

TC.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

(UZMANLIK TEZİ)

HEREDİTER SPASTİK PARAPAREZİ TANISI ALAN HASTALARDA
GENETİK ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. MEHMET BUĞRAHAN DÜZ

DANIŞMAN

PROF. DR. Mehmet SEVEN

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2017

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 çalışmayla 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.

Dr. Mehmet Buğrahan Düz



İTHAF

Hayattaki en değerli varlığım olan aileme,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam ve kardeşime

Saygıdeğer akrabalarım ve dostlarıma...



TEŞEKKÜR

Kıymetli bilgilerini, yardımlarını ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız ve tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Mehmet Seven'e

Uzmanlık eğitimimize çok önemli katkılar sağlayan ve birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum saygıdeğer hocam Sn. Prof. Dr. Mustafa Özen'e

Tezimin proje ve yazımı sürecinde ve her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocamlarım Sn. Doç. Dr. Hakan Ulucan'a Sn. Yrd. Doç. Dr. Gülgün S. Güven, Yrd. Doç. Dr. Selçuk Daşdemir, Uz. Dr. Elif Fenercioğlu, Uz. Dr. Aysel Kalaycı Yiğın'e

Tez hastalarımın seçilmesinde ve değerlendirilmesinde klinik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sn. Prof. Dr. Mehmet Ali Akalın'a ve Sn. Uz. Dr. Melih Tütüncü'ye

Kısa bir süre kendisi ile çalışma imkânı bulmama rağmen özellikle klinik anlamda tecrübelerinden istifade ettiğim değerli hocam Sn. Prof. Dr. Adnan Yüksel'e

Moleküler teknik ve uygulamalarda bizlerle deneyimlerini paylaşan çok değerli arkadaşlarım Ömer Faruk Karataş'a

Birlikte çalışmaktan mutlu olduğum çok şey öğrendiğim hala da öğrenmeye devam ettiğim uzman arkadaşlarım Sn. Uz. Dr. Alper Gezdirci, Sn. Uz. Dr. Erkan Koparır ve Sn. Uz. Dr. Asuman Koparır'a

Güzel günleri paylaştığım uzmanlık öğrencisi arkadaşlarım Dr. Emre Kırat, Dr. Baxtiyar Mammadov, Dr. Emrehan Kırtas, Dr. Uğur Gümüş, Dr. Gizem Kaval ve Dr. Hamdi Kale'ye

Laboratuar arkadaşlarım Seda Salman Yılmaz, Murat Polat, Filiz Özdemir, İlknur Suer, Esra Güzel, Derya Akyüz, Abdullah Çelebi, Özlem Demirel, Nazlı Bilge, Pınar Karaca, Bülent Bağlama Ezgi Çolo ve bölümümüz çalışanları Fatma Öner, Pınar İşleyen, Ercan Keser, Salih İşenc, Ebru Polat, Şaban Curkuş, Şenay Deler, Azize Turan, Fatma Gençoğlu, Hasan Yalçinkaya'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
İTHAF	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
1 GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe.....	3
2.2 Epidemiyoloji	4
2.3 Patofizyoloji	5
2.4 Herediter Spastik Paraplejilerin Klinik Özellikleri	12
2.4.1 Spastik Paraplejiler.....	12
2.4.2 Saf Herediter Spastik Paraplejiler	12
2.4.3 Kompleks Herediter Spastik Paraplejiler	13
2.5 HSP'nin Ayırıcı Tanısı.....	14
2.6 Laboratuvar ve Görüntüleme Yöntemleri	18
2.7 Kalıtım özelliklerine göre Herediter Spastik Parapleji.....	18
2.7.1 SPG4.....	18
2.7.2 SPG3A.....	19
2.7.3 SPG31.....	20
2.8 HSP'de Genetik Tanı Test Stratejileri	32
2.8.1 YND Gen Panelleri	32
2.8.2 Tüm Ekzom Dizileme ve Tüm Genom Dizileme	32

2.8.3	DNA Mikroarray Tabanlı Tanı.....	33
2.8.4	Konvansiyonel Genetik Test Stratejileri	33
2.9	Genetik Danışma	34
2.10	HSP ve Sağ Kalım	35
2.11	SANGER DİZİLEME (SD)	35
2.12	YENİ NESİL DİZİLEME	37
2.12.1	YND Platformların Teknik Özellikleri.....	38
2.12.2	Biyoenformatik Data Analizi	39
2.12.3	Dizileme Teknolojilerinden Elde Edilen Varyantların Değerlendirilmesi	45
3	GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1	Klinik Değerlendirme.....	50
3.2	Elektromiyografi (EMG) ve Manyetik Rezonans Çalışmaları	50
3.3	DNA İzolasyonu ve saflık derecelerinin hesaplanması	54
3.4	Sanger Dizileme (SD)	55
3.4.1	Sanger Dizileme Reaksiyonları	55
3.4.2	Sanger Dizileme Veri Analizi	58
3.5	Tüm Ekzom Dizileme (TED)	58
3.5.1	TED Reaksiyonları	59
3.5.2	Veri İşleme ve Analizi.....	60
4	BULGULAR	62
4.1	1 no'lu Aile.....	62
4.2	2 no'lu Aile.....	67
4.3	3 no'lu Aile.....	71
4.4	4 no'lu Aile.....	74
4.5	5 no'lu Aile.....	76
4.6	6 no'lu Aile.....	81
5	TARTIŞMA	80
6	SONUÇ	85
7	KAYNAKÇA	90

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: HSP alt tipleri ile ilişkilendirilmiş proteinler ve bunların hücre içerisindeki görevleri	7
Tablo 2: HSP ile ayırıcı tanısı yapılan hastalıkların klinik özellikleri ve bu hastalıkların tanısında kullanılan testler.....	15
Tablo 3: OMIM'de tanımlanmış tüm HSP alt tiplerine ait klinik özelliklerin özeti.....	21
Tablo 4: Biyoinformatik analizlerde sık kullanılan programlar	40
Tablo 5: Patojenik varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterler	46
Tablo 6: Benign varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterler.....	48
Tablo 7: Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerin birlikte değerlendirilmesi...	49
Tablo 8: Tıbbi Araştırma Konseyi Kas Zaafı Ölçeği	50
Tablo 9: SPAST, ATL1 ve REEP1 genlerinin Sanger dizileme öncesi PZR reaksiyonlarında kullanılacak primer dizileri	56
Tablo 10: PZR uygulaması için bileşenler ve miktarları.....	57
Tablo 11: Dizileme PZR için bileşenler ve miktarları	57
Tablo 12: Dizileme PZR programı.....	58
Tablo 14: 259. pozisyonda bulunan serin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu	67
Tablo 15: 157. pozisyonda bulunan lösin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu	71
Tablo 16: 358. pozisyonda bulunan valin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu	74
Tablo 17: III.5 no'lu bireyin TED analizinde belirlenen HSP ile ilişkili varyantlar.....	78
Tablo 18: 620. pozisyonda bulunan valin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu	80
Tablo 19: IV.5 no'lu bireyin TED analizinde belirlenen HSP ile ilişkili varyantlar	80
Tablo 20: V.2 no'lu bireyin TED analizinde belirlenen HSP ile ilişkili varyantlar.....	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: HSP genlerinin keşif süreci (A) ve sorumlu genlerin frekansları (B).....	4
Şekil 2: Piramidal motor sistem	6
Şekil 3: HSP’de farklı genetik tanısal metotlar kullanılarak tanı koyma stratejilerine bir örnek	34
Şekil 4: PZR ve kapiller jel elektroforezde yürütülen DNA fragmanlarının sanger sekanslama yöntemi ile kromatografin ortaya çıkma süreci	36
Şekil 5: IGV programı içerisinde YND analizine ait örnek bir ekran görüntüsü.....	42
Şekil 6: TED biyoenformatik analiz iş akışı	44
Şekil 7: Çalışmanın iş akış şeması	53
Şekil 8: TED reaksiyonları	61
Şekil 9: 1 no’lu ailenin pedigrisi.....	65
Şekil 10: IV.3 no’lu hastanın ve diğer hasta aile bireylerinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.....	66
Şekil 11: 2 no’lu ailenin pedigrisi.....	69
Şekil 12: IV.7 no’lu hastanın ve diğer hasta aile bireylerinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.....	70
Şekil 13: 3 no’lu ailenin pedigrisi	72
Şekil 14: III.1 no’lu hastanın ve diğer hasta aile bireylerinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.....	73
Şekil 15: 4 no’lu ailenin pedigrisi	75
Şekil 16: IV.3 no’lu hastanın ve diğer hasta aile bireyinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.....	76
Şekil 17: 5 no’lu ailenin pedigrisi	77
Şekil 18: III.5 no’lu hastanın ve diğer hasta aile bireyinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.....	79
Şekil 19: 6 no’lu ailenin pedigrisi.....	82

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Sık kullanılanlar (alfabetik olarak sıralı)

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

AMP: Adenozin Monofosfat

ATL1: Atlastin GTPaz 1 geni

ATP: Adenozin Trifosfat

DNA: Deoksiribonükleik asit

EMG: Elektromiyografi

ER: Endoplazmik Retikulum

GPI: Glikoz-6 fosfat izomeraz

HSP: Herediter Spastik Paraparezi

KIAA0196: WASH complex subunit 5 geni

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA: Mesajcı RNA

OD-HSP: Otozomal dominant Herediter Spastik Parapleji

REEP1: Receptor accessory protein 1 geni

RNA Ribonükleik asit

SD: Sanger Dizileme

SEP: Somatosensöriyel uyarılmış poyansiyel

SPAST: Spastin geni

SPG4: Spastik Paraparezi 4

SPG3A: Spastik Paraparezi 3A

SPG31: Spastik Paraparezi 31

SPGn: Spastik Paraparezi tip n

TED: Tüm Ekzom Dizileme

tRNA: Taşıyıcı RNA

TGD: Tüm Genom Dizileme

VEP: Vizüel uyarılmış poyansiyel

YND: Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

Düz MB. Herediter Spastik Paraparezi Tanısı Alan Hastalarda Genetik Etyolojinin Araştırılması İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul. 2017.

Herediter spastik parapareziler (HSP) üst motor nöron hastalıklarının hem genetik ve hem de klinik olarak heterojen bir grubunu oluşturur. HSP'nin en belirgin bulgusu alt ekstremité güçsüzlüğü ve spastisitedir. Temel olarak klinik bulgulara ve tutulum yerine göre “saf” ve “kompleks” olmak üzere iki tipi vardır. Saf tipte spastisiteye pes kavus, üriner semptomlar, hafif ataksi ve distal kasların atrofi eşlik edebilir. Kompleks tip ise dismorfik bulgular, kognitif bozukluklar, beyaz cevher lezyonları, spinal kord atrofi ve polinöropati gibi daha kompleks bulgularla seyreder. Bugüne kadar, HSP kliniği ile ilişkilendirilebilen otozomal resesif (OR), otozomal dominant (OD) veya X'e bağılı kalıtılan 76'dan fazla gen bildirilmiş olup her bir gen sadece bir alt tipte ilişkilendirilmiştir. Mutasyon saptanan gene göre HSP alt tiplendirmesi yapılmaktadır. Otozomal dominant HSP kliniğine sahip bireylerin yaklaşık %50'sinde SPG4, SPG3A ve SPG31 alt tipleri tespit edilmiştir. Bu HSP alt tiplerine ise sırasıyla *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerindeki mutasyonlar neden olmaktadır.

Otozomal dominant kalıtılan Mendeliyen geçişli hastalıkların moleküler etyolojisinin aydınlatılmasında halen yaygın olarak Sanger dizileme yöntemi kullanılmaktadır. Günümüzde teknolojik gelişmelerle birlikte yeni nesil dizileme yöntemlerinin de geliştirilmesi çok yüksek hacimde DNA dizilerinin okunması mümkün hale gelmiştir. Yeni nesil dizileme yöntemlerinden biri olan tüm ekzom dizileme yöntemi insan genomunda kodlanan bölgelerde yer alan mutasyonların taranmasında hastalıkların genetik etyolojisinin aydınlatılmasında, birden fazla gene ve alt tipe sahip hastalıkların moleküler tanısında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem sayesinde günümüzde nedeni bilinmeyen hastalıklara daha hızlı ve daha ekonomik koşullarda tanı konulabilmektedir.

Bu çalışma klinik ve laboratuvar bulguları ışığında saf tip OD-HSP tanısı konulan hastaların genetik etyolojisinin aydınlatılması amacıyla yapıldı. Hasta grubu Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Nöroloji Anabilim Dalı polikliniklerinde 2012-2016 yılları arasında saf tip OD HSP tanısı ile takip edilen 6 aileden toplam 23 bireyden oluşturuldu. Çalışmanın ilk aşamasında her aileden seçilen bir bireyin periferik venöz kanından elde edilen DNA materyalinden *ATL1*, *SPAST* ve *REEP1* genlerine yönelik Sanger dizileme yapıldı. Mutasyon saptanan kişilerin benzer kliniğine sahip akrabalarında saptanan mutasyon tarandı.

İkinci aşamada ise bu genlerde Sanger dizilemede mutasyon tespit edilemeyen veya Sanger dizileme ile segregasyonu gösterilemeyen toplam üç hastaya tüm ekzom dizileme yapıldı.

Bir no'lu aileden 6 hastada *ATL1* geninde literatürde daha önce bildirilmiş c.776C>A mutasyonu, iki no'lu aileden 6 hastada *ATL1* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş c.470T>C mutasyonu, üç no'lu aileden 3 hastada *SPAST* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş c.1072G>C mutasyonu, dört no'lu aileden ise 2 hastada *SPAST* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş c.1099-1G>C mutasyonu saptandı. Çalışılan gen ve mutasyona göre bir ve iki no'lu ailedeki hastalar SPG3A, üç ve dört no'lu ailedeki hastalar SPG4 HSP alt tipi olarak kabul edildi. Sanger dizileme ile mutasyon tespit edilemeyen beş no'lu ailedeki bir hastaya yapılan tüm ekzom dizileme analizi sonucunda *KIAA0196* geninde literatürde daha önce bildirilmiş c.1859 T> C mutasyonu tespit edildi. Beş no'lu ailedeki 5 hastadan 3'ünde bu mutasyon Sanger dizileme ile doğrulanarak bu hastalar SPG8 tanısı aldı. Mutasyon doğrulanamayan iki kişiden birisine tüm ekzom dizileme yapıldı, ancak HSP ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyant tespit edilemedi. Altı no'lu ailede ise bir bireyde yapılan Sanger ve tüm ekzom dizilemede HSP ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyant tespit edilemedi.

Sanger dizileme ve tüm ekzom dizileme birlikte kullanılarak çalışmaya dâhil edilen 23 bireyden 20'sinin (%87) moleküler genetik etiyolojisi belirlendi.

Aşamalı olarak Sanger dizileme ve tüm ekzom dizileme yöntemlerinin birlikte kullanımı HSP'nin genetik etiyolojisinin aydınlatılmasına, klinik alt gruplarının belirlenmesine ve uygun genetik danışma verilmesine imkân sağlamıştır.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 22323)

ABSTRACT

Duz MB. Investigation of genetic etiology in patients with hereditary spastic paraparesis
Istanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Medical Genetics.
Specialization in Medicine Thesis. 2017.

Hereditary spastic paraparesis (HSP) constitutes both a genetic and a clinically heterogeneous group of upper motor neuron diseases. Most prominent features of HSP are weakness and spasticity of lower limb. There are basically two types, "pure" and "complex", depending on clinical findings and site of involvement. In pure type, spasticity can be accompanied by pes cavus, urinary symptoms and mild ataxia. The complex type is characterized more complex findings as dysmorphic features, cognitive impairment, white matter lesions, atrophy of spinal cord, and polyneuropathy. To date, more than 76 HSP subtypes have been reported that are inherited by autosomal recessive (AR), autosomal dominant (AD) or X linked and each subtype has been associated with only one gene. Approximately 50% of individuals with autosomal dominant HSP have SPG4, SPG3A and SPG31 subtypes. These HSP subtypes are caused by mutations in *SPAST*, *ATL1* and *REEP1* genes, respectively.

Sanger sequencing is still widely used to elucidate the molecular etiology of autosomal dominant inherited Mendelian disorders. Recently, along with technological developments, the development of next generation sequencing methods has made it possible to read very high amount DNA sequences. One of the next generation sequencing methods, whole exome sequencing methods have been used successfully in the screening of mutations in human genome-encoded mutations, in the elucidation of the genetic etiology of diseases, and in the molecular diagnosis of diseases with multiple genes and subtypes. Through this method, diseases of unknown cause can be diagnosed faster and more economically.

This study aims elucidation of the molecular genetic etiology of patients who diagnosed autosomal dominant HSP depending on clinical and laboratory findings. The patient group was consist of 23 individuals from 6 families followed by pure type AD-HSP diagnosis between 2012-2016 in Cerrahpasa Medical School, Department of Medical Genetics and Neurology. In the first phase of the work, Sanger sequencing was performed on the *ATL1*, *SPAST* and *REEP1* genes from the DNA material obtained from peripheral venous blood of a selected individual from each family. This mutation was screened in relatives of similar clinics of mutation-detecting individuals. In the second phase of the work, whole exome sequencing was performed on three patients with no mutation in Sanger sequence or segregation analysis failed.

In number one family, six patients have previously reported in the literature c.776C> A mutation in *ATL1* gene. In number two family, six patients have previously unreported in the literature c.470T>C mutation in *ATL1* gene. In number three family, three patients have previously unreported in the literature c.1072G>C mutation in *SPAST* gene. In number four family, two patients have previously unreported in the literature c.1099-1G>C mutation in *SPAST* gene. Depending on sequenced gene and detected mutation, number one and two families diagnosed as HSP subtype SPG3A, number three and four families diagnosed as HSP subtype SPG4. Whole exome sequencing was performed a patient in number five family who had no mutation in Sanger sequencing and previously reported c.1859 T> C mutation in the *KIAA0196* gene was detected. 3 of 5 patients in the five number family, this mutation was confirmed by Sanger sequencing and these patients were diagnosed with HSP subtype SPG8. Whole exome sequencing was performed on one of the two individuals whose mutation could not be confirmed and no variant could be identified associated with HSP. In number six family, any HSP associated variant could not be identified in Sanger and whole exome sequencing.

Molecular genetic etiology was elucidated 20 of the 23 (87%) individuals included the study with utilization together Sanger sequencing and whole exome sequencing. Gradually, the use of Sanger sequencing and whole exome sequencing methods has enabled the identification of genetic etiology of HSP, the identification of clinical subgroups, and the provision of appropriate genetic counseling.

This work was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects Unit. (Project number: 22323)

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Hereditær spastik parapareziler (HSP) üst motor nöron hastalıklarının hem genetik ve hem de klinik olarak heterojen bir grubunu oluşturur. HSP'nin en belirgin bulgusu alt ekstremité güçsüzlüğü olmasına rağmen, bu hastalığa periferik nöropati ve epileptik nöbetler gibi diğer nörolojik semptomlar/bulgular eşlik edebilir. Bugüne kadar, HSP kliniği ile ilişkilendirilebilen otozomal resesif (OR), otozomal dominant (OD) veya X'e bağılı kalıtılan 76'dan fazla gen bildirilmiş, her gen sadece bir alt tiptle ilişkilendirilmiştir. Otozomal dominant HSP kliniğine sahip bireylerin yaklaşık %50'sinde SPG4, SPG3A ve SPG31 alt tipleri tespit edilmiş olup, alt tipler sırasıyla *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genleri ile ilişkilidir. Ancak hastaların pek çoğunun moleküler genetik etiyolojisi günümüze kadar alışılagelmiş rutin testlerle aydınlatılamamıştır.

Sanger dizileme (SD) yıllardır pratik uygulamalarda kullanılan, belirli bir gen veya gen bölgelerinde bulunan nokta mutasyonlarını ve birkaç nükleotidi içeren delesyon/duplikasyonların tespitini sağlayan bir yöntemdir. Tüm ekzom dizileme ise insan genomunda tüm kodlanan bölgelerdeki nokta mutasyonları ve birkaç nükleotidi içeren delesyon/duplikasyonların tespitini sağlayan yeni nesil bir dizileme yöntemidir.

HSP klinik ve genetik olarak oldukça heterojen bir hastalık olup alt tiplerinin klinik seyirleri ve ciddiyetleri son derece birbirinden farklıdır. Bu nedenle genetik etiyolojinin aydınlatılarak alt tiplendirmenin yapılması hastalara daha doğru ve kapsamlı genetik danışma verilmesine olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı polikliniklerinde klinik ve laboratuvar bulgularıyla saf tip otozomal dominant HSP tanısıyla takip edilen, 6 aileden 23 hastanın moleküler genetik etiyolojisinin aydınlatılması hedeflendi. Bu amaçla hastalardan elde edilen periferik kan örneklerinden **Deoksiribonukleik asit** (DNA) izole edilip, ilk aşamada *ATL1*, *SPAST* ve *REEP1* genlerine yönelik SD yapıldı, bu genlerde mutasyon tespit edilemeyen ailelerden birer bireye ise tüm ekzom dizileme yapıldı. Elde edilen değişiklikler "The American College of Medical Genetics and Genomics 2015" kılavuzu ışığında değerlendirildi. Analizler neticesinde 20 hastanın moleküler genetik etiyolojisi aydınlatılarak 12'sine SPG3A, 5'ine SPG4, 3'üne SPG8 tanısı konuldu.

Sanger ve tüm ekzom dizileme yöntemleri aşamalı olarak birlikte kullanılarak saf tip otozomal dominant HSP'nin genetik nedeninin aydınlatılabileceği, alt tiplendirmenin

yapılabileceği, bu sayede sağlıklı bir genetik danışma verilebileceği ve nihayet HSP'nin etiyolojik tanısında rutin bir analiz yontemi olarak kullanılabileceği gosterildi.

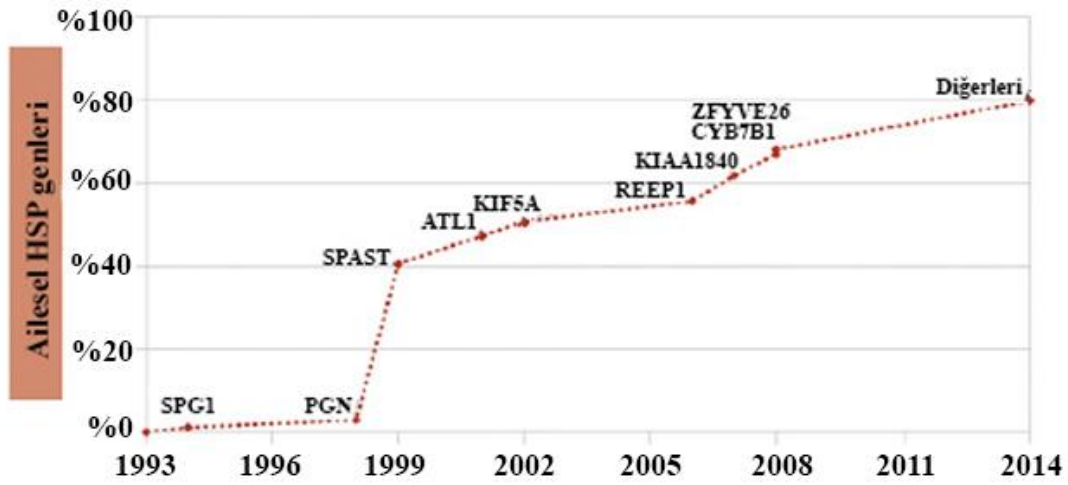


2 GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

HSP ilk defa 1876 yılında Seeligmüller (1) tarafından tanımlanmış olmasına rağmen, Strümpell dört sene sonra bu klinik antiteyi net olarak tarif etmiştir. Strümpell çalışmada sırasıyla 37 ve 56 yaşında, alt ekstremitelerinde spastisite ve periferik refleksleri artmış olan iki erkek kardeşini ve aksayan babalarını tarif etmiştir (2). Sonraki dönemde Strümpell ve Lorrain tarafından benzer klinik özelliklere sahip aileler bildirilmiştir (3, 4). Pratt ve ark. tarafından spastitesi olan hastalarda mental retardasyon, iktiyozis, pigmenter retinal dejenerasyon, optik atrofi, amiyotrofi, ekstrapiramidal bulgular, sensöriyel nöropati, ataksi ve dizartri gibi farklı bulguların eşlik etmesi sebebiyle ilk defa “HSP plus” tanımı ortaya atılmıştır (5). Eşlik eden bulguların çeşitliliği nedeniyle, dönemin otoriteleri arasında HSP klinik tablosunun saf ve kompleks olarak sınıflandırılması gerekliliği tartışılmaya başlanmıştır (6-8) 1981 yılında Harding ve ark. 22 HSP olgusu üzerinde yaptığı çalışmada ilk defa hastaları saf ve kompleks olarak sınıflandıracak kriterleri tanımlamıştır. Bunun yanında klinik tablonun ortaya çıkış zamanının ve ciddiyetinin farklı olması, prognozundaki değişkenlik sebebiyle bir başka sınıflama daha yapmışlardır. 35 yaşından önce klinik belirtilerin ortaya çıkması durumunda hastalığın daha yavaş ilerlediğini (Tip 1), 35 yaşından daha geç bir dönemde başlaması durumunda kas güçsüzlüğünün, üriner semptomların ve sensöriyel nöropatinin daha belirgin olduğunu belirtmişlerdir (Tip 2) (9). Birçok ailenin tam anlamıyla sınıflandırılmaması nedeniyle bu kriterler üzerinde fikir birliği bulunmamaktadır.

Son yıllarda tek gen hastalıkları tanısında kullanılan teknolojilerin ilerlemesi ile HSP'nin moleküler alt yapısı ortaya konulmaya başlanmıştır. İlk defa 1990 yılında spastik parapleji, korpus kallozum hipoplazisi, zihinsel gerilik, el baş parmağında adduksiyon kontraktürü ve hidrosefali olan bir hastada SPG1'e (Spastic Paraplegia 1) *L1CAM* geninde tespit edilen mutasyonun neden olduğu tanımlanmıştır. (10). 1993 yılında ise SPG2 klinik tablosuna neden olan genin *PLP1* olduğu bildirilmiştir (11). Sonraki yıllarda hastalığın daha iyi anlaşılması ve tanısal moleküler genetik metotların ilerlemesi ile yeni genler tanımlanmıştır (Şekil 1). 2000'li yılların ikinci yarısından sonra yeni metotların geliştirilmesi ve bu süreç içerisinde maliyetlerin düşmesi ile gen tanımlanma çalışmaları hız kazanmıştır. Sadece 2014 yılından sonra 10'dan fazla yeni HSP alt tipi tanımlanmıştır(12).



Şekil 1: HSP genlerinin keşif süreci (13)'den alınmıştır)

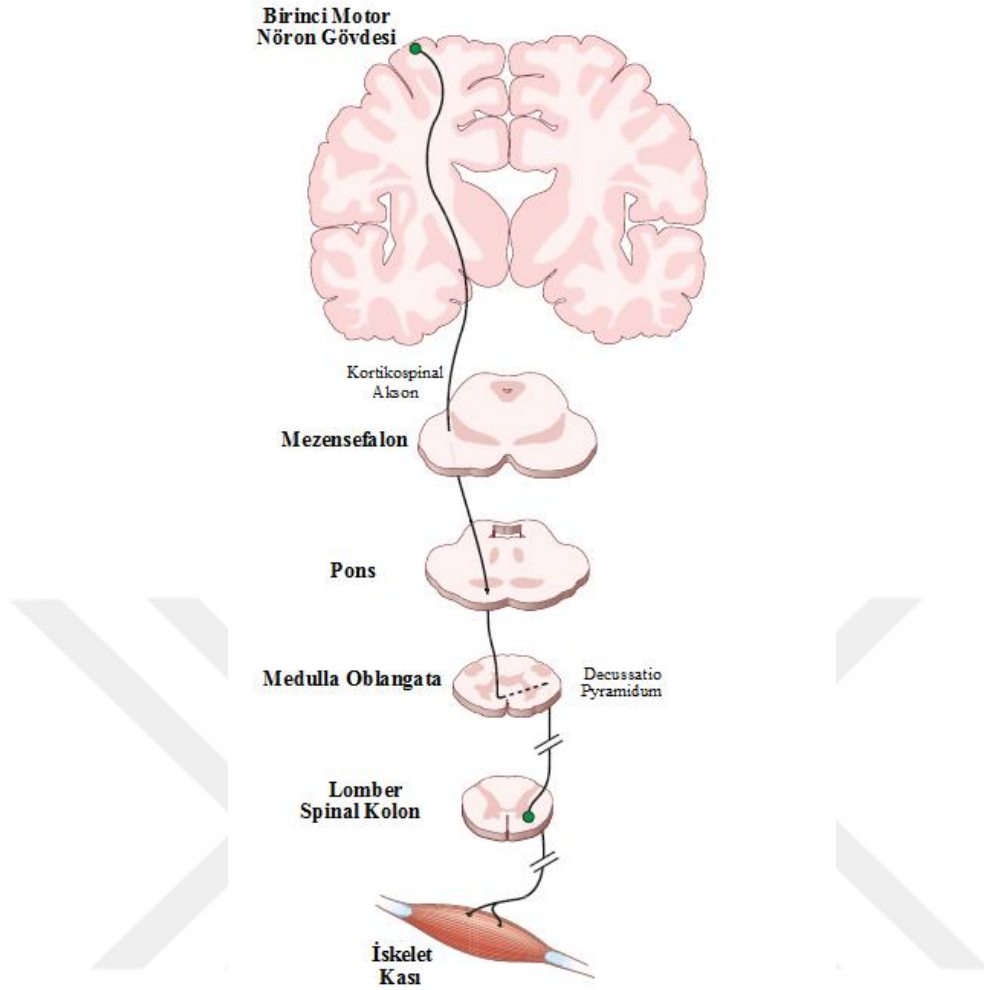
2.2 Epidemiyoloji

HSP prevalansı literatürde birbirinden farklı olarak bildirilmiştir. Bunun sebebi ise çalışmaya dahil edilen hastaların seçiminde farklı tanısal kriterlerin kullanılması, değişken epidemiyolojik metodoloji ve coğrafi faktörlerin olduğu düşünülmektedir. İtalya Molise bölgesinde prevalans 2,7/100.000 olarak bildirilmişken yine İtalya'nın bir başka bölgesi Valle d'Aosta'da 4,3/100.000'tür (14). Tüm HSP tipleri göz önünde bulundurulduğunda prevalans 4,3-9,8/100.000 arasında değişmektedir (15). Avrupa toplumunda OD-HSP diğer tip HSP'lerden daha sık görülür. Yapılan çalışmalarda İrlanda'da bu oranın 1,27/100.000, Norveç'te ise 5,5/100.000 (16, 17) olduğu tespit edilmiştir. Otozomal resesif HSP'nin (OR-HSP) sıklığı ise akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda daha yüksektir (15). Norveç'te 0,6/100.000 (17) iken Tunus'ta yaklaşık 9 kat daha fazla 5,5/100.000 olduğu bildirilmiştir (18).

İzole tip HSP, Kuzey Avrupa, Japonya ve Kuzey Amerika'da daha siktir (19, 20). Kompleks HSP ise OR-HSP tanısı alan hastalarda daha fazla görülmekte olup, yüksek oranlarda akraba evlilikleri görülen Akdeniz kuşağındaki ülkelerde bu tip daha yaygın görülmektedir (15). Ülkemizde ise HSP'nin prevalansına ilişkin herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

2.3 Patofizyoloji

Bilinçli hareket, serebral korteksten köken alıp nöromüküler sinapsta sonlanan ve “piramidal motor sistem” adı verilen uzun, dolambaçlı ve multisinaptik bir sistem tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 2). Bu sistem temel olarak iki basamağa ayrılmıştır. Birincisi, serebral motor korteksin V. Katmanından köken alan nöronlar beyin kökünden geçer, medullanın kaudal ucundan *Decussatio pyramidum*’da çapraz yaparak lateral kortikospinal yol olarak spinal korddan aşağı iner. Bazı kortikospinal nöronlar direkt alt motor nöronla sinaps yapmasına rağmen büyük çoğunluğu spinal kordda internöronlar üzerinden alt motor nöronlar ile etkileşime geçerler. İkinci aşamada ise alt motor nöron nöromusküler bileşkede kas lifleri ile sinaps yaparak sonlanır. Kortikospinal ve alt motor nöronların katettiği yaklaşık 1 metre mesafenin tamamı aksonlardan meydana gelmektedir. Akson içerisinde bulunan aksoplazmada hücresel hacmin %99’u bulunmaktadır. Bu mesafe aksiyon potansiyeli ile hızlı bir şekilde katedilebilmesine rağmen bu olayın gerçekleşmesi birçok mekanizmanın düzgün çalışması proteinlerin, lipidlerin, mRNA’ların ve organellerin düzgün sıralanması ve dağılması gibi birçok kompleks hücresel mekanizmalara bağlıdır. Bu dağılımın gerçekleşmesi nöronal hücre iskeleti boyunca motor proteinlerin hedeflerine uygun şekilde dağılımı ve ulaşması ile ilgilidir. Aksonal transport temel olarak mikrotübüller üzerinden yapılmaktadır. Kinezin, dinein ve myozin gibi protein aileleri anterograd ve retrograd transportlarda rol almaktadır. Transportun özgül olması ve kontrol edilmesi ise, çeşitli düzenleyici adaptör proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücre içi bazı proteinler ve bu komplekslerin etkileşimi; organel, protein, lipid ve diğer moleküllerin dağılımı ve yer almasını, olgun nöronda bulunan dallanma noktası, internodal segment ve presinaptik nöron gibi yapıların özelleşmesini ve aksonal gelişim esnasında büyümesini kontrol eder. Bu aşamalarda ortaya çıkabilecek bozukluklar hücresel iletimin verimli yapılamamasına, buna bağlı olarak da klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olur (21).



Şekil 2: Piramidal motor sistem

HSP klinik açıdan son derecede heterojen bir hastalıktır. Tiplerine göre spastisitenin derecesi, vasfı ve seyrinin birbirinden farklı olmasının hastalığa yanında eşlik eden bulgular da çeşitlilik arz etmektedir. Bunun temel nedeninin mitokondriyal disfonksiyon, mikrotübül ve diğer membran trafik proteinlerinin tutulumu, lizozomal disfonksiyon, makrotofaji ve lipid metabolizması gibi hücre içi birçok yolağın ve yapısal molekülün HSP patogenezinde rol oynaması olduğu düşünülmektedir (22). HSP tiplerine bağımlı olarak etkilenen protein ve mutasyonların yol açtığı hücre içi bozuklukların detayı Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: HSP alt tipleri ile ilişkilendirilmiş proteinler ve bunların hücre içerisindeki görevleri

Tip	Protein	Fonksiyonu	Referans
SPG1	Neural cell adhesion molecule L1	Nöronal migrasyon ve diferensiyasyon	(23)
SPG2	Prolactin-2B1	Kompakt miyelin intraperiod hattı korunması	(24)
SPG3A	Atlastin-1	Kortikospinal nöronlardaki ER membranı ile etkileşime geçerek mikrotübül dinamikleri ve ER şekillendirilmesi	(25)
SPG4	Spastin	Başlıca akson gelişimi ve dallanmasında olmak üzere mikrotübül yapısının gelişiminin desteklenmesi	(26)
SPG5A	Cytochrome P450 7B1	Ekstrahepatik dokulardaki kolesterol katabolik yollarındaki ilk aşamada fonksiyonu olan ER membran proteinin katalizi	(24)
SPG6	Magnesium transporter NIPA1	Distal aksonal fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli Bone morphogenetic protein (BMP) sinyal inhibisyonu	(27)
SPG7	Paraplegin	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor, mitokondriyal iç membranında yer alır	(28)
SPG8	Strumpellin	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor, valosin içeren proteini bağlar	(24)
SPG10	Kinesin HC5A	Anterograde aksonal transport	(24)

SPG11	Spatacsin	AP5 (Asit fosfataz-5) kompleksini vezikülleri ayırır	(29)
SPG12	Reticulon2	Spastin ile interaksiyon ve ER şekillenmesinde görevli	(30)
SPG13	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Mitokondriyal HSP60 şaperonu	(24)
SPG15	Spastizin	AP5 kompleksini vezikülleri ayıran aksesuar protein, endozomal trafikte rol alır	(29)
SPG17	Seipin	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor, N-glikozillenmiş proteini N- ve C- terminal fragmentlere ayırır	(31)
SPG18	Erlin-1	ER ile ilişkili degradasyon sistemi içindeki proteinlerin bir komponenti	(32)
SPG20	Spartin	Epidermal büyüme faktörünün degradasyonu	(33)
SPG21	Maspardin	Golgi cisimciğine transfer edilen veziküllerin ayrılması ve transportu	(34)
SPG22	Monocarboxylate transporter 8	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor	(24)
SPG30	Kinesin3	Aksonal trafik ve transport	(24)
SPG31	Receptor expression-enhancing protein 1	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor, ER tübüler membran ile etkileşimi sağlar	(35)
SPG33	Protrudin	FYVE-finger ailesinin üyesi, spastin ile etkileşim ile intraselüler trafik yönetimi	(36)
SPG35	Fatty acid 2-hydroxylase	Lipid hidroksilasyonu	(37)

SPG39	Neuropathy target esterase	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor, fosfolipaz, lizofosfolipaz	(38)
SPG42	Acetyl-coenzyme A transporter 1	Başlıca fonksiyonu bilinmiyor, Asetil-Koa transporter	(24)
SPG44	Connexin47	Hücre bağlantı proteinini	(24)
SPG47	AP-4 adaptor complex beta subunit	Vezikül formasyonunun sağlanması ve ayrılması	(39)
SPG48	Adaptor related protein complex 5 zeta 1 subunit	AP kompleksinde vezikül ayrılmasında ve DNA tamirinde homolog rekombinasyonda	(40)
SPG49	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 2	İntraselüler otofaji yolağı etkilenir ve lizozoma hedef proteinlerin ulaşması	(41)
SPG50	AP-4 adaptor complex mu subunit	AP4 kompleksi endolizozomal sisteme aktarılacak olan kargo proteinlerin tanınması ve ayrılması	(42)
SPG51	AP-4 adaptor complex subunit epsilon	AP4 kompleksi endolizozomal sisteme aktarılacak olan kargo proteinlerin tanınması ve ayrılması	(43)
SPG52	AP-4 adapter complex subunit sigma-1	AP4 kompleksi endolizozomal sisteme aktarılacak olan kargo proteinlerin tanınması ve ayrılması	(44)
SPG53	Vacuolar protein sorting-associated protein 37A	ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) sisteminin bir komponenti, intraselüler trafik, mutiveziküler yapıların maturasyonu ve ubikutinlenmiş proteinlerin iç zardan ayrılması	(45, 46)

SPG54	Phospholipase DDHD2	Santral sinir sisteminde lipid metabolizmasında rolü olduğu düşünülmektedir	(47, 48)
SPG55	Probable peptide chain release factor C12orf65, mitochondrial	Mitokondriyal DNA translasyonunda görev aldığı düşünülmektedir.	(49, 50)
SPG56	Cytochrome P450 2U1	Yağ asit metabolizmasında rol alır	(51)
SPG57	TFG protein	ER mikrotübüler yapısı ve fonksiyonu üzerinden uzun süreli aksonal korunma	(51)
SPG58	Kinesin-like protein KIF1C	Retrograde Golgi-ER transportu	(12)
SPG59	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	Enzim deubikitinizasyonu	(12)
SPG60	WD repeat-containing protein 48	Deubikitinizasyonun düzenlenmesi	(12)
SPG61	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	Protein transportu	(12)
SPG62	Erlin-1	ER bağımlı degradasyon	(12)
SPG63	AMP deaminase 2	AMP'nin IMP'ye deaminasyonu	(12)
SPG64	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	ATP hidrolizi, diğer nükleotidlerin pürinerjik sisteme geçişlerinin düzenlenmesi	(12)
SPG65	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	Ön planda IMP olmak üzere, pürin ve pirimidin nükleotidlerin hidrolizi ve metabolizması	(12)
SPG66	Arylsulfatase I	Sülfat esterlerinin hidrolizi ve hormon biyosentezi	(12)
SPG67	GPI inositol-deacylase	GPI biyosentezi	(12)
SPG68	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1	Hücre adhezyonu ve reseptör sinyali	(12)
SPG69	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	Nörotransmitter ve hormonların ekzositozu	(12)

SPG70	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	Sitozolil metiyonil-tRNA sentetaz	(12)
SPG71	Zinc finger RNA-binding protein	RNA lokalizasyonu?	(12)
SPG72	Receptor expression-enhancing protein 2	ER membran yapısındaki kıvrımlar	(52)
SPG73	Carnitine palmitoyl-transferase	Motor nöronlarda ifade edilir. ER'de bulunur ve atlastin-1 ile etkileşir	(53)
SPG74	Putative transferase CAF17, mitochondrial	Mitokondriyal demir-sülfür protein yerleştirilmesi	(54)
SPG75	Myelin associated glycoprotein	Myelin bakımı ve korunması, glia ve akson arası etkileşim	(55)
SPG76	Calpain 1	Sinaptik plastisite, sinaptik yapılanma, akson maturasyonu ve bakımı	(56)

2.4 Herediter Spastik Paraparezilerin Klinik Özellikleri

2.4.1 Spastik Paraplejiler

HSP başlangıcı son derece sinsidir. Bacaklarda sertlik ve ayakkabı ucunda aşınma en tipik bulgularıdır. Diğer spastik parapleji nedenleri ile karşılaştırıldığında alt ekstremitelerde spastisitesi daha ön plandadır. Spastik paraplejinin başlangıç yaşı ve niteliği, belirtilerin ilerlemesi, aile öyküsü ve diğer eşlik eden klinik bulgular hastalığın nedenleri ve tiplendirilmesi için son derece önemli ipuçlarıdır (57).

Aile hikayesi dışında sporadik spastik paraplejiyi, HSP'den ayıracabilecek güvenilir bir klinik özellik bulunmamaktadır. Sporadik Spastik Parapleji geçici bir tanıdır. Bu tanı başlıca, HSP ile ilişkilendirilmiş genlerde patojenik bir mutasyon bulunması veya ailede benzer olgu/olguların ortaya çıkması durumunda HSP'ye çevrilir. Diğer taraftan üst ekstremitelerde progresyon göstermesi, konuşma ve yutkunma fonksiyonlarının etkilenmesi ile tanı primer lateral skleroz ile değiştirilir. Son olarak zaman içerisinde bu klinik tabloya sebep olabilecek farklı bir etiyolojik faktörünün tanımlanması durumunda da tanı yeniden gözden geçirilir (57, 58). Yukarıda da belirtildiği gibi hem farklı bir hastalık tespiti açısından hem de asemptomatik etkilenmiş bireyler ve nonpenetrant mutasyon taşıyıcılarının gözden kaçmaması için proband ve ailedeki diğer bireylere kapsamlı fizik muayene yapmak gerekmektedir (9, 57).

Temel olarak klinik bulgulara ve tutulum yerine göre “saf” ve “kompleks” olmak üzere iki tipi vardır. SPG4 ve SPG3A ilk zamanlarda otozomal dominant saf herediter spastik paraplejilerin prototipi olarak kabul edilse de ilerleyen dönemde bu hastalarda mental retardasyon, ince korpus kallozum, demans, kas atrofisi, motor-sensöriyel aksonal polinöropatilerin de eşlik edebildiği görülmüştür. Tam tersi olarak SPG7 ve SPG11 en tipik otozomal resesif tip kompleks herediter spastik paraplejiler olarak kabul edilmesine rağmen bazı hastalarda saf herediter spastik paraplejiler gibi izole tutulumu neden olmuşlardır (59).

2.4.2 Saf Herediter Spastik Parapareziler

Saf HSP hastalarında genellikle ilerleyici yürüme bozukluğu ve bacaklarda sertlik ortaya çıkar (60). Normal doğum sürecini takip eden nöromotor gelişim sonrasında yaşamın herhangi bir döneminde başlayabilir, alevlenme ve remisyon dönemleri ise gözlenmez. HSP tiplerinin klinik bulgularının ortaya çıkma dönemi birbirinden farklılık gösterebilir. Başlangıç döneminde aileleri veya hastaların kendilerinin fark ettiği yürüyüş bozukluğu mevcuttur. Sıklıkla hastalar bu durumu sık düşme, ayakkabının ucunun erken eskimesi, sık takılıp düşme

olarak tarif ederler. Yürüyüş bozukluğu uzun yıllar boyu yavaş bir progresyon gösterebilir ve koltuk değneği, yürüme arabası ve tekerlekli sandalye kullanmalarını gerektirebilir.

Nörolojik muayenede ilerleyici, alt ekstremitte güçsüzlüğü, spastisite saptanır ve bu spastisite sonucunda HSP hastalarında klasik olan sirkümdüksiyon ve ayak ucu yürüyüş paterni ortaya çıkar (14, 61). Spastisite, ön planda hamstring, kuadriseps, adduktor, ve gastroknemius-soleus kaslarında görülürken, güçsüzlük ise en belirgin iliopsoas, hamstring ve tibialis anterior kaslarında görülür (59). Spastisite ve güçsüzlüğün klinik yansımaları değişkendir. Bazı hastalarda belirgin spastisiteye güçsüzlük eşlik etmezken, bazı hastalarda ise her iki semptom eşit oranda görülür. Hiperrefleksi, çapraz adduktor belirtisi ve plantar ekstansör yanıt tipiktir. Ayak başparmağındaki hafif vibrasyon kaybı sıklıkla mevcuttur. Kas tonusu artmaksızın ve kas gücü azalmaksızın üst ekstremitede hafif reflekslerde artış olabilir (59).

Diğer saf HSP bulguları ise alt ekstremitede orta derece duyuşsal anomaliler, ayak bileği refleksi yokluğu, pes kavus, üriner semptomlar, hafif ataksi ve distal kasların erimesidir. Duyusal anomaliler saf HSP'lerde %10-65 arasında görülür ve bu değişken oranların başlangıç yaşı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Daha erken başlayan hastalarda ilerleyen dönemlerde bu rahatsızlık daha sık gözlenmektedir. Duyusal ileti bozukluğu daha çok vibrasyon ve propriyosepsiyon duyuları ile bağlantılıdır. Ayak bileği refleksinde kaybolmasının da benzer mekanizmalarla olduğu düşünülmektedir. Pes kavus çok sıklıkla gözlenmesine de Harding ve arkadaşları hastaların 1/3'ünde olduğunu belirtmiştir. Üriner sfinkter bozukluklarına bağlı olarak hastaların %50'sinde üriner aciliyet ve duraksama görülür. Saf HSP hastalarının konuşma, çiğneme ve yutkunma fonksiyonları ve üst ekstremitte kas gücüyle el becerileri normaldir (59).

2.4.3 Kompleks Herediter Spastik Parapareziler

Kompleks Herediter Spastik Paraparezilerde, saf Herediter Spastik Paraparezilere ek olarak nörolojik ve nörolojik olmayan anomaliler eşlik eder. Spastik paraplejide görülen üriner aciliyet, duyuşsal sorunlara ek olarak üst ekstremitte spastisitesi, utangaç mizaç, emosyonel değişkenlik, zihinsen gerilik, kognitif bozukluk, demans, epilepsi, afazi, distoni, ekstrapiramidal bulgular (Parkinsonizm, kore, atetoz, diskinezi), serebellar anomaliler (atrofi, nistagmus, disartri, anartri, disfaji, ataksi, tremor, çarpık yürüyüş), hidrocefali, dismorfik bulgular (mikrocefali, posterior fossa anomalileri), beyaz cevher lezyonları, spinal kord atrofisi, kas atrofisi, polinöropati gibi nörolojik patoloji belirteçleri tespit edilebilir. Hem alt hem de üst ekstremitede distal kaslarda spastisite görülmesi kompleks Herediter Spastik Paraparezide alt

motor nöron tutulumu ile ilişkili olduğundan şüphe edilmektedir. Bunun yanında nörolojik olmayan bulgular ise retinopati, maküler dejenerasyon, optik atrofi, katarakt, sağırılık, kısa boy, fasyal dismorfizm, tekrarlayan kusma, ortopedik anomaliler (maksiller hipoplazi, skolyoz, kalça çıkığı, ayak deformitesi), gastroözofagial reflü, cilt lezyonlarıdır (24).

2.5 HSP'nin Ayırıcı Tanısı

HSP'nin bir dışlama tanısı olduğu gözden kaçırılmamalıdır. Ayırıcı tanı esnasında istenen tetkikler neticesinde diğer tanılar ekarte edilir (14, 57, 62, 63). Benzer klinik bulgular; yapısal spinal kord anomalileri, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar, bazı enfeksiyon hastalıklarında da görülür. Hastalığın ayırıcı tanısını yapmak için detaylı bir anamnezi takiben fizik muayene yapılmalıdır. Gerektiğinde laboratuvar tahlilleri ve görüntüleme yöntemleri ile ayırıcı tanıya gidilmelidir. Ailede benzer klinik tabloya sahip bireylerin olması HSP lehine bir bulgu iken travmatik doğum hikâyesi erken başlangıçlı HSP ile serebral palsy ayrımında son derece faydalıdır. Ön planda ataksi durumunda spinoserebellar ataksi sendromları, fasikülasyonla ve amiyotrofi olduğunda ise Amiyotrofik Lateral Skleroz düşünülmelidir. HSP hastalarında B12 vitamini, E vitamini, kan arjinin, serum ve laktat seviyelerinin normal olması beklenir. Bunlardan B12 ve E vitamini eksiklerinin yerine konulması klinik tabloyu düzeltir. Diğer taraftan kan arjinin, serum ve laktat seviyelerinin yüksek olması bazı metabolik hastalıklar için belirteçtir. DOPA yanıtı distoniye ise klinik şüphenin ardından levo-DOPA veya karbidopaya yanıt beklenir (14, 62). Genellikle HSP hastalarında MRG'de anormal bulguya rastlanamaz. Ancak HSP'nin bazı kompleks tipleri bunun dışında kalır. SPG11 ve SPG4'te ince korpus kallozum ve frontal atrofi görülebilir (14, 64, 65). Enfeksiyöz hastalıkların ayırıcı tanısında ise hikaye ve enfeksiyöz ajana spesifik antikorlar tanıya gitmek için kullanılır. Tablo 2'de HSP ile ayırıcı tanıya giren hastalıkların klinik özellikleri ve bu hastalıkların tanısında kullanılacak testler detaylı bir şekilde belirtilmiştir (14, 62).

Tablo 2: HSP ile ayırıcı tanısı yapılan hastalıkların klinik özellikleri ve bu hastalıkların tanısında kullanılan testler

Kategori	Hastalık	HSP'den ayırıcı klinik özellikler	Tanısal Testler
Yapsal Spinal Kord Anormallikleri	Arnold Chiari Malformasyonu	Ataksi	Posterior fossa MRG
	Servikal veya lumbar spondilozis	Üst ekstremitte tutulumu, radikülopati	Vertebra gafileri ve MRG
	Tetherd kord Sendromu		Konus medullaris MRG
	Diplejik serebral palsi	Sorunlu doğum hikayesi	Beyin MRG
	Spinal kord neoplazileri	Ağrı, duyu kaybı, asimetric tutulum	Spinal kord MRG
	Spinal kord arteriyovenöz malformasyonları	Ani progresyon	Spinal arteriyografisi ve MRG
	Vertebralarda granülom	Sırt ağrısı, subakut klinik seyir	Vertebra gafileri ve MRG
Nörodejeneratif Hastalıklar	Multiple Skleroz	Alevlenme, remisyon, ataksi, optik nörit, Lhermitte's işareti	Beyin MRG, BOS incelemesi VEP
	Amiyotrofik Lateral Skleroz	Fasikülasyonlar, amiyotrofi	EMG, Sinir ileti hızı

	Spinocerebellar Ataksiler	Belirgin ataksi	Genetik Analiz
Metabolik Hastalıklar	Adrenolökodistrofi,	Çocukluk çağı başlangıçlı formu; progresif kognitif bozukluk ve periferik nöropatinin eşlik ettiği kortikospinal yolak bulguları. Daha geç başlangıçlı formunda; kognisyon normal, periferik nöropati değişken	Beyin MRG, Uzun zincirli yağ asitleri
	Adrenomyeloneuropati		
	Metakromatik Lökodistrofi	Otozomal resesiftir. Psikomotor gerilik ve periferik nöropati	Beyin MRG, arilsülfataz
	Krabbe Lökodistrofi	Otozomal resesif, periferik nöropati yapan bir hastalıktır. Çocukluk çağında başlar, daha geç başlangıcı olmaz	Beyin MRG, galaktoserebrozidaz
	Subakut kombine dejenerasyon	Periferik nöropati, ön planda arka kolon tutulumu	Serum B12 vitamini konsantrasyonu
	Mitokondriyal ensefalomyopati	Kısa boy, retinitis pigmentosa ve çoklu stroke benzeri atak	Beyin MRG, serum laktat ve pirüvat incelemesi
	Abetalipoproteinemi	Periferik nöropati	Lipoprotein elektroforezi
	Vitamin E eksikliği	Periferik nöropati	Serum E vitamini konsantrasyonu
	Arjinaz eksikliği		Plazma arjinini, aminoasidüri
Nörolatirizm		<i>Lathyrus sativus</i> hikâyesi	

**Enfeksiyöz
Hastalıklar**

Tersiyer Sfiliz

Şüpheli cinsel ilişki hikâyesi

VDRL, FTA

Tropikal spastik paraparezi
(HTLV-1 enfeksiyonu)

Subakut klinik seyir

HTLV-1 antikorları

AIDS

Subakut klinik seyir, Şüpheli cinsel ilişki hikâyesi

HIV antikorları, CD4
sayısı

Diğer

DOPA yanıtı distoni

Diüurnal ritim, DOPA'ya yanıt

Düşük doz Levo-DOPA
ya da Karbidopaya yanıt

2.6 Laboratuvar ve Görüntüleme Yöntemleri

Saf HSP'lerde EMG ve sinir ileti hızları genellikle normaldir. SEP (somatosensoryel uyarılmış potansiyel) genellikle düşük veya yoktur. Santral motor iletim zamanı kaydedilememiş veya uzamış alt ekstremitte, üst ekstremitte normaldir. Beyin omurilik sıvısı (BOS) çalışmaları ve MR görüntülemeleri genellikle normaldir.

2.7 Kalıtım özelliklerine göre Herediter Spastik Pareziler

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man®) veritabanında şu ana kadar bildirilmiş 76 farklı HSP fenotipi (1-76) bulunmaktadır. HSP'nin alt tiplerinin klinik detayları Tablo 3'te verilmiştir. Alt tiplerden beş tanesi X'e bağlı (1, 2, 16, 22 ve 34), iki tanesi hem otozomal dominant hem de otozomal resesif (3A ve 72), on dokuz tanesi otozomal dominant (4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 17, 19, 29, 31, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42 ve 73) kalan elli tanesi ise otozomal resesif kalıtım özelliğine sahiptir. Klinik olarak tanımlanmış olan bu tiplerden yirmibir tanesinin (9, 14, 16, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 43, 45 ve 46) genetik etiyojisi tanımlanamamıştır.

Avrupa toplumunda otozomal dominant kalıtılan HSP'lerden tip 4, 3A ve 31 en sık görülen tipleri olup mutasyon saptanabilen bireylerin %50'sini oluşturmaktadır.

2.7.1 SPG4

SPG4, otozomal dominant HSP'nin en sık görülen tipidir (66). SPG4 otozomal dominant saf tip HSP'lerin % 15-40'ını oluşturmaktadır. Avrupa ülkelerinde, ABD, Kanada, Japonya ve Çin'de en sık görülen otozomal dominant kalıtılan HSP tipidir (66). SPG4'ün kardinal klinik özellikleri; sinsi ve ilerleyici bilateral alt ekstremitte spastisitesi, derin tendon reflekslerinde artma ve Babinski ve klonus gibi patolojik reflekslerin ortaya çıkmasıdır. SPAST ile ilişkili HSP'de üst ekstremitte reflekslerinde de artış gözlenir ancak tetrapleji ise son derece nadir bir bulgudur. Etkilenen bireylerin % 50'sinden fazlasında proksimal kas güçsüzlüğü, 1/3'ünde ise sfinkter ile ilişkili bozukluklar olduğu bildirilmiştir.

SPG4'te pes kavus ve dizartride gözlenebilir. Güç algılanan kognitif bozukluk bildirilmiş (67-69), ancak bu durumun hastalıkla ilişkisi bilinmemektedir. Nöbet, zeka geriliği ve ataksi nadir olarak eşlik eder. Nöropati az sayıda etkilenmiş bireyde, posterior fossa anomalileri iki ailede bildirilmiş olmasına rağmen her iki klinik durum ile ilişkilendirilmiş patojenik SPAST varyatı tespit edilememiştir (70, 71). Az sayıda bireyde ciddi demans görülen hastalarının birinin nöropatolojik incelemesinde hipokampüste nöronal kayıp ve immün reaktif

tau nörofibriler yumaklar, substantia nigra'da Lewy cisimcikleri tespit edilmiştir (72). Bununla birlikte, ortaya çıkacak hastalıkta kortikal ve medüller lezyonların dağılımının genel bir tablosu için SPAST ile ilişkili HSP'li kişilerde az sayıda nöropatolojik çalışma mevcuttur (73).

SPAST geni, 2p22'de lokalize olur ve 17 ekzondan oluşur. SPAST geni 90 kD büyüklüğünde 616 aminoasitten oluşan spastin proteini kodlanır. Spastin, daha uzun mikrotübülleri daha kısa olanlara parçalayan ve böylece mikrotübüllerin sayısını ve hareketliliğini ve bunların dinamik artı uçlarının dağılımını düzenleyen bir mikrotübül kesen ATPaz'dır. Mikrotübül kırılması mikrotübül dizisinin uzunluğu, sayısı ve mobilitesi gibi çeşitli özelliklerinin düzenlemesi için önemlidir. Ayrıca spastin, atlastin1 ve REEP1'in koordine etkileşimi endoplazmik retikulum tübüllerinin hidrofobik kısımlarının sıkıştırılarak şekillendirilmesi ve tübüler endoplazmik retikulum ağını oluşturan endoplazmik retikulum-mikrotübül etkileşimleri için önemlidir (153). Mutant spastin ile mikrotübüllerin etkileşimi mitokondri ve peroksizom gibi organeller hücre içerisinde anormal dağılımı ile ilişkilendirilmiştir. Bundan dolayı akson distaline mikrotübül hücre iskeletine bağlı olarak organel transportunun bozulmasının SPG4'ün primer hastalık mekanizması olabileceği öne sürülmüştür (74).

2.7.2 SPG3A

SPG3A klinik bulgular açısından diğer otozomal tip HSP'lerden daha homojendir. Şikâyetlerin başlama yaşı yaklaşık 4'tür. Bildirilen bireylerin % 80'inden fazlasında yaşamın ilk on yılından önce spastik yürüme görülmektedir(75). 10 yaştan önce başlayan erken başlangıçlı otozomal dominant HSP'lerin %30-50'si SPG3A'dan meydana gelmektedir. Tüm otozomal dominant olguları göz önüne alındığında ise %10-15'inde patojenik ATL1 mutasyonu tespit edilmektedir. Büyük bir kohortta yapılan bir çalışmada SPAST'ta patojenik varyant tespit edilemeyen olguların %40'ında ATL1'de patojenik mutasyon tespit edilmiştir. Günümüze kadar bildirilen olguların tamamında ATL1'in monoallel kalıtıldığı bildirilmesine rağmen, Khan ve arkadaşları ATL1'in biallelik kalıtımına örnek göstermiştir. Heterozigot aday mutasyona yedi bireyden altısında HSP düşündürecek bir klinik bulunmamaktaydı. Kalan bir bireyde ise yalnızca subklinik azalmış vibrasyon hissi mevcuttu. HSP kliniğine sahip altı bireyde ise homozigot aday c.353G>A mutasyonu mevcuttu (81).

SPG3A ve Herediter sensöryel nöropati, tip ID (HSN ID) birbiri ile allelik olan iki farklı hastalıktır. HSN ID otozomal dominant geçişli, aksonal tip herediter motor ve sensöryel nöropati ile karakterize olup, ağırlı yaralanmalara neden olabilecek derecede ciddi ve belirgin

ağrı duyusu kusuru ile ayırıcı tanısı yapılmaktadır. Herediter sensöryel nöropati olan bir ailede ATL1’de missense mutasyon tespit edilmiştir. Saf otonomik bozukluk ile giden klinik tablosu olan bir bireyde ATL1’in 2. Ekzonunun splicing bölgesinde aday bir mutasyon bildirilmiştir. Bu hastanın allelik bir durum mu yoksa SPG3A’nın atipik bir prezentasyonu olup olmadığı aydınlatılmayı beklemektedir (75).

ATL1 geni, 14q22’de lokalize ve 14 ekzondan oluşur. Bu genden atlastin1 adı verilen protein kodlanır ve 552 aminoasitden oluşan bu protein, 69 kD büyüklüğündedir. Atlastin1, tübüler endoplazmik retikulum (ER) ağının oluşumunda ve nöronlarda akson uzamasında rol oynayan dynamin ile ilişkili bir GTPaz’dır. Spastinin N-terminal domaini, atlastinin C-terminal domainine direkt bağlanarak hücre içi yollarda birbirleriyle etkileşerek fonksiyon görürler (146, 147). Rat beyinlerinde atlastin1’in sadece golgi cisimciğinde ve endoplazmik retikulum değil aynı zamanda aksonların büyüme konilerinde de ifade edildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak bu bulgular, atlastin-1’in nöronlarda farklı fonksiyonlara sahip olduğunu ve muhtemelen hem hücre içi zar trafiğinde hem de aksonal büyüme konisinin genişlemesinde rol oynadığını ortaya koymuştur. (148). Dolayısıyla SPG3A’da görülen erken başlangıçlı aksonopatinin aksonların anormal gelişiminden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

2.7.3 SPG31

Otozomal dominant kalıtılan HSP’ler arasında tanımlanan dördüncü alt tip olan SPG 31, başlangıç yaşı ağırlıklı olarak yaşamın ilk dekadıdır. Buna rağmen ekspresyon düşüklüğü ile ilişkili olarak erişkin dönemde tanı alan hastalar da mevcuttur.

SPG31 hemen hemen tamamen saf bir spastik parapleji fenotipiyle ilişkilidir. Üriner alışkanlıkların bozukluğu ve vibrasyon duyusu bozuklukları SPG 4’e benzer sıklıkta görülür. Şimdiye kadar kompleks tablonun tanımladığı tek hastada sadece periferik nöropati görülmüştür. Diğer HSP formlarında görülen periferik sinir tutulumu SPG31’de daha nadir görülür. Bununla birlikte, kesin sonuçlara ulaşmak için daha kapsamlı elektrofizyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir (76).

Tablo 3: OMIM'de tanımlanmış tüm HSP alt tiplerine ait klinik özelliklerin özeti

Tip	Kalıtım Paterni	Loküs	Gen	Başlangıç Zamanı	SPG Tipi	Ek bulgular	Referanslar
SPG1	X	Xq28	L1CAM	perinatal	Kompleks	Mental retardasyon, hidrosefali, afazi, el başparmağı adduksiyon kontraktürü (MASA sendromu) ince korpus kallozum	(23)
SPG2	X	Xq21	PLP1	Geç	Saf veya Kompleks	Optik atrofi, ataksi, nistagmus, beyaz cevher lezyonları, periferik nöropati, afazi, demans	(77, 78)
SPG3A	OD/OR	14q11–q21	ATL1	4 yaş civarı	Saf veya Kompleks	Silver sendromu	(24)
SPG4	OD	2p22	SPAST	1-63 yaş, bimodal dağılım 10 ve 30. yaşlarda pik	Saf veya Kompleks	Demans, epilepsi, periferik nöropati, tremor, ataksi, üst ekstremitte tutulumu, çocuk düşürme (Strumpell–Lorrain	(24)

						familial spazmodik parapleji)	
SPG5A	OR	8q12–q13	CYP7B1	4-47 yaş	Saf veya Kompleks	Beyaz cevher lezyonları	(24)
SPG6	OD	15q11.1	NIPA1	13-19 yaş	Saf veya Kompleks	Periferik nöropati, spinal kord atrofi, epilepsi, dizartri, distoni, üst ekstremitte tutulumu	(24)
SPG7	OR	16q24.3	SPG7	11-72 yaş	Saf veya Kompleks	Optik veya serebellar atrofi, anormal mitokondri, disartri, disfaji, periferik nöropati, ince korpus kallozum	(24)
SPG8	OD	8q23–q24	KIAA0196	18-59 yaş	Saf	-	(79, 80)
SPG9	OD	10q23.3–24.1	ALDH18A1	Çocukluktan ergenliğe geçiş dönemi	Kompleks	Katarakt, gastroözofageal reflü, motor nöropati,	(81)
SPG10	OD	12q13.3	KIF5A	İnfanıl dönem veya 35 yaş civarı	Saf veya Kompleks	Katarakt, Gastroözofageal Reflü, polinöropati	(24)
SPG11	OR	15q13–q15	KIAA1840	İnfanıl dönem veya çocukluktan ergenliğe geçiş dönemi	Saf veya Kompleks	Mental retardasyon, sensöriyel nöropati, ince korpus kallozum, disartri,	(24)

						nistagmus, üst ekstremitede güçsüzlük, ataksi, parkinsonizm, makülopati, beyaz cevher lezyonları, ALS-5 ve Kjellin sendromlarına allelilik	
SPG12	OD	19q13	RTN2	Erken	Saf	-	(30, 82)
SPG13	OD	2q24-q34	HSPD1	1 yaş-6. dekad	Saf veya Kompleks	Distoni	(83, 84)
SPG14	OR	3q27-q28	Bilinmiyor	Geç	Saf veya Kompleks	Mental retardasyon, motor nöropati	(85)
SPG15	OR	14q22-q24	ZFYVE26	1-2. dekad	Kompleks	Makülopati, polinöropati, disartri, mental retardasyon, pigmental retinopati, ince korpus kallozum, beyaz cevher lezyonları, Kjellin sendromuna allelik	(86-88)

SPG16	X	Xq11.2	Bilinmiyor	3-7 yaş	Saf veya Kompleks	Afazi, bozuk görme, mental retardasyon, inkontinens	(89, 90)
SPG17	OD	11q12–q14	BSCL2	Çocukluktan ergenliğe geçiş dönemi	Kompleks	Silver sendromu, CMT-2'ye allelik	(24)
SPG18	OR	8p12–8q11.22	ERLIN2	Çocukluk dönemi	Kompleks	Zihinsel gerilik, epilepsi, konjenital kalça çıkığı	(32)
SPG19	OD	9q33–q34	Bilinmiyor	Geç	Saf	-	(91)
SPG20	OR	13q12.3	SPG20	1-2 yaş	Kompleks	Troyer sendromu (disartri, distal kas atrofisi)	(24)
SPG21	OR	15q22.31	ACP33	Çocukluktan başlayarak her dönem ayrı semptom	Saf veya Kompleks	Demans, serebellar tutulum, ekstrapiramidal bulgular, ince korpus kallozum, beyaz cevher lezyonları (MAST sendromu)	(34, 92)
SPG22	X	Xq21	SLC16A2	Çocukluk dönemi	Saf veya Kompleks	Allan Herndon Dudley sendromu	(93, 94)
SPG23	OR	1q24–q32	Bilinmiyor	Çocukluk dönemi	Kompleks	Pigmenter cilt lezyonları (Lison sendromu)	(95)

SPG24	OR	13q14	Bilinmiyor	Çocukluk dönemi	Kompleks	Spastik disartri ile değişken derecede ilişki, psodobulbar işaretler	(96)
SPG25	OR	6q23–q24	Bilinmiyor	Çocukluk dönemi	Kompleks	Disk herniasyonu	(97)
SPG26	OR	12p11.1–q14	Bilinmiyor	Çocukluk dönemi	Kompleks	Disartri, üst ve alt ekstremitede distal amiyotrofi, zeka geriliği	(98)
SPG27	OR	10q22.1–q24	Bilinmiyor	2-7 yaş veya ergenlik	Kompleks	Disartri, polinöropati, mental retardasyon	(99)
SPG28	OR	14q21.3– q22.3	Bilinmiyor	Çocukluk dönemi	Saf	-	(100)
SPG29	OD	1p31.1–21.1	Bilinmiyor	15 yaş civarı	Kompleks	İşitme kaybı, hiatus hernisine bağlı tekrarlayan öksürük	(101)
SPG30	OR	2q37	KIF1A	Ergenlik dönemi	Saf veya Kompleks	Hafif serebellar bulgular, sensöriyel nöropati, HSAN ile allelik	(35, 102)
SPG31	OD	9p21	REEP1	1. dekad	Saf veya Kompleks	Aksonal nöropati, Silver- like sendrom, serebellar ataksi, tremori demans	(24)

SPG32	OR	14q12–q21	Bilinmiyor	6-7 yaş	Kompleks	Mental retardasyon, beyin sapı seviyesinde birleşme defekti, serebellar atrofi	(103)
SPG33	OD	10q24.2	ZFYVE27	50 yaş civarı	Kompleks	Ayak deformitesi	(36)
SPG34	X	Xq25–27	Bilinmiyor	12-25 yaş	Saf	-	(104)
SPG35	OR	16q21–q23	FA2H	6-11 yaş	Saf veya Kompleks	Kognitif gerilik, nöbet, beyaz cevher lezyonları, NBIA ile allelik	(105, 106)
SPG36	OD	12q23–24	Bilinmiyor	14-28 yaş	Kompleks	Polinöropati	(106)
SPG37	OD	8p21.1–q13.3	Bilinmiyor	8-60 yaş	Saf	-	(107)
SPG38	OD	4p16–p15	Bilinmiyor	9-35 yaş	Kompleks	Silver sendromu	(108)
SPG39	OR	19p13.2	PNPLA6	Çocukluk dönemi	Kompleks	Aksonal nöropati, spinal kord atrofisi	(109)
SPG40	OD	Bilinmiyor	Bilinmiyor	35 yaştan sonra	Saf veya Kompleks	Üst ekstremitede hiperrefleksi, hafıza yetersizliği	(110)
SPG41	OD	11p14.1– p11.2	Bilinmiyor	ortalama 16 yaş	Saf	El kaslarında hafif güçsüzlük	(111)
SPG42	OD	3q24–q26	SLC33A1	4-42 yaş	Saf	-	(112)

SPG43	OR	19p13.11–q12	Bilinmiyor	4-42 yaş	Kompleks	Distal el kaslarında belirgin atrofi (Silver sendromu), NBIA ile allelik	(113, 114)
SPG44	OR	1q42.13	GJA12/GJC2	Geç	Kompleks	Beyaz cevher lezyonları, hipomyelinizasyon, Pelizaeus–Merzbacher hastalığı ile allelik	(114)
SPG45	OR	10q24.3–q25.1	Bilinmiyor	Erken	Kompleks	Mental retardasyon, oküler anomaliler	(115)
SPG46	OR	9p21.2–q21.12	Bilinmiyor	Erken	Kompleks	Mental retardasyon, katarakt, serebellar disfonksiyon, ince korpus kallozum	(116)
SPG47	OR	1p13.2–1p12	AP4B1	Çocukluk dönemi	Kompleks	Mental retardasyon, nöbetler, ince korpus kallozum, periventriküler beyaz cevher lezyonları	(39, 44)
SPG48	OR	7p22.2	KIAA0415	50 yaş civarı	Saf veya Kompleks	Spinal kord hiperintensivitelere	(88)

SPG49	OR	14q32.31	TECPR2	2 yaş civarı	Kompleks	hipotoni, gelişim geriliği, dismorfik yüz, ataksi, gastroözofageal reflü, disartri, dismetri, episodik santral apne	(41)
SPG50	OR	7q22.1	AP4M1	Postnatal	Kompleks	İnfanıl hipotoni, psikomotor gerilik, strabismus, ciddi mental retardasyon, beyaz cevher lezyonları	(42, 117)
SPG51	OR	15q21.2	AP4E1	Postnatal	Kompleks	Mikrosefali, hipotoni, psikomotor gerilik, dismorfik görünüm, beyaz cevher lezyonları	(43, 44)
SPG52	OR	14q12	AP4S1	Postnatal	Kompleks	Mental retardasyon, utangaç karakter, kısa boy, dismorfik yüz görünümü	(44)
SPG53	OR	8p22	VPS37A	8-36 yaş	Kompleks	Üst ekstremiteler tutulumu, kognitif bozukluk, konuşmada gerilik, kifoz,	(45)

						küçük eklemlerde hiperfleksibilite, hipertrikoz	
SPG54	OR	8p11.23	DDHD2	3-18 ay	Kompleks	Mental retardasyon, ince korpus kallozum, beyaz cevher lezyonları	(47, 48)
SPG55	OR	12q24.31	C12ORF65	2-7 yaş	Kompleks	Mental retardasyon, diskromotopsi, optik atrofi	(49, 50)
SPG56	OR	4q25	CYP2U1, DDHD1	1 ay- 5 yaş	Saf veya Kompleks	Mental retardasyon, üst ekstrmitelerde distoni, disartri, ince korpus kallozum, beyaz cevher lezyonları	(51)
SPG57	OR	5q31.2	TFG	2 yaş civarı	Kompleks	Görme problemi	(118)
SPG58	OR	17p13.2	KIF1C	2.5-4 yaş	Kompleks	Mental retardasyon, ekstrapiramidal bulgular, ataksi, klonus, hipodonti, beyaz cevher anomalileri	(12)
SPG59	OR	15q21.2	USP8	20 ay civarı	Saf veya Kompleks	Nistagmus	(12)

SPG60	OR	3p22.2	WDR48	1 yaş civarı	Kompleks	Periferik nöropati, hafif öğrenme güçlüğü	(12)
SPG61	OR	16p12.3	ARL6IP1	14 ay civarı	Kompleks	Terminal falanks kaybı, yaygın motor ve sensöriyel nöropati	(12)
SPG62	OR	10q24.31	ERLIN1	2.5-13 yaş	Saf veya Kompleks	Pes ekinovarus, kifoz, orta düzeyde zeka	(12)
SPG63	OR	1p13.3	AMPD2	14 ay civarı	Saf veya Kompleks	ince korpus kallozum, beyaz cevher lezyonları, kısa boy	(12)
SPG64	OR	10q24.1	ENTPD1	1 yaş	Kompleks	Katarakt, beyaz cevher lezyonları, orta düzey zeka geriliği, agresif kişilik, gecikmiş puberte, mikrosefali	(12)
SPG65	OR	10q24.32-q24.33	NT5C2	Postnatal-18 ay	Kompleks	İnce korpus kallozum, beyaz cevher lezyonları, zeka geriliği, enürezis noktürna, pes ekinovarus, glukom, optik atrofi, strabismus,	(12)

SPG66	OR	5q32	ARSI	1.5 yaş civarı	Kompleks	korpus kallozum ve serebellar hipoplazi, kolposefali, polinöropati, öğrenme güçlüğü	(12)
SPG67	OR	2q33.1	PGAP1	4 ay-4 yaş	Kompleks	korpus kallozum agenezisi, vermis hipoplazisi, orta düzey zeka	(12)
SPG68	OR	11q13.1	FLRT1	2-3 yaş	Kompleks	Periferik nöropati	(12)
SPG69	OR	1q41	RAB3GAP2	6 ay	Kompleks	İşitme kaybı, katarakt,	(12)
SPG70	OR	12q13.3	MARS	6 ay	Kompleks	Skolyoz, nefrotik sendrom	(12)
SPG71	OR	5p13.3	ZFR	1 yaş	Kompleks	ince korpus kallozum	(12)
SPG72	OD-OR	5q31.2	REEP2	Postnatal	Saf	-	(52)
SPG73	OD	19q13.33	CPT1C	19-48 yaş	Saf	-	(53)
SPG74	OR	1q42.13	IBA57	1. dekad	Saf veya Kompleks	Optik atrofi, polinöropati	(54)
SPG75	OR	19q13.12	MAG	1. dekad	Kompleks	Distal bacak atrofisi, orta derecede zekâ geriliği	(12, 55)
SPG76	OR	11q13.1	CAPN1	9-39 yaş	Saf veya Kompleks	Disarti, üst ekstremitelerde hiperrefleksi, ataksi, polinöropati, skolyoz	(56)

2.8 HSP’de Genetik Tanı Test Stratejieri

HSP’de moleküler genetik tanının konulması hastalığın tanısının kesinleştirilmesi ve prenatal genetik tanı ile ileri dönemlerde başlayabilecek klinik tedavi imkanı sunması açısından oldukça önemlidir.

YeniNesil Dizileme gen panelleri, TED ve TGD gibi kapsamlı mutasyon tarama teknikleri, DNA’daki kopya sayısının tespitini sağlayan mikroarray tabanlı tanı platformları bu tip hastalıklarda hastalığın alt tiplerine uygun genetik test panelleri şeklinde alternatifler sunabilmektedir (Şekil 3).

2.8.1 YND Gen Panelleri

Sanger sekanslama yöntemi ile uzun sürede ve daha yüksek maliyet ile HSP kliniğine sebep olabilecek genlerdeki mutasyonları saptamak yerine YND teknolojisi kullanılarak daha önceden bildirilmiş genlerin taranması en popüler yaklaşımdır. Bu yaklaşım sonucunda OR ve OD tipte HSP’lerin %40’ına yüksek okuma sayısı ile tanı konulmuştur (119). Metodun en önemli dezavantajı ise sadece HSP ile ilişkisi bilinen genlerin analiz edilmesi ve diğer ilişkili olduğu belirlenen genlerin güncelleme yapılamadığından incelenememesidir.

2.8.2 Tüm Ekzom Dizileme ve Tüm Genom Dizileme

HSP’nin moleküler genetik etiyolojisini ortaya koymak için bir başka yöntem ise TED’dir. Bu yöntemi kullanmanın hastalığa neden olabilecek yeni genlerin keşfi gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Örneğin; *LYST* mutasyonları Chediak-Higashi sendromuna neden olduğu bilinmesine rağmen bu gendeki bir başka mutasyonun kompleks OR-HSP’ye neden olduğu TED ile saptanmıştır (120). TED’in birçok merkez tarafından yaygın olarak kullanılması sonucunda son yıllarda tespit edilen formlarının neredeyse tamamı TED ile saptanmıştır (12, 55, 56).

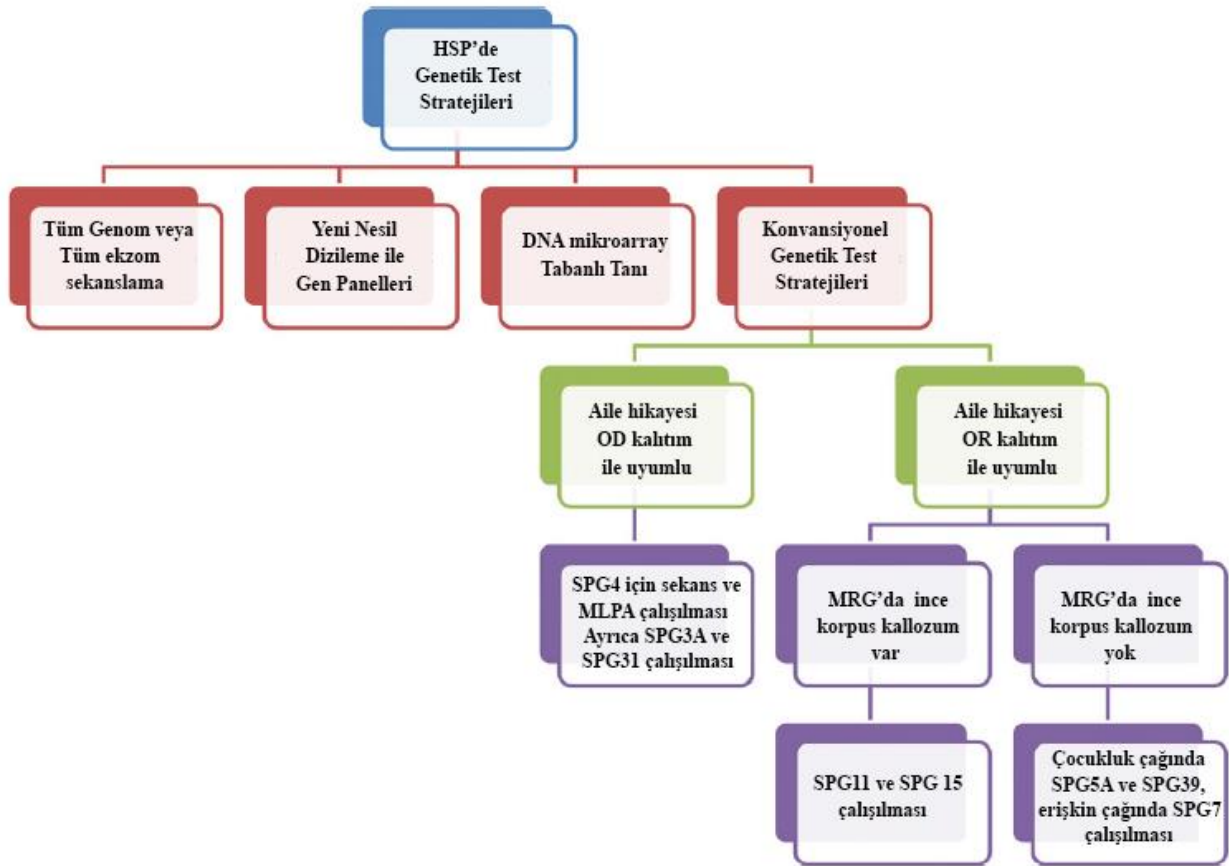
TED ile yeni nesil dizileme tabanlı hedefe yönelik gen panelleri karşılaştırıldığında, TED’in HSP ile ilişkisi bilinen tüm genleri yeterince her zaman örtmemesi en büyük dezavantajdır (119). TGD analizlerinin kodlanmayan bölgedeki varyantları, kopya değişiklik sayısı ve kromozomal değişiklikleri tespit edebilmesi TED karşı en büyük üstünlükleridir. Maliyetinin daha yüksek olması, kodlanmayan bölgedeki varyantların klinik öneminin tespitinin günümüzde hala güç olması ise zayıf yönleridir. Bu sorunların giderilmesi durumunda TGD gelecekte en yaygın kullanılacak yöntem olmaya en kuvvetli aday gibi görünmektedir (121).

2.8.3 DNA Mikroarray Tabanlı Tanı

Son dönemlerde en sık tespit edilen HSP mutasyonlarında kullanılmak üzere yüksek kapasiteli çipler tasarlanmıştır (122). Bu teknik ile sadece 96 adet mutasyonu taranması sebebiyle, HSP hastalarında bir başlangıç mutasyon taraması için kullanılabilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise sadece belirli mutasyonların taranmasıdır. Şu ana kadar herhangi bir etnik grup ya da klinik belirteç ile mutasyon ilişkilendirilemediğinden genlere homojen olarak dağılmış mutasyonların tespiti son derece zordur.

2.8.4 Konvansiyonel Genetik Test Stratejileri

Gelişmiş genetik test imkânları olmadığı takdirde en sık görülen mutasyonların aşamalı olarak taranması en iyi seçenek olacaktır. OD-HSP'lerin %50'sinde SPAST geninde mutasyon saptanması nedeniyle başlangıçta bu gen dizilenebilir. Buna ek olarak, yaklaşık %20 oranda bu gende delesyon ve duplikasyon da görülebileceğinden MLPA ile kopya sayısı değişiklikleri kontrol edilmelidir (122). Bu iki test seçeneğine rağmen tespit edilemezse, diğer sık görülen OD-HSP etiyolojisi sebeplerinden ATL1 ve REEP1 araştırılması önerilmiştir.



Şekil 3: HSP'de farklı genetik tanısal metotlar kullanılarak tanı koyma stratejilerine bir örnek (121)

2.9 Genetik Danışma

Genetik danışma, kalıtsal bir hastalık taşıyan veya taşıma riski bulunan kişilere ve bu kişilerin akrabalarına, hastalığın seyri ve tedavi yöntemleri, tekrarlama riskleri ve çözüm yolları ile beraber hangi dönemlerde hangi testlerin yapılması gerektiği ve bunların sonuçlarıyla ilgili bilgi verilmesidir.

OD-HSP tanısı alan hastaların %90'ının etkilenmiş ebeveyni vardır. Buna rağmen *de novo* patojenik varyantların bu hastalığa sebep olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. OD-HSP'de *de novo* varyant sıklığı bilinmemektedir. Probandın kardeşlerinde hastalığın görülme ihtimali ise ebeveynlerin taşıdığı patojenik varyant olup olmasına bağlıdır. Ebeveynlerde bir tane patojenik varyant olması durumunda hastalığın görülme ihtimali %50'dir. OD-HSP patojenik varyantı taşıyan bir bireyin çocukları %50 ihtimalle hasta olacaktır

Hastalığın derecesi ve başlangıç yaşı açısından değerlendirildiğinde, aynı ailede aynı patojenik varyantları taşıyan bireyler arasında, farklı ailelerde aynı patojenik varyantları taşıyan bireyler arasında ve farklı SPG tipleri arasında son derece değişkenlik göstermektedir.

2.10 HSP ve Sağ Kalım

Spastik parapleji hastalarının etkileri yüksek fenotipik ve genotipik heterojeniteye bağlı olarak değişkendir. Bu yüzden bazı hastaların yaşam süreleri herhangi bir değişiklik olmazken, bazı hastalarda eşlik eden diğer anomaliler neticesinde yaşam süreleri kısalmıştır. Lökoensefalopati, epilepsi ve zihinsel gelişim geriliği durumları daha erken yaşta ölümlere sebep olabilir. Hastaların yürüyüş bozukluğuna bağlı gelişen immobilizasyon durumu ise kazanılmış sekonder kardiyovasküler sorunlara yol açmaktadır. Özellikle kardiyovasküler emboli, serebrovasküler olay, myokard enfarktüsü veya pulmoner tromboembolizme neden olur. Ayrıca immobilizasyon, sistemik ve pulmoner enfeksiyonlara eğilimi arttırmaktadır. Sağlık bakımı personelinin ve hastaların kişisel tedavi yönetimleri sayesinde spastik parapleji hastalarının büyük kısmında yavaş ilerleme gözlenmektedir. Ancak SPG6 ve SPG12 gibi bazı tiplerde bakım ve destek programlarına rağmen beklenen yavaşlama sağlanamamıştır. (24).

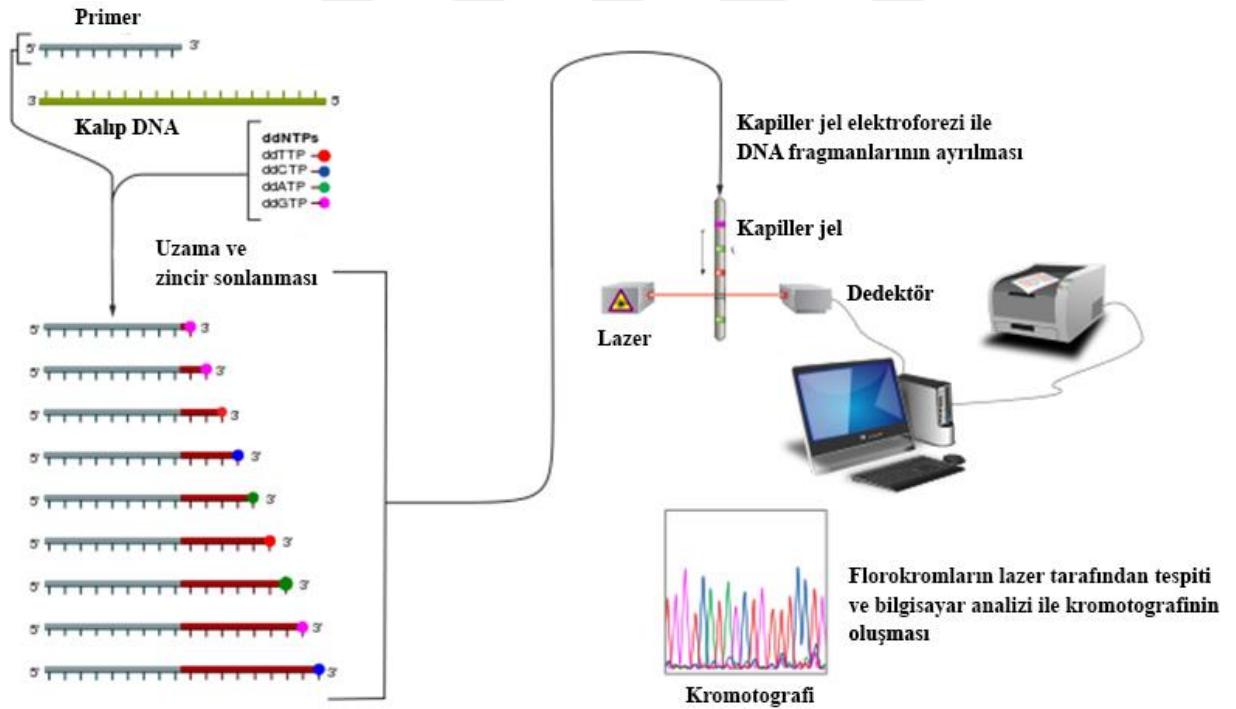
2.11 SANGER DİZİLEME (SD)

1974 yılında, Sanger ve ark. tarafından, DNA replikasyon temel esaslarını dayanarak Sanger Dideoksi dizileme yöntemi geliştirilmiştir. Bu işlemde DNA polimerazın, dNTP'lerin (deoksiniükleotid trifosfat) ve 3'-hidroksil (OH⁻) grubu olmayan ddNTP'lerin (dideoksiniükleotid trifosfat) nükleotid analoglarını zincire eklenerek fosfodiester bağı oluşturabilme özelliğinden yararlanır. ddNTP'lerin yapıya eklenmesiyle zincir uzaması gerçekleşmez ve böylece fosfodiester bağ oluşumu engellenmiş olur. Yapıya yeni nükleotit katılamadığından zincir uzaması sonlanır.

Sanger dideoksi, dizileme için kalıp DNA, dizi primeri, DNA polimeraz, nükleotitler (dNTP), dideoksiniükleotitler (ddNTP) ve reaksiyon tamponu gereklidir. Dört farklı reaksiyon hazırlanır ve her birinde floresan ile işaretlenmiş dideoksiniükleotitlerden (ddA, ddG, ddC ve ddT) yalnız birisi vardır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) temel aşamalarının her biri ayrı ısı bloklarında gerçekleştirilir. Zincirin uzama evresinde DNA polimeraz, deoksiniükleotidi veya dideoksiniükleotidi zincire ekleyerek senteze devam eder. Deoksiniükleotidin veya dideoksiniükleotidin zincire eklenmesi tamamen rölatif konsantrasyonlarına bağlıdır. Bir deoksiniükleotit (A, C, G, T) zincire eklendiği zaman zincir uzaması devam edebilir. Buna rağmen dideoksiniükleotidin (ddA, ddC, ddG, or ddT) eklendiğinde ise uzama durur. Sanger dideoksi dizilemede, 3' ucun dideoksiniükleotid eklenmesi nedeniyle ile sentezi durdurulmuş

farklı uzunluktaki DNA fragmanları oluşacaktır. Bu ürünler sonra elektroforez ile birbirinden ayrılır. Elektrik alan uygulanarak negatif yüklü DNA fragmanları pozitif elektroda doğru hareket ederler. Bir DNA fragmanının hızı mevcut moleküler ağırlığı ile ters orantılıdır. Bu süreç ile birlikte birbirinden bir baz farklı olan DNA fragmanları dahi ayrılabilir (123, 124) (Şekil4). SD metodu ile yaklaşık 6-1000 baz arası uzunlukta güvenli okuma yapılabilir (125-127)

SD yöntemi özellikle Mendeliyan geçişli hastalıkların tanısında, nokta mutasyonlarını (transizyon-transversiyon), 1000 bazdan küçük delesyon/duplikasyonlar ile insersiyon ve inversiyon gibi az sayıdaki nükleotidi içeren değişimleri tespit edebilirken, çok sayıda nükleotid içeren (1000 bazdan büyük) delesyon/duplikasyon gibi değişimleri; öploid veya anöploid gibi sayısal kromozomal anomalilerini; translokasyon, insersiyon, inversiyon gibi yapısal kromozomal anomalilerini ve ekspresyon farklılıklarını tespit etmekte kullanılmamaktadır. Ayrıca düşük orandaki mozaisizmi saptamada yetersiz kalmakta ve metilasyon çalışmalarında net sonuçlar verememektedir (125-127)



Şekil 4: PZR ve kapiller jel elektroforezde yürütülen DNA fragmanlarının sanger sekanslama yöntemi ile kromotografin ortaya çıkma süreci (128)

2.12 YENİ NESİL DİZİLEME

2004 yılında National Human Genom Research Institute (NHGRI) tüm genom dizileme maliyetinin 10 yıl içinde 1000 Amerikan dolarının altına inecek bir araştırma programının çağrısına çıktığını duyurdu (129, 130). Bu gelişme, birinci nesil teknoloji olarak adlandırılan Sanger sekans yöntemine karşı yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesine ve ticari bir ürün haline gelmesine imkân tanımıştır. YND teknolojileri ile birlikte üç yeni değişiklik olmuştur. Birincisi, DNA fragmanlarının spesifik klonlanması gerekirken, YND ile hücreden bağımsız bir sistemde kütüphane hazırlanmaktadır. İkinci yenilik ile binlerce hatta yüz milyonlarca dizileme reaksiyonu paralel olarak gerçekleştirilebilmektedir. Sonuncusu ise dizileme neticesinin jel elektroforezde değerlendirilmesine gerek duyulmadan hızlı bir şekilde gözlemlenebilmektedir. Bu teknoloji SD'ye kıyasla daha kısa fragman okuma esasına dayanmaktadır. Bu durum eldeki fragmanları doğru şekilde dizilim oluşturarak referans genoma entegre edecek yeni programlara ve algoritmalara ihtiyaç doğurmuştur. İlk ticari YND teknolojisi 2005 yılında 454 Life Sciences tarafından pirosekanslama metodu olarak piyasaya sürülmüştür. 454 Genome Sequencer adlı bu cihaz 110 baz çifti uzunluğunda yaklaşık 200.000 okuma yapıyordu. Bir yıl sonra Solexa/Illumina, 2007 yılında ise Applied Biosystems tarafından Sequencing in Oligo Ligation Detection (SOLiD) piyasa sürülmüştür (131)

Bunu takip eden dönemde ise Qiagen senteze dayalı sekanslama, Polony sekanslama ve tek molekül tespit sistemi (Helicos BioSciences) gibi farklı dizileme platformları piyasaya sürülmüştür. Helicos BioSciences sisteminde DNA dizilimeden önce herhangi bir amplifikasyon olmaması nedeniyle bu teknoloji YND dizileme ile üçüncü jenerasyon dizileme arasında bir form olarak kabul edilmiştir. 2010 yılında Pacific Biosciences (PacBio) tarafından ortaya çıkarılan üçüncü jenerasyon dizilemede ise tek molekül tespit sistemine ek olarak bu işlemin gerçek zamanlı yapılıyor olmasıdır. Bu teknoloji ile birkaç kilobaz uzunluğunda okumalar yapılarak *de novo* genom düzenlemeleri tespit edilebilmektedir (131).

TED son yıllarda birçok hastalığın moleküler sebebin aydınlatılmasında ve poligenik hastalıkların subtiplerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. 2009 yılında, Choi ve ark. tarafından hipokalemi ön planda olan Bartter Sendromu (MIM241200) ön tanısı ile takip edilen hastaya TED analizi yapılmış ve Konjenital Klor Kaybettiren Diyare (CLD;MIM214700) ile ilişkilendirilmiş *SLC26A3* geninde mutasyon bulunmuştur. Geriye dönük hastanın klinik değerlendirmesi yapıldığında klinik tablonun konjenital klor kaybettiren diyareye daha çok benzediği bildirilmiştir (139). Diğer bir çalışmada Leber'in konjenital amorozisi ile takip edilen bir hastada TED ile *PEX1* genindeki mutasyonun peroksizomal biyogenez bozukluğu tespit

edilmiştir. Genlerinin tümü tanımlanmış olan multigenik hastalıklarda YND metodu ile tanımlanmış olan bu genlerin değerlendirilmesi son yıllarda sıklıkla tercih edilen yaklaşımlardan biridir.

2.12.1 YND Platformların Teknik Özellikleri

Örneklerin hazırlanması

1. **454, Ion Torrent, SOLiD:** Kütüphanedeki DNA fragmanları her bir tane başına bir fragman olacak şekilde yakalanır. Su içerisinde çözünmüş olan emülsiyon PZR reaktifleri ve her bir fragman bağlı tane ile amplifikasyon gerçekleşir. Ardından, DNA denatüre edilir, fiber optik slayta (454 ve Ion Torrent) veya cam slayta (SOLiD) aktarılır.
2. **Illumina/Solexa:** Kütüphane denatüre edilir ve adaptör ile kaplanmış oligonükleotidlere sahip solid yüzeye bağlanır. Her DNA fragmanının serbest ucu eğilir ve tamamlayıcı adaptör dizisi ile hibridize olarak komplementer zincirin sentezi gerçekleşir. Tekrarlayan solid faz amplifikasyon döngülerini takip eden denatürasyon ile 1000 kopyalık tek zincirli DNA kümeleri elde edilir.

Dizileme Teknolojileri

1. **Pirosekanslama (454):** Kuyucuklara dizi primeri ve enzimler yüklenir. Bir oligonükleotid DNA'yı dizilemek için kalıp DNA zincirine bağlandığında DNA polimeraz kalıp DNA'dan yeni zincir oluşturmaya başlar. Nükleotidin eklenmesi esnasında pirofosfat serbest kalarak ışın yayılmasına neden olur. Bu ışına monitörden gerçek zamanlı olarak görüntülenir.
2. **Semikondüktör dizileme (Ion Torrent):** Pirosekanslama yöntemine pirofosfat salınımı dışında son derece benzerdir. Bu platformda nükleotid eklenmesi ile proton salınımı olur, bu durum iyon sensörleri tarafından tespit edilir. İçerisinde herhangi bir görüntüleme teknolojisi barındırmamaktadır.
3. **Geri dönüşümlü sonlandırıcı nükleotit dizileme (Illumina/Solexa):** Sentez reaktifleri, primerler, DNA polimeraz, dört farklı işaretli geri dönüşümlü sonlandırıcı nükleotitlerdir. Bir baz eklendiğinde bu baz ile ilişkili renge ait ışınlar çıkar. 3' ucundaki baz çıkartılıp tarif edilen reaksiyon tekrarlanarak dizileme işlemi gerçekleştirilir.
4. **Ligasyon ile sekanslama (SOLiD):** Sekans primeri 5' ucunda oligonükleotid ligasyona uygun ve komşu dizi ile hibridize olabilecek adaptör içerir. Ortama iki bazlık dizisi

bilinen floresan bağı 8 bazlık bir dizi verilir. Bu dizi primere eklenerek karşı zincir ile hibridize olur. Bu esnada hem iki bazlık dizi için spesifik floresan ışıma yapılır hem de kalan altı bazın üçü kesilerek zincirden uzaklaştırılır. Sonuç olarak öğrenilmek istenen dizinin tamamlayıcı dizisi iki bazı bilinen diğer üç bazı bilinmeyen dizi şeklinde ortaya çıkar. Eş zamanlı olarak bu dizi ile hibridize olan ve komşu bazlar ile hibridize olan primerler sayesinde diğer bilinmeyen üçlü dizilerde tespit edilir (131).

Teknolojideki bu ilerleme, YND'nin klinikte tanının doğrulanması için kullanılabilme imkânı sunmuştur. Bu cihazların rutin analizlerde kullanılabilmesi daha ucuz ve verilerin daha kolay analiz edilmesine bağlıdır. 2009 yılında birbirini izleyerek Roche 10 saatte 400 nükleotid uzunluğunda okuma yapan ve 35 Mb data üreten GS Junior'u, Illumina ise 27 saatte 150 nükleotid uzunluğunda okuma yapan ve 1.5 Bb data üreten MiSeq'i piyasaya sürmüştür. Bunların dışında en hızlı cihaz Ion Torrent'tir. PacBio'nun ise benzer şekilde hızlı olması, ancak maliyetinin diğerlerine kıyasla yüksek olması nedeniyle küçük laboratuvarlar ve klinikte kullanılması uygun değildir (131).

2.12.2 Biyoenformatik Data Analizi

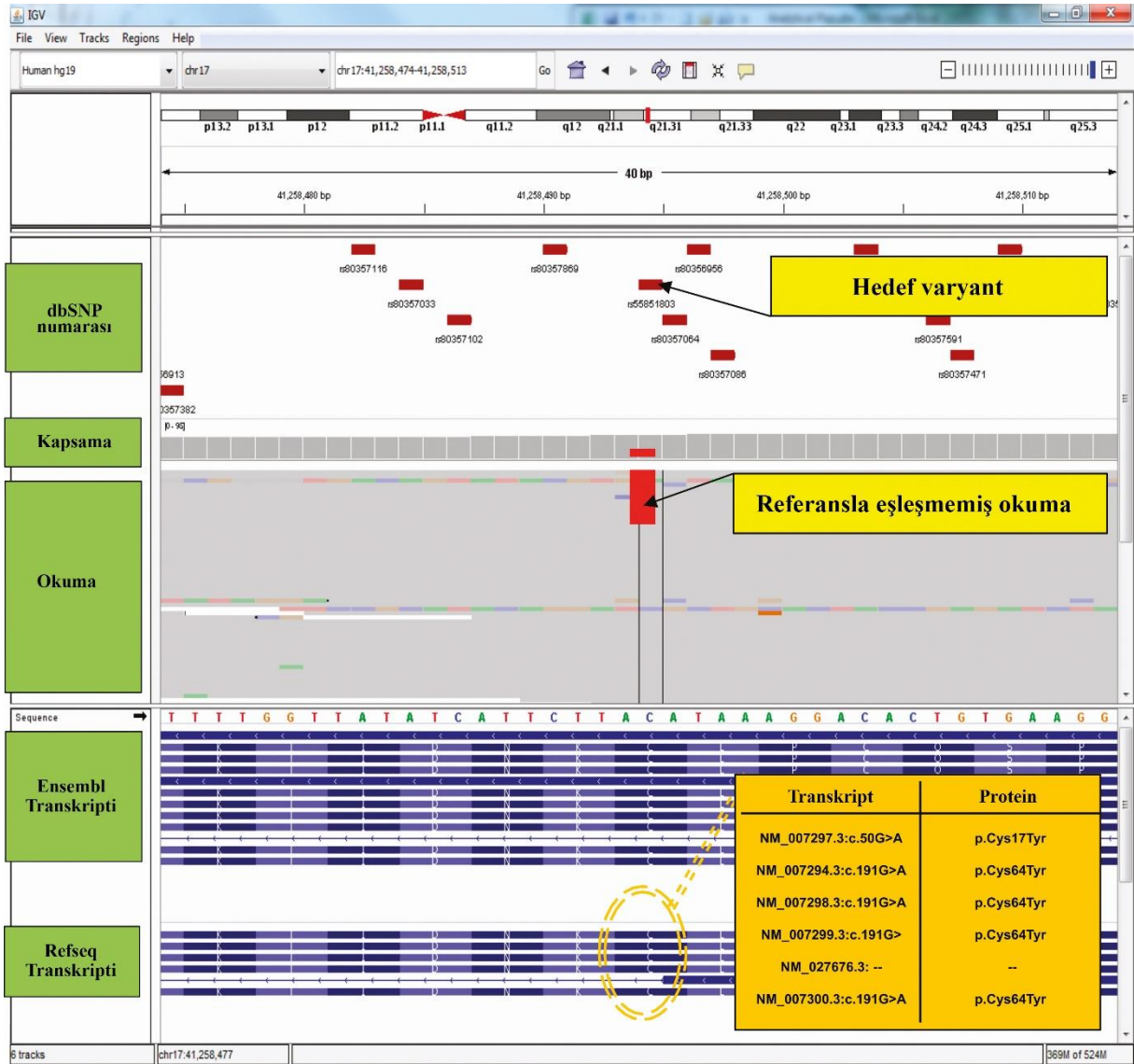
TED cihazları laboratuvar aşamaları sonunda genetik analize hazır büyük bir ham veri üretmektedir. TED'de en önemli aşamalardan bir tanesi ham verilerin düzenli hale getirilerek analiz edilecek hale dönüştürülmesidir (132). Bu süreçte birbirini tamamlayan farklı programlar kullanılmaktadır (Tablo4).

Tablo 4: Biyoinformatik analizlerde sık kullanılan programlar (133)'den alınmıştır

Program	Bağlantı	Ücretsiz Erişim
Hizalama		
BWA	http://bio-bwa.sourceforge.net/	Evet
Novoalign	http://www.novocraft.com	Hayır
Bowtie 2	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2	Evet
Germline adlandırma		
GATK (UnifiedGenotyper)	https://www.broadinstitute.org/gatk/download	Hayır
SAMtools	http://samtools.sourceforge.net/	Evet
Varscan2	http://varscan.sourceforge.net/	Evet
SNVMix	http://compbio.bccrc.ca/software/snvmix/	Evet
Somatik adlandırma		
SomaticSniper	http://gmt.genome.wustl.edu/somatic-sniper	Evet
JoinSNVMix2	https://code.google.com/p/joint-snv-mix/	Evet
Mutect	https://github.com/broadinstitute/mutect	Hayır
Kopya sayısı değişikliği adlandırmaları		
ExomeCNV	http://sourceforge.net/projects/exome-cnv/	Evet
CONTRA	http://sourceforge.net/projects/contra-cnv/	Evet
CNVnator	http://sv.gersteinlab.org/cnvnator/	Hayır
RDXplorer	http://sourceforge.net/projects/rdxplorer/	Evet
Yapısal varyant aracı		
Delly	https://github.com/tobiasrausch/delly	Evet
Breakdancer	http://breakdancer.sourceforge.net/	Evet
PINDEL	http://gmt.genome.wustl.edu/pindel/current/	Evet
CREST	http://www.stjude.com/research/site/lab/zhang	Hayır

Farklı programlar farklı ham verileri kullansa bile sonuç olarak ilk aşamada dizileme neticesinde elde edilen sinyaller kullanılarak çok sayıda okuma yapılmış DNA fragmanındaki bazlar tespit edilmektedir. 15-200 nükleotidlik dizisi tespit edilen okuma dizileri bundan sonra hizalama işlemine tabi tutulmaktadır. Hizalama işlemi, kısa okuma dizilerinin referans bir genom üzerinde haritalanma işlemidir. Böylece, elde edilen baz dizilerinin insan referans

genomu üzerinden muhtemel pozisyonu bulunacaktır. Yazılım, referans genomu içinde okunan her olası başlangıç noktası değerlendirmelidir. Okuma uzunluklarının farklı olması ve tespit edilen baz kalitesinin birbirinden farklı olması bu süreci daha komplike hale getirmektedir. Sonuçta bu evre yoğun ve zaman alan bir periyottur (133). Diğer taraftan bu aşamada ortaya çıkacak bir sorun nedeniyle analizin bundan sonraki evreleri sağlıklı bir şekilde tamamlanamayacaktır. TED hizalanmış okumaları “Sequence Alignment/Map” (SAM) ve “Binary Alignment Map” (BAM) dosya formatında depolanmaktadır (134). Sekanslama ve hizalama için hem ticari hem de ücretsiz ulaşım sağlanabilen programlar mevcuttur. Bu programların doğruluk ve çalışma hızları değişmektedir. Bazı algoritmalar hizalama yaparken referans genom ile arasında boşluklar oluşturmalarına rağmen, programların birçoğu daha hızlı bir şekilde ve referans genom arasında bir boşluk olmaksızın hizalamak için bir indeksleme metodu kullanmaktadır. Hizalama işlemi tamamlandıktan sonra referans genomdan farklılıkların tanımlanması olan varyant adlandırma işlemine geçilir (132) (Şekil 5).



Şekil 5: IGV programı içerisinde YND analizine ait örnek bir ekran görüntüsü (133'ten alınmıştır)

Burada önemli noktalardan bir tanesi dizileme esnasında kirliliklere bağlı ortaya çıkabilecek yalancı pozitifliklerin önüne geçilmesidir. Böylece aslında var olmayan herhangi bir değişiklik varyant havuzuna atılabilir. Varyant kalitesi değerlendirilerek gerçekten var olduğu düşünülen değişiklikler değerlendirilir. Kalan varyantlar hastalıklarla ilişkili olabileceği gibi, protein üzerinde herhangi bir etkisi bulunmayan dolayısıyla klinik açıdan anlamı olmayabilir. Bu aşamada insersiyon, delesyon, tek baz değişimleri ve büyük düzenlemelerden oluşan varyantlar “Variant Calling Format” (VCF) dosya formatında depolanır. Bu aşamadan sonra genetik analize hazır, içerisinde binlerce varyant olan bir liste oluşur (135). Mevcut varyantlar filtrelenerek, herhangi bir hastalık veya biyolojik bir süreç ile ilgili olmamasına dayanarak seçilir. Mendelyan geçişli hastalıklarda pedigriye dayanarak filtreleme yapılabilirken, kanser hastalarında hem normal hem de tümör dokusundaki varyantlar

karşılaştırılarak somatik ve germline varyant ayrımı yapılır. Pedigriye dayanarak filtreleme için ise en somut örneklerden biri, otozomal resesif geçiş paterni olan hastalıklarda, anne ve babalarda heterozigot, probandda ise homozigot varyantlar seçilecek olmasıdır (Şekil 6) (135).





Şekil 6: TED biyoenformatik analiz iş akışı (133'ten değiştirilerek alınmıştır)

2.12.3 Dizileme Teknolojilerinden Elde Edilen Varyantların Değerlendirilmesi

2015 yılında ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) tarafından yayınlanan rehber tek gen, paneller, ekzomlar ve genomlar dahil olmak üzere klinik laboratuvarlarda kullanılan genetik testlerin yorumlanması için kullanılmaktadır. Bu rehberde, varyantın patojenik olup olmadığı değerlendirilirken taşıdığı özelliklere göre “çok güçlü”, “güçlü”, “orta” ve “destekleyici” patojenite kriterlerden kaç tanesi ile uyumlu olduğu tespit edilir (Tablo 5). Benzer şekilde benign olup olmadığı değerlendirilirken taşıdığı özelliklere göre “tek başına” “güçlü” ve “destekleyici” benign kriterlerden kaç tanesi ile uyumlu olduğu tespit edilir (Tablo 6). Sonuçta varyantın uyumlu olduğu patojenik ve benign kriterlerin sayısı ve tipine uygun olarak "patojenik", "olası patojenik", "önemi bilinmeyen", "olası benign" ve "benign" olup olmasına göre yorum yapılır (Tablo 7) (136).

Tablo 5: Patojenik varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterler (136)

Patojenitenin kanıtı	Kategori
Çok güçlü	1. (PVS1) Fonksiyon kaybettirici mutasyonlar (nonsense, frameshift, splice site, başlangıç kodon, tek ya da birden fazla ekzon delesyonları)
Güçlü	1. (PS1) Daha önce tanımlanmış patojenik aynı aminoasit değişikliğinin aynı kodondaki farklı nükleotit değişikliğinden kaynaklanması 2. (PS2) <i>De novo</i> varyant tanımlanması 3. (PS3) İn-vivo veya in vitro yapılan fonksiyonel çalışmalar 4. (PS4) Etkilenen bireylerdeki varyant sıklığının kontrol gruplara göre önemli ölçüde artmış olması
Orta	1. (PM1) Mutasyonun hot spot ve/veya kritik ve iyi tanımlanmış domainde yer alması 2. (PM2) Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project veya Exome Aggregation Consortium veritabanlarında kontrol gruplarda olmaması (resesif ise çok düşük sıklıkta olması) 3. (PM3) Resesif hastalıklar için patojenik varyantın trans şeklinde tespit edilmesi 4. (PM4) Tekrarlamayan bölgelerde in-frame delesyon/insersiyondan kaynaklanan ya da stop kodonu değiştirerek proteinin uzunluğunun değişmesi 5. (PM5) Patojenik missense mutasyon tespit edilen bölgede farklı bir missense değişikliğinin saptanması 6. (PM6) <i>De novo</i> olduğu tahmin edilen ancak annenin/babanın çalışılmadığı durumlar
Destekleyici	1. (PP1) Hastalığa neden olduğu bilinen bir gende aynı ailedeki birden çok etkilenmiş bireyde seyrege olması 2. (PP2) Benign missense varyant oranının düşük olduğu bir gende missense varyant tespit edilmesi ve hastalığın mekanizmasında missense varyantların rol almaları

3. (PP3) Birden çok bilgisayar programlarının gen veya gen ürününün zararlı (deleterious) bir şekilde etkilendiğinin gösterilmesi (conservation, evolutionary, splicing etkisi gibi)
 4. (PP4) Hastanın fenotipi ya da aile öyküsü tek bir genetik etiyolojiye sahip hastalıkla uyumlu olması
 5. (PP5) Son zamanlarda güvenilir bir kaynakta etki patojenik olarak rapor edilmiş ancak ispatı için laboratuvarında bağımsız değerlendirme gerçekleştirmek için elverişli olmayan
-



Tablo 6: Benign varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterler (136)

Benign kriterler	Kategori
Tek başına	1. (BA1) Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project veya Exome Aggregation Consortium veritabanlarında Allel sıklığı >%5 olması
Güçlü	1. (BS1) Allel sıklığının hastalık için beklenende daha yüksek olması 2. (BS2) tam penetrans olması beklenen resesif (homozigot), heterozigot (dominant), X'e bağlı (hemizigot) hastalıklar için sağlıklı yetişkin bireylerde gözlenmesi 3. (BS3) İn vivo ve in vitro fonksiyonel çalışmalarda protein fonksiyonu ve splicing üzerine hasar verici etkisinin gösterilememesi 4. (BS4) Ailedeki etkilenmiş bireylerde segregе olmaması
Destekleyici	1. (BP1) Hastalığın sebebinin öncelikle gende proteinin erken sonlanmasına sebep olan varyantların olduğu bilinen durumlarda missense varyant tespiti 2. (BP2) Tam penetran otozomal dominant bir hastalıkta patojenik bir varyant ile trans pozisyonunda gözlenmesi ya da herhangi bir kalıtım paterninde cis durumunda patojenik varyant gözlenmesi 3. (BP3) Fonksiyonu bilinmeyen tekrarlayıcı bölgelerde in-frame delesyon ya da insersiyon saptanması 4. (BP4) Birden çok bilgisayar programlarının gen veya gen ürününün zararlı bir şekilde etkilendiğinin gösterilememesi (conservation, evolutionary, splicing etkisi gibi) 5. (BP5) Alternatif bir moleküler temeli olan bir hastada varyant gözlenmesi 6. (BP6) Son zamanlarda güvenilir bir kaynakta benign olarak rapor edilmiş ancak ispatı için laboratuvarı bağımsız değerlendirme gerçekleştirmek için elverişli olmayan 7. (BP7) Sinonim (sessiz) varyasyonun splicing tahmin algoritmalarında splice konsensüs dizilerine etki etmemesi ve yeni bir splice oluşturmaması ve nükleotitin yüksek korunmuş bir bölgede yer alması

Tablo 7: Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerin birlikte değerlendirilmesi (136)

Patojenik	i. 1 Çok güçlü (PVS1) VE a) ≥ 1 Güçlü (PS1–PS4) YA DA b) ≥ 2 Orta (PM1–PM6) YA DA c) 1 Orta (PM1–PM6) ve 1 destekeyici (PP1–PP5) YA DA d) ≥ 2 Destekeyici (PP1–PP5) ii. ≥ 2 Güçlü (PS1–PS4) YA DA iii. 1 Güçlü (PS1–PS4) VE a) ≥ 3 Orta (PM1–PM6) YA DA b) 2 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 2 destekeyici (PP1–PP5) YA DA c) 1 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 4 destekeyici (PP1–PP5)
Olası patojenik	i. 1 Çok güçlü (PVS1) VE 1 orta (PM1–PM6) YA DA ii. 1 Güçlü (PS1–PS4) VE 1–2 orta (PM1–PM6) YA DA iii. 1 Güçlü (PS1–PS4) VE ≥ 2 destekeyici (PP1–PP5) YA DA iv. ≥ 3 Orta (PM1–PM6) YA DA v. 2 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 2 destekeyici (PP1–PP5) YA DA vi. 1 Orta (PM1–PM6) VE ≥ 4 destekeyici (PP1–PP5)
Benign	i. 1 Tek başına (BA1) YA DA ii. ≥ 2 Güçlü (BS1–BS4)
Olası Benign	i. 1 Güçlü (BS1–BS4) VE 1 destekeyici (BP1–BP7) YA DA ≥ 2 Destekeyici (BP1–BP7)
Önemi bilinmeyen	i. Yukarıda sıralanan kriterler karşılanmıyorsa YA DA ii. Benign ve patojenik kriterler çelişkili ise

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubu; klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgular ışığında saf tip OD-HSP tanısı alan ve moleküler genetik etiyolojisi aydınlatılmamış olan İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinden takip edilen 4 ve Nöroloji Anabilim Dalı polikliniğinden takip edilen 2 ailedeki toplam 23 hasta bireyden oluşturuldu.

3.1 Klinik Değerlendirme

Hastaların nörolojik muayeneleri, EMG yorumları nöroloji uzmanlarınca, kranyal ve spinal MR görüntüleri radyoloji uzmanlarınca değerlendirildi. Ayrıca, fizik ve dismorfik muayeneleri tıbbi genetik uzmanlarınca yapıldı. Klinik değerlendirmede; hastalığın başlangıç yaşı, başlangıç bulgusu, hastalık süresi, idrar ve gaita inkontinansı sorgulandı. Fizik ve nörolojik muayenede ise kraniyal psödobulbar bulgular, kas kuvveti, kas tonusu, denge ve yürüyüş tarzı, Tıbbi Araştırma Konseyi ölçeğine (Tablo 8) göre kas zaafı, derin tendon refleksleri ve patolojik refleksleri, duysal bulgular, serebellar muayene bulguları incelendi.

Tablo 8: Tıbbi Araştırma Konseyi Kas Zaafı Ölçeği

Evre 0: Görülebilir kasılma yoktur.
Evre 1: Ancak gözle görülebilen ya da palpasyonla fark edilebilen kasılma vardır. Eklem hareketi yoktur.
Evre 2: Ancak yerçekimi ortadan kaldırıldığında hareket mümkündür.
Evre 3: Yalnızca yerçekimine karşı tam eklem hareketi mümkündür.
Evre 4: Kas normal hareketini yapabilir ancak karşı yönde kuvvet uygulandığında yenilebilir.
Evre 5: Normal kas gücü (Kas normal hareketini yapabilir ve karşı yönde kuvvet uygulandığında yenilemez.)

HSP tanısı için bildirilmiş kesin tanı kriterleri bulunmamaktadır. Bu nedenle HSP'ye benzer klinik tabloya yol açabilecek beyin ve medulla spinalisin yapısal anomali, B12 vitamin eksikliği veya demiyelinizan hastalığı olanlar ile temel olarak alt ekstremitte bulguları dışında farklı nörolojik veya sistemik tutulumu olan hastalar çalışmaya alınmadı.

3.2 Elektromiyografi (EMG) ve Manyetik Rezonans Çalışmaları

Aileler içinden seçilen indeks olguların tümünde duysal ve motor iletiler için sağ üst ekstremitede medyan ve ulnar, duysal iletiler için sağ alt ekstremitede sural ve tibiyal sinirler, motor iletiler için peroneal ve tibiyal iletiler çalışıldı.

Aşağıda belirtilen kriterleri karşılayan 6 aileden 23 hasta birey çalışmaya dâhil edildi.

A. Çalışmaya dâhil edilme kriterleri;

1. Ailede en az iki kuşakta birden fazla bireyin HSP kliniğine sahip olması
2. Aile ağacının otozomal dominant kalıtım ile uyumlu olması
3. Saf tip HSP kliniğine sahip olması
4. HSP kliniğini taklit edebilecek başka bir nörolojik hastalığın mevcut olmaması
5. Eşlik eden başka bir genetik hastalığın olmaması

B. Dışlama kriterleri;

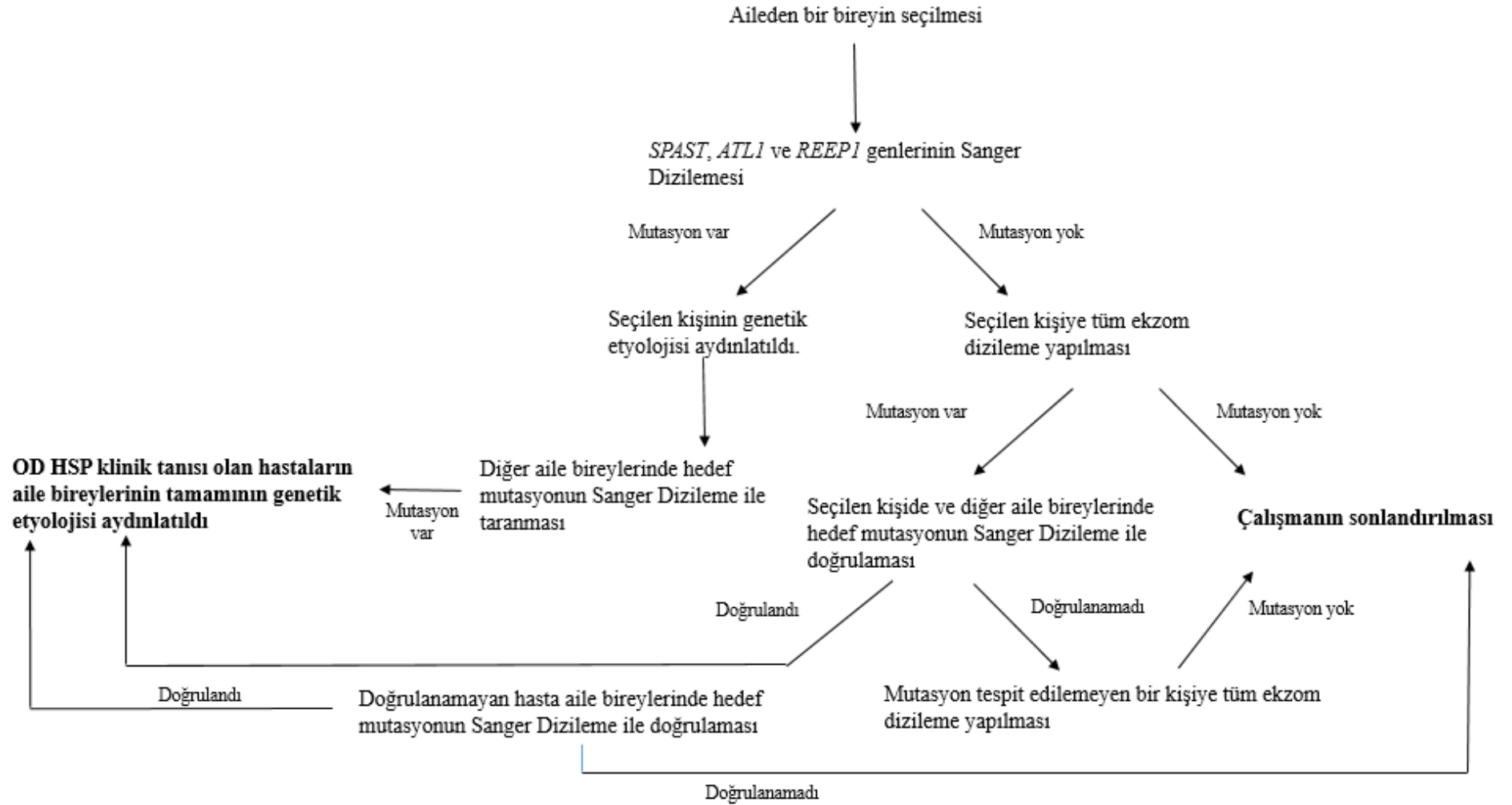
1. Ailede tek bireyin klinik HSP tanısı almış olması
2. Kompleks tip HSP kliniğine sahip olması
3. Eşlik eden yapısal beyin veya medulla spinalis anomalisi olması
4. Anamnez, fizik muayene bulguları ile laboratuvar analizleri sonucu HSP tanısının dışlanması veya tanının netleştirilememesi
5. HSP kliniğine neden olabilecek genetik etiyolojinin aydınlatılmış olması

Bu çalışmada (hastalardan kan alınmasından genetik etiyolojinin aydınlatılmasına kadar geçen süreç içerisinde) yapılan işlemler Şekil 7’de gösterilmiştir.

1. DNA izolasyonu
2. Her aileden bir hasta bireyin ile *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerinin Sanger dizilemesi
3. Mutasyon saptanan bireylerin diğer hasta akrabalarında tespit edilen mutasyonun taranması
4. Mutasyon saptanamayan ailelerden seçilen bir hastanın tüm ekzom dizilemesinin gerçekleştirilmesi
5. Hedef varyantların belirlenmesi
6. Sanger dizileme ile tespit edilen varyantların dizileme yapılan kişide ve diğer hasta akrabalarında doğrulanması ve segregasyon analizinin yapılması
7. Tespit edilemeyen aileden diğer bir bireye daha tüm ekzom dizileme yapılması
8. Hedef varyantların belirlenmesi

9. Sanger dizileme ile tespit edilen varyantların dizileme yapılan kişide ve diğer hasta akrabalarında doğrulanması ve segregasyon analizinin yapılması





Şekil 7: Çalışmanın iş akış şeması

Çalışmanın 3. ve 4. aşamaları “DNA Laboratuvarları Genetik Tanı Merkezi”nde, diğer kısımları ise İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

3.3 DNA İzolasyonu ve saflık derecelerinin hesaplanması

Hastaların periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

1. Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu için, Roche yarı manuel DNA izolasyon (Roche, Germany) kiti kullanıldı.
2. Her bir hastanın 2 cc kan örneği 15 ml’lik falkon tüplere konularak üzerine 6 ml Red Blood Lysis Buffer eklendi.
3. Mevcut karışımı içeren falkon tüpler 10 dakika (dk) boyunca elde nazıkçe karıştırıldı.
4. İçerisinde bulunan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla tüpler 900 rcf’te 10 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüjden sonra, tüpün üstündeki kısım nazıkçe boşaltıldı ve her bir tüpe 1ml White Cell Lysis Buffer eklenerek saydam bir karışım elde edinceye kadar pipetaj yapıldı.
6. Takiben falkon tüpler 37 °C’de 15 dk bekletildi ve her bir tüpe 500 ul protein çöktürme tamponu eklendikten sonra 30 sn boyunca vortekslendi.
7. Örnekler bu haliyle 1,5 ml’lik tüplere aktarılıp 12000 rcf’te 10 dk santrifüj edildi.
8. Sıvı şeffaf kısım 15 ml’lik falkon tüpe alınarak sıvı üzerine iki kat hacimde soğuk %100 etil alkol eklenip, tüp yüzen DNA’lar gözlenene kadar kısaca çalkalandı.
9. Elde edilen DNA mikropipet aracılığıyla 1,5 ml’lik tüplere alındı.
10. DNA üzerindeki sıvı atılarak yerine 1 ml soğuk %70 etanol eklendi.
11. Örnek bu şekliyle 875 rcf’te 5 dk santrifüje tabi tutularak, dibe çöken DNA’ya zarar vermeyecek şekilde üstteki sıvı kısım atıldı.
12. Kurutma işlemi için ağzı açık haldeki tüpler önceden ısıtılmış 37 °C’deki etüve yerleştirildikten sonra tam kuruma elde edildi.
13. Kurutma işleminin ardından DNA’ların 200 µl DNaz’dan korunmuş distile suda çözüldü.

İzole edilen DNA örneklerinin NanoDrop ND-2000c spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlendi. DNA derişimi absorbans değeri, DNA katsayısı ile sulandırma katsayısının çarpılmasıyla hesaplandı. Ayrıca örneklerin saflığı, spektrometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılmasıyla elde edildi.

3.4 Sanger Dizileme (SD)

Bu çalışmada SD yöntemi hem *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerinin tüm ekzon ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinde mutasyon tarama yapılması hem de TED analizi neticesinde hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen varyantların doğrulanabilmesi için kullanıldı. Her iki aşamada da SD'ye hazırlanması için polimeraz zincir reaksiyonu, birinci pürifikasyon, dizi PZR ve ikinci pürifikasyon gerçekleştirildi.

3.4.1 Sanger Dizileme Reaksiyonları

“Ensemble”, “Primer 3” ve “NCBI Primer Blast” programları kullanılarak *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerinin tüm ekzon ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinde mutasyon tarama yapılması ve TED analizi neticesinde hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen varyantların doğrulanabilmesi için hedef varyant/varyantları kapsayan dizilerin çoğaltılması amacıyla primerler tasarlandı (Tablo 9). Genom üzerindeki bağlanma ve çoğaltma bölgesi “UCSC in silico PCR” üzerinden doğrulandı. Tasarlanan primerde bağlanma kalitesini düşürebilecek bir tek nükleotid varyasyonu (SNP) mevcudiyeti “SNP Check” programı ile kontrol edildi.

Tablo 9: *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerinin Sanger dizileme öncesi PZR reaksiyonlarında kullanılacak primer dizileri (Primerlerin tasarımı bize aittir)

Primer Adı	Dizi	Primer Adı	Dizi
SPAST-1F	CAGGAGGAGAAGGGGTTGTG	ATL-5F	TTCATTCCTTATTGTCTCTCAAGC
SPAST-1R	GGAAGGCTGGTGTCTGAAAC	ATL-5R	TGGGCCAATAGTTCCTGTTT
SPAST-2F	GCAAAATAGGACTCACGGCC	ATL-6F	CTAATTGCCATGGCTCTGCT
SPAST-2R	GTGCCTGGCCCAAATACAT	ATL-6R	CCTGGAACCAGAATGCCTAA
SPAST-3F	GAAGTGATCCTTGCAACTCAC	ATL-7F	CATTCAGGCAGTTTGGGAGT
SPAST-3R	GCCTGGACCACATTTTCAATC	ATL-7R	AATGAGATTGCGGCTAGTGG
SPAST-4F	CCATGGTATTTGTTTTGGACG	ATL-8F	TTAGACACGGCTCTGTGTGG
SPAST-4R	TCCCCTACCCAAAGAAAACA	ATL-8R	GAATCCCACAGTTCACCAAGG
SPAST-5F	TGGTACATGTTCTCATTGAAAT	ATL-9F	TGGAATTTGGGCAAGGAGA
SPAST-5R	TTAAATGTCTAATGAGGTCCAA	ATL-9R	CATATTGGCTCTTGGTGCAG
SPAST-6-7F	ATCCACAGGGCAACTTGCTA	ATL-10F	AGGACCTTCACAAGGGTCTG
SPAST-6-7R	GGCGACACAATGAGTGAGAC	ATL-10R	TGCACCTGCTTTTCTACTGTG
SPAST-8F	AGCTCTGTTTGGGAAGATGC	ATL-11F	CAGCATTTAATGGCAGGCTA
SPAST-8R	TGAGCCCAGATCACTCAAAAC	ATL-11R	GGGTACCACATGCTATTTTGG
SPAST-9F	ACACCTGGCCTCATAGCTTA	ATL-12F	TTCATCTTGAAGGACTTGGATT
SPAST-9R	TTAAGCCAGCCAGTTTACGG	ATL-12R	TGCTGAAATGTAACTGGAAAA
SPAST-10-12F	TCTCCCCTTTCTCAAACCAA	ATL-13F	TGGATCCTCTGAGCCACTTT
SPAST-10-12R	CTGACCAATTTGCCTAAAACC	ATL-13R	CAGCAGAGTCCACCATTTC
SPAST-13F	TCTCTTTTGGGAGGAAAACCTG	ATL-14F	GGAAGCCCAGAAAGCAAGTA
SPAST-13R	CTGTACCATGGATTGGAAGA	ATL-14R	CCAGTTTGCAGTCTTCAGAGG
SPAST-14F	TGAGGATTAAGTCAAACAGG	REEP1-1F	AGATCCCCGAGGTTCAAGTT
SPAST-14R	GCAAAGGAGGTAGAGGATGA	REEP1-1R	CCTCACATTTCTGCCAAAGG
SPAST-15F	CTATGGGTTTGCTGACAAAG	REEP1-2F	GGGTGTGGGCTTTAACAGAA
SPAST-15R	TTTTTGAGTTTTCTGCTGCTT	REEP1-2R	TCTAGGCAGGGGAAGGTCT
SPAST-16F	GGGCAGTATGCAAGAAATTGA	REEP1-3F	GAATCCTGGGTCACTCTTGG
SPAST-16R	CAGATGCAGCGGCTCAA	REEP1-3R	CGAATGCTTCTTTACCAACTCC
SPAST-17F	CCATCATTTTCGTTAACCACCA	REEP1- 4F	AACCTGTGTTCTCTGGTTTGC
SPAST-17R	GGCAAGGCCTTAAACAACAA	REEP1- 4R	GGAAATTCACCTTTGCGTGGT
ATL-1F	TGTGATGCTGAGCTTGGTTC	REEP1- 5F	TGTGTAGAATGGCAGGCAAG
ATL-1R	GTCCAAATGCTGGGAGGAG	REEP1- 5R	TTGCAAGTATGTGGGCATGT
ATL-2F	CAGGGTGCTCTTGACTCCTG	REEP1- 6F	AGTGGTGTCTGAGGGTAGGG
ATL-2R	GTAGTTTGGTCCCCAAAGCAC	REEP1- 6R	CCGGGTGAGAAGACAACACT
ATL-3F	GCAGATGGTTGCTCCTCTGT	REEP1- 7F	CGATATGTGGGATGGGACTC
ATL-3R	GGATGCTACCCCACTTTAAGC	REEP1- 7R	CCTTCCCTTTAGCCTCTCC
ATL-4F	GCTTAAAGTGGGGTAGCATC		
ATL-4R	TGACCTTTTCTAACCAAAGCA		

Hedeflenen bölgenin dizilenmesi için tasarlanan primerler ve tablo10'da belirtilen karışımlar protokole uygun kullanılarak PZR gerçekleştirildi.

Tablo 10: PZR uygulaması için bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Her bir reaksiyon için miktar (µL)
PZR master miks	12.5
Distile su	10.5
İleri primer	0.5
Geri primer	0.5
DNA	1
Toplam miktar	25

Optimum sıcaklıklar “NCBI Primer Blast” programı önerisiyle belirlendi ve PZR gerçekleştirildi.

PZR sonrası 50 ml 0.5x TAE’ye 0.75 g agaroz eklenerek %1.5’ lik agaroz jel hazırlandı. 1 µl bromofenol mavisi ile 5 µl PZR ürünü karıştırılarak jele yüklendi ve 120 voltta 20 dakika yürütüldü. UV transilluminator cihazı ile ‘infinity caps’ programı kullanılarak görüntüleme işlemi yapıldı ve hedef bölgenin amplifiye edildiği doğrulandı. PZR neticesinde hiç bant elde edilemeyen veya birden fazla nonspesifik bant elde edilen gen bölgelerinde tekrar optimizasyon yapıldı. Buna göre hiç bant elde edilemeyen bölgelerde PZR uzama sıcaklığı ve primer bağlanma ısıları tekrar gözden geçirildi. Bant elde edilemeyen reaksiyonlara 1.5 µl DMSO eklenerek tekrar PZR gerçekleştirildi ve tekrar PZR ürünü karıştırılıp jele yüklenerek kontrol edildi.

2.5 µl PZR ürünü üzerine 1 µl ExoSap konularak ilk yapılan PZR sonrası ürünün saflaştırma ve oluşan artefaktlardan temizlenmesi amaçlandı. Bunun için hazırlanan tüp termal döngü cihazına konularak 37°C’de 15 dakika, 80°C’de 15 dakika inkübe edildi. Uygun ısıda artefaktları bağlayan ExoSap tüpün dibine çöktü ve üst kısımda temizlenmiş PZR ürünleri elde edildi. Temizlenen PZR ürünleri ve Tablo 11’de belirtilen karışımlar kit protokolünde belirtilen şekilde ayrı tüplerde hazırlandı ve Tablo 12’de belirtilen sekans PZR programı uygulandı.

Tablo 11: Dizileme PZR için bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Her bir reaksiyon için miktar (µL)
Exosap ile Temizlenen PZR Ürünü	3.5
Big Dye	1
Sequencing Buffer	1
Primer (F veya R)	1
Distile Su	3.5
Toplam miktar	10

Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer sekans cihazı ile tek yönlü okuma forward primerleri kullanılarak çalışıldı.

Tablo 12: Dizileme PZR programı

Program	Sıcaklık	Süre	Siklus
Preinkübasyon	96°C	5 dakika	1
	96°C	30 saniye	
Amplifikasyon	50°C	30 saniye	25
	60°C	1 dakika	
Soğutma	4°C	∞	1

Dizileme PZR sonrası her bir tüp için 10 µl X-terminator solüsyonu ile 45 µl SAM solüsyonu karışımı hazırlanarak 96'lık plate ile her kuyuya 55 µl karışım aktarıldı. Üzerine 10 µl'lik hazırlanan dizileme PZR ürünü eklenerek ürünün saflaştırma ve oluşan artefaktlardan temizlenmesi amaçlandı. Ardından 3500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve plate cihaza yerleştirildi, dizileme işlemine geçildi.

ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kiti, AmpliTaq DNA polimeraz içeren, 5'-3' nükleaz aktivitesi ile fosfataz aktivitesi inhibe edilmiş bir PZR kitidir. ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde bulunan karışım içinde PZR için gerekli tüm kimyasallar yanında her bir bazın eşit miktarda ddNTP'leri de bulunur. Bu ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir. Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir. Kit tüm kalıp DNA'lar için ortak bir PZR protokolü içerir ve PZR süresi ortalama 2,5 saattir.

3.4.2 Sanger Dizileme Veri Analizi

Ensembl veri tabanında *SPAST* geni için ENST00000615843.4, *ATL1* geni için ENST00000358385.10 ve *REEP1* geni için ENST00000165698.9 numaralı transkriptler referans olarak kullanıldı. SD sonrası araştırılan hasta örnekleri için elde edilen 'ab1' uzantılı veriler "CodonCode aligner" programı ile analiz edildi.

3.5 Tüm Ekzom Dizileme (TED)

TED gerçekleştirilirken örneklerin DNA izolasyonundan varyantların belirlenmesi sürecinde takip edilen iş akışı; kütüphanenin hazırlanması, kümelerin oluşturulması, dizileme reaksiyonları ve veri işlem-analizi şeklinde dört aşamadan oluşmaktadır.

3.5.1 TED Reaksiyonları

Elde edilen genomik DNA örneği Nextera® Rapid Capture Exome Custom Enrichment kiti kullanılarak kütüphane hazırlama işlemleri gerçekleştirildi. İlk aşamada transpozomlar ile genomik DNA örnekleri çift zincir olarak rastgele fragmente edildi. Fragmente edilmiş DNA dizilerinin uçlarına adaptör dizileri eklendi. Bir önceki aşamada kullanılan eklenememiş adaptör dizilerden örnekleri temizlemek için örnek temizleme taneleri (Sample Purification Beads) kullanıldı. Pürifikasyon aşaması tamamlanan örneklerin amplifiye edilmesi, kişiye özel dizileri eklenmiş PZR ile gerçekleştirildi. Müteakip aşamada ise benzer örnek temizleme taneleri kullanılarak istenmeyen ürünler uzaklaştırıldı.

Yeni nesil dizileme reaksiyonları için hazırlanmış, yüzeyinde özel oligonükleotid dizileri yerleştirilmiş cam slayt olan akıcı hücre üzerine eklenmiş adaptör dizileri olan DNA fragmanları aktararak akıcı hücre üzerindeki oligonükleotidlerle hibridize edildi ve kalan kısmın geri sentezi gerçekleştirildi. Meydana gelen çift zincirli DNA'dan kalıp olarak kullanılan zincir yıkanarak uzaklaştırıldı. Elimizde mevcut olan DNA fragmanı akış hücresi üzerine bağlanmış oldu. Bundan sonra fragmanın serbest ucunda bulunan adaptör akış hücresi üzerinde boş bulunan uygun oligonükleotidlerle tekrar hibridize olarak köprü PZR reaksiyonları gerçekleştirildi ve reaksiyon sonrası zincirler denatüre olarak tek zincirli flow cell'e bağlı pozisyona geldi. Yukarıda anlatılan reaksiyon aynı anda tüm akış hücreleri üzerinde gerçekleşerek milyonlarca klonal DNA ampikonu elde edildi. Köprü PZR'den sonra yıkama reaksiyonları ile reverse zincirler ortamdan uzaklaştırıldı.

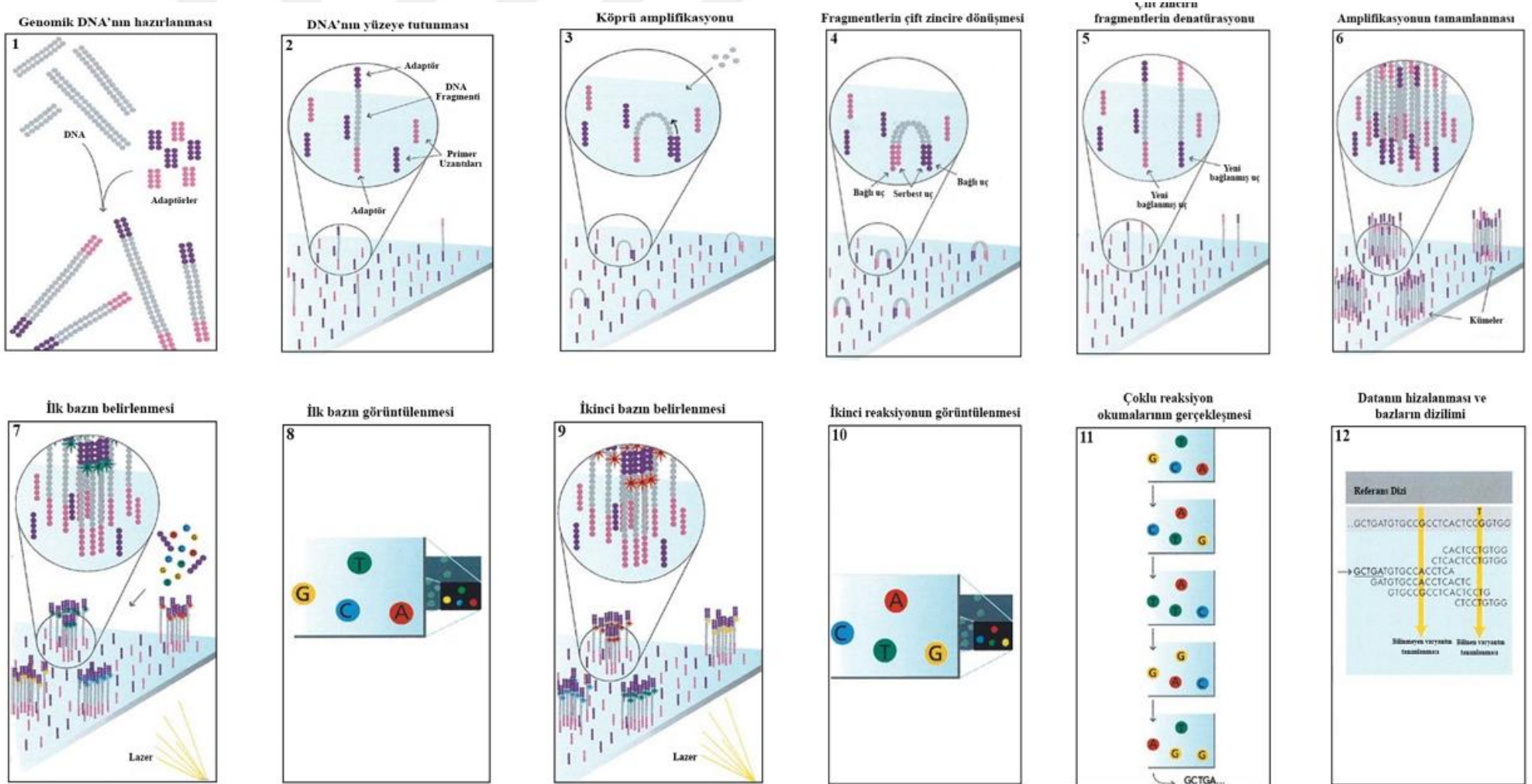
İlk aşamada yerleştirilen adaptör içerisinde bulunan primer dizisi ile sekans primerleri hibridize oldu ve ortamda bulunan enzimler ve nüleotit spesifik floresan ile işaretli serbest nükleotidler kullanılarak komplementer nükleotit yerleştirildi. Nükleotidin uygun bölgeye bağlanması esnasında üzerindeki floresan ışımı yaptı ve bu cihaz tarafından algılanarak floresana karşılık gelen baz tanımlanması yapıldı. Bu reaksiyon eş zamanlı olarak tüm akıcı hücre üzerinde gerçekleşti ve cihaz 150-200 nükleotit uzunluğunda milyonlarca fragman dizisini okuyarak ham datanın oluşması için ilk aşamayı gerçekleştirdi. Dizileme sonrasında sentezlenen fragman yıkanarak uzaklaştırıldı ve benzer reaksiyon revers diziler için de gerçekleştirilerek okumalar elde edildi (137) (Şekil 8).

3.5.2 Veri İşleme ve Analizi

Tüm okuma kümeleri üst üste getirilerek ileri ve geri diziler ile hedef diziler belirlendi. Son aşamada ise elde edilen tüm veriler referans genomdan elde edilmiş ekzon ve ekzon-intron bölgeleri üzerinde karşılaştırılarak elde edilen verideki diziler ve varyantlar belirlendi.

İşlem sonrası elde edilen paired-end sekans verisi üretici firma tarafından cihaz üzerinde bioinformatik yazılımlar kullanılarak analize hazır ham data olan FASTQ dosya formatı elde edildi. Analize hazır human genome (hg19) üzerine hizalanmış bam dosyası oluşturulurken çeşitli kalite filtreleri uygulandı. Varyasyonların tespit edilmesi ve küçük kopya sayısı değişikliklerinin (indel) belirlenmesi için ise The Genome Analysis Tool kit (GATK) v1.6 programından yararlanıldı.

Varyant değerlendirmesinde OMIM, Pubmed, 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Ensemble, PolyPhen, Mutationtaster (prediction programlar) gibi veritabanlarından faydalanılarak varyantların herbiri birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi. Varyantların yorumlanması aşamasında OD-HSP ile ilişkilendirilmiş genlerdeki heterozigot varyantlar ön planda analiz edildi.



Şekil 8: TED reaksiyonları (134'ten değiştirilerek alınmıştır)

4 BULGULAR

Çalışma grubu; İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Nöroloji Anabilim Dalı polikliniklerinde 2012-2016 yılları arasında klinik ve laboratuvar bulgularıyla saf tip OD-HSP tanısı ile takip edilen 6 ailenin toplam 23 bireyinden oluşturuldu.

Bir ve iki no'lu ailede 6, üç no'lu ailede 3, dört no'lu ailede 2, beş no'lu ailede 5 ve altı no'lu ailede 1 hasta birey mevcuttu. Hasta grubu 10-72 yaş aralığında (ort: 38,65±3,4) 8 kadın/kız ve 15 erkekten oluşmaktaydı. Kadın/kızların yaş ortalaması 44,62±8,17 iken, erkeklerin yaş ortalaması 35,46±2,83'tü. Hastaların tamamına yakınında 8 ay-40 yaş arasında başlayan yürüyüş bozukluğu ve bacaklarda sertleşme şikâyetleri vardı. 7 hasta yürürken yardımcı cihaz kullanıyordu. 18 hastada idrara ani sıkışma hissi varken, 7'sinde buna idrar inkontinansı eşlik ediyordu.

Hastaların fizik muayenelerinde; alt ekstremitelerde bilateral 1. motor nöron bulguları mevcuttu. 7 hastada pes kavus, 1 hastada pes planus deformitesi vardı. Pes kavusu olan iki hastanın ayrıca skolyozu da mevcuttu. Tüm hastaların EMG'si normal, bir hastanın spinal MR'ında siringomyeli tespit edildi.

Hastalardan elde edilen DNA derişimleri 44,9 ile 112 ng/µl arasında değişirken, saflık oranları (A260/280) 1,8-2,1 arasında bulundu. 17 hastada SD ile missens mutasyon, 3'ünde TED ile missense mutasyon saptandı. 3 hastada ise hastalıkla ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyant bulunamadı. Çalışmaya dâhil edilen hastaların klinik ve laboratuvar bulguları ile genetik sonuçları Tablo21'de toplu olarak verildi.

4.1 1 no'lu Aile

Olgu1 (IV.3): 42 yaşında erkek hastanın bacaklarında sertlik ve yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yakınmalarının 18. ayda başladığı ve zamanla ilerlediği belirtildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt Fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı. Kraniyal MR'da patolojik bulgu saptanmadı. Spinal MR'da siringomyeli kavitesi mevcuttu. EMG normaldi. SEP incelemesinde median yanıt latansları uzamış olup, bilateral tibial yanıt elde edilemedi.

Olgu2 (IV.6): 44 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 12. ayda başladığı ve zamanla ilerlediği belirtildi. Fizik muayenede; Kas tonusu

bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüş spastik tarzdaydı.

Olgu3 (IV.19): 27 yaşında erkek hasta, heyecanlanınca ve acele edince bacaklarında gerilme ve birbirine dolaşmadan yakınıyordu. Yürüyüş bozukluğu 14-15 yaşında başlamıştı. Fizik muayenede; Alt ekstremitelerde bilateral artmış kas tonusu, dört ekstremitelerde kas gücü 5/5 (N), derin tendon refleksleri üst ekstremitelerde +++, alt ekstremitelerde +++, plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı.

Olgu4 (IV.21): 52 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 9-10 yaşlarında başladığı ve zamanla ilerlediği ifade edildi. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon ve aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı. Her iki ayağında pes planus deformitesi mevcuttu.

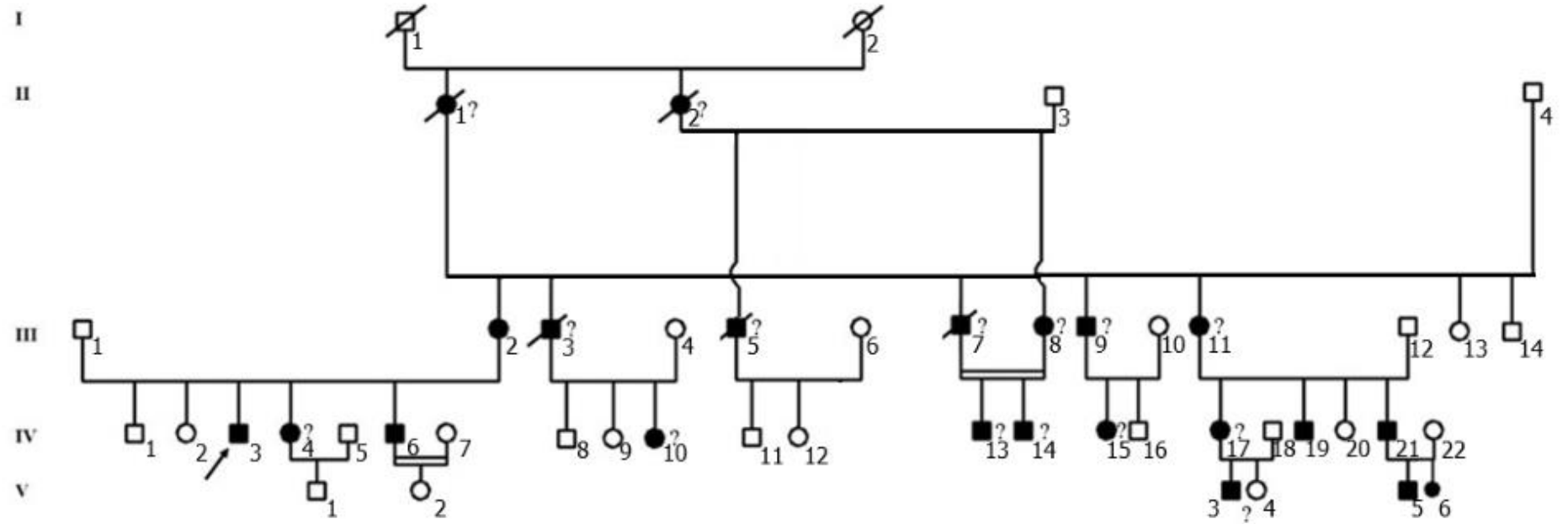
Olgu5 (V.5): 30 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı. Her iki ayağında pes kavus deformitesi mevcuttu.

Olgu6 (V.6): 13 yaşında kız hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 15. ayda başladığı ifade edildi. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı. Her iki ayağında pes kavus deformitesi mevcuttu.

1 no'lu ailenin pedigrisinde vefat etmiş fakat mevcut hastalara benzer şikâyetleri olduğu belirtilen II.1, II.2, III.3, III.5, III.7, no'lu bireyler ile yaşayan ve hasta olduğu belirtilen III.8, III.9, III.11, IV.4, IV.10, IV.13, IV.14, IV.15, IV.17, V.5 no'lu kişilerin tarafımızdan muayene edilmediği veya hasta olduklarına ilişkin bir rapor bulunmadığı için (?) işareti ile gösterildi. III.2 no'lu birey hasta olup, sağlıklı 1 hasta kız, 1 erkek, 2 hasta erkek çocuğu (IV.3, IV.6) mevcuttu. IV.6 no'lu bireyin eşi ile aralarında akrabalık mevcut olup, çocuklarının hasta olmadıkları ifade edildi. III.2 no'lu bireyin kardeşi olan ve hasta olduğu ifade edilen III.11 no'lu bireyin 1 hasta ve 1 sağlıklı kızı olduğu aktarıldı. İki erkek çocuğu ise (IV.19, IV.21) hastaydı.

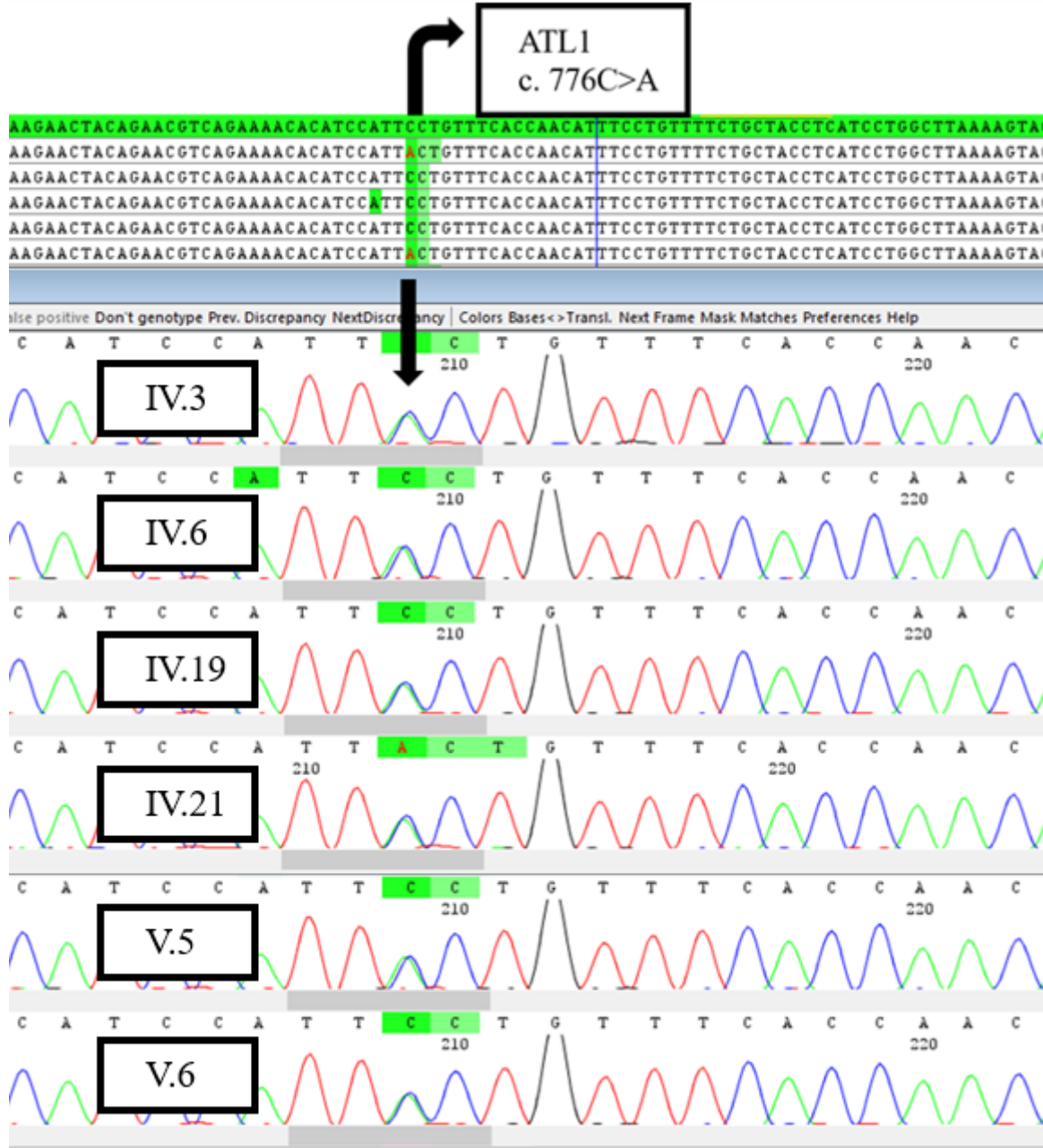
IV.19 no'lu bireyin çocuğu yoktu, IV.21 no'lu bireyin ise iki çocuğu da (V.5, V.6) hastaydı. 1 no'lu ailenin detaylı pedigrii Şekil 9'da sunuldu.





Şekil 9: 1 no'lu ailenin pedigrisi

IV.3 no'lu hastanın *ATL1* geninde NM_001127713 numaralı transkriptin 8. ekzonunda heterozigot 776'ncı pozisyonda bulunan sitozin nükleotidinin yerini adenin nükleotidinin aldığı (c.776C>A) saptandı. Bu değişikliğin 259 pozisyonda bulunan ve diğer canlı türlerinde yüksek derecede korunmuş olan serin aminoasidinin (Tablo 14) tirozin ile yer değiştirmesine (p.S259Y) neden olduğu tespit edildi. Mevcut değişiklik mutasyon veritabanlarında missense mutasyon olarak daha önce bildirilmişti (rs119476047). 1 no'lu ailenin IV.6, IV.19, IV.21, V.5 ve V.6 bireylerinde de aynı (c.776C>A) değişiklik saptandı (Şekil 10).



Şekil 10: IV.3 no'lu hastanın ve diğer hasta aile bireylerinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.

Tablo 13: 259. pozisyonda bulunan serin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu

<i>H. sapiens</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F
<i>P. Troglodytes</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F
<i>M. Mulatta</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F
<i>C. Lupus</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	K	I	S	C	F
<i>B. taurus</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	K	I	S	C	F
<i>M. musculus</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F
<i>R. Norvegicus</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F
<i>G. gallus</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	K	I	S	C	F
<i>D. rerio</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F
<i>X. tropicalis</i>	E	L	Q	N	V	R	K	H	I	H	S	C	F	T	N	I	S	C	F

4.2 2 no'lu Aile

Olgu1 (IV.7): 13 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 12. ayda başladığı ve zamanla ilerleyerek bacaklarda sertleşmenin başladığı belirtildi. İdrara ani sıkışma hissi ve inkontinans mevcuttu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, bilateral aşıl klonusu pozitif, yürüyüşü spastik tarzdaydı. Kranial ve spinal MR'da patolojik bulgu saptanmadı. EMG normaldi. Her iki ayağında pes kavus deformitesi mevcuttu.

Olgu2 (III.7): 38 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 12. ayda başladığı, şikâyetlerinin zamanla ilerlediği, baston ile mobilizasyonunu sağladığı ifade edildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüş spastik tarzdaydı.

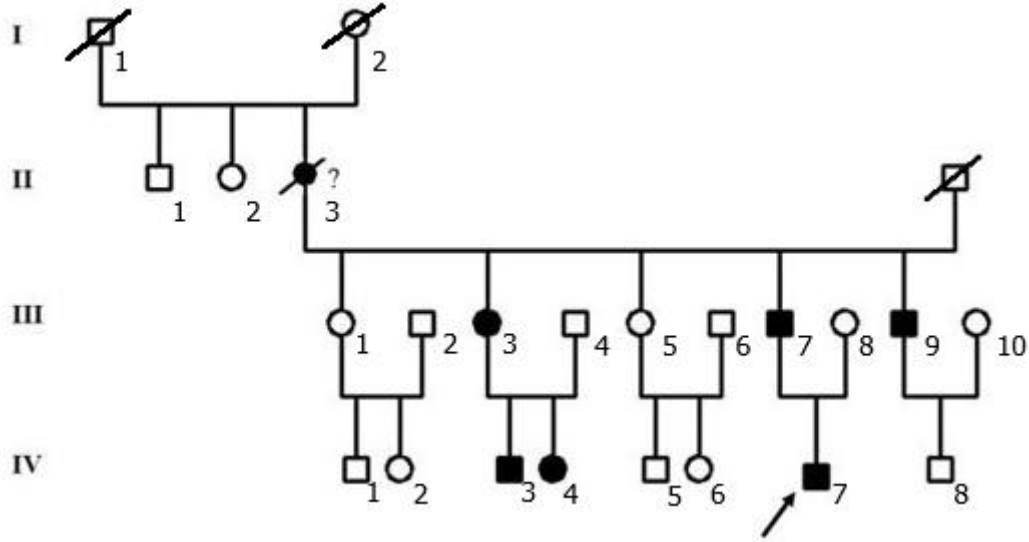
Olgu3 (IV.3): 17 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 12. ayda başladığı, şikâyetlerinin zamanla ilerlediği belirtildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde ++++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu pozitif, yürüyüşü spastik tarzdaydı. Her iki ayağında pes kavus deformitesi mevcuttu.

Olgu4 (III.3): 43 yaşında kadın hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 13. ayda başladığı ifade edildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı.

Olgu5 (IV.4): 10 yaşında kız hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yakınmasının 12. ayda başladığı belirtildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı.

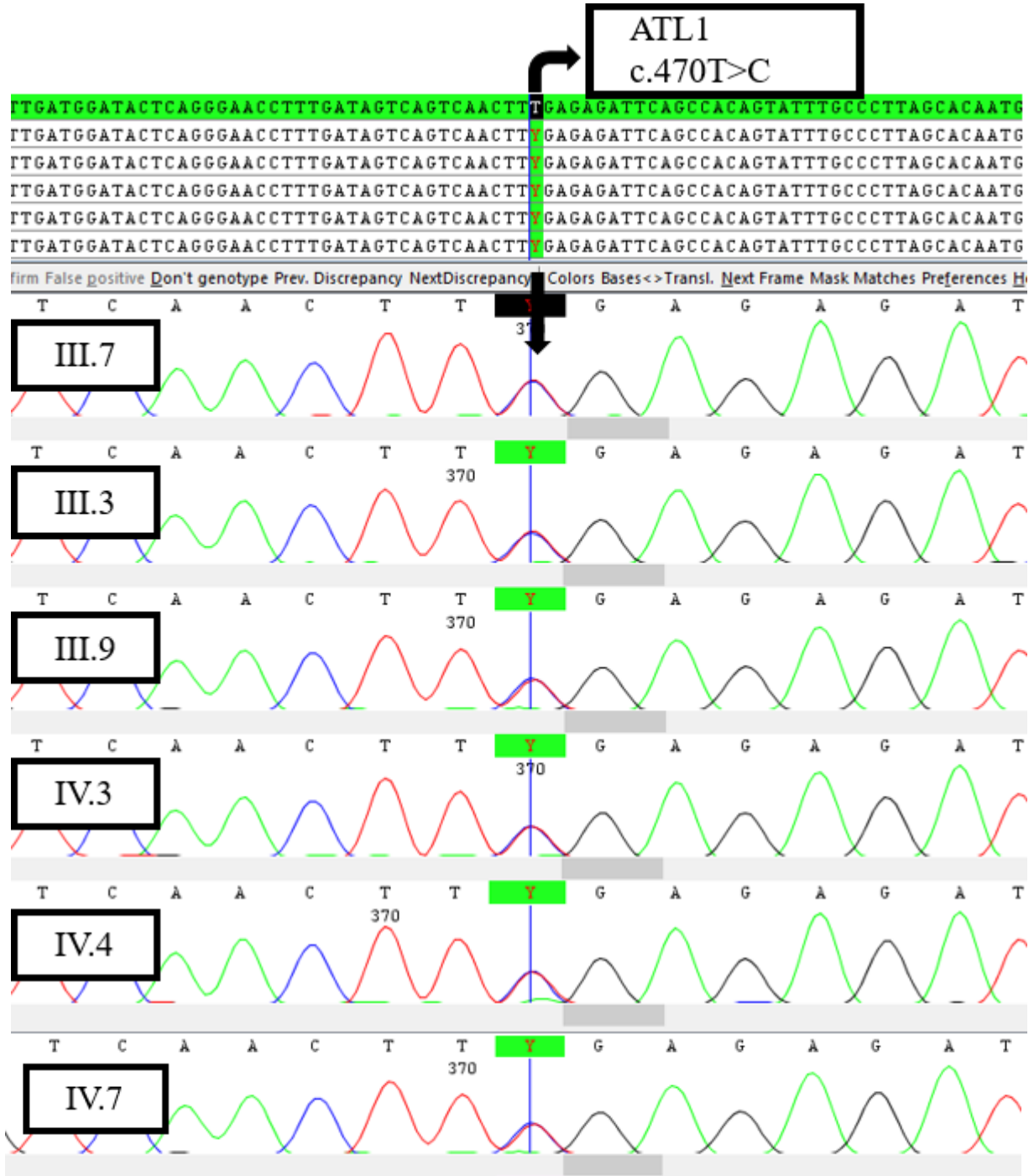
Olgu6 (III.9): 33 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yakınmasının 15. ayda başladığı ve zamanla şikâyetlerinin ilerlediği, baston ile mobilizasyonunu sağladığı ifade edildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde +++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu negatif, yürüyüşü spastik tarzdaydı.

İki no'lu ailenin pedigrisinde; vefat eden I.1 ve I.2 no'lu bireylerde herhangi bir hastalık bulgusu olmadığı, II.3 no'lu bireyin vefat ettiği, diğer hastalara benzer bulguların mevcut olduğu aile tarafından aktarılmasına rağmen tarafımızca muayene edilmediği için (?) işareti ile gösterildi. II.3 no'lu bireyin 2 sağlıklı kızı, hasta bir kızı (III.3) ve iki erkek çocuğu (III.7 ve III.9) vardı. III.9 no'lu bireyin bir erkek çocuğu sağlıklıydı. III.3 ve III.7 no'lu bireylerin ise toplam iki erkek (IV.3 ve IV.7) ve bir kız (IV.4) çocuğun hepsi hastaydı. 2 no'lu ailenin pedigrisi şekil 11'de sunuldu.



Şekil 11: 2 no'lu ailenin pedigrisi

IV.7 no'lu bireyin *ATL1* geninde NM_001127713 numaralı transkriptin 4. ekzonunda heterozigot 470'inci pozisyonda bulunan sitozin nükleotidinin yerini adenin nükleotidinin aldığı (c.470T>C) saptandı. Bu değişikliğin 157 pozisyonda bulunan yüksek derecede korunmuş olan serin aminoasidinin (Tablo 15) lösin aminoasidi ile yer değiştirmesine (p.L157S) neden olduğu tespit edildi. Mevcut değişiklik literatürde daha önce bildirilmediğinden mutasyon veritabanlarında bulunmamaktadır. 2 no'lu ailenin III.3, III.7, III.9, IV.3 ve IV.4 no'lu bireylerinde de benzer (c.470T>C) değişiklik saptandı (Şekil 11).



Şekil 12: IV.7 no'lu hastanın ve diğer hasta aile bireylerinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.

Tespit edilen varyant ACMG 2015 kriterlerine göre; çeşitli veritabanlarında kontrol gruplarında olmadığı (1 orta), patojenik missense mutasyon tespit edilen bölgede farklı bir missense değişikliği saptandığı (1 orta), varyantın birden çok etkilenmiş bireyde segregasyonu olduğu (1 destekleyici), missense varyantların hastalığın mekanizmasında rol alan bir gende bulunduğu (1 destekleyici), birden çok bilgisayar programlarının gen veya gen ürününün zararlı

olduğunun belirtildiği (1 destekleyici), fenotipi ve aile öyküsü tek bir genetik etiyojisiye sahip hastalıkla uyumlu olduğu (1 destekleyici) kabul edilmektedir.

Tablo 14: 157. pozisyonda bulunan lösin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu

<i>H. sapiens</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>P. Troglodytes</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>M. Mulatta</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>C. Lupus</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>B. taurus</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>M. musculus</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>R. Norvegicus</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>G. gallus</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>D. rerio</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A
<i>X. tropicalis</i>	Q	G	T	F	D	S	Q	S	T	L	R	D	S	A	T	V	F	A

4.3 3 no'lu Aile

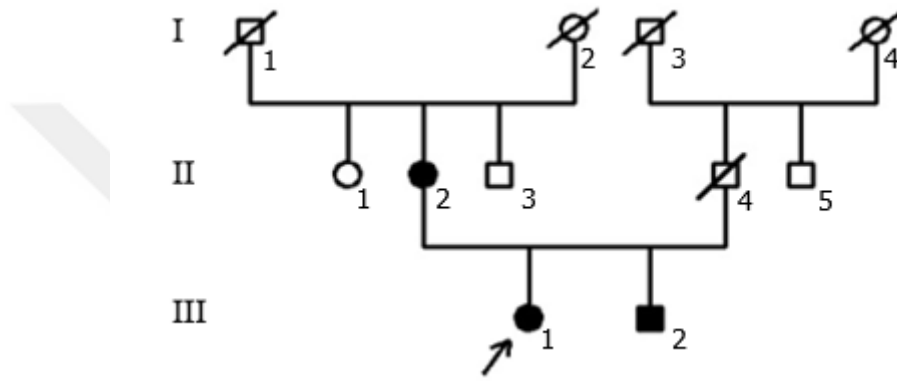
Olgu1 (III.1): 48 yaşında kadın hasta, bacaklarda sertlikten ve hiç yürüyememekten yakınıyordu. 6 yaşında yürürken ayağını yere sürtmeye başladığı. 27 yaşında koltuk değneği, 46 yaşında tekerlekli sandalye kullanmaya başladığı ifade edildi. İdrara ani sıkışma hissi olduğu, idrar ve gayta kontrolü bulunmadığı, her iki gözünden de katarakt ameliyatı olduğu belirtildi. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde ++++ olarak alınıyordu. Plantar yanıt ekstansiyon, bilateral aşıl klonusu pozitif. Her iki ayağında pes kavus deformitesi mevcuttu. EMG normaldi. Kraniyal MR'da patolojik bulgu yoktu. Spinal MR'da L4-L5 ve L5-S1 dural kese basısı mevcut, sinir kökü basısı yoktu.

Olgu2 (III.2): 37 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 7 yaşında başladığı, zamanla ilerleyerek 23 yaşında bacaklarında kasılma ve iğnelenmenin eşlik ettiği belirtildi. Son iki yıldır tripod ile yürüyen hastanın yürürken denge bozukluğu mevcuttu. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı yoktu. Hipertansiyon tanısı alan hasta 5 yıldır antihipertansif ilaç kullanıyordu. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5 (N). DTR alt ekstremitelerde artmış. Plantar yanıt ekstansiyon, bilateral aşıl klonusu pozitif ve yürüyüşü spastik tarzdaydı.

Olgu3 (II.2): 71 yaşında kadın hastanın bacaklarında sertlik vardı ve hiç yürüyemiyordu. Yürüyüş bozukluğunun 7 yaşında başladığı belirtildi. Hasta zamanla tripod kullanmak zorunda

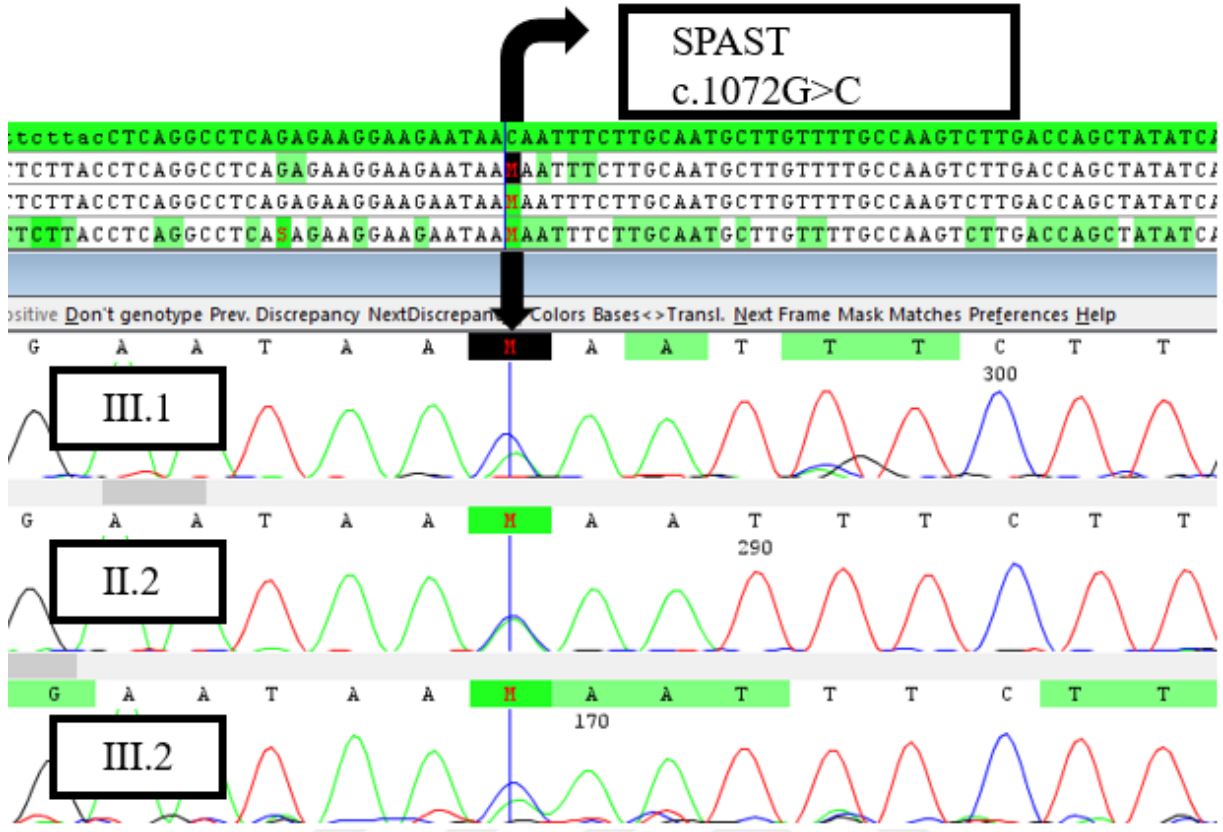
kaldığını, şimdilerde tekerlekli sandalye ile mobilizasyonunu sağladığını ifade etti. Fizik muayenede Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 4/5 (azalmış), DTR üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde alınamadı. Plantar yanıt lakayt ve aşıl klonusu negatifti. Her iki ayağında ileri seviyede pes kavus deformitesi mevcuttu.

3 no'lu ailenin pedigrisinde; II.2 no'lu birey hastaydı. Bir kız (III.1), bir erkek çocuğu da (III.2) benzer fenotipe sahipti. III.1 ve III.2 no'lu bireyler çocuk sahibi değillerdi. 3 no'lu ailenin pedigrisi Şekil 13'de sunuldu.



Şekil 13: 3 no'lu ailenin pedigrisi

III.1 no'lu bireyin *SPAST* geninde NM_001127713 numaralı transkriptin 7. ekzonunda heterozigot 1072'inci pozisyonda bulunan guanin nükleotidinin yerini sitozin nükleotidinin aldığı (c.1072G>C) saptandı. Bu değişikliğin 358 pozisyonda bulunan yüksek derecede korunmuş olan valin aminoasidinin (Tablo 16) lösin ile yer değiştirmesine (p.V358L) neden olduğu tespit edildi. Mevcut değişiklik literatürde daha önce bildirilmediğinden mutasyon veritabanlarında bulunmamaktadır. 3 no'lu ailenin II.2 ve III.2 no'lu bireylerinde de benzer (c.1072G>C) değişiklik saptandı (Şekil 14).



Şekil 14: III.1 no'lu hastanın ve diğer hasta aile bireylerinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.

Tespit edilen varyant ACMG 2015 kriterlerine göre; çeşitli veritabanlarında kontrol gruplarında olmadığı (1 orta), patojenik missense mutasyon tespit edilen bölgede farklı bir missense değişikliğin saptandığı (1 orta), varyantın birden çok etkilenmiş bireyde segregasyonu (1 destekleyici), missense varyantların hastalığın mekanizmasında rol alan bir gende bulunduğu (1 destekleyici), birden çok bilgisayar programlarının gen veya gen ürününün zararlı olduğunun belirtildiği (1 destekleyici), fenotipi ve aile öyküsü tek bir genetik etiyolojisiye sahip hastalıkla uyumlu olduğu (1 destekleyici) kabul edilmektedir.

Tablo 15: 358. pozisyonda bulunan valin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu

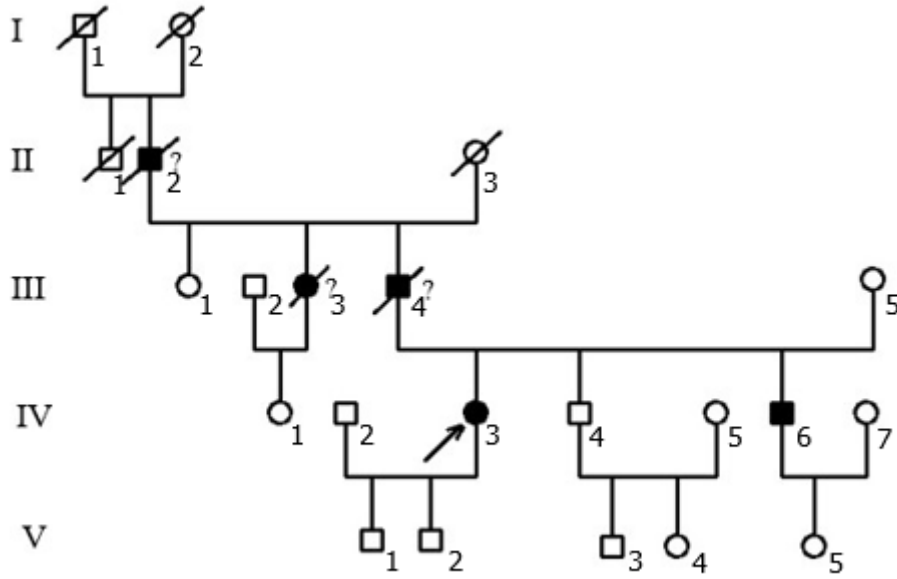
<i>H. sapiens</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>P. Troglodytes</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>M. Mulatta</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>C. Lupus</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>B. taurus</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>M. musculus</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>R. Norvegicus</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>G. gallus</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L
<i>D. rerio</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	A	L	R	P	E	L
<i>X. tropicalis</i>	L	A	K	Q	A	L	Q	E	I	V	I	L	P	S	L	R	P	E	L

4.4 4 no'lu Aile

Olgu1 (IV.3): 50 yaşında kadın hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Bel ağrısının 43 yaşında başladığı zamanla ilerleyerek yürüyüş bozukluğuna yol açtığına ifade edildi. Yürüyüş bozukluğu ilerleyici tarzda olup, zaman içerisinde bacaklarda ağrı ve ayakta kasılmaya neden olmuş. Ani idrara sıkışma hissi ve inkontinansı başlamış. Fizik muayenede; Alt ekstremitede bilateral artmış kas tonusu, dört ekstremitede kas gücü 5/5 (N), derin tendon refleksleri üst ekstremitede ++, alt ekstremitede ++++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, klonus yoktu ve yürüyüş spastik tarzdaydı. EMG ve MR normaldi.

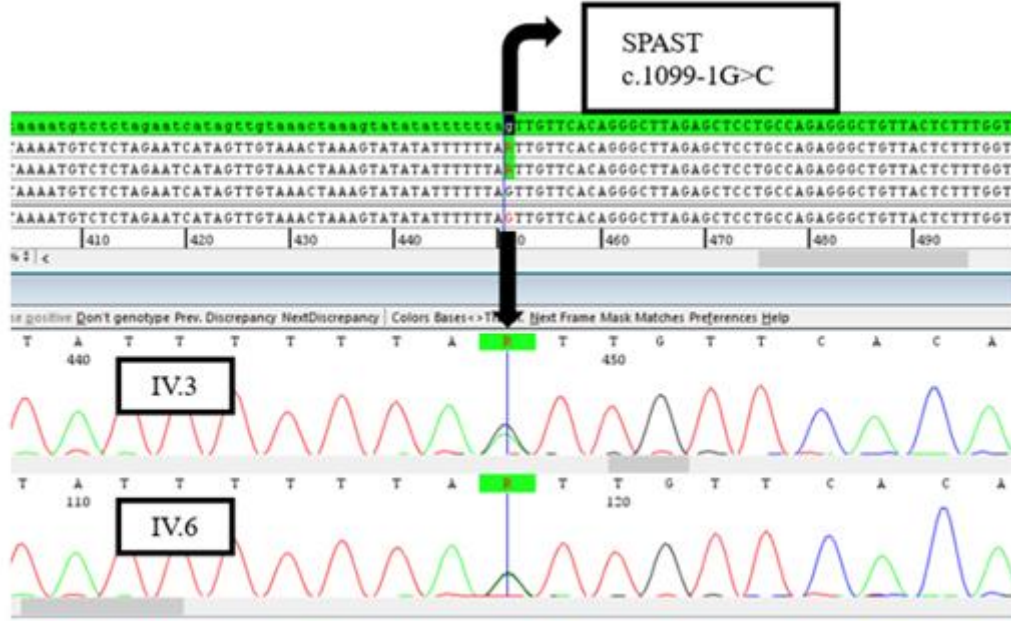
Olgu2 (IV.6): 45 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Bacaklarda ağrı ve kasılmanın 42 yaşında başladığı, zamanla ilerleyerek yürüyüş bozukluğu olduğu ifade edildi. Fizik muayenede; Alt ekstremitede bilateral artmış kas tonusu, dört ekstremitede kas gücü 5/5 (N), derin tendon refleksleri üst ekstremitede ++, alt ekstremitede ++++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, bilateral aşıl klonusu pozitif ve yürüyüş spastik tarzdaydı.

4 no'lu ailenin pedigrisinde; I.1 ve I.2 no'lu bireylerin vefat ettiği ve ailede HSP kliniğine sahip bireylere benzer yakınmalarının olmadığı ifade edildi. Hastalara benzer şikâyetleri olduğu ve vefat ettiği belirtilen II.2, III.3 ve III.4 no'lu bireylerin tarafımızdan muayene edilmediği veya hasta olduklarına ilişkin bir rapor bulunmadığı için (?) işareti ile gösterildi. III.4 no'lu bireyin bir sağlıklı erkek, bir hasta kız (IV.3) ve bir de hasta erkek çocuğu (IV.6) vardı. 4 no'lu ailenin detaylı aile ağacı şekil 15'te gösterildi.



Şekil 15: 4 no'lu ailenin pedigrisi

IV.3 no'lu bireyin *SPAST* geninde NM_001127713 numaralı transkriptin 7. intron ile 8. ekzonun birleşim bölgesinde, 8. ekzonun başlangıcından bir nükleotit önce bulunan guanin nükleotidin yerini heterozigot sitozin nükleotidinin aldığı (c.1099-1G>C) saptandı. Mevcut değişiklik literatürde daha önce bildirilmediğinden mutasyon veritabanlarında bulunmamaktadır. 4 no'lu ailenin IV.6 no'lu bireyinde de benzer (c.1099-1G>C) değişiklik saptandı (Şekil 16).



Şekil 16: IV.3 no'lu hastanın ve diğer hasta aile bireyinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.

Tespit edilen varyantın ACMG 2015 kriterlerine göre; splice site gibi fonksiyon kaybettirici mutasyon olduğu (1 çok güçlü), varyantın birden çok etkilenmiş bireyde segregasyon olduğu (1 destekleyici) fenotipi ve aile öyküsü tek bir genetik etiyolojisiye sahip hastalıkla uyumlu olduğu (1 destekleyici) kabul edilmektedir.

4.5 5 no'lu Aile

Olgu1 (III.5): 49 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. İlk kez 30 yaşında düzgün koşamamaya, 38 yaşından sonra yürüyememeye başladığı, Ani idrar sıkışma hissine inkontinans eşlik ettiği belirtildi. Fizik muayenede; Alt ekstremitelerde bilateral artmış kas tonusu, dört ekstremitelerde kas gücü 5/5 (N), derin tendon refleksleri üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde ++++ olarak alındı. Plantar yanıt ekstansiyon, aşıl klonusu mevcut, yürüyüş spastik tarzdaydı. Kraniyal ve spinal MR'da patolojik tespit edilemedi. EMG ise normaldi.

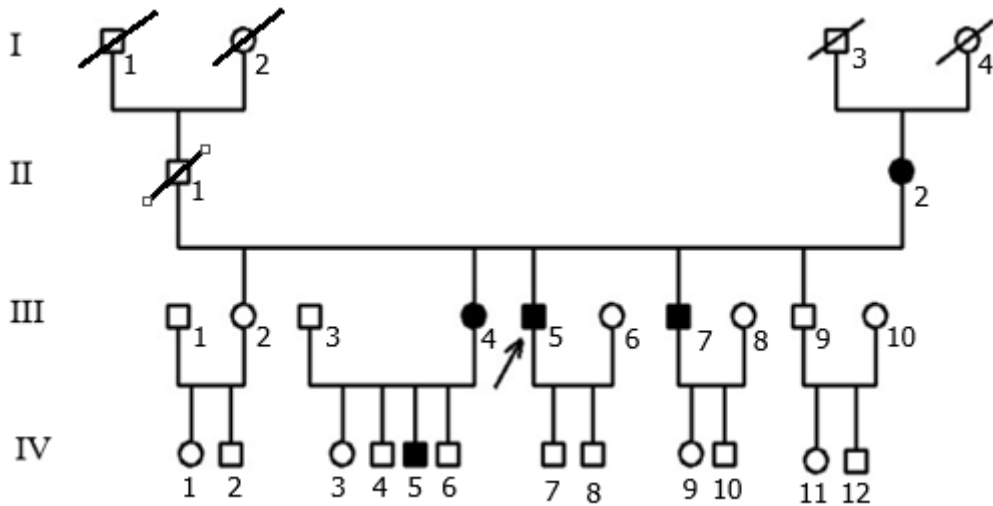
Olgu2 (III.7): 43 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Yürüyüş bozukluğunun 35 yaşında başladığı ifade edildi. İdrara ani sıkışma hissinden yakınmakla birlikte idrar inkontinansı eşlik etmiyordu. Fizik muayenede; Alt ekstremitelerde bilateral artmış kas tonusu, dört ekstremitelerde kas gücü 5/5 (N), derin tendon refleksleri üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde ++++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu vardı ve yürüyüş spastik tarzdaydı.

Olgu3 (II.2): 72 yaşında kadın hastanın bacaklarında belli belirsiz ağrı dışında bir şikâyeti yoktu. Fizik muayenede; Alt ekstremitede bilateral hafif artmış kas tonusu, dört ekstremitede kas gücü 5/5 (N), derin tendon refleksleri üst ekstremitede ++, alt ekstremitede +++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu yok, yürüyüş normaldi.

Olgu4 (III.4): 50 yaşında kadın hastanın uzun süre yürüdüğünde bacaklarda karıcalanma dışında bir şikâyeti yoktu. Fizik muayenede; Alt ekstremitede bilateral hafif artmış kas tonusu, dört ekstremitede kas gücü 5/5, derin tendon refleksleri üst ekstremitede ++, alt ekstremitede +++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu yoktu, yürüyüş normaldi.

Olgu5 (IV.5): 30 yaşında erkek hastanın yürüyüş bozukluğu mevcuttu. Bacaklarda sertleşmenin 28 yaşında başladığı zamanla ileleyerek yürüyüş bozukluğu oluştuğu ifade edildi. Fizik muayenede; Alt ekstremitede bilateral artmış kas tonusu, dört ekstremitede kas gücü 5/5, derin tendon refleksleri üst ekstremitede +++, alt ekstremitede +++ olarak alındı. Plantar yanıt fleksiyon, aşıl klonusu yoktu, yürüyüşü spastik tarzdaydı.

5 no'lu ailenin pedigrisinde; I.3 ve I.4 no'lu bireyler vefat etmiş olup, hasta olup olmadıkları hakkında tıbbi bir bilgi bulunmamaktadır. Hasta II.2 no'lu bireyin sağlıklı 1 kız ve 1 erkek çocuğu, hasta bir kız (III.4) ve iki erkek çocuğu (III.5 ve III.7) vardı. III.4 no'lu bireyin 1 hasta erkek (IV.5), 3 sağlıklı çocuğu vardı. III.5 ve III.7 no'lu birey ise sağlıklı 3 erkek, 1 kız çocuğa sahipti. 5 no'lu ailenin detaylı aile ağacı Şekil 17'de gösterildi.



Şekil 17: 5 no'lu ailenin pedigrisi

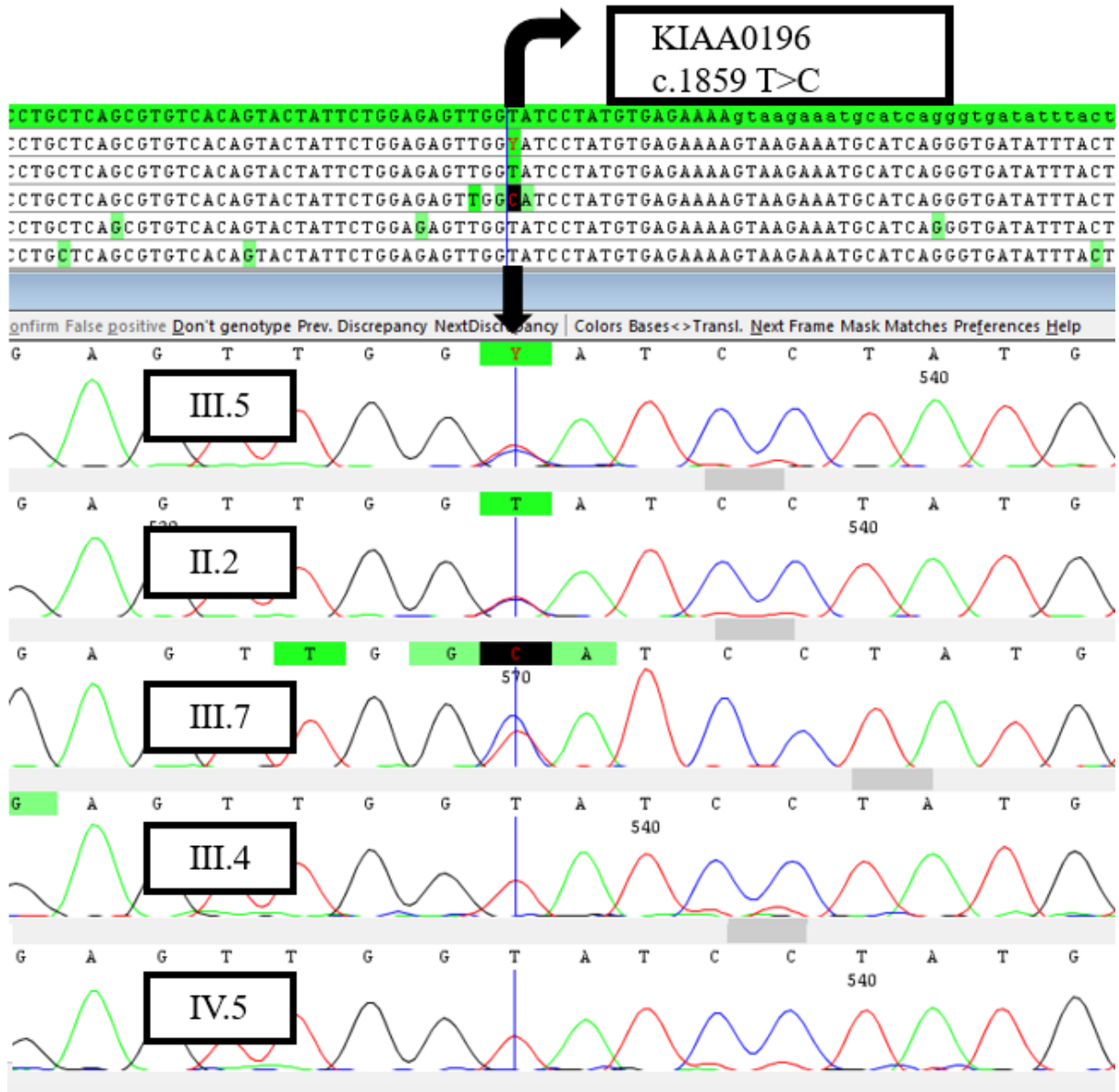
III.5 no'lu bireyin *ATL1*, *SPAST* ve *REEP1* genlerinin SD'sinde HSP ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir mutasyon tespit edilemedi. Proband olarak seçilen III.5 no'lu

bireye TED analizi yapıldı ve HSP ile ilişkilendirilen genlerde toplam 8 varyant belirlendi. Tespit edilen bu varyantlar Tablo 17’de gösterildi.

Tablo 16: III.5 no’lu bireyin TED analizinde belirlenen HSP ile ilişkili varyantlar

Gen	Nükleotit değişikliği	Protein üzerinde değişiklik	Okuma Sayısı	Allel Frekansı (%)	ACMG 2015 Değerlendirmesi	Klinik Önemi
<i>NIP1A</i>	c.249G>A (het)	p.Gly84Asp	23	91.1	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFR</i>	c.1559T>C (het)	p.Ile520Thr	20	30.8	1 Çok Güçlü	Benign
<i>USP8</i>	c.2292C>A (het)	p.Asn764Lys	60	34.4	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFYVE27</i>	c.413G>T (het)	p.Gly138Val	13	73.2	1 Çok Güçlü	Benign
<i>TECPR2</i>	c.2047A>G (homo)	p.Ile683Val	58	28.3	1 Çok Güçlü	Benign
<i>KIAA1840</i>	c.1388T>C (het)	p.Phe463Ser	41	46.5	1 Çok Güçlü	Benign
KIAA0196	c.1859 T>C (het)	p.Val620Ala	51	-		
<i>AP4M1</i>	c.812G>A	p.Arg271His	22	6	1 Çok Güçlü	Benign

Tespit edilen varyantların allel frekansları, KIAA0196 geninde bulunan varyant hariç, %5’den yüksekti (1 çok güçlü benign). Bu varyantlardan KIAA00196 geninde tespit edilen varyantın allel frekansı ise sıfırdı. NM_014846 numaralı transkriptin 15. ekzonunda heterozigot 1859’inci pozisyonda bulunan timin nükleotidinin yerini sitozin nükleotidinin aldığı (c.1859 T>C) saptandı. Bu değişikliğin 620. pozisyonda bulunan yüksek derecede korunmuş olan valin aminoasidinin (Tablo 18) alanin ile yer değiştirmesine (p.V620A) neden olduğu tespit edildi. Belirlenen değişikliğin mutasyon veritabanlarında mevcut olduğu ve literatüde de daha önce bildirildiği saptandı (138). Bulunan varyantın Sanger dizileme ile validasyon çalışması yapıldı. II.2, III.5 ve III.7 no’lu bireylerde belirtilen varyant doğrulanırken, III.4 ve IV.5 no’lu bireylerde ise belirtilen mutasyon doğrulanamadı (Şekil 18).



Şekil 18: III.5 no'lu hastanın ve diğer hasta aile bireyinin Sanger sekans ve segregasyon görüntüleri.

Tablo 17: 620. pozisyonda bulunan valin aminoasidinin farklı türlerdeki yüksek korunmuşluğu

<i>H. sapiens</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>P. Troglodytes</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>M. Mulatta</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>C. Lupus</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>B. taurus</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>M. musculus</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>R. Norvegicus</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>G. gallus</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>D. rerio</i>	V	S	Q	Y	Y	S	G	E	L	V	S	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I
<i>X. tropicalis</i>	V	S	Q	F	Y	S	G	E	L	V	A	Y	V	R	K	V	L	Q	I	I

Bu aşamadan sonra aynı ailede HSP'ye neden olabilecek başka bir genin olup olmadığını belirlemek amacıyla IV.5 no'lu bireye TED analizi yapıldı ve HSP ile ilişkilendirilen genlerde toplam 15 varyant belirlendi. Tespit edilen bu varyantlar tablo 19'da gösterildi.

Tablo 18: IV.5 no'lu bireyin TED analizinde belirlenen HSP ile ilişkili varyantlar

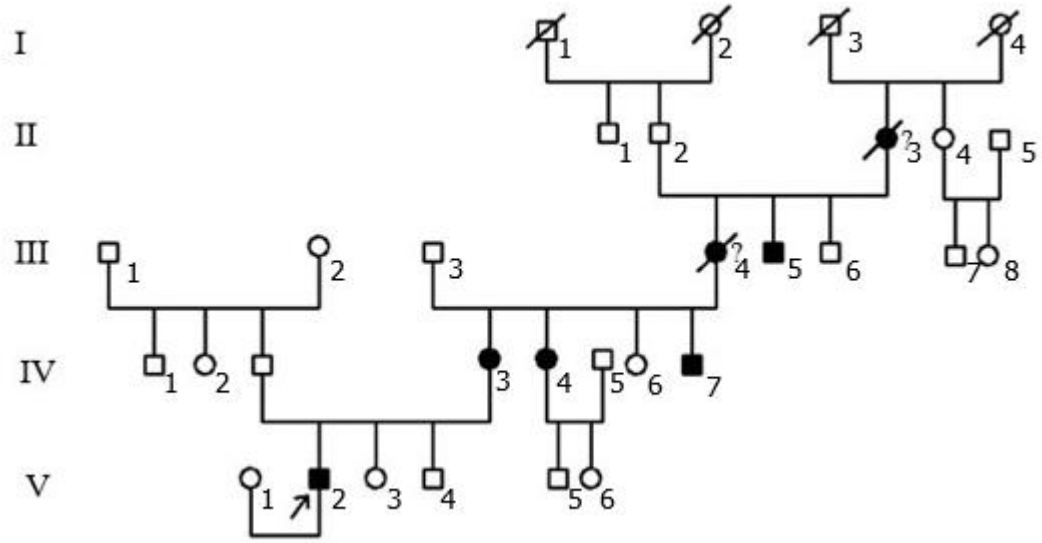
Gen	Nükleotit değişikliği	Protein üzerinde değişiklik	Okuma Sayısı	Allel Frekansı (%)	ACMG 2015 Değerlendirmesi	Klinik Önemi
<i>AP4E1</i>	c.487T>C (homo)	p.Cys163Arg	51	43.5	1 Çok Güçlü	Benign
<i>C12orf65</i>	c.44G>A (het)	p.Arg15Gln	16	2.8	2 Güçlü, 1 Destekleyici	Benign
<i>IBA57</i>	c.134G>C (het)	p.Gly45Ala	15	48.9	1 Çok Güçlü	Benign
<i>RAB3GAP2</i>	c.3275G>C (het)	p.Ser1092Thr	68	8.9	1 Çok Güçlü	Benign
<i>SPG7</i>	c.1507A>G (het)	p.Thr503Ala	46	15	1 Çok Güçlü	Benign
<i>SPG7</i>	c.2063G>A (het)	p.Arg688Gln	14	15	1 Çok Güçlü	Benign
<i>USP8</i>	c.2287C>T (het)	p.Arg763Trp	57	34.1	1 Çok Güçlü	Benign
<i>USP8</i>	c.2292C>A (het)	p.Asn764Lys	60	34.4	1 Çok Güçlü	Benign
<i>USP8</i>	c.2327T>C (het)	p.Leu776Pro	60	0.8	2 Güçlü	Benign
<i>ZFR</i>	c.1381G>A (het)	p.Val461Ile	47	93.6	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFYVE26</i>	c.5672A>G (homo)	p.Asn1891Ser	27	95.4	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFYVE27</i>	c.244G>A (het)	p.Val82Ile	48	3.3	2 Güçlü, 1 Destekleyici	Benign
<i>ZFYVE27</i>	c.413G>T (homo)	p.Gly138Val	14	73.2	1 Çok Güçlü	Benign
<i>PNPLA6</i>	c.1280-6C>T (het)	-	44	28.1	1 Çok Güçlü	Benign
<i>SPG7</i>	c.987+5A>G (het)	-	61	47.3	1 Çok Güçlü	Benign

Tespit edilen varyantların allel frekansları, üç varyant hariç, %5'den yüksekti (1 çok güçlü benign). *ZFYVE27* ve *C12orf65* genlerinde bulunan varyantların allel frekansı %5'in altında bulundu. Mevcut varyantların frekansı hastalığın frekansından yüksek olması (1 güçlü) ve tam penetre olması beklenen heterozigot varyantın sağlıklı yetişkin bireylerde gözlenmesi nedeniyle (1 güçlü), in silico programlarda patojenitesinin gösterilememesi (1 destekleyici) ACMG 2015 sınıflandırmasına göre benign olarak kabul edildi. *USP8*'de 2 güçlü benign kriteri bulunmasına rağmen, in silico programlarda patojenik olabileceği belirtilmiş, ancak 2 güçlü bulgu nedeniyle benign olarak değerlendirilmiştir.

4.6 6 no'lu Aile

Olgu1 (V.2): 34 yaşında erkek hastanın bacaklarda kasılma, uyuşma ve yürüyüş bozukluğu mevcuttu. İlk kez ayağını yere sürtmeye 23 yaşında başladığı, şikâyetlerin zamanla ilerlediği, ani idrara sıkışma hissi olduğu buna ara ara idrar inkontinansı eşlik ettiği ifade edildi. Fizik muayenede; Kas tonusu bilateral alt ekstremitelerde artmış (spastisite), kas gücü tüm ekstremitelerde 5/5(N). derin tendon refleksleri üst ekstremitelerde ++, alt ekstremitelerde ++++ olarak alındı. Plantar yanıt lakayt, aşıl klonusu yok, yürüyüş spastik tarzdaydı. Kraniyal MR'da frontoparietalde hafif gliotik odak mevcuttu. Spinal MR'da ve EMG'de patolojik bulgu saptanmadı.

6 no'lu ailenin pedigrisinde; II.3 ve III.4 no'lu bireylerin hastalara benzer şikâyetleri olduğu ancak vefat ettiği, tarafımızdan muayene edilemediği veya hasta olduklarına ilişkin bir rapor bulunmadığı için (?) işareti ile gösterildi. II.3 no'lu bireyin 1 sağlıklı ve 1 hasta erkek (III.5) çocuğu vardı. III.4 no'lu bireyin 2 sağlıklı kızı, 1 hasta erkek (IV.7) ve iki hasta kızı (IV.3 ve IV.4) vardı. IV.3 no'lu birey sağlıklı 1 kız, 1 erkek, hasta 1 erkek çocuğa (V.2) sahipti. 6 no'lu ailenin detaylı pedigrisi şekil 19'da gösterildi.



Şekil 19: 6 no'lu ailenin pedigrisi

V.2 no'lu bireyin SD analizinde *ATL1*, *SPAST* ve *REEP1* genlerinde HSP ile ilişkili herhangi bir mutasyon tespit edilemedi. Bu bireye TED analizi yapıldı ve HSP ile ilişkili genlerde toplam 15 varyant belirlendi. Tespit edilen varyantlar tablo 20'de gösterildi.

Tablo 19: V.2 no'lu bireyin TED analizinde belirlenen HSP ile ilişkili varyantlar

Gen	Nükleotit değişikliği	Protein üzerinde değişiklik	Okuma Sayısı	Allel Frekansı (%)	ACMG 2015 Değerlendirmesi	Klinik Önemi
<i>ENTPD1</i>	c.190A>G (het)	p.Asn64Asp	21	10.62	1 Çok Güçlü	Benign
<i>NT5C2</i>	c.7A>G (het)	p.Thr3Ala	11	11.3	1 Çok Güçlü	Benign
<i>RAB3GAP2</i>	c.3275G>C (het)	p.Ser1092Thr	44	8.9	1 Çok Güçlü	Benign
<i>SLC16A2</i>	c.97T>C (homo)	p.Ser33Pro	10	56	1 Çok Güçlü	Benign
<i>SPG7</i>	c.1507A>G (het)	p.Thr503Ala	46	15	1 Çok Güçlü	Benign
<i>USP8</i>	c.2287C>T (het)	p.Arg763Trp	40	34.1	1 Çok Güçlü	Benign
<i>USP8</i>	c.2292C>A (het)	p.Asn764Lys	42	34.4	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFR</i>	c.1559T>C (homo)	p.Ile520Thr	20	30.8	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFR</i>	c.1381G>A (het)	p.Val461Ile	46	93.6	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFYVE26</i>	c.5672A>G (het)	p.Asn1891Ser	11	95.4	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFYVE26</i>	c.3308C>T (het)	p.Pro1103Leu	34	4.6	2 Güçlü, 1 Destekleyici	Benign
<i>ZFYVE27</i>	c.413G>T (het)	p.Gly138Val	13	73.2	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ATL1</i>	c.630+7G>A (het)	-	40	13.3	1 Çok Güçlü	Benign
<i>SPG7</i>	c.987+5A>G ((het)	-	54	47.3	1 Çok Güçlü	Benign
<i>ZFYVE26</i>	c.2332+7delT (het)	-	44	3.5	2 Güçlü, 1 Destekleyici	Benign

Tespit edilen varyantların allel frekansları, iki varyant hariç, %5'den yüksekti (1 çok güçlü benign). *ZFYVE26* gendeki iki varyantın allel frekansı %5'in altında bulundu. Mevcut varyantların frekansı hastalığın frekansından yüksek olması (1 güçlü) ve tam penetre olması, beklenen heterozigot varyantın sağlıklı yetişkin bireylerde gözlenmesi (1 güçlü), in silico programlarda patojenitesinin gösterilememesi (1 destekleyici) nedeniyle ACMG 2015 sınıflandırmasına göre benign olarak kabul edildi.

5 TARTIŞMA

Hereditör Spastik Paraparezi (HSP) OR, OD, X'e bağı kalıtılabilen alt ekstremitelerde spastisite ve yürüme güçlüğü ile karakterize genetik bir hastalıktır. Temel olarak klinik bulgulara ve tutulum yerine göre "saf" ve "kompleks" olmak üzere iki tipi vardır. Saf HSP hastalarında genellikle ilerleyici yürüme bozukluğu ve bacaklarda sertlik dışında bir bulguya rastlanmaz (60). Doğum sürecini takip eden normal nöromotor gelişim sonrasında yaşamın herhangi bir döneminde başlayabilir, alevlenme ve remisyon dönemleri gözlenmez. HSP'nin her iki tipinde de klinik bulgularının ortaya çıkma dönemi birbirinden farklılık gösterir. Başlangıç döneminde ailelerin veya hastaların kendilerinin fark ettiği yürüyüş bozukluğu mevcuttur. Yürüyüş bozukluğu uzun yıllar boyu yavaş bir progresyon gösterebilir ve koltuk değneği, tripod ve tekerlekli sandalye kullanmalarını gerektirebilir. Kompleks HSP'de ise, saf HSP'ye ek olarak nörolojik ve/veya nörolojik olmayan anomalilerin eşlik etmesi beklenir.

HSP ilişkili genlerde tespit edilen mutasyonlara göre alt tiplere ayrılır. Bugüne kadar, OR, OD veya X'e bağı kalıtılan 76'dan fazla farklı HSP alt tipi tanımlanmıştır. Bunlardan 19'u OD kalıtım paternine sahiptir. OD geçişli en sık görülen alt tip SPG4'tür. SPG3A ve SPG31 ise SPG4'ten sonra sık görülen diğer iki alt tiptir. HSP'de alt tipler mutasyon bulunan gene göre isimlendirilir. OD-HSP'de alt tiplendirme amacıyla yapılan farklı çalışmalarda hastaların %50-60'ının alt tipinin SPG4, SPG3A ve SPG31 olduğu tespit edilmiştir (60). Fenotipe neden olan mutasyonların büyük kısmı missense, nonsense, küçük delesyon ve insersiyonlardan oluşmaktadır. Bunun yanında SPG4, SPG3A ve SPG31'e kliniğine *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerindeki büyük ekzonik delesyonların da neden olduğu bildirilmiştir (60, 66, 75, 139). Bu nedenle bazı derlemelerde ilk aşamada SPG4, SPG3A ve SPG31 fenotipine neden olan *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerinde mutasyon bulunup bulunmadığının araştırılması tavsiye edilmektedir (140). OD kalıtılan diğer 16 alt tip ise SPG6, SPG8, SPG9, SPG10, SPG12, SPG13, SPG17, SPG19, SPG29, SPG33, SPG36, SPG37, SPG38, SPG40, SPG41, SPG42 ve SPG73'den oluşmaktadır.

Sanger Dizileme (SD) birçok mendeliyan hastalığın moleküler genetik etiolojisinin aydınlatılmasında kullanılan bir metottur. Klinik ve rutin laboratuvar bulgularıyla OD-HSP tanısı almış bireylerde SPG4, SPG3A ve SPG31'e neden olan mutasyonun tanımlanması için SD yöntemi kullanılarak birçok çalışma yapılmış ve hastaların moleküler genetik etiolojisi aydınlatılmıştır (141-143). Ancak HSP'nin klinik ve genetik açıdan heterojen bir hastalık olması, hastalıktan sorumlu 76 farklı genin bulunması, SD metodunun kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle ilişkili genlerin tamamının daha hızlı ve uygun maliyetle

taranabilmesinin gereği ortaya çıkmıştır. Tüm ekzom dizileme (TED) yöntemi, bu amaçla multigenik Mendelyan geçişli hastalıkların moleküler genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında kullanılmaya başlamıştır. HSP tanılı bireylerde SD yapılmaksızın ilk aşamada TED yöntemi ile hem SPG4, SPG3A ve SPG31 gibi sık rastlanılan alt tipler (139, 140), hem de SPG8, SPG10, SPG12 veya SPG35 gibi daha nadir alt tipler belirlenmiştir (137, 138). 2014 yılında Novarino ve ark.'nın yaptığı kapsamlı bir çalışmada TED yöntemi kullanılarak 18 farklı yeni HSP alt tipi ve bunlarla ilişkili genler ortaya konulmuştur. Ayrıca daha önceden bildirilmiş genler ile yeni tanımlanan genler arasında etkileşimler incelenmiş ve HSPosome adı verilen ileride yapılacak çalışmalara rehberlik etmesi amacıyla bir gen etkileşim ağı tanımlanmıştır (12).

Çalışmamızın ilk aşamasında saf tip OD HSP tanısı ile takip edilen ailelerden seçilen bir hasta bireyin *ATL1*, *SPAST* ve *REEP1* genlerine yönelik SD yapıldı. Mutasyon saptanan bireylerin ailelerinde aynı mutasyon taranarak diğer aile bireylerinin de moleküler genetik etiyolojisi aydınlatıldı. İkinci aşamada SD ile *ATL1*, *SPAST* ve *REEP1* genlerinde mutasyon saptanamayan bireylere TED yapıldı. HSP ile ilişkili genlerdeki patojenik varyantlar hem TED yapılan bireyde, hem de diğer aile bireylerinde SD ile doğrulandı.

Bir no'lu ailedeki hastaların *ATL1* geninde c.776C>A mutasyonu bulundu. Bu hastalar SPG3A alt tip tanısı aldı. Hastaların klinik belirtilerinin ortaya çıkma yaşı SPG3A tanısı alanlara benzer olarak 4 yaş olup, yürümeyi destekleyici cihaz kullanımı oldukça nadirdi. Hastaların çoğunda tespit edilen hiperaktif mesane SPG3A'da görülen bir bulgu olmasına rağmen, diğer HSP alt tiplerinde nadir görülmektedir (75). Hiperaktif mesane, sinir sisteminde bir hasar nedeniyle normal mesane fonksiyonunun kaybına bağlı olarak ortaya çıkar (144). Hastalarımızın çoğunda daha önce SPG3A tanısı alan bireylere benzer şekilde kardinal bulgulara eşlik eden iskelet deformitesi vardı. Pes kavus ve skolyoz gibi iskelet deformiteleri diğer HSP alt tiplerine kıyasla SPG3A'da daha sık görülmektedir (75). Pes kavus ayağın intrinsik kasları ile bacak kasları arasındaki innervasyon dengesizliği neticesinde ortaya çıkan bir deformitedir (145). Skolyozun ise vücudun postural kaslarının asimetrik innervasyonu ile ilgili olduğu belirtilmektedir (146). Görüntüleme çalışmalarında hafif spinal atrofi gibi bulgular beklenmesine rağmen hastalarımızın birinde tespit edilen torakal siringomyelinin klinik bir yansıması olmaması nedeniyle insidental bir bulgu olarak kabul edildi. Aile ağacı analizinde; Birinci kuşaktakilerin hasta olmadığı, ikinci kuşaktakilerin ise hasta olduğunun ifade edilmesi, birinci kuşaktaki ebeveynlerden birinin germline mozaik bir mutasyon, ya da hastalığın farkedilmeyecek kadar hafif bir formu veya her iki ebeveynin de sağlıklı kişiler olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. İkinci kuşakta iki bireyin hasta olduğunun belirtilmesi, birinci

kuşaktaki ebeveynlerden birinin germline mozaik bir mutasyona sahip olma olasılığını güçlendirmektedir. Hastalığın ikinci kuşaktan itibaren vertikal olarak, kuşak atlamaksızın ve cinsiyet ayrımı gözetmeksizin devam etmesi ve mutasyonun gösterilmesi otozomal dominant kalıtım ile uyumludur.

Hastanın hikayesi, fizik muayenesi, aile ağacı analizi ve diğer tetkikler birlikte değerlendirildiğinde saf tip OD-HSP kabul edildi. yapılan SD’de 6 hastanın tamamında *ATL1* geninde literatürde HSP fenotipine neden olduğu bildirilen heterozigot c.776C>A mutasyonu saptandı. Tespit edilen heterozigot mutasyon (c.776C>A, p.S259Y) *ATL1* geninin 8. ekzonunda 776. pozisyonda bulunan sitozin nükleotidinin adenin nükleotidi ile yer değiştirmesi, 259. pozisyonda bulunan serin aminoasidinin tirozin ile yer değiştirmesine yolaçmaktadır. Literatürde bildirilen 70’den fazla *ATL1* mutasyonun büyük kısmı missens ve nonsens, küçük bir kısmı ise splicing, küçük delesyon ve insersiyonlardan oluşmaktadır (142). Belirlediğimiz değişiklik missens mutasyon tipindedir. Ayrıca *ATL1*’de büyük ekzon delesyonları da bildirilmiştir (143). *ATL1* geninde bulunan mutasyonlar SPG3A alt tip olarak adlandırılmaktadır. Mutasyonun ilk defa tanımlandığı hastalarda izole alt ekstremite spastisitesi dışında başka bir bulgu olmadığı bildirilmiştir (147). Bizim hastalarımızda hastalığın kliniğine iskelet deformiteleri ve üriner semptomların da katılması hastalığın heterojen karakteriyle izah edilmiştir.

İki no’lu ailedeki hastaların *ATL1* geninde c.470T>C mutasyonu bulunduğu hastalar SPG3A alt tip tanısı aldı. Hastaların klinik belirtilerin ortaya çıkma yaşı SPG3A tanısı alan hastalara benzer olarak 4 yaştı. Bu tip hastalarda yürümeyi destekleyici cihaz kullanımının oldukça nadir olduğu bildirilmiştir. Hiperaktif mesane SPG3A’da sıklıkla tespit edilen bir bulgu olmasına rağmen diğer HSP tiplerinde daha nadir görülmektedir (75). Aile içerisindeki bireyler fenotip olarak birbirinden çok farklı olduğu gibi, yürümeyi destekleyici cihaz kullanımında daha fazla olması SPG3A’nın aile içerisinde de yüksek oranda heterojeniteyle ilgili olabilir. Bilateral alt ekstremitelerde kas tonusu artışı ve spastik yürüme paterni SPG3A’nın kardinal fizik muayene bulgusu olarak bildirilmektedir. Ayrıca pes kavus ve skolyoz gibi iskelet deformiteleri diğer HSP alt tiplerine kıyasla SPG3A’da daha sık görülmektedir (75). Literatür ile uyumlu olarak hastalarımızın yaklaşık yarısında kardinal bulguya eşlik eden iskelet deformiteleri de vardı. Probandın EMG’sinde, kranial ve spinal MR incelemelerinde patolojik bir bulguya rastlanılmaması HSP hastalarında beklenen bir durumdur. Aile ağacı analizinde; vefat etmiş ve yakınları tarafından hasta olduğu ifade edilen II.3 no’lu bireyde *de novo* mutasyon meydana gelmiş olabilir. Hastalığın çocuklarına ve torunlarına kuşak atlamaksızın ve cinsiyet ayrımı

gözetmeksizin geçmesi ve mutasyonun gösterilmiş olması otozomal dominant kalıtımı onaylamaktadır.

Hastanın hikayesi, fizik muayenesi, aile ağacı analizi ve diğer tetkikler birlikte değerlendirildiğinde saf tip OD-HSP kabul edilen 6 hastaya SD yapıldı ve *ATL1* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş c.470T>C, p.L157S değişikliği saptandı. Bu yeni mutasyon “Exome Sequencing Project”, “1000 Genomes Project” veya “Exome Aggregation Consortium” veritabanlarında bulunmamaktadır. “MutationTaster” ve “Polyphen2” gibi in silico prediktif programlarda ise bu değişikliğin proteinde fonksiyon kaybına neden olabileceği belirtilmektedir. Tespit edilen bu varyant ACMG 2015 kriterlerine göre 2 orta ve 4 destekleyici bulgu ile olası patojen olarak değerlendirilmektedir. *ATL1* geninde tespit edilen bu mutasyon; (c.470T>C, p.L157S) 4. ekzonda 470. Pozisyonda bulunan timin nükleotidinin sitozin nükleotidi ile yer değiştirmesi sonucu 157. pozisyonda bulunan lösin aminoasidinin triptofan ile yer değiştirmesine yol açmaktadır. Literatürde p.L157S değişikliği daha önce bildirilmemiş olmasına rağmen, p.L157W değişikliği sadece bir ailede bildirilmiştir. Çocukluk çağı başlangıçlı, progresyon göstermeyen diplejik serebral palsi tanısı ile takip edilen kadın hastada klonus, reflekslerin canlı olması ve spastik tarzda yürüyüş paterni bildirilmiştir. Hastanın birinci çocuğunda 9. ayda dipleji farketmesinin ardından, aile HSP tanısı ile tekrar değerlendirilmiş ve p.L157W değişikliği anne ve çocukta tespit edilmiştir. Her iki bireyde de saf HSP tablosu mevcut olup üriner disfonksiyon bildirilmemiştir (146). 2 no’lu ailede tüm bireylerde bacaklardaki spastisite p.L157W mutasyonuna sahip olan bireyler gibi yaşamın ilk yılında başlamıştı. *ATL1* geninin kodladığı *Atlastin1* proteininin bu bölgesinde görülecek olası bir bozukluğun klinik bulguların daha erken evrede ortaya çıkmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Bir hastada eşlik eden hem pes kavus, hem de üriner inkontinans varken, diğer hastada sadece üriner inkontinans vardı. İskelet deformiteleri ve üriner sorunların SPG3A tanısı alan bireylerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir (75).

Üç no’lu ailedeki hastaların *SPAST* geninde c.1072G>C mutasyonu bulunduğundan hastalar SPG4 alt tip tanısı aldı. 3 no’lu ailede literatür ile uyumlu olarak SPG4 için tanı alma yaşı 7 olup, SPG4 tanısı alan hastalara sıklıkla 1. ve 3. dekadın başında tanı konulmaktadır. SPG4 tanısı alan hastalarda sıklıkla idrara ani sıkışma hissi de vardır. Literatürde SPG4 hastalarında sfinkter kusuru hastaların 1/3’ünde bildirilirken, hastalarımızda bu oran 2/3’tü. Tekerlekli sandalye kullanma oranı % 17 iken, hastalarımızda bu oran %66’dır. Bu farklılığın hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hastalarımızın %66’sında pes kavus deformitesi vardı. İskelet deformiteleri ile SPG4 arasında ilişkiyi ortaya koyabilecek bir

çalışma bulunmamasına rağmen, hastalarda pes kavus gibi deformitelerin bulunabileceği vurgulanmıştır (66). Probandın EMG'sinde, kranial ve spinal MR incelemelerinde patolojik bir bulguya rastlanılmaması HSP hastalarında beklenen bir durumdur. Aile ağacı analizinde probandın annesinden daha üst kuşakların vefat ettiği, bu kuşakta hastalık belirtisi olmaması probandın annesinde *de novo* mutasyon sonucu hastalığın ortaya çıktığını düşündürmektedir. Annenin bir erkek ve bir kız çocuğunun hasta olması mitokondriyel kalıtımı da akla getirmekle birlikte mutasyonun ortaya çıkarılması mitokondriyel kalıtımı dışlamaktadır.

Hastanın hikayesi, fizik muayenesi, aile ağacı analizi ve diğer tetkikler birlikte değerlendirildiğinde saf tip OD-HSP kabul edilen 3 hastada yapılan SD'de *SPAST* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş heterozigot c.1072G>C, p.V358L değişikliği saptandı. Tespit edilen heterozigot mutasyon; (c.1072G>C, p.V358L) 7. ekzonda 1072. pozisyonda bulunan guanin nükleotidinin sitozin nükleotidi ile yer değiştirmesi sonucunda 358. pozisyonda bulunan valin aminoasidinin lösin ile yer değiştirmesine neden olmaktadır. Bu yeni mutasyon "Exome Sequencing Project", "1000 Genomes Project" veya "Exome Aggregation Consortium" veritabanlarında bulunmamaktadır. Ancak *SPAST* geninin AAA domaininde daha önce missense mutasyonların HSP fenotipine neden olduğu bildirilmiştir. "MutationTaster" ve "Polyphen2" gibi in silico prediktif programlarda ise bu değişikliğin proteinde fonksiyon kaybına neden olabileceği belirtilmektedir. Bulduğumuz bu yeni mutasyon ACMG 2015 kriterlerine göre 2 orta ve 4 destekleyici bulgu ile olası patojen olarak değerlendirildi. Bu yeni mutasyonun hastalığın moleküler genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında önemli olduğu ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Dört no'lu ailede iki hastada klinik bulguların ortaya çıkış zamanı ve karakteri literatürde SPG4 tanısı alan bireylere benzerdi. Fizik muayenede hastalarımızın tamamında SPG4'ün kardinal klinik bulgusu olan bilateral alt ekstremite kas tonusu artmış, derin tendon refleksleri canlı ve yürüyüşleri spastik tarzdaydı. Probandın EMG'sinde, kranial ve spinal MR incelemelerinde patolojik bir bulguya rastlanılmaması HSP hastalarında beklenen bir durumdur. Aile ağacı analizinde; hastalığın erkek bireyden kız ve erkek çocuklarına geçtiği, hastalığın vertikal olarak kuşak atlamaksızın ve cinsiyet ayrımı gözetmeksizin aktarıldığı, bu tip geçiş özelliğinin otozomal dominant kalıtım ile uyumlu olduğu kabul edildi.

Hastanın hikayesi, fizik muayenesi, aile ağacı analizi ve diğer tetkikler birlikte değerlendirildiğinde saf tip OD-HSP kabul edilen 2 hastada yapılan SD'de *SPAST* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş heterozigot c.1099-1G>C değişikliği saptandı. Tespit edilen bu mutasyon; (c.1099-1G>C) 7. intron ile 8. ekzonun birleşim bölgesinde, 8. Ekzonun

başlangıcından bir nükleotit önce bulunan guanin nükleotidinin yerini heterozigot sitozin nükleotidinin alması olarak değerlendirilmektedir. Bu yeni mutasyon “Exome Sequencing Project”, “1000 Genomes Project” veya “Exome Aggregation Consortium” veritabanlarında bulunmamaktadır. Splicing bölgesinde yer alan bu mutasyonun kırılma hatalarına neden olabileceği, hatalı protein oluşumunun fonksiyon kaybına yol açabileceği belirtilmektedir (148). Bu nedenle tespit edilen varyant ACMG 2015’e göre 1 çok güçlü ve 2 destekleyici bulgu ile patojenite lehine değerlendirildi. Bu yeni mutasyon hastalığın moleküler genetik etiyojisinin aydınlatılmasında önemli olduğu gibi literatüre de katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Beş no’lu ailede iki hastada klinik bulguların ortaya çıkış zamanı ve karakteri literatürde SPG8 tanısı alan bireylere benzer olup, 3 hastamızdan ikisi yürümek için yardımcı cihaz kullanıyordu. SPG8 diğer alt tiplerden daha ciddi seyreder ve hastalar 3. veya 4. dekada tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelir (138). Bizim hastalarımızın klinik tablolarının bu kadar şiddetli ve ilerleyici olmaması hastalığın ekspresyon farklılığından kaynaklanmış olabilir (60). Daha önce bildirilen bizim saptadığımız mutasyonu taşıyan hastalarda klinik tablo ilerleyici değildi (138). Hastaların üriner şikayetleri ve fizik muayene bulguları ise SPG8 tanılı hastalara benzerdi (140). Probandın EMG’sinde, kranial ve spinal MR incelemelerinde patolojik bir bulguya rastlanılmaması HSP hastalarında beklenen bir durumdur. Aile ağacı analizinde; sadece kadın hastalardan erkek ve kız çocuklarına hastalığın geçtiği tespit edildi. Hasta erkeklerin çocuklarının hastalığın klinik belirti ve bulgularının ortaya çıkması için henüz yaşlarının küçük olması, hastalığın dışıdan dışıya geçmesi, mitokondriyel kalıtımı da akla getirmekle birlikte, mutasyonun ortaya çıkarılmasıyla mitokondriyel kalıtım dışlanmıştır.

Hastanın hikayesi, fizik muayenesi, aile ağacı analizi ve diğer tetkikler birlikte değerlendirildiğinde saf tip OD-HSP kabul edilen III.5 no’lu hastaya yapılan SD’de OD-HSP kliniğine neden olabilecek herhangi bir varyant tespit edilemedi. III.5 no’lu bireye yapılan TED’de HSP ilişkili genlerde toplam 8 varyant saptandı. Allel frekansı %5’in üzerinde olan 7 varyant ACMG 2015’e göre benign kabul edildi. Allel frekansı sıfır olan *KIAA0196* genindeki heterozigot c.1859 T> C varyantın ise literatürde HSP fenotipine neden olduğu bildirilmiştir (138). Bu mutasyonun validasyonu için yapılan SD’de anne (II.2) ve iki oğlunda (III.7) aynı mutasyon gösterilirken diğer iki hasta bireyde (III.4 ve IV.5) mutasyon gösterilemedi. Tespit edilen bu mutasyon; (c.1859 T> C, p.V620A) *KIAA0196* geninin 15. ekzonunda 1859. pozisyonunda bulunan timin nükleotidinin sitozin nükleotidi ile yer değiştirmesi sonucunda 620. pozisyonunda bulunan valin aminoasidinin alanin ile yer değiştirmesine neden olmaktadır.

Günümüze kadar *KIAA0196* geninde toplam 14 adet mutasyon tanımlanmış olup, bunların tamamı missenstir. Bizim bulduğumuz p.V620A mutasyonu da missens olup daha önce bir ailede bildirilmiştir (138). Literatürde bildirilmiş bu ailede, bizim ailemizdeki bulgulara benzer olarak probandin şikâyeti 22 yaşında bacaklarda güçsüzlük olarak ortaya çıkmış, annesinde ise semptomlar 30'lu yaşlarda başlamıştı. Probandda birinci motor nöron bulguları ile pes kavus ve idrara ani sıkışma hissi mevcut olup, annesinde klinik detay belirtilmemiştir. Literatürde bildirilmiş bu ailenin üst kuşaklarında spinoserebellar ataksi tip 6'ya (SCA6) neden olduğu tespit edilmiş, ancak bu mutasyon yukarıda belirtilen iki hastada gösterilememiştir. İki bireye, olası başka mutasyon veya mutasyonların saptanması için TED analizi yapılmış, analiz neticesinde anılan iki bireyde de SPG8 alt tip olarak kabul edilen *KIAA0196* geninde p.V620A mutasyonu tespit edilmiştir. Böylece spinoserebellar ataksi tip 6 ile HSP alt tip 8 aynı ailede farklı bireylerde saptanmıştır. Aynı ailede birden fazla nörolojik hastalık görülmesi, bir ailede farklı alt tip HSP'lerin de olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu lokus heterojenitesi ile izah edilebilir. Bu mutasyonlar açısından beş no'lu ailedeki IV.5 no'lu bireye TED yapıldı. Tespit edilen 19 varyanttan allel frekansı %5'in üzerinde olan 16 varyant ACMG 2015'e göre benign kabul edildi. Allel frekansı %5'in altında olan *ZFYVE27* ve *C12orf65* genlerindeki varyantların frekanslarının hastalık frekansından yüksek olması, sağlıklı yetişkin bireylerde mevcut olması ve in silico programlarda patojenitesinin gösterilememesi nedeniyle ACMG 2015'e göre benign kabul edildi. *USP8* genindeki c.2327C>T varyantının yukarıda belirtilen iki varyanttan farklı olarak in silico programlarda patojenik olabileceği belirtilmiştir. Bu gendeki mutasyonlar OR kalıtılan SPG59 alt tipine neden olmaktadır. Şimdiye kadar bu gende HSP fenotipine sahip olan bir ailede tek bir homozigot mutasyon gösterilmiştir (12). Literatürde *USP8* c.2327C>T varyantı heterozigot taşıyan 1011 olgu bildirilmiş, ancak hiç birinde HSP veya HSP benzeri bulgu bildirilmemiştir. Hem kalıtım kalıbının uyumlu olmaması hem de bu varyantı taşıyan bireylerde benzer fenotipin görülmemesi nedeniyle bu varyantın hastalık yapıcı etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Sonuç olarak beş no'lu ailedeki iki hastada da mutasyon bulunamadığı için genetik etioloji aydınlatılamamıştır.

Altı no'lu ailede hastanın başlangıç şikâyetleri yürüyüş bozukluğu ve bacaklarda sertleşmeydi. Klinik belirtilerin ortaya çıkış zamanı 25 yaşı. Hastanın klinik ve fizik muayene bulguları HSP ile uyumluydu. Probandın EMG'sinde, kranial ve spinal MR incelemelerinde patolojik bir bulguya rastlanılmaması HSP hastalarında beklenen bir durumdur. Kalıtımın kuşaklar arasında geçiş özelliklerine bakıldığında, hastalığın dışıdan dışıye aktarıldığı görülmektedir. Erkek hastaların henüz çocuk sahibi olmamaları nedeniyle mitokondriyel

kalıtım dışlanamadı. Ancak HSP benzeri fenotipe sahip kompleks tipte paraplejiye sahip olan mitokondriyal geçişin çok nadir olması nedeniyle mitokondriyel kalıttan çok otozomal dominant kalıtım paternine uygun olduğu kabul edildi.

Hastanın hikayesi, fizik muayenesi, aile ağacı analizi ve diğer tetkikler birlikte değerlendirildiğinde öncelikle saf tip OD-HSP kabul edilen 1 hastada yapılan SD’de OD-HSP kliniğine neden olabilecek herhangi bir mutasyon tespit edilemedi. İkinci aşamada yapılan TED’de HSP ilişkili genlerde toplam 15 varyant saptandı. Allel frekansı %5’in üzerinde olan 13 varyant ACMG 2015’e göre benign kabul edildi. Allel frekansı %5’in altında olan *ZFYVE26* genindeki varyantların frekansları hastalık frekansından yüksek olması, sağlıklı yetişkin bireylerde de mevcut olması ve *in silico* programlarda patojenitesinin gösterilememesi nedeniyle ACMG 2015’e göre benign kabul edildi. Sonuç olarak altı no’lu ailedeki hastada mutasyon bulunamadığı için genetik etiyoloji aydınlatılamadı. Bu duruma neden olabilecek faktörlerden birincisi, her ne kadar fenotip olarak benzemese ve klasik bir HSP tipi olarak kabul edilmese de mitokondriyel kalıtılan kompleks tip HSP benzeri hastalıkla ilişkili olan *MT-ATP6* gen mutasyonları da bildirilmiştir (60). Bu amaçla mitokondriyel DNA izolasyonu yapılarak bu gende olabilecek mutasyonun taranması gerekmektedir. Diğer taraftan, SPG4 alt tip tanısı alan bireylerin 1/4’ünde *SPAST* geninde, SPG3A alt tip tanısı alan bireylerin yüzde birinden azında *ATL1* geninde heterozigot ekzonik delesyon da bildirilmiştir (66, 75). Ayrıca, SPG39 gibi alt tiplerde de heterozigot ekzonik delesyon tanımlanmıştır (149). Bir allel kaybı olsa bile PZR esnasında diğer allel çoğalabileceği için SD ve TED analizleri ile bu durumun tespit edilmesi mümkün değildir. Heterozigot ekzonik delesyonları saptamak için MLPA yöntemi kullanılabilir. Günümüzde SPG4 ve SPG3A alt tipler için ticari MLPA probu mevcut olup, daha nadir alt tipler için ise hali hazırda bir prob bulunmamaktadır (150). Bu durumda klinik bulgular dikkate alınarak MLPA probu tasarlanabilir ve mutasyon taraması yapılabilir. Çalışmamızda MLPA yöntemi ile bahsedilen deneyler bütçe kısıtlılığı nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Bunun dışında TED analiziyle tespit edilen ancak kliniğe nasıl yansıdığı bilinmeyen varyantlar da mevcuttur. (151). Her sene ortalama 2-3 genin HSP ile ilişkilendirildiği göz önüne alınacak olursa, elde edilen TED analizi verilerinin belirli periyotlarla çok merkezli çalışmalardan elde edilen verilerle birlikte değerlendirilmesi ve kontrol edilmesi, yeni nadir alt tiplerin tanımlanmasına imkân sağlayacaktır. (12). Mevcut çalışmadan elde edilen varyantlar belirli aralıklarla veritabanları taranarak yeni tanımlanmış HSP tipleri ile ilişkisi araştırılacaktır. Diğer taraftan bu klinik tabloya neden olabilecek mutasyonun kaynağı kodlanan bölge dışındaki intronlar, düzenleyici bölgeler ve intergenik bölgelerde de olabilir (152). Bu durum “HSPsome”

adı verilen gen etkileşim ağındaki genlerin ifade düzeylerini değiştirerek etki edebilir (12). Buna ilişkin HSP moleküler etiyolojisi aydınlatılamamış hastalara TGD analizi ile tanı konulabileceği fikri ortaya atılmıştır. HSP hastalarında TGD analizi deneysel olarak kullanılmakla birlikte etkinliğinin tam anlamıyla ortaya konulabilmesi için daha fazla sayıda hastanın verilerine ihtiyaç duyulmaktadır (152, 153). Son olarak epigenetik değişimlerin birçok hastalık ile ilişkisi belirlenmiştir (154). Bu bağlamda HSP kliniğine neden olabilecek epigenetik değişikliklerin tespitine yönelik her hangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalıkla ilişkili genlerin metilasyon paternini ortaya koyabilecek yeni nesil metilasyon dizileme çalışmaları önerilmektedir.

Sanger ve tüm ekzom dizileme yöntemlerinin aşamalı olarak birlikte kullanıldığı bu çalışma, klinik olarak saf tip otozomal dominant kalıtılan HSP tanısı ile takip edilen ancak moleküler genetik etiyolojisi bilinmeyen hastaların genetik etiyolojisi aydınlatılmış ve bu sayede alt tiplendirme yapılarak daha sağlıklı genetik danışma verilebilme imkanı sağlanmıştır. SD ve TED'in birlikte uygulanması HSP tanısında ve tiplendirmesinde rutin bir analiz yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

6 SONUÇLAR

- Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Nöroloji polikliniklerinde HSP tanısıyla takip edilen hastalarda yapıldı.
- Çalışmamız; HSP tanısı ile takip edilen hastaların moleküler etiyojisinin aydınlatılması amacıyla ilk aşamada SD ile *SPAST*, *ATL1* ve *REEP1* genlerinde Sanger dizileme ile mutasyon taraması yapılan, mutasyon bulunamayan bireylere TED analizi yapılan ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.
- SD ile *ATL1* geninde 6 hastada literatürde daha önce bildirilmiş c.776C>A mutasyonu, 6 hastada literatürde daha önce bildirilmemiş c.470T>C mutasyonu tespit edildi ve bu hastalara SPG3A tanısı konuldu. *SPAST* geninde literatürde daha önce bildirilmemiş 3 hastada c.1072G>C mutasyonu, 3 hastada c.1099-1G>C mutasyonu tespit edildi. Bu hastalar SPG4 alt tip olarak adlandırıldı.
- Mutasyon tespit edilemeyen 3 hastaya TED analizi yapıldı. 1 hastada (%33) *KIAA0196* geninde literatürde daha önce bildirilmiş c.1859 T> C mutasyonu tespit edildi ve bu hastanın diğer iki akrabasında SD ile mutasyon doğrulanarak toplam 3 hasta SPG8 alt tip tanısı aldı.
- SPG8 tanısı konulan ailede HSP kliniğine sahip olan tüm bireylerde mutasyonun OD HSP kalıtımına uygun bir şekilde segregе olduğu belirlendi. Ancak tüm HSP kliniğine sahip bireylerde bu mutasyon gösterilemedi. Hastalığın heterojen olması nedeniyle aynı aile içinde farklı mutasyon olabileceği ve farklı bir HSP alt tipi olabileceği düşünüldü.
- Nadir görülen hastalıklarda çalışılan hasta sayısının artmasıyla gen hastalık ilişkisine imkan sağlaacağı, bu nedenle TED analizi ile elde edilen varyantların klinik öneminin açıklanabileceği düşünülmektedir.
- Çalışmada saptanan 5 mutasyondan 3'ü yeni mutasyondur. Bunlardan ACMG 2015'e göre 1'i patojen, diğer 2'si ise olası patojen olarak kabul edilmektedir. Bu mutasyonların bilimsel literatüre katkı sağlayacağı öngörülmektedir.
- SD ve TED analizlerinin birlikte kullanılmasıyla çalışmaya dâhil edilen 23 bireyden 20'sinin (%87) moleküler genetik etiyojisi aydınlatılmış, klinik alt tipler belirlenmiş ve uygun genetik danışma verilmesi sağlanmıştır.

7 KAYNAKÇA

1. A S. Sklerose der seitenstränge des Rückenmarks bei 4 kindern derselben Familie. . *Dtsch Med Wochenschr* 1876;**2** 185-6
2. A S. Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. . *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1880;**10**:676–717.
3. A. S. Ueber die hereditäre spastische Spinalparalyse. *Deutsche zeitschrift für Nervenfeilkunde*. 1893(4):173–88.
4. M. L. Contribution a l'étude de la paraplégie spasmodique familiale. . *Paris: Steinheil*; 1898.
5. Baraitser M. The genetics of neurological disorders. . *Oxford University Press*; 1967.
6. Holmes GL SB. Strümpell's pure familial spastic paraplegia: case study and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1977(40):1003-8.
7. K. Osvath Paralysis spinalis spastica familiaris. . *Deutsche zeitschrift für Nervenfeilkunde* 1968(193):287-323.
8. Bell J CE. On hereditary ataxia and spastic paraplegia. . *Treasury of Hum an Inheritance*. 1939(IV):141– 281.
9. Harding AE. Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1981;**44**(10):871-83.
10. Schrander-Stumpel C, Legius E, Fryns JP, Cassiman JJ. MASA syndrome: new clinical features and linkage analysis using DNA probes. *J Med Genet*. 1990;**27**(11):688-92.
11. Bonneau D, Rozet JM, Bulteau C, Berthier M, Mettey R, Gil R, Munnich A, Le Merrer M. X linked spastic paraplegia (SPG2): clinical heterogeneity at a single gene locus. *J Med Genet*. 1993;**30**(5):381-4.
12. Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, Hofree M, Silhavy JL, Heiberg AD, Abdellateef M, Rosti B, Scott E, Mansour L, Masri A, Kayserili H, Al-Aama JY, Abdel-Salam GM, Karminejad A, Kara M, Kara B, Bozorgmehri B, Ben-Omran T, Mojahedi F, Mahmoud IG, Bouslam N, Bouhouche A, Benomar A, Hanein S, Raymond L, Forlani S, Mascaro M, Selim L, Shehata N, Al-Allawi N, Bindu PS, Azam M, Gunel M, Caglayan A, Bilguvar K, Tolun A, Issa MY, Schroth J, Spencer EG, Rosti RO, Akizu N, Vaux KK, Johansen A, Koh AA, Megahed H, Durr A, Brice A, Stevanin G, Gabriel SB, Ideker T, Gleeson JG. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*. 2014;**343**(6170):506-11.
13. Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*. 2014;**261**:518-39.
14. McDermott C, White K, Bushby K, Shaw P. Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;**69**(2):150-60.

15. Coutinho P, Barros J, Zemmouri R, Guimarães J, Alves C, Chorão R, Lourenço E, Ribeiro P, Loureiro JL, Santos JV, Hamri A, Paternotte C, Hazan J, Silva MC, Prud'homme JF, Grid D. Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families. *Arch Neurol*. 1999;**56**(8):943-9.
16. Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, Tallaksen CM. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain*. 2009;**132**(Pt 6):1577-88.
17. McMonagle P, Webb S, Hutchinson M. The prevalence of "pure" autosomal dominant hereditary spastic paraparesis in the island of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;**72**(1):43-6.
18. Boukhris A, Stevanin G, Feki I, Denora P, Elleuch N, Miladi MI, Goizet C, Truchetto J, Belal S, Brice A, Mhiri C. Tunisian hereditary spastic paraplegias: clinical variability supported by genetic heterogeneity. *Clin Genet*. 2009;**75**(6):527-36.
19. Braschinsky M, Luus SM, Gross-Paju K, Haldre S. The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia. *Neuroepidemiology*. 2009;**32**(2):89-93.
20. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet*. 2012;**91**(2):320-9.
21. Blackstone C. Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu Rev Neurosci*. 2012;**35**:25-47.
22. Kara E, Tucci A, Manzoni C, Lynch DS, Elpidorou M, Bettencourt C, Chelban V, Manole A, Hamed SA, Haridy NA, Federoff M, Preza E, Hughes D, Pittman A, Jaunmuktane Z, Brandner S, Xiromerisiou G, Wiethoff S, Schottlaender L, Proukakis C, Morris H, Warner T, Bhatia KP, Korlipara LV, Singleton AB, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, Houlden H. Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia. *Brain*. 2016;**139**(Pt 7):1904-18.
23. Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, Metzenberg A, Ionasescu V, Temple K, Kenwrick S. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet*. 1994;**7**(3):402-7.
24. Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci*. 2012;**318**(1-2):1-18.
25. Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest*. 2010;**120**(4):1097-110.
26. Canbaz D, Kırımtay K, Karaca E, Karabay A. SPG4 gene promoter regulation via Elk1 transcription factor. *J Neurochem*. 2011;**117**(4):724-34.

27. Tsang HT, Edwards TL, Wang X, Connell JW, Davies RJ, Durrington HJ, O'Kane CJ, Luzio JP, Reid E. The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum Mol Genet.* 2009;**18**(20):3805-21.
28. Tzoulis C, Denora PS, Santorelli FM, Bindoff LA. Hereditary spastic paraplegia caused by the novel mutation 1047insC in the SPG7 gene. *J Neurol.* 2008;**255**(8):1142-4.
29. Murmu RP, Martin E, Rastetter A, Esteves T, Muriel MP, El Hachimi KH, Denora PS, Dauphin A, Fernandez JC, Duyckaerts C, Brice A, Darios F, Stevanin G. Cellular distribution and subcellular localization of spatacsin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Neurosci.* 2011;**47**(3):191-202.
30. Montenegro G, Rebelo AP, Connell J, Allison R, Babalini C, D'Aloia M, Montieri P, Schüle R, Ishiura H, Price J, Strickland A, Gonzalez MA, Baumbach-Reardon L, Deconinck T, Huang J, Bernardi G, Vance JM, Rogers MT, Tsuji S, De Jonghe P, Pericak-Vance MA, Schöls L, Orlacchio A, Reid E, Züchner S. Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J Clin Invest.* 2012;**122**(2):538-44.
31. Yagi T, Ito D, Nihei Y, Ishihara T, Suzuki N. N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress. *Hum Mol Genet.* 2011;**20**(19):3831-40.
32. Alazami AM, Adly N, Al Dhalaan H, Alkuraya FS. A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated hereditary spastic paraplegia locus (SPG18). *Neurogenetics.* 2011;**12**(4):333-6.
33. Joshi DC, Bakowska JC. SPG20 protein spartin associates with cardiolipin via its plant-related senescence domain and regulates mitochondrial Ca²⁺ homeostasis. *PLoS One.* 2011;**6**(4):e19290.
34. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, Crosby AH. Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet.* 2003;**73**(5):1147-56.
35. Rivière JB, Ramalingam S, Lavastre V, Shekarabi M, Holbert S, Lafontaine J, Srour M, Merner N, Rochefort D, Hince P, Gaudet R, Mes-Masson AM, Baets J, Houlden H, Brais B, Nicholson GA, Van Esch H, Nafissi S, De Jonghe P, Reilly MM, Timmerman V, Dion PA, Rouleau GA. KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Am J Hum Genet.* 2011;**89**(2):219-30.
36. Mannan AU, Krawen P, Sauter SM, Boehm J, Chronowska A, Paulus W, Neesen J, Engel W. ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2006;**79**(2):351-7.
37. Edvardson S, Hama H, Shaag A, Gomori JM, Berger I, Soffer D, Korman SH, Taustein I, Saada A, Elpeleg O. Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet.* 2008;**83**(5):643-8.
38. Hein ND, Stuckey JA, Rainier SR, Fink JK, Richardson RJ. Constructs of human neuropathy target esterase catalytic domain containing mutations related to motor neuron disease have altered enzymatic properties. *Toxicol Lett.* 2010;**196**(2):67-73.

39. Bauer P, Leshinsky-Silver E, Blumkin L, Schlipf N, Schröder C, Schicks J, Lev D, Riess O, Lerman-Sagie T, Schöls L. Mutation in the AP4B1 gene cause hereditary spastic paraplegia type 47 (SPG47). *Neurogenetics*. 2012;**13**(1):73-6.
40. Hirst J, Barlow LD, Francisco GC, Sahlender DA, Seaman MN, Dacks JB, Robinson MS. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol*. 2011;**9**(10):e1001170.
41. Oz-Levi D, Ben-Zeev B, Ruzzo EK, Hitomi Y, Gelman A, Pelak K, Anikster Y, Reznik-Wolf H, Bar-Joseph I, Olender T, Alkelai A, Weiss M, Ben-Asher E, Ge D, Shianna KV, Elazar Z, Goldstein DB, Pras E, Lancet D. Mutation in TECPR2 reveals a role for autophagy in hereditary spastic paraparesis. *Am J Hum Genet*. 2012;**91**(6):1065-72.
42. Verkerk AJ, Schot R, Dumee B, Schellekens K, Swagemakers S, Bertoli-Avella AM, Lequin MH, Dudink J, Govaert P, van Zwol AL, Hirst J, Wessels MW, Catsman-Berrevoets C, Verheijen FW, de Graaff E, de Coo IF, Kros JM, Willemsen R, Willems PJ, van der Spek PJ, Mancini GM. Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy. *Am J Hum Genet*. 2009;**85**(1):40-52.
43. Moreno-De-Luca A, Helmers SL, Mao H, Burns TG, Melton AM, Schmidt KR, Fernhoff PM, Ledbetter DH, Martin CL. Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *J Med Genet*. 2011;**48**(2):141-4.
44. Abou Jamra R, Philippe O, Raas-Rothschild A, Eck SH, Graf E, Buchert R, Borck G, Ekici A, Brockschmidt FF, Nöthen MM, Munnich A, Strom TM, Reis A, Colleaux L. Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am J Hum Genet*. 2011;**88**(6):788-95.
45. Zivony-Elboun Y, Westbroek W, Kfir N, Savitzki D, Shoval Y, Bloom A, Rod R, Khayat M, Gross B, Samri W, Cohen H, Sonkin V, Freidman T, Geiger D, Fattal-Valevski A, Anikster Y, Waters AM, Kleta R, Falik-Zaccai TC. A founder mutation in Vps37A causes autosomal recessive complex hereditary spastic paraparesis. *J Med Genet*. 2012;**49**(7):462-72.
46. Bache KG, Slagsvold T, Cabezas A, Rosendal KR, Raiborg C, Stenmark H. The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation. *Mol Biol Cell*. 2004;**15**(9):4337-46.
47. Alrayes N, Mohamoud HS, Jelani M, Ahmad S, Vadgama N, Bakur K, Simpson M, Al-Aama JY, Nasir J. Truncating mutation in intracellular phospholipase A₁ gene (DDHD2) in hereditary spastic paraplegia with intellectual disability (SPG54). *BMC Res Notes*. 2015;**8**:271.
48. Schuurs-Hoeijmakers JH, Geraghty MT, Kamsteeg EJ, Ben-Salem S, de Bot ST, Nijhof B, van de Vondervoort II, van der Graaf M, Nobau AC, Otte-Höller I, Vermeer S, Smith AC, Humphreys P, Schwartzentruber J, Ali BR, Al-Yahyaee SA, Tariq S, Pramathan T, Bayoumi R, Kremer HP, van de Warrenburg BP, van den Akker WM, Gilissen C, Veltman JA, Janssen IM, Vulto-van Silfhout AT, van der Velde-Visser S, Lefeber DJ, Diekstra A, Erasmus CE, Willemsen MA, Vissers LE, Lammens M, van Bokhoven H, Brunner HG, Wevers RA, Schenck A, Al-Gazali L, de Vries BB, de Brouwer AP, Consortium FC. Mutations in DDHD2, encoding an intracellular phospholipase A(1), cause a recessive form of complex hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*. 2012;**91**(6):1073-81.

49. Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, (JASPAC) JSPRC. A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet*. 2012;**49**(12):777-84.
50. Spiegel R, Mandel H, Saada A, Lerer I, Burger A, Shaag A, Shalev SA, Jabaly-Habib H, Goldsher D, Gomori JM, Lossos A, Elpeleg O, Meiner V. Delineation of C12orf65-related phenotypes: a genotype-phenotype relationship. *Eur J Hum Genet*. 2014;**22**(8):1019-25.
51. Tesson C, Nawara M, Salih MA, Rossignol R, Zaki MS, Al Balwi M, Schule R, Mignot C, Obre E, Bouhouche A, Santorelli FM, Durand CM, Oteyza AC, El-Hachimi KH, Al Drees A, Bouslam N, Lamari F, Elmalik SA, Kabiraj MM, Seidahmed MZ, Esteves T, Gaussen M, Monin ML, Gyapay G, Lechner D, Gonzalez M, Depienne C, Mochel F, Lavie J, Schols L, Lacombe D, Yahyaoui M, Al Abdulkareem I, Zuchner S, Yamashita A, Benomar A, Goizet C, Durr A, Gleeson JG, Darios F, Brice A, Stevanin G. Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*. 2012;**91**(6):1051-64.
52. Esteves T, Durr A, Mundwiller E, Loureiro JL, Boutry M, Gonzalez MA, Gauthier J, El-Hachimi KH, Depienne C, Muriel MP, Acosta Lebrigio RF, Gaussen M, Noreau A, Spezziani F, Dionne-Laporte A, Deleuze JF, Dion P, Coutinho P, Rouleau GA, Zuchner S, Brice A, Stevanin G, Darios F. Loss of association of REEP2 with membranes leads to hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*. 2014;**94**(2):268-77.
53. Rinaldi C, Schmidt T, Situ AJ, Johnson JO, Lee PR, Chen KL, Bott LC, Fadó R, Harmison GH, Parodi S, Grunseich C, Renvoisé B, Biesecker LG, De Michele G, Santorelli FM, Filla A, Stevanin G, Dürr A, Brice A, Casals N, Traynor BJ, Blackstone C, Ulmer TS, Fischbeck KH. Mutation in CPT1C Associated With Pure Autosomal Dominant Spastic Paraplegia. *JAMA Neurol*. 2015;**72**(5):561-70.
54. Lossos A, Stümpfig C, Stevanin G, Gaussen M, Zimmerman BE, Mundwiller E, Asulin M, Chamma L, Sheffer R, Misk A, Dotan S, Gomori JM, Ponger P, Brice A, Lerer I, Meiner V, Lill R. Fe/S protein assembly gene IBA57 mutation causes hereditary spastic paraplegia. *Neurology*. 2015;**84**(7):659-67.
55. Lossos A, Elazar N, Lerer I, Schueler-Furman O, Fellig Y, Glick B, Zimmerman BE, Azulay H, Dotan S, Goldberg S, Gomori JM, Ponger P, Newman JP, Marreed H, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N, Mor N, Harel M, Geiger T, Eshed-Eisenbach Y, Meiner V, Peles E. Myelin-associated glycoprotein gene mutation causes Pelizaeus-Merzbacher disease-like disorder. *Brain*. 2015;**138**(Pt 9):2521-36.
56. Gan-Or Z, Bouslam N, Birouk N, Lissouba A, Chambers DB, Vérièpe J, Androschuk A, Laurent SB, Rochefort D, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Szuto A, Liao M, Figlewicz DA, Bouhouche A, Benomar A, Yahyaoui M, Ouazzani R, Yoon G, Dupré N, Suchowersky O, Bolduc FV, Parker JA, Dion PA, Drapeau P, Rouleau GA, Ouled Amar Bencheikh B. Mutations in CAPN1 Cause Autosomal-Recessive Hereditary Spastic Paraplegia. *Am J Hum Genet*. 2016;**98**(5):1038-46.
57. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol*. 2008;**7**(12):1127-38.

58. Fink JK. Sporadically occurring neurologic disease: HSP genes and apparently sporadic spastic paraplegia. *Neurology*. 2008;**71**(19):1468-9.
59. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2013;**126**(3):307-28.
60. JK F. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. *Genereviews*. 2014 [Electronic book]
61. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*. 1983;**1**(8334):1151-5.
62. Fink JK, Heiman-Patterson T, Bird T, Cambi F, Dubé MP, Figlewicz DA, Haines JL, Hentati A, Pericak-Vance MA, Raskind W, Rouleau GA, Siddique T. Hereditary spastic paraplegia: advances in genetic research. Hereditary Spastic Paraplegia Working group. *Neurology*. 1996;**46**(6):1507-14.
63. Depienne C, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol*. 2007;**20**(6):674-80.
64. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinical principles and genetic advances. *Semin Neurol*. 2014;**34**(3):293-305.
65. Hedera P, Eldevik OP, Maly P, Rainier S, Fink JK. Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology*. 2005;**47**(10):730-4.
66. Dürr A TC, Depienne C . Spastic Paraplegia 4. *Genereviews*. 2012.
67. Erichsen AK, Server A, Landrø NI, Sandvik L, Tallaksen CM. Proton magnetic resonance spectroscopy and cognition in patients with spastin mutations. *J Neurol Sci*. 2009;**277**(1-2):124-9.
68. Ribai P, Depienne C, Fedirko E, Jothy AC, Viveweger C, Hahn-Barma V, Brice A, Durr A. Mental deficiency in three families with SPG4 spastic paraplegia. *Eur J Hum Genet*. 2008;**16**(1):97-104.
69. Erichsen AK, Inderhaug E, Mattingsdal M, Eiklid K, Tallaksen CM. Seven novel mutations and four exon deletions in a collection of Norwegian patients with SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol*. 2007;**14**(7):809-14.
70. Fukunaga M, Ohyagi Y, Morita M, Shigeto H, Taniwaki T, Kira J. [Late-onset sporadic case of SPG4 (1726T>C mutant) accompanied by polyneuropathy with diabetes mellitus]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2007;**47**(6):359-61.
71. Scuderi C, Fichera M, Calabrese G, Elia M, Amato C, Savio M, Borgione E, Vitello GA, Musumeci SA. Posterior fossa abnormalities in hereditary spastic paraparesis with spastin mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;**80**(4):440-3.
72. White KD, Ince PG, Lusher M, Lindsey J, Cookson M, Bashir R, Shaw PJ, Bushby KM. Clinical and pathologic findings in hereditary spastic paraparesis with spastin mutation. *Neurology*. 2000;**55**(1):89-94.

73. Tallaksen CM, Guichart-Gomez E, Verpillat P, Hahn-Barma V, Ruberg M, Fontaine B, Brice A, Dubois B, Durr A. Subtle cognitive impairment but no dementia in patients with spastin mutations. *Arch Neurol*. 2003;**60**(8):1113-8.
74. McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Bingley M, Wharton SB, Bushby KM, Shaw PJ. Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol*. 2003;**54**(6):748-59.
75. Hedera P. Spastic Paraplegia 3A. *Genereviews*. 2014. [Electronic book]
76. Beetz C, Schüle R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BP, Frints SG, van Zelst-Stams WA, Byrne P, Otto S, Nygren AO, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJ, Schrandt-Stumpel CT, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schöls L, de Jonghe P, Züchner S. REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain*. 2008;**131**(Pt 4):1078-86.
77. Saugier-Verber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet*. 1994;**6**(3):257-62.
78. Suzuki SO, Iwaki T, Arakawa K, Furuya H, Fujii N, Iwaki A. An autopsy case of adult-onset hereditary spastic paraplegia type 2 with a novel mutation in exon 7 of the proteolipid protein 1 gene. *Acta Neuropathol*. 2011;**122**(6):775-81.
79. Valdmanis PN, Meijer IA, Reynolds A, Lei A, MacLeod P, Schlesinger D, Zatz M, Reid E, Dion PA, Drapeau P, Rouleau GA. Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*. 2007;**80**(1):152-61.
80. Rocco P, Vainzof M, Froehner SC, Peters MF, Marie SK, Passos-Bueno MR, Zatz M. Brazilian family with pure autosomal dominant spastic paraplegia maps to 8q: analysis of muscle beta 1 syntrophin. *Am J Med Genet*. 2000;**92**(2):122-7.
81. Lo Nigro C, Cusano R, Scaranari M, Cinti R, Forabosco P, Morra VB, De Michele G, Santoro L, Davies S, Hurst J, Devoto M, Ravazzolo R, Seri M. A refined physical and transcriptional map of the SPG9 locus on 10q23.3-q24.2. *Eur J Hum Genet*. 2000;**8**(10):777-82.
82. Orlacchio A, Kawai T, Rogaeva E, Song YQ, Paterson AD, Bernardi G, St George-Hyslop PH. Clinical and genetic study of a large Italian family linked to SPG12 locus. *Neurology*. 2002;**59**(9):1395-401.
83. Anderson JF, Siller E, Barral JM. The neurodegenerative-disease-related protein sarsin is a molecular chaperone. *J Mol Biol*. 2011;**411**(4):870-80.
84. Gilbert DL, Leslie EJ, Keddache M, Leslie ND. A novel hereditary spastic paraplegia with dystonia linked to chromosome 2q24-2q31. *Mov Disord*. 2009;**24**(3):364-70.
85. Vazza G, Zortea M, Boaretto F, Micaglio GF, Sartori V, Mostacciuolo ML. A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, SPG14, maps to chromosome 3q27-q28. *Am J Hum Genet*. 2000;**67**(2):504-9.

86. Hanein S, Martin E, Boukhris A, Byrne P, Goizet C, Hamri A, Benomar A, Lossos A, Denora P, Fernandez J, Elleuch N, Forlani S, Durr A, Feki I, Hutchinson M, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;**82**(4):992-1002.
87. Schicks J, Synofzik M, Pétursson H, Huttenlocher J, Reimold M, Schöls L, Bauer P. Atypical juvenile parkinsonism in a consanguineous SPG15 family. *Mov Disord.* 2011;**26**(3):564-6.
88. Słabicki M, Theis M, Krastev DB, Samsonov S, Mundwiler E, Junqueira M, Paszkowski-Rogacz M, Teyra J, Heninger AK, Poser I, Prieur F, Truchetto J, Confavreux C, Marelli C, Durr A, Camdessanche JP, Brice A, Shevchenko A, Pisabarro MT, Stevanin G, Buchholz F. A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biol.* 2010;**8**(6):e1000408.
89. Tamagaki A, Shima M, Tomita R, Okumura M, Shibata M, Morichika S, Kurahashi H, Giddings JC, Yoshioka A, Yokobayashi Y. Segregation of a pure form of spastic paraplegia and NOR insertion into Xq11.2. *Am J Med Genet.* 2000;**94**(1):5-8.
90. Claes S, Devriendt K, Van Goethem G, Roelen L, Meireleire J, Raeymaekers P, Cassiman JJ, Fryns JP. Novel syndromic form of X-linked complicated spastic paraplegia. *Am J Med Genet.* 2000;**94**(1):1-4.
91. Bakowska JC, Wang H, Xin B, Sumner CJ, Blackstone C. Lack of spartin protein in Troyer syndrome: a loss-of-function disease mechanism? *Arch Neurol.* 2008;**65**(4):520-4.
92. Soderblom C, Stadler J, Jupille H, Blackstone C, Shupliakov O, Hanna MC. Targeted disruption of the Mast syndrome gene SPG21 in mice impairs hind limb function and alters axon branching in cultured cortical neurons. *Neurogenetics.* 2010;**11**(4):369-78.
93. Boccone L, Mariotti S, Dessì V, Pruna D, Meloni A, Loudianos G. Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) caused by a novel SLC16A2 gene mutation showing severe neurologic features and unexpectedly low TRH-stimulated serum TSH. *Eur J Med Genet.* 2010;**53**(6):392-5.
94. Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, Ward J, Sanabria J, Marsa S, Lewis JA, Echeverri R, Lubs HA, Voeller K, Simensen RJ, Stevenson RE. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet.* 2005;**77**(1):41-53.
95. Blumen SC, Bevan S, Abu-Mouch S, Negus D, Kahana M, Inzelberg R, Mazarib A, Mahamid A, Carasso RL, Slor H, Withers D, Nisipeanu P, Navon R, Reid E. A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32. *Ann Neurol.* 2003;**54**(6):796-803.
96. Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amro SN, Cupler E, Kambouris M, Meyer BF, Bharucha VA. A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology.* 2002;**59**(12):1905-9.

97. Zortea M, Vettori A, Trevisan CP, Bellini S, Vazza G, Armani M, Simonati A, Mostacciuolo ML. Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1. *J Med Genet*. 2002;**39**(6):387-90.
98. Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Patel H, Wood NW, Schapira AH, Warner TT. A clinical and genetic study of SPG5A linked autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *Neurology*. 2003;**61**(2):235-8.
99. Meijer IA, Cossette P, Roussel J, Benard M, Toupin S, Rouleau GA. A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1. *Ann Neurol*. 2004;**56**(4):579-82.
100. Bouslam N, Benomar A, Azzedine H, Bouhouche A, Namekawa M, Klebe S, Charon C, Durr A, Ruberg M, Brice A, Yahyaoui M, Stevanin G. Mapping of a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28). *Ann Neurol*. 2005;**57**(4):567-71.
101. Orlacchio A, Kawai T, Gaudiello F, St George-Hyslop PH, Floris R, Bernardi G. New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol*. 2005;**58**(3):423-9.
102. Klebe S, Lossos A, Azzedine H, Mundwiller E, Sheffer R, Gaussen M, Marelli C, Nawara M, Carpentier W, Meyer V, Rastetter A, Martin E, Bouteiller D, Orlando L, Gyapay G, El-Hachimi KH, Zimmerman B, Gamliel M, Misk A, Lerer I, Brice A, Durr A, Stevanin G. KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations. *Eur J Hum Genet*. 2012;**20**(6):645-9.
103. Stevanin G, Paternotte C, Coutinho P, Klebe S, Elleuch N, Loureiro JL, Denis E, Cruz VT, Dürr A, Prud'homme JF, Weissenbach J, Brice A, Hazan J. A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia (SPG32) on chromosome 14q12-q21. *Neurology*. 2007;**68**(21):1837-40.
104. Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, Licinio L, Lezirovitz K, Nascimento RM, Bueno C, Martyn M, Leão EK, Zatz M. Reevaluation of a large family defines a new locus for X-linked recessive pure spastic paraplegia (SPG34) on chromosome Xq25. *Neurogenetics*. 2008;**9**(3):225-6.
105. Dick KJ, Al-Mjeni R, Baskir W, Koul R, Simpson MA, Patton MA, Raeburn S, Crosby AH. A novel locus for an autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (SPG35) maps to 16q21-q23. *Neurology*. 2008;**71**(4):248-52.
106. Dick KJ, Eckhardt M, Paisán-Ruiz C, Alshehhi AA, Proukakis C, Sibbain NA, Maier H, Sharifi R, Patton MA, Bashir W, Koul R, Raeburn S, Gieselmann V, Houlden H, Crosby AH. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat*. 2010;**31**(4):E1251-60.
107. Hanein S, Dürr A, Ribai P, Forlani S, Leutenegger AL, Nelson I, Babron MC, Elleuch N, Depienne C, Charon C, Brice A, Stevanin G. A novel locus for autosomal dominant "uncomplicated" hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 8p21.1-q13.3. *Hum Genet*. 2007;**122**(3-4):261-73.
108. Orlacchio A, Patrono C, Gaudiello F, Rocchi C, Moschella V, Floris R, Bernardi G, Kawai T. Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia: A locus to 4p and allelism with SPG4. *Neurology*. 2008;**70**(21):1959-66.

109. Rainier S, Bui M, Mark E, Thomas D, Tokarz D, Ming L, Delaney C, Richardson RJ, Albers JW, Matsunami N, Stevens J, Coon H, Leppert M, Fink JK. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *Am J Hum Genet.* 2008;**82**(3):780-5.
110. Subramony SH, Nguyen TV, Langford L, Lin X, Parent AD, Zhang J. Identification of a new form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Clin Genet.* 2009;**76**(1):113-6.
111. Zhao GH, Hu ZM, Shen L, Jiang H, Ren ZJ, Liu XM, Xia K, Guo P, Pan Q, Tang BS. A novel candidate locus on chromosome 11p14.1-p11.2 for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Chin Med J (Engl).* 2008;**121**(5):430-4.
112. Lin P, Mao F, Liu Q, Shao C, Yan C, Gong Y. Prenatal diagnosis of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG42) caused by SLC33A1 mutation in a Chinese kindred. *Prenat Diagn.* 2010;**30**(5):485-6.
113. Meilleur KG, Traoré M, Sangaré M, Britton A, Landouré G, Coulibaly S, Niaré B, Mochel F, La Pean A, Rafferty I, Watts C, Shriner D, Littleton-Kearney MT, Blackstone C, Singleton A, Fischbeck KH. Hereditary spastic paraplegia and amyotrophy associated with a novel locus on chromosome 19. *Neurogenetics.* 2010;**11**(3):313-8.
114. Hartig MB, Iuso A, Haack T, Kmiec T, Jurkiewicz E, Heim K, Roeber S, Tarabin V, Dusi S, Krajewska-Walasek M, Jozwiak S, Hempel M, Winkelmann J, Elstner M, Oexle K, Klopstock T, Mueller-Felber W, Gasser T, Trenkwalder C, Tiranti V, Kretzschmar H, Schmitz G, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H. Absence of an orphan mitochondrial protein, c19orf12, causes a distinct clinical subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Am J Hum Genet.* 2011;**89**(4):543-50.
115. Dursun U, Koroglu C, Kocasoy Orhan E, Ugur SA, Tolun A. Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG45) with mental retardation maps to 10q24.3-q25.1. *Neurogenetics.* 2009;**10**(4):325-31.
116. Boukhris A, Feki I, Elleuch N, Miladi MI, Boland-Augé A, Truchetto J, Mundwiller E, Jezequel N, Zelenika D, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. A new locus (SPG46) maps to 9p21.2-q21.12 in a Tunisian family with a complicated autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum. *Neurogenetics.* 2010;**11**(4):441-8.
117. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Püttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wieczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011;**478**(7367):57-63.
118. Beetz C, Johnson A, Schuh AL, Thakur S, Varga RE, Fothergill T, Hertel N, Bomba-Warczak E, Thiele H, Nürnberg G, Altmüller J, Saxena R, Chapman ER, Dent EW, Nürnberg P, Audhya A. Inhibition of TFG function causes hereditary axon degeneration by impairing endoplasmic reticulum structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;**110**(13):5091-6.

119. Kumar KR, Blair NF, Vandebona H, Liang C, Ng K, Sharpe DM, Grünwald A, Gölnitz U, Saviouk V, Rolfs A, Klein C, Sue CM. Targeted next generation sequencing in SPAST-negative hereditary spastic paraplegia. *J Neurol*. 2013;**260**(10):2516-22.
120. Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki M, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Takiyama Y. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;**85**(9):1024-8.
121. Kishore R. Kumar NFB, Carolyn M. Sue. An Update on the Hereditary Spastic Paraplegias: New Genes and New Disease Models. *Movement Disorders Clinical Practice*. 2015.
122. Luo Y, Du J, Zhan Z, Chen C, Wang J, Hu Y, Hu Z, Xia K, Tang B, Shen L. A diagnostic gene chip for hereditary spastic paraplegias. *Brain Res Bull*. 2013;**97**:112-8.
123. DERYA AKYÜZ HU. Y mikrolelesyonu negatif bulunan azoospermik infertil erkeklerde mutasyon analizi 2016.
124. SequencingS. https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf, 2016 [Internet]
125. Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. *Clin Chem*. 2005;**51**(1):35-9.
126. Murphy KM, Eshleman JR. Simultaneous sequencing of multiple polymerase chain reaction products and combined polymerase chain reaction with cycle sequencing in single reactions. *Am J Pathol*. 2002;**161**(1):27-33.
127. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol*. 2005;**187**(8):2715-26.
128. https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing#/media/File:Sanger-sequencing.svg. 2016 [Internet]
129. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;**431**(7011):931-45.
130. Schloss JA. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat Biotechnol*. 2008;**26**(10):1113-5.
131. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*. 2014;**30**(9):418-26.
132. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem*. 2015;**61**(1):124-35.
133. Day-Williams AG, Zeggini E. The effect of next-generation sequencing technology on complex trait research. *Eur J Clin Invest*. 2011;**41**(5):561-7.

134. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Subgroup GPPD. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;**25**(16):2078-9.
135. Dolled-Filhart MP, Lee M, Ou-Yang CW, Haraksingh RR, Lin JC. Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing. *ScientificWorldJournal*. 2013;**2013**:730210.
136. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;**17**(5):405-24.
137. <https://www.biostars.org/p/75967/>. Illumina workflow 2017 [Internet]
138. Jahic A, Kreuz F, Zacher P, Fiedler J, Bier A, Reif S, Rieger M, Krüger S, Beetz C, Plaschke J. A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. *J Neurol Sci*. 2014;**347**(1-2):372-4.
139. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>. 2016 [Internet]
140. Paul N Valdmanis IAM, Guy A Rouleau. Spastic Paraplegia 8. *Genereviews*. 2016. [Electronic book]
141. Loureiro JL, Brandão E, Ruano L, Brandão AF, Lopes AM, Thieleke-Matos C, Miller-Fleming L, Cruz VT, Barbosa M, Silveira I, Stevanin G, Pinto-Basto J, Sequeiros J, Alonso I, Coutinho P. Autosomal dominant spastic paraplegias: a review of 89 families resulting from a portuguese survey. *JAMA Neurol*. 2013;**70**(4):481-7.
142. Mészárosová AU, Putzová M, Čermáková M, Vávrová D, Doležalová K, Smetanová I, Stejskal D, Beetz C, Seeman P. SPAST mutation spectrum and familial occurrence among Czech patients with pure hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet*. 2016;**61**(10):845-50.
143. Richard S, Lavie J, Banneau G, Voirand N, Lavandier K, Debouverie M. Hereditary spastic paraplegia due to a novel mutation of the REEP1 gene: Case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2017;**96**(3):e5911.
144. Fourtassi M, Jacquin-Courtois S, Scheiber-Nogueira MC, Hajjioui A, Luaute J, Charvier K, Maucourt-Boulch D, Rode G. Bladder dysfunction in hereditary spastic paraplegia: a clinical and urodynamic evaluation. *Spinal Cord*. 2012;**50**(7):558-62.
145. Piazza S, Ricci G, Caldarazzo Ienco E, Carlesi C, Volpi L, Siciliano G, Mancuso M. Pes cavus and hereditary neuropathies: when a relationship should be suspected. *J Orthop Traumatol*. 2010;**11**(4):195-201.
146. Roaf R. Scoliosis secondary to paraplegia. *Paraplegia*. 1970;**8**(1):42-7.
147. Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, Tükel T, Apak M, Heiman-Patterson T, Ming L, Bui M, Fink JK. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*. 2001;**29**(3):326-31.

148. Sterne-Weiler T, Sanford JR. Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome Biol.* 2014;**15**(1):201.
149. Yoon G, Baskin B, Tarnopolsky M, Boycott KM, Geraghty MT, Sell E, Goobie S, Meschino W, Banwell B, Ray PN. Autosomal recessive hereditary spastic paraplegia-clinical and genetic characteristics of a well-defined cohort. *Neurogenetics.* 2013;**14**(3-4):181-8.
150. <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF%5CE%5Ct9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss%7C&ProductOID=7dHrHH4jxJw%7C>. 2017[Internet]
151. Wang J, Liao J, Zhang J, Cheng WY, Hakenberg J, Ma M, Webb BD, Ramasamudram-Chakravarthi R, Karger L, Mehta L, Kornreich R, Diaz GA, Li S, Edelmann L, Chen R. ClinLabGeneticist: a tool for clinical management of genetic variants from whole exome sequencing in clinical genetic laboratories. *Genome Med.* 2015;**7**:77.
152. Ward LD, Kellis M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat Biotechnol.* 2012;**30**(11):1095-106.
153. Kumar KR, Wali GM, Kamate M, Wali G, Minoche AE, Puttick C, Pinese M, Gayevskiy V, Dinger ME, Roscioli T, Sue CM, Cowley MJ. Defining the genetic basis of early onset hereditary spastic paraplegia using whole genome sequencing. *Neurogenetics.* 2016;**17**(4):265-70.
154. Fahrner JA, Bjornsson HT. Mendelian disorders of the epigenetic machinery: tipping the balance of chromatin states. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014;**15**:269-93.