen kelimesi bilimsel literatüre ilk defa 1977 yılında Jacq ve ark. tarafından kazandırılmıştır(29). Bu çalışmada Afrika pençeli kurbağası olarak da bilinen *Xenopus laevis*'in genom organizasyonunu incelerken 5S rRNA genini ve onun aktif olmayan bir versiyonunu (bir psödogen) tandem tekrar dizilerinde saptamışlardır. İnsanlarda saptanan ilk psödogen örnekleri α -globin(30) and β -globin(31) genlerine ait gen kümeleridir. İnsan genomunda GENCODE projesi (Genler ve gen varyantları ansiklopedisi) versiyon 45'e göre 14.719 psödogen bulunmaktadır. Bunların çoğunluğu (10.658) işlenmiş psödogenlerdir. Psödogenler "işlevsiz" etiketi nedeniyle yıllarca "genomik fosiller" "evrimin kalıntıları" olarak anılmasına rağmen şu anda yaklaşık %10-20'sinin transkripsiyonel aktivite gösterdiği fark edilmiştir(2,3). Hatta protein kodlama kapasitesini yeniden kazanan psödogenlerin varlığı da gösterilmiştir(4).

Psödogenlerin isimlendirmesi psödogenin köken aldığı ebeveyn genin adına Yunan alfabesinin yirmi üçüncü harfi olan "Psi" Ψ harfinin ya da sonuna "P" harfinin eklenmesi ile yapılır (32).

2.1.1. Psödogen Sınıflandırması

Psödogenlerin sınıflandırılmasında iki ana psödogen sınıfından bahsedilebilir: İşlenmiş psödogenler ve duplike psödogenler. Bunların dışında daha nadir görülen çeşitli psödogen türleri de vardır. Bunlara örnek olarak üniter psödogenler, polimorfik psödogenler ve nükleer mitokondriyal psödogenler (NUMT) verilebilir(5,32).

İşlenmiş psödogenler ebeveyn genden üretilen mesajcı RNA'ların (mRNA) ters transkripsiyona uğrayarak genoma rastgele entegre olmasıyla oluşur. (Şekil 1a) "İşlenmiş" adı mRNA'yı andıran intronların yokluğu, küçük yan direkt tekrar dizilerinin varlığı ve 3' terminal poliadenilasyonu özellikleri nedeniyle verilmiştir(33). Bu entegrasyonun, muhtemelen ters transkriptaz ve endonükleaz aktivitesi olan LINE-1 (Uzun serpiştirilmiş nükleer elementler-memeli genomunda yaygın olarak bulunan

retrotraspozisyon yoluyla oluşmuş, endojen mobil genetik elementlerdir.) retrotranspozisyonu sırasında oluşabileceğine dair yayınlar mevcuttur(34). Tekrar genoma entegre olduğu bölge genellikle başka bir kromozom üzerindedir ve ebeveyn genin yakınındaki açık kromatin bölgesine olma eğilimindedir. Promotör bölgesinden yoksundurlar(35).

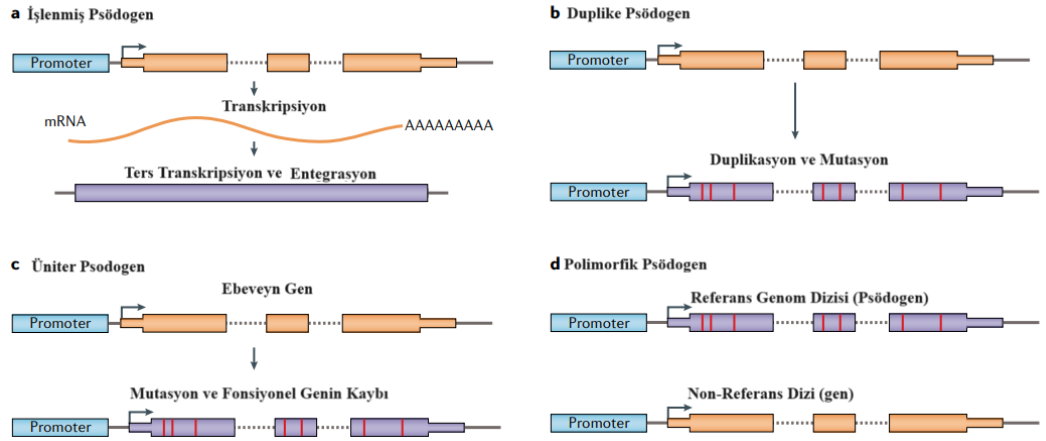
İşlenmemiş psödogenler olarak da bilinen duplike psödogenler ebeveyn genin DNA'nın kısmi veya tam duplikasyonu sonucu oluşurlar ve bir mutasyon sonucu protein kodlama özelliklerini kaybetmişlerdir.(*Şekil 2b*) İki homolog kromozom arasındaki eşit olmayan kromozomal çaprazlama (crossing over) ve oluşan mutasyonlar bu psödogenin oluşumuna sebep olabilir(36). Duplike psödogenlerin işlenmiş psödogenlerden farklı olarak promotörü, intron yapısı ve diğer düzenleyici öğeleri varken 3' poli-A kuyruğu ve yan direk tekrar dizileri (flanking diziler) yoktur(37). Aynı kromozom üzerindeki ebeveyn genlerinin yakınında yerleşmişlerdir ancak ebeveyn gen ve psödogen evrimsel süreçte majör kromozomal yeniden düzenlenmeler sonucu ayrılabilir(32).Tablo 1'de işlenmiş ve işlenmemiş psödogenlerin özellikleri özetlenmiştir. Tablo.1 Xiao ve ark. makalesinden uyarlanmıştır(37).

Tablo 1:İşlenmiş ve işlenmemiş psödogenlerin özellikleri (Xiao ve ark)

<i>İşlenmiş Psödogenler</i>	<i>İşlenmemiş psödogenler</i>
Ters transkribe olmuş mRNA'dan kaynaklanır ve genomu yeniden entegre edilir.	Gen duplikasyonu sonucu oluşur.
İntron ve promotörleri yoktur.	Promotörlere, ekzon-intron yapısına ve diğer düzenleyici dizilere sahiptir
3' ucunda bir poli-A kuyruğuna sahiptir. Yer değiştirilebilen elementlerin insersiyon bölgeleri ile ilişkili yan direkt tekrarlarla sahiptir.	3' ucunda bir poli-A kuyruğu yoktur Yan direkt tekrarlar yoktur.
Ebeveyn genden farklı lokuslardadır.	Bazıları tandem segmental çoğaltmanın bir sonucu olarak ana genleriyle birlikte bir küme halinde bulunur
3' ve 5' trunkasyonları vardır Genellikle kısadır.	3' trunkasyonları vardır Nispeten daha uzundur.

Üniter psödogenler fonksiyonel bir ebeveyn genin psödogenleşmesi ile oluşur ve ebeveyn geni bulunmayan “yetim” bir genomik bir dizi olarak tanımlanır. (*Şekil 1c*) Bu psödogen çeşidi genin yapısal tüm elemanlarına sahiptir ancak işlev görmesini önleyen mutasyonlardan mustarıptır.(38) GENCODE v45'e göre psödogenlerin çok küçük bir kısmı (258) üniter psödogenlerden oluşmaktadır. Üniter psödogenlerin evrimsel olarak, fonksiyon kaybının organizma tarafından tolere edilebileceği hayatta kalım için önemli olmayan genler olması gerektiği düşünülmektedir.(32)

Üniter psödogenlerden daha nadir olarak görülen polimorfik psödogenler yapı ve oluşum açısından üniter genlerin alt grubu gibidir ancak üniter psödogenlerin aksine bazı insan genomlarında polimorfik psödogenler fonksiyonel aleller olarak işlev görmeye devam etmektedirler.(*Şekil 1d*)(32)



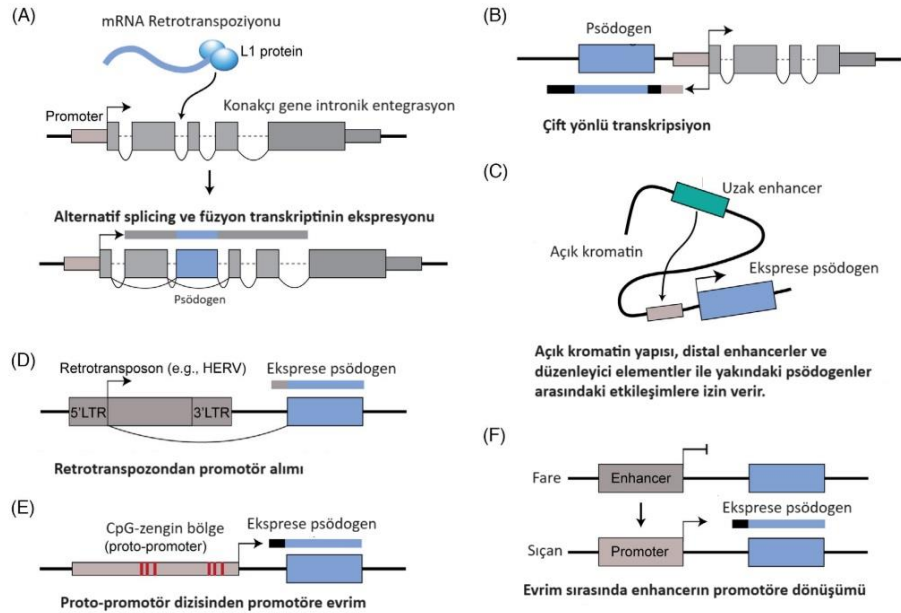
Şekil 1: Önemli psödogen sınıfları (Cheetam ve ark. 2020)

2.1.2. Psödogen İfadesi

Psödogenler tanım olarak transkripsiyonel ve translasyonel olarak sessizdir ancak pek çok çalışma bazı psödogenlerin rezidüel promotör aktivitesine sahip olabileceğini göstermiştir. Pek çok organizmada psödogenlerin işlevsel ve işlevsel olmayan transkriptleri tanımlanmıştır(39).

Bir psödogenin ifadesi uzay-zamansal ifade özgüllüğü gösterir ve bu sayede psödogenler ebeveyn genine bağımlı veya bağımsız bir şekilde işlev görebilir. Örneğin işlenmiş bir psödogen olan *PTENP1*'in kaybı, ebeveyn geni *PTEN* seviyesinde azalmaya yol açabilir. Hatta melanomda her ikisi de silinmiş olarak saptanabilir. Bununla beraber ebeveyn geninden bağımsız olarak ifade edilebilen psödogenler de vardır. Özellikle farklı organlarda, dokularda ve hatta kanda ifade edilen dokuya özgü ifade profillerindeki farklılıklara rastlanır(40). Beyinde ifade edilen *HTR7* (5-Hidroksitriptamin reseptörü 7) ve *HTR7*'den farklı olarak böbrek ile karaciğerde ifade edilen psödogeni *HTR7P1* arasındaki dokular arası ifade farklılığı buna örnektir(41). Psödogen ifadesi dinamiktir. Çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında (Örn: kanser) psödogen ifadesi değişmektedir(42). Bir psödogen ifadesinde en önemli değişkenlerden biri kullandığı promotördür. Bazı psödogenlerin kendi promotörü olurken bazı psödogenler yakınlardaki başka bir genin promotörünü kullanır. İşlenmiş psödogenlerin promotörü yoktur ve yakınlardaki bir genin promotörü aracılığıyla ifade edilebilir. Bu nedenle ifade profili ebeveyn genden farklı olabilir(42).

Psödogen ifadesini yüksek verimli RNA dizilemesinin (RNA-seq) ortaya çıkması ile özellikle kanserlerde gösteren pek çok çalışma vardır(2,43–45). Düzenleyici elementlerden yoksun işlenmiş psödogenler çok çeşitli mekanizmalar ile ifade edilebilir. Psödogenler tarafından kullanılan bu mekanizmalar *Şekil.2*'de şematize edilmiştir(46). Özellikle işlenmiş psödogenlerin kodlayan genlerin intron ya da ekzonlarına entegre olabildikleri ve entegre oldukları genin düzenleyici mekanizması üzerinde etkili bir şekilde "otostop" yapabildikleri bilinmektedir. Bu entegrasyon sonucunda psödogen ve konakçı gen ekzonlarının füzyon transkripti ortaya çıkabilir (*Şekil.2A*)(47). Alternatif olarak çift yönlü promotorlara sahip olan genlerin yukarıdaki (upstream) psödogenler ifade edilebilir(*Şekil.2B*)(48). Açık kromatin bölgeleri distal enhancerlar ve yakındaki genlerle ilişkili düzenleyici elementleri ile psödogenler arasında etkileşimlere izin vererek psödogen transkripsiyonunu güçlendirebilir(*Şekil.2C*)(47,49). Psödogenler, proto-promoter sekansları içeren CpG açısından zengin bölgelerden yeni promotörler elde edebilirler(*Şekil.2E*) (50). Psödogenler proksimalinde çok yakında bulunan retrotranspozonların promotorleri ile ifade edilebilir (*Şekil.2D*). Bazı promotorlerin retrokopileri düzenleyici element olacak şekilde evrimleşmiş olabilirler (*Şekil.2F*).



Şekil 2:Psödogenlerin ifade edilme mekanizmaları (Troskie ve ark.)

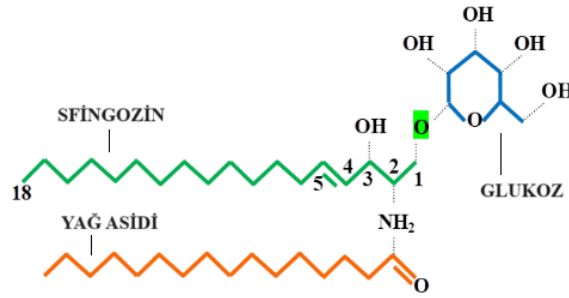
Transkribe olan psödogen RNA'sı örneğin rekabetçi endojen RNA (ceRNA) olarak ebeveyn genin ifadesini etkileyebilir. CeRNA'lar miRNA'ları bağlayarak, miRNA'lar üzerinden mRNA'ları ve dolayısıyla gen ifadesini etkileyebilir. Teorik olarak uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), dairesel RNA'lar (circRNA'lar) ve miRNA 'sünger' olarak kaşımıza çıkan herhangi bir RNA transkripti ceRNA olarak tanımlanabilir. Psödogen transkriptleri de miRNA sünger' olarak davranabilir ve mRNA'ları miRNA baskısından kurtararak örneğin ebeveyn genin ifadesinde değişikliğe sebep olabilir(51). OCT4-pg4(52), BRAFP1(53), CYZ4Z2P(54) gibi psödogenlerin ceRNA olarak görev aldığını gösteren çeşitli deneysel çalışmalar vardır. Staneiro ve ark. en az beş algoritma tarafından tahmin edilen miRNA'lardan biri olan miR-22-3p aşırı ifadesinin *GBA1* ve *GBAP1* endojen mRNA seviyelerini önemli ölçüde azaltabildiğini göstermişlerdir. (%72'ye kadar; P <0.0003). *GBAP1* 3'UTR bölgesinin aşırı ifadesinin miR-22-3p'nin sünger' gibi davranıp miR-22-3p'yi izole ederek *GBA1* mRNA seviyelerinde ve GCse aktivitesinde önemli bir artışa yol açan yeni ceRNA tabanlı ağı da saptamışlardır(55). Özellikle bu çalışma *GBA1* ve *GBAP1* arasındaki olası ilişkiyi ortaya koymasıyla ve ortaya çıkarılan *GBA/GBAP1/miR-22-3p* ağı sayesinde yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

2.2. *GBA1* Genini Tanımak

2.2.1. Glukozilseramid Metabolizması

Bakteriden insana kadar olan organizmaların hücre membranında önemli görevler üstlenen glukozilseramid (GlcCer, diğer adıyla glukoserebrosit), amid bağı ile bağlanan bir sfingozin ve bir yağ asidi zincirinden oluşan bir seramid (N-açil sfingozin) kısmı ile bir glukoz kısmından oluşur.(Şekil 2)(56) Seramid içeriğinde bulunan yağ asidi çeşitli uzunlukta (C14-C26) olabilir ancak sıklıkla karışımıza stearik asit (C18) çıkar(57). GlcCer sentezi endoplazmik retikulumda (ER) seramid sentezi ile başlar ve seramid UDP-glikoz'un golgi cisimciğinin sitozolik yaprağında, β 1-1-glikosidik bağı ile, glükosilseramid sentaz (GSS, seramid glukoziltransferaz olarak da bilinir ve UGCG geni ile kodlanır.) enzimi tarafından transfer edilmesi ile devam eder(57,58). Daha sonra transport proteini dört fosfat adaptörlü protein-2 (FAPP2) glükosilseramidin çoğunu ER'ye geri gönderir. GlcCer'in bir kısmı hücre zarına veya

endozomlara yönlendirilebileceği gibi, bir kısmı da golgi luminal tarafa gönderilerek kompleks glikosfingolipidlerin (GSL) sentezlenebilmesi için çeşitli modifikasyonlara uğrar.(59) Çoğu glikosfingolipid'nin (GSL) sentezi seramidden GlcCer oluşumu ile başlar ve glukozilseramid'in 300'den fazla glikolipidin yapı taşı olduğu bilinmektedir.(60)



Şekil 3:GlcCer'i oluşturan yapılar (Gan ve ark.2021)

GlcCer'in glukoz ve seramide yıkımındaki defekti ilk kez Dr. Roscoe Brady 1965 yılında tanımlamıştır(61). GlcCer'de bulunan glukoz komponenti lizozomal bir enzim olan glukoserebrosidaz (asit-beta glukosidaz, glukosilseramidaz beta veya GCase) tarafından hidrolize edilir. *GBA1*, *GBA2* ve *GBA3* genleri tarafından kodlanan üç farklı GCase vardır. *GBA1* bir lizozomal hidrolazken, safra asidi β -glukosidaz'ı olarak da bilinen *GBA2* 9. kromozomda yerleşmiştir ve 18 ekzon içerir, ER veya Golgi aparatının sitozolik yüzeyinde bulunan non-lizozomal bir glukozerebrosidazı kodlar. *GBA3* ise 4. kromozomda yerleşmiştir ve 6 ekzon içerir, karaciğerde, dalakta, böbrek gibi dokularda ifade edilmesine rağmen fonksiyonu hala tam olarak bilinmemektedir.(57,62)

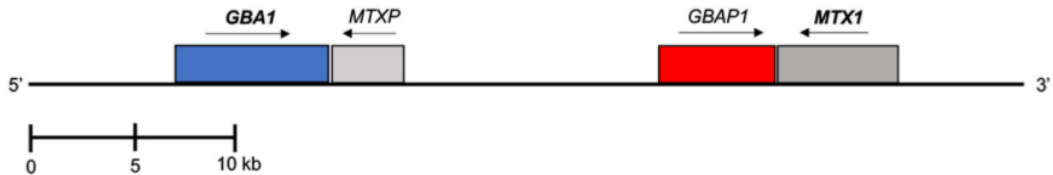
Lizozomal *GBA1*, insan hastalıkları patofizyolojisindeki rolü nedeniyle oldukça önemlidir. *GBA1* genindeki bialelik mutasyonlar Gaucher hastalığına (GH) sebep olurken, heterozigot mutasyonlar Parkinson hastalığı (PH) ve Lewy cisimcikli demans (LCD) için risk oluşturmaktadır(10). Bunun dışında *GBA1* geni mutasyonları multisistem atrofi (MSA) ile de ilişkilendiren yayınlar mevcut olmasına rağmen(63) GBA ve MSA arasında korelasyona rastlanmayan yayınlar da vardır(64).

2.2.2. GBA1 Geni Yapısı ve İşlevi

GBA1 Geni Moleküler Yapısı

GBA1 geni 1. kromozomun uzun kolu üzerinde 1q21 bölgesinde yer alır ve yaklaşık 7,6 kb büyüklüğündedir.(7) Bu gen 11 ekzon ve 10 introndan oluşur ve kodlayan bölgelerde %96 homoloji gösteren *GBAP1* isimli psödogeni vardır. *GBAP1* psödogeni 5,7 kb büyüklüğündedir ve *GBA1* geninin 16 kb downstream bölgesinde yer almaktadır. %98'e yaklaşan homoloji ile benzerliğin en yüksek olduğu bölge, intron 8 ile 3' UTR arasındaki bölgedir. Bununla birlikte, *GBA1* ve *GBAP1* dizilerindeki en büyük farklılık *GBAP1*'in ekzon 9'unda yer alan 55 bç'lik bir delesyondur(7,65,66). *GBAP1*'deki bu benzersiz delesyon *GBA1* genini psödogeninden ayırmak için kullanılabilir. 55 bç'lik bu delesyon *GBAP1* psödogenindeki fonksiyon kaybının sebebidir(67). *GBA1* geni ve psödogeni arasındaki boyut farklılığının nedeni ise *GBA1* geni intronlarında yayılmış olan Alu insersiyonlarıdır(68). *GBAP1*'in primat olmayan türlerdeki yokluğu, bu psödogenin oluşmasına neden olan duplikasyon olayının yaklaşık 40 milyon yıl önce Alu dizilerinin *GBA1* genine insersiyonundan önce meydana geldiğini düşündürmektedir(67).

1q21 bölgesindeki içinde *GBA1* ve *GBAP1* genlerini içeren 85 kb'lık uzunluğundaki bir segment, bu genlerin dışında altı fonksiyonel gen ve bir psödogen daha içeren gen açısından zengin bir segmenttir.(69) Dış mitokondriyal membranda yer alan içe aktarım protein kompleksi-1'in bir elemanı olan metaxin proteinini kodlayan *MTX1* geni ve psödogeni *MTXP*, *GBA* geni ve psödogenin aşağı (downstream) bölgesinde yer alır.(Şekil 2)(70)

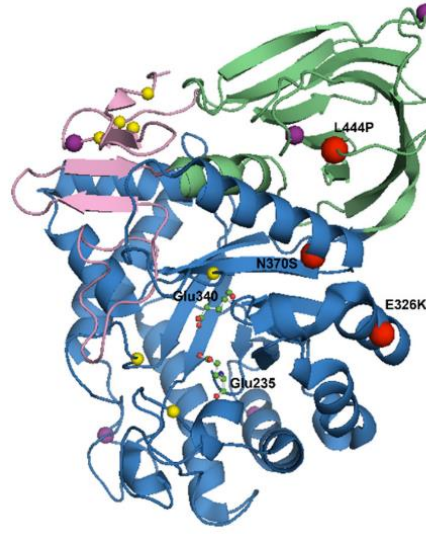


Şekil 4: *GBA1*, *MTX1* ve bunların psödogenlerinin ölçekli gösterimi. (Woo ve ark. 2021)

GBAI Gen Ürünü: Glukoserebrozidaz

GBAI geni glukozilseramid (GlcCer) ve glukozilsfingosinin (GlcSph) yıkımından sorumlu olan GCase'ı kodlar(8). GCase ER'de sentezlenir ve optimal enzim aktivitesi için gerekli pH 4–5 olan lizozoma gelene kadar aktif değildir(62). *GBAI* transkripsiyonu, transkripsiyon faktörü EB (TFEB geni tarafından kodlanır) tarafından düzenlenir. TFEB, CLEAR (Koordineli Lizozomal İfade ve Düzenleme) gen ağını ve lizozomal biyogenezi düzenleyen en önemli transkripsiyon faktörüdür. (71,72) ER'de sentezinden sonra GCase Golgi aparatına gönderilerek glikozillenir(73). Lizozomal aktivitenin en önemli parçası olan asit hidrolazların çoğu golgi aparatında mannoz-6-fosfat (M6P) ile modifiye edilerek M6P-bağımlı yol aracılığıyla lizozoma taşınırlar. Ancak GCase'ın bu yolaktan bağımsız olarak lizozomal integral membran proteini tip-2 (LIMP-2, *SCARB2* geni tarafından kodlanır) ile lizozoma aktarıldığı tespit edilmiştir(74). GCase'ın lizozomal aktivasyonu için Saposin C (Prekürsörü prosaposin *PSAP* geni tarafından kodlanır.) gereklidir (75).

Membranla ilişkili bir protein olan GCase 497 amino asitten oluşur ve beş glikozilasyon bölgesi içerir(8). Bu bölgeler (Asn 19, Asn 59, Asn 146, Asn 270 ve Asn 462) Şekil 4'te mor küreler olarak gösterilmiştir. Üç domaine sahiptir(76). Domain-2 329 aa uzunluğundadır, sekiz β -tabakasından oluşan bir immünoglobulin katlantısı gibidir(77). Domain-1 39 aminoasit(aa) uzunluğunda sinyal peptididir ve protein katlanması ile ilişkili iki disülfid köprüsüne sahip antiparalel bir β -tabakadır(77). Domain-3 ise 62 aa uzunluğundadır, bir $(\beta/\alpha)_8$ triosefosfat izomerase (TIM) varilinden oluşur ve aktif bölgeyi barındırır(77).Şekil 4'te glukoserebrozidaz enziminin yapısı gösterilmiştir.(77) Domain-1 pembe, Domain iki yeşil, Domain-3 mavi renkle gösterilmiştir. Glu 235 ve Glu 340 aktif bölge katalitik kalıntıları olarak işaretlenmiştir. Sarı küreler serbest sistein kalıntıları ve kırmızı küreler ise en yaygın üç *GBAI* mutasyonunu göstermektedir.



Şekil 5:pH 5,5'ta Glukoserebrosidazın Yapısı ve Sık Rastlanan Mutasyonlar (*Smith ve ark.*)

Glukoserebrosidaz Enzim Aktivitesi

GCase aktivitesindeki düşüklüğün ve *GBA1* genindeki mutasyonların gösterilmesi Gaucher hastalığı (GH) tanısında yıllardır altın standart olarak kullanılmaktadır(78). Farklı *GBA1* mutasyonları GCase enzim aktivitesini farklı derecelerde etkiler(79). GH tanılı hastalardaki enzim aktivitesi sağlıklı kontrollerin %10-20'si civarındayken, heterozigot *GBA1* taşıyıcılarında %50 düzeyindedir(80). *GBA1* mutasyonu taşıyıcısı Parkinson hastalarının beyinlerinde özellikle substansiya nigra (SN) (%58 azalma) GCase aktivitesindeki azalma gösterilmiştir(81). Başka bir çalışmada GCase aktivitesindeki bu azalma yine *GBA1* mutasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. (82). *GBA1* taşıyıcılığı olmayan sporadik PH tanılı hastalarda GCase aktivitesindeki azalmayı gösteren çeşitli çalışmaların varlığı ayrıca dikkate değerdir(83–85). Bu bulgular düşük GCase aktivitesinin PH patogenezinde önemli olabileceğini düşündürmektedir ve *GBA1* taşıyıcılığı dışı hangi faktörlerin GCase aktivitesinde etkili olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

PH semptomlarının ciddiyetini GCase aktivitesi ile ilişkilendiren çalışmalar vardır(84,86). Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada hasta ve hasta olmayan *GBA1* taşıyıcılarında GCase aktivitesi diğer gruplara göre daha düşük saptanırken, hastalık derecesi ve GCase aktivitesini ilişkisiz olarak saptanmıştır(87). Bu değişken bulgular

hastalık ciddiyeti ve GCase aktivitesi ilişkisinin incelendiği geniş hasta popülasyonu ile yapılacak ileri araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır.

2.2.3. *GBAI* Geni Mutasyonları

Bilinen 400'den fazla *GBAI* mutasyonu vardır ve bu mutasyonların çoğunluğu yanlış anlamlı mutasyonlar olmasına rağmen anlamsız mutasyonlar, çerçeve kaymasına yol açan küçük delesyon ve duplikasyonlar, insersiyonlar ya da 'splice' bölgesi mutasyonları da *GBAI* mutasyon spektrumu içindedir.(8,70) *GBAI*'e yakın bir mesafede bulunan ve yüksek homoloji gösteren *GBAP1* psödogeni nedeniyle gen konversiyonu, füzyonu veya duplikasyonu ile sonuçlanan *GBAI/GBAP* rekombinant alellerin (hem karşılıklı hem de karşılıklı olmayan) oluşumu görülebilir(62). Nomenklatür 39 aminoasit uzunluğundaki lider dizinin eklenmesi nedeniyle değişmiştir(8). En sık görülen üç mutasyon c.1226A>G (N370S ya da yeni nomenklatürde N409S), c.1448T>C (L444P/L483P) ve c.1093G>A (E326K/E365K) olarak karşımıza çıkar.(62)

Sık rastlanılan ayırt edici varyantlar, belirli fenotiplere özgü olabileceği gibi, belirli etnik topluluklarda da daha sık görülebilir. *GBAI* mutasyonu taşıyıcılığı Aşkenazi Yahudilerinde 1:18 sıklıkla görülebilirken, diğer popülasyonlarda ise bu oran yalnızca %1'dir(88). N370S varyantı Tip I GH'de en sık rastlanan mutasyondur ve en az bir alelde bulunması GH nöropatik formlarından koruyuculuğu sağlar(89). L444P mutasyonu homozigot durumda sıklıkla Tip III GH ile ilişkilidir(88). *GBAI* geninde tanımlanan mutasyonlar tüm gene yayılmıştır ve proteinin aktif bölgesine göre olan konum ile hastalık fenotipi ilişkisizdir(62). Örneğin L444P mutasyonu, domain-2'de olmasına rağmen genellikle nöronopatik hastalıkla ilişkili ciddi bir *GBAI* mutasyonudur(77).

GBAI mutasyonları GH fenotipindeki etkisine göre "hafif" veya "ağır" olarak sınıflandırılabilir. Nöropatik formlarda karşımıza çıkan mutasyonlar "ağır", non-nöropatik formda karşımıza çıkan mutasyonlar "hafif" olarak değerlendirilir(90). Hafif ve ağır etkili varyantlar ile etkisi bilinmeyen varyantların bazıları, Gan-Or ve ark. ait derleme(91) ve Parlar ve ark. (92) tarafından oluşturulan "*The GBAI-PD Browser*"

çevrimiçi veri bankasından alınan bilgilerle Tablo.2’de eski nomenklatüre uygun olarak listelenmiştir.

Tablo 2:Ciddiyetine göre *GBAI* Varyantları

Hafif "mild" etkili varyantlar		Ağır "severe" etkili varyantlar		Bilinmeyen "unknown" etkili varyantlar	
N370S	R48W	L444P	H255Q	L174P	R163Q
S271G	L66P	D409H	N188S	Q497R	F347L
R277C	M123V	D380A	P201H	K7E	
R496H	G189V	R131C	I260T	D443N	
F37V	G193R	R463C	V394L	G193E	
G46E	S271G	R257Q		K(-27)R	
Y205C	S271N	G202R		M123T	
F216Y	R277C			L144V	
L264I	R329C			T369M	
V375L	N396T			W393R	
G377C	V398I				
R496H	D399H				

Rekombinant Aleller

DNA yeniden düzenlemesi memeli hücrelerinde mayoz bölünme sırasında meydana gelen temel hücresel bir süreçtir. Yüksek homoloji gösteren bölgeler arasında oluşan bu yeniden düzenlemeler yani “rekombinasyonlar” patojenik mutasyonların oluşumu ile sonuçlanabilir. *GBAI* ve *GBAP1* gibi yüksek homoloji gösteren ve birbirine yakın bölgede bulunan iki dizi arasında rekombinasyon ve karmaşık alellerin oluşumu riski yüksektir(93,94). Hem resiprokal (karşılıklı) hem non-resiprokal(karşılıklı olmayan) rekombinasyonlar bu rekombinant alellerin sebebi olabilir(94).

Gen konversiyonuyla ya da *GBAI* geni ile psödogen arasındaki eşit olmayan kromozomal gen çaprazlamasıyla üretilen alellerden RecNcil aleli ilk olarak 1990

yılında tanımlanmıştır. Bu alel ekzon 10 da L444P ve A456P aa değişimlerini, ve bir adet sessiz mutasyon olan V460V'yi barındırır(95). RecNcil aleli ağır etkili varyantlar grubuna girer ve özellikle perinatal letal Gaucher hastalığında homozigot olarak karşımıza çıktığı çalışmalar mevcuttur(96,97). Özellikle RecNcil alelinin kemik hastalığının yaygın (%71) olarak görüldüğü Arjantin GH kohortunda 52,7% oranında saptanmıştır ve bu alelin kurucu mutasyonu olabileceğinden bahsedilmiştir. Ağır kemik bulguları RecNcil aleli ve RecNcil/ N370S genotipi ile ilişkilendirilmiştir(98). Bu çalışmada, uzun okumalar yapan SMRT (Single-molecule real-time) teknolojisinin kullanılmıştır diğer çalışmalara göre yüksek oranda kompleks alel saptanmasının sebebinin uzun okuma teknolojisi olabileceği belirtilmiştir. RecTL aleli ise RecNcil alelini oluşturan üç varyanta ek olarak karşımıza çıkan D409H varyantını da içeren dört nokta mutasyonunun kombinasyonundan (D409H, L444P, A456P, and V460V.) oluşur(99).

RecΔ55 aleli(c.1263del55) ekzon 9 da 55 baz çiftlik bir delesyonu ifade eder ve sık rastalanan diğer bir aleldir. İlk olarak 1993 yılında Beutler ve ark. tarafından tanımlanmıştır (100). İspanyol GH kohortunda yapılan bir çalışmada, homozigot N370S(c.1226A > G) hastalarındaki genotip fenotip tutarsızlıklarından yola çıkan Torralba ve ark. hastaların %40'ında RecΔ55 aleli saptamıştır ve yanlış atanan homozigotluk durumunu tanımlamışlardır(101). Yine İspanyol GH kohortunda yapılan bir çalışmada RecΔ55 aleli ile D409H mutasyonu birlikteliği de gözlenmiştir. Bu recombinant alelin iki kromozomal çaprazlama olayının ilki 5579-5877 ve ikincisi 6273-6305 nükleotidleri arasında olacak şekilde oluştuğunu saptamışlardır. (102).

Stone ve ark. yaptıkları çalışmada. hasta popülasyonlarının %27'sinde recombinant alel saptamışlardır ve bu rekombinant aleller perinatal lethality ile ilişkilendirilmişlerdir(103). Literatüre bakıldığında intron 3 ve intron 6 ile ilişkilendirilmiş başka çaprazlama olayları da karşımıza çıkar.(104,105)

2.2.4. *GBA1* dizilemesi için kullanılan teknikler

Birinci nesil dizilme yöntemi olarak kabul edilen Sanger dizileme 1977 yılında Frederick Sanger ve ark. tarafından geliştirilmiştir ve yaklaşık 40 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır ve DNA dizilemede altın standart olarak kabul edilmektedir(106).

Sanger dizileme yıllar içinde gelişerek 1000 bç'ne varan okuma uzunluğu, %99,9'a varan doğruluk oranı ve uygun maliyeti ile küçük ölçekli araştırmalarda ve diğer dizileme yöntemlerinin doğrulanmasında yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir(107). Çeşitli versiyonları olan Sanger yöntemi hedefli bölge dizilenmesi amacıyla yapıldığında hedef DNA fragmanının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ile başlar. Normal deoksिनükleotidler (dNTP'ler) ve zincir sonlandırıcı dideoksिनükleotidler (ddNTP'ler) kullanan DNA polimeraz tek sarmallı DNA şablondan yeni DNA şeritleri sentezler ve farklı uzunluklarda DNA fragmanları oluşur. Bu farklı uzunluktaki fragmanlar jel elektroforez veya kapiller elektroforezde yürütülerek sırayla okunur ve DNA dizisi ortaya çıkar.

20 yıldan fazla süredir GH tanısında *GBAI* genini dizilemek için Sanger dizileme yöntemi kullanılmaktadır(108). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle ikinci ve üçüncü nesil dizileme yöntemlerinin doğrulanması ve segregasyon analizleri için Sanger dizileme bir altın standart olarak kullanılmaktadır. PH kohortunda *GBAI* varyantlarını belirlemek amacıyla Nanopor dizilemeyi kullanan Graham ve ark. aynı zamanda varyant doğrulaması için Sanger dizileme yöntemini kullanmışlardır(25). Başka bir çalışmada yaklaşık 900 İtalyan hastalık PH kohortunda yapılan tüm *GBAI* geni taraması da Sanger yöntemiyle yapılmıştır(109). PH tanılı Askenazi Yahudilerinde yapılan geniş kohorta sahip başka bir çalışmada ise yeni nesil dizileme yöntemlerine ek olarak *GBAI* geninin ekzon 10 ve 11 Sanger dizilemesi, örneklerin ekzon 10 ve 11'de kaplamı azalması nedeniyle yapılmıştır. Çalışmada genel olarak rastlanan ortalama yüksek kaplam ve verim Sanger dizileme ile sağlanmıştır(110). Bu çalışmalar Sanger yönteminin *GBAI* geni dizilemesinde özellikle *GBAP1* psödogeni varlığında ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

GH tanılı hastalarda PZR bazlı teknikler *GBAI* geninde sıklıkla görülen mutasyonları taramak amacıyla kullanılmıştır(111,112). Ancak belirli mutasyonların taranması yerine tüm *GBAI* geninin dizilenmesi Ruskey ve ark. çalışmasında gösterildiği gibi tanı veriminin artmasını sağlamaktadır(110). *GBAI* geninin psödogeni *GBAP1*'den izole edilerek varyantların ve rekombinant alellerin doğrulukla saptanması için önemli yöntemlerden biri de uzun menzilli PZR'dir. Uzun menzilli PZR uzun DNA fragmanlarını(tipik olarak 5 ila 30 kb arasında) çoğaltmak için özel

olarak tasarlanmış standart PCR tekniğinin bir varyasyonudur *GBAI* geni mutasyonlarının GH tanımlı hastalarda tanımlanmaya başladığı yıllarda sık görülen mutasyonlarının taranmasının ardından tüm genin büyük delesyonlar, duplikasyonlar ve rekombinant alellerin saptanabilmesi amacıyla uzun menzilli ya da şablonlu PZR kullanılması oldukça sık kullanılan bir araştırma metodu olarak karşımıza çıkar(103,104,113,114).

Sanger ve PZR gibi yöntemlerle 60 yaş üstü popülasyonla sıklığı %1'i bulan PH kohortunda *GBAI* analizi yapmak, maliyet ve zaman açısından verimli olmayabilmektedir(115). İkinci nesil dizileme yöntemleri, diğer adıyla yeni nesil dizileme (YND) platformları bu noktada karşımıza çıkmaktadır. YND sayesinde çoklu hedef bölgelerini birden fazla hasta aynı anda olacak şekilde daha ucuz, daha hızlı, daha güvenilir bir şekilde dizileme ve analiz etme imkânı doğmuştur. DNA dizilemede çığır açan bir yaklaşım olan YND yöntemi PH gibi sık görülen hastalıklara uygulanmaya devam etmektedir(116–118). Ancak psödogeni olan *GBAI* geninin ve *GBA-GBAPI* kompleksi yeniden düzenlemelerinin YND ile analizi zordur ve *GBAI* rekombinant alellerin saptanması için yeni stratejiler gerekmektedir.

Yeni nesil dizileme yöntemi ve GBAI geni

2005 yılında ticari olarak kullanılmaya başlanan YND, klonal olarak çoğaltılmış, kısa (250-800 bp) DNA fragmanlarının paralel olarak dizilenmesidir. Bu “kısa okuma” teknolojisi maliyet ve zaman açısından oldukça verimli olmasına rağmen, bu okumaların uzun DNA fragmanlarını oluşturmak için yeniden birleştirilmesi gerekir, bu da yapısal varyantların saptanması, tekrarlayan veya oldukça homolog düşük karmaşıklık bölgeleriyle ilgili hizalama sorunlarına yol açar(23). Özellikle *GBAI* geni ve psödogeni *GBAPI* gibi yüksek homoloji gösteren yakın bölgelerde YND yönteminde varyant çağrılarını oldukça zordur ve hatalı hizalanmadan kaynaklanan yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlara yol açar(119).

GBAI geninin dizilenmesi için çeşitli önlemler alınabilir. Seçici olarak *GBAI* 'i zenginleştirmek, *GBAPI* kontaminasyonunu önlemek için gene ve psödogen farklılıklarını hedefleyen uygun primer ve probler üretmek bu önlemlerden bazılarıdır. Ancak Zampieri ve ark. yaptıkları çalışmada *GBAI* genini spesifik olarak

zenginleştirmelerine rağmen hizalama hataları nedeniyle veri analizinde sorunlar çıktığını göstermiştir. Aynı zamanda yüksek homolojinin, 150-500 bp uzunluğunda kısa *GBAI*'e spesifik dizilerin üretilmesine engel olacağı belirtilmiştir(120). Hem kütüphane hazırlığı ve hem de veri analizine yönelik spesifik prosedürlerin kombinasyonu ile yüksek sensiviteye ve spesifiteye ulaşabilmişlerdir. Bu sebeple *GBAI* için NGS prosedürlerinin özellikli olması gerektiği belirtilmiştir.

Varyantları tek başına belirlemek yerine aynı kromozom (haplotip) üzerinde bağlantılı bir şekilde kalıtımını ortaya çıkarmak ve farklı lokuslardaki alellerin spesifik kombinasyonlarının belirlenmesi sürecine haplotip aşamalandırma (haplotype phasing) denir. Kısa okumalı teknolojilerin doğası nedeniyle birlikte kalıtılan varyantlar aynı okuma üzerine denk kalacak kadar yakın olmadıkları sürece haplotipleri belirlemek oldukça zordur(121). Özellikle *GBAI* genindeki rekombinant aleller göz önüne alındığında haplotip aşamalandırma bu alellerin saptanması için oldukça önemlidir ve bu rutin kısa okumalı YND yöntemleri ile mümkün değildir.

2.3. *GBAI* Geni Mutasyonlarıyla İlişkili Fenotipler

2.3.1. Gaucher hastalığı

Gaucher hastalığı GlcCer aktivitesindeki azalma ile çeşitli organlarda lipit birikimi ile giden nadir genetik bir hastalıktır. İlk defa 1882 yılında bir tıp öğrencisi olan Philippe Gaucher'in doktora tezinde hepatosplenomegali, karın ağrısı, kanama şikayetleri nedeniyle pek çok hastane başvurusu olan 34 yaşında bir kadın hastanın dalağını ışık mikroskopisinde incelemesi ve şimdi "Gaucher hücreleri" olarak anılan lipit yüklü makrofajları saptaması ile tanımlanmıştır.(70)

GH en sık görülen lizozomal depo hastalığıdır ve 2023 yılında yapılan bir meta-analizde global doğum prevelansı 1,5:100000 ve global prevalansı 0,9:100000 olarak saptanmıştır(122). Ancak belirli etnik gruplarda artmış sıklıkta görülebilir. Örneğin Aşkenazi Yahudilerinde Tip I GH sıklığı 1:800 olarak belirlenmiştir(123). GH nörolojik bulguların şiddetine göre üç tipe ayrılmıştır. Ancak günümüzde GH' nın erken başlangıçlı ağır formlardan sadece iç organ tutulumu ile giden hafif formlara

kadar değişebilen bir fenotipik spektrum oluşturabileceği görüşü önem kazanmaktadır(124).

Tip I GH'nin semptomları ve başlangıç yaşı değişkendir. Erken başlangıçlı hepatosplenomegali, pansitopeni ve osteoporoz gibi ciddi hastalıktan asemptomatik erişkinlere kadar değişen bir spektrumu olan Tip I GH nörolojik tutulumu olmamasıyla Tip II ve Tip III GH'den ayrılır.(123) Tip I GH tüm GH tanılı hastaların %83'ünü oluşturur.(122) Tip I GH'da en sık rastlanan varyant olan N370S'nin homozigot olarak saptandığı hastaların üçte ikisi hafif semptomlar göstermektedir ve bazı bireylere yaşamın 8. veya 9. dekadına kadar teşhis konulamamaktadır. (125) Ancak hematolojik, viseral ve kemik semptomlarını ciddi bir şekilde gösteren N370S homozigot genotipindeki hastaların varlığı da hastalık fenotipinde başka faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Akut nöronopatik GH olarak da adlandırılan Tip II GH erken nörolojik problemlerle ortaya çıkar, hızlı ilerler ve iki yaşından önce ölümle sonuçlanır.(124) Nörolojik bulguları içerisinde beyin sapı anormalliklerini işaret eden supranükleer bakış felci, sinirlilik, hipertoni ve/veya hipokinezi bulunur. Gelişme geriliği, nöbet ve ilerleyici bir nörodejenerasyon görülür. Konjenital iktiyoz ve doğum sırasında ölüm de Tip II GH fenotipi ile ilişkili olabilir.(126) Hidrops fetalis Tip II GH'nin prenatal bulgusu olarak karşımıza çıkabilir. N370S varyantının en az bir alelde varlığı Tip II GH'ye karşı koruyucudur. L444P ise Tip II GH'de sık karşımıza çıkar ancak homozigot genotipine rastlamak güçtür.(127)

Tip III GH Subakut/Kronik Nöropatik GH olarak bilinir, adölesan başlangıçlıdır ve hastalık yavaş ilerleme gösterir. Bazı hastalardaki tek nörolojik belirti yatay sakkadik göz hareketlerinde yavaşlama olabileceği gibi, miyoklonik nöbetler, organomegali, gelişme geriliği ve demans gibi çeşitli semptomlar Tip III GH hastalarında karşımıza çıkar. (126) D409H mutasyonu aort kalsifikasyonları veya fibrozisi gibi kalp bulgularının eşlik ettiği bozulmuş sakkadik göz hareketleri ile ilişkilendirilmiştir. Hidrosefali ve iskelet anomalileri de bu fenotip içindedir.(128) Tip III GH, Tip IIIa, Tip IIIb , Tip IIIc olmak üzere üç ayrı subtipte ayrılabilir ve Tip IIIa yaşamı tehdit eden miyoklonik nöbetlerle karakterizedir.(10)

GBAI genindeki mutasyonlar GlcCase enzimi aktivitesinde azalmaya ve dolayısıyla bu enzimin substratı GlcCer birikimine yol açar. Bu birikim özellikle makrofajlarda olur ve şekil değiştirerek Gaucher hücreleri adını alan makrofajlarsa ‘buruşuk kâğıt mendil’ içeren taşlı halkalar (lizozomal birikim nedeniyle yana itilen hücre çekirdeği nedeniyle) görünümü saptanır. GH karaciğer, dalak, kemik iliği ve bazen de akciğerleri içeren bulgularının ana nedeni bu hücre birikimleridir. Biriken GluCer, GlcSph yolağında kullanılır ve serum GlcSph seviyeleri >100 kata kadar çıkar.(129,130)

2.3.2. Parkinson Hastalığı

Tanımı ve Epidemiyolojisi

Londra’da bir pratisyen hekim olan James Parkinson 1817’de parkinson hastalığını (PH) “*paralysis agitans*” ismiyle şu şekilde tanımlamıştır: “*Hareket halinde olmayan ve hatta desteklenen kısımlarda kas gücünün azalmasıyla birlikte istemsiz titrek hareket; gövdeyi öne doğru eğme ve yürüyüşten koşma temposuna geçme eğilimi vardır: duyular ve zeka zarar görmemiştir.*”(131) 200 yıl sonra bu tanıma çok benzer şekilde parkinsonizmin kardinal motor bulguları içinde istirahat tremoru, bradikinezi, postüral instabilite ve rijidite yer almaktadır. Motor ve motor olmayan semptomları olan PH, parkinsonizmin en sık sebebidir. PH Alzheimer hastalığından sonra ikinci sıklıkta görülen ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalıktır(11). PH prevalansı genel popülasyonda 1-2:1000 iken 60 yaş üstü hasta grubuna bakıldığında prevalans %1 olarak karşımıza çıkar. 50 yaş öncesi PH oldukça nadirdir.(115)

Substantia nigra (SN) beyin sapında bulunan, motor kontrol, davranış, öğrenme, duygusal işleme ve alışkanlıkların oluşumu gibi birçok önemli işlevde görevli bazal gangliyonlardan biridir. SN pars kompakta ve pars reticulata olmak üzere iki bölümden oluşur. Bu bölümler sırasıyla dopaminerjik ve GABAerjik nöronların hücre gövdelerini barındırır. Substantia nigra pars kompaktadan başalayan nöronlar putamene uzanarak nigrostriatal yolağı oluşturur. PH’da putamen dopamin seviyeleri tanı anında 80% azalmıştır ve SN’daki dopaminerjik nöronların ise 60%’ının tanı anında çoktan kaybolmuş olduğu saptanmıştır(132). SN pars kompaktadaki dopaminerjik nöron kaybıyla ilgili iki ana teori bulunmaktadır. Bu teorilerden ilki

Lewy cisimcikleri (LC) adı verilen agregatların birikiminin nöronal kayba yol açmasıdır. İkincisi ise mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak kaybın ortaya çıkmasıdır(133).

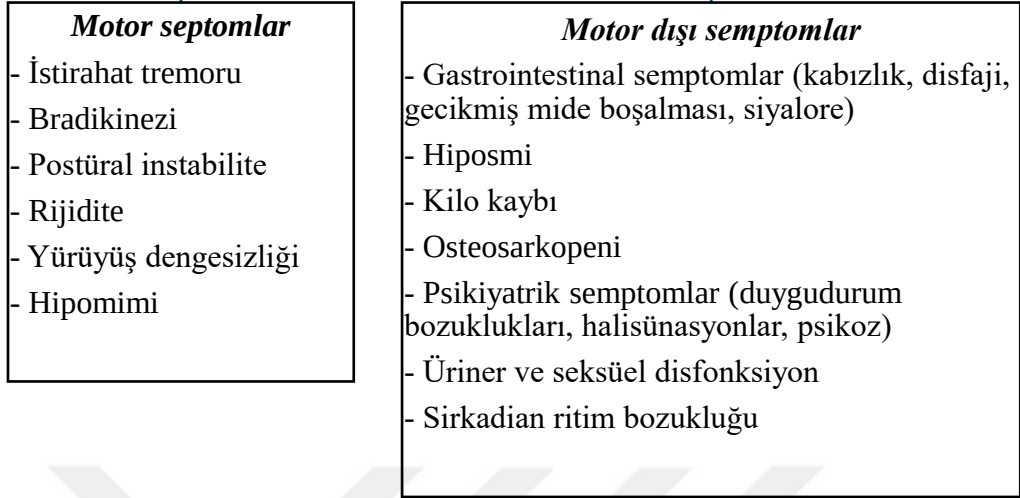
SN pars kompakta'daki dopaminerjik nöronlarda biriken ve LC olarak adlandırılan genellikle α -sinüklein agregatları PH'daki ana patolojidir ve dopaminerjik nöron kaybı ile ilişkilidir(11). LC'nin santral sinir sisteminde SN dışında vagusun dorsal motor çekirdeği, olfaktör bulbus, lokus seruleus (mavi nokta), ve omurilikteki intermediolateral çekirdek. LC periferik sinir sisteminde ise çölyak gangliyonları ve enterik sinir sisteminde birikir(132). Bu yerleşim PH semptomatolojisiyle paralellik göstermesi nedeniyle oldukça önemlidir. SN'deki depigmentasyon ve nöron kaybı, SN ve striatum (kaudat artı globus pallidus) arasındaki nigrostriatal yolakta yetmezlik ile sonuçlanır(11,134).

Mitokondriyal disfonksiyonun PH'daki rolü özellikle geri dönüşümsüz mitokondriyal kompleks I inhibisyonu yapan 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tertahidropiridin (MPTP) maruziyeti sonrasında ortaya çıkan parkinsonizm bulguları ile dikkat çekmeye başlamıştır(135,136). Hem sporadik hem monogenik PH'de gösterilen mitokondriyal disfonksiyonu PH patogenezinde oldukça önemlidir. Mitokondrinin enerji metabolizması, kalsiyum metabolizması ve hücre ölümü kontrolündeki önemli fonksiyonları göz önüne alındığında mitokondriyal disfonksiyonun SN'daki hassas dopaminerjik nöronlarda yaratacağı stres oldukça belirgindir(137).

Klinik Özellikler

Parkinson hastalığı motor ve motor dışı semptomları birlikte barındıran kompleks bir hastalıktır. Hastalar genellikle PH tanımındaki kardinal motor bulgular ortaya çıktığı zaman tanı alır ancak motor dışı semptomlar genellikle motor semptomlardan yıllar önce ortaya çıkar.(138) PH motor ve motor dışı semptomları şekil 4'te gösterilmiştir.

Parkinson Hastalığı



Şekil 6:PH motor ve motor dışı septomlar (De Rui ve ark. 2020)

Bradikinezi

Bradikinezi istemli hareketlerin başlamasında yavaşlaması ve tekrarlayan eylemlerde eylem devam ettikçe amplitüd veya hızın azalması (sıralama etkisi) olarak tanımlanır(139). Hipokinezi (düşük amplitüdlü hareket) ve akinezi (hareket yokluğu) bradikinezi terimi altında incelenebilir ve genellikle PH muayenesinde değişken şekillerde karşımıza çıkar. Ekstremit bradikinezisi MDS-PD kriterleri gereğince PH tanısı için gereklidir. Ancak yüz, ses, yürüyüş bradikinezisi de ekstremit bradikinezisine eşlik edebilir.(140)

İstirahat Tremoru

Tremor, bradikinezi ile birlikte PH'nin en sık görülen motor septomlarından biridir ve %65 hastada tanı anında mevcuttur.(141,142) İstirahat tremoru, istirahat halinde olan ekstremitde hareketin başlangıcı ile inhibe olan 4-6 Hz'lik tremoru ifade eder. Alt ekstremit, çene, çene veya dil gibi diğer vücut bölgelerinde görülebilir ancak sıklıkla üst ekstremiti etkiler ve muayenede en çok üst ekstremit değerlendirilir. Kinetik ve postüral tremor tek başına MDS-PD kriterlerini karşılamaz.(140,143)

Rijidite

Rijidite muayene eden kişi tarafından, hasta tamamen rahat bir pozisyondayken hastanın ekstremit ve boynuna yaptırılan pasif yavaş harekete karşı oluşan "kurşun boru" direncidir. İzole gevşeme başarısızlığından ziyade harekete karşı oluşan hızdan bağımsız direnci ifade ettiği için paratoni ve spastisiteden farklıdır.(144) “Dişli çark fenomeni (artan kas tonusunun tremor ile kesintiye uğraması) kurşun boru sertliği olmadan rijidite kriteri için yeterli değildir.(140)

Parkinsonizm saptanan hastalarda PH tanısı için MDS-PD (International Parkinson and Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson’s disease) kriterleri kullanılabilir. Bu kriterde PH tanısı “klinik olarak belirlenmiş PH” ve “klinik olarak muhtemel PH” olarak iki düzeyde incelenir. Farklı gereklilikleri olan bu iki tanı için gerekli olan temel kriter, kardinal üç motor bulgudan, biri bradikinezi olacak şekilde en az ikisinin bulunmasıdır(140).

GBA1 ve Parkinson hastalığı

PH ve *GBA1* ilişkisi ilk olarak 1980’li yıllarda Tip I GH’de dopamine yanıtı ekstrapiramidal semptomların gözlenmesi ile dikkat çekmiştir(145). PD tanılı hastaların %12’sinde *GBA1* mutasyonu saptanır bu nedenle taşıyıcılığı PH için en önemli risk faktörüdür.(146) 2020 yılında yapılan bir çalışmada PH gelişme riski 60 yaşında %10, 70 yaşında %16 ve 80 yaşında %19 olarak saptanmıştır(147).

GBA1 geni taşıyıcısı parkinson hastalarında (*GBA1*-PH) en baskın başlangıç semptomu bradikinezidir ve bu hastalarda motor semptomlardaki ilerleme daha hızlıdır. Erken PH başlangıç yaşı hem homozigot *GBA1* hem heterozigot *GBA1* hastalarında görülen diğer bir özelliktir(16). Blauwendraat ve ark. geniş bir kohortla yaptıkları GWAS çalışmasında *GBA1* genindeki özellikle N370S varyantının hastalığın başlangıç yaşında 2,6 yıl azalmaya neden olduğunu saptamışlardır(148). 2021 yılında yapılan ve 21 çalışmanın dahil edildiği bir meta-analizde *GBA1*-PH grubunda 2,87 yıl daha erken başlangıç yaşı saptanmıştır(149).

REM uyku bozukluğu, halüsinasyon, depresyon, hiposmi gibi motor dışı semptomlar *GBA1* ilişkili PH’de daha baskındır(10,77,150). Hiposmi ya da anosmi

PH tanısı olan hastaların 90%'ından fazlasında gelişir ve Bohnen ve ark. yaptıkları bir çalışma ile hiposminin PH erken dönemde bir belirteci olabileceği belirtilmiştir(151). Yapılan başka bir çalışmada özellikle GH tanılı hastalarda ve heterozigot *GBA1* taşıyıcılarında hiposmi, PH motor semptomları öncesinde ortaya çıkan en erken ve en sensitif belirteç olarak karşımıza çıkmaktadır(152).

REM (Rapid Eye Movement) uykusu davranış bozukluğu (RDB), özellikle normalde kasların atonik olması gereken REM uykusu sırasında görülen rüyalarla ilişkili olarak görülen seslendirmeler, ani hareketler ve motor davranışlarla karakterizedir. RDB α -sinükleopatilerin akümüasyonu ile giden PH, LCD ve MSA gibi nörodejeneratif hastalıkların ön belirtisi olarak karşımıza çıkabilir. Çünkü RDB tanılı hastalara bakıldığında >80'i bir dekat içerisinde bu hastalıkları geliştirir(153). Şiddetli ve hafif *GBA1* varyantlarının farklı etkileri olabileceğini belirten başka bir çalışmada *GBA1* varyantları artmış RDB riski ile ilişkilendirilmiştir(154).

PH'sa saptanan genetik faktörler olası bilişsel gerileme ve demans için bir belirteç olarak karşımıza çıkabilmektedir. Özellikle L444P ve N370S varyantlarına sahip hastalar kontroller ile karşılaştırıldığında zayıf bilişsel sonuçlar göstermişlerdir. *GBA1* ilişkili demans hastalarının oranı E326K polimorfizmi ile birlikte %10 civarına çıkabilir(155). Bu bulgulara karşılık son yıllarda Leocadi ve ark. tarafından yapılan 10 kişilik *GBA1*-PH ve 20 kişilik *GBA1*(-) PH hasta grubunun boylamsal olarak 5 sene izlendiği bir çalışmada iki grup arasında benzer bilişsel profile rastlanmıştır. Sınırlı hasta grubu bu çalışmanın önemli sınırlılıklarından biridir. Buna rağmen *GBA1*-PH hasta grubunda MRI bulgularında arka bölgelerde daha fazla kortikal incelme ve frontal (üst, alt ve orta) ve orbito-frontal loblarda ek olarak daha fazla tutulum saptanmıştır(156). Bilişsel gerilemenin *GBA1*-PH grubunda daha belirgin olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur(157–159).

2.3.3. Lewy cisimcikli demans

1912 yılında Alman nöroloji doktoru Friedrich Lewy Dr. Alois Alzheimer'ın laboratuvarında PH ile ilgili çalışmalarını yürütürken dorsal vagal çekirdekte ve Meynert'in bazalis çekirdeği nöronlarındaki LC fark etmiştir(19,160). Nöronlar ve glial hücrelerde biriken LC α -sinüklein agregatlarını içerir ve sinükleinopatiler adı

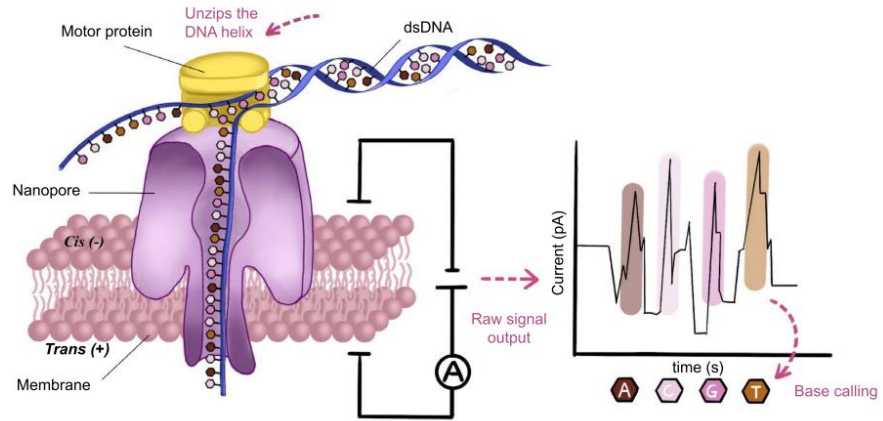
verilen bir grup nörodejeneratif hastalıkta görülür. LC hastalıkları en sık görülen sinükleopatilerdir ve bu hastalıklar içerisinde PH, PH demansı(PHD), LCD vardır(161). LCD iki klinik tablodan oluşur: PHD ve LC ile görülen demans. Demans bulguları motor semptomlardan en az 1 yıl önce çıkıyorsa LC ile görülen demans tanısı konur. Kesin PH tanısı olan hastada tanıdan en az bir yıl sonra başlayan bilişsel belirtiler PHD'ni işaret eder(160). Klinik uygulamada sıklıkla karışan bu iki hastalığı birbirinden ayırmak hastalığın ilerleyen dönemlerinde oldukça zordur ve hasta öyküsünde sadece hastanın mevcut fenotipinin değil motor ve bilişsel semptomların ortaya çıkış sırasının belirlenmesi oldukça önemlidir.

LCD toplumdaki demans hastalarının % 4,2'sinde saptanır.(161) Demans hastanın yaşamını etkileyerek mesleki ve günlük aktivitelerini bozacak düzeyde ilerleyici bilişsel bozulma olarak tanımlanır ve LCD tanısı için olmazsa olmaz kriterlerdir. Bunun yanında çekirdek klinik özellikler şunlardır: Dalgalanan bilinç, görsel halüsinasyonlar, REM uykusu davranış bozukluğu ve parkinsonizm(162). Bilinç dalgalanmaları dikkat ve uyanıklıkta bozulma ile ortaya çıkar ve LCD erken dönemlerinde belgelenmesi LCD tanısı için oldukça önemlidir. İyi biçimlendirilmiş tekrarlayan görsel halüsinasyonlar LCD hastalarının %80'inde karşımıza çıkar. parkinsonizm varlığından bahsetmek için PH kardinal motor bulgularından birinin varlığı yeterlidir. Genellikle LCD hastalarının %85'inde mevcuttur(162).

LCD hastalarında *GBA1* mutasyonu taşıyıcılığı çok merkezli bir çalışmada anlamlı olarak ilişkili (OR:8,28, 95% CI, 4,78–14,88) olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada *GBA1*-LCD ilişkisinin *GBA1*-PH ilişkisinden daha güçlü olabileceği belirtilmiştir(163). Shiner ve ark. yaptıkları çalışmada özellikle Aşkenazi Yahudilerinde bulunan %6,35'lik *GBA1* taşıyıcılık oranına karşılık, LCD tanılı Aşkenazi Yahudilerinde istisnai derecede yüksek mutasyon sıklığını (%31) ortaya çıkarmışlardır. Bu popülasyonda *GBA1* taşıyıcılığı olan bireylere bakıldığında çoğunluğunun 70-80 yaşına kadar herhangi bir hastalık geliştirmemesine rağmen bazı bireyler PH, bazı bireyler LCD geliştirmektedir. Bu fenotipik farklılığın sebebinin ileri araştırmaların konusu olabileceğini belirtmişlerdir(164).LCD ve *GBA1* geni arasında ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur(165,166).

2.4. Nanopor dizileme

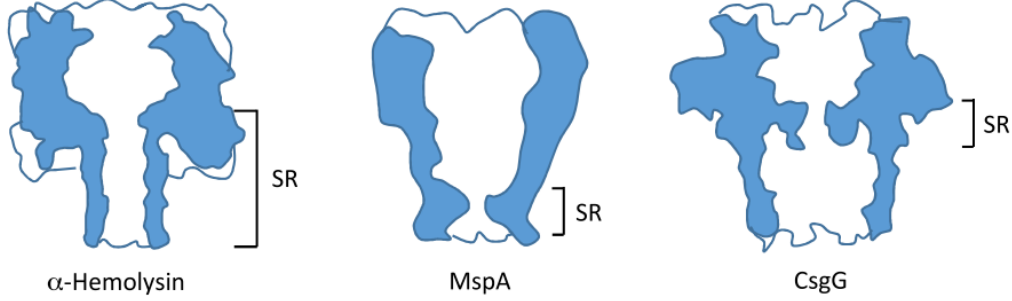
1989 yılında Profesör David Deamer bir lipozom membran üzerine yerleştirilen bir protein kanalların yani nanogözeneklerin DNA veya RNA moleküllerini dizilemek için kullanılabileceği fikrinin notlarını almıştır(167). Bugünkü nanopor dizilemeye bakıldığında, bir flow cell içerisinde çeşitli sayıda nanogözeneklerin bulunduğu bir membran ile ayrılan iki iyonik çözelti dolu bölmeden oluşur. Çözeltilere uygulanan sabit voltaj akımı sebebiyle nanogözenekten geçen bir iyonik akım vardır ve gözenekten geçen biyolojik molekülün kanalı bloke ederek bu iyonik akımda yaptığı değişiklikler biyosensör tarafından ölçülür. DNA içerisinde bulunan her bir bazın iyonik akımda yarattığı karakteristik dalgalanmalar, analiz algoritmaları tarafından okunarak baz tanıma yapılır ve DNA dizisi haline getirilir(27). Tek iplikli DNA'nın nanogözenekten geçişi motor protein tarafından kontrol edilir. Optoelektronik teknolojinin sınırlılıkları nedeniyle DNA'nın ultra hızlı geçişi düşük doğrulukla sonuçlanır. Bu nedenle motor proteinin görevi bu geçişi yavaşlatmaktır. Nanopor teknolojisinin şematik özeti Şekil.7'de gösterilmiştir(168)



Şekil 7: Nanopore teknolojisi özeti (Chen ve ark.)

Nanopor dizileme DNA polimeraz bağımlı değildir. DNA fragmanları orijinal haliyle gerçek zamanlı olarak okunurlar. Bu sayede DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonları direk olarak tespit etmek mümkün olmaktadır(168). Şekil.8'de üç farklı nanopor gözeneği gösterilmiştir: a-hemolizin gözeneği, MspA gözeneği ve CsgG gözeneği. ONT şu anda CsgG gözeneğini kullanmaktadır. SR olarak gösterilen bölgeler nanoporun biyosensör bölgelerini işaret etmektedir. MspA ve CsgG gözeneği

algılama bölgesinin kısa olması sayesinde her geçişte daha az sayıda nükleotit okunarak daha doğru baz belirlenmesi sağlanır(27).



Şekil 8: Çeşitli nanogözenek türleri (van Dijk ve ark.)

Şu anda üç farklı çeşit nanopore dizileme yöntemi bulunmaktadır: 1D, 2D, 1D². Tek DNA ipliğinin dizilendiği 1D teknolojisi ilk karşımıza çıkan yöntemdir. Daha sonra bulunan iki DNA ipliğinin bir saç tokası yapısı ile birbirine bağlanarak her iki DNA iplikçığının de okunduğu 2D yöntemi ise daha yüksek doğrulukla dizilemeyi sağlamaktadır. 1D² yöntemi ise 2D yöntemi gibi her iki ipliğin de okunmasına dayanır ancak iki ipliği birbirine fiziksel olarak bağlanması vardır. Saç tokası yapısı yoktur(169). Teorik olarak nanopore teknolojisinin okuma uzunluğunun sınırı yoktur ve 1 Mb'lık uzunluklar şu anda olasılık dahilindedir. Özellikle MinION son derece uygun fiyatlı ve küçük boyutları sebebiyle rahat taşınabilir. Hızlı kitleri sayesinde saha çalışmaları için uygundur. Özellikle 1D yöntemi için ~%15 hata oranı, 1D² yöntemi için ~%3 hata oranı belirtilmektedir(27).

Üçüncü nesil dizileme yöntemleri ile *GBAI* geni dizilemesi ve izlenecek çalışma çerçevesini belirleyen öncü çalışmalar son yıllarda karşımıza çıkmaktadır Leija-Salazar ve ark. PH ve GD tanılı *GBAI* mutasyonuna sahip 102 hasta ile yaptıkları çalışmalarında *GBAPI* psödogenini dizilemeden, yüksek multipleks kapasitesinde faz bilgileriyle tam uzunlukta *GBAI* dizilimi sağlamışlardır. Bu çalışma *GBAI* ekzonik ve intronik varyantları ve rekombinant alelleri tespit etmek için nanopor kullanılan öncü bir çalışmadır. Psödogene minimal hizalama gördükleri bu çalışma sayesinde akraba analizi gerektiren haplotip fazlandırma problemini çözmüşlerdir(24). PH tanılı kohortta yapılan başka bir çalışma *GBAI* geni nanopor ile dizilenmiş ve bu varyantları Sanger ile doğrulamışlardır. 229 PH ve 50 sağlıklı kontrol ile yapılan bu çalışma *GBAI*

varyantlarını tanımlamak için nanopor kullanımının yüksek verimli bir yöntem olabileceğini ortaya çıkarması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca nanoporun kesin haplotipleri tanımlamayı sağlaması açısından ikinci nesil dizilemeden üstünlüğünü göstermiştir(25).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta seçimi

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yürütüldü. Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 15.05.2024 tarihli 2024/17-22 numaralı onayı ile gerçekleştirildi (Ek-1).

Çalışmanın başlangıcında Haziran 2019 ile Temmuz 2024 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniklerine PH ve Demans ön tanısı veya aile taraması amacıyla ile başvuran danışanların Tıbbi Genetik hasta dosyaları ve Probel HBYS sistemi kayıtları geriye dönük olarak incelendi. Bu iki tanı ile başvurarak Tablo.3'teki Demans YND paneli çalışılan hastalar içerisinde *GBA1* geninde patojenik/muhtemel patojenik/klinik önemi bilinmeyen varyantlar saptanan hastalar içerisinde çalışmaya gönüllü katılımı kabul eden hastalar dahil edildi.

Tablo 3: Demans YND paneli gen içeriği ve transkriptleri

YND paneli gen içeriği ve transkriptleri			
<i>A2M</i> (ENST00000318602),	<i>AAAS</i> (ENST00000209873)	<i>ACE</i> (ENST00000290866)	<i>APOE</i> (ENST00000252486)
<i>APP</i> (ENST00000346798)	<i>ATP13A2</i> (ENST00000326735)	<i>ATP1A3</i> (ENST00000545399)	<i>C9orf72</i> (ENST00000380003)
<i>CHMP2B</i> (ENST00000263780)	<i>CSF1R</i> (ENST00000286301)	<i>DCTN1</i> (ENST00000361874)	<i>DNMT1</i> (ENST00000359526)
<i>EIF4G1</i> (ENST00000424196)	<i>FBXO7</i> (ENST00000266087)	<i>FUS</i> (ENST00000254108)	<i>GCH1</i> (ENST00000491895)
<i>GBA1</i> (ENST00000368373)	<i>GRN</i> (ENST0000053867)	<i>HTRA2</i> (ENST00000258080)	<i>LRRK2</i> (ENST00000298910)
<i>MAPT</i> (ENST00000344290)	<i>MPO</i> (ENST00000225275)	<i>NOTCH3</i> (ENST00000263388)	<i>PARK7</i> (ENST00000493678)
<i>PINK1</i> (ENST00000321556)	<i>PLA2G6</i> (ENST00000332509)	<i>POLG</i> (ENST00000268124)	<i>PRKN</i> (ENST00000366898)
<i>PRKRA</i> (ENST00000325748)	<i>PRNP</i> (ENST00000379440)	<i>PSEN1</i> (ENST00000324501)	<i>PSEN2</i> (ENST00000366783)
<i>SLC6A3</i> (ENST00000270349)	<i>SNCA</i> (ENST00000394986)	<i>SNCB</i> (ENST00000310112)	<i>SORL1</i> (ENST00000260197)
<i>SQSTM1</i> (ENST00000389805)	<i>TAF1</i> (ENST00000423759)	<i>TARDBP</i> (ENST00000240185)	<i>TH</i> (ENST00000381178)
<i>TREM2</i> (ENST00000373113)	<i>TYROBP</i> (ENST00000262629)	<i>UBQLN2</i> (ENST00000338222)	<i>UCHL1</i> (ENST00000284440)
<i>VCP</i> (ENST00000358901)	<i>VPS35</i> (ENST00000299138)		

Çalışmaya dahil edilme ve dışlama kriterleri Tablo 4'te özetlenmiştir. Bu kriterlere uyan hastalar belirlenerek telefon numaraları Probel hastane kayıt sistemi ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Polikliniğinde bulunan hasta dosyalarından iletişim bilgileri elde edilerek iletişime geçildi. İletişime geçilen olgular ayrıntılı öykü, özgeçmiş, soy geçmiş ve fiziksel muayene değerlendirilmesi yapıldı ve çalışmaya katılmaya gönüllü olan olgulardan aydınlatılmış onam formu alındı (Ek-2). Çalışmayı kabul eden hastaların *GBA1* genindeki varyantlarını tekrar değerlendirmek üzere nanopor dizileme uygulandı.

Tablo 4:Çalışmaya dahil edilme ve dışlama kriterleri

Dahil Olma Kriterleri:	Dışlanma Kriterleri:
• Muhtemel patojenik/patojenik/ klinik önemi bilinmeyen <i>GBA1</i> varyantı saptanan demans ve/ve ya PH tanılı hastalar • Aile taraması veya segregasyon analizi amaçlı değerlendirilen indeks olgunun aile üyeleri • Dosya kayıtlarının tam olması • Genetik testinin sonuçlanmış olması ve hasta katılımı	• Dosya kayıtları eksik olan hastalar • Genetik analizi tamamlanmamış olan hastalar • Sekonder parkinsonizm ve vasküler parkinsonizm/demans tablosu varlığı • Ciddi kafa travması öyküsü varlığı

3.2. Olgularının Değerlendirilmesi ve Verilerin Toplanması

Çalışmaya katılan olguların doğum tarihleri, yaşları, cinsiyetleri, ilk semptomu, semptom başlama yaşı, mevcut semptomları, mevcut tedavileri sorgulandı. Olguların özgeçmiş ve soygeçmişleri sorgulanarak en az 3 kuşağı dahil edecek şekilde aile ağaçları çizildi. Seçilen olgulara rutin poliklinik hizmetleri kapsamında uygulanan Demans Sendromları YND paneli tetkik sonuçları Dokuz Eylül Genteik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi arşivlerinden temin edildi. Yapılan genetik tetkikler ve sonuçları hastalara anlatılarak genetik danışmanlık verildi. Çalışma anlatılarak var olan genetik sonuçlarının başka bir yöntem ile tekrar değerlendirileceği belirtildi. Hasta ile ilgili veriler veri kayıt formuna işlendi. (Ek-3)

3.3. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Oluşturulan gönüllü çalışma grubundaki hastalardan DNA izolasyonu için EDTA'lı tüplere 4 ml periferik kan örneği alındı. Teslim alınan örnekler sistem üzerinden kontrol edilip en az 3 belirleyici etiket ile laboratuvar hasta listesine kaydedilmektedir. Safılaştırılmış total genomik DNA elde edilmesi amacıyla QIAamp® DNA Blood Mini kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Her olgunun 200 µl kanından spin kolon DNA izolasyon tekniği ile üreticinin önerdiği protokoller uygulanarak manuel olarak DNA eldesi yapılmıştır. Çalışma aşamaları Tablo 5'te özetlenmektedir.

Tablo 5: Periferik kandan genomik DNA izolasyonu

Periferik kandan genomik DNA izolasyonu	1. 20 µl proteinaz K, 200 µl ligasyon buffer solüsyon ve 200 µl periferik kan 1.5ml mikrosentrifüj tüpüne eklenir. 56 °C’de 10 dakika inkübasyonda bırakılır.
	2. 200 µl etanol (%96-100) örneğe eklenir ve 15 sn vortekslenir..
	3. Karışım spin kolona nakledildi. Spin kolon temiz 2 ml toplama tüpüne konulur.
	4. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilir. Filtrat atılır.
	5. 500 µl ‘Wash buffer 1’ eklenerek spin kolon yeni bir temiz 2 ml toplama tüpüne konulur.
	6. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilerek filtrat atılır.
	7. 500 µl ‘Wash buffer 2’ eklenerek spin kolon yeni bir temiz 2 ml toplama tüpüne konur.
	8. 20000xg’de 3 dk santrifüj edilerek filtrat atılır.
	9. Spin kolon temiz 1.5 ml mikrosentrifüj tüpüne alınır ve 100-200 µl ‘Elution buffer’ veya distile su eklenerek 1-5 dk oda sıcaklığında bekletilir.
	10. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilerek spin kolonlar atılır.
	11. Elde edilen DNA’lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, parafilmle ağızları kapatılarak DNA saklama kutularına konulup -20°C’de saklanır.

3.4. DNA Miktarlarının Florometre ile Ölçülmesi

Bu nanopor cihazının kalite standartları gereğince DNA miktarları Invitrogen-Qubit™ 4 Fluorometer cihazında ölçülmüştür. DNA örneklerinin miktarlarının florometre ile ölçüm basamakları Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6: DNA İzolatları Miktarlarının Florometre ile Ölçülmesi

DNA Miktarlarını Florometre ile Ölçülmesi	1. İki standart ve numuneler için gerekli sayıda Qubit tüpünü hazırlanır. Kalibrasyon için iki standart gereklidir ancak her ölçümde kalibrasyon gerekli olmasa da kritik değerlere sahip örnekler için kalibrasyon yapılması önerilmektedir.
	2. Standartlar S1 ve S2 olacak şekilde tüp kapakları işaretlenir. Tüp yanlarına ölçümü etkileyebileceği içim işaretleme yapılmaz.
	3. Qubit çalışma solüsyonu 199 µl kit tamponu ve 1 µl kit reaktif (reagent) olacak şekilde 1:200 oranında hazırlanır. Her bir örnek için hazırlanır.
	3. Standartlar için 200 µl'lik tampon-reagent karışımından 190 µl kondu ve üzerine 10 µl standart eklenir.
	3. Örnekler için, cihaza özgü tüpe 200 µl'lik tampon-reagent karışımından 199 µl kondu ve üzerine 1 µl DNA izolatu eklenir. Tüpler birkaç saniye vortekslenir.
	4. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.
	5. Standart 1 ve Standart 2 sırasıyla okutularak kalibrasyon yapıldı.
	6. Örnek tüpleri cihaza yerleştirilerek okuma yapıldı.
	7. DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GBA1 geni ve *GBAP1* psödojenini kapsayacak amplifikasyonu sağlamak için polimeraz zincir reaksiyonu Roche Lightcycler 96 kullanılarak yapılmıştır. *GBA1* ve *GBAP1*'i ayrı ayrı içeren iki ampikonu oluşturan 2 ileri 2 ters primer kullanılmıştır (170). 6333 bp ve 8916 bp'lik alanı kapsayan bu iki primer çifti bir havuzda toplanarak kullanılmıştır.

Tablo 7:PZR için kullanılan primer çiftleri, ampikon uzunlukları ve Tm değerleri

<i>GBA1</i> - ileri primer	TCCTAAAGTTGTCACCCATACATG	Tm- 58,5C	8916 bç
<i>GBA1</i> - ters primer	CCCAACCTTTCTTCCTTCTTCTCAA	Tm-60,9C	
<i>GBAP1</i> ileri primer	GTGTCCGTTCTCCACATCCTTG	Tm-63,7C	6333 bç
<i>GBAP1</i> - ters primer	AGCCTTCCTTCCTTCCCTGCAT	Tm-61,2C	

20 µL PZR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım içerisinde Tablo.8’de verilen miktarlar kullanılmıştır. Bu karışım Tablo 9’daki PZR koşullarında reaksiyona sokulmuştur.

Tablo 8:PZR karışımı içeriği

20 µL PZR karışımı
10 µL MobiomX- HiFi Taq Master Miks
2 µL primerler
80 ng DNA olacak şekilde ayarlanmış değişen hacimlerde DNA örneği
DNA örnek hacmini 8 µL’ye tamamlayacak miktarda su

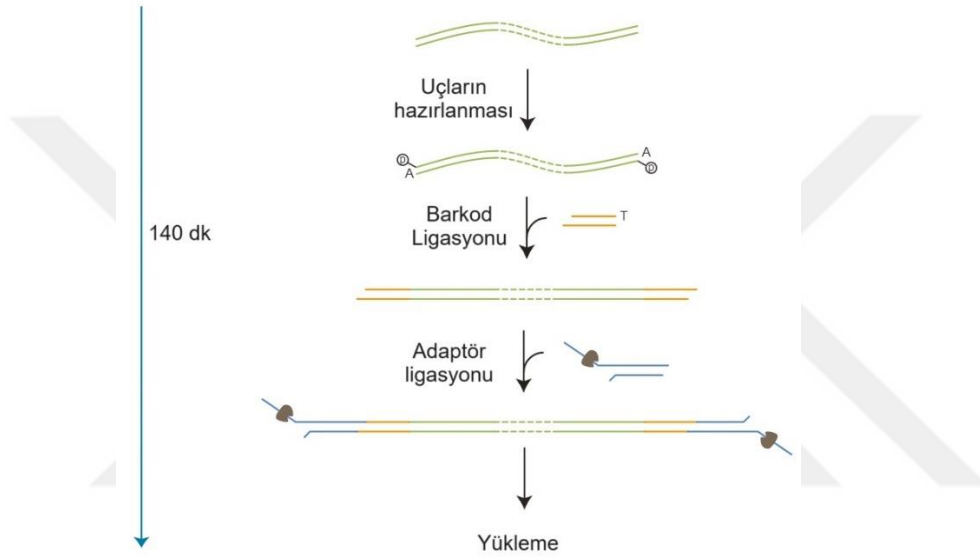
Tablo 9:PZR koşulları

PZR koşulları	1) 95°C de 3 dakika
	2) 35 döngü; 95°C'de 30 saniye denatürasyon; 60°C'de 1 dakika annealing; 72°C'de 10 dakika uzatma;
	3) 72°C'de 10 dakika tek bir son uzatma.

PCR amplifikasyonunun kalitesi etidyum bromür boyalı %0,5 agaroz jel kullanılarak kontrol edildi. PCR sonrası çoğaltılan PCR ürünlerinin miktarı, florometrik yöntem ile Qubit® 4.0 Florometre (Invitrogen) cihazında ölçüldü. Nanopor dizileme için 75 fmol PCR ürünü olacak şekilde uygun hacimde kullanıldı.

3.6. Kütüphane Hazırlama ve Oxford Nanopor MinION™ dizilenmesi

11 olgu ve 1 pozitif kontrole ait DNA izolatlarından elde edilen PCR ürünlerinin barkodlanması, flow cell'in hazırlanması ve yüklenmesi Oxford Nanopore Technologies (ONT) Native Barcoding Kit 96 V14(SQK-NBD114.96) kullanılarak ONT tarafından sağlanan protokole (Sürüm: NBA_9170_v114_revN_15Sep2022) uygun olarak uygulandı. Kütüphane hazırlanma aşamasının ana basamakları Şekil.9'da gösterilmiştir.



Şekil 9:Kütüphane hazırlanma aşamasının ana basamakları

3.6.1. DNA uçlarının hazırlanması

Bir DNA Kontrol Numune (DCS) tüpüne doğrudan 105 µl Elüsyon Tamponu (EB) eklenerek DCS seyreltilir. 75 fmol DNA olacak şekilde alikotlanan her bir DNA örneği 0,2 ml PCR tüplerine alınarak nükleaz-ari su ile 11,5 ul'ye tamamlanır ve pipetleme yapılır. Her bir tüpe Tablo 10'da belirtilen bileşenler ile karışım hazırlanır. Pipetleme yapılır ve santrifüjde çevrilir. Bir SimpliAmp Thermal Cycler kullanarak 20°C'de 10 dakika ve 65°C'de 10 dakika inkübe edilir.

Tablo 10:Her bir örnek için hazırlanacak karışımın bileşenleri

75 fmol ampikon DNA içeren hacimde DNA
örneği ve bu hacmi 11.5 µl'e tamamlayacak kadar su
1 µl dilüe edilmiş DCS

1.75 µl Ultra II End-prep Reaction Tamponu
0.75 µl Ultra II End-prep Enzim Mix

Yeterli PCR ürünü oluşmamış düşük konsantrasyona sahip örnekler için maksimum hacimde DNA örneği girilmiştir.

3.6.2. Barkodların DNA uçlarına bağlanması

Her bir numune için tek bir barkod seçilir. (NB81-93) Her bir numune için 0,2 ml PCR tüplerine Tablo 11’deki karışım hazırlanır. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir.

Tablo 11:Barkod ligasyonu için gerekli bileşenler

3,75 µl Uçları hazırlanmış DNA
1,25 µl Native Barcode
5 µl Blunt/TA Ligase Master Mix

İnkübasyon sonrası her bir tüpe 1 ul Şeffaf kapaklı EDTA’dan her tüpe aynı anda olacak şekilde eklenir. Bu şekilde barkodlamanın aynı anda durdurulması sağlanır. Pipetleme ve kısa santrifüj yapılır. Tüm barkodlu numuneleri 1,5 ml Eppendorf tüpünde toplanır. Tüpe 0,4X AMPure XP Beads (AXP) eklenir ve hazırlanan toplu barkodlu örnekler AMPure XP ile saflaştırılır. Saflaştırma basamakları Tablo.12’da gösterilmiştir

Tablo 12: AMPure XP ile saflaştırma basamakları

AMPure XP ile saflaştırma basamakları	Tüpe 0,4X AMPure XP Beads (AXP) eklenir ve tüp hafifçe vurarak karıştırılır.
	Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karıştırılarak inkübe edilir.
	Nükleaz içermeyen su ile taze 2ml 80% etanol hazırlanır.
	Numune havuzu berrak ve renksiz olana kadar mıknatıs üzerinde beadsler toplanır.
	Tüp mıknatıs üzerindeyken süpernatant alınır.
	Hala mıknatısın üzerinde olan tüpdeki beadler, peleti bozmadan 700 µl taze hazırlanmış %80 etanol ile yıkanır. Ve etanol pipet yardımıyla atılır ve Önceki adım tekrarlanır
	Tüp mıknatıs üzerine geri konur. Rezidü kalan etanol de pipetlenir ve 30 saniye kurumaya bırakılır.
	Tüp mıknatıstan alınır ve peleti 37 µl Nükleaz içermeyen su eklenir ve 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilir.
	Eluat berrak ve renksiz olana kadar beadler bir mıknatıs üzerinde çöktürülür.
	Temiz bir 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind tüpünde 37 µl eluatı alınır ve saplanır. Beadleri içeren pelet atılır.

- Qubit florometre kullanarak ölçüm yapılır.

3.6.3. Dizileme adaptörlerinin DNA uçlarına bağlanması

Karıştırılmış ve barkodlanmış numuneler adaptör ligasyonu için Tablo 13'te belirtilen bileşenler kullanılarak 1,5 ml Eppendorf tüpünde hazırlanır ve 30° C'de 25 dakika boyunca inkübe edilir.

Tablo 13: Adaptör ligasyonu için gerekli bileşenler

35 µl barkodlanmış toplu örnekler
5 µl Native Adapter (NA)
50 µl NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (2X),
10 µl Quick T4 DNA Ligase

Numune tüpünün içerisine 50 µl AMPure XP beadleri (AXP) eklenir ve pipetleme yapılır. 37° C'de 10 dakika boyunca bir karıştırılarak inkübe edilir. Tüp kısa santrifüj yapılır. Eluat berrak ve renksiz olana kadar mıknatıs üzerinde beadsler toplanır. Süpernatantı pipetle alınır. 125 µl Long Fragment Buffer (LFB) eklenerek beadler yıkanır. Hafifçe vurularak karıştırılır. Tüp kısa santrifüj yapılır. Eluat berrak

ve renksiz olana kadar mıknatıs üzerinde beadsler toplanır. Süpernatantı pipetle alınır. Önceki adım tekrarlanır. Tüp kısa santrifüj yapılır. Süpernatantı pipetle alınır.

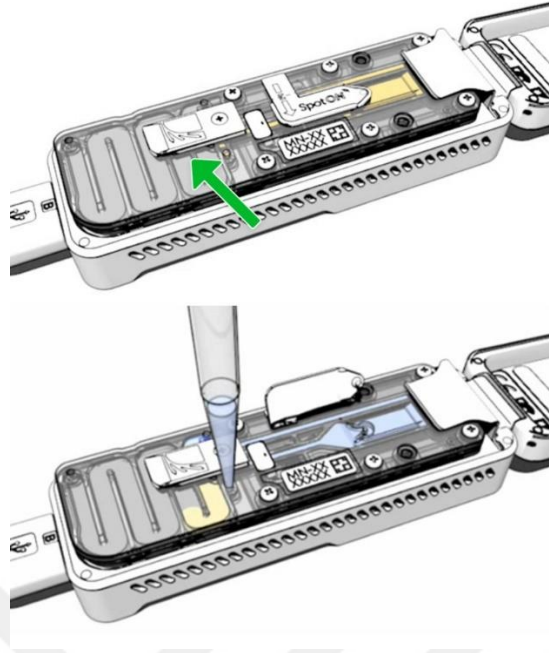
Tüpleri mıknatıstan alınır ve pelete 15 µl elution tamponu (EB) eklenir. Tüp kısa santrifüj yapılır ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilir. 2 dakikada bir numuneyi 10 saniye boyunca hafifçe vurarak çalkalanarak karıştırılır. Eluat berrak ve renksiz olana kadar en az bir dakika olacak şekilde mıknatıs üzerinde beadsler toplanır. DNA kütüphanesini içeren 15 µl eluatı temiz bir 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind tüpüne çıkarılır ve saklanır.

- Bir Qubit florometre kullanarak numunenin 1 µl'si için ölçüm yapılır.
- DNA kitaplığının 35-50 fmol'ünü Elution tamponu (EB) ile 12 µl'ye hazırlanır.

3.6.4. Flow cell'in hazırlanması ve DNA kitaplığının flow cell'e yüklenmesi

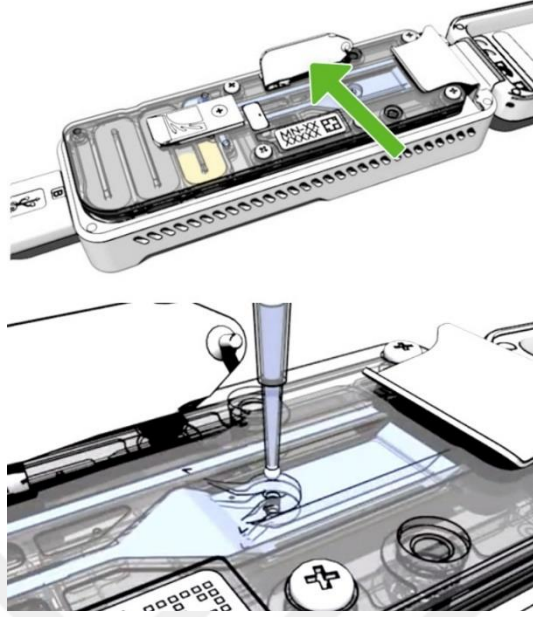
Flow cell hazırlama karışımı için sırasıyla; 1,170 µl Flow Cell Flush (FCF) ve 30 µl Flow Cell Tether (FCT) karıştırılır ve pipetleme yapılır

MinION cihazının kapağını açılarak flow cell takılır. Flow cell hazırlama portu üzerindeki kapak saat yönünde kaydırılarak açılır. Hazırlama portu açılımı ve hazırlama karışımı yükleme işlemi Şekil.10'da gösterilmiştir(171). Kapağın altında küçük bir hava kabarcığı olup olmadığını kontrol edilir. Hazırlama portu yoluyla flow cell hazırlama karışımının 800 µl'sini yüklenir.



Şekil 10: Hazırlama portu açılımı(üst) ve hazırlama karışımı yükleme işlemi(alt)

Yükleme DNA kütüphanesini hazırlamak için sırasıyla 37.5 µl dizileme tamponu (SB), 25.5 µl Library Beads (LIB) ve 12 µl DNA kütüphanesi karıştırılır. SpotON numune bağlantı noktasının kapağını yavaşça kaldırılır. Şekil.11’de üst kısımda gösterilmiştir(171). Flow cell hazırlama portuna 200 ul hazırlama karışımını yüklenir. Hazırlanan kitaplığı pipetleme yaptıktan sonra 75 ul'sini SpotON örnek portu aracılığıyla flow cell’e damla damla eklenir. Şekil.11’de alt kısımda gösterilmiştir(171).



Şekil 11:SpotON numune bağlantı noktasının kapağının açılması(üst) ve örnek kütüphanesinin yüklenmesi(alt)

Cihaz kapağını kapatılır ve MinKNOW(24.06.10)’ da bir dizileme çalışması ayarlanır. Çalışma maksimum süresi 72 saat olarak belirlenmiştir. Por tarama sıklığı 1,5 saatte bir olacak şekilde ayarlanmıştır. Minimum Q skoru 9 olarak belirlenmiştir ve 1 kb’dan küçük olan okumalar filtrelenmiştir. Flow cell tipi FLO-MIN114’dır ve Flow cell ID FBA07994 olarak saptanmıştır. Kit olarak SQK-NBD114-96 seçilmiştir.

Sekanslama işlemi başlatılır.

3.7. Biyoinformatik

3.7.1. Haritalama ve hizalama

Hizalama aracı olarak Minimap2 (versiyon 2.2.0) kullanılmıştır. NCBI’den indirilen GRCh37- hg19 referans kromozom-1’e hizalanmıştır. Hizalama sonrası BAM dosyası elde edilmiştir.

3.7.2. Varyant Çağırma

Samtools (versiyon 1.20) isimli araç kullanılarak elde edilen BAM dosyaları indexlenmiş ve ardından varyant çağırma adımına geçilmiştir. Varyant çağırma

algoritması olarak Clair3 (versiyon v1.0.10) kullanılmıştır. Clair3 çalıştırılırken minimum SNP alel frekansını belirleyen parametre olan *–snp-min-af* parametresi 0.08, minimum indel frekansını belirleyen parametre olan *–indel-min-af* 0.15 olarak kullanılmıştır.



4. BULGULAR

Çalışmaya Haziran 2019 ile Temmuz 2024 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniklerine PH ve/veya demans ön tanısı ya da aile taraması amacıyla başvurarak yeni nesil hedefli gen paneli ve/veya sanger çalışılan 232 olguya ait hasta dosyalarının incelenmesi ile başlanmıştır. 232 hasta içerisinde 9 tanesi (3.88%) aile taraması amacıyla, 167 tanesi demans (71.98%) ve 56 tanesi (24.14%) PH tanısıyla polikliniğimize başvurmuştur.

Bu retrospektif araştırma sonucunda dosya taraması yapılan 232 olgunun 18 tanesinde (7.76%) 19 *GBA1* geni varyantı tespit edilmiştir. *GBA1* geninin araştırıldığı transkriptler Tablo 14’te gösterilmiştir. Bunlardan 4 tanesi (Olgu 8-9-10-11) ve 2 tanesi (Olgu 12-13) aynı varyantı taşımaktadır. 1 tanesi de (Olgu 5) 2 *GBA1* varyantına sahiptir. Olgu 5’e ait varyantlardan bir tanesi Olgu 4 ile aynıdır. Olgu 16 ve 17 indeks vaka olmak üzere sağlıklı olgu 18 aynı aileden üç bireydir. Bu üç olguda da beklendiği gibi aynı varyant saptanmıştır. *GBA1* varyantı saptanan hastaların özellikleri Tablo 15’de özetlenmiştir.

Tablo 14:Olgulardaki GBA1 geni varyantlarının transkriptleri

Olgu 2-6-7-9-10-11-13-14	<i>GBA1</i> (ENST00000327247)
Olgu 1-3-4-5-8-12-15-16-17-18	<i>GBA1</i> (ENST00000368373)

Tablo 15: *GBAI* varyantı taşıdığı saptanan olgular ve özellikleri

	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Gen	Ekzon	HGVSc	HGVSp	dbSNP	Zigosite	ACMG sınıfı
Olgu 1	67	Erkek	Demans	<i>GBAI</i>	3	c.149A>G	p.Tyr50Cys	-	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 2	76	Kadın	PH	<i>GBAI</i>	6	c.533del	p.Pro178LeufsTer22	rs397518434	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 3	73	Erkek	Demans	<i>GBAI</i>	6	c.663C>G	p.Pro221=	-	Heterozigot	Klinik önemi bilinmeyen
Olgu 4	22	Kadın	Sağlıklı	<i>GBAI</i>	7	c.882T>G	p.His294Gln,	rs367968666	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 5	53	Kadın	PH	<i>GBAI</i>	7	c.882T>G	p.His294Gln,	rs367968666	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
					9	c.1342G>C	p.Asp448His,	rs1064651	Heterozigot	Patojenik
Olgu 6	40	Kadın	PH	<i>GBAI</i>	8	c.922G>A	p.Ala308Thr,	rs368425393	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 7	64	Erkek	PH	<i>GBAI</i>	8	c.928A>G	p.Ser310Gly,	rs1057942	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 8	68	Kadın	Demans	<i>GBAI</i>	9	c.1223C>T	p.Thr408Met	rs75548401	Heterozigot	Klinik önemi bilinmeyen
Olgu 9	63	Erkek	Demans	<i>GBAI</i>	9	c.1223C>T	p.Thr408Met	rs75548401	Heterozigot	Klinik önemi bilinmeyen
Olgu 10	68	Erkek	Demans	<i>GBAI</i>	9	c.1223C>T	p.Thr408Met	rs75548401	Heterozigot	Klinik önemi bilinmeyen
Olgu 11	73	Erkek	PH	<i>GBAI</i>	9	c.1223C>T	p.Thr408Met	rs75548401	Heterozigot	Klinik önemi bilinmeyen
Olgu 12	66	Erkek	Demans	<i>GBAI</i>	9	c.1226A>G	p.Asn409Ser	rs76763715	Heterozigot	Patojenik
Olgu 13	55	Erkek	PH	<i>GBAI</i>	9	c.1226A>G	p.Asn409Ser	rs76763715	Heterozigot	Patojenik
Olgu 14	53	Erkek	Demans	<i>GBAI</i>	10	c.1346C>T	p.Thr449Met,	rs757930613	Heterozigot	Klinik önemi bilinmeyen
Olgu 15	68	Erkek	PH	<i>GBAI</i>	10	c.1448T>C	p.Leu483Pro	rs421016	Heterozigot	Patojenik
Olgu 16	42	Kadın	PH	<i>GBAI</i>	10	c.1495G>C	p.Val499Leu	rs369068553	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 17	43	Kadın	PH	<i>GBAI</i>	10	c.1495G>C	p.Val499Leu	rs369068553	Heterozigot	Muhtemel Patojenik
Olgu 18	32	Kadın	Sağlıklı	<i>GBAI</i>	10	c.1495G>C	p.Val499Leu	rs369068553	Heterozigot	Muhtemel Patojenik

Hasta gruplarına bakıldığında 56 tanesi (24.14%) PH tanısıyla polikliniğimize başvurmuştur. Bu hastalar içerisinde 9 hastada (16.07%) *GBAI* varyantı saptanmıştır. Bu hastalardan sadece Olgu 10'a ait varyant ACMG (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji) kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmaktadır. Patojenik ve muhtemel patojenik olarak değerlendirilen *GBAI* varyantlarına sahip PH tanılı hastaların oranı 14.29% (n=8) olarak saptanmıştır.

167 hasta demans (71.98%) tanısı ile polikliniğimize başvurarak tetkik edilmiştir ve bu hastalar içerisinde 7 hastada (4.19%) *GBAI* varyantı saptanmıştır. Bu hastalardan sadece 2 hastaya ait varyantlar ACMG (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji) kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırıldığı için patojenik *GBAI* varyantına sahip demans tanılı hastaların oranı 1.20% (n=2) olarak saptanmıştır.

ACMG (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji) kriterlerine göre yapılan patojenite sınıflamasına bakıldığında, 4 varyant patojenik (P), 9 varyant muhtemel patojenik (LP), 6 varyant klinik önemi bilinmeyen (VUS) olarak sınıflandırılmıştır.

GBAI varyantları, homozigot durumda neden oldukları GH tipine göre de sınıflandırılabilir. 19 varyant içerisinde saptanan 12 farklı varyantın 3 tanesi hafif tiptedir ve bu varyantlar non-nöropatik GH ile ilişkilidir. 3 tanesinde nöropatik GH ile ilişkili ağır tipte varyant saptanmıştır. 6 tanesinde ise GH fenotipine etkisi belirsiz ya da PH risk ilişkili varyant saptanmıştır (Tablo 16)

Tablo 16:Saptanan *GBAI* geni varyantlarının GH ciddiyetine göre sınıflaması

Hafif Varyantlar	Şiddetli Varyantlar	Belirsiz Varyantlar
c.928A>G (p.Ser310Gly)	c.533del (p.Pro178LeufsTer22)	c.663C>G(p.Pro221=)
c.1226A>G(p.Asn409Ser)	c.882T>G(p.His294Gln)	c.922G>A(p.Ala308Thr)
c.1448T>C(p.Leu483Pro)	c.1342G>C(p.Asp448His)	c.1223C>T(p.Thr408Met)
		c.1346C>T(p.Thr449Met)
		c.1495G>C(p.Val499Leu)
		c.149A>G(p.Tyr50Cys)

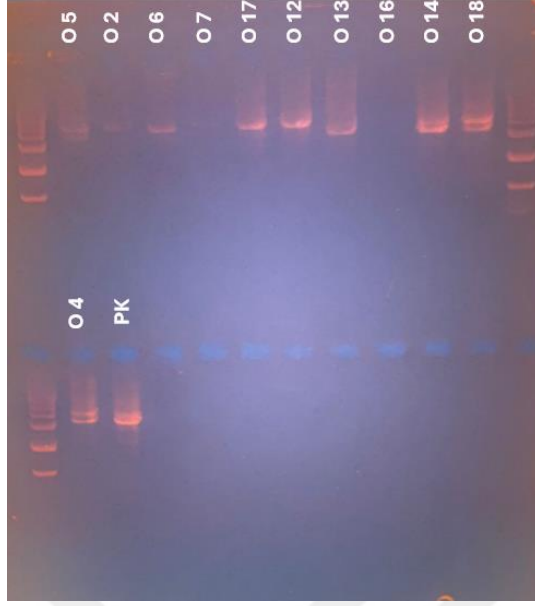
Patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen varyantlara sahip hastalar ile iletişime geçilerek çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen hastalar poliklinik kontrollerine çağırılmış ve veri kayıt formu doldurularak güncel klinik bilgileri alınmıştır. Olgulara genetik danışma verilmiştir. 11 hasta (**Olgu 2-4-5-6-7-12-13-14-16-17-18**) çalışmaya katılmayı kabul etmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalara periferik kandan yöntemde belirtilen şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır. PZR öncesi Nanodrop ve Qubit Florometre ile yapılan konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları ile PZR sonrası Qubit Florometre ile yapılan konsantrasyon ölçüm sonuçları Tablo 17’de verilmiştir. Olgu 4, Olgu 13 ve Olgu 14 en az başlangıç konsantrasyonuna sahip örnekler olmuştur. Olgu 4 aynı zamanda 1,79 saflık oranı ile 1,80-2,00 saflık sınırlarının dışında kalmıştır. Olgu 2, Olgu 4 ve olgu 16 ise PZR sonrası ölçümlerde en az konsantrasyona sahip örnekler olmuşlardır.

Tablo 17:Nanodrop ve Qubit Florometre ile yapılan konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları

	Nanodrop ölçümü	Qubit Florometre	
	Başlangıç konsantrasyonları ve saflık 260/280 nm	İlk Ölçüm PZR Öncesi başlangıç konsatrasyonları	İkinci Ölçüm PZR sonrası
Olgu 2	41,5 ng/μl - 1,93	40,6 ng/μl	13,9 ng/μl
Olgu 4	16,9 ng/μl - 1,79	12,2 ng/μl	20,8 ng/μl
Olgu 5	51,1 ng/μl - 1,91	58,2 ng/μl	39,9 ng/μl
Olgu 6	133,4ng/μl-1,89	24,4 ng/μl	32,2 ng/μl
Olgu 7	33 ng/μl - 1,88	34,4 ng/μl	61,0 ng/μl
Olgu 12	127,4ng/μl-1,89	39,2 ng/μl	53,2 ng/μl
Olgu 13	14,2 ng/μl – 1,96	8,54 ng/μl	50,6 ng/μl
Olgu 14	17,6 ng/μl - 1,90	13 ng/μl	63 ng/μl
Olgu 16	32,4ng/μl - 1,95	24 ng/μl	13,7 ng/μl
Olgu 17	135,6ng/μl-1,89	120 ng/μl	46,0 ng/μl
Olgu 18	31,8 ng/μl - 1,95	25,6 ng/μl	31,0 ng/μl

Şekil 12’de %0,5 agaroz jelde yürütülen PZR ürünleri görülmektedir Olgu 2, Olgu 7 ve Olgu 16’da bant görülememiştir. Olgu 2 ve 16 PZR sonrası düşük konsantrasyonları ve jelde bant yokluğu uyumludur. Olgu 7’ye ait konsantrasyon ölçümü yüksek olmasına rağmen bant görülememiştir



Şekil 12:PZR sonrası yapılan agaroz jel kontrolü

4.1. Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmaya katılmayı kabul eden 11 hastanın 7 tanesi PH tanısı almıştır. PH tanılı çalışmaya katılmayı kabul eden bu hasta grubunun mevcut yaş ortalaması 53,29'dur. Bu hastaların hastalık başlangıç yaş ortalaması 47,71'dir. PH başlangıç yaşına göre juvenil(<20 yaş), erken (20-50 yaş) ve geç(>50 yaş) başlangıçlı olarak üçe ayrılabilir(172). Bu sınıflandırmaya göre hastaların 4'ü erken başlangıçlı PH grubuna girerken, 3'ü geç başlangıçlı PH sınıfına girmektedir.

Olguların ikisi erkek, beşi kadındır. Başlangıç semptomlarına bakıldığında olguların üçünde bradikinezi ilk semptom olurken, dördünde tremor ilk semptom olarak görülmüştür. Bradikinezi hastaların %100'ünde var olan tek semptomdur. Postüral instabilite hiçbir hastada görülmezken, istirahat tremoru hastaların yarısında saptanmıştır. Rijidite dört olguda saptanmıştır. Psikiyatrik bulgular içerisinde anksiyete en sık olarak karşımıza çıkarken hastaların yarısında görülmektedir. İki hastada depresyon bulguları mevcuttur. Çalışmaya dahil edilen PH tanılı olguların klinik özellikleri Tablo 18'de belirtilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen olgu 12 ve 14 demans tanısı ile takip edilmektedir. Bu hastalar ait klinik özellikler ileride tartışılacaktır. Çalışmaya dahil edilen olgu 4 ve olgu 18 sağlıklı taşıyıcılardır. Olgu 4 GH şüphesi olan çocuğu dolayısıyla Sanger ile yapılan

aile taraması sonucu çalışmaya dahil edilmiştir. Olgu 18'in PH tanısı yoktur ve erken başlangıçlı PH tanısı olan Olgu 17 ve 16'nın kardeşidir.

Çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden bu 11 hastaya nanopor dizileme uygulanarak *GBAI* geni varyantları re-analiz edilmiştir.



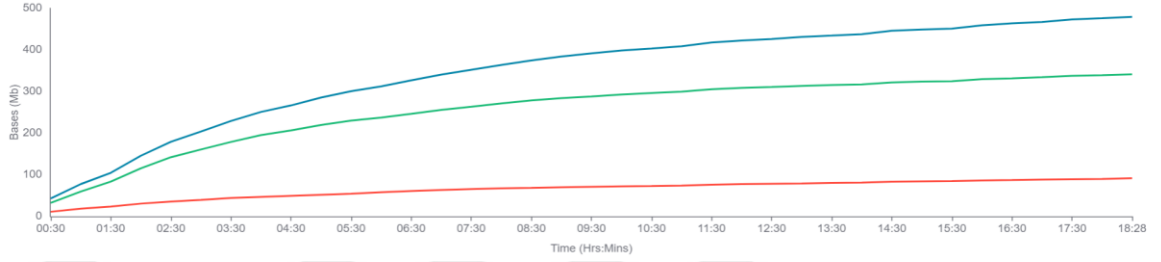
Tablo 18: Çalışmaya dahil edilen PH tanılı olguların klinik özellikleri

	Yaş	Cinsiyet	İlk semptom	Başlangıç yaşı	Bradikinezi	İstirahat Tremoru	Rijidite	Postüral instabilite	Psikiyatrik Bulgular	Non-motor semptomlar	Unutkanlık	MOCA
Olgu 2	76	Kadın	Tremor	68	✓	✓	X	X	Anksiyete	Kabızlık Hiposmi	✓	18/30
Olgu 5	53	Kadın	Tremor	47	✓	✓	X	X	Anksiyete Depresyon	Hiposmi OH RDB	X	17/30
Olgu 6	40	Kadın	Bradikinezi	35	✓	X	✓	X	Anksiyete	Hiposmi	X	29/30
Olgu 7	64	Erkek	Tremor	56	✓	X	✓	X	X	İdrar yapamama	✓	25/30
Olgu 13	55	Erkek	Tremor	51	✓	✓	X	X	Agresyon	Hiposmi	X	20/30
Olgu 16	42	Kadın	Bradikinezi	36	✓	✓	X	X	Depresyon	RDB Kabızlık	✓	22/30
Olgu 17	43	Kadın	Bradikinezi	41	✓	✓	✓	X	Anksiyete	RDB	✓	X

Montreal Bilişsel Değerlendirme (MoCA), ortostatik hiptansiyon (OH), REM: uyku davranış bozukluğu (RDB)

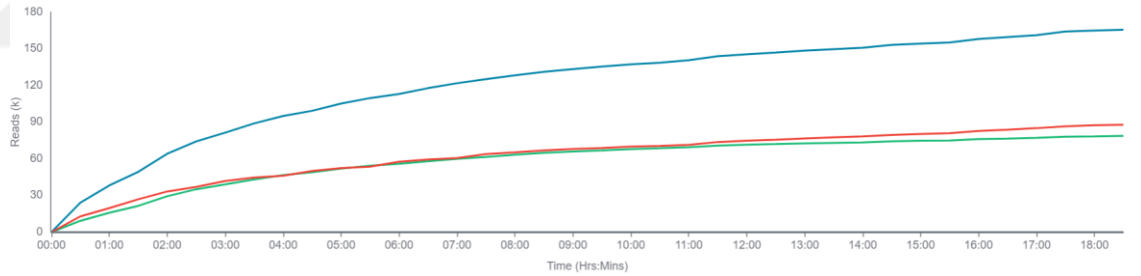
4.2. Nanopor kalite parametreleri

11 olguya ait sekanslama işlemi yaklaşık 18 saat 27 dakika içerisinde tamamlanmıştır. Toplamda 479.39 Mb baz saptanmış ve 165.68 kb okuma yapılmıştır. Cihazın zaman içinde yaptığı kümülatif baz çağırma miktarını gösteren grafik Şekil 13’de gösterilmiştir.



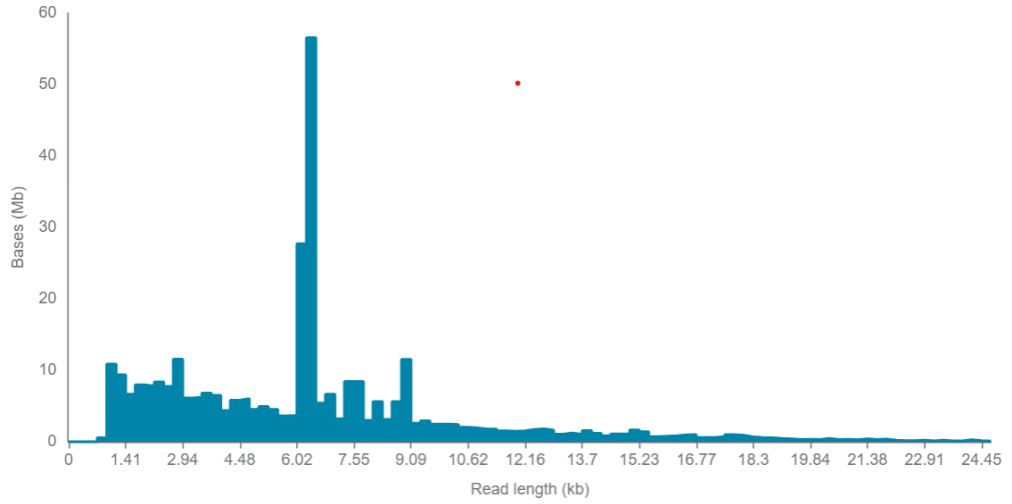
Şekil 13: Total baz çıktısı (Mavi: Tahmin edilen baz sayısı, Yeşil: Kalite skorlarını geçen bazlar, Kırmızı: Kalite skorlarını geçemeyen bazlar)

Cihazın zaman içinde yaptığı kümülatif okuma miktarını gösteren grafik Şekil.14’te gösterilmiştir.



Şekil 14: Total okuma çıktısı (Mavi: total okuma sayısı, Yeşil: Kalite skorlarını geçen okumalar, Kırmızı: Kalite skorlarını geçemeyen okumalar)

Tahmini N50 6.41 kb olarak hesaplanmıştır. Okunan datadaki baz çağırma oranı 100%’dür. Minimum Q skoru 9 olmak üzere 78.84 k okuma uygun kalitede bulunurken 87.92 k okuma başarısız olmuştur. Toplam okunan baz sayısı ve okuma uzunluğunun karşılaştırıldığı Şekil.15’te PZR ampikon uzunluğumuz olan 6-8 kb bölgesinde yoğunlaşan baz çağırımları görülmektedir.



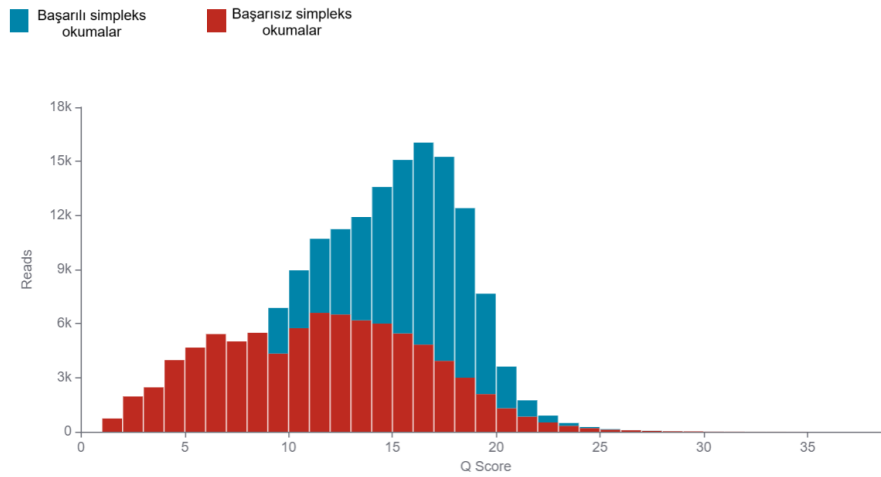
Şekil 15:Okuma uzunluğu grafiği

Her bir olguya atanan barkodlara göre baz çağırma ve okuma sayıları Tablo 19’da verilmiştir. Çağırılan total baz çağırma sayısı ortalama 26,49 Mb (en küçük 8,6 ve en büyük 48,1) olarak saptanmıştır. Çalışmamızın kalite skorlarını geçen baz çağırma oranlarına bakıldığında ortalama 82,88% baz çağırma oranı vardır. Total okuma miktarına bakıldığında ortalama okuma miktarı 8,72 kb (en büyük Olgu 7- 14,84 ve en küçük olgu 4- 3,72) olarak bulunmuştur. Kalite standartlarını geçen okuma oranı ise oldukça değişkenlik göstermektedir. Kalite skorlarını geçen okuma oranı ortalaması 53,8%’dir. En küçük oran olgu 16’da 35,8% ve en büyük oran olgu 7’de 67,5% olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tablo 19: Her bir olguya atanan barkodlara göre baz çağırma ve okuma sayıları

	Barkod	Total Baz (Mb)	Kalite skorlarını geçen baz (%)	Total Okuma (k)	Kalite skorlarını geçen okuma (%)
Olgu 2	NB82	8.6	80.2	3.99	37.8
Olgu 4	NB91	9.21	81	3.72	43.8
Olgu 5	NB81	19.04	82	7.09	44.6
Olgu 6	NB83	19.53	84	6.17	62.1
Olgu 7	NB84	48.1	85	14.84	67.5
Olgu 12	NB86	36.46	85.3	10.32	66
Olgu 13	NB87	25.32	83.4	8.12	52.6
Olgu 14	NB89	59	86.5	17.57	68.5
Olgu 16	NB88	11.99	78	6.38	35.8
Olgu 17	NB85	34.06	84.5	9.67	66.8
Olgu 18	NB90	20	81.8	7.23	46.3

Kalite puanı (Q skoru), baz çağırma sırasında hesaplanır. Minimum 9 Q skoru altına düşen okumalar başarısız okumalar olarak sınıflandırılır. Okumalara ait Q skoru değerlerinin grafiği Şekil.16’da verilmiştir.



Şekil 16: Okumalara ait Q skoru değerleri

Her bir olguya atanan barkodlara göre baz çağırma sonrası hizalama oranları Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20: Barkodlara göre hizalama oranları

od	Bark yüzdesi	Hizalama
NB81		%90.5
NB82		%90.9
NB83		%92.3
NB84		%91.7
NB85		%91.4
NB86		%91.4
NB87		%91.8
NB88		%91.4
NB89		%91.8
NB90		%90.7
NB91		%90.5
NB92		%91.1

4.3. YND ile saptanan varyantların Nanopor varyantları ile karşılaştırılması

YND paneli ve Sanger dizileme sonucunda 11 olguya ait farklı patojenitelere sahip 12 varyant bu çalışma dahilinde nanopor dizileme ile incelendi. Olgulara ait *GBA1* geninde bulunan bu YND varyantları ve bu varyantların nanoporda varyant çağırma programları aracılığıyla saptanıp saptanmadığı Tablo 20’de verilmiştir. 11 olguya ait YND paneli ve Sanger dizilemede toplamda 12 varyant saptanmıştır. Nanopor dizileme sonrası varyant çağırma araçları bu varyantların sadece 2 tanesini (16.67%) saptamıştır.

Düşük saptanma oranları nedeniyle BAM (Binary Alignment Map) dosyası IGV (Integrative Genomics Viewer)’de incelendiğinde bazı varyantların VCF (Variant Call Format) dosyasına aktarılamadığı ve başarılı varyant çağırma yapılamadığı görülmüştür. Nanopor dizileme sonucu elde edilen okumalar içerisinde her bir varyantın IGV’deki pozisyonlarının incelenmesi ile elde edilen okuma sayıları ve oranları Tablo 21’de verilmiştir. 12 varyanta ait okuma sayılarına bakıldığında olgu 2 ve 4’e ait varyantlar en düşük okuma sayısına sahiptir. En yüksek okuma sayısına sahip iki olgu 5 ve 14’tür.

Varyantlara ait IGV görüntülerinde düşük alel fraksiyonu ile saptanan değişimler, bu değişimlerin tipleri ve alel fraksiyonları Tablo 22’de incelenmiştir. VCF dosyasında saptanan iki varyanta ek olarak 9 varyant daha IGV’de saptanmıştır ve

varyant çağırma algoritmaları tarafından tanınamamıştır. Varyant çağırma algoritması sonucu VCF’de karşımıza çıkan 2 varyant olgu 5’e ait *GBAI*:c.1342G>C ve Olgu 14 ‘e ait *GBAI*:c.1346C>T varyantlarıdır. 9 varyant varyant çağırma algoritmalarını geçememiş ancak IGV’de saptanabilmiştir. Olgu 6’ya ait *GBAI*: c.922G>A VCF ve IGV incelemelerine rağmen saptanamamıştır.

Varyant çağırma algoritması sonucu VCF’de karşımıza çıkan 2 varyanta ait alel fraksiyonları incelendiğinde olgu 5’e ait *GBAI*:c.1342G>C varyantı 37% ve Olgu 14 ‘e ait *GBAI*:c.1346C>T varyantı 33% alel fraksiyonu ile zigosite açısından şüpheli bölgede kalmıştır. IGV incelemesi sonucu saptanan 9 varyantın alel fraksiyonları incelendiğinde ortalama 25,5% alel fraksiyonu karşımıza çıkmaktadır. Olgu 7’ye ait varyant, varyant çağırma aşamasında saptanamamasına rağmen 45% alel fraksiyonu ile heterozigosite tayini yapılabilmektedir. Tablo 23’te varyantların değişim tipleri ve alel fraksiyonları verilmiştir. Olgu 6’ya ait varyantların alel 12% olarak en düşük alel fraksiyonuna sahip varyanttır. 12 varyantın değişim tiplerine bakıldığında 1 delesyon, 5 transisyon, 6 transversiyon olduğu görülmektedir.

Tablo 21:Olgularda YND ve Sanger dizileme sonucu saptanan varyantlar ve Nanopor dizileme ile varyant çağırma algoritmaları sonucunu saptanan varyantlar

	İlk saptanan yöntem	Pozisyon	Ekzon	HGVSc	HGVSp	dbSNP	Zigosite	ACMG Sınıfı	Nanopor Sonucu
Olgu 2	YND	chr1:155208362	Ekzon 6	c.533del	p.Pro178LeufsTer22	rs397518434	Heterozigot	LP	Saptanmadı
Olgu 4	YND ve Sanger	chr1-155207249	Ekzon 7	c.882T>G	p.His294Gln	rs367968666	Heterozigot	LP	Saptanmadı
Olgu 5	YND	chr1-155207249	Ekzon 7	c.882T>G	p.His294Gln	rs367968666	Heterozigot	LP	Saptanmadı
	YND	chr1-155205518	Ekzon 9	c.1342G>C	p.Asp448His	rs1064651	Heterozigot	P	Saptandı
Olgu 6	YND	chr1:155207209	Ekzon 8	c.922G>A	p.Ala308Thr	rs368425393	Heterozigot	LP	Saptanmadı
Olgu 7	YND	chr1:155207203	Ekzon 8	c.928A>G	p.Ser310Gly	rs1057942	Heterozigot	LP	Saptanmadı
Olgu 12	YND	chr1:155205634	Ekzon 9	c.1226A>G	p.Asn409Ser	rs76763715	Heterozigot	P	Saptanmadı
Olgu 13	YND	chr1:155205634	Ekzon 9	c.1226A>G	p.Asn409Ser	rs76763715	Heterozigot	P	Saptanmadı
Olgu 14	YND	chr1:155205514	Ekzon 10	c.1346C>T	p.Thr449Met	rs757930613	Heterozigot	VUS	Saptandı
Olgu 16	YND	chr1:155204996	Ekzon 10	c.1495G>C	p.Val499Leu	rs369068553	Heterozigot	LP	Saptanmadı
Olgu 17	YND	chr1:155204996	Ekzon 10	c.1495G>C	p.Val499Leu	rs369068553	Heterozigot	LP	Saptanmadı
Olgu 18	YND	chr1:155204996	Ekzon 10	c.1495G>C	p.Val499Leu	rs369068553	Heterozigot	LP	Saptanmadı

Tablo 22:11 hastaya ait 12 varyantın nanopor dizilemede saptanan okuma sayıları ve oranları

	Pozisyon	HGVSc	Varyant çağırma sonucu	Toplam okuma	Adenin	Sitozin	Guanin	Timin	Dele syon
Olgu 2	chr1:155208363	c.533del	Saptanmadı	254	5(2%, 1+,4-)	0	248(98%, 117+, 131-)	1 (0%, 1+, 0-)	59
Olgu 4	chr1:155207249	c.882T>G	Saptanmadı	269	206 (77%, 105+, 101-)	60 (22%, 32+, 28-)	2 (1%, 1+, 1-)	1 (0%, 0+, 1-)	5
Olgu 5	chr1:155207249	c.882T>G	Saptanmadı	1160	860 (74%, 428+, 432-)	298 (26%, 162+, 136-)	0	2(0%, 0+, 2-)	14
	chr1:155205518	c.1342G>C	Saptandı	1214	12 (1%, 12+, 0-)	738 (61%, 438+, 300-)	452 (37%, 288+, 164-)	12 (1%, 10+, 2-)	30
Olgu 6	chr1:155207209	c.922G>A	Saptanmadı	364	3 (1%, 3+, 0-)	317 (87%, 160+, 157-)	1 (0%, 1+, 0-)	43 (12%, 20+, 23-)	3
Olgu 7	chr1:155207203	c.928A>G	Saptanmadı	913	5 (1%, 5+, 0-)	409 (45%, 242+, 167-)	7 (1%, 3+, 4-)	492 (54%, 278+, 214-)	2
Olgu 12	chr1:155205634	c.1226A>G	Saptanmadı	903	3 (0%, 3+, 0-)	242 (27%, 158+, 84-)	9 (1%, 8+, 1-)	649 (72%, 439+, 210-)	10
Olgu 13	chr1:155205634	c.1226A>G	Saptanmadı	610	1 (0%, 1+, 0-)	177 (29%, 127+, 50-)	5 (1%, 4+, 1-)	427 (70%, 262+, 165-)	6
Olgu 14	chr1:155205514	c.1346C>T	Saptandı	1535	504 (33%, 386+, 118-)	15 (1%, 12+, 3-)	1002 (65%, 650+, 352-)	14 (1%, 14+, 0-)	10
Olgu 16	chr1:155204996	c.1495G>C	Saptanmadı	312	0	247 (79%, 152+, 95-)	60 (19%, 41+, 19-)	5(2%, 0+,5-)	8
Olgu 17	chr1:155204996	c.1495G>C	Saptanmadı	843	3 (0%, 3+, 0-)	609 (72%, 427+, 182-)	222 (26%, 154+, 68-)	9 (1%, 0+, 9-)	20
Olgu 18	chr1:155204996	c.1495G>C	Saptanmadı	601	1(0%, 1+, 0-)	430 (72%, 259+, 171-)	157 (26%, 81+, 76-)	13 (2%, 0+, 13-)	7

Tablo 23: Varyantlara ait değişimlerin tipleri ve alel fraksiyonları

	Pozisyon	HGVSc	Değişimin tipi	Varyant çağırma sonucu	IGV'de saptanma sonucu	Toplam okuma	Değişim	Alel fraksiyonu
Olgu 2	chr1:155208362	c.533del	Delesyon	Saptanmadı	Saptanmadı	254	Delesyon	23%
Olgu 4	chr1-155207249	c.882T>G	Transversiyon	Saptanmadı	Saptandı	269	C aleli	22%
Olgu 5	chr1-155207249	c.882T>G	Transversiyon	Saptanmadı	Saptandı	1160	C aleli	26%,
	chr1-155205518	c.1342G>C	Transversiyon	Saptandı	Saptandı	1214	G aleli	37%
Olgu 6	chr1:155207209	c.922G>A	Transisyon	Saptanmadı	Saptanmadı	364	T aleli	12%,
Olgu 7	chr1:155207203	c.928A>G	Transisyon	Saptanmadı	Saptandı	913	C aleli	45%
Olgu 12	chr1:155205634	c.1226A>G	Transisyon	Saptanmadı	Saptandı	903	C aleli	27%
Olgu 13	chr1:155205634	c.1226A>G	Transisyon	Saptanmadı	Saptandı	610	C aleli	29%
Olgu 14	chr1:155205514	c.1346C>T	Transisyon	Saptandı	Saptandı	1535	A aleli	33%
Olgu 16	chr1:155204996	c.1495G>C	Transversiyon	Saptanmadı	Saptandı	312	G aleli	19%
Olgu 17	chr1:155204996	c.1495G>C	Transversiyon	Saptanmadı	Saptandı	843	G aleli	26%
Olgu 18	chr1:155204996	c.1495G>C	Transversiyon	Saptanmadı	Saptandı	601	G aleli	26%

Tablo 24:Nanopor dizilemede IGV’de saptanan tüm varyantlar

Olgu	Barkod	Pozisyon	Değişim	HGVSc	Alel fraksiyonu	Patojenisite	VCF’de saptanma durumu	NGS’te durumu	saptanma
Olgu 2	NB82	chr1:155208362	AG>A	c.533del	23%	LP	Yok	Var	
		chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	22%	VUS	Yok	Yok	
Olgu 4	NB91	chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	24%	VUS	Yok	Bilinmiyor	
		chr1:155.207.249	A>C	c.882T>G	26%	LP	Yok	Sanger	
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	19%	P	Yok	Bilinmiyor	
Olgu 5	NB81	chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	24%,	VUS	Yok	Bilinmiyor	
		chr1:155.207.249	A>C	c.882T>G	26%	LP	Yok	Var	
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	37%,	P	Var	Var	
Olgu 6	NB83	chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	24%,	VUS	Yok	Yok	
		chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	17%	P	Yok	Yok	
Olgu 7	NB84	chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	25%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.207.983	A>G	c.703T>C	20%	P	Var	Yok	
		chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	22%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.207.932	A>T	c.754T>A	20%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	21%	VUS	Yok	Yok	
		chr1:155.207.203	T>C	c.928A>G	45%	LP	yok	Var	
		chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	20%	VUS	Yok	yok	
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	25%,	P	Yok	Yok	
		chr1:155.205.043	A>G	c.1448T>C	23%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.205.008	C>G	c.1483G>C	27%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.204.994	C>G	c.1497G>C	26%	LB	Yok	Yok	
Olgu 12	NB86	chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	20%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.207.983	A>G	c.703T>C	17%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	24%	VUS	Yok	Yok	
		chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	17%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	20%	VUS	Yok	Yok	
		chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	21%	VUS	Yok	Yok	
		chr1:155.206.036	C>T	c.1224G>A	19%	VUS	Yok	Yok	
		chr1:155.205.634	T>C	c.1226A>G	27%	P	yok	Var	
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	26%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.205.008	C>G	c.1483G>C	25%	P	Yok	Yok	
		chr1:155.204.994	C>G	c.1497G>C	24%	LB	Yok	Yok	

Tablo 23:Nanopor dizilemede IGV’de saptanan tüm varyantlar(Devamı)

Olgu 13	NB87	chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	17%	P	Yok	yok
		chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	22%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	17%	P	Yok	Yok
		chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	20%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	20%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.205.634	T>C	c.1226A>G	29%	P	yok	Var
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	22%	P	Yok	Yok
Olgu 14	NB89	chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	21%	P	Yok	yok
		chr1:155.207.983	A>G	c.703T>C	18%	P	Yok	Yok
		chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	20%	P	Yok	Yok
		chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	18%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	19%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.206.036	C>T	c.1224G>A	18%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	21%	P	Yok	Yok
		chr1:155.205.514	G>A	c.1346C>T	33%	VUS	Var	Var
		chr1:155.205.008	C>G	c.1483G>C	24%	P	Yok	Yok
Olgu 16	NB88	chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	29%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	20%	P	Yok	Yok
		chr1:155.204.996	C>G	c.1495G>C	19%	LP	Yok	var
Olgu 17	NB85	chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	23%	P	Yok	yok
		chr1:155.207.983	A>G	c.703T>C	19%	P	Yok	Yok
		chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	21%	P	Yok	Yok
		chr1:155.207.932	A>T	c.754T>A	20%	P	Yok	Yok
		chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	21%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	21%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.206.036	C>T	c.1224G>A	20%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	20%	P	Yok	Yok
		chr1:155.205.008	C>G	c.1483G>C	28%	P	Yok	Yok
		chr1:155.204.996	C>G	c.1495G>C	19%	LP	Yok	Var
		chr1:155.204.994	C>G	c.1497G>C	26%	LB	yok	yok
Olgu 18	NB90	chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	17%	P	Yok	yok
		chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	25%	VUS	Yok	Yok
		chr1:155.204.996	C>G	c.1495G>C	26%	LP	Yok	var

4.4. Nanopor ile saptanan tüm ekzonik varyantlar

VCF dosyasında varyant çağırma hataları olduğu için nanopor okumaları IGV’de incelenmiştir. Nanopor dizilemede IGV’de saptanan tüm varyantlar Tablo 24’te listelenmiştir. Hem YND yöntemi ile hem nanopor okumalarında saptanan 11 varyant koyu yazılmıştır. Nanopore dizilemede 11 hastaya ait toplamda 65 ekzonik varyant tespit edilmiştir. Bunlardan 11 tanesi (%16.92) YND’de de tespit edilmiştir.

Olgu 6 dışındaki olgularda saptanan bu 65 varyanta bakıldığında YND ve Sanger’de 11 varyantın dışında saptanan pek çok varyantın tekrar ettiği görülmüştür. Bu varyantlar ve hangi olgularda saptandığı Tablo 24 ‘te listelenmiştir. YND ve Nanoporda aynı anda saptanan varyantlar koyu yazılmıştır. Nanopor ile saptanan 65 varyanttan 54 tanesi YND ile saptanmamıştır.

Tablo 25:Olgu 6 dışındaki olgularda saptanan bu 65 varyant

Pozisyon	Değişim	HGVSc	Olgular
chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	Olgu 7 -12-13-14-17-18
chr1:155.208.363	AG>A	c.533del	Olgu 2
chr1:155.207.983	A>G	c.703T>C	Olgu 7 -12-14-17
chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	Olgu 2 -4 -5 -6 -12-13-16-18
chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	Olgu 6 -7- 12-13-14- 17
chr1:155.207.932	A>T	c.754T>A	Olgu 7- 17
chr1:155.207.249	A>C	c.882T>G	Olgu 4- 5
chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	Olgu 7- 12-13-14- 17
chr1:155.207.203	T>C	c.928A>G	Olgu 7
chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	Olgu 7- 12-13-14- 17
chr1:155.206.036	C>T	c.1224G>A	Olgu 12-14- 17
chr1:155.205.634	T>C	c.1226A>G	Olgu 12-13
chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	Olgu 4 -7- 12- 13- 14- 16 - 17
chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	Olgu 5
chr1:155.205.514	G>A	c.1346C>T	Olgu 14
chr1:155.205.008	C>G	c.1483G>C	Olgu 7- 12-14- 17
chr1:155.204.996	C>G	c.1495G>C	Olgu 16 -17-18
chr1:155.204.994	C>G	c.1497G>C	Olgu 7- 12- 17

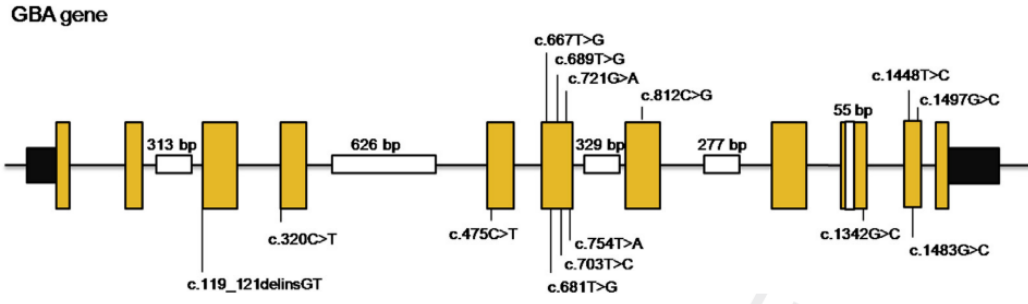
YND’de saptanmayan 54 varyantın *GBAP1* geninden gelen okumaların *GBA1* genine hizalanarak yanlış pozitiflik oluşturması ihtimalini incelemek için *GBA1* genine hizalanan okumaların *GBAP1* üzerinde homoloji gösterdiği bölgeler ve tam homoloji gösterip göstermediği incelenmiştir ve benzerlik Tablo 25’te verilmiştir.

GBAI geni ve *GBAP1* psödogenin varyantın olduğu bölgede tek nükleotid farkı olup olmadığı fark sütununda belirtilmiştir. Psödogen üzerinde yer alan bu tek nükleotid farkı psödogene ait okumalar *GBAI* üzerine hizalandığında yanlış pozitif varyantlar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tablo 26:*GBAI* genine hizalanan okumaların *GBAP1* üzerinde homoloji gösterdiği bölgeler

<i>GBAI</i> Pozisyon	Değişim	HGVSc	<i>GBAP1</i> pozisyon	Fark
chr1:155.208.421	G>A	c.475C>T	chr1:155.187.144	Var
chr1:155.208..363	AG>A	c.533del	chr1:155.187.086	Yok
chr1:155.207.983	A>G	c.703T>C	chr1:155.186.706	Var
chr1:155.207.978	G>C	c.708C>G	chr1:155.186.701	Yok
chr1:155.207.965	C>T	c.721G>A	chr1:155.186.688	Var
chr1:155.207.932	A>T	c.754T>A	chr1:155.186.655	Var
chr1:155.207.249	A>C	c.882T>G	chr1:155.186.292	Yok
chr1:155.207.210	G>A	c.921C>T	chr1:155.186.253	Var
chr1:155.207.203	T>C	c.928A>G	chr1:155.186.246	Var
chr1:155.206.157	C>T	c.1103G>A	chr1:155.185.475	Var
chr1:155.206.036	C>T	c.1224G>A	chr1:155.185.354	Var
chr1:155.205.634	T>C	c.1226A>G	chr1:155.184.952	Yok
chr1:155.205.518	C>G	c.1342G>C	chr1:155.184.891	Var
chr1:155.205.514	G>A	c.1346C>T	chr1:155.184.887	Yok
chr1:155.205.008	C>G	c.1483G>C	chr1:155.184.381	Var
chr1:155.204.996	C>G	c.1495G>C	chr1:155.184.369	Yok
chr1:155.204.994	C>G	c.1497G>C	chr1:155.184.367	Var

Tablo 25'teki tüm varyantlar hizalama hatası sonucu oluşacak psödogen kaynaklı yanlış pozitif sonuçlar olması açısından literatürden faydalanılarak değerlendirilmiştir. Zampieri ve ark. yaptığı çalışma incelendiğinde bu tek nükleotid farkından kaynaklanan varyantlar psödogen kaynaklı uyumsuzluklar olarak değerlendirilmişlerdir ve bu uyumsuzluklar Şekil 17'de listelenmiştir.(120). Şekilde ekzonlar sarı kutu, intronlar gri çizgilerle ifade edilmiştir. Beyaz çubuklar *GBAP1* geninde delesyona uğramış kısımlardır. İşaretlenen varyantlar *GBAI* ve *GBAP1* dizisi arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanan varyantlardır.



Şekil 17: *GBA1* ve *GBA1* dizisi arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanan varyantlar (Zampieri ve ark.)

Zampieri ve ark. makalesine bakacak olursak bizim saptadığımız 17 varyant içerisinde 8 tanesi psödogen kaynaklı uyumsuzluklarla oluşan varyantlardır. Bizim çalışmamızda saptanıp YND’de saptanmayan *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.703T>C, *GBA1*:c.721G>A, *GBA1*:c.754T>A, *GBA1*:c.1342G>C, *GBA1*:c.1448T>C, *GBA1*:c.1483G>C, *GBA1*:c.1497G>C varyantları literatürde belirtildiği gibi psödogen kaynaklı uyumsuzluklarla oluşan varyantlardır. Bu varyantların *GBA1* ve *GBA1* geni varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığı vardır. Bu varyantlar yanlış pozitif olarak kabul edilmiştir.

Bizim çalışmamızda saptanıp YND’de saptanmayan *GBA1*:c.708C>G, *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A varyantları literatürde psödogen kaynaklı uyumsuzluklarla oluşan varyantlar içerisinde bildirilmemiştir. Varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığına bakıldığında *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A varyantlarının bu farklılığa sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu üç varyant görüldüğü olgular içerisinde IGV görüntüleri ile incelenmiştir.

YND’de saptanan olguların çoğunda (5/7) yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığı yoktur. Ancak *GBA1*:c.928A>G ve *GBA1*:c.1342G>C varyantlarında psödogenden gelen okumalar olma ihtimali vardır. Bu nedenle bu iki varyant görüldüğü olgular içerisinde IGV görüntüleri ile incelenmiştir.

4.5. 11 Olguya ait Anamnez, Soyağacı, YND ve Nanopor IGV Görüntüleri

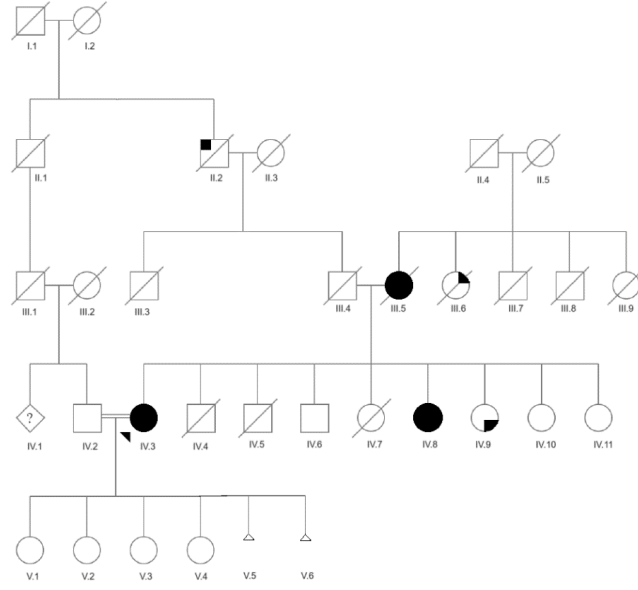
Olgularda saptanan anamnez bilgileri, klinik bulgular, laboratuvar, görüntüleme bulguları ve nanopor dizileme bulguları aşağıda özetlenmiştir.

4.5.1. Olgu 2

Daha önceden bilinen hipertansiyon tanısı olan 76 yaşında kadın hasta, 68 yaşındayken elindeki eşyaları düşürme şikâyeti başlamış. İlk olarak sağ elinde başlayan bu tremorları stres ile artıyor ve şu anda bilateral olarak mevcut. Düz yürümekte zorlandığını ifade eden hasta zik zak çizerek yürüdüğünü belirtiyor. Özellikle kişileri ve isimleri hatırlamakta zorlanma yaşayan hasta unutkanlık tarifliyor. Depresyon ve halüsinasyon şikayetleri olmayan hastada anksiyete problemi bulunmaktadır. RDB tariflemiyor. Gençliğinden beri süren hiposmisi var. Ara sıra olan kabızlık şikâyeti var. Nörolojik muayenesi yapılan hastada sağ baskın olmak üzere her iki elde de kinetik tremor tespit edildi. Bradimimik yüz görüldü. Bradikinezi sağ üst ekstremitede saptandı. Nörolojik ölçek sonuçlarına bakıldığında Hoehn and Yahr skalasında Evre 2'dir. UPDRS-III skoru 16 ve MoCA test skoru 18/30'dir. Hasta bilişsel işlevleri gösteren MoCA testinden düşük (<20) skor alması bilişsel etkilenmeyi gösterir.

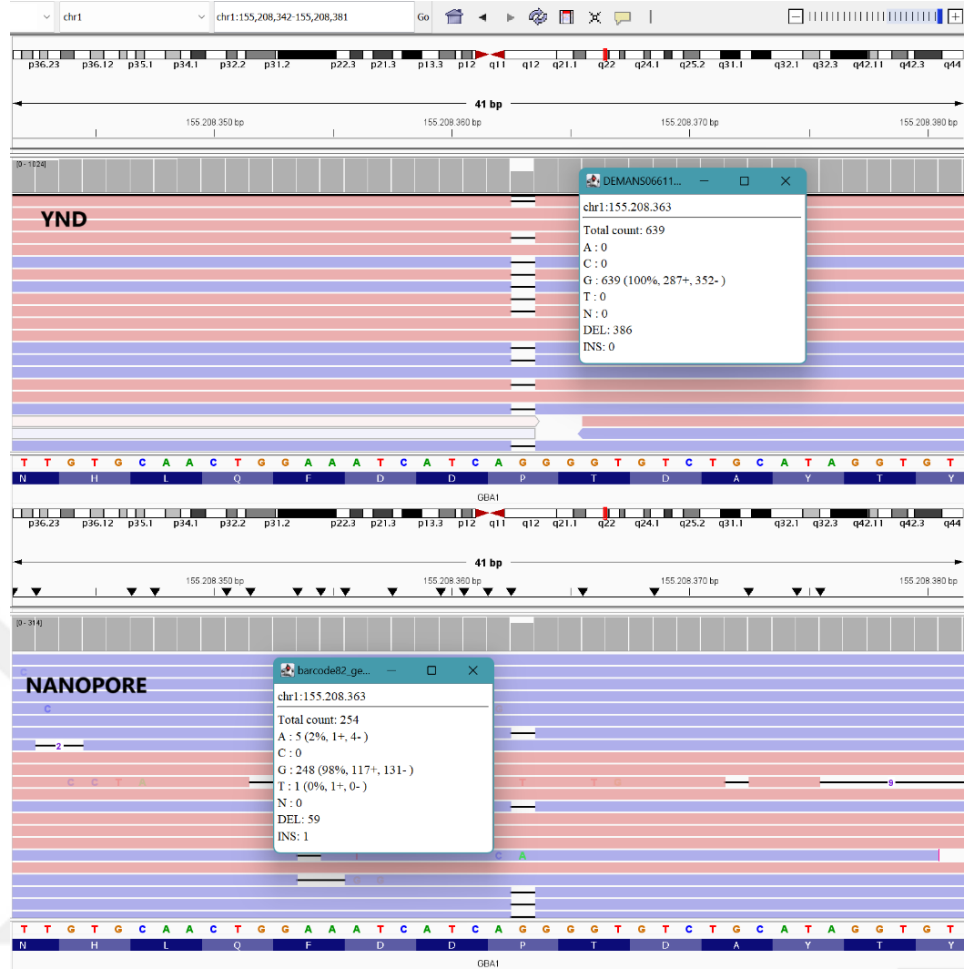
Olgunun aile hikayesine bakıldığında şu anda 81 yaşında olan kız kardeşi de (IV.8) 76 yaşında PH tanısı almıştır ve tedavisine devam etmektedir. Şu anda hayatta olmayan annesinin (III.5) de geç başlangıçlı PH hastalığı tanısı mevcuttur. Hastanın annesine ait hikâye derinleştirildiğinde demans bulgularının da olduğu tespit edilmiştir. Teyzesinin (IV.9) meme kanseri, büyük teyzesinin (III.6) ise mide kanseri öyküsü soyağacına ait diğer bulgulardandır. Olgu 2'in ok ile belirtildiği soyağacı Şekil 19'da gösterilmiştir.

● Parkinson Hastalığı ■ Demans ○ Meme kanseri ◐ Mide kanseri



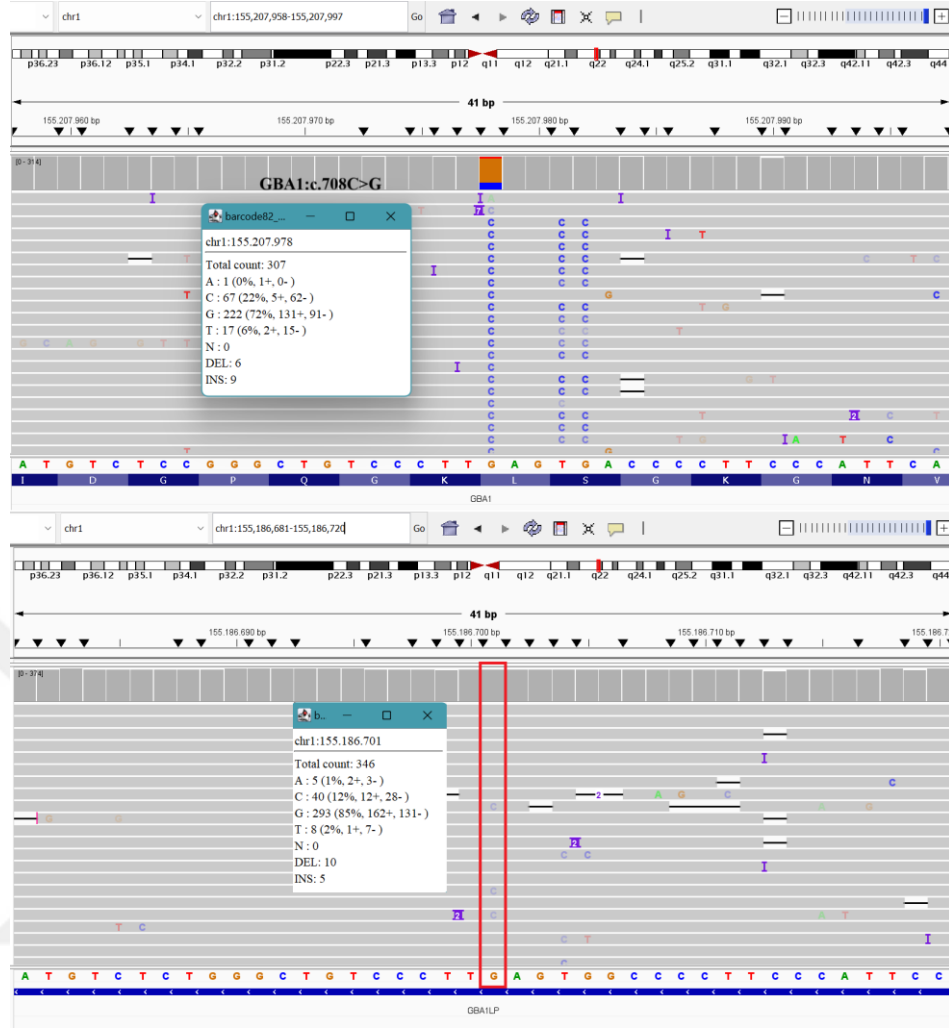
Şekil 18: Olgu 2'e ait soyağacı

Hastaya yapılan YND demans paneli sonucunda olan *GBA1* geninde heterozigot, çerçeve kayması oluşturan c.533del (p.Pro178LeufsTer22) muhtemel patojenik (LP) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait YND IGV görüntüsü Şekil 20'de üstte verilmiştir. Olgu 2'ye ait nanopor dizileme sonucunda varyant çağırma aşamasında tespit edilememiştir. Chr1-155208362 AG>A (NM_000157.4- ENST00000368373.3) pozisyonunda bulunan *GBA1*:c.533del değişiminin o pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 20'de altta verilmiştir. Bu bölgede delesyonun olduğu okumalar mevcuttur ve bu okumalar %23(59/248) oranında IGV'de tespit edilmiştir. Olgu 2 254 toplam okuma sayısı ile, okuma sayısının en az olduğu olgudur.



Şekil 19: Olgu 2'ye ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

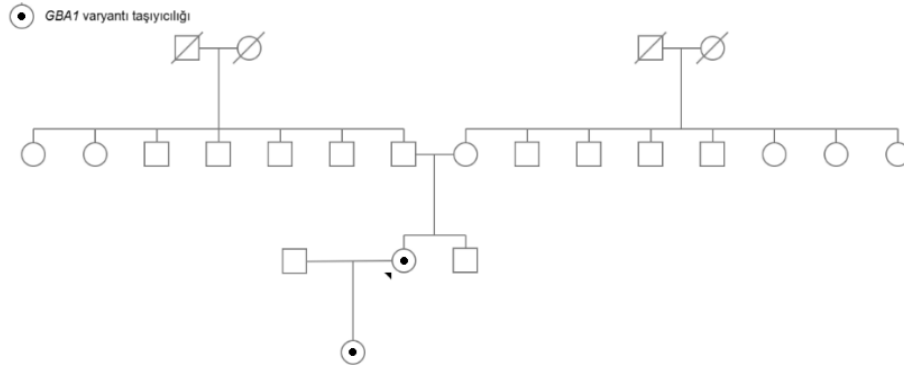
Olgu 2'ye ait nanoporda saptanan tüm varyantlar Tablo 24'te verilmiştir. IGV'de saptanan diğer bir varyant olan chr1:155.207.978 pozisyonundaki c.708C>G değişimi 22% alel fraksiyonuna sahiptir ve ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen olarak değerlendirilmiştir. Literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir. Şekil 21'de varyanta ait *GBA1* varyant bölgesi ve *GBAP1* bölgesi IGV görüntüleri verilmiştir. İncelendiğinde tam homoloji gösterdiği görülmektedir. Bu varyant aynı zamanda Olgu 4 -5 -6 -12-13-16-18'de de saptanmıştır.



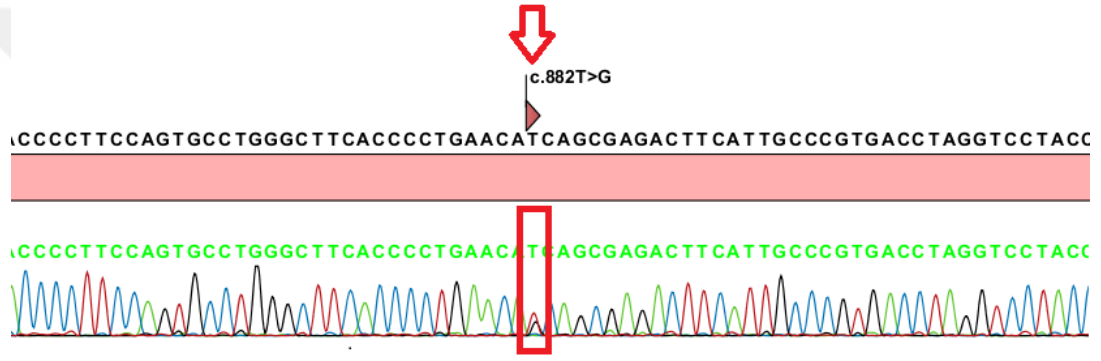
Şekil 20:GBA1: c.708C>G varyantının bölgesi ve homoloji gösterdiği GBAP1 bölgesi

4.5.2. Olgu 4

Daha önceden bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 22 yaşındaki hasta 3 yaşında Gaucher şüphesi bulunan kızının aile taraması amacıyla başvurdu. Olguya ait soyağacı Şekil 22’de verilmiştir. Dış merkezde yapılan YND paneli sonucunda olan *GBA1* geninde heterozigot c.882T>G yanlış anlamalı p.His294Gln (H294Q), muhtemel patojenik (LP) varyantı saptanmıştır. Bu varyant Sanger dizileme ile doğrulanmıştır. Bu varyanta ait Sanger görüntüsü Şekil 23’te verilmiştir.

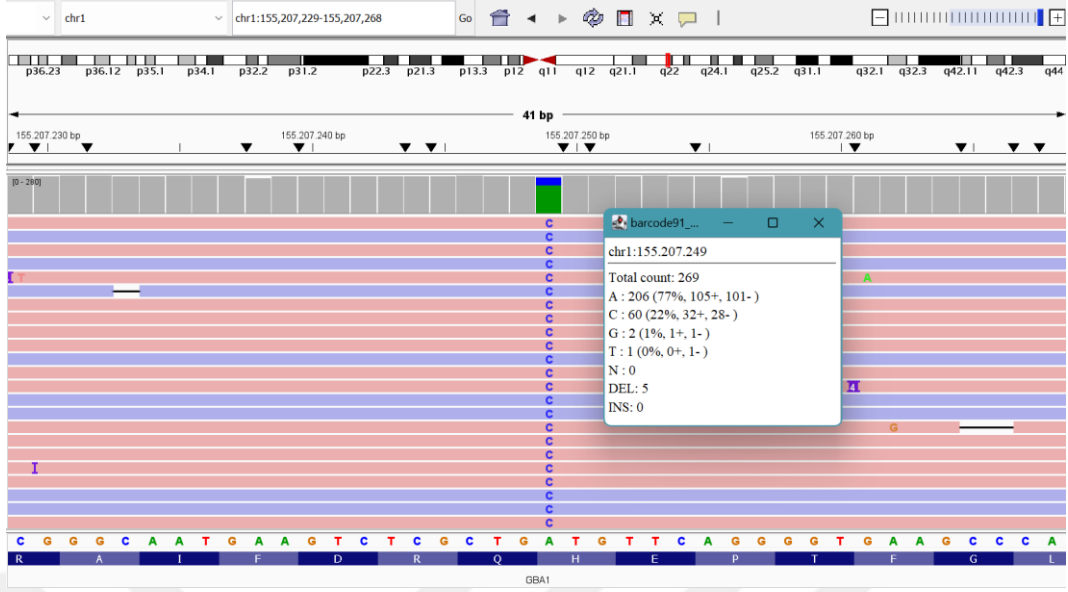


Şekil 21:Olgu 4'e ait soyağacı



Şekil 22:Olgu 4'e ait muhtemel patojenik varyantın Sanger görüntüsü

Olgu 4'ye ait nanopor dizileme sonucunda bu varyant saptanamamıştır. Chr1-155207249 A>C (NM_000157.4 - ENST00000368373.3) pozisyonunda bulunan *GBA1*:c.882T>G değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 24'te verilmiştir. IGV görüntüleri değişime ait pozisyonda incelendiğinde okumanın 206(77%, 105+,101-) tanesinin adenin (A) bazı, 60(22%, 32+, 28-) tanesinin sitozin olarak okunduğu ancak varyant çağırmanın yapılamadığı görülmüştür. Olgu 4 269 toplam okuma sayısı ile, okuma sayısının en az olduğu iki olgudan biridir.



Şekil 23:Olgu 4'e ait muhtemel patojenik varyantın nanopor IGV görüntüsü

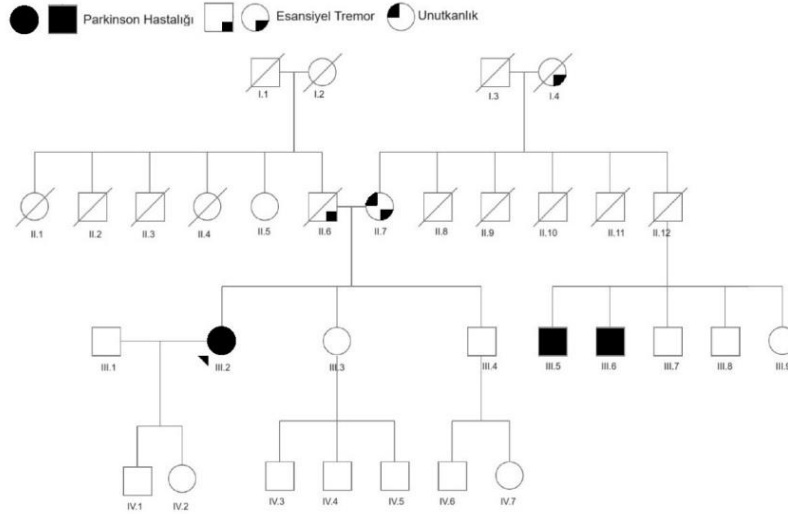
Olgu 4'ye ait nanoporda saptanan tüm varyantlar Tablo 23'te verilmiştir. Olgu 4'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*: c.882T>G varyantının dışında *GBA1*:c.708C>G ve *GBA1*:c.1342G>C varyantları da saptanmıştır. *GBA1*:c.708C>G ve literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir. *GBA1*:c.1342G>C literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır. Olgu 4'e ait IGV görüntüsü incelendiğinde *GBA1*:c.1342G>C varyantının çok yakınındaki psödogene ait 55 bç'lik delesyonun olduğu okumalarla aynı ampikon üzerinde olduğu görülmüştür.

4.5.3.Olgu 5

Daha önceden bilinen bir hastalığı olmayan olan 53 yaşında kadın hasta, 47 yaşındayken sağ ayağında başlayan titremeler zamanla sağ kola ilerlemiş. Şu anda sol elde de nadiren hafif titremeler oluyormuş Kalkarken adım atmada zorlanma ve yavaş yürüme şikâyeti var. Aynı zamanda sağ bacağına kasılmalar olduğunu belirtiyor. Özellikle isimleri hatırlamakta zorlanma yaşayan hasta unutkanlık tarifliyor. Halüsinasyon şikayetleri olmayan hastada, küçük şeylere ağlamasıyla kendini belli eden depresyon ve 9-10 senedir olan panik atak mevcut. Kabızlığı olmayan hastanın idrar kaçırma problemi var. Ancak bunun için bir tıbbi yardım almamış. Ortostatik hipotansiyon tarifliyor. 4 senedir hiposmisi mevcut. RDB olarak uykuda sıçramalar

şeklinde görülmekte. Nörolojik muayenesi yapılan hastada sağ el ve ayakta istirahat tremoru tespit edildi. Sol elde görülen tremor sağ ele göre daha hafifti. Hastada ensede rijidite, öne doğru eğik postür görüldü. Konuşma ve yürümede yavaşlama saptandı. Nörolojik ölçek sonuçlarına bakıldığında Hoehn and Yahr skalasında Evre 2,5'tur. UPDRS-III skoru 35 ve MoCA test skoru 17/30'dir. Hasta bilişsel işlevleri gösteren MoCA testinden düşük (<20) skor alması bilişsel etkilenmeyi gösterir.

Olgunun aile hikayesine bakıldığında hem annesinde (II.7) hem babasında (II.6) PH tanısı olmamasına rağmen esansiyel tremorlarının olması dikkat çekmektedir. Şu anda hayatta ve 81 yaşında olan annesinde (II.7) esansiyel tremora ek olarak unutkanlık şikayeti mevcuttur. Hastanın baba tarafına ait soyağacı ailenin bab tarafıyla iletişimde olunmamasından dolayı ayrıntılı olarak çizilememiştir. Hastanın anneannesinde de (I.4) esansiyel tremor şikayeti mevcuttu. Anneannein ölüm nedeni hakkında ayrıntılı bilgiye ulaşılamamıştır. Hastanın dayısının iki oğlunda da PH tanısı bulunmaktadır. Kuzenlerden birinde (III.5) hastalık başlangıç yaşı 60 yaşından sonra olarak belirtilmiştir. Diğer kuzende (III.6) ise hastalık başlangıç yaşının 66 olduğu öğrenilmiştir. Olgu 5'ün ok ile belirtildiği olgu 5'e ait soyağacı Şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 24: Olgu 5'e ait soyağacı

Hastaya yapılan YND demans paneli sonucunda olan *GBA1* geninde iki adet heterozigot *GBA1* varyantı saptanmıştır; c.1342G>C yanlış anlamlı p.Asp448His (D448H), patojenik (P) ve c.882T>G yanlış anlamlı p.His294Gln (H294Q), muhtemel

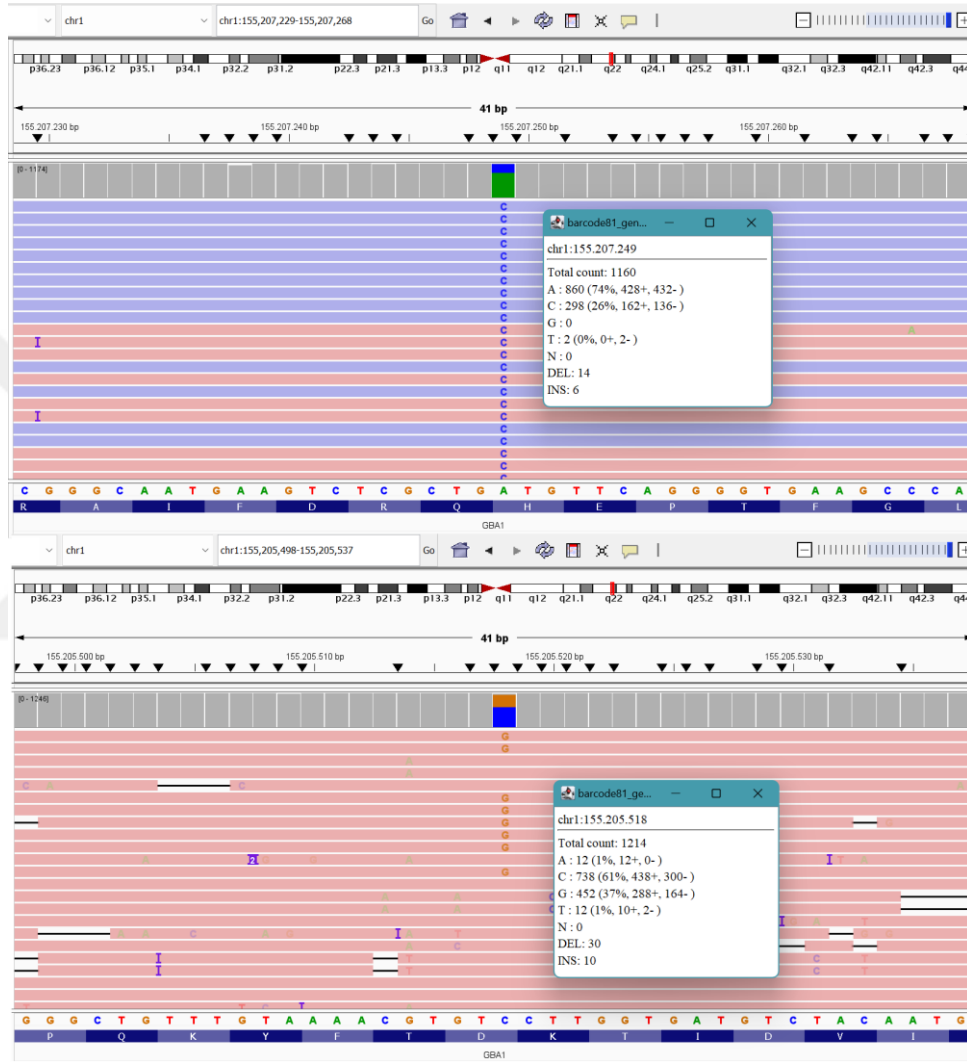
patojenik (LP). Bu iki varyanta ait YND IGV görüntüsü H294Q üstte D448H altta olmak üzere Şekil 26’da verilmiştir.



Şekil 25:Olgu 5'e ait varyantların YND IGV görüntüsü

Olgu 5’ye ait nanopor dizileme sonucunda c.1342G>C yanlış anlamlı patojenik (P) p.Asp448His (D448H) varyantı saptanırken ve c.882T>G yanlış anlamlı p.His294Gln (H294Q), bu varyantı saptanmamıştır. *GBA1* c.1342G>C varyantına ait IGV görüntüsü Şekil 27’de altta verilmiştir Olgu 5’te YND’de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1-155207249 pozisyonunda bulunan *GBA1*:c.882T>G

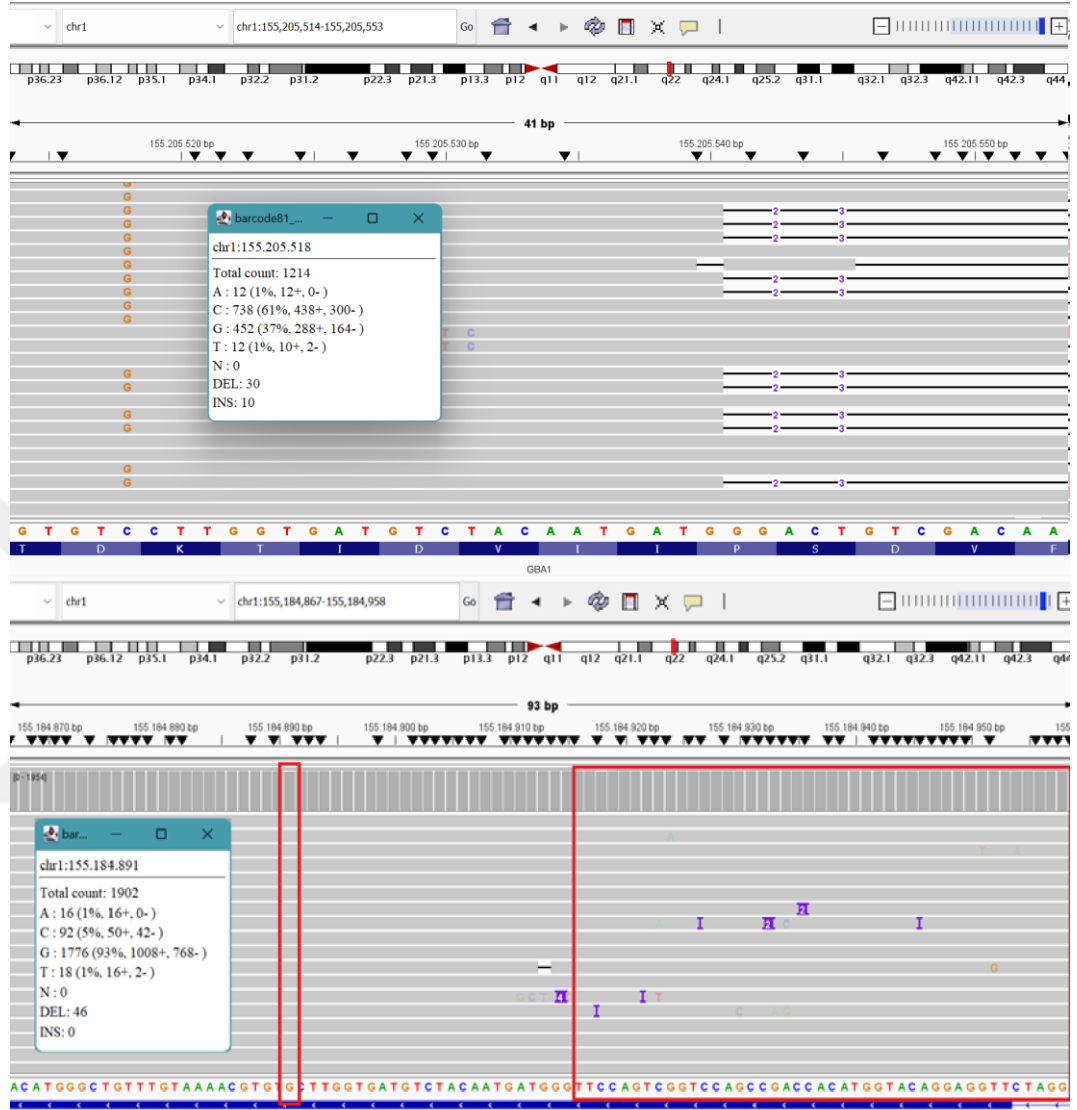
değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 29’de üstte verilmiştir. IGV görüntüsünde 1160 okumanın 860 (74%, 428+, 432-) tanesi Adenin (A) bazı, 298 (26%, 162+, 136-) tanesinin Sitozin (C) olarak okunmuştur. IGV’de varyant düşük alel fraksiyonu ile karşımıza çıkmaktadır ancak varyant çağırma aşamasında varyant çağırmanın yapılamadığı görülmüştür.



Şekil 26: Olgu 5'e ait varyantların nanopor IGV görüntüsü

Olgu 5’e ait *GBA1*:c.1342G>C varyantı diğer olgularda da tekrar etmiş ve psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesindedir. Bu varyant psödogen ile karşılaştırılarak incelendiğinde *GBA1*:c.1342G>C varyantının olduğu okumaları bazılarında *GBA1* dizisinde farklılık gösteren delesyon bölgesinin olduğu

görülmüştür. *GBA1*:c.1342G>C varyantı ve *GBA1* üzerinde homoloji gösterdiği bölge üzerindeki görüntüsü Şekil 28’de verilmiştir

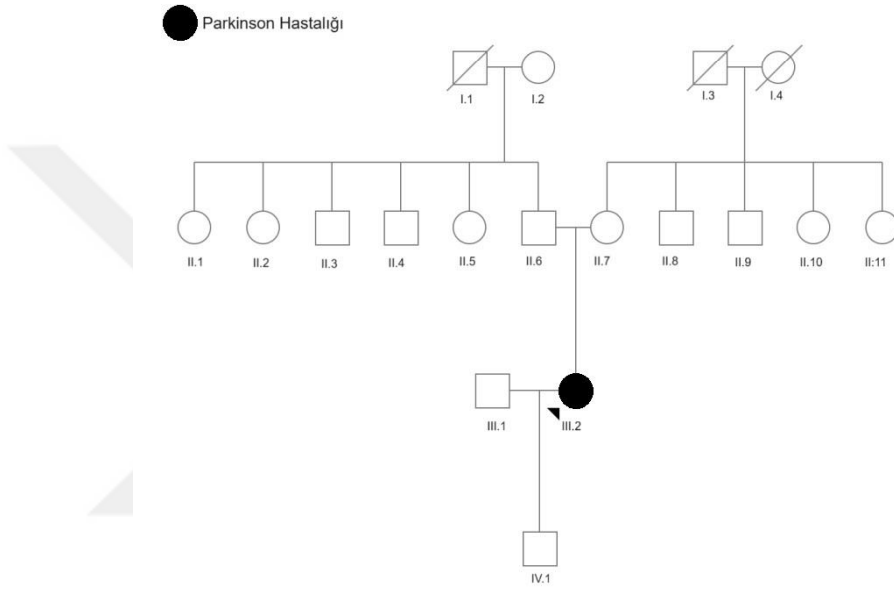


Şekil 27:Olgu 5’ye ait *GBA1*: c.1342G>C varyantı ve *GBA1* üzerinde homoloji gösterdiği bölge üzerindeki görüntüsü

4.5.4. Olgu 6

Daha önceden bilinen bir hastalığı olmayan olan 40 yaşında kadın hasta, 35 yaşındayken sol kolunda kasılmalar ile başlayan ve son 1 yıldır artan beceriksizlik şikâyeti ver. Özellikle sol el 3.-4.-5. Parmaklarda kasılma ve beceriksizlik varmış. Son zamanlarda sol bacağına adım atarken yavaşlama mevcut. Halüsinasyon ve depresyon şikayetleri olmayan hastada anksiyete bulunmaktadır. İdrar kaçırma,

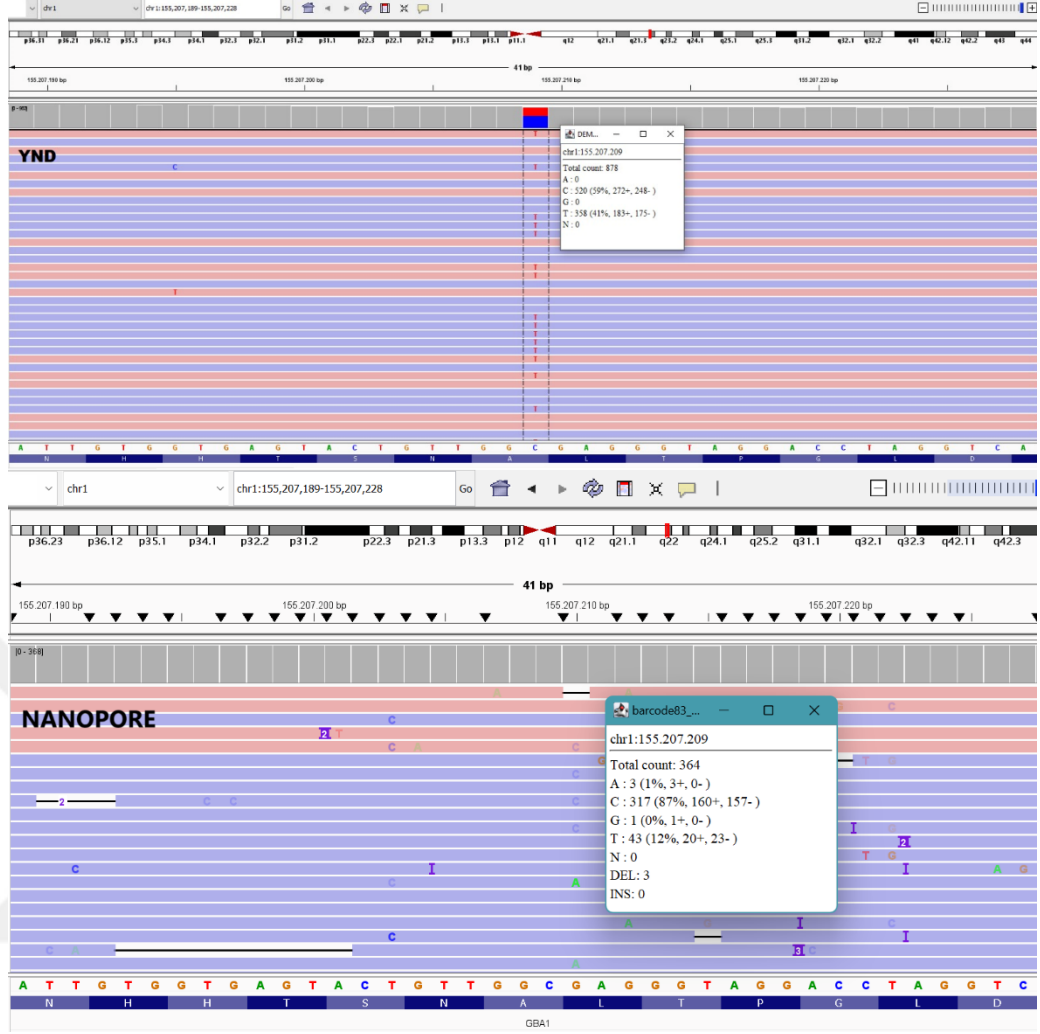
kabızlık ve ortostatik hipotansiyon yok. 3 yıldır hiposmisi var ve uykuda konuşma şeklinde RDB tarifliyor. Nörolojik muayenesi yapılan hastada sol taraf baskın bir şekilde hafif rijidite ve bradikinezi saptanmıştır. Nörolojik ölçek sonuçlarına bakıldığında Hoehn and Yahr skalasında Evre 1'dir. UPDRS-III skoru 10,5 ve MoCA test skoru 29/30'dir. Bilişsel işlevleri sağlıklı olan hastanın ailesinde benzer hastalık öyküsü yoktur. Tüm ailede metabolik hastalık, demans, unutkanlık, PH, tremor, sorgulanmıştır. Olgu 6'ün ok ile belirtildiği soyağacı Şekil 29'de verilmiştir.



Şekil 28: Olgu 6'e ait soyağacı

Olgu 6'nın YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBA1* geninde heterozigot, yanlış anlamlı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 8'de c.922G>A muhtemel patojenik (LP) (p.Ala308Thr, chr1:155207209 C->T, rs368425393) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait YND IGV görüntüsü Şekil 30'da üstte verilmiştir.

Olgu 6'da YND'de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1:155207209 (ENST00000327247.5) pozisyonunda bulunan *GBA1*:c.922G>A değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 30'da altta verilmiştir. Olgu 6 364 toplam okuma sayısının 317 (87%, 160+, 157-) tanesi sitozin 43 (12%, 20+, 23-) tanesi timin olmak üzere düşük okuma sayısı olan olgulardan biridir. Bu varyant timine ait düşük alel frekansı ile nanopor IGV'de de görülememiştir.



Şekil 29:Olgu 6'ya ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

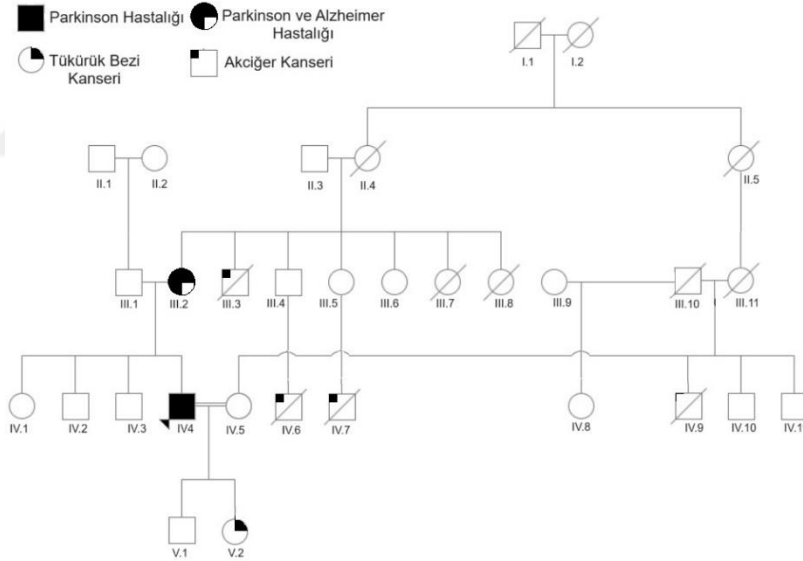
Olgu 6'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanamayan *GBAI*:c.922G>A varyantının dışında *GBAI*:c.708C>G ve *GBAI*:c.721G>A varyantları da saptanmıştır. *GBAI*:c.708C>G ve literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir. *GBAI*:c.721G>A literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır.

4.5.5.Olgu 7

Daha önceden bilinen hipertansiyon ve vertigo hastalığı olan 64 yaşında erkek hasta 56 yaşında ellerde başlayan istirahat tremoru ile tanı almış. Hasta ile yapılan görüşme süresinde bradikinezi ve bradimimi fark edildi. Yürüyüşünde bozukluk olmadığını belirten hasta ayak sürüme yaptığı gözlemlendi. Herhangi bir psikiyatrik

bozukluğu olmayan hastanın tek non-motor semptomu olan idrar yapamama da madopar kullanımı sonrasında düzelmiş. Özellikle isimleri hatırlamakta zorlanma yaşayan hasta unutkanlık tarifliyor. Nörolojik muayenesi yapılan hastada hafif bradikinezi, bilateral alt ve üst ekstremitede rijidite, konuşmada yavaşlama, postürde hafif eğilme ve ayak sürüme görülmüş Nörolojik ölçek sonuçlarına bakıldığında Hoehn and Yahr skalasında Evre 1'dir. UPDRS-III skoru 9 ve MoCA test skoru 25/30'dir.

Ailede benzer hastalık öyküsü sorgulandığında olgu 7'in annesinin (III.2) hem parkinson hem Alzheimer hastalığı tanısı bulunmaktadır. Pedigriye genel olarak bakıldığında çeşitli kanserlerin varlığı da dikkat çekmektedir. Olgu 7'in kuzenleri (IV.6 ve IV.7) ve dayısında (III.3) akciğer kanseri vardır. Olgunun kızında (V.2) ise tükürük bezi kanseri öyküsü bulunmaktadır. Olgu 7'nin ok ile belirtildiği soyağacı Şekil 31'de verilmiştir.



Şekil 30:Olgu 7 'e ait soyağacı

Olgu 7'nin YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBA1* geninde heterozigot, yanlış anlamlı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 8'de c.928A>G muhtemel patojenik (LP) (p.Ser310Gly , chr1:155207203 T->C, rs1057942) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait YND IGV görüntüsü Şekil 31'de üstte verilmiştir. Olgu 7'de aynı değişim nanoporda da saptanmıştır. Chr1:155207203 T->C pozisyonunda bulunan *GBA1*:c.928A>G değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil

31'de altta verilmiştir. 913 toplam okuma sayısının 409 (45%, 242+, 167-) tanesi sitozin, 492 (54%, 278+, 214-) tanesi timin olarak okunmuştur.

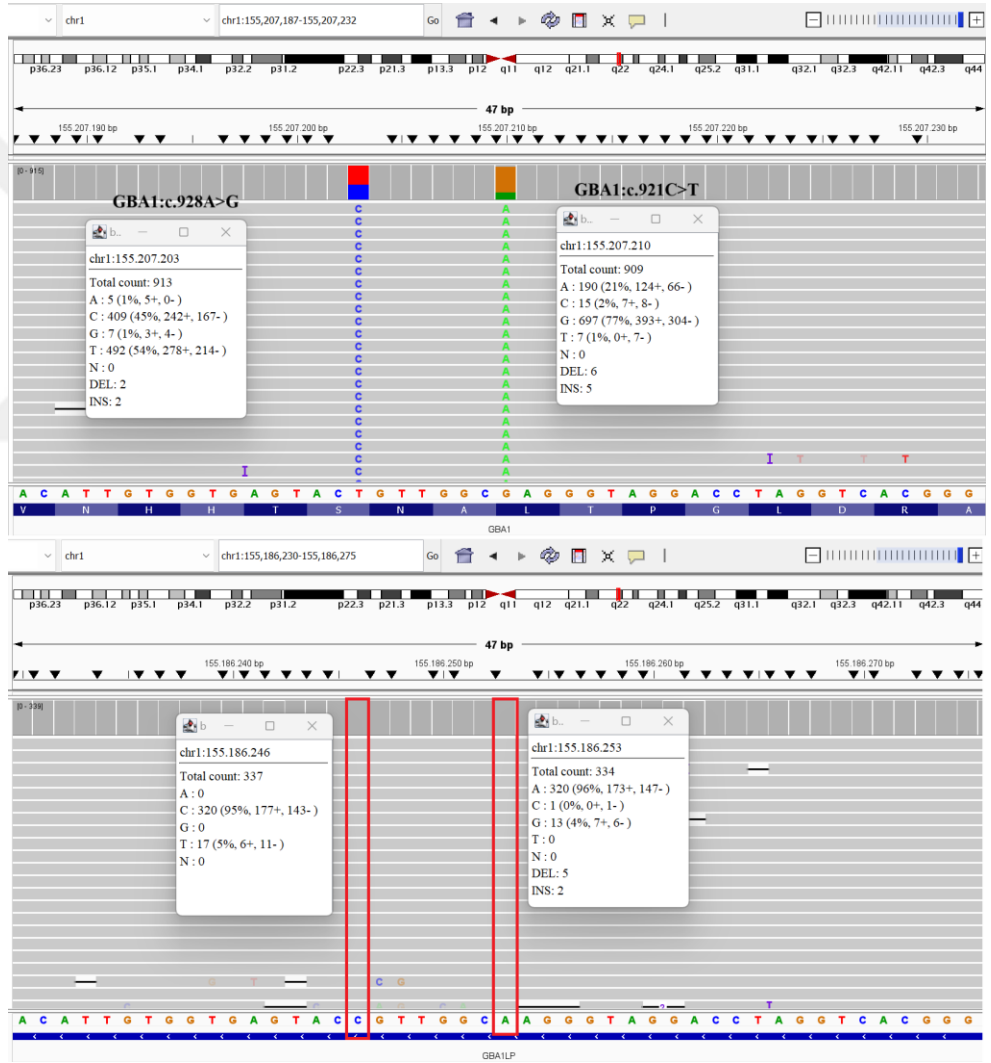


Şekil 31:Olgu 7'ye ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

Olgu 7'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*:c.928A>G varyantının dışında *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.703T>C, *GBA1*:c.721G>A, *GBA1*:c.754T>A, *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A, *GBA1*:c.1342G>C, *GBA1*:c.1448T>C, *GBA1*:c.1483G>C, *GBA1*:c.1497G>C varyantları da saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.921C>T, ve *GBA1*:c.1103G>A dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır. *GBA1*:c.921C>T, ve *GBA1*:c.1103G>A literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde

değildir ancak homoloji gösteren varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığına sahiptir.

YND’de saptanan ancak yüksek alel frekansına rağmen varyant çağırma basamağında saptanamayan Olgu 7’ye ait chr1:155.207.203 pozisyonundaki *GBA1*:c.928A>G varyantının IGV görüntüleri incelendiğinde hemen yanındaki *GBA1*:c.921G>A varyantının ikisini de barındıran okumalar olduğu gibi sadece *GBA1*:c.928A>G varyantını barındıran okumaların da olduğu görülmüştür. Bu değişimlere ait IGV görüntüleri Şekil 32’de verilmiştir.

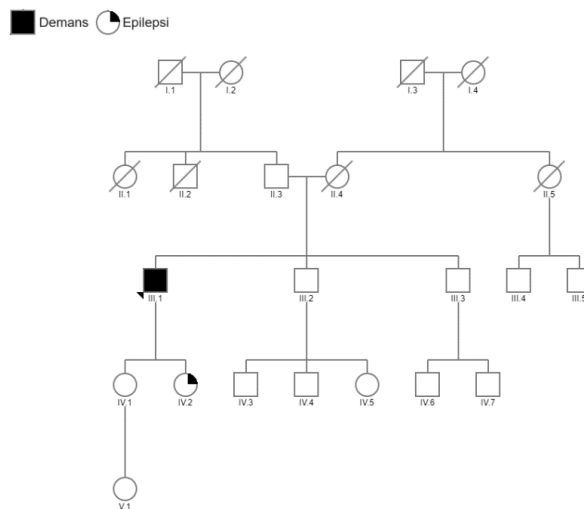


Şekil 32: Olgu 7’ye ait *GBA1*:c.928A>G ve *GBA1*:c.921G>A varyantı ve *GBA1* üzerinde homoloji gösterdiği bölge üzerindeki görüntüsü

4.5.6. Olgu 12

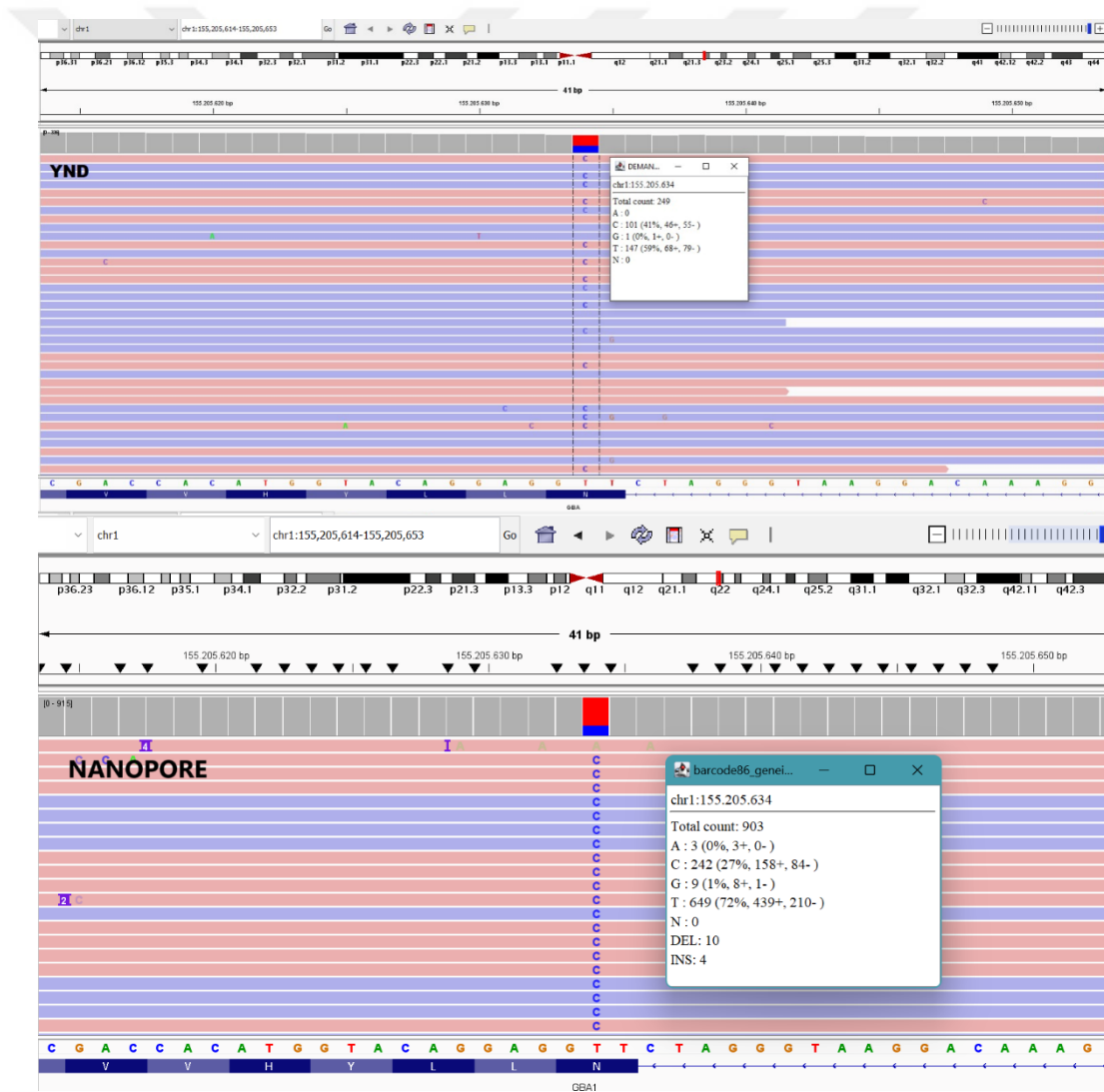
Daha önceden bilinen obstrüktif uyku apne sendromu tanısı olan 66 yaşında erkek hasta, 55 yaşında iken takıntılı ve sinirli davranışları ailesi tarafından fark edilmiş. İlk olarak unipolar depresyon tanısı almış. Bu süreçte huzursuz bacak sendromu tanısı da alan hasta bunun için nörantin kullanıyor. Aynı zamanda melatonin ve cipraleks kullanmakta. 56 yaşında çekilen beyin manyetik rezonans görüntülemesi (MRG) olağan olmakla beraber aynı yıl içinde çekilen kraniyal PET görüntülemesinde sağ fronto-temporal bölge hafif hipometabolik görünümde saptanmış ve hasta nöroloji tarafından frontotemporal demans(FTD) ön tanısı ile yönlendirilmiş. Unutkanlık şikâyeti olmayan hastada kişilik değişikliği ve takıntıları ön planda olan bir klinik hâkim.

Hastanın aile öyküsüne bakıldığında demans tanısı olan herhangi bir birey olmadığı görülmektedir. Hastanın 32 yaşındaki kızında (IV:2) epilepsi tanısı bulunmaktadır. Olgunun annesi (II.4) 80 yaşında demans bulgusu olmadan koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve astım hastalıkları ile vefat etmiştir. Hastanın 99 yaşındaki babasının (II.3) demans tanısı olmamakla beraber takıntılı davranışları ailesi tarafından fark edilmektedir. Anemnez derinleştirildiğinde olgunun baba tarafından dedesinin (I.1) de vefat etmeden önce agresif kişiliği ve takıntılı davranışları varmış. Olgu 12'un ok ile belirtildiği soyağacı Şekil 34'da verilmiştir.



Şekil 33: Olgu 12'a ait soyağacı

Olgu 12'nin YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBAI* geninde heterozigot, yanlış anlamalı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 9'da c.1226A>G patojenik (P) (p.Asn409Ser, chr1:155205634 T->C, rs76763715) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait IGV görüntüsü Şekil 34'te üstte verilmiştir. Olgu 12'de YND'de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1:155205634 T->C (ENST00000327247.5) pozisyonunda bulunan *GBAI*: c.1226A>G değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 34'te altta verilmiştir. Olgu 12 903 toplam okuma sayısının 649 (72%, 439+, 210-) tanesi timin 242 (27%, 158+, 84-) tanesi sitozin olmak üzere yüksek toplam okuma sayısı ve sitozine ait düşük alel frekansı ile nanopor IGV'de görülmüştür ancak VCF dosyasında saptanamamıştır.



Şekil 34:Olgu 12'ye ait patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

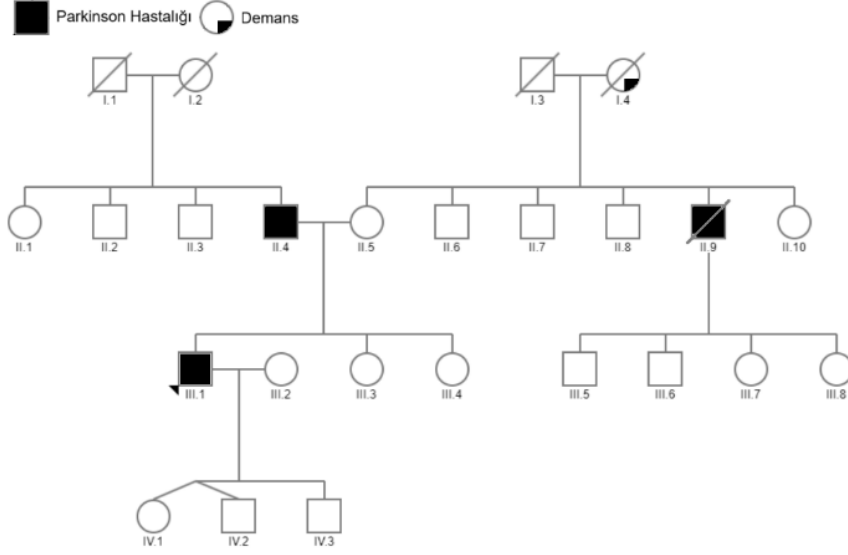
Olgu 12'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*: c.1226A>G varyantının dışında *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.703T>C, *GBA1*:c.708C>G, *GBA1*:c.721G>A, *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A, *GBA1*: c.1224G>A, *GBA1*: c.1226A>G *GBA1*: c.1342G>C, *GBA1*:c.1483G>C, *GBA1*:c.1497G>C varyantları da saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.708C>G, *GBA1*: c.1224G>A, ve *GBA1*:c.1103G>A dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır. *GBA1*:c.921C>T, ve *GBA1*:c.1103G>A, *GBA1*: c.1224G>A, literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir ancak homoloji gösteren varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığına sahiptir.

4.5.7. Olgu 13

Daha önceden bilinen bir rahatsızlığı olmayan olgu, 51 yaşında sol taraflı kol ve bacaklarda yavaşlama hissi ile başlayan semptomları ve ilerleyen dönemlerde sol elde başlayan titremeleri sonucunda PH tedavisi almaya başlamış. Hasta ile yapılan görüşmelerde ellerde ve ayakta artan tremor fark edildi. Yürürken sendelemeleri başlayan hasta duvara tutunarak yürümesi gerektiği zamanlar oluyormuş. Son zamanlar sinirlilikte artış olan hastanın depresyon ve anksiyete gibi bulguları yokmuş. Uykuda konuşmaları oluyormuş. PH non-motor semptomlarına bakıldığında hiposmisi yaklaşık 10 yıldır olan hastanın, kabızlık, ortostatik hipotansiyon ve idrar kaçırma gibi şikayetleri yok. Nörolojik muayenesi yapılan hastada sol taraflı bradikinezi, tremor saptanan hastada rijidite rastlanmamıştır. Nörolojik ölçek sonuçlarına bakıldığında Hoehn and Yahr skalasında Evre 2'dir. MoCA test skoru 20/30'dir.

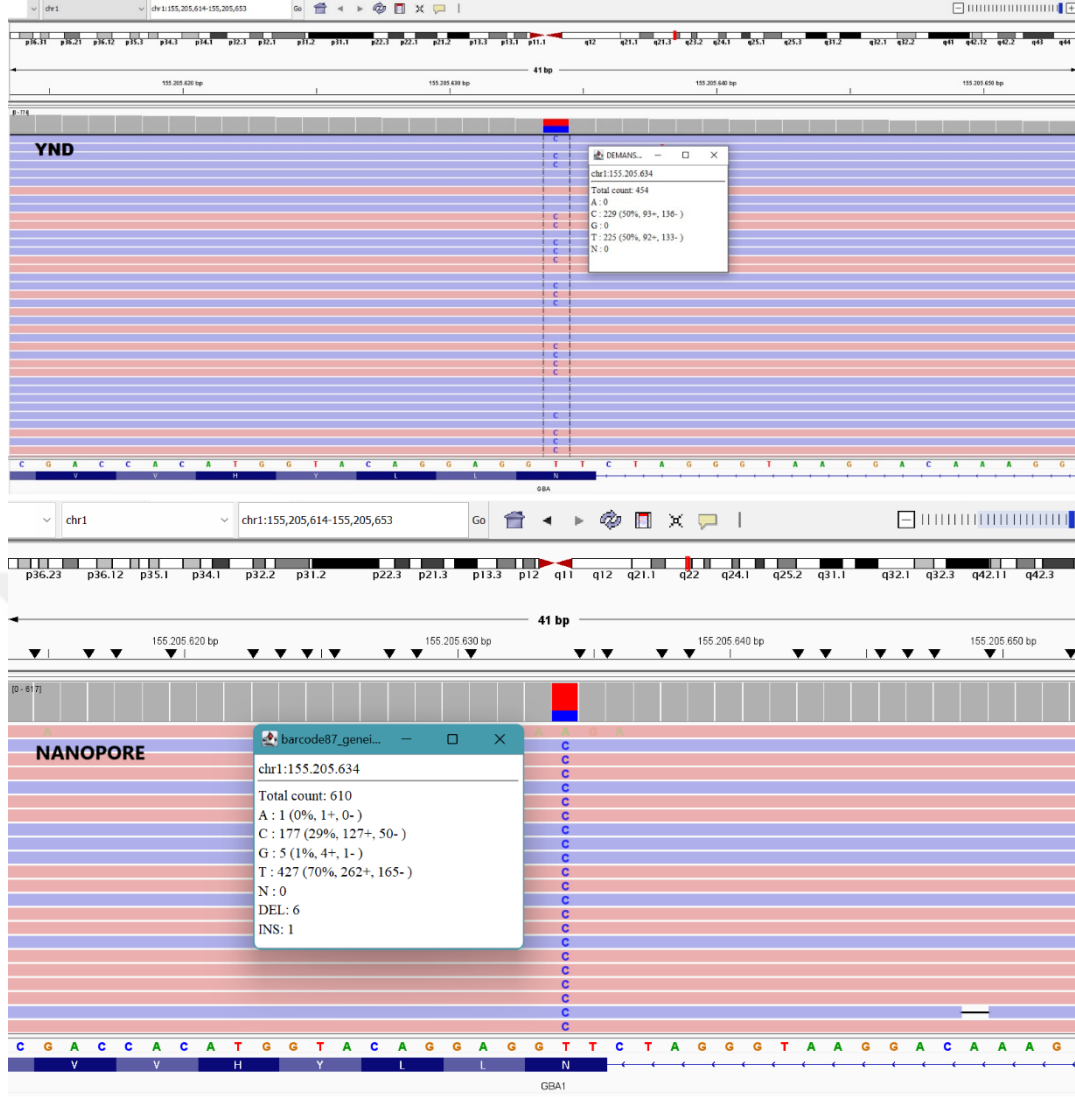
Hastanın aile öyküsüne bakıldığında olgu 13'ün 75 yaşında olan babasında (II.4) 60'lı yaşlarda konulan bit PH tanısı mevcuttur. Hastanın anne ve babası arasında akraba bulunmamakla beraber ebeveynleri yaklaşık yüz haneden küçük bir köyde evlilik yapmışlardır. Hastanın 75 yaşında bilinmeyen bir nedenle vefat eden dayısında (II.9) da PH tanısı bulunmaktadır ancak tanı alma yaşı belirsizdir. Anemnez derinleştirildiğinde hastanın 85 yaşında vefat eden anneannesinde (I.4) de demansa ait

başlangıç bulguları olduğu görülmektedir. Olgu 13'ün ok ile belirtildiği soyağacı Şekil.35'te verilmiştir.



Şekil 35:Olgu 13'a ait soyağacı

Olgu 13'nın YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBA1* geninde heterozigot, yanlış anlamlı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 9'da c.1226A>G patojenik (P) (p.Asn409Ser, chr1:155205634 T->C, rs76763715) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait IGV görüntüsü Şekil 36'da üstte verilmiştir. Olgu 13'te YND'de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1:155205634 T->C (ENST00000327247.5) pozisyonunda bulunan *GBA1*: c.1226A>G değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 36'da altta verilmiştir. Olgu 13 610 toplam okuma sayısının 427 (70%, 262+, 165-) tanesi timin 177 (29%, 127+, 50-) tanesi sitozin olmak üzere yüksek toplam okuma sayısı olan olgulardan biridir. Sitozine ait 29%'luk bir oranda okuma karşımıza çıkarak IGV'de saptanmıştır ancak VCF dosyasında görülememiştir



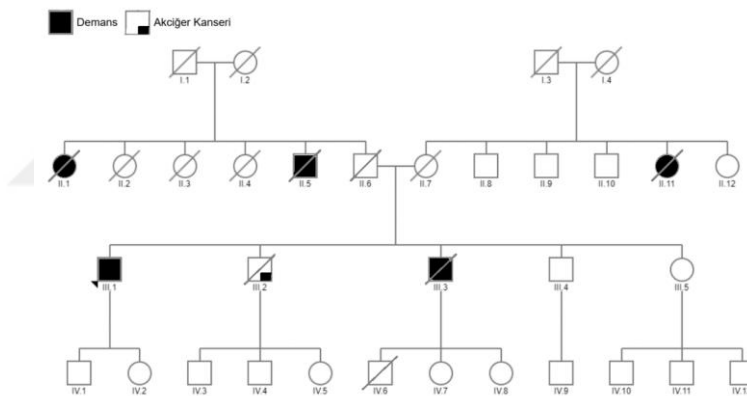
Şekil 36:Olgu 13'e ait patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

Olgu 13'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*: c.1226A>G varyantının dışında *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.708C>G, *GBA1*:c.721G>A, *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A, *GBA1*: c.1342G>C, varyantları da saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.708C>G, ve *GBA1*:c.1103G>A dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır. *GBA1*:c.921C>T, ve *GBA1*:c.1103G>A literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir ancak homoloji gösteren varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığına sahiptir.

4.5.8. Olgu 14

Daha önceden bilinen hastalığı olmayan hastada yedi yıldır devam etmekte olan unutkanlık şikayetleri mevcutmuş. 5 sene önce SVO öyküsü bulunmakta. Unutkanlık ve para hesabı yapmada problemler ile başlayan demans tablosu giderek progresyon göstermektedir. Ailesi tarafından tek başına yaşamasının imkânsız olduğu belirtilmektedir.

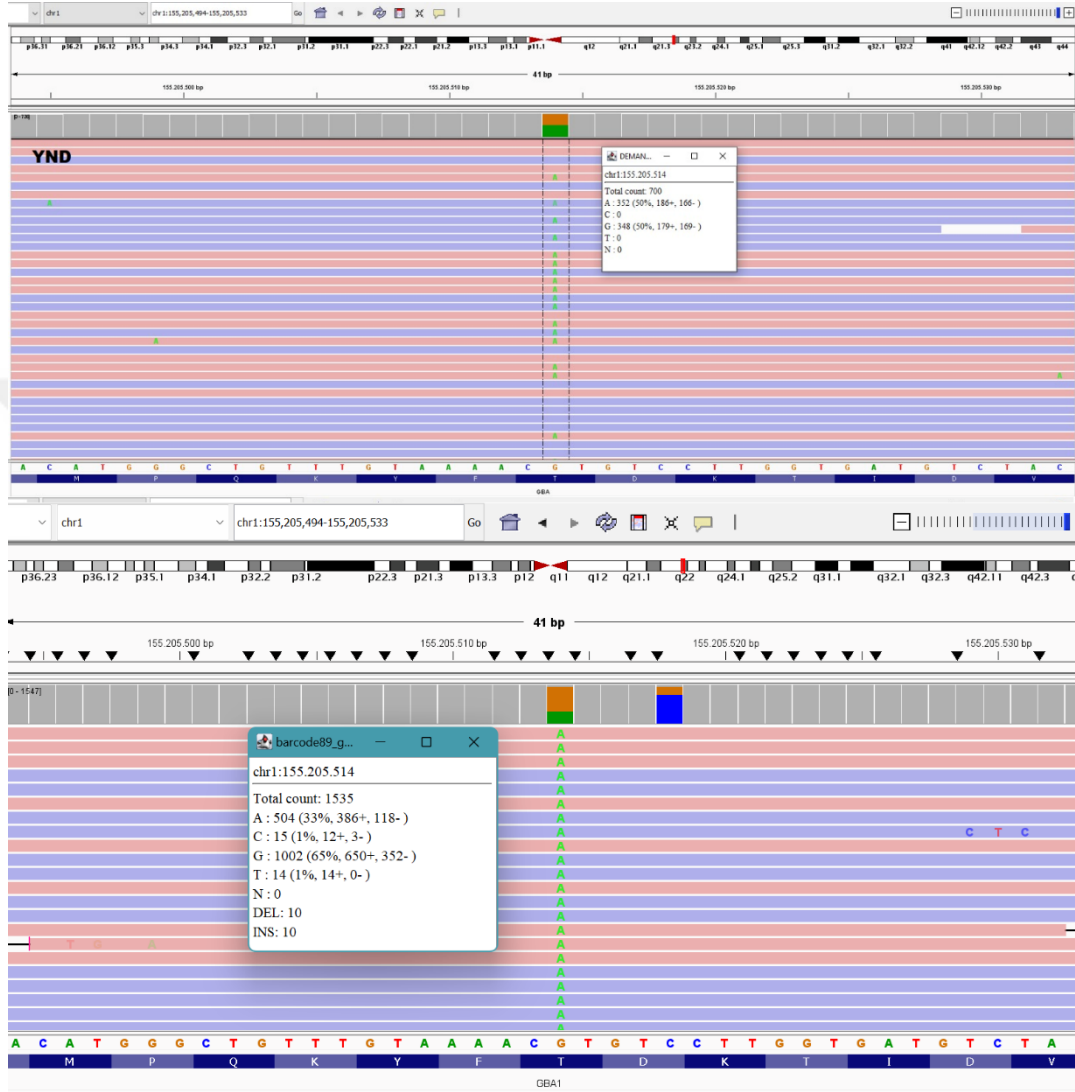
Olgunun aile öyküsüne bakıldığında ailenin pek çok bireyinde demans öyküsü olduğu görülmektedir. Hastanın kardeşi (III.3) 48 yaşında demans tanısı almıştır ve 51 yaşında vefat etmiştir. Hastanın bir diğer erkek kardeşi (III.2) ise 63 yaşında akciğer kanserinden vefat etmiştir. Olgunun teyzesi (II.11) 80 yaşında demans tanısı almış ve 84 yaşında vefat etmiştir. Hastanın halası (II.1) ve amcasında (II.5) da demans tanısı mevcuttur. Olgunun ok ile belirtildiği soyağacı Şekil 37’de verilmiştir.



Şekil 37:Olgu 14'e ait soyağacı

Olgu 14'nın YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBAI* geninde heterozigot, yanlış anlamlı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 10'da c.1346C>T klinik önemi bilinmeyen (VUS) (p.Thr449Met, chr1:155205514 G->A, rs757930613) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait YND IGV görüntüsü Şekil.38'de üstte verilmiştir. Olgu 14'te aynı değişim nanoporda da saptanmıştır. chr1:155205514 (pozisyonunda bulunan *GBAI*: c.1346C>T değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 38'de altta verilmiştir. Olgu 14 1535 toplam okuma sayısının 504 (33%, 386+, 118-) tanesi adenin 1002 (65%, 650+, 352-) tanesi guanin olmak üzere en yüksek toplam okuma sayısına sahip olan olgudur. G>A değişiminde 33%'lik bir

oranda adenin okuması karşımıza çıkmıştır. Düşük alel frekansına rağmen IGV’de görülmüştür ve varyant çağırması başarılı olarak yapılmıştır.



Şekil 38: Olgu 14'e ait klinik önemi bilinmeyen varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

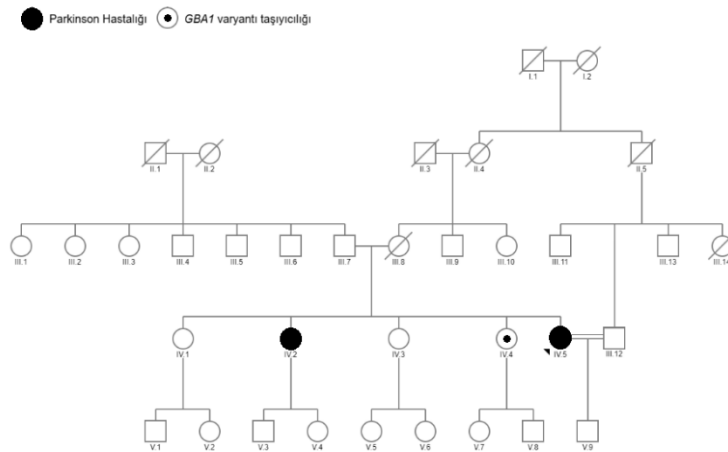
Olgu 14'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*: c.1226A>G varyantının dışında *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.703T>C, *GBA1*:c.721G>A, *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A, *GBA1*: c.1224G>A *GBA1*: c.1342G>C, *GBA1*:c.1346C>T, *GBA1*:c.1483G>C varyantları da saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*: c.1224G>A ve *GBA1*:c.1103G>A dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır. *GBA1*:c.921C>T, ve

GBA1:c.1103G>A literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir ancak homoloji gösteren varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığına sahiptir.

4.5.9. Olgu 16

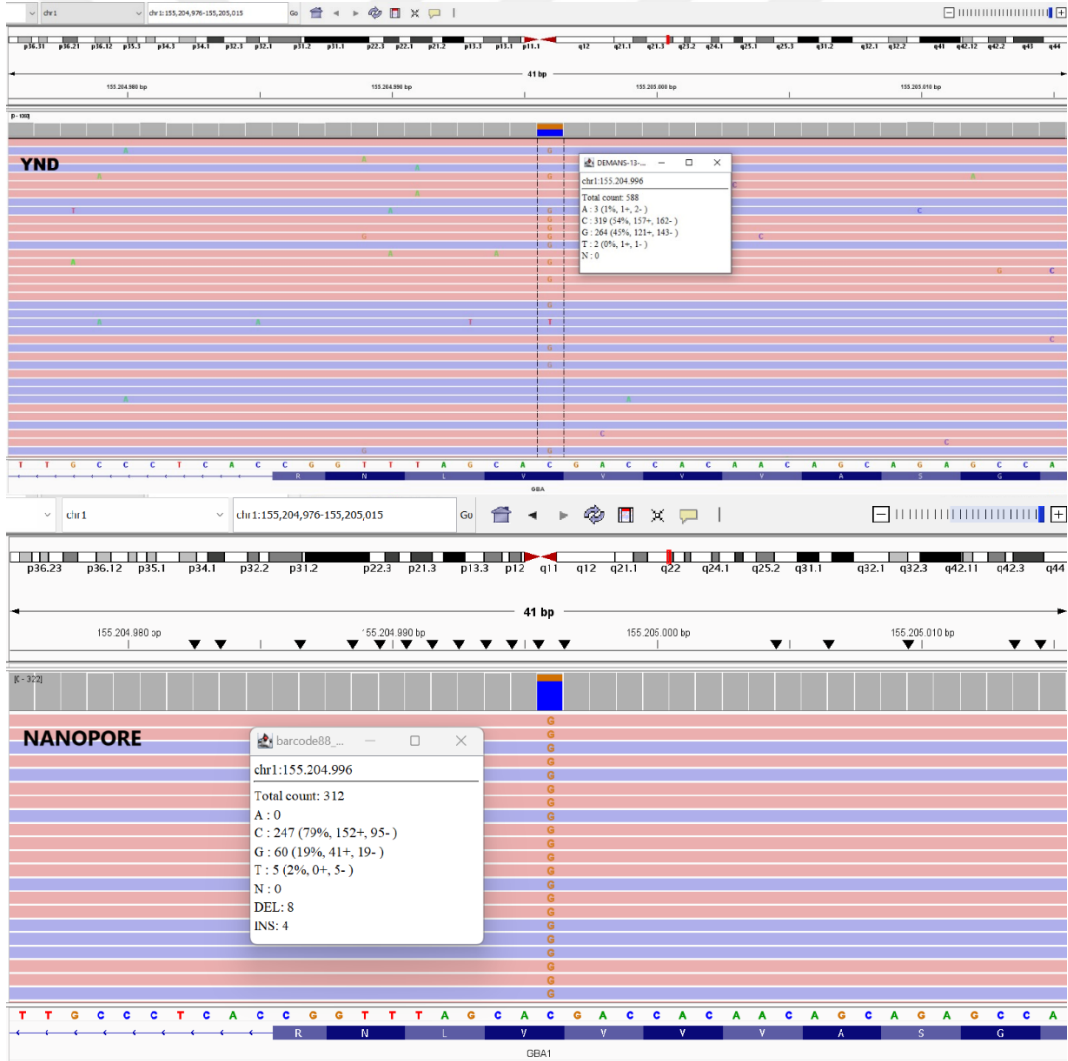
Daha önceden bilinen hemiplejik migren tanısı olan 40 yaşında kadın hasta Olgu 16, 36 yaşından beri devam etmekte olan konuşmada yavaşlama ve ellerde titreme şikâyeti mevcut. Hiposmisi yaklaşık 3 yıldır mevcut olan hasta, salivasyon artışı ve kabızlık gibi otonomik disfonksiyon belirtileri göstermekte. Uykuda konuşma şeklinde RDB şikayetleri var. 2019 yılından beri halüsinasyon şikâyeti olan hasta aynı zamanda anksiyete ve depresyon belirtileri göstermekte. Nörolojik muayenesine bakıldığında ses kısıklığı, yüz bradimimisi, bradikinezi fark edilmektedir. Romberg testi pozitifdir. Bilateral postüral tremor mevcuttur. Hoehn and Yahr skalasında Evre 3'tür. UPDRS-III skoru 27'dir. MoCA test skoru 22/30'dir ve hastada bilişsel etkilenme yoktur.

Olgu 16'nın aile öyküsüne bakıldığında hastanın bir kız kardeşinde (IV.2) de PH tanısı mevcuttur ve Olgu 17 olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Olgu 17'ye ait klinik özellikler daha sonra tartışılacaktır. Olgu 18 (IV.4) hastanın aile taraması ile tanı alan kardeşidir PH bulguları olmamakla beraber serebral palsi tanısı bulunmaktadır. Olgu 16,17 ve 18'e ait soyağacı Şekil 39'de verilmiştir



Şekil 39: Olgu 16,17 ve 18'e ait soyağacı

Olgu 16'nın YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBAI* geninde heterozigot, yanlış anlamalı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 10'da c.1495G>C muhtemel patojenik (p.Val499Leu, chr1:155204996 C->G, rs369068553) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait IGV görüntüsü Şekil 40'da üstte verilmiştir. Olgu 16'te YND'de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1:155204996 (ENST00000327247.5) pozisyonunda bulunan *GBAI*: c.1495G>C değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 40'da altta verilmiştir. Olgu 16 312 toplam okuma sayısının 247 (79%, 152+, 95-) tanesi sitozin 60 (19%, 41+, 19-) tanesi guanin olmak üzere düşük toplam okuma sayısı olan olgulardan biridir. Düşük allel fraksiyonu ile VCF dosyasında saptanamayan bu varyant IGV'de 19% allel fraksiyonu ile görülmüştür.



Şekil 40:Olgu 16'ya ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

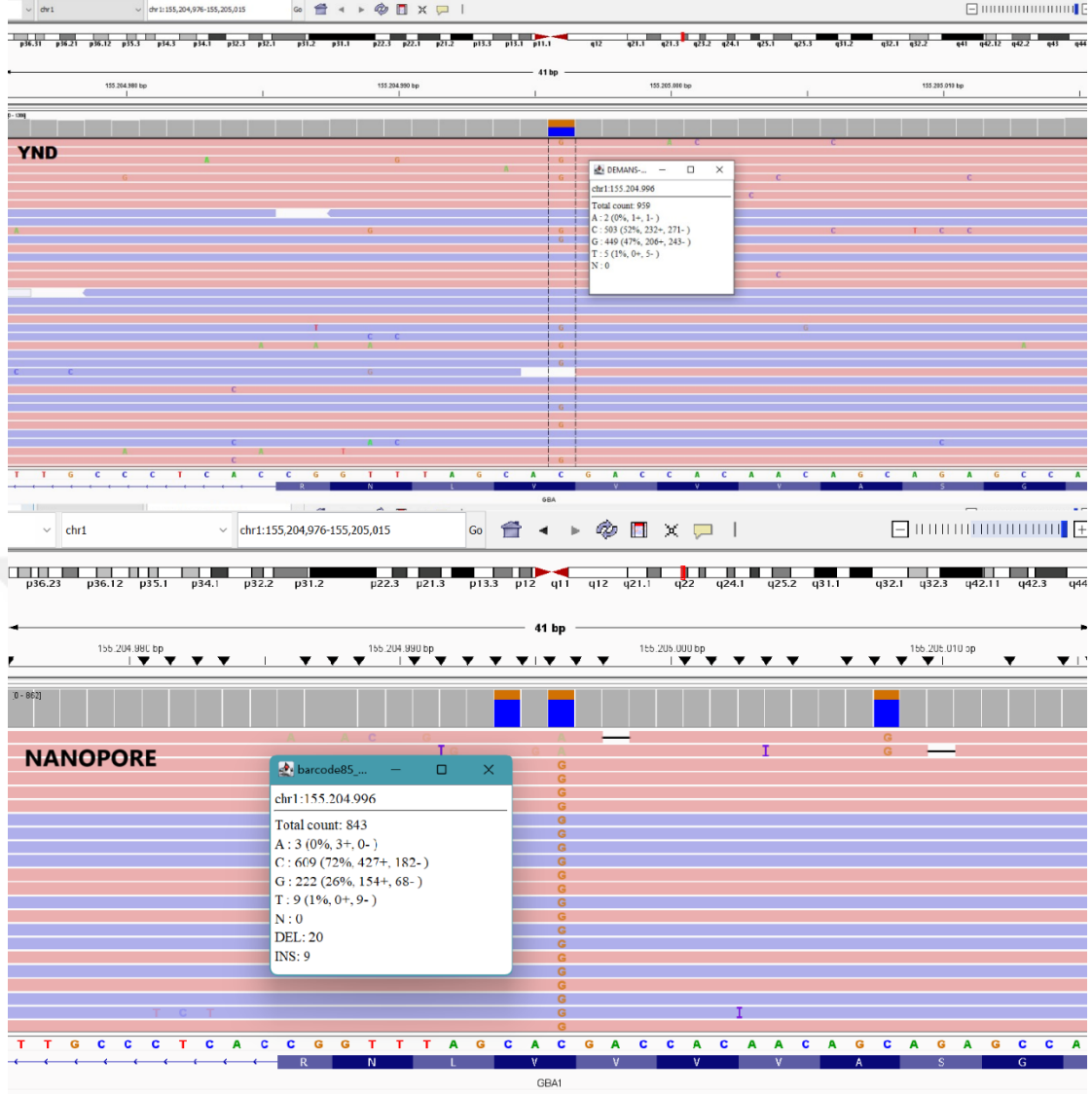
Olgu 16'ya ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*: c.1495G>C varyantının dışında *GBA1*:c.708C>G, *GBA1*: c.1342G>C varyantları da saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.708C>G dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır.

4.5.10. Olgu 17

Daha önceden bilinen hipertansiyon, astım, hiperlipidemi tanıları olan 43 yaşındaki kadın hasta 41 yaşında iken bacaklarda ağırlıklı olmak üzere bradikinezi, yürüyüşte yavaşlama ve donma şikâyeti ile PH tanısı almış. Her iki elinde tremoru olan hasta ilaç kullanımı sonrası düzelme olduğunu belirtiyor. Rijidite her iki elinde de mevcut. Ses değişikliği olmazken, yutma güçlüğü bulunmakta. Uyku apnesi sebebiyle uyku kalitesindeki düşüşten şikayetçi. Aynı zamanda uykuda konuşma, tekme atma şeklinde RDB var. Depresyon belirtisi yokken anksiyete belirtileri belirgin. Halüsinasyon yok. Hiposmi yok. Unutkanlık özellikle isimlendirmelerde zorluk şeklinde var. Otonomik disfonksiyona yönelik kabızlık, terleme artışı gibi problemleri yok. Olgu 17'ye (IV.2) ait soyağacı Şekil 39'de verilmiştir

Olgu 17'nin YND demans paneli sonucuna baktığımızda *GBA1* geninde heterozigot, yanlış anlamlı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 10'da c.1495G>C muhtemel patojenik (p.Val499Leu, chr1:155204996 C->G, rs369068553) değişimi saptanmıştır. Bu değişime ait IGV görüntüsü Şekil 41'de üstte verilmiştir.

Olgu 17'te YND'de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1:155204996 C->G pozisyonunda bulunan *GBA1*:c.1495G>C değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 41'de altta verilmiştir. IGV görüntüsünde 843 okumanın 609 (72%, 427+, 182-) tanesinin sitozin bazı, 222 (26%, 154+, 68-) tanesi guanin olarak okunmuştur. IGV'de varyant düşük alel fraksiyonu ile karşımıza çıkmaktadır ancak varyant çağırma aşamasında varyant çağırmanın yapılamadığı görülmüştür



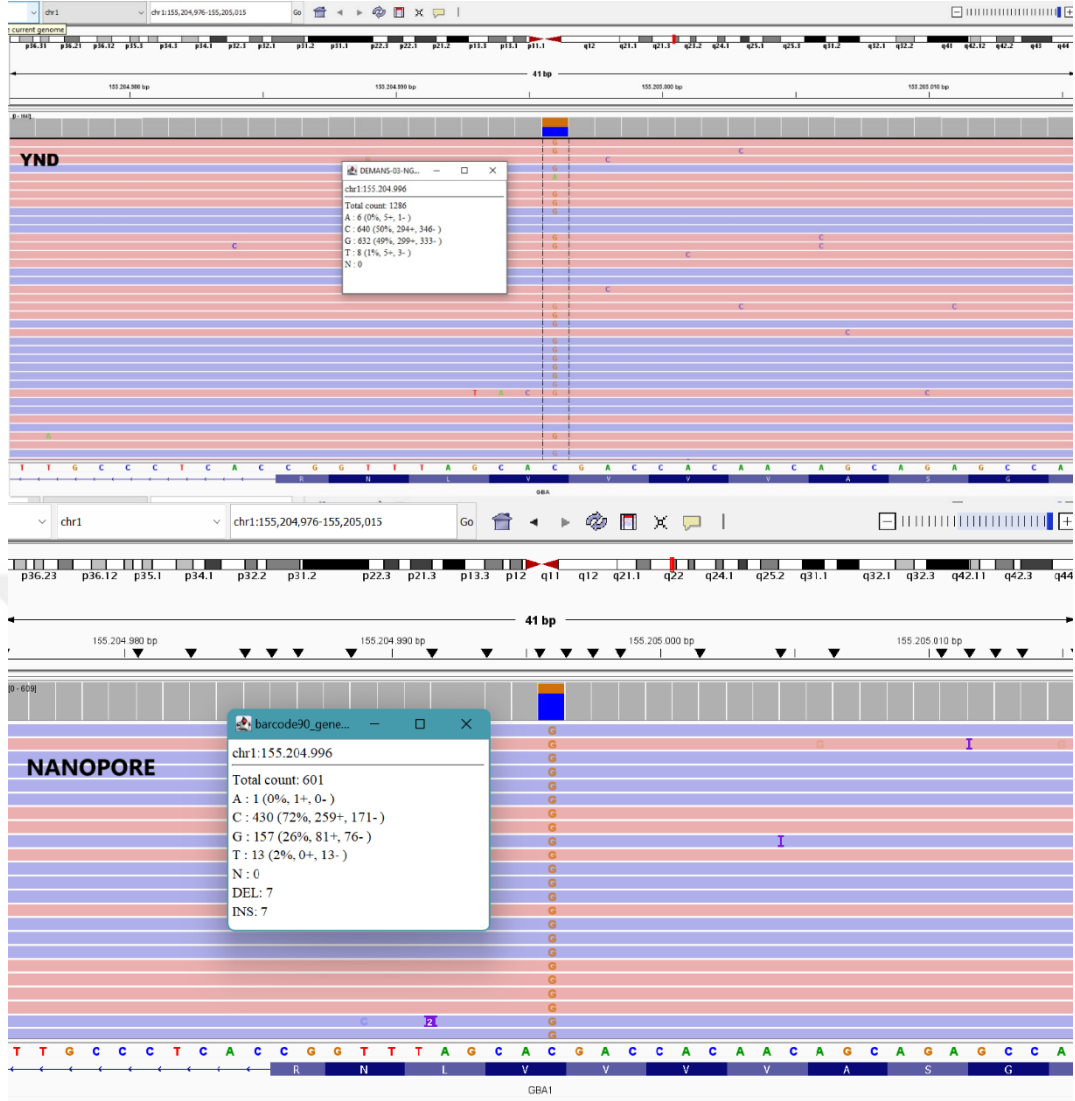
Şekil 41:Olgu 17'ye ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

Olgu 17'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan *GBA1*: c.1495G>C varyantının dışında *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.703T>C, *GBA1*:c.721G>A, *GBA1*:c.754T>A, *GBA1*:c.921C>T, *GBA1*:c.1103G>A, *GBA1*: c.1224G>A, *GBA1*:c.1342G>C, *GBA1*:c.1448T>C,, *GBA1*:c.1483G>C, *GBA1*:c.1497G>C varyantları da saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.921C>T, ve *GBA1*:c.1103G>A dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır. *GBA1*:c.921C>T, ve *GBA1*:c.1103G>A literatürde belirtilen psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde değildir ancak homoloji gösteren varyant bölgeleri arasında yanlış pozitifliğe yol açan tek nükleotid farklılığına sahiptir.

4.5.11. Olgu 18

Daha önceden bilinen serebral palsi dışında hastalık tanısı olmayan Olgu 18’de PH bulguları bulunmamaktadır. Olgu 16 ve 17’nin aile taraması kapsamında yapılan YND demans panelinde *GBAI* geninde heterozigot, yanlış anlamlı protein oluşumu ile sonuçlanan ekzon 10’da c.1495G>C muhtemel patojenik (p.Val499Leu, chr1:155204996 C->G, rs369068553) değişimi saptanmıştır. Olguya ait soy ağacı Şekil.39’de verilmiştir. Taşıyıcı olarak kabul edilen hastaya ait YND(üstte) IGV görüntüsü Şekil 42’de verilmiştir.

Olgu 18’de YND’de saptanan ancak nanoporda saptanamayan chr1:155204996 C->G pozisyonunda bulunan *GBAI*:c.1495G>C değişiminin bu pozisyona ait nanopor IGV görüntüsü Şekil 42’de altta verilmiştir. IGV görüntüsünde 601 okumanın 430 (72%, 259+, 171-) tanesinin sitozin bazı, 157 (26%, 81+, 76-) tanesi guanin olarak okunmuştur. IGV’de varyant düşük alel fraksiyonu ile karşımıza çıkmaktadır ancak varyant çağırma aşamasında varyant çağırmanın yapılamadığı görülmüştür.



Şekil 42: Olgu 18'e ait muhtemel patojenik varyantın YND ve nanopor IGV görüntüsü

Olgu 18'e ait nanopor dizilemede YND'de de saptanan GBA1: c.1495G>C varyantının dışında *GBA1*:c.475C>T, *GBA1*:c.708C>G varyantları saptanmıştır. Bu varyantlar içinden *GBA1*:c.708C>G dışındakiler psödogen kaynaklı uyumsuzluklar listesinde yer almaktadır.

5. TARTIŞMA

Glikolipidleri ve sfingolipidleri yıkımında görevli lizozomal bir enzim olan GCase 1q21 bölgesinde bulunan *GBAI* geni tarafından kodlanır. *GBAI* geni 7,6 kb büyüklüğündedir ve 11 ekzon ve 10 introndan oluşmaktadır(120). *GBAI* geninin 16 kb downstream bölgesinde *GBAPI* isimli bir psödogeni vardır. *GBAPI*'in ekzon 9'unda yer alan 55 baz çiftlik bir delesyon dışında yüksek homoloji gösteren *GBAI* ve *GBAPI* genlerinin dizilemesi zorlayıcıdır(6,7). Özellikle yeni nesil dizileme yöntemlerinde hizalama problemleri sonucu yanlış pozitif ve yanlış negatiflik gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır.

GBAI geni ve PH arasındaki ilişki ilk olarak GH tip 1 (non-nörojenik form) hastaları ve yakınlarında artmış PH insidansını gösteren çalışmalar ile ortaya çıkmıştır(13,173,174). 2004 yılında klinik ya da patolojik olarak doğrulanmış PH olan 57 hastaya ait beyin otopsinden *GBAI* dizilemesi yapılan bir çalışmada hastaların %21(n=12)'inde *GBAI* varyantı saptanmıştır(175). Sidransky ve ark. tarafından yapılan çok merkezli bir araştırmada *GBAI* mutasyonu oranı Aşkenazi Yahudilerinde %15, kontrol Aşkenazi Yahudilerinde %3, Aşkenazi Yahudi'si dışı etnik gruplarda hastaların %3'ünde ve kontrollerin %1'den azında saptanmıştır. Bu çalışmanın en büyük kısıtlılığı tüm merkezlerde *GBAI* geninin tamamının dizilemeden sadece L444P ve N370S mutasyonlarının ortak olarak bakılabilmesidir. *GBAI* geninin tamamen dizildiği hasta sayısı Aşkenazi Yahudi'si dışı etnik gruplarda 1883'tir ve bu grupta hastaların %7'sinde mutasyon tanımlanmıştır. Bu sonuçlar bize belirli nokta mutasyonu bakılmasının mutant alelerin çoğunu kaçıracağını göstermiştir. *GBAI* geninin tamamının düzenlenmesi mutant alelerin tamamının saptanması için oldukça önemlidir(176). Avrupa popülasyonunda yapılan ve 7555 vaka ve 7057 kontrolün incelendiği bir meta-analizde PH hastalarında *GBAI* mutasyonu oranı %5.48 olarak saptanmıştır(177). 3438 vaka ve 3098 sağlıklı kontrol ile Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada %3,64 *GBAI* mutasyon oranı saptanmıştır ancak bu çalışmada da belirli mutasyonlar tarandığı için novel mutant alelerin gözden kaçmış olması olasıdır(178). Anlaş ve ark. Türk popülasyonunda 71 PH hastası ve 76 sağlıklı kontrol ile yaptığı çalışmada hastaların %15,5'inde *GBAI* varyantı saptamıştır. Kontrollerde ise hiç *GBAI* varyantı saptanmamıştır. (179)

Aşkenazi Yahudi'lerinde yüksek oranda *GBA1* mutasyonu taşıyıcılığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. *GBA1* taşıyıcılığının altı mutasyonun(N370S, 84GG, IVS2+1, D409H, L444P, ve V394L) taranarak araştırıldığı eski bir çalışmada Aşkenazi Yahudi'lerinde *GBA1* taşıyıcı sıklığı 1:17 (yaklaşık %5,88) olarak saptanmıştır(180). 2005 yılında yapılan altı mutasyonun (N370S, L444P, 84GG, IVS2+1G°A, V394L, and R496H) tarandığı bir çalışmada 99 Aşkenazi kökenli PH tanısı olan hastanın %31,3'ünde *GBA1* varyantı saptanmıştır. Aynı çalışmada 1543 Aşkenazi kökenli kontrol grubunda ise taşıyıcılık sıklığı %6,2 olarak bulunmuştur(181). Tüm genin dizilenmesi spesifik mutasyonların bakılmasına göre tanı veriminin artmasını sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan başka bir çalışma grubu, 735 Aşkenazi kökenli PH tanılı hastada ve 662 Aşkenazi kökenli kontrol grubunda sırasıyla %18 ve %7,5 oranında vakada *GBA1* mutant alelini tüm gen dizilemesi ile saptamıştır(110). Gan-Or ve ark. İsrail Aşkenazi topluluğunda 420 PH hastası, 333 yaşlı kontrol ve 3.805 genç kontrol ile yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Sekiz (N370S, R496H84GG, IVS2+1, V394L, D409H, L444P, RecTL) *GBA1* mutasyonu taradıkları bu çalışmada *GBA1* taşıyıcı sıklığı PH hasta grubunda %17,9 yaşlı kontrol grubunda %4,2 ve genç kontrol grubunda %6,35 olarak saptanmıştır(90).

Çeşitli ülkelerde *GBA1* taşıyıcılık oranı üzerine farklı çalışmalar yürütülmüştür. İspanya'da 225 Parkinson hastası ile yapılan bir çalışmada *GBA1* mutant alel frekansını %9,8 olarak saptamışlardır(182). Yine İspanya'da sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada 532 PH grubu ve 542 kontrol grubu *GBA1* geni PZR yöntemi ile incelenmiş ve taşıyıcılık oranları sırasıyla %12,2 (PH) ve %7,9 (kontrol) olarak saptanmıştır. Doğu Kanada'da yapılan başka bir çalışmada 225 PH hastası ve 110 kontrol bireyinde *GBA1* geninin tüm ekzonlarını dizileyerek yaptıkları çalışmada kontrollerdeki %0,91 *GBA1* frekansına göre 4,8 kat fazla olan PH grubu *GBA1* frekansını %4,4 olarak saptamışlardır(183). Kanada'da *GBA1* genini tarayan başka bir çalışmada ise %5,7'lik mutasyon sıklığı bildirilmiştir(184).

Bizim çalışmamızda retrospektif olarak yapılan araştırmada patojenik ve muhtemel patojenik olarak değerlendirilen *GBA1* varyantlarına sahip PH tanılı hastaların oranı %14,29 (n=8) olarak saptanmıştır. Literatüre bakıldığında incelenen popülasyon ve izole mutasyon ya da tüm gen dizilemesi yöntemine göre mutant alel

saptama oranı değişmektedir ancak genel olarak bakıldığında PH hastalarının %5-25'i *GBAI* mutasyonları taşımaktadır(76). Bu çalışmada saptanan %14,29'lık oran literatür ile uyumlu olarak görünse de geniş kohortlarda yapılan çalışmalarda %5-7 olarak(176,177,184) saptanan oranlara göre yüksektir. Bu yüksekliğin sebeplerinden ilki 56 kişilik hasta popülasyonunun kısıtlılığı ve bu kısıtlılık içerisinde yeni *GBAI* taşıyıcısı hastaların aile taraması gibi sebeplerle randomize olmadan popülasyona katılmış olmasıdır. Aile taraması nedeniyle kısıtlı popülasyona katılan bireylerin yüksek oranlarda *GBAI* taşıyıcılığı sonucunu oluşturmuş olması muhtemeldir. Bu yüksekliğin diğer bir sebebi örneklemimize ait hasta yaşının düşük olmasıdır. Literatürde batı toplumlarında erken başlangıçlı PH sıklığı %3–7(185) olarak belirtilirken bu çalışmanın örnekleminde erken başlangıçlı PH hastası sayısı 19 (%33,93)'dur. Erken başlangıçlı PH tanısının yoğunlukta olduğu hasta grubunda genetik etiolojinin baskın olması beklenen bir sonuçtur.

167 hasta demans (%71,98) tanısı ile polikliniğimize başvurmuştur ve 2 hastaya ait varyantlar ACMG (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji) kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırıldığı için *GBAI* varyantına sahip demans tanılı hastaların oranı %1,20 (n=2) olarak saptanmıştır. Tsuang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada saf LCD olarak tanı alan 79 kişilik hasta grubunda 6 hastada (%7,6) patojenik *GBAI* mutasyonu saptanmıştır. Aynı çalışmadaki diğer hasta gruplarına bakılırsa;222 kişilik LCD-AH grubunda sekiz hastada (%3,6), 243 kişilik AH hasta grubunda iki hastada % (0,8) ve 381 kişilik kontrol grubunda 3 kişide (%0,8) saptanmıştır(166). Clark ve ark. tarafından yapılan beyin dokusundan tüm *GBAI* ekzonlarının çalışıldığı başka bir çalışmada *GBAI* mutasyonu tüm grubun %18'inde saptanmıştır. Saf LCD, saf AH ve kontrol gruplarında ayrı ayrı olarak bakıldığında bu oran sırasıyla %28, %10 ve %3 olarak bulunmuştur.(186) Bizim çalışmamızdaki %1,20 (n=2) oranının düşük olmasının en büyük sebebi hastaların demans tanılarının patolojik olarak değil klinik olarak konulması sebebiyle spesifik olarak belirlenmeden YND demans paneli araştırması yapılmasıdır.

Bizim çalışmamız, *GBAI* geni varyantı taşıyan hastalarda intron ve ekzon olarak tüm *GBAI* ve *GBAP1* geninin uzun PZR ampikonları oluşturularak nanopor dizileme yöntemi ile dizilendiği ülkemizdeki ilk çalışmadır. *GBAI*'in nanopor ile dizilendiği ilk

çalışma Leija-Salazar ve ark. tarafından 102 hastanın tükürük (93 örnek) ve beyin (9 örnek) örneklerinden yapılan çalışmadır(24). Bu çalışma da bizim çalışmamız gibi *GBA1* geninin 8.9-kb'lik amplikonunun oluşturulması ile yapılmıştır. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak hem *GBA1* hem *GBAP1* dizilemesi yapılmıştır. Bu çalışmada altın standart metot olarak Sanger dizileme kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda Sanger dizilemesi yapılan bir hasta vardır ancak kalan hastalar için Sanger dizileme planlaması yapılmıştır. Leija-Salazar ve ark. tarafından yapılan çalışmada örneklerdeki bilinen tüm anlamsız mutasyonları tespit edebilmişler ve ancak bir rekombinant aleli tanımlayamamışlardır. Bu çalışmada varyantların faz bilgisi için WhatsHap programı kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda varyantların faz bilgisi için herhangi bir algoritma kullanılmamıştır ve faz bilgisi elde edilmemiştir.

Başka bir çalışmada yine *GBA1* geninin 8.9-kb'lik amplikonu oluşturularak Oxford Nanopore GridION ile dizileme yapılmış ve Sanger dizileme ile doğrulama yapılmıştır(187). Bu çalışmada 462 Norveçli PH hastası ve 367 sağlıklı kontrole ait örnekler kullanılmıştır. Saptadıkları 79 nadir *GBA1* varyantının 18 tanesi P, LP, VUS olarak sınıflandırılırken kalanı B, LB olarak sınıflandırılmaktadır. Bu çalışmada iki (NGMLR, Minimap2) farklı hizalama aracı üç farklı varyant çağırma aracı (BCFtools, Clair3, Pepper-Margin-Deepvariant) ile kullanılarak biyoinformatik araçların karşılaştırması yapılmıştır. NGMLR, Minimap2 ile BCFtools kombinasyonunun en başarılı sonuçlar verdiği saptanmıştır. %95,8 gerçek pozitif *GBA1* varyantı, %4,2 yanlış pozitif varyant saptanması yapmışlardır. Bu kombinasyonun hiç yanlış negatif varyant saptaması yapmadığı görülmüştür ancak yalnızca Sanger dizileme ile doğrulama yapıldığı için yanlış negatif varyantların az hesaplandığı da bu çalışmada belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda Minimap2 ve Clair3 biyoinformatik araçları kombinasyonu kullanılmıştır.

Graham ve ark. tarafından Yeni Zelanda kohortunda yapılan başka bir çalışmada 229 PH vakası and 50 sağlıklı kontrol GridION nanopore dizileme platformu ve Sanger doğrulaması ile *GBA1* geni dizilenmiştir(25). Leija-Salazar ve ark. tarafından oluşturulan metot doğrulanmış ve hastaların %9,2'sinde *GBA1* geni varyantı saptamışlardır.

Leija-Salazar ve ark.'nın çalışması ve bu çalışmada oluşturulan iş şemasının uygulandığı diğer iki çalışmada da *GBAI* geninde nanopor ile yüksek varyant tanımlama oranları olduğu görülmektedir(24,25,187). Bizim çalışmamızın %16,67'lik varyant saptanma oranının literatür ile karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu görülmektedir. Başarıyla saptanan varyantlar Olgu 5 (*GBAI*:c.1342G>C) ve Olgu 14'e (*GBAI*:c.1346C>T) aittir. Olgu 5'e ait iki varyant vardır ve *GBAI*:c.1342G>C değişimi saptanırken *GBAI*:c.882T>G varyantı için biyoinformatik analizlerde varyant çağırma yapılamamış ve saptanamamıştır.

Varyant saptanma oranının düşüklüğünün çeşitli sebepleri olabilir. Bu sebepler üç ana çalışma basamağına kabaca bölünebilir: PZR, Dizileme ve Biyoinformatik. Her bir basamakta oluşabilecek sorunlar bu kısımda incelenecektir.

PZR

Bizim çalışmamızda uzun menzilli PZR yapılmıştır ve *GBAI* ve *GBAPI*'e ait 8916 ve 6333 uzunluklarında iki ampikon elde edilmiştir. PZR aşamasında dizileme sonuçlarını etkileyebilecek çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler primerler, polimeraz, PZR koşulları, Mg konsantrasyonu, şablon DNA'nın kalitesi ve miktarı olarak sıralanabilir. Primerler literatürden yararlanılarak oluşturulmuştur (170). Hİ-Fi Taq polimeraz, Mg konsantrasyonu sabit olarak HiFi Taq Master Miks olarak satın alınmıştır. PZR koşulları ise optimize edildikten sonra örneklerle çalışılmaya geçmiştir. Bu aşamada örnek DNA'ların kalitesi ve miktarı sonuçları etkileyebilecek faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. DNA saflık oranının 1.8-2.0 arasında olması yapılacak moleküler tekniğin akıbeti için oldukça önemlidir (193). Bizim olgularımıza ait örneklerin saflık oranlarına bakıldığında Olgu 4 dışında tüm örnekler 1.8-2.0 aralığı içerisindedir.

Örneklerin konsantrasyonlarına bakıldığında bazı örneklerde manuel olarak birkaç kez izolasyon yapılmasına rağmen yüksek başlangıç konsantrasyonu elde edilememiştir. En düşük DNA konsantrasyonu Qubit Florometre sonuçlarına göre Olgu 4,13 ve 14'e aittir. Bu düşük konsantrasyon sorunu PZR sonrası ölçümlerde sadece Olgu 4'te devam etmiştir. Ancak jel kontrolünde bant görünümü iyidir. Dizileme sonuçlarına bakıldığında Olgu 4 en düşük okuma sayısına sahip iki örnekten biri

olmuştur. Bu da DNA konsantrasyonu düşüklüğü ve PZR sonrası konsantrasyon düşüklüğünün okuma sayısına etki ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda DNA saflık derecesi 1,79 olması Olgu 4'te PZR inhibisyonu yaratabilecek kontaminant proteinlerin varlığına işaret olarak düşünülebilir.

İyi başlangıç konsantrasyonlarına rağmen Olgu 2 ve Olgu 16 PZR sonrası ölçümlerde düşük konsantrasyonlarda kalmışlardır. Bu ölçümle korele olacak şekilde jel görüntülemeye olgu 2 ve olgu 16'ya ait bantlar oldukça siliktir. Yine benzer şekilde bu örneklerle ait okumalar da düşük sayıda kalmıştır. Bu açıdan bakıldığında bu örneklerde sorunun PZR aşamasında başlayıp jel görüntülemeye saptandığı ve ardından dizileme ve okuma aşamasına sirayet ettiği görülebilmektedir. Bu PZR başarısızlığını anlamak için literatüre bakıldığında karşımıza ilk neden olarak PZR inhibisyonu çıkmaktadır. Çevredeki kalıntılardan elde edilen DNA moleküler analizi kontaminantlar yüzünden zordur ve şiddetli inhibisyon alellerin kaybına veya tam yanlış negatif sonuçlara yol açabilir(188). Humik asit ve fulvik asit toprakta, IgG, hemoglobin ve hematin kanda bulunan önemli PZR inhibitörlerindendir(189). Olgu 2 ve 16'da periferik kandan yapılan izolasyonlar olduğu için kontaminasyon açısından saflıklarına bakıldığında 1,93 ve 1,95 olduğu görülmektedir. Bu sebeple PZR inhibe olduğunu düşündürecek bir bulguya rastlanmamıştır. PZR verimini etkileyen faktörler primer, dNTP, ve MgCl₂ konsantrasyonu, Taq polimeraz miktarı, adjuvan kullanımı ve şablon DNA miktarı olarak karşımıza çıkar(190). Bu değişkenler içerisinde sadece şablon DNA miktarı ve kalitesi örnekler arasında farklılık gösterdiği için olgu 2 ve 16'daki PCR verimi düşüklüğü örneklerdeki olası DNA kalitesi düşüklüğü/fragmentasyonu sebebi ile oluşmuş olabilir(191).

Dizileme

Nanopor dizileme yeni bir dizileme tekniği olması sebebiyle hala YND teknolojilerine göre ham dizilerde hala yüksek hata oranına sahiptir. MinION Analiz ve Referans Konsorsiyumu'ndan yapılan bir çalışma, 2D okumaların toplam hata oranını %12 (Yanlış çağırma 3%, insersiyon 4%, delesyon 5%) olarak saptamıştır. 2D başarılı okumaların toplam hata oranı ise 10.5% olmuştur(192). Özellikle elektrik sinyallerinin nükleik asitlere dönüşümünü sağlayan yazılımların yani baz çağırıcıların

performansı bu başarı oranında oldukça önemlidir(193). Bizim çalışmamızda da kullanılan baz çağırıcı Guppy literatüre bakıldığında %85–92 ortalama okuma doğruluğuna sahiptir(194). Çalışmamızın baz çağırma oranlarına bakıldığında ortalama %82,88 baz çağırma oranı vardır. Baz çağırma oranlarında çok farklılık göstermemesine rağmen okuma sayısı ve kalite skorlarını geçen okuma oranlarına bakıldığında sonuçlar değişkenlik göstermektedir. Tüm örneklerle ait toplam okuma sayısı ortalaması 8,72 kb'dir (en yüksek Olgu 7 - 14,84 ve en düşük Olgu 4 - 3,72). Okuma sayısı arasındaki farklılıkların en önemli sebebinin PZR çıktı kalitesi arasındaki farklar olduğu düşünülmektedir.

Nanopore her bir bazın temel çağrı kalitesini tanımlamak için Phred kalite skorunu kullanmaktadır. Kalite skorlarını geçen okuma oranı ortalaması %53,8'dir. En düşük iki oran olgu 2 (%37,8) ve Olgu 16 (%35,8)'ya aittir. En yüksek kaliteli okuma oranları ise olgu 7 (%67,5) ve olgu 14 (%68,5)'e aittir. Q skoru 9 ve üzeri olan okumalar baz alındığı için %53,8'lik bir oran elde edilmiştir ve bu düşük bir orandır. Literatüre bakıldığında Zhao ve ark. tarafından bakteri genomunda uzun okumalar ile yapılan bir çalışmada Q skoru eşiği 10 olarak alınmasına rağmen okumaların %86'sı bu skoru geçmeyi başarmıştır(195). Düşük kalite skorlarının çeşitli sebepleri olabilir. Örneğin düşük örnek kalitesi ve zayıf kütüphane hazırlığı kalite skorlarını düşüren faktörlerden biri olabilir(196). Bununla uyumlu olarak Kalite skorlarını geçen okuma sayısı en düşük olan iki olgu 2 ve 16 aynı zamanda PZR sonrası ölçümü en düşük olan iki olgudur.

Biyoinformatik

Çalışmamızda varyantların 9 tanesi varyant çağırma basamağında saptanamamış ve sadece IGV'de görülebilmıştır. Alel fraksiyonları için eşik değeri belirlemek için literatüre bakıldığında Sears ve ark. tarafından yapılan araştırma karşımıza çıkmıştır. Hangi varyantları artefakt olarak değerlendirecekleri ve bu artefaktları araştırmak için vakit kaybedilmesini önlemek için varyant alel frekansına bir eşik belirlemişlerdir. Alel frekansı değerini 0,33 olarak belirlemiş ancak %5'lik bir tampon uygulayarak eşiği 0,33'ten 0,28'e düşürmüşlerdir(197). Bu çalışma kısa okumalı YND ile çalışılan tüm ekzom dizileme datasından elde edilse de uzun okumalı

nanopor dizileme verisi bulunamadığı için bu değerler dikkate alınmıştır. Bu eşik değeri ile bakıldığında varyant saptama oranı %33,3(4/12) olmaktadır. Varyant saptanma oranı farklı varyant alel frekansı eşikleri kullanılmasına rağmen literatüre göre oldukça düşüktür.

Varyant çağırma BAM dosyası şeklinde genomu hizalanmış okumalar üzerinden yapılır ve referans genom ile okumalar arasındaki farkların “çağırılması” aşamasıdır. Çalışmamızdaki varyantların yarısından çoğu bu aşamada elenmiştir. Varyant çağırma aşamasına etki edebilecek faktörler Zverinova ve ark. tarafından incelenmiştir(196). DNA izolasyonu, PCR duplikeleri, kaplam ve okuma uzunluğu bu faktörlerdir.

Zverinova ve ark. DNA izolasyonu gibi bir işlemin sonucunda elde edilen genomik DNA'nın kalitesi ve niceliğinin deney üzerinde büyük etkisinin olabileceğinden bahsetmişlerdir. Bizim çalışmamızda düşük DNA konsantrasyonu olan örnekler mevcuttur ve bu düşüklük bu örneklerdeki varyantların okuma sayılarına direkt olarak yansımıştır.

PZR duplikeleri aynı PZR klonuna ait okuma setlerine verilen addır. Tek bir klondaki bir mutasyonun farklı okumalar olarak algılanması o varyanta ait alel fraksiyonunu arttırarak yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Benzer şekilde wild tip alelin duplike olduğu durumlarda varyantın alel frekansı düşer ve yanlış negatif sonuçlar oluşabilir. Bizim çalışmamıza bakıldığında düşük alel frekansı olmasına rağmen PZR duplikeleri IGV’de görülmemiştir.

Olgu 7’ye ait varyant haricindeki tüm varyantların ortak özelliği düşük alel fraksiyonuna sahip olmalarıdır. Bizim çalışmamızda *GBAI* geni ve psödogeni *GBAP1* aynı anda PZR ile çoğaltılmış ve dizilenmiştir. IGV görüntüleri ayrıntılı incelendiğinde uzun okumalar olmasına rağmen yanlış hizalama problemleri karşımıza çıkmıştır ve YND ile saptanan varyantlarda düşük alel fraksiyonuna neden olmuştur. *GBAP1* üzerindeki dizi farklılıkları ise *GBAI*’e hizalandığında yanlış pozitif sonuçlar olarak karşımıza çıkmıştır. Bu sorunu çözebilmek için “secondary alignment” algoritmasının devre dışı bırakılmıştır. Yanlış pozitif sonuçların çoğunlukla temizlenmesini ve alel

fraksiyonları yükselmesini sağlamıştır. Buna rağmen zigosite tayini için yeterli alel fraksiyonu sağlanamamıştır. Biyoinformatik analizlerimiz halen devam etmektedir.

Bizim çalışmamızdaki alel fraksiyonlarının %25 civarında kalmasının bir sebebi olarak hem *GBAI* geni hem *GBAPI* psödogenininin birlikte dizilenmesi verilebilir. Çünkü yüksek homoloji gösteren iki gen varlığı iki gen arasında benzersiz olmayan bölgelere bakıldığında 2 çift alel olmasına neden olmuştur. Özgün bölgelerin uzun okumalarla birleşince hizalama problemlerini aşacağını düşünerek tasarlanan çalışmamız hizalama problemleri nedeniyle düşük alel fraksiyonu sorunu yaşamıştır.

Zampieri ve ark. *GBAI* geninin YND platformlarında dizilenmesinin zorluklarını inceledikleri makalelerinde psödogen kaynaklı uyumsuzluklar şematik olarak göstermişlerdir(120). Bizim çalışmamızda karşımıza çıkan yanlış pozitif kabul ettiğimiz varyantların çoğu bu şekilde karşımıza çıkmaktadır. Hem *GBA* hem de *GBAPI* 11 ekzondan oluşur ve ekzon/intron sınırları aynı olması *GBAI* dizilemeyi *GBAPI* kontaminasyonuna açık hale getirmektedir. Zampieri ve ark. 150 ila 500 bp'lik bir boyut aralığında amplikonların *GBAI* dizisini ayırt etmek için yeterli olmadığını belirtmişlerdir.

Olgu 4'e ait pozisyonu chr1:155.207.978 olan *GBAI*: c.708C>G varyantı ve bu varyantın *GBAPI* üzerinde homoloji gösterdiği chr1:155.186.701 pozisyonu IGV'de incelendiğinde bu iki bölgenin referansının birbirine tamamen uyum sapladığı görülmüştür. *GBAPI* üzerinde chr1:155.186.701 pozisyonunda guanin nükleotidi bulunmaktadır (Şekil 17). Okumalarda bulunan sitozin *GBAPI*'den gelmemektedir. Bu sebeple varyantın *GBAPI*'den gelen yanlış okuma olma ihtimalini azalmaktadır. Bu varyant *GBAPI* ya da *GBAI*'e ait gerçek bir varyant olabilir. Benzer durum *GBAI*: c.708C>G varyantının saptandığı diğer 8 olguda (Olgu 2 -4 -5 -6 -12-13-16-18) da geçerlidir. *GBAI*: c.708C>G varyantı için literatür araması yapıldığında bu varyantın nadir sinonim bir varyant olduğu ve çalışmalarda hastalık ilişkilendirilmesinin yapılmadığı ACMG tarafından klinik önemi bilinmeyen bir varyant olarak sınıflandırıldığı görülmüştür. Bu varyantın Sanger ile doğrulanması gerekmektedir.

Olgu 5'e ait YND ile saptanan ve Olgu 4'te Sanger ile saptanan diğer bir varyant olan *GBAI*:c.882T>G (p.His294Gln, H294Q) varyantı her iki olguda da

nanopor varyant çağırma algoritmasını geçememiş ancak IGV’de görülebilmektedir. *GBAP1*’de homoloji gösteren chr1:155.186.292 pozisyonu incelendiğinde *GBA1*:c.882T>G okumalarının *GBAP1*’den gelmediği tespit edilmiştir. Moraitou ve ark. tarafından yapılan çalışmada kontrol grubunda (206 kişi) 1 kişide T369M değişimi ile, PH tanılı hastalarda (205 kişi) 6 hastada duble mutant alel olarak cis pozisyonunda tespit edilmiştir (200). Duble mutant alel(*GBA1*:c.882T>G ve *GBA1*: c.1342G>C) olarak GH hastalarında homozigot ve bileşik heterozigot olarak saptandığı çalışmalar vardır (201). Zhang ve ark. tarafından yapılan bir meta analizde *GBA1*:c.882T>G varyantının Aşkenazi Yahudi’si olmayan toplumlarda tek başına PH riskini arttırdığı gösterilmiştir(202).

Olgu 4’e ait *GBA1*:c.882T>G değişimi aile taraması amacıyla yapılan Sanger dizileme sonucunda tespit edilmiştir. Sağlıklı taşıyıcı olarak değerlendirilen hastada nanopor dizileme ile 3 varyant tespit edilmiştir. *GBA1*: c.882T>G dışında saptanan iki varyant *GBA1*: c.708C>G ve *GBA1*: c.1342G>C başka bir dizileme yöntemi ile doğrulanmamıştır. Diğer bir duble mutant alel saptanan hasta olgu 4’tür. Olgu 4’e ait IGV’lerde de Olgu 5 gibi *GBA1*:c.1342G>C değişimi *GBAP1* dizisinde görülen delesyon ile aynı okumalar üzerindedir ve *GBA1*: c.882T>G değişimi ile aynı okumalar üzerinde değildir. Bu yüzden duble mutant alel olmama ihtimali vardır ve Sanger ve Fazlama çalışmaları ile doğrulanması gerekmektedir.

Olgu 5’e ait YND ile saptanan *GBA1*:c.1342G>C değişimi nanopor yöntemi ile de başarıyla saptanmıştır. Olgu 5’e ait örnek başarıyla çoğalmıştır, jel görüntülemeye bant hafif silik bir şekilde görülmüştür. Ancak PZR sonrası konsantrasyonu normaldir. Başarılı PZR gerçekleşmiştir. 1214 okuma sayısı ile yüksek okuma sayısına sahip varyantlardan biridir. *GBA1*:c.1342G>C varyantı nanopor ile saptanan tüm varyantlara bakıldığında pek çok olguda yanlış pozitif olarak saptanmıştır. *GBAP1*’in *GBA1* üzerindeki chr1:155.205.518 pozisyonuna homoloji gösteren bölgesinde guanin nükleotidi yerine sitozin nükleotidi bulunmamaktadır. Pek çok olguda saptanması *GBAP1* ‘e ait okumaların *GBA1*’e hizalanması sonucunda bu varyantın ortaya çıkabileceği şüphesini doğurmaktadır. Olgu 5’e ait bu varyantın da yanlış pozitif olabileceğini ihtimali dahilinde Olgu 5’e ait chr1:155.205.518 pozisyonu IGV’de incelendiğinde G>C değişimi olan okumaların devamında *GBAP1* genindeki 55 bç’lik

delesyon olduğu görölmüştür. Bu sebeple G>C değişimi ve delesyonun birlikte göröldüğü okumalar *GBAP1* psödogenine ait olabilir. Bu okumalara ait IGV görüntüleri Şekil 19’da verilmiştir. Bu açıdan Olgu 5 ‘e ait *GBA1*:c.1342G>C varyantının Sanger yöntemiyle doğrulanması planlanmıştır.

GBA1:c.1342G>C (p.Asp448His , D448H) varyantı literatürde izole mutasyon olarak bildirildiğı gibi Olgu 5 te saptandığı gibi *GBA1*:c.882T>G değişimi ile birlikte cis pozisyonda olduğu duble mutant alel olarak Balkan ve İtalya’nın Adriyatik bölgesindeki insanlarda tespit edilmiştir(203,204). Olgu 5 IGV görüntülerine bakıldığında *GBA1*:c.1342G>C değişiminin *GBAP1* dizisi ile homoloji gösteren okumalarda olduğu görölmüştür. Uzun okumalar IGV’de takip edildiğinde bu iki varyantın aynı ampikon üzerinde olmadığı görölmüştür. Bu nedenle bizim çalışmamıza göre Olgu 5’e ait *GBA1*:c.1342G>C değişimi psödogen yanlış hizalaması ile saptanmış olma ihtimali vardır. *GBA1*:c.882T>G değişimi ile aynı ampikonlar üzerinde görölmediğı için duble mutant alel olmaması olasıdır . Ancak bu durumun netleşebilmesi için biyoinformatik analizler dahilinde faz çalışması yapılması planlanmıştır.

5 Olguda karşımıza çıkan c.921C>T(p.Leu307=) varyantı (Olgu 7- 12-13-14-17) Zampieri ve ark.’nın çalışmasında uyumsuzluk olarak belirtilmemiştir ancak *GBA1* geni chr1:155.207.210 pozisyonundaki G>A değişimi *GBAP1* chr1:155.186.253 üzerindeki adenin bazıdan gelmektedir. Bir örneğı şekil 18’de gösterilmiştir. *GBA1*: c.921C>T varyantı için literatür araması yapıldığında bu varyantın nadir sinonim bir varyant olduğu ve çalışmalarda hastalık ilişkilendirilmesinin yapılmadığı ACMG tarafından klinik önemi bilinmeyen bir varyant olarak sınıflandırıldığı görölmüştür.

Olgu 6’ya ait YND’de saptanan *GBA1*: c.922G>A varyantı hem varyant çağırma algoritmalarınca hem de 12% alel fraksiyonuna rağmen IGV’de saptanamamıştır. Literatürde bu varyant ile ilgili olarak herhangi bir hastalık yapıcı ilişki kuran çalışma bulunmamaktadır. Olgu 6’ya ait çalışmamız baştan incelendiğinde Olgu 6’ya ait DNA kalitesi, PZR öncesi ve sonrası konsantrasyonları çok düşük değildir. Jel kontrolünde bant silik görünmektedir. Kalite skorlarını geçen okuma ortalaması 62,1% ile yüksek

olmasına rağmen toplam okuma sayısı diğer örneklerle göre oldukça düşüktür. Toplam okuma sayısı düşüklüğü yanlış negatif sonuca yol açmış olabilir. Toplam okuma sayısı düşüklüğü ise DNA kalitesi ve konsantrasyonu normal olan bir olguda kütüphane hazırlığındaki bir sorundan kaynaklanmış olabilir.

Olgu 7'ye ait konsantrasyon ölçümü yüksek olmasına rağmen bant görülememesi jele yükleme problemi olabileceğini düşündürmektedir. Bant görülememesine rağmen iyi konsantrasyon ölçümleri vardır. 913 okuma sayısı ile *GBAI*: c.928A>G transisyon değişimi C aleli için 45% alel fraksiyonuna ulaşmıştır. Bu olguya ait varyant VCF'de saptanamamasına rağmen IGV'de görüntülenebilmiştir. *GBAI*: c.928A>G değişimi literatürde hem erişkin tip 1 GH kliniği(198) ilişkilidir hem de Çin kohortunda(199) PH riskini arttırdığı gösterilmiştir.

Alel frekansı en yüksek olan varyant Olgu 7'ye ait *GBAI*:c.928A>G varyantıdır. Bu varyantın okumalarına bakıldığında sadece *GBAI*:c.928A>G varyantını içeren okumalara ek olarak *GBAI*:c.921G>A varyantını birlikte içeren okumaların olduğu görülmüştür. *GBAI*:c.921G>A varyantının *GBAPI* okumalarından gelen bir varyant olduğu düşünülürse her iki varyantı da içeren okumaların *GBAPI*'den geldiği sadece *GBAI*:c.928A>G varyantını içeren okumaların *GBAI* genine ait olduğu kabul edilebilir. Hem *GBAPI* hem *GBAI*'den gelen okumaların varlığı Olgu 7'ye ait *GBAI*:c.928A>G varyantının yüksek alel fraksiyonunu açıklayabilir.

5 Olguda karşımıza çıkan c.1103G>A(p.Arg368His, R368H) varyantı (Olgu 7-12-13-14-17) Zampieri ve ark.'nın çalışmasında uyumsuzluk olarak belirtilmemiştir. *GBAI* geni chr1:155.206.157 pozisyonundaki C>T değişimi *GBAPI* chr1:155.185.475 üzerindeki timin bazıdan gelmektedir. Literatürde PH kohortlarında karşımıza çıkan bu varyant ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmaktadır(200).

Çalışmamızın kısıtlılıkları

- Hasta sayısının azlığı
- Negatif kontrol ile çalışma yapılmaması

- *GBAI* varyantlarının Sanger dizileme ile doğrulanmaması
- Rekombinant varyantların tespit edilememesi
- Varyantlara yönelik haplotiplendirme çalışması yapılmamasıdır

Çalışmamızda YND ile *GBAI* varyantı tespit edilen olgularda uzun okumalı yeni bir yöntem ile genotip tespiti yapılmıştır ve literatürdeki diğer yöntemler incelenmiştir



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda 11 hastaya ait 12 varyant nanopor dizileme ile dizilenmiş ve saptanan varyantlar YND sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Nanopor dizileme varyantların sadece 2 tanesini (%16,67) saptamıştır. Bu oran literatüre oranla oldukça düşüktür. Ancak varyant çağırma basamağındaki hata sonucunda sadece IGV’de görülen varyantlar da hesaba katılırsa tespit edilen varyant sayısı 11’a ulaşmakta ve %91,67’lük bir saptama oranı elde edilmektedir.

- Çalışmamızdaki en büyük problem varyant çağırma basamağında yaşanmıştır ve IGV’de görülen varyantların tespit edilememiştir. Varyant çağırma basamağında kullanılan Clair3 gibi araçların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

- Sonuçlarımız, düşük saptama oranına rağmen, nanoporun uzun okumaları başarıyla dizileyebildiğini göstermektedir. Ancak biyoinformatik basamaklarının cihaz yaygın kullanıma sunulmadan önce ele alınması ve geliştirilmesi gerekecektir.

- İki olgumuzda YND platformunda saptanan c.1342G>C varyantının, nanopor platformundaki IGV okumaları incelendiğinde *GBAPI*’e ait 55 bç’lik delesyon ile birlikte olduğu görülmüştür. Literatürde de psödogen kaynaklı uyumsuzluklar arasında saptanan bu varyantın hem nanopor hem YND tarafından yanlış pozitif olarak saptanma olasılığı vardır. Bu varyantın Sanger yöntemi ile doğrulanması gerekmektedir.

- Psödogen kaynaklı uyumsuz varyantlar *GBAI* ve *GBAPI* arasındaki dizi farklılıklarının yanlış hizalama problemleri sonucunda varyant olarak ortaya çıkması sonucu oluşan varyantlardır. *GBAI*:c.921C>T, *GBAI*:c.1103G>A varyantları literatürde psödogen kaynaklı uyumsuz varyantlar listesinde olmamasına rağmen çalışmamızda yanlış pozitif olarak tespit edilmiştir.

- Hizalama problemlerimizin biyoinformatik olarak çözümlenmesi için çalışmalarımız hala devam etmektedir. Bu sorunların ileriki çalışmalarda yaşanmaması için *GBAPI* psödogenini *GBAI*’den PZR aşamasında izole ederek dizilemek oldukça önemlidir.

- Uzun amplikonları oluşturan PZR çalışması, kütüphane hazırlığı, sekanslama ve biyoinformatik analiz basamakları da dahil olmak üzere iş akışı oluşturulmuş, sorun giderme çalışmaları yapılmış ve rutinde kullanılabilecek iş akışı oluşturulmuştur. Oluşturulan iş akışı, PH genetik sebeplerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve PH

ile m¼cadele mekanizmalarının iyileştirilmesi için hastalıkların erken tespitinin önünü açacaktır.

- Ülkemizde *GBA1* geni ve *GBAP1* psödogeni uzun okumalar ile ilk defa bizim çalışmamızda nanopor ile dizilenmiştir. Sonraki çalışmalara öncü olacak niteliktedir.



7. KAYNAKLAR

1. Mahmudi O, Sennblad B, Arvestad L, Nowick K, Lagergren J. Gene-pseudogene evolution: A probabilistic approach. BMC Genomics [Internet]. 2015;16(Suppl 10):1–11. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/S10/S12>
2. Sisu C. GENCODE Pseudogenes. Methods Mol Biol [Internet]. 2021;2324:67–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34165709>
3. Zhang Z, Zheng D. Pseudogene Evolution in the Human Genome. In: Encyclopedia of Life Sciences [Internet]. Wiley; 2014. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0020836.pub2>
4. Betrán E, Wang W, Jin L, Long M. Evolution of the phosphoglycerate mutase processed gene in human and chimpanzee revealing the origin of a new primate gene. Mol Biol Evol [Internet]. 2002 May;19(5):654–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11961099>
5. Kovalenko TF, Patrushev LI. Pseudogenes as Functionally Significant Elements of the Genome. Biochem. 2018;83(11):1332–49.
6. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism Ellen. Bone. 2012;23(1):1–7.
7. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. Genomics. 1989;4(1):87–96.
8. Do J, McKinney C, Sharma P, Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. Mol Neurodegener. 2019;14(1):1–16.
9. Daykin EC, Ryan E, Sidransky E. Diagnosing neuronopathic Gaucher disease: New considerations and challenges in assigning Gaucher phenotypes. Mol Genet Metab. 2021;132(2):49–58.

10. Riboldi GM, Di Fonzo AB. GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells* [Internet]. 2019 Apr 19;8(4):40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31010158>
11. Ye H, Robak LA, Yu M, Cykowski M, Shulman JM. Genetics and Pathogenesis of Parkinson ' s Syndrome. 2023;
12. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2020;27(1):27–42.
13. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Achai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM An Int J Med* [Internet]. 1996 Sep [cited 2022 Dec 4];89(9):691–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8917744/>
14. Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet*. 2004;41(12):937–40.
15. Becker JG, Pastores GM, Di Rocco A, Ferraris M, Graber JJ, Sathe S. Parkinson's disease in patients and obligate carriers of Gaucher disease. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. 2013 Jan;19(1):129–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940477>
16. Petrucci S, Ginevrino M, Trezzi I, Monfrini E, Ricciardi L, Albanese A, et al. GBA-Related Parkinson's Disease: Dissection of Genotype–Phenotype Correlates in a Large Italian Cohort. *Mov Disord*. 2020;35(11):2106–11.
17. Gomperts SN. Lewy Body Dementias: Disease Dementia Bodies and Parkinson Dementia With Lewy. *Neurodegener Dis Clin Asp Mol Genet Biomarkers*. 2018;297–312.
18. Kövari E, Horvath J, Bouras C. Neuropathology of Lewy body disorders. 2009;80:203–10.

19. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S. The Lewy Body in Parkinson ' s Disease and Related Neurodegenerative Disorders. 2013;495–508.
20. Sousa severiano C, Alarcao J, Ferreira J joaquim. Frequency of dementia in Parkinson ' s disease : A systematic review and. 2022;432(December 2021).
21. Kane JPM, Surendranathan A, Bentley A, Barker SAH, Taylor J paul, Thomas AJ, et al. Clinical prevalence of Lewy body dementia. 2018;1–8.
22. Liu L, Li J, Quan W, Qin Y, Zhang Q, Pei X, et al. Effect of GBA gene variants on clinical characteristics of dementia with Lewy bodies: a review and meta-analyses. *Neurol Sci* [Internet]. 2022;43(6):3541–50. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06031-w>
23. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Mar 24];82(11):801–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
24. Leija-Salazar M, Sedlazeck FJ, Toffoli M, Mullin S, Mokretar K, Athanasopoulou M, et al. Evaluation of the detection of GBA missense mutations and other variants using the Oxford Nanopore MinION. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(3):1–12.
25. Graham OEE, Pitcher TL, Liao Y, Miller AL, Dalrymple-Alford JC, Anderson TJ, et al. Nanopore sequencing of the glucocerebrosidase (GBA) gene in a New Zealand Parkinson's disease cohort. *Park Relat Disord* [Internet]. 2020;70(November 2019):36–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.11.022>
26. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):518–24.
27. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. Vol. 34, *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd; 2018. p. 666–81.

28. Singh RK, Singh D, Yadava A, Srivastava AK. Molecular fossils “pseudogenes” as functional signature in biological system. *Genes and Genomics* [Internet]. 2020;42(6):619–30. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13258-020-00935-7>
29. Jacq C, Miller JR, Brownlee GG. A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell* [Internet]. 1977 Sep;12(1):109–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/561661>
30. Lauer J, Shen CK, Maniatis T. The chromosomal arrangement of human alpha-like globin genes: sequence homology and alpha-globin gene deletions. *Cell* [Internet]. 1980 May;20(1):119–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6446404>
31. Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human beta-like globin gene cluster. *Cell* [Internet]. 1980 Apr;19(4):959–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6155216>
32. Salmena L. Pseudogenes: Four Decades of Discovery. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2021;2324:3–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34165705>
33. Vanin EF. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1985;19(22):253–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3909943>
34. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*. 2000;24(4):363–7.
35. Tutar Y. Pseudogenes. *Comp Funct Genomics*. 2012;2012:6–9.
36. Sen K, Podder S, Ghosh TC. Insights into the genomic features and evolutionary impact of the genes configuring duplicated pseudogenes in human. *FEBS Lett* [Internet]. 2010;584(18):4015–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.012>

37. Xiao J, Kumarsekhwal M, Li P, Raja R, Sylvie C, Wang X, et al. Pseudogenes and their genome-wide prediction in plants. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
38. Zhang ZD, Frankish A, Hunt T, Harrow J, Gerstein M. Identification and analysis of unitary pseudogenes: Historic and contemporary gene losses in humans and other primates. *Genome Biol.* 2010;11(3).
39. Balakirev ES, Ayala FJ. Pseudogenes: Are They “Junk” or Functional DNA? *Annu Rev Genet.* 2003;37:123–51.
40. Chen X, Wan L, Wang W, Xi WJ, Yang AG, Wang T. Re-recognition of pseudogenes: From molecular to clinical applications. *Theranostics.* 2020;10(4):1479–99.
41. Olsen MA, Schechter LE. Cloning, mRNA localization and evolutionary conservation of a human 5-HT7 receptor pseudogene. *Gene.* 1999;227(1):63–9.
42. Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DRF. Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease. *Rna.* 2011;17(5):792–8.
43. Kalyana-Sundaram S, Kumar-Sinha C, Shankar S, Robinson DR, Wu YM, Cao X, et al. Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers. *Cell.* 2012;149(7):1622–34.
44. Shi X, Nie F, Wang Z, Sun M. Pseudogene-expressed RNAs: a new frontier in cancers. *Tumor Biol [Internet].* 2016;37(2):1471–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4482-z>
45. Troskie RL, Jafrani Y, Mercer TR, Ewing AD, Faulkner GJ, Cheetham SW. Long-read cDNA sequencing identifies functional pseudogenes in the human transcriptome. *Genome Biol.* 2021;22(1):1–15.
46. Troskie RL, Faulkner GJ, Cheetham SW. Processed pseudogenes: A substrate for evolutionary innovation. *BioEssays.* 2021;43(11):1–11.

47. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H. Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3220–5.
48. Trinklein ND, Force Aldred S, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP, Myers RM. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res*. 2004;14(1):62–6.
49. Fablet M, Bueno M, Potrzebowski L, Kaessmann H. Evolutionary origin and functions of retrogene introns. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2009 Sep;26(9):2147–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553367>
50. Kundu TK, Rao MR. CpG islands in chromatin organization and gene expression. *J Biochem* [Internet]. 1999 Feb;125(2):217–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990116>
51. An Y, Furber KL, Ji S. Pseudogenes regulate parental gene expression via ceRNA network. *J Cell Mol Med*. 2017;21(1):185–92.
52. Wang L, Guo ZY, Zhang R, Xin B, Chen R, Zhao J, et al. Pseudogene OCT4-pg4 functions as a natural micro RNA sponge to regulate OCT4 expression by competing for miR-145 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* [Internet]. 2013 Aug;34(8):1773–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615404>
53. Karreth FA, Reschke M, Ruocco A, Ng C, Chapuy B, Léopold V, et al. The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell* [Internet]. 2015 Apr 9;161(2):319–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843629>
54. Zheng L, Li X, Gu Y, Lv X, Xi T. The 3'UTR of the pseudogene CYP4Z2P promotes tumor angiogenesis in breast cancer by acting as a ceRNA for CYP4Z1. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2015 Feb;150(1):105–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701119>
55. Straniero L, Rimoldi V, Samarani M, Goldwurm S, Di Fonzo A, Krüger R, et

- al. The GBAP1 pseudogene acts as a ceRNA for the glucocerebrosidase gene GBA by sponging miR-22-3p. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
56. Desplanque M, Bonte MA, Gressier B, Devos D, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Trends in Glucocerebrosides Research: A Systematic Review. *Front Physiol*. 2020;11(October):1–14.
 57. Reza S, Ugorski M, Suchański J. Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease. *Glycobiology*. 2021;31(11):1416–34.
 58. Futerman AH, Pagano RE. Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem J* [Internet]. 1991 Dec 1;280 (Pt 2(Pt 2):295–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1747103>
 59. Messner MC, Cabot MC. Glucosylceramide in humans. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2010;688:156–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20919653>
 60. Bleicher RJ, Cabot MC. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2002;1585(2–3):172–8.
 61. BRADY RO, KANFER J, SHAPIRO D. THE METABOLISM OF GLUCOCEREBROSIDES. I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A GLUCOCEREBROSIDE-CLEAVING ENZYME FROM SPLEEN TISSUE. *J Biol Chem* [Internet]. 1965 Jan;240:39–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14253443>
 62. Granek Z, Barczuk J, Siwecka N, Rozpędek-Kamińska W, Kucharska E, Majsterek I. GBA1 Gene Mutations in α -Synucleinopathies—Molecular Mechanisms Underlying Pathology and Their Clinical Significance. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
 63. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, et al. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin*

- Transl Neurol [Internet]. 2015 Apr;2(4):417–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25909086>
64. Wernick AI, Walton RL, Koga S, Soto-Beasley AI, Heckman MG, Gan-Or Z, et al. GBA variation and susceptibility to multiple system atrophy. *Park Relat Disord* [Internet]. 2020;77(March):64–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.06.007>
65. Ginns EI, Choudary P V, Tsuji S, Martin B, Stubblefield B, Sawyer J, et al. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985 Oct;82(20):7101–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3863141>
66. Tayebi N, Stern H, Dymarskaia I, Herman J, Sidransky E. 55-base pair deletion in certain patients with Gaucher disease complicates screening for common Gaucher alleles. *Am J Med Genet* [Internet]. 1996 Dec 18;66(3):316–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985494>
67. Wafaei JR, Choy FYM. Glucocerebrosidase recombinant allele: Molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates. *Blood Cells, Mol Dis*. 2005;35(2):277–85.
68. Straniero L, Rimoldi V, Melistaccio G, Di Fonzo A, Pezzoli G, Duga S, et al. A rapid and low-cost test for screening the most common Parkinson's disease-related GBA variants. *Park Relat Disord* [Internet]. 2020;80:138–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.09.036>
69. Winfield SL, Tayebi N, Martin BM, Ginns EI, Sidransky E. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. *Genome Res* [Internet]. 1997 Oct;7(10):1020–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331372>
70. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: Mutation

and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 2008;29(5):567–83.

71. Tan A, Prasad R, Lee C, Jho E hoon. Past, present, and future perspectives of transcription factor EB (TFEB): mechanisms of regulation and association with disease. *Cell Death Differ.* 2022;29(8):1433–49.
72. Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet.* 2011;20(19):3852–66.
73. Gegg ME, Menozzi E, Schapira AHV. Glucocerebrosidase-associated Parkinson disease: Pathogenic mechanisms and potential drug treatments. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2022;166(January):105663. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105663>
74. Blanz J, Zunke F, Markmann S, Damme M, Braulke T, Saftig P, et al. Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2. *Traffic.* 2015;16(10):1127–36.
75. Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E, Sidransky E. The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2012 Jul;106(3):257–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652185>
76. Balestrino R, Schapira AHV. Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. *Neuroscientist.* 2018;24(5):540–59.
77. smith laura, Scapira anthony h. V. GBA Variants and Parkinson Disease: Mechanisms and Treatments. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2011;7(2):70–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.216>
78. Dinur T, Bauer P, Beetz C, Kramp G, Cozma C, Iuraşcu MI, et al. Gaucher Disease Diagnosis Using Lyso-Gb1 on Dry Blood Spot Samples: Time to Change the Paradigm? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jan 30;23(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35163551>

79. Montfort M, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and “modifier” polymorphisms. *Hum Mutat.* 2004;23(6):567–75.
80. Migdalska-Richards A, Schapira AHV. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *J Neurochem.* 2016;139:77–90.
81. Gegg ME, Burke D, Heales SJR, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol.* 2012;72(3):455–63.
82. Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson’s disease with and without GBA mutations. *Brain.* 2015;138(9):2648–58.
83. Moors TE, Paciotti S, Ingrassia A, Quadri M, Breedveld G, Tasegian A, et al. Characterization of Brain Lysosomal Activities in GBA-Related and Sporadic Parkinson’s Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2019 Feb;56(2):1344–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29948939>
84. Alcalay RN, Wolf P, Chiang MSR, Helesicova K, Zhang XK, Merchant K, et al. Longitudinal Measurements of Glucocerebrosidase activity in Parkinson’s patients. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020;7(10):1816–30.
85. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson’s disease. *Brain.* 2014;137(3):834–48.
86. Hughes LP, Pereira MMM, Hammond DA, Kwok JB, Halliday GM, Lewis SJG, et al. Glucocerebrosidase Activity is Reduced in Cryopreserved Parkinson’s Disease Patient Monocytes and Inversely Correlates with Motor Severity. *J Parkinsons Dis.* 2021;11(3):1157–65.
87. Omer N, Giladi N, Gurevich T, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Glinka T, et al.

Glucocerebrosidase Activity is not Associated with Parkinson's Disease Risk or Severity. *Mov Disord*. 2022;37(1):190–5.

88. O'Regan G, Desouza RM, Balestrino R, Schapira AH. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis*. 2017;7(3):411–22.
89. Blanz J, Saftig P. Parkinson's disease: acid-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. *J Neurochem*. 2016;198–215.
90. Gan-Or Z, Giladi N, Rozovski U, Shifrin C, Rosner S, Gurevich T, et al. Genotype-phenotype correlations between gba mutations and parkinson disease risk and onsetsymbol. *Neurology*. 2008;70(24):2277–83.
91. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A, et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology* [Internet]. 2015 Mar 3;84(9):880–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653295>
92. Parlar SC, Grenn FP, Kim JJ, Baluwendraat C, Gan-Or Z. Classification of GBA1 Variants in Parkinson's Disease: The GBA1-PD Browser. *Mov Disord* [Internet]. 2023 Mar;38(3):489–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36598340>
93. Purandare SM, Patel PI. Recombination hot spots and human disease. *Genome Res*. 1997;7(8):773–86.
94. Tayebi N, Stubblefield BK, Park JK, Orvisky E, Walker JM, LaMarca ME, et al. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: Implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet*. 2003;72(3):519–34.
95. Eyal N, Wilder S, Horowitz M. Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene*. 1990;96(2):277–83.
96. Bhutada E, Pyragius T, Petersen SG, Niemann F, Matsika A. Perinatal Lethal Gaucher Disease due to RecNcil Recombinant Mutation in the GBA Gene

Presenting with Hydrops Fetalis and Severe Congenital Anemia. Case Rep Pathol. 2018;2018:1–4.

97. Mignot C, Gelot A, Bessi res B, Daffos F, Voyer M, Menez F, et al. Perinatal-lethal Gaucher disease. Am J Med Genet. 2003;120 A(3):338–44.
98. Drelichman G, Fernández Escobar N, Soberon B, Basack N, Frabasil J, Schenone A, et al. Long-read single molecule real-time (SMRT) sequencing of GBA1 locus in Gaucher disease national cohort from Argentina reveals high frequency of complex allele underlying severe skeletal phenotypes: Collaborative study from the Argentine Group for Diagnosis. Mol Genet Metab Reports. 2021;29(September).
99. Zimran A, Horowitz M. RecTL: A complex allele of the glucocerebrosidase gene associated with a mild clinical course of Gaucher disease. Am J Med Genet. 1994;50(1):74–8.
100. Beutler E, Gelbart T, West C. Identification of six new Gaucher disease mutations. Genomics [Internet]. 1993 Jan;15(1):203–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432537>
101. Torralba MA, Alfonso P, Pérez-Calvo JI, Cenarro A, Pastores GM, Giraldo P, et al. High prevalence of the 55-bp deletion (c.1263del55) in exon 9 of the glucocerebrosidase gene causing misdiagnosis (for homozygous N370S (c.1226A > G) mutation) in Spanish Gaucher disease patients. Blood Cells Mol Dis [Internet]. 2002;29(1):35–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482401>
102. Sarria AJ, Giraldo P, Pérez-Calvo JI, Pocov  M. Detection of three rare (G377S, T134P and 1451delAC), and two novel mutations (G195W and Rec[1263del55;1342G>C]) in Spanish Gaucher disease patients. Mutation in brief no. 251. Online. Hum Mutat. 1999;14(1):88.
103. Stone DL, Tayebi N, Orvisky E, Stubblefield B, Madike V, Sidransky E. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease.

Hum Mutat. 2000;15(2):181–8.

104. Reissner K, Tayebi N, Stubblefield BK, Koprivica V, Blitzer M, Holleran W, et al. Type 2 Gaucher disease with hydrops fetalis in an Ashkenazi Jewish family resulting from a novel recombinant allele and a rare splice junction mutation in the glucocerebrosidase locus. *Mol Genet Metab.* 1998;63(4):281–8.
105. Filocamo M, Bonuccelli G, Mazzotti R, Giona F, Gatti R. Identification of a novel recombinant allele in three unrelated Italian Gaucher patients: Implications for prognosis and genetic counseling. *Blood Cells, Mol Dis.* 2000;26(4):307–11.
106. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 Dec;74(12):5463–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>
107. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135–45.
108. Orvisky E, Park JK, Parker A, Walker JM, Martin BM, Stubblefield BK, et al. The identification of eight novel glucocerebrosidase (GBA) mutations in patients with Gaucher disease. *Hum Mutat.* 2002;19(4):458–9.
109. Petrucci S, Ginevrino M, Trezzi I, Monfrini E, Ricciardi L, Albanese A, et al. GBA-Related Parkinson's Disease: Dissection of Genotype-Phenotype Correlates in a Large Italian Cohort. *Mov Disord* [Internet]. 2020 Nov;35(11):2106–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32658388>
110. Ruskey JA, Greenbaum L, Roncière L, Alam A, Spiegelman D, Liong C, et al. Increased yield of full GBA sequencing in Ashkenazi Jews with Parkinson's disease. *Eur J Med Genet.* 2019;62(1):65–9.
111. Park JK, Tayebi N, Stubblefield BK, LaMarca ME, MacKenzie JJ, Stone DL, et al. The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin Genet* [Internet]. 2002 Jan;61(1):32–4. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11903352>

112. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 anti type 3 gaucher disease. *Am J Hum Genet*. 2000;66(6):1777–86.
113. Finckh U, Seeman P, Von Widdern OC, Rolfs A. Simple PCR amplification of the entire glucocerebrosidase gene (GBA) coding region for diagnostic sequence analysis. *Mitochondrial DNA*. 1998;8(6):349–56.
114. Sidransky E. Gaucher disease: Complexity in a “simple” disorder. *Mol Genet Metab*. 2004;83(1–2):6–15.
115. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson’s disease. *J Neural Transm*. 2017;124(8):901–5.
116. Bandrés-Ciga S, Mencacci NE, Durán R, Barrero FJ, Escamilla-Sevilla F, Morgan S, et al. Analysis of the genetic variability in Parkinson’s disease from Southern Spain. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2016;37:210.e1-210.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.020>
117. Gorostidi A, Martí-Massó JF, Bergareche A, Rodríguez-Oroz MC, López de Munain A, Ruiz-Martínez J. Genetic Mutation Analysis of Parkinson’s Disease Patients Using Multigene Next-Generation Sequencing Panels. *Mol Diagnosis Ther*. 2016;20(5):481–91.
118. Salemi M, Lanza G, Salluzzo MG, Schillaci FA, Di Blasi FD, Cordella A, et al. A Next-Generation Sequencing Study in a Cohort of Sicilian Patients with Parkinson’s Disease. *Biomedicines*. 2023;11(12):1–12.
119. Mandelker D, Schmidt RJ, Ankala A, McDonald Gibson K, Bowser M, Sharma H, et al. Navigating highly homologous genes in a molecular diagnostic setting: A resource for clinical next-generation sequencing. *Genet Med* [Internet]. 2016;18(12):1282–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/gim.2016.58>
120. Zampieri S, Cattarossi S, Bembi B, Dardis A. GBA Analysis in Next-

- Generation Era: Pitfalls, Challenges, and Possible Solutions. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2017;19(5):733–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.05.005>
121. Delaneau O, Howie B, Cox AJ, Zagury JF, Marchini J. Haplotype estimation using sequencing reads. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2013 Oct 3;93(4):687–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24094745>
 122. Wang M, Li F, Zhang J, Lu C, Kong W. Global Epidemiology of Gaucher Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2023;45(4):181–8.
 123. Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*. 2008;372(9645):1263–71.
 124. Dandana A, Ben Khelifa S, Chahed H, Miled A, Ferchichi S. Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. *Pathobiology*. 2016;83(1):13–23.
 125. Yang AC, Bier L, Overbey JR, Cohen-Pfeffer J, Desai K, Desnick RJ, et al. Early manifestations of type 1 Gaucher disease in presymptomatic children diagnosed after parental carrier screening. *Genet Med* [Internet]. 2017 Jun;19(6):652–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27735925>
 126. Roshan Lal T, Sidransky E. The Spectrum of Neurological Manifestations Associated with Gaucher Disease. *Dis (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2017 Mar 2;5(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28933363>
 127. Weiss K, Gonzalez A, Lopez G, Pedoeim L, Groden C, Sidransky E. The clinical management of Type 2 Gaucher disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2015 Feb;114(2):110–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25435509>
 128. Cindik N, Ozcay F, Şüren D, Akkoyun I, Gökdemir M, Varan B, et al. Gaucher disease with communicating hydrocephalus and cardiac involvement. *Clin Cardiol*. 2010;33(1):26–30.

129. Stirnemann JÔ, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):1–30.
130. Baris HN, Cohen IJ, Mistry PK. Gaucher disease: The metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;12(0 1):72–81.
131. Jost WH, Reichmann H. “An essay on the shaking palsy” 200 years old. *J Neural Transm.* 2017;124(8):899–900.
132. Raza C, Anjum R, Shakeel N ul A. Parkinson’s disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci [Internet].* 2019;226:77–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
133. Surmeier DJ. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson’s disease. *FEBS J.* 2018;285(19):3657–68.
134. Hayes MT. Parkinson’s Disease and Parkinsonism. *Am J Med [Internet].* 2019;132(7):802–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>
135. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science [Internet].* 1983 Feb 25;219(4587):979–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6823561>
136. Gash DM, Rutland K, Hudson NL, Sullivan PG, Bing G, Cass WA, et al. Trichloroethylene: Parkinsonism and complex 1 mitochondrial neurotoxicity. *Ann Neurol.* 2008;63(2):184–92.
137. Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson’s disease. *Prog Neurobiol [Internet].* 2013;106–107:17–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643800>
138. De Rui M, Inelmen EM, Trevisan C, Pigozzo S, Manzato E, Sergi G.

- Parkinson's disease and the non-motor symptoms: hyposmia, weight loss, osteosarcopenia. *Aging Clin Exp Res* [Internet]. 2020;32(7):1211–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40520-020-01470-x>
139. Berg D, Lang AE, Postuma RB, Maetzler W, Deuschl G, Gasser T, et al. Changing the research criteria for the diagnosis of Parkinson's disease: Obstacles and opportunities. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013;12(5):514–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70047-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70047-4)
 140. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(12):1591–601.
 141. Gökçal E, Gür VE, Selvitop R, Babacan Yıldız G, Asil T. Motor and non-motor symptoms in parkinson's disease: Effects on quality of life. *Noropsikiyatri Ars*. 2017;54(2):143–8.
 142. Gigante AF, Pellicciari R, Iliceto G, Liuzzi D, Mancino PV, Custodero GE, et al. Rest tremor in Parkinson's disease: Body distribution and time of appearance. *J Neurol Sci* [Internet]. 2017;375:215–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.12.057>
 143. Dirkx MF, Bologna M. The pathophysiology of Parkinson's disease tremor. *J Neurol Sci* [Internet]. 2022;435(November 2021):120196. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120196>
 144. Erro R, Stamelou M. The Motor Syndrome of Parkinson's Disease [Internet]. 1st ed. Vol. 132, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc.; 2017. 25–32 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irn.2017.01.004>
 145. McKeran RO, Bradbury P, Taylor D, Stern G. Neurological involvement in type 1 (adult) Gaucher's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1985 [cited 2022 Dec 4];48(2):172–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3981177/>
 146. Maple-Grødem J, Dalen I, Tysnes OB, Macleod AD, Forsgren L, Counsell CE,

- et al. Association of GBA Genotype With Motor and Functional Decline in Patients With Newly Diagnosed Parkinson Disease. *Neurology*. 2021;96(7):E1036–44.
147. Balestrino R, Tunesi S, Tesei S, Lopiano L, Zecchinelli AL, Goldwurm S. Penetrance of Glucocerebrosidase (GBA) Mutations in Parkinson's Disease: A Kin Cohort Study. *Mov Disord*. 2020;35(11):2111–4.
 148. Blauwendraat C, Heilbron K, Vallergera CL, Bandres-Ciga S, von Coelln R, Pihlstrøm L, et al. Parkinson's disease age at onset genome-wide association study: Defining heritability, genetic loci, and α -synuclein mechanisms. *Mov Disord*. 2019;34(6):866–75.
 149. Li Q, Jing Y, Lun P, Liu X, Sun P. Association of gender and age at onset with glucocerebrosidase associated Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2021;42(6):2261–71.
 150. Menozzi E, Schapira AHV. Exploring the Genotype–Phenotype Correlation in GBA-Parkinson Disease: Clinical Aspects, Biomarkers, and Potential Modifiers. *Front Neurol*. 2021;12(June):1–8.
 151. Bohnen NI, Studenski SA, Constantine GM, Moore RY. Diagnostic performance of clinical motor and non-motor tests of Parkinson disease: a matched case-control study. *Eur J Neurol* [Internet]. 2008 Jul;15(7):685–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18435767>
 152. McNeill A, Duran R, Proukakis C, Bras J, Hughes D, Mehta A, et al. Hyposmia and cognitive impairment in Gaucher disease patients and carriers. *Mov Disord*. 2012;27(4):526–32.
 153. Högl B, Stefani A, Videnovic A. Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration - An update. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2018;14(1):40–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.157>
 154. Krohn L, Ruskey JA, Rudakou U, Leveille E, Asayesh F, Hu MTM, et al. GBA variants in REM sleep behavior disorder: A multicenter study. *Neurology*.

2020;95(8):E1008–16.

155. Fagan ES, Pihlstrøm L. Genetic risk factors for cognitive decline in Parkinson's disease: a review of the literature. *Eur J Neurol*. 2017;24(4):561-e20.
156. Leocadi M, Canu E, Donzuso G, Stojkovic T, Basaia S, Kresojević N, et al. Longitudinal clinical, cognitive, and neuroanatomical changes over 5 years in GBA-positive Parkinson's disease patients. *J Neurol* [Internet]. 2022;269(3):1485–500. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10713-4>
157. Ren J, Zhou G, Wang Y, Zhang R, Guo Z, Zhou H, et al. Association of GBA genotype with motor and cognitive decline in Chinese Parkinson's disease patients. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2023;15:1091919. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36845659>
158. Pal G, Robertson E, O'Keefe J, Hall D. The Neuropsychiatric and Motor Profile of GBA-Associated Parkinson's Disease: A Review. *Mov Disord Clin Pract* [Internet]. 2016;3(1):4–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30363594>
159. Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Orbe Reilly M, et al. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology* [Internet]. 2012 May 1;78(18):1434–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442429>
160. Sanford AM. Lewy Body Dementia. *Clin Geriatr Med* [Internet]. 2018;34(4):603–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2018.06.007>
161. Prasad S, Katta MR, Abhishek S, Sridhar R, Valisekka SS, Hameed M, et al. Recent advances in Lewy body dementia: A comprehensive review. *Disease-a-Month* [Internet]. 2023;69(5):101441. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2022.101441>
162. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor JP, Weintraub D, et

- al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* [Internet]. 2017 Jul 4;89(1):88–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23427593>
163. Nalls MA, Duran R, Lopez G, Kurzawa-Akanbi M, McKeith IG, Chinnery PF, et al. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol* [Internet]. 2013 Jun;70(6):727–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588557>
 164. Shiner T, Mirelman A, Weisz MG, Bar-Shira A, Ash E, Cialic R, et al. High frequency of GBA gene mutations in dementia with Lewy bodies among Ashkenazi Jews. *JAMA Neurol*. 2016;73(12):1448–53.
 165. Gaubert S, Hourregue C, Mouton-Liger F, Millot P, Franco M, Amar-Bouaziz E, et al. Exploring the link between GBA1 mutations and Dementia with Lewy bodies, A mini-review. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2022 Oct;141:104856. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36084847>
 166. Tsuang D, Leverenz JB, Lopez OL, Hamilton RL, Bennett DA, Schneider JA, et al. GBA mutations increase risk for Lewy body disease with and without Alzheimer disease pathology. *Neurology* [Internet]. 2012 Nov 6;79(19):1944–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035075>
 167. Company history [Internet]. Available from: <https://nanoporetech.com/about/history>
 168. Chen J, Xu F. Application of Nanopore Sequencing in the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Infections [Internet]. Vol. 27, *Molecular Diagnosis and Therapy*. Springer International Publishing; 2023. p. 685–701. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-023-00669-8>
 169. Lin B, Hui J, Mao H. Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *Biosensors*. 2021;11(7).
 170. Toffoli M, Chen X, Sedlazeck FJ, Lee CY, Mullin S, Higgins A, et al.

Comprehensive short and long read sequencing analysis for the Gaucher and Parkinson's disease-associated GBA gene. *Commun Biol.* 2022;5(1):1–10.

171. ONT MinION flow cell hazırlama ve yükleme aşamaları [Internet]. Available from: <https://community.nanoporetech.com/guides/minion/rna002/5/load-your-flow-cell?os=windows#faq-tab&>
172. Domingos J, Teixeira Bastos MDC, Couto R, Cameira AR, Cardoso AL, Reffóios A, et al. People with Early Onset Parkinson's Disease: Empowered to Improve Care. *J Parkinsons Dis.* 2023;13(4):633–6.
173. Várkonyi J, Simon Z, Soós K, Poros A. Gaucher disease type I complicated with Parkinson's syndrome. *Haematologia (Budap)* [Internet]. 2002;32(3):271–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12611487>
174. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab* [Internet]. 2003 Jun;79(2):104–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809640>
175. Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab.* 2004;81(1):70–3.
176. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Oct 22;361(17):1651–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846850>
177. Zhao F, Bi L, Wang W, Wu X, Li Y, Gong F, et al. Mutations of glucocerebrosidase gene and susceptibility to Parkinson's disease: An updated meta-analysis in a European population. *Neuroscience.* 2016;320(February):239–46.
178. Chen J, Li W, Zhang T, Wang YJ, Jiang XJ, Xu ZQ, et al. Glucocerebrosidase

- gene mutations associated with Parkinson's disease: A meta-analysis in a Chinese population. *PLoS One*. 2014;9(12):1–9.
179. Anlaş Ö, Demir G, Bağcı G. GBA Mutation Analysis in Turkish Parkinson's Disease Patients: Comparison of Clinical and Cognitive Performance. *Arch Neurol Neurosci*. 2022;12(2).
 180. Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Borochowitz Z, Falik-Zaccai T, Heldmann K, Carmi R, et al. Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Hum Mutat*. 1998;12(4):240–4.
 181. Aharon-Peretz J, Badarny S, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: Phenotype-genotype correlation. *Neurology*. 2005;65(9):1460–1.
 182. Setó-Salvia N, Pagonabarraga J, Houlden H, Pascual-Sedano B, Dols-Icardo O, Tucci A, et al. Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course. *Mov Disord*. 2012;27(3):393–9.
 183. Han F, Grimes DA, Li F, Wang T, Yu Z, Song N, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are common in patients with Parkinson's disease from Eastern Canada. *Int J Neurosci*. 2016;126(5):415–21.
 184. Sato C, Morgan A, Lang AE, Salehi-Rad S, Kawarai T, Meng Y, et al. Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord* [Internet]. 2005 Mar;20(3):367–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517592>
 185. Riboldi GM, Frattini E, Monfrini E, Frucht SJ, Di Fonzo A. A Practical Approach to Early-Onset Parkinsonism. *J Parkinsons Dis*. 2022;12(1):1–26.
 186. Clark LN, Kartsaklis LA, Wolf Gilbert R, Dorado B, Ross BM, Kisselev S, et al. Association of glucocerebrosidase mutations with dementia with lewy bodies. *Arch Neurol* [Internet]. 2009 May;66(5):578–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433657>

187. Gabbert C, Schaake S, Lüth T, Much C, Klein C, Aasly JO, et al. GBA1 in Parkinson's disease: variant detection and pathogenicity scoring matters. *BMC Genomics*. 2023;24(1):1–8.
188. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition - A review. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2012;6(3):297–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>
189. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(9):2009–23.
190. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47–51.
191. Cheng S, Chen Y, Monforte JA, Higuchi R, Houten B Van. Technical Tips: Template Integrity Is Essential for PCR Amplification of Genomic DNA. *Cold Spring Harb Lab*. 2016;30:294–9.
192. Ip CLC, Loose M, Tyson JR, de Cesare M, Brown BL, Jain M, et al. MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis. *F1000Research*. 2015;4.
193. Delahaye C, Nicolas J. Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(10 October). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0257521>
194. Peresini P, Boza V, Brejova B, Vinar T. Nanopore base calling on the edge. *Bioinformatics*. 2021;37(24):4661–7.
195. Zhao W, Zeng W, Pang B, Luo M, Peng Y, Xu J, et al. Oxford nanopore long-read sequencing enables the generation of complete bacterial and plasmid genomes without short-read sequencing. *Front Microbiol*. 2023;14(May):1–9.
196. Zverinova S, Guryev V. Variant calling: Considerations, practices, and developments. *Hum Mutat*. 2022;43(8):976–85.

197. Sears K, Hickey C, Vincent R, Stocks-Candelaria J, Tate J, Bumgardner C, et al. Establishing a Variant Allele Frequency Cutoff for Manual Curation of Medical Exome Sequencing Data. *J Mol Diagn* [Internet]. 2024 Oct 18;101865. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101865>
198. Wen XL, Wang YZ, Zhang XL, Tu JQ, Zhang ZJ, Liu XX, et al. Compound heterozygous p.L483P and p.S310G mutations in GBA1 cause type 1 adult Gaucher disease: A case report. *World J Clin Cases*. 2022;10(36):13148–469.
199. Zhou Y, Wang Y, Wan J, Zhao Y, Pan H, Zeng Q, et al. Mutational spectrum and clinical features of GBA1 variants in a Chinese cohort with Parkinson's disease. *npj Park Dis*. 2023;9(1):1–11.
200. Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Paisan-Ruiz C, Katsarou Z, Hardy J, Fidani L. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci Lett*. 2009;452(2):87–9.
201. Moraitou M, Hadjigeorgiou G, Monopolis I, Dardiotis E, Bozi M, Vassilatis D, et al. β -Glucocerebrosidase gene mutations in two cohorts of Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2011;104(1–2):149–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.06.015>
202. De Melo Amaral CE, Lopes PF, Ferreira JCC, Alves EAC, Montenegro MVB, Da Costa ET, et al. GBA mutations p.n370s and p.l444p are associated with parkinson's disease in patients from northern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019;77(2):73–9.
203. Santamaria R, Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Dominissini S, Grossi S, et al. Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H;H255Q] double mutant allele. *Hum Mutat* [Internet]. 2008 Jun;29(6):E58–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429048>
204. Mozafari H, Tghikhani M, Rahimi Z, Vaisi Raygani A, Ansari S, Khatami S, et al. Analysis of glucocerebrosidase (GBA) gene mutations in Iranian patients

with gaucher disease. Iran J Child Neurol. 2021;15(3):139–51.

205. McNeill A, Duran R, Hughes DA, Mehta A, Schapira AHV. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;83(8):853–4.



8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan

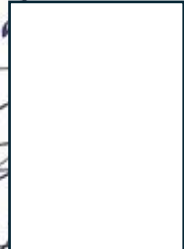
Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	goaek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8926-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Psödogeni Olan Genlerin Uzun Okumalarla Değerlendirilmesi: GBA1 Geni Varyantlarının Nanopor İle Dizilenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan Tıbbi Genetik A.D.
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	Yağmur Küçümen Kılıcı
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2024/17-22	Tarih:15.05.2024				
	Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan'ın sorumlusu olduğu "Psödogeni Olan Genlerin Uzun Okumalarla Değerlendirilmesi: GBA1 Geni Varyantlarının Nanopor İle Dizilenmesi" isimli bilimsel araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	

EK-2- Aydınlatılmış Onam Formu

GENETİK ARAŞTIRMALARDA AİLE BİREYLERİ İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM

Sayın.....

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı “Psödogeni Olan Genlerin Uzun Okumalarla Değerlendirilmesi: GBA1 Geni Varyantlarının Nanopor İle Dizilenmesi” isimli bir araştırma yapmaktadır. Bu proje gönüllü olarak katılmanızı teklif ettiğimiz bir uzmanlık tezi araştırmasıdır. GBA1 geninde değişim saptanan Parkinson hastalığı ve Demans tanılı hastalarda bu genin hastalıklar ile ilişkisinin daha iyi anlaşılması amacıyla periferik kan örneğinde üçüncü nesil dizileme tekniği ile GBA1 geni dizi analizi yapılacaktır. Bu şekilde rutinde yeni nesil dizileme tekniği ile araştırılan GBA1 geni tekrar dizilenerek, Yeni nesil dizileme tekniğinin kaçırdığı değişimlerin saptanması amaçlanmaktadır. Elde edilen bilgiler ile hastalığın nedenlerinin anlaşılması amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmada beklenen toplam gönüllü sayısının 8 olması beklenmektedir fakat bu sayının değişmesi ihtimal dahilindedir. Araştırma Mayıs 2024 – Ekim 2024 tarihleri arasında 6 ay sürerek sonuçlanacaktır.

Bu çalışma ile Parkinson hastalığının en önemli risk faktörü GBA1 geni yeni bir yöntem ile araştırmayı hedefledik. Amacımız Parkinson hastalığının genetik sebeplerinin en doğru yöntemlerle taranabilmesi ve bu taramanın yaygınlaşmasının sağlanmasıdır. Bu tip bir çalışma için az miktarda kan ve/veya tükürük örneği yeterli olmaktadır. Etkin bir araştırma için çocuğunuzun yanı sıra ana-babalarından ve diğer aile üyelerinden de örnek olmak gerekli olabilir. Ailenizde böyle bir problem bulunması nedeni ile eğer kabul ederseniz sizi de araştırmaya katmak istiyoruz.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmanızdan dolayı sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Toplanan kanlar tarafımızdan tetkik edilecektir.

Araştırmaya katılmak isterseniz Prof. Dr. Ahmet Okay Çağlayan veya Dr. Yağmur Küçümen Kılıcı tarafından muayene edilecek, gerekli olduğunda izninize istinaden fotoğrafınız çekilebilecek ve aile ağacı bilgileriniz çıkarılacaktır. Genetik analiz için kolunuzdan 5 tüp kan alınacaktır. Bazen ikinci bir kan alımı daha gerekli olabilir. Ayrıca bazı durumlarda yanak içinden sürüntü ya da tükürük örneğinden de yararlanabiliriz. Toplanan kanda yeterli genetik materyal elde edilemediği durumda ya da farklı bir metodla çalışılma gerekliliğinde toplanan kandan hücre çoğaltması yoluna gidilebilir. Bu işlem “hücre kültürü” olarak adlandırılır ve bu yolla hücreleriniz uzun süreli olarak çoğaltılabilir.

Kan alınırken iğne batması nedeniyle hafif bir acı duyabilirsiniz. Çok düşük bir ihtimal olsa da kan alırken kanamanın uzaması ya da enfeksiyon gelişmesi riskleri olabilir. Yanak içinden sürüntü alınması halinde düşük bir ihtimalle de olsa sürüntü yerinde enfeksiyon görülebilir.

Kişiye ait genetik bilgiler maddi ve sosyal açıdan istismar edilebilecek bilgilerdir. Örneğin genetik testte biyolojik anne ve babayı belirlemek mümkündür. O nedenle, araştırma sonuçlarının yalnızca bilimsel amaçlarla ve kimliğinizi gizli tutarak kullanılacağını tekrar vurgulamak istiyoruz. Araştırma sonucunda kendinizde bu hastalık görülme bile farklı bilgilere ulaşabiliriz. Bu bilgileri size bildirebiliriz. Bilgi edinmek istemiyor iseniz lütfen yazılı formun altında belirtiniz.

Bu risklere ek olarak örneğinizde tüm genom bilgilerinizin elde edileceği geniş ölçekli bir analiz yapılması da gerekli olabilir. Bu analiz sonucunda çocuğunuz/ailenizdeki **bu hastalık dışında başka hastalıklar için taşıyıcı olduğunuz ya da ileride bu tarz hastalıkları geliştirebileceğiniz bilgisi edinilebilir.** Buna ek olarak bazı hastalıklara yatkınlık yaratan genom değişikliklerini de taşıdığınız saptanabilir. Bu bilgilerin büyük bir kısmı henüz klinik önemi ispatlanmamış araştırma düzeyinde olan bilgilerdir. Bu nedenle çalışmada hastalık oluşumunda klinik önemi olduğu kesinlik kazanmış olan bilgileri size iletebiliriz. Diğer bilgiler kimlik bilgileriniz ile ilişkilendirilmeden dijital veri bankalarına eklenerek araştırmacıların kullanımına açılabilir.

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar saklanabilir ve başka genetik araştırmalarda gene sizin izninize istinaden kontrol veya olgu örneği olarak kullanılabilir. İzin vermediğiniz takdirde size ve/veya

yakınınıza ait olan örnekler çalışma bitiminde imha edilecektir. Lütfen yazılı formun altındaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyerek bu konudaki görüşünüzü belirtiniz.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler kimlik belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçlar dışında kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Araştırmaya katılmak zorunda olmadığınız gibi araştırmaya katılmayı kabul ettiğinizde, istediğiniz anda ayrılma hakkına da sahipsiniz. Ancak bu kararınızı bize önceden bildirirseniz araştırmanın bozulmasına meydan vermemiş olursunuz. Katılmak istemediğinizde şu anda sürdürülen tedavi işlemleri bundan etkilenmeyecektir.

Katılımcının Beyanı

Prof. Dr.Ahmet Okay Çağlayan'ın sorumlu araştırmacı olduğu Yağmur Küçümen Kılıcı'ya ait uzmanlık tezi olan Psödogeni Olan Genlerin Uzun Okumalarla Değerlendirilmesi: GBA1 Geni Varyantlarının Nanopor İle Dizilenmesi ile ilgili genetik araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi ile riskleri ve tıbbi bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Araştırma ile ilgili sorularım için Dr. Yağmur Küçümen Kılıcı ile temas edebileceğim bana bildirildi. İstedğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Araştırmaya katılımımın tamamen gönüllü olduğu, katılmam ya da katılıp daha sonra araştırmadan çekildiğim durumda tedavi ve tetkiklerimin bundan etkilenmeyeceği belirtildi. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım ile kendimin /çocuğumun katılmasına olurum vardır.

Katılımcı	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
-----------	------------	--------------	-----------	------

Veli/Vası	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
-----------	------------	--------------	-----------	------

Tanık	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
-------	------------	--------------	-----------	------

Hekim:

Adı Soyadı :

Adres/Tel :

İmza :

Görüşme tarih ve saati :

Bu çalışmada elde edilecek çalışma ile ilişkili/bağımsız kendimle/çocuğumla ilgili genetik bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()
Öğrenmek istemiyorum ()

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için, etik kurul kararı alınmak suretiyle, kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda, yeniden etik kurul kararı alınmak suretiyle, kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.



EK-3 Veri Kayıt formu

VERİ KAYIT FORMU

Tarih:

Dr.:

Hasta No:

Doğum tarihi:

Başvuru nedeni:

MEDİKAL HİKAYE

- Önceki Tıbbi Durumlar
- Hastalık tanı yaşı
- Son Yıldaki Hastaneye Yatış Sayısı
- Son Yılda Geçirilen Ameliyatlar
- Mevcut İlaçlar (Adını, dozajını ve sıklığını ekleyin) -
- Allerjiler:
- SVO öyküsü:
- Kafa travması:,
- Alkolizm/ ilaç kullanımı

KLİNİK ÖZELLİKLER:

Tanı yaşı:

Titremeler:

Bradikinezi (hareket yavaşlaması)

Kas sertliği:

Denge Sorunları

Yürüyüşün Donması:

Konuşma Zorlukları:

Ağrı:

Depresyon:

Endişe:

- Ses Değişiklikleri: Sesin yumuşaması veya kısıklanması.
- Yutma Güçlükleri: Çiğneme ve yutma güçlüğü.
- Uyku Bozuklukları: Uykusuzluk veya gündüz aşırı uykululuk gibi uyku bozuklukları.
- Bilişsel Değişiklikler: Hafıza sorunları ve düşünme ve akıl yürütmede zorluk.
- Otonomik Disfonksiyon: Kan basıncı, sindirim ve terlemenin düzenlenmesi ile ilgili sorunlar. kabızlık, ortostatik hipotansiyon, idrar kaçırma);
- Yorgunluk: Aşırı yorgunluk ve enerji eksikliği., gündüz uyku hali
- Dikkat ve uyanıklıkta dalgalanma ?
- Kişilik Değişiklikler
- Halüsinasyonlar ve Sanrılar

Destekleyici klinik özellikler

Antipsikotik ajanlara şiddetli duyarlılık;

Postürel dengesizlik;

tekrarlanan düşmeler;

hiposmi;

PEDİGRİ