

BURCU RÜSTEMOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SUBKORTİKAL ENFARKT VE LÖKOENSEFALOPATİ
İLE GİDEN SEREBRAL ARTERİYOPATİ
(CADASIL/CARASIL) HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ *NOTCH3*
VE *HTRA1* GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

BURCU RÜSTEMOĞLU

**DANIŞMAN
ZEHRA OYA UYGUNER**

**İKİNCİ DANIŞMAN
GÜVEN TOKSOY**

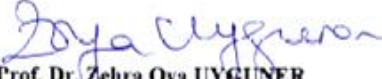
**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Burcu RÜSTEMOĞLU tarafından Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER'in danışmanlığında hazırlanan "**Subkortikal Enfarkt ve Lökoensefalopati ile Giden Serebral Arteriyopati (CADASIL/CARASIL) Hastalığı ile İlişkili NOTCH3 ve HTRA1 Gen Mutasyonlarının Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 02.02.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Seher BAŞARAN
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik A.D.



Doç. Dr. Birsen KARAMAN
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik A.D.



Doç. Dr. Murat KÜRTÜNCÜ
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Nöroloji A.D.

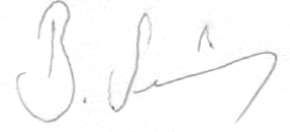


Doç. Dr. Gülsen BABACAN
Bezmialem V. Üni. Tıp Fakültesi
Elektrofizyoloji A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BURCU RÜSTEMOĞLU

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile daima yol gösteren, çalışmalarımı yakından takip edip, yardımlarını esirgemeyen, sevgili tez danışman hocam sayın *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e,

Tezimin her cümlesini büyük bir özveri ve sabır ile okuyarak yol gösteren ve değerli fikirlerini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim sevgili hocam sayın *Prof. Dr. Seher BAŞARAN*'a,

Bilgi ve destekleriyle yanımda olan sevgili hocam sayın *Doç. Dr. Birsen KARAMAN*'a,

Yeni nesil dizileme çalışmalarımda yol gösteren, tezimin her aşamasında yanımda olan, ikinci tez danışmanım ve ağabey olarak gördüğüm sayın *Dr. Güven TOKSOY*'a,

Engin moleküler genetik bilgisiyle hayran bırakan, bilgilerini her daim zaman ayırarak benimle paylaşan, eğitimim sırasında kendisinden çok şey öğrendiğim desteğini her zaman gösteren ve ağabey olarak gördüğüm sayın *Dr. Çağrı GÜLEÇ*'e,

Tezimdeki klinik bilgilerin oluşturulmasında öğretici ve yardımcı olan sayın hocam *Doç. Dr. Murat KÜRTÜNCÜ*'ye, çalışma grubumuzun oluşturulması ve olgu değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın *Uzm. Dr. Şahin AVCI* ve *Uzm. Dr. Mine SEZGİNE*,

Yüksek lisans eğitimim boyunca moral ve motivasyon desteklerini esirgemeyen, bana destek olan değerli çalışma arkadaşlarım *Alev Yalın, Emel Özvardar, Volkan Karaman, Fatih Tepgeç, Ebru Pektaş, Havva Öztürk, Zuhale Kaplan, Nuray Kırmızı, Kadir Kaya* olmak üzere tüm Tıbbi Genetik poliklinik ve laboratuvar çalışanlarına,

Çalışmalarımda bana destek olan sevgili arkadaşlarım *Agharza Aghayev, Adam Najaflı, Somayyeh Heidargholizadeh* 'ye,

Beni bu günlere getiren, eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım aileme, üzerimde emeği olan ve yolumun kesiştiği herkese,

Teşekkür ederim

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20217

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER	19
2.1. Beyin anatomisi	19
2.1.1. Beynin Vasküler Yapısı	21
2.1.1.1. Vasküler Demans	22
2.1.1.2. CADASIL	24
2.1.1.3. CARASIL.....	28
2.1.2. Tanısal Yaklaşım.....	31
2.1.2.1. Klinik tanı.....	31
2.1.2.2. İmmünohistokimyasal bulgular.....	34
2.1.2.3. Genetik Danışma.....	36
2.2. Moleküler Yöntemler.....	37
2.2.1. DNA Dizileme Yöntemleri	37
2.2.1.1. Sanger Dizileme	37
2.2.1.2. Yeni Nesil Dizileme	38
2.2.1.3. Ion Torrent Sistemi ve Özellikleri.....	39
2.2.1.4. Varyant Analizinde Kullanılan Tahmin Programları	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Çalışma Grubu	42
3.2. Olguların Değerlendirilmesi	42

3.2.1. Klinik değerlendirmeler	42
3.2.2. Moleküler Analizler	42
3.2.2.1. DNA eldesi.....	42
3.2.2.2. Sanger Dizileme İçin DNA Kalite Ölçümü	42
3.2.2.3. Primer Tasarlanması.....	43
3.2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	43
3.2.2.5. PZR saflaştırma	44
3.2.2.6. Dizi PZR Reaksiyonu.....	45
3.2.2.7. Kapiller Elektroforez.....	46
3.2.2.8. Kapiller Elektroforez Sonuçları ve Değerlendirmeleri	46
3.2.2.9. Yeni Nesil Dizileme (YND) Tabanlı Panel-Gen Testi	47
3.2.2.10. YND için DNA Kalite Ölçümü.....	47
3.2.2.11. YND paneli için hedef bölgelerin belirlenmesi ve primer tasarımı	47
3.2.2.12. Qubit 2.0 Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü.....	48
3.2.2.13. Hedef bölgelere ait Hot Spot dosyasının oluşturulması	49
3.2.2.14. Kütüphane hazırlanması.....	49
3.2.2.15. Hedef DNA bölgelerinin oğaltılması.....	49
3.2.2.16. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi.....	50
3.2.2.17. Barkodlanan Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması	53
3.2.2.18. Saflaştırılmış Kütüphane Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçümü ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama	53
3.2.2.19. Kütüphanenin kantitasyonu için dilusyon faktörünün hesaplanması ve ölçümü.....	55
3.2.2.20. Taslak (<i>Template</i>) Hazırlanması	55
3.2.2.21. Emülsiyon PZR	55
3.2.2.22. Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi	57
3.2.2.23. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi.....	58
3.2.2.24. Veri Analizi.....	59
3.2.3. YND İle Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Doğrulanması.....	60
4. BULGULAR.....	61
5. TARTIşMA	81
KAYNAKLAR	90
HAM VERİLER	98

FORMLAR	99
PATENT HAKKI İZNİ	107
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	108
ÖZGEÇMİŞ	109



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Küçük damar hastalıklarının özellikleri (20)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.....	23
Tablo 2-2: Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri (90)'dan alınmış ve değiştirilmiştir.	38
Tablo 3-1: PZR programı.....	44
Tablo 3-2: Dizi PZR programı.....	45
Tablo 3-3: 2X primer havuzu için hazırlanan karışım.....	49
Tablo 3-4: Kütüphane PZR solüsyonları	50
Tablo 3-5: Termal döngü programı	50
Tablo 3-6: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı.....	50
Tablo 3-7: Barkod-Adaptör karışımı	51
Tablo 3-8: Barkod-Adaptör ligasyon solüsyonu.....	51
Tablo 3-9: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı.....	51
Tablo 3-10: Kütüphane amplifikasyonu için termal döngü programı	53
Tablo 3-11: Amplifikasyon Çözeltisi.....	56
Tablo 3-12: Zenginleştirmede kullanılan solüsyonlar	58
Tablo 3-13: Dizileme plan şablonu.....	59
Tablo 4-1 Saptanan <i>NOTCH3</i> gen mutasyon bilgileri.....	65
Tablo 4-2 Saptanan <i>HTRA1</i> gen mutasyon bilgileri	66
Tablo 4-3 CADASIL olgularının bilgileri ve klinik bulguları.....	67
Tablo 4-4 CARASIL olgusunun bilgileri ve klinik bulguları.....	69
Tablo 4-5: <i>NOTCH3</i> mutasyonu olan ve olmayan olgularda saptanan bulguların oranı	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Normal beyin dokusu (13)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.	19
Şekil 2-2: Beynin anatomik bölgeleri (14) 'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.	20
Şekil 2-3:Notch Sinyal Yolağının Şematik Gösterimi (2)'den alınmış ve değiştirilmiştir.	27
Şekil 2-4: FLAIR (Fluid-attenuated inversion recover) MRG görüntülemesinde hiperintens alanların bazıları kırmızı oklarla gösterilmiştir. A) Aksiyal kesitte eksternal kapsülde görülen ak madde lezyonları B) Koronal kesitte temporal bölgede ak madde lezyonları C) Aksiyal kesitte temporal bölgedeki ak madde lezyonları	31
Şekil 2-5: CADASIL klinik bulguları ve görülme yaş aralıkları (1)'den alınmış ve değiştirilmiştir.	33
Şekil 2-6: CADASIL küçük damar patolojisi (85)'den alınmış ve değiştirilmiştir.	35
Şekil 2-7: Sanger dizileme aşamaları.....	37
Şekil 3-1: Kütüphane hazırlama aşamaları (21)'den değiştirilerek alınmıştır.	52
Şekil 3-2: <i>Ion OneTouch</i> Emülsiyon PZR cihazı	56
Şekil 3-3: <i>Ion OneTouchTM</i> ES cihazındaki solüsyon yerleşimi.....	57
Şekil 4-1: A) <i>NOTCH3</i> gen ekzonları (ENST00000263388.6, NM_000435.2), B) Çalışmamızda saptanan mutasyonlar ve etkilediği ekzon ile protein domaini üzerindeki yerleri C) Genin kodladığı <i>NOTCH3</i> protein domainleri (Q9UM47, ENST00000263388.6, NP_000426)	63
Şekil 4-2: A) <i>HTRA1</i> gen ekzonları B) Çalışmamızda saptanan mutasyonların hangi ekzon ve protein domainini etkilediği oklarla gösterilmiştir C) <i>HTRA1</i> protein domainleri	64
Şekil 4-3: Olgu 1 (CD#80) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	71
Şekil 4-4: Olgu 2 (CD#149) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	71
Şekil 4-5: Olgu 3 (CD#155) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemeleri.....	72
Şekil 4-6: Olgu 4 (CD#70), aile ağacı ve elektroferogram görüntülemeleri	72
Şekil 4-7: Olgu 5 (CD#157), aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	73
Şekil 4-8: Olgu 6 (CD#99), aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	73
Şekil 4-9: Olgu 7 (CD#100) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	74
Şekil 4-10: Olgu 8 (CD#150) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	75
Şekil 4-11: Olgu 9 (CD#100) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi	75

Şekil 4-12: Olgu 10 (CD#100) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi.....	76
Şekil 4-13: Olgu 11 (CD#64) aile ağacı, IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntülemesi ve elektroferogram görüntülemesi	77
Şekil 4-14: Olgu 12 (CD#112) aile ağacı, IGV görüntülemesi ve elektroferogram görüntülemesi.....	78
Şekil 4-15: Olgu 13 (CD#136) aile ağacı, IGV görüntülemesi ve elektroferogram görüntülemesi.....	79
Şekil 4-16: Olgu 14 (CD#156) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi.....	80
Şekil 4-17: Olgu 15 (CD#98) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi.....	80



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

bç	: Baz çifti
CADASIL	: Subkortikal Enfarkt ve Lökoensefalopati ile giden Otozomal Dominant Serebral Arteriyopati
CARASIL	: Subkortikal Enfarkt ve Lökoensefalopati ile giden Otozomal Resesif Serebral Arteriyopati
ECM	: Ekstraselüler matriks
ECD	: Ekstraselüler domain
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
HTRA1	: (High-Temperature Requirement A Serine Peptidase 1) (Yüksek ısı gerektiren serin peptidaz 1 A) geni
IGV	: Integrative Genomics Viewer
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
N3ECD	: Notch3 ekstraselüler domaini
N3ICD	: Notch3 intraselüler domaini
N3TMD	: Notch3 transmembran domaini
NOTCH3	: Notch homolog 3 geni
PolyPhen-2	: Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	: Protein Variation Effect Analyzer
SD	: Sanger Dizileme
SIFT	: Sorting Tolerant From Intolerant
VaD	: Vasküler demans
VDKH	: Vasküler düz kas hücresi
YND	: Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

Rüstemoğlu, B. Subkortikal Enfarkt ve Lökoensefalopati ile giden Serebral Arteriyopati (CADASIL/CARASIL) hastalığı ile ilişkili NOTCH3 ve HTRA1 gen mutasyonlarının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018

CADASIL, subkortikal enfarkt ve lökoensefalopati ile giden otozomal dominant (OD) serebral arteriyopati, beyindeki küçük damarların vasküler bir faktör olmaksızın tıkanması sonucu, ak maddenin bozulması ile ortaya çıkan sistemik bir mikroanjiyopati hastalığıdır. Otozomal resesif (OR) formu ise çok daha nadir görülen CARASIL'dir. CADASIL, 19p13.12'de lokalize 33 ekzonlu *NOTCH3*'deki mutasyonlarla ilişkili olup ekzon 2-6 ve 11'de frekansının yüksek olduğu bildirilmektedir. CARASIL ise 10q25'de lokalize 9 ekzonlu *HTRA1*'deki mutasyonlarla ilişkilidir.

Amacımız, CADASIL/CARASIL klinik tanılı olgularda *NOTCH3* ile *HTRA1* genlerinin incelenmesi, mutasyon sıklıklarımızın belirlenmesi ve moleküler tanı stratejimizin oluşturulmasıdır. Sonuçlarımızın ailelere etkin genetik danışmanlık verilmesine ve tedavi stratejilerine katkı sağlaması beklenmektedir.

Projede algoritmik bir yaklaşımla 64 olguda *NOTCH3* hedef ekzon bölgeleri 2-6 ve 11, Sanger dizileme (SD) ile, *NOTCH3* tüm gen yeni nesil dizileme (YND) temelli özgün panel-gen testi ile, panelin kapsamadığı bölgeler ve *HTRA1* geni SD ile incelendi.

NOTCH3 hedef bölgelerindeki mutasyon sıklıkları laboratuvarımızda yapılan önceki test sonuçlarıyla birlikte retrospektif olarak değerlendirildiğinde mutasyon oranımız % 20.8 idi. Panel-gen testinin ekzon 19 ve 22'de gösterilen farklı mutasyonlarla tanıya katkısı % 5.5 olarak belirlendi. Panelin kapsamı dışındaki bölgelerde herhangi bir mutasyon saptanmaması, bu bölgelerin tanı gücünün düşük olduğunu gösterdi. Panel-gen uygulamasının büyük kohortlarda birlikte çalışma olanağı sunarak sık ve nadir mutasyonların gösterilmesini sağlaması iş yükü/zaman açısından avantajlı görüldü.

HTRA1 geninde tek bir olguda mutasyon saptandı. Bu durumun klinik kriterlerin heterojenliği ilişkili olabileceği ya da hastalığın toplumumuzda da nadir olduğunu düşündürdü.

NOTCH3 ve *HTRA1* genlerinde mutasyon saptanmayan örneklerin fenotiple ilişkili yeni genlerin araştırılmasına yönelik projelere önemli bir kaynak teşkil etmesi beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: CADASIL, CARASIL, *NOTCH3*, *HTRA1*, Sanger Dizileme, Yeni Nesil Dizileme teknolojisi, IonTorrent Platformu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20217



ABSTRACT

Rüstemoğlu B. Investigation of the *NOTCH3* and *HTRA1* Gene Mutations in Cerebral Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL/CARASIL). İstanbul University, Institute of Health Science, Anabilim Dalının İngilizce Adı Tezi. İstanbul. 2018

CADASIL, cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarction and leukoencephalopathy, is a systemic microangiopathic disease of the brain caused by impaired circulation of the small vessels. Mutations in *NOTCH3* on 19p13.12 are responsible for the phenotype. Of its 33 exons, exons 2-6 and 11 are hot spot regions. Autosomal recessive (AR) form of the disease, CARASIL, is associated with mutations in *HTRA1*- a nine exon gene on 10q25, and is less common.

Our aim is to screen for *NOTCH3* and *HTRA1* genes in clinically diagnosed CADASIL / CARASIL patients, to determine the mutation frequencies and to improve molecular diagnostic strategy. We anticipate that our results will provide effective genetic counseling, and contribute to treatment strategies.

In this project, *NOTCH3* target regions (exons 2-6 and 11) were Sanger sequenced in 64 cases, as well as applying targeted next generation sequencing (NGS) panel for *NOTCH3*. Analyses of missed regions of *NOTCH3* and *HTRA1* were performed by Sanger sequencing.

Mutation frequency of *NOTCH3* target regions, evaluated with the previous test results was 20.8%. NGS panel contributed an additional 5.5% with mutations identified in exons 19 and 22. We observed that NGS decreases work load and time spent in large cohort analysis while easily identifying frequent and rare mutations.

Only one patient had *HTRA1* gene mutation which points to the high clinical heterogeneity of the disease, and its rarity in Turkey.

We expect that cases with no mutations in *NOTCH3* and *HTRA1* genes will be an important resource for the identification of novel genes.

Key Words: CADASIL, CARASIL, *NOTCH3*, *HTRA1*, Sanger Sequencing, NGS, IonTorrent platform

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 20217



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subkortikal enfarkt ve lökoensefalopati ile giden otozomal dominant (OD) ve otozomal resesif (OR) serebral arteriyopati beyindeki küçük damarları etkileyen, kalıtsal nadir bir nörolojik hastalıktır. OD formu CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) OR formu için ise CARASIL (Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) akronimi ile isimlendirilmektedir. Küçük beyin damarlarında gözlenen bulgular benzer de olsa, bu iki hastalık, kalıtım modeli, genetik kökeni, görüntülemedeki farklı belirteçleri, histolojik ve klinik bulguları bakımından farklılıklar göstermektedir.

Yetişkinlerde inme ve vasküler demansın en yaygın kalıtsal nedeni olan CADASIL, orta yaş evresinde (30-60), beyin korteksi altındaki alanı besleyen damarların hipertansiyon, ateroskleroz gibi vasküler bir risk olmaksızın tıkanması sonucu, ak maddenin bozulması ile ortaya çıkan bir sistemik mikroanjiyopati hastalığıdır. Etkilenmiş bireylerde tekrarlayan iskemik ataklar ve inme, auralı yani öncül bulgularla (halüsinasyonlar, konuşma ve ifade etmede güçlük, uyuşmalar, çeşitli düzeyde algılama bozuklukları gibi) gelişen veya aurasız ortaya çıkan migren atak öyküsü, bilişsel beceri kaybı, demans, uyuşukluk, çevreyle ilgisizlik (apati) ve ruhsal durum değişimleri gözlenmektedir. Nörogörüntülemede sporadik küçük damar hastalıklarında olduğu gibi periventriküler ak madde ve sentrum semiovalede iskemik lezyonlar olur. Nadiren bazal çekirdekler ve talamuslarda da lezyon görülebilir. Klinik tanı, kraniyal manyetik görüntülemede (MRG) temporal bölgede ve dış kapsüldeki ak madde lezyonlarını gösteren hiperintens alanların varlığı ile desteklenmektedir (1-3).

CADASIL ilk olarak 1993'de polimorfik belirteçler ile 19.kromozoma bağlantılanmış (4) ve 1996'da ilişkili genin 19p13.12'de *NOTCH3* olduğu gösterilmiştir (5).

CARASIL ile ilişkili genin ise 2009'da bağlantı analizi ve fonksiyonel ilişkilendirme çalışmaları ile 10q25'de lokalize *HTRA1* olduğu gösterilmiştir (6).

NOTCH3, dört üyeli Notch ailesinden birini kodlamaktadır. Notch sinyal yolları, embriyogenezde birçok organ gelişimi, kök hücre yenilenmeleri, hücre farklılaşması, çoğalması, apoptoz ve vaskulogenezi için önemlidir (7).

HTRA1, serin proteaz ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. Bu protein ailesi memelilerde hücre sinyalizasyonu, protein yıkımı, kas-iskelet sistemi gelişimi gibi çeşitli fizyolojik süreçlere katılmaktadır (8).

Uluslararası literatürde, *NOTCH3* ve *HTRA1* gen incelemelerinin birlikte çalışıldığı çok az sayıdaki yayında genotip-fenotip ilişkileri net olarak açıklanmamıştır (2,9). Ulusal düzeyde ise sadece *NOTCH3* geninde mutasyonun sık olduğu ekzonlarda yapılmış olgu sunumları bulunmaktadır (10-12).

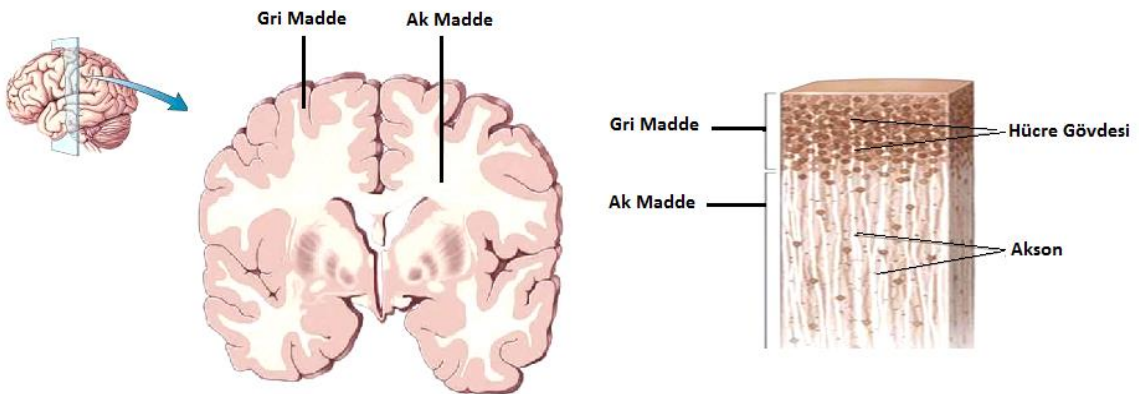
Amacımız, CADASIL/CARASIL klinik tanılı en az 50 olguda, *NOTCH3* ve *HTRA1* genlerinin algoritmik bir yaklaşımla incelenerek, genotip-fenotip ilişkilerinin araştırılması ve ülkemizdeki mutasyon sıklıklarının saptanması, ideal moleküler tanı yönteminin belirlenmesi ve ailelere özgün genetik danışma desteğinin verilmesiydi.

Bu amaç çerçevesinde, birinci basamakta 64 CADASIL/CARASIL olgusunda mutasyonların sık saptandığı, *NOTCH3* geninin 2-6 ve 11.ekzonları Sanger yöntemi ile dizilendi. Mutasyon saptanmayan 54 olguda, ikinci basamağa geçilerek yeni nesil tabanlı dizi teknolojisi (YND) ile *NOTCH3* geninin tüm ekzon ve ekzon-intron sınırları özgün tasarlanan YND paneli ile IonTorrent platformunda dizilendi. Bulunan değişimlerin doğrulanması ve panelimizde kapsanmayan *NOTCH3* bölgeleri Sanger yöntemi ile dizilendi. Bu aşamada da mutasyon saptanmayan 51 olguda, üçüncü basamak testine geçilerek, CARASIL hastalığı ile ilişkilendirilen *HTRA1* geninin tüm ekzonları Sanger yöntemi ile dizilendi ve sadece bir olguda mutasyon saptandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin anatomisi

Sağ ve sol hemisferlerden oluşan beyin (serebrum), korteks, bazal gangliyonlar ve limbik sistem olarak üç yapıya ayrılır. Serebral yüzey dokusu “serebral korteks” olarak adlandırılır. Katlanmış korteks, 100 milyar sinir hücresinin (nöron) yaklaşık %70’ini içerir. Nöron yapısı; dendrit, hücre gövdesi, akson ve akson ucu kısımlarından oluşur. Nöronların hücre gövdesi kısmı, yoğun olarak kortekste bulunur ve bu bölgeye gri-kahverengi görünüm verdiğinden “gri madde” olarak adlandırılır. Korteksin alt kısmında, miyelinli aksonlar yoğun olarak bulunmaktadır. Miyelin, aksonun çevresini bir yağ tabakası şeklinde sardığından bu kısmın beyaz görünmesine neden olur ve bu nedenle bu bölge “ak madde” olarak isimlendirilir.



Şekil 2-1: Normal beyin dokusu (13)’den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.

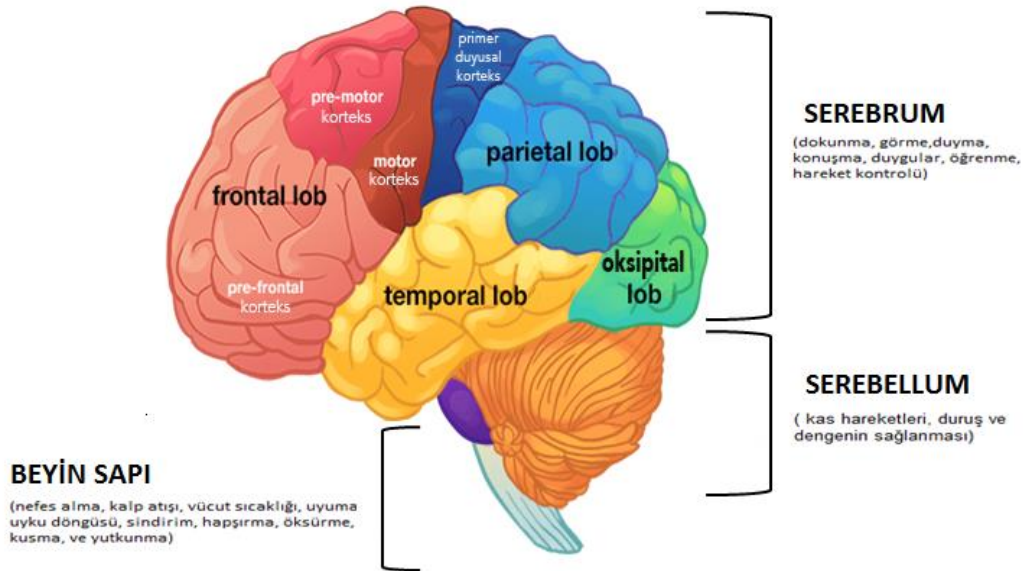
Serebrum, frontal, paryetal, oksipital ve temporal lob olmak üzere dört farklı loba ayrılır. Serebral kortekste bir hasar, bu loblarda fonksiyon kayıplarına neden olur.

Frontal lob, beynin ön kısmında bulunur, konuşma, iskelet kas hareketi (motor korteks) ve davranışsal ifadeyi kontrol eder. Paryetal lob, frontal lobun arkasında yer alır ve istem dışı hareket ve duyu verilerinin alınması ve işlenmesi görevlerini yürütür. Paryetal ve frontal lobun altında iki taraflı yerleşim gösteren temporal lob, hafıza, koku

ve işitme ile ilişkili işlevlerden sorumludur. Oksipital lob, görme eylemi için gerekli olup, görme sinyallerinin alınmasını ve bu bilginin işlenmesini sağlar. Bu alandaki hasar, kontralateral görüş kaybıyla klinik olarak ilişkilendirilmektedir.

Beynin diğer bölümlerinden bazal ganglionlar, hareketi koordine eder ve kaudat, putamen ve globus pallidusdan oluşur.

Limbik sistem; amigdala, singulat girus ve hipokampustan oluşur. Amigdala ve singulat girus, duygu ve hafızada önem taşırken, hipokampus hafızadan ve öğrenmeden sorumludur. Bu yapılar serebral kortekste yerleşiktir ve beyin çekirdeğine yakındır.



Şekil 2-2: Beynin anatomik bölgeleri (14) ‘den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.

Serebellum (beyincik), beyin sapının bitişiğinde yer alır ve motor fonksiyonlara yardımcı olur. Hızlı değişen hareketleri, dengeyi ve konum duygusunu koordine eden serebellumda oluşan hastalıklar, tremor, konuşma ve yürümede bozulmalara, nistagmus gibi göz bulgularına yol açar.

Beyin sapı (spinal kord), medulla, pons ve orta beyin olmak üzere üç bölüme ayrılır. Beyin sapı beynin ilk gelişen kısmıdır ve birçok kritik nörolojik işlemde sorumludur. Beyin sapı boyunca uzanan retiküler (ağsı) formasyon nefes alma, kan

basıncı ve uyanıklık gibi kritik vücut işlevlerinin kontrolünde önemlidir. Beyin sapı, kraniyal sinirlerin neredeyse tamamının bulunduğu bölgedir (15-17)(15-17).

2.1.1. Beynin Vasküler Yapısı

Beyin vücuttaki oksijenin yaklaşık %20'sini ve kardiyak dolaşımın yaklaşık %15'ine ihtiyaç duyar.

Beynin vasküler dolaşımı anterior ve posterior bileşenlere ayrılabilir. Aorttan dallanan karotid arterler ve vertebral arterler beyine kan akımını sağlar. Karotid arterler anterior dolaşımı, vertebral arterler posterior dolaşımı sağlarlar ve birlikte, Willis Poligonunu oluştururlar. Willis Poligonu, serebral kan akımı sağlamak için birkaç ana damarın bulunduğu dairesel bir halkadır. Buradan dallanan orta serebral arter (OSA), frontal lobun küçük bir bölümünün yanı sıra parietal, oksipital ve temporal loblara kan tedarik eder. Lentikülostriat arterler OSA'dan dallanır, internal kapsül ve bazal gangliyonlara olan dolaşımı sağlarlar ve inmelere neden olan ilerleyici arteriyoskleroz bu damarların tıkanması ile ortaya çıkar.

Küçük vasküler damarlar, beyin yüzeyinde veya derin serebral dokuda bulunur. Bunlar küçük kortikal arterler, arterioller olup yüzeysel, medüller ve derin olmak üzere nüfuz eden arterlerdir. Derine nüfuz eden arterler, lentikülostriat, talamoperforan ve beyin sapı paramedian dalları içerir.

Beyindeki kortikal ve subkortikal alanların, distal sınır bölgelerinin, sentrum semiovale, kaudat çekirdek, internal kapsül, globus pallidus, putamen ve beyin kökünün orta hattı gibi merkezdeki ve derindeki ensefalik alanların kan akımı mikrosirkülasyon ile sağlanır. Mikrosirkülasyonu etkileyen anjiyopati kaynaklı tüm küçük damar hastalıklarının en yaygın olarak kabul göreni, geleneksel olarak tek bir penetran arterin tıkanması sonucu oluşan ve iskemik inmeye neden olan laküner enfarktüs (17) .

2.1.1.1. Vasküler Demans

Memeli beyni, vaskülarizasyonu en yüksek olan organlardan biridir. Serebral damar sistemi, nöronal homeostaz için kritiktir, oksijen ve besin maddelerinin temini, metabolik atıkların uzaklaştırılması ve nöral mikro ortamın korunmasını sağlar. Bu nedenle, gelişimsel veya edinilmiş anormallikler, merkezi sinir sisteminin (MSS) damar yapısını etkileyerek ciddi nörolojik bozukluklara yol açar (18).

Demans, işlevsel bozulma ile sonuçlanan ilerleyici bilişsel yıkımın izlendiği bir hastalıktır. Bellek, yürütücü fonksiyonlar, görsel-uzamsal yetiler, dil ve dikkat önemli bilişsel özellikleridir.

Demanslar, primer ve sekonder demanslar olarak sınıflandırılır. Demansların büyük bir bölümü primer demanslar grubunda yer alır ve merkezi sinir sisteminin demansa yol açan nörodejeneratif hastalıklarını içerir. Sekonder demanslar ise nörolojik, sistemik veya psikiyatrik bir hastalığın seyri sırasında, alışılmış klinik bulgularının yanı sıra demansa gelişimine neden olan hastalıklardır. Sekonder demansların en sık nedeni de ön planda basamaksı seyir gösteren, daha çok yürütücü işlev bozukluğu ile karakterize olan vasküler demanstır (19).

Vasküler demans (VaD), iskemik veya kanayıcı inme veya iskemik-hipoksik beyin lezyonları sonucu gelişen, günlük yaşam aktivitelerini bozacak ölçüde ağır kognitif tutulum ile karakterize, kompleks bir hastalık olarak tanımlanır. VaD, 65 yaş üstü insanları etkileyen en yaygın demans türü olup, değişken klinik tablo ve ön görülemeyen hastalık seyri ile karakterizedir. VaD tanısında, bilişsel performans ölçümünü de içeren ayrıntılı bir öykü ve fizik muayene önemlidir.

VaD'a yol açan hastalık gruplarından biri olan serebral küçük damar hastalıkları (SKDH) ise beyindeki küçük arterleri, arterioller, venülleri ve kılcal damarları etkileyen çeşitli etyolojilere sahip bir patolojik süreç grubunu tanımlar. Yaşla ilişkili ve hipertansiyona bağlı küçük damar hastalıkları ve serebral amiloid anjiyopati en yaygın formlarıdır (20-22).

Tablo 2-1: Küçük damar hastalıklarının özellikleri (20)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.

Küçük Damar Hastalıkları	
Patoloji Özellikleri	Laküner infarktlar Arteriyoskleroz Hiyalinizasyon ve lipohiyalinizasyon Perivasküler alanlar Mikroanjiyopati
Radyolojik Özellikleri	Lakünler Yaygın ak madde hasarları Mikrokanamalar
Klinik Bulgu Gelişimi	Basamaksı seyreder
Hastalık Progresyonu	Yavaş ilerler
Nörolojik Semptomlar	Sensorimotor kayıp Dizartri Yürüme güçlüğü Disfaji Üriner problemler
Bilişsel İşlevler	Bilişsel gerileme ve bozulma Apati Öğrenme güçlüğü ve sözel bellek kayıpları

Serebrovasküler yetersizlikler ile ortaya çıkan ak madde lezyonlarının ilerlemesinde, bilinen dış faktörlerin (yaş, çevre) yanı sıra, genetik faktörlerin de rol oynadığı bilinmektedir (24). Kalıtsal küçük damar hastalıkları, beyin bölgelerinde lezyonlar, iskemik ve hemorajik inmeler ve demansa neden olduğu bilinen SKDH'ların küçük bir kısmını oluşturur. İskemik inmelerin yaklaşık %25'i küçük damar hastalıklarından kaynaklanır (21,23).

Kalıtsal küçük damar hastalıklarında, CADASIL/CARASIL ak madde lezyonlarının gözlendiği en karakteristik hastalıktır. Genetik kökenli bu hastalık, orta yaş döneminde, subkortikal alanı besleyen küçük damarların vasküler bir faktör olmaksızın tıkanması sonucu, ak maddenin bozulması ile ortaya çıkan kalıtsal sistemik bir mikroanjyopatisidir (1,2,4).

2.1.1.2. CADASIL

CADASIL çoklu subkortikal iskemik lezyonlar ve laküner infarktlar ile karakterizedir. İnfarktlar ve lezyonlar MSS'ni etkileyerek bilişsel yetilerde gerilemeye ve demansa neden olur. Hastalığın ilk bulgusu genellikle migrendir ve bunu orta yetişkinlikte hafif inmeler izler (20).

İlk CADASIL olgusu 1955 yılında Van Bogaert tarafından tanımlanmış ve "Binswanger's hastalığı" olarak isimlendirilmiştir ancak ilerleyen yıllarda eski doku örneklerinin genetik analizi ile bu hastaların bazılarının gerçekte CADASIL hastası olduğu saptanmıştır (24).

Hastalık zaman içinde farklı isimlendirmeler almış olsa da (kronik ailesel vasküler ensefalopati, subkortikal iskemik inmeler ile ailevi bozukluk, demans ve lökoensefalopati ve ailesel Binswanger sendromu gibi), 1993 yılından itibaren ise CADASIL akronimini kullanılmaktadır.

Hastalık ilişkili gen, 1993'de 19. kromozoma bağlantılanmış (4) ve 1996'da 19p13.12'deki *NOTCH3* geni klonlanmıştır (5). Yapılan çalışmalar bu genin Notch3 reseptörünü kodladığını ve vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) ifade edildiğini göstermiştir

NOTCH3 geninin kodladığı protein, dört üyeli Notch protein ailesinden biridir. Notch sinyal yolağı, Notch ailesi reseptörlerinin aynı kökenli ligandlarına bağlanmasıyla komşu hücreler arasındaki etkileşimleri düzenleyen, evrimsel olarak

korunmuş bir hücre içi iletişim yoludur. Bu yolak, birçok organ gelişimi ile vaskulogenez, kök hücre yenilenmeleri, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, apoptoz gibi çok önemli fizyolojik süreçlerde görevlidir (25-27)

CADASIL patogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, fonksiyon kaybından ziyade, yeni fonksiyon kazandıran mutasyonların hastalığın patogenetik mekanizmasında etkin olduğunu göstermiştir (2).

Tüm CADASIL mutasyonlarının ortak yolağında VDKH yüzeyinde NOTCH3 ekstraselüler domain (N3ECD) birikimi saptanmaktadır. Arteriyel duvarlarda N3ECD birikimini takiben VDKH dejenerasyonu ve fibrilleşmesi gözlenir. Bu durum, serebral ak maddedeki arteriollerin darlaşmasına ve MRG'de karakteristik olarak gözlenen laküner infarktlerin oluşmasına yol açar (3,17).

Mutant proteindeki dengesiz sistein rezidüleri, Notch3'ün anormal glikozilasyonuna, anormal dimerizasyonuna ve disülfid bağları ile çapraz bağlanmalara ve yüksek oranda multimerizasyonuna yol açarak, VDKH yüzeyinde N3ECD birikimiyle çökelti oluşmasına neden olur. Bu nedenle, CADASIL hastalığının tanısında, VDKH'lerde granüler osmofilik materyalin (GOM) elektron mikroskopik olarak gösterilmesi veya dermal arterlerde N3ECD için pozitif immünohistokimyasal sonuç alınması patognomik bir bulgudur (2,28,29).

NOTCH3 geni, 19p13.12'de lokalize 33 ekzonlu bir gendir (MIM* 600276). Ters iplikçikten sentezlenir. 6 transkript varyantı bulunan genin, en büyük transkript varyantı 8666 bp uzunluğundadır (NM_000435.2) ve bu varyant 2321 aa büyüklüğünde (NP_000426) bir polipeptiti kodlar (30). NOTCH3 proteini, tek zincir geçişli, heterodimer yapılı, bir transmembran reseptörüdür. Bu reseptöre ligand bağlandıktan sonra, intraselüler domain nukleusa doğru hareket eder ve transkripsiyon faktörlerini aktive eder (2).

Bugüne kadar *NOTCH3* geninde CADASIL ile ilişkilendirilmiş 291 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyon tiplerinden yanlış anlamlı mutasyonlar sıklıkla görülmekte olup, kesilme kırılma hatası, küçük insersiyon ve duplikasyonlar, küçük ve büyük delesyonlar daha nadirdir (31).

Çoğu CADASIL ile ilişkili mutasyonlar, NOTCH3 proteininin ekstraselüler domaindeki 34 EGF-benzeri tekrarlarından birinde sistein rezidüsünün artması ya da

azalmasına neden olur. EGF benzeri tekrarlar ve diğer NOTCH3 protein domainlerinin yapısında bulunan sistein aminoasitinin bu sayısal değişikliği, eşleşmeyen reaktif sistein kalıntısının oluşumuna ve başka bir NOTCH3 molekülü veya başka bir protein ile etkileşimi sırasında kurulan anormal disülfid köprülerinden kaynaklanan NOTCH3'ün anormal dimerizasyonu ile sonuçlanır. Notch3 proteininin üç boyutlu yapısının değişimi CADASIL'in patogeneğinde merkezi bir rol oynar (32,33).

Epidermal büyüme faktörü [EGF (EGF_like domain)], orta korunmuşluk seviyesinde bir polipeptittir. İlk olarak spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanır. Reseptörün sitoplazmik alanındaki tirozin kinazın harekete geçirilmesi için gerekli olan dimerizasyonunu indükleyerek, DNA sentezi ve hücre çoğalmasıyla sonuçlanan bir sinyal iletimini başlatır.

Tüm EGF-benzeri domainlerin ortak özelliği, membrana bağlı proteinlerin hücre dışı bölgelerinde yer alması ve salgılanan proteinlerde bulunmasıdır. Bu kaideye istisna olan enzim prostaglandin G/H sentaz 1 enzimidir. EGF-benzeri domain, disülfid bağlarını içeren 6 sistein rezidüsü içerir.

Bazı EGF domainlerinin N terminalinde bir kalsiyum bağlama bölgesi bulunur. Kalsiyum bağlanması protein-protein etkileşimi için önemlidir (34,35).

LN (Lin-12 / Notch domain), gelişim sürecinde hücre kaderini belirleyen hücre içi sinyaller için transmembran reseptörü olarak görev yapan bir polipeptiddir. LN sadece Notch ile ilgili proteinlerde bulunan bir bölgedir. Ligand bağlanmadan önce reseptörün dinlenme konformasyonunda tutulmasına yardım eder. Her biri 6 sistein rezidüsü içeren 35-40 amino asit büyüklüğünde bir yapıdır (36,37).

ANK (Ankyrin tekrarları), 32 amino asitlik ardışık olarak tekrarlanan yapılardır. Ökaryotlar başta olmak üzere fonksiyonel açıdan çok çeşitli proteinlerde bulunur. Pek çok ankyrin tekrar bölgesi, protein-protein etkileşim alanları olarak işlev görür (38,39)(39,40).

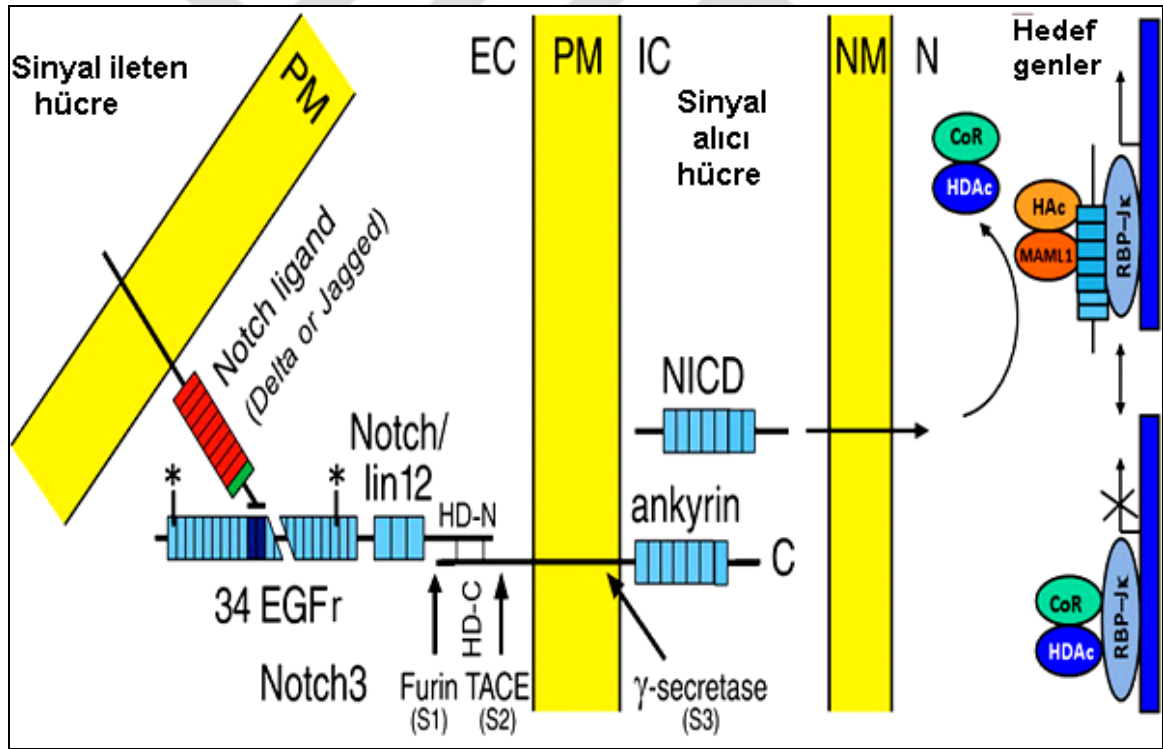
NOD, NODP, DUF3454 domainlerinin Notch yapılarında yer alan işlevleri bilinmeyen protein bölgeleridir.

Diğer Notch reseptörleri gibi Notch3 de tüm domainlerini içerecek bütünlükte sentezlenir. Protein, kesme işlevi olan furin enzimi tarafından S1 olarak adlandırılan ilk

kesilmeye uğrar, N terminal ve C terminal olarak adlandırılan iki parçaya bölünür. C terminal kısmı sinyali alan hücrenin plazma membranına girer, N terminali ise membran dışında kaldığından ekstraselüler domain olarak işlev görür. N3ECD, 210 kda büyüklüğünde olup, 34 epidermal büyüme faktör benzeri tekrarlardan (EGFr) (Epidermal growth factor-like repeats) oluşmaktadır, EGFr'lerin her biri 6 sistein aminoasidi içerir. EGFr domaini ardından üç adet Notch/Lin12 tekrar domaini gelir.

C terminalinde kalan kısım, transmembran (N3TMD) ve intraselüler domaini (N3ICD) içerir ve birlikte Notch3 transmembran intraselüler domain (N3TMIC) olarak isimlendirilir. N3ICD, yedi adet ankyrin tekrarı içerir.

N3ECD yapısında, N terminali ve C terminali, heterodimerizasyon domaini olarak adlandırılan birleşim bölgesinde (HD-N ve HD-C) non-kovalent bağlarla (97kDa) birbirine bağlanır.



Şekil 2-3:Notch Sinyal Yolağının Şematik Gösterimi (2)'den alınmış ve değiştirilmiştir.

Sinyali oluşturan Notch ligandının, (insanda Delta veya Jagged olarak isimlendirilir) bağlanma bölgesi, 10 ve 11. EGF tekrar bölgesidir. Notch ligandının sinyal verici hücre membranına bağlanması sonrasında S2 olarak tanımlanan kesilme fazı gerçekleşir. Bu işlemi TACE olarak isimlendirilen (TNF, tumor necrosis factor and alpha-converting enzyme), ADAM10 veya ADAM17 enzimleri gerçekleştirir. Böylece, N3ECD, eksternal ve intramembranöz domaine ayrılır. Bunu takiben intramembranöz domainde S3 kesilme fazı membran içinde γ -sekretaz enzimi tarafından gerçekleştirilir ve N3TMD'den ayrılan NICD nükleus içine girer (40,41) Hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için RBP-J κ ve ko-aktivatörlerle etkileşir. Nükleus içine giren N3ICD nin amacı represör moleküller olan CoR ve HDAC salınmasını sağlamaktır (42,43). HAc ve MAML1 moleküllerinin de bu yapıya bağlanması ile aktivasyon kompleksi oluşur ve transkripsiyonu aktive eder (Şekil 2-3) (2).

2.1.1.3. CARASIL

Resesif kalıtım gösteren CARASIL'de, klinik tablo ve ak madde değişiklikleri CADASIL ile benzerlik gösterir, ancak bilişsel gerileme daha erken başlar ve yürüme güçlüğü, bel ağrısı ve alopesi karakteristik özelliklerindendir (2).

CARASIL, *HTRA1* (High-temperature requirement A serine peptidase 1) genindeki bi-allelük mutasyonlardan kaynaklanmakta olup kodladığı HTRA1 proteini, serin peptidaz ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin proteinleri, memelilerde hücre sinyalizasyonu, protein yıkımı, kas-iskelet sistemi gelişimi gibi fizyolojik süreçlerde rol alır (6,8).

HTRA1, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) sinyalinin baskılayıcısı olarak görev yapar. Gendeki fonksiyon kaybı mutasyonları, gen ürününün proteaz aktivitesinde azalmaya neden olduğundan TGF- β üzerindeki baskı kalkar ve sinyalizasyonda artış görülür (44).

TGF- β ailesinin üyeleri, vasküler anjiyogenez ve yeniden şekillendirmede görevlidir. Aynı zamanda, hücre tipine ve hücre dışı matrikse bağlı olarak vasküler endotel hücrelerinde ve düz kas hücrelerinde çok yönlü rollere sahiptirler.

Vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşmasında önemli görevleri olan ve baskılanamayan aşırı derecede artmış TGF- β sinyali, vasküler düz kas hücrelerinin

dejenerasyonuna neden olur. Bu nedenle TGF- β -ailesinin sinyal yollarındaki bozukluklar, ekstraselüler matriks proteinlerin (fibronektin, versikan) sentezinin artmasına ve vasküler bozukluklara neden olur (20,45,46).

CARASIL hastalığı ile ilişkili bilinen tek gen, 2009 yılında bağlantı analizi ve fonksiyonel ilişkilendirme çalışmaları ile belirlenen *HTRA1* genidir (MIM * 602194) 10q26.13 de lokalize gen, 9 ekzonludur. İki transkript varyantı bulunan genin, büyük transkript varyantı 2120 bç uzunluğundadır (NM_002775). Translasyonda 480 aa büyüklüğünde, 4 fonksiyonel domaini bulunan bir polipeptit (NP_000426) sentezlenir (6,47-49).

HTRA1 proteininde, genin 1. ekzonu IGFBP ve KAZAL protein domainlerini kodlar. 3-6. ekzonlar tripsin-benzeri serin proteazın ana domainini, 6-9. ekzonlar ise PDZ olarak adlandırılan bir domaini kodlamaktadır (50).

IGFBP_N domaini: IGF bağlayıcı polipeptitlerde bulunan bir domain türüdür. İnsülin benzeri büyüme faktörlerine (IGF-I ve IGF-II) bağlanırlar. IGF'lerin yarılma ömrünü uzatır ve büyüme destekleyici etkilerini inhibe ettiği bildirilmiştir. N-terminalinde 12 sistein rezidüsü, C-terminalinde ise 6 sistein rezidüsü bulunmaktadır (51,52).

KAZAL domaini: Bu domain kanonik serin proteinaz inhibitörlerinden biridir. Bir çok organizmada bulunur ve çeşitli fizyolojik mekanizmalarda önemli rol oynar (53). Kazal inhibitörlerinin reaktif bölgeleri değişkenlik gösterir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, yapısındaki lizin varlığının tripsini güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (54).

Tripsin_2 domaini: Tripsin benzeri peptidaz domain olarak adlandırılan domain serin paptidaz aktivitesini gerçekleştiren bölgedir. Tripsin, peptit zincirlerini lizin ya da arginin amino asitlerinin karboksil bölgesinden kesim yapar (55-57) (48-50).

PDZ domaini : Bu domain ismini aynı domainlere sahip olan ilk keşfedilen üç proteinin baş harflerinden (**P**ost synaptic density protein, **D**rosophila disc large tumor suppressor ve **Z**onula occludens-1) almıştır. Ökaryotik PDZ domainleri, sinyal moleküllerinin kümeleşmesine katılan membran proteinlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan çok işlevli etkileşim gösteren modüllerden oluşur. Çoğu durumda, PDZ domainine hedef proteinlerin C-ucunda oluşan özel bir motifden bağlanma gerçekleşir.

PDZ domaini aynı zamanda heterodimerler de oluşturabilir ve hedef proteinlerin internal peptit fragmanları ile etkileşime girebilir (58-60).

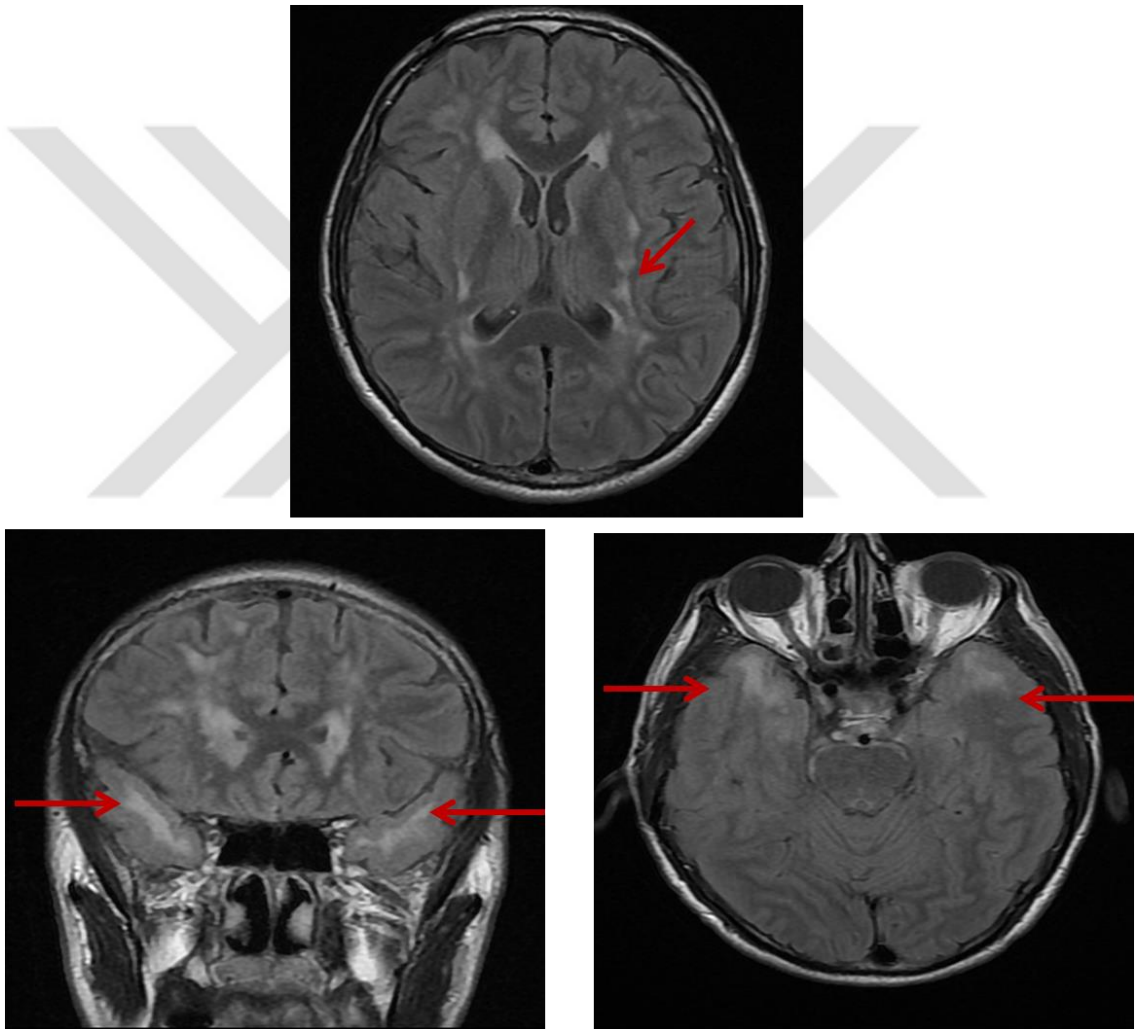
TGF- β 1 pre-pro-protein olarak sentezlenir. Endoplazmik retikulumda proTGF- β 1 dimerize olur ve Golgi cisimciğinden geçişi sırasında proTGF- β 1 f $\ddot{u}$ rin enzimi ile kesime uğrar. proTGF- β 1'in kesimi ile 2 $\ddot{u}$ r $\ddot{u}$ n latency-associated peptide (LAP) ve olgun TGF- β 1 oluşur ve bunlar birbirlerine non-kovalent bağlarla bağlanarak latent TGF- β 1 kompleksini oluştururlar. Bu küçük latent TGF- β 1 kompleksi, LAP sayesinde LTBP1'e bağlanarak büyük latent TGF- β 1 kompleksini oluşturur. H $\ddot{u}$ cre dışına çıkan bu yapı ECM tarafından tutulur. ECM deki farklı proteazlar ve ya integrinlerin kompleksteki LAP yapısını uzaklaştırmasıyla olgun TGF- β oluşur ve kendi reseptörüne bağlanır.

TGF- β sinyal yolağı VDKH farklılaşmasında önemli görevleri vardır. HTRA1 proteini, ER içinde ERAD (ER-associated protein degradation) proteini ile proTGF- β 1'nin yıkımını sağlayarak, TGF- β sinyalinin baskılanmasını sağlar (2), bu da ekstrasel $\ddot{u}$ ler matrikste (ECM) olgun TGF- β 1 miktarlarında azalmayla sonuçlanır. *HTRA1* genindeki, HTRA1 fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar sonucu, olgun TGF- β miktarında artış ve buna bağılı olarak da TGF- β sinyalizasyonu $\ddot{u}$ zerindeki baskılanma ortadan kalkar. Artmış TGF-beta sinyalizasyonu, bağı dokusu b $\ddot{u}$ y $\ddot{u}$ me fakt $\ddot{u}$ r $\ddot{u}$ (CTGF), fibroblast b $\ddot{u}$ y $\ddot{u}$ me fakt $\ddot{u}$ r $\ddot{u}$ (FGF) ve ECM proteoglikanları da dahil olmak $\ddot{u}$ zere $\mathcal{C}$ esitli proteinlerin $\ddot{u}$ retimini arttırarak ECM'de birikmelerine ve vask $\ddot{u}$ ler fibroza neden olur (61).

2.1.2. Tanısal Yaklaşım

2.1.2.1. Klinik tanı

CADASIL hastalığının klinik tanısında, MRI bulgularından ak madde hiperintensiteleri önem taşır. Ak madde lezyonları periventriküler bölgede ve derin ak madde de yoğunlaşmıştır, yüzeysel ak madde de az da olsa görülür. Etkilenen bölgeler ise frontal, parietal ve anterior temporal ile eksternal kapsüldür (62-65).



Şekil 2-4: FLAIR (Fluid-attenuated inversion recover) MRG görüntülemesinde hiperintens alanların bazıları kırmızı oklarla gösterilmiştir. **A)** Aksiyal kesitte eksternal kapsülde görülen ak madde lezyonları **B)** Koronal kesitte temporal bölgede ak madde lezyonları **C)** Aksiyal kesitte temporal bölgedeki ak madde lezyonları

Klinik tanıda ayrıca aşağıda verilen dört bulgu belirleyicidir (Şekil 2-5).

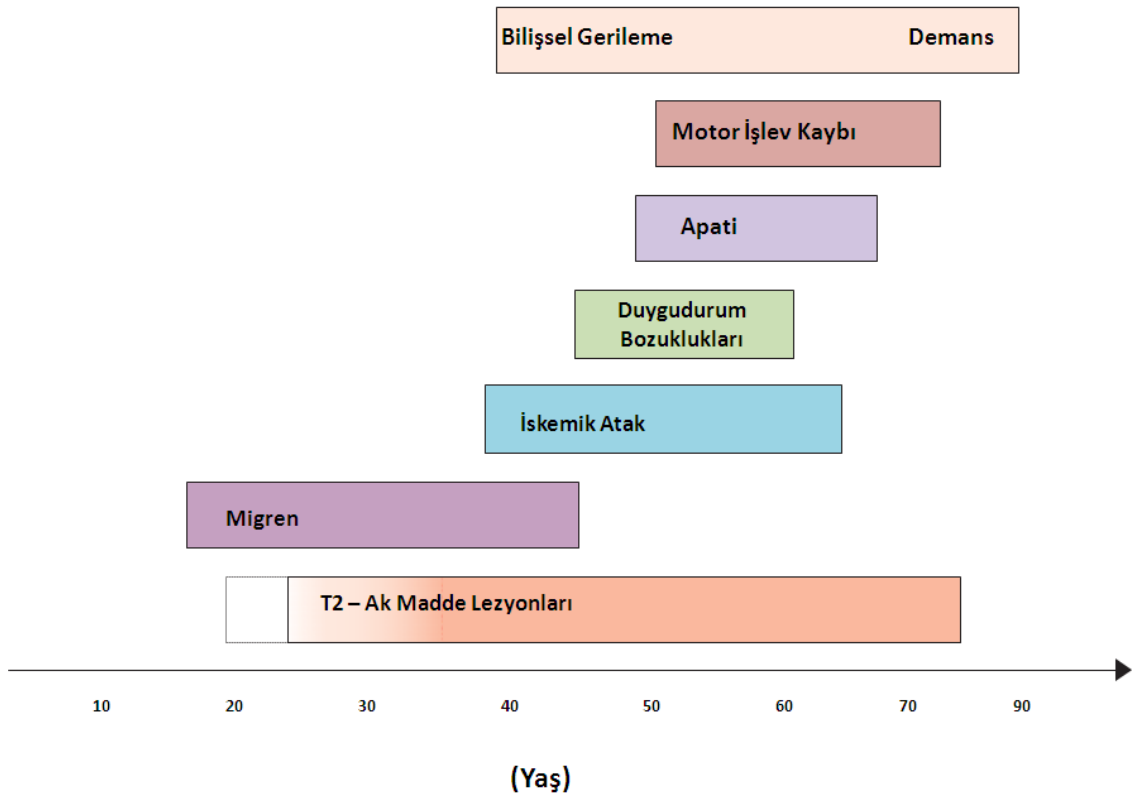
Migren: CADASIL hastalarının %20-40'ında auralı (görme bozuklukları, sintilasyon skotomı, afazi, hemiparezi, hemihipoestezi gibi aurayı takip eden baş ağrısı atakları), %60'a yakınında aurasız migren ağrıları gözlenir. Migren ataklarının ortalama 30'lu yaşlarda başladığı bildirilse de 20'li yaşlarda da ortaya çıktığını gösteren vakalar bulunmakta ve auranın progresif olarak sıklaştığı da bildirilmektedir (1,55-59). Kadınlarda ilk auralı migren ataklarının geç gebelik ya da lohusalık zamanlarında ortaya çıkabildiği ve zaman içinde kötüleşerek devam ettiği gösterilmiştir(1,66-69).

İskemik ataklar: Semptomatik hastaların yaklaşık %85'inde görülür. İnme semptomunun görülme yaş aralığı geniştir. İlk inmesini 11 yaşında yaşayan hasta olduğu gibi (66), ilk inmesini 70 yaşına ulaşana kadar yaşamayan hastalar da bildirilmiştir (70). Bu gibi ileri yaş vakalarda iskemik atakların etiyolojisi yaşlanma ile sıklaşan aterosklerotik inmeler ile karışabilmektedir. Genel olarak CADASIL hastalarında inme geçirenlerin yaş aralığı 40-50 olarak belirtilmektedir. İnmelerin neredeyse hepsi subkortikal bölgede meydana gelir ve tipik olarak laküner sendromlara (duyu ve motor aktivite kayıpları, dizatri, kognitif yıkım, ataksi) yol açar (1,67).

Bilişsel Yıkım ve Demans: Geçici iskemik atak ve inme sonrasında görüldüğü bildirilmektedir. Hastalığın ileri safhalarına kadar episodik hafıza korunsa da zaman içinde hastada ciddi subkortikal vasküler tip demans gelişmektedir (71-74).

Psikiyatrik Bulgular: CADASIL hastalarının %20-30'unda psikiyatrik bulgular görülebilmektedir. Depresyon bu semptomlar içinde en fazla görülenidir. Apati (çevreye ilgisizlik) yaygın görülen bir psikiyatrik duygu durum değişikliğidir. Fransız CADASIL kohortunda hastaların %41'e yakınında apati görülmüştür. Bu durum hastaların yaşı, kognitif gerilemenin şiddeti, diğer nöropsikiyatrik semptomlar, sıklıkla depresyon, ve subkortikal doku lezyonlarının yoğunluğuyla ilişkilidir (75). Manik episodlar pek yaygın değildir (%2). Şizofreni, ruhsal denge bozuklukları (psikozlar), paranoya, agresiflik ve melankoli bildirilen diğer bulgular arasındadır (1,2,67,76).

Tüm bu bulgulara ek olarak, kısmi veya genelleşmiş epileptik nöbetler, hastaların yaklaşık %6-10'unda, genellikle hastalığın geç evresinde görülür (77,78).



Şekil 2-5: CADASIL klinik bulguları ve görülme yaş aralıkları (1)'den alınmış ve değiştirilmiştir.

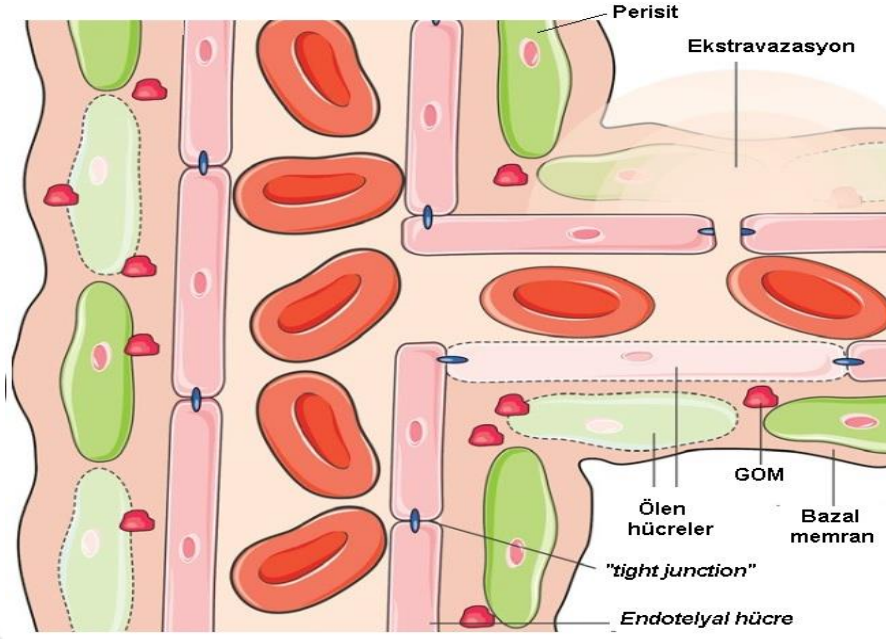
CARASIL klinik tanısında ise nörolojik belirtiler ve bulgular birçok bakımdan, CADASIL ile benzerlik gösterir. Hipertansiyonun olmaması CADASIL'de olduğu gibi CARASIL'de de vurgulanan bir durumdur. Etkilenen kişilerin %25'e yakınında 40 yaşından önce inme benzeri ataklar görülür. Hastaların çoğunluğu CADASIL'de olduğu gibi laküner tip tekrarlayan iskemik inmeler geçirirler. İlerleyen aşamalarda bu durum beyin fonksiyonlarının bozulmasına, sonunda da 30-40'lı yaşlarda demansın gelişmesine neden olur. Hafızanın etkilenmesi CARASIL hastalarının CADASIL hastalarına göre daha erken ve ağırdır. CARASIL'deki ilginç bir başka semptom ise, erkek hastalarda saç kayıplarının (alopesi) gözle görülür şekilde fazla olmasıdır. Bu durum CARASIL hastalığında konnektif (bağ) dokunun bozulmasına bağlanır. Ayrıca bu dokulardaki bozulma, alt torasik (göğüs) ve üst bel seviyesi arasındaki disk hernileri ile spondiloza da sebep olduğundan, CARASIL hastalarının %80'inde bel ağrısı görülür. En sık görülen başlangıç semptomu; 20-30 yaşlar arasındaki spastisite ve yürüyüş bozukluğudur. Yirmi ile elli yaş aralığında duygudurum değişiklikleri (apati ve

irritabilite), psödobulber palsi ve bilişsel işlev bozukluğu gözlenebilir. Ayrıca yaygın dağılımlı ak madde ve eksternal kapsül lezyonları görülür. Ak madde hiperintensiteleri, periventriküler ve derin ak maddede simetrik olarak yerleşim gösterir. Temporal lobun ön kısmındaki ak madde, serebellum, beyin sapı, orta serebellar pedinkül ve beyin eksternal kapsül CARASIL'in karakteristiği olan T2 ağırlıklı sinyal anormallikleri gözlemlenir. Bazal gangliada ve subkortikal ak maddede laküner infarklar oluşur (49,79,80).

2.1.2.2. İmmünohistokimyasal bulgular

CADASIL için en ağır histopatolojik bulgular, serebral ak madde ve derin gri maddede görülmektedir. Damar tunika adventisiasında fibröz bağ dokusu birikerek bu arteriollerin tamamen bozulması ve tıkanmasına neden olur. İmmünohistokimyasal olarak tunika medyada granüler osmofilik materyal (GOM) birikimi saptanır. N3ECD proteininin GOM birikimleri içindeki dağılımı yüksektir. Bu birikimin içeriğinde ayrıca çeşitli kollajen türleri, laminin, klusterin ve diğer ekstraselüler matriks proteinleri de birikir.

Arteriollerin özgün patolojisi, serebral ak maddede vasküler kalınlaşma ve lümen stenozu, ilk olarak Miao tarafından bildirilmiştir (81). Baudrimont ve arkadaşları (82), bir CADASIL hastasının beyin arterlerini elektron mikroskopisi (EM) ile araştırmış ve medyanın iç kısmında bulunan ve bazal tabakaya ulaşan, daha sonra GOM olarak adlandırılacak olan granüler yoğunluktaki hücre dışı materyali göstermişlerdir. GOM birikimi CADASIL için patognomik bir bulgudur (Şekil 2-6). Arteriyopati sistemik olduğundan dermal arterioller de dahil olmak üzere birçok farklı organın arterlerinde ve deri biyopsisinde GOM yatakları tespit edilebilmektedir (83). EM tetkikleri için güvenilir ve deneyimli laboratuvarlar dünyada sınırlı sayıdadır. Bu nedenle immünohistokimyasal testlerle deri biyopsisinde %85-95 hassasiyetle ve %95-100 özgüllükle gösterilen N3ECD'nin EM'e alternatif olduğu bildirilmektedir (29,84).



Şekil 2-6: CADASIL küçük damar patolojisi (85)'den alınmış ve değiştirilmiştir.

CADASIL hastalarında GOM, arter ve kılcal damarların duvarında birikim gösterir. Perisit ve endotel hücrelerinde oluşan kayıp, bazal membranda incelme ve kan-beyin bariyerinde bozulmalara sebep olur (85).

CARASIL'deki ana serebrovasküler patoloji, CADASIL ile aynı vasküler yola rastlar ve serebral ak madde ile bazal gangliyonlardaki küçük penetran arterlerde görülür. Histopatolojik olarak arterler, tunika medyadasındaki VDKH, ışık mikroskopik basofilik granülitesis veya elektron mikroskopik GOM birikimleri olmaksızın ileri derecede arteriyoskleroz göstermektedir. Amiloid birikimi görülmemektedir. CADASIL'deki GOM birikimi gibi hastalıklı arterlerde karakteristik bir değişiklik olmadığından, deri biyopsileri tanı testi olarak kullanılmaz.

Bu vasküler patolojiler, özellikle serebral ak madde de çok odaklı iskemik infarktların yanı sıra yaygın iskemik değişiklikler ve ılımlı bir atrofi oluşumu ile sonuçlanır. CARASIL'in sistemik yapısı, CADASIL'de olduğu gibi belirgin değildir. Serebral arterlerdeki vasküler değişiklikler etkilenen diğer organlarda görülen değişimlerden daha şiddetlidir (2,49,86).

2.1.2.3. Genetik Danışma

CADASIL, otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalıktır. Etkilenen olguların genelde etkilenen bir ebeveyni vardır, *de novo* değişimler nadir görülür. Etkilenen bir kişinin her çocuğunun, patojenik varyantı kalıtmış olma riski %50'dir. Ailenin patojenik varyantı biliniyorsa, benzer semptomları gösteren etkilenmiş diğer aile bireylerinin bu değişim için moleküler genetik tanı testi yaptırması olanaklıdır. Ancak presemptomatik olan ve 18 yaşından büyük olan bir aile bireylerinde nöroloji ve psikiyatri bölümlerinin konsültasyonu olumlu olursa, en az üç ay ara ile yapılan en az iki tıbbi genetik danışmanlık seansında birey halen istekli olursa ve onam verirse, ailedeki patojenik değişimi taşıyıp taşımadığı için moleküler genetik test yapılabilir. Yüksek riskli bir gebelik ve preimplantasyon genetik tanı için doğum öncesi test yapılması da mümkündür, ancak tipik olarak yetişkinlerde ortaya çıkan bozuklukların doğum öncesi testleri için talep çok nadirdir ve etik olarak tartışmalı bir konudur.

CARASIL, otozomal resesif kalıtılan nadir bir hastalıktır. Etkilenen olguların her bir kardeşinin etkilenme riski %25, taşıyıcı olma riski %50 ve mutant geni taşımama şansı %25'tir. Bi-alleliek mutasyon taşıyan indeks olgunun doğacak tüm çocukları, eşii mutasyon taşımıyorsa, asemptomatik taşıyıcı olarak doğacaklardır. Ailenin patojenik varyantı tanımlanırsa, risk altındaki benzer semptomları gösteren aile bireyleri için moleküler test yaptırabilirler.

Bu nadir görülen nörojenetik hastalıklar için günümüzde etkin bir tedavi bulunmamakta, semptomları hafifletmeye ve kişinin yaşam kalitesini arttırmayı hedefleyen ilaçlar kullanılmaktadır.

Hastalığa neden olan mutasyonların yüksek bir oranı EGFr domainindeki sistein residülerinin başka bir amino asite dönüşümü sonucu, sistein tekrarlarının tek sayıya düşmesi, ekstrasellüler yapıda çözünmeyen multimerik yapıların ortaya çıkması ve serebrovasküler alanda toksik madde birikimi ile ilişkilidir. Günümüzde bu mutasyonların oluştuğu ekzonların, olgun transkriptte çereçeve kaymasına yol açmayacak biçimde, özgün tasarlanmış bir antisens oligonükleotid (ASO) ile, pre-mRNA düzeyinde ekzonun atlatılması stratejisi geliştirilmiştir. Bu strateji halen Duchenne Musküler Distrofisinde (DMD) hastalığı daha hafif formu olan Becker Musküler Distrofisine (BMD) dönüştürmek için klinik araştırmalar düzeyinde kullanılmaktadır (Eteplirsen, Sarepta Pharmaceuticals). CADASIL'de benzer yaklaşım

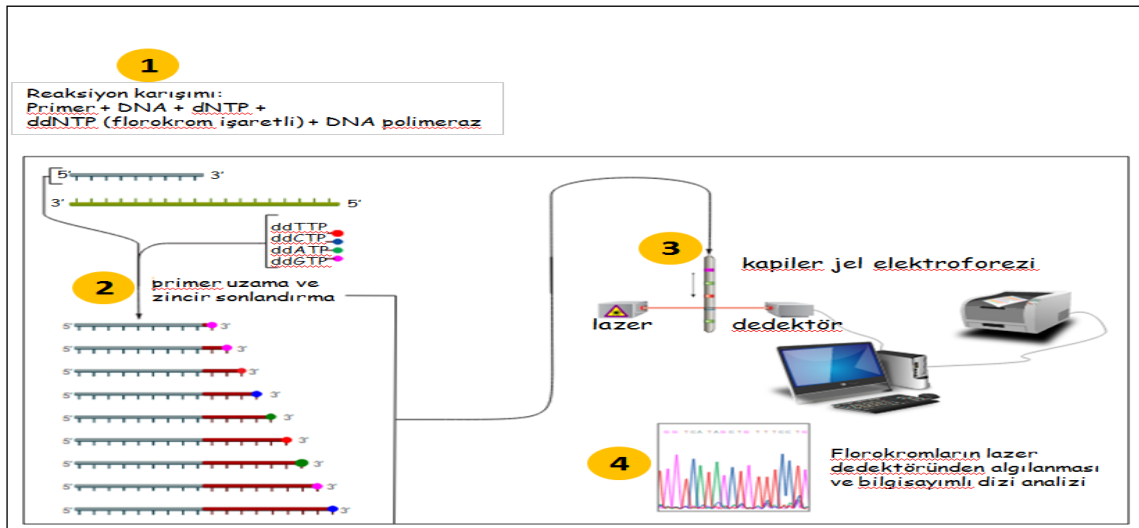
hastaların serebral vasküler düz kas hücrelerinden hazırlanan kültürlerde denenmiş ve ve ekzonun başarılı bir biçimde atlatıldığı, NOTCH3 protein fonksiyonunun normale dönebildiği, liganda bağlanabilme ve aktive edilebilme özelliklerini kazandığı gözlenmiştir (87). Bu sonuçlar, CADASIL'in genetik mutasyona özgün tedavileri için umut vaad etmektedir.

2.2. Moleküler Yöntemler

2.2.1. DNA Dizileme Yöntemleri

2.2.1.1. Sanger Dizileme

DNA zincir uzamasının sonlandırılması esasına dayalı bir DNA dizileme yöntemini olan bu yöntem Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından 1977 yılında keşfedildi. 40 yılı aşkın bir süredir kullanılan yöntem moleküler genetikte en çok kullanılan ve altın standart olan bir DNA dizileme yöntemi olarak kabul edilmektedir. (88). 3'OH grubu olmayan modifiye nükleotidlerin (dideoksinükleotid, ddNTP) kullanımıyla gerçekleşen bu yöntem, primer uzama aşamasında, normal nükleotidlere ek olarak bu modifiye ve floresan işaretli terminatör nükleotidlerin, yeni sentezlenen zincire eklenmesiyle, her basamakta uzaması sonlanan fragmanlar elde edilir. Floresan işaretli ve farklı uzunluktaki zincirler, kapiller jel elektroforezinde uzunluklarına göre ayrılır ve taşıdıkları floresan sinyallerle ölçülür. Gerçekleşen bu işlemler bilgisayar sistemlerinin entegrasyonu ile birlikte hızlı ve analizlerinin kolaylıkla yapılabilmesine olanak sağlamıştır (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Sanger dizileme aşamaları

2.2.1.2. Yeni Nesil Dizileme

İnsan genom projesinin tamamlanmasından sonra, ikinci ya da yeni nesil dizileme (YND) olarak adlandırılan masif paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Günümüzde üçüncü nesil dizileme teknolojileride ön plana çıkmaya başlamıştır. Yeni Nesil Dizileme yöntemi, bir örnekten elde edilen DNA'nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak ve yüksek sayıda dizilenmesi esasına dayanan yöntemdir.

Dizileme teknolojileri, genel olarak kalıp hazırlama, dizileme, görüntüleme ve veri analizi basamaklarından oluşur (89).

	1. Nesil Dizileme	2. Nesil Dizileme				3. Nesil Dizileme	
	Sanger	FLX 454 GS (Roche)	Solexa (Illumina)	SOLID (Applied Biosystem)	Ion Torrent (Thermo Fisher)	Helicos (HeliScope)	PacBio (Pacific Bioscience)
Kütüphane Oluşturma	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon
Klonal Amplifikasyon	Klonlama, PZR	emPZR	Köprü PZR	emPZR	emPZR	yok	yok
Dizileme	Zincir sonlanması	Piro-dizileme	Geridönüşümlü zincir sonlanması	Prob ligasyonu	Hidrojen iyonuna duyarlı yarı iletken	Gerçek zamanlı (Real-Time) dizileme	Gerçek zamanlı (Real-Time) dizileme

Tablo 2-2: Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri (90)'dan alınmış ve değiştirilmiştir.

Yeni nesil dizileme ile elde edilen veriler kısa okuma uzunluklarına sahip olduklarından ileri biyoinformatik araçlarla bu dizilerin referans genoma haritalanması ve ardışık birleştirilerek hizalanması gereklidir. Kısa okuma uzunlukları (~400bp) nedeniyle YND yöntemleri tekrar dizilerinin, büyük delesyon ve duplikasyonların net olarak belirlenmesini, dengeli translokasyonlarda kırık bölgelerin ampikon sınırları

içinde bulunması durumuna bağlı olarak belirlenmesinde olanaklı değildir. Ayrıca YND sonucu elde edilen varyantların çokluğu ve onların anlamlandırılmasındaki zorluklar, ko-segregasyon analizleri, hedef bölgelerin motif veya GC baz içeriği açısından zengin olması kaynaklı düşük okuma alınan ampliconların yeniden taranması gerekliliği vb. uzun süreli ve ek masraf gerektiren işlemlerdir (91).

YND teknolojisindeki yeni gelişmeler temeli PZR'e dayalı olmayan, üçüncü nesil dizileme teknolojilerin ön plana çıkmasını sağlamıştır (92). Bu teknoloji, daha kısa sürede veri eldesini sağması, PZR hatalarının önüne geçmeyi hedeflemesi, uzun okuma oranları, küçük miktarlarda başlangıç materyalinin kullanımı gibi avantajları vardır.

Bu çalışma kapsamında ikinci nesil dizileme teknoloji sistemlerinden biri olan Ion Torrent Platformu kullanılmıştır.

2.2.1.3. Ion Torrent Sistemi ve Özellikleri

Nükleotidlerin uzayan DNA zincirine eklenmesi sonucu açığa çıkan H^+ iyonlarının neden olduğu pH değişimlerini algılayan bir sisteme sahiptir. 'Life Technologies tarafından 2010 yılında piyasaya sürülmüştür. Dizileme için floresan işaretli nükleotidlere, kamera ya da lazer sistemlerine ihtiyaç duymaz. Bu yönüyle Ion Torrent platformunun diğer platformlara göre ekonomiktir.

Ion Torrent platformunda kütüphane ve taslak hazırlama aşamaları; DNA'nın multipleks primerlerle amplicon temelli çoğaltılması, elde edilen fragman uçlarının enzimatik olarak modifikasyonu (end repair) ve adaptörlerin bağlanması, adaptör bağlı kütüphane ürünlerinin emülsiyon PZR ile çoğaltılmasından oluşur. Uçlarına adaptör bağlı DNA fragmanları, üzerlerinde adaptör dizilerin tamamlayıcı bazlarından oluşan dizilerin kovalent olarak bağlı bulunduğu boncuklarla eşleştirilir ve içerisinde PZR için gerekli reaktiflerin ve polimerazın bulunduğu yağ mişelleri oluşturularak her bir DNA fragmanı emPZR ile amplifiye edilir. Zenginleştirme aşamasında amplifiye edilmiş DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, yağ parçacıkları, reaktifler ve amplifikasyona katılmamış boncuklardan ayrıştırılır. Bu platformda altında iyon sinyal alıcısı bulunan milyonlarca kuyucuğa sahip çip üzerinde dizileme yapılmakta ve dizileme sırasında ampliconlara dNTP bağlandığı esnada ortaya salınan H^+ iyonlarını bu sinyal alıcısı algılayarak ham veriye dönüştürmektedir (93).

İş akışı sırasıyla, sinyal işleme, baz isimlendirme, haritalama, varyant isimlendirme-önceliklendirme ve yorumlanması basamaklarından oluşmaktadır. Bu basamaklar platformun Torrent Suite Server (TSS) olarak adlandırılan programı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Varyant isimlendirme ve önceliklendirme TSS ile oluşturulmuş BAM ve BAM-BAI formatındaki verinin *Ion Torrent* platformunun *Ion Reporter* programı ile tekrar varyant isimlendirme, önceliklendirme ve ilişkilendirme ile birlikte ileri analize alınmaktadır.

Sinyal İşleme ve Baz İsimlendirme: Bu aşama sonrasında veri haritalanmamış BAM dosyası formatına dönüştürülmektedir.

Ham Verinin Kalite Kontrolü: Ham verinin adaptör kontaminasyonu, in-del ve düşük kaliteli okumalardan kaynaklanan yapay dizilerden arındırılması, standartlara uymayan okumaların çıkarılması veya düzeltilmesi aşamasıdır. Baz kalite değerlerinin ve nükleotid dağılımının görsellenmesini, primer kontaminasyonu, nükleotit içeriği ve GC fazlalığı gibi dizi özelliklerine göre okumaların filtrelenmesini içerir.

Haritalama ve Hizalama: Okumaların referans genomdaki lokalizasyonların belirlenmesi amacı ile haritalanıp hizalandığı basamaktır. FASTQ formatındaki diziler SAM/BAM uzantılı dosya formatına dönüştürülür. Veriler bam dosyası olarak saklanır. Platform bu aşama için TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) algoritmasını kullanmaktadır.

Haritalama Sonrası Kalite Kontrolü: AQ17 (alignment quality 17): %2 ve daha düşük hata payı ile haritalanan baz sayısı, AQ20 (alignment quality 20): %1 ve daha düşük hata payı ile haritalanan baz sayısı ve Perfect (mükemmel): hata payı olmayan olmak üzere üç formu vardır.

Varyant Belirleme, Filtreleme ve İsimlendirme: Hizalanmış dizilerin referans genomla kıyaslanarak varyasyonların belirlendiği basamaktır. İleri analiz aşamasında TSS tarafından üretilmiş BAM formatındaki referans genoma hizalanmış olarak saklanan veriler *Ion Reporter* programına aktarılır, *Ion Reporter* programı çalışma için belirlenmiş varyant isimlendirme ve analiz parametreleri ile varyantları belirleyerek ilişkilendirme sonrası detaylı VCF raporu oluşturur. Varyantlar belirlendikten sonra IGV (*Integrated Genome Browser*) programında görüntülenebilir.

2.2.1.4. Varyant Analizinde Kullanılan Tahmin Programları

Varyantların analizinde aşağıdaki *in silico* programlarından yararlanılarak tahminsel patojenite değerlendirilmiştir.

Mutation Taster: İnsan genomundaki dizi değişimlerinin patojenite etkisinin değerlendirildiği hesaplamaya dayalı bir programdır. Ekzonik ve inronik değişimler, kısa insersiyon, delesyon ile ekzon-intron sınırındaki değişimlerin fonksiyonel etkilerini tahmin etme amacıyla tasarlanmış bir tahmin aracıdır. Analizde *prob value* olarak verilen değer tahminin olasılığını belirtmektedir. Bu değer 1'e yaklaştıkça güvenirliliği artmaktadır (94).

PROVEAN: PROVEAN, protein yapısını oluşturan aminoasit diziliminde meydana gelen değişimlerin protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin etmek için geliştirilmiş bir analiz aracıdır. Hem tek hem de çoklu amino asit değişimlerinin ortaya çıkaracağı etkileri tahmin eder. Eşik değeri -2.5 olarak belirlenmiştir. Bundan yüksek değerler *neutral* olarak bildirilir. Bu durum değişen amino asitin protein üzerindeki etkisinin patojenik olma olasılığının düşük olduğunu gösterir. Eşik değerinden daha düşük sayısal veriler ise, aa değişiminin protein üzerindeki etkisinin patojenik olma olasılığının yüksek olduğu anlamına gelir ve *deleterious* olarak bildirilir (95).

SIFT: Amino asit değişimlerinin protein fonksiyonunu nasıl etkilediğini gösteren hesaplamaya dayalı bir tahmin aracıdır. PSI-BLAST'tan homolog diziler arasındaki korunmuşluğun analizini yaparak bir tahmin puanı verir. SIFT tahmin puanı 0 ve 1 aralığında olur. 0'a yakın değerler *Damaging*, 1'e yaklaştıkça *Tolerated* olarak verilir (96,97).

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2): Yapısal ve karşılaştırmalı evrimsel yaklaşım kullanarak, aminoasit değişimlerinin insan protein stabilitesi ve fonksiyonu üzerindeki etkisinin tahminini verir. Puanlama aralığı 0'dan 1'e kadardır. 0 değeri "*Benign*" olarak isimlendirilirken, 1'e yaklaştıkça "*Possibly Damaging*", "*Probably Damaging*" ve "*Damaging*" tanımlamaları yapılır. Sayısal puanlamanın yanı sıra renk skalası görseli de kullanılır. Bu skalada, yeşil "*benign*", kırmızı renge doğru geçiş ise gittikçe artan patojenite etkisini gösterir ve "*damaging*" tanımıyla ifade edilir (98).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu, 2003-2017 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına, Türkiye'deki çeşitli Nöroloji kliniklerinden CADASIL/CARASIL klinik tanısı ile yönlendirilen olgular oluşturdu. Moleküler Genetik laboratuvarımızda 2005 ve öncesinde *NOTCH3* geni ekzon 3 ve 4 analizi ile değerlendirilen toplam 14 olgu, daha sonra 2006-2014 yıllarında hedef ekzon sayısı artırıldığında (ekzon 2-6, 11) 80 olgu incelenmiştir. 2015 ve 2017 yılları arasında ise, 64 olgu algoritmik bir yaklaşımla *NOTCH3* ve *HTRA1* gen analizleri ile değerlendirildi. Projeye katılan olgularda panel-gen testinde kapsanmayan bölgeler için Sanger dizileme yapıldı.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (17.12.2015 tarih ve 398480 sayı, ek-1). Çalışmaya katılan olgulardan bilgilendirilmiş onam alındı (ek-2).

3.2. Olguların Değerlendirilmesi

3.2.1. Klinik değerlendirmeler

Olguların öykü ve fizik muayene bulguları ekte (Ek-1) gösterilen moleküler genetik analiz istek formu esas alınarak kaydedildi. Aile öykülerine göre aile ağaçları çizildi.

3.2.2. Moleküler Analizler

3.2.2.1. DNA eldesi

DNA izolasyonları, steril 2 ml K₃EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon / manyetik boncuk bazlı sisteme özgün kitler (*Magnapure Large Volume KIT*, ve *EZ1 DNA Blood 350 ml kit 154054059 ref no:951054 QIAGENE*) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı.

3.2.2.2. Sanger Dizileme İçin DNA Kalite Ölçümü

DNA İzolasyonu sonrası örneklerinin yoğunlukları (ng/μl) ve absorbsiyon ölçümleri ($A_{260/280} \sim 1,80 - 1,89$) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, ThermoScientific). $A_{260/280}$ değerleri 1.80'den daha az olan örnekler yüksek

protein kontaminasyonu nedeni ile manuel olarak tekrar çöktürülerek saflaştırıldı (Son konsantrasyonu 2Mm Ammonium Asetat [$\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$] ve 2,5 hacim %100 etanol [$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$] ile çöktürüldükten sonra, pellet 2 defa %80'lik ve bir defa %100'lük etanolde yıkandıktan sonra kurutularak, dH_2O 'da çözüldü). $A_{260/280}$ değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase enzimi ile muamele edilerek fazla olan ribonükleik asitler parçalandı.

3.2.2.3. Primer Tasarlanması

Primerlerin tasarlanması aşamasında aşağıdaki özellikler göz önünde bulunduruldu;

- İleri-geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olması (en fazla +/- 2-5°C fark),
- 18-24 nükleotid içermesine ve içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin mümkün olduğunca eşit dağılımlı olması,
- Gen bölgesinde beklenen mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsamaması,
- Dizi analizinde ilk ~30-60 bazın iyi okunamayabileceği,
- Seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi içermemesi

Primerlerin özgünlüğü, UCSC Genome Bioinformatics'den *in silico* PZR interaktif sistemi (99) ile test edildi.

3.2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH_4) $_2\text{SO}_4$] (ThermoScientific), 25 mM MgCl_2 (ThermoScientific), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 μM dNTP (ThermoScientific), 0,2/0,5 μM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taqpolimeraz enzimi (ThermoScientific) ve 200 ng genomikDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH_2O) ile 50 μl 'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında

amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'ı ile birlikte çalışıldı.

Tablo 3-1: PZR programı

Denatürasyon	x 25-40 Döngü	95°C	10dk
Bağlanma		64-52°C	30sn
Uzama		70°C	4sn - 1dk
Bekleme		4°C	1saat
Duraklama		10°C	∞

Yukarıdaki PZR programında, termal döngü cihazlarında başlatıldı. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

3.2.2.5. PZR saflaştırma

PZR saflaştırma işlemi için GeneJET PCR Purifikasyon Kiti (Thermo Scientific) kullanıldı. Kolon purifikasyon tekniğini kullanan bu kitte, elimizdeki PZR ürünümüzün içine aynı miktarda (50 µl) 1:1 oranında Binding Buffer eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra, tüm sıvı kit içinden çıkan filtreli GeneJET purifikasyon kolonuna aktarıldı ardından 13.000rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Filtre altına süzülen süpernatant atıldı. Aynı filtreli kolon tübüne 700 µl Wash Buffer eklendikten sonra 13.000rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı ve filtre altında kalan süpernatant atıldı. Bu işlemin ardından Wash Buffer daki alkol kalıntılarını temizleme amacıyla kolon tübündeki filtre yeni bir kolona aktarılır ve hiç bir şey eklenmeden boş bir şekilde 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu filtre çıkarılarak yeni bir mikrosantrifüj tübüne alındı ve filtreye 20-50 µl aralığında Elution Buffer eklendi. Bu sayede saflaştırılmış PZR ürünümüz, filtreden mikrosantrifüj tübüne aktarımı sağlandı.

3.2.2.6. Dizi PZR Reaksiyonu

PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan ampikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi.

Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı. Çalışmaların tümü buz üzerinde gerçekleştirildi.

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer, BigDye v3.1 (ddNTPleri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), primer (PZR da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (dizi okuma kalitesi için seçilir) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH₂O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plak (plate - USA Scientific- 800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü.

Tablo 3-2: Dizi PZR programı

Denatürasyon	X 25 Döngü	96°C	10 sn
Bağlanma		50°C	5 sn
Uzama		60°C	4 dk
Sonlanma	4°C		∞

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden temizliği için plak içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklendi. Plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi ve 3810 rpm’de 45 dak. santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak kuyucuk ağızları üste gelecek biçimde çevrildi ve 1100 rpm’de 30 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70’lik etanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm’de 20 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak 1170 rpm’de 60 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer’ı [(dH₂O ya da HiDi

formamid (Highly Deionized formamid)] eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dakika denatüre edildi, 2 dakika buz üzerinde bekletildi ve ABI3500 cihazında yürütüldü.

3.2.2.7. Kapiller Elektforez

Saflaştırılan örnekler ABI3500 cihazı için uygun olan plak (USA Scientific-800-522-8477) her bir kuyuya bir örnek gelecek şekilde yerleştirildi. Plak santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 1200 RPM de 2 dakika çevrildi. Santrifüj bitince, plak ABI3500 cihazına yerleştirilip yürütme işlemine geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dye set seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı:1,6 kVolts, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (datadelay): 250 sn. 'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

3.2.2.8. Kapiller Elektforez Sonuçları ve Değerlendirmeleri

Kapiller elektforezi sonucunda alınan piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı. Elektroferogramda pik rengi, Adenin ise yeşil, Guanin ise siyah, Sitozin ise mavi ve Timin ise kırmızı ile gösterildi. Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v2.7 (ABI) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi.

Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde;

UCSC Genome Browser (100), Ensembl Genome Browser (101) vb. çeşitli veribankası sitelerinden yararlanıldı.

SeqScape V3 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işleminden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape V3 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak

tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP , HGMD ve ENSEMBL GeneSNPView gibi veritabanları kullanarak programda işaretlendi.

Bu analizde saptanan değişimler daha önce bahsedilmiş *in silico* programlarından (*Mutation Taster*, *PolyPhen-2*, *SIFT*, *PROVEAN*) yararlanılarak tahminsel patojenite değerlendirilmiştir.

3.2.2.9. Yeni Nesil Dizileme (YND) Tabanlı Panel-Gen Testi

YND alışması, özgün tasarlanmış hedef panel-gen testi ile Ion Torrent PGM platformunda geekleştirildi.

3.2.2.10. YND için DNA Kalite lümü

Her olgu için, DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/μl olacak şekilde miliQ (18.2 MΩ) su kullanılarak gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA rnekleri özgün kit kullanılarak (Qubit dsDNA HS Assay Kit) florometrik yöntemle (Qubit® V3.11 Fluorometer) tekrar ölçüldü.

3.2.2.11. YND paneli için hedef bölgelerin belirlenmesi ve primer tasarımı

Panel kapsamında, OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) ve HGMD (*Biobase Professional*) veri tabanları genler ve mutasyonları açısından tarandı. Tekrar sayısı artışları ve genomik düzeydeki büyük indel mutasyonlar IonTorrent PGM platformuna uygun olmadığından elendi. Her bir genin 2015 yılındaki HGMD transkripti referans alınarak IonAmpliSeq Designer internet sayfasından (21) ilişkili genlerin kodlayan ekzon bölgelerini, UTR bölgeleri ile ekzonların 10 b intron sınır bölgelerini içeren 242,96 kb'lık alan, toplam 884 ampikon ile % 98,71 kapsamda (coverage) iki primer havuzundan oluşan bir YND paneli oluşturuldu.

Demans Paneli adı verilen nörodejeneratif hastalıklarla (CADASIL, Parkinson Hastalığı, Alzheimer hastalığı) ilişkilendirilmiş genleri barındıran panel-gen testindeki bilgiler aşağıda verilmiştir.

Demans Panel-gen Bilgileri: *ADAM10* (15q22, NM_001110.2), *APOE*(19q13.2, NM_000041.2), *APP* (21q21.2, NM_000484.3), *ATP13A2* (1p36, NM_022089.2), *ATP1A3* (19q13.31, NM_152296.3), *C10orf2* (10q23.3-q24.3, NM_021830.4), *CALHM1* (10q24.33, NM_001001412.3), *CLU* (8p21-p12, NM_001831.2), *CP* (3q23-q25, NM_000096.3), *DCTN1* (2p13, NM_004082.4), *DNAJC13* (3q22.1, NM_015268.3), *DNAJC6* (1p31.3, NM_001256864.1), *EEF1D* (8q24.3, NM_032378.4), *EIF4G1* (3q27-qter, NM_198241.2), *FBXO7* (22q12-q13, NM_012179.3), *GAK* (4p16, NM_005255.2), *GBA* (1q21, NM_001005741.2), *GCH1* (14q22.1-q22.2, NM_000161.2), *GIGYF2* (2q37.1, NM_001103146.1), *GRN* (17q21.32, NM_002087.2), *HTRA2* (2p12, NM_013247.4), *LRKK2* (12q12, NM_198578.3), *MAPT* (17q21.1, NM_005910.5), *NOTCH3* (19p13.2-p13.1, NM_000435.2), *NPC1* (18q11-q12, NM_000271.4), *PARK2* (6q25.2-q27, NM_004562.2), *PARK7* (1p36.33-p36.12, NM_007262.4), *PINK1* (1p36, NM_032409.2), *PLA2G6* (22q13.1, NM_003560.2), *POLG* (15q25, NM_002693.2), *PRKRA* (2q31.2, NM_003690.4), *PSEN1* (14q24.3, NM_000021.3), *PSEN2* (1q31-q42, NM_000447.2), *SLC6A3* (5p15.3, NM_001044.4), *SMPD1* (11p15.4-p15.1, NM_000543.4), *SNCA* (4q21, NM_000345.3), *SORL1* (11q23.2-q24.2, NM_003105.5), *SYNJ1* (21q22.2, NM_003895.3), *TH* (11p15.5, NM_199292.2), *TREM2* (6p21.1, NM_018965.2), *UCHL1* (4p14, NM_004181.4), *VPS35* (16q12, NM_018206.4).

3.2.2.12. Qubit 2.0 Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü

Seyreltilmiş DNA örneklerinden kalibrasyon amaçlı *Qubit dsDNA HS Assay Kit* ile ölçüldü. Kalibrasyon ölçümlerinde, kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanıldı. Standart örneklerin her birine 199 µl *Qubit® dsDNA HS Buffer* ve 1 µl *Qubit® dsDNA HS Reagent* kullanılarak çalışma solusyonu hazırlandı. 10 µl standart örnek 190 µl çalışma solusyonu ile karıştırılıp 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek *Qubit® 2.0 Florometre'* ölçüldü. Her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solusyonu kullanılarak miks (198 µl çalışma solusyonu + 2 µl seyreltilmiş DNA örneği) hazırlanarak iki dakika oda sıcaklığında inkübe edilip ölçüldü. Örnek DNA yoğunlukları istenen aralığa (1,6-2 ng/µl) gelinceye kadar gerekli seyreltme ya da yoğunlaştırma işlemleri yapıldı.

3.2.2.13. Hedef bölgelere ait Hot Spot dosyasının oluşturulması

Tasarlanan YND panelinin biyoinformatik analizlerinde, belirlenen tanımlanmış varyasyonların öncelikli olarak bakılmasını sağlamak için hazırlanan bu dosyada, hedeflenen bölgelerde yer alan bilinen bütün varyasyonları içeren bilgiler, amplikonların hg19/GRCh37 ile uyumlu başlangıç ve bitiş koordinatları girilerek ENSEMBL (<http://grch37.ensembl.org/>) veri bankasından indirildi. Her bir varyasyonun yer aldığı kromozom, başlangıç ve bitiş koordinatları, ismi, referans ve değişime uğramış allel bilgilerini kapsayacak bir excel dosyası oluşturuldu. Tanımlanmış mutasyonlar bilgileri, *HGMD Professional 2015.4*'de kontrol edilerek kaydedildi. Oluşturulan excel dosyası, BED dosyası formatına çevrilerek, *Torrent Server* ve *Ion Reporter* yazılımlarındaki ilgili analiz akış şemasına eklendi.

3.2.2.14. Kütüphane hazırlanması

Kütüphane hazırlanması, *IonAmpliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies)* kullanılarak, firma protokollerinde belirtilen şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, *Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies)* ile barkodlandı. Barkodlanan kütüphane ürünleri *Agentcourt AMPure XP reagent* ve % 70'lik alkol kullanılarak saflaştırıldı. Normalizasyon için miktar tayini, *Ion Library Quantitation Kit* kullanılarak qPCR yöntemi ile yapıldı.

3.2.2.15. Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması

Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması için toplam 884 primer çifti içeren (havuz I: 448 primer çifti; havuz II: 436 primer çifti) iki adet primer havuzu kullanıldı. Her bir örnek için iki farklı primer havuzu kullanılarak Tablo 3-3' deki gibi iki farklı karışım hazırlandı.

Tablo 3-3: 2X primer havuzu için hazırlanan karışım

Malzeme	Miktar
5X Ion Ampliseq HiFi Miks	4 µl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	10 µl

PZR için hazırlanan iki pool için, iki farklı miks kullanılarak her bir örnek başına Tablo 3-4’de gösterilen şekilde iki farklı solüsyon oluşturuldu.

Tablo 3-4: Kütüphane PZR solüsyonları

2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks	14 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	6 µl
Total hacim	20 µl

Hedef bölgelerin çoğaltılması için, hazırlanan PZR solusyonu, program kullanılarak termal döngü cihazında hedef bölgelerin çoğaltılması için kullanıldı.

Tablo 3-5: Termal döngü programı

Evre	Basamak	Sıcaklık	Süre
'Bekleme	Enzim aktivasyonu	99 °C	2 dk
Döngü (x16)	Denatürasyon	99 °C	15 sn
	Bağlanma ve uzama	60 °C	4 dk
Bekleme	-	10 °C	∞

3.2.2.16. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi

Ardından primer dizilerinin kısmi olarak kesilmesi amacıyla, her bir DNA örneğinin iki farklı primer havuzu ile çoğaltılmış olan PZR ürünleri, her birinden 10’ar µl alınarak, toplam hacim 20 µl olacak şekilde birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 2 µl *FuPa Reagent* eklenerek, gösterilen (Tablo 3-6) programda termal döngü cihazına alındı.

Tablo 3-6: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	Süre
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
10 °C	Duraklama (1 saate kadar)

Daha sonra barkod ve adaptor ekleme aşamasına geçildi. Her bir barkod Tablo 3-5’ deki kimyasallar eklenerek 1:4 oranında seyreltilti.

Tablo 3-7: Barkod-Adaptör karışımı

İçerik	Hacim
Ion P1 Adaptör	2 µl
Ion Xpress™ Barcode X ¹	2 µl
Nükleazdan arındırılmış su	4 µl
Toplam hacim	8 µl

* 1: Seçilmiş barkod

Barkod-adaptörlerin, primer dizilerinin kısmi kesiminden sonra elde edilen ürüne ligasyonu için Tablo 3-8’deki karışım eklendi ve Tablo 3-9’deki programda termal döngü cihazına alındı.

Tablo 3-8: Barkod-Adaptör ligasyon solüsyonu

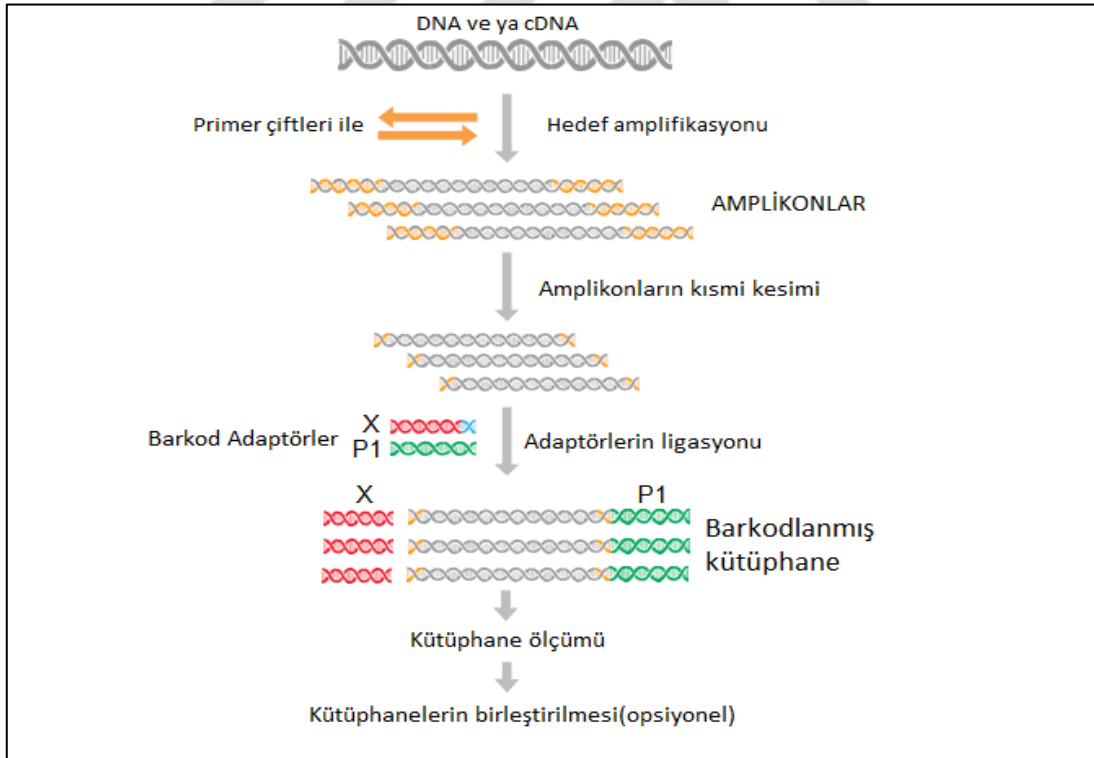
Malzeme	Hacim
Switch solüsyonu	4 µl
Barkod-Adaptör Karışımı	2 µl
DNA ligaz	2 µl
Toplam Hacim (22 µl ürün ile birlikte)	30 µl

Tablo 3-9: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	Süre
22 °C	30 dk
68°C	5dk
72°C	5dk
10 °C	Duraklama (24 saate kadar)

Barkod-adaptörlerin ligasyonu sonrasında fazla DNA materyalinin ve enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla çoğaltılmamış kütüphane ürünlerinin saflaştırılması aşamasına geçildi.

Her bir örneğe 45 µl (toplam örnek hacminin 1.5 katı) *Agencourt AMPure XP Reagent* eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Sonra örnekleri içeren plate manyetik bir rafa (DynaMag-96 Side Magnet Cat.no.12331D) alındı ve solusyon berraklaşmaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 150 µl taze hazırlanmış % 70’lik etanol eklendi. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış ampliconların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.



Şekil 3-1: Kütüphane hazırlama aşamaları (21)’den değiştirilerek alınmıştır.

3.2.2.17. Barkodlanan Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması

Bu aşamada her bir örneğe 45 µl (toplam örnek hacminin 1.5 katı) Agencourt AMPure XP Reagent eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Sonra örnekleri içeren plate manyetik bir rafa alındı ve solüsyon şeffaflaşmaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 150 µl yeni hazırlanmış % 70'lik etanol eklendi. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştırıldığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından kütüphane ürünlerinin normalizasyonu aşamasına geçildi.

3.2.2.18. Saflaştırılmış Kütüphane Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçümü ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama

Kütüphane, normalizasyonun yapılabilmesi için yeterli materyal elde etme amacıyla Platinum™ PCR Super Mix ve Library Amplification Primer Mix ile amplifiye edildi. Bu amaçla, manyetik boncuklara bağlı olarak bulunan kütüphane ürünleri mıknatıslı alınır. 50 µL Platinum™ PCR Super Mix HiFi ve 2 µL Library Amplification Primer Mix her ürüne gelecek şekilde karışım haline getirildi. Yapışkan film ile kapatılan plate, manyetik rafa yerleştirilerek en az 2 dakika oda ısısında beklenilir. 50 µl süpernant her kuyudan çekilerek yeni plate'e (boş kuyu) aktarılır. Yeni platedeki ürünler termal döngü cihazında aşağıdaki tabloda bulunan programda çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi sonrasında Qubit 2.0 Fluorometer cihazı ile amplifiye edilmiş kütüphane ürünleri ölçümü yapıldı.

Tablo 3-10: Kütüphane amplifikasyonu için termal döngü programı

Aşama	Isı	Zaman
Bekleme	98°C	2 Dakika
Döngü(X5)	98°C	15 Saniye
	64°C	1 dakika
Duraklama	10°C	Duraklama

Termal döngü programından alınan ürünler, Agencourt AMPure XP Kit ile iki aşamalı saflaştırma işlemine tabii tutuldu. İlk aşamada yüksek molekül ağırlıklı DNA boncuklara bağlanırken, amplikonlar ve primerler solüsyon halinde kaldı. Bunun için, platedeki örnek hacminin 0,5X miktarında *Agencourt™ AMPure™ XP* Reaktifi 25 µL her bir kuyuya eklendi. Boncuk süspansiyonunu DNA ile iyice karıştırmak için birkaç kez pipetaj işlemi yapıldı. 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Ardından plate magnetik rafa alınır ve burada da en az 5 dakika bekletilir ve solüsyon berraklaştıktan sonra her bir kuyudaki ürün, boncuk pellete zarar verilmeden çekilerek yeni kuyulara aktarıldı.

İkinci turda, amplikonlar boncuklara bağlandı ve primerler süpernatantta kaldı. Boncuk peletinden amplikonları çözülerek ayrıştırıldı.

Bu amaçla, Agencourt AMPure XP Reaktifinden 60 µL eklendi (1.2X orijinal örnek hacmi). Boncuk süspansiyonunu DNA ile iyice karıştırmak için birkaç kez pipetaj yapıldı. Boncuklarla tamamen bağlanması için 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

Bu işlemden sonra plate magnetik rafa aktarıldı. Burada 3 dakika kuyulardaki sıvı berraklaşana kadar yani amplikonlar tamamen boncuklara bağlandıktan sonra, geriye kalan süpernatant çekilerek kuyudan uzaklaştırılıp atıldı.

Boncukların yıkanması için 150 µL yeni hazırlanmış %70'lik alkol her bir kuyuya dağıtıldı. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.

Magnetik boncuklardan amplikonların ayrıştırılarak çözünmesi için her bir örneğe 50 µl *Low TE* (Tris-EDTA) eklendi. *Low TE* eklenmiş örnekleri içeren plate, manyetik rafa yerleştirildi ve manyetik boncukların kuyucukların kenarlarına tam olarak yapışması için oda sıcaklığında 2 dk bekletildi.

3.2.2.19. Kütüphanenin kantitasyonu için dilusyon faktörünün hesaplanması ve ölçümü

199 µl Qubit™ dsDNA HS Buffer ve 1 µl Qubit™ dsDNA HS reagent karıştırılarak Working solüsyonu hazırlandı. 10 µl amplifiye edilmiş kütüphane üzerine 190 µl bu karışım eklendi. İki dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Bu sırada Qubit Standard 1 ve 2 nin üzerine (10'ar µl) ve 190 µl Working Solusyonu eklendi. Bu standartlar Qubit 2.0 Fluorometer cihazına tanıtıldıktan sonra inkübe edilmiş ürünler cihazda ölçüldü.

Elde edilen konsantrasyon 24 ng/µl ye bölünerek dilusyon faktörü bulundu. Sabit olarak belirlediğimiz 10 µl ürün üzerine Dilusyon faktör oranına göre belirlediğimiz miktarda Low TE eklenir. Bu işlemten sonra , tüm kütüphane ürünleri ~100 pM yoğunluğa eşitlenerek normalizasyon gerçekleştirildi.

Eşitleme sonrasında her kütüphane örneğinden 10 µl alınarak emülsiyon PZR'de kullanılmak üzere stok kütüphane hazırlandı.

3.2.2.20. Taslak (*Template*) Hazırlanması

Bu aşamada normalize edilmiş kütüphane ürünlerine emülsiyon PZR ve zenginleştirme işlemleri uygulandı. Bu işlemlerde Ion PGM™ HiQ™ View OT2 Kit kullanıldı.

3.2.2.21. Emülsiyon PZR

Emülsiyon PZR aşamasında hedef bölgeleri içeren kütüphane ürünlerinin yağ-su emülsiyonları oluşturarak klonal çoğaltılması amaçlanmıştır.

Bir önceki basamakta hazırlanan stok kütüphane ürününden 2 µl alınarak toplam hacim nükleazdan arındırılmış su ile 25 µl'ye tamamlandı. Böylece kütüphane ürünleri 12 pM'a seyreltildi. Emülsiyon PZR için tablo 3-14'de gösterildiği gibi amplifikasyon çözeltisi hazırlandı.

Tablo 3-11: Amplifikasyon Çözeltisi

1	Arındırılmış su	25 µl
2	Ion Pgm Hi-Q View Enzim Miks	50 µl
3	Dilüe kütüphane ürünü	25 µl
4	Ion Pgm Hi-Q View ISP	100 µl
	Total	1000 µl

Hazırlanan amplifikasyon çözeltisi vorteks ile karıştırıldıktan sonra, tüm karışım reaksiyon filtresine (*Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter*) yüklendi. Ardından 2 kez 850 µl reaksiyon yağı filtreye ilave edildi. İşlem sonucunda elde edilecek ürünlerin toplanacağı 2 tübe (recovery tubes) cihaza yerleştirilmeden önce 150 µl Ion OneTouch Breaking Solution eklenip cihaza yerleştirildi. Kullanılan kite uygun programda, IonOneTouch 2 cihazında emülsiyon PZR yapıldı.

**Şekil 3-2: Ion OneTouch Emülsiyon PZR cihazı**

- 1) Ion OneTouch Reaksiyon Filtresi
- 2) Isı bloğu içindeki Amplifikasyon Plate e ulaşımı sağlayan kol
- 3) Atık tübünün koyulduğu alan
- 4) Ion OneTouch Recovery Solüsyon tübü
- 5) Ion OneTouch Oil Solüsyon tübü
- 6) Atık kutusu
- 7) Atık tablası
- 8) Santrifüj
- 9) Ion OneTouch DL Enjektör merkezi
- 10) Cihaz ana ekranı

Emülsiyon PZR sonrası ~10 dk santrifüj yapılarak amplikon yüklü partiküller (ISP) dibe çöktürüldü. Toplam 100 µl ürün kalacak şekilde her iki tüpteki supernatant kısım atıldı. Üstlerine 500 µl Ion OneTouch Yıkama Solüsyonu eklendi. Yeterli pipetaj yapıldıktan sonra 1.5 ml yeni bir eppendorf tüpte bu ürünler birleştirildi. 2,5 dk santrifüj yapıldıktan sonra renkli olan amplikon yüklü partiküllerin olduğu pellete zarar vermeden tüpte 100 µl kalacak şekilde supernatant çekilerek atıldı.

3.2.2.22. Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi

Zenginleştirilme işlemi için gerekli çözeltiler sırasıyla hazırlandı.

1. Melt-Off Çözeltisinin Hazırlanması

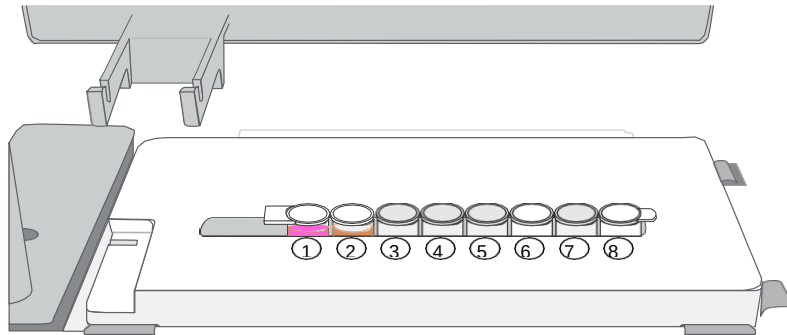
Final yoğunluklar; % 0.1 Tween deterjan ve 125 mM NaOH olacak şekilde hazırlandı.

280 µl Tween çözeltisi + 40 µl 1 M NaOH = 320 µl Melt-Off çözeltisi

2. Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkama

DynaBeads MyOne Streptavidin C1 Beads pipetaj yapıldıktan sonra ve 13 µl alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Eppendorf, manyetik rafa (*DynaMagTM-2 Magnet*) alındı ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilerek boncukların eppendorf duvarına yapışması sağlandı. Kalan supernatant uzaklaştırıldı. 130 µl MyOne BeadsWash Solution eklenerek eppendorf manyetik raftan alındı ve pipet yardımıyla karıştırıldı. Böylece streptavidin C1 boncukları, stok çözeltiden uzaklaştırılmış oldu.

Hazırlanan çözeltiler ve emülsiyon PZR ürünü, tabloda gösterilen sırada 8 kuyulu levhaya yüklendi.



Şekil 3-3: Ion OneTouchTM ES cihazındaki solüsyon yerleşimi

Tablo 3-12: Zenginleştirmede kullanılan solüsyonlar

Kuyu Numarası	Yüklenen malzeme
Kuyu 1	Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)
Kuyu 2	DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl)
Kuyu 3	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 4	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 5	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)
Kuyu 8	Boş

Zenginleştirme işlemi hazırlananlar için hazırlanan bu solusyonlar Ion OneTouch™ ES cihazına yerleştirildi. Zenginleştirme sonrası oluşacak ürünün aktarılacağı 0.2 ml ependorf tüpüne 10 µl nötralizasyon çözeltisi konulduktan sonra cihaz çalıştırıldı.

3.2.2.23. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi

Dizileme için Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit kullanıldı. Klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkamalarının ardından pH kalibrasyonları yapıldı. Zenginleştirilmiş ürünler çipe *Ion 318™ Chip v2* yüklendi. Tablo 3-16'daki gibi dizileme planı oluşturularak dizileme işlemi başlatıldı.

Tablo 3-13: Dizileme plan şablonu

Ion Reporter	Version: 5.6
Örnek	DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion reporter iş akışı	DSD_workflow
Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Kütüphane anahtarı	Ion TCAG (TCAG)
Template Kiti	Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit
Akış sayısı	850
Çip Tipi	Ion 318™ Chip V2
3' Adaptör:	Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGAGAC)
Barkod	IonXpress
Boncuk yükleme (%)	10
Anahtar Sinyal (1-100)	30
Kullanılabilir dizi (%)	30
Referans Kütüphane	Hg 19 (<i>Homo sapiens</i>)
Hedef Bölgeler	IAD82119_197_ Designed
Hotspot Bölgeler	ALZ_PARK_CAD_HOTSPOTS_v2
Eklentiler	CoverageAnalysis FileExporter RunTransfer variantCaller (germline_low_stringency)
Proje	ALZ_PARK_CAD_Panel

3.2.2.24. Veri Analizi

Dizileme sonrasında Torrent Server yazılımına aktarılan verilere ait BAM dosyaları, analiz için Ion Reporter yazılımına aktarıldı. Hedef bölgelere ve *hotspot* bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, Ion Reporter da analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, filtrelerle tabi tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. Öncelikle referansdan farklı olmayan veriler (NoREF), okuma alınamamış bölgelere ait veriler (NoCall) ve nadir allel frekans değerleri (MAF) <0.02 olmayan değişimlere ait veriler filtrelendi.

Filtreleme sonrası kalan değişimler hotspot verilerine göre değerlendirildi. Hotspot dosyalarında tanımları bulunmayan değişimler; bulundukları bölge, çerçeve kayması, dur kodonu oluşumu ve aminoasit değişimine yol açmalarına göre listelendi. Ardından bu tanımlanmamış değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı aşağıdaki tahmin programlarında (*MutationTaster*, *Polyphen-2*, *SIFT*, *PROVEAN*) göre değerlendirildi.

Bunlara ek olarak filtre işleminde sonra saptanan bütün varyantlar *Ion Torrent* Platformuna özgü okuma hatalarını eleme amacıyla IGV dosyalarından kontrol edildi. Bu işlemin de ardından her değişimin çalışma grubunda kaç olguda görüldüğü değerlendirildi.

3.2.3. YND İle Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Doğrulanması

Saptanan değişimler, okuma kapsamlarına ve derinliklerine göre değerlendirildikten sonra doğrulama için Sanger dizileme ile incelendi

4. BULGULAR

Bu tez kapsamında CADASIL/CARASIL klinik tanılı toplam 64 indeks olguda moleküler mutasyonları araştırmak amacıyla algoritmik bir yaklaşımla *NOTCH3* ve *HTRA1* genlerinde inceleme yapıldı.

İlk aşamada hedef ekzonlar 2-6 ve 11 SD ile incelendi. Bu aşamada beş olguda ekzon 4’de, bir olguda ekzon 5’de ve dört olguda ekzon 11’de mutasyon gösterilerek toplam 10 olgu tanı almış oldu (Tablo 3-1) ve mutasyon saptama oranının %15,6 olduğu belirlendi. Bir sonraki aşamada mutasyon saptanmayan 54 olguda YND tabanlı panel-gen testi ile *NOTCH3* geni incelendi. Bir olguda ekzon 19’da ve iki olguda ekzon 22’de mutasyon saptandı. Panel-gen testinin katkısının, % 4.7 olduğu belirlendi. Panel-gen testinin kapsam dışı bıraktığı yedi farklı bölgede, 908 bç’lik bir alan için proje kapsamında özgün primerler tasarlandı. Bu bölgeler 51 olguda SD ile incelendi ancak herhangi bir mutasyon saptanmadı.

Birinci basamak testinde olgu 1 ve olgu 3’te saptanan varyantlar, *NOTCH3* proteininin mutasyonların sık gösterildiği ekstraselüler domaininde (EGF-3 ve EGF-4) yer alan yanlış anlamlı değişimler olduğu ve daha önce literatürde tanımlanmamış olduğu belirlendi (Tablo 4-1).

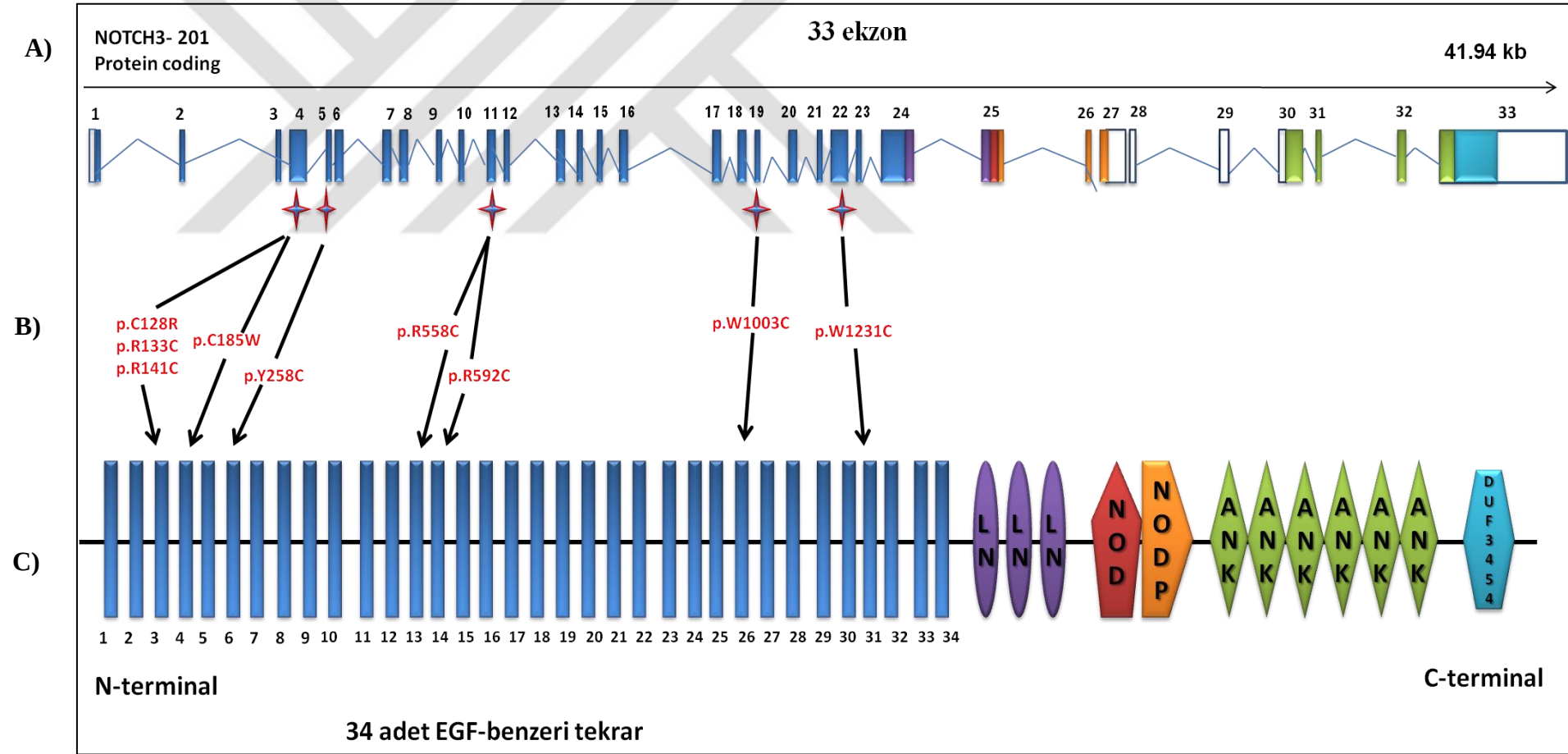
Olgu 1’deki değişim (p.C185W), yüksüz polar sülfhidril grubu içeren sisteini non-polar triptofana dönüştürürken, olgu 3’deki değişim (p.C128R) yüksüz polar sülfhidril grubu içeren sisteini, yüklü polar bazik arjinine dönüşmesine neden olmaktadır. Literatürde bu değişimle (p.C185W) aynı kodonda yer alan üç farklı nokta mutasyonunun (c.553T>C, c.553T>G, c.553T>A) sisteinin yerine sırasıyla arjinin (p.C185R), glisin (p.C185G) ve serinin (p.C185S) geçmesine yol açtığı ve CADASIL hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (70,76,102,103).

Olgu 1’in ailesinde iki sağlıklı erkek ve dört sağlıklı kız kardeşi olduğu bilgisi mevcuttu. Ayrıca tıbbi öyküsünde annesinin sağlıklı babasının ise 75 yaşında başlayan demansı olduğu ve 80 yaşında öldüğü bilgisi raporlanmıştı. Olgu 1’in ailesinde başka etkilenmiş bireyler olmasına karşın, onam vermedikleri için saptanan bu yeni değişim için segregasyon analizi yapılamadı.

Olgu 3'ün ailesinde ise sağlıklı üç kız ve üç erkek kardeşi, bir iskemik ataklar geçirdiği bildirilen kız kardeşi, bir diğer CADASIL öykülü kız kardeşi ve migren öyküsü bildirilen bir kız kardeşi raporlanmıştır. 73 yaşında hayatta olan annesinde migren öyküsü, ve iskemik atakları olan babanın ise 56 yaşında öldüğü bilgisi raporlanmıştır. Çalışmamızda indeks olgumuzda ve CADASIL'den etkilenmiş kız kardeşinde (p.C128R) mutasyonu heterozigot olarak gösterildi.

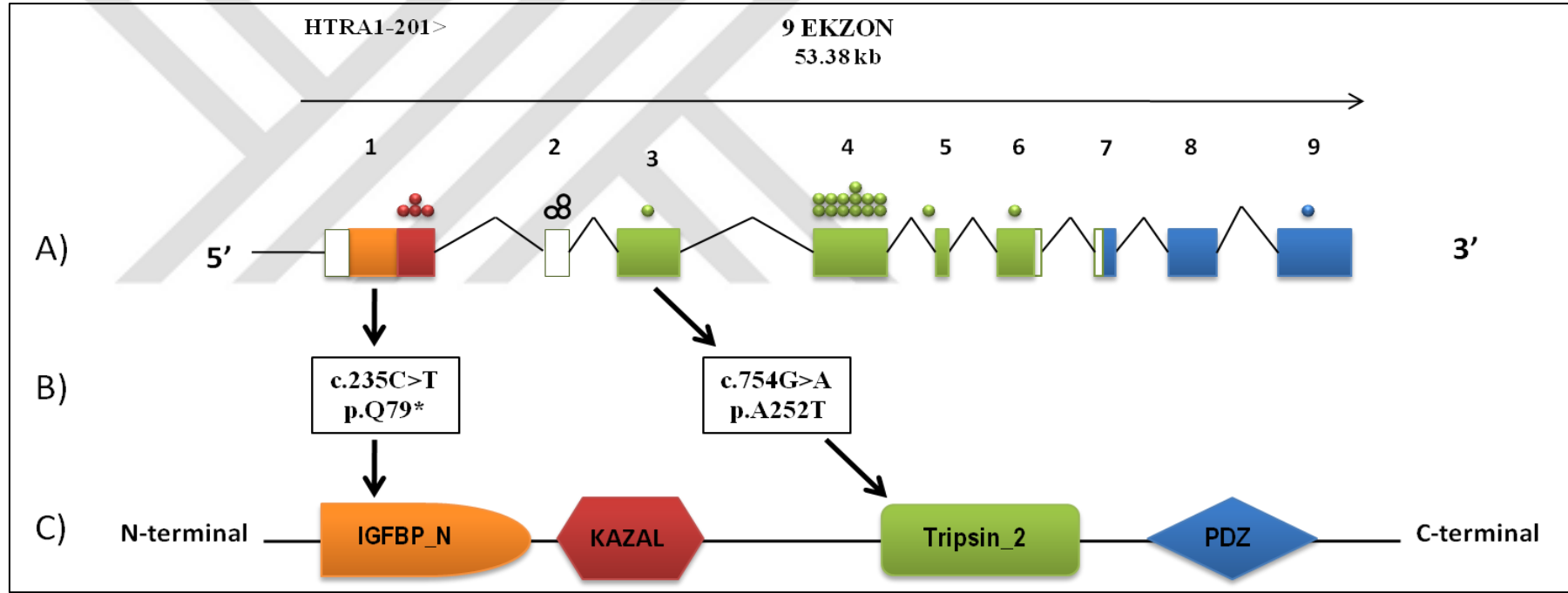
Çalışmanın ikinci basamağında GOM testi pozitif olan olgu 13'te saptanan p.W1003C'nin EGF-26 bölgesinde sistein rezidü sayısını etkileyen ve ilk kez bu çalışmada gösterilen yanlış anlamlı bir varyant olduğu belirlendi (Tablo 4-1). İndeksin üç kız kardeşinden büyük olan ikisi CADASIL'den etkilenmişti ve varyantı heterozigot olarak taşıyorlardı. Test yapılmayan en küçük kız kardeşte de ak madde lezyonu olduğu raporlanmıştır. İndeksin kızında da migren öyküsü mevcuttu. Vefat etmiş iki amcasında da iskemik atak öyküleri bulunmaktaydı.

Çalışmanın son basamağında *NOTCH3* geninde mutasyon saptanmayan 51 olguda *HTRA1* geninde yapılan SD incelemesinde, olgu 14'de daha önce literatürde hastalık ilişkisi gösterilmiş homozigot bir mutasyon (c.754G>A; p.A252T), ekzon 3'de homozigot olarak daha önce bildirilmemiş patojenik nitelikte anlamsız bir varyant (c.235C>T ; p.79Q*) ekzon 1'de saptandı (Tablo 4-2). Bu yeni değişimin, glutamin aminoasitini şifreleyen kodonu, dur kodonuna dönüştürerek protein translasyonunun erken sonlanmasına ve HTRA1 protein fonksiyon kaybına yol açması beklenir. Ekzon 3'de gösterilen bu mutasyon yanlış anlamlı tipte bir değişim olup non-polar alaninin yüksüz polar hidroksil grubu içeren threonine dönüşümüne neden olmaktadır. Bu mutasyonun toplumlarda görülme sıklığı MAF=0.000008/1 (ExAC'da 121102 allelede 1 allele) olarak bildirilmiştir. Aynı değişimin indeksin benzer bulgularla etkilenmiş erkek kardeşinde de homozigot olarak gösterildi. Olgunun anne ve babası aynı köyden oldukları bilgisi mevcuttu.



Şekil 4-1: A) NOTCH3 gen ekzonları (ENST00000263388.6, NM_000435.2), B) Çalışmamızda saptanan mutasyonlar ve etkilediği ekzon ile protein domaini üzerindeki yerleri C) Genin kodladığı NOTCH3 protein domainleri (Q9UM47, ENST00000263388.6, NP_000426)

*Renklendirmeler ekzon bölgelerinin kodladığı protein domainlerine göre yapılmıştır.



Şekil 4-2: A) *HTRA1* gen ekzonları B) Çalışmamızda saptanan mutasyonların hangi ekzon ve protein domainini etkilediği oklarla gösterilmiştir C) *HTRA1* protein domainleri

*Renklendirmeler ekzon bölgelerinin kodladığı protein domainlerine göre yapılmıştır.

* Şekil 4-2 A'daki ekzonlar üzerinde belirtilen yuvarlak noktalar, literatürde bildirilmiş mutasyonların sayı ve dağılımlarını göstermektedir.

Tablo 4-1: Saptanan *NOTCH3* gen mutasyon bilgileri

Olgu No	Aile No	Gen	Ekzon	Nükleotid (NM_000435)	Peptid (NP_000426)	Literatür Bilgisi	dbSNP no	HGMD	MUTATION TASTER	POLYPHEN-2	SIFT	PROVEAN
1	CD#80	<i>NOTCH3</i>	4	c.555T>G	p.C185W	Bu Çalışma	—	—	Disease Causing (0.99)	Probably Damaging (1)	Damaging (0)	Deleterious (-9.60)
2	CD#149	<i>NOTCH3</i>	4	c.457C>T	p.R153C	(102,104,105)	rs797045014	CM971060	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.846)	Damaging (0.05)	Deleterious (-3.88)
3	CD#155	<i>NOTCH3</i>	4	c.382T>C	p.C128R	Bu Çalışma	—	—	Disease Causing (0.99)	Probably Damaging (1)	Damaging (0)	Deleterious (-10.36)
4	CD#70	<i>NOTCH3</i>	4	c.397C>T	p.R133C	(102,106,107)	rs137852642	CM971057	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.846)	Damaging (0.05)	Deleterious (-3.72)
5	CD#157	<i>NOTCH3</i>	4	c.421C>T	p.R141C	(102,107,108)	—	CM971058	Disease Causing (0.99)	Probably Damaging (0.973)	Damaging (0.03)	Deleterious (-3.61)
6	CD#99	<i>NOTCH3</i>	11	c.1774C>T	p.R592C	(109)	rs764148985	CM107182	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.892)	Tolerated (0.11)	Deleterious (-4.54)
7	CD#100	<i>NOTCH3</i>	11	c.1672C>T	p.R558C	(28,110)	rs75068032	CM961046	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.86)	Damaging (-0.03)	Neutral (-2.44)
8	CD#150	<i>NOTCH3</i>	11	c.1630C>T	p.R544C	(111,112)	rs201118034	CM994179	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.462)	Damaging (0.05)	Neutral (-2.35)
9	CD#105	<i>NOTCH3</i>	11	c.1672C>T	p.R558C	(28,110)	rs75068032	CM961046	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.86)	Damaging (-0.03)	Neutral (-2.44)
10	CD#133	<i>NOTCH3</i>	5	c.773A>G	p.Y258C	(102)	—	CM971066	Disease Causing (0.99)	Probably Damaging (1)	Damaging (0)	Deleterious (-7.87)
11	CD#64	<i>NOTCH3</i>	22	c.3691C>T	p.R1231C	(102)	rs201680145	CM971071	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.462)	Tolerated (0.074)	Deleterious (-4.72)
12	CD#112	<i>NOTCH3</i>	22	c.3691C>T	p.R1231C	(102,113)	rs201680145	CM971071	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.462)	Tolerated (0.074)	Deleterious (-4.72)
13	CD#136	<i>NOTCH3</i>	19	c.3009G>C	p.W1003C	Bu Çalışma	—	—	Disease Causing (0.99)	Possibly Damaging (0.848)	Damaging (0.001)	Deleterious (-8.04)

Tablo 4-2: Saptanan *HTRA1* gen mutasyon bilgileri

Olgu No	Aile No	Gen	Ekzon	Nükleotid (NM_002775)	Peptid (NP_002766)	Literatür Bilgisi	dbSNP no	HGMD	MUTATION TASTER	POLYPHEN-2	SIFT	PROVEAN
14	CD#156	<i>HTRA1</i>	3	c.754G>A	p.A252T	(6,114,115)	rs113993968	CM092288	Disease Causing (0.99)	Probably Damaging (0.997)	Damaging (0.001)	Deleterious (-3.51)
15	CD#98	<i>HTRA1</i>	1	c.235C>T	Q79*	Bu Çalışma	—	—	Disease Causing (1)	—	—	—

Tablo 4-3: CADASIL olgularının bilgileri ve klinik bulguları

Olgu No	Aile No	Cinsiyet	Doğum Tarihi	Hastalık Başlama Yaşı	Migren	İskemik Atak	Bilişsel Etkilenme	Demans	Psikiyatrik Bulgular	MRG Bulguları	Ek Bulgular
1	CD#80	D	1966	43	—	—	+	—	—	Subkortikal ak madde lezyonları	*Yürüme güçlüğü
2	CD#149	E	1959	40	+	+	+	—	—	Subkortikal ak madde lezyonları	—
3	CD#155	E	1981	33	+	—	—	—	*+	Subkortikal temporal iskemik odaklar	Disfaji
4	CD#70	E	1961	40	*+	—	+	—	—	Yaygın ak madde lezyonları	—
5	CD#157	E	1969	42	*+	—	+	—	+	Periventriküler kapsula eksternada hiperintens lezyonlar	Dizartri
6	CD#99	E	1960	52	*+	—	+	—	+	Subkortikal ak madde lezyonları	Dizartri Yürüme güçlüğü
7	CD#100	D	1960	49	*+	+	+	—	+	Yaygın subkortikal ve derin ak madde lezyonları	—

8	CD#150	E	1959	40	+	—	+	—	*+	Subkortikal ak madde lezyonları	Dizartri Yürüme güçlüğü
9	CD#105	D	1966	~30	*+	—	—	—	+	Periventriküler derin ak madde lezyonları	Yürüme güçlüğü
10	CD#133	E	1959	54	—	+	—	—	+	Periventriküler ak madde lezyonları	*Dizartri
11	CD#64	E	1941	72	—	+	*+	+	+	Periventriküler ak madde lezyonları	Yürüme güçlüğü
12	CD#112	E	1970	35	—	—	+	+	—	Periventriküler derin ak madde lezyonları	—
13	CD#136	D	1965	43	*+	—	+	—	—	Yaygın subkortikal ak madde lezyonları	—

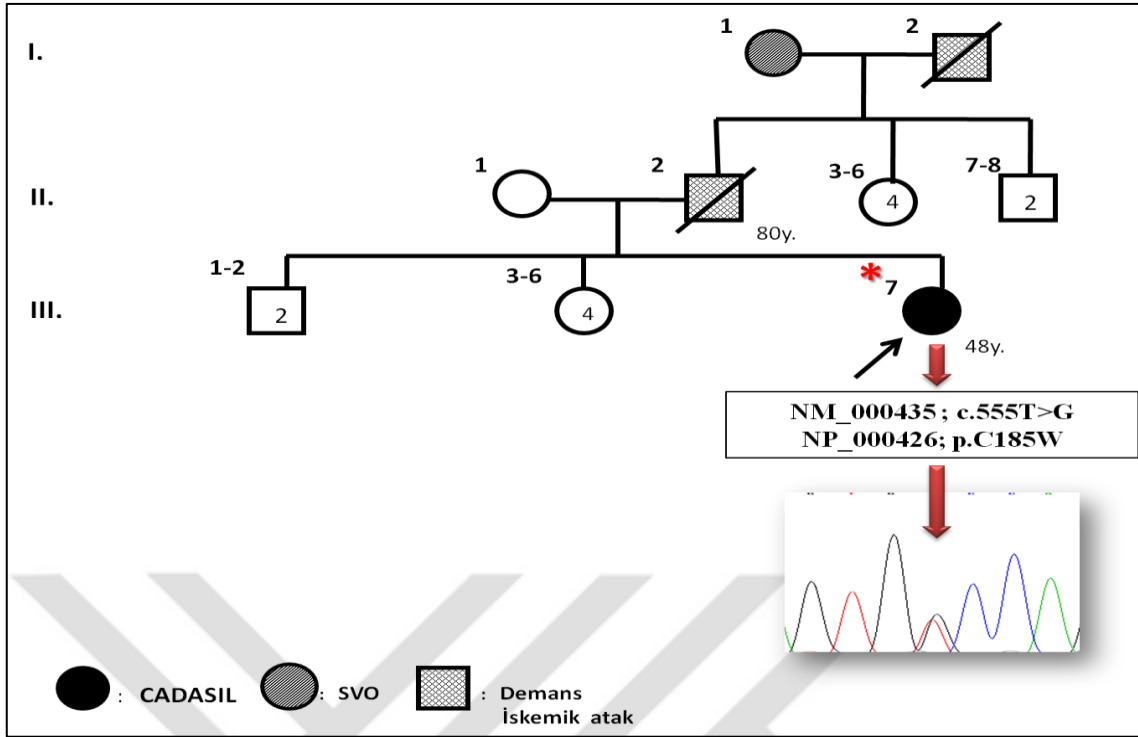
* sembolü ile gösterilenler olgularda ortaya çıkan ilk bulgulardır.

Tablo 4-4 CARASIL olgusunun bilgileri ve klinik bulguları

Olgu No	Aile No	Cinsiyet	Doğum Tarihi	Hastalık Başlama Yaşı	İskemik Atak	Bilişsel Etkilenme	Demans	Alopesi	Yürüme Güçlüğü	Psikiyatrik Bulgular	MRG Bulguları	Ek Bulgular
14	CD#156	E	1982	30	—	+	—	+	+	—	Periventriküler yaygın subkortikal ak madde lezyonları	—
15	CD#136	E	1983	25	—	—	—	—	*+	—	Derin subkortikal , periventriküler yaygın ak madde lezyonları	Brakidaktili

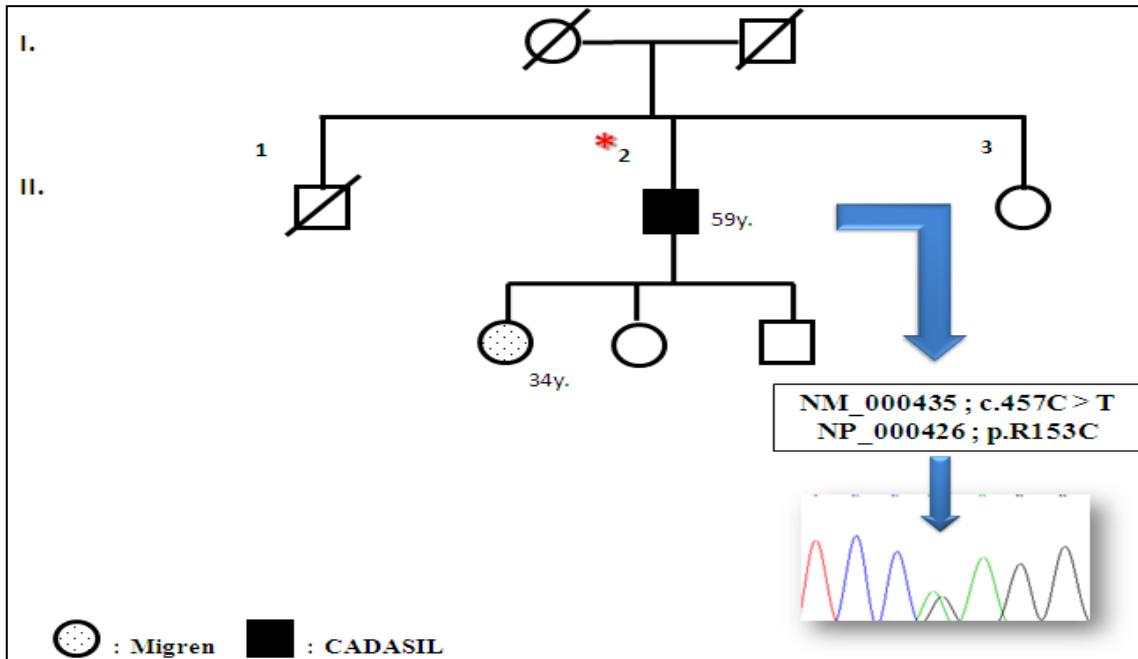
Tablo 4-5: *NOTCH3* mutasyonu olan ve olmayan olgularda saptanan bulguların oranı

BULGULAR	<i>NOTCH3</i> MUTASYON SAPTANAN OLGULAR		<i>NOTCH3</i> MUTASYON SAPTANMAYAN OLGULAR	
	$\Sigma n=13$		$\Sigma n=51$	
	n	%	n	%
Migren	9	69,2	24	47
İskemik atak	4	23	14	27,4
Bilişsel etkilenme	10	76,9	27	52,9
Demans	1	7,6	6	11,7
Psikiyatrik bulgular	8	61,5	13	25,4



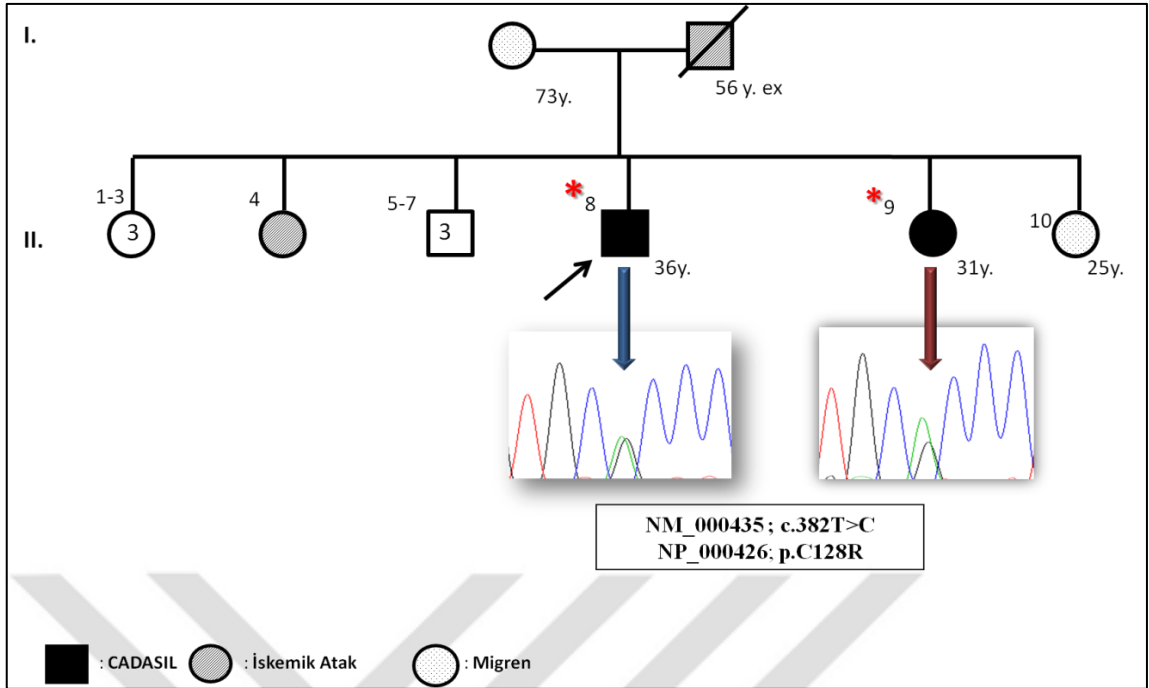
Şekil 4-3: Olgu 1 (CD#80) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-7) uygulanan Sanger dizileme testinde, ilk defa bu çalışmada saptanan, *NOTCH3* (c.555T>G; p.C185W) heterozigot mutasyonu



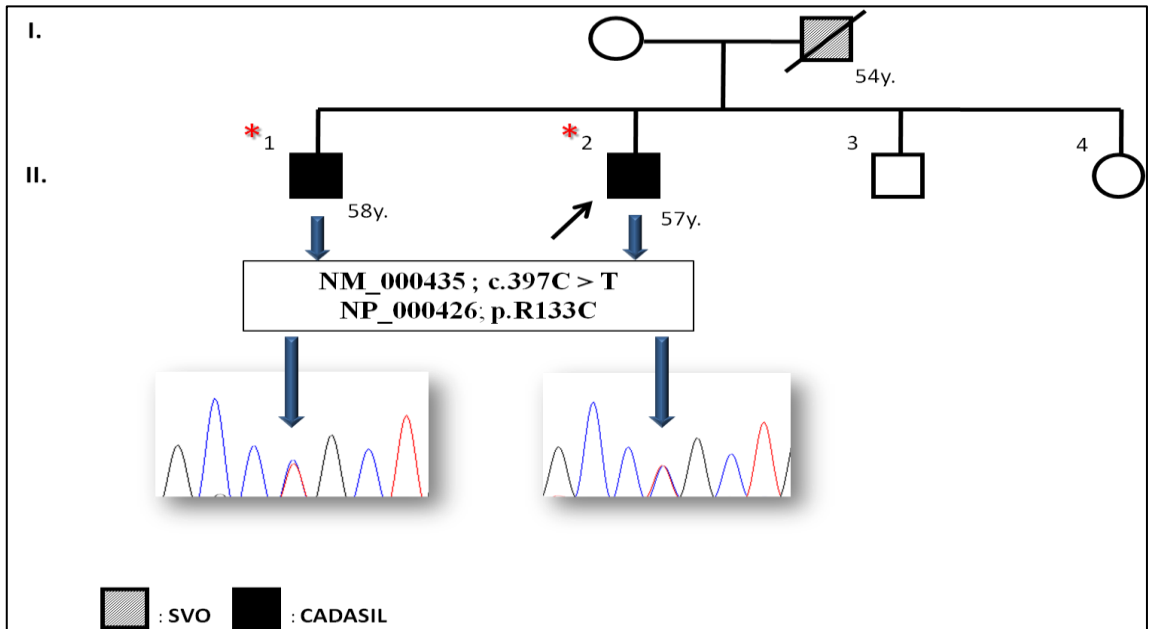
Şekil 4-4: Olgu 2 (CD#149) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks (II-2)'e ait Sanger dizileme testinde saptanan *NOTCH3* (c.457C>T; p.R153C) heterozigot mutasyonu



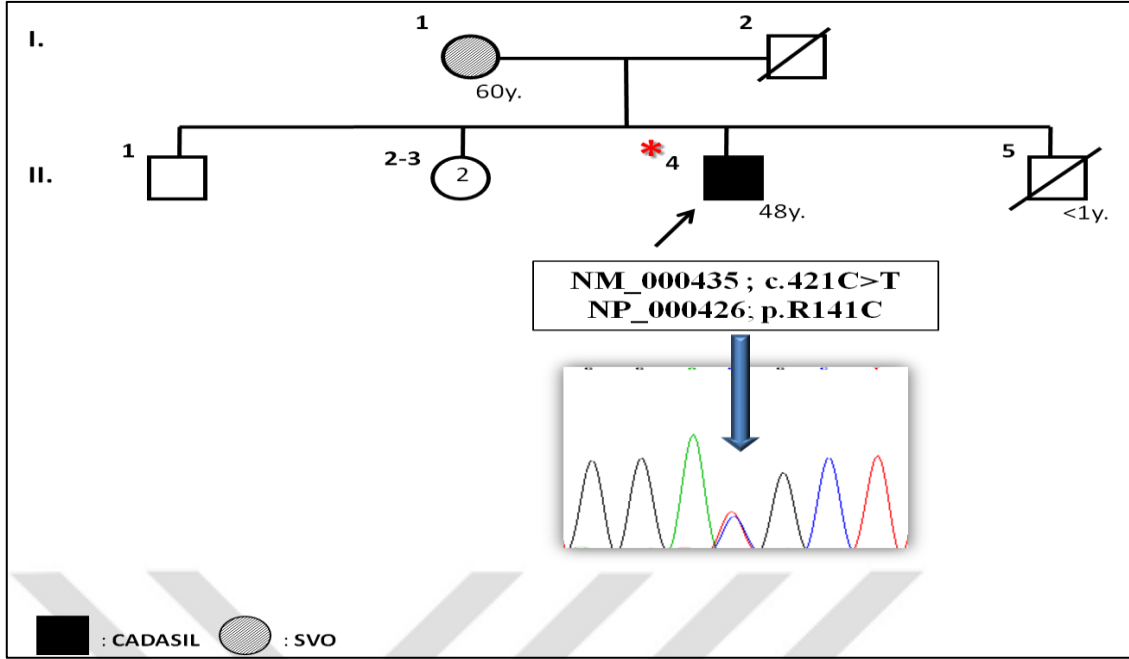
Şekil 4-5: Olgu 3 (CD#155) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemeleri

İndeks olgu (II-8) ve etkilenmiş kız kardeşine ve (II-9) ait Sanger dizileme testinde ilk defa bu çalışmada saptanan, *NOTCH3* (c.382T>C; p.C128R) heterozigot mutasyonu



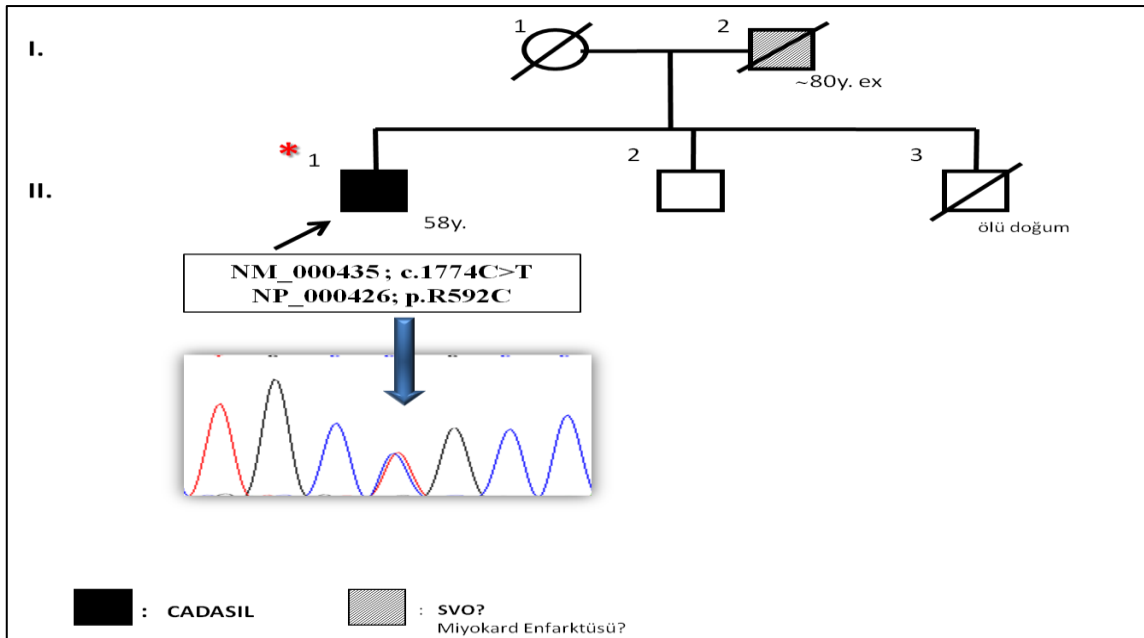
Şekil 4-6: Olgu 4 (CD#70), aile ağacı ve elektroferogram görüntülemeleri

İndeks olguya (II-2) ve etkilenmiş erkek kardeşine (II-1) yapılan Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.397C>T; p.R133C) heterozigot mutasyonu



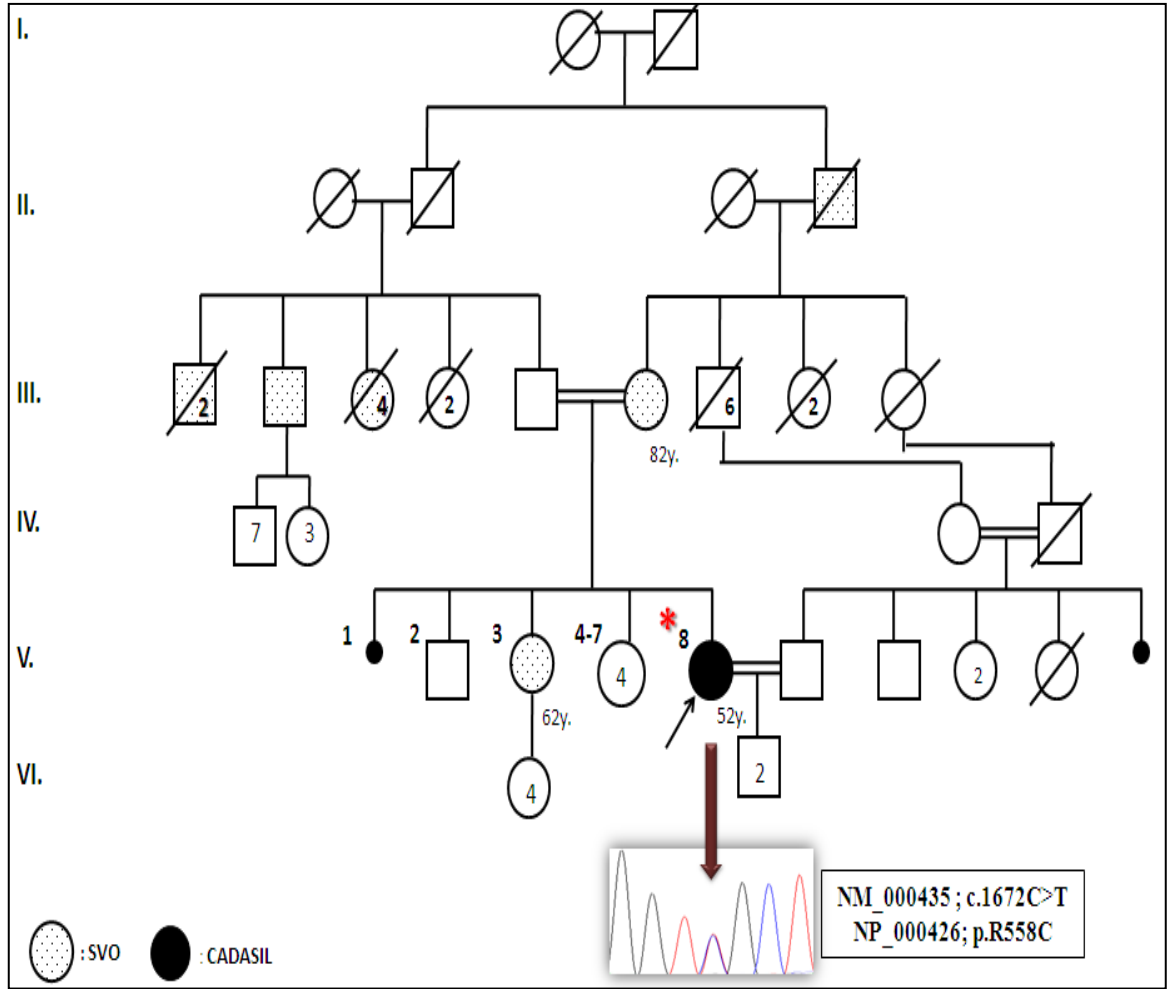
Şekil 4-7: Olgu 5 (CD#157), aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-4) ait Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.421C>T; p.R141C) heterozigot mutasyonu



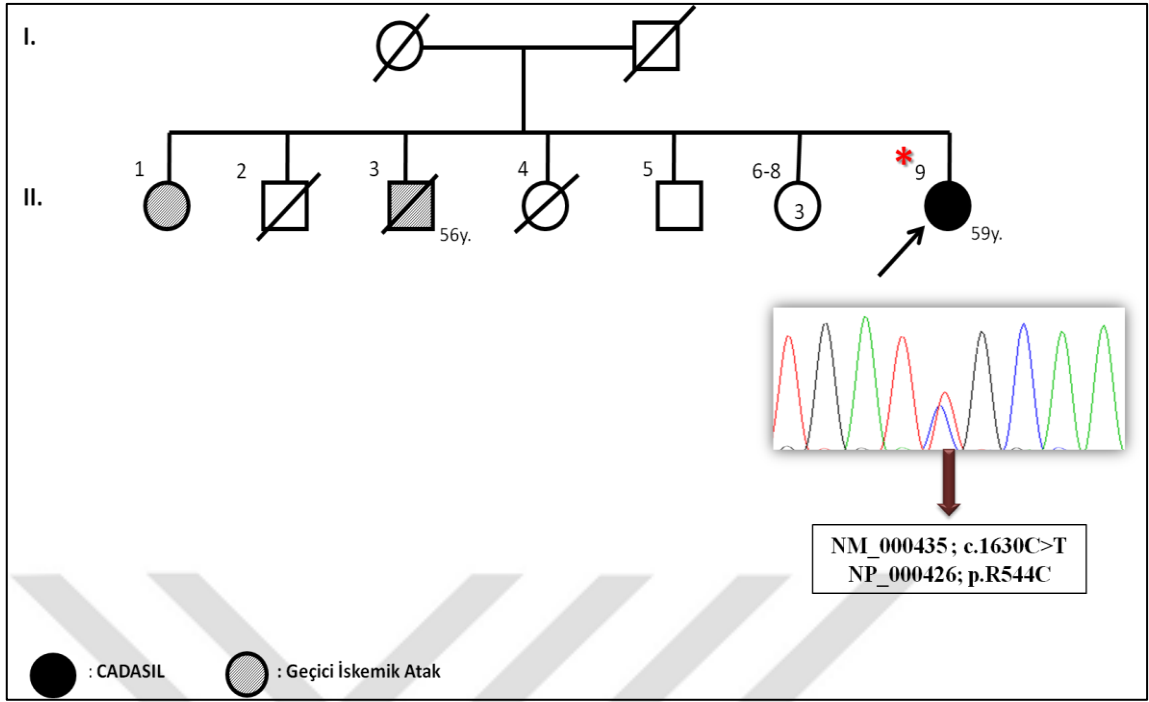
Şekil 4-8: Olgu 6 (CD#99), aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-1) ait Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.1774C>T; p.R592C) heterozigot mutasyonu



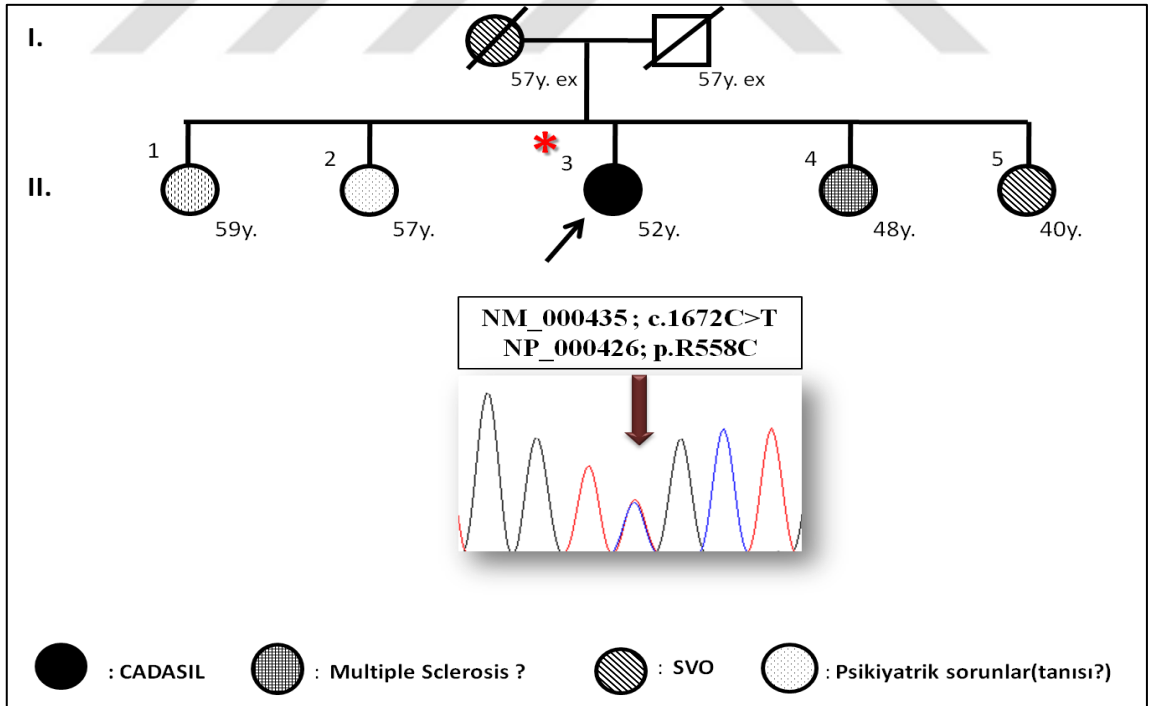
Şekil 4-9: Olgu 7 (CD#100) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (V-8) ait Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.1672C>T; p.R558C) heterozigot mutasyonunun elektroferogram görüntülemesi



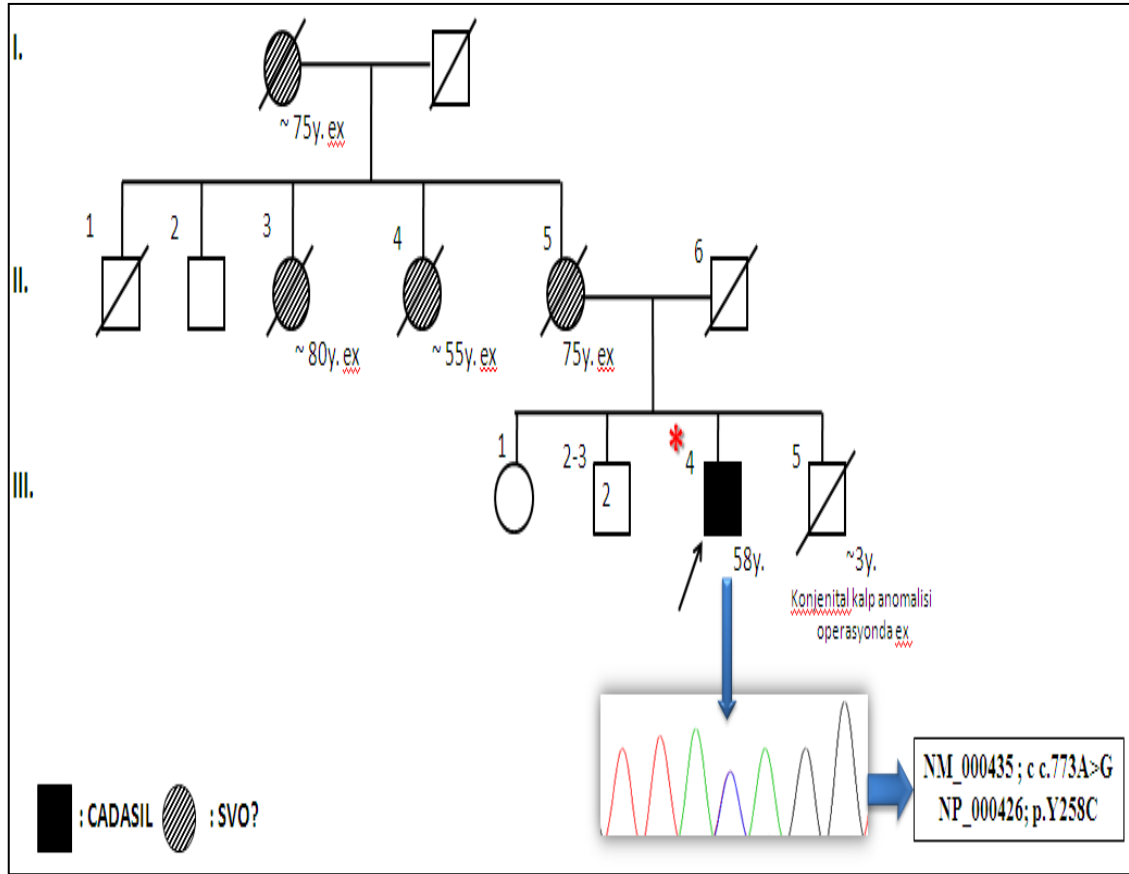
Şekil 4-10: Olgu 8 (CD#150) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-9) ait Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.1630C>T; p.R544C) heterozigot mutasyonu



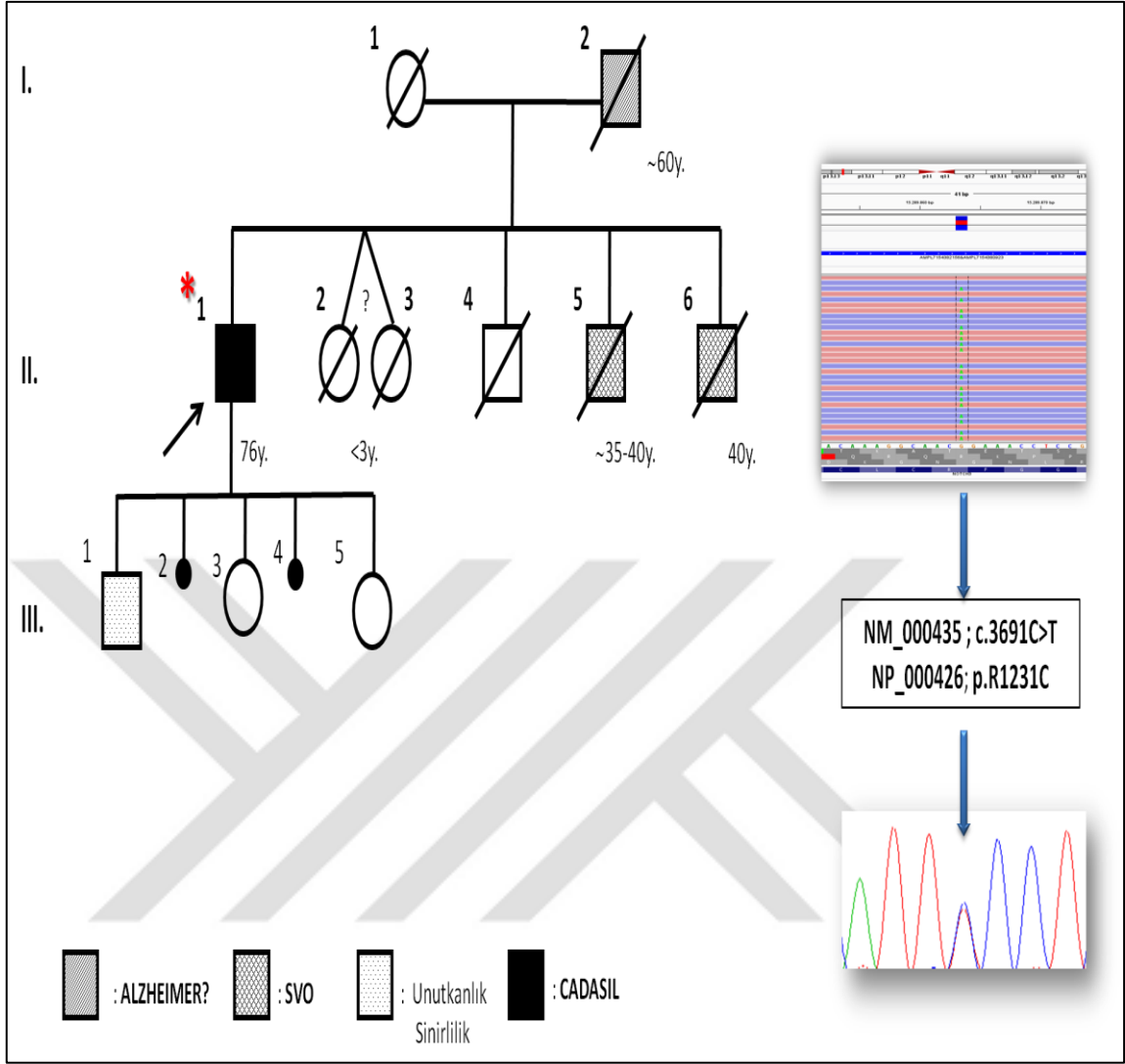
Şekil 4-11: Olgu 9 (CD#100) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-3) ait Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.1672C>T; p.R558C) heterozigot mutasyonu



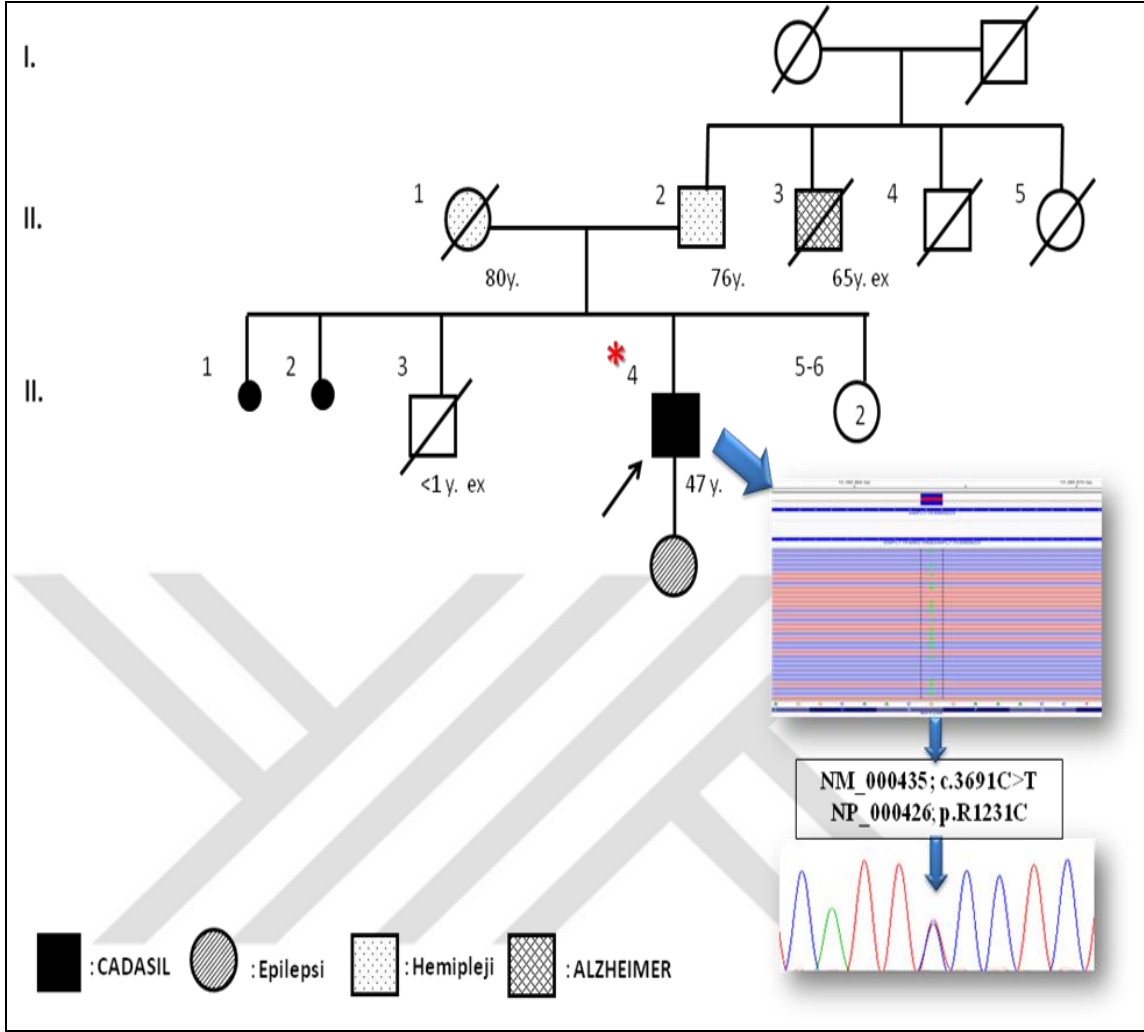
Şekil 4-12: Olgu 10 (CD#100) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-3) ait Sanger dizileme testinde saptanan, *NOTCH3* (c.1672C>T; p.R558C) heterozigot mutasyonunun elektroferogram görüntülemesi



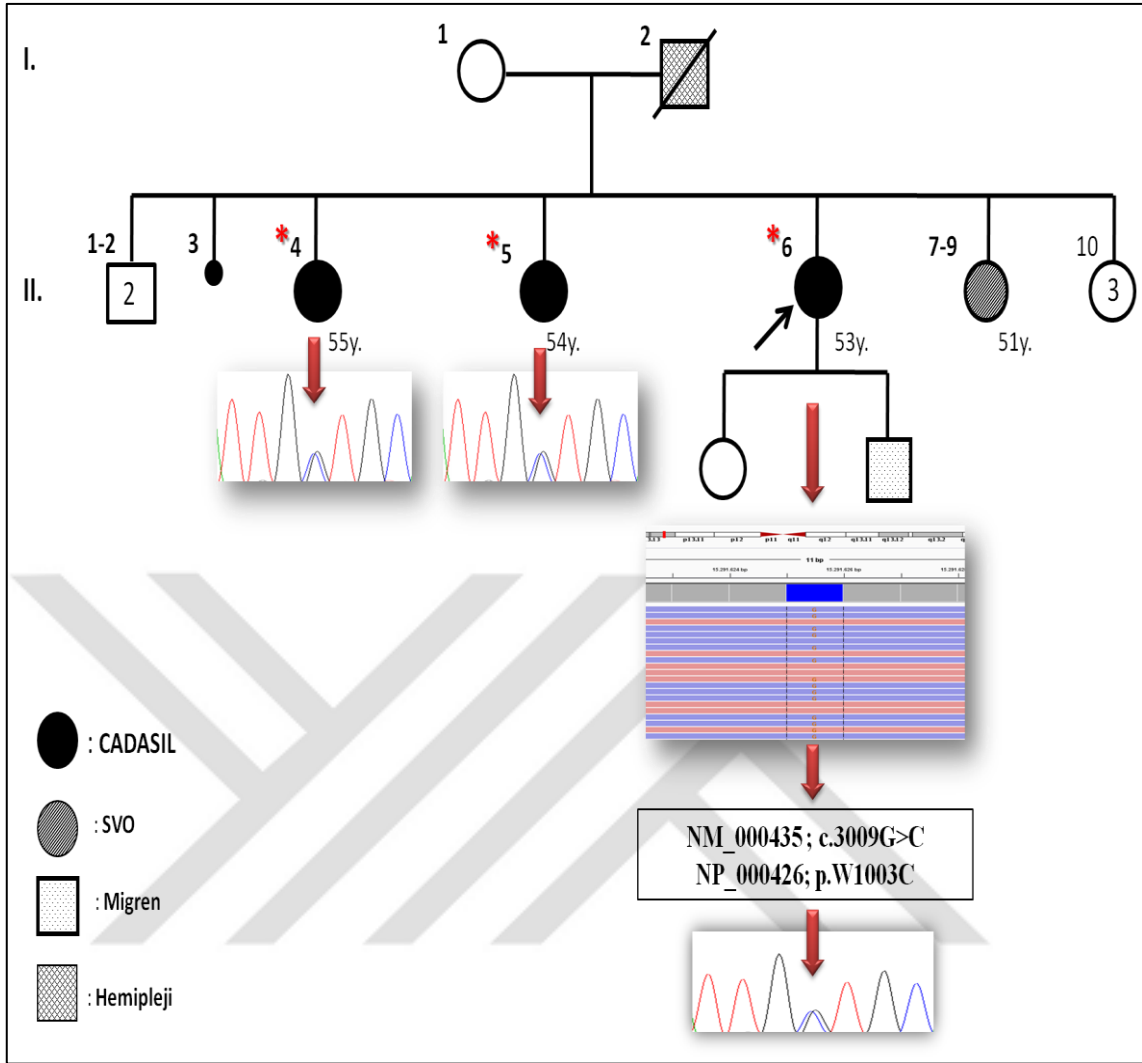
Şekil 4-13: Olgu 11 (CD#64) aile ağacı, IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntülemesi ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-1) ait panel-gen testinde saptanan, *NOTCH3* (c.1672C>T; p.R558C) heterozigot mutasyonu ve bu mutasyonun Sanger dizileme testi ile confirmasyonu



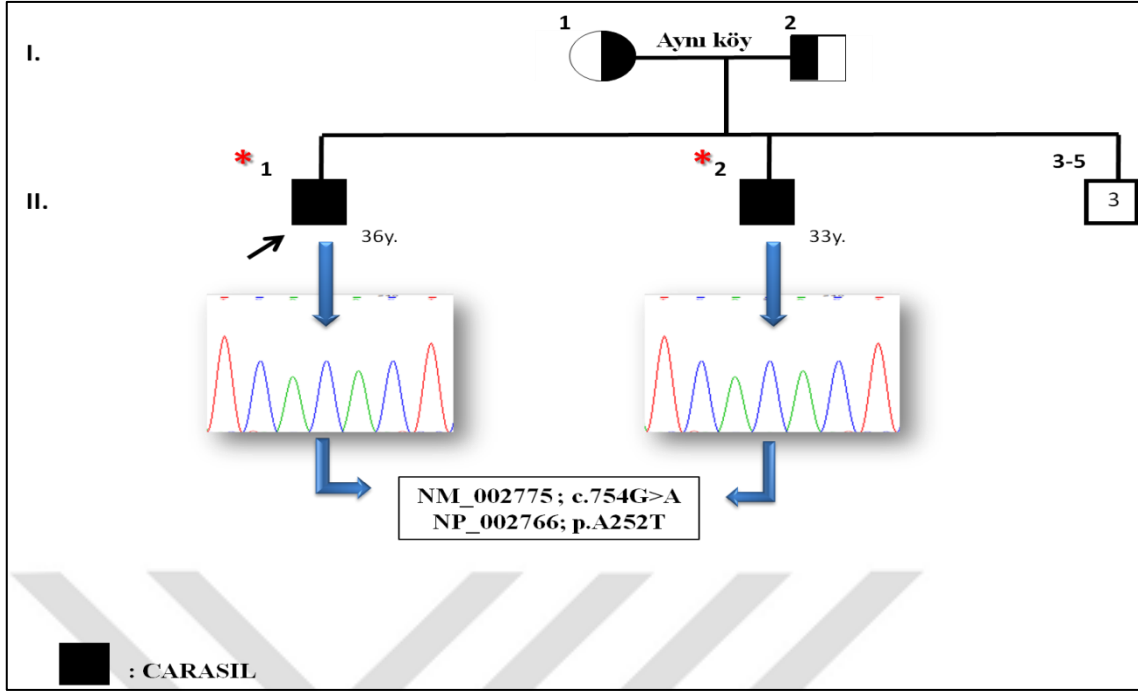
Şekil 4-14: Olgu 12 (CD#112) aile ağacı, IGV görüntülemesi ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-4) ait panel-gen testinde saptanan, *NOTCH3* (c.3691C>T; p.R1231C) heterozigot mutasyonu ve bu mutasyonun Sanger dizileme testi ile konfirmasyonu



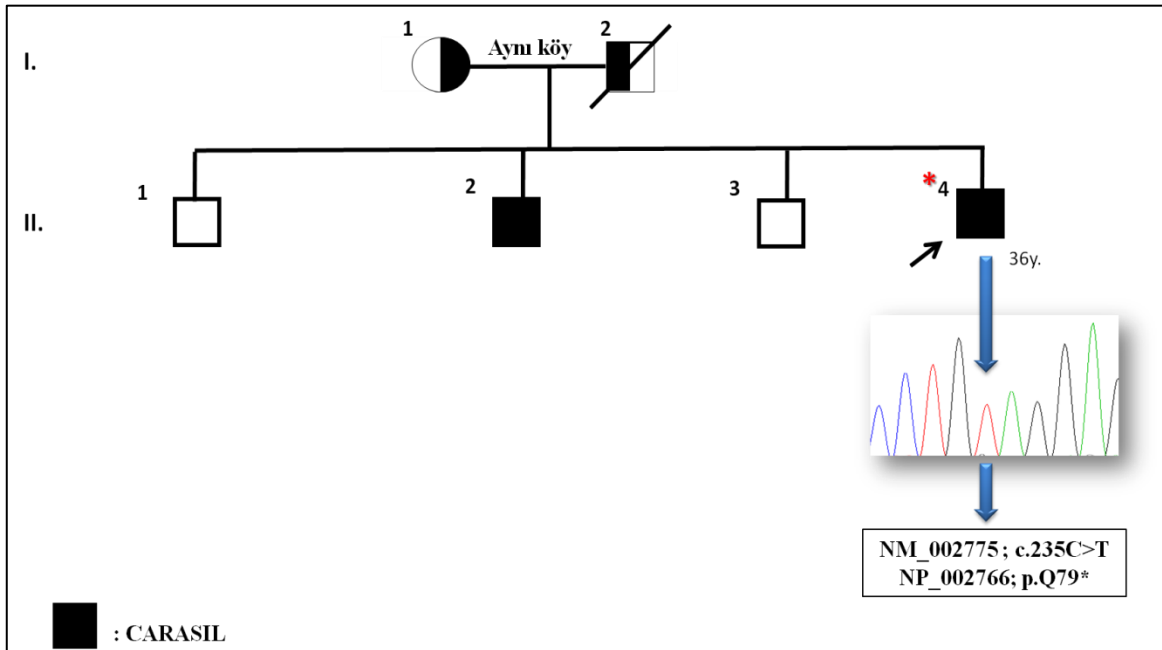
Şekil 4-15: Olgu 13 (CD#136) aile ağacı, IGV görüntülemesi ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-6) ait panel-gen testinde saptanan, *NOTCH3* (c.3009G>C; p.W1003C) heterozigot mutasyon ve bu mutasyonun etkilenmiş iki kardeşinde (II-4 ve II-5) yapılan segregasyon analizi



Şekil 4-16: Olgu 14 (CD#156) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-1) ve etkilenmiş erkek kardeşinde (II-2) yapılan Sanger dizileme testinde saptanan, *HTRA1* (c.754G>A; p.A252T) homozigot mutasyonu



Şekil 4-17: Olgu 15 (CD#98) aile ağacı ve elektroferogram görüntülemesi

İndeks olguya (II-4) yapılan Sanger dizileme testinde saptanan, *HTRA1* (c.235C>T; p.Q79*) homozigot mutasyonu

5. TARTIŞMA

Serebral küçük damar hastalıkları (SKDH) ve bunun başlıca klinik sonuçları olan inme ve vasküler demans, yaş ortalaması artan toplumlarda giderek önem kazanan bir sağlık problemi haline gelmiştir. Serebral küçük damar hastalıklarının kalıtsal olanlar arasında en yaygını (114) OD formda görülen subkortikal enfarktüs ve lökoensefalopati ile giden serebral arteriyopati (CADASIL) hastalığıdır. Bu hastalığın OR formu (CARASIL) çok daha nadirdir. Kapalı toplumlarda ve akraba evliliği yüksek olan toplumlarda OR hastalık oranlarının batılı toplumlara göre daha yüksek olması beklenir. Türkiye İstatistik Kurumu bilgilerine göre Türkiye’de ortalama akraba evliliği oranı % 23.2’dir (21). Bu nedenle CARASIL’in ülkemizdeki sıklık oranının batılı toplumlara göre daha yüksek olması beklenebilir.

CADASIL ve CARASIL’de temel olarak küçük kan damarları etkilenir. Kan akışında yetersizlik ile belirgin olan bu etkilenme, özellikle beyindeki serebral damarlarda olduğunda hastalığa özgü bulguların ortaya çıkmasından sorumlu tutulmaktadır. Bu süreçte, kan damarlarını çevreleyen vasküler düz kas hücrelerinin normal anatomik yapısı bozulur ve sonunda hücrelerin ölümüne kadar ilerler. Beyindeki küçük arterlerde ortaya çıkan damar hasarı arteriyopati olarak adlandırılır ve CADASIL’in ilk bulgularından biri olan migrenin altında yatan ana patolojik nedendir. Hasar gören kan damarlarında kan akışı azalır ve zamanla enfarktüs gelişir. Beyindeki bu tür bir enfarktüs inmeyede neden olabilir. CADASIL’li bireylerde inme, çocukluktan yetişkinliğe kadar herhangi bir yaşta ortaya çıkabilse de, özellikle 40-50 yaşlarında sıklığı artar ve yaşam boyunca birden fazla defa tekrar edebilir. Bu tekrarlayan iskemik ataklar zamanla beyinde kalıcı hasarlar bırakır. Beynin subkortikal bölgesinde meydana gelen inmeler, demansa kadar ilerleyebilen bilişsel etkilenmeye yol açar (1,2,16,110,116).

CARASIL’de beyin ve sinir sistemi dışındaki vücudun diğer bölgelerini etkileyen anormallikler, 20-30’lu yaşlarda bulgu vermeye başlar. Çoğu kez, bacaklardaki spastisite ve yürüme sorunları, hastalığın ilk bulgularıdır. Hastalık ilerledikçe hareket ve yürümedeki zorluklar daha da ağırlaşır. Hastalıktan etkilenen kişilerin yaklaşık yarısı, 40 yaşından önce ortaya çıkan inme ya da benzeri bir atak

öyküsüne sahiptir. CADASIL’de olduğu gibi, CARASIL’li bireylerde de bilişsel etkilene ve duygu durum değışikliğı görülebilmektedir. Ancak CADASIL’deki en yaygın görülen bulgu olan migren CARASIL hastalarında nadir görülür. CARASIL’in diğerkarakteristik özellikleri arasında alopesi ve bel ağrısı atakları sayılabilir.

CADASIL ve CARASIL’de beyindeki değışimler, lökoensefalopati adı verilen ak madde lezyonlarının oluşumuna yol açar. Bu değışimlerin MRG ile tespiti, hastalığın tanısında önemlidir (2,6,49,79,117).

CADASIL ve CARASIL hastalıklarında görülen bulgular ve MRG sonuçları klinik tanıya yardımcı olmakla birlikte kesin tanı için yeterli değildir. Kesin tanı, bu hastalıklarla ilişkilendirilmiş *NOTCH3* ve *HTRA1* genlerindeki mutasyonların belirlenmesi için yapılan moleküler genetik testler ile konulur. CADASIL hastalığında ayrıca, patognomik bir bulgu olan vasküler dokulardaki GOM birikiminin, EM ve immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi ile de kesin tanıya gidilebilir. EM incelemeleri için güvenilir ve deneyimli laboratuvarlar dünyada sınırlı sayıdadır. Bu nedenle deri biyopsisinde GOM birikimlerinin gösterilmesi için EM incelemesi yerine immünohistokimyasal yöntem genelde tercih edilmektedir. CARASIL’de ise histopatolojik olarak küçük arterlerin, tunika medyadaki VDKH’lerde, ışık mikroskopisi ile basofilik granül tespiti veya EM incelemesinde GOM birikimleri olmaksızın ileri derecede arteriyoskleroz tespiti ile belirlenebilir (118,119). Bunlarla birlikte vasküler patolojinin aynı mutasyonu taşıyan kişiler arasında farklılık gösterebileceğı ve bu farklılığın yaşa bağılı olduğu da bilinmektedir. Örneğin CADASIL’deki GOM birikimlerinin histopatolojik yöntemlerle tespitinin, etkilenen kişinin yaşına bağılı olarak değıştiğı, genç ve ileri yaşlarda GOM birikim miktarı düşük bulunurken orta yetişkinlikte artmış olarak saptanabileceğı bildirilmektedir. GOM birikimi olan hastalarda *NOTCH3* gen mutasyon oranının %90 üzerinde olması, *NOTCH3* geni için yapılan moleküler testlerin CADASIL için son derece duyarlı (%45-96) ve özgün (%100) olduğunu göstermektedir (118-120).

CADASIL tanısında özgün bir bulgu olarak kabul edilen GOM birikiminin gösterilmesi, gerek deri biyopsisi gibi invazif bir yöntem olması, gerekse tekniğın özel bir uzmanlık gerektirmesi ve maliyeti gibi nedenlerle zorluklar içermektedir. Bilgimiz dahilinde Türkiye’de bu hastalıkların kesin tanısı için EM ve immünhistokimyasal testleri uygulayan laboratuvar az sayıdadır. Bu nedenle de günümüzde rutin tanıda kesin

tanıya ulaşmak için moleküler analize ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler genetik testlerin noninvaziv olması ve deneyimli genetik laboratuvar sayısının artmasıyla test hizmetine ulaşmayı kolaylaşmaktadır. Klinik tanının heterojenitesi de, kesin tanıya ulaşmada moleküler genetik tanının çok önemli olduğunu göstermektedir.

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de yaş ortalamasının artmasıyla nörodejeneratif hastalıkların yaygınlığı artmaktadır. Orta yetişkinlik ve ileri yaşlarda görülen, hayat kalitesini ve yaşam süresini azaltan nörodejeneratif hastalıklardan CADASIL ve CARASIL'in ülkemizdeki sıklığı konusunda yapılmış araştırmalar sadece olgu sunumları düzeyindedir (10-12,121,122). CADASIL ve CARASIL'in birlikte ele alındığı araştırmalar ise ulusal literatürde yoktur, uluslararası literatürde ise sınırlı sayıdadır (2,9). Literatürdeki farklı populasyonlarda CADASIL olgularında yapılan çalışmalar mutasyonların en sık ekzon 4'de saptandığını göstermektedir (102,111,123,124). Mutasyon sıklığının en yüksek saptandığı ikinci ekzon Fransız, Alman ve İngiliz toplumlarında 3. Ekzon (123,125), Japon ve Hollanda toplumlarında 11. ekzon olarak bildirilmiştir (116). Bu nedenle Tıbbi Genetik AD moleküler laboratuvarımızda 2005 ve öncesinde 14 olguda *NOTCH3* geninin 3 ve 4. ekzonlarını, daha sonraki yıllarda (2006-2015) 80 olguda, diğer ekzonlarda da mutasyonların gösterilmesi üzerine genin 2-6, 11. ekzonları SD tekniği ile yapılmıştı. 2015 yılından itibaren YND platformunun laboratuvarımızda kurulması ile akış şemasına genin diğer 27 ekzonun da taranması ile panel-gen testinin tanıya katkısının belirlenmesi, panel-gen testinin kapsamayan bölgelerinin ve *HTRA1* genin 9 ekzonunun SD tekniği ile incelenmesi ve tanıya katkısı mümkünse en uygun akış şemasının belirlenmesi bu tezin amacı olarak belirlendi.

İlk olarak 1977 yılında bazı ailelerde OD kalıtım gösteren inme tanımlandıktan sonra 1991 de çok büyük bir ailede hastalığın klinik, görüntüleme ve genetik özellikleri gösterilerek akronim olarak CADASIL kullanılmaya başlanmış ve Tournier-Lasserre E ve arkadaşları tarafından 1993'de hastalık 19q12 ye haritalanmış (4), 1996'da aynı grup tarafından hastalık ilişkili gen olarak *NOTCH3* tanımlanmıştır(28). Bu grup, 1997'de 50 etkilenmiş akraba olmayan CADASIL olgusunun 27'sinde bağlantı analizi ile ilişkili geni kromozom 19'a haritalanmış, 16'sında beyin, otopsi veya deri biopsi materyalinde vasküler düz kas hücreesindeki lezyonların histopatolojik olarak tanıyı desteklediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, *NOTCH3* geninin tüm ekzonlarını ve ekzon-intron

bağlantı noktalarını tek zincir konformasyon polimorfizmi yöntemi (SSCP) ve SD teknikleri ile incelemişler ve 45 olguda (%90) tümü yanlış anlamlı mutasyon tipinde ve EGF-benzeri tekrar bölgelerinde lokalize heterozigot mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir (102). Saptanan mutasyonların 32'si ekzon 3 ve 4 de, 4'ü ekzon 11'de saptanırken ikişer mutasyon ekzon 18 ve 19'da, birer mutasyon da ekzon 2, 5, 14, 22 ve 23'de yer almaktaydı. Markus ve arkadaşları 2002 de İngiliz popülasyonunda olası CADASIL tanılı 83 olguda ekzon 2-23 dizilemişler ve 48 ailede (%58) 15 farklı mutasyon saptamışlardır. Bu mutasyonların %73'ü ekzon 4'de, %8'i ekzon 3'de, %6'sı ekzon 5 ve ekzon 6'da bulunmuştur (123). Peters ve arkadaşları 2005'de biopsi ile ispatlanmış 125 Alman CADASIL olgusunda ekzon 2-24'ü SD analizi ile incelemiş ve olguların 120'sinde (%96) mutasyon saptamışlardır. Bu serideki mutasyonların %85.8'i ekzon 2-6 arasında, %58.3'ü sadece ekzon 4'e yer almıştır (124). Ampuero ve arkadaşları (2009) İspanyol popülasyonunda CADASIL şüphesi ile değerlendirmeye aldıkları 200 olguyu klinik, immunohistokimyasal ve moleküler genetik analizlerle değerlendirmişler. Bu çalışmada olguların 190'ında *NOTCH3* geninin ekzon 2-6, 8, 11, 14, 18, 19, 22, 23 dizilenmiş ve 65 olguda (%34) mutasyon saptanmıştır (126). Liu ve arkadaşları (2015), Çin popülasyonundan CADASIL tanılı olan ve mutasyon saptanmış 62 olguyu iki aşamalı olarak değerlendirmiştir. İlk aşamada ekzon 2-6'da 57 olguda, mutasyon saptanmayan 5 olguda ise ikinci aşamada ekzon 7-24 analiz edilmiş ve ikisi novel toplam 28 mutasyon saptanmıştır (127). 2017 yılında Mizuta ve arkadaşları 102 Japon CADASIL ve CADASIL-benzeri tanılı olguda, *NOTCH3* geni ekzon 2-8, 11, 14, 18, 19 ve 21'de dizi analizinde mutasyon saptanan olguda 40 farklı mutasyon saptamışlardır. Bu mutasyonların ekzonlara göre dağılımı sıklık sırasıyla ekzon 4 (n: 44), ekzon 3 (n: 24), ekzon 11 (n: 10), ekzon 6 (n: 6), ekzon 2 (n: 5), ekzon 7 (n: 5), ekzon 5 (n: 3), ekzon 8, 14, 18, 19 ve 21'de birer mutasyon olarak belirlenmiştir(63).

İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD moleküler laboratuvarımızda 2006 öncesinde *NOTCH3* geni ekzon 3 ve 4 analizi ile değerlendirilen toplam 14 CADASIL klinik tanılı olgunun 5'inde mutasyon saptanarak %36 tanı oranı elde edilmişti. Daha sonra ekzon sayısı arttırıldığında (ekzon 2-6, 11) incelenen 80 olgunun 20 sinde mutasyon saptanmış ve tanı oranı %25 olarak belirlenmişti. 2015 sonrasında YND tekniğinin de kullanıldığı aşamalı bir algoritma ile incelenen 64 olguda 2-6 ve 11. ekzonların SD ile incelendiği ilk aşamada 10 olgu tanı almış (%16), mutasyon saptanmayan 54 olgunun YND ile tüm ekzonları dizilendiğinde 3 olguda daha mutasyon

saptanmış ve uygulamanın tanıya katkısı %5.6 olarak belirlenmiştir. Bu aşama sonrasında 64 olguda tanı oranımız %20.3 (13/64) olarak gerçekleşmiştir. 3. aşama olarak uygulanan panel-gen testinin kapsamadığı yedi farklı bölgede 908 bç'lik bir alan için proje kapsamında özgün primerler tasarlanarak bu bölgeler 51 olguda SD ile incelendiğinde herhangi bir mutasyon saptanmamış ve tanıya katkı sağlamadığı belirlenmiştir.

Tıbbi Genetik AD'da, 2006 öncesinde sadece ekzon 3 ve 4 ün incelendiği 14 olgudaki %36'lık moleküler tanı oranının 2006-2014 yılları arasında 80 olguda daha fazla ekzonun değerlendirildiği (ekzon 2-6, 11) ve 2015-2017 yılları arasında aynı hedef ekzonların incelendiği 64 olguda (toplam 134) sırasıyla %25 ve %16'ya gerilemesi, YND tekniği ile tüm gen dizilendiğinde dahi tanı oranının %20,3 olması dikkat çekicidir. Bu durum, CADASIL klinik tanısının güncel pratiğinde deri biyopsisinin yapılmaması ve olgu seçim kriterlerinde kullanılan MRG bulgularının diğer nörodegeneratif hastalıklarla örtüşmesi ve hastalığın klinik heterojenitesinin geniş olması ile açıklanabilir ve ayrıca CADASIL için klinik seçim kriterlerinin Türk populasyonu için yeniden değerlendirilmesi uygun olabilir.

Çalışmamızda 2015-2017 tarihleri arasında değerlendirilen 64 olgudaki klinik bulguların genel dağılımı ve oranları (Tablo 4-5) mutasyon saptanan ve saptanmayanlardaki en yaygın birinci bulgu bilişsel etkilenme, ikincisinin ise migrendir. Psikiyatrik bulguların ise mutasyon saptanan olgularda daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Sonuçlarımız iskemik atakların etkili bir belirteç olmadığını vurgulamakta ancak pozitif olgu sayısının azlığı bu oranları etkileyen önemli bir faktördür.

2006-2017 yılları arasında olgularımızın 33'ünde saptanan mutasyonların ekzonlara dağılımı sıklık sırasıyla ekzon 4 (12/33, %36.3), ekzon 11 (6/33,%18.1), ekzon 3 (5/33, %15.1), ekzon 2 (3/33, %9.1), ekzon 6 (2/33, %6.1) ekzon 5 (2/33, %6.1), ekzon 22 (2/33, %6.1) ve ekzon 19 (1/33, %3) idi. Bu bulgular daha önce belirtilen farklı populasyonlarda yapılan çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

2015 sonrasında aşamalı yaklaşımla 13 olguda 11 farklı mutasyon saptanmıştır ve bunların 8'i tanımlanmış mutasyonlar olmasına karşın üçü daha önce literatürde ve veritabanlarında tanımlanmamış novel mutasyonlar idi (Olgu-1; p.C185W, Olgu-3; p.C128R ve Olgu-13; p.W1003C). Bu nedenle, ilk defa saptanan bu varyantların

hastalık ilişkili olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan *in silico* analizler her üç varyantın da patojenik olduğu yönünde sonuç verdi. Bu üç varyanttan beklenen fizikokimyasal farklılıklar protein yapısındaki sekonder katlanmaların düzenini bozacağını öngörmekte ve bilinen *NOTCH3* gen mutasyonlarının etki mekanizmaları ile benzerlik göstermektedir. Bu üç varyantın protein düzeyinde neden olduğu değişimin, daha önce tanımlanmış mutasyonlarda da olduğu gibi ekstraselüler domainini oluşturan yapıyı etkileyerek işlev bozukluğuna yol açması beklenmektedir. Saptadığımız mutasyonların, hastalığın kalıtım modeli ile uyumlu olarak heterozigot formda görülmesi ve CADASIL mutasyonlarının birçoğunda gözlenen sistein sayı değişikliğine yol açması, bu değişimlerin hastalık ilişkili bir mutasyon olduğunu güçlü bir biçimde destekledi. Aile içi segregasyon analizinde iki varyant için iki ailede etkilenmiş kardeşlerde de mutasyon gösterilmesi bu varyantların patojenitesi lehine bir bulgu olarak değerlendirildi.

NOTCH3 geninde saptanan ekzon 11 deki (c.1672C>T; p.R558C) ve ekzon 22 deki (c.3691C>T; p.R1231C) değişimler ikişer farklı olguda saptanmıştı ve bu nedenle olguların aile ağaçları ve dosyaları tekrar değerlendirildiğinde aynı coğrafi bölgelerde yaşadıkları ancak bilindiği kadarıyla aralarında bir akrabalık ilişkisi bulunmadığı görülmüştür. Ancak ortak atasal birliktelik haplotip analizleri ile gösterilebilir. Bu çalışma yapılmadığından kurucu etkisi hakkında bilgi edinilememiştir.

Bugüne kadar (HGMD 02.01.2018) CADASIL ile kesin ilişkisi bilinen, *NOTCH3* geninde tanımlanmış 287 mutasyondan 266'sı yanlış anlamlı, 3'ü erken terminasyona neden olan anlamsız, ikisi transkriptte kırılma hatasına neden olan intronik mutasyon ve biri de sessiz mutasyondur. Ayrıca *NOTCH3* geninde CADASIL ile ilişkilendirilmiş 8 küçük delesyon, 3 küçük insersiyon, 2 küçük indel ve 2 adet büyük delesyon mutasyonu bildirilmiştir (21). Çalışmamızda *NOTCH3* geninde saptanan tüm değişimler yanlış anlamlı mutasyon tipinde idi. Yanlış anlamlı mutasyonlar *NOTCH3* proteinindeki her bir EGF-benzeri tekrarında çift sayıda olması gereken (6 adet) sisteinlerin tekil sayılara dönüşmesine neden olmaktadır. Günümüzde kabul edilen CADASIL patolojisine yol açan mekanizmanın esası sisteinlerin sayısal değişimleriyle ilişkilendirilmektedir (33). *NOTCH3* reseptör proteininin ligandlarına bağlanabilmesini sağlayan ekstrasellüler domainin oluşturan EGF-benzeri tekrarların yapısındaki sisteinler arası disülfid köprüleri, bu domainin yapı stabilizasyonu için

önemlidir. Bu sisteinlerin sayısının artış ve azalışı, NOTCH3 ekstraselüler domaini (N3ECD) içindeki disülfid bağlarının formasyonlarını değiştirir. Bu durumda mutant N3ECD'nin multimerizasyonu yabancı tip N3ECD'ye kıyasla daha yüksek oranda gerçekleşir. Multimerizasyondaki artış, özellikle beyindeki küçük arterlerin VDKH'lerinde ve diğer organ ile dokuların arterlerinde toksik agregasyona yol açar. Bu domainin yapısında meydana gelen değişimler proteinin tersiyer yapısını değiştirerek fonksiyonunu bozduğu bildirilmektedir (1,32). Çalışmamızda gösterilen mutasyonların, literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak tamamı NOTCH3 proteininin ekstraselüler domaini olan EGF benzeri tekrar bölgelerini (EGF_4: 4 mutasyon, EGF_6: 1 mutasyon, EGF_14: 2 mutasyon, EGF_15: 1 mutasyon, EGF_26: 1 mutasyon, EGF_31: 1 mutasyon) etkilediği gözlemlendi.

NOTCH3 panel-gen testinde, ekzon 1, 22, 24, 25, 33'deki kapsanmayan bölgelerin 54 olgudaki analizi yoğun bir ıslak laboratuvar emeği gerektirmiş ancak bu bölgelerde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. CADASIL'in nadir bir hastalık olması, mutasyonların genel olarak tüm gene yayılmış olarak bulunması, ekzon 22'nin kapsanmayan bölgesinde daha önce iki farklı mutasyonun bildirilmiş olması (c.3893G>T; p.C1298F, c.3944G>A; p.C1315Y), ek olarak bu bölgelerde N3ECD yi oluşturan EGF-benzeri tekrarlarını kodlayan diziler üzerinde çok sayıda önemi bilinmeyen nadir varyantların bulunması, eksiksiz bir sonuca ulaşmak için algoritmaya bu bölgelerin de ilave edilmesinin önemli olduğunu göstermektedir.

NOTCH3 geni moleküler tanı algoritmamız için iki seçenek ön plana çıkmaktadır. Birincisi yeni gösterilen hedef ekzon bölgelerinin (ekzon 19 ve 22) SD kapsamına alınmasıdır. Bu tür bir uygulama özellikle YND alt yapısı olmayan laboratuvarlar için kabul edilebilir bir yaklaşım olacaktır. Diğer seçenek ise panel-gen testinin birinci basamak test olarak uygulanmasıdır. Teknolojik gelişmelerle YND maliyetlerinin gün geçtikçe düştüğü, hedefteki sekiz ekzonun SD ile incelenmesinin ise ek iş yükü getireceği göz önünde bulundurulursa, panel-gen testinin uygulanması gelecekte daha akılcı görünmektedir. Sonuç olarak, laboratuvar alt yapısına bağlı olarak CADASIL/CARASIL genetik tanı algoritmasının değişiklik gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Kenju Hara ve arkadaşlarının 2009 yılında bağlantı analizi ve fonksiyonel ilişkilendirme çalışmaları ile belirlediği CARASIL hastalığı ile ilişkili bilinen tek gen, 10q26.13 de lokalize, 9 ekzonlu *HTRA1* genidir (MIM * 602194) (6). Çalışmamızda, aile öyküsünde akraba evliliği olan sekiz ve küçük nüfuslu köyden geldiklerini beyan eden dokuz olgu dahil toplam 51 olguda yapılan *HTRA1* gen analizinde iki olguda (olgu 14 ve olgu 15) biri bilinen (p.A252T) diğeri ilk kez bu çalışmada gösterilen (p. Q79*) mutasyonlar homozigot olarak saptanmıştır. Bu olguların ebeveynleri küçük nüfuslu köylerden gelmektedir. Klasik olarak OR hastalıklarda heterozigotlar asemptomatiktir. Hindistan, Japon ve İtalyan hastalarında yapılan bazı çalışmalarda heterozigot *HTRA1* mutasyonu taşıyan olguların hafif klinik bulgular gösterdiği, Japon olgularında *HTRA1*'in proteaz aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir (128-130) Bu nedenle, olgularımızın, anne ve babalarının nörolojik açıdan incelenmesi önerilmelidir. *HTRA1* analizi, serimizdeki mutasyon oranının %4 (2/51), akrabalık ilişkisi kesin ve olası olan grupta ise %11,7 (2/17) olduğunu göstermiştir.

Bugüne kadar (HGMD 05.01.2018) CARASIL hastalığıyla ilişkili *HTRA1* geninde 26 farklı mutasyon bildirilmiştir. 21 yanlış anlamlı mutasyon, 2 erken terminasyona neden olan anlamsız mutasyon, bir tane kırılma hatasına neden olan intronik mutasyon ile birlikte, birer tane küçük delesyon ve insersiyon tiplerinde görülen mutasyonlardır (32). Çalışmamızda saptanan değişimle yanlış anlamlı ve anlamsız tipte mutasyonlardı. Olgu 14'te saptanan mutasyon, genin kodladığı *HTRA1* proteinin, serin paptidaz aktivitesini gerçekleştiren tripsin benzeri peptidaz domainini etkiler ve aktivitesinde azalmaya neden olur. Olgu 15'te literatürde ilk defa bu çalışmada saptanan dur kodonuna sebep olan anlamsız tipte bu mutasyon, protein translasyonunun erken sonlanmasına ve *HTRA1* protein fonksiyon kaybına yol açması beklenir.

Fernández ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da (9) geniş kohortlarda *NOTCH3* ve *HTRA1* genlerinin birlikte bulunduğu YND panel-gen testinin zaman ve maliyet yönünden önerilebilir olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda *HTRA1* geni panel-gen test kapsamında bulunmadığından, bu gen SD ile incelenmişti. Çalışmamızın çıkarımlarından bir diğeri de, panel-gen testlerinin tasarlanması sırasında panellere yeni genlerin eklenebilir özellikte olması testlerin güncelliğini korumasını sağlayacak ve etkililiğini arttıracaktır. Benzer klinik ve MRG bulguları gösteren CADASIL ve

CARASIL hastalıklarının klinik ayrımı güç olabilir. Bu nedenle *NOTCH3* ve *HTRA1* genlerinin birlikte yer aldığı YND panel-gen testlerinin tasarlanması, benzer klinik ile nörogörüntüleme bulguları gösteren bu iki hastalığın da kesin tanısı için katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

1. Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Bousser M-G. Cadasil. *The Lancet Neurology* 2009; **8**(7): 643-653.
2. Tikka S, Baumann M, Siitonen M, Pasanen P, Pöyhönen M, Myllykangas L, ve ark. CADASIL and CARASIL. *Brain Pathology* 2014; **24**(5): 525-544.
3. Viswanathan A, Gschwendtner A, Guichard J-P, Buffon F, Cumurciuc R, O'sullivan M, ve ark. Lacunar lesions are independently associated with disability and cognitive impairment in CADASIL. *Neurology* 2007; **69**(2): 172-179.
4. Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, ve ark. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nature genetics* 1993; **3**(3): 256-259.
5. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, ve ark. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; **383**(6602): 707.
6. Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, ve ark. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *New England Journal of Medicine* 2009; **360**(17): 1729-1739.
7. Monet-Leprêtre M, Bardot B, Lemaire B, Domenga V, Godin O, Dichgans M, ve ark. Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain* 2009; **132**(6): 1601-1612.
8. Clausen T, Southan C, Ehrmann M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Molecular cell* 2002; **10**(3): 443-455.
9. Fernández A, Gómez J, Alonso B, Iglesias S, Coto E. A next-generation sequencing of the NOTCH3 and HTRA1 Genes in CADASIL Patients. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015; **56**(3): 613-616.
10. Utku U, Celik Y, Uyguner O, Yüksel-Apak M, Wollnik B. CADASIL syndrome in a large Turkish kindred caused by the R90C mutation in the Notch3 receptor. *European journal of neurology* 2002; **9**(1): 23-28.
11. Uyguner Z, Siva A, Kayserili H, Saip S, Altıntaş A, Apak M, ve ark. The R110C mutation in Notch3 causes variable clinical features in two Turkish families with CADASIL syndrome. *Journal of the neurological sciences* 2006; **246**(1): 123-130.
12. Ince B, Benbir G, Siva A, Saip S, Utku U, Celik Y, ve ark. Clinical and radiological features in CADASIL and NOTCH3-negative patients: a multicenter study from Turkey. *European neurology* 2014; **72**(3-4): 125-131.
13. https://web.stanford.edu/group/hopes/cgi-bin/hopes_test/the-hopes-brain-tutorial-text-version/.
14. Gertz SD. *Liebman's neuroanatomy made easy and understandable*. Pro Ed; 2007.
15. Manasco H. *Introduction to neurogenic communication disorders*. Jones & Bartlett Publishers; 2017.
16. Pare JR, Kahn JH. Basic neuroanatomy and stroke syndromes. *Emergency medicine clinics of North America* 2012; **30**(3): 601-615.
17. Norrving B. Lacunar Syndromes, Lacunar Infarcts, and Cerebral Small-vessel Disease. 2016: 449-465.e444.

18. Fisher M. Clinical atlas of cerebrovascular disorders. 1994.
19. Emre M. Classification and diagnosis of dementia: a mechanism based approach. *European journal of neurology* 2009; **16**(2): 168-173.
20. Yamamoto Y, Craggs L, Baumann M, Kalimo H, Kalaria R. Molecular genetics and pathology of hereditary small vessel diseases of the brain. *Neuropathology and applied neurobiology* 2011; **37**(1): 94-113.
21. Assareh A, Mather KA, Schofield PR, Kwok JB, Sachdev PS. The genetics of white matter lesions. *CNS neuroscience & therapeutics* 2011; **17**(5): 525-540.
22. Storkebaum E, Quaegebeur A, Vikkula M, Carmeliet P. Cerebrovascular disorders: molecular insights and therapeutic opportunities. *Nature neuroscience* 2011; **14**(11): 1390-1397.
23. Sondergaard CB, Nielsen JE, Hansen CK, Christensen H. Hereditary cerebral small vessel disease and stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2017; **155**: 45-57.
24. Van Bogaert L. Encéphalopathie sous-corticale progressive (Binswanger) à évolution rapide chez deux soeurs. *Med Hellen* 1955; **24**: 961-972.
25. Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, et al. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *Journal of Clinical Investigation* 2000; **105**(5): 597.
26. Prakash N, Hansson E, Betsholtz C, Mitsiadis T, Lendahl U. Mouse Notch 3 expression in the pre-and postnatal brain: relationship to the stroke and dementia syndrome CADASIL. *Experimental cell research* 2002; **278**(1): 31-44.
27. Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, et al. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes & development* 2004; **18**(22): 2730-2735.
28. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; **383**(6602): 707-710.
29. Tikka S, Mykkanen K, Ruchoux M-M, Bergholm R, Junna M, Pöyhönen M, et al. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain* 2009; **132**(4): 933-939.
30. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000074181;r=19:15159038-15200981;t=ENST00000263388.
31. HGMD. https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/search_gene.php?
32. Dichgans M, Herzog J, Gasser T. NOTCH3 mutation involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *Neurology* 2001; **57**(9): 1714-1717.
33. Stojanov D, Vojinovic S, Aracki-Trenkic A, Tasic A, Benedeto-Stojanov D, Ljubisavljevic S, et al. Imaging characteristics of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL). *Bosn J Basic Med Sci* 2015; **15**(1): 1-8.
34. Davis CG. The many faces of epidermal growth factor repeats. *The New biologist* 1990; **2**(5): 410-419.
35. Appella E, Weber IT, Blasi F. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS letters* 1988; **231**(1): 1-4.
36. Aster JC, Simms WB, Zavala-Ruiz Z, Patriub V, North CL, Blacklow SC. The folding and structural integrity of the first LIN-12 module of human Notch1 are calcium-dependent. *Biochemistry* 1999; **38**(15): 4736-4742.
37. Greenwald I. Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Current opinion in genetics & development* 1994; **4**(4): 556-562.

38. Luh FY, Archer SJ, Domaille PJ, Smith BO, Owen D, Brotherton DH, ve ark. Structure of the cyclin-dependent kinase inhibitor p19Ink4d. *Nature* 1997; **389**(6654): 999-1003.
39. Batchelor AH, Piper DE, De La Brousse FC, McKnight SL, Wolberger C. The structure of GABP α/β : an ETS domain-ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* 1998; **279**(5353): 1037-1041.
40. Bozkulak EC, Weinmaster G. Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Molecular and cellular biology* 2009; **29**(21): 5679-5695.
41. Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol* 2007; **176**(4): 445-458.
42. Fouillade C, Monet-Leprêtre M, Baron-Menguy C, Joutel A. Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease. *Cardiovascular research* 2012; **95**(2): 138-146.
43. Fouillade C, Baron-Menguy C, Domenga-Denier V, Thibault C, Takamiya K, Hukanir R, ve ark. Transcriptome analysis for Notch3 target genes identifies Grip2 as a novel regulator of myogenic response in the cerebrovasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013; **33**(1): 76-86.
44. Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A, Nihonmatsu M, Kawata H, Kato T, ve ark. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1. *Human Molecular Genetics* 2011; **20**(9): 1800-1810.
45. Choi JC. Genetics of cerebral small vessel disease. *Journal of stroke* 2015; **17**(1): 7.
46. Ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007; **8**(11).
47. <https://www.omim.org/entry/602194?search=HTRA1&highlight=htra1>.
48. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000166033;r=10:122461525-122514908;t=ENST00000368984.
49. Fukutake T. Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): from discovery to gene identification. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2011; **20**(2): 85-93.
50. <http://pfam.xfam.org/protein/Q92743>.
51. Siwanowicz I, Popowicz GM, Wisniewska M, Huber R, Kuenkele K-P, Lang K, ve ark. Structural basis for the regulation of insulin-like growth factors by IGF binding proteins. *Structure* 2005; **13**(1): 155-167.
52. Kalus W, Zweckstetter M, Renner C, Sanchez Y, Georgescu J, Grol M, ve ark. Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions. *The EMBO Journal* 1998; **17**(22): 6558-6572.
53. Laskowski Jr M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annual review of biochemistry* 1980; **49**(1): 593-626.
54. Laskowski M, Qasim M. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2000; **1477**(1): 324-337.

55. Vandermarliere E, Mueller M, Martens L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass spectrometry reviews* 2013; **32**(6): 453-465.
56. Pozzi N, Vogt AD, Gohara DW, Di Cera E. Conformational selection in trypsin-like proteases. *Current opinion in structural biology* 2012; **22**(4): 421-431.
57. http://pfam.xfam.org/family/Trypsin#cite_note-4.
58. Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 1997; **19**(6): 469-479.
59. Kennedy MB. Origin of Pdz (Dhr, Glgf) domains. *Trends in biochemical sciences* 1995; **20**(9): 350.
60. Ranganathan R, Ross EM. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Current biology* 1997; **7**(12): R770-R773.
61. Lan T-H, Huang X-Q, Tan H-M. Vascular fibrosis in atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology* 2013; **22**(5): 401-407.
62. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *The Lancet Neurology* 2013; **12**(5): 483-497.
63. Mizuta I, Watanabe-Hosomi A, Koizumi T, Mukai M, Hamano A, Tomii Y, ve ark. New diagnostic criteria for cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy in Japan. *Journal of the neurological sciences* 2017; **381**: 62-67.
64. O'sullivan M, Jarosz J, Martin R, Deasy N, Powell J, Markus H. MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *Neurology* 2001; **56**(5): 628-634.
65. Auer DP, Pütz B, Gössl C, Elbel G-K, Gasser T, Dichgans M. Differential lesion patterns in CADASIL and sporadic subcortical arteriosclerotic encephalopathy: MR imaging study with statistical parametric group comparison. *Radiology* 2001; **218**(2): 443-451.
66. Granild-Jensen J, Jensen UB, Schwartz M, Hansen US. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy resulting in stroke in an 11-year-old male. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2009; **51**(9): 754-757.
67. Dichgans M, Mayer M, Uttner I, Brüning R, Müller-Höcker J, Rungger G, ve ark. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Annals of neurology* 1998; **44**(5): 731-739.
68. Guey S, Mawet J, Hervé D, Düring M, Godin O, Jouvent E, ve ark. Prevalence and characteristics of migraine in CADASIL. *Cephalalgia* 2016; **36**(11): 1038-1047.
69. Jouvent E, Mangin J-F, Hervé D, Düring M, Dichgans M, Chabriat H. Cortical folding influences migraine aura symptoms in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011: jnnp-2011-300825.
70. Watanabe M, Adachi Y, Jackson M, Yamamoto-Watanabe Y, Wakasaya Y, Shirahama I, ve ark. An unusual case of elderly-onset cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) with multiple cerebrovascular risk factors. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2012; **21**(2): 143-145.
71. Amberla K, Wäljas M, Tuominen S, Almkvist O, Pöyhönen M, Tuisku S, ve ark. Insidious cognitive decline in CADASIL. *Stroke* 2004; **35**(7): 1598-1602.

72. Peters N, Opherck C, Danek A, Ballard C, Herzog J, Dichgans M. The pattern of cognitive performance in CADASIL: a monogenic condition leading to subcortical ischemic vascular dementia. *American Journal of Psychiatry* 2005; **162**(11): 2078-2085.
73. Taillia H, Chabriat H, Kurtz A, Verin M, Levy C, Vahedi K, ve ark. Cognitive alterations in non-demented CADASIL patients. *Cerebrovascular Diseases* 1998; **8**(2): 97-101.
74. Dichgans M. Cognition in CADASIL. *Stroke* 2009; **40**(3 suppl 1): S45-S47.
75. Reyes S, Viswanathan A, Godin O, Dufouil C, Benisty S, Hernandez K, ve ark. Apathy A major symptom in CADASIL. *Neurology* 2009; **72**(10): 905-910.
76. Adib-Samii P, Brice G, Martin RJ, Markus HS. Clinical spectrum of CADASIL and the effect of cardiovascular risk factors on phenotype. *Stroke* 2010; **41**(4): 630-634.
77. Oh J-H, Kang BS, Choi JC. CADASIL Initially Presented with a Seizure. *Journal of epilepsy research* 2016; **6**(2): 104.
78. Velizarova R, Mourand I, Serafini A, Crespel A, Gelisse P. Focal epilepsy as first symptom in CADASIL. *Seizure* 2011; **20**(6): 502-504.
79. Fukutake T, Hirayama K. Familial young-adult-onset arteriosclerotic leukoencephalopathy with alopecia and lumbago without arterial hypertension. *European neurology* 1995; **35**(2): 69-79.
80. Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke* 2014; **45**(11): 3447-3453.
81. Miao Q, Paloneva T, Tuominen S, Pöyhönen M, Tuisku S, Viitanen M, ve ark. Fibrosis and stenosis of the long penetrating cerebral arteries: the cause of the white matter pathology in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Brain pathology* 2004; **14**(4): 358-364.
82. Baudrimont M, Dubas F, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser M. Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke* 1993; **24**(1): 122-125.
83. Goebel HH, Meyermann R, Rosin R, Schlote W. Characteristic morphologic manifestation of cadasil, cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, in skeletal muscle and skin. *Muscle & nerve* 1997; **20**(5): 625-627.
84. Morroni M, Marzioni D, Ragno M, Di Bella P, Cartechini E, Pianese L, ve ark. Role of electron microscopy in the diagnosis of CADASIL syndrome: a study of 32 patients. *PLoS One* 2013; **8**(6): e65482.
85. Müller K, Courtois G, Ursini MV, Schwaninger M. New Insight Into the Pathogenesis of Cerebral Small-Vessel Diseases. *Stroke* 2017; **48**(2): 520-527.
86. Arima K, Yanagawa S, Ito N, Ikeda Si. Cerebral arterial pathology of CADASIL and CARASIL (Maeda syndrome). *Neuropathology* 2003; **23**(4): 327-334.
87. Rutten JW, Dauwerse HG, Peters DJ, Goldfarb A, Venselaar H, Haffner C, ve ark. Therapeutic NOTCH3 cysteine correction in CADASIL using exon skipping: in vitro proof of concept. *Brain* 2016; **139**(4): 1123-1135.
88. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, ve ark. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *nature* 1977; **265**(5596): 687-695.

89. Fan J-B, Chee MS, Gunderson KL. Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews Genetics* 2006; **7**(8): 632-644.
90. Berglund EC, Kiialainen A, Syvänen A-C. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investigative Genetics* 2011; **2**(1): 23.
91. Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-Sayers S, Deshpande P, Schatz MC, McCombie WR. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome research* 2015; **25**(11): 1750-1756.
92. Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics* 2010; **19**(R2): R227-R240.
93. Merriman B, Torrent I, Rothberg JM, Team D. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 2012; **33**(23): 3397-3417.
94. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods* 2014; **11**(4): 361-362.
95. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015; **31**(16): 2745-2747.
96. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* 2009; **4**(7): 1073-1081.
97. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research* 2003; **31**(13): 3812-3814.
98. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, ve ark. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 2010; **7**(4): 248-249.
99. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgside=600002349_01cnKxgikIaB8imyz9Y6AqZR9SKG.
100. BROWSER U. <http://genome.ucsc.edu/index.html>.
101. BROWSER E. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index.
102. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, ve ark. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *The Lancet* 1997; **350**(9090): 1511-1515.
103. Joutel A, Favrole P, Labauge P, Chabriat H, Lescoat C, Andreux F, ve ark. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *The Lancet* 2001; **358**(9298): 2049-2051.
104. Ceroni M, Poloni T, Tonietti S, Fabozzi D, Uggetti C, Frediani F, ve ark. Migraine with aura and white matter abnormalities: Notch3 mutation. *Neurology* 2000; **54**(9): 1869-1871.
105. Matsushima T, Conedera S, Tanaka R, Li Y, Yoshino H, Funayama M, ve ark. Genotype-phenotype correlations of cysteine replacement in CADASIL. *Neurobiology of aging* 2017; **50**: 169. e167-169. e114.
106. Finnilä S, Tuisku S, Herva R, Majamaa K. A novel mitochondrial DNA mutation and a mutation in the Notch3 gene in a patient with myopathy and CADASIL. *Journal of molecular medicine* 2001; **79**(11): 641-647.
107. Wollenweber FA, Hanecker P, Bayer-Karpinska A, Malik R, Bänzner H, Moreton F, ve ark. Cysteine-sparing CADASIL mutations in NOTCH3 show proaggregatory properties in vitro. *Stroke* 2015; **46**(3): 786-792.
108. Karlström H, Beatus P, Dannaeus K, Chapman G, Lendahl U, Lundkvist J. A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking

- and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; **99**(26): 17119-17124.
109. Praline J, Limousin N, Vourc'h P, Pallix M, Debais S, Guennoc A-M, ve ark. CADASIL and ALS: a link? *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2010; **11**(4): 399-401.
 110. Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, Verbeeck C, Serie DJ, Rayaprolu S, ve ark. NOTCH3 variants and risk of ischemic stroke. *PloS one* 2013; **8**(9): e75035.
 111. Oberstein SL, Ferrari M, Bakker E, Van Gestel J, Kneppers A, Frants R, ve ark. Diagnostic Notch3 sequence analysis in CADASIL: three new mutations in Dutch patients. *Neurology* 1999; **52**(9): 1913-1913.
 112. Choi JC, Kang S-Y, Kang J-H, Park J-K. Intracerebral hemorrhages in CADASIL. *Neurology* 2006; **67**(11): 2042-2044.
 113. Rinnoci V, Nannucci S, Valenti R, Donnini I, Bianchi S, Pescini F, ve ark. Cerebral hemorrhages in CADASIL: report of four cases and a brief review. *J Neurol Sci* 2013; **330**(1-2): 45-51.
 114. Ito S, Takao M, Fukutake T, Hatsuta H, Funabe S, Ito N, ve ark. Histopathologic analysis of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): a report of a new genetically confirmed case and comparison to 2 previous cases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2016; **75**(11): 1020-1030.
 115. Nishimoto Y, Shibata M, Nihonmatsu M, Nozaki H, Shiga A, Shirata A, ve ark. A novel mutation in the HTRA1 gene causes CARASIL without alopecia. *Neurology* 2011; **76**(15): 1353-1355.
 116. Oberstein SAL. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 2003; **60**(12): 2020.
 117. Nozaki H, Sekine Y, Fukutake T, Nishimoto Y, Shimoe Y, Shirata A, ve ark. Characteristic features and progression of abnormalities on MRI for CARASIL. *Neurology* 2015; **85**(5): 459-463.
 118. Brulin P, Godfraind C, Leteurtre E, Ruchoux M-M. Morphometric analysis of ultrastructural vascular changes in CADASIL: analysis of 50 skin biopsy specimens and pathogenic implications. *Acta neuropathologica* 2002; **104**(3): 241-248.
 119. Tikka S, Mykkänen K, Ruchoux M-M, Bergholm R, Junna M, Pöyhönen M, ve ark. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain* 2009; **132**(4): 933-939.
 120. Yamamoto Y, Craggs LJ, Watanabe A, Booth T, Attems J, Low RW, ve ark. Brain microvascular accumulation and distribution of the NOTCH3 ectodomain and granular osmiophilic material in CADASIL. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2013; **72**(5): 416-431.
 121. Matur Z, Poyraz M, Uyguner O, Kayserili H, Guveli B, Baykan B. Migraine, white matter lesions and subarachnoid hemorrhage: analysis of a large pedigree/Migren, ak madde lezyonlari ve subaraknoid kanama: genis bir aile agacinin analizi. *Archives of Neuropsychiatry* 2010; **47**(2): 162-166.
 122. Siva A, Altintas A, Saip S, Uyguner O, Kayserili H, Eskazan E, ve ark. Notch3 Mutations in Two Turkish Families with Cadasil Syndrome. *Neurology* 2004; **62**(7): A44.
 123. Markus H, Martin R, Simpson M, Dong Y, Ali N, Crosby A, ve ark. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 2002; **59**(8): 1134-1138.

124. Peters N, Opherck C, Bergmann T, Castro M, Herzog J, Dichgans M. Spectrum of mutations in biopsy-proven CADASIL: implications for diagnostic strategies. *Archives of neurology* 2005; **62**(7): 1091-1094.
125. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, ve ark. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *The Lancet* 1997; **350**(9090): 1511-1515.
126. Ampuero I, Alegre-Abarategui J, Rodal I, España A, Ros R, Sendón JLL, ve ark. On the diagnosis of CADASIL. *Journal of Alzheimer's Disease* 2009; **17**(4): 787-794.
127. Liu X, Zuo Y, Sun W, Zhang W, Lv H, Huang Y, ve ark. The genetic spectrum and the evaluation of CADASIL screening scale in Chinese patients with NOTCH3 mutations. *Journal of the neurological sciences* 2015; **354**(1): 63-69.
128. Di Donato I, Bianchi S, Gallus GN, Cerase A, Taglia I, Pescini F, ve ark. Heterozygous mutations of HTRA1 gene in patients with familial cerebral small vessel disease. *CNS neuroscience & therapeutics* 2017; **23**(9): 759-765.
129. Nozaki H, Kato T, Nihonmatsu M, Saito Y, Mizuta I, Noda T, ve ark. Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting heterozygotes with CARASIL. *Neurology* 2016; **86**(21): 1964-1974.
130. Preethish-Kumar V, Nozaki H, Tiwari S, Vengalil S, Bhat M, Prasad C, ve ark. CARASIL families from India with 3 novel null mutations in the HTRA1 gene. *Neurology* 2017; 10.1212/WNL.0000000000004710.

HAM VERİLER



FORMLAR

(EK-1)

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ
GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Proje Adı

“Subkortikal Enfarkt ve Lökoensefalopati ile giden Serebral Arteriyopati (CADASIL/CARASIL) hastalığı ile ilişkili *NOTCH3* ve *HTRA1* gen mutasyonlarının araştırılması”

Tarih:

I-Araştırmayla İlgili Bilgiler

Bu proje, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalının Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilecek bir genetik çalışma olup, klinik olarak CADASIL/CARASIL düşünülen olgularda *NOTCH3* ve *HTRA1* gen mutasyon sıklıklarının ve genotip-fenotip ilişkileri ile moleküler patolojinin araştırılmasını, mutasyon sıklıklarının belirlenmesini, moleküler tanı için akış şemalarının belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmaya izin vermeden önce sizleri çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle bağlı olacaktır.

Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan mutasyonları daha detaylı araştırmak, klinik tanıyı desteklemek/desteklememek ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına ve ülkemizdeki mutasyon sıklıklarının belirlenmesine yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Bu çalışma tek merkezli olup 50 olgu ile gerçekleştirilecek ve 18 ay sürecektir (Aralık 2015-Haziran 2017).

Bu projeye katılmak için sizden 2 ml periferik kan örneği alınacaktır. Bu örnekten elde edilen DNA materyali proje çalışmasında kullanılacaktır. Elde edilen DNA örneğinin yetersiz veya kalitesiz olması durumunda tekrar örnek istenebilecektir. Bu durumda gönüllü tekrar bilgilendirilerek izni alınacaktır.

Olası riskler ve faydalar:

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişmesi durumu.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle bağlı olacaktır.

Olası yararlar: Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan mutasyonları daha detaylı araştırmak, klinik tanıyı desteklemek/desteklememek ve

genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına ve ülkemizdeki mutasyon sıklıklarının belirlenmesine yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

II- Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgiler:

Bu çalışmaya katılmaktan herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu durumda, tedaviniz devam eder, herhangi bir cezaya ya da yaptırıma maruz kalmayacaksınız, hiçbir hakkınızı kaybetmeyeceksiniz

İzleyicilerin, yoklama yapan kişilerin, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceğini, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağını, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin verilmiş olacağını bildirmek isteriz.

Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacaktır. Kamuoyuna açıklanmayacak, araştırma sonuçları bilimsel dergilerde yayımlansa dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağını bildirmek isteriz.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.

Bu belgeyi okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı vererseniz formda aşağıdaki kutucuklardan birini seçiniz.

DNA örneğimin:

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

III- Katılımcının/Hastanın Beyanı

Sayın Dr..... tarafından (Kurum Adı)..... (Anabilim Dalı, Ünite Adı)'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü

tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.....(Doktor ismi), (telefon ve adres) 'ten arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Kontak kurulabilecek kişiler:

Prof. Dr. Z. Oya Uyguner (ITF Tıbbi Genetik AD)- Sorumlu Araştırmacı
Doç. Dr. Murat Kürtüncü (ITF Nöroloji AD) – Projenin Klinik Danışmanı
Bio. Burcu Sevinç (ITF Tıbbi Genetik AD)-Yardımcı Araştırmacı

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direkt hat: (0 212) 414 20 00 – 31289 (ITF- Nöroloji)
Dahili hat:(0 212) 414 20 00 – 32327 (ITF-Tıbbi Genetik AD)

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: kurtuncum@gmail.com/ o.uyguner@istanbul.edu.tr/
burcu.sevinc1@gmail.com

Adı Soyadı Doğum tarihi Tel No. İmza

Gönüllü /Yasal temsilcisi

Gönüllü /Yasal temsilcisi

Gönüllü /Yasal temsilcisi

Gönüllü /Yasal temsilcisi

(EK-2)

Çalışmada kullanılan primer dizileri

NOTCH3- F1	<u>Exon 1</u>	5'- GCC TCA CTT CGG CGA AGT T -3'	19	60	368
NOTCH3- R1		5'- GGT CCT CCA GGA CTG GCA T -3'	19	60	
NOTCH3-F2	Exon 2	5'-CAT GCA GCT GTT GCC TGG T-3'	19	58	288
NOTCH3-R2		5'-GGT AGA GAC ATC CAT GGT GA-3'	20	60	
NOTCH3-F3/4	Exon 3-4	5'-GTG TCT GGG GCC ATC CT-3'	17	56	670
NOTCH3-F3/4		5'-CTG GCC TGC TGT CCC CA-3'	17	58	
NOTCH3-F5/6	Exon 5-6	5'-CAG GAG AGT CAG AGG GGT-3'	18	58	587
NOTCH3-R5/6		5'-GTC AGA CTT CTT ATT TGC CCT-3'	21	60	
NOTCH3-F11	Exon 11	5'-CTG AAC CAG GAT TGG TCC GA-3'	20	62	388
NOTCH3-R11		5'-CAC TAG ATG CAC CAT TCC CA-3'	20	60	
NOTCH3-F18-19	Exon 18-19	5'-CTA ACA GCG GGA CTC AGG AA-3'	20	62	727
NOTCH3-R18-19		5'-CAT CCC GGC CAG TTG TCA-3'	18	58	
NOTCH3-F21/23	Exon 21-23	5'- CCT ACT GGT AGT GCG CTG AA -3'	20	60	921
NOTCH3-R21/23		5'- GAA ACT CCC TTC CCT TCG AT -3'	20	60	
NOTCH3-F24	Exon24	5'- CCA CTC CTC CAT TTC TTC TCC T -3'	22	61.0	742
NOTCH3-R24		5'- AAG TGG ATG GGC AGG TGG -3'	18	61.9	
NOTCH3-F25	Exon25	5'- TGC AAG CCT TGT CTG GAG TCT -3'	21	62.4	555
NOTCH3-R25		5'- GCT CCT GAC ATC TGG TGG GTA -3'	21	62.4	
NOTCH3-F26-27-28	Exon 26-28	5'-GTG GAG ATG GCG CTT CAG A-3'	19	62	962
NOTCH3-R26-27-28		5'-GGG GAC AGC GGT GCC AT-3'	17	65	
NOTCH3-R27Seq		5'-CAG AGG TCT GAG TCA GGT CAA-3'	21		
NOTCH3-F33	Exon 33	5'- CCA GGT CTG TCA AGC TCC A -3'	19	60	1337
NOTCH3 R33		5'- CCT GGG CTG ATG ACC TAT CT -3'	20	62	
NOTCH3-F33 SEQ		5'-GAC TCG CTG GAC TCC C -3'	16	54.7	
NOTCH3-R33 SEQ		5'-CCA GTG GCA GCA GGA ACG A-3'	19	62	

Name	Region	Seq	Mer	Tm	Band
HTRA1-F1	Exon 1	5'-GAG GCC CTC CTGCACTCT-3'	18	60.5	676
HTRA1-R1		5'-CGAGAGTTGCCCTGGCCA-3'	18	65.9	
HTRA1-F1seq		5'-GCC CAG ACC GCT GCG A-3'	16		
HTRA1-R1seq		5'-GTT GGC GTC GCT GCC GCA-3'	18		
HTRA1-F2-3	Exon 2&3	5'-CCT TCA GAA TTC CAA AGG CT-3'	20	58	957
HTRA1-R2-3		5'-GGC TCA GAC TGG CTT CAG T-3'	19	60	
HTRA1-R2seq		5'-GTT CTA AGG GAG ACA CAC TTA-3'	21		
HTRA1-F3seq		5'-GGC TGT TGC ACA ACC CA-3'	17		
HTRA1-F4-5	Exon 4&5	5'-GGA TGT TAG TTG TGA GCT CAG T-3'	22	56	1028
HTRA1-R4-5		5'-GCA GTA CAT TTA CAG AGC CA-3'	20	54	
HTRA1-R4seq		5'-GGG CTA AGA CCT ATG CTG A-3'	19		
HTRA1-F5seq		5'-CGA CCA GGC AGG GAC AT-3'	17		
HTRA1-F6	Exon6	5'-CAC TTC GAT CTC TGA AAT AGC T-3'	22	55.6	335
HTRA1-R6		5'-CTT GGC TAG TCC TAG GGG CT-3'	20	59.9	
HTRA1-F7	Exon7	5'- GTG GCC CTT CCT GCA AC-3'	17	60.2	235
HTRA1-R7		5'-GGT GCC CGT GAG CAC CT-3'	17	63.4	
HTRA1-F8	Exon8	5'-GGA ACT GGT GAG AGC TGA GT-3'	20	62	283
HTRA1-R8		5'-CAA CAT AAT CAT CTG AGC CAG T-3'	22	56.8	
HTRA1-F9	Exon9	5'-GCT GTG CCT CTG TCC AT-3'	17	55.3	325
HTRA1-R9		5'-GCA GCC CAG AGT CCT CA-3'	17	58.44	
		TOPLAM	377		

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 2074

Tarih : 28.12.2015

Konu : Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER

Sayın Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi : Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 17/12/2015 gün ve 398480 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek lisans öğrencisi Burcu SEVINÇ' in yürüteceği 2015/2055 dosya numaralı "Subkortikal Enfarkt ve Lökensefalopati ile giden Serebral Arteriyopati (CADASIL/CARASIL) hastalığı ile ilişkili NOTCH3 ve HTRA1 gen mutasyonlarının araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 25/12/2015 tarih ve 22 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yagiz URESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanakİstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Subkortikal Enfarakt ve Lökoensefalopati ile giden Serebral Arteriyopati (CADASIL/CARASIL) hastalığı ile ilişkili NOTCH3 ve HTRA1 gen mutasyonlarının araştırılması"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI "Subkortikal Enfarkt ve Lökensefalopati ile giden Serebral Arteriyopati (CADASIL/CARASIL) hastalığı ile ilişkili NOTCH3 ve HTRA1 gen mutasyonlarının araştırılması"

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	16/12/2015	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından, Ust Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:22	Tarih: 25/12/2015		
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER'in sorumluluğunda ve Yüksek İhtisas öğrencisi Burcu SEVİNÇ'in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmaya katılan Etik Kurul Üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

- * :Araştırma ile ilişkisi
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik altı komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SUBKORTİKAL ENFARKT VE LÖKOENSEFALOPATİ İLE GİDEN SEREBRAL ARTERİYOPATİ (CADASIL CARASIL) HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ NOTCH3 VE HTRA1 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Gönderim Tarihi: 09-Oca-2018 07:35 PM (UTC+0200)
Gönderim Numarası: 901260014
Dosya adı: I_LE_L_K_L_NOTCH3_VE_HTRA1_GEN_MUTASYONLARININ_ARA_TIRILMASI.doc (758K)
Kelime sayısı: 16099
Karakter sayısı: 109003

SUBKORTİKAL ENFARKT VE LÖKOENSEFALOPATİ İLE GİDEN SEREBRAL ARTERİYOPATİ (CADASIL CARASIL) HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ NOTCH3 VE HTRA1 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%19	%1	%1	%17
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%16
2	Abdullah A. Al-Ashwal, Afaf Al-Sagheir, Khushnooda Ramzan, Mohammed Al-Owain et al. "Clinical, Endocrine, and Molecular Genetic Analysis of a Large Cohort of Saudi Arabian Patients with Laron Syndrome", Hormone Research in Paediatrics, 2017 Yayın	%1
3	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	phd.semmelweis.hu İnternet Kaynağı	<%1
5	tanjuyildon.tr.gg İnternet Kaynağı	<%1