

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**SMN1 GEN DELESYONU DIŞLANMIŞ SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ
ÖN TANILI ÇOCUKLARDA ETİYOLOJİNİN
TÜM EKZOM DİZİ ANALİZİ VERİLERİNE DAYANARAK
RETROSPEKTİF OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ABDULLAH SEZER**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ESRA TUĞ
Prof. Dr. MEHMET ALİ ERGÜN**

**ANKARA
EYLÜL 2020**

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik uzmanı ünvanını aldığım bu yolda bana emek veren, yol gösteren, maddi manevi yanımda olan ve birlikte olmaktan onur duyduğum hocalarıma ve yoldaşlık eden ekip arkadaşlarıma gönülden ve tüm samimi duygularıyla teşekkür ederim.

Bizleri öğrenmeye teşvik eden, düzen ve alışkanlıklarıyla örnek, tez dönemimde her daim yanımda olan, desteğini esirgemeyen, sabrı ve samimiyeti sonsuz tez danışmanım Doç. Dr. Esra Tuğ hocama çok teşekkür ederim.

Enerjisi, pozitif duruşu, yüksek moral kaynağı ve tükenmeyen desteği ile bizlere her daim abilik yapan, bize yeni kapılar açan, yenilikçi ve saygıdeğer Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün hocama bir ömür teşekkürü borç bilirim.

Asistanı olmaktan gurur duyduğum, dürüstlük, saygı ve etik değerleri en güzel şekliyle öğreten, başarının ve faydalı olmanın anahtarlarını veren değerli hocam Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e müteşekkirim.

Yöneticiliği ve disiplini ile bize yön veren, her derdimizde bizi dinleyen, yardımımıza koşan ve tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz hocama minnettarım. Nezaketi, çağdaş bakışı, desteği ve samimiyeti ile her zaman bize örnek olmuştur, içtenlikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Zekası, bilimselliği, başarısı ile önde, zerafeti, çalışkanlığı, yardımseverliği ve öğreticiliği ile örnek olan sonsuz saygı ve sevgi duyduğum Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Kayhan hocama çok teşekkür ederim.

Güzel fikirleri, sempatik duruşu, hekimliği, tıbbi nosyonu ve genetik sevgisi ile hep yanımda olan ve kendisi ile çalışmaktan keyif aldığım değerli hocam Prof. Dr. Ercan Demir'e çok teşekkür ederim.

Asistanlığı benim için keyifli kılan, bana çok şey katan Uzm. Dr. Hanife Saat, Uzm. Dr. Pelin Özyavuz Çubuk, Uzm. Dr. Aysel Ünal, Uzm. Dr. Serdar Mermer ve sevgili arkadaşlarım Dr. Mustafa Hakan Demirbaş, Dr. Ayşe Savaş, Dr. Hilal Esmenur Yıldız Kaya, Dr. Elvin Kazancıoğlu, Dr. Özge Beyza Gündoğdu Öğütlü, Dr. Lale Yılmaz, Dr. Ezgi Ürtekin, Dr. Burçe Çağda Kara, Dr. Tilbe Hakçıl ve Dr. Yusuf Bahap'a çok teşekkür ediyorum.

Sitogenetik ve moleküler genetik laboratuvarının değerli ve yeri doldurulamaz üyeleri Işıl Küçün Kiraz, Ebru Aytekin, Esra Küçük, Neslihan Kuş, Ceylan Pırıl Karahan, Gizem Damla Yalçın ve İrem Melike Güler'e, ayrıca akademik çalışmalarında bana çok katkısı olan Hasan Hüseyin Kazan'a ve Sezen Güntekin Ergün'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum, iyi ki varsınız.

Bölümümüzün demirbaşları, olmazsa olmazları Mehtap Tırpan, Ayşe Erdoğan, Samet Koçak, Suzan Dere ve Halil İbrahim Karakaya'ya yardımları ve yakınlıkları için çok teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, bana hayatı öğreten aileme ve her adımında yanımda olan sevgili hayat arkadaşım Elif İlhan Sezer'e çok teşekkür ederim. Bir ömür sağlıklı ve hep beraber yaşamayı dilerim.

İÇİNDEKİLER	Sayfalar
Teşekkür	i
İçindekiler	ii
Kısaltmalar	v
Tablolar Dizini	xiii
Şekiller Dizini	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Motor nöron hastalıkları	3
2.1.1. <i>SMN1</i> ilişkili klasik SMA	5
2.1.1.1. Klinik özellikler	7
2.1.1.2. Moleküler patogeneze	10
2.1.2. Distal SMA'lar	11
2.1.3. SMA plus sendromları	14
2.1.4. Alt motor nöron tutulumu olabilen nörodejeneratif veya multisistemik hastalıklar	16
2.1.5. Juvenil amiyotrofik lateral skleroz	18
2.2. SMA ve diğer alt motor nöron hastalıklarının tanısı	20
2.2.1. Biyokimyasal değerlendirmeler	21
2.2.2. Elektrodiagnostik değerlendirmeler	22
2.2.3. Sinir ve kas görüntüleme yöntemleri	23
2.2.4. Sinir ve kas histopatolojisi	23
2.2.5. Moleküler yöntemler	24
2.2.5.1. <i>SMN1</i> ilişkili SMA'nın moleküler tanısı	24
2.2.5.2. 5q-dışı SMA'ların moleküler tanısı	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Hastalar	30
3.1.1. Hasta 1	30

3.1.2. Hasta 2	33
3.1.3. Hasta 3	35
3.1.4. Hasta 4 ve 5	38
3.1.5. Hasta 6 ve 7	40
3.1.6. Hasta 8 ve 9	42
3.2. Tüm ekzom dizileme (WES)	45
3.2.1. Islak laboratuvar aşaması	45
3.2.1.1. Genomik DNA izolasyonu	45
3.2.1.2. Genomik DNA'da kalite-miktar tayinleri	47
3.2.1.3. Kütüphane hazırlanması	48
3.2.1.4. Sekans Aşaması	49
3.2.2. Biyoinformatik Analizler	49
3.2.3. Tüm ekzom dizileme analizi	50
3.2.3.1. Anotasyon ve filtreleme	50
3.2.3.2. Varyant yorumlama ve sınıflandırma	51
3.3. Protein-protein etkileşim analizleri	53
4. BULGULAR	53
4.1. Demografik ve klinik özellikler	53
4.2. Tüm ekzom dizileme analizi	56
4.2.1. Hasta 1	56
4.2.2. Hasta 2	60
4.2.3. Hasta 3	63
4.2.4. Hasta 4 ve 5	66
4.2.5. Hasta 6 ve 7	70
4.2.6. Hasta 8 ve 9	77
4.3. Protein-protein etkileşim analizleri	81
5. TARTIŞMA	85
5.1. Genotip-fenotip korelasyonları	87

5.1.1. Hasta 1	87
5.1.2. Hasta 2	90
5.1.3. Hasta 3	92
5.1.4. Hasta 4 ve 5	93
5.1.5. Hasta 6 ve 7	95
5.1.6. Hasta 8 ve 9	100
5.2. Moleküler mekanizmalar	103
5.3. WES analizinin etkinliği ve tam algoritmasındaki yeri	104
6. SONUÇLAR	108
7. KAYNAKLAR	111
8. ÖZET	138
9. SUMMARY	139
10. ÖZGEÇMİŞ	141
11. EKLER	143

KISALTMALAR

A: Absorbsiyon

ABR/BERA: İşitsel beyinsapı cevabı

ACGS: Association for Clinical Genomic Science

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

AGTPBP1: ATP/GTP binding protein 1

ALS: Amiyotrofik lateral skleroz

ALS2: alsin Rho guanine nucleotide exchange factor ALS2

AMC3: Arthrogryposis multiplex congenita 3, myogenic type

AMP: Association for Molecular Pathology

AR: androgen receptor

Arg: Arginine

SAH1: N-acylsphingosine amidohydrolase 1

ASCC1: activating signal cointegrator 1 complex subunit 1

ASYE: alt solunum yolu enfeksiyonu

ATP7A: ATPase copper transporting alpha

BAM: Binary Alignment Map

BED: Browser Extensible Data

BICD2: BICD cargo adaptor 2

BM: Bethlem miyopati

BP7: Benign supporting 7

BSCL2: BSCL2 lipid droplet biogenesis associated, seipin

BT: Bilgisayarlı tomografi

BWA: Burrows-Wheeler Aligner

°C: Santigrad derece

CH: Calponin-homology

CK: Kreatin kinaz

CMT: Charcot-Marie-Tooth

COL6A1: collagen type VI alpha 1 chain

COL6A2: collagen type VI alpha 2 chain

COL6A3: collagen type VI alpha 3 chain

cPAS: Combinatorial probe-anchor synthesis

DCTN1: dynactin subunit 1

DDG2P: Development Disorder Genotype - Phenotype Database

DHMN: Distal hereditör motor nöropati

DNAJB2: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B2

DNB: DNA nanoball

dNTP: Deoksinükleotid

DSMA: Distal spinal musküler atrofi

DYNC1H1: dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1

E: Erkek

EDMD4: Emery-Dreifuss musküler distrofi 4

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EMG: Elektromiyografi

EXOSC3: exosome component 3

EXOSC8: exosome component 8

EXOSC9: exosome component 9

f: Frekans

FBXO38: F-box protein 38

FUS: FUS RNA binding protein

GARS1: glycyl-tRNA synthetase 1

GATK: Genome Analysis Toolkit

GLE1: GLE1 RNA export mediator

GNAS: GNAS complex locus

GO: GeneOntology

GTEX: Genotype-Tissue Expression

HGMD: Human Gene Mutation Database

HPO: Human Phenotype Ontology

HPRD: Human Protein Reference Database

HSP: Herediter spastik parapleji

HSPB1: heat shock protein family B (small) member 1

HSPB3: heat shock protein family B (small) member 3

HSPB8: heat shock protein family B (small) member 8

IGHMBP2: Immunoglobulin mu DNA binding protein 2

IGV: Integrative Genomics Viewer

Ile: Isoleucine

INAD: İnfantil nöroksonal distrofi

indel: İnsersiyon/delesyon

K: K₁₂

KASH: Klarsicht

Leu: Leucine

LM-PCR: Ligation-mediated polymerase chain reaction

LOVD: Leiden Open Variant Database

LRR: Leucine-rich repeats

Met: Methionine

MLPA: Multiplex ligation probe amplification

µl: Mikrolitre

mM: Mili mol

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

NAD: Nöraksonal distrofi

NGS: Next-generation sequencing

nm: nanometre

OD: Otozomal dominant

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

OR: Otozomal resesif

PCR-RFLP: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

PLA2G6: phospholipase A2 group VI

PLEKHG5: pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G5

PM1: Pathogenic moderate 1

PM2: Pathogenic moderate 2

PM3: Pathogenic moderate 3

PM3_P: Pathogenic moderate 3_supporting

PM5_P: Pathogenic moderate 5_supporting

PP1: Pathogenic supporting 1

PP2: Pathogenic supporting 2

PP3: Pathogenic supporting 3

PP4: Pathogenic supporting 4

PS3: Pathogenic strong 3

PVS1: Pathogenic very strong 1

PYROXD1: pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 1

qPCR: Quantitative polimerase chain reaction

RBM28: RNA binding motif protein 28

REEP1: receptor accessory protein 1

RNP: Ribonükleoprotein

rpm: Rotation rer minute

SAM: Sequence alignment map

SCAR8: Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 8

SD: Standart deviyasyon

SETX: senataxin

SIGMAR1: sigma non-opioid intracellular receptor 1

SLC52A2: solute carrier family 52 member 2

SLC52A3: solute carrier family 52 member 3

SLC5A7: solute carrier family 5 member 7

SMA: Spinal musküler atrofi

SMAPME: Spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy

SMN1: survival of motor neuron 1

SMN2: survival of motor neuron 2

SNP: Single nucleotide polymorphism

snRNP: küçük nükleer ribonükleoprotein

SOD1: superoxide dismutase 1

SPG11: SPG11 vesicle trafficking associated, spatacsin

SR: Spectrin repeats

SYNE1: spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1

TBCD: tubulin folding cofactor D

TBCE: tubulin folding cofactor E

TRIP4: thyroid hormone receptor interactor 4

TRPV4: transient receptor potential cation channel subfamily V member 4

UBA1: ubiquitin like modifier activating enzyme 1

UKMD: Ullrich konjenital musküler distrofi

VarAft: Variant annotation and filter tool

VCF: Variant calling format

VRK1: VRK serine/threonine kinase 1

WARS1: tryptophanyl-tRNA synthetase 1

WES: Whole-Exome Sequencing

WGS: Whole-Genome Sequencing

XR: X'e bağlı resesif

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfalar

Tablo 1. Spinal musküler atrofinin sınıflandırılması	7
Tablo 2. Distal spinal musküler atrofinin OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri	13
Tablo 3. Spinal musküler atrofi plus sendromlarının OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri	15
Tablo 4. Alt motor nöron tutulumu olabilen nörodejeneratif veya multisistemik hastalıkların OMIM veritabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri	17
Tablo 5. Juvenil amiyotrofik lateral skleroz tiplerinin OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri	19
Tablo 6. Hastaların demografik buguları ve klinik özellikleri	55
Tablo 7. WES analiz verilerinin kapsam ve derinlik değerleri	56
Tablo 8. Hasta 1'in WES analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar	59
Tablo 9. Hasta 2'nin WES analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar	62
Tablo 10. Hasta 3'ün WES analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar	65
Tablo 11. Hasta 4 ve 5'in WES analizinde saptanan ortak patojen varyantlar ve ilişkili hastalıklar	69
Tablo 12. Hasta 6 ve 7'nin WES analizinde saptanan ortak varyantlar ve ilişkili hastalıklar	76

Tablo 13. Hasta 8 ve 9'un WES analizinde saptanan ortak varyantlar ve ilişkili hastalıklar	80
Tablo 14. STRING analizinde zenginleştirme belirlenen "Biologic process" terimleri	84
Tablo 15. Hastalarda belirlenen potansiyel olarak etiyolojiyi açıklayabilecek moleküler sonuçlar	86

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfalar
Şekil 1. SMA tanısı için önerilen iş akışı şeması	21
Şekil 2. Hasta 1'e ait pedigri	32
Şekil 3. Hasta 2'ye ait pedigri	34
Şekil 4. Hasta 3'e ait pedigri	37
Şekil 5. Hasta 4 (proband) ve hasta 5'e (III-5) ait pedigri	39
Şekil 6. Hasta 6 (proband) ve hasta 7'ye (III-4) ait pedigri	41
Şekil 7. Hasta 8 (proband) ve hasta 9'a (III-7) ait pedigri	43
Şekil 8. <i>TBCE</i> geninde saptanan c.809T>C (p.Leu270Pro) homozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	58
Şekil 9. <i>ASAH1</i> geninde saptanan c.119G>T (p.Gly40Val) homozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	61
Şekil 10. <i>PLA2G6</i> geninde saptanan c.1094T>G (p.Met365Arg) homozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	64
Şekil 11. <i>PYROXD1</i> geninde saptanan c.464A>G (p.Asn155Ser) ve c.486delA (p.Val163CysfsTer9) heterozigot varyantlarının BAM verisindeki görüntüsü	68
Şekil 12. <i>COL6A2</i> geninde saptanan c.2329T>C (p.Cys777Arg) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	73
Şekil 13. <i>COL6A2</i> geninde saptanan c.2462-5_2462-4delCA heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	74

Şekil 14. <i>GNAS</i> geninde saptanan c.101G>A (p.Trp34Ter) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	75
Şekil 15. <i>SYNE1</i> geninde saptanan c.18816-21delG heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	78
Şekil 16. <i>SYNE1</i> geninde saptanan c.21669G>T (p.Leu7223Phe) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü	79
Şekil 17. GIANT ile spinal kordda protein-protein etkileşim değerlendirmesi	82
Şekil 18. STRING ile protein-protein etkileşim değerlendirmesi	83
Şekil 19. Tubulin-specific chaperone E proteinin domainleri ile literatürde ve hasta 1’de saptanan <i>TBCE</i> varyantlarını gösteren şema	89
Şekil 20. <i>COL6A2</i> tarafından kodlanan kollajen alfa-2 (VI) zincirinin domainlerini ve hastalarda saptanan varyantların yerleşim yerlerini gösteren şema	98
Şekil 21. Nesprin-1 Giant izoformunun domainlerini ve hastalarda saptanan varyantların yerleşim yerlerini gösteren şema	102
Şekil 22. SMA/alt motor nöron hastalığı tanısı için önerilen algoritma	107

1. GİRİŞ

Çocukluk çağında önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olan nöromusküler hastalıklar, periferik sinir ve/veya kasların hasarı veya işlev bozukluğunun görüldüğü geniş bir hastalık grubudur (1). Çocuk yaş grubundaki sıklığı 21-63/10⁵ olarak belirtilmektedir (2-5). Nöromusküler hastalıklar içerisinde önemli bir grubu oluşturan motor nöron hastalıkları, etkilenen bireylerde yürüme, hareket etme, nefes alma ve yutma güçlükleri ile progresif seyir göstermektedir (6).

Genomik düzeyde yapılan ileri moleküler tetkiklerin yaygınlaşması sebebiyle birbiriyle örtüşen veya birbirinden farklı fenotiplere sahip çocukluk çağı motor nöron hastalığı etiyojisinde tanımlanan farklı genetik etkenlerin sayısı oldukça artmıştır (7). Çocuklarda en sık kalıtsal motor nöron hastalığı sebebi, “Survival of Motor Neuron 1 (*SMN1*, OMIM *600354” genindeki biallelik patojenik varyantlardan kaynaklanan ve ön boynuz hücrelerinin (alt motor nöronları) ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize olan spinal musküler atrofi (SMA) olup, *SMN1* ilişkili SMA olarak da ifade edilebilmektedir (8). Klinik değerlendirmeler sonucu SMA şüphesi bulunan hastalarda, öncelikle hastaların %96’sında saptanan *SMN1* ekzon 7-8 homozigot delesyonunun araştırılması önerilmektedir. *SMN1* geninde delesyon saptanmayan hastalarda alt motor nöron veya ön boynuz hücrelerinin etkilenimine işaret eden ek laboratuvar bulgularının varlığında, mevcut fenotipin moleküler etiyojilerine yönelik yeni nesil dizileme yöntemini kullanan nöromusküler hastalık gen panelleri, tüm ekzom dizileme (Whole-Exome Sequencing, WES) veya tüm genom dizileme (Whole-Genome Sequencing, WGS) analizlerinin yapılması önerilmektedir (9).

Tüm genomun %2'sinin kodlayan diziler olan ekzonlardan oluştuğu ve monogenik hastalık sebebi olan mutasyonların %85'inin bu ekzonlarda yerleştiği bilinmektedir (10). Dolayısıyla tüm ekzonları aynı anda değerlendirmeyi sağlayan WES analizi, geleneksel yaklaşımlara kıyasla daha etkili ve maliyet etkin bir yöntem olmaktadır (11). Nöromusküler hastalık değerlendirmesinde sadece probanda yapılan WES analizleri ile %29-40 oranında tanısal verim elde edilebilmektedir (12).

Bu çalışma ile, *SMN1* gen delesyonu dışlanmış SMA/alt motor nöron hastalığı ön tanısı olan çocukluk yaş grubundaki dokuz hastada, etiyolojinin WES analizi verilerine dayanarak retrospektif olarak araştırılması ve elde edilen verilerin genotip-fenotip korelasyonu yapılarak yorumlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Motor nöron hastalıkları

Nöromusküler hastalıklar, periferik sinir veya kas hasarının veya işlev bozukluğunun görüldüğü geniş bir hastalık grubudur. Etkilenen bölge nöron hücre gövdeleri, aksonlar, Schwann hücreleri, nöromusküler kavşak veya kas olabileceği gibi, bu bölgelerin çeşitli kombinasyonları şeklinde olabilir (1). Böylece, heterojen özellik gösteren ve sıklıkla kalıtsal bozukluklardan oluşan bu karmaşık hastalık grubu, sinir sisteminin ön boynuz hücrelerini, periferik siniri, nöromusküler kavşağı ve kas liflerini etkileyebilmektedir. Çocuklukta önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olan nöromusküler hastalıkların çocuk popülasyonundaki sıklığı farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda $21-63/10^5$ olarak saptanmıştır (2-5).

Nöromusküler hastalıklar tutulum yerine göre nöroanatomik olarak sınıflandırılmaktadır; i. ön boynuz hastalıkları, ii. nöronal hastalıklar, iii. nöromusküler kavşak hastalıkları, iv. kas hastalıkları (13). Nöromusküler hastalıklar içerisinde önemli bir grubu motor nöron hastalıkları oluşturmaktadır (6). Motor nöron hastalıklarının başlangıç yaşı, doğumdan yetişkinliğe kadar değişen geniş bir yelpaze göstermektedir. Etkilenen bireylerde yürüme, hareket etme, nefes alma ve yutma güçlükleri progresif seyretmektedir. Alt motor nöron fonksiyon bozukluklarında belirgin olarak kas güçsüzlüğü, kas atrofisi, fasikülasyonlar ve refleks kaybı saptanırken, üst motor nöron fonksiyon bozukluklarında hiperrefleksi, spastisite ve anormal reflekslerin pozitifleşmesi tespit edilmektedir (14). Motor nöronların spesifik olarak veya daha yaygın bir nörodejeneratif sürecin parçası

olarak dahil olduğu çok çeşitli etiyolojili hastalıklar mevcuttur (15). Günümüzde dünya genelinde çocukları etkileyen en yaygın motor nöron hastalığı etkeni enfeksiyöz nedenlerdir (16). Motor nöron hastalığı kliniğı ile başvuran çocuklarda kalıtsal, immünolojik, enfeksiyöz, paraneoplastik, sporadik veya toksik nedenler çeşitli etiyolojik faktörler göz önünde bulundurulmakla birlikte, sinsi başlangıçlı ve yavaş ilerleyen fenotiplerde genetik temel ön planda düşünölmelidir (7).

Genomik düzeyde yapılan testlerin yaygınlaşması sebebiyle birbiriyle örtüşen veya birbirinden farklı fenotiplere sahip çocukluk çağı motor nöron hastalığı etiyolojisinde tanımlanan farklı genetik etkenlerin sayısı oldukça artmıştır (7). Çocuklarda en sık kalıtsal motor nöron hastalığı sebebi, *SMN1* genindeki biallelik patojenik varyantlardan kaynaklanan ve ön boynuz hücrelerinin (alt motor nöronları) ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize olan spinal musküler atrofidir (SMA, *SMN1* ilişkili SMA) (8).

Çocuklarda ve gençlerde alt motor nöron hastalığı kliniğine yol açan farklı gruplar altında sınıflandırılabilircek çeşitli genetik hastalıklar tanımlanmıştır:

1. Distal herediter motor nöropati (DHMN) veya distal SMA: Belirgin olarak ekstremite distalini etkileyen motor nöron hastalıkları (17)
2. SMA plus veya atipik SMA: Çocukluk çağı motor nöron hastalığı olarak ifade edilen ve ön boynuz (alt motor nöron) hücrelerinin tutulumu bulgularına ilave olarak yaygın nörolojik (epilepsi, ensefalopati, spastisite, beyin sapı-serebellum tutulumu, işitme-görme kaybı) veya

çoklu sistem (gastrointestinal, romatolojik) tutulumuna ait bulgular gösteren hastalıklar (17, 18)

3. Nörodejeneratif veya multisistemik genetik hastalıklar: Alt motor nöron etkilenmesine bağlı olarak amiyotrofinin (kas atrofisi) izlendiği fakat bunun ana bulgu olmadığı bazı nörodejeneratif veya multisistemik genetik hastalıklar (7)

4. Juvenil ALS: Üst ve alt motor nöron tutulumu birlikte olan juvenil amiyotrofik lateral skleroz (ALS) kliniği (7)

Klasik SMA'ya ek olarak yukarıda sayılan farklı klinik alt motor nöron tutulumu görülen hastalıklar ilerleyen kısımda ayrıntılandırılacaktır.

2.1.1. *SMN1* ilişkili klasik SMA

Spinal musküler atrofinin tarihi, 19. yüzyılın sonlarında Werdnig ve Hoffman'ın birbirinden bağımsız olarak ilerleyici kas güçsüzlüğü bulunan çocuklarda yaptıkları tanımlamalara dayanmaktadır (19, 20). Werdnig ve Hoffman tarafından tarif edilen hastalık klinik olarak daha çok tip 2 SMA'ya uymakla birlikte, isimleri klinik tablonun daha ağır izlendiği tip 1 SMA'nın diğer adı olarak yaşamaktadır. SMA'nın genetik ilişkisi ise 1990 yılında çocukluk çağı SMA hastalarının büyük kısmının 5. kromozomun q13 lokusu ile bağlantısı keşfedildiğinde hızlanmıştır (21). Bu keşfi, 1995 yılında SMA hastalarının %96'sından sorumlu olduğu belirlenen *SMN1* geninin bulunması izlemiştir (22).

Spinal musküler atrofi, ilk tanımlandığı dönemden beri kortikospinal veya duyuusal etkilenme olmadan omuriliğin ön boynuz hücrelerindeki kaybı ve progresif

kas güçsüzlüğünü içeren hastalıkları ifade etmek için kullanılmakta ve çoğunlukla SMA'nın en sık sebebi olarak bilinen 5q13.2 bandına lokalize *SMN1* genindeki biallelik mutasyonlardan kaynaklanan tipi (*SMN1* ilişkili SMA veya 5q ilişkili SMA) anlaşılmaktadır (23). *SMN1* ilişkili SMA başlangıç zamanı doğumdan ergenlik ve genç erişkinliğe kadar uzanan, spinal korddaki (alt motor nöronlar) ve beyin sapı çekirdeğindeki ilerleyici dejenerasyon ve ön boynuz hücrelerinin kaybından kaynaklanan, simetrik tutulum gösteren ve proksimal kas gruplarında daha belirgin olmak üzere kas güçsüzlüğü ve atrofisi ile karakterize bir hastalık grubudur. Dolayısıyla SMA, başlangıç yaşı ve kazanılan maksimum motor fonksiyonlar temelinde dört farklı klinik grupta sınıflandırılır (Tablo 1). Ayrıca, antenatal başlangıçlı ağır SMA formlarını tanımlamak için ek bir fenotipik alt tip daha (tip 0) belirlenmiştir (24).

Tablo 1. Spinal musküler atrofinin sınıflandırılması (24).

Fenotip	OMIM numarası	Başlangıç zamanı	Yaşam beklentisi	Motor kazanımlar	Diğer bulgular
SMA tip 0 Prenatal form	-	Prenatal belirtiler ile neonatal	Birkaç hafta, 6 aydan kısa	Kazanılamaz	- Ağır neonatal hipotoni - Ağır kas güçsüzlüğü - Arefleksi - Doğumda solunum yetmezliği - Fasiyal dipleji - Azalmış fetal aktivite - Atriyal septal defekt - Artrogripozis
SMA tip 1 Akut infantil form Werdnig-Hoffman hastalığı	253300	6 aydan önce	8-10 ay	Baş tutma gelişebilir, desteksiz oturma kazanılamaz	- Baş kontrolünün kaybı - Hafif eklem kontraktürleri - Normal veya minimal fasiyal hipotoni - Çeşitli emme ve yutma problemleri - Dil fasikülasyonları
SMA tip 2 Kronik infantil form	253550	6-18 ay	25 yaşına kadar (%70)	Desteksiz oturabilir	- Gelişme geriliği ve kazanılmış motor yeteneklerin kaybı - Azalmış veya alınamayan derin tendon refleksleri - Proksimal kas güçsüzlüğü - Parmaklarda postüral tremor
SMA tip 3 Juvenil form Kugelberg-Welander hastalığı	253400	18 aydan sonra	Normal	Bağımsız hareket	- Proksimal kas güçsüzlüğü - Kazanılmış motor yeteneklerin kaybı - Halsizlik - Parmaklarda postüral tremor - Patellar refleksin kaybı
SMA tip 4 Erişkin form	271150	Erişkin yaşta	Normal	Normal	- Halsizlik - Proksimal kas güçsüzlüğü

2.1.1.1. Klinik özellikler

Spinal musküler atrofi tip 1 ya da diğer adıyla Werdnig-Hoffman hastalığı, motor nöron hastalıkları arasında en sık görülendir ve bu hastalık grubunun ilk tanımlanan modelidir. Doğumdaki sıklığının, farklı coğrafyalarda değişmekle birlikte, 4-10/100.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (25). Yaşamın ilk altı ayında belirgin hale gelen klinik bulgular nedeniyle etkilenmiş bebekler simetrik,

generalize ve proksimal baskın bir kas güçsüzlüğü ile birlikte hipotoniktir. Alt ekstremiteler üst ekstremitelere göre genelde daha fazla etkilenmektedir. Çoğu motor nöron hastalığında olduğu gibi hafif olmakla beraber fasiyal güçsüzlük mevcuttur, ancak ekstraoküler kaslar korunmuştur. Dilde ve nadiren ekstremitelerde fasikülasyonlar görülebilir. SMA tip 1’de, tip 2 ve 3 için daha karakteristik olmakla beraber nadiren ellerde tremor görülebilir. Tipik olarak derin tendon refleksleri alınamaz. Zayıf ağlama, zayıf emme, zayıf beslenme, abdominal solunum ve bozulmuş sekresyonlar yaygın olarak görülmektedir. Azalmış göğüs ön-arka çapı ile birlikte pektus ekskavatum, çan şeklinde göğüs ve belirgin karın etkilenmiş bebeklerin karakteristik görünümüdür. Hastalığın erken dönemlerinde interkostal kaslar etkilenirken, diyafram kasları daha iyi korunmuştur. Ekstremitelerde hafif kontraktürler görülebilmektedir, fakat artrogripozis SMA tip 0 ile uyumlu olup, klasik SMA fenotipinin bir parçası değildir. Bağımsız oturma gibi motor fonksiyonların kazanılamadığı tip 1 SMA’da entelektüel etkilenme beklenmemektedir. Mekanik ventilatör desteği almayan hastaların büyük kısmı yaşamın ilk iki yılında bulbar ve/veya solunum kaslarının zayıflığı sebebiyle kaybedilmektedir (6).

Spinal musküler atrofi tip 2, kronik infantil form olarak yaşamın 6-18 ayları arasında başlamaktadır (26). Bu hastalar klinik olarak hiç yürüyemeyen çocuklar olarak tanımlanmaktadır. Postürel el tremoru SMA tip 1’den önemli farkı olmakla birlikte, dilde fasikülasyonlar, ellerde tremor, simetrik ve proksimal baskın güçsüzlük de SMA tip 2 fenotipini karakterize etmektedir. Bozulmuş bulbar fonksiyon ile ilgili problemler daha az görülmektedir. Tedavi edilmeyen SMA tip

2 hastalarının %98'i 5 yaşına kadar, üçte ikisi ise 25 yaşına kadar yaşayabildiğinden bu hastalarda kifoskolyoz ve kontraktürler gelişebilmektedir (6).

Spinal musküler atrofi tip 3 ya da diğer adıyla Kugelberg-Welander hastalığı ile çocuklukta başlayan SMA kliniği tanımlanmaktadır (27). Bulguların ortaya çıkış yaşı göz önüne alınarak tip 3 SMA, 3a ve 3b olarak iki ayrı gruba ayrılmaktadır. Tip 3a'da semptomlar 18 ay ile 3 yaş arasında, 3b'de ise 3 yaş ile 21 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. Etkilenen bireyler daha sonra kaybedecek olsalar da ayakta durma ve yürüme motor becerilerini kazanabilmektedir. Başlangıç semptomları her iki tipte de genellikle proksimal bacak kaslarının güçsüzlüğüdür. SMA tip 3a hastalarının %70'i semptomlarının başlangıcından itibaren 10 yıla kadar, %20'si ise 40 yıla kadar yürüyebilmektedir. SMA tip 3b'de ise hastaların neredeyse tamamı semptomlarının başlangıcından itibaren 10 yıla kadar, %60'ı 40 yıla kadar yürüyebilmektedir (27). SMA tip 2'de olduğu gibi tip 3'te de ellerde tremor, arefleksi ve dilde fasikülasyonlar yaygın görülen bulgulardır. Tip 3 SMA hastalarının daha ileri yaşlarda olması ve cilt altı yağ dokularının korunmuş olması sebebiyle ekstremitte fasikülasyonları tip 1 ve 2'ye göre daha belirgin olmaktadır (6, 26).

Spinal musküler atrofi tip 4'te etkilenen bireyler tipik olarak 21 yaşına kadar hastalıklarının farkında olmazlar (28). Başlangıç semptomları, diğer tiplerde olduğu gibi alt ekstremitte proksimal kaslarını etkileyen güçsüzlüktür. Alt ekstremitede kalça fleksörleri, ekstansörleri ve diz ekstansörleri, üst ekstremitede ise omuz abduktörleri ve dirsek ekstansörleri en çok etkilenen kas gruplarıdır. Dil ve eklem

fasikülasyonları ile ellerde tremor görülebilir. Bazı vakalarda baldır bölgesinde hipertrofi görülebilmektedir. Yaşam beklentisi normaldir (6, 28).

2.1.1.2. Moleküler patogeneze

Spinal musküler atrofilerin en yaygın görülen nedeni motor nöronlarda yetersiz “Survival Motor Neuron (SMN)” protein düzeyi olmasıdır (8, 18). Çoğunlukla 5. kromozomun q13.2 bölgesinde yer alan *SMN1* geninin her iki kopyasını etkileyen patojen varyantlardan kaynaklanan bu durum, SMA5q ya da SMN ilişkili SMA olarak ifade edilmektedir (8). SMA hastalarının %96’sında *SMN1* geninin 7. ve 8. ekzonlarının homozigot delesyonları saptanmaktadır (29).

Survival motor nöron protein üreten *SMN1* ve *SMN2* genleri, sırasıyla telomerik ve sentromerik olmak üzere birbirine ters kopyalardan oluşan neredeyse homolog diziler içermektedir. Böylece *SMN1*’in yokluğu, motor nöronlar dışındaki hücre tiplerinin nispeten normal gelişimine izin verecek SMN proteini üreten *SMN2* geni tarafından kısmen telafi edilebilmektedir. Bu genler %99 nükleotit benzerliğine sahip olmakla beraber, *SMN2* geninin *SMN1* geninden farklı olan beş nükleotidinden biri olan 7. ekzondaki c.840C>T transisyonu, transkriptlerinin kırılma noktalarını değiştirerek büyük kısmında trunkasyona uğramış (7. ekzonu olmayan) daha az stabil bir SMN proteininin üretilmesine neden olmaktadır (22, 30, 31).

Spinal musküler atrofi hastalarda *SMN2* kopya sayısı değişken (0-8 kopya) olabilmektedir (8). Her bir *SMN2* kopyası yaklaşık %10 fonksiyonel SMN proteini üretebildiği için *SMN1*’in fonksiyon kaybı durumunda, *SMN2* geni protein kaybını

yerine koymakta yetersiz kalmaktadır. Böylece SMA hastalarındaki fenotipik ağırlığın geniş aralığı, *SMN2* geninin kopya sayısı ile de ilişkilidir. Daha fazla *SMN2* kopya sayısı daha hafif fenotip sağlarken, mutlak bir korelasyon bulunmamaktadır. Hastanın fenotipi, diğer genetik ve/veya çevresel faktörler ile de etkilenebilmektedir (32).

Survival motor nöron proteini, spliceosomal küçük nükleer (small nuclear, sn) ribonükleoproteinlerin (RNP) de dahil olduğu çok sayıda RNP kompleksinin biyogenezinde gerekli bir moleküler şaperondur. SMN ekspresyonunda azalmalar, snRNP'lerin azalmasına ve akış yönünde RNA kırılma (splicing) işlemlerinde değişikliklere neden olmaktadır. SMN ayrıca aksonlarda ve dendritlerde bulunmakta, nöron gelişimi ve onarımı süreçlerinde nöronal mRNA-protein komplekslerinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple SMA, temel RNA işleme olaylarındaki kusurların neden olduğu, diğer motor nöron hastalıklarının anlaşılmasını da sağlayan bir prototip olarak düşünülmektedir (33).

2.1.2. Distal SMA'lar

Distal herediter motor nöronopati (DHMN) olarak da ifade edilen distal SMA (DSMA), simetrik tutulum gösteren ve genellikle yavaş ilerleyen uzunluğa bağlı motor baskın bir nöropatidir. Charcot-Marie-Tooth (CMT) hastalığı ve herediter duysal nöropatinin aksine duysal tutulum belirgin değildir (17). Ancak bazı DHMN formlarında az da olsa duysal etkilenme gözlenmektedir. Buna paralel olarak bazı DHMN hastalarında ve bazı aksonal CMT tip 2 hastalarında aynı gende aynı patojen varyantlar bildirilmekle birlikte (34-36), motor etkilenmenin

baskın olduğu DHMN ile aksonal CMT tip 2 hastalıkları farklı hastalıklardır. ALS, Kennedy hastalığı ve klasik SMA gibi diğer motor sendromlarda da minimal duyuşsal etkilenme görülebilmektedir (17).

“Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)” (37) veri tabanında DHMN’nin resesif kalıtlımlı grubu DSMA, dominant kalıtlımlı grubu ise DHMN olarak ifade edilmektedir. Hem DSMA hem de DHMN genotipik olarak oldukça heterojen olup, şimdiye kadar en az 18 farklı gen/lokus ile ilişkilendirilmiştir (17, 37, 38). Distal SMA’ların genotipik ve fenotipik özellikleri Tablo 2’de özetlenmektedir. Burada sorumlu olarak belirlenen bazı genler ayrıca aksonal CMT tip 2 (*IGHMBP2*, *HSPB8*, *HSPB1*, *GARS1* ve *TRPV4*), ALS (*DCTN*) ve herediter spastik parapleji (*BSCL2*, *REEP1*) gibi motor nöronları etkileyen diğer hastalıklarda da saptanmaktadır. Protein yanlış katlanması, aksonal taşıma, RNA metabolizması ve katyon kanal fonksiyonunun bozukluğu gibi mekanizmalar DHMN’lerin sorumlu nedenleri arasında bulunmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Distal spinal musküler atrofinin OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri.

Hastalık (OMIM numarası #)	Başlangıç ve seyir	Fenotip	Genler/Lokuslar	Fonksiyon	Kalıtım modeli	Allelik hastalıklar (OMIM numarası #)	Referanslar
Distal SMA 1 (DHMN6, 604320)	Bebeklik Erken letal	İntrauterin gelişme geriliği, azalmış fetal hareketler, ağır infantil aksonal nöropati, solunum yetmezliği.	<i>IGHMBP2</i>	Ribozomal biyogenez, RNA işleme	OR	Aksonal CMT tip 2S (616155)	(39)
Distal SMA 2 (Jerash tipi DHMN, 605726)	Çocukluk İlerleyici	Üst ve alt ekstremiteleri etkileyen distal kas güçsüzlüğü	<i>SIGMAR1</i>	Endoplazmik retikulum stresi ve mitokondriyal disfonksiyon	OR	ALS16 (614373)	(40)
Distal SMA 3 (DHMN4, %607088)	Bebeklikten erişkinliğe Yavaş seyirli	Diyafragmatik paraparezi	11q13	-	OR		(41)
Distal SMA 4 (611101)	Erken çocukluk Hızlı ilerleyici	Hızlı ilerleyici, azalmış solunum fonksiyonları	<i>PLEKHG5</i>	Guanin nükleotidi değişim faktörü	OR	Resesif ara form CMT tip C (615376)	(42)
Distal SMA 5 (614881)	Genç erişkin Yavaş seyirli	Alt ekstremit baskın	<i>DNAJB2</i>	Şaperon aktivitesini düzenleyici	OR		(43)
DHMN1 (%182960)	Juvenil İlerleyici	Üst ekstremit tutulumu sonradan gelişebilir	7q34-q36	-	OD		(44)
DHMN2A (158590)	Genç erişkin Hızlı ilerleyici	Alt ekstremit baskın	<i>HSPB8</i>	Isı-şok proteini, sıcaklık bağımlı şaperon aktivitesi	OD	Aksonal CMT tip 2L (608673)	(45, 46)
DHMN2B (608634)	Erişkin Yavaş seyirli	Alt ekstremit baskın	<i>HSPB1</i>	Moleküler şaperon	OD	Aksonal CMT tip 2F (606595)	(34)
DHMN2C (613376)	Genç erişkin Yavaş seyirli	Ayak ve el iç kaslarının atrofi	<i>HSPB3</i>	Aktin polimerizasyon inhibitörü	OD		(47)
DHMN2D (615575)	Erişkin Yavaş seyirli	El iç kaslarında zayıflık	<i>FBXO38</i>	Ubiquitin-protein ligaz kompleksinin parçası	OD		(48)
DHMN5A (600794)	Genç erişkin Yavaş seyirli	Üst ekstremit baskın	<i>GARS1</i>	Glisil-tRNA sentetaz	OD	Aksonal CMT tip 2D (601472)	(49, 50)
DHMN5A (600794)	Genç erişkin Yavaş seyirli	Üst ekstremit baskın	<i>BSCL2</i>	Adiposit diferansiyasyonu, endoplazmik rekulum stresi	OD	Lipodistrofinin eşlik edebildiği progresif ensefalopati (615924) Konjenital lipodistrofi tip 2 (269700) OD spastik parapleji 17 (270685)	(51, 52)
DHMN5B (614751)	Genç erişkin Yavaş seyirli	El iç kaslarında amiotrofi	<i>REEP1</i>	Aksonal onarım	OD	OD spastik parapleji 31 (270685)	(53)
DHMN7A (158580)	Genç erişkin Yavaş seyirli	Vokal kord paralizi, kaba ses	<i>SLC5A7</i>	Kolin geri alımı	OD	Presinaptik konjenital miyastenik sendrom 20 (617143)	(54, 55)
DHMN7B (607641)	Genç erişkin Yavaş seyirli	Vokal kord paralizi, solunum zorluğu, el iç kaslarında zayıflık ve atrofi	<i>DCTN1</i>	Veziküllerin dincin aracılı retrograd taşınması	OD	ALS yatkınlığı (105400) Perry sendromu (168605)	(56)
DHMN8 (60017)	Konjenital Nonprogresif	Azalmış fetal aktivite, artrogripozis	<i>TRPV4</i>	Kalsiyum kanalı	OD	CMT tip 2C (606071), Skapuloperoneal SMA (181405), İskelet displazisi (113500, 606835, 156530, 168400, 184095, 184252)	(36, 57)
DHMN9 (617721)	Juvenil Yavaş seyirli	El iç kaslarında amiotrofi	<i>WARS1</i>	Triptofanil-tRNA sentetaz	OD		(58)
X'e bağlı distal SMA 3 (300489)	İlk dekat Yavaş seyirli	Alt ekstremit üstten daha önce etkilenir	<i>ATP7A</i>	Bakır transportu	XR	Menkes hastalığı (309400) Oksipital horn sendromu (304150)	(59, 60)

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant, XR: X'e bağlı resesif

2.1.3. SMA plus sendromları

Spinal musküler atrofi plus sendromları veya atipik SMA'lar, alt motor nöron disfonksiyonunun ana özellik olduğu fakat tek özellik olmadığı, ayırt edici kas zaafiyeti özellikleri sayesinde bir arada sınıflandırılabilen bir grup hastalıktır (7). SMA ile birlikte görülen pontoserebellar hipoplazi, konjenital SMA ile birlikte görülen atrogripozis ve kırıklar, SMA ile birlikte görülen progresif miyoklonik epilepsi vb. hastalıklarda baskın olarak proksimal kas zaafiyeti görülmektedir. Alt ekstremité bulguları baskın olan SMA'lar ve skapuloperoneal SMA'lar ayırt edici kas güçsüzlüğü özellikleri bulunan hastalıklardır. Çocukluk çağından erişkinliğe kadar bulgu verebilen Brown-Vialetto-Van Laere sendromu ve daha çok erişkinlikte bulgu veren Kennedy hastalığında (spinobulbar musküler atrofi) bulbar zaafiyet daha belirgin olmaktadır (7, 61). SMA plus sendromlarının genotipik ve fenotipik özellikleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Spinal musküler atrofi plus sendromlarında, DHMN'ye benzer olarak bazı nöromusküler hastalıklarla ortak sorumlu genler etiyolojide rol almaktadır; aksonal CMT tip 2 (*DYNC1H1*, *TRPV4*), musküler distrofi (*TRIP4*), letal konjenital kontraktür sendromu (*GLE1*) gibi. Çocuklarda ve gençlerde motor nöron bozukluklarının altında yatan patojenik mekanizmalardan olan otofaji, protein kalite kontrolü, hücre iskeleti dinamiği ve RNA metabolizmasının düzensiz regülasyonu, genel olarak klasik SMA ve ALS'nin mekanizmaları ile örtüşmektedir (33, 62) (Tablo 3).

Tablo 3. Spinal musküler atrofi plus sendromlarının OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri.

Hastalık (OMIM numarası #)	Başlangıç Seyir	Fenotip	Genler	Fonksiyon	Kalıtım modeli	Allelik hastalıklar (OMIM numarası #)	Referanslar
Pontoserebellar hipoplazi 1A-D (607596, 614678, 616081, 618065)	Erken bebeklik İlerleyici, erken ölüm görülebilir	Ağır hipotoni, areflesi, kas zaafiyeti, santral görme kaybı, solunum yetersizliği ve progresif mikrosefali. Kranyal MR'da serebral hipoplazi ve değişen derecelerde pons etkilenmesi.	<i>VRK1</i> <i>EXOSC3</i> <i>EXOSC8</i> <i>EXOSC9</i>	RNA işleme	OR		(63, 64) (65) (66) (67)
Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA (159950)	Çocukluk İlerleyici	Proksimal kas zaafiyeti, hipotoni, areflesi ve kas yıkımı. Dil fasikülasyonları, sensörinöral işitme kaybı, poliartriküler artrit ve yüzde kas zaafiyeti gözlemlenebilir. Sonradan miyoklonik epilepsi.	<i>ASAH1</i>	Hücre iskeletinin mimarisi, aksonal dallanma, otofaji	OR	Farber lipogranülopatisi (228000)	(68)
Kas-iskelet sistemi anomalileri ile birlikte SMA							
Konjenital artrogripozis ve kırıklar ile birlikte SMA 1 (616866)	Antenatal Erken letal	Artrogripozis, kırıklar, kardiyak defektler, ağır hipotoni, kas zaafiyeti, areflesi, dilde fasikülasyon ve solunum yetersizliği	<i>TRIP4</i>	RNA işleme	OR	Davignon-Chauveau tipi musküler distrofi (617066)	(69)
Konjenital artrogripozis ve kırıklar ile birlikte SMA 2 (616867)	Antenatal Erken letal	Artrogripozis, kırıklar, kardiyak defektler, ağır hipotoni, kas zaafiyeti, areflesi, dilde fasikülasyon ve solunum yetersizliği	<i>ASCC1</i>	RNA işleme	OR	Barrett özofagusu/özofagus adenokarsinomu (614266)	(69, 70)
X'e bağlı SMA 2 (301830)	Antenatal Erken letal	Konjenital kırıklar, artrogripozis ve dilde fasikülasyon	<i>UBA1</i>	Proteasomlarla protein yıkımı	X'e bağlı		(71)
Konjenital artrogripozisle birlikte ön boynuz hücre hastalığı (611890)	Antenatal Bebeklik veya erken çocuklukta ölüm	Fetal akinezi deformasyon sekansı, intrauterin veya doğumdan sonraki günlerde ölüm. Spinal kord normal, ön boynuz hücreleri etkilenmiştir.	<i>GLE1</i>	RNA işleme, mRNA eksport mediyatörü	OR	Letal konjenital kontraktür sendromu 1 (253310)	(72)
Ayrı edici kas tutulumları olan SMA plus sendromları							
Alt ekstremité baskın SMA 1 (158600)	Kojenitalden erişkinliğe Nonprogresif ya da yavaş seyirli	Alt ekstremité proksimal kas zaafiyeti distalden daha belirgin. Alt ekstremité MR'da uyluk adductorlarında ve semitendinöz kasında zayıflık	<i>DYNC1H1</i>	Aksonal transport için dinein kompleksinin yapısı	OD	Aksonal CMT tip 2O (614228) Otozomal dominant mental retardasyon 13 (614563)	(73, 74)
Alt ekstremité baskın SMA 2A-B (615290, 618291)	Kojenitalden erişkinliğe Yavaş seyirli	Kas zaafiyeti alt ekstremitenin proksimalinde distalden daha belirgin ve alt ekstremitéde üstten daha belirgin.	<i>BICD2</i>	Hücre iskeleti dinamikleri, dinein-dinaktin kompleksi	OD		(75-77)
Skapuloperoneal SMA (181405)	Doğumda, bebeklikte Nonprogresif ya da yavaş seyirli	Yüzde ve pectoral kasta progresif güçsüzlük, laringeal palsy. Sensörinöral işitme kaybı ve iskelet anomalileri eşlik edebilir. Alt ekstremité MR'da biseps femoris ve medial gastrocnemius kaslarında zayıflık	<i>TRPV4</i>	Kalsiyum kanalı	OD	Aksonal CMT tip 2C (606071) DHMN8 (600175) İskelet displazileri (113500, 606835, 156530, 168400, 184095, 184252)	(78, 79)
Brown-Vialetto-Van Laere sendromu 1 (211530)	Erken çocuklukta erişkinliğe İlerleyici	İlerleyici pontobulbar palsy, kol, el ve yüzde zayıflık, ataksi, disfaji, dilde kas yıkımı ve fasikülasyonlar, sensörinöral işitme kaybı	<i>SLC52A3</i>	Riboflavin transportu	OR	Fazio-Londe hastalığı (211500)	(80)
Brown-Vialetto-Van Laere sendromu 2 (614707)	Erken çocukluk İlerleyici	İlerleyici pontobulbar palsy, kol, el ve yüzde zayıflık, ataksi, disfaji, dilde kas yıkımı ve fasikülasyonlar, sensörinöral işitme kaybı, optik atrofi, görme kaybı	<i>SLC52A2</i>	Riboflavin transportu	OR		(81, 82)

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant.

2.1.4. Alt motor nöron tutulumu olabilen nörodejeneratif veya multisistemik hastalıklar

Motor nöron dejenerasyonu, nörodejeneratif veya multisistemik hastalıklara eşlik eden önemli bir bulgu olabilmektedir. Bu nedenle motor nöron tutulumunun belirlenmesi, hastalığın doğru karakterize edilmesi ve hastanın klinik izleminin doğru yönetilmesinde önemlidir. Hastalarda klinik, elektrofizyolojik ve patolojik incelemelerle ilerleyici kas zayıflığı, amiyotrofi ve denervasyon bulguları ortaya konabilir.

Alt motor nöron tutulumu olabilen nörodejeneratif veya multisistemik hastalıkların genotipik ve fenotipik özellikleri Tablo 4'te özetlenmiştir. Tablo 4'te belirtilen hastalıklar, özellikle erken dönemde hipotoni, kas zaafiyeti ve amiyotrofi gibi alt motor nöron bulguları nedeniyle SMA'nın ayırıcı tanısında dikkate alınması gereken hastalıklardır (7, 83).

Tablo 4. Alt motor nöron tutulumu olabilen nörodejeneratif veya multisistemik hastalıkların OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri.

Hastalık (OMIM numarası #)	Başlangıç Seyir	Fenotip	Genler	Fonksiyon	Kalıtım modeli	Allelik hastalıklar (OMIM numarası #)	Referanslar
Serebellar atrofi ile birlikte çocukluk çağı başlangıçlı nörodejenerasyon (618276)	Erken çocukluk Progresif	Progresif nörodejenerasyon. Global gelişme geriliği, bozulmuş entelektüel gelişim, kısıtlı konuşma veya konuşma yokluğu, motor anormallikler ve kas atrofisi. Bazı hastalarda ataksi, distoni, periferik nöropati. Kraniyal MR'da serebellar atrofi.	<i>AGTPBP1</i>	Hedef proteinlerin deglutamilasyonu	OR		(83)
İnfanıl nöroaksonal distrofi 1 (256600)	Erken çocukluk Genelde progresif	Başlangıçta strabismus, hipotoni, kas zaafiyeti ve gelişme geriliği. Takibinde psikomotor gerileme, spastik tetrapleji, distoni, nistagmus ve optik atrofi	<i>PLA2G6</i>	Mitokondri yapı ve fonksiyonu	OR	Beyinde demir birikimi ve nörodejenerasyon 2 (610217) Otozomal resesif Parkinson hastalığı 14 (612953)	(84, 85)
Amiyotrofi optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (617207)	Bebeklik Progresif	Distal motor nöropati, spastik ataksi ve ikinci dekatta beyinde demir birikimi	<i>TBCE</i>	Golgi aparatında mikrotübül polimerizasyonu	OR	Hipoparatiroidizm-retardasyon-dismorfizm sendromu (241410) Kenny-Caffey sendromu 1 (244460)	(86)
Alopesi, nörolojik defektler ve endokrinopati sendromu (612079)	İkinci dekat Progresif motor bozulma	Alopesi, ağır entelektüel yetersizlik, progresif motor bozulma, alt ve üst motor nöron tutulumu, santral hipogonadizm, santral adrenal yetmezlik, kısa boy, mikrosefali ve hipodonti. MR'da hipoplazik hipofiz bezi.	<i>RBM28</i>	RNA işleme, ribozom biyogenezinin düzenlenmesi	OR		(87)

OR: Otozomal resesif.

2.1.5. Juvenil amiyotrofik lateral skleroz

Kortikospinal sistemin, beyin sapının ve spinal motor nöronların dejenerasyonu ile oluşan ALS, yaş ve cinsiyete göre değişkenlik gösteren çeşitli klinik özellikleri ve baskın motor semptomları nedeniyle multisistemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Toplumlara göre değişken olmakla birlikte, dünya çapında insidansı 0,4-2,6/100.000 olarak bilinmektedir (88). Vakaların yaklaşık %90'ında hastalığın başlangıç yaşı ortalama altıncı dekad ve semptomların başlangıcından itibaren sağkalım süresi ortalama 2-4 yıl olan ALS, poligenik ve çevresel faktörlerle ilişkili karmaşık etiyolojisi ile birlikte sporadik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (89). Buna karşılık, genç insanların etkilendiği kalıtsal ALS, erkek ve kadınlarda eşit oranda görülmekte ve bimodal hastalık süresi göstermektedir. Özellikle, 25 yaşından önce başlayan juvenil ALS, yetişkin başlangıçlı tiplere göre daha fazla ailesel kalıtılma ihtimaline sahiptir ve hem otozomal dominant hem de resesif kalıtım modelleri göstermektedir (Tablo 5). Juvenil başlangıçlı ailesel ALS'ler (juvenil ALS 2, 4, 5, 16), normal yaşam beklentisi ve daha yavaş ilerleme ile uzun süreli sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (90, 91). Buna karşın, sporadik ALS ile uyumlu olarak değerlendirilen ALS 6 (*FUS*) veya ALS 1 (*SOD1*) gibi klinik spesifik varyantlarda ergenlik döneminde agresif seyir gösteren vakalar tanımlanmıştır (92). Bozulmuş otofaji, protein kalite kontrolü, hücre iskeleti dinamiği ve RNA metabolizmasının regülasyonu ALS'nin altında yatan patojenik mekanizmalar olarak bilinmektedir (62).

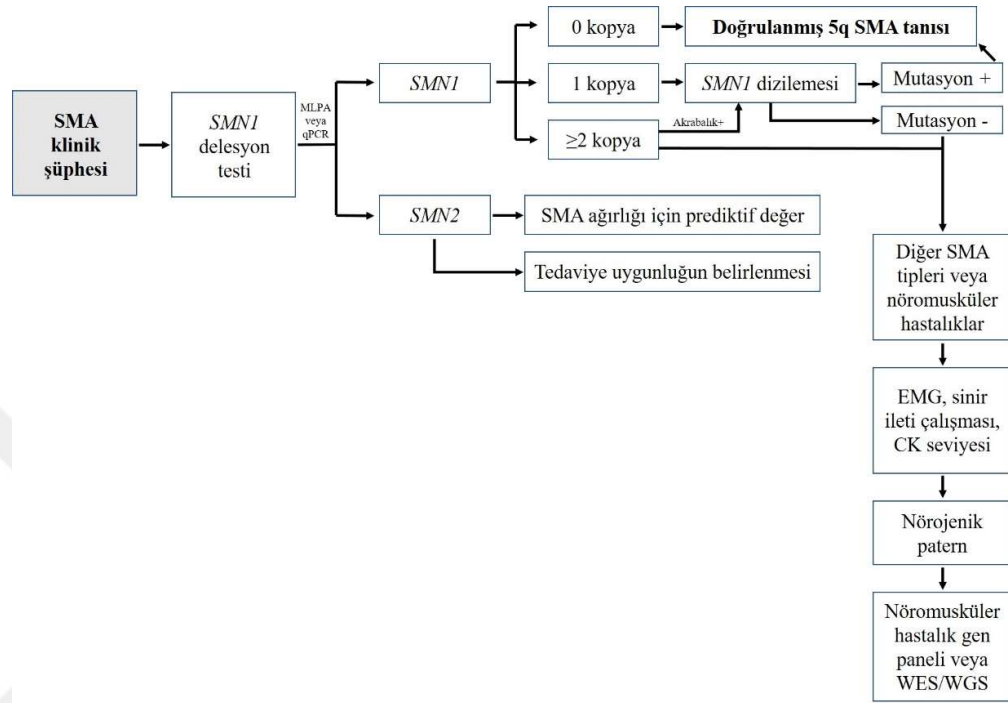
Tablo 5. Juvenil amiyotrofik lateral skleroz tiplerinin OMIM veri tabanı bilgileri ve fenotipik özellikleri.

Hastalık (OMIM numarası #)	Başlangıç Seyir	Fenotip	Genler	Fonksiyon	Kalıtım modeli	Allelik hastalıklar (OMIM numarası #)	Referanslar
Juvenil ALS 2 (205100)	Çocukluk Yavaş ilerleyici	Yüz ve ekstremitte kaslarında spastisite ve zayıflık, bulbar ve psödobulbar semptomlar. Kognitif etkilene görülebilir.	<i>ALS2</i>	Guanin nükleotidi değişim faktörü	OR	Juvenil primer lateral skleroz (606353)	(93, 94)
Juvenil ALS 4 (602433)	Genç erişkin Yavaş ilerleyici	Ağır distal kas zaafiyeti ve piramidal bulgular. Korunmuş bulbar fonksiyon ve entelektüelite	<i>SETX</i>	DNA tamiri ve RNA işleme	OD	OR spinoserebellar atrofi ve aksonal nöropati 2 (606002)	(95)
Juvenil ALS 5 (602099)	Bir-ikinci dekat Yavaş ilerleyici	Distal kas zaafiyeti ve amiyotrofi. Daha sonra spastisite ve bulbar semptomlar. 20-40 yaşlarında tekerlekli sandalyeye bağımlı.	<i>SPG11</i>	Aksonal onarım	OR	Aksonal CMT tip 2X (616668) OR spastik parapleji 11 (604360)	(96)
Frontotemporal demansla birlikte olabilen ALS 6 (608030)	Ortalama 40 yaşında, juvenil başlangıçlı olabilir Hızlı ilerleyici	Hızlı ilerleyici spastik yürüyüş, güçsüzlük, amiyotrofi, dizatri ve yüz kas tutulumu. Frontotemporal demans veya entelektüel etkilene eşlik edebilir	<i>FUS</i>	Transkripsiyon, RNA işleme ve DNA tamiri	OD, OR	Hereditör esansiyel tremor 4 (614782)	(97, 98)
Juvenil ALS 16 (614373)	Bebeklik, çocukluk Yavaş ilerleyici	Alt ekstremitte de başlayıp sonradan üst ekstremitte de tutar	<i>SIGMAR1</i>	Endoplazmik retikulum stresi ve mitokondriyal disfonksiyon	OR	OR distal SMA 2 (605726)	(99)

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant

2.2. SMA ve diğ er alt motor nöron hastalıklarının tanısı

Uluslararası “The SMA Care Group” tarafından SMA’nın tanısı ve yönetimi amacıyla hazırlanan kılavuza (9) göre klinik değerlendirmelerle SMA şüphesi olan hastalarda kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative polimerase chain reaction, qPCR) veya multiplex ligation probe amplification (MLPA) yöntemleri kullanarak *SMN1* genindeki olası delesyonların araştırılması tanıya yönelik uygulanacak ilk aşamadır. Bu kılavuzda, *SMN1* geninin tespit edilen kopya sayısına göre uygulanacak sonraki analizler bir iş akışı şemasında belirlenmektedir (şekil 1). Delesyon saptanmayan hastalarda diğer SMA tipleri veya nöromusküler hastalık varlığı açısından elektromiyografi (EMG), sinir ileti çalışmaları ve serum kreatin kinaz (creatine kinase, CK) seviyeleri belirlenerek hastada nörojenik bulguların varlığı araştırılmaktadır. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda nörojenik bulgu gösteren hastalara nöromusküler hastalık gen paneli veya WES/WGS analizlerinin yapılması önerilmektedir (9).



Şekil 1. SMA tanısı için önerilen iş akışı şeması. Bu şema, “The SMA Care Group” tarafından SMA’nın tanısı ve yönetimi amacıyla hazırlanan kılavuzdan (9) uyarlanmıştır.

2.2.1. Biyokimyasal değerlendirmeler

Periferik sinir etkilenmesinin gözlemlendiği hastalarda vitamin seviyeleri, monoklonal antikorlar, diyabetik nöropatide hemoglobin A1C seviyesi, otoimmün parametreler, bakteriyel-viral seroloji testleri ve ağır metallerin seviyelerinin ölçümü özellikle genetik dışı etiyolojilerin belirlenmesinde fayda sağlamaktadır (6).

Serum CK seviyelerinin ölçümü nöromusküler hastalık değerlendirmelerinde önemli bir yardımcı parametredir. Bazı miyopatiler, musküler distrofiler ve hızlı kas yıkımına sebep olan hastalıklarda serum CK seviyeleri normalin 50 katından yüksek seviyelere ulaşabilmektedir (100). Aksine

bazı miyopati türlerinde de normal seviyelerde saptanabilmektedir (6). Kas hastalığının primer göstergesi olarak değerlendirilen serum CK seviyelerinin yüksekliği nörojenik hastalıklarda da saptanabilmektedir. Nörojenik hastalıklardan genellikle SMA tip 1’de normalin 5 katına kadar, ALS’de 3-4 katına kadar ve Kennedy hastalığında 8 katına kadar yükselebilmektedir (6, 101).

Yüksek serum CK seviyeleri her zaman patolojilerle ilişkili olmayabilir. Serum CK seviyeleri cinsiyetten, ırktan, yaştan ve kas kitle miktarından etkilenebilmektedir. Ayrıca, elektrobiagnostik testlerden sonra serum CK seviyeleri normalin 5 katına kadar, başka invazif tıbbi girişimlerden sonra normalin 50 katına kadar yükselebilmektedir. Bu gibi durumlarda serum CK seviyelerinin bir hafta içerisinde normale seviyelere dönmesi beklenmektedir (6).

2.2.2. Elektrobiagnostik değerlendirmeler

Pediyatrik nöroloji hekimleri tarafından yapılan bu değerlendirmeler EMG ve sinir ileti çalışmalarını içermektedir. Elektriksel sinir stimölasyonuna veya istemli bir kasılmaya kas tepkisi test edilmekte ve sinirler içindeki iletim hızları ölçölmektedir. Sonuçlar, anormal bir kas tepkisi (miyopatik model) ile motor sinir liflerinin tutulumu (nöropati veya denervasyon, nörojenik model), yani sadece kas ve motor nöron etkilenimlerini içeren hastalıklar arasında ayırım yapmayı sağlamaktadır. EMG ve sinir iletim hızı ölçömlerinin birlikte kullanımı saf motor nöropatileri, demiyelinizan sensorimotor nöropatileri (hem motor hem de duyuşal sinir latensisinde belirgin uzama ve çok düşük iletim hızları) ve aksonal

sensorimotor nöropatileri (normal latensi ve iletim hızları ile azalmış yanıt) ayırmaya yardımcı olmaktadır (102).

2.2.3. Sinir ve kas görüntüleme yöntemleri

Nöromusküler hastalıkların değerlendirilmesinde manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (BT) ve ultrasonografi yöntemleri kullanılabilir. Bunlar arasında daha sık kullanılan ve klinikte hasarların belirlenmesi ve hastalıkların birbirinden ayırt edilmesinde daha çok fayda sağlayan yöntem MRI'dır (103). MRI yöntemi ile kas incelemesinde, kas dokusunun yağ dokusu ile yer değiştirmesi tespit edilerek doğrudan kası veya denervasyon yoluyla siniri etkileyen kronik hastalıkların tespiti sağlanabilir. MRI'nı, farklı lokasyon ve modalitelerde uygulanması ile akut sinir hasarları, fokal sinir tuzaklanması veya kompresyonu, periferik sinir tümörleri, inflamatuvar demiyelinizan nöropatiler ve intramedullar hastalıklar değerlendirilebilmektedir. Ek olarak CMT'de hipertrofik sinirlerin saptanmasında kullanılabilmektedir (102).

2.2.4. Sinir ve kas histopatolojisi

SMNI-ilişkili SMA'da ön boynuz hücrelerinin dejenerasyonu Werdnig ve Hofmann'ın ilk makalelerini yayımladıkları yıllardan itibaren bilinmektedir (104). Ön boynuz hücrelerinin mikroskopik değerlendirilmesinde artmış nörofilamentler içeren motor nöronların hidropik dejenerasyonu ve medulla spinalis ventral kökleri içinde artmış glial demetler görülebilmektedir (6).

SMA'da iskelet kasının mikroskopik görüntülemesinde ise genellikle denervasyona bağlı grup atrofisi ve tip1 fiber hipertrofisi gibi klasik motor nöron hastalığı bulgularına rastlanır. Bununla birlikte, SMA tipleri arasında az da olsa histopatolojik farklılıklar gözlenebilmektedir. SMA tip 1'de kas biyopsisinde küçük yuvarlak şekilli atrofik tip 1 ve tip 2 fiberler arasında normal veya hipertrofik tip 1 fiberler görülür. Tip 1 SMA ile karşılaştırıldığında tip 3 SMA'da daha fazla denervasyona bağlı grup atrofisi ve tip1 fiber hipertrofisi görülmektedir (105).

SMA'da kas ve sinir biyopsileri için mikroskopik bulgular yukarıda özetlenmiş olmakla birlikte, moleküler genetik çağının başlamasıyla kas veya sinir biyopsisinin tanıda kısıtlı yararı ve işlemin invazif olması nedeniyle günümüzde öncelikli tanı yaklaşımları arasında yer almamaktadır. Ancak yapılan genetik testlerle homozigot delesyon veya mutasyon bulunamaması durumunda klinik araştırmaya devam edilip kas veya sinir biyopsisi gibi invazif işlemler ayırıcı tanılarının desteklenmesi veya dışlanması için uygulanabilir (9, 106).

2.2.5. Moleküler yöntemler

2.2.5.1. *SMN1* ilişkili SMA'nın moleküler tanısı

Spinal musküler atrofi klinik olarak tanınabilir özellikleri olan bir hastalık olmakla birlikte, klinik tanının moleküler olarak doğrulanması gerekmektedir. Tipik SMA hastalarının %96'sında etiyolojide *SMN1* geni ekzon 7 veya ekzon 7-8 homozigot delesyonu olması nedeniyle hastalarda ilk olarak bu delesyonun belirlenmesi için polimeraz zincir reaksiyonu – restriksiyon fragman uzunluk

polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullanılmaktadır. Bunun dışında *SMN1* geni ekzon 7 veya ekzon 7-8 delesyonunu değerlendirmek için hem hastalarda hem de taşıyıcılık araştırmasında kullanılabilecek yöntemler; qPCR, MLPA ve yeni nesil dizileme (Next-generation sequencing, NGS) analizidir. Bu üç yöntem, *SMN1* geni ekzon 7 veya ekzon 7-8 delesyonunu değerlendirmek için altın standart olarak kabul edilmektedir (9).

Survival motor neuron 2 geninin kopya sayısı her allelde 0-4 arasında olabilmektedir (8). Genin her bir kopyası yaklaşık %10 fonksiyonel SMN proteini üretebildiği için, SMA fenotipinin ağırlığını etkileyen önemli bir faktör olan *SMN2* geninin kopya sayısının rutin olarak araştırılması önerilmektedir (107). Bunun yanında yakın zamanda kullanıma girmiş bir antisens oligonükleotid ajan olan nusinersen tedavisine aday hastaları belirlemek için *SMN2* kopya sayısının değerlendirilmesi gerekmektedir (108).

Survival motor neuron 1 geninde nadiren patojen tek nükleotid varyantları delesyonlarla birlikte trans olarak saptanabilmektedir. Bu varyantların tespiti genomik DNA'dan "long-ranged PCR" sonrası kodlayan bölgelerin dizilenmesi veya *SMN1* transkriptlerinin "revers transkriptaz PCR" işlemi sonrası dizilenmesi ile tespit edilebilmektedir (109, 110). "The SMA Care Group" tarafından SMA'nın tanısı ve yönetimi amacıyla hazırlanan kılavuzda SMA şüphesi bulunan ve *SMN1* geni tek kopya olarak tespit edilen hastalarda tek nükleotid varyantlarının araştırılması önerilmektedir. *SMN1* kopya sayısı iki veya daha fazla olan hastalarda ise 5q-dışı SMA'ların moleküler tanısına yönelik olarak nöromusküler hastalık gen panelleri veya WES/WGS gibi kapsamlı analizlerin yapılması önerilmektedir (9)

2.2.5.2. 5q-dışı SMA'ların moleküler tanısı

5q-dışı SMA'ların moleküler tanısında kullanılan nöromusküler hastalık gen panelleri, WES ve WGS testleri, yöntem olarak aynı anda birçok DNA dizisini analiz edebilmek için geliştirilmiş yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) sistemlerini kullanarak yapılmaktadır. NGS ile milyonlardan milyarlarca varan sayılarda örtüşen kısa okumalar elde edilmektedir. Elde edilen okumalar referans genomda haritalanıp karşılaştırılmaktadır (mapping, alignment). Haritalanan okumalardan bir veya daha fazla baz pozisyonunda yeterli sayıda okuma referans sekansla eşleşmediğinde varyant tespit edilmektedir (variant calling). Bu aşamada elde edilen varyantlara (panellerde düzinelerce, WES'te on binlerce, WGS'te milyonlarca) çeşitli araçlarla anotasyon işlemi uygulanmaktadır. Anote edilen varyantlar gendeki yerleşim yerlerine göre, sağlıklı popülasyon verilerindeki sıklık bilgilerine göre ve varyant veri tabanlarındaki mevcut sınıflamalara göre filtrelenmektedir. Bu aşamalardan sonra elde edilen varyantlar hastaların klinikleri ile birlikte yorumlanarak patojenite sınıflamasıyla birlikte raporlar oluşturulmaktadır (111, 112).

Yeni nesil dizileme uygulamalarından klinik ile uyumlu önceden tanımlanmış hastalık genlerini içeren paneller, sonuçlarının yorumlanması en kolay ve en az maliyetli grubu oluşturmaktadır. Hedeflenen bölgelerde varyant yakalama etkinliği ve derinlik değerleri WES ve WGS'e göre daha iyi olmaktadır (12, 111). Gen panellerinin, klinik tanının tek bir gene işaret etmediği durumlarda birinci sırada tercih edilecek genetik testler olarak faydaları kanıtlanmıştır (113). SMA/alt motor nöron hastalığı ve aksonal CMT 2 ön tanıları olan hastaların farklı gen

panelleri ile değerlendirildiği bir çalışmada, alt motor nöron hastalığı genlerini içeren panellerle %13 tanısal verim elde edilirken, nöromusküler hastalıklarla ilişkilendirilmiş 479 geni içeren gen panel dizileme analizinde verim %33'e ulaşmıştır (114). Tasarımları ve inceleme kapsamı belirli genlerle sınırlı olduğu için paneller klinik kullanımda daha uygun olmakla birlikte, bilinmeyen bir sorumlu genin araştırıldığı durumlarda diğer seçenekler daha ön planda olmaktadır. Bunun yanında, sürekli keşfedilen yeni hastalık genleri nedeniyle panel tasarımlarının hızlı bir şekilde güncellenmesi gerekliliği bulunmaktadır (12). Günümüzde nöromusküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen 587 gen mevcut olup bu sayı yeni keşfedilen genlerin eklenmesiyle artış göstermektedir (115).

Tüm ekzom dizileme, genomda tüm protein kodlayan bölgelerin (ekzonların) zenginleştirme ve yüksek verimli sekanslama yoluyla potansiyel varyantların analiz edilmesini sağlayan bir yeni nesil dizileme tekniğidir. Mendeliyan hastalıklara neden olan varyantların %85'i, genomda yalnızca %2'lik yer kaplayan ekzonlarda yer almaktadır (10). İnsan genomunda bilinen 20.000 gendeki ortalama 180.000 ekzonun taranması yoluyla Mendeliyan kalıtım özelliği gösteren hastalıklar ve kompleks hastalıklara yol açabilecek genetik varyantların saptanmasına olanak sağlayan bu teknik, tanıya yardımcı olan basit ve uygun maliyetli bir yaklaşım avantajı sağlamaktadır. Panel tasarımlarından farklı olarak sorumlu genetik etiyolojinin bilinmediği hastalıklarda yeni genlerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. WES testinde panellere göre hedeflenen ve zenginleştirilen bölgenin daha geniş olması derinlik değerlerinin panellere kıyasla daha düşük olması ve özellikle dizilenmesi zor olan bölgelerde bazen okuma

derinliğinin sıfıra kadar düşmesine sebep olmaktadır. Psödogenler, tekrar dizileri ve duplikasyon-delesyon bölgeleri de elde edilen kısa okumaların referans genomla eşleşmenin başarısını düşürerek yanlış pozitiflik ve yanlış negatifliklerle hatalı sonuçların oluşmasına sebep olabilmektedir (111).

Nöromusküler hastalık tanısında yalnızca probanda WES analizinin uygulandığı çalışmalarda %29-40 oranında tanısal verim elde edilirken (116-119), akraba evliliğinin sık olduğu topluluklarda oran bu oran %73'e kadar çıkmaktadır (120). WES analizinde tanısal verimi artırmanın bir diğer yolu da anne-baba ve probandı içeren trio çalışmalarıdır. Bu analiz yöntemi, hızla *de novo* varyantların tespitine ve cis veya trans durumlarının belirlenmesine olanak tanıdığından hem otozomal dominant hem de otozomal resesif hastalıkların tanısı için fayda sağlamaktadır (12). WES analizi ile limb-girdle musküler distrofi hastalarının değerlendirildiği bir çalışmada yalnızca probanda WES çalışıldığında hastaların %40'ında moleküler tanı elde edilebilirken, trio çalışmalarında %60 tanısal verim sağlandığı bildirilmiştir (118).

Tüm genom dizileme, genomun tamamına yakın bir dizileme sağladığından, kapsama özelliğinin her yerde benzer olması beklenmektedir. Buna karşın WGS, panel ve WES analizlerine göre daha pahalı, sekans işinin daha çok ve saklanacak veri miktarının çok daha büyük olduğu bir analizdir. Verilerin %98'i kodlamayan bölgeye ilişkin olduğu için varyantların karakterize edilmiş ve sınıflandırılmış kısmı daha azdır ve bu sebeple varyantları yorumlamak daha zordur (111). WGS'nin avantaj sağladığı durumlar ise gen panelleri ve WES ile saptanamayacak kodlamayan bölgelere ait varyantların ve kromozomal yeniden düzenlenimlerin

yakalanabilmesidir. Mikroarray ve WES analizleri ile tanı alamayan 50 entellektüel yetersizlik hastasında, WGS ile hastaların %42'sinde genetik sebebin ortaya konduğu bildirilmiştir (121). Ek bir avantaj olarak, uzun okumalı sekans teknolojilerini kullanan WGS platformları, WES ve gen panel analizlerinin yetersiz kaldığı tri-, tetra-, hekzanükleotid tekrar artışlarını ve kısıtlanmalarını saptamada başarılı olmaktadır (122).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 2018-2019 yıllarında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine spinal musküler atrofi/alt motor nöron hastalığı kliniğinin varlığı nedeniyle Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'ndan refere edilmiş hastalar retrospektif olarak taranarak *SMN1* geninde delesyon varlığı dışlanmış olan 6'sı erkek 3'ü kız toplam 9 hasta dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların spinal musküler atrofi/alt motor nöron hastalığı ön tanısı alması ve *SMN1* geninde 7-8. Ekzon delesyonunun dışlanmış olması esas alınmıştır.

Çalışma için Etik Kurul onayı, 27.01.2020 tarihli Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 115 karar numarasıyla alınmıştır.

3.1. Hastalar

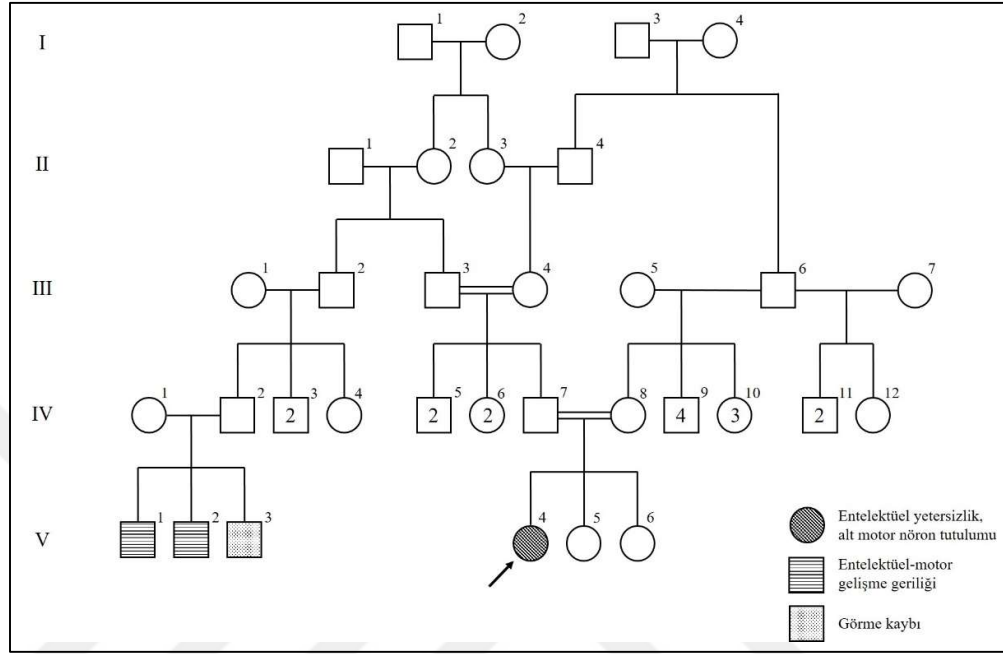
3.1.1. Hasta 1

On iki yaş 9 aylık kız hastanın, iki buçuk yaşında iken kısa adımlar atma, parmak ucunda yürüme, aksama ve sık düşme gibi yürüme ile ilgili sorunları ve konuşmasında gecikme nedeniyle Pediatrik Nöroloji bölümüne başvurulmuş ve o dönemden beri takip ediliyor. Antenatal takipleri normal olan hastanın, doğum sırasında ve doğum sonrası erken dönemde herhangi bir sağlık problemi olmamış. Altı aylıkken desteksiz oturabiliyormuş ve bir yaşında iken tutunarak ayağa

kalkabiliyormuş. Bir yaşından sonra 3-4 kez geçirdiği febril nöbetler nedeniyle motor gelişimi yavaşlayan hasta, iki yaşından sonra yürümeye başlamış. Takip eden dönemde özellikle alt ekstremitelerde spastisite başlamış ve beş yaşından beri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon bölümünce takip ediliyormuş. Alt ekstremitelerini etkileyen spastisite için iki kez botulinum toksini enjeksiyonu uygulanmış. Halen desteksiz oturabilen fakat desteksiz yürüyemeyen ve yürüyüş desteği için ayak-bilek ortezi kullanan hastanın mobilizasyonu tekerlekli sandalye ile sağlanıyor.

İki yaşında iken ilk kelimelerini söyleyebilen hastanın, uzun cümleler kurmaya başlayabildiği zaman ailesince hatırlanmıyor. Bir buçuk yaşında iken sfinkter kontrolü başlamış. Yedi yaşında iken gözlerde kayma, kısa süreli bilinç kaybı ile giden bir nöbeti ve on iki yaşında iken uykuda generalize nöbeti olmuş ancak antiepileptik ilaç kullanılmamış. On iki yaşında menarş görülmüş. Okul başarısı düşük olan hasta, halen fizyoterapiye ek olarak özel eğitim alıyor.

Aralarında dördüncü derece akrabalık bulunan sağlıklı 32 yaşında anne ve 40 yaşında babanın, hasta dışında 11 ve 9 yaşlarında sağlıklı iki kız çocukları mevcut. Hasta 1'e ait pedigrî Şekil 2'de bulunmaktadır. Hastanın dördüncü derece akrabaları arasındaki görme engeli olan bir bireyin (V-3) ve entelektüel-motor gelişme geriliği olan iki bireyin (V-1 ve V-2), hastalıklarının etiyolojisine yönelik aileden herhangi bir bilgi alınamamış, bu hasta bireylerin anne-babalarının akraba olmadığı öğrenilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Hasta 1'e ait pedigrisi.

Hastanın 12 yaş 9 aylıkken yapılan fizik muayenesinde; vücut ağırlığı 46 kg (-0,4 SD), boyu 150 cm (-1,13 SD) ve baş çevresi 53,5 cm (-0,79 SD) olarak ölçüldü. Muayene sırasında dizartrik konuştuğu ve desteksiz ayakta duramadığı gözlemlendi. Dismorfik değerlendirmede; hafif hipertelorizm, diastema, sağ lomber bölgede 2x2 cm boyutunda hiperpigmente alan bulunan hastanın sol bacağına iki adet kas biyopsisi skarı ve bilateral pes planovalgus vardı. Nörolojik muayenede; alt ekstremitelerde azalmış kas gücü, canlı derin tendon refleksleri ve değişen ağırlıklarda spastisite olduğu tespit edildi.

Laboratuvar değerlendirmelerinde; periferik kanda CK seviyesi hafif artmıştı. Beyin MRI, beyin difüzyon MRI, beyin MRI spektroskopisi, lomber MRI ve kalça MRI değerlendirmeleri normaldi. Uykuda geçirdiği generalize nöbet

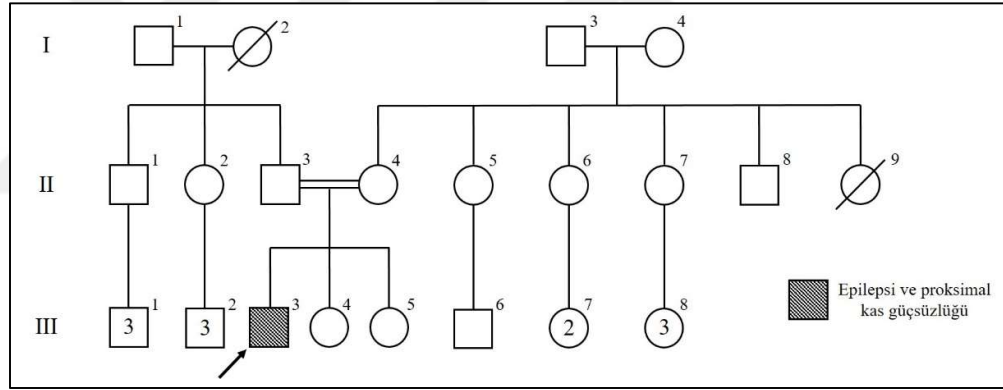
sonrası yapılan uyku elektroensefalogram (EEG) değerlendirmesi normaldi. Hastanın iğne EMG ve sinir ileti çalışmaları motor tutulumun belirgin olduğu aksonal nöropati ile uyumlu olarak değerlendirildi. Hastaya yapılan kas biyopsisi, artefaklı örnek olarak değerlendirilerek kas dokusundaki patolojiye dair bilgi elde edilememiştir. MLPA yöntemi ile yapılan *SMN1* ekzon 7-8 kopya sayısı değerlendirmesinde değişiklik saptanmadı. Gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik, epilepsi ve alt ekstremitelerde kas güçsüzlüğü bulunan hastanın elektrofizyolojik ve laboratuvar incelemelerinde nörojenik bulguların belirlenmesi üzerine, hastada SMA/alt motor nöron tutulumunun eşlik ettiği bir hastalık tablosu düşünülerek ileri moleküler analizler yapıldı.

3.1.2. Hasta 2

On yedi yaş 8 aylık erkek hastanın iki yıldır tutunarak merdiven çıkma ve çabuk yorulma şikâyetleri mevcutmuş. Antenatal takipleri normal olan hastanın maternal anatomik uygunsuzluk nedeniyle sezaryen/seksiyo ile miyadında doğumu gerçekleşmiş. Postnatal dönemde unilateral kriptorşidizm nedeniyle orşiopeksi operasyonu geçirmiş. On yaşında iken iki kez uykuda afebril nöbet geçiren hastanın iki buçuk yıl sodyum valproat tedavisi ile başka nöbeti olmamış ve sonrasında tedavisi sonlandırılmış. Hastanın benign seyirli nöbet öyküsünden sonra, yakın zamanda kas güçsüzlüğü şikâyetlerini takiben yeniden afebril nöbetleri başlamış. Yapılan Pediyatrik Nöroloji değerlendirmelerinde bu nöbetlerin aksiyel miyotonik karakterde olduğu belirlenmiştir. Altı aylıkken desteksiz oturabilen hasta, iki yaşında desteksiz yürümeye ve cümle kurmaya başlamış. Sfinkter kontrolünü 2

yaşında iken sağlamış. Okul başarısı ortalama imiş. Puberte bulguları zamanında başlamış.

Aralarında altıncı derece akrabalık bulunan 38 yaşında Hashimoto tiroiditi olan anne ve 42 yaşında sağlıklı babanın hasta dışında ambliyopi problemi bulunan on yaşında bir kız çocuğu ve sağlıklı yedi yaşında bir kız çocuğu mevcut. Hastanın soygeçmişinde benzer problemi olan birey bulunmamaktaydı. Hasta 2'ye ait pedigr Şekil 3'te bulunmaktadır.



Şekil 3. Hasta 2'ye ait pedigr.

Hastanın 17 yaş 8 aylıkken yapılan fizik muayenesinde; vücut ağırlığı 60 kg (-1,3 SD), boyu 169 cm (-1,09 SD) ve baş çevresi 57,5 cm (-0,09 SD) olarak ölçüldü. Dismorfik değerlendirmede; frontalde yukarı yönlü saçlar ve diastema mevcuttu. Nörolojik muayenede; alt ekstremitte proksimalinde azalmış kas gücü, normal kas tonusu, canlı derin tendon refleksleri, dizatri, trunkal ataksi, Gowers arazi, ellerde intansiyonel tremor, topuk üzerinde yürüme zayıf ve tandem yürüme sarsak olarak saptandı. Patolojik refleks alınmazken, 5-6 atımlık klonus alınıyordu.

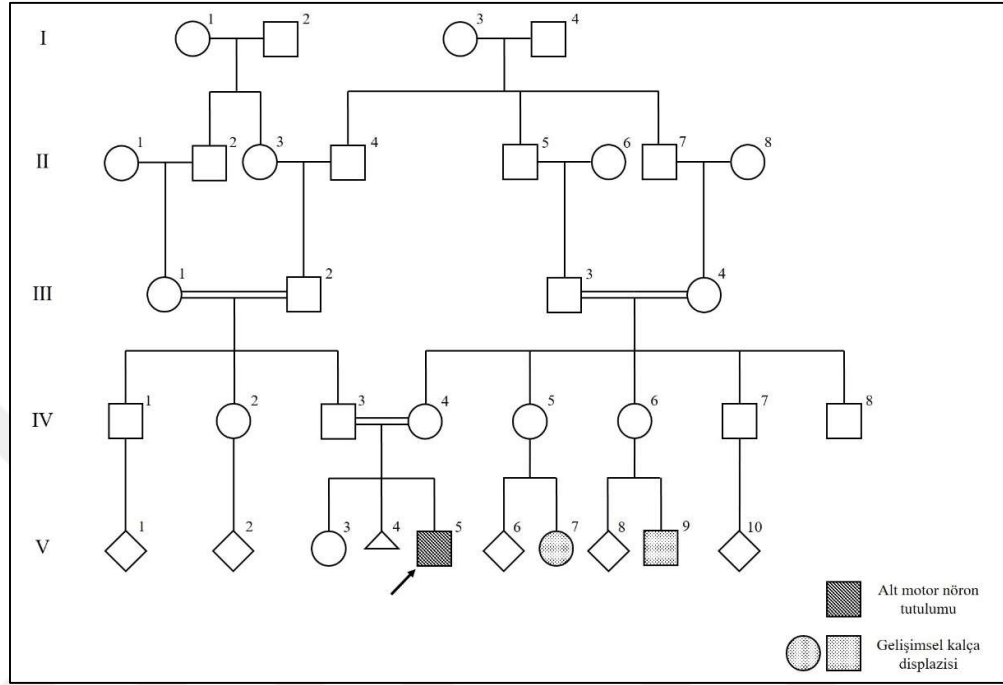
Laboratuvar değerlendirmelerinde periferik kanda CK seviyesi 5-6 kat artmıştı. Beyin MRI’da solda lateral ventrikül gövde düzleminde subkortikal beyaz cevherde birkaç adet milimetrik boyutlu nonspesifik nodüler sinyal değişiklikleri raporlandı. Beyin difüzyon MRI’ı normal olan hastanın, lomber MRI’ında hafif spondiloz raporlandı. 18 yaşında uyanık ve uykuda iken çekilen EEG’de serebral disfonksiyon ve paroksizmal bozukluk varlığına işaret eden bulgular raporlandı. İğne EMG ve sinir ileti çalışmalarında, motor nöron veya aksonların yaygın kronik nörojenik tutulumunu destekleyen bulgular saptandı. Hasta 2’ye MLPA yöntemi ile yapılan *SMN1* ve *SMN2* ekzon 7-8 kopya sayısı değerlendirmesinde 2 kopya *SMN1* ve 1 kopya *SMN2* varlığı saptandı. Epilepsi ve proksimal kas güçsüzlüğü bulunan hastanın elektrofizyolojik ve laboratuvar incelemelerinde nörojenik bulguların belirlenmesi üzerine, epilepsinin eşlik ettiği SMA/alt motor nöron tutulumu tablosu dşnlerek hastaya ileri moleküler analizler yapıldı.

3.1.3. Hasta 3

İki yaş 2 aylık erkek hastada, yürümede dengesizlik olması ve kas gücü zayıflığı nedeniyle Pediyatrik Nöroloji bölümüne başvurulmuş. Antenatal takipleri normal olan hastanın, doğum sırasında ve doğum sonrası erken dönemde herhangi bir sağlık problemi olmamış ve yenidoğan taramaları normalmiş. Yedi-sekiz aylıkken gelişimsel kalça displazisi nedeniyle 4 ay ortezi kullanılmış. Bir yaşına kadar motor gelişim basamakları zamanında gerçekleşirken, on beş aylıkken desteksiz yürümeye başlamış fakat iki-üç adım sonra dşyrmuş. Denge kuramama sorunu akşamları daha belirgin olduğu için çabuk yorulduğunu

düşünülmüştü. Üç aydır motor sistem şikayetleri için fizyoterapi yapılmıştı. İlk kelimelerini 20 aylıkken söyleyebilen hasta, halen 4 kelime konuşabiliyormuş ve cümle kuramıyormuş. Sfinkter kontrolünü sağlayamamış. Hastanın 2 yaş 3 aylıkken ve 2 yaş 5 aylıkken yapılan işitsel beyinsapı cevabı (ABR/BERA) testlerinde bilateral ileri derecede sensörinöral işitme kaybı saptanması üzerine hastaya işitme cihazı kullanılmaya başlanmış.

Aralarında 5. derece akrabalık bulunan talasemi taşıyıcısı 30 yaşında anne ve 31 yaşında sağlıklı babanın hasta dışında altı yaşında sağlıklı bir kız çocukları mevcut ve ilk trimesterde bir spontan abortus öyküleri bulunmaktaydı. Soygeçmişte, nörolojik problemi olan birey bulunmadığı öğrenilen hasta 3'ün pedigrisi Şekil 4'te bulunmaktadır. Hastanın üçüncü derece akrabaları arasında gelişimsel kalça displazisi olan iki birey (V-7 ve V-9) bulunduğu öğrenilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Hasta 3'e ait pedigrisi.

Hastanın 2 yaş 2 aylıkken yapılan fizik muayenesinde; vücut ağırlığı 12 kg (-0,77 SD), boyu 88 cm (-0,53 SD) ve baş çevresi 47 cm (-1,66 SD) olarak ölçüldü. Dismorfik değerlendirmede dikkati çeken bir bulgu saptanmadı. Nörolojik muayene sırasında desteksiz ayağa kalkamadığı yardım ile çaprazlayarak kısa mesafe yürüyebildiği, dört ekstremitelerini aktif kullanabildiği ve ince motor becerilerinin geliştiği gözlenen hastanın, kalça adduktörlerinde ve dirsek fleksörlerinde spastisite olduğu tespit edildi. Patolojik refleks veya klonus alınmadı.

Laboratuvar değerlendirmelerinde; farklı zamanlarda yapılan CK seviyesi değerlendirmeleri normal veya sınırda yüksek iken metabolik taramalar normaldi. Beyin MRI'ında, serebellar atrofi raporlandı. Hastanın sinir ileti çalışması normal sonuçlanırken, iğne EMG ile değerlendirmesinde motor nöron veya aksonlarda

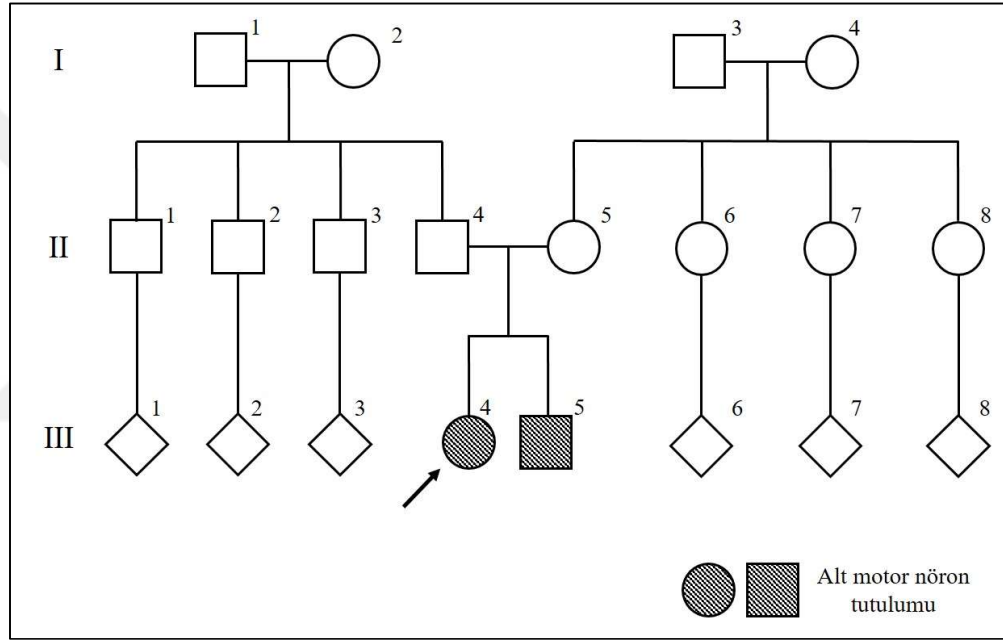
tutulumu destekleyen bulgular saptandı. MLPA yöntemi ile yapılan *SMN1* ekzon 7-8 kopya sayısı değerlendirmesinde değişiklik saptanmadı. Gelişme geriliği ve yaygın kas güçsüzlüğü bulunan hastanın elektrofizyolojik ve laboratuvar incelemelerinde nörojenik bulguların belirlenmesi üzerine, hastada SMA/alt motor nöron tutulumunun eşlik ettiği bir hastalık tablosunun varlığı düşünülerek ileri moleküler analizler yapıldı.

3.1.4. Hasta 4 ve 5

On dört yaşında kız (Hasta 4) ve 8 yaşında erkek (Hasta 5) kardeşlerden, Hasta 4'ün yedi yaşında iken desteksiz merdiven çıkamama, oturduğu yerden desteksiz kalkamama ve sık düşme gibi şikayetleri nedeniyle Pediyatrik Nöroloji bölümüne başvurulmuş. İki yaşından beri proksimal kas grubunun daha çok etkilendiğini gösteren şikayetleri olan hastanın antenatal takipleri normalmiş, ve doğum sırasında ve doğum sonrası erken dönemde herhangi bir sağlık problemi olmamış. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış ve okul başarısı iyiymiş.

Erken bebeklik döneminden beri Pediyatrik Nöroloji bölümünce takip edilen hasta 5'in de iki yaşından beri hasta 4'e benzer proksimal kas grubunun etkilendiğine işaret eden bulguları mevcutmuş. Ek olarak hasta 5'te yutma bozukluğu ve tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonları bulunmaktaymış. Antenatal, perinatal ve postnatal dönemde herhangi bir sorunu olmayan hastanın gelişim basamakları zamanında tamamlanmış ve okul başarısı iyiymiş. Hasta 4 ve 5, bulgularının başlangıç yaşı ve proksimal kas grubunun tutulumu nedeniyle SMA tip 3 ön tanısı ile medikal izleme alınmış.

Aralarında akrabalık bulunmayan 34 yaşındaki sağlıklı anne ve 38 yaşındaki sağlıklı babanın hasta 4 ve 5 dışında çocukları bulunmamaktaydı. Soygeçmişte, nörolojik problemi olan aile üyesi bulunmadığı öğrenildi. Hasta 4 ve 5'e ait pedigri Şekil 5'te bulunmaktadır.



Şekil 5. Hasta 4 (proband) ve hasta 5'e (III-5) ait pedigri.

Hasta 4 ve 5'in sırasıyla, 14 ve 8 yaşlarında iken yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normal saptandı. Dismorfik değerlendirmede dikkati çeken bir bulgu saptanmayan her iki hastanın nörolojik muayenelerinde miyopatik yüz görünümü, Gower's arazi ve yürürken düştükleri gözlemlendi. El ve sırtlarında eşya taşıyamadıkları gözlemlenen hastaların kas gücü değerlendirmelerinde proksimalde kas gücü kaybı, hipotonisite ve derin tendon reflekslerinin hipoaktif olduğu saptandı ve patolojik refleks alınmadı.

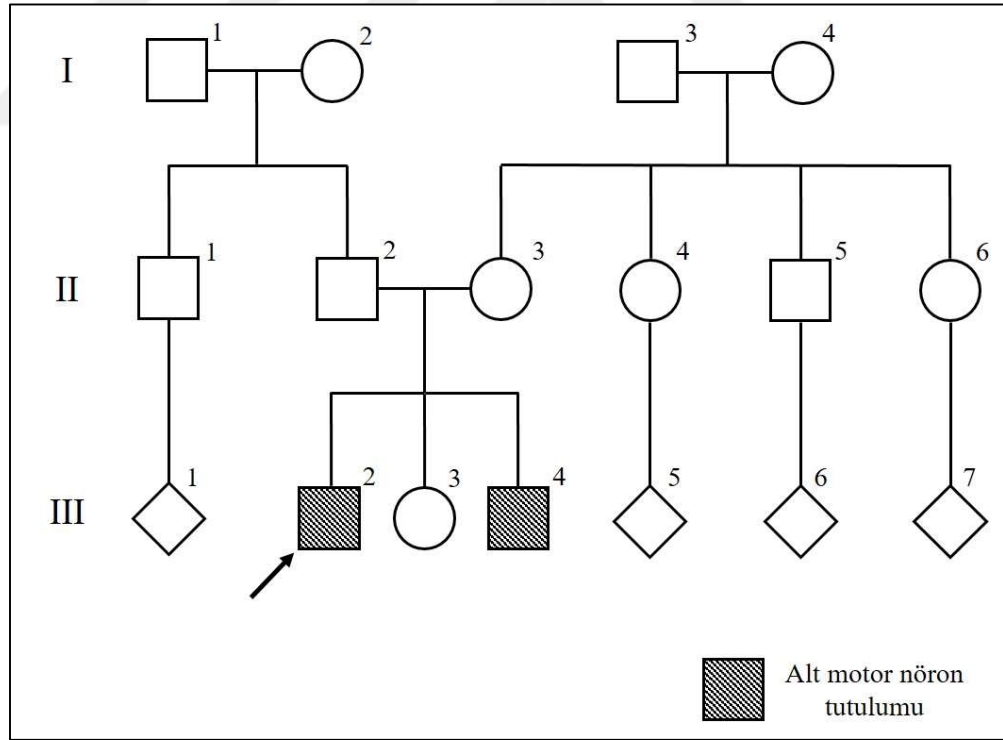
Hasta 4'ün sinir ileti ve iğne EMG çalışmalarında miyopatiyi destekleyebilecek, fakat SMA açısından kesin ayrımın yapılamadığı bulgular saptandı. Hasta 5'e yutma güçlüğü ve aspirasyon şikayetleri sebebi ile yapılan modifiye baryum/fiberoptik endoskopik yutma değerlendirmesinde sıvı ve katı gıdalarda aspirasyon, öksürme yokluğu ve yutma refleksinde gecikme saptandı. Hasta 5'in kas biyopsisi, denervasyona ikincil bulgular gösteren kas biyopsisi bulguları göstermekteydi. Hasta 4 ve 5'e MLPA yöntemi ile yapılan *SMN1* ve *SMN2* ekzon 7-8 kopya sayısı değerlendirmesinde *SMN1* ve *SMN2* ürünlerinin ikişer kopya olduğu saptandı. Proksimal kas güçsüzlüğü bulunan hastaların kas biyopsisinde nörojenik tutulum belirlenmesi üzerine, hastalarda SMA/alt motor nöron hastalığı düşünülerek ileri moleküler analizler yapıldı.

3.1.5. Hasta 6 ve 7

On bir yaş 9 aylık (Hasta 6) ve 6 yaş 8 aylık (Hasta 7) erkek kardeşlerden, hasta 6'nın desteksiz merdiven çıkamama, oturduğu yerden desteksiz kalkamama, çabuk yorulma ve ani düşmeleri nedeniyle beş yaşında iken Pediyatrik Nöroloji bölümüne başvurulmuş. Antenatal takipleri normal olan ve doğum sırasında ve sonrası erken dönemde herhangi bir sağlık problemi olmadığı belirtilen hasta 6'nın proksimal kas grubunu daha çok ilgilendirdiği belirlenen şikayetleri iki buçuk yaşından beri mevcutmuş. Gelişim basamakları zamanında tamamlanan hastanın okul başarısı düşükmüş. Unilateral inguinal herni operasyonu geçirmiş.

Hasta 7'nin de iki-üç yaşlarından beri hasta 6 ile benzer olarak proksimal kas grubunun etkilendiğine işaret eden bulguları mevcutmuş. Antenatal, perinatal ve postnatal dönemi normal olan hastanın gelişim basamakları zamanında tamamlanmış ve okul başarısı iyiymiş. Ek sağlık problemi bulunmuyormuş.

Aralarında akrabalık bulunmayan 30 yaşında sağlıklı anne ile 34 yaşında ve nefrolitiyazis öyküsü bulunan babanın hasta 6 ve 7 dışında 10 yaşında astımı olan bir kız çocukları bulunmaktaydı. Soygeçmişte, nörolojik problemi olan aile üyesi bulunmadığı öğrenildi. Hasta 6 ve 7'ye ait pedigri Şekil 6'da bulunmaktadır.



Şekil 6. Hasta 6 (proband) ve hasta 7'ye (III-4) ait pedigri.

Hasta 6 ve 7'nin sırasıyla 11 yaş 9 aylık ve 6 yaş 8 aylık iken yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normal saptandı. Hasta 6'nın dismorfik

değerlendirmesinde; yuvarlak yüz, aşağı yönlü ağız komisürleri, fuziform parmaklar, sağ el 5. parmakta klinodaktili, sıg ayak arkları ile kısa 4.-5. metatarslar saptandı. Hasta 7'nin dismorfik değerlendirmesinde ise yuvarlak yüz, epikantal katlantılar, prominent kulaklar, hafif pektus ekskavatum, sağ elde tek transvers çizgi, 4.-5. metatarsal kısalık ve sağ lomber bölgede mavi pigmentli yama saptandı. Nörolojik muayenelerinde hasta 7'de normale yakın nörolojik muayene bulguları belirlenirken, hasta 6'da aşıl tendonunda ve el parmaklarında kontraktür, ekstremitte proksimallerinde ve distallerinde kas gücü kaybı, normale yakın tonus ve derin tendon reflekslerinin hipoaktif olduğu saptandı. Patolojik refleks alınmadı.

Laboratuvar değerlendirmelerinde; kalsiyum, fosfor ve parathormon seviyeleri normal iken, CK seviyeleri normalin 2-3 katı artmıştı. Hasta 6'nın sinir ileti çalışması ve iğne EMG'de, motor nöron veya aksonlarda nörojenik tutulumu destekleyen bulgular saptandı. Hasta 7'ye MLPA yöntemi ile yapılan *SMN1* ekzon 7-8 kopya sayısı değerlendirmesinde değişiklik saptanmadı. Proksimal kas güçsüzlüğü bulunan hastaların elektrofizyolojik ve laboratuvar incelemelerinde nörojenik bulguların belirlenmesi üzerine, hastalarda SMA/alt motor nöron hastalığı düşünülerek ileri moleküler analizler yapıldı.

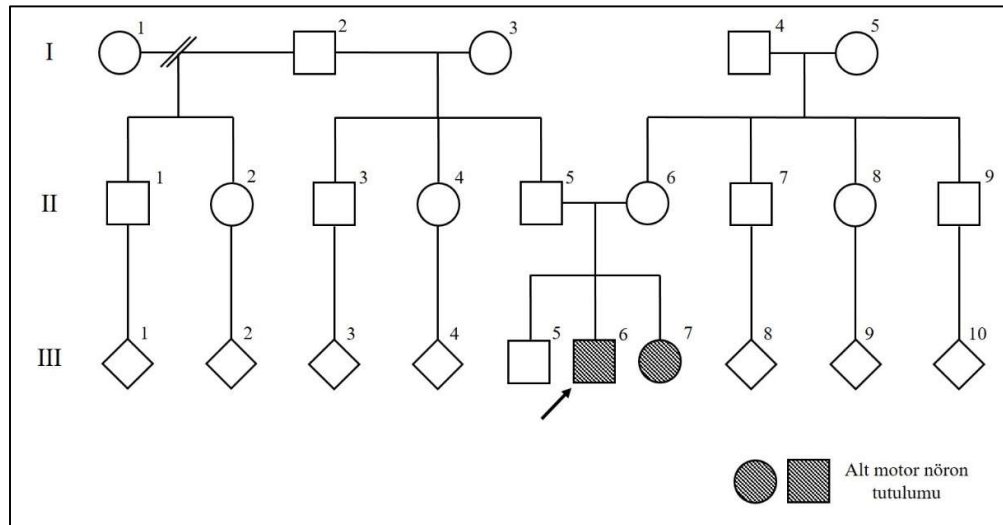
3.1.6. Hasta 8 ve 9

Üç yaş 9 aylık erkek (Hasta 8) ve 2 yaş 4 aylık kız (Hasta 9) kardeşlerden, hasta 8'in desteksiz merdiven çıkamama ve çabuk yorulma şikayetleri nedeniyle üç yaş 7 aylıkken Pediyatrik Nöroloji bölümüne başvurulmuş. Proksimal kas grubunun

daha çok etkilendiğini gösteren bulguları 3 yaşından beri mevcut olan hasta 8'in antenatal takipleri normalmiş, doğum sırasında ve sonrası erken dönemde herhangi bir sağlık problemi olmamış. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış ve ek sağlık problemi bulunmuyormuş.

Hasta 8'de nöromotor hastalık kliniği olması nedeniyle takibe alınan hasta 9'da da iki yaşından itibaren proksimal kas grubunun etkilendiğine işaret eden bulguları ortaya çıkmış. Antenatal, perinatal ve postnatal dönemde normal gelişim basamakları gösteren hasta 9'un da ek sağlık problemi bulunmuyormuş.

Aralarında akrabalık bulunmayan 32 yaşındaki sağlıklı anne ve 34 yaşındaki sağlıklı babanın hasta 8 ve 9 dışında, 9 yaşında bilateral pes ekinovarusu olan bir erkek çocuğu daha bulunmaktaydı. Soygeçmişte, nörolojik problemi olan aile üyesi bulunmadığı öğrenildi. Hasta 8 ve 9'a ait pedigree Şekil 7'de bulunmaktadır.



Şekil 7. Hasta 8 (proband) ve hasta 9'a (III-7) ait pedigree.

Hasta 8 ve 9'un sırasıyla 3 yaş 9 aylık ve 2 yaş 4 aylıkken yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normal saptandı. Dismorfik değerlendirmelerinde her iki hastada da dikkati çeken bir bulgu saptanmadı. Hasta 8'in nörolojik muayenesinde Gower's arazı, alt ekstremitte proksimalinde kas gücü kaybı, normal kas tonusu ve derin tendon reflekslerinin oldukça hipoaktif olduğu saptandı. Patolojik refleks veya klonus alınmadı.

Laboratuvar değerlendirmelerinde; her iki hastanın da CK seviyeleri normal fakat üst sınıra yakın olarak bulundu. Hasta 8'in beyin MRI görüntülemesi normal olarak değerlendirildi. Hasta 8'in sinir ileti çalışması ve iğne EMG bulguları motor nöron veya aksonlarda kronik nörojenik tutulumla uyumlu olarak saptandı. Hasta 8'e MLPA yöntemi ile yapılan *SMN1* ekzon 7-8 kopya sayısı değerlendirmesinde değişiklik saptanmadı. Proksimal kas güçsüzlüğü bulunan hastaların elektrofizyolojik ve laboratuvar incelemelerinde nörojenik bulguların belirlenmesi üzerine, hastalarda SMA/alt motor nöron hastalığı düşünülerek ileri moleküler analizler yapıldı.

3.2. Tüm ekzom dizileme (WES)

WES tekniği, genomik DNA izolasyonu sonrasında kütüphane hazırlanması ve dizi analizinden oluşan ıslak laboratuvar çalışmalarını (wet-lab) takiben ileri biyoinformatik analizler ve WES analizinden oluşmaktadır.

3.2.1. Islak laboratuvar aşaması

3.2.1.1. Genomik DNA izolasyonu

Spin kolon yöntemi:

1. 1,5 ml'lik mikrofüj tüpüne 500 µl buffer AP1 konulmuştur.
2. Buffer üzerine yaklaşık 250 µl EDTA'lı kan örneği eklenmiştir. Mikrofüj tüpünün kapağı kapatıldıktan sonra maksimum hızda vortekslenmiştir.
3. Karışımın üzerine 100 µl buffer AP2 ilave edildikten sonra 10 saniye daha vortekslenmiştir. Karışım spin kolonlara (Axygen Scientific, ABD) aktarılmıştır.
4. 12000 rpm'de 10 dakika ortam sıcaklığında santrifüj edilerek hücresel atıkların ökilmesi sağlanmıştır.
5. 2 µl mikrofüj tüpü içerisine miniprep kolon yerleştirilmiştir. Bir önceki adımdaki işlemden sonra belirginleşen süpernatant miniprep kolonlara aktarılmıştır. 12000 rpm'de bir dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
6. 2 µl mikrofüj tüpünün altındaki süzölmüş sıvı boşaltıldıktan sonra miniprep kolon 2 µl mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. Önceden etanol eklenmiş 700 µl W1A miniprep kolonların üzerine eklenerek 2

dakika kadar oda ısısında bekletilmiştir. Sonrasında yine 12000 rpm’de 1 dakika kadar santrifüj uygulanmıştır.

7. Mikrofüj tüpünün altından süzülen sıvı boşaltılmış ve miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. 800 µl buffer W2 miniprep kolonun üzerine eklenerek 12000 rpm’de tekrar santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.
8. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltıldıktan sonra miniprep kolon 2 µl mikrofüj tüpüne yerleştirilmiştir. 500 µl buffer W2 miniprep kolonun üzerine eklenerek 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece buffer W2 ile iki kez yıkanıp tuzların arındırılması sağlanarak enzimatik reaksiyonlar sırasında bu nedenle oluşabilecek problemler elimine edilmiştir.
9. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltılmıştır. Miniprep kolon 2 ml santrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra 12000 rpm’de santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.
10. Miniprep kolon 1,5 ml’lik mikrofüj tüpüne yerleştirilmiştir. Önceden 65°C dereceye ısıtılmış 80-200 µl buffer TE eklenmiştir. Bir dakika oda ısısında bekletildikten sonra 12000 rpm’de bir dakika süre ile santrifüj edilerek genomik DNA elde edilmiştir.

Tuzda çöktürme yöntemi ile DNA eldesi:

1. EDTA’lı tüpe alınan 5 ml kan örneği üzerine 10 ml soğuk steril bidistile su eklenerek çalkalandıktan sonra 2200 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

2. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra pelletin üzerine 1500 µl lysis buffer (10 mM TrisCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA Ph: 8,2), 35 µl proteinaz K, 1000 µl SDS (%10) eklenerek bir gece 37 °C derecede bekletilmiştir.
3. Ertesi gün 1000 µl 10 mM amonyum asetat karışımına eklenerek vortekslenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Başka bir tüpe aktarılan süpernatantın üzerine iki katı hacimde soğuk absolü etanol eklenmiştir.
5. Belirginleşen DNA 250 µl TE (10 Nm Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA Ph: 7,5) içeren ependorfa alınmış, bir gün oda sıcaklığında çözündükten sonra -20 °C derecede saklanmıştır.

3.2.1.2. Genomik DNA’da kalite-miktar tayinleri

Dizi analizine başlamak için genomik DNA’nın kalite parametreleri değerlendirilmiştir. Bu aşamada DNA örnekleri seyreltilmiş/seyreltilmemiş sıvı (düşük iyon konsantrasyonlu sıvı tampon) solüsyonlar içinde ultraviyole ışığı altında sahip oldukları absorpsiyon (A) optik yoğunluk üzerinden ölçülmüştür. Nükleik asit konsantrasyonu boş bir örnek (kör) ile kıyaslanarak 260 nm’de A ölçülerek belirlenmiştir. Nükleik asitlerin saflığını hesaplamak için A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları kullanılmıştır.

3.2.1.3. Kütüphane hazırlanması

Genomik DNA örneği sonikasyon tekniği (ses dalgalarının enerjisinden yararlanarak biyolojik maddenin parçalanması) veya enzimatik yöntemler kullanılarak rastgele fragmanlara ayrılmıştır. Boyutları 250-450 baz çifti arasında olan fragmanlar seçilerek her zincirin 3' ucuna "A" bazı eklenmiştir. Elde edilen DNA fragmanlarının her iki ucuna adaptör ve barkodlar bağlanarak ligasyon aracılı PCR (Ligation-mediated polymerase chain reaction, LM-PCR) ile amplifiye edilmiş, ardından bağlanmayanların uzaklaştırılması için saflaştırma yapılmıştır. Hasta 3 dışındaki tüm hastalarda MGIEasy Exome Capture V4 Probe Set (MGI Tech Co. Ltd., Çin Halk Cumhuriyeti) capture kiti ile, hasta 3'te ise Twist Comprehensive Exome Panel (Twist Bioscience, Amerika Birleşik Devletleri) kiti ile hibridizasyon yapılarak zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Sonrasında hibridize olmayan fragmanlar yıkanarak temizlenmiştir. Yakalanan ürünler sirkularizasyon denilen bir aşama ile yuvarlak bir zincir haline getirilerek aynı zincir üzerinde DNA nanotopları (nanoball, DNB) oluşturmak üzere amplifiye edilmiştir.

3.2.1.4. Sekans Aşaması

Her bir DNB, MGISEQ-2000 (MGI Tech Co. Ltd., Çin Halk Cumhuriyeti) dizileme platformundaki "flow cell" üzerinde bulunan spotlara yerleştirilerek sekanslama işlemi "flow cell" üzerinde gerçekleştirilmiştir. Birbirinden farklı boyalarla işaretli modifiye deoksिनükleotidler (dNTP) içeren reaksiyon solüsyonu "flow cell" içerisine yüklenmiştir. MGISEQ-2000 cihazı ile "combinatorial probe-

anchor synthesis (cPAS)” teknolojisi kullanarak her bir nanotop üzerindeki bazların okuması sağlanmıştır.

3.2.2. Biyoinformatik Analizler

Ekzom dizileme sonucunda elde edilen ham veride varyasyonların listelenmesi için bir dizi dosya çevirimi ve biyoinformatik analizin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, standart ya da ileri düzey biyoinformatik veri analizleri kullanılarak cihazdan elde edilen veriden, WES analizinin yapılabildiği “Variant Calling Format (VCF)” dosyasının oluşumuna kadar aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. MGISEQ-2000 cihazından “clean data” niteliğindeki Fastq dosyaları elde edilmiştir.
2. “Clean data”, “Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.15” (123) kullanılarak referans genom “Human Genome 19 (hg19)” (124) ile karşılaştırılmıştır (alignment).
3. Referans genom verisine göre karşılaştırmalı dizi analiz sonuçlarını barındıran “Sequence Alignment Map (SAM)” dosyası “PICARD TOOLS” (125) yöntemiyle koordinatlarına göre sıralanmış duplike okumalar işaretlenmiştir.
4. Analiz edilen genomik DNA’daki olası insersiyon/delesyonlar (indel), “Genome Analysis Toolkit (GATK)” (126) ile lokalize edilerek “Binary Alignment Map (BAM)” dosyası oluşturulmuştur.

5. Kütüphane hazırlığında kullanılan capture kiti ile uyumlu olan hedef “Browser Extensible Data (BED)” dosyası kullanılarak “Haplotype Caller of GATK v3.7” (126) ile tek nükleotid değişiklikleri (single nucleotide polymorphism, SNP) ve indel VCF dosyaları oluşturulmuştur.

6. Elde edilen genomik veride var olan SNP ve indel’ler birleştirilerek WES analizinin yapılabileceği tek bir VCF dosyası haline getirilmiştir.

3.2.3. Tüm ekzom dizileme analizi

3.2.3.1. Anotasyon ve filtreleme

Veriler VCF dosyası olarak alınmış ve bu verilerin anotasyon ve filtreleme basamakları için “Variant Annotation and Filter Tool (VarAft) v2.17.1” (127) programı kullanılmıştır. Elde edilen anote edilmiş veride varyantlara yönelik aşağıdaki filtreler uygulanmıştır:

1. RefSeq veri tabanında (128) var olan transkriptler temel alınarak ekzonlarda ve kırılma bölgelerinde (ekzon-intron sınırı, +10, -10 bp) yerleşen varyantlar

2. GnomAD veri tabanında (129) var olan sağlıklı toplum verilerine göre allel frekansı heterozigotlarda $<0,5$; homozigotlarda <1 olan varyantlar

3. Kendi hasta popülasyonumuzdaki sıklığı <3 olan varyantlar

4. “ClinVar”, “Leiden Open Variant Database (LOVD)” ve “Human Gene Mutation Database (HGMD) Public version” varyant veri tabanlarında (130-132)

benign ve olası benign olarak bildirilmemiş (sınıflaması kanıta dayalı yapılmış olanlar) varyantlar

5. OMIM ve “Human Phenotype Ontology (HPO)” veri tabanlarındaki (37, 133) morbid genlerde saptanan varyantlar

6. Birden fazla hasta bireyin bulunduğu ailelerin (Hasta 4 ve 5, Hasta 6 ve 7, Hasta 8 ve 9) analizlerinde ortak heterozigot ve ortak homozigot varyantlar analize dahil edilmiştir.

3.2.3.2. Varyant yorumlama ve sınıflandırma

Filtrelerden geride kalan varyantlar “Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)” ve “Moleküler Patoloji Derneği (Association for Molecular Pathology, AMP)”nin 2015 yılında yayınladığı NGS varyantlarını sınıflandırma kılavuzuna (112) ve “Klinik Genomik Bilim Derneği (Association for Clinical Genomic Science, ACGS)”nin 2019 yılında yayınladığı varyant yorumlama kılavuzlarına (134) göre sınıflandırılmıştır.

Varyant yorumlama için kullanılacak verilerin veri tabanlarından çekilmesi için “VarSome” ve “Franklin Genoox” varyant yorumlama araçları (135, 136) kullanılmıştır. Yanlış anlamlı varyantların patojenite tahmini için, “VarSome” ve “Franklin Genoox” varyant yorumlama araçlarının (135, 136) çeşitli *in silico* araçlardan elde edilen skorlarla ürettiği toplu tahmin skorları kullanılmıştır. Yanlış anlamlı varyantların protein özellikleri üzerindeki etkilerini ve oluşabilecek patojenik etkilerin moleküler mekanizmalarını değerlendirmek için “MutPred2”

tahmin aracı (137) kullanılmıştır. Varyantların mRNA kırılma işlemi üzerine etkilerini değerlendirmek için “Human Splicing Finder v3.0” (138) ve “Netgene2” (139) tahmin araçları kullanılmıştır. Genlerin alternatif transkriptlerine “RefSeq” “Ensembl” veri tabanlarından (128, 140), alternatif protein izoformlarına “UniProt” veri tabanından (141) ulaşılmıştır. Proteinlerin domain bilgilerine “UniProt” ve “Human Protein Reference Database (HPRD)” veri tabanlarından (141, 142) ulaşılmıştır. Protein dizilerinin türler arasında korunmuşluk düzeyinin belirlenmesi için “UnProt/Align” aracı (143) kullanılmıştır. Doku spesifik gen ekspresyon bilgileri “Genotype-Tissue Expression (GTEx)” veri tabanından (144) sağlanmıştır. Varyantların okuma değerlendirmeleri BAM dosyasından “Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.8.0” yazılımı (145) ile yapılmıştır. Varyantlar “Human Genome Variation Society” tarafından hazırlanan sekans varyantlarını tanımlama kılavuzuna (146) göre yazılmıştır. Saptanan varyantların doğrulanması ve aile çalışmaları için Sanger dizi analizi tekniği kullanılmıştır. Sanger dizi analizinde kullanılan primerlerin tasarımı “Primer-BLAST” aracı (147) kullanılarak yapılmıştır. Analizler ve aile segregasyon çalışmaları sonunda yapılan yorumlamalar ile patojen, olası patojen ve klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılan varyantlar hastaların mevcut klinik durumu ve aile hikayesine göre değerlendirilmiş ve genotip-fenotip korelasyonu belirlenmiştir.

3.3. Protein-protein etkileşim analizleri

Bilinen ve tahmini protein-protein etkileşimlerini değerlendirebilmek için “Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues (GIANT) v2” (148) ve “STRING v11.0” (149) araçları kullanılmıştır. Hastalarda WES analizinde potansiyel olarak etiyojiden sorumlu olabilecek varyantların belirlendiği gen listesine *SMN1* geni de eklenerek etkileşim analizi yapılmıştır. GIANT aracındaki değerlendirme spinal kord dokusunda yapılmıştır. STRING aracında yapılan analizlerde “GeneOntology (GO)” veri tabanındaki (150) “Biologic Process” terimlerinden anlamlı olarak zenginleştirilenler belirlenmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Demografik ve klinik özellikler

Çalışmaya dahil edilen 9 hastanın medyan hastalık başlangıç yaşı 2 (2-15 yaş), değerlendirme sırasındaki medyan yaş 8 (2 yaş 2 ay-17 yaş 8 ay) ve medyan hastalıklı süre 4 yıl 8 ay (2 ay-12 yıl) olarak belirlenmiştir. Hastaların yedisi kas güçsüzlüğü bulgularıyla geri kalan ikisi psikomotor gelişme geriliğiyle prezente olmuştur. Yedi hastada proksimal, bir hastada yaygın ve bir hastada distal kas güçsüzlüğü görülmüştür. İki hastada eklem laksitesisi ve bir hastada eklem kontraktürü belirlenmiştir. Yalnızca bir hastada aspirasyon ilişkili solunum şikayetleri ve disfaji mevcuttur. Hastaların ikisinde nöbetler, birinde sensörinöral işitme kaybı ve serebellar atrofi ve kardeş olan iki hastada 4.-5. metatars kısalığı belirlenmiştir. Etkilenmiş kardeşlerden sadece birinde elektrodyagnostik işlemler

uygulanmıştır. Böylece toplamda altı hastaya yapılan elektrodyagnostik uygulamalar sonucunda beş hastada nörojenik bulgular saptanırken bir hastada bu tanısal işlem ile SMA-miyopati ayrımı için yeterli bilgi sağlanamamıştır. İki hastaya yapılan kas biyopsi değerlendirmesi sonucunda bir hastada nörojenik tutulum belirlenirken, diğer hastada yetersiz kas biyopsi materyali nedeniyle inceleme informatif olmamıştır. Hastalarda serum CK seviyeleri normalden 5-6 kat yüksek seviyelere kadar değiştiği izlenmiştir. Çalışmamız dahil edilen hastaların demografik bulguları ve klinik özellikleri Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6. Hastaların demografik bulguları ve klinik özellikleri

Hasta	Yaş, cinsiyet,	Akrabalık	Etkilenmiş aile bireyi	Başlangıç	İlk şikayet	Kas güçsüzlüğü	Kas-iskelet özellikleri	Psikomotor gelişim	Solunum	EMG	Sinir ileti çalışması	Kas biyopsisi	CK	Ek problem
Hasta 1	12 yaş 9 ay, K	4. derece	Yok	2.5 yaş	Gelişme geriliği	Alt ekstremite	Pes planovalgus	Gecikmiş	-	Nörojenik	Aksonal motor	Artefaktlı	Hafif yüksek	Nöbet
Hasta 2	17 yaş 8 ay, E	6. derece	Yok	15 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	Spondiloz	Normal	-	Nörojenik	Aksonal motor	Yok	5-6 kat yüksek	Nöbet
Hasta 3	2 yaş 2 ay, E	5. derece	Yok	2 yaş	Gelişme geriliği	Yaygın	-	Gecikmiş	-	Nörojenik	Aksonal motor	Yok	Normal	Sensörinöral işitme kaybı, serebellar atrofi
Hasta 4	14 yaş, K	Yok	Hasta 5 (kardeş)	2 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	Dirsek ve el bileği laksisite	Normal	-	Miyopati-SMA ayrımının yapılamadığı bulgular	Yok	Yok	Yok	Miyopi
Hasta 5	8 yaş, E	Yok	Hasta 4 (kardeş)	2 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	Dirsek ve el bileği laksisite	Normal	Tekrarlayan ASYE	Yok	Yok	Nörojenik	Yok	Disfaji
Hasta 6	11 yaş 9 ay, E	Yok	Hasta 7 (kardeş)	2 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	Ayak bileğinde ve el parmaklarında fleksiyon kontraktürü	Normal	-	Nörojenik	Aksonal motor	Yok	2-3 kat yüksek	4.-5. metatars kısalığı
Hasta 7	6 yaş 8 ay, E	Yok	Hasta 6 (kardeş)	2 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	Pektus deformitesi	Normal	-	Yok	Yok	Yok	2-3 kat yüksek	4.-5. metatars kısalığı
Hasta 8	3 yaş 9 ay, E	Yok	Hasta 9 (kardeş)	3 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	-	Normal	-	Nörojenik	Aksonal motor	Yok	Sınırdan yüksek	-
Hasta 9	2 yaş 4 ay, K	Yok	Hasta 8 (kardeş)	2 yaş	Kas güçsüzlüğü	Proksimal	-	Normal	-	Yok	Yok	Yok	Sınırdan yüksek	-

K: kız, E: erkek, EMG: elektromiyografi, CK: Kreatin kinaz, ASYE: alt solunum yolu enfeksiyonu.

4.2. Tüm ekzom dizileme analizi

Yapılan WES analizi sonrasında elde edilen verilerin medyan okuma derinliği 292,72 (182,71-352,99) ve 20x kapsam oranının medyan değeri %98,3 (%97,69-98,89) olarak belirlenmiştir. WES analiz verilerinin kapsam ve derinlik değerleri Tablo 7’ de verilmiştir.

Tablo 7: WES analiz verilerinin kapsam ve derinlik değerleri.

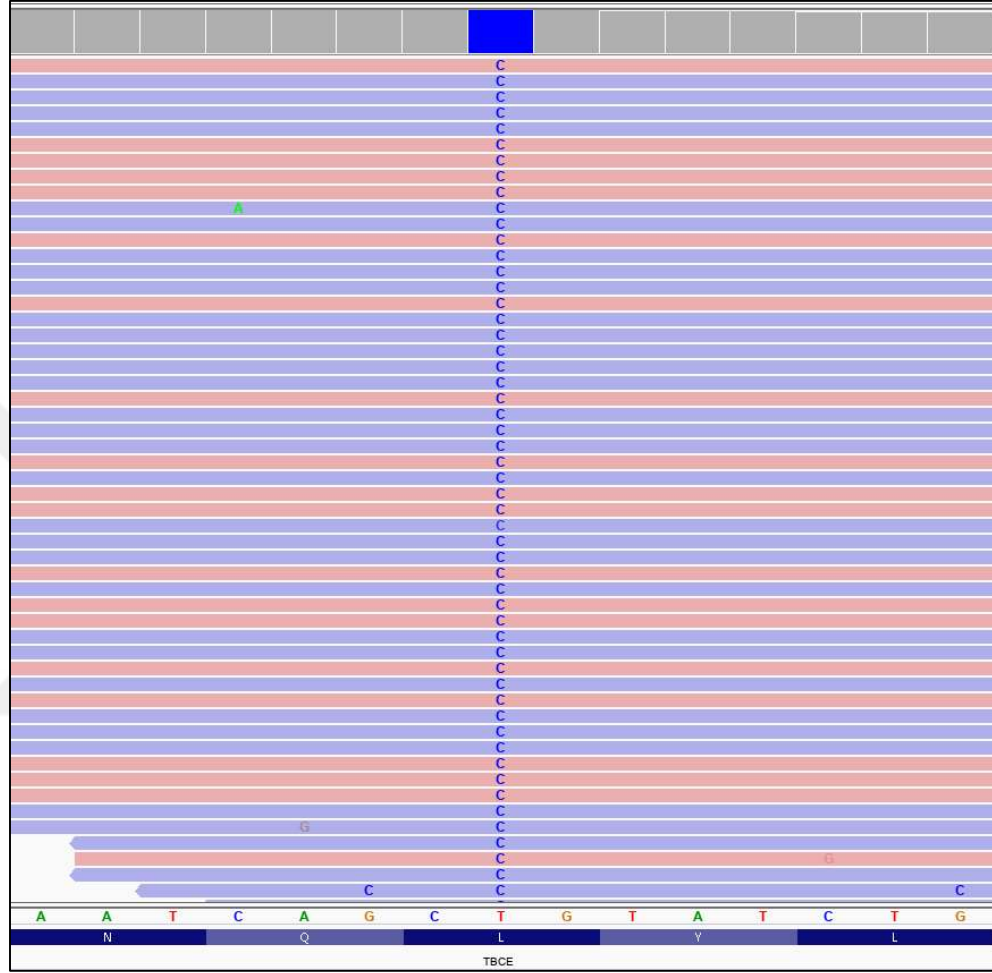
Hasta	Okuma derinliği	1x kapsam (%)	20x kapsam (%)	50x kapsam (%)	100x kapsam (%)
Hasta 1	352,99	99,53	98,11	94,51	84,69
Hasta 2	292,72	99,7	98,27	94,38	82,49
Hasta 3	182,71	99,71	98,89	97,02	82,34
Hasta 4	312,82	99,7	98,52	95,41	85,19
Hasta 5	298,02	99,56	98,3	94,97	84,22
Hasta 6	305,66	99,7	98,47	95,18	84,55
Hasta 7	211,89	99,8	97,69	91,33	71,85
Hasta 8	280,39	99,76	98,37	94,5	82,11
Hasta 9	250,49	99,67	97,91	92,75	77,7

4.2.1. Hasta 1

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 14.176 gende 52.017 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 130 heterozigot varyant ve 4 homozigot varyant kriterlendirilerek hastanın klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. *TBCE* geninde saptanan (NM_003193.5) c.809T>C (p.Leu270Pro) homozigot varyantı (Şekil 8) olası patojen olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 8’de bulunmaktadır. Sanger dizi analizi ile *TBCE* geninde saptanan varyant için her iki ebeveynin heterozigot olduğu

belirlenmiştir. Hastanın dördüncü derece akrabaları arasındaki görme engeli olan bireyin (Şekil 2, birey V-3) ve entelektüel-motor gelişme geriliği bulunan bireylerin (Şekil 2, birey V-1 ve V-2) hastada *TBCE* geninde saptanan olası patojen varyant için Sanger dizi analizi ile değerlendirilmesi planlanmıştır.

Hastada *TBCE* geninde saptanan c.809T>C (p.Leu270Pro) homozigot varyantı literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) daha önce bildirilmemiş olup, popülasyon verilerinde (129) de bulunmamaktadır. *In silico* araçlarda (135) bu varyantın hastalık yapıcı nitelikte olduğu tahmin edilmektedir. Hastamızda saptanan c.809T>C (p.Leu270Pro) varyantı, genin “lösinden zengin tekrarlar (Leucine-rich repeats, LRR) 5” domaininde bulunmakta (141) ve bu domaine adını veren lösün (Leucine, Leu) rezidülerinden birini etkilemektedir. “MutPred2” aracında Leu270Pro dönüşümünün proteinin helikal yapısında bozulmaya neden olacağı tahmin edilmektedir (137). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında hastanın *TBCE* geninde saptanan (NM_003193.5) c.809T>C (p.Leu270Pro) homozigot varyant, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek olası patojen olarak yorumlanmıştır. Böylece hastadaki ilerleyici amiyotrofi kliniğinin, *TBCE* geni ile ilişkili “Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (OMIM #617207)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.



Şekil 8. *TBCE* geninde saptanan c.809T>C (p.Leu270Pro) homozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 8. Hasta 1'in WES analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

Gen Transkript	Varyant	Zigosite	Ailesel köken	Sınıflama*	Hastalık (OMIM numarası #)	Kalıtım modeli
<i>TBCE</i> NM_003193.5	c.809T>C (p.Leu270Pro)	Homozigot	Maternal / paternal	Olası patojen (PM1, PM2, PM3_P, PP3)	-Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (617207) -Hipoparatiroidizm-retardasyon- dismorfizm sendromu (241410) -Kenny-Caffey sendromu 1 (244460)	OR OR OR

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG-AMP 2015 (112) ve ACGS 2019 (134) kılavuzlarına göre yapılmıştır.

OR: Otozomal resesif, PM1: Pathogenic moderate 1, PM2: Pathogenic moderate 2, PM3_P: Pathogenic moderate 3_supporting, PP3: Pathogenic supporting 3.

4.2.2. Hasta 2

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 14.020 gende 51.435 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 114 heterozigot varyant ve 11 homozigot/hemizigot varyant kriterlendirilerek hastanın klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. *ASAH1* geninde saptanan (NM_177924.5) c.119G>T (p.Gly40Val) homozigot varyantı (Şekil 9) olası patojen olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 9’da bulunmaktadır. Sanger dizi analizi ile *ASAH1* geninde saptanan varyant için her iki ebeveynin heterozigot olduğu belirlenmiştir.

Varyant veri tabanları (130-132) ve literatür değerlendirmelerinde, hastada *ASAH1* geninde saptanan c.119G>T (p.Gly40Val) homozigot varyantının daha önce bildirilmemiş olduğu ve popülasyon verilerinde (129) bulunmadığı saptanmıştır. *In silico* araçlarda (135) bu varyantın hastalık yapıcı özellikte olduğu tahmin edilmektedir. “MutPred2” aracında Gly40Val dönüşümünün protein-protein interaksyonu sağlayan bölgelerde bozulmaya yol açacağı tahmin edilmektedir (137). Hastamızda saptanan c.119G>T (p.Gly40Val) varyantı ile aynı kodonda bulunan homozigot c.118G>C (p.Gly40Arg) varyantı veri tabanlarında (130) SMAPME kliniği ile ilişkilendirilmiştir (ClinVar ID: 873542). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurularak, hastamızda *ASAH1* geninde saptanan (NM_003193.5) homozigot c.119G>T (p.Gly40Val) varyantı ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek olası patojen olarak yorumlanmıştır. Hastada var olan ilerleyici SMA ve epilepsi kliniğinin de *ASAH1*

geni ile ilişkili “Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA (SMAPME) (159950)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.



Şekil 9. *ASAH1* geninde saptanan c.119G>T (p.Gly40Val) homozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 9. Hasta 2'nin WES analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

Gen Transkript	Varyant	Zigosite	Ailesel köken	Sınıflama*	Hastalık (OMIM numarası #)	Kalıtım modeli
<i>ASAH1</i> NM_177924.5	c.119G>T (p.Gly40Val)	Homozigot	Maternal / paternal	Olası patojen (PM1, PM2, PM3_P, PM5_P, PP2, PP3)	-Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA (159950) -Farber lipogranülopatisi (228000)	OR OR

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG-AMP 2015 (112) ve ACGS 2019 (134) kılavuzlarına göre yapılmıştır.

OR: Otozomal resesif, PM1: Pathogenic moderate 1, PM2: Pathogenic moderate 2, PM3_P: Pathogenic moderate 3_supporting, PM5_P: Pathogenic moderate 5_supporting, PP2: Pathogenic supporting 2, PP3: Pathogenic supporting 3.

4.2.3. Hasta 3

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 16.029 gende 81.336 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 135 heterozigot varyant ve 6 homozigot/hemizigot varyant kriterlendirilerek hastanın klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. *PLA2G6* geninde saptanan (NM_003560.4) c.1094T>G (p.Met365Arg) homozigot varyantı (Şekil 10) olası patojen olarak sınıflandırılmıştır. Bulunan olası patojen varyanta ait bilgiler Tablo 10'da bulunmaktadır. Taşıyıcılık değerlendirmesi için ebeveyn çalışması planlanmıştır.

Hastada *PLA2G6* geninde saptanan c.1094T>G (p.Met365Arg) homozigot varyant literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) bildirilmemiş olup, popülasyon verilerinde (129) de bulunmamaktadır. ClinVar veri tabanında (130) *PLA2G6* genindeki yanlış anlamlı varyantlardan klinik önemi belirsizler dışındakilerin yaklaşık %91'i (51÷56) ve LOVD veri tabanındakilerin (131) yaklaşık %82'si (61÷74) patojen veya olası patojen olarak sınıflandırılmaktadır. *In silico* araçlarda (135, 136) bu varyantın hem hastalık yapıcı olduğu hem de benign olduğu yönünde tahminler yapılmaktadır. "MutPred2" aracında ise Met365Arg dönüşümünün proteinin loop yapısında kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (137). Hastamızda saptanan c.1094T>G (p.Met365Arg) varyantı, *PLA2G6* geni tarafından kodlanan "kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2" proteininin türler arasında iyi korunduğu bilinen ankyrin 7 tekrar domaininde yerleşmektedir (141). Ankyrin domainlerinin, yapısındaki hidrofobik amionoasitlerinin diğer grup polar ve yüklü aminoasitlere kıyasla çok iyi korunduğu ve protein katlanmasında önemli rol aldığı

göz önüne alındığında (151), nonpolar metiyonin (Methionine, Met) aminoasitinin pozitif yüklü ve polar arjinin (Arginine, Arg) aminoasidine dönüşümünün protein katlanmasını etkileyebileceği öngörülmektedir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında *PLA2G6* geninde saptanan (NM_003560.4) c.1094T>G (p.Met365Arg) homozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek olası patojen olarak yorumlanmıştır. Hastadaki erken başlangıçlı nörogelişimsel gerilik, spastisite ve motor nöron tutulumu ile seyreden fenotipin *PLA2G6* geni ile ilişkili infantil nöraksomal distrofi 1 (INAD1) ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.



Şekil 10. *PLA2G6* geninde saptanan c.1094T>G (p.Met365Arg) homozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 10. Hasta 3'ün WES analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

Gen Transkript	Varyant	Zigosite	Sınıflama*	Hastalık (OMIM numarası #)	Kalıtım modeli
PLA2G6 NM_003560.3	c.1094T>G (p.Met365Arg)	Homozigot	Olası patojen (PM2, PM3_P, PP2, PP3, PP4)	-İnfanıl nöroksonal distrofi 1 (256600)	OR
				-Beyinde demir birikimi ve nörodejenerasyon 2 (610217)	OR
				-OR Parkinson hastalığı 14 (612953)	OR

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG-AMP 2015 (112) ve ACGS 2019 (134) kılavuzlarına göre yapılmıştır.

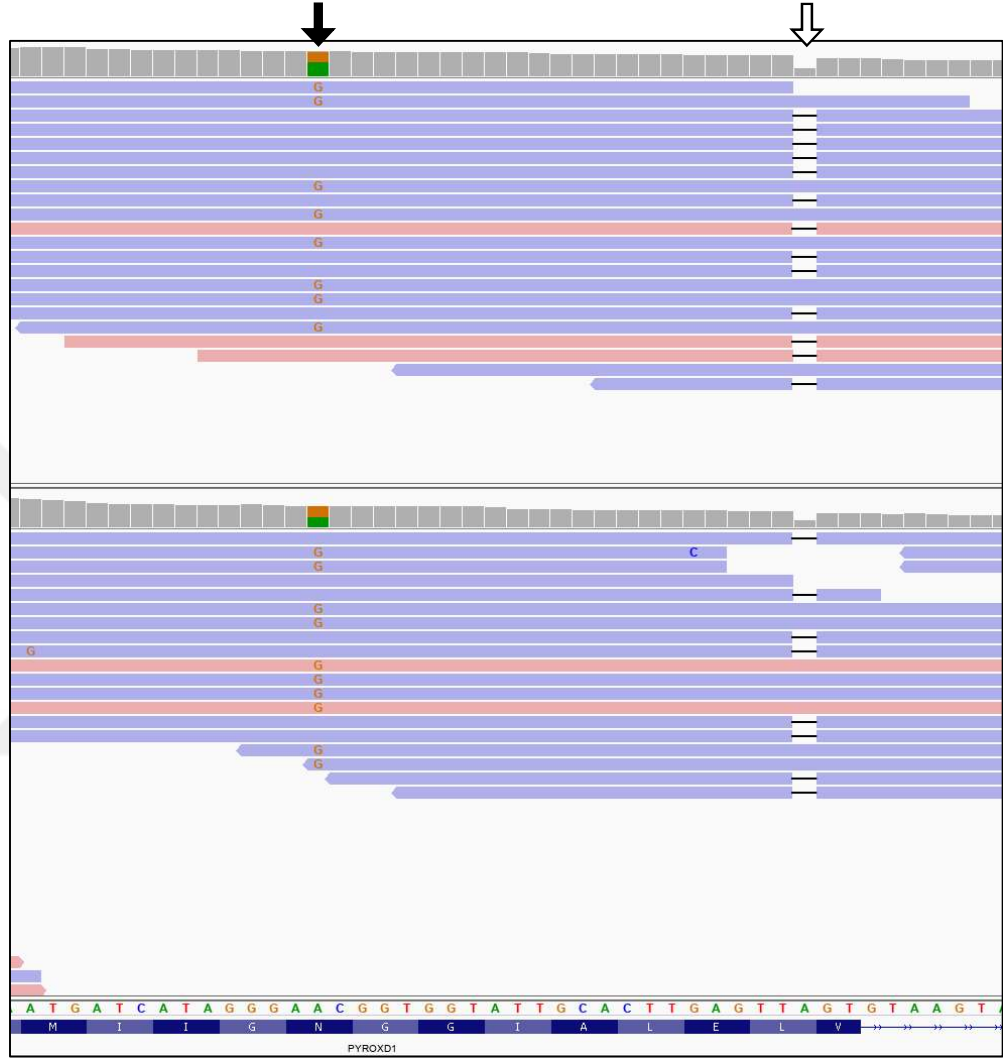
OR: Otozomal resesif. PM2: Pathogenic moderate 2, PM3_P: Pathogenic moderate 3_supporting, PP2: Pathogenic supporting 2, PP3: Pathogenic supporting 3, PP4 Pathogenic supporting 4.

4.2.4. Hasta 4 ve 5

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride Hasta 4'te 14.257 gende 52.148 varyant, Hasta 5'de 14.124 gende 51.950 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemeler sonrasında Hasta 4'ün analizinde 123 heterozigot ve 1 homozigot varyant belirlenirken, Hasta 5'in analizinde 124 heterozigot ve 2 homozigot/hemizigot varyant saptanmıştır. Hasta 4 ve 5'te belirlenen varyantlardan ortak olanları değerlendirmek için yapılan filtrelerde ise 60 heterozigot varyantın her iki hastada da bulunduğu saptanmıştır. Bunlar içinde sadece iki farklı gende, birden fazla heterozigot nadir varyant edilirken, ortak homozigot nadir varyant bulunmamıştır. BAM verisi analiz edilerek her iki hastada da trans konumda oldukları (Şekil 11) belirlenen *PYROXD1* genindeki (NM_024854.5) c.464A>G (p.Asn155Ser) ve c.486delA (p.Val163CysfsTer9) heterozigot varyantları patojen olarak sınıflandırılmıştır. Bulunan patojen varyantlara ait bilgiler Tablo 11'de bulunmaktadır. Varyantların farklı ebeveynlerden kalıtıldıkları Sanger dizi analizi ile de gösterilmiştir.

Hastalarda *PYROXD1* genindeki birleşik heterozigot varyantlardan biri olan c.464A>G (p.Asn155Ser) heterozigot varyantı, literatürde (152-155) ve varyant veri tabanlarında (130) (ClinVar ID: 372280) biallelik olduğunda patojen etki göstererek "Miyofibriler miyopati 8 (OMIM #617258)" hastalarında etiyolojiden sorumlu olarak bildirilmiştir. *In vitro* çalışmalar ile bu varyantın protein fonksiyonunu etkileyebileceğine dair bulgular elde edilmiştir (152, 153, 155). Popülasyon verilerine (129) göre sadece 12 kişide ($f=0,000045$) heterozigot olarak belirlenen bu varyantın homozigot olduğu birey saptanmamıştır. *In silico* araçlarda

(135, 136) bu varyantın hastalık yapıcı özellikte olduğu tahmin edilmektedir. Bu bilgiler ışığında, *PYROXD1* geninde saptanan (NM_024854.5) c.464A>G (p.Asn155Ser) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek patojen olarak yorumlanmıştır. Hasta 4 ve 5'te *PYROXD1* geninde trans allelde saptanan (NM_024854.5) c.486delA (p.Val163CysfsTer9) heterozigot varyantı ise literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) daha önce bildirilmemiş olup, popülasyon verilerinde (129) saptanmamıştır. Erken sonlanma kodonu oluşturması beklenen bu varyant, 12 ekzonu olan *PYROXD1* geninin 5. ekzonunda yerleşmekte ve 1557. kodonda bulunan sonlanma kodonunun 567. kodona gelmesine neden olmaktadır. Bu sebeple belirlenen varyantın “nonsense-mediated mRNA decay” mekanizması ile transkriptlerin yıkımına neden olabileceği öngörülmektedir. Bu varyantın trans allelde olması ve yıkıcı etki göstermesi, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirildiğinde patojen olarak yorumlanmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla, hasta 4 ve 5'in tanısı *PYROXD1* geni ile ilişkili “Miyofibriler miyopati 8” olarak düşünülmüştür.



Şekil 11. *PYROXD1* geninde saptanan c.464A>G (p.Asn155Ser) ve c.486delA (p.Val163CysfsTer9) heterozigot varyantlarının BAM verisindeki görüntüsü. Varyantlar farklı okumalar üzerinde yerleşmektedir. Üstteki okumalar Hasta 4, alttaki okumalar Hasta 5'e aittir. Siyah ok: c.464, beyaz ok: c.486.

Tablo 11. Hasta 4 ve 5'in WES analizinde saptanan ortak patojen varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

Gen Transkript	Varyant	Zigosite	Ailesel köken	Sınıflama*	Hastalık (OMIM numarası #)	Kalıtım modeli
<i>PYROXD1</i> NM_024854.5	c.464A>G (p.Asn155Ser)	Birleşik heterozigot	Maternal	Patojen (PS3, PM2, PM3, PP1, PP3)	-Miyofibriler miyopati 8 (617258)	OR
	c.486delA (p.Val163CysfsTer9)	Birleşik heterozigot	Paternal	Patojen (PVS1, PM2, PM3, PP1)		

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG-AMP 2015 (112) ve ACGS 2019 (134) kılavuzlarına göre yapılmıştır.

OR: Otozomal resesif. PVS1: Pathogenic very strong 1, PS3: Pathogenic strong 3, PM2: Pathogenic moderate 2, PM3: Pathogenic moderate 3, PP1: Pathogenic supporting 1, PP3: Pathogenic supporting 3.

4.2.5. Hasta 6 ve 7

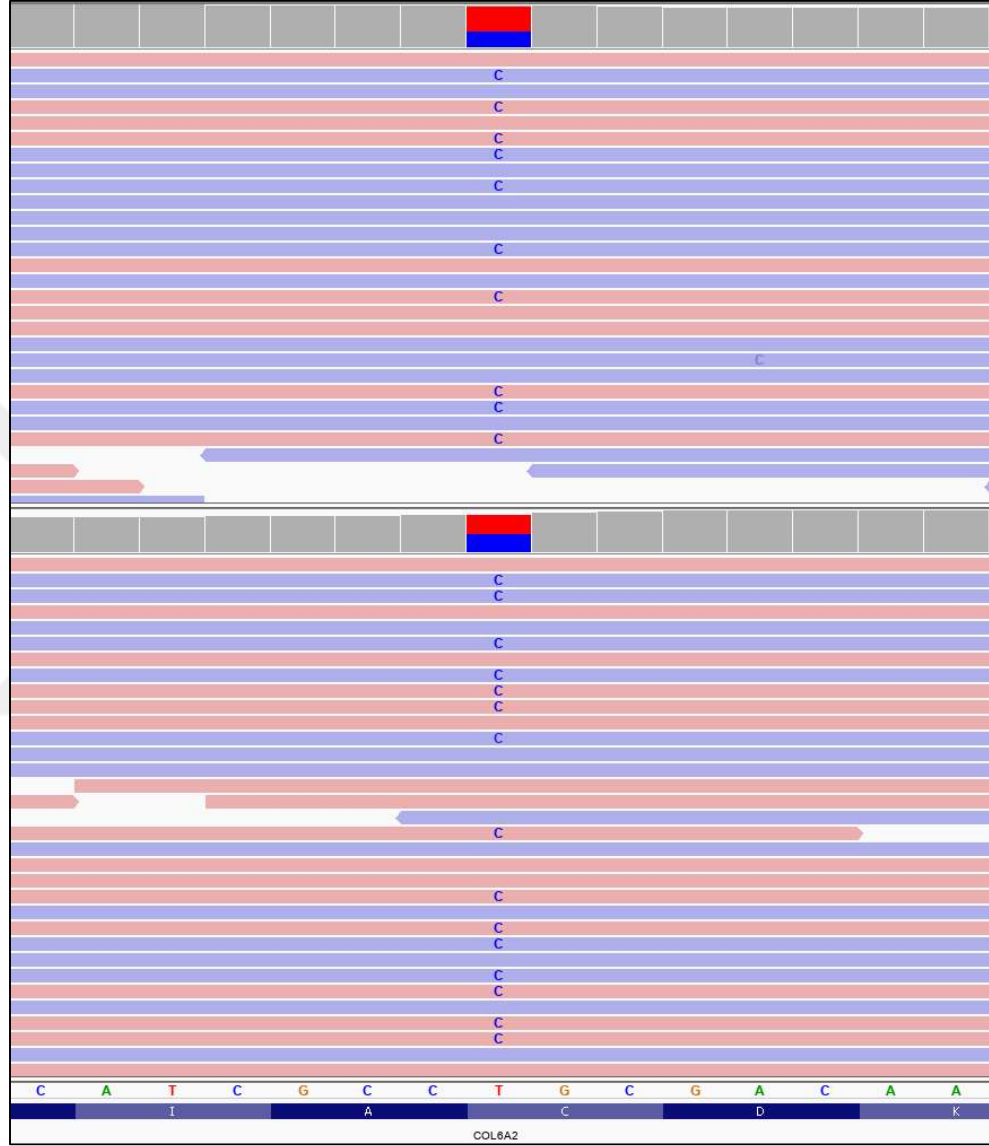
Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride Hasta 6'da 14.256 gende 52.432 varyant, Hasta 7'de 14.165 gende 51.191 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra, Hasta 6'da 131 heterozigot ve 4 homozigot/hemizigot varyant belirlenirken, Hasta 7'de 126 heterozigot ve 2 homozigot/hemizigot varyant saptanmıştır. Hasta 6 ve 7'de belirlenen varyantlardan ortak olanları değerlendirmek için yapılan filtrelerde ise 70 heterozigot varyantın her iki hastada da bulunduğu saptanmıştır. Bunlar içinde sadece 4 farklı gende birden fazla heterozigot nadir varyantın ortak olduğu, 1 gende ise homozigot nadir bir varyantın ortak olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Her iki hastada *COL6A2* geninde saptanan (NM_001849.3) c.2329T>C (p.Cys777Arg) ve c.2462-5_2462-4delCA heterozigot varyantlarının (Şekil 12 ve 13) Sanger dizileme ile farklı ebeveynlerden kalıtıldıkları gösterilmiştir. Hastalarda *GNAS* geninde ortak olarak saptanan ve patojen olarak sınıflandırılan c.101G>A (p.Trp34Ter) heterozigot varyantının (Şekil 14) maternal kökenli olduğu Sanger dizi analizi ile belirlenmiştir. *COL6A2* ve *GNAS* genindeki varyantlara ait bilgiler Tablo 12'de verilmiştir.

Hastalarda *COL6A2* geninde birleşik heterozigot durumdaki varyantlardan c.2329T>C (p.Cys777Arg) varyantının, literatürde (156-159) ve varyant veri tabanlarında (130) (ClinVar ID: 17166) homozigot durumda "Ullrich konjenital musküler distrofi 1" etiyojisinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Hasta bireylerin cilt fibroblastlarından yapılan incelemelerinde, ekstrasellüler matrikste ve tip VI kollajen miktarında azalma olduğu bildirilmiştir (157, 158). Popülasyon

verilerinde (115) bu varyantın sadece 1 kişide ($f=0,000004$) heterozigot olarak bulunduğu, homozigot bireyin tanımlanmadığı saptanmıştır. *In silico* araçlarda (135, 136) c.2329T>C (p.Cys777Arg) varyantının hastalık yapıcı özellikte olduğu tahmin edilmektedir. Elde edilen bu verilere dayanarak hastalarımızda *COL6A2* geninde saptanan heterozigot c.2329T>C (p.Cys777Arg) varyant, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek olası patojen olarak yorumlanmıştır. Hasta 6 ve 7’de *COL6A2* geninde belirlenen ikinci varyant, trans allelde bulunan heterozigot (NM_001849.3) c.2462-5_2462-4delCA varyantı olup, literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) daha önce bildirilmemiştir. Popölasyon verilerine (115) göre sadece 1 kişide ($f=0,000004$) heterozigot olarak saptanırken, homozigot olan birey saptanmamıştır. *COL6A2* geninin 27. intronunun akseptör kırılma bölgesinde yerleşen bu varyant, kanonik akseptör sekansı etkilememektedir. *In silico* araçlarda (138, 139) bu varyantın kırılmayı etkilemediği tahmin edilmektedir. Tüm bu bilgilerle c.2462-5_2462-4delCA varyantı ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır.

Hastalarda *GNAS* geninde saptanan maternal kalıtlı heterozigot (NM_016592.4/ENST00000313949.7) c.101G>A (p.Trp34Ter) varyantı, yapılan araştırmaya göre literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) daha önce bildirilmemiş olup, popölasyon verilerinde (129) de bulunmamaktadır. On üç ekzonlu NM_016592.4/ENST00000313949.7 transkriptinin kodlayan ilk ekzonunda yerleşen bu varyantın, transkriptin 246. pozisyonunda yer alan sonlanma kodonunun 34. pozisyona gelmesi ile “nonsense mediated mRNA decay”

mekanizması yoluyla transkriptin yıkımına neden olabildiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu varyant *GNAS* geni için kanonik olan NM_000516.6/ENST00000371085.7 transkriptinde upstream bölgede yer almaktadır (140). Hastalarımızda saptanan c.101G>A (p.Trp34Ter) varyantı ile etkilenen ENST00000313949.7 transkriptinin, protein izoformlarından NESP55'i kodladığı bilinmektedir (140, 141). İlgili transkriptin, paternal allelde promotör bölgesinin metile olduğu ve maternal allelde ise eksprese olduğu gösterilmiştir. NESP55 izoformunun ekspresyonunun ya da protein fonksiyonunun kaybı, *GNAS* ile ilişkilendirilmiş hastalıklardan “Psödohipoparatiroidizm Ib (OMIM #603233)” hastalarında saptanmıştır (160). Tüm bu bilgilerle c.101G>A (p.Trp34Ter) varyantı ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirildiğinde patojen olarak yorumlanmıştır. Dolayısıyla, hasta 6 ve 7’de nöromusküler hastalık yanında “Psödohipoparatiroidizm Ib (OMIM #603233)” tablosunun bulunduğu düşünülmüştür. Hastaların psödohipoparatiroidizm açısından takipleri de planlanmıştır.



Şekil 12. *COL6A2* geninde saptanan c.2329T>C (p.Cys777Arg) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü. Üstteki okumalar Hasta 6, alttaki okumalar Hasta 7'ye aittir.



Şekil 13. *COL6A2* geninde saptanan c.2462-5_2462-4delCA heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü. Üstteki okumalar Hasta 6, alttaki okumalar Hasta 7'ye aittir.



Şekil 14. *GNAS* geninde saptanan c.101G>A (p.Trp34Ter) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü. Üstteki okumalar Hasta 6, alttaki okumalar Hasta 7'ye aittir.

Tablo 12. Hasta 6 ve 7'nin WES analizinde saptanan ortak varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

Gen Transkript	Varyant	Zigosite	Ailesel köken	Sınıflama*	Hastalık (OMIM numarası #)	Kalıtım modeli
COL6A2 NM_001849.3	c.2329T>C (p.Cys777Arg)	Birleşik heterozigot	Maternal	Olası patojen (PS3, PM2, PP1)	-?Konjenital miyoskleroz (255600)	OR
					-Bethlem miyopati 1 (158810)	OD/OR
	c.2462-5_2462-4delCA (p.?)	Birleşik heterozigot	Paternal	Klinik önemi belirsiz (PM2, PM3, PP1)	-Ullrich konjenital musküler distrofi 1 (254090)	OD/OR
GNAS NM_016592.4	c.101G>A (p.Trp34Ter)	Heterozigot	Maternal	Patojen (PVS1, PM2, PP1)	-ACTH bağımsız makronodüler adrenal hiperplazi (219080)	Somatik
					-McCune-Albright sendromu (174800)	Somatik
					-Progresif osseöz heteroplazi (166350)	OD
					-Psödohipo-paratiroidizm Ia, Ib, Ic (103580, 603233, 612462)	OD
					-Psödopsödo-hipoparatiroidizm (612463)	OD

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG-AMP 2015 (112) ve ACGS 2019 (134) kılavuzlarına göre yapılmıştır.

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant. PVS1: Pathogenic very strong 1, PS3: Pathogenic strong 3, PM2: Pathogenic moderate 2, PM3: Pathogenic moderate 3, PP1: Pathogenic supporting 1.

4.2.6. Hasta 8 ve 9

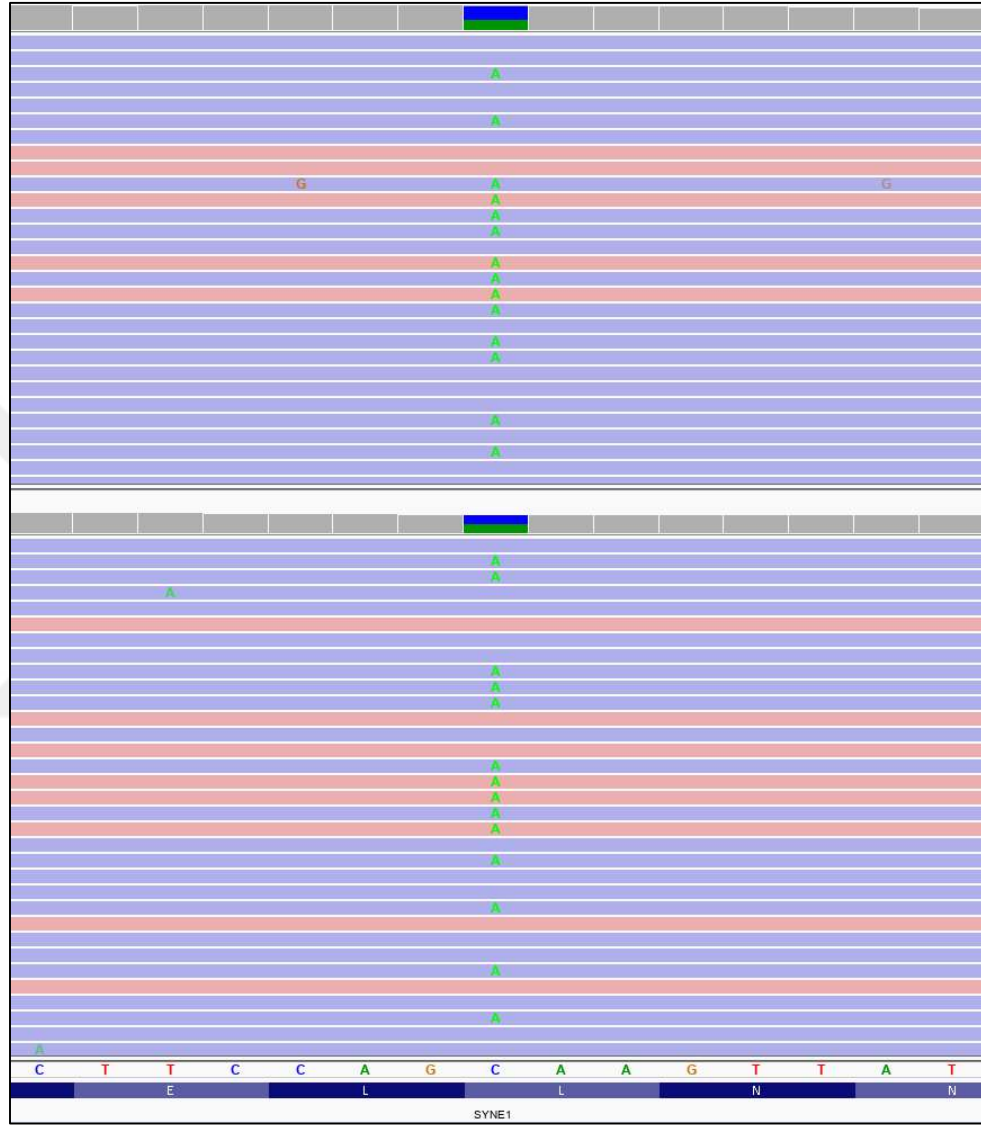
Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride Hasta 8'de 14.318 gende 53.046, Hasta 9'da 14.399 gende 53.303 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra Hasta 8'de 135 heterozigot ve 3 homozigot/hemizigot varyant; Hasta 9'da ise 134 heterozigot ve 1 homozigot/hemizigot varyant saptanmıştır. Hasta 8 ve 9'da belirlenen varyantlardan ortak olanları değerlendirmek için yapılan filtrelerde 65 heterozigot varyantın her iki hastada ortak olduğu belirlenirken, aynı gende birden fazla heterozigot nadir varyant tespit edilmemiştir. Bu varyantlardan *SYNE1* genindeki (NM_182961.4) c.21669G>T (p.Leu7223Phe) heterozigot varyantına ek olarak, aynı gende yerleşim yeri sebebi ile analizler sırasında filtre dışında kalmış olan c.18816-21delG heterozigot varyantının da her iki hastada var olduğu görülmüştür (Şekil 15 ve 16). *SYNE1* geninde saptanan heterozigot varyantların farklı ebeveynlerden kalıtıldıkları Sanger dizi analizi ile belirlenmiştir. Hastalarda ortak homozigot nadir varyant ise belirlenmemiştir. *SYNE1* genindeki varyantlara ait bilgiler Tablo 13'te verilmiştir.

Hastalarda *SYNE1* geninde birleşik heterozigot olarak belirlenen varyantlardan c.21669G>T (p.Leu7223Phe) varyantının literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) daha önce bildirilmediği ve popülasyon verilerinde (129) de saptanmadığı görülmektedir. *In silico* araçlarda (135, 136) bu varyant ile ilgili hem hastalık yapıcı olduğu yönünde hem de benign olduğu yönünde tahminler vardır. Tüm bu bilgiler göz önüne alınarak *SYNE1* geninde saptanan heterozigot c.21669G>T (p.Leu7223Phe) varyantı ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır.

Hasta 8 ve 9'un *SYNE1* geninde trans allelde saptanan (NM_182961.4) c.18816-21delG heterozigot varyantı da literatürde ve varyant veri tabanlarında (130-132) daha önce bildirilmemiş ve popülasyon verilerinde (129) saptanmamıştır. Genin 100. intronunda akseptör kırpılma bölgesine yakın yerleşen bu varyant, kanonik akseptör sekansı etkilememektedir (140). *In silico* araçlarda (138, 139) da bu varyantın kırpılmayı etkilemediği tahmin edilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, c.18816-21delG varyantı ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına (112, 134) göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır.



Şekil 15. *SYNE1* geninde saptanan c.18816-21delG heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü. Üstteki okumalar Hasta 8, alttaki okumalar Hasta 9'a aittir.



Şekil 16. *SYNE1* geninde saptanan c.21669G>T (p.Leu7223Phe) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü. Üstteki okumalar Hasta 8, alttaki okumalar Hasta 9’a aittir.

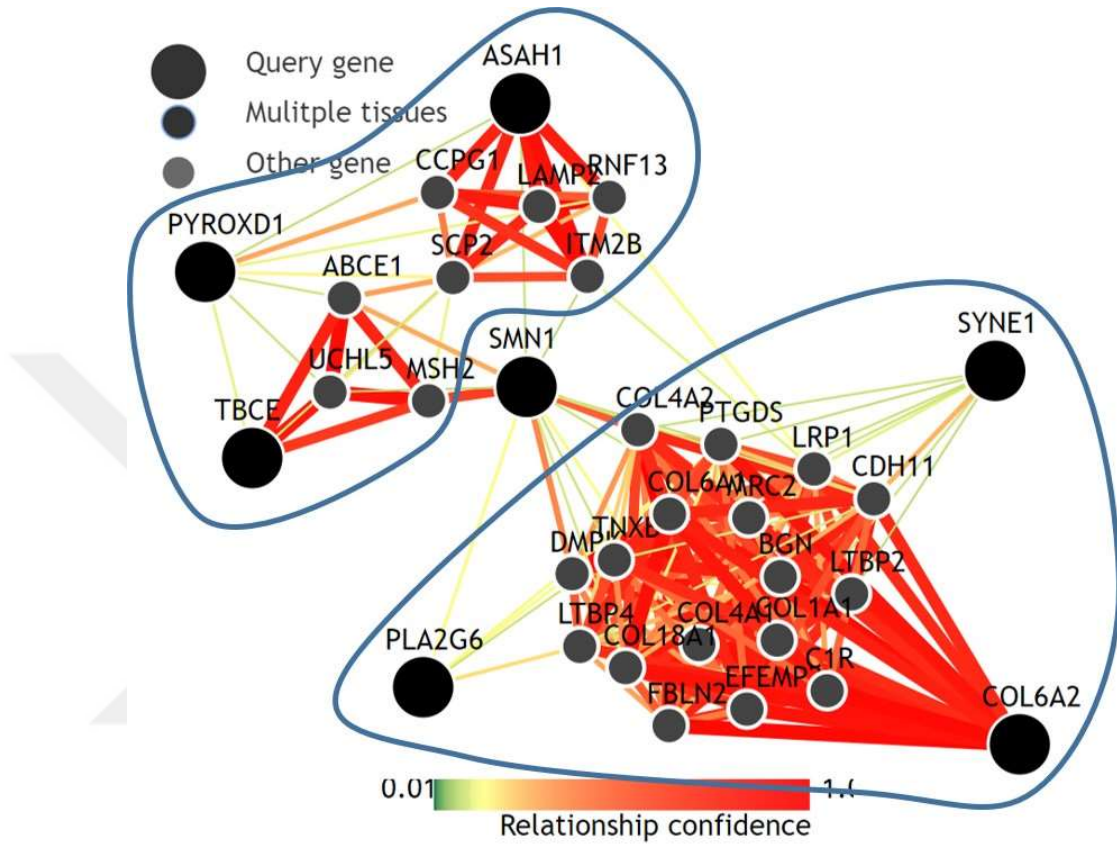
Tablo 13. Hasta 8 ve 9'un WES analizinde saptanan ortak varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

Gen Transkript	Varyant	Zigosite	Ailesel köken	Sınıflama*	Hastalık (OMIM numarası #)	Kalıtım modeli
SYNE1 NM_182961.4	c.21669G>T (p.Leu7223Phe)	Birleşik heterozigot	Maternal	Klinik önemi belirsiz (PM2)	-Miyojenik tip artrogripozis multipleks konjenita 3 (618484)	OR
					-Emery-Dreifuss musküler distrofi 4 (612998)	OD
	c.18816-21delG (p.?)	Birleşik heterozigot	Paternal	Klinik önemi belirsiz (PM2, BP7)	-OR spinoserebellar ataksi 8 (610743)	OR

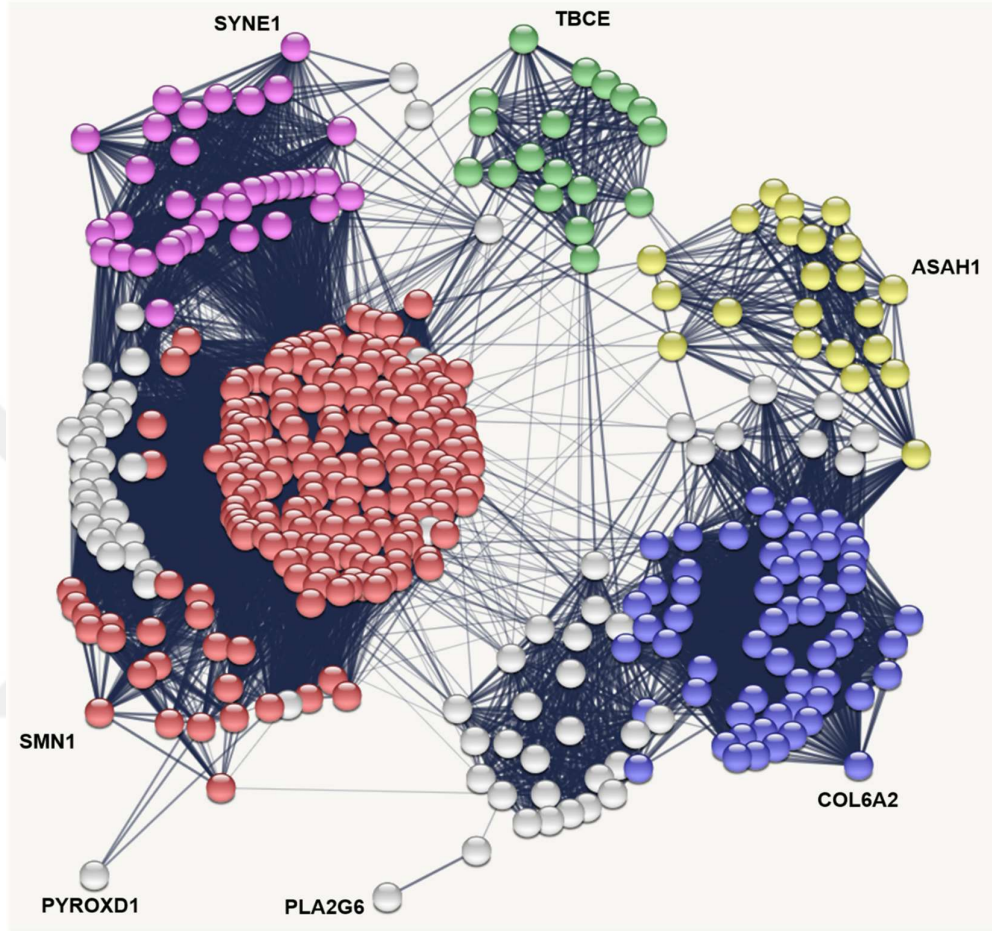
*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG-AMP 2015 (112) ve ACGS 2019 (134) kılavuzlarına göre yapılmıştır.
OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant. PM2: Pathogenic moderate 2, BP7: Benign supporting 7.

4.3. Protein-protein etkileşim analizleri

Alt motor nöron hastalığı ön tanısı ile değerlendirilen hasta grubunda WES analizi ile varyantları saptanan *ASAH1*, *COL6A2*, *PLA2G6*, *PYROXD1*, *SYNE1* ve *TBCE* genleri ile birlikte *SMN1* geni, GIANt v2 ve STRING protein-protein etkileşim araçları ile değerlendirilmiştir. GIANt v2 ile spinal kordda yapılan değerlendirmede, *ASAH1*, *PYROXD1* ve *TBCE* genlerinin bir etkileşim kümesi içerisinde, *COL6A2*, *PLA2G6* ve *SYNE1* genlerinin başka bir etkileşim kümesi içerisinde yer aldıkları görülmüştür. *SMN1* geni bu iki kümenin ortasında yerleşmekte olup her iki küme ile de etkileşmektedir (Şekil 17). STRING ile yapılan değerlendirmede ise hastalarda varyantları saptanan gelerin protein ürünlerinin tümünün SMN proteinin içerisinde yer aldığı ve mRNA kırılmasını sağlayan kompleks ile dolaylı olarak etkileşim içerisinde bulunduğu görülmektedir (Şekil 18). STRING analizinde “GeneOntology” veri tabanındaki “Biologic process” terimlerinden anlamlı zenginleştirme belirlenenler Tablo 14’te listelenmiştir.



Şekil 17. GIANT ile spinal kordda protein-protein etkileşim değerlendirmesi



Şekil 18. STRING ile protein-protein etkileşim değerlendirilmesi. Farklı renkler Reactome veri tabanına (161) göre farklı yollardaki genleri temsil etmektedir: kırmızı=mRNA kırılma (spliceosome), pembe=mayotik sinapsis, yeşil=tubulin katlanma, sarı=sfingolipid metabolizması, mavi=kollajen oluşumu.

Tablo 14. STRING analizinde zenginleştirme belirlenen “Biologic process” terimleri.

GO terimi	Açıklama	Hatalı tanımlama oranı	Dahil edilen genler
GO:0008152	metabolic process	1.99E-34	<i>SMN1, ASAH1, PLA2G6, PYROXD1</i>
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	1.18E-31	<i>SMN1, ASAH1, PLA2G6</i>
GO:0065003	protein-containing complex assembly	3.74E-18	<i>SMN1, COL6A2</i>
GO:0051641	cellular localization	1.32E-17	<i>SMN1, SYNE1</i>
GO:0016043	cellular component organization	1.33E-16	<i>SMN1, COL6A2, SYNE1, TBCE</i>
GO:0007010	cytoskeleton organization	5.26E-07	<i>TBCE, SYNE1</i>
GO:0006810	transport	1.78E-06	<i>SMN1, ASAH1, PLA2G6</i>
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	6.55E-06	<i>ASAH1, PLA2G6</i>
GO:0032501	multicellular organismal process	1.23E-05	<i>PLA2G6, SYNE1</i>
GO:0051179	localization	9.30E-05	<i>SMN1, ASAH1, PLA2G6, SYNE1</i>

Zenginleştirmeye dahil edilen genler: *ASAH1, COL6A2, PLA2G6, PYROXD1, SMN1, SYNE1* ve *TBCE*.

GO: GeneOntology.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, SMA veya alt motor nöron hastalığı bulguları olup daha önce *SMN1* geninde delesyon saptanmamış olan ve ileri moleküler analiz için 2018-2019 yıllarında Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine refere edilen 9 hastanın tüm ekzom dizileme verilerinin biyoinformatik analiz teknikleri kullanarak retrospektif olarak değerlendirmesi ile elde edilen veriler, genotip-fenotip korelasyonu yapılarak yorumlanmıştır. Nöromusküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen *TBCE*, *ASAH1*, *PLA2G6*, *PYROXD1* ve *COL6A2* genlerinde 4'ü ilk kez bu çalışmada belirlenmiş, 2'si literatürde daha önce bildirilmiş olan toplam 6 patojen/olası patojen varyant tanımlanmıştır. Ayrıca, nöromusküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen *COL6A2* ve *SYNE1* genlerinde, klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılan ancak hastalarımızda klinik bulguları açıklama potansiyeline sahip olduğunu düşündüğümüz 3 varyant saptanmıştır. Böylece, SMA veya alt motor nöron hastalığı klinik bulgularına sahip olan 6 farklı ailedeki 9 hastanın tamamında, potansiyel olarak etiyolojiyi açıklayabilecek moleküler bir sonuç elde edilmiş olup, tüm sonuçlar Tablo 15'te verilmiştir. Üç ailede *TBCE*, *PLA2G6* ve *SYNE1* genleriyle ilişkili olarak alt motor nöron tutulumu olan bir nörodejeneratif hastalık, iki ailede *PYROXD1* ve *COL6A2* genleriyle ilişkili bir miyopati-musküler distrofi ve bir ailede de *ASAH1* geniyle ilişkili SMA-plus sendromu tanısı konulmuştur. Bu sonuçlarla hastalarımıza moleküler olarak tanı konulması yanı sıra, klinik izlem ve prognozlarına da doğru ve faydalı bilgiler sağlanacağı düşünülmektedir.

Tablo 15. Hastalarda belirlenen potansiyel olarak etiyolojiyi açıklayabilecek moleküler sonuçlar.

Hasta	Ön tanı	Final tanı*	Gen	Zigosite	Bilirlilik	Varyant	Protein	Sınıflandırma
Hasta 1	SMA/alt motor nöron hastalığı + entelektüel yetersizlik + nöbet	Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (OMIM #617207)	<i>TBCE</i>	Homozigot	Yeni	c.809T>C	(p.Leu270Pro)	Olası patojen
Hasta 2	SMA/alt motor nöron hastalığı + nöbet	Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA (OMIM #159950)	<i>ASAH1</i>	Homozigot	Yeni	c.119G>T	(p.Gly40Val)	Olası patojen
Hasta 3	SMA/alt motor nöron hastalığı + gelişme geriliği	İnfanitil nöroksonal distrofi 1 (OMIM #256600)	<i>PLA2G6</i>	Homozigot	Yeni	c.1094T>G	(p.Met365Arg)	Olası patojen
Hasta 4	SMA/alt motor nöron hastalığı	Miyofibriler miyopati 8 (OMIM #617258)	<i>PYROXD1</i>	Birleşik heterozigot	Bilinen; yeni	c.464A>G; c.486delA	(p.Asn155Ser); (p.Val163CysfsTer9)	Patojen/patojen
Hasta 5	SMA/alt motor nöron hastalığı	Miyofibriler miyopati 8 (OMIM #617258)	<i>PYROXD1</i>	Birleşik heterozigot	Bilinen; yeni	c.464A>G; c.486delA	(p.Asn155Ser); (p.Val163CysfsTer9)	Patojen/patojen
Hasta 6	SMA/alt motor nöron hastalığı	Bethlem miyopati 1 (OMIM #158810)	<i>COL6A2</i>	Birleşik heterozigot	Bilinen; yeni	c.2329T>C; c.2462-5_2462-4delCA	(p.Cys777Arg); (p.?)	Olası patojen; klinik önemi belirsiz
Hasta 7	SMA/alt motor nöron hastalığı	Bethlem miyopati 1 (OMIM #158810)	<i>COL6A2</i>	Birleşik heterozigot	Bilinen; yeni	c.2329T>C; c.2462-5_2462-4delCA	(p.Cys777Arg); (p.?)	Olası patojen; klinik önemi belirsiz
Hasta 8	SMA/alt motor nöron hastalığı	OR spinoserebellar ataksi 8 (OMIM #610743)	<i>SYNE1</i>	Birleşik heterozigot	Yeni; yeni	c.21669G>T; c.18816-21delG	(p.Leu7223Phe); (p.?)	Klinik önemi belirsiz; klinik önemi belirsiz
Hasta 9	SMA/alt motor nöron hastalığı	OR spinoserebellar ataksi 8 (OMIM #610743)	<i>SYNE1</i>	Birleşik heterozigot	Yeni; yeni	c.21669G>T; c.18816-21delG	(p.Leu7223Phe); (p.?)	Klinik önemi belirsiz; klinik önemi belirsiz

*Hasta 8 ve 9'da *SYNE1* geninde saptanan varyantlar klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırıldığından bu sonuç ilgili hastalarda final tanı niteliğinde değildir.

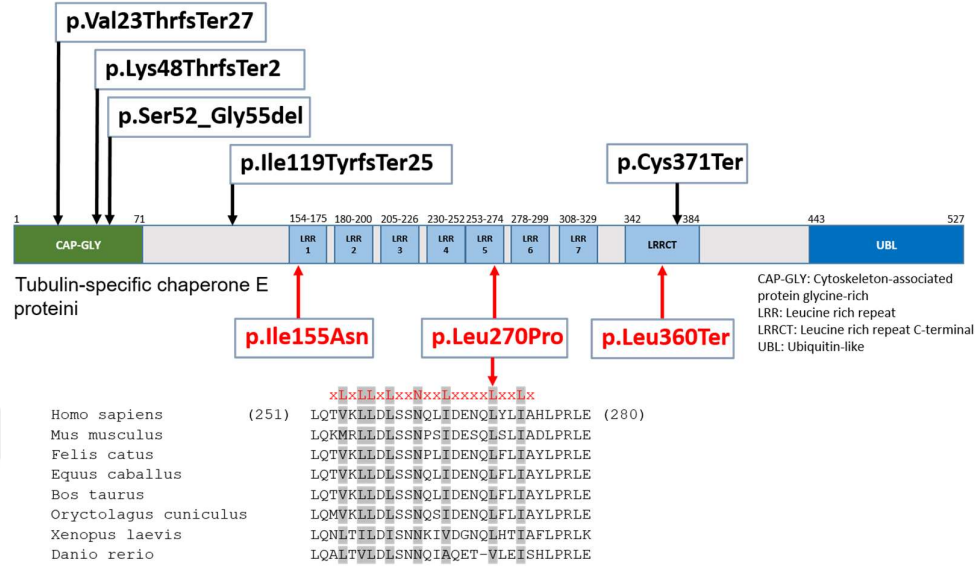
5.1. Genotip-fenotip korelasyonları

5.1.1. Hasta 1

Hastada *TBCE* geninde olası patojen olarak sınıflandırılan (NM_003193.5) c.809T>C (p.Leu270Pro) homozigot varyantı saptanmıştır. *TBCE* geni, tubulin katlanması ve polimerizasyonunda görev alan beş şaperon proteininden (tubulin chaperon A, B, C, D ve E) birini kodlamaktadır. Tubulin proteinlerinin etkilendiği tubulinopatiler, nöronal göçün kusurlu olmasından kaynaklanan serebral korteks problemleri ile karakterize nörogelişimsel bir hastalık grubudur (162). Tubulin şaperonlarını kodlayan genlerden sadece *TBCD* ve *TBCE* genleri insanlarda kalıtsal hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. *TBCD* geninde biallelik patojen varyant varlığı “Beyin atrofisi ve ince korpus kallozumla birlikte erken başlangıçlı progresif ensefalopati (OMIM #617193)”ye neden olmaktadır (163, 164). Bu hastalığın *TBCE* geni ile ilişkilendirilmiş olan “Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (OMIM #617207)” ile benzer klinik gösterdiği bilinmektedir. İlk kez 2016 yılında bildirilen bu hastalıkla etkilenen bireylerde, spinal musküler atrofi kliniği ile uyumlu bulgular da raporlanmıştır (165).

“Tubulin folding cofactor E” (*TBCE*) geninde daha önce çok sayıda patojen varyant bildirilmiş olup, bunlardan c.155_166del (p.Ser52_Gly55del) homozigot durumda iken; hipoparatiroidizm, entelektüel yetersizlik, fasiyal dismorfizm ve ağır büyüme geriliği ile karakterize “Hipoparatiroidizm-retardasyon-dismorfizm sendromu (OMIM #241410)” ve bu sendroma benzer bulguların görüldüğü “Kenny-Caffey sendromu 1 (OMIM #244460)” ile ilişkilendirilmiştir. (166, 167).

Ayrıca, yıkıcı etkiye sahip biallelik *TBCE* varyantları da “Hipoparatiroidizm-retardasyon-dismorfizm sendromu”na yol açabilmektedir (130, 167). *TBCE* geninde daha önce bildirilen patojen varyantlardan; yanlış anlamlı c.464T>A (p.Ile155Asn) varyantı homozigot durumda iken ve erken sonlanma kodonu oluşturan c.924del (p.Ser308_Leu309insTer) varyantı ile trans allellerde yerleştiğinde “Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (OMIM #617207)”ye neden olduğu gösterilmiştir (86). “Tubulin-specific chaperone E” proteinin 155. pozisyonunda konsensus Leu rezidülerinden birinde (168) yerleşen izolösin (isoleucine, Ile), kendisi gibi hidrofobik aminoasitlerle birlikte LRR domainin katlanmasına katkıda bulunmaktadır. *TBCE* geninde c.464T>A (p.Ile155Asn) varyantı nedeniyle polipeptid yapısında Ile yerine geçen asparajin (asparagine, Asn) aminoasitinin bu katlanmayı bozduğunun tahmin edildiği belirtilmiştir (86). Ayrıca bu varyantın, etkilenmiş bireylerde *TBCE* seviyesini azalttığı fibroblast kültürlerinden yapılan Western-blot çalışmaları ile de gösterilmiştir (86). Sonuç olarak, hastamızdaki gibi LRR domaininin konsensus Leu rezidülerini etkileyen yanlış anlamlı varyantların “Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati (OMIM #617207)” kliniğine yol açtığı düşünülmektedir (Şekil 19).



Şekil 19. Tubulin-specific chaperone E proteinin domainleri ile literatürde ve hasta 1’de saptanan *TBCE* varyantlarını gösteren şema. Siyah renkle yazılmış varyantlar “Hipoparatiroidizm-retardasyon-dismorfizm sendromu” ve “Kenny-Caffey sendromu 1” ile ilişkilendirilmiştir. Kırmızı ile yazılan varyantlar “Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati” ile ilişkilendirilmiştir. Hasta 1’de saptanan p.Leu270Pro varyantının türler arasında korunan bir bölgede ve rezidüde yerleştiği görülmektedir.

Yapılan literatür araştırmasında “Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati”den etkilendiği bildirilen dört farklı aileden altı hastanın klinik bilgisine ulaşılabildiği görülmüştür. Klinik bulguların başlangıç yaşının doğumdan on dört aya kadar değişebildiği bu hastaların bağımsız yürüyemediği, dördünün desteksiz oturmayı öğrenmişken bu yeteneğini kaybettiği, birinin hiç oturamadığı ve birinin ise desteksiz oturabildiği bildirilmiştir (86). Mevcut hastaların, hastalığın klinik seyri ve başlangıç yaşı itibarıyla hastamızla benzer özellikler gösterdiği gözlenmektedir. Ancak hastamızdan farklı olarak, literatürdeki hastaların tamamında iki-üç yaşlarında iken beyin MRI’da tespit edilen serebellar atrofi ve/veya korpus kallozum hipoplazisi saptandığı bildirilmiştir. Bu hastaların dördünde 2. dekatta yapılan beyin MRI’da gangliyonlarda demir birikimi de ek

olarak saptanmıştır (86). Hastamızın ise altı yaşındayken yapılan beyin MRI'ı normal olarak değerlendirilmekle birlikte, ek anomaliler ve demir birikimi açısından yeniden değerlendirilmesi, ayrıca literatürdeki hastaların tamamında bilateral optik atrofi varlığı rapor edilmesi (86) üzerine görme ile ilgili aktif şikayeti bulunmayan hastamıza oftalmolojik değerlendirme planlanmıştır.

Nöromusküler hastalıklarda kazanılmış maksimum motor fonksiyonların ve bulguların başlangıç yaşının hastalığın klinik ağırlığını belirlemede önemli olduğu (24) göz önüne alındığında, hastamızın daha önce bildirilen hastalara göre daha hafif bir kliniğinin olduğu söylenebilir. Bu, protein fonksiyonel etkilenmesinin derecesi, değişken ifadenme, *TBCE* geninin ve regülatör genlerinin olası etkileşimi ve epigenetik faktörler nedeniyle gözlemlenebilmektedir.

5.1.2. Hasta 2

Hastada *ASAH1* geninde olası patojen olarak sınıflandırılan (NM_177924.5) c.119G>T (p.Gly40Val) homozigot varyantı belirlenmiştir. *ASAH1* genindeki biallelik patojenik varyantların, bu genin ürünü olan asit seramidaz enzim seviyesini azaltarak, “Farber lipogranülopatisi (OMIM #228000)” ve “Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA (SMAPME, OMIM #159950)”ya yol açtığı bilinmektedir (169). Farber lipogranülopatisi erken başlangıçlı subkutan nodüller, ağırlı ve ilerleyici eklem deformiteleri ve larinks etkilenimi nedeniyle kaba sesin olduğu bir lizozomal depo hastalığı olup, bu hastalıkta nörolojik etkilenimin daha az sıklıkta olduğu gözlenmektedir. SMAPME ise genellikle

çocukluk çağında başlayan ve spinal motor nöronların hasarına bağlı gelişen proksimal kas güçsüzlüğü ve kas atrofisini takiben ortaya çıkan miyoklonik epilepsiler ile karakterize bir hastalıktır (37). Bu hastalıklar ve *ASAH1* genindeki patojenik varyantlar arasında net bir genotip-fenotip ilişkisi kurulamamış olmakla birlikte, asit seramidaz proteininin α -subünitini (1-145. aminoasitler arası) kodlayan bölgede yerleşen varyantların daha çok SMAPME ile, β - subünitini (146-395. aminoasitler arası) kodlayan bölgede yerleşen varyantların ise “Farber lipogranülo-matozis” kliniği ile ilişkili olduğu bilinmektedir (169). Ek olarak, hastamızda saptanan c.119G>T (p.Gly40Val) varyantı ile aynı kodonda bulunan homozigot c.118G>C (p.Gly40Arg) varyantı veri tabanlarında (130) SMAPME kliniği ile ilişkilendirilmiştir (ClinVar ID: 873542). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurularak, hastada var olan ilerleyici SMA ve epilepsi kliniğinin de *ASAH1* geni ile ilişkili “Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA (SMAPME) (159950)” ile uyumlu olduğu düşünülmektedir.

Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA, ilk olarak alt motor nöron hastalığı bulguları ile üç ila yedi yaşlar arasında ortaya çıkmakta ve genellikle ekstremiteler proksimalinde, özellikle üst ekstremitelerde baskın miyoklonik ve atonik nöbetler motor nöron şikayetlerini takiben belirginleşmektedir (68, 170, 171). Hastalardaki kas güçsüzlüğünün genel olarak erken çocukluk döneminde ortaya çıktığı bilinmekle birlikte, kas güçsüzlüğünün 10 yaşından sonra ortaya çıktığı ve 15 yaşında EMG testinde motor nöron etkileniminin gösterildiği hastalar da bildirilmiştir (172). Ayrıca, literatürde miyoklonik epilepsinin kas güçsüzlüğünden önce başladığı hasta bildirimleri de mevcuttur (172, 173). Hastamızda var olan geç

başlangıçlı alt motor nöron bulgularının, iki ayrı dönemde başlayan ilki benign seyirli ve ikincisi aksiyel miyotonik karakterdeki nöbetlerin literatürde de örnekleri bulunan (172, 173) atipik seyirli bir SMAPME kliniği ile uyumlu olduğunu söylenebilir.

5.1.3. Hasta 3

Hastamızda *PLA2G6* geninde olası patojen olarak sınıflandırılan (NM_003560.4) c.1094T>G (p.Met365Arg) homozigot varyantı saptanmıştır. *PLA2G6* geninin biallelik patojenik varyantları klinik ağırlığına göre “İnfanıl nöraksonal distrofi 1 (INAD1, OMIM #256600)”, “Beyinde demir birikimi ve nörodejenerasyon 2 (Atipik nöraksonal distrofi (NAD), OMIM #610217)” ve “OR Parkinson hastalığı 14 (OMIM #612953)” ile ilişkilendirilmiştir. INAD1 genellikle 6 ay ile 3 yaş arasında gelişimsel gerilik veya regresyon, hipotoni ve progresif spastik ataksi gibi bulgular göstermektedir. Atipik NAD ise çocukluktan 2. dekatın sonlarına kadar değişen başlangıç yaşı ve ataksi, konuşma geriliği, otistik özellikler, nöropsikiyatrik bozukluklar gibi bulgular ile başlayabilmektedir. *PLA2G6*-ilişkili Parkinson hastalığında ise yürüme zorluğu, nöropsikiyatrik değişiklikler, distoni ve kognitif etkilenmenin eşlik edebildiği parkinsonizm tablosu genellikle erken erişkinlik döneminde kendini göstermektedir (37, 174). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında, hastadaki erken başlangıçlı nörogelişimsel gerilik, spastisite ve motor nöron tutulumu ile seyreden fenotipin *PLA2G6* geni ile ilişkili INAD1 ile uyumlu olduğu düşünülmektedir.

“Phospholipase A2, Group VI” genindeki varyantlarla, ilgili nörodejeneratif hastalıkların genotip-fenotip korelasyonu açısından net bir kural gösterilemediği ifade edilmektedir (175). Buna karşın, biallelik yıkıcı varyantların -nonsense-mediated mRNA decay mekanizmasını aktive eden- ve kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 proteinin katalitik aktivitesini ciddi ölçüde etkileyen yanlış anlamlı varyantların INAD1 kliniğine yol açtığı bildirilmektedir. Ayrıca, biallelik yıkıcı varyantların daha erken yaşta klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmektedir (176). OR Parkinson hastalığı 14’te proteinin katalitik aktivitesinde değişiklik olmadığı bilinmekte, atipik NAD’ta ise genellikle yanlış anlamlı varyantlar tespit edilmektedir (174). ClinVar veri tabanında (130) patojen/olası patojen olarak sınıflandırılan 51 yanlış anlamlı varyantın 16’sının INAD1 kliniği ile uyumlu olduğu belirtilmektedir. Hastamızdaki biallelik yanlış anlamlı varyantın, literatürdeki diğer INAD1 hastalarıyla klinik ve moleküler olarak benzer özellikler gösterdiği söylenebilir.

5.1.4. Hasta 4 ve 5

Hastalarımızda *PYROXD1* geninde patojen olarak sınıflandırılan (NM_024854.5) c.464A>G (p.Asn155Ser) ve c.486delA (p.Val163CysfsTer9) varyantlarının birleşik heterozigot olarak bulunduğu belirlenmiştir. Literatür araştırmasında bulunabildiği kadarıyla, günümüze kadar on üç ailede yirmi hasta *PYROXD1* geni ile ilişkili “Miyofibriler miyopati 8” hastası olarak bildirilmiştir (152-155, 177). Hasta 4 ve 5’deki birleşik heterozigot varyantlardan biri olan

c.464A>G (p.Asn155Ser), literatürdeki hastalarda da en sık saptanan patojen varyanttır (152-155). Yapılan genotip-fenotip korelasyonunda c.464A>G (p.Asn155Ser) varyantının, homozigot veya başka bir yanlış anlamlı varyant ile birleşik heterozigot iken çocukluk çağı veya erişkin yaşta başlayan limb-girdle musküler distrofi kliniğine yol açtığı belirtilmiştir (155). Bunun yanında, mRNA kırılma işlemini etkileyerek yıkıcı etki oluşturması beklenen bazı varyantların birleşik heterozigotluğu durumunda, hastalığın başlangıç zamanının doğuma ya da erken bebeklik dönemine kadar öne gelebildiği ileri sürülmektedir (155). Hastalarımızda ise yanlış anlamlı c.464A>G (p.Asn155Ser) ve çerçeve kayması yoluyla yıkıcı etki oluşturması beklenen c.486delA (p.Val163CysfsTer9) varyantları birleşik heterozigot olarak bulunmaktadır ve her iki hastanın da klinik bulguları çocukluk çağında başlamıştır. Yıkıcı etki oluşturması beklenen c.486delA (p.Val163CysfsTer9) varyantının homozigot olmamasının, hastaların kliniğinin doğumda ya da bebeklik döneminde değil de çocukluk çağında başlaması üzerinde bir faktör olduğu söylenebilir.

Miyofibriler miyopatiler ortak morfolojik bulgular üzerinden tanımlanmış bir nöromusküler hastalık grubunu ifade etmektedir. Bu morfolojik bulgular, Z diskinde başlayan miyofibriler düzensizliği takiben miyofibriler yıkım ürünlerinin birikmesi ve anormal lif bölgelerinde çok sayıda proteinin ektopik ekspresyonundan oluşmaktadır (178). Bugüne kadar en az dokuz farklı genle ilişkilendirilmiş miyofibriler miyopati tanımlanmıştır (37). Bunlardan özellikle *BAG3* geniyle ilişkili “Miyofibriler miyopati 6 (OMIM #612954)” hastalarında sıklıkla aksonal ve demiyelinizan polinöropati bildirilmiştir (179-181). Uzunluğa

bağlı aksonal motor nöropatinin elektrofizyolojik çalışmalar ve klinik bulgularla desteklendiği bir başka hasta, *MYOT* geninde yanlış anlamlı bir varyant nedeniyle “Miyofibriler miyopati 3 (OMIM #609200)” olarak tanımlanmış ve hastanın takibinde yapılan görüntülemelerde miyopatiyi destekleyen bulgular saptanmıştır (182). *PYROXD1* geniyle ilişkili “Miyofibriler miyopati 8 (OMIM #617258)”ın ilk kez tanımlandığı hasta grubundan olan iki kardeşte de aksonal duysal nöropati bildirilmiştir (152). Ayrıca, *PYROXD1* geniyle ilişkili “Miyofibriler miyopati 8 (OMIM #617258)” tanısı konulan aynı aileden üç hastanın kas biyopsisinden yapılan patolojik değerlendirmelerinde, ilerlemiş kronik nörojenik sendromlarla uyumlu özellikler gösteren doku bulguları olduğu rapor edilmektedir (154). Bu bilgiler göz önüne alındığında, hastalarımızda denervasyon sürecine işaret eden kas biyopsisi ve miyopati-SMA ayrımının yapılamadığı elektrofizyolojik çalışma sonuçlarının, miyofibriler miyopatiye özgü kas tutulumundan kaynaklandığı söylenebilir.

5.1.5. Hasta 6 ve 7

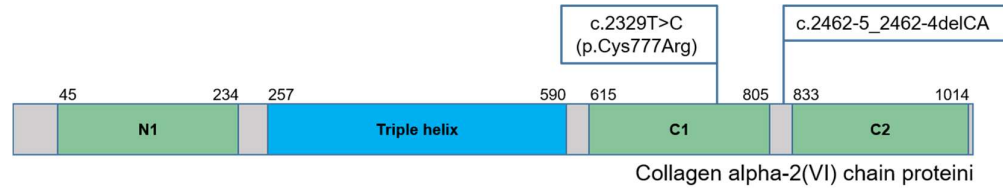
Hastalarımızda *COL6A2* geninde sırasıyla olası patojen ve klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılan (NM_001849.3) c.2329T>C (p.Cys777Arg) ve c.2462-5_2462-4delCA varyantlarının bileşik heterozigot durumda oldukları belirlenmiştir. Üç kollajen VI geninin (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*) her biri, iki ana tip kas hastalığı ile ilişkilendirilmiştir; bunlardan Ullrich konjenital musküler distrofi 1 (UKMD, OMIM #254090) daha ağır fenotip gösterirken, Bethlem

miyopati 1 (BM, OMIM #158810) hafif-orta klinik ile seyretmektedir (37). Ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşeni olan kollajen VI kas, tendon, cilt, kıkırdak ve intervertebral disk gibi birçok dokuda bulunmaktadır (183). UKMD hastalarında yapılan kas biyopsilerinde, dejenerasyon-rejenerasyon ve kas dokusunun yağ ve fibrotik bağ dokusu ile yer değiştirdiği distrofik özellikler saptanmaktadır. Kollajen VI'ya spesifik immünfloresan boyamada, endomisyum ve bazal laminada kollajen VI'nın ciddi oranda veya tamamen kaybolduğu izlenebilmektedir. BM'de ise kas biyopsisinde miyopatik veya distrofik değişiklikler saptanabilmekte, kastan yapılan kollajen VI immünfloresan boyama sonucu genellikle normal veya minimal değişikliklerle sonuçlanmaktadır (183). BM hastalarının cilt fibroblastlarından yapılan kollajen VI immünfloresan analizleri daha iyi sonuç verebilir (183, 184).

Kollajen VI ile ilişkili hastalıklarda, CK seviyeleri normal veya normalin 5 katı kadar artmış olabilmektedir (183). Hastalarımızın da CK seviyelerinin normalin 2-3 katı kadar arttığı izlenmekteydi. Kollajen VI ile ilişkili hastalıklarda yapılan EMG'lerde genellikle miyopatik değişiklikler saptanmaktadır (183). Bununla birlikte, bazı hastalarda normal EMG bulguları veya nörojenik bulgular da saptanabilmektedir (183). Kollajen VI ile ilişkili kas hastalıklarının değerlendirildiği farklı çalışma gruplarında, EMG'de nörojenik tutulumun yaygın olarak saptandığı bildirilmektedir (185, 186). Hastalarımızın da EMG değerlendirmelerinde, motor nöron veya aksonlarda nörojenik tutulum izlendiği rapor edilmektedir.

Kollajen VI ile ilişkili hastalıklar içinde spektrumunun farklı uçlarında bulunan UKMD ve BM hastalıkları, klinik özelliklerine göre tanımlanmaktadır. Her iki hastalık da özellikle proksimal veya generalize, yavaş ilerleyici bir kas güçsüzlüğüne yol açmaktadır. Bu hastalıklardan UKMD genellikle erken bebeklik döneminde bulgu verirken, BM’de bulgular çocukluk ve erken erişkinlik döneminde ortaya çıkmaktadır. UKMD hastaları ilk dekatta genellikle yürüyemez veya yürüme yetilerini kaybetmektedirler. BM hastalarında ise motor gelişim normal ya da hafif etkilenmiş olarak gözlenir ve bu hastaların tamamı yürüyebilmektedir. UKMD hastalarının proksimal eklemlerinde kontraktürler, distal eklemlerinde (parmak, el ve ayak bilekleri) artmış laksisite saptanmaktadır. BM hastalarında ise el-ayak bileklerinde ve uzun parmak fleksör kaslarında kontraktür görülebilmektedir. UKMD hastalarında erken dönemde solunum yetmezliği gelişebilirken, BM’de 4.-5. dekatlara kadar solunum etkilenmesi beklenmemektedir (183). Hastalarımızın her ikisinde de çocukluk döneminde önce proksimal kas gruplarında başlayan ve daha sonra distal kas gruplarının da etkilendiği kas güçsüzlüğü izlenmektedir. Yaşı daha büyük olan ve hastalığının daha ileri evrede olduğu gözlemlenen hasta 6’nın ayak bileği eklem açıklığındaki kısıtlanma ve hastalığın başlangıç yaşı göz önüne alınarak, hastalarımızın tanısının fenotipin daha hafif bir seyir gösterdiği BM ile uyumlu olduğu söylenebilir. Literatürde de hastalardaki SMN1-dışı SMA ve aksonal CMT klinik bulgularının varlığı nedeniyle moleküler genetik etiyolojilerinin değerlendirildiği geniş bir kohortta, kollajen VI kodlayan genlerde patojen varyantların belirlenmesi sonrasında UKMD ve BM tanısı konulan hastalar olduğu bildirilmektedir (114).

Hastalarımızda *COL6A2* geninde saptanan c.2329T>C (p.Cys777Arg) varyantının, literatürde bildirilen hastalarda sadece homozigot durumda saptandığı, bu hastaların ilerleyici bir klinik seyir gösterdikleri ve tekerlekli sandalyeye bağımlı hale geldikleri belirtilmektedir (156-159). Bu güne kadar bildirilen hastaların hiç birinde bu varyantın birleşik heterozigot olduğu hasta rapor edilmemiştir. Hastalarımızda heterozigot olarak belirlediğimiz (NM_001849.3) c.2329T>C (p.Cys777Arg) varyantının homozigot olması durumunda dokuda kollajen VI miktarını azalttığı gösterilmiş olmakla beraber, hangi mekanizma ile bunun gerçekleştiği henüz açık değildir (157, 158). Bu varyantın, proteinin C-terminal ucuna daha yakın olduğu ve ilk C-terminal globuler (C1) domaininde yerleştiği bilinmektedir (Şekil 20) (141). Proteinin C1 domainindeki yanlış anlamlı varyantların genellikle OR kalıtım gösteren UKMD tanısı konulan hastalarda saptandığı bildirilmektedir (156, 185).



Şekil 20. *COL6A2* tarafından kodlanan kollajen alfa-2 (VI) zincirinin domainlerini ve hastalarda saptanan varyantların yerleşim yerlerini gösteren şema.

Hastalarımızda *COL6A2* geninde saptanan diğer varyant olan c.2462-5_2462-4delCA ise proteinin ikinci C-terminal (C2) domainini kodlayan son ekzon olan 28. ekzonun, ekzon-intron bileşkesinin akseptör kırılma bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 20) (140, 141). Bu varyanta yakın yerleşimli şu ana kadar bilinen tek kırılma bölgesi varyantı olan c.2462-3C>A, OR kalıtım gösteren ve

klirik olarak orta-ilerleyici UKMD tanısı konulan bir hastada etiyolojiden sorumlu olarak literatürde belirtilmektedir (185). Belirtilen hastadaki bu varyant, son ekzonda bulunması nedeniyle muhtemelen “nonsense-mediated mRNA decay” mekanizmasını aktiveştirmeyen c.2642delA (p.Gln881ArgfsTer13) varyantı ile birleşik heterozigot olarak rapor edilmektedir (185). C2 domainin kaybına yol açması muhtemel olan c.2455C>T (p.Gln819Ter) varyantı, C2 domaininde yerleşen başka yanlış anlamlı varyantlarla birleşik heterozigot olduğu durumlarda daha hafif klinik tablonun hakim olduğu BM ile ilişkilendirilmektedir (187). Buna karşın, c.2455C>T (p.Gln819Ter) varyantının homozigot olduğu durumlar, *COL6A2* geni ile ilişkili olduğu bilinen ve erken dönemde ciddi kontraktürlerin görüldüğü “Miyoskleroz miyopati (OMIM #255600)” hastalarında da saptanmıştır (188). Bir varyantın homozigot veya birleşik heterozigot olması durumlarının farklı klinik tablolara yol açabildiği göz önüne alındığında, hastalarımızda saptanan ve daha önce bildirilmemiş olan bu varyant kombinasyonunun var olan klinik tabloyla muhtemel ilişkisi daha önemli hale gelmektedir.

Hastalarımızda *GNAS* geninde saptanan ve patojen olarak sınıflandırılan heterozigot (NM_016592.4/ENST00000313949.7) c.101G>A (p.Trp34Ter) varyantının maternal kalıtıldığı belirlenmiştir. Maternal allelin etkilenmesi ile oluşabilen psödohipoparatiroidizm Ib’de özellikle parathormon direnci görülürken, bazı hastalarda tiroid stimulan hormon direnci de görülebilmektedir (189). Kognitif becerilerin normal olduğu bu hastalarda Albright herediter osteodistrofi kliniği beklenmezken, hafif brakidaktili ve Madelung deformitesi ile iskelet anomalileri görülebilmektedir (189). Hastalarımızın biyokimyasal testlerinde kalsiyum-fosfat

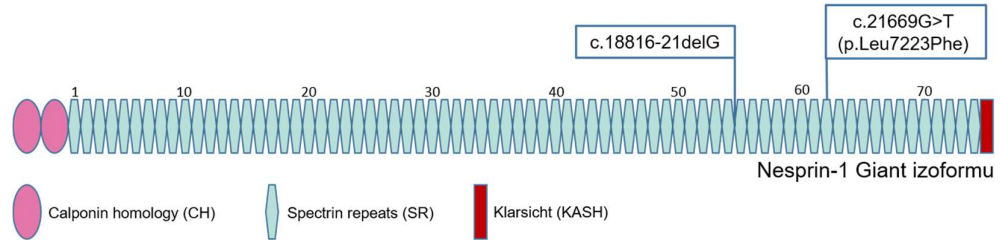
metabolizma değerleri normal saptanmakla birlikte, muayenede ve iskelet görüntülemelerinde 4-5. metakarpal kısılıkları dikkati çekmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında, hastalardaki hafif iskelet bulguları *GNAS* geninde saptanan maternal kalıtlımlı heterozigot (NM_016592.4/ENST00000313949.7) c.101G>A (p.Trp34Ter) varyantın varlığı ile açıklanabilen “Psödohipoparatiroidizm Ib (OMIM #603233)” olarak düşünülmektedir. Bu nedenle görülebilecek endokrinolojik problemler açısından hastalarımızın Pediyatrik Endokrinoloji bölümüne yönlendirilmesi planlanmıştır.

5.1.6. Hasta 8 ve 9

Hastalarımızda *SYNE1* geninde saptanan ve klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılan (NM_182961.4) c.21669G>T (p.Leu7223Phe) ve c.18816-21delG varyantlarının birleşik heterozigot durumda bulundukları belirlenmiştir. *SYNE1* geni ile ilişkili olduğu bilinen üç ana hastalık bulunmaktadır (37). Bu hastalıklardan “OR spinoserebellar ataksi 8 (Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 8, SCAR8, OMIM #610743)” birkaç ekstraserebellar semptomla birlikte genellikle 2.-3. dekatta bulguların başladığı OR spinoserebellar ataksi tipi olarak tanımlanmıştır (190). Sonradan bildirilen hastalar ve geniş kohortlarla SCAR8, motor nöron etkilenimi ile birlikte başka nörolojik problemlerin de görülebildiği ve daha erken başlangıç yaşının olabildiği bir nörodejeneratif hastalık olarak tanımlanmıştır (191-193). *SYNE1* geniyle ilişkili bir diğer hastalık olan otozomal dominant kalıtlımlı “Emery-Dreifuss musküler distrofi 4 (EDMD4, OMIM #612998)”, ilk kez EMG’de

miyopati ve kas biyopsisinde musküler distrofi ile uyumlu bulguların varlığıyla 10 yaşında bir hastada tanımlanmış olup, daha sonra hastada boyunda ve omuz kuşağında kas güçsüzlüğü ile seyrettiği bildirilmiştir (194). İntrauterin dönemde başlangıç gösteren azalmış fetal hareketler, hipotoni, iskelet defektleri ve motor gelişimde gecikme gibi bulgularla karakterize ağır bir fenotip sergileyen OR kalıtmımlı “miyojenik tip artrogripozis multipleks kongenita 3 (Arthrogryposis multiplex congenita 3, myogenic type, AMC3, OMIM #618484)” ise *SYNE1* geniyle ilişkili son hastalıktır (195).

“Spectrin Repeat-Containing Nuclear Envelope Protein 1” geni alternatif izoformların üretilmesini sağlayan farklı başlangıç ve bitiş bölgelerine sahiptir (140). En büyük izoform olan NM_182961.4 transkripti 8797 aminoasit uzunluğunda Nesprin-1 Giant (NP_892006.3) izoformunu kodlamaktadır (141). Bu izoformun N-terminal bölgesinde aktin-bağlayıcı özellik gösteren iki adet ardışık yerleşimli “kalponin-homoloji” (calponin-homology, CH) domaini, takibinde 74 adet “spektrin tekrarları” (spectrin repeats, SR) ve C-terminalde “klarsicht” (KASH) domaini bulunmaktadır (Şekil 21) (141). Yapılan genotip-fenotip korelasyon çalışmalarında, KASH domaininde ve bu domaine çok yakın SR domainlerinde yerleşen biallelik yıkıcı varyantların AMC3 ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (196). EDMD4 için yanlış anlamlı varyantların belli bir sıcak nokta seçmeyen fakat muhtemel fonksiyon kazandırıcı özellikte belirtilmektedir (196). Son olarak, SCAR8’de çok farklı varyant tipleri biallelik olarak saptanmakla birlikte, hastalıkla doğrudan ilişkili olabileceği düşünülen belirli bir sıcak nokta tespit edilememektedir (196).



Şekil 21. Nesprin-1 Giant izoformunun domainlerini ve hastalarda saptanan varyantların yerleşim yerlerini gösteren şema.

Hastalarda *SYNE1* geninde birleşik heterozigot varyantlardan biri olarak saptanan yanlış anlamlı c.21669G>T (p.Leu7223Phe) varyantı, bu gene ait NM_182961.4 transkriptinin kodladığı en büyük izoform olan Nesprin-1 Giant izoformunun 62. SR domaininde yerleşmektedir (141). Bu gendeki yanlış anlamlı varyantların fonksiyon kazandırma mekanizmasıyla EDMD4 kliniği ile ilişkili olduğu düşünülmekle birlikte (196), SCAR8 hastalarında da yanlış anlamlı varyantlar bildirilmektedir. Özellikle motor nöron etkilenimi de bulunan bazı SCAR8 hastalarında, SR domainlerinden birinde yerleşen heterozigot yanlış anlamlı bir varyantın, SR domainlerinde yerleşen başka bir heterozigot yanlış anlamlı varyantla (197-200) veya yıkıcı varyantlarla (193, 201) birleşik heterozigot olduğu durumlar bildirilmiştir.

Komplike SCAR8 hastalarının yarısından fazlasında görülen ek fenotipik özellik motor nöron hastalığıdır. Hastaların %31'inde izole üst motor nöron disfonksiyonu, %8'inde izole alt motor nöron disfonksiyonu ve %19'unda kombine üst ve alt motor nöron disfonksiyonu bulunduğu bildirilmektedir (192). Genel olarak hastalarda öncelikle ataksi, dizartri gibi serebellar tutulumla uyumlu bulgular, ardından motor nöron tutulumuna ait bulgular ortaya çıkmaktadır (192).

Buna karşın motor nöron etkileniminin daha erken başladığı, sonradan serebellar etkilenimin eklendiği hastalar da bildirilmiştir (114, 191, 200). SCAR8 hastalığının atipik seyirlerine sıklıkla rastlanıyor olması nedeniyle birleşik heterozigot olarak belirlenen *SYNE1* nadir varyantlarının hastalarımızdaki fenotipten sorumlu olma ihtimali bulunmaktadır. Klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılan bu nadir varyantların patojenitesinin belirlenebilmesi için ek çalışmalara ve hasta bildirimlerine ihtiyaç vardır.

5.2. Moleküler mekanizmalar

Spinal musküler atrofi/alt motor nöron hastalığı fenotip gösteren hastalarda yapılan WES analizleri sonrasında *TBCE*, *ASAH1*, *PLA2G6*, *PYROXD1*, *COL6A2* ve *SYNE1* genlerinde varyantlar belirlenmiştir. *TBCE* geni mikrotübül yapıda hücre iskeletinin organizasyonu, mitotik iğın organizasyonu ve tubulin katlanmasında görev alan alfa-tubulin bağlanma özelliği gösteren şaperon proteini kodlamaktadır (141, 150). Sfingolipid metabolizmasında görev alan asit seramidaz enzimini kodlayan *ASAH1* geni, asit seramidazın oluşturduğu sfingolipid hidroliz ürünleri aracılığıyla hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi biyolojik süreçlerde rol almaktadır (141, 150). *PLA2G6* geni kodladığı fosfolipaz aktivitesi gösteren protein ile fosfolipid metabolizmasında görev alarak membran homeostazı, mitokondriyal bütünlük ve sinyal iletiminde rol almaktadır (141, 150). FAD-bağımlı oksidoredüktaz aktivitesi gösteren bir enzim kodlayan *PYROXD1* geni hücrenin oksidatif strese yanıtında önem arz etmektedir (141, 150). Kollajen

VI zincirlerinden birini kodlayan *COL6A2* geni, hücre adhezyonu ve ekstrasellüler matriks organizasyonu süreçlerinde bulunmaktadır (141, 150). Aktin bağlayıcı özellikte protein kodlayan *SYNE1*, hücre iskeletinin organizasyon, kas hücresi farklılaşması, mayotik sinapsis ve spermatogenez süreçlerinde görev almaktadır (141, 150). Yukarıda sıralanan değişik biyolojik süreçlerde görev alan genler birbirleriyle ve alt motor nöron hastalıklarında etiyolojide mutasyonları en sık olarak belirlenen *SMN1* geni ile protein-protein etkileşim analizlerinden elde edilen verilerde de görüldüğü gibi (Tablo 14) pek çok farklı yolda etkileşime girmektedir. GIANT ve STRING aracılığıyla oluşturulan gen ağlarında *SMN1* geni ve *SMN1*'in biyogenezinde rol aldığı “spliceosome” kompleksini kodlayan genlerin merkezi bir konumda yerleşmiş olması, *SMN1*'in alt motor nöron hastalıklarındaki önemini vurgulamaktadır.

5.3. WES analizinin etkinliği ve tanı algoritmasındaki yeri

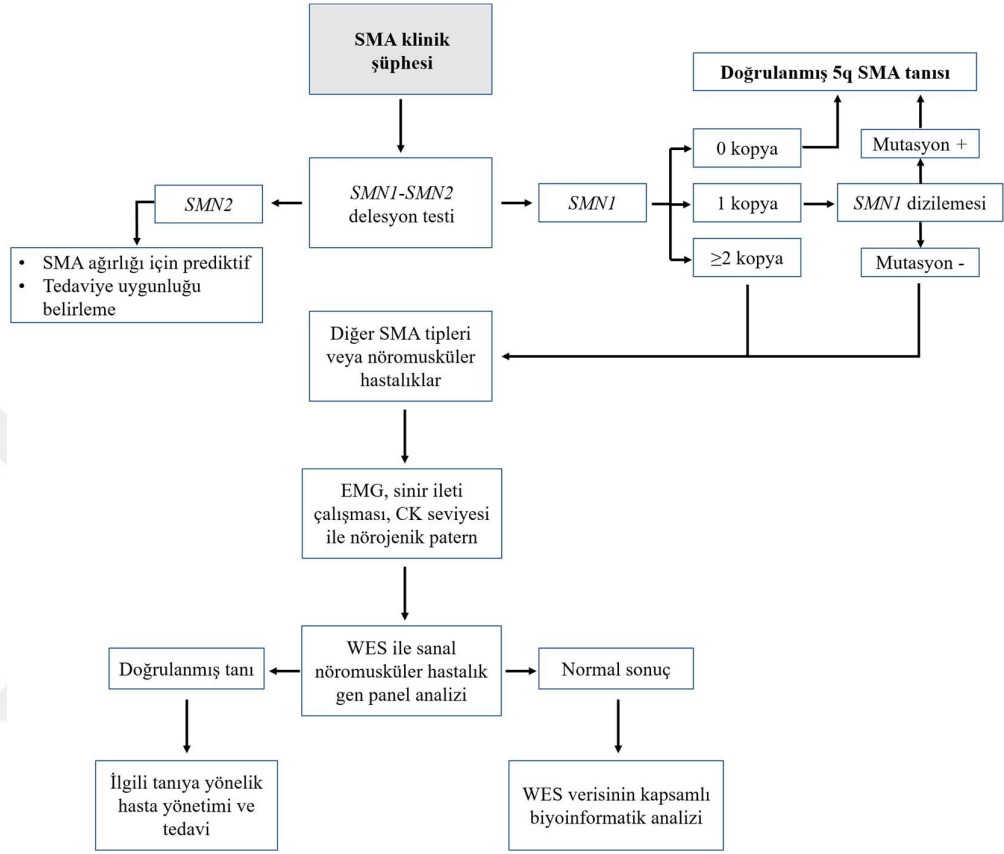
Bu çalışmada SMA/alt motor nöron hastalığı fenotipi gösteren 9 hastanın WES analizinden elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Hastaların 7'sinde nöromusküler hastalıklarla ilişkili patojen/olası patojen varyantlar belirlenirken, 2 kardeşte birleşik heterozigot durumda bulunan klinik önemi belirsiz varyantlar saptanmıştır. Önceki çalışmalarla kıyaslandığında çalışmamızda daha yüksek tanısal başarı oranı elde edilmiştir. Bu durum, çalışmaya alınan hastaların pedigrilerinin çoğunlukla otozomal resesif kalıtımla uyumlu olması ve birden fazla

etkilenmiş bireyin bulunduğu ailelerde etkilenmiş bireylerin tümünün WES analizine alınabilmesi ile açıklanabilir.

Uluslararası “The SMA Care Group” tarafından SMA’nın tanısı ve yönetimi amacıyla hazırlanan kılavuzda (9) *SMNI* delesyonu/nokta mutasyonu dışlanan hastalarda genetik etiyolojinin değerlendirilmesi için nöromusküler hastalık gen panelleri veya WES/WGS gibi kapsamlı analizlerin yapılması önerilmiştir (Şekil 1). SMA/alt motor nöron hastalığı veya aksonal CMT ön tanıları olan hastaların (sırasıyla 95 hasta ve 26 hasta) farklı gen panelleri ile değerlendirildiği 2018 yılındaki bir çalışmada; 62 alt motor nöron hastalığı genini içeren panelle %13 tanısal verim elde edilirken, nöromusküler hastalıklarla ilişkilendirilmiş 479 geni içeren gen panel dizileme analizinde verim %33’e ulaşmıştır (114). Bu analizleri takiben tanı konulamayan hastalarda WES/WGS analizi yapılmış ve ilk panele alınan hastaların %53’üne, ikinci panele alınan hastaların %11’ine ek moleküler tanılar konduğu bildirilmiştir. Her ne kadar bu çalışmanın yazarları tarafından, nöromusküler hastalık gen panelleri yüksek etkinlikleri sebebiyle ilk tanı testi olarak önerilse de (114), her iki panel analizinde tanı konamayan hastalarda kapsamlı analizler tanısal başarı sağlamıştır. Bunun yanında çalışmanın yapıldığı dönemde nöromusküler hastalıklarla ilişkili gen sayısı 479 iken iki yıl içerisinde bu sayı 587’ye ulaşmıştır (202).

Klinik olarak ayırıcı tanı yapılmasının güç olduğu ve tanımlanan yeni sorumlu genlerle birlikte yüksek genetik heterojenite sebebiyle moleküler yöntemlerin tanı için oldukça sağladığı bu hastalık grubunda, hızlıca eskien gen panelleri yerine WES/WGS gibi kapsamlı analizler ilk tanı testi olarak

değerlendirilebilir. Tanı algoritmasında gen panellerinin ilk genetik test olarak kullanılmasının en önemli gerekçelerinden biri olarak, panellerin WES/WGS analizlerine göre daha düşük maliyetli olması belirtilmektedir (12). Bununla birlikte, dizileme teknolojilerinin gün geçtikçe maliyetlerinin azalması sayesinde, WES analizi tanısal etkinliğinin yanı sıra çok daha maliyet-etkin bir yöntem haline gelmiştir (12). Panellerde başlangıçta ıslak laboratuvar aşamasında belirlenen ve yeni gen eklemenin mümkün olmadığı gen listesi yerine, WES analizinde dizilenen tüm protein kodlayan genlerden güncel sanal paneller oluşturularak yüksek tanısal başarı elde edilebilmektedir (203). WES analizinde oluşturulacak nöromusküler hastalık gen panelleri sınırlı birkaç geni içeren hastalık spesifik sanal paneller şeklinde olabileceği gibi tüm nöromusküler hastalık genlerini içeren geniş sanal paneller şeklinde de değerlendirilebilmektedir. Oluşturulacak sanal paneller için gen listeleri OMIM (37), HPO (133), GO (150), “musclegenetable” (115), PanelAPP (204) ve “Development Disorder Genotype - Phenotype Database (DDG2P)” (205) gibi sürekli güncellenen veri tabanlarından sağlanabilir. Ek olarak sanal panellerin analizinde etiyolojiden sorumlu olabilecek bir varyant saptanamayan hastalarda WES verilerinin araştırma düzeyinde analizleri ile yeni gen keşfi mümkün olmaktadır. Bu bakış açısıyla, “The SMA Care Group” tarafından SMA’nın tanısı ve yönetimi amacıyla hazırlanan kılavuzda (9) belirlenen tanı algoritması Şekil 22’de görüldüğü gibi güncellenebilir.



Şekil 22. SMA/alt motor nöron hastalığı tanısı için önerilen algoritma

6. SONUÇLAR

- Bu çalışmada, *SMN1* geninde delesyon bulunmayıp ileri moleküler analiz için refere edilen 9 hastanın WES analizlerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi ile elde edilen veriler, genotip-fenotip korelasyonu yapılarak yorumlanmıştır.
- SMA veya alt motor nöron hastalığı klinik bulgularına sahip olan 6 farklı ailedeki 9 hastanın tamamında, yüksek olasılıkla ya da potansiyel olarak etiyojijyi açıklayabilecek moleküler bir sonuç elde edilmiştir.
- Nöromusküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen *TBCE*, *ASAHI*, *PLA2G6*, *PYROXD1* ve *COL6A2* genlerinde 4'ü ilk kez bu çalışmada belirlenmiş, 2'si literatürde daha önce bildirilmiş olan toplam 6 patojen/olası patojen varyant tanımlanmıştır.
- Nöromusküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen *COL6A2* ve *SYNE1* genlerinde klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılan ancak hastalarımızda klinik bulguları açıklama potansiyeline sahip olduğunu düşündüğümüz 3 varyant saptanmıştır.
- Hasta 1'de *TBCE* geninde tanımlanan olası patojen varyantın "Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati"ye sebep olduğu düşünülmektedir. Böylece, "Amiyotrofi ve optik atrofi ile birlikte progresif ensefalopati" ile ilişkili olması kuvvetle muhtemel ikinci yanlış anlamlı varyant çalışmamızda tanımlanmıştır.

- Hasta 2’de *ASAH1* geninde tanımlanan varyantın, atipik seyirli bir “Progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte SMA” kliniğine yol açtığı düşünülmüştür.
- *PLA2G6* geninde tanımlanan olası patojen varyantın “İnfanıl nöraksanal distrofi” kliniğine yol açtığı düşünülmüştür. Erken dönemde özellikle hipotoni, kas zaafiyeti ve amiyotrofi gibi alt motor nöron tutulumu bulguları ile seyretmesi nedeniyle başlangıçta SMA olarak karakterize edilen hasta 3’e, tanımlanan varyant ile SMA’ya kıyasla daha yaygın nörolojik problemlerle karakterize olan “İnfanıl nöraksanal distrofi” tanısı konulmuştur.
- Hasta 4 ve 5’te *PYROXD1* geninde birleşik heterozigot olarak saptanan varyantların, hafif seyirli bir “Miyofibriler miyopati 8”e yol açtığı düşünülmüştür.
- Hasta 6 ve 7’de *COL6A2* geninde birleşik heterozigot olarak saptanan varyantların “Bethlem miyopati”ye yol açtığı düşünülmüştür. Ek olarak hastalarda, hafif iskelet etkilenimine sebep olan “Psödohipoparatiroidizm Ib” ile uyumlu olduğu düşünülen, maternal kalıtıldığını teyit ettiğimiz, *GNAS* geninde patojen varyant saptanmıştır. Birden fazla moleküler tanının tespiti, WES analizinin klinikte kullanımının ek faydalarından birini göstermektedir.
- Miyofibriler miyopatide ve Bethlem miyopatide EMG ve kas biyopsisinde genelde miyopati ile uyumlu bulgular saptanmasına rağmen hastalarımızda nörojenik bulgular izlenmektedir. Nöromusküler hastalıkların

etiyojilerini araştırırken klinik, elektrodagnostik, histopatolojik ve moleküler incelemelerin tümünün bir arada değerlendirilmesinin gerekliliği gösterilmektedir.

- Hasta 8 ve 9’da *SYNE1* geninde birleşik heterozigot olarak saptanan klinik önemi belirsiz varyantların, erken dönemde serebellar etkilenimden önce alt motor nöron tutulumu olabilen komplike fenotipli hastaların bildirildiği “Otozomal resesif spinoserebellar ataksi 8”e neden olabileceği düşünülmüştür.
- Sonuç olarak, WES analiz sonuçları dokuz hastanın klinik bulgularına göre yeniden yorumlandığında, dört hastada *TBCE*, *PLA2G6* ve *SYNE1* genleriyle ilişkili olarak alt motor nöron tutulumu olan bir nörodejeneratif hastalık, dört hastada *PYROXD1* ve *COL6A2* genleriyle ilişkili bir miyopati ve bir hastada *ASAH1* geniyle ilişkili SMA-plus sendromu tanısı konulmuştur.
- Bu çalışma nöromusküler hastalıkların ayırıcı tanısının geniş bir yelpazede değerlendirilmesi gerekliliğini ve WES gibi kapsamlı moleküler analizlerin ayırıcı tanıdaki katkısını gözler önüne sermektedir.
- SMA’nın tanısı ve yönetimi amacıyla hazırlanan kılavuzlardaki algoritmaların kapsamlı moleküler analizler ile revize edilmesi gerekliliği görülmektedir.
- SMA/alt motor nöron hastalığının etiyojisi belirlemede WES analizinin etkinliğini değerlendirebilmek için daha büyük hasta gruplarında prospektif çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Morrison BM, editor Neuromuscular diseases. Seminars in neurology; 2016: Thieme Medical Publishers.
2. Darin N, Tulinius M. Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden. Neuromuscular Disorders. 2000;10(1):1-9.
3. Chung B, Wong V, Ip P. Prevalence of neuromuscular diseases in Chinese children: a study in southern China. Journal of child neurology. 2003;18(3):217-9.
4. Rasmussen M, Risberg K, Vøllo A, Skjeldal OH. Neuromuscular disorders in children in south-eastern Norway. Journal of Pediatric Neurology. 2012;10(2):95-100.
5. Woodcock IR, Fraser L, Norman P, Pysden K, Manning S, Childs AM. The prevalence of neuromuscular disease in the paediatric population in Yorkshire, UK; variation by ethnicity and deprivation status. Developmental Medicine & Child Neurology. 2016;58(8):877-83.
6. Amato AA, Russell JA. Neuromuscular disorders: McGraw Hill Professional; 2015.
7. Teoh HL, Carey K, Sampaio H, Mowat D, Roscioli T, Farrar M. Inherited paediatric motor neuron disorders: beyond spinal muscular atrophy. Neural plasticity. 2017;2017.
8. Farrar MA, Kiernan MC. The genetics of spinal muscular atrophy: progress and challenges. Neurotherapeutics. 2015;12(2):290-302.

9. Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, Wirth B, Montes J, Main M, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: part 1: recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscular Disorders*. 2018;28(2):103-15.
10. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*. 2003;33(3):228-37.
11. Schofield D, Alam K, Douglas L, Shrestha R, MacArthur DG, Davis M, et al. Cost-effectiveness of massively parallel sequencing for diagnosis of paediatric muscle diseases. *NPJ genomic medicine*. 2017;2(1):1-7.
12. Volk AE, Kubisch C. The rapid evolution of molecular genetic diagnostics in neuromuscular diseases. *Current opinion in neurology*. 2017;30(5):523-8.
13. Bhatt JM. The epidemiology of neuromuscular diseases. *Neurologic clinics*. 2016;34(4):999-1021.
14. Tawil R, Venance S. *Neuromuscular disorders*: John Wiley & Sons; 2011.
15. Talbot K. Motor neurone disease. *Postgraduate medical journal*. 2002;78(923):513-9.
16. Messacar K, Schreiner TL, Van Haren K, Yang M, Glaser CA, Tyler KL, et al. Acute flaccid myelitis: a clinical review of US cases 2012–2015. *Annals of neurology*. 2016;80(3):326-38.
17. Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM. The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(1):6-14.

18. Darras BT. Non-5q spinal muscular atrophies: the alphanumeric soup thickens. AAN Enterprises; 2011.
19. Werdnig G. Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten. 1891;22(2):437-80.
20. Hoffmann J. Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde. 1893;3(6):427-70.
21. Brzustowicz L, Lehner T, Castilla L, Penchaszadeh G, Wilhelmsen K, Daniels R, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q1 1.2–13.3. Nature. 1990;344(6266):540-1.
22. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell. 1995;80(1):155-65.
23. Wee CD, Kong L, Sumner CJ. The genetics of spinal muscular atrophies. Current opinion in neurology. 2010;23(5):450-8.
24. Adam M, Ardinger H, Pagon R, Wallace S, Bean L, Stephens K, et al. Spinal Muscular Atrophy--GeneReviews®.
25. Verhaart IE, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—a literature review. Orphanet journal of rare diseases. 2017;12(1):124.
26. Bertini E, Burghes A, Bushby K, Estournet-Mathiaud B, Finkel R, Hughes R, et al. 134th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Treatment

- of Spinal Muscular Atrophy 11–13 February 2005 Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*. 2005;15(11):802-16.
27. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *Journal of the neurological sciences*. 1997;146(1):67-72.
 28. Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, et al. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *Journal of child neurology*. 2007;22(8):1027-49.
 29. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human mutation*. 2000;15(3):228-37.
 30. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human molecular genetics*. 1999;8(7):1177-83.
 31. Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Human molecular genetics*. 2007;16(24):3149-59.
 32. Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, et al. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: an analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscular disorders*. 2018;28(3):208-15.

33. Beattie CE, Kolb SJ. Spinal muscular atrophy: Selective motor neuron loss and global defect in the assembly of ribonucleoproteins. *Brain research*. 2018;1693:92-7.
34. Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, et al. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nature genetics*. 2004;36(6):602-6.
35. Del Bo R, Locatelli F, Corti S, Scarlato M, Ghezzi S, Prella A, et al. Coexistence of CMT-2D and distal SMA-V phenotypes in an Italian family with a GARS gene mutation. *Neurology*. 2006;66(5):752-4.
36. Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papić L, Kremer H, McEntagart ME, Uhrig S, et al. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nature genetics*. 2010;42(2):160.
37. Elektronik veri tabanı: <https://www.omim.org> (Mayıs 2020).
38. Penttilä S. Genetic background of late-onset spinal motor neuronopathy. 2018.
39. Pitt M, Houlden H, Jacobs J, Mok Q, Harding B, Reilly M, et al. Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness and its relationship to SMARD1. *Brain*. 2003;126(12):2682-92.
40. Li X, Hu Z, Liu L, Xie Y, Zhan Y, Zi X, et al. A SIGMAR1 splice-site mutation causes distal hereditary motor neuropathy. *Neurology*. 2015;84(24):2430-7.

41. Viollet L, Barois A, Rebeiz JG, Rifai Z, Burlet P, Zarhrate M, et al. Mapping of autosomal recessive chronic distal spinal muscular atrophy to chromosome 11q13. *Annals of neurology*. 2002;51(5):585-92.
42. Maystadt I, Rezsöhazi R, Barkats M, Duque S, Vannuffel P, Remacle S, et al. The Nuclear Factor κ B-Activator Gene PLEKHG5 Is Mutated in a Form of Autosomal Recessive Lower Motor Neuron Disease with Childhood Onset. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;81(1):67-76.
43. Blumen SC, Astord S, Robin V, Vignaud L, Toumi N, Cieslik A, et al. A rare recessive distal hereditary motor neuropathy with HSP1 chaperone mutation. *Annals of neurology*. 2012;71(4):509-19.
44. Gopinath S, Blair IP, Kennerson ML, Durnall JC, Nicholson GA. A novel locus for distal motor neuron degeneration maps to chromosome 7q34-q36. *Human genetics*. 2007;121(5):559-64.
45. Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, et al. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nature genetics*. 2004;36(6):597-601.
46. Irobi J, Almeida-Souza L, Asselbergh B, De Winter V, Goethals S, Dierick I, et al. Mutant HSPB8 causes motor neuron-specific neurite degeneration. *Human molecular genetics*. 2010;19(16):3254-65.
47. Kolb S, Snyder P, Poi E, Renard E, Bartlett A, Gu S, et al. Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: utility of a candidate gene approach. *Neurology*. 2010;74(6):502-6.

48. Sumner CJ, d'Ydewalle C, Wooley J, Fawcett KA, Hernandez D, Gardiner AR, et al. A dominant mutation in FBXO38 causes distal spinal muscular atrophy with calf predominance. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;93(5):976-83.
49. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin S-Q, et al. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72(5):1293-9.
50. Christodoulou K, Kyriakides T, Hristova AH, Georgiou D-M, Kalaydjieva L, Yshpekova B, et al. Mapping of a distal form of spinal muscular atrophy with upper limb predominance to chromosome 7p. *Human molecular genetics*. 1995;4(9):1629-32.
51. Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, et al. Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nature genetics*. 2004;36(3):271-6.
52. Auer-Grumbach M, Löscher WN, Wagner K, Petek E, Körner E, Offenbacher H, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in hereditary motor neuronopathy type V: a clinical, electrophysiological and genetic study. *Brain*. 2000;123(8):1612-23.
53. Beetz C, Pieber TR, Hertel N, Schabhüttl M, Fischer C, Trajanoski S, et al. Exome sequencing identifies a REEP1 mutation involved in distal hereditary motor neuropathy type V. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91(1):139-45.

54. McEntagart M, Norton N, Williams H, Teare MD, Dunstan M, Baker P, et al. Localization of the gene for distal hereditary motor neuropathy VII (dHMN-VII) to chromosome 2q14. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68(5):1270-6.
55. Barwick KE, Wright J, Al-Turki S, McEntagart MM, Nair A, Chioza B, et al. Defective presynaptic choline transport underlies hereditary motor neuropathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91(6):1103-7.
56. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature genetics*. 2003;33(4):455-6.
57. Van der Vleuten A, van Ravenswaaij-Arts C, Frijns C, Smits A, Hageman G, Padberg G, et al. Localisation of the gene for a dominant congenital spinal muscular atrophy predominantly affecting the lower limbs to chromosome 12q23–q24. *European Journal of Human Genetics*. 1998;6(4):376-82.
58. Tsai P-C, Soong B-W, Mademan I, Huang Y-H, Liu C-R, Hsiao C-T, et al. A recurrent WARS mutation is a novel cause of autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. *Brain*. 2017;140(5):1252-66.
59. Takata R, Martins CS, Passosbueno M, Abe K, Nishimura A, Da Silva MD, et al. A new locus for recessive distal spinal muscular atrophy at Xq13. 1–q21. *Journal of medical genetics*. 2004;41(3):224-9.
60. Kennerson ML, Nicholson GA, Kaler SG, Kowalski B, Mercer JF, Tang J, et al. Missense mutations in the copper transporter gene ATP7A cause X-linked distal hereditary motor neuropathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(3):343-52.

61. Peeters K, Chamova T, Jordanova A. Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain*. 2014;137(11):2879-96.
62. Monahan Z, Shewmaker F, Pandey UB. Stress granules at the intersection of autophagy and ALS. *Brain research*. 2016;1649:189-200.
63. Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, Geiger D, Segel R, Lee M, et al. Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;85(2):281-9.
64. Gonzaga-Jauregui C, Lotze T, Jamal L, Penney S, Campbell IM, Pehlivan D, et al. Mutations in VRK1 associated with complex motor and sensory axonal neuropathy plus microcephaly. *JAMA neurology*. 2013;70(12):1491-8.
65. Wan J, Yourshaw M, Mamsa H, Rudnik-Schöneborn S, Menezes MP, Hong JE, et al. Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nature genetics*. 2012;44(6):704-8.
66. Boczonadi V, Müller JS, Pyle A, Munkley J, Dor T, Quartararo J, et al. EXOSC8 mutations alter mRNA metabolism and cause hypomyelination with spinal muscular atrophy and cerebellar hypoplasia. *Nature communications*. 2014;5:4287.
67. Burns DT, Donkervoort S, Müller JS, Knierim E, Bharucha-Goebel D, Faqeih EA, et al. Variants in EXOSC9 disrupt the RNA exosome and result in cerebellar atrophy with spinal motor neuronopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2018;102(5):858-73.

68. Zhou J, Tawak M, Tiziano FD, Veillet J, Bayes M, Nolent F, et al. Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in *ASAH1*. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91(1):5-14.
69. Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, et al. Mutations in subunits of the activating signal cointegrator 1 complex are associated with prenatal spinal muscular atrophy and congenital bone fractures. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;98(3):473-89.
70. Böhm J, Malfatti E, Oates E, Jones K, Brochier G, Boland A, et al. Novel *ASCC1* mutations causing prenatal-onset muscle weakness with arthrogryposis and congenital bone fractures. *Journal of medical genetics*. 2019;56(9):617-21.
71. Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, von Rhein M, et al. Rare missense and synonymous variants in *UBE1* are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(1):188-93.
72. Nousiainen HO, Kestilä M, Pakkasjärvi N, Honkala H, Kuure S, Tallila J, et al. Mutations in mRNA export mediator *GLE1* result in a fetal motoneuron disease. *Nature genetics*. 2008;40(2):155.
73. Harms M, Ori-McKenney K, Scoto M, Tuck E, Bell S, Ma D, et al. Mutations in the tail domain of *DYNC1H1* cause dominant spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2012;78(22):1714-20.
74. Tsurusaki Y, Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraishi H, et al. A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics*. 2012;13(4):327-32.

75. Neveling K, Martinez-Carrera LA, Hölker I, Heister A, Verrips A, Hosseini-Barkooie SM, et al. Mutations in BICD2, which encodes a golgin and important motor adaptor, cause congenital autosomal-dominant spinal muscular atrophy. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;92(6):946-54.
76. Oates EC, Rossor AM, Hafezparast M, Gonzalez M, Speziani F, MacArthur DG, et al. Mutations in BICD2 cause dominant congenital spinal muscular atrophy and hereditary spastic paraplegia. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;92(6):965-73.
77. Ravenscroft G, Di Donato N, Hahn G, Davis MR, Craven PD, Poke G, et al. Recurrent de novo BICD2 mutation associated with arthrogryposis multiplex congenita and bilateral perisylvian polymicrogyria. *Neuromuscular Disorders*. 2016;26(11):744-8.
78. DeLong R, Siddique T. A large New England kindred with autosomal dominant neurogenic scapuloperoneal amyotrophy with unique features. *Archives of Neurology*. 1992;49(9):905-8.
79. Deng H-X, Klein CJ, Yan J, Shi Y, Wu Y, Fecto F, et al. Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nature genetics*. 2010;42(2):165.
80. Green P, Wiseman M, Crow YJ, Houlden H, Riphagen S, Lin J-P, et al. Brown-Vialetto-Van Laere syndrome, a ponto-bulbar palsy with deafness, is caused by mutations in c20orf54. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(3):485-9.

81. Johnson JO, Gibbs JR, Megarbane A, Urtizberea JA, Hernandez DG, Foley AR, et al. Exome sequencing reveals riboflavin transporter mutations as a cause of motor neuron disease. *Brain*. 2012;135(9):2875-82.
82. Ciccolella M, Corti S, Catteruccia M, Petrini S, Tozzi G, Rizza T, et al. Riboflavin transporter 3 involvement in infantile Brown-Vialetto-Van Laere disease: two novel mutations. *Journal of medical genetics*. 2013;50(2):104-7.
83. Shashi V, Magiera MM, Klein D, Zaki M, Schoch K, Rudnik-Schöneborn S, et al. Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *The EMBO journal*. 2018;37(23).
84. Morgan NV, Westaway SK, Morton JE, Gregory A, Gissen P, Sonek S, et al. Erratum: PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron (*Nature Genetics* (2006) 38 (752-754)). *Nature Genetics*. 2006;38(8):957.
85. Gregory A, Westaway S, Holm IE, Kotzbauer P, Hogarth P, Sonek S, et al. Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A2. *Neurology*. 2008;71(18):1402-9.
86. Sferra A, Baillat G, Rizza T, Barresi S, Flex E, Tasca G, et al. TBCE mutations cause early-onset progressive encephalopathy with distal spinal muscular atrophy. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(4):974-83.
87. Nousbeck J, Spiegel R, Ishida-Yamamoto A, Indelman M, Shani-Adir A, Adir N, et al. Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(5):1114-21.

88. Orrell RW. Motor neuron disease: Systematic reviews of treatment for ALS and SMA. *British medical bulletin*. 2010;93(1).
89. Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Mitchell D, Swingler R, et al. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2006;1762(11-12):1150-7.
90. Rabin BA, Griffin JW, Crain BJ, Scavina M, Chance PF, Cornblath DR. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 1999;122(8):1539-50.
91. HAMIDA MB, HENTATI F, HAMIDA CB. Hereditary motor system diseases (chronic juvenile amyotrophic lateral sclerosis) Conditions combining a bilateral pyramidal syndrome with limb and bulbar amyotrophy. *Brain*. 1990;113(2):347-63.
92. Zou Z-Y, Liu M-S, Li X-G, Cui L-Y. Mutations in SOD1 and FUS caused juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis with aggressive progression. *Annals of translational medicine*. 2015;3(15).
93. Yang Y, Hentati A, Deng H-X, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*. 2001;29(2):160-5.
94. Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature genetics*. 2001;29(2):166-73.

95. Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74(6):1128-35.
96. Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2010;133(2):591-8.
97. Kwiatkowski TJ, Bosco D, Leclerc A, Tamrazian E, Vanderburg C, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009;323(5918):1205-8.
98. Ticozzi N, Silani V, LeClerc AL, Keagle P, Gellera C, Ratti A, et al. Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology*. 2009;73(15):1180-5.
99. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 2011;70(6):913-9.
100. Katiriji B, Al Jaber MM. Creatine kinase revisited. *Journal of clinical neuromuscular disease*. 2001;2(3):158-64.
101. Chahin N, Sorenson EJ. Serum creatine kinase levels in spinobulbar muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*. 2009;40(1):126-9.
102. Mary P, Servais L, Vialle R. Neuromuscular diseases: Diagnosis and management. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. 2018;104(1):S89-S95.

103. Fischer D, Bonati U, Wattjes MP. Recent developments in muscle imaging of neuromuscular disorders. *Current opinion in neurology*. 2016;29(5):614-20.
104. Werdnig G. Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. 1891. *Archives of neurology*. 1971;25(3):276.
105. Oskoui M, Darras B, De Vivo D. Spinal muscular atrophy: 125 years later and on the verge of a cure. *Spinal muscular atrophy*: Elsevier; 2017. p. 3-19.
106. Srivastava G, Srivastava P. Spinal muscular atrophy—a revisit of the diagnosis and treatment modalities. *International Journal of Neuroscience*. 2019;129(11):1103-18.
107. Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A, et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Human genetics*. 2006;119(4):422-8.
108. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet*. 2016;388(10063):3017-26.
109. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(5):1340-56.

110. Kubo Y, Nishio H, Saito K. A new method for SMN1 and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *Journal of human genetics*. 2015;60(5):233.
111. Holm IA, Yu TW, Joffe S. From sequence data to returnable results: ethical issues in variant calling and interpretation. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2017;21(3):178-83.
112. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405.
113. Vasli N, Böhm J, Le Gras S, Muller J, Pizot C, Jost B, et al. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases. *Acta neuropathologica*. 2012;124(2):273-83.
114. Karakaya M, Storbeck M, Strathmann EA, Delle Vedove A, Hölker I, Altmueller J, et al. Targeted sequencing with expanded gene profile enables high diagnostic yield in non-5q-spinal muscular atrophies. *Human mutation*. 2018;39(9):1284-98.
115. Elektronik veritabanı: <http://www.musclegenetable.fr>. (Eylül 2020).
116. Klein CJ, Middha S, Duan X, Wu Y, Litchy WJ, Gu W, et al. Application of whole exome sequencing in undiagnosed inherited polyneuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2014;85(11):1265-72.

117. Schabhüttl M, Wieland T, Senderek J, Baets J, Timmerman V, De Jonghe P, et al. Whole-exome sequencing in patients with inherited neuropathies: outcome and challenges. *Journal of neurology*. 2014;261(5):970-82.
118. Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, Jones K, Corbett A, Reddel SW, et al. Use of whole-exome sequencing for diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy: outcomes and lessons learned. *JAMA neurology*. 2015;72(12):1424-32.
119. Hartley T, Wagner J, Warman-Chardon J, Tétreault M, Brady L, Baker S, et al. Whole-exome sequencing is a valuable diagnostic tool for inherited peripheral neuropathies: outcomes from a cohort of 50 families. *Clinical genetics*. 2018;93(2):301-9.
120. Fattahi Z, Kalhor Z, Fadaee M, Vazehani R, Parsimehr E, Abolhassani A, et al. Improved diagnostic yield of neuromuscular disorders applying clinical exome sequencing in patients arising from a consanguineous population. *Clinical genetics*. 2017;91(3):386-402.
121. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344-7.
122. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(6):333.
123. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.

124. Elektronik veri tabanı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>. (Şubat 2009).
125. Institute B. Picard tools. Broad Institute, GitHub repository; 2016.
126. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research*. 2010;20(9):1297-303.
127. Desvignes J-P, Bartoli M, Delague V, Krahm M, Miltgen M, Bérout C, et al. VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W545-W53.
128. Elektronik veri tabanı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq> (Mayıs 2020).
129. Elektronik veri tabanı: <https://gnomad.broadinstitute.org>. (Mayıs 2020).
130. Elektronik veri tabanı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>. (Mayıs 2020).
131. Elektronik veri tabanı: <https://www.lovdl.nl> (Mayıs 2020).
132. Elektronik veri tabanı: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>. (Mayıs 2020).
133. Elektronik veri tabanı: <https://hpo.jax.org> (Mayıs 2020).
134. Ellard S, Baple EL, Owens M, Eccles DM, Abbs S, Deans ZC, et al. ea, ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2018. ACGS Guidelines. 2017.
135. Elektronik veri tabanı: <https://varsome.com>. (Mayıs 2020).
136. Elektronik veri tabanı: <https://franklin.genoox.com>. (Mayıs 2020).

137. Pejaver V, Urresti J, Lugo-Martinez J, Pagel KA, Lin GN, Nam H-J, et al. MutPred2: inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants. *BioRxiv*. 2017:134981.
138. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research*. 2009;37(9):e67-e.
139. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P, Brunak S. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic acids research*. 1996;24(17):3439-52.
140. Elektronik veri tabanı: <https://www.ensembl.org>. (Mayıs 2020).
141. Elektronik veri tabanı: <https://www.uniprot.org>. (Mayıs 2020).
142. Elektronik veri tabanı: <https://www.hprd.org> (Mayıs 2020).
143. Elektronik veri tabanı: <https://www.uniprot.org/align>. (Mayıs 2020).
144. Elektronik veri tabanı: <https://gtexportal.org>. (Mayıs 2020).
145. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*. 2011;29(1):24-6.
146. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Human mutation*. 2016;37(6):564-9.
147. Elektronik veri tabanı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. (Mayıs 2020).

148. Wong AK, Krishnan A, Troyanskaya OG. GIANT 2.0: genome-scale integrated analysis of gene networks in tissues. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W65-W70.
149. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*. 2009;37(suppl_1):D412-D6.
150. Elektronik veri tabanı: <http://geneontology.org>. (Eylül 2020).
151. Mosavi LK, Minor DL, Peng Z-y. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(25):16029-34.
152. O'grady GL, Best HA, Sztal TE, Schartner V, Sanjuan-Vazquez M, Donkervoort S, et al. Variants in the oxidoreductase PYROXD1 cause early-onset myopathy with internalized nuclei and myofibrillar disorganization. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(5):1086-105.
153. Saha M, Reddy HM, Salih MA, Estrella E, Jones MD, Mitsuhashi S, et al. Impact of PYROXD1 deficiency on cellular respiration and correlations with genetic analyses of limb-girdle muscular dystrophy in Saudi Arabia and Sudan. *Physiological genomics*. 2018;50(11):929-39.
154. Woods JD, Khanlou N, Lee H, Signer R, Shieh P, Chen J, et al. Myopathy associated with homozygous PYROXD1 pathogenic variants detected by genome sequencing. *Neuropathology*. 2020.

155. Lornage X, Schartner V, Balbuena I, Biancalana V, Willis T, Echaniz-Laguna A, et al. Clinical, histological, and genetic characterization of PYROXD1-related myopathy. *Acta neuropathologica communications*. 2019;7(1):138.
156. Lampe A, Dunn D, Von Niederhausern A, Hamil C, Aoyagi A, Laval S, et al. Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Journal of medical genetics*. 2005;42(2):108-20.
157. Nadeau A, Kinali M, Main M, Jimenez-Mallebrera C, Aloysius A, Clement E, et al. Natural history of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Neurology*. 2009;73(1):25-31.
158. Kim J, Jimenez-Mallebrera C, Foley A, Fernandez-Fuente M, Brown S, Torelli S, et al. Flow cytometry analysis: a quantitative method for collagen VI deficiency screening. *Neuromuscular Disorders*. 2012;22(2):139-48.
159. Liew WK, Darras BT. Teaching NeuroImages: Characteristic phenotype of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Neurology*. 2013;81(7):e44.
160. Bastepe M, Fröhlich LF, Linglart A, Abu-Zahra HS, Tojo K, Ward LM, et al. Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type 1b. *Nature genetics*. 2005;37(1):25-7.
161. Elektronik veri tabanı: <https://reactome.org>. (Eylül 2020).
162. Bahi-Buisson N, Cavallin M. Tubulinopathies overview. *GeneReviews®*[Internet]: University of Washington, Seattle; 2016.

163. Flex E, Niceta M, Cecchetti S, Thiffault I, Au MG, Capuano A, et al. Biallelic mutations in TBCD, encoding the tubulin folding cofactor D, perturb microtubule dynamics and cause early-onset encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(4):962-73.
164. Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, et al. Biallelic TBCD mutations cause early-onset neurodegenerative encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(4):950-61.
165. Ikeda T, Nakahara A, Nagano R, Utoyama M, Obara M, Moritake H, et al. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy. *Journal of human genetics*. 2017;62(4):473-80.
166. Ratbi I, Lyahyai J, Kabiri M, Banouar M, Zerkaoui M, Barkat A, et al. The Bedouin mutation c. 155-166del of the TBCE gene in a patient with Sanjad-Sakati syndrome of Moroccan origin. *Annals of Saudi medicine*. 2015;35(2):170-2.
167. The H, Consortium ARKCS. Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome. *Nature genetics*. 2002;32(3):448.
168. Matsushima N, Miyashita H, Mikami T, Kuroki Y. A nested leucine rich repeat (LRR) domain: the precursor of LRRs is a ten or eleven residue motif. *BMC microbiology*. 2010;10(1):235.
169. Elsea SH, Solyom A, Martin K, Harmatz P, Mitchell J, Lampe C, et al. ASAH1 pathogenic variants associated with acid ceramidase deficiency (ACD):

Farber disease and spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy (SMA-PME). *Human Mutation*. 2020.

170. Gan JJ, Garcia V, Tian J, Tagliati M, Parisi JE, Chung JM, et al. Acid ceramidase deficiency associated with spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy. *Neuromuscular Disorders*. 2015;25(12):959-63.

171. Topaloglu H, Melki J. Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonus epilepsy. *Epileptic Disorders*. 2016;18(s2):S128-S34.

172. Dymont D, Sell E, Vanstone M, Smith A, Garandeau D, Garcia V, et al. Evidence for clinical, genetic and biochemical variability in spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy. *Clinical genetics*. 2014;86(6):558-63.

173. Filosto M, Aureli M, Castellotti B, Rinaldi F, Schiumarini D, Valsecchi M, et al. ASAH1 variant causing a mild SMA phenotype with no myoclonic epilepsy: a clinical, biochemical and molecular study. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24(11):1578.

174. Adam M, Ardinger H, Pagon R, Wallace S, Bean L, Stephens K, et al. PLA2G6-Associated Neurodegeneration--GeneReviews®.

175. Guo Y-p, Tang B-s, Guo J-f. PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN): review of clinical phenotypes and genotypes. *Frontiers in Neurology*. 2018;9:1100.

176. Darling A, Aguilera-Albesa S, Tello CA, Serrano M, Tomás M, Camino-León R, et al. PLA2G6-associated neurodegeneration: new insights into brain

abnormalities and disease progression. *Parkinsonism & related disorders*. 2019;61:179-86.

177. Sainio MT, Välipakka S, Rinaldi B, Lapatto H, Paetau A, Ojanen S, et al. Recessive PYROXD1 mutations cause adult-onset limb-girdle-type muscular dystrophy. *Journal of neurology*. 2019;266(2):353-60.

178. Selcen D, Engel AG. Myofibrillar myopathies. *Handbook of clinical neurology*. 101: Elsevier; 2011. p. 143-54.

179. Hamaguchi M, Kokubun N, Inoue M, Komagamine T, Aoki R, Nishino I, et al. A family with adult-onset myofibrillar myopathy with BAG3 mutation (P470S) presenting with axonal polyneuropathy. *Neuromuscular Disorders*. 2020.

180. Konersman CG, Bordini BJ, Scharer G, Lawlor MW, Zangwill S, Southern JF, et al. BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy. *Neuromuscular Disorders*. 2015;25(5):418-22.

181. Selcen D, Muntoni F, Burton BK, Pegoraro E, Sewry C, Bite AV, et al. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Annals of neurology*. 2009;65(1):83-9.

182. Bourque PR, Breiner A, Warman-Chardon J. Myofibrillar Myopathy Mimicking Polyneuropathy. *Case Reports in Neurology*. 2020;12(1):97-102.

183. Halper J, Kjaer M. Progress in heritable soft connective tissue diseases: Springer; 2014.

184. Hicks D, Lampe A, Barresi R, Charlton R, Fiorillo C, Bonnemann C, et al. A refined diagnostic algorithm for Bethlem myopathy. *Neurology*. 2008;70(14):1192-9.

185. Fan Y, Liu A, Wei C, Yang H, Chang X, Wang S, et al. Genetic and clinical findings in a Chinese cohort of patients with collagen VI-related myopathies. *Clinical genetics*. 2018;93(6):1159-71.
186. Verma S, Goyal P, Guglani L, Peinhardt C, Pelzek D, Barkhaus PE. COL6A and LAMA2 mutation congenital muscular dystrophy: a clinical and electrophysiological study. *Journal of clinical neuromuscular disease*. 2018;19(3):108-16.
187. Gualandi F, Urciuolo A, Martoni E, Sabatelli P, Squarzoni S, Bovolenta M, et al. Autosomal recessive Bethlem myopathy. *Neurology*. 2009;73(22):1883-91.
188. Merlini L, Martoni E, Grumati P, Sabatelli P, Squarzoni S, Urciuolo A, et al. Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology*. 2008;71(16):1245-53.
189. Adam M, Ardinger H, Pagon R, Wallace S, Bean L, Stephens K, et al. Disorders of GNAS Inactivation--GeneReviews®.
190. Gros-Louis F, Dupré N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, et al. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nature genetics*. 2007;39(1):80-5.
191. Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Udaka F, et al. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology*. 2013;80(6):600-1.
192. Synofzik M, Smets K, Mallaret M, Di Bella D, Gallenmüller C, Baets J, et al. SYNE1 ataxia is a common recessive ataxia with major non-cerebellar features: a large multi-centre study. *Brain*. 2016;139(5):1378-93.

193. Mademan I, Harmuth F, Giordano I, Timmann D, Magri S, Deconinck T, et al. Multisystemic SYNE1 ataxia: confirming the high frequency and extending the mutational and phenotypic spectrum. *Brain*. 2016;139(8):e46-e.
194. Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, et al. Nesprin-1 and-2 are involved in the pathogenesis of Emery–Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Human molecular genetics*. 2007;16(23):2816-33.
195. Baumann M, Steichen-Gersdorf E, Krabichler B, Petersen B-S, Weber U, Schmidt WM, et al. Homozygous SYNE1 mutation causes congenital onset of muscular weakness with distal arthrogryposis: a genotype–phenotype correlation. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(2):262-6.
196. Peng Y, Ye W, Chen Z, Peng H, Wang P, Hou X, et al. Identifying SYNE1 Ataxia with novel mutations in a Chinese population. *Frontiers in neurology*. 2018;9:1111.
197. Algahtani H, Marzouk Y, Algahtani R, Salman S, Shirah B. Autosomal recessive cerebellar ataxia type 1 mimicking multiple sclerosis: a report of two siblings with a novel mutation in SYNE1 gene in a Saudi family. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;372:97-100.
198. Coutelier M, Hammer MB, Stevanin G, Monin M-L, Davoine C-S, Mochel F, et al. Efficacy of exome-targeted capture sequencing to detect mutations in known cerebellar ataxia genes. *JAMA neurology*. 2018;75(5):591-9.

199. Swan L, Cardinal J, Coman D. SYNE1-related autosomal recessive cerebellar ataxia, congenital cerebellar hypoplasia, and cognitive impairment. *Clinics and practice*. 2018;8(3).
200. Kim JS, Kim AR, Youn J, Lee C, Kim N-S, Park W-Y, et al. Identifying SYNE1 ataxia and extending the mutational spectrum in Korea. *Parkinsonism & related disorders*. 2019;58:74-8.
201. Fogel BL, Lee H, Deignan JL, Strom SP, Kantarci S, Wang X, et al. Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA neurology*. 2014;71(10):1237-46.
202. Elektronik veri tabanı: <http://www.musclegenetable.fr>. (Eylül 2020).
203. Wang X, Shen X, Fang F, Ding C-H, Zhang H, Cao Z-H, et al. Phenotype-driven virtual panel is an effective method to analyze WES data of neurological disease. *Frontiers in pharmacology*. 2019;9:1529.
204. Elektronik veri tabanı: <https://panelapp.genomicsengland.co.uk>. (Eylül 2020).
205. Elektronik veri tabanı: <https://decipher.sanger.ac.uk/ddd>. (Eylül 2020).

8. ÖZET

“*SMN1* gen delesyonu dışlanmış Spinal Musküler Atrofi ön tanılı çocuklarda etiyolojinin tüm ekzom dizi analizi verilerine dayanarak retrospektif olarak araştırılması”

Motor nöron hastalıkları çocukluk çağında önemli morbidite ve mortalite sebeplerindendir. Genomik düzeydeki tanısal testlerin yaygınlaşması ile motor nöron hastalıklarında tanımlanan farklı genetik etkenlerin sayısı oldukça artmıştır. Çocuklarda en sık kalıtsal motor nöron hastalığı nedeni olan *SMN1* geni ile ilişkili spinal musküler atrofisinin (SMA) tedavi seçeneklerinin uygulamaya girdiği günümüzde, bu fenotipi gösteren hastaların izleminin ve tedavisinin doğru yapılabilmesi için genetik etiyolojilerinin belirlenmesi daha da önemli hale gelmiştir. Bu çalışmada, SMA’nın en sık sebebi olarak bilinen *SMN1* geninin homozigot ekzon 7-8 delesyonu dışlanmış ve SMA/alt motor nöron hastalığı ön tanısı olan dokuz hastada tüm ekzom dizileme (“Whole Exome Sequencing”; WES) verilerinin analizi ile genetik etiyolojilerinin araştırılması amaçlanmıştır. WES analiz sonuçları literatürdeki hastalarla genotip-fenotip korelasyonları yapılarak ve hastaların klinik bulgularına göre yorumlandığında, dört hastaya *TBCE*, *PLA2G6* ve *SYNE1* genleriyle ilişkili olarak alt motor nöron tutulumu olan bir nörodejeneratif hastalık, dört hastaya *PYROXD1* ve *COL6A2* genleriyle ilişkili bir miyopati ve bir hastaya *ASAH1* geniyle ilişkili SMA-plus sendromu tanısı konulmuştur. Bu çalışma, nöromusküler hastalıkların ayırıcı tanısının geniş bir yelpazede değerlendirilmesi gerekliliğini ve WES gibi kapsamlı moleküler analizlerin tanıya katkısını gözler önüne sermektedir.

Anahtar kelimeler: SMN dışı SMA, Tüm ekzom dizileme, Nöromusküler hastalıklar

9. SUMMARY

"Investigation of the etiology in the children with a presumptive diagnosis of Spinal Muscular Atrophy, whose *SMN1* gene deletion was excluded, based on the retrospective data from whole exome sequence analysis"

Motor neuron diseases are one of the important causes of morbidity and mortality in childhood. With the widespread use of diagnostic tests in genomic level, the number of different genetic factors identified in motor neuron diseases has increased considerably. Nowadays, when the treatment options for spinal muscular atrophy (SMA) associated with the *SMN1* gene, which is the most common cause of hereditary motor neuron disease in children, have been put into practice, it has become even more important to determine the genetic etiology of patients with this phenotype in order to follow up and treat them correctly. In this study, it was aimed to investigate the genetic etiology by analyzing whole-exome sequencing (WES) data in nine patients with a presumptive diagnosis of SMA/ lower motor neuron disease in whom homozygous deletion in exon 7-8 of *SMN1* gene, which is known as the most common cause of SMA, were excluded. WES analysis results were interpreted according to genotype-phenotype correlations with the patients, presented in the literature and clinical findings of our patients. Accordingly, four of the patients with a neurodegenerative disease with lower

motor neuron involvement, another four patients with a myopathy and the last patient with a SMA-plus syndrome were associated with the variants in the *TBCE*, *PLA2G6*, and *SYNE1* genes, *PYROXD1* and *COL6A2* genes, and *ASAH1* gene, respectively. This study reveals the necessity of evaluating the differential diagnosis of neuromuscular diseases in a wide range and the contribution of comprehensive molecular analyzes such as WES in diagnosis.

Keywords: Non-SMN SMA, Whole-exome sequencing (WES), Neuromuscular diseases

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Abdullah

Soyadı: Sezer

Doğum Yeri ve Tarihi: İspir/15.11.1991

Eğitimi:

2016-2020 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de Araş. Gör. Dr.

2009-2015 İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Tıbbi Genetik Derneği

European Society of Human Genetics

Bilimsel Etkinlikleri:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Sezer, A., Bayram, M., Kayhan, G., Unal, A., Ozdemir, H., Karcaaltincaba, D., & Karaoguz, M. Y. (2018). Clinical and submicroscopic findings of two prenatal cases with inv dup del (8p) syndrome. *Gene Reports*, 10, 75-78.
2. Sezer, A., Kayhan, G., Zenker, M., & Percin, E. F. (2019). Hypopigmented patches in Roberts/SC phocomelia syndrome occur via aneuploidy susceptibility. *European journal of medical genetics*, 62(12), 103608.

3. Kazan, H. H., Urfali-Mamatoglu, C., Yalcin, G. D., Bulut, O., Sezer, A., Banerjee, S., & Gunduz, U. (2019). 15-LOX-1 has diverse roles in the resensitization of resistant cancer cell lines to doxorubicin. *Journal of cellular physiology*.
4. Sezer, A., Kayhan, G., Koç, A., Ergün, M. A., & Perçin, F. E. (2020). Warburg Micro Syndrome 1 due to Segmental Paternal Uniparental Isodisomy of Chromosome 2 Detected by Whole-Exome Sequencing and Homozygosity Mapping. *Cytogenetic and Genome Research*, 160(6), 309-315.

11. EKLER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu						
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara						
	TELEFON	0312 202 69 58						
	FAKS	0312 202 46 73						
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr						

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	SMN1 gen delesyonu dışlanmış Splinal Musküler Atrofi ön tanılı çocuklarda etiyolojinin tüm ekzom dizi analizi verilerine dayanarak retrospektif olarak araştırılması						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Esra TUĞ						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Genetik AD. / G.Ü.T.F.						
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)							
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Dosya ve görüntü kayıtları kullanılarak yapılan retrospektif çalışmalar veya arşiv taramaları – Uzmanlık tezi						
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐			

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	17.01.2020	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐
	DİĞER	☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 115	Toplantı tarihi: 27.01.2020
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN ÜNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki		Katılım *	İmza
Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN BAŞKAN	Anest. ve Rea. AD, Farmako. Bİ.Dr.	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Gülten TAÇOY BAŞKAN YARD.	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. İlyas OKUR BİLDİRİMDEN SORUMLU ÜYE	Çocuk Sağ. ve Hast AD Ç.Met. Bes BD	G.Ü.T.F	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

Prof. Dr. Nevzat YÜKSEL ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>YMM</i>
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Oylanıyor Katılmadı</i>
Prof. Dr. Nuriye ÖZDEMİR ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ÜYE	Tıbbi Biyokimya A.D	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
Doç. Dr. Hasan BOSTANCI ÜYE	Genel Cerrahi AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
Doç. Dr. Murat UÇAR ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
Doç. Dr. Gökçe S. ÖZTÜRK FİNCAN ÜYE	Tıbbi Farmakoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	Katılmadı
Dr.Öğr.Üyesi A.Meltem SEVGİLİ ÜYE	Tıbbi Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	Katılmadı
Uzm Dr. Emine AVCI ÜYE	Halk Sağlığı	Halk Sağlığı Genel Müd.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
Araş.Gör.Dr. Fahri Erdem KAŞAK ÜYE	Hukukçu	Hacı Bayram Veli Üniv.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Katılmadı</i>
İ. Nüket EKŞİ ÜYE	Sivil Temsilci	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	<i>Katılmadı</i>

- * :Araştırma ile İlişki
- ** :Toplantıda Bulunma