

15 Yıllık Huntington Hastalığı Genetik Test Sonuçları ve Literatürdeki HH Test Kılavuzları

15 years of experience in genetic testing for Huntington's disease and Guidelines at literature

Huntington Hastalığının Genetik Testi ve Kılavuzlar

Evrım Kömürcü-Bayrak^{1*}, Mehveş Poda¹, Gamze Güven¹, Filiz Güçlü-Geyik¹, Neslihan Çoban¹, Çağrı Güleç¹, Neslihan Abacı¹, Fahri Akbaş^{1,2}, Nihan Ergine¹-Ünaltuna¹

İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı

2Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

*Sorumlu yazar: ebayrak@istanbul.edu.tr

ÖZET

Giriş ve Amaç: Huntington Hastalığı (HH), koreik hareketler, psikiyatrik değişiklikler ve kognitif yıkımın eşlik ettiği otozomal dominant kalıtmı nörodejeneratif bir hastalıktır. Günümüzde sadece semptomatik tedavisi mümkün olan ve yaklaşık 1/10.000 kişiyi etkilediği bilinen HH'nın Türkiye'deki prevalansı halen bilinmemektedir. Bu hastalığa neden olan temel mutasyon tipi, IT-15 geninin 1. ekzonunda bulunan CAG tekrar bölgesinin genişleyerek ≥ 36 tekrar üzerine çıkmasıdır ($>99\%$). Ülkemiz için HH genetik tanı testinin hastalık yönetimine katkı sağlaması amacı ile ele alınan bu yazıda 2004 yılı Huntington Hastalığı Test Kılavuzunun tam çevirisi ve bölümümüzde uygulanan HH moleküler test sonuçları sunulmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Laboratuvarımızda uygulanan 15 yıllık HH genetik tanı testi (PZR-temelli analiz) sonuçları, yaş, cinsiyet ve CAG tekrar sayılarına göre değerlendirildi. Retrospektif olarak incelen hasta grubumuz, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda Ocak 2000-Haziran 2015 tarihleri arasında HH için genetik tanı testi uygulanan 677 hastanın dosya kayıtlarına dayanmaktadır. Bulgular: Klinik tanıları genetik olarak da desteklenen 413 HH hastasının 207'sinin erkek ($\%50.1$), 206'sının kadın ($\%49.9$) ve ortalama yaşın 46.1 ± 13 (sınırlar; 14-86) olduğu belirlendi. Mutant allelede CAG tekrar sayısı, hastaların $\%2.7$ 'sinde ($n=11$) azalmış penetrans olan 36-39 arasında, $\%20.8$ 'inde ($n=86$) >50 , diğer hastalarda ($n=316$) 40-50 arasında tespit edildi. HH testinde CAG tekrar sayısı 36'nın altında normal allelleri olan vakaların 23'ünde, 27-35 (mayotik instabilitesi olan) aralığındaki mutasyona uğrayabilir allele sahip oldukları belirlendi. HH testinde mutant allele açısından pozitif olan vakaların $\%2$ 'si ($n=8$) juvenil form (≤ 20 yaş) olarak belirlendi. Sonuç: Bölümümüzde uzun zamandan beri uygulanmakta olan HH genetik testinin, benzer klinik bulgulara sahip diğer nörodejeneratif hastalıkların dışlanması ve ailesel riskler açısından önem taşıdığı belirlendi.

Anahtar Kelime: Huntington Hastalığı, CAG tekrar sayısı, genetik test

SUMMARY

Background and aim: Huntington Disease (HD) is an autosomal dominant hereditary neurodegenerative disease of midlife onset that produces choreic movements and cognitive decline, often accompanied by psychiatric changes. Because there are no effective neuroprotective therapies that delay the progression of the disease, it is treated only symptomatically. It affects approximately 1 in 10,000 individuals. However, the prevalence of this disease in Turkey is still unknown. The expanded CAG repeats ($n \geq 36$) in exon 1 of the IT-15 gene account for $>99\%$ of cases of HD. In this article, recently published guidelines together with the translation of the 2004 guideline for Huntington Disease Testing, as well as our departmental applications in HD molecular testing and results are available. Thus, our departmental procedures and results in HD genetic testing are presented in order to contribute on the management of this disease in Turkey.

Material and methods: The results of the performed HD testing (PCR-based strategy) in our laboratory since 15 years were evaluated according to age, sex and the number of CAG repeat. Accordingly, we retrospectively investigated in 677 patients applied HD genetic testing between January 2000 and June 2015 in Istanbul University, Institute of Experimental Medicine, Department of Genetics.

Results: We obtained positive results for HD testing from 413 patients, who were 207 men (50.1%), 206 women (49.9%) and the mean age 46.1 ± 13 years (range; 14-86). The CAG repeat number in the in 2.7% of patients were between 36-39 repeats ($n=11$), which is known as to have reduced penetrance in 20.8% of patients ($n = 86$) >50 repeat and in other patients ($n = 316$) between 40 and 50 repeat. The 23 of the cases with normal alleles (<36 repeats) applied HD testing were determined the mutable normal alleles between 27 and 35 repeat (referred to as the meiotic instability range). The eight patients (2%) of whole patients with mutant allele were identified as juvenile-onset HD (≤ 20 years).

Discussion: HD genetic testing is applied in our department for a long time to the exclusion of other neurodegenerative diseases with similar clinical symptoms and disease risk assessment.

Key Words: Huntington disease, CAG repeats, genetic testing

BÖLÜM 1: HH KILAVUZLARI

Dünya Nöroloji Federasyonu (WFN) ve Uluslararası Huntington Derneği (IHA) tarafından 1994 yılında yayınlanan ilk Huntington Hastalığı (HH) için prediktif test kılavuzundan hemen sonra gen mutasyonu tanımlanmıştır. Avrupa'da kılavuzları değerlendirme süreci için 2007 yılında Avrupa Huntington Hastalığı Ağı (EHDN) başlatılmış ve halen 'Genetik Test ve Danışmanlık' Çalışma Grubunda yer alan 12 Avrupa ülkesinden aile üyeleri, genetik danışmalar, psikologlar, klinik genetikçiler, nörologlar ve laboratuvar araştırmacıları arasında genetik test bilgilerinin paylaşımı sağlanmaktadır¹. HH moleküler genetik testi çok sayıda laboratuvarında uygulanmakta olup, HH genetik test kalitesinin ölçülmesi ve standardının yükseltilmesi amacıyla, 10 yıldan fazla süredir bu test için Avrupa Moleküler Genetik Kalite Ağı, yıllık dış kalite değerlendirme (EQA) raporu hazırlamaktadır². Aynı amaçla en son 2014 yılında ACMG Laboratuvar Kalite Güvence Komitesi tarafından klinik genetik laboratuvarları için Tıbbi Genetik ve Genomiks Amerikan Koleji (ACMG) standartları ve yönergeler kılavuzu yayınlanmıştır³. Kılavuzlardaki önerilerin net olarak sunulması, klinisyenler ve aile üyeleri için test sürecini netleştirmede yardımcı olmaktadır. Bu kılavuzlar, prediktif test için minimum standartların belirlenmesini, riskli kişileri korunmasını, etik ve klinik ikilemlere yardımcı olmasını sağlama amacı ile sunulmaktadır ve ilk kılavuzlardaki önerilerin çoğu günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır¹⁻⁵.

BÖLÜM 2: HUNTINGTON HASTALIĞI (HH) TESTİ İÇİN TEKNİK STANDARTLAR VE YÖNERGELER KILAVUZU5

HH GİRİŞ

Huntington Hastalığı (HH) Çalışma Grubu tarafından Laboratuvar Kalite Güvence Komitesi Moleküler Alt Komitesi tarafından geliştirilmiş olan 2004 yılında hazırlanmış olan Huntington Hastalığı Test Kılavuzundaki hastalığa özgü tanımlamalar, mevcut olan genel ACMG Standartları ve Klinik Genetik Laboratuvarları Kılavuzuna ek olarak verilmektedir. Testi uygulayan laboratuvarlar, CLIA/CAP kalite güvence standartlarına göre uygun örnek dökümantasyonu, çalışma validasyonu, genel yeterlilik ve kalite kontrol önlemlerini karşılamaktan sorumlu tutulmaktadır. Tüm bu kılavuzlar, yardımcı bir rehber olarak hazırlanmış olup herhangi bir kısıtlama veya sadece bir yaklaşım olarak yorumlanmamalıdır. Elbette, tecrübeli ve belgeli laboratuvar sorumluları, önemli toleranslar ile tasarlanmış test stratejileri ve çeşitli test platformlarının kullanımında esnekliğe sahip olabilmektedir.

HH2 HUNTINGTON HASTALIĞI

HH2.1 Gen sembolü/kromozom lokusu: *HH*; ek olarak *IT-15* geni.

HH2.2 *OMIM* numarası: 143100.

HH2.3 *Özet klinik tanımlama*: Huntington Hastalığı (HH), sıklıkla psikiyatrik değişimlerin eşlik ettiği kognitif yıkımın ve koreik hareketlerin oluşması ile karakterize orta yaş başlangıçlı nörodejeneratif bir hastalıktır. Yaklaşık 10000 kişiden biri

etkilenmektedir. Juvenil başlangıçlı Huntington hastalığı etkilenmiş hastaların %5'inde görülür ve hızlı ilerleyen bu tipte, 20 yaşından önce rijidite, spastisite ve entelektüel gerileme ile ortaya çıkar. Hastalık semptomları özellikle nukleus kaudatus ve putamendeki nöronların seçici kaybı nedeni ile olur ve günümüzde etkili bir tedavisi hala mevcut değildir.

HH2.4 *Kalıtım modeli*: Bir polimorfik trinükleotid (CAG) tekrar sayısının ile ilişkilendirilen klinik belirtiler otozomal dominant kalıtıma sahiptir. 36-39 tekrarlı alleller için değişken penetrans mevcut iken tekrar sayıları ≥ 40 olduğunda hastalık tam penetranslı olarak görünür.

HH2.5 *Gen tanımı/ normal gen ürünü*: *IT-15*, 200 kb'dan fazla uzunluğu olan ve 67 ekzon içeren bir gendir. Bu genin kodladığı huntingtin proteini, 3136 amino asit rezidüsü içerir, molekül ağırlığı 350 kD'dur ve bilinen herhangi bir protein ile homolojisi bulunmamaktadır. Bütün genomik bölgesi dizilenmiştir ve CAG artış mutasyonu 1. ekzonda yer almaktadır. HH geninin promoter bölgesinin yapısal analizleri bu genin bir "housekeeping" gen olduğunu göstermektedir. Mutant huntingtin hücrese seviyede, nöronal ve nöronal olmayan dokularda yaygın olarak ifade ediliyor olsa da, kaudat ve putamendeki nöronlarda bölgeye-özü nöronal kayıp bulunmaktadır.

HH2.6 *Genotip/fenotip ilişkisi*: CAG tekrar sayısı (40 veya daha fazla tekrar) ve başlangıç yaşı arasında ters bir ilişki mevcuttur. Bu ilişki, yüksek tekrarlarda (>50 tekrar) daha güçlüdür. Ancak tekrar sayısı, herhangi bir hastanın başlangıç yaşı hakkında kesin bir tahmin yapılmasına izin vermemektedir.

HH2.7 *Mutasyonun mekanizması*: HH, toksik bir fonksiyon kazanım mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Fonksiyon kazancı, normal bir fonksiyonun aşırı aktivitesi ya da belki proteinin yeni bir fonksiyon geliştirmesi sonucu olabilir. Artış ile ilgili patolojik olaylar, büyük çözünmeyen agregatlara neden olan diğer proteinler ile olan yeni etkileşimlerinden veya proteinlerin multimerizasyonundan kaynaklanıyor olabilir. HH hastalarının beyinlerinde, kesilmiş mutant protein agregatlarının intranükleer inklüzyonları tespit edilmiştir. Bu değişiklikler sonuçta hücre ölümü ile ilişkilidir, ama mutlaka nedensel etkeni değildir.

HH2.8 *Mutasyonların listesi*: HH'nda allelik heterojenite tanımlanmamıştır.

HH2.9 *HH mutasyonunun etnik ilişkisi*: Bütün büyük etnik gruplar, HH CAG tekrarının genişlemesine duyarlı görünmektedir.

HH3 ÖZEL TEST UYGULAMALARI

HH3.1 *Duyarlılık ve özgüllük*: CAG-tekrar sayısı artış mutasyonları, HH vakalarının >%99'undan sorumludur. Bu nedenle, *IT-15* geninin CAG-tekrar bölgesini etkili bir şekilde ölçen ve tespit eden testler, >% 99 duyarlılığa sahiptir. ≥ 40 CAG tekrarlı alleli olup da hastalığı olmadan yaşayan veya normal bir yaşam sürdükten sonra ölmüş, HH patolojisi

bulunmayan herhangi bir birey belgelenmemiştir. Bu nedenle, pozitif bir sonuç (en az bir allelinde 40 veya daha fazla CAG tekrarı olması) %100 olarak bu hastalığa özgüdür. Yayınlanmış hiçbir çalışmada, 26 veya daha az CAG tekrarlı allel boyutları ile HH fenotipi ilişkilendirilmemiştir. 27-35 arası CAG tekrarlı alleller, nadirdir ve bir HH fenotipi ile net bir ilişkisi bulunmamaktadır, ancak mayotik instabilitesi olan mutasyona uğrayabilir tipte allellerdir. 36-39 arası CAG tekrarlı allel boyutları, hem klinik olarak etkilenen ve hem de klinik olarak etkilenmeyen kişilerde bildirilmiştir. Bu nedenle, allellerinden biri ya da her ikisi 36-39 CAG tekrar aralığında olduğunda testin özgüllüğünü belirlemek mümkün değildir.

HH3.2 Tanısal teste karşı prediktif test: Tanısal test, hem doğrulama hem de prediktif test için kullanılır. Doğrulama ve prediktif testin pozitif sonuçları tanısal kabul edilmektedir. Prediktif test uygulamasının 18 yaşın altındaki bireylere önerilmemesi kabul edilmektedir. Multidisipliner bir prediktif test protokolü, pek çok yerde taşıyıcılık durumunun belirlenmesini isteyen bireyler için uygulanabilmektedir.

HH3.3 Prenatal test: Bu test, amniyotik sıvı hücreleri ve koryon villus örneklerinde (CVS) prenatal tanı için kullanılabilir. Her iki ebeveynin elde edilen DNA örnekleri, doğum öncesi örnek ile birlikte çalışmalıdır. Ayrıca, test edilmekte olan örneğin fetal kaynağını teyit etmek için her bir doğum öncesi materyal üzerinde maternal hücre kontaminasyonu çalışmaları yapılmalıdır. Bazı ekstra durumlarda, fetüsün bir ebeveyni ve kendisinde aynı anda prediktif ve/veya doğrulayıcı testler yapılabilir.

HH4 KILAVUZLAR

HH4.1 Normal ve mutasyon kategorilerinin tanımlamaları

HH4.1.1 Normal alleller: Normal alleller, CAG tekrar sayısı ≤ 26 olarak tanımlanmaktadır. Bu alleller patolojik değildir ve mayozun $>99\%$ 'nda dengeli bir polimorfik tekrar olarak segrage olmaktadır. En sık görülen normal allel, 17 ve 19 CAG tekrarı içerir.

HH4.1.2 Mutasyona dönüşebilen alleller: Bu tip normal alleller, 27 ile 35 CAG tekrar aralığında olup genellikle mayoz istikrarsızlığı olan ya da "intermediate" ara alleller olarak da tanımlanmaktadır. Bu allellerin henüz bir HH fenotipi ile ilişkisi gösterilmese de bunlar, spermde mayotik olarak kararsız olabilirler ve bu aralıktaki paternal kaynaklı allellerin patolojik olarak genişleyebildiği tarif edilmiştir. Şimdiye kadar, etkilenmiş allelli olan çocuklar için bu aralıktaki maternal kaynaklı allellerden kaynaklandığı hiç rapor edilmemiştir. Genel nüfusun yaklaşık % 1.5-2'si bu boy aralığındaki allelleri taşımaktadır. Bu aralıktaki bir allelin HH alleleline genişleyerek aktarım olasılığı, aktaracak bireyin cinsiyeti, allel boyutu, CAG tekrarını içeren bölgenin moleküler konfigürasyonu ve onun haplotipi de dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu risk, 35 CAG tekrarı taşıyan bir paternal alleller için % 6-10 gibi yüksek olabilir.

HH4.1.3 Azalmış penetranslı HH allelleri: Azalmış penetranslı HH allelleri, 36-39 CAG tekrar sayısına sahip allel olarak tanımlanır. Bu aralıktaki tekrar boyutları, genellikle azalmış penetrans aralığı olarak ifade edilir. Bu boyut aralığındaki alleller, mayotik olarak kararsızdır ve hem klinik hem de nöropatolojik olarak değerlendirilmiş vakalardaki HH fenotipi ile ilişkilidir. Ancak nadiren bu aralıktaki alleller, yaşlı asemptomatik bireylerde bulunmuştur. Sınırlı sayıdaki kayıtlı vakalar, bu aralıktaki alleller için tahmini penetrans risklerinin gelişimini engellemiş olmasına rağmen, bireysel vaka raporlarının incelenmesi ile risk tahminleri yapılabilir.

HH4.1.4 Tam penetranslı HH allelleri: Tam penetranslı HH allelleri, CAG tekrar sayısının ≥ 40 olduğu alleller olarak tanımlanır. Daha önce yaşlılarda, 36-39 CAG tekrarı olan klinik olarak asemptomatik HH gen taşıyıcıları bildirilmiş olmasına rağmen CAG tekrarı ≥ 40 olup HH patolojisi olmayan hiç kimse rapor edilmemiştir. Bugüne kadarki en büyük HH alleli yaklaşık 250 CAG tekrarına sahip erken başlangıçlı bir hastada tespit edilmiştir.

HH4.1.5 Mozaikizm: Mozaikizm, hem mitoz hem de mayoz istikrarsızlığından kaynaklı beyin ve spermde tanımlanmıştır ve büyük CAG artışları ile ilişkilendirilmiş erken başlangıçlı HH olgularda daha belirgin olduğu görülmektedir. Ancak mozaikliğin derecesi, periferik kan lenfositlerinden elde edilen DNA'dan tespit edilen CAG tekrar uzunluklarının yorumlanmasında ciddi bir öneme sahip değildir.

HH4.2 Metodolojik Uygulamalar

HH için moleküler tanı testleri sunan Amerika Birleşik Devletlerindeki (ABD) laboratuvarları, klinik laboratuvar işlemleri ile ilgili tüm federal ve eyalet yönetmeliklerine uygundur ve tüm CLIA/CAP kalite kontrol gereksinimlerini içermelidir. Buna ek olarak, tüm laboratuvarlar yıllık HH yeterlilik test tartışmalarına aktif olarak katılmalıdır. Ayrıca, tüm metodolojik uygulamalar Tıbbi Genetik Amerikan Kolejinin Laboratuvar Kalite Güvence Komitesi tarafından geliştirilen Klinik Genetik Laboratuvar Standartları ve Rehberi ile uyumlu olmalıdır. Benzer şekilde, ABD dışındaki laboratuvarlar kendi ülkelerinin klinik laboratuvarlar gözetimini yöneten yasal düzenlemeleri ile uyumlu olmalıdır.

HH4.2.1 PCR Yöntemleri

HH4.2.1.1 Çok sayıda farklı primer setleri, PCR koşulları, ampikon ayırımı ve saptama teknikleri tanımlanarak yayınlanmıştır. Tekrar uzunluğunun doğru ve kesin olarak belirlenebilmesi için PCR-bazlı stratejilerin seçiminde asıl deney koşullarının ve post-PCR analizlerinin optimize edilmiş olması önem taşımaktadır. CAG tekrar boyutlandırmasında, P^{32} uygulamalı yöntemlerin ve agaroz, kapiller, ve denatüre poliakrilamid jel elektroforez yöntemlerinin kullanıldığı karşılaştırmalı post-PCR analizlerinin kıyaslamasında farklılıklar olduğu dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, hasta ampikon boyutlarının doğru olarak kantitasyonu, uygun eksternal veya internal standartlarla karşılaştırma sonucu ampirik olarak belirlenmelidir. Bunlar, boyutları bağımsız olarak belirlenmiş

olan dizileme "ladder"ları (M13), klonlanmış referans standartları ve uygun normal ve anormal hasta kontrolleri olabilir ancak standartlar bunlarla sınırlı değildir. HH fenotipi ile ilişkilendirilmiş polimorfik CAG tekrar uzunluğu ile ilgili olarak, CAG ve komşu CCG tekrarının ikisini de amplifiye eden tek primer çifti kullanımına dayanan hasta genotiplemesi önerilmemektedir. HH CAG tekrarının 3' yönünde bulunan CCG tekrarının polimorfik olduğu ve normal ve HH allellerinin boyutlandırmasında tanı yanlışlıklarına yol açabileceği gösterilmiştir.

HH4.2.1.2 CAG tekrar aralığını içeren uygun kontroller, her analiz için kullanılmalıdır. Ampirik olarak bu çalışmanın tanımlama sınırlarını belirlemek uygulayan laboratuvarın sorumluluğundadır. Tanımlama üst sınırı bilinmemesine rağmen, yaklaşık 115 CAG tekrar taşıyan aleller PCR bazlı yöntemler ile amplifiye edilmiş olsa da (S.V. Sørensen, Kopenhag Üniversitesi, kişisel iletişim, 2003) daha büyük yaklaşık 125 CAG tekrarlarını taşıyan alellerin ise tekrar amplifiye edilebilmesine dirençli olduğu görülmektedir (D. Barden, Washington Üniversitesi, kişisel iletişim, 2003).

HH4.2.1.3 CAG bölgesi içinde veya çevresindeki polimorfizmler tespit edilmiş ve bunların HH testi yapılan hastalarda >%1 sıklığa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nükleotid değişimleri genelde iki gruba ayrılabilir: primer-bağlanma bölgelerini değiştirenler ve CAG ile CCG alanları arasında kesinti kaybı ile sonuçlananlar. Birinci gruptaki nükleotid değişiklikleri, primer yanlış bağlanması ile ilişkilendirilmiş yetersiz allel-spesifik amplifikasyon sonucu genotipleme verilerinin yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Bu nedenle, iki normal allel için kesin klinik varlığında "belirgin homozigosite" dikkatle yorumlanmalıdır ve alternatif primer çiftleri ya da diğer yöntemler (Southern blot veya dizileme) kullanılarak belirsiz sonuçlar çözümlenmelidir. İkinci grupta ise, CAG ve CCG alanları (CAGCAGCCGCCG) arasındaki 12-bp'lik segmentteki nadir bir A>G değişim, bu alanın artmış mayotik istikrarsızlığına hem de konvansiyonel hesaplama formüllerine dayalı kesintisiz CAG tekrar uzunluğunun yanlış hesabına yol açabilir.

HH4.2.2 Southern Blot: Southern blot protokolleri, juvenil başlangıçlı HH ile ilişkilendirilmiş geniş artışların (iyi amplifiye etmek için başarısız olabilir) belirlenmesinde ve "homozigot normal" genotiplerin konfirmasyonunda bazen yararlı olmaktadır.

Genotipik ayırım gerektiren durumlarda, tüm laboratuvarların bu protokollerin uygulanabileceğini göz önüne almalı veya bu testi uygulayan bir kurumla resmi yönlendirme düzeninin kurulması tavsiye edilmektedir.

HH4.3 Yorumlamalar

1998 yılından bu yana, CAP/ACMG Biyokimyasal ve Moleküler Genetik Kaynak Komitesi CAG tekrar kantitasyonunun doğruluğunu standardize etmeyi amaçlamıştır. HH sonuçlarının raporlanmasında Komitenin önerisi, her laboratuvarın HH allellerin boyutu için belirtilen doğruluk

oranlarına sahip olmasıdır: ≤ 43 alleller için ± 1 tekrar; 44 ile 50 arasında alleller için ± 2 tekrar; 51 ile 75 arasında alleller için ± 3 tekrar ve > 75 alleller için ± 4 tekrar.

HH4.3.1 Klinik test sonuçlarının raporlanması için gerekli kabul elemanlar, ACMG Klinik Genetik Laboratuvar Standartları ve Kılavuzunda ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Ek olarak, aşağıda belirtilen ilave elemanlar, bir HH genotipinin raporlanmasına dahil edilmelidir.

HH4.3.1.1

Genotipi belirlemek için kullanılan metodolojilerde, PCR metodolojisi kullanılmış ise, primer çifti(ler)'nin tanımlaması amplikon ayırma ve saptama yöntemine dahil edilmelidir. Ayrıca, her raporda geniş artışların tespiti için PCR hassasiyeti konusunda bir açıklama içermelidir. Eğer Southern blot gerekli ise, restriksiyon enzim(ler) ve prob(lar) tanımlanmalıdır. Her rapor, halen klinik uygulamada yararlanılan CAG tekrar uzunluğu kategorileri ve tanımlayıcılarını içermelidir ve her raporlanabilir genotip, sınıflanmış ve bu kategorik tanımları kullanılarak yorumlanmalıdır.

HH4.3.1.2 Her rapora, ACMG Klinik Genetik Laboratuvar Standartları ve Kılavuzunda tavsiye edilen kriterleri karşılayan boyutlandırma hassasiyeti, her iki allelin CAG tekrar sayılarına dahil edilmelidir. PCR ve/veya Southern blot ile tespit edilen geniş alleller için "yaklaşık" veya "tahmini" gibi niteleyici terimler kullanılabilir ancak belirsizlik yaratacak bir yorum yazmaktan kaçınılmalıdır. Tüm pozitif sonuçlarda, genetik danışma gerekliliği ve diğer risk altındaki aile üyelerinde testin uygulanabilir olduğunu belirtmelidir.

HH4.3.2 Alternatif tanımlara aşağıdaki noktalar dahil edilebilir.

HH4.3.2.1 HH'nin klinik tanısının moleküler konfirmasyonunda, hastaların yaklaşık %3'ünde HH fenokopileri tarif edilmiştir ve birkaç başka lokus (HHL1 ve HHL2) tanımlanmıştır. Bu durumda, bu hastalarda *IT-15* geni genişlemesi negatif olacaktır. Ayrıca, HH ve dentatorubral-pallidolüsyian atrofi (DRPLA) arasındaki dikkate değer klinik benzerlik, genişleme için negatif test sonucu olan HH klinik tanılı bu hastalarda DRPLA gen testi bir öneri olarak yapılabilir.

HH4.3.3 Spesifik olmayan ve iyi belgelenememiş klinik ve/veya aile öyküsünde, mutasyona dönüşebilir normal alleller ile azaltılmış penetranslı HH allellerin önemi üzerine aşırı yorumlar yapılmamalıdır. Laboratuvarlar, bu kategorik CAG tekrar uzunluğu tanımlayıcıları ile ilgili yayınlara hakim olmalı ve test sırasında tanı laboratuvarına verilen spesifik hasta/pedigri bilgileri ile ilgili verileri dengeleyen bir yorumu net olarak belirtebilmelidir.

BÖLÜM 3: TÜRKİYE'DE HUNTINGTON HASTALIĞI

Giriş: CAG tekrar sayısı genel popülasyonda ortalama 16-20 iken, hastalarda 36 ve daha çok CAG tekrar gözlenmektedir⁶. 38'den fazla CAG tekrar uzunluğunun, bu hastalıkta yaşa göre başlangıç ile ters korelasyonu mevcuttur ve çeşitli çalışmada tekrar sayısı miktarı yaşa göre başlangıçta varyansı %42-73 oranında hesaplanmıştır⁶. HH dünya çapında rastlanmasına rağmen hastalık prevalansı önemli coğrafik farklılıklara sahiptir (Şekil 1)⁶. Ancak Türkiye'deki prevalansı halen bilinmemektedir. HH'nın moleküler tanı testi ülkemizde de yaygın olarak uygulanmasına rağmen bu konuda sınırlı sayıda yayına ulaşılabilmektedir⁸⁻¹⁰. Ayrıca temel hastalık patogenezi ile ilgili¹¹⁻¹² ve asıl olarak gerek hasta ve yakınları için gerekse tanısı ile ilgilenen sağlık personeli için yol gösterici nitelikte yazılmış Türkçe kaynaklar da sınırlı sayıdadır¹³. Özellikle genetik test ile tanısı kesinleşmiş HH olanların ve aile yakınlarının önünü görebilmeleri için aile dayanışmalarının ve multidisipliner organizasyonların oluşturulması önem taşımaktadır.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada, 15 yıllık HH genetik tanı testi sonuçları yaş, cinsiyet ve CAG tekrar sayılarına göre değerlendirilmiştir. Tanı testi, PZR ve agaroz jel elektroforezi teknikleri ile İ.Ü. DETAE Tıbbi Tanı Laboratuvarı HH Test Çalışma Talimatına göre uygulanmaktadır. Büyük çoğunluğu İstanbul olan 20'ye yakın hastaneden bölümümüze genetik test için gönderilmiş hasta dosyaları taranmıştır. Buna göre, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda Ocak 2000-Haziran 2015 tarihleri arasında HH için genetik tanı testi uygulanan 677 hastanın dosya kayıtları retrospektif olarak incelendi. İstatistiksel analizler, SPSS 14.0 yazılımı kullanılarak (Chicago, IL, USA) yapıldı. Sürekli değişkenler için ANOVA, T-test ve kategorikler için ise X² analizleri kullanıldı. Analizlerde *p* değeri 0.05'den az olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular:

Genetik tanı ile ≥ 36 CAG tekrar sayısı olan mutant allele sahip olduğu belirlenen 413 HH hastasının 207'si erkek (%50.1), 206'ı kadın (%49.9) ve ortalama yaş 46.1 ± 13 (sınırlar; 14-86 yıl) olarak belirlendi. Mutant allelede CAG tekrar sayısı, hastaların %2.7'sinde (n=11) azalmış penetrans olan 36-39 arasında (yaş ortalaması; 57.4 ± 17.7 yıl), %20.8'ünde (n=86) >50 (yaş ortalaması; 33.7 ± 8.8 yıl), diğer hastalarda (n=316) 40-50 arasında (yaş ortalaması; 49.1 ± 11.8 yıl) tespit edilmiştir (Şekil 2). HH testinde CAG tekrar sayısı 36'nın altında normal allelleri olan vakaların 23'ünde (yaş ortalaması; 50.4 ± 16 yıl), 27-35 (mayotik instabilitesi olan) aralığındaki mutasyona uğrayabilir allele sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 2). Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde (ANOVA testi) CAG tekrar sayısı ile yaş arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.0001$). Ayrıca, HH testinde mutant alleli olanların %2'si (n=8) juvenil form (≤ 20 yaş) olarak belirlenmiştir.

Tartışma ve sonuç:

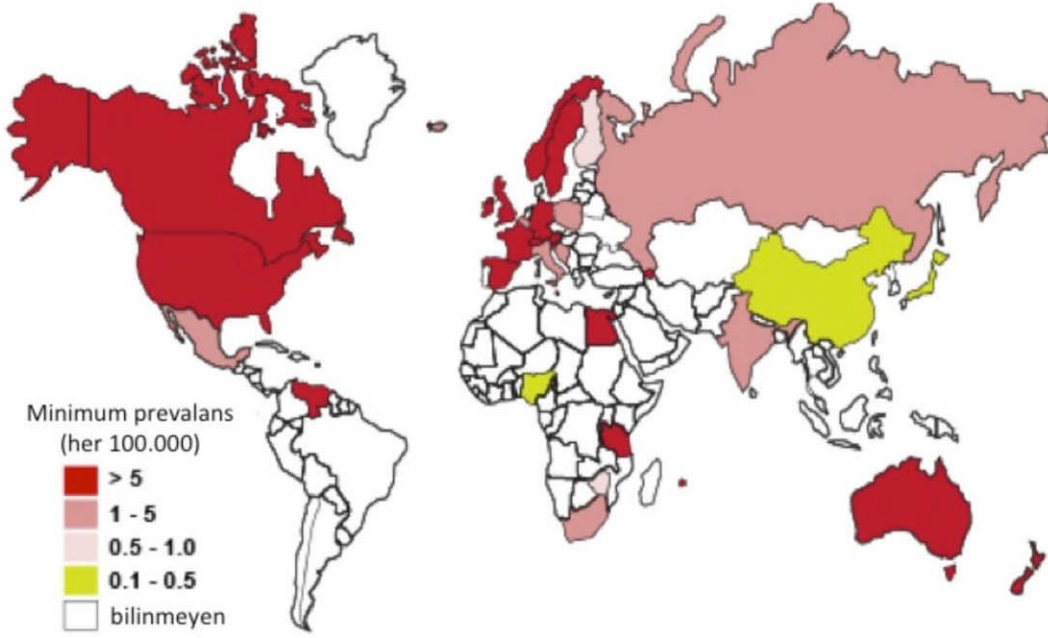
Pozitif test sonucuna sahip HH hastalarında, CAG tekrar sayısı artıka yaş ortalaması literatür ile uyumlu olarak azalmaktadır^{6,7}. Pozitif test sonucuna sahip 413 Huntington hastasına genetik danışma önerilmiştir. Türkiye'deki Huntington hasta ve aileleri için Uluslararası Huntington Derneği ile bağlantılı lokal bir dayanışma derneği mevcut¹⁴ olsa da daha aktif ve çeşitli disiplinler ile işbirliği halinde olması beklenmektedir.

Sonuçta HH genetik tanı testi, HH ile benzer klinik bulgulara sahip diğer nörodejeneratif hastalıkların dışlanması ve hastalık risk değerlendirmeleri için uzun zamandan beri bölümümüzde uygulanmaktadır.

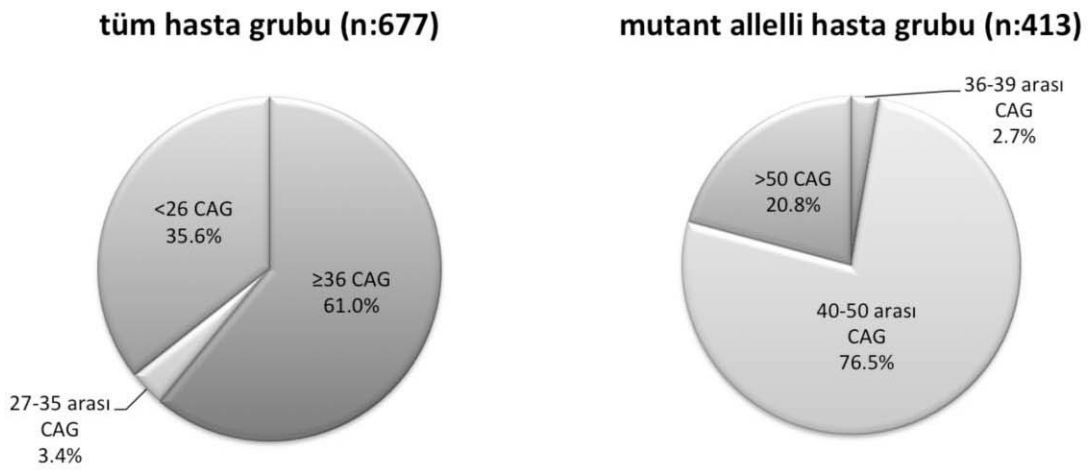
Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BEK-2016-21060

KAYNAKLAR

- 1- MacLeod R, Tibben A, Frontali M, Evers-Kiebooms G, Jones A, Martinez-Descales A, Roos RA; Editorial Committee and Working Group 'Genetic Testing Counselling' of the European Huntington Disease Network. Recommendations for the predictive genetic test in Huntington's disease. *Clin Genet.* 2013; 83: 221-31. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01900.x.
- 2- Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, Bauer P, Stenhouse SA, Barton DE; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21: 480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200.
- 3- Bean L, Bayrak-Toydemir P. American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2014 edition: technical standards and guidelines for Huntington disease. *Genet Med.* 2014; 16: e2. doi: 10.1038/gim.2014.146.
- 4- Craufurd D, MacLeod R, Frontali M, Quarrell O, Bijlsma EK, Davis M, Hjermand LE, Lahiri N, Mandich P, Martinez A, Tibben A, Roos RA; Working Group on Genetic Counselling and Testing of the European Huntington's Disease Network (EHDN). Diagnostic genetic testing for Huntington's disease. *Pract Neurol.* 2015; 15: 80-4. doi: 10.1136/practneurol-2013-000790.
- 5- Potter NT, Spector EB, Prior TW. Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. *Genet Med.* 2004; 6: 61-5.
- 6- Warby SC, Visscher H, Collins JA, Doty CN, Carter C, Butland SL, Hayden AR, Kanazawa I, Ross CJ, Hayden MR. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19: 561-6. doi: 10.1038/ejhg.2010.229.
- 7- Metzger S, Bauer P, Tomiuk J, Laccone F, Didonato S, Gellera C, Mariotti C, Lange HW, Weirich-Schwaiger H, Wenning GK, Seppi K, Melegh B, Havasi V, Balikó L, Wiczorek S, Zaremba J, Hoffman-Zacharska D, Sulek A, Basak AN, Soydan E, Zidovska J, Kebrdlova V, Pandolfo M, Ribai P, Kadasi L, Kvasnicova M, Weber BH, Kreuz F, Dose M, Stuhmann M, Riess O. Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. *Hum Genet.* 2006; 120: 285-92.
- 8- Akbas F, Erginel-Unaltuna N. DNA testing for Huntington disease in the Turkish population. *Eur Neurol.* 2003; 50:20-4.
- 9- Ataç FB, Elibol B, Schaefer F. The genetic analysis of Turkish patients with Huntington's disease. *Acta Neurol Scand.* 1999; 100: 195-8.
- 10- Akyol A, Temoçin K, Kıyılıoğlu N, Bölükbaşı O, Ersoy N, Başak AN. Huntington Hastalığı Tanısı Konan Bir Ailede Klinik ve Moleküler Analiz, *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları Dergisi* 2001; 4: 82-86.
- 11- Nagehan Ersoy, A. Nazlı Başak. "Huntington Hastalığı'nın Moleküler Biyolojisi", *Derleme, Türk Nöroloji Dergisi* 2005; 11: 27-44.
- 12- Ersoy N., Pirkevi C., Saner N., Başak A. N., "Trinükleotid Tekrarı Hastalıkları ve Nörodejenerasyonun Moleküler Temeli", *Derleme, Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları Dergisi* 2004; 7: 34-62.
- 13- A. Nazlı Başak Laboratuvarı, Huntington Hastalığı, Boğaziçi Üniversitesi, Suna ve İnan Kırac Vakfı, Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı Yayınları 2, İstanbul, Temmuz 2008, Promat Basım Yayın San. ve Tic. A.Ş., ISBN: 978 975 9123-49-9.
- 14- Turkish Huntington Society, www.alsturkiye.org



Şekil 1: HH'nın dünya çapında tahmini prevalansı²



Şekil 2: CAG tekrar sayılarının tüm hastalar (n=677) ve mutant allele sahip hastalardaki (n=413) dağılımları