AGHARZA AGHAYEV

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2026

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ESANSİYEL TREMORUN GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

AGHARZA AGHAYEV

DANIŞMAN
PROF. DR. Z. OYA UYGUNER

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK

İSTANBUL-2026

BEYAN

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

AGHARZA AGHAYEV

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında "Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi" Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF

Ailem'e...

TEŞEKKÜR

Yaklaşık on yılı aşan bir süreç boyunca, yalnızca doktora eğitimim süresince değil, mesleki ve akademik yolculuğumun her aşamasında bilgi, deneyim ve rehberliğiyle bana yön veren; bilimsel bakış açımın gelişmesinde ve akademik kimliğimin şekillenmesinde büyük katkıları olan, desteğini her zaman hissettiğim çok değerli danışman hocam *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e en içten ve derin teşekkürlerimi sunarım. Kendisi, genetik alanındaki birikiminin yanı sıra akademisyenlik anlayışı, çalışma disiplini ve yaklaşımıyla benim için her zaman örnek olmuştur.

Bilgi ve deneyimleriyle akademik gelişimime katkıda bulunan ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım *Prof. Dr. Seher Başaran, Prof. Dr. Birsen KARAMAN, Prof. Dr. Asuman GEDİKBAŞI, Doç. Dr. Güven Toksoy, Doç. Dr. Çağrı GÜLEÇ* ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komisyonumda yer alarak çalışmama değerli katkılar sağlayan saygıdeğer hocalarım *Prof. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK* ve *Doç. Dr. Nihan Hande AKÇAKAYA*'ya şükranlarımı sunarım.

Tezimdeki özellikle klinik bilgilerin oluşturulmasında öğretici ve yardımcı olan sayın hocalarım *Doç. Dr. Ayça Dilruba ASLANGER*, çalışma grubumuzun oluşturulması ve olgu değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın *Uzm. Hemşire. Melda ERDOĞDU* ve *Dr. Duygu AYDEMİR*'e teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar aşamasında birlikte yoğun emek verdiğimiz, sabır ve özveriyle çalıştığımız değerli arkadaşım *Gülendam Bağırova*'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca moral ve motivasyon desteklerini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini paylaşmanın yanı sıra dostluklarını da hissettiğim başta *Alev Yalın Kocaçinar,* Dr. *Volkan Karaman,* Dr. *Fatih Tepgeç, Havva Öztürk, Ebru Pektaş* olmak üzere tüm Tıbbi Genetik ailesine teşekkür ederim.

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

En içten teşekkürlerimle...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2024-40883

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Agharza Aghayev tarafından Prof. Dr. Z. Oya Uyguner'in danışmanlığında hazırlanan "Esansiyel Tremorun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 15 /04 /2026 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Evrim Kömürcü Bayrak

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD

Prof. Dr. Kanay Yararbaş

Demiroğlu Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD

Doç. Dr. Ayça Dilruba Aslanger

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD

Dr. Öğr. Üyesi (Doç. Dr) Didem Seven

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD

Doç. Dr. Nihan Hande Akçakaya

Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurum Başkanlığı
Dördüncü İhtisas Kurulu Nöroloji Üyesi;
önceki kurumu Demiroğlu Bilim Üniversitesi,
Tıp Fakültesi Nöroloji AD

Prof. Dr. Z. Oya Uyguner

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. HAREKET BOZUKLUKLARI 3
2.1.2. Ekstrapiramidal Sistem 4
2.2. ESANSİYEL TREMOR 5
2.2.1. Tarihçe 7
2.2.2. Patofizyolojisi 9
2.2.2.1. ET ve PH`nin Karşılaştırmalı Patofizyolojisi 13
2.2.3. Klinik Özellikleri 14
2.2.3.1. Motor Bulgular 16
2.2.3.2. Motor Dışı Bulgular 18
2.2.4. Tanı ve Tedavisi 19
2.2.4.1. Ayırıcı Tanı 22
2.2.4.2. Tedavi 26
2.2.5. Esansiyel Tremorun Genetik Etiyolojisi 27
2.2.5.1. Genetik Risk Faktörleri 27
2.2.5.2. Çevresel Risk Faktörleri 28
2.2.5.3. İlişkili Genler ve Genetik Hastalıklar 30
2.3. YENİ NESİL DİZİLEME ANALİZLERİ 51
3. GEREÇ VE YÖNTEM 57
3.1. Çalışma Grubu 57

3.2. Moleküler Genetik İncelemeler 58
3.2.1. Ekzom Dizileme (ED) 58
3.2.2. Tüm Genom Dizileme (TGD) 59
3.2.3. Varyant Değerlendirmesi, Metrikler ve Skorlama 59
3.2.4. Saptanan Varyantların Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulanması 68
3.2.5. *Triplet Repeat-Primed* PZR (TP-PCR) 72
4. BULGULAR 75
4.1. Klinik Bulgular 75
4.2. Moleküler Bulgular 83
4.2.1. *Tier 3*: Biyolojik olarak güçlü adaylar olmakla birlikte segregasyon kanıtı bulunmayan varyantlar. 84
4.2.2. *Tier 2*: Yalnızca etkilenmiş bireylerde gözlenen ancak sınırlı mayoz sayısı veya ek segregasyon verisinin bulunmaması nedeniyle kanıtı sınırlı olan varyantlar 85
4.2.2.1. Kısmi segregasyon kanıtına sahip *Tier 2* varyantlar 86
4.2.3. *Tier 1*: Etkilenmiş aile bireyleri ile birlikte segregasyon gösteren ve etkilenmemiş akrabalarda bulunmayan varyantlar 86
5. TARTIŞMA 103
5.1. Nörotransmisyon ve Sinaptik Düzenleme ile İlişkili Genler 108
5.2. Veziküler ve Membran Taşınımı ile İlişkili Genler 113
5.3. Mitokondriyal Fonksiyon ve Protein Kalite Kontrolü ile İlişkili Genler 115
5.4. Metal ve Redoks Homeostazında Rol Alan Genler 115
6.SONUÇ 118
KAYNAKLAR 120
HAM VERİLER 153
FORMLAR 154
Hasta Takip Formu 154
ETİK KURUL ONAYI 159
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 160

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Hareket bozukluklarının alt tipleri 3
Tablo 2-2. Tremorun hareket/postür ve etiyoloji-klinik özelliklere göre sınıflandırılması 15
Tablo 2-3. Esansiyel tremor ve Parkinson hastalığının klinik ve nörobiyolojik özelliklerinin karşılaştırılması 24
Tablo 2-4. ET ile ilişkilendirilmiş lokus ve genlerin özeti 33
Tablo 2-5. Tremor ile prezente olabilen başlıca otozomal dominant hastalıklar 36
Tablo 2-6. Tremor ile prezente olabilen başlıca otozomal resesif hastalıklar 41
Tablo 2-7. Tremor ile prezente olabilen başlıca X`e bağlı hastalıklar 47
Tablo 2-8. Klinik tablolarında tremor görülebilen başlıca kromozomal anomaliler ve mikrodelesyon sendromları 50
Tablo 2-9. YND platformlarının karşılaştırılması 54
Tablo 2-10. Kısa Okumalı (Short-Read) ve Uzun Okumalı (Long-Read) Dizileme teknolojilerinin karşılaştırılması 55
Tablo 3-1. HGMD`de ET ilişkili varyantların genomik, fonksiyonel ve yolak temelli karakterizasyonu 60
Tablo 3-2. Primer dizileri 69
Tablo 3-3. PZR döngü koşulları 70
Tablo 3-4. Dizi PZR döngü koşulları 71
Tablo 3-5. Fragman analizi ve TP-PZR için kullanılan primer çiftlerinin dizileri 73
Tablo 4-2. Olguların demografik ve klinik özellikleri 77
Tablo 4-1. Olguların klinik bulguları 78
Tablo 4-3. Etkilenmiş ve etkilenmemiş aile bireylerinde segregasyon analizi 80
Tablo 4-4. *NOTCH2NLC* ve *GIPC1* tekrar artışlarına yönelik analizinin özeti 83
Tablo 4-5. Yedi ailede segregasyon analizi ile dışlanan başlangıçta tanımlanmış aday varyantların özeti 87
Tablo 4-6. Segregasyon analizi yapılamayan altı tek probandlı ailede aday varyantların özeti 88
Tablo 4-7. Üç ailede tanımlanan varyantların etkilenmiş aile bireylerinde segregasyonu 89
Tablo 4-8. Etkilenmiş aile bireyleriyle birlikte segregasyon gösteren ve etkilenmemiş bireylerde bulunmayan aday varyantlar 90

Tablo 5-1. ET ile lişkili aday genlerin fonksiyonel karakterizasyonu 105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Bazal ganglia ve ilişkili yapıları gösteren koronal kesit 4

Şekil 2-2. Motor sistemin belli başlı yapıları arasındaki ana ilişkilerin, geri-dönen ve desendan yolların şematik görünüşü 5

Şekil 2-3. Esansiyel tremorun (ET) cinsiyet ve yaş gruplarına göre prevalansı 7

Şekil 2-4. Hareket kontrolünde rol alan ve ET patofizyolojisi ile ilişkilendirilen beyin bölgelerinin şematik gösterimi 9

Şekil 2-5. Sanger dideoksi dizilemenin aşamaları 52

Şekil 4-1. Tablo 4-4'te yer alan dört olguya (ET-01, ET-02, ET-09 ve ET-10) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri 90

Şekil 4-2. Tablo 4-7'te yer alan altı olguya (ET-03, ET-08, ET-12, ET-13, ET-16 ve ET-17) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri 93

Şekil 4-3. Tablo 4-5'te yer alan üç olguya (ET-06, ET-11 ve ET-14) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri 94

Şekil 4-4. Tablo 4-6'te yer alan üç olguya (ET-04, ET-05 ve ET-07) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri 96

Şekil 4-5. Amino asit değişimlerinin yapısal etkisini değerlendirmek amacıyla ABCG4 proteini için öngörülen 3B protein yapıları 96

Şekil 4-6. *GABRR2* genindeki amino asit değişimlerinin yapısal sonuçlarını değerlendirmek amacıyla öngörülen 3B protein yapıları 97

Şekil 4-7. Tablo 4-6'te yer alan üç olguya (ET-15, ET-18 ve ET-20) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri 99

Şekil 4-8. İnsan GABRP proteininin (UniProt O00591) öngörülen 3B yapısı ve topolojik Organizasyonu 99

Şekil 4-9. ET-13 olgusuna ait *NOTCH2NLC* ve *GIPC1* genlerindeki tekrar bölgelerinin fragman analizi (*a*) ve tüm genom dizileme (TGD) (*b*) sonuçlarının karşılaştırmalı gösterimi

Şekil 5-1. *TENM4* varyantlarının lokalizasyonu 109

Şekil 5-2. GABAerjik reseptörler, cAMP–PKA sinyal yolu, sitoskeletal düzenleme ve redoks homeostazı arasında bağlantı kuran entegre sinyal yolakları 110

Şekil 5-3. *HTRA2, PSEN2*, demir metabolizması ve γ-sekretaz sinyallemesinin mitokondriyal proteostaz, oksidatif stres ve nörodejenerasyon üzerindeki birbiriyle bağlantılı rollerinin şematik gösterimi 111

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics

CADD – Combined Annotation Dependent Depletion

ClinVar – Clinical Variant Database

CNV – Copy Number Variation

DNA – Deoxyribonucleic Acid

dNTP – Deoksiribonükleozit trifosfat

ddNTP – Dideoksinükleosit trifosfat

EMG – Elektromiyografi

ER – Endoplazmik Retikulum

ES – Exome Sequencing (Ekzom Dizileme)

ET – Essential Tremor (Esansiyel Tremor)

ET-plus – Ek nörolojik bulgularla seyreden esansiyel tremor fenotipi

gnomAD – Genome Aggregation Database

HGMD – Human Gene Mutation Database

IGV – Integrative Genomics Viewer

HPO – Human Phenotype Ontology

IPMDS – International Parkinson and Movement Disorder Society

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

MRI – Magnetic Resonance Imaging (Manyetik Rezonans Görüntüleme)

NGS – Next-Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)

PD – Parkinson’s Disease (Parkinson Hastalığı)

PZR – Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TP-PCR – Triplet-Primed Polymerase Chain Reaction

WGS – Whole Genome Sequencing

ÖZET

Aghayev AR. (2026). Esansiyel Tremorun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler : Esansiyel tremor, yeni nesil dizileme, ekzom dizileme, tüm genom dizileme, genetik heterojenite, segregasyon analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2024-40883

Esansiyel tremor (ET), erişkin başlangıçlı en yaygın hareket bozukluğu olmasına karşın, genetik temeli henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ailesel kümelenme iyi bilinmekle birlikte, ET belirgin genetik heterojenite göstermekte olup, çok sayıda nadir ve aileye özgü varyant bildirilmiştir. Bu çalışmada, aile temelli dizileme ve segregasyon analizleri kullanılarak ET'ye katkıda bulunabilecek nadir aday genetik varyantların belirlenmesi amaçlanmıştır. Yirmi ET ailesinde kademeli bir dizileme stratejisi uygulanmış; solo, duo ve trio ekzom dizileme gerçekleştirilmiş, ayrıca seçilmiş hastalarda tamamlayıcı bir yaklaşım olarak tüm genom dizilemesi yapılmıştır. Varyant önceliklendirmesi; popülasyon frekansı, öngörülen fonksiyonel etki, gen düzeyinde kısıtlılık metrikleri ve uygun olduğu durumlarda yerleşik varyant sınıflandırma çerçevelerine dayanılarak yapılmıştır. Etkilenmiş ve etkilenmemiş aile bireylerinin mevcut olduğu durumlarda segregasyon analizleri gerçekleştirilmiş ve tanımlanan varyantlar ailesel kanıtın gücüne göre sınıflandırılmıştır. Analiz edilen 20 ailenin 16'sında birden fazla etkilenmiş birey bulunurken, dört aile görünürde sporadik tekil olgular olarak sınıflandırılmıştır. ET indeks olgularında toplam 18 gen üzerinde nadir aday varyantlar saptanmıştır. Bunlar arasında özellikle *ABCG4, ADCY5, FTL, GABBR2, GABRP, GCH1, HTRA2, PSEN2* ve *TMEM230* genlerini etkileyen dokuz varyant, segregasyon analizine kalıtımla uyumlu olduğundan önceliklendirilmiştir. Segregasyon analizinin ayırt edici olduğu durumlarda destekleyici genetik kanıt sağlanmış, aksi halde varyant yorumlaması nadirlik ve biyolojik anlamlılığa dayandırılmıştır. Bu çalışmada tanımlanan aday genler; inhibitör nörotransmisyon, dopaminerjik sinyalizasyon, membran taşınımı, mitokondriyal fonksiyon ve protein homeostazı gibi ET ile ilişkili biyolojik süreçleri vurgulamakta olup, hastalığın heterojen ve aileye özgü genetik bir modele sahip olduğunu desteklemektedir.

ABSTRACT

Aghayev AR. (2026). Investigation of the Genetic Etiology of Essential Tremor. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. PhD Thesis. İstanbul.

Keywords: Essential tremor, next-generation sequencing, exome sequencing, whole-genome sequencing, genetic heterogeneity, segregation analysis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2024-40883

Essential tremor (ET) is the most common adult-onset movement disorder, yet its genetic basis remains incompletely understood. Although familial aggregation is well recognized, ET shows marked genetic heterogeneity, with many rare and family-specific variants reported. We aimed to identify rare candidate genetic variants potentially contributing to ET using family-based sequencing and segregation analyses. A tiered sequencing strategy was applied in 20 unrelated ET families, including solo, duo, and trio exome sequencing, with additional whole-genome sequencing performed in selected patients as a complementary approach. Variants prioritization was based on population frequency, predicted functional impact, gene-level constraint metrics, and established variant classification frameworks where informative. Segregation analyses were conducted when affected and unaffected family members were available, and identified variants were classified according to the strength of familial evidence. Among the 20 families analyzed, 16 included more than one affected individual, while four were classified as apparently sporadic singleton cases. Rare candidate variants were identified across 18 genes in ET index cases. Of these, nine variants affecting distinct genes notably *ABCG4*, *ADCY5*, *FTL*, *GABBR2*, *GABRP*, *GCH1*, *HTRA2*, *PSEN2*, and *TMEM230* were prioritized based on the feasibility of segregation analyses. Segregation provided supportive genetic evidence when discriminatory; otherwise, variant interpretation relied on rarity and biological plausibility. The candidate genes, identified in this study, highlight biological processes relevant to ET, including inhibitory neurotransmission, dopaminergic signaling, membrane trafficking, mitochondrial function, and protein homeostasis, supporting a heterogeneous, pedigree-specific genetic model.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Esansiyel tremor (ET), ritmik kinetik veya postüral tremor ile karakterize edilen en sık görülen hareket bozukluklarından biridir (**1**). Genellikle başlangıçta asimetrik olarak ortaya çıkan tremor zamanla bilateral üst ekstremite tutulumuna ilerleyebilmekte ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde alt ekstremiteler, baş, çene ve ses gibi diğer anatomik bölgeleri de etkileyebilmektedir. ET tanısı esas olarak klinik değerlendirmeye dayanmakta olup, tanı kriterleri Uluslararası Parkinson ve Hareket Bozuklukları Derneği (International Parkinson and Movement Disorder Society, IPMDS) tarafından güncellenmiş ve temel klinik özelliklerin yanı sıra "ET-plus" fenotipi de tanı çerçevesine dahil edilmiştir (**1**). Epidemiyolojik çalışmalar ET prevalansının yaşla birlikte belirgin şekilde arttığını göstermektedir; genel popülasyonda yaklaşık %0,9 olarak bildirilen prevalans, doksan yaş üzerindeki bireylerde %20'nin üzerine çıkabilmektedir. Bu durum, çeşitli bölgesel çalışmalarla da desteklenen önemli bir halk sağlığı yüküne işaret etmektedir (**2**). ET çoğunlukla erişkin yaşta ortaya çıkmakla birlikte olguların yaklaşık %5'inde başlangıç yaşı 20'nin altındadır. Bunun yanında ET'nin sağlık sistemleri üzerindeki ekonomik yükü de dikkat çekicidir, yıllık doğrudan tıbbi maliyetlerin 9,4 milyar ABD dolarını aştığı bildirilmektedir (**3**).

Geçmişte benign ve tek semptomlu bir hastalık olarak değerlendirilen ET'nin günümüzde çok boyutlu bir klinik tabloya sahip olduğu kabul edilmektedir. ET sıklıkla bilişsel gerileme, yürüme ataksisi ve çeşitli nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (**1**). Klinik değerlendirmede Fahn–Tolosa–Marin tremor derecelendirme ölçeği halen altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, bazı hastalarda hafif ekstrapiramidal bulgular veya özellikle ailesel olgularda Parkinson hastalığı (PH) ile fenotipik örtüşmeler de gözlenebilmektedir (**2,3**).

ET'nin genetik mimarisi oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür. Klinik heterojeniteye rağmen olguların yaklaşık %70'inde aile öyküsünün bulunması, hastalığın patogenezinde güçlü bir genetik katkının varlığını düşündürmektedir (**4**). Mevcut veriler, tanısal doğruluğun artırılması, hastalığın patojenik mekanizmalarının aydınlatılması ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla kapsamlı genetik çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır (**5**). Geleneksel bağlantı analizleri yalnızca sınırlı sayıda aday lokusun tanımlanmasına olanak sağlamış olsa da, yeni nesil

dizileme (Next-Generation Sequencing, NGS) teknolojilerindeki ilerlemeler - özellikle ekzom dizileme (ES) ve tüm genom dizileme (TGD) ET patogenezinde rol oynayabilecek nadir varyantların ve yeni aday genlerin tanımlanmasını mümkün kılmıştır (**5,6**).

Yüksek verimli dizileme teknolojilerinden yararlanılan bu çalışmada, ET ile ilişkili olduğu düşünülen çeşitli biyolojik yolaklarda yer alan genlerdeki nadir ve potansiyel olarak patojenik varyantlar araştırılmıştır. Bu yolaklar arasında GABAerjik nörotransmisyon, kalsiyum sinyal iletimi, mitokondriyal homeostaz, membran iyon taşınımı, protein ubiquitinasyonu ve degradasyonu ile endoplazmik retikulum (ER) stres yanıtı yer almaktadır. Özellikle *FUS, KCNS2, NOS3, SCN4A* ve *TENM4* genlerinde tanımlanan varyantların daha önce ET ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (**6,7**). Bu çalışma, klinik olarak ayrıntılı biçimde karakterize edilmiş bir ET kohortunda gerçekleştirilen kapsamlı genomik analizler aracılığıyla, tek bir genin doğrudan nedenselliğini ortaya koymaktan ziyade ET yatkınlığına katkıda bulunabilecek aileye özgü nadir varyantların belirlenmesine yönelik hipotez oluşturucu bir yaklaşım benimsemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HAREKET BOZUKLUKLARI

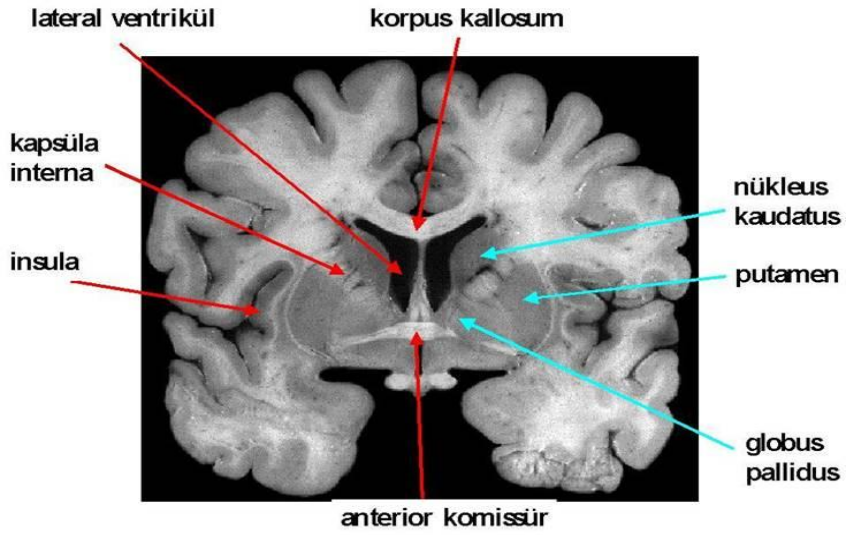
Hareket bozuklukları (HB), kas gücü kaybı veya spastisite olmaksızın istemli ve otomatik hareketlerin miktarında ya da niteliğinde ortaya çıkan değişikliklerle karakterize nörolojik hastalık grubunu ifade eder. Bu bozukluklar genel olarak hipokinetik (hareket azalması; *hipokinezi, bradikinezi, akinezi*) ve hiperkinetik (artmış veya anormal istemsiz hareketler; *tremor, distoni, kore* vb.) olarak sınıflandırılır (**Tablo 2-1**). Hareket bozukluklarının patofizyolojisi çoğunlukla bazal ganglionlar ve ilişkili ekstrapiramidal sistem devrelerinin etkilenmesi ile ilişkilidir. Tremor, iyi tanımlanmış bir hareket bozukluğu olup, esansiyel tremor bu fenomenin en sık görülen klinik nedenlerinden biridir (**8,9**).

Tablo 2-1. Hareket bozukluklarının alt tipleri.

Hipokineziler	**Hiperkineziler**
Akinezi / Bradikinezi (Parkinsonizm)	Abdominal diskineziler
Apraksi	Akatizik hareketler
Bloke edici tikler	Ataksi / asinergi / dismetri
Katapleksi ve düşme atakları	Ateztoz
Katatoni, psikomotor depresyon ve obsesyonel yavaşlık	Ballismus
Donma fenomeni	Kore
Tereddütlü yürüyüş	Distoni
Hipotiroid yavaşlığı	Hemifasiyal spazm
Rijidite	Hiperepleksi
Kas katılığı (stiffness)	Hipnojenik diskinezi
	Sıçrayan güdük
	Oynayan başparmak ve parmaklar
	Myoklonus
	Myokimi ve sinkineziler
	Paroksismal diskineziler
	Uykuda periyodik hareketler
	REM uykusu davranış bozukluğu
	Huzursuz bacaklar
	Stereotipi
	Tikler
	Tremor

2.1.2. Ekstrapiramidal Sistem

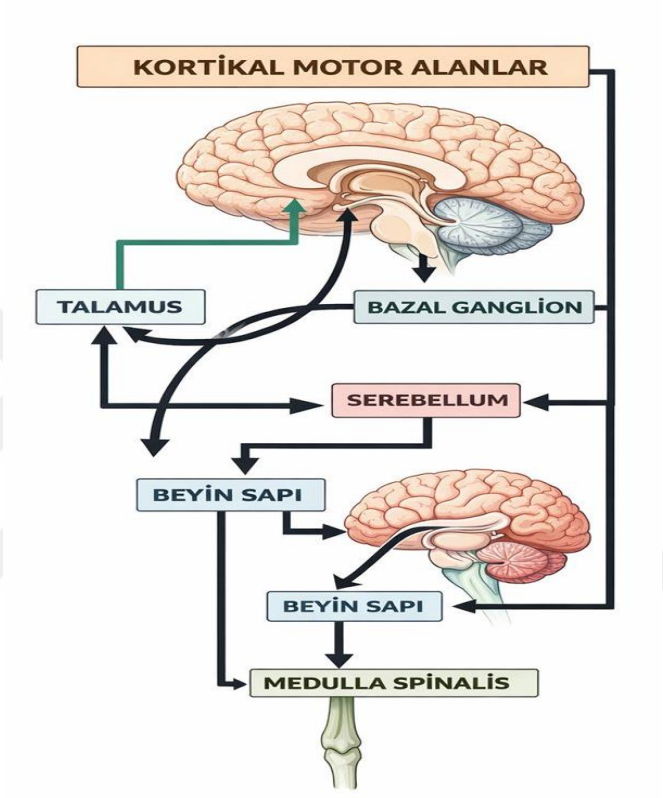
Ekstrapiramidal sistem, tarihsel olarak piramidal motor yollar dışında kalan ve hareketlerin düzenlenmesinde rol oynayan nöral yapıları tanımlamak amacıyla kullanılan bir terimdir. Günümüzde anatomik olarak tek ve bağımsız bir sistem olmadığı anlaşılmış olsa da, bu kavram hareketlerin kontrolü ve modülasyonunda görev alan bazal ganglia ve ilişkili kortiko-subkortikal devreleri ifade etmek için kullanılmaya devam etmektedir. Ekstrapiramidal sistemin temel yapısını oluşturan bazal ganglia; *kaudat çekirdek, putamen, globus pallidus, subtalamik çekirdek ve substantia nigra* gibi çekirdek gruplarından oluşur (**Şekil 2-1**). Bu yapılar, kortiko-bazal ganglia-talamo-kortikal devreler aracılığıyla serebral korteks ile karşılıklı bağlantılar kurarak motor, kognitif ve limbik işlevlerin düzenlenmesinde rol oynar.



Şekil 2-1. Bazal ganglia ve ilişkili yapıları gösteren koronal kesit. *Kırmızı oklar: beyaz madde yapıları ve boşlukları; turkuaz oklar: bazal ganglia çekirdekleri, gri madde nukleuslarını göstermektedir*.

Bazal ganglia, doğrudan hareketi başlatan yapılardan ziyade, motor korteksten gelen bilgileri işleyerek hareketlerin planlanması, başlatılması, hız ve amplitüdünün ayarlanması ve uygun motor programların seçilmesi gibi düzenleyici işlevler üstlenir. Bu sistemde bilgi akışı temel olarak direkt ve indirekt yollar aracılığıyla gerçekleşir. Direkt yol hareketi kolaylaştırıcı etki gösterirken, indirekt yol istenmeyen veya çelişen motor programların baskılanmasına katkıda bulunur. Böylece hareketlerin uygun kas gruplarında, uygun hız ve büyüklükte gerçekleşmesi sağlanır (**Şekil 2-2**). Bazal ganglia

devrelerinde dopamin, GABA ve glutamat başta olmak üzere çeşitli nörotransmiterler önemli rol oynar. Özellikle dopaminin direkt ve indirekt yollar üzerindeki düzenleyici etkisi, talamus ve motor korteks arasındaki uyarıcı–inhibitör dengenin korunmasını sağlar. Bu sistemde meydana gelen yapısal veya fonksiyonel bozukluklar, PH, distoni, kore ve tremor gibi hareket bozukluklarının ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (**10-12**).

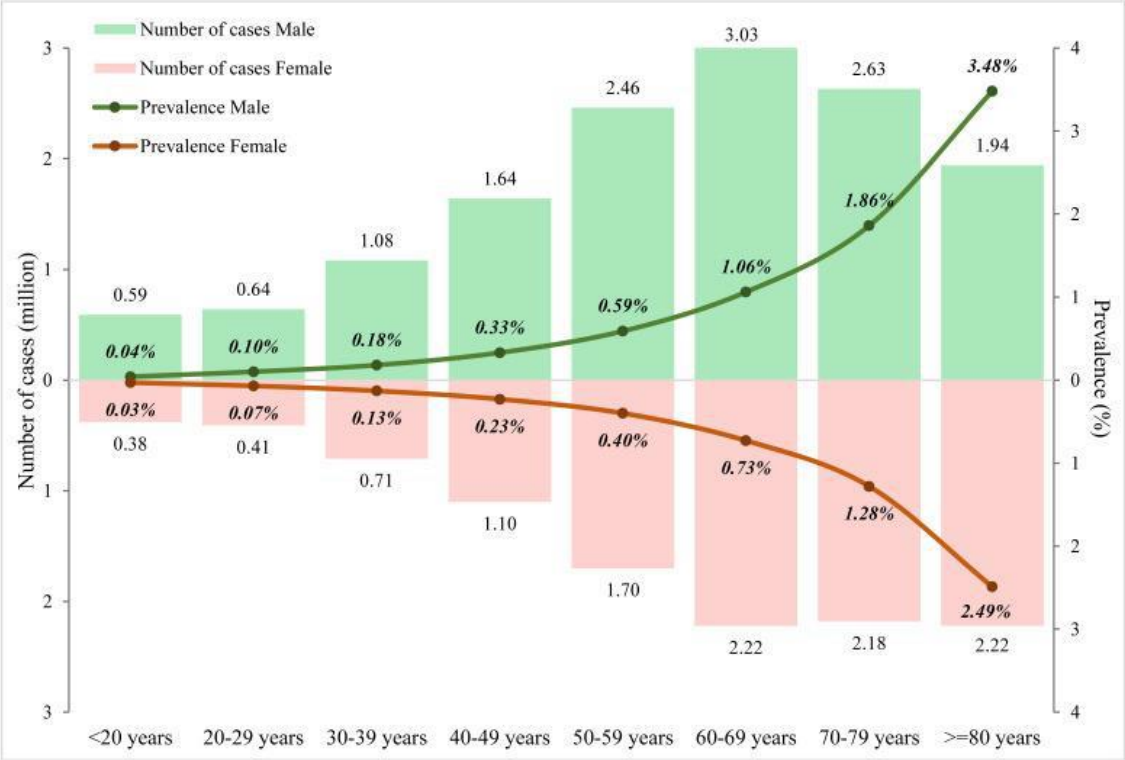


Şekil 2-2. Motor sistemin belli başlı yapıları arasındaki ana ilişkilerin, geri-dönen ve desendan yolların şematik görünüşü.

2.2. ESANSİYEL TREMOR

Esansiyel Tremor (ET), en sık görülen kronik nörolojik hastalıklardan biri olmasına karşın, aynı zamanda en fazla ihmal edilen bozukluklar arasında yer almaktadır. ET'nin epidemiyolojik dağılımı, tanımının belirsizliği, klinik bulguların sınırlı bir spektrumda seyretmesi ve bu bulguların özgüllüğünün düşük olması nedeniyle halen net biçimde ortaya konulamamıştır. Günümüzde ET tanısını koymaya yönelik doğrulanmış bir altın standart yöntem bulunmamaktadır (**13**). Yapılan tahminlere göre, 65 yaş üzerindeki genel popülasyonun yaklaşık %5'i ET'den etkilenmektedir (**2**). Semptomlar genellikle progresif bir seyir izlemekte olup, bireyleri meslek değiştirmeye

ya da erken emekliliğe zorlayabilmektedir (**14**). ET'nin dünya genelindeki insidans ve prevalansına ilişkin güçlü ve güvenilir veriler halen sınırlı olup, hastalığın başlangıç yaşı, eşlik eden hastalıklar gibi demografik özelliklerinin rolü ile uzun dönem tedavi stratejileri yeterince araştırılmamıştır (**2**). Ayrıca, genel popülasyonda yaşam beklentisinin artmasıyla birlikte ET'nin insidans ve prevalansının da artması beklenmektedir. Bu durum, hastalık yükünde artışa yol açacak ve nörologlar ile birinci basamak hekimleri arasında güçlü bir iş birliğini gerektiren sağlık hizmeti yönetimini zorunlu kılacaktır. Bu bağlamda, hastalığın insidans ve prevalansına ilişkin güncel verilerin elde edilmesi, belirleyici faktörlerin ortaya konulması ve demografik, klinik özelliklerin hastalık başlangıcı ve progresyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. ET hareket bozuklukları arasında en yüksek prevalansa sahip hastalık olduğu tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 7 milyon kişinin ET ile yaşadığı ve bunun toplam nüfusun yaklaşık % 2'sine karşılık geldiği tahmin edilmektedir. Avrupa özelinde değerlendirildiğinde ise, bugüne kadar ET epidemiyolojisini sistematik olarak inceleyen kapsamlı çalışmalar bulunmamaktadır (**14**). Mevcut verilerden biri İspanya'dan bildirilmiş olup, 60 yaş ve üzerindeki bireylerde ET prevalansı % 6,3 (% 2,3–14,3) olarak rapor edilmiştir (**15**). Bununla birlikte, daha yakın tarihli bir meta-analiz ET'nin küresel prevalansını % 0,32 olarak bildirmiştir. Buna karşılık, Louis ve McCreary tarafından gerçekleştirilen daha önceki bir çalışmada, tüm yaş grupları dikkate alındığında prevalansın yaklaşık üç kat daha yüksek olduğu (% 0,9) gösterilmiş; 60 yaş üzerindeki bireylerde bu oranın % 4,6–6,3'e, 95 yaşına kadar olan ileri yaş gruplarında ise % 21,7'ye ulaştığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın 2021 yılında yayımlanan güncellemesinde ise, havuzlanmış prevalans tahmini % 1,33'e yükseltilmiş olup, dünya genelinde en az her 100 kişiden birinin yaşamları boyunca ET ile karşılaşabileceği öngörülmektedir (**2,16**). **Şekil 2-3**'de, Song ve arkadaşları tarafından bildirilen küresel prevalans dağılımı, cinsiyet ve yaş gruplarına göre ayrıntılı biçimde sunulmaktadır. Genel olarak erkeklerde prevalansın kadınlara kıyasla daha yüksek olduğu, ayrıca yaşla birlikte prevalansın giderek artan bir hızla yükseldiği dikkat çekmektedir.



Şekil 2-3. Esansiyel tremorun (ET) cinsiyet ve yaş gruplarına göre prevalansı (**16**).

2.2.1. Tarihçe

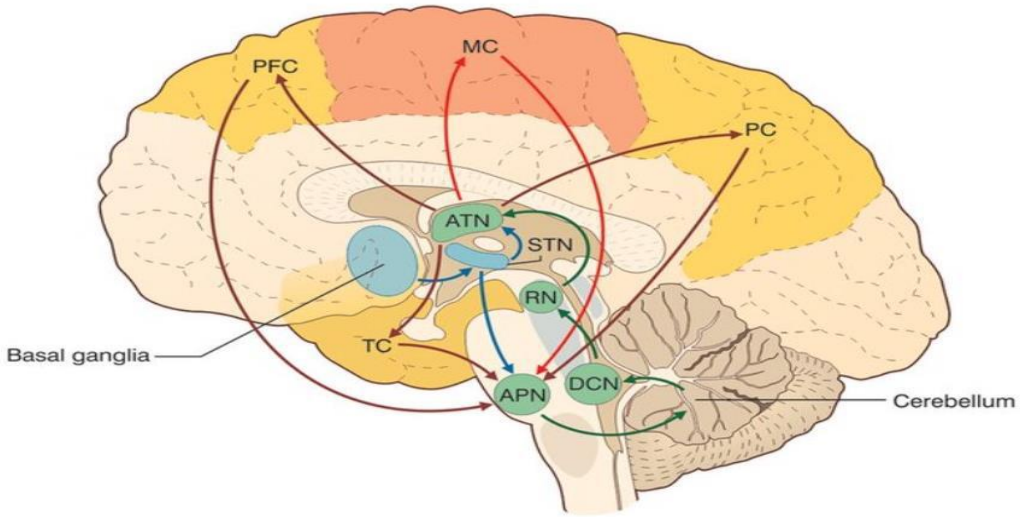
Başlangıçta ET tanımı, PH, ataksi, distoni ve diğer parkinsonizm tipleri gibi tremorojenik hastalıkların tanımlarıyla iç içe ele alınmıştır. Spontan ve kalıcı tremora ilişkin en eski betimlemeler, MÖ 5000–3000 yılları arasında uygulandığı kabul edilen antik Hint tıp sistemi Ayurveda'da yer almaktadır. Bu sistemde, günümüzde ET ve PH tanılarıyla örtüşen, farklı yönleriyle tremoru betimleyen çok sayıda terim kullanılmıştır. Özetle Ayurveda'ya göre tremorlar insan bedenini oluşturan üç temel unsurdan biri olan ve ruhsal denge ile motor yönleri temsil eden "vata" (*Ayurveda'da hava ve boşluk elementleriyle ilişkili biyolojik enerji*) dengesizliğine bağlı olarak ortaya çıkmakta, bu dengesizlik tremorla ilişkili hastalıklar, vücut sertliği ve depresyona yol açmaktadır (**17,18**). Geleneksel Çin Tıbbı'ndan yazılı kaynaklarda yaklaşık MÖ 300 yılına tarihlense de, klinik pratiğinin Neolitik Çağ'a kadar uzandığı düşünülmekte ve esansiyel tremorun nedeni "iç rüzgâr" olarak tanımlanmaktadır (**19,20**). Antik Yunan'da, Homeros'un Odysseia destanında Kral Nestor'un PH düşündüren semptomlardan mustarip olduğu ve bu nedenle atletik yarışmalara katılamadığı anlatılmaktadır. O dönemde atletik yetkinlik, bir kralın gücünü kanıtlaması açısından son derece önemliydi

(**21**). Bunun yanı sıra, Antik Yunan'ın önde gelen hekimlerinden Bergamalı Galen (MS 130–200), *On Tremor, Palpitation, Convulsion and Shivering* adlı eserinde tremorları ayrıntılı biçimde ele almıştır. Galen, istirahat tremoru ile istemli hareket sırasında ortaya çıkan kinetik tremoru birbirinden ayırmış, günümüzde PH için özgü olan istirahat tremorunu "*shaking palsy*" olarak tanımlamıştır. Ondan önce, bugün PH ve ET olarak bilinen tablolar, aynı hastalığın iki fenotipi olarak kabul edilmekteydi. Dikkat çekici biçimde, Galen'in yazılı gözlemlerine rağmen bu yaklaşım 17. yüzyıla kadar ciddi biçimde sorgulanmamıştır. Günümüzde ise bu ayrım, PH ile ET arasındaki temel farklardan biri olarak kabul edilmektedir (**22,23**). 19. yüzyılda, hastaya özgü içsel özelliklere bağlanan ve nedeni bilinmeyen hastalıklar sıklıkla "essential (esansiyel)" olarak adlandırılmıştır. Ancak günümüzde bu terim büyük ölçüde anlamını yitirmiş olup, hastalığın adını belirsiz kılmaktadır. Alman hekim Georg Friedrich Most'un, 1836 yılında ailesel ET'yi tanımlayan ilk kişi olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, James Parkinson 1817 yılında ET'nin, daha sonra kendi adıyla anılacak olan PH`nı ayrı bir klinik durum olduğunu belirtmiş, ancak bu gözlemleri 1887 yılına kadar yayımlanmamıştır (**24,25**). "Tremore semplice essenziale" terimini ilk kullanan hekim ise, 1874 yılında Siena Üniversitesi'nden Prof. Pietro Burresi olmuştur. Burresi, 18 yaşındaki bir erkek hastada, uykuda kaybolan aksiyon tremoru varlığını, aile öyküsünün bulunmamasını ve semptomları açıklayabilecek başka bir nedenin olmamasını tanımlamıştır. Kurşun, cıva ve diğer toksik ajanlar sorumlu bulunmamış, ayrıca diğer motor bulguların yokluğu nedeniyle multipl skleroz olasılığı dışlanmıştır. O dönemde PH için kullanılan *paralysis agitans* tanısı da, denge ve yürüme bozukluğunun ve daha önemlisi felcin olmaması nedeniyle uygun görülmemiştir (**25,26**). 1887 yılında Charles Dana, ET'yi muhtemelen ailesel geçişle ilişkili, simetrik kinetik tremorla seyreden ve aile bireylerinde kümelenme gösteren, nedeni bilinmeyen bir durum olarak tanımlamıştır (**17,27**). Avusturya'nın Graz kentinde Sinir ve Ruh Hastalıkları Kliniği'nde görev yapan Anton Nagy, 1890'lı yıllarda tek bir ailede görülen ET olgularını incelemiştir. Çocukluk çağından beri ET'den etkilenen 26 yaşındaki bir kadının yazı yazma, çatal-bıçak kullanma ve nesneleri tutma gibi günlük aktivitelerde ciddi güçlük yaşadığı, semptomların yaşla birlikte ilerleyerek baş ve bacakları da etkilediği bildirilmiştir. Nörolojik muayenede santral sinir sistemi tutulumuna işaret eden bir bulgu saptanmamış ancak aile öyküsü incelendiğinde, soy ağacındaki bireylerin yaklaşık %50'sinde el ve baş tremoruna benzer belirtilerin bulunduğu gösterilmiştir

(**25**). 20. yüzyıla gelindiğinde, ET tanısı giderek daha sık biçimde, tremorun diğer nedenleri dışlandıktan sonra konulan bir "ek tanı" haline gelmiştir. Uzun süre boyunca ET iyi huylu, her zaman ailesel kökenli ve sınırlı semptom yelpazesine sahip bir durum olarak değerlendirilmiştir. Günümüzde ise yanlış tanı ve tanı gecikmesi hâlen oldukça yaygındır. Bunun başlıca nedenlerinden biri, ET'nin yalnızca motor sistemi değil, psikiyatrik alanı ve genel olarak hastaların yaşam kalitesini de ciddi biçimde etkileyebilecek bir antite olduğunun yeterince tanınmamasıdır (**14**).

2.2.2. Patofizyolojisi

Tremor patogenezinde en olası rolü oynayan sistemin serebello–talamo–kortikal devre olduğu düşünülmekle birlikte, bu devredeki hasarın niteliği ve altta yatan süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda temel sorulardan biri, ET'nin gerçek anlamda nörodejeneratif bir hastalık olup olmadığı, tremora yol açan sürecin aynı zamanda nöronların kademeli kaybına da neden olup olmadığı net değildir. Bir diğer önemli araştırma alanı, ET'de histopatolojik değişiklik gösteren tüm beyin bölgelerinin net biçimde tanımlanmasıdır. Günümüze kadar yapılan postmortem çalışmalar, hayvan modelleri ve görüntüleme araştırmaları birlikte değerlendirildiğinde, belirgin bir heterojenitenin bulunduğu görülmektedir. Bununla birlikte, ET ile ilişkili olduğu gösterilen başlıca beyin bölgeleri; serebellum, inferior olivary çekirdekler (*inferior olive nuclei, ION*), kırmızı çekirdek (*red nucleus*), talamus ve serebral korteks olarak sıralanmaktadır (**Şekil 2-4**).



Şekil 2-4. Hareket kontrolünde rol alan ve ET patofizyolojisi ile ilişkilendirilen beyin bölgelerinin şematik gösterimi (**28**`*den uyarlanarak*).

PFC: prefrontal korteks; MC: motor korteks; PC: parietal korteks; ATN: anterior talamik çekirdek; RN: kırmızı çekirdek; DCN: derin serebellar çekirdekler; STN: subtalamik çekirdekler; APN: anterior pontin çekirdekler; TC: temporal korteks.

Hareket genellikle bir niyet ile başlar, bu niyet, duyusal girdilere yanıt olarak soyut düşünme ve karar verme süreçlerini yöneten serebral kortekste ortaya çıkar. Premotor korteks, bu aşamada hedefe ulaşmak için gerekli olan hareket dizisini önceden planlar ve bir tür eylem şeması oluşturur. Bazal gangliyonlar - *striatum, globus pallidus ve substantia nigra*'yı içeren yapılar, özellikle PH`de hasar gören bölgeler olup, hareket planlarının yumuşatılması, rafine edilmesi ve uygun motor aktivitenin başlatılmasından sorumludur. Kırmızı çekirdek, hareket koordinasyonunu etkileyen küçük ancak işlevsel açıdan önemli bir beyin yapısıdır. Talamus ise, beynin farklı bölgeleri arasında bir tür sinyal aktarma ve entegrasyon merkezi olarak görev yapar. Talamusun temel işlevleri arasında motor kortekse geri bildirimlerin iletilmesi, bazal gangliyonlar ve serebellumu içeren devreler aracılığıyla istemli hareketlerin düzenlenmesi ve motor çıktının ek bir düzeyde yumuşatılması yer almaktadır. İnferior olivary çekirdekler (ION), santral sinir sisteminde tırmanıcı liflerin (*climbing* fibers) köken aldığı yapılardır. Bu lifler, serebellar kortekste yer alan Purkinje hücreleri ile sinaps yapar. Purkinje hücreleri, ION'dan gelen geri bildirim sinyallerini kullanarak serebellumda depolanmış olan hareket modellerini düzeltici biçimde modüle eder. Ortaya çıkan sinyal daha sonra serebellar çekirdekler üzerinden iletilir ve bir sonraki hareket denemesinde kullanılmak üzere hareket planı daha da harmanlanır (**28**).

Serebellum, hareketin kontrolünden sorumlu temel nörolojik yapı olup, karmaşık, rafine ve beceri gerektiren motor davranışların koordinasyon ve kalibrasyonuna ait içsel modelleri barındıracak şekilde evrimleşmiştir. Yeni ve karmaşık bir hareket dizisi öğrenildiğinde, örneğin bir topa belirli bir yön ve hassasiyetle vurmak gibi serebellum, deneme-yanılma temelli geri bildirim mekanizmaları aracılığıyla hareket planını kaydeder ve sonraki denemeleri optimize eder. Bu hata temelli geri bildirimlerin önemli bir bölümünün, inferior olivary çekirdeklerden (ION) kaynaklanan ve tırmanıcı lifler (climbing fibers) aracılığıyla iletilen sinyallerden oluştuğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Bu bağlamda intansiyon tremoru, bozulmuş serebello–talamik

fonksiyonun göstergesi olarak kabul edilmekte olup, yaş ilerledikçe ET hastalarında daha sık görülmesi, ET'nin esasen serebellar kökenli bir hastalık olduğu görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, terapötik açıdan bakıldığında, serebellar–talamik çekirdekleri hedefleyen derin beyin stimülasyonu uygulamalarının yüksek etkinlik göstermesi de bu hipotezi güçlendirmektedir (**29,30**).

Serebellumun fonksiyonel alt bölümleri - Fonksiyonel görevleri ve embriyolojik kökenleri dikkate alınarak serebellum üç ana bölüme ayrılmaktadır:

Neoserebellum / serebroserebellum: Motor davranışların içsel modellerinin programlanmasından ve işlenmesinden sorumludur. Hareketle ilişkili serebral kortikal alanlarla bağlantılıdır ve daha soyut bilişsel süreçlere de katkı sağlar. Hata geri bildirimlerinin ve bu hatalara verilen düzeltici yanıtların bu bölgeden kaynaklandığı, sonraki denemeler için hareket modelinin bu sayede ayarlandığı düşünülmektedir.

Spinosebellum: Yürüme ve postüral koordinasyonun düzenlenmesinde temel rol oynar.

Vestibüloserebellum: İç kulaktaki vestibüler reseptörlerden gelen bilgiler aracılığıyla göz stabilizasyonu ve denge kontrolünü sağlar (**31**).

Deuschl'a göre, ET'nin serebellumun bu üç alt bölümünü de etkilediğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, ET hastalarında göz kırpma refleksleri, balistik hareketler (ani ve patlayıcı kuvvet içeren hareketler; örn. yumruk atma) ve ritim kazanımı gibi işlevlerin değiştiği ya da tamamen kaybolduğu gösterilmiştir (**29,32**). Bu bulgular, ET'de hem istemli hem de istemsiz hareketlerin etkilendiğini düşündürmektedir.

Güncel literatürde ET patofizyolojisine ilişkin üç ana hipotez öne çıkmaktadır (**24,33**):

1. Nörodejeneratif hipotez,
2. Santral osilatör ağ hipotezi,
3. GABAerjik hipotez.

Nörodejeneratif hipotez - Bu hipotezi desteklemek amacıyla çok sayıda çalışmada ET'ye özgü beyin dokusu değişiklikleri araştırılmıştır. Yaşla birlikte progresyon göstermesi ve demansla olan ilişkisi, ET'nin PH`de substantia nigra için geçerli olan sürece benzer bir nörodejeneratif mekanizmaya sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu görüş, ET hastalarında Parkinson ve Alzheimer hastalığı riskinin artmış olduğunun

gösterilmesiyle de desteklenmektedir. Postmortem çalışmalarda Purkinje hücrelerinde dejenerasyon, akson ve dendrit kalınlaşmaları, yeniden yapılanmalar ve lokalizasyon değişiklikleri bildirilmiş, bu nedenle ET için "Purkinjopati" terimi de önerilmiştir (**34,35**). Ayrıca, inferior olivary çekirdek Purkinje hücre bağlantılarının ET hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla farklı olduğu gösterilmiştir: kontrol grubunda daha kalın ve yakın dendritlerle sinapslar baskınken, ET hastalarında sinapsların daha ince ve uzak dendritlerle kurulduğu gözlenmiştir. Tremor şiddeti arttıkça bu yeniden yapılanmaların daha belirgin hale geldiği ve kompansatuvar değişikliklerin devreye girdiği düşünülmektedir (**24**). Bununla birlikte, literatürde bu hipotezi zayıflatan bulgular da mevcuttur. Görüntüleme çalışmalarını içeren bir meta-analiz, serebellum ve Purkinje hücrelerinde tutarlı bir hasar kanıtının her çalışmada gösterilemediğini ortaya koymuştur. Ayrıca yaşlı bireylerde Purkinje hücrelerinin yaklaşık %5'lik kaybının normal yaşlanma sürecinin bir parçası olduğu da ileri sürülmektedir (**29**). Purkinje hücrelerinin yanı sıra, diğer nöronal ve glial hücre tiplerinde de işlevsel değişiklikler saptanmıştır. Ancak nörodejeneratif hipoteze yöneltilen en güçlü itirazlardan biri, etanolün ET hastalarında belirgin ve dramatik biçimde tremoru azaltıcı etkisinin, gerçek bir serebellar dejenerasyon varlığında beklenmeyecek olmasıdır (**30**). Ayrıca ET'de koku alma bozukluğunun belirgin gösterilememesi de bu hipotezle çelişen bir diğer noktadır. Bu tutarsızlıklar, santral osilatör ağ hipotezinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır (**36**).

Santral osilatör ağ hipotezi - Nöronal osilasyonlar, aktif nöronların elektriksel özelliklerine bağlı olarak beyinde fizyolojik bir olgudur. Karmaşık nöral ağlar içinde yer alan nöronlar, eşzamanlı olarak osile olabilir ve bu durum çok sayıda hücre arasında koordinasyonu sağlar. Ancak osilasyonların frekansı değiştiğinde ve birden fazla nöral ağı etkilediğinde bu süreç patolojik hale gelebilir, epileptik nöbetler bu duruma klasik bir örnektir (**37**). Başlangıçta, ET gelişiminin yalnızca inferior olivary çekirdeklerdeki osilasyonlara bağlı olduğu düşünülmüştür. Ancak daha sonraki çalışmalar, kasların tek bir osilatör tarafından eşzamanlı olarak aktive edilmediğini göstermiştir (**38,39**). Takip eden araştırmalar, metabolik, yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin yalnızca ION'da değil, serebellum, talamus ve motor kortekste de mevcut olduğunu ortaya koymuştur. EEG ve EMG çalışmalarında da, tek bir beyin bölgesindeki osilasyon ile kas aktivitesi arasında tam bir uyum olmadığı gösterilmiştir (**40**). Ayrıca serebellar inme veya cerrahi sonrası bu yapıların çıkarılması ya da ciddi hasar görmesi durumlarında, ET tremorunun

beklenen biçimde kaybolmaması, tremorun tek bir anatomik merkeze indirgenemeyeceğini düşündürmektedir (**24**).

GABAerjik hipotez - Üçüncü temel mekanizma, Gamma-Aminobütirik Asit (GABA) nörotransmisyonundaki bozukluğun serebellar nöron fonksiyonlarını etkileyerek tremora yol açtığı yönündeki hipotezdir. GABA modülasyonu ile ET arasındaki genetik ilişki gösterilmiş, ayrıca benzodiazepinler (örn. alprazolam), gabapentin, topiramat ve primidon gibi GABA düzeyini artıran ilaçların klinik etkinliği bu görüşü desteklemiştir. Bu hipotez, santral osilatör ağ teorisiyle çelişmemekte, aksine onu tamamlayıcı nitelik taşımaktadır. Önerilen mekanizmalardan biri, Purkinje hücre kaybına ikincil olarak gelişen GABA azalmasının, ET'nin birincil nedeni değil, nörokimyasal bir dengesizlik sonucu ortaya çıkmasıdır (**24,33,41**). Ayrıca glutamaterjik nörotransmisyon da bazı hayvan modellerinde ET ile ilişkilendirilmiştir, kontrol gruplarına kıyasla hem glutamat hem de GABA düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (**39**).

2.2.2.1. ET ve PH`nin Karşılaştırmalı Patofizyolojisi

Görüntüleme çalışmalarını içeren yakın tarihli bir meta-analiz, ET hastalarında substantia nigra'da demir birikimine dair belirgin kanıt bulunmadığını, bunun PH için karakteristik bir bulgu olduğunu ortaya koymuştur. Aynı çalışmada, ET'de dopaminerjik sistemin büyük ölçüde korunmuş olduğunu göstermiş, hatta bazı araştırmalarda ET hastalarının PH için kontrol grubu olarak kullanıldığı bildirilmiştir (**36**). Sang-Woo ve arkadaşlarının PET ve ^{123}I-MIBG miyokard sintigrafisi kullanarak yürüttüğü çalışmada ET-solo, PH-solo ve ET+PH olguları karşılaştırılmıştır. Presinaptik dopaminerjik yoğunlukların PH-solo ve ET+PH gruplarında benzer olduğu, ET-solo grupta ise daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Miyokardiyal denervasyon oranları ET+PH grubunda daha yüksek bulunmuş olup, bu durum ET'nin Parkinson hastalığının patofizyolojisiyle etkileşime girdiğini düşündürmüştür. Bu bağlamda ET'nin nörodejeneratif bir süreç gibi davrandığı ve hatta bazı hastalarda PH`nin prodromal bir formu olabileceği ileri sürülmüştür (**34**). Louis ve arkadaşlarının 2007 yılında analiz ettiği 33 ET olgusuna ait postmortem beyin örneklerinde, olguların %75'inde belirgin serebellar dejenerasyon (Purkinje hücrelerinde yaklaşık %40 azalma) saptanmış, ancak Lewy cisimcikleri izlenmemiştir. Kalan %25'lik grupta ise Lewy cisimcikleri yalnızca *locus coeruleus*'ta bulunmuştur. Bu iki patern sırasıyla "serebellar ET" ve "Lewy cisimcikli ET varyantı" olarak adlandırılmıştır ve ET'de *locus coeruleus*–Purkinje hücre

sinapslarının patolojik sürecin başlangıç noktası olabileceği öne sürülmüştür. Nitekim postmortem çalışmalar, ET hastalarının yaklaşık %25'inde beyin sapı Lewy cisimciklerinin, özellikle *locus coeruleus*'ta sağlıklı kontrollere kıyasla daha sık görüldüğünü ortaya koymuştur (**42**). Bu bulgular, ET+PH olgularında patolojinin önce *locus coeruleus*'ta başlayıp daha sonra *substantia nigra*'ya yayılabileceğini düşündürse de, bunun tersinin mümkün olup olmadığı veya bu paternin yalnızca yaşlanmaya mı ait olduğu hâlen tartışmalıdır (**43**). Son olarak, 18–52 yaş arası genç ET hastalarında frontal kortekste azalmış serebral kan akımı saptandığı ve bunun tremor şiddetiyle doğru orantılı olduğu bildirilmiştir. Ancak bu ilişkinin, özellikle depresyon ve anksiyete gibi eşlik eden psikiyatrik durumlar açısından yeterince kontrol edilmemiş olması önemli bir limitasyon olarak değerlendirilmektedir (**30,44**).

2.2.3. Klinik Özellikleri

ET`in ayırt edici klinik özelliği başta üst ekstremitelerin hareketi sırasında ortaya çıkan aksiyon tremoru olan progresif, kronik ve muhtemelen nörodejeneratif bir hastalıktır. İstirahat tremoru ise daha çok PH`ye özgü kabul edilmektedir. ET olgularının büyük çoğunluğunda hastalık hafif semptomlarla başlamakta, ancak zaman içinde ilerleyerek işlev kaybına yol açan, hatta engelleyici bir duruma dönüşebilmektedir (**45**). "Tremor" terimi bir vücut bölümünün istemsiz, ritmik ve osilatuvar (*çoğu zaman sinüzoidal özellik gösteren*) hareketini ifade eder. Bu hareket, genellikle sabit bir frekansa sahip olup amplitüdü değişkenlik gösterebilir ve simetrik ya da asimetrik biçimde ortaya çıkabilir. Tremor, antagonistik kas gruplarının ardışık ve dönüşümlü kasılmaları sonucunda meydana gelir (**46,47**). Tremorların sınıflandırılması ortaya çıktıkları pozisyona, vücuttaki dağılımına, frekansına, amplitüdüne ve etiyolojisine göre yapılabilmektedir (**Tablo 2-2**). En temel ayırım, tremorun hangi pozisyon ya da hareket sırasında ortaya çıktığına göre yapılmakta olup, bu bağlamda üç ana kategori tanımlanmaktadır:

i. İstirahat tremoru:

Bir ekstremitenin hareketsiz olduğu, aktif olarak herhangi bir görevle meşgul olmadığı durumlarda ortaya çıkan tremordur. En sık PH ile ilişkilendirilmekte olup "parkinsonyen tip" tremor olarak da adlandırılmaktadır.

ii. Aksiyon tremoru:

İstemli kas aktivitesi veya hareket sırasında ortaya çıkan tremordur ve kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır:

a. *Postüral tremor*: Ekstremitenin yerçekimine karşı bilinçli olarak belirli bir pozisyonda tutulması sırasında gözlenir; kolların yatay pozisyonda tutulması buna tipik bir örnektir.

b. *Kinetik tremor*: Yazı yazma veya bir nesneye uzanma gibi amaçlı hareketler sırasında ortaya çıkan tremordur.

iii. *İzometrik tremor*: Etkilenen vücut bölümünde görünür bir hareket olmaksızın, kasların sabit bir dirence karşı kasılması sırasında ortaya çıkan tremordur. Bir nesnenin hareket ettirilmeden sıkıca kavranması bu duruma örnek olarak verilebilir (**24**).

Tablo 2-2. Tremorun hareket/postür ve etiyoloji-klinik özelliklere göre sınıflandırılması.

Tremor Tipi	Tanım / Özellikler	Frekans / Genlik	Klinik Özellikler	İlişkili Hastalıklar
Hareket ve Postüre Bağımlılığına Göre Tremor Çeşitleri				
İstirahat Tremoru	İstemli hareket yokken ortaya çıkar, hareketle kaybolur	Orta frekans	"Para sayma" tremoru, distal ekstremitelerde	PH
Postüral Tremor	Yerçekimine karşı postür korunurken ortaya çıkar	Değişken	Kollar öne uzatıldığında belirgin	ET
Aksiyon (Kinetik) Tremor	İstemli hareket sırasında ortaya çıkar	Genelde yüksek frekans	Hareket boyunca devam eder	ET
İntansiyon Tremoru	Hedefe yaklaşırken genliği artar	Düşük frekans, yüksek genlik	Parmak-burun testinde belirgin	Serebellar lezyonlar
Rubral Tremor (Holmes)	İstirahat + aksiyon kombinasyonu	Düşük frekans, kaba	Proksimal kaslarda belirgin	Orta beyin lezyonları
Etiyoloji ve Klinik Özelliklere Göre Tremor Çeşitleri				
Fizyolojik Tremor	Normal bireylerde görülen tremor	10–12 Hz	Patolojik değildir	Normal fizyoloji
Artmış Fizyolojik Tremor	Fizyolojik tremorun artmış hali	↑ genlik	Stresle artar	Metabolik, ilaçlar
Esansiyel Tremor (ET)	En sık tremor tipi	4–12 Hz	Bilateral, progresif	Genetik
Ortostatik Tremor	Ayağa kalkınca başlar	15–16 Hz	Bacaklarda titreme	İdiopatik
Primer Yazıcı Tremoru	Yazı sırasında ortaya çıkar	5–6 Hz	Göreve özgü	Distonik/ET
İzole Ses Tremoru	Sadece ses etkilenir	-	Konuşma sırasında	ET/distoni
İzole Çene Tremoru	Çenede tremor	-	Geniospazm	AD geçiş

Distonik Tremor	Distoni ile birlikte	Değişken	Postürle azalır	Distoni
Periferik Nöropatik Tremor	Nöropati ile ilişkili	Değişken	Proksimal/distal	Nöropatiler
Palatal Tremor	Yumuşak damakta ritmik hareket	Ritmik	Klik sesi olabilir	Guillain-Mollaret
Psikojenik Tremor	Ani başlangıçlı	Değişken	Distraktibilite	Psikojenik

2.2.3.1. Motor Bulgular

ET en sık 5–12 Hz frekans aralığında, çoğunlukla simetrik yerleşimli ve çıplak gözle belirgin biçimde izlenebilen postüral ve/veya kinetik tremor ile karakterizedir. Tremor esas olarak üst ekstremiteleri, eller ve ön kolları tutar. Kinetik/aksiyon tremoru olguların neredeyse tamamında (%90–95) görülmektedir. Baş ve/veya ses tremoru (*larinks tutulumu sonucu*) diğer tipik özellikler arasında yer almakla birlikte, genellikle izole bulgular şeklinde ortaya çıkmaz. Boyun ve çene tutulumu da görülebilir ve bu durum özellikle kadın hastalarda daha belirgindir (**48-51**).

Genel olarak tremor, heyecan, açlık gibi güçlü gereksinimler, aşırı sıcak ya da soğuk ortamlar ve yorgunlukla artış gösterir. Buna karşılık, belirli ölçüde istemli kontrol edilebilir özellik taşır, bireyler, beceri gerektiren el aktiviteleri sırasında tremoru kısa süreliğine baskılayabilirler. “Evet-evet (yes-yes)” tip baş tremorunun ET için karakteristik olduğu bildirilmekle birlikte, bazı araştırmacılar “hayır-hayır (no-no)” tipinin de sık görüldüğünü, hatta bazı kohortlarda daha yaygın olduğunu (olguların %75’ine kadar) belirtmiştir. İzole baş tremoru varlığında, nörologların ET’den ziyade servikal distoniyi düşünmeleri önerilir. Baş tremorunun, yalnızca PH olan bireylerde neredeyse hiç görülmediği, daha çok altta yatan ET gelişimi bulunan olgularda ortaya çıktığı bildirilmektedir (**52,53**). Tremor başlangıçta düşük amplitüdlü ve yüksek frekanslı olduğunda “fizyolojik” tremor olarak değerlendirilebilir, buna karşılık, genellikle uzun süreli ve daha yüksek amplitüdlü olan “patolojik” tremor zaman içinde belirginleşir. Amplitüd arttıkça çoğu zaman motor dışı bulguların da eşlik etmesiyle işlevsel kısıtlılık ve sekel ortaya çıkar ve bu durum hastaların sağlık kurumlarına başvurmasına yol açar (**24**). Ses tremoru, konuşma sırasında vokal kıvrımların istemsiz ve ritmik hareketleri sonucu ortaya çıkar ve sarsıntılı bir ses kalitesine neden olur. Hastaların en az %12’sinde bildirilmektedir. Yüz, çene ve gövde tremoru ise nadir olup yaklaşık her 20 hastadan birinde görülür. Buna karşın, çene tremoru geleneksel olarak PH ile ilişkilendirilse de, ET’li hastaların bir kısmında da saptanabilmektedir (**24,53**).

Dikkat çekici biçimde, baş ve ses tremorlarının prevalansında cinsiyete bağlı farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Kadınlarda bu tip tremorların daha sık görüldüğü, erkeklerde ise postüral tremorun daha yaygın olduğu bildirilmektedir (**49**). İstirahat tremoru olguların yaklaşık %20–30'unda görülebilmekle birlikte, PH`den farklı olarak, ET'de bu tremor genellikle hareketle artış gösterir. Ayrıca istirahat tremoru bulunan ET hastalarının daha ağır hastalık tablosuna sahip olduğu, tremorun daha geniş bir vücut dağılımı gösterdiği, baş tremorunun daha sık eşlik ettiği ve hastalık başlangıç yaşının daha erken olduğu belirtilmiştir. Bir hedefe yönelik hareketler, örneğin bardaktan su içme veya parmak-burun testi üst ekstremite tremoru bulunan ET hastalarında özellikle zorlayıcı olabilir, bu durum intansiyon tremoru olarak tanımlanmaktadır. Parmak-burun testi, ET'yi ortaya koymak amacıyla yapılan nörolojik muayenede sıklıkla kullanılır ve genellikle kolların yerçekimine karşı sabit bir pozisyonda tutulmasının istendiği postüral tremor değerlendirmesiyle birlikte uygulanır. Ayrıca, bardağa su dökme, yazı yazma, labirent çizme veya Arşimet spiral testi çizimi gibi amaçlı görevler, ET şüphesi olan olguların klinik değerlendirilmesinde yararlı testlerdir. Alt ekstremite tremoru sık değildir (olguların yaklaşık %30'u) ve istirahat halinde ortaya çıkması durumunda PH olasılığını düşündürmelidir (**26,47,54**). ET hastalarında, PH`nin en özgül ve belirgin semptomlarından biri olan bradikinezinin prevalansı incelendiğinde, bu bulgunun ET'nin fenotipik özelliklerinden biri olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. 2020 yılında İtalya'da gerçekleştirilen bir çalışmada, ET'li hastaların bir alt grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla daha yavaş hareketler saptanmış, ancak PH`de tipik olarak görülen, tekrarlayıcı hareketlerde giderek yavaşlama ve amplitüd azalmasıyla seyreden sekans etkisi (sequence effect, SE) gözlenmemiştir (**55,56**). Bu çalışmadan yola çıkan patofizyolojik hipoteze göre, serebello-talamokortikal ağdaki hasar hem tremorda hem de bradikinezide rol oynayabilmekte, ancak PH`den farklı olarak, bradikinezinin esas olarak bazal gangliyonların diğer bölümlerinden ziyade substantia nigra hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (**57,58**). ET ve PH`deki tremor fenotipleri arasındaki bir diğer önemli fark, yeniden ortaya çıkan tremor (*re-emergent tremor*) ile ilgilidir. Bu tremor tipi, postür alındıktan sonra belirli bir latent dönemden sonra ortaya çıkan bir postüral tremordur, örneğin hastadan kollarını belirli bir süre yatay pozisyonda tutmasının istendiği klinik testlerde gözlenir. ET'de latent sürenin PH`ye kıyasla daha kısa olduğu, PH`de ise bu sürenin 3 dakika veya daha uzun olabildiği bildirilmiştir (**53**).

2.2.3.2. Motor Dışı Bulgular

Motor dışı özellikler ET'nin karakteristik bileşenleri olarak giderek daha fazla kabul görmektedir. Bu bulgular, tremorların yerleşmesinden sonra ikincil belirtiler şeklinde ortaya çıkabildiği gibi, bazı olgularda motor semptomlardan önce de gelişebilmektedir. Bu bağlamda; bilişsel bozukluk, demans, psikiyatrik durumlar (*depresyon, apati, anksiyete*), işitme kaybı, koku alma bozukluğu ve uyku bozuklukları ET ile ilişkili karakteristik durumlar olarak tanımlanmıştır. Louis tarafından gerçekleştirilen bir meta-analizde, ET hastalarının hafif bilişsel bozukluğun değerlendirilmesinde kullanılan Montreal Bilişsel Değerlendirme testinde, yaşa göre eşleştirilmiş kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha düşük puanlar aldığı gösterilmiştir, diğer epidemiyolojik çalışmalar da hafif bilişsel bozukluğun ve demansın ET hastalarında kontrollere göre daha sık görüldüğünü doğrulamıştır (**59,60**). Benito-León ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma, bilişsel sorunların ET'nin motor belirtilerinden önce mevcut olabileceğine dair kanıtlar sunmuştur (**61**). ET hastalarında bellek ve işlevsellikte gözlenen bu progresif değişimlerin seyri, nörodejeneratif hipotezi destekler niteliktedir. Geniş ölçekli prospektif bir kohort çalışmasında ET hastalarında demans prevalansının yaklaşık %20 olduğu, hafif bilişsel bozukluğundan demansa yıllık dönüşüm oranının ise %12 olarak saptandığı bildirilmiştir (**62**). Depresyon, ET'ye sıklıkla eşlik eden bir bulgudur ve Beck Depresyon Envanteri (BDI) gibi klinik ölçütlerin, tremor şiddeti arttıkça yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca İspanya'da yürütülen toplum temelli bir çalışmada, ET hastalarının genel popülasyona kıyasla depresyon geliştirme riskinin %78`den daha yüksek olduğu tahmin edilmiştir. Miller ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, çok sayıda depresif semptomun varlığının, bellek ve bilişsel yetilerde daha hızlı bir gerileşmeyi öngördüğü bildirilmiştir (**63**). Bununla birlikte, depresyon tanısı konmuş ET hastalarında, depresif semptomların spektrumunun, ET eşlik etmeyen majör depresyon olgularına kıyasla daha hafif olduğu görülmektedir (**64**). Bu bulgular ışığında, depresyonun yalnızca ET'nin sık görülen bir sonucu değil, altta yatan biyolojik hastalık sürecinin birincil mekanizmalarından biri olabileceği de tartışılmaktadır (**68**). ET ile sıklıkla ilişkilendirilen diğer psikiyatrik durumlar apati ve anksiyetedir. Apatiye ilişkin kanıtlar sınırlı olmakla birlikte, bir çalışmada Apati Değerlendirme Ölçeği (AES) puanlarının ET, distoni ve PH grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, anksiyete ile ET arasındaki ilişkiyi destekleyen daha güçlü bilimsel kanıtlar mevcuttur

(**59,65**). Genel olarak değerlendirildiğinde, ET ve PH`de duygudurum bozukluklarının insidansı ve tipleri arasında belirgin bir fark bulunmadığı görülmektedir (**66**).

ET ile ilişkili duyusal bozukluklar arasında en sık işitme kaybı ve koku alma bozukluğu yer almaktadır. On dokuz çalışmayı kapsayan bir literatür derlemesi, işitme kaybının ET hastalarında PH ve sağlıklı kontrollere kıyasla daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak, Türkiye'de gerçekleştirilen daha güncel bir çalışmada, odyometrik değerlendirmeler ve işitsel beyin sapı yanıtı analizlerinde işitme kaybının tremor şiddeti ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir. Saf ses odyometrisi ölçümleri de, tremor şiddeti ile işitme kaybı arasında benzer bir doğru orantı olduğunu ortaya koymuştur (**67,68**). Koku alma bozukluğu, nörodejenerasyonun olası bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Ancak ET ile ilişkisi henüz net değildir, mevcut çalışmaların çoğu, koku alma bozukluğu ile ET varlığı ya da tremor şiddeti arasında anlamlı bir ilişki saptamamıştır (**69**).

Son olarak, uyku düzeninin bozulmasının ET hastalarında bilişsel gerileme ile ilişkili olduğu 188 ET hastasını içeren bir kohort çalışmasında gösterilmiştir. Bu çalışmada uyku kalitesi Pittsburgh Uyku Kalitesi İndeksi ile değerlendirilmiş, daha uzun uyku latansının izlem süresince işlevsellikte azalma ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilişkinin, uyku süresi ve kalitesi üzerindeki nedensel etkisi iyi bilinen depresyonun aracı veya karıştırıcı (*confounder*) rolü nedeniyle karmaşıklaşabileceği de vurgulanmıştır (**70**).

2.2.4. Tanı ve Tedavisi

ET PH, distoni, ataksi ile fizyolojik, fonksiyonel, serebellar ve ilaçlara bağlı tremorlar gibi alternatif tanıların dışlanmasının ardından konulan bir rezidüel tanı olarak değerlendirilmektedir. Bu belirti ve semptomlar ailesi söz konusu olduğunda yanlış tanı önemli bir sorun oluşturmakta ve günümüzde ET için bildirilen yanlış tanı oranları %37–50 arasında değişmekte olup, en sık doğru tanı olarak konulan alternatifler PH ve distonidir (**46,71**). Fenotiplerin büyük ölçüde örtüşmesi ve patogenezlerinin benzerliği nedeniyle Louis tarafından "*esansiyel tremorlar ailesi*" kavramı ortaya atılmıştır (**72**). Temel tanı kriterleri, eller ve ön kolları tutan bilateral aksiyon tremoru varlığını içermektedir. Nörolojik muayene sırasında tremorun frekansı, amplitüdü, paterni ve vücuttaki dağılımı dikkatle değerlendirilmelidir. Diğer anormal nörolojik bulguların bulunmaması ET tanısını destekleyen önemli bir unsurdur. Tremorun uzun süredir

devam etmesi (*en az 3 yıl*) ve aile öyküsünün varlığı da tanıyı destekleyici ek kanıtlar arasında yer almaktadır. Kafein, alkol, ilaçlar, fiziksel egzersiz ve stres gibi tremoru etkileyebilen faktörler ET lehine ya da aleyhine ipuçları sağlayabilir. Nitekim etanol ET'de tremoru azaltıcı etki gösterebilirken, kafein genellikle tetikleyici bir rol oynamaz. Buna karşılık stres, aşırı sıcaklık maruziyeti, sosyal olarak gergin durumlar veya zorlayıcı gereksinimler şeklinde çoğu zaman ET semptomlarını belirginleştirir. ET'yi kesin olarak doğrulayan özgül bir biyobelirteç ya da nörogörüntüleme bulgusu bulunmamaktadır. Bununla birlikte, diğer tremor nedenlerini dışlamak amacıyla çeşitli testler yapılabilir. Laboratuvar değerlendirmeleri arasında tiroid fonksiyon testleri ve Wilson hastalığını dışlamak için seruloplazmin düzeyleri yer alabilir, ayrıca özellikle kurşun ve cıva olmak üzere ağır metal maruziyetine yönelik taramalar önerilmektedir. Beyin görüntüleme yöntemleri, Wilson hastalığı, kafa travması, inme veya kitle lezyonları gibi yapısal nedenlerden şüphelenilen olgularda yararlıdır. Striatumun tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisi (SPECT), PH ve substantia nigra gibi striatal bölgelerin dejenerasyonu ile seyreden diğer parkinsonyen sendromları ET'den ayırt etmede yardımcı olabilir (**73**).

1998 yılında Hareket Bozuklukları Derneği (Movement Disorder Society, MDS) tarafından ET için bir uzlaşı bildirisiyle resmi bir tanım önerilmiş, bu tanım 2018 yılında güncellenmiştir. Aşağıda her iki tanım, tanı kriterlerinin zaman içindeki evrimini ve hangi özelliklerin daha belirgin hale geldiğini, hangilerinin ise hâlen tartışmalı olduğunu göstermek amacıyla sunulmaktadır.

1998 MDS Tanı Kriterleri (**51**)

Dahil etme kriterleri

- Eller ve ön kolları tutan, kalıcı ve gözle görülebilen bilateral postüral tremor; kinetik tremor eşlik edebilir
- Tremor süresinin 5 yıldan uzun olması

Dışlama kriterleri

- Froment belirtisi dışında başka anormal nörolojik bulguların varlığı
- Artmış fizyolojik tremora yol açabilecek bilinen nedenlerin bulunması

- Tremorojenik ilaçlara eşzamanlı ya da yakın zamanda maruziyet veya ilaç kesilmesine bağlı durum
- Tremor başlangıcından önceki 3 ay içinde sinir sistemine doğrudan ya da dolaylı travma
- Psikojenik kökene ilişkin klinik ya da öyküsel kanıtlar
- Ani başlangıç ya da basamaklı kötüleşmeyi düşündüren güçlü kanıtlar

2018 MDS Tremor Yeniden Sınıflaması (*revizyon*)

2018 yılında Uluslararası Parkinson ve Hareket Bozuklukları Derneği (MDS), tremorları iki ana boyuta dayalı olarak yeniden sınıflandırmıştır:

- Hastalığın klinik özellikleri: *tıbbi öykü, aile öyküsü, zamansal seyir, tremor özellikleri ve eşlik eden bulgular*
- Hastalığın etiyolojisi: *genetik, kazanılmış veya idiyopatik*

Bu kriterlere göre ET, aşağıdaki dört koşulun varlığı ile tanımlanmaktadır:

1. Bilateral üst ekstremite aksiyon tremoru ile seyreden izole tremor sendromunun bulunması
2. Baş, ses veya alt ekstremiteler gibi diğer vücut bölgelerinde tremorun eşlik edebilmesi
3. Tremorun en az 3 yıldır devam ediyor olması
4. Distoni, ataksi veya parkinsonizm gibi başka nörolojik bulguların bulunmaması

Washington Heights–Inwood Esansiyel Tremor Genetik Çalışması Kriterleri (**74**)

Bu kriterler, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir:

- Muayenede, en az bir kolda +2 düzeyinde postüral tremor varlığı (*baş tremoru eşlik edebilir, ancak tek başına tanı için yeterli değildir*)

- Muayenede, en az dört görev sırasında +2 düzeyinde kinetik tremor ya da bir görevde +2, ikinci bir görevde +3 düzeyinde kinetik tremor bulunması

(Görevler: *su dökme, kaşıkla su içme, bardaktan su içme, parmak-burun manevrası, spiral çizimi*)

- Tremor baskın elde mevcutsa, en az bir günlük yaşam aktivitesini (*yeme, içme, yazma, el kullanımı*) etkilemesi

- İlaçlar, hipertiroidi, etanol veya distoninin etiyolojik faktör olarak dışlanması

- Semptomların psikojenik olmaması (*garip özellikler, tutarsızlık, dikkatle dağılabilirlik, eşlik eden belirgin psikiyatrik bulgular*)

Tremor derecelendirmesi:

0: Görünür tremor yok

+1: Düşük amplitüdlü, zor fark edilen veya aralıklı tremor

+2: Orta amplitüdlü, genellikle mevcut ve belirgin osilatuvar tremor

+3: Büyük amplitüdlü (>2 cm), şiddetli ve sıçrayıcı tremor; dökülme ya da kalemi kağıda tutamama nedeniyle görevin tamamlanmasını güçleştirir

ET`in tanı kriterlerinin en güncel versiyonlarında tremorun en az 3 yıl süreyle devam etmesini zorunlu kılmaktadır. Ayırıcı tanıda fizyolojik tremor da mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır; bu tablo, uyku yoksunluğu, aşırı kafein tüketimi, stresli durumlar veya lityum, bazı antidepresanlar ya da valproik asit gibi ilaçlara bağlı, tamamen geri dönüşümlü nedenlerle ortaya çıkabilir (**50**).

2.2.4.1. Ayırıcı Tanı

PH - Hareket bozuklukları arasında belki de en ayrıntılı biçimde incelenmiş olan PH, 65 yaş üzerindeki popülasyonda %2–3 prevalans ile en sık görülen ikinci hareket bozukluğu olarak kabul edilmektedir. PH'nin erkeklerde kadınlara göre daha sık görüldüğü (erkek:kadın ≈ 3:2) bilinmektedir. Hastalık genellikle 60 yaşından sonra başlamakta olup, olguların yalnızca yaklaşık %4'ünde başlangıç yaşı 50'nin altındadır (**75**). PH hareketin düzenlenmesinde kritik rol oynayan substantia nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronları etkiler. Motor belirtiler ve bazı eşlik eden semptomlar yüzeysel

olarak ET ile benzerlik gösterebilse de, ayrıntılı karşılaştırmada iki hastalık arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. PH motor ve motor dışı belirtilerle seyreden multifaktöriyel bir nörodejeneratif hastalıktır. PH'nin tipik klinik özellikleri arasında hareketlerde yavaşlama (bradikinezi; *dişli çark tarzı hareket*), tremor, postüral reflekslerin kaybına bağlı instabilite ve öne eğik duruş, rijidite, istirahat tremoru ve yürüme bozukluğu yer alır. Bunun yanı sıra hipersalivasyon, konuşma güçlüğü, maske yüz ifadesi, mikrografi ve diskineziler (yüz, kol veya bacaklarda ani, istemsiz, dans benzeri hareketler) daha özgül ve karakteristik bulgular olarak kabul edilmektedir (**75**). Hastalığın seyri sırasında tremor, Parkinson hastalarının yaklaşık dörtte üçünde ortaya çıkar ve ET'ye kıyasla genellikle daha düşük frekanslıdır (yaklaşık 4–6 Hz). Substantia nigra'daki dopamin üreten nöronların kademeli kaybı, temel patofizyolojik mekanizma olarak tanımlanmıştır. Bu kayıp, her ne kadar sınırlı sürelerle olsa da, levodopa gibi dopaminerjik tedavilerle dopamin sinyalizasyonunun yeniden sağlanması yoluyla kısmen telafi edilebilmektedir (**46,76**). PH'de motor dışı bulgular, ET ile kısmen örtüşmektedir, depresyon, anksiyete ve apati gibi duygudurum bozuklukları sık görülür. Ayrıca otonom disfonksiyon, konstipasyon, hiposmi (koku alma azalması), uyku düzeni bozuklukları, insomnia veya gündüz aşırı uyku hali gibi vejetatif belirtiler PH`de yaygın olup, ET'de genellikle baskın değildir. PH`nin tanısı büyük ölçüde klinik değerlendirmeye dayanır ve bradikineziye ek olarak tremor veya rijiditenin varlığını gerektirir; bunun yanında ilaçlara bağlı parkinsonizm veya serebellar hasar gibi alternatif nedenleri dışlamaya yönelik kriterlerin sağlanması gerekir. Bununla birlikte, bradikinezi ve istirahat tremoru her zaman tüm PH olgularını kapsayacak kadar spesifik değildir. Nitekim bir çalışmada, yalnızca izole aksiyon tremoru bulunan (klasik yaklaşıma göre ET lehine değerlendirilen) hastaların %68'inde, substantia nigra hasarını düşündüren anormal dopamin taşıyıcı görüntüleme bulguları saptanmıştır (**77**). PH`nin kesin tanısı için altın standart post-mortem otopside substantia nigra nöronları içerisinde Lewy cisimciklerinin alfa-sinüklein proteininden oluşan anormal agregatların saptanmasıdır. Bu yapılar, nöronal kayba veya fonksiyon bozukluğuna yol açan temel patolojik bulgular olarak kabul edilmektedir.

ET+PH sendromu ve ET-plus - PH ile ET olası yanlış tanılarının ötesinde, her iki hastalığın tanı kriterlerinin aynı hastada karşılandığı ET+PD (veya ET–plus) örtüşme sendromu da tanımlanmıştır. Nitekim ET hastalarının PH geliştirme riskinin yaklaşık 4 kat arttığı, yaşam boyu mutlak riskin ET taşıyan erkeklerde %8,5, kadınlarda ise %5,6

olduğu tahmin edilmektedir (**78**). Buna ek olarak, ET tanısı almış hastalarda PH`ye özgü tipik özelliklerin bulunması durumunda ET-plus kavramı resmî olarak literatüre girmiştir (**79**). Buna karşılık, ET+PD sendromu bazı çalışmalarda ayrıntılı biçimde incelenmiş ve her iki fenotipik tablonun da ortak bir patofizyolojik süreçten kaynaklanabileceğine işaret eden bulgular elde edilmiştir. ET+PD sendromunun tanısı, büyük ölçüde esansiyel tremorun süresi ile PH`ye ait klinik bulguların ortaya çıkış zamanlamasının karşılaştırılmasına dayanmaktadır, zira her iki hastalıkta da hemen tüm tremor tipleri görülebilmekte ve tremor paternleri tek başına ayırt edici olmamaktadır (**80**). Öte yandan, PH`nin önceden yerleşik tanı olduğu olgularda ET veya alkol kullanımına ilişkin aile öyküsünün varlığı, latent dönem olmaksızın ortaya çıkan yeniden beliren (re-emergent) tremor, baş, ses ve yazı tremorunun bulunması ET'nin eşlik ettiğini düşündürebilir (**53**). Her iki hastalığın da yaşla birlikte ilerlemesi, klinik ayırt edici özellikleri daha da belirsizleştirebilir, nitekim ET'de tremor frekansının azalırken amplitüdün artması, Parkinson hastalığında gözlenen değişimlere benzer bir patern sergileyebilir (**24**). Ayrıca, ET ile PH arasındaki yakın ilişkinin tek yönlü olabileceği yani yalnızca ET hastalarının PH geliştirebileceği, tersinin mümkün olmadığı öne sürülmüş, ancak bu görüş de literatürde çeşitli çalışmalarla sorgulanmıştır (**53**) (**Tablo 2-3**).

Tablo 2-3. Esansiyel tremor ve Parkinson hastalığının klinik ve nörobiyolojik özelliklerinin karşılaştırılması (***53**`den uyarlanarak*).

Özellik	ET	ET + PH	PH
Tremor tipi	Aksiyon (kinetik/postüral) tremor	İstirahat ve aksiyon tremoru birlikte	İstirahat tremoru
Tremor frekansı	5–12 Hz	Değişken	4–6 Hz
Tutulan bölgeler	Üst ekstremiteler, baş ve ses	Üst ve alt ekstremiteler	Üst ve alt ekstremiteler
Motor bulgular	İnce motor hareketlerde titreme (ör. yazı yazma)	Bradikinezi	Bradikinezi ve rijidite
Yürüme ve denge	Yürüme ataksisi görülebilir	Postüral bozukluklar görülebilir	Postüral instabilite ve yürüme ataksisi
Koku duyusu	Genellikle korunmuştur	Anosmi görülebilir	Anosmi sık görülür
Dopamin sistemi	Dopamin üretim bozukluğu yok	Dopamin üretiminde azalma	Belirgin dopamin üretim azalması
Tedavi yanıtı	Alkol, beta-blokerler, antikonvülzanlar ve benzodiazepinlere yanıt	Değişken	Levodopa ve diğer dopaminerjik ilaçlara yanıt
Nöropsikiyatrik bulgular	Duygudurum bozuklukları, demans, uyku düzensizliği	Benzer bulgular görülebilir	Duygudurum bozuklukları, demans, uyku düzensizliği
Patolojik bölgeler	Serebellum, talamus, inferior olivar çekirdek	Karma patofizyoloji	Striatum ve substantia nigra

Distoni - Distoni, en sık görülen hareket bozukluklarından biridir. İstemsiz kas kasılmalarına yol açar ve bu kasılmalar zaman zaman tremoru andırsa da, ritmik olmayan özellik göstermesiyle ayırt edilir. Distonide sıklıkla anormal postürler, spazmlar, tortikollis ve torsiyonlar ortaya çıkar. Bu nedenle distonik tremor çoğu zaman düzensizdir ve ET'nin aksine genellikle istirahatte ya da belirli postürler sırasında görülür. Distoninin başlıca belirleyicilerinin genetik faktörler veya travmatik olaylar olduğu düşünülmektedir. Ayrıca nöroleptikler gibi güçlü farmakolojik ajanların yan etkileri ya da Wilson hastalığı gibi diğer nörolojik hastalıklar da etiyolojide rol oynayabilir. Bu doğrultuda distoni, primer (idiyopatik) ve sekonder distoni olarak sınıflandırılmaktadır. Stres ve yorgunluğun yanı sıra viral, bakteriyel veya fungal beyin enfeksiyonları; menenjit ve ensefalit sonrasında gelişen santral sinir sistemi hasarları da olası nedenler arasında gösterilmiştir (**81,82**). ET'den farklı olarak distoniye eşlik eden tremorların alkol ile azaldığına dair kanıt bulunmamakta ve buna karşılık kafeinin distonik semptomları tetikleyebileceği kabul edilmektedir.

Ataksi - Ataksi, kasların koordinasyon eksikliği ile karakterize bir nörolojik bulgudur ve genellikle hareketin kontrolünden sorumlu nörolojik merkezlerin hasarı sonucunda ortaya çıkar. Bununla birlikte, "ataksi" terimi aynı zamanda oldukça heterojen ve özgül olmayan bir tanı grubunu ifade etmek için de kullanılmaktadır. Ataksi kalıtsal ya da edinilmiş olabilir. Friedreich ataksisi ve Machado–Joseph hastalığı gibi nadir hastalıklar kalıtsal ataksiye örnek teşkil ederken, serebrovasküler olaylar, tümörler, multipl skleroz veya kronik alkol kullanımı edinilmiş ataksiye yol açabilir (**83**). Serebellum, talamus, parietal loblar veya vestibüler sistemde meydana gelen dejenerasyonlar ataksinin olası nedenleri arasında yer almaktadır. Serebellar lezyonların varlığında hareket koordinasyonunda belirgin bozulma, yürüme güçlüğü ve dengesizlik (özellikle tandem yürüme bozukluğu), konuşma ve görme fonksiyonlarında bozulma ile disfaji en belirgin klinik bulgular olarak ortaya çıkar. Hubble ve arkadaşları, ET'li hastalarda görülen ataksinin yaşa bağlı ek bir serebellar dejenerasyonu yansıtabileceğini ve ET henüz tanınmamışsa ayırıcı tanıyı güçleştirebileceğini bildirmiştir (**49**).

Parkinsonizmler - "Parkinsonizmler", PH`ya benzer belirti ve bulgularla seyreden, ancak altta yatan nedenler farklı olduğu için PH tanı kriterlerini karşılamayan geniş bir hastalık grubunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bu tabloların önemli bir özelliği, çoğu zaman dopaminerjik tedavilere yanıtın yetersiz ya da hiç olmamasıdır.

Parkinsonizmlerin başlıca formları multisistem atrofi (MSA) ve ilaçlara bağlı parkinsonizmdir. Multisistem atrofi (otonom sinir sisteminin multisistem dejenerasyonu olarak da adlandırılır), hem beyin hem de omurilikte otonom sinir sistemi nöronlarının dejenerasyonu ile birlikte hareket bozukluklarının görüldüğü ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Motor fonksiyon kaybının yanı sıra, mesane kontrol bozukluğu ve senkop gibi otonom belirtiler gelişebilir ve hastalar 5–10 yıl içinde yatağa bağımlı hale gelebilir (**84**). Sekonder parkinsonizmler sıklıkla ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkar. Özellikle nöroleptik ve antipsikotik ilaçlar, bazal gangliyonlar ve hipotalamusta dopamin reseptörlerini bloke ederek otonom sinir sistemi fonksiyonlarını etkileyebilir. Ayrıca enfeksiyonlar da parkinsonizme yol açabilir, ensefalit sonrası gelişen hasar ilaçlara bağlı parkinsonizme benzer bir klinik tablo oluşturabilir. Bir diğer mekanizma ise serebral arteriosklerozdur. Bu durumda vasküler parkinsonizm yetersiz kanlanmaya bağlı doğrudan doku hasarı sonucu gelişir (**76**). Son olarak, vitamin eksikliği ya da vitamin metabolizmasındaki düzensizliklerin de parkinsonizmlerin etiyolojisinde rol oynayabileceği ve bu vitaminlerin replasman tedavi yanıtını açıklayabileceği öne sürülmüştür (**85**).

2.2.4.2. Tedavi

ET tedavisinde farmakolojik yaklaşım genellikle semptomların günlük yaşam üzerindeki etkisine göre belirlenir. Hafif olgularda tedavi gerekmeyebilir veya aralıklı uygulanabilirken, orta ve ileri olgularda ilaç tedavisi tercih edilir. Amerikan Nöroloji Akademisi kılavuzlarına göre propranolol ve primidon etkinliği kanıtlanmış birinci basamak tedavilerdir (**86**). Propranolol, non-selektif β-blokör olarak tremoru yaklaşık %50–70 oranında azaltabilirken, primidon GABA aracılı nöronal inhibisyonu artırarak benzer etkinlik gösterebilir ancak yan etkileri daha belirgin olabilir. Topiramat, gabapentin, atenolol ve alprazolam gibi ajanlar muhtemelen etkili ikinci basamak seçenekler arasında yer alırken, benzodiazepinler, nadolol, nimodipin ve botulinum toksin tip A gibi tedaviler bazı hastalarda yarar sağlayabilir (**86-88**). Bununla birlikte ET için kullanılan ilaçların çoğu farklı endikasyonlar için geliştirilmiş olup yaklaşık %30–50 hastada farmakolojik tedavilere yeterli yanıt alınamayabilir. Bu tür dirençli ve ciddi fonksiyon kaybına yol açan olgularda talamotomi, MR-kılavuzlu odaklanmış ultrason veya derin beyin stimülasyonu gibi cerrahi yöntemler uygulanabilmektedir (**89**).

2.2.5. Esansiyel Tremorun Genetik Etiyolojisi

ET etiyolojisi açısından risk faktörleri iki ana grupta değerlendirilmektedir: *ailesel (herediter) ET ve sporadik ET*. Louis tarafından yürütülen bir çalışmada, tremor başlangıç yaşının ailesel ET'de sporadik forma kıyasla belirgin biçimde daha erken olduğu gösterilmiş, bu durumun literatürde tanımlanan başlangıç yaşına ilişkin bimodal dağılımı açıklayabileceği öne sürülmüştür (**90**). 19.yüzyılda bildirilen ilk ET olgularından bu yana, ailesel yatkınlık ve genetik faktörlerin ET'nin ortaya çıkışında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir, ancak bu katkının nicel boyutu günümüze kadar tam olarak ortaya konulamamıştır. Bununla birlikte, ET'nin bütünüyle genetik bir hastalık olmadığı da kabul edilmektedir. Nitekim olguların yaklaşık yarısında benzer şekilde etkilenmiş bir aile bireyi bildirilmemektedir, ancak bu bilginin hatırlama yanlılığına (*recall bias*) bağlı olarak eksik raporlanmış olabileceği ve gerçek oranın olduğundan düşük tahmin edilmiş olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (**29**). Bu bağlamda, Deuschl ve Elble yalnızca fenotipik sunumlarda değil, aynı zamanda gözlenen patofizyolojik mekanizmalarda da belirgin heterojenitenin bulunmasını gerekçe göstererek ET için üç kategoriden oluşan yeni bir sınıflama önermiştir: herediter ET, sporadik ET ve senil ET (**30**).

2.2.5.1. Genetik Risk Faktörleri

ET kalıtsal kökene sahip olduğu iyi bilinmekle birlikte, güncel epidemiyolojik çalışmaların odağı giderek hastalığın ne ölçüde genetik, ne ölçüde çevresel kökenli olduğunun nicel olarak belirlenmesine yönelmiştir. Ancak bu konuda henüz kesin bir görüş birliğine varılamamış, ikiz çalışmalarında bildirilen konkordans oranları belirgin heterojenlik göstermektedir. Genel olarak genetik katkının yüksek olduğu ve yaklaşık %60–90 arasında değiştiği tahmin edilmekle birlikte, bazı çalışmalarda bu oranın %20 civarında hesaplandığı da bildirilmiştir (**91**). Bu farklılığın başlıca nedeninin, ET'nin sınıflandırılmasındaki güçlükler olduğu ve bunun çalışma popülasyonlarının bileşiminde önemli farklılıklara yol açtığı düşünülmektedir. Buna rağmen, ikiz çalışmaları kalıtılabilirliğin nicel olarak değerlendirilmesinde en güçlü yaklaşımlar arasında yer almaktadır, monozigotik (MZ) ikizler genotiplerinin %100'ünü paylaşırken, dizigotik (DZ) ikizlerde bu oran %50'dir. Danimarka İkiz Kayıt Sistemi'ne dayanan 2004 tarihli bir çalışmada, oldukça duyarlı bir tanım kullanıldığında proband-temelli konkordans oranları MZ ikizlerde %77, DZ ikizlerde ise %59 olarak bildirilmiş,

yalnızca yüksek olasılıklı ET olgularıyla sınırlandırıldığında ise bu oranlar MZ ikizlerde %93'e yükselirken, DZ ikizlerde %29'a düşmüştür (**92**). Tanner ve arkadaşları 2001 yılında yayımladıkları çalışmada, çift-temelli (*pairwise*) konkordans oranını MZ ikizlerde %60, DZ ikizlerde ise %27 olarak rapor etmiştir. Kullanılan iki konkordans ölçütü metodolojik olarak farklılık göstermekte olup, çift-temelli konkordans oranları doğası gereği daha düşük değerler vermektedir. Çift-temelli konkordans, bir ikiz çiftinin her iki bireyinin de hastalıktan etkilenmiş olma oranını ifade ederken; proband-temelli konkordans bireyleri ayrı ayrı ele alarak bir ikizin etkilenmiş olması koşulunda diğerinin etkilenme olasılığını daha iyi yansıtmaktadır. Karşılaştırma amacıyla Lorenz ve arkadaşları önceki çalışmalarında MZ ikizlerde %63, DZ ikizlerde ise %14 çift-temelli konkordans oranı bildirmiştir (**92,93**). Aile temelli çalışmalar incelendiğinde, hem ET olgularının hem de kontrollerin ailelerini içeren Washington Heights–Inwood Esansiyel Tremor Genetik Çalışması'nda ET hastalarının birinci derece akrabalarında ET gelişme riskinin kontrollere kıyasla yaklaşık 5 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir (**94**). Bu bulgular ET'nin kalıtım mekanizmasının basit bir Mendel kalıtım modeline uymadığını ve muhtemelen inkomplet penetransın söz konusu olduğunu ya da genetik yatkınlığın çevresel risk faktörleri tarafından kısmen veya tamamen aktive edildiğini düşündürmektedir. Kalıtım modeli açısından en yaygın kabul gören yaklaşım ET'nin inkomplet penetrans gösteren otozomal dominant bir hastalık gibi davrandığı yönündedir. Bununla birlikte, segregasyon analizlerinden elde edilen bulgular, 65 yaşına kadar penetransın tam hale geldiğini göstermektedir (**95**). İkiz çalışmalarında bu varsayım sıklıkla benimsenmiş olsa da, literatürde penetransın daha düşük olabileceğine işaret eden daha güçlü kanıtlar da mevcuttur (**96**).

2.2.5.2. Çevresel Risk Faktörleri

Çevresel faktörler, ET`in tam olarak genetik kökenli olmamasını açıklamak amacıyla yıllar içinde hastalığın gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Motor dışı belirti ve bulguların ET'nin öncülleri olup olmadığı halen tartışmalıdır, ancak patofizyolojik açıdan doğrudan risk faktörleri gibi davrandıkları pek olası görünmemektedir. Nörodejeneratif hipotez bağlamında beyinde hasara yol açan altta yatan hastalık mekanizmasının, motor semptomlar (örn. tremor) ortaya çıkmadan önce psikiyatrik ya da bilişsel bozukluklar şeklinde kendini gösterebileceği ileri sürülmektedir. Buna karşılık, yaşam tarzına ilişkin faktörlerin ET'nin ortaya çıkışını kolaylaştırabileceği

düşünülmektedir. Örneğin, aşırı kafein tüketiminin tremoru artırdığı gözlenmektedir. Bu bağlamda 2018 yılında yapılan bir çalışmada ET olgularının birinci derece akrabalarında, eşleştirilmiş kontrollere kıyasla subklinik düzeyde dahi olsa daha fazla tremor saptandığı, daha da dikkat çekici olarak bu bireylerin anlamlı derecede daha az kafein tükettikleri gösterilmiştir. **97**). Buna karşın etanolün ET'li hastaların büyük çoğunluğunda tremoru azaltıcı etkisi olduğu iyi bilinmektedir (**38**). Ayrıca, fiziksel aktivitenin ET'nin ortaya çıkışı üzerindeki etkilerine ilişkin kanıt bulunmamakta, mevcut çalışmalar yalnızca tanı almış ET olgularında fiziksel aktivitenin semptom şiddetini azaltıcı etkisine odaklanmaktadır (**98**). Bunun yanı sıra, çevresel kirleticilere maruziyetin ET gelişiminde olası tetikleyici rolü olup olmadığı uzun yıllardır araştırılmaktadır. Organoklorin pestisitler (OCP'ler) geçmişte tarımda sivrisinek popülasyonlarının, termitlerin ve ürünlere zarar veren diğer böceklerin kontrolünde yaygın olarak kullanılmıştır. DDT, DDE ve klordan gibi maddeleri içeren bu bileşikler geçmişte gıdalarda bulunan miktarlarda dahi toksik etkiye sahip olup günümüzde yasaklanmıştır. Avrupa Birliği'nde 1970'li ve 1980'li yıllar arasında kullanımları yasaklanmış olmakla birlikte 20. yüzyılda yoğun biçimde maruz kalan popülasyonlar üzerinde etkilerinin halen devam edebileceği düşünülmektedir. Günümüzde dahi tarım ve bazı endüstriyel alanlarda çalışan bireyler yüksek OCP konsantrasyonlarına kronik olarak maruz kalabilmektedir. Uzun süreli OCP maruziyetinin GABA nörotransmitter düzeylerinde azalmaya yol açarak hareket kontrolünde modülasyon bozukluğu oluşturduğu ve bu yolla kalıcı aksiyon tremorlarına neden olabildiği bildirilmiştir (**29**). Kurşun, cıva veya manganez içeren bileşiklere maruziyetin serebellumdaki Purkinje hücrelerine zarar verebildiği gösterilmiştir. Bu görüşü destekleyen argümanlardan biri yaşlanmayla ilişkili hastalıkların tamamında kanda artmış kurşun düzeylerinin saptanmasıdır ve bu durum ET gelişimi için olası bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Nitekim kurşunun GABA düzenleyici süreçlerde hasara yol açtığı gösterilmiştir (**29**). Ek olarak β-karbolin alkaloidlerinin (βCA'lar) özellikle sıçan modellerinde tremora neden olan iyi tanımlanmış nörotoksik bileşikler olduğu uzun süredir bilinmektedir. Bu maddeler ortak bir moleküler yapıyı paylaşmakta ve PH`ye özgü semptomlarla ilişkili nörotoksinlerin etkilerini taklit etmektedir. 2002 yılında gerçekleştirilen bir olgu-kontrol çalışmasında ET hastalarının kan örneklerinde bu kimyasal düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir (**99**). Post-mortem çalışmalarda ET hastalarının serebellumunda daha

yüksek βCA konsantrasyonlarının saptanmış olması önemli bir kanıt olarak değerlendirilmektedir.

2.2.5.3. İlişkili Genler ve Genetik Hastalıklar

ET ile ilişkili aday lokuslar ve genler **Tablo 2-4**'de listelenmiştir (**100-124**). ET'nin genetik altyapısının aydınlatılmasını güçleştiren birçok etken söz konusu olabilir (**125**). Birincisi, uzun yıllar boyunca belirgin tanı kriterlerinin bulunmaması ve ET için biyobelirteçlerin olmaması ET çalışma kohortlarının yanlışlıkla ET olarak tanı alan diğer tremor bozukluklarıyla kontamine olmasına yol açmış olabilir (örn. Klinefelter sendromu (KS), Frajil-X ile ilişkili tremor/ataksi sendromu (FXTAS), DYT-ANO3 (DYT24) ve SCA-PPP2R2B (SCA12) (**126**) ya da ek nörolojik bulguların (örn. hafif bellek bozukluğu, tandem yürüyüş bozukluğu, ince postüral anormallikler) eşlik ettiği "ET-plus" sendromlarının ET olarak sınıflanmasına neden olmuş olabilir (**13**). İkincisi, ET ailelerinde gözlenen azalmış penetrans bu alandaki genetik çözümlemeyi zorlaştırmaktadır. Üçüncüsü, ET soy ağaçlarında fenokopi oranının yüksek olabilmesidir, yani farklı genotipler veya çevresel/genetik olmayan faktörler sonucunda benzer ya da aynı fenotipin ortaya çıkması. Dördüncüsü, ET patogenezinde birden çok risk lokusunun, epigenetik modifikasyonların ve çevresel etkilerin katkısı olabileceğidir (**125**). Son olarak, zaman içinde ET araştırmalarında kullanılan genetik teknolojilerin içsel kısıtlılıkları da önemli bir engel oluşturmuştur. Örneğin, ET'ye ilişkin erken dönem genetik araştırmaların önemli bir kısmı genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile yürütülmüş olup, bu yaklaşımın sınırlılıkları yakın zamanda Tam ve ark. tarafından gözden geçirilmiştir (**127**). Benzer biçimde, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri yapısal varyasyon içeren bölgeler, tekrar dizileri, GC-zengin bölgeler veya çok sayıda homolog element içeren diziler gibi genomik alanların güvenilir biçimde analiz edilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Buna karşılık, giderek yaygınlaşan uzun okuma dizileme teknolojileri NGS'nin bu özgül sınırlılıklarını aşma potansiyeli taşımakta, kodlamayan bölgelerin, kompleks genomik varyantların, tekrar bölgelerin ve DNA metilasyon paternlerinin ET patogenezindeki önemine ışık tutabileceği düşünülmektedir (**128,129)**. Bu çerçevede uzun okumalı dizileme yakın zamanda ET'li 11 Çin ailesinde *NOTCH2NLC* geninde GCC trinükleotid tekrar genişlemesini tanımlamaya katkı sağlamıştır (**124**). Özetle, ET ve ET-plus muhtemelen genetik temeli heterojen olan klinik sendromlar olarak değerlendirilebilir. Bu bağlamda, tremorların

yakın tarihli sınıflandırması NGS çağında genetik tremor sendromlarının ayrıştırılabilmesi için daha derin bir klinik fenotiplemeyi teşvik etmelidir (**13**). İzole ve kombine tremor sendromlarına yol açtığı bilinen çok sayıda gen ve kromozomal anomali mevcuttur. Tremora neden olan genetik hastalıklar ve tanıya yönelik ipuçları **Tablo 2-5, 2-6, 2-7** ve **2-8**'te sunulmuştur.

Genetik tremor bozukluklarının çoğu fenotip tam olarak ortaya çıktığında kompleks bir klinik tablo sergiler. Bununla birlikte bazıları (örn. DYT-ANO3, SCA-PPP2R2B, FXTAS, KS) hem hastalığın başlangıcında hem de sonraki yıllarda klinik olarak ET ile karışabilecek kadar benzer bir tablo sergileyebilir. Ayrıca etiyolojisi araştırılmamış veya belirlenememiş bazı tremor sendromları klinik pratikte hatalı biçimde ET olarak adlandırılabilmektedir. Tremorlara yönelik ayrıntılı sendromik yaklaşım ve ET için sıkı tanı kriterleri sağlayan 2018 tremor sınıflandırması hastaların fenotipik olarak daha homojen alt gruplara ayrılmasına olanak tanır ve nihayetinde tremorların genetik temelini anlamamızda ilerlemeye katkı sağlayabilir. Başlangıç yaşının küçük olması ayırıcı tanıyı daraltır, çünkü çocukluk veya ergenlik döneminde başlayan genetik tremor bozukluğu sayısı sınırlıdır (örn. Wilson hastalığı, KS, bazı monogenik primer distoniler ve nörometabolik hastalıklar). Vücut dağılımına ilişkin özgül paternler de tanısal süreci yönlendirebilir (örn. palatal tremor: Alexander hastalığı, SCA20, POLG-ilişkili bozukluklar; laringeal tremor: distonik durumlar, ET). Benzer şekilde, istirahat tremoru ayırıcı tanıyı çoğunlukla parkinsonyen durumlarla sınırlandırırken, intansiyon tremoru SCAlar ve diğer ataksik sendromlarda görüldüğü üzere serebellar tutulumun diğer bulgularının araştırılmasını gerektirir. Anormal laboratuvar testleri tanıya işaret edebilir: Wilson hastalığı ve aserüloplazminemide serum serüloplazmin ve idrar bakır düzeyleri; nöroferritinopati ve aserüloplazminemide demir çalışmaları; cinsiyet kromozomu anöploidilerinde seks hormon düzeyleri; dopa-yanıtlı distonide ve daha nadir nörometabolik hastalıklarda BOS incelemesi bunlara örnektir. FXTAS, Wilson hastalığı, NBIA gibi durumlarda beyin MRG'deki özgül bulgular ile Parkinson hastalığı ve diğer parkinsonyen durumlarda dopamin reseptör görüntülemesinin pozitifliği de tanısal açıdan yol gösterici olabilir. Genetik tremor sendromlarının çoğu, pozitif aile öyküsü olmaksızın ortaya çıkabilir. Bu durum özellikle otozomal resesif, X'e bağlı ve klasik mitokondriyal kalıtımda sık olmakla birlikte, inkomplet ya da yaşa bağlı penetrans gösteren otozomal dominant bozukluklarda veya *de novo* mutasyonlar nedeniyle de görülebilir. Ayrıca cinsiyet kromozomu anöploidileri

kalıtsal değildir ve ebeveynlerin tekrar riski artmış değildir; ancak ebeveynde mozaiklik saptanırsa risk yeniden değerlendirilmelidir. Coğrafi köken SCA-PPP2R2B, DYT/PARK-TAF1 ve nöroferritinopati gibi tanıları düşündürebilir. Erkek çocuklarda entelektüel yetersizlik öyküsü ve/veya kadın aile bireylerinde erken amenore varlığı FXTAS açısından klinik şüpheyi artırmalıdır. Tremor bozukluklarına yol açtığı bilinen çok sayıda genetik defekt bulunmasına rağmen, rutin klinik bakımda karşılaşılan tremor-dominant tablolara sahip hastaların önemli bir kısmında çok genli paneller, ekzom dizileme (ES) ve tüm genom dizileme (TGD) gibi NGS temelli incelemeler yapılmış olsa bile kesin bir moleküler tanı konulamamaktadır. NGS ve uzun okumalı dizileme teknolojilerindeki ilerleme ve erişilebilirliğin artmasıyla tremorlara ilişkin genetik bilginin üstel biçimde artması beklenmektedir (**128-132**). Birincisi hedefe yönelik gen panelleri, bilinen tremor genlerinin maliyet-etkin biçimde eşzamanlı değerlendirilmesini sağlar ve *de novo* mutasyonlara bağlı sporadik olgularda moleküler tanıyı kolaylaştırır. İkincisi, Sanger doğrulaması ve bağlantı analizi ile kombine edilmiş ES/TGD, tekil ailelerde tremor sendromlarından sorumlu yeni genlerin tanımlanmasına olanak verebilir. Üçüncüsü, YND geniş ölçekli ekzom/genom taramalarını mümkün kılarak GWAS benzeri yaklaşımlarla yeni risk lokuslarının saptanmasına ve poligenik risk skorlaması temelli çalışmalara katkı sağlayabilir. Son olarak uzun okumalı dizileme ikinci nesil dizilemenin "kör noktalarında" kalan varyantların saptanması, büyük ve kompleks yeniden düzenlenmelerin, büyük insersiyon/delesyonların ortaya konması, haplotip fazlaması (*phasing*) ve DNA metilasyon değişikliklerinin değerlendirilmesi gibi alanlarda önemli avantajlar sunabilir. Bununla birlikte ayrıntılı fenotipleme, klinik veri ve hedefe yönelik incelemeler, genetik test kararının verilmesi ve sonuçların yorumlanmasında temel belirleyici olmaya devam etmektedir.

Tablo 2-4. ET ile ilişkilendirilmiş lokus ve genlerin özeti**.**

Lokus / Gen	Kromozom	Gen ürünü	Çalışma tipi	Çalışma popülasyonu	Tanı kriterleri (özet)	Kaynak
ETM1	3q13	*DRD3*	GWS + LA	16 küçük İzlandalı aile (75 ET)	TRIG kriterleri: ≥5 yıl süren bilateral postüral ± kinetik el/önkol tremoru; diğer nörolojik bulguların yokluğu	[100]
ETM2	2p22–p25	*HS1BP3*	GWS + LA	1 büyük Çek/Amerikan aile (18 ET)	Görünür ve kalıcı bilateral postüral tremor; ≥2–4 cm amplitüd; 4–10 Hz	[101]
MTHFR	1p36.22	Metilentetrahidrofolat redüktaz	CG + CGAS	158 akraba olmayan Kafkas ET + 246 Kafkas kontrol	ET tanısı (*literatürde bildirildiği şekilde*)	[102]
HS1BP3	2p24.1	Hematopoetik lineage hücre-spesifik protein bağlanma 3	FM	22 ABD ailesi	≥1 el/önkolde ≥5 yıl süren görünür ve kalıcı tremor; parkinsonism / distoninin yokluğu	[103]
ETM3	6p23	—	GWS + LA	7 Kuzey Amerika ailesi (65 ET)	≥5 yıl süren tremor; sekonder nedenlerin dışlanması	[104]
DRD3	3q13.31	Dopamin reseptörü D3	CG + LA	30 akraba olmayan Fransız ET ailesi	1998 MDS Konsensus kriterleri	[105]
LINGO1	15q24.3	Leucine-rich repeat ve Ig domain containing 1	GWAS	452 İzlandalı ET (ilk faz); 301 ET + 419 kontrol (ikinci faz); Avrupa / İzlanda / ABD	1998 MDS ve TRIG kriterleri	[106]
MAPT	17q21.31	Mikrotübül ilişkili protein tau	CG + CGAS	356 ET + 409 kontrol (Kafkas)	Tanı kriterleri belirtilmemiş	[107]
SLC1A2	11p13	Eksitatör amino asit taşıyıcı 2	GWAS	436 ET + 928 kontrol (ilk); 554 ET + 609 kontrol (ikinci)	1998 MDS Konsensus kriterleri	[108]
FUS (ETM4)	16p11.2	Fused in sarcoma / transl. in liposarcoma	WES	Fransız-Kanadalı aile; 27 ET	1998 MDS Konsensus kriterleri	[109]

HTRA2	2p13.1	Mitokondriyal serin proteaz	WES	1 büyük Türk aile (11 ET, 5 ET+PD, 8 kontrol); 25 ek Türk ET ailesi; 364 kontrol	ET tanısı 1998 MDS Konsensus kriterlerine göre; bazı olgularda ET + PD birlikteliği	[110]
TENM4 (ETM5)	11q14.1	Teneurin transmembran protein 4	WES	3 İspanyol aile (23 ET, 12 kontrol); 299 ilişkisiz İspanyol ET	1998 MDS Konsensus kriterlerine göre ET	[111]
TREM2	6p21.1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	CG + CGAS	3 fazlı çalışma: 456 ET + 2.715 kontrol; 897 ET + 1.449 kontrol; 14.777 kontrol	1998 MDS Konsensus kriterlerine göre kesin / olası ET	[112]
SORT1	1p13.3	Sortilin 1	WES	1 küçük İspanyol ailesi (2 ET, 4 kontrol)	1998 MDS Konsensus kriterleri ve WHIGET kriterleri	[113]
SCN4A	17q23.3	Voltaj bağımlı sodyum kanal α4 altbirimi	WES	1 büyük İspanyol aile (7 ET + epilepsi); 76 sporadik ve 25 ailesel ET	1998 MDS ve WHIGET kriterleri; bazı bireylerde miyoklonus ve ataksi	[114]
DNAJC13	3q22.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, üye 13	WES	571 ET (Avrupa kökenli)	Standart klinik tanı kriterlerine göre ET	[115]
NOS3	7q36.1	Nitrik oksit sentaz 3	CG + CGAS	37 aile (her birinde 3–7 ET)	WHIGET klinik kriterlerine göre ET	[116]
HAPLN4	19p13.11	Hyaluronan ve proteoglikan bağlayıcı protein 4	WES	37 aile (ABD ve Avrupa)	ET tanı kriterleri (klinik)	[116]
USP46	4q12	Ubiquitin-spesifik proteaz 46	WES	37 aile (ABD)	ET tanı kriterleri (klinik)	[116]
KCNS2	8q22.2	Voltaj bağımlı potasyum kanal altbirimi Kv9.2	WES	37 aile (ABD)	ET tanı kriterleri (klinik)	[116]
STK32B	4p16.2	Serin/treonin kinaz 32B	GWAS	1.778 ET + 5.376 kontrol (Kuzey-Batı Avrupa); 1.029 ET + 1.005	1998 MDS kriterleri; postüral ve aksiyon tremoru	[117]

				kontrol		
CTNNA3	10q21.3	Katenin alfa 3	GWAS	Kuzey-Batı Avrupa kökenli ET	Standart ET tanı kriterleri	[118]
SCN11A	3p22.2	Voltaj bağımlı sodyum kanal Nav1.9	WES	1 Çinli aile (ET + tekrarlayan ağrı atakları)	Üst ekstremitelerde postüral ve aksiyon tremoru	[118]
MC1R	16q24.3	Melanokortin 1 reseptör	CG + CGAS	200 Çinli ET + 432 kontrol	1998 MDS Konsensus kriterleri	[119]
VDR	12q13.11	Vitamin D reseptörü	CG + CGAS	239 Kafkas ET + 239 kontrol	ET tanısı bildirildi; ayrıntı verilmemiş	[120]
IL1B	2q14.1	İnterlökin-1 beta	CG + CGAS	200 Çinli ET, 229 sağlıklı kontrol	1998 MDS Konsensus kriterlerine göre ET; parkinsonizm, ilaç ilişkili tremor, serebellar tremor ve hipertiroidiye bağlı tremorlar dışlandı	[121]
CACNA1G	17q21.33	Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı α1G altbirimi	CG + CGAS	Çeşitli kohortlar	WHIGET kriterlerine göre kesin, olası veya muhtemel ET	[122]
SLIT3	5q34–q35	Slit guidance ligand 3	WGS	8 aile (51 ET, 9 sağlıklı kontrol)	ET tanısı klinik kriterlere göre	[123]
KARS	16q23.1	Lizinil-tRNA sentetaz	WGS	8 aile (51 ET, 9 sağlıklı kontrol)	ET tanısı klinik kriterlere göre	[123]
KIF5A	12q13.3	Kinesin familyası üyesi 5A	WGS	8 aile (51 ET, 9 sağlıklı kontrol)	ET tanısı klinik kriterlere göre	[123]
NTRK1	1q23.1	Nörotrofik tirozin kinaz reseptörü 1	WGS	8 aile (51 ET, 9 sağlıklı kontrol)	ET tanısı klinik kriterlere göre	[123]
NOTCH2NLC	1q21.2	Notch 2 N-terminal-like C	WES + LRS + RP-PCR + GC-PCR	197 Çinli ET ailesi + 1.305 Çinli kontrol	1998 MDS Konsensus kriterlerine göre ET	[124]

Açıklamalar: CGAS: Olgu-kontrol genetik ilişkilendirme çalışması, CG: Aday gen yaklaşımı, ET: Esansiyel tremorlu bireyler, FM: İnce haritalama (fine mapping), GC-PCR: GC-zengin polimeraz zincir reaksiyonu, GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışması, GWS: Genom çapında tarama, HC: Sağlıklı kontroller, LA: Bağlantı analizi, LRS: Uzun okuma dizileme (long-read sequencing), MDS: Movement Disorder Society, PD: Parkinson hastalığı, RP-PCR: Tekrar-bağımlı PCR (repeat-primed

PCR), TR: Hedefli yeniden dizileme, TRIG: Tremor Investigation Group, WES: Tüm ekzom dizileme, WGS: Tüm genom dizileme, WHIGET: Washington Heights–Inwood Genetic Study of Essential Tremor, ^: Özgün genetik çalışma; replikasyon çalışmaları rapor edilmemiştir.

Tablo 2-5. Tremor ile prezente olabilen başlıca otozomal dominant hastalıklar.

Tremor bozukluğu	**OMIM®**	**Kromozom**	**Gen**	**Başlangıç yaşı**	**Ana fenotip^**	**Tremor nadir bulgu §**	**Laboratuvar ve görüntüleme bulguları**
Primer distoniler							
DYT-TOR1A (DYT1)	128100	9q34.11	*TOR1A*	1.–3. dekat	Erken başlangıçlı, çoğunlukla jeneralize distoni; genellikle alt ekstremitelerle başlar. İzole yazı tremoru, baş tremoru ve geç başlangıçlı istirahat tremoru bildirilebilir	–	–
DYT/PARK-GCH1 (DYT5a)	128230	14q22.2	*GCH1*	1.–6. dekat	Diurnal dalgalanma gösteren ilerleyici dopa-duyarlı distoni. Üst ekstremitelerde postüral ve kinetik tremor. Bazen parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), piramidal bulgular, skolyoz, anksiyete, depresyon, OKB, uyku bozuklukları	–	Kan: fenilalanin yüklemesi sonrası yüksek. BOS: düşük neopterin, biyopterin, 5-HIAA; düşük veya normal HVA
DYT-THAP1 (DYT6)	602629	8p11.21	*THAP1*	2.–3. dekat	Erken başlangıçlı, çoğunlukla jeneralize distoni; boyun ve üst	–	–

					ekstremiteler sıklıkla tutulur. Baş veya üst ekstremite tremoru izole ya da ilk bulgu olabilir		
PxMD-SLC2A1 (DYT9, GLUT1 eksikliği)	601042 / 606777	1p34.2	*SLC2A1*	Çocukluk	Paroksismal egzersizle tetiklenen distoni, serebellar ataksi veya sık serebellar aksiyon tremoru	–	BOS: düşük glukoz ve laktat; BOS/kan glukoz oranı düşük
DYT-ANO3 (DYT24)	615034	11p14.3-p14.2	*ANO3*	4.–5. dekat	Fokal veya segmental distoni. Baş ve/veya kol tremoru sıklıkla distoniden önce gelir. Bazen miyoklonik sıçramalar eşlik eder	–	–
DYT-GNAL	615073	18p11.21	*GNAL*	Çocukluk–4. dekat	Fokal veya segmental, nadiren jeneralize distoni. Üst ekstremite distonik tremoru distoniden önce veya sonra görülebilir	–	–
Spinoserebellar ataksiler							
SCA-ATXN2 (SCA2)	183090	12q24.12	*ATXN2*	3.–4. dekat	Yavaş ilerleyen ataksi, yavaş sakkadlar, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), postüral tremor, duyusal bulgular	–	Beyin MR: belirgin serebellar atrofi; pons, medulla, spinal kord tutulumu.
SCA-ATXN3 (SCA3)	109150	14q32.12	*ATXN3*	3.–4. dekat	Ataksi, oftalmopleji, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), distoni, kore, spastisite, duysal bulgular, miyopati	–	Beyin MR: ponto-serebellar atrofi.
SCA-CACNA1A	183086	19p13.13	*CACNA1A*	Erişkin (>50	Saf serebellar sendrom; ataksi ve	–	Beyin MR: serebellar

(SCA6)				yaş)	postüral tremor; nadiren parkinsonizm (istirahat tremoru)		hemisfer ve vermiste orta-ileri atrofi
SCA-ATXN7 (SCA7)	164500	3p14.1	*ATXN7*	Adolesan	Palatal tremor, ataksi, görsel bozukluklar, oftalmopleji, spastisite	–	Beyin MR: belirgin ponto-serebellar atrofi
SCA-PPP2R2B (SCA12)	604326	5q32	*PPP2R2B*	Çocukluk–erişkin	Aksiyon tremoru (ilk veya baskın bulgu), hafif/olmayan ataksi, disartri, piramidal bulgular; parkinsonizm bildirilebilir	–	Beyin MR: serebellar ve/veya hemisfer atrofi
SCA-ITPR1 (SCA15/SCA16)	606658	3p26.1	*ITPR1*	5. dekat	Saf serebellar ataksi, baş tremoru ve bilişsel bozulma	–	Beyin MR: serebellar atrofi (özellikle vermis)
SCA20	608687	11q12.2–12.3	Bilinmiyor	Erişkin (19–64 yaş)	Disartri, yavaş ilerleyen ataksi, palatal tremor (%23), laringeal distoni, hiperrefleksi, hafif piramidal bulgular, baş tutulumu olmaksızın kolların postüral tremoru	–	Beyin BT/MR: erken dentat kalsifikasyonu, bazen talamik kalsifikasyon; beyin MR'da inferior oliver T2 sinyal artışı (semptomatik palatal tremorla ilişkili)
SCA-FGF14 (SCA27)	609307	13q33.1	*FGF14*	Adolesan	Ataksi, orofasiyal diskinezi, bilişsel etkilenme, el tremoru, bilişsel gerileme	–	Beyin MR: serebellar vermis ve hemisferlerde atrofi
Parkinson hastalığı (otozomal dominant formlar)							
PARK-SNCA (PARK1/PARK4)	168601 / 605543	4q22.1	*SNCA*	Genellikle 4.–5. dekat	Parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), bilişsel bozulma	–	
PARK-LRRK2	607060	12q12	*LRRK2*	Genellikle	Yavaş ilerleyen parkinsonizm	–	

(PARK8)				>50 yaş	(istirahat tremoru dâhil), levodopaya iyi yanıt		
PARK-VPS35 (PARK17)	614203	16q11.2	*VPS35*	Genellikle 5.–6. dekat	Parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), levodopaya iyi yanıt	–	
Frontotemporal demans							
MAPT-FTD	600274	17q21.31	*MAPT*	3.–7. dekat	FTD, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil) FTD'den önce gelişebilir, nadiren MND	×	Beyin MR: frontal ve/veya temporal atrofi;
C9orf72-FTD	105550	9p21.2	*C9orf72*	4.–7. dekat	FTD, MND, akinetik-rijid parkinsonizm; postüral veya istirahat tremoru nadir	×	Beyin MR: frontal/temporal atrofi
PRNG-FTD	607485	17q21.31	*PRNG*	6.–9. dekat	FTD, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), nadiren MND	×	Beyin MR: frontal/temporal atrofi
FUS-FTD	608030	16p11.2	*FUS*	4.–5. dekat	FTD, MND; nadiren parkinsonizm, sıklıkla postüral tremorla	×	Beyin MR: kaudat çekirdek atrofisi, frontal/temporal atrofi
TARDBP-FTD	612069	1p36.22	*TARDBP*	Genellikle 6. dekat	FTD, MND, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil)	×	Beyin MR: frontal/temporal atrofi
Huntington hastalığı	143100	4p16.3	*HTT*	Genellikle 4. dekat	Kore, psikiyatrik belirtiler, bilişsel bozulma. Akinezik-rijid parkinsonizm; juvenil formda. İzole postüral el ve baş tremoru nadiren başlangıç bulgusu	×	Beyin MR: kaudat atrofi
Perry sendromu	168605	2p13.1	*DCTN1*	4.–5. dekat	Parkinsonizm (istirahat tremoru	×	

					dâhil), kilo kaybı, santral hipoventilasyon, psikiyatrik belirtiler		
Herediter spastik parapleji							
HSP-SPAST (HSP4)	182601	2p22.3	*SPAST*	Bebeklik–7. dekat	Saf (çoğunlukla) veya kompleks HSP (bilişsel bozulma, epilepsi, ataksi, distal amiyotrofi); postüral el tremoru	–	Beyin MR: beyaz cevher ve posterior fossa anormallikleri
HSP-REEP1 (HSP31)	610250	2p11.2	*REEP1*	2.–7. dekat	Kompleks HSP, aksonal nöropati, serebellar ataksi, bilişsel etkilenme; ortostatik tremor tek olguda bildirilmiş	–	–
HSP-REEP2 (HSP72)	615625	5q31.2	*REEP2*	Bebeklik	Spastik paraparezi, hafif postüral tremor	–	–
NBIA-KORE-FTL (Nöroferritinopati)	606159	19q13.33	*FTL*	Genellikle erişkin (2.–6. dekat)	Progresif kore ve distoni (özellikle orofasiyal bölge), palatal tremor, bilişsel gerileme, psikiyatrik bulgular	–	Kan: düşük ferritin, KCFT anormal olabilir. Beyin MR: bazal gangliyonlar ve dentat çekirdekte demir birikimi, globus pallidus ve kortikal tutulum
HSP/NBIA-C19orf12 (HSP43, MPAN)	614298	19q12	*C19orf12*	Çocukluk	Spastik paraparezi, disartri, distoni, parkinsonizm, nöropati, psikiyatrik bulgular, optik atrofi	×	Beyin MR: globus pallidus ve substantia nigra'da demir birikimi
Erişkin başlangıçlı	203450	17q21.31	*GFAP*	≥13 yaş – 7.	Bulber belirtiler (disartri, disfoni,	–	Beyin MR: servikal spinal

Alexander hastalığı				dekat	disfaji), piramidal bulgular, yavaş ilerleyen serebellar ataksi, palatal tremor, disotonomi, uyku bozuklukları, bilişsel gerileme		kord atrofi (tadpole sign), beyaz cevher anomalileri; nöropatoloji: Rosenthal lifleri
Primer ailesel beyin kalsifikasyonu (Fahr hastalığı)	213600 / 615007 / 615483 / 616413	8p11.21 / 5q32 / 22q13.1 / 1q25.3	*SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB*, *XPR1*	3.–4. dekat	Progresif parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), distoni, aksiyon tremoru, psikiyatrik belirtiler, baş ağrısı, nöbetler	–	Beyin BT/MR: bazal gangliyon ve dentat çekirdekte kalsifikasyon
Herediter diffüz lökodistrofi (sferoidlerle)	221820	5q32	*CSF1R*	Genellikle 4. dekat	Kişilik değişiklikleri, bilişsel gerileme, nöbetler, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), kinetik tremor, spastisite	×	Beyin MR: serebral beyaz cevher lezyonları, ventrikül genişlemesi; histopatoloji: inflamatuar miyelin kaybı
Charcot-Marie-Tooth hastalığı	Çeşitli	Çeşitli	*PMP22*, *MPZ*, *NEFL* vb.	Genellikle 2.–3. dekat	Sensorimotor nöropati, pes cavus, peroneal kas atrofisi, postüral tremor	×	NCS: demiyelinizan veya aksonal iletim bozukluğu

Tablo 2-6. Tremor ile prezente olabilen başlıca otozomal resesif hastalıklar.

Tremor bozukluğu	OMIM®	Kromozom	Gen	Başlangıç yaşı	Ana fenotip	Tremor nadir bulgu	Laboratuvar ve görüntüleme bulguları
Wilson hastalığı	277900	13q14.3	*ATP7B*	Adolesan / erken erişkin	Tremorlu distoni (aksiyon tremoru, kanat çırpar tarzı tremor), parkinsonizm (istirahat	–	Kan: düşük serum bakırı ve seruloplazmin. İdrar: yüksek bakır atılımı. Beyin MR: bazal

					tremoru dâhil), serebellar bulgular, nöropsikiyatrik belirtiler, karaciğer yetmezliği		gangliyonlarda T2 hiperintensite (“dev panda” veya “çift panda” bulgusu)
Parkinson hastalığı – otozomal resesif formlar							
PARK-Parkin (PARK2)	600116	6q26	*PRKN*	4. dekat	Genç başlangıçlı parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), distonik özellikler, hafif piramidal bulgular	–	
PARK-PINK1 (PARK6)	605909	1p36.12	*PINK1*	3.–4. dekat	Genç başlangıçlı parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), distoni, piramidal bulgular	–	
PARK-DJ1 (PARK7)	606324	1p36.23	*DJ1*	3.–4. dekat	Genç başlangıçlı parkinsonizm, arefleksi, psikiyatrik belirtiler	–	
PARK-FBOX7 (PARK15)	260300	22q12.3	*FBXO7*	3. dekat	Distoni-parkinsonizm-piramidal sendrom	–	
PARK-SYNJ1 (PARK20)	615530	21q22.11	*SYNJ1*	3. dekat	Genç başlangıçlı parkinsonizm, distoni, bilişsel gerileme, nöbetler, göz kapağı apraksisi	–	
Dopamin taşıyıcı eksikliği sendromu (DTDS)	613135	5p15.33	*SLC6A3*	Bebeklik	İnfantil parkinsonizm-distonisi, istirahat ve aksiyon tremoru	–	BOS: yüksek HVA, normal neopterin/biopterin, 5-HIAA
İnfantil parkinsonizm-distonisi tip 2	618049	10q25.3	*SLC18A2*	Bebeklik	Şiddetli psikomotor gerilik, aksiyal hipotoni, distoni, parkinsonizm, okülojirik krizler	–	

Primer distoniler (otozomal resesif)							
DYT-GCH1 (DYT5a)	128230	14q22.2	*GCH1*	1.–6. dekat	Progresif dopa-duyarlı distoni, günlük dalgalanma, bazen parkinsonizm ve tremor	–	Kan: yüksek fenilalanin yükleme testi. BOS: düşük neopterin, biopterin, 5-HIAA, düşük/normal HVA
DYT-TH (DYT5b)	191290	11p15.5	*TH*	Bebeklik–adolesan	Distoni-parkinsonizm, okülojirik krizler, otonomik disfonksiyon, tremor ve miyoklonus	–	BOS: düşük HVA, neopterin, biopterin, 5-HIAA
Otozomal resesif herediter ataksiler							
Friedreich ataksisi	229300	9q21.11	*FXN*	1.–2. dekat	Serebellar/sensory ataksi, arefleksi, kas güçsüzlüğü, postüral veya kinetik tremor, baş tremoru	–	NCS: MCV >40 m/sn veya SNAP yok/azalmış. Beyin MR: erken normal, ileri evrede spinal kord ve serebellum atrofisi
Ataksi-telenjiektazi	208900	11q22.3	*ATM*	Bebeklik (geç başlangıç bildirilebilir)	Serebellar ataksi, okülomotor apraksi, konjonktival telenjiektazi, immün yetmezlik, malignite yatkınlığı	–	Kan: yüksek alfa-fetoprotein. Beyin MR: serebellar atrofi
Okülomotor apraksi tip 1	208920	9p21.1	*APTX*	1.–2. dekat	Ataksi-telenjiektazi benzeri fenotip, sensorimotor nöropati, kognitif bozulma, kore, distoni, parkinsonizm (istirahat tremoru)	–	Kan: düşük albümin, yüksek kolesterol. Beyin MR: serebellar atrofi
Okülomotor apraksi tip 2	606002	9q34.13	*SETX*	1.–2. dekat	OMA tip 1'e benzer; kore, distoni ve parkinsonizm	–	Kan: yüksek alfa-fetoprotein. Beyin MR: serebellar atrofi

					(istirahat tremoru)		
Vitamin E eksikliği ile herediter ataksi	277460	8q12.3	*TTPA*	1.–2. dekat	Friedreich benzeri fenotip, görme kaybı veya retinitis pigmentoza; distonik baş tremoru başlangıç bulgusu olabilir	–	Kan: düşük vitamin E
Abetalipoproteinemi	200100	4q23	*MTTP*	1.–2. dekat	Friedreich benzeri fenotip, retinitis pigmentoza, hipokolesterolemi, malabsorpsiyon	–	Kan: yok veya çok düşük LDL-kolesterol, trigliserid ve apolipoprotein B; akantositoz; düşük vitamin E
Serebrotendinöz ksantomatozis	213700	2q35	*CYP27A1*	1.–2. dekat (geç başlangıç bildirilebilir)	Serebellar ataksi, bilişsel gerileme, juvenil katarakt, tendon ksantomları, erken parkinsonizm (istirahat tremoru), kronik diyare, periferik nöropati, distoni, miyoklonus	–	Kan: yüksek kolestanol, düşük 27-OH kolesterol. Beyin MR: serebellar ve/veya serebral atrofi, lökodistrofi
NBIA – PKAN (NBIA/DYT-PANK2)	234200	20p13	*PANK2*	Çocukluk (geç başlangıç bildirilebilir)	Parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil), davranış değişiklikleri, pigmenter retinopati (%50)	–	Beyin MR: globus pallidusta demir birikimi, “kaplan gözü” bulgusu
NBIA – PLAN (NBIA/DYT-PARK-PLA2G6)	256600	22q13.1	*PLA2G6*	Çocukluk (geç başlangıç bildirilebilir)	Parkinsonizm (istirahat tremoru), piramidal bulgular, bilişsel gerileme, serebellar ataksi	–	Beyin MR: substantia nigra ve globus pallidusta demir birikimi, serebellar atrofi

NBIA / HSP – MPAN (HSP43, C19orf12)	614298	19q12	*C19orf12*	Çocukluk	Spastik paraparezi, disartri, distoni, parkinsonizm, nöropati, psikiyatrik bulgular, optik atrofi	–	Beyin MR: globus pallidus ve substantia nigra'da demir birikimi
CoPAN	615643	17q21.2	*COASY*	Çocukluk	Global gelişimsel gecikme, ataksi, piramidal bulgular, distoni, parkinsonizm	–	Beyin MR: globus pallidus ve substantia nigra'da demir birikimi
FAHN (HSP35, NBIA/DYT-FA2H)	234200	20p13	*FA2H*	1.–2. dekat	Spastik paraparezi, ataksi, distoni	–	Beyin MR: bazal gangliyonlarda demir birikimi (sabit değil), kortikoserebellar atrofi, beyaz cevher hiperintensiteleri
Kufor–Rakeb hastalığı (PARK-ATP13A2)	606693	1p36.13	*ATP13A2*	2.–3. dekat	Erken başlangıçlı levodopaya yanıtlı parkinsonizm (istirahat tremoru), piramidal bulgular, supranükleer bakış felci, bilişsel gerileme	–	Beyin MR: yaygın atrofi, putamen ve kaudatta demir birikimi
Aserüloplazminemi (NBIA/DYT-PARK-CP)	604290	3q24–q25	*CP*	Orta erişkinlik	Retina dejenerasyonu, diyabet, nörolojik bulgular (distoni, parkinsonizm, ataksi)	–	Kan: düşük seruloplazmin, yüksek ferritin. Beyin MR: bazal gangliyon ve dentat çekirdekte demir birikimi
Glutarik asidüri tip 1	231670	19p13.13	*GCDH*	Bebeklik / erişkin	Bebeklikte akut ensefalopatik krizler, yaygın distoni; erişkinde aksiyon tremoru (kollar/baş), distoni, serebellar ve piramidal bulgular	–	Bazı ülkelerde rutin yenidoğan taraması

Klasik galaktozemi	230400	9p13.3	*GALT*	Yenidoğan – erişkin	Bebeklikte ateşle tetiklenen ensefalopatik ataklar; erişkinde brakiyal distonik tremor, orofasiyal diskinezi	–	Bazı ülkelerde rutin yenidoğan taraması
Manganez taşıyıcı bozuklukları – SLC30A10 eksikliği	613280	1q41	*SLC30A10*	Çocukluk / erişkin	Karaciğer hastalığı, polisitemi; çocuklukta ekstremite distonisi, disartri, ince tremor, bradikinezi; erişkinde parkinsonizm (istirahat tremoru)	×	Kan: anormal KCFT, polisitemi. Beyin MR: bazal gangliyonlarda T1 hiperintensite
SLC39A14 eksikliği	617013	8p21.3	*SLC39A14*	Bebeklik	Gelişim basamaklarında gerileme, distoni, bulber bulgular, spastisite	×	Beyin MR: bazal gangliyonlarda T1 hiperintensite
HSP-KIAA1840 (HSP11)	604360	15q21.1	*KIAA1840*	Bebeklik veya adölesan (geç başlangıç bildirilebilir)	Kompleks HSP, serebellar bulgular, polinöropati, nöbetler, bilişsel gerileme, anormal göz hareketleri, amiyotrofi, parkinsonizm (istirahat tremoru), aksiyon tremoru	–	Beyin MR: beyaz cevher anormallikleri, serebellar atrofi, korpus kallozum incelmesi, “lince’s ear” bulgusu
HSP-DSTYK (HSP23)	270750	1q32.1	*DSTYK*	Çocukluk	Bilişsel gerileme, Lyon tipi hidronefroz, kraniyofasiyal anomaliler, pes kavus, iskelet dismorfizmi, tremor	–	–
HSP-GJC2 (HSP44)	613206	1q42.13	*GJC2*	Erişkinlik	Yavaş progresif paraparezi, disartri, parmak becerisinde	–	Beyin MR: hipomiyelinizasyon, lökodistrofi ve TCC (tüm

					azalma, dismetri, intansiyon tremoru, skolyoz, üst ekstremite tutulumu, bilişsel bozulma		hastalarda)
HSP-PGAP1 (HSP67)	N.A.	2q33.1	*PGAP1*	Bebeklik	Ağır gelişimsel gecikme, abdominal distansiyon, sınırda zekâ, ACC, vermis hipoplazisi, defektif miyelinizasyon	×	Beyin MR: korpus kallozum agenezisi, hipomiyelinizasyon
HSP-REEP2 (HSP72)	615625	5q31.2	*REEP2*	Erken çocukluk	Spastik paraparezi, hafif postüral tremor	–	–
Charcot–Marie–Tooth hastalığı	Çeşitli	Çeşitli	Çeşitli (örn. *MFN2, MPZ, NEFL*)	Genellikle 2.–3. dekat	Sensorimotor nöropati, pes kavus, peroneal kas atrofisi, postüral tremor	×	NCS: demiyelinizan veya aksonal tipte MCV değişiklikleri

Tablo 2-7. Tremor ile prezente olabilen başlıca X`e bağlı hastalıklar.

Tremor ile seyreden hastalık	**OMIM®**	**Kromozom**	**Gen**	**Başlangıç yaşı**	**Temel fenotip**	**Tremor nadir mi**	**Laboratuvar ve görüntüleme bulguları**
Frajil X-ilişkili tremor/ataksi sendromu (FXTAS)	300623	Xq27.3	*FMR1*	Orta–ileri erişkinlik (genellikle >50 yaş)	Niyet veya aksiyon tremoru, serebellar ataksi, kognitif gerileme, nöropati, vestibüler ve otonom disfonksiyon; postural ve istirahat tremoru bildirilebilir; aile öyküsünde erkeklerde entelektüel yetersizlik, kadın akrabalarda prematür over		Beyin MR: orta serebellar pedinkül bulgusu, orta–ileri beyin atrofisi, serebral ve serebellar beyaz cevher anomalileri

					yetmezliği		
DYT-TAF1 / Lubag sendromu	314250	Xq13.1	*TAF1*	3.–4. dekat	Distoni, parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil)		Beyin MR: putamen çevresinde hiperintens halka, kaudat başı veya putamen atrofisi
Waisman sendromu	311510	Xq28	*RAB39B*	Erken çocukluk (<45 yaş)	Entelektüel yetersizlik, erken başlangıçlı parkinsonizm (istirahat tremoru dâhil)		–
Adrenolökodistrofi	300100	Xq28	*ABCD1*	Çocukluk / erişkinlik	Spastik paraparezi, adrenal yetmezlik, mesane ve barsak disfonksiyonu		Kan: çok uzun zincirli yağ asitleri ↑, ACTH ↑; Beyin MR: beyaz cevher anomalileri
Rett sendromu	312750	Xq28	*MECP2*	Bebeklik (6–18 ay)	Neredeyse sadece kızlarda; gelişimsel duraklama ve gerileme, iletişim kaybı, irritabilite, anksiyete, distoni, tremor, solunum düzensizlikleri, epileptik nöbetler, ilerleyici motor bozulma ve stereotipiler		–
Lesch–Nyhan sendromu	300322	Xq26.2–q26.3	*HPRT1*	Bebeklik (3–6 ay)	Distoni (distonik tremor dâhil), koreatetoz, bilişsel ve dikkat bozuklukları, kendine zarar verici davranışlar		Kan: ürik asit ↑
Spinal ve bulber musküler atrofi (Kennedy hastalığı)	313200	Xq12	*AR*	3.–5. dekat (daha erken olabilir)	Alt motor nöron hastalığı: kas güçsüzlüğü ve atrofi, fasikülasyonlar, bulber tutulum (dizartri, disfaji), kramplar; endokrin bulgular		Kan: CK ↑, hiperglisemi, hiperlipidemi; EMG/NCS: akut ve kronik denervasyon, SNAP amplitüdlerinde azalma

					(jinekomasti, testiküler atrofi, infertilite); postural el tremoru (kas güçsüzlüğünden önce görülebilir), postural bacak tremoru nadir		
Pelizaeus–Merzbacher hastalığı	312080	Xq22.2	*PLP1*	Erken çocukluk	Piramidal disfonksiyon, serebellar ataksi, baş tremoru, progresif nistagmus, psikomotor gerilik	×	Beyin MR: hipomiyelinizasyon
NBIA / PARK-WDR45 (BPAN)	300894	Xp11.23	*WDR45*	Erken çocukluk	İki evreli: erken çocuklukta gelişimsel gecikme, epilepsi; adölesan/erişkin dönemde parkinsonizm ve kognitif gerileme; istirahat tremoru parkinsonizmin bir parçası olabilir		Beyin MR: erken evrede normal veya nonspesifik atrofi; ilerleyen dönemde substantia nigra ve globus pallidusta demir birikimi; T2* ve SWI'de hipointensite
Cabezas sendromu	300354	Xq24	*CUL4B*	Bebeklik	Entelektüel yetersizlik, konuşma gecikmesi, kısa boy, servikodorsal kifoz, hipertansiyon, trunkal obezite, anormal yürüyüş, belirgin alt dudak, hipogonadizm		Beyin MR: kortikal displazi, ventrikülomegali, korpus kallozumda beyaz cevher kaybı
CMTX (GJB1)	302800	Xq13.1	*GJB1* (vakaların ~%90'ı)	2.–3. dekat	Erkeklerde daha ağır seyir; sensörimotor nöropati; **postural tremor** bildirilebilir. Kadın taşıyıcılar genellikle normal ya da minimal etkilenmiştir.	×	NCS: Motor iletim hızı (MCV) demiyelinizan–aksonal spektrumda

Tablo 2-8. Klinik tablolarında tremor görülebilen başlıca kromozomal anomaliler ve mikrodelesyon sendromları.

Tremor ile ilişkili hastalık	Karyotip	Semptom başlangıç yaşı	Temel fenotip	Laboratuvar / görüntüleme bulguları
Klinefelter sendromu	47,XXY	Puberte	**Üst ekstremitelerde intansiyon tremoru**, bazen baş ve ses tremoru; uzun boy, hipogonadizm, androjen eksikliği; infertilite, azospermi, küçük ve sert testisler	Kan: hipergonadotropik hipogonadizm / androjen eksikliği. Spermiogram: azospermi
Jacobs sendromu	47,XYY	1. dekat	**Kollarda intansiyon tremoru** (tek veya çift taraflı), bazen postural veya hafif istirahat tremoru; çocuklukta dikkat eksikliği, davranış sorunları, makrosefali, erken puberte, hiperaktivite	–
Diğer süpernümerer X veya Y sendromları	48,XXYY	1. dekat	**Üst ekstremitelerde postural ve/veya aksiyon tremoru**; uzun boy, mikro-orşidizm, hipogonadizm, dismorfik yüz bulguları, öğrenme güçlüğü, dikkat eksikliği	Kan: hipergonadotropik hipogonadizm / androjen eksikliği. Spermiogram: azospermi
22q11.2 delesyon sendromu	22q11.2 delesyonu	1. dekat	Konjenital kalp anomalileri (özellikle konotrunkal), palatal anomaliler, fasiyal dismorfizm, gelişimsel gecikme, öğrenme güçlüğü, immün yetmezlik, endokrin bozukluklar; daha nadiren psikiyatrik hastalıklar, epilepsi ve **parkinsonizm (istirahat tremoru dahil)**	

Açıklamalar: 5-HIAA = 5-hidroksiindolasetik asit; CSF = beyin-omurilik sıvısı; CT = bilgisayarlı tomografi; FTD = frontotemporal demans; HSP = herediter spastik paraparezi; HVA = homovanilik asit; MCV = motor iletim hızı; MND = motor nöron hastalığı; MRI = manyetik rezonans görüntüleme; NCS = sinir iletim çalışması; N.A. = mevcut değil; NBIA = beyinde demir birikimi ile seyreden nörodejenerasyon; SNAP = duyusal sinir aksiyon potansiyeli; OMIM® = Online Mendelian Inheritance in Man.

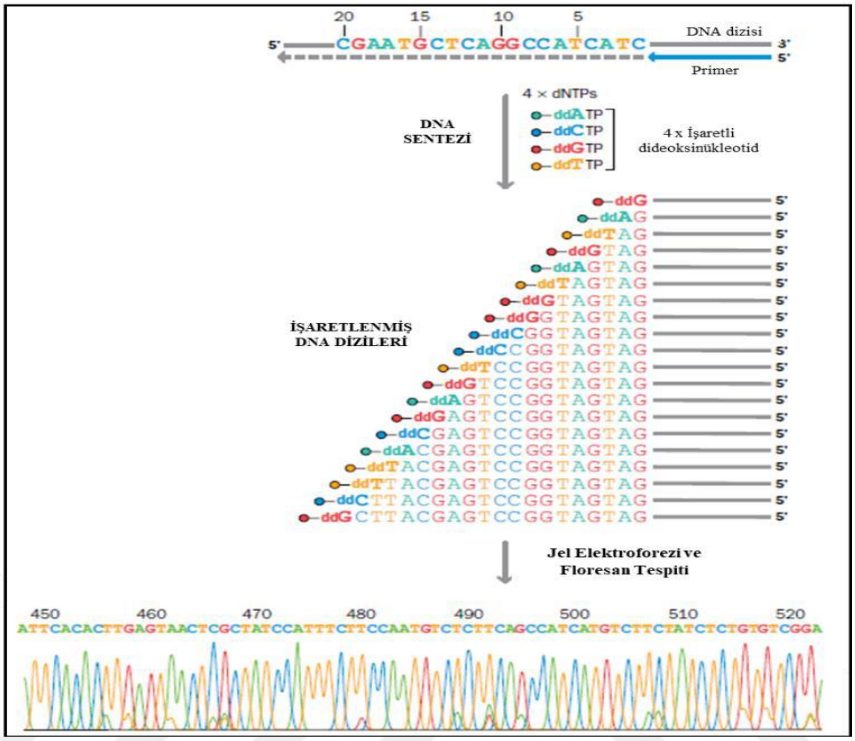
^ Tremor özellikleri kalın yazı ile belirtilmiştir, § Tremor klinik spektrumun nadir bir parçasıdır.

2.3. YENİ NESİL DİZİLEME ANALİZLERİ

DNA dizilimini hızlı ve ekonomik bir şekilde sağlayan yeni nesil dizi analizi (YND), son yıllarda genetik testlerde önemli bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir. Bu gelişme sayesinde, Mendelyen hastalıklar, kanser ve bazı kompleks hastalıklar gibi geniş yelpazedeki hastalıkların genetik kökenleri belirlenebilir hale gelmiştir. YND'nin etkin kullanımıyla, tedavi stratejileri geliştirilebilir ve ailelere özgün genetik danışmanlık sağlanabilir. Kişide uygulanan YND pek çok varyant tespit eder. Bu varyantların hangisinin ilişkili olduğunu belirlemek için biyoinformatik araçlar ve klinik uzmanlık bilgileri kullanılır. Segregasyon analizi, varyant yorumlamasında kritik bir rol oynar ve varyantın ailede hastalık birlikteliği gösterip göstermediğini belirler. Çoğu kez varyantlar arasında, hastalıkla ilişkilendirilmeyen ancak presemptomatik ya da prediktif nitelikte olabilen önemli ikincil bulgular da gözlenebilir. Bu nedenle, bir bireye tanı amacı güden YND tekniği uygulanacaksa, iyi bir genetik danışmanlık ve gerekli onayların alınması önemlidir. Tüm testlerde olduğu gibi YND'nin de sınırlılıklarının bilinmesi ve dikkate alınması gerekir. Dizi teknolojilerindeki gelişmeler, yıllar içinde hastalıkla ilişkili genlerin ve varyantların tanımlanmasına ve moleküler patolojik yolakların anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır. Bu teknolojiler üç farklı dizi kimyası kullanır.

Birinci Nesil (Sanger Dizileme): Sanger dizileme, ilk geliştirilen dizileme yöntemidir. DNA dizilerindeki nükleotidleri tek tek okumak için floresan işaretli nükleotidler kullanır. Bu yöntem , PCR ile çoğaltılmış DNA fragmanlarını tek bir yönden okuyan ve "sequencing-by-synthesis" (sentez yoluyla dizileme) reaksiyonu ardından kapiler elektroforezinde ayıran bir sistemdir. Tek reaksiyonda, yaklaşık 700 baz çifti (bp) uzunluğundaki DNA dizilerini tek bir iplikçik üzerinden okuyabilir (**Şekil 2-5**). Sanger dizileme yöntemi, 1980 yılında bilim insanları Frederick Sanger, Walter Gilbert ve Paul Berg'e kimya dalında Nobel Ödülü kazandırmıştır (**133**). Günümüzde halen küçük genlerin ve hedef bölgelerin incelenmesi gerektiğinde, doğruluğu ve güvenilirliği nedeniyle altın standart olarak kabul edilir. En sık karşılaşılan sınırlılığı, *allel-drop-out* olarak nitelenen ve bireydeki öngörülemeyen polimorfik yapıların primerlerin doğru eşleşmesini engelleyerek iki alleli değil tek alleli okumasıdır. Böyle bir sorundan şüphe duyulursa, primerlerin yerini değiştirmek çözüm olabilmektedir. Bir diğer kritik husus, tasarlanan primer çiftlerinin hedeflenen bölgeyi özgül olarak çoğaltma gereksinimidir;

bu koşulun, testin doğruluğunun sağlanabilmesi açısından mutlaka karşılanması gerekmektedir.



Şekil 2-5. Sanger dideoksi dizilemenin aşamaları.

Dideoksi dizilemede, DNA polimeraz, tek sarmallı DNA'dan komplementer dizi oluşturmak için oligonükleotid primer kullanır. Sekanslama reaksiyonlarında standart dNTP'ler ve bunlarla rekabet eden floresan grupları bulunan etiketli ddNTP'ler kullanılır. Dizileme sonucunda ortak bir 5′ uca fakat dideoksinükleotidin yerleşim yerine bağlı olarak farklı 3′ uçları olan uzunlukları tek bir nükleotit boyutu kadar değişkenlik gösteren iç içe geçmiş DNA dizi kümeleri üretilir. Bu diziler jel elektroforezi ile boyutlarına göre ayrılır ve kaydedilen floresan sinyalleri sonucunda boyaya özgü yoğunluk profillerine uygun olarak ardışık baz dizisi çıktısı hazırlanır.
Human Molecular Genetics, 5. Baskıdan uyarlanmıştır (**134**).

İkinci Nesil (Yüksek Tekrarlı Kısa Dizileme): Bu yöntem, DNA'yı küçük parçalara ayırır ve 150 ile 400/600 baz çifti uzunluğundaki fragmentleri çoğaltarak yüksek paralel dizileme biçiminde gerçekleştirir. Gen-paneli, klinik ekzom ve tüm ekzom veya genom dizileme gibi diziler ikinci nesil dizileme kapsamında yer alır. Örneğin, Illumina Hi-Seq 3000 ve Illumina NextSeq 500 ile 150 bp, Illumina MiSeq ile 300 bp, NovaSeq ile 50, 100, 150bp amplikonlar dizilenir. NovaSeq5000 ve ardından geliştirilen NovaSeq6000 ise yüksek verimlilikte büyük veri çıkışına sahip olduğu için özellikle tüm ekzom ve

tüm genom dizilemelerinde kullanılır. Ayrıca Ion Torrent'in Ion S5 ve Ion S5 XL platformları, daha geniş bir kullanım yelpazesi ile 200, 400 ya da başka farklı amplikon uzunluklarına sahip fragmentler ile çalışmayı destekler. Bu teknoloji, PCR ile çoğaltılmış fragmentleri kalıp (template) olarak kullanıp "sequencing-by-synthesis" (sentez yaparken dizileme) ya da "sequencing-by-ligation" (ligasyon ile dizileme) işlemi şeklinde çalışır. İkinci nesil dizinin temelinde iki farklı dizileme stratejisi "pair-end" ve "mate-pair" vardır. Bu stratejiler, bir DNA fragmentinin her iki ucundan veya birbirinden uzak iki fragmentinden dizileme yapmayı hedefler.

Üçüncü Nesil (Amplifikasyonsuz dizileme): Pacific Biosciences'ın PacBio ve Oxford Nanopore bu yöntemi uygulayan platformlardır. Amplifikasyona ihtiyaç duymadan DNA'nın tek iplikçikler halinde uzun parça olarak okunmasını gerçekleştirir. Bu yöntem ile genomun zor haritalanan yüksek değişken ve yüksek tekrarlı elemanlar içeren kompleks bölgelerinin daha iyi çözümü, yapısal varyantların tespiti, epigenomik analizler ve haplotip faz ayrımı olanaklı olur (**135**). Yakın geçmişte, yüksek kapasiteli kısa okumalı paralel dizileme olarak da bilinen ikinci nesil dizileme, genom araştırmalarında geleneksel Sanger dizilemenin yerini almış olsa da, rutin uygulamalarda hemen yaygınlaşmamıştı (**136**). Günümüzde ise tanı temelli testlerde bu teknoloji panel testlerden başlayıp klinik ekzom ve ekzom dizileme yöntemlerine kadar uzanan hemen hemen tüm genetik testlerin çoğunda kullanılan yöntemler olmuştur. Tüm bu uygulamalara rağmen, klinik hastalıklar arasında farklılıklar olsa da ekzom analizinin tanı verimliliği %25-30 civarındadır (**137**).

YND platformları, DNA'nın fragmentasyonu, kütüphane hazırlığı, masif paralel dizileme işlemi ve biyoinformatik süreçler sonrasında analize hazır belgeler oluşturur. Fragmantasyon ile hedeflenen DNA, kullanılan platforma göre değişmekle birlikte genellikle 100-300 bç uzunluğunda kütüphane hazırlığında kullanılmak üzere kısa segmentlere ayrılır. Kütüphane hazırlığında her bir DNA örneği hastayı tanımlayacak şekilde indekslenir ve dizilemede kullanılacak adaptörler bu örneklere eklenir. Adaptörler aracılığıyla dizilenecek DNA segmentlerine primerlerin bağlanması sağlanır. Dizileme ise YND sekanslayıcı cihazlar ile gerçekleştirilir. Bu cihazlardan üretilen dizi bilgisi biyoinformatik yazılımlarla analiz edilir. Biyoinformatik süreç, baz çağırma, okumaların hizalanması, varyantların belirlenmesi ve belirlenen varyantların anotasyonunu içerir. Dizilenen bilgiler referans insan genoma göre hizalanır ve olası farklılıklar (varyantlar) araştırılır. Saptanan bu varyantlar, klinik bulgular, toplum

veritabanlarındaki sıklıkları, protein üzerindeki etkileri gibi birçok parametreye göre değerlendirilir (**138**).

Yeni nesil dizileme platformları, kullanılan dizileme teknolojisi, okuma uzunluğu, veri üretim kapasitesi ve uygulama alanları açısından farklılık göstermektedir. Illumina platformları kısa okuma uzunluğu ile yüksek doğruluk sağlarken, PacBio ve Oxford Nanopore platformları uzun okuma teknolojileri sayesinde yapısal varyantlar, tekrar dizileri ve haplotip çözümlemesinde avantaj sağlamaktadır. Ion Torrent ve MGI platformları ise özellikle klinik gen panelleri ve orta ölçekli genomik çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (**Tablo 2-9, Tablo 2-10**).

Tablo 2-9. YND platformlarının karşılaştırılması.

Platform / Cihaz	Firma	Dizileme Teknolojisi	Okuma Uzunluğu	Maks. Veri Çıkışı (Run başına)	Avantajları	Sınırlamaları
MiSeq	Illumina	Sequencing by Synthesis (SBS)	2×300 bp	~15 Gb	Küçük panel, mikrobiyoloji, hedefli gen panelleri için ideal	Düşük verim
NextSeq 1000/2000	Illumina	SBS	2×150 bp	~360 Gb	Orta ölçekli genom ve eksom çalışmalarında yaygın	Okuma uzunluğu sınırlı
NovaSeq 6000 / NovaSeq X	Illumina	SBS	2×150 bp	3–16 Tb	Çok yüksek throughput, büyük popülasyon genomikleri	Yüksek maliyet
Ion S5 / Genexus	Thermo Fisher (Ion Torrent)	Semiconductor sequencing	~200–400 bp	~15–20 Gb	Hızlı run süresi, klinik gen panellerinde kullanışlı	Homopolimer hataları
MGISEQ-2000 / DNBSEQ-G400	BGI / MGI	DNBSEQ + cPAS	2×150 bp	~720 Gb	Yüksek doğruluk, düşük maliyet	Platform erişimi sınırlı
PacBio Sequel II / Revio	Pacific Biosciences	SMRT long-read sequencing	10–25 kb (HiFi reads)	~100–400 Gb	Uzun okuma, yapısal varyant ve haplotip analizi	Daha yüksek maliyet
PromethION / GridION / MinION	Oxford Nanopore	Nanopore sequencing	10 kb – >1 Mb	~50 Gb – >5 Tb	Ultra uzun okuma, gerçek zamanlı analiz	Ham doğruluk daha düşük (iyileştirilmekte)

Tablo 2-10. Kısa Okumalı (Short-Read) ve Uzun Okumalı (Long-Read) Dizileme teknolojilerinin karşılaştırılması.

Özellik	Kısa Okumalı Dizileme	Uzun Okumalı Dizileme
Temel platformlar	Illumina, MGI, Ion Torrent	PacBio SMRT, Oxford Nanopore
Okuma uzunluğu	50–300 bp	5 kb – >1 Mb
Doğruluk	Çok yüksek (≥99.9%)	Ham doğruluk daha düşük ancak HiFi ile çok yüksek
Yapısal varyant tespiti	Sınırlı	Çok iyi
Tekrarlı bölgelerin analizi	Zor	Daha başarılı
De novo genom montajı	Zor	Uygun
Haplotip çözümü	Sınırlı	Daha iyi
Veri üretim maliyeti	Daha düşük	Daha yüksek
Klinik kullanım	Panel, WES, WGS	Yapısal varyantlar, tekrar artışları

YND teknolojileri sayesinde, eskiden mümkün olmayan miktarda yorumlanması gereken genetik veri elde edilmektedir. Bu veriler, hastalıklarla ilişkili varyantları tanımlamak ve sınıflandırmak için kullanılmaktadır. Varyantların sınıflandırılması, bir genin normal varyantlarını hastalığa neden olan patojenik varyantlardan ayırmayı içerir. Bu ayrım, genetik hastalıkların kesin teşhisini koymak, genetik riskleri belirlemek ve tedavi seçeneklerini belirlemek için hayati öneme sahiptir. Bu nedenle, varyantların doğru bir şekilde sınıflandırılması ve yorumlanması gerekir. Bu amaçla, 2015 yılında varyantların sınıflandırılması için bir sistem önerilmiş ve bu önemli adım günümüzde kabul görmüştür. Sistem her geçen gün yeni kanıtlarla geliştirilmeye devam etmektedir (**139**). Bu sınıflandırma beş gruptan oluşur: "patojenik", "muhtemelen patojenik", "önemi bilinmeyen değişim (VUS: variant of unknown significance), "muhtemelen benign" ve "benign". Sınıflandırma işleminde, varyantın ilgili hastalıkla daha önce ilişkilendirilmiş bir gen olup olmadığı, popülasyondaki sıklığı, evrimsel olarak korunmuşluğu, hastalığın kalıtım modeli ile uyumlu zigosite gösterip göstermediği, fonksiyonel etkileri ve veri tabanlarında bulunan pek çok bilgi değerlendirilmektedir. Bu bilgiler ışığında varyantın hastalığa neden olma olasılığı hakkında tahminde bulunulmaya çalışılmaktadır. Zaman içinde yeni kanıtlar ortaya çıktıkça varyant sınıflamaları değişebilmektedir. Özellikle "önemi bilinmeyen değişim" statüsündeki varyantlar için ek kanıtlar, bu varyantların daha ayrıntılı değerlendirilmesine ve yorumlanmasına yardımcı olmaktadır (**140,141**). 1000 Genom Projesi'nde yapılan trio

çalışmaları, göreceli olarak orta yaşta ve sağlıklı bireylerde dahi *de novo* varyantın bulunduğunu ve bunların kodlayıcı genlerde de saptanabileceğini göstermiştir. Bu durum, hastalık ilişkili bir gende varyant yorumlarının ne kadar zorlu olabileceğini düşündürmektedir (**142**). Segregasyon analizi hastalık ilişkisi olduğu blinen bir gende yeni ya da nadir bir varyant saptandığında tanı testlerinin önemli bir aşamasını oluşturur. Günümüzde referans genomun son sürümü GRCh38.p14'tür. Bundan sonra, tam mole genomun (46,XX) telomerden telomere uzun dizi teknolojisi kullanılarak dizilendiği "T2T CHM13v2.0" projesi geliştirilmiştir. Ardından, popülasyon genelindeki genomik çeşitliliği yansıtmak üzere çok sayıda bireyin her iki haplotipinin faz tayiniyle ayrı ayrı temsil edildiği 'Pangenom' projesi devreye girmiştir (**143**). Hedefi, bir türün genomunda bulunan tüm varyasyonların pozisyonel durumlarını anlama ve dağılımlarının paternini tespit etmektir. Proje çıktıları sonucunda genetik varyasyonların kişinin sağlığına özgün katkılarını daha iyi anlamamız beklenmektedir. YND analizleri, klinik genetikte tanı ve önleyici tıp ile tedavi stratejilerinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Ancak, halen karşılaştığımız en büyük zorluk, özellikle tüm genom analizlerinde kodlayan bölgeler dışında kalan varyantların etkileri konusunda bilmediğimizin çok olmasıdır. Pangenom projelerinin sonuçları bu belirsizlikleri bir oranda giderebilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma kohortu, ET tanısı almış 20 farklı aileden seçilen 20 indeks olgudan oluşmaktadır. Segregasyon analizleri kapsamında ayrıca 13 etkilenmiş ve 21 etkilenmemiş akrabaya genetik testler uygulanmıştır. Etkilenmiş bireyler Fahn–Tolosa–Marin Tremor Derecelendirme Ölçeği ve kapsamlı nörolojik muayeneyi içeren standartlaştırılmış klinik değerlendirmeden geçirilmiştir (**EK-1**). Gerekli görülen durumlarda tremorun sekonder nedenlerini dışlamak amacıyla yardımcı incelemeler (MRI, EMG ve laboratuvar testleri) yapılmıştır. Alternatif tremor etiyolojisi bulunan bireyler, üst ekstremite tutulumu olmaksızın izole baş veya ses tremoru olanlar, ET tanısı kesin olmayan olgular veya klinik verileri yetersiz olan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

ET ve "ET-plus" kavramları için 2018 Uluslararası Parkinson ve Hareket Bozuklukları Derneği (IPMDS) konsensüs kriterleri esas alındı. Buna göre esansiyel tremor, en az üç yıl süreli bilateral üst ekstremite aksiyon/postür tremoru (baş ve ses tremoru eşlik edebilir) varlığıyla ve başka nörolojik bulgu olmamasıyla tanımlandı. ET-plus ise hafif düzeyde ek nörolojik bulguları olan (ör. istirahat tremoru, hafif tandem yürüme bozukluğu, hafif kognitif etkilenme gibi) ET olguları için kullanıldı.

Dahil Edilme Kriterleri:

-Klinik olarak kesin veya olası ET tanısı almış olmak ve özellikle üst ekstremitelerde aksiyon tremorunun varlığı temel alındı; tremorun günlük yaşamda belirgin bir semptom olması şart koşuldu

-Yaş kısıtlaması olmaksızın çocukluk çağından ileri yaşa kadar her yaştan başlangıç kabul edildi (çalışmamızda başlangıç yaşları 7 ila 67 arasında değişmektedir)

-Hastaların çalışmaya yazılı onam verip, aydınlatılmış onam formlarını imzalaması

Dışlanma Kriterleri:

-Alternatif tremor nedenleri: PH, distoni veya başka bir alternatif tremor nedeni

-Ayrıca, hipertiroidi, ilaçlara bağlı tremor gibi ET dışı tremor nedenleri

Toplanan klinik veriler; demografik değişkenler, başlangıç yaşı, hastalık süresi, tremorun dağılımı ve şiddeti, alkol yanıtı, nörolojik bulgular ve aile öyküsünü kapsamaktadır. Her aile için iki veya üç kuşağı içeren aile ağacı oluşturulmuştur.

Çalışma yerel etik kurul tarafından onaylanmıştır (protokol no: 2022/2129, **EK-2**) ve tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. DNA örnekleri periferik kandan izole edilmiş ve −20 °C'de saklanmıştır.

3.2. Moleküler Genetik İncelemeler

Çalışmaya dahil edilen 20 ailede moleküler genetik çalışmalar gerçekleştirilmiş ve seçilmiş olgularda başlangıç bulgularına göre solo/duo/trio ekzom dizileme (ES) ve/veya tüm genom dizileme (TGD) kullanılarak aşamalı bir test stratejisi uygulanmıştır. Dizileme işlemleri standart Illumina platformları kullanılarak gerçekleştirilmiş, aday varyantlar segregasyon analizleri amacıyla Sanger dizileme ile doğrulanmıştır. Bilgilendirici mayoz sayısının sınırlı olması ve yaşa bağlı penetrans nedeniyle bağlantı analizi yapılmamıştır. Aday genler HGMD ve HPO veritabanları kullanılarak tanımlanmış ve bu genlerdeki varyantlar gen toleransı ve öngörülen patojenite açısından standart filtreleme stratejileri ve kısıtlılık (*constraint*) metrikleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Birden fazla bireyin etkilendiği ailelerde ortak varyantlar, solo/duo/trio ve TGD analizleri aracılığıyla önceliklendirilmiştir. Varyant yorumlanmasını kolaylaştırmak amacıyla saptanan varyantlar segregasyon kanıtlarına göre üç kategoriye ayrılmıştır:

Tier 1: Etkilenmiş aile bireyleri ile birlikte segregasyon gösteren ve etkilenmemiş akrabalarda bulunmayan varyantlar,

Tier 2: Yalnızca etkilenmiş bireylerde gözlenen ancak sınırlı mayoz sayısı veya ek segregasyon verisinin bulunmaması nedeniyle kanıtı sınırlı olan varyantlar,

Tier 3: Biyolojik olarak güçlü adaylar olmakla birlikte segregasyon kanıtı bulunmayan varyantlar.

3.2.1. Ekzom Dizileme (ED)

Hedef genom bölgeleri, IDT Exome Kiti kullanılarak zenginleştirilmiştir. Yaklaşık 34 Mb büyüklüğünde ve Consensus Coding Sequences (CCD) bölgelerinin %99.2'sinden fazlasını kapsayan alanlar, Illumina NextSeq 550 platformunda yüksek verimli dizileme yöntemi ile ~70–80X kapsama derinliğinde dizilenmiştir. Elde edilen varyantlar, fenotiple ilişkili genler açısından anotasyon ve önceliklendirmeye tabi tutulmuş; *in house* ve veritabanlarındaki popülasyon frekans verileri (dbSNP) kullanılarak filtrelenmiştir. Varyantların daha önce bildirilip bildirilmediği PubMed,

ClinVar ve HGMD veri tabanları aracılığıyla araştırılmıştır (**144,145**). Varyantların patojenite değerlendirmesi, *in silico* analiz araçları (AlphaMissense, MutationTaster, PolyPhen-2, Human Splicing Finder) ve AlphaFold kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Varyant sınıflandırması, ACMG kriterlerine göre Franklin platformu (https://franklin.genoox.com/clinical-db/home) kullanılarak yapılmıştır. DNA örneklerinin mevcut olduğu durumlarda aile içi segregasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Ekzom dizileme analizine ait ayrıntılı çalışma protokolü **EK-3**'de gösterilmiştir.

3.2.2. Tüm Genom Dizileme (TGD)

ED analizine ek olarak, bu kohorttan seçilen beş indeks olguda tüm genom dizileme (TGD) analizi gerçekleştirilmiştir. Dizileme, 150 bp paired-end okumalar ile Illumina NovaSeq 6000 platformunda yapılmıştır. DNA kütüphane hazırlığı, TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve tüm genom genelinde ortalama 30× kapsama derinliği hedeflenmiştir. Elde edilen diziler, BWA-MEM algoritması kullanılarak GRCh38/hg38 referans genomuna hizalanmış ve varyant çağırma işlemi GATK Best Practices pipeline doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Tek nükleotid varyantları (SNV) ve küçük insersiyon/delesyonların (indel) analizine ek olarak, kopya sayısı varyasyonları (CNV) hem read-depth hem de split-read temelli algoritmalar kullanılarak değerlendirilmiştir. Analiz aşamasında Genomize yazılımı da kullanılmıştır. Ayrıca, özellikle nörogenetik lokuslarda kısa tandem tekrar (STR) genişlemelerini tespit etmek amacıyla ExpansionHunter yazılımı kullanılarak tekrar genişleme analizi yapılmıştır. Varyant filtreleme ve yorumlama kriterleri, ED analizinde uygulanan kriterlerle uyumlu olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Varyant Değerlendirmesi, Metrikler ve Skorlama

Potansiyel ET ile ilişkili genler, Human Gene Mutation Database (HGMD) ve Human Phenotype Ontology (HPO) veritabanları kullanılarak tanımlanmıştır (522 gen) (**144**) (**Tablo 3-1**). Kodlayıcı bölgeler ve kırpılma bölgelerinde yer alan varyantlar, kalite ve nadirlik kriterlerine göre filtrelenmiştir (minör allel frekansı, MAF < %1); bu amaçla dbSNP, ClinVar (**145**) ve Genome Aggregation Database (gnomAD v4.1) (**146**) kullanılmıştır. Bağlamsal yorumlama için varyantlar daha sonra ACMG/AMP kriterlerine göre Franklin (Genoox) platformu kullanılarak önemi belirsiz varyant

Tablo 3-1. HGMD`de ET ilişkili varyantların genomik, fonksiyonel ve yolak temelli karakterizasyonu.

Gen	Kromozomal lokalizasyon	Transkript (RefSeq)	Veritabanında tanımlı varyant (HGMD)	Özelliği (HGMD)	dbSNP / HGMD	Literatür	Kalıtım tipi	Varyantın bulunduğu domain	KEGG, metabolik yolak analizi / (https://reactome.org/)
1. Konjenital esansiyel tremor									
SCN4A Sodium voltage-gated channel alpha subunit	17q23-q25.3	NM_000334.4	c.4679C>T Pro1560Leu, p.P1560L	DM	rs571210585, CM227414	Asif (2022) Am J Med Genet A 188, 1251	OD	Ion transport domain	L1CAM etkileşimi (R-HSA-373760.2)
2. Esansiyel Tremor									
SCN4A Sodium voltage-gated channel alpha subunit	17q23-q25.3	NM_000334.4	c.4609G>A Gly1537Ser, p.G1537S	DM	rs571210585, CM1513434	Bergareche (2015) Hum Mol Genet 24, 7111 Kars (2021) Proc Natl Acad Sci U S A 118: e2026076118	OD	Ion transport domain	L1CAM etkileşimi (R-HSA-373760.2)
HNRNPA2B1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	7p15	NM_031243.3	c.42+17T>C	DM?	CS1410961	Lorenzo-Betancor (2014) PLoS One 9, e111989 Analysis of nuclear export sequence regions of FUS-Related RNA-binding proteins in essential tremor.	OD		Amiyotrofik lateral skleroz mRNA denetimi ve taşınma faktörleri Spliceozom ilişkili proteinler Heterojen nükleer ribonükleoproteinler Eksozomal proteinler Şapkalı ve intron içeren pre-mRNA'nın işlenmesi (R-HSA-72203.4)
KARS1 Lysyl-tRNA synthetase 1	16q23.1	NM_001130089.2	c.1513C>T Arg505Cys, p.R505C	DM?	CM1913501	Odgerel (2019) PLoS One 14,	OR	Aminoacyl-tRNA synthetase, class II (D/K/N) Lysyl-tRNA synthetase, class II, C-terminal	Aminoaçil-tRNA biyosentezi tRNA aminoaçilasyon (R-HSA-379724.1) Selenoaminoasid biyosentezi (R-HSA-2408522.4)
SLIT3 Slit guidance ligand 3	5q35	NM_003062.4	c.3505G>C Val1169Leu, p.V1169L	DM?	CM1913505	Odgerel (2019) PLoS One 14,	OD	Concanavalin A-like lectin/glucanase domain Laminin G domain	Akson yönlendirme ROBO reseptörleri aracılı sinyal iletimi (R-HSA-376176.5)
KIF5A Kinesin family member 5A	12q13.13	NM_004984.4	c.2769G>A Arg923Arg, p.R923=	DM?	rs35225609, CM1913503	Odgerel (2019) PLoS One 14,	OD	Interaction with BICD2 region	Endositoz Dopaminerjik sinaps RHO GTPazları KTN1'i aktive eder (R-HSA-5625970.1) Kinezinler

									(R-HSA-983189.3) Golgi içi ve Golgi'den ER'ye retrograd taşınma (R-HSA-6811442.1)
CACNA1G Calcium voltage-gated channel subunit alpha1	17q22	NM_018896.5	c.1367G>A Arg456Gln, p.R456Q	DM?	CM1913511	Odgerel (2019) PLoS One 14,	OD		MAPK sinyal yolakları Kalsiyum sinyal yolakları Sirkadiyen ritim düzenlenmesi Aldosteron sentezi ve sekresyonu Kortizol sentezi ve sekresyonu GnRH sekresyonu Nöron uzantı gelişimi için NCAM sinyalizasyonu (R-HSA-375165.3)
CRK CRK proto-oncogene, adaptor protein	17p13.3	NM_016823.4	c.396G>A Glu132Glu, p.E132=	DM?	rs368739765, CM1913510	Odgerel (2019) PLoS One 14,		C-terminal SH3 domain	MAPK sinyal yolu ErbB sinyal yolu Rap1 sinyal yolu Kemokin sinyal yolu Fokal adezyon Fc gama reseptör aracılı fagositoz Nörotrofin sinyal yolu Aktin sitoskeletonunun düzenlenmesi İnsülin sinyal yolu Büyüme hormonu sentezi, sekresyonu ve etkisi PTK6 aracılı sinyal iletimi (R-HSA-8848021.2)
FUS FUS RNA binding protein	16p11.2	NM_004960.4	c.646C>T Arg216Cys, p.R216C	DM	rs267606832, CM101743	Merner (2012) Am J Hum Genet 91: 313 Essential tremor	OD		Şapkalı intron içeren pre-mRNA'nın işlenmesi (R-HSA-72203.4)
			c.868C>T Gln290Term, p.Q290*	DM	rs387907274, CM127155	Merner (2012) Am J Hum Genet 91, 313		zinc finger domain	
			c.1129C>T Arg377Trp, p.R377W	DM	rs766187715, CM141064	Rajput (2014) Eur J Neurol 21, 361		RNA recognition motif domain	
			c.1176G>A Met392Ile, p.M392I	DM	rs751937417, CM134176	Zheng (2013) Neurobiol Aging 34, 2078.e3		RNA recognition motif domain	

			c.1292C>T Pro431Leu, p.P431L	DM	rs186547381, CM127168	Merner (2012) Am J Hum Genet 91, 313		Zinc finger, RanBP2-type	
HTRA2 HtrA serine peptidase	2p12	NM_013247.5	c.1195G>A Gly399Ser, p.G399S	DM?	rs72470545, CM052355	Unal Gulsuner (2014) Proc Natl Acad Sci U S A 111: 18285 [Essential tremor]	OD/OR	PDZ domain	Apoptoz Nörodejenerasyon yolakları NOTCH3 aktivasyonu ve sinyalin çekirdeğe iletimi (R-HSA-9013507.1)
NOTCH2NLC Notch 2 N-terminal like C	1q21.2	NM_001364013.1	5' UTR (GGC)n repeat expansion normal 5-38 pathological 66-517	DM	CE1913903	Tian (2019) Am J Hum Genet 105, 166 Ng (2020) Ann Neurol 88: 614 PubMed: 32495371 NOTCH2NLC GGC Repeat Expansions Are Associated with Sporadic Essential Tremor: Variable Disease Expressivity on Long-Term Follow-up. Yau (2021) Mov Disord 36: 251 PubMed: 33026126 Low Prevalence of NOTCH2NLC GGC Repeat Expansion in White Patients with Movement Disorders. Chen (2020) Clin Genet 98: 274 PubMed: 32602554 Phenotypic bases of NOTCH2NLC GGC expansion positive neuronal intranuclear inclusion disease in a Southeast Asian cohort.	Neuronal intranuclear inclusion disease-related disorder		

3. Sporadik Esansiyel Tremor									
EWSR1 EWS RNA binding protein	22q12.2	NM_001163285.2	c.1408C>T Arg470Cys, p.R470C	DM?	rs138287627, CM1410960	Lorenzo-Betancor (2014) PLoS One 9, e111989		RNA recognition motif domain; RNA recognition motif domain	Kanserde transkripsiyonel düzensizlik XBP1(S) şaperon genlerini aktive eder (R-HSA-381038.3) FOXO aracılı oksidatif stres, metabolik ve nöronal genlerin transkripsiyonu (R-HSA-9615017.1)

ntrk1tv3 Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1, transcript variant 3	1q21-q22	NM_001007792.1	c.122+2627T>C IVS2 ds T-C +2627	DM?	CS1913506	Odgerel (2019) PLoS One 14,			
MATK Megakaryocyte-associated tyrosine kinase	19p13.3	NM_002378.4	c.76-1420T>C IVS2 as T-C -1420	DM?	rs999228433, CS1913509	Odgerel (2019) PLoS One 14,			Nörotrofin sinyal yolu ERBB2 aracılı sinyal iletimi (R-HSA-1227986.8)
TENM4 Teneurin transmembrane protein 4	11q14.1	NM_001098816.3	c.158G>C Arg53Pro, p.R53P	DM	rs760852624, CM1511326	Hor (2015) Hum Mol Genet 24, 5677	OD	Teneurin intracellular, N-terminal	Nef ve sinyal iletimi (R-HSA-164944.3)
			c.1421C>A Ala474Asp, p.A474D	DM	CM1511327				
			c.1553G>A Arg518Gln, p.R518Q	DM	rs201191369, CM1511328				
			c.3053G>A Arg1018His, p.R1018H	DM	rs748691958, CM1511329				
			c.3382G>A Val1128Met, p.V1128M	DM	rs556858741, CM1511330				
			c.3412G>A Val1138Met, p.V1138M	DM	rs538881762, CM1511331				
			c.4100C>A Thr1367Asn, p.T1367N	DM	rs763485258, CM1511332			Six-bladed beta-propeller, TolB-like	
			c.4324G>A Ala1442Thr, p.A1442T	DM	rs375681722, CM1511333			Six-bladed beta-propeller, TolB-like	
			c.4603A>C Lys1535Gln, p.K1535Q	DM	rs770111861, CM1511334			Six-bladed beta-propeller, TolB-like	
			c.4895G>A Arg1632His, p.R1632H	DM	rs199687168, CM1511335			Six-bladed beta-propeller, TolB-like	
			c.5287G>A Gly1763Arg, p.G1763R	DM	rs201995608, CM1511336			Six-bladed beta-propeller, TolB-like	
			c.7353G>A	DM	rs201769315,			Rhs repeat-	

			Met2451Ile, p.M2451I		CM1511337			associated core	
			c.7654C>T Gln2552Term , p.Q2552*	DM	CM172092	Houle (2017) Mov Disord 32, 292			

DRD3 Dopamine receptor D3	3q13.3	NM_000796.6	c.25A>G Ser9Gly, p.S9G	DFP	rs6280, CM033372	Garc?a-Mart?n (2009) Mov Disord 24: 1910 PubMed: 19645064 Dopamine receptor D3 (DRD3) genotype and allelic variants and risk for essential tremor. Jeanneteau (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103: 10753 PubMed: 16809426 A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor.	OD		Dopaminerjik sinaps G alfa (i) aracılı sinyal iletimi olayları (R-HSA-418594.7) Sınıf A/1 (Rodopsin benzeri reseptörler) (R-HSA-373076.8)
TUB Tubby bipartite transcription factor	11p15.5	NM_003320.5	c.58A>T Ile20Phe, p.I20F	DM?	rs1241709665, CM2013839	Sailani (2020) PLoS Genet 16, e1009010			Proksimal tübülde bikarbonat geri emilimi
			c.146G>A Arg49Gln, p.R49Q	DM?	rs55648406, CM2013838	Sailani (2020) PLoS Genet 16, e1009010		Tubby, N-terminal	
			c.1291G>A Val431Ile, p.V431I	DM?	rs75594955, CM2013837	Sailani (2020) PLoS Genet 16, e1009010		Tubby C-terminal-like domain Tubby, C-terminal	
			c.1543G>C Gly515Arg, p.G515R	DM?	CM2013840	Sailani (2020) PLoS Genet 16, e1009010		Tubby C-terminal-like domain Tubby, C-terminal	
DNAJC13 DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13	3q22.1	NM_015268.4	c.2564A>G Asn855Ser, p.N855S	DM?	rs387907571, CM141862	Rajput (2015) Eur J Hum Genet 23: 887 [Essential tremor)		Armadillo-like helical ↑↓ Armadillo-type fold	Şaperonlar ve katlanma katalizörleri [BR:ko03110] Isı şok proteinleri Nötrofil degranülasyonu (R-HSA-6798695.2)

4. Esansiyel Tremor, ilişkili genler (assossiasyon çalışmaları)									
TREM2 Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	6p21.1	NM_018965.4	c.140G>A Arg47His, p.R47H	DFP	rs75932628, CM132582	Ortega-Cubero (2015) Parkinsonism Relat Disord 21: 306 PubMed: 25585992 TREM2 R47H variant and risk of essential tremor: a cross-sectional international multicenter study. Additional phenotype ✓ Essential tremor, association with	OD/OR	Immunoglobulin V-set domain ⇅ Immunoglobulin-like domain Immunoglobulin-like fold	Osteoklast farklılaşması DAP12 etkileşimleri (R-HSA-2172127.1)
LRRK2 Leucine rich repeat kinase	12q12	NM_198578.4	c.4883G>C Arg1628Pro, p.R1628P	DFP	rs33949390, CM084928	Chao (2015) Sci Rep 5: 9029 PubMed: 25761573 Lrrk2 R1628P variant is a risk factor for essential tremor. Additional phenotype ✓ Essential tremor, association with	OD	C-terminal of Roc (COR) domain	Nörodejenerasyon yolakları PTK6 aracılı sinyal iletimi (R-HSA-8848021.2)
HS1BP3 HCLS1 binding protein 3	2p24.1	NM not yet	Ala265Gly Not yet available Not yet available	DP	rs11680709, CM051235	Higgins (2005) Neurology 64, 417 Higgins (2006) Mov Disord 21: 306			Kaspaz aracılı sitoskeletal proteinlerin parçalanması (R-HSA-264870.1)
HNMT Histamine N-methyltransferase	2q22.1	NM_006895.3	c.314C>T Thr105Ile, p.T105I	DFP	rs11558538, CM983499	Ledesma (2008) Neuromolecular Med 10: 356 PubMed: 18543121 The nonsynonymous Thr105Ile polymorphism of the histamine N-methyltransferase is associated to the risk of developing essential tremor. Additional phenotype ✓ Essential tremor, association with; Thr allele	OD	S-adenosyl -L-methionine-dependent methyltransferase	Histidin metabolizması Selenosistein aminoasit metabolizması R-HSA-2408522.4) Histidin katabolizması (R-HSA-70921.3)
4. Esansiyel Tremor, erken başlangıçlı									
NOS3 Nitric oxide synthase 3	7q36	NM_000603.5	c.46G>A Gly16Ser, p.G16S	DM	rs368332097, CM167059	Liu (2016) Eur J Hum Genet 24, 1009	OD		Arjinin biyosentezi Arjinin ve prolin metabolizması Fagositlerde ROS ve RNS üretimi (R-HSA-1222556.9) Nitrik oksit metabolizması: NOS3 aktivasyonu ve düzenlenmesi (R-HSA-202131.4)
			c.164C>T Pro55Leu, p.P55L	DM	rs374957936, CM167060	Liu (2016) Eur J Hum Genet 24, 1009			
HAPLN4 Hyaluronan and	19p13.1	NM_023002.3	c.1048G>C Gly350Arg,	DM?	rs781390304,	Liu (2016) Eur J Hum Genet 24, 1009		C-type lectin-like/link domain	

proteoglycan link protein 4			p.G350R		CM167065			Link domain	
USP46 Ubiquitin specific peptidase 46	4q12	NM_022832.4	c.398C>T Ala133Val, p.A133V	DM?	rs759572548, CM167063	Liu (2016) Eur J Hum Genet 24, 1009		Peptidase C19, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase Ubiquitin specific protease domain	PCNA içeren replikasyon kompleksi tarafından DNA hasarının tanınması (R-HSA-110314.3)
KCNS2 Potassium voltage-gated channel modifier subfamily S member 2	8q22	NM_020697.4	c.1137T>A Asp379Glu, p.D379E	DM	CM167061	Liu (2016) Eur J Hum Genet 24, 1009		Ion transport domain	Potasyum kanalları (R-HSA-1296071.2)

(VUS), olası patojenik (LP) veya patojenik (P) olarak sınıflandırılmıştır (**147,148**). Ek aday varyantların belirlenmesi amacıyla, UniProt tarafından tanımlanan protein domainleri içeren genleri hedefleyen bir ters tarama (*reverse screening*) stratejisi uygulanmıştır (https://www.uniprot.org) (**149**). *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) veri tabanı ise yolak analizleri için kullanılmıştır (**150**). Genetik varyantların fonksiyonel etkisini değerlendirmek ve genlerin belirli varyant türlerine karşı toleransını incelemek amacıyla gnomAD (versiyon 41.0) ve University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser kaynaklı kısıtlılık (constraint) metrikleri kullanılmıştır. Bu metrikler arasında *loss-of-function* intolerans olasılığı (pLI), gözlenen/beklenen (o/e) oranı ve *loss-of-function* (LoF, fonksiyon kaybı), yanlış anlamlı ve sessiz varyantlar için Z skorları yer almaktadır. Bu metrikler, varyant düzeyindeki anotasyonlarla birlikte değerlendirilmiştir. Bu anotasyonlar arasında *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD v1.7), *Rare Exome Variant Ensemble Learner* (REVEL) ve *Splice Artificial Intelligence* (SpliceAI) yer almaktadır ve bu sayede patojenitenin kapsamlı bir değerlendirmesi yapılmıştır. pLI skoru (0–1 aralığında), bir genin heterozigot *loss-of-function* varyantlarına karşı intolerans olasılığını tahmin eder. pLI ≥ 0.9 yüksek intoleransı gösterir ve çoğunlukla dominant hastalıklarla ilişkilidir; pLI ≤ 0.1 ise genin bu varyantlara toleranslı olduğunu gösterir. o/e oranı, gözlenen varyant sayısının beklenen varyant sayısına oranını karşılaştırır ve LoF, yanlış anlamlı ve sessiz varyantlar için ayrı ayrı raporlanır. 0.35'ten küçük değerler güçlü bir kısıtlılığı, 1'e yakın değerler ise toleransı gösterir. Yanlış anlamlı ve sessiz varyantlar için Z skorları, bu varyant tipleri üzerindeki seçilim baskısını yansıtır; Z > 3.09 güçlü bir kısıtlılığa ve beklenenden daha az varyant gözlenmesine işaret eder.

Tek nükleotid varyantları (SNV) ve küçük indel varyantlarının patojenitesini değerlendirmek için CADD skoru kullanılmıştır (**151,152**). CADD skorları PHRED-benzeri bir ölçekte (1–99) ifade edilir. Genellikle 10–20 arası skorlar VUS, 20'den büyük skorlar olası zararlı varyantlar, 30'un üzerindeki skorlar ise güçlü patojenite ile ilişkilidir. Yanlış anlamlı varyantların değerlendirilmesinde REVEL skoru kullanılmıştır. REVEL, SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, LRT, PROVEAN, VEST, MetaSVM, MetaLR, GERP++, phastCons ve phyloP (filogenetik p-değerleri) dahil olmak üzere 13 farklı aracın tahminlerini

birleştirir ve 0–1 aralığında bir skor üretir; >0.5 skorlar olası patojenik (LP) olarak değerlendirilmiştir.

Varyant frekans verileri, Franklin platformu üzerinden sağlanmış olup, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden 3.362 bireyi içeren Turkish Variome veritabanına dayanmaktadır; bu veri seti 2.589 ekzom ve 773 genom verisini kapsamaktadır. Ayrıca gnomAD (Max), varyantlar için maksimum alt popülasyon frekansını (ekzom ve genom verilerinin birleşimi) sağlar ve güvenilir frekans tahminleri için en az 2.000 allel eşik değeri kullanılır (**153**).

Korunum analizleri için UCSC *Genome Browser* üzerinden elde edilen ve 100 farklı türün genomlarının çoklu dizi hizalanmasına dayanan PhyloP100way skorları kullanılmıştır (**154**). Bu skorlar, her nükleotid pozisyonundaki evrimsel kısıtlılığı ölçer. Yüksek pozitif değerler (örn. >2) güçlü evrimsel korunumu gösterir ve genellikle fonksiyonel açıdan önemli bölgelerde bulunduğunu düşündürür. Buna karşılık düşük veya negatif değerler, daha düşük kısıtlılık veya hızlanmış evrime işaret eder. Bununla birlikte, negatif skorlar fonksiyonel önemsizlik olarak yorumlanmamalıdır; çünkü bazı düzenleyici elementler adaptif süreçler nedeniyle hızlı evrimleşebilir ancak yine de biyolojik olarak önemli olabilir.

İntronik ve sessiz varyantlar, varyantların RNA splicing üzerindeki potansiyel etkisini tahmin etmek amacıyla SpliceAI aracı kullanılarak değerlendirilmiştir (UCSC *Genome Browser* entegrasyonu). Bu skorlama sisteminde yüksek delta skorları (≥0.5) varyantın splicing üzerinde önemli bir etkisi olabileceğini, düşük skorlar (<0.2) anlamlı bir etki olmadığını, ara skorlar (0.2–0.5) ise ek verilerle değerlendirilmesi gereken belirsiz etkileri ifade eder. Dokuya özgü gen ekspresyon düzeyleri GTEx *Consortium* atlası kullanılarak çapraz olarak değerlendirilmiştir (**155**).

3.2.4. Saptanan Varyantların Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulanması

ED ve TGD analizleri sonucunda belirlenen her bir aday varyant için gene özgü ileri ve geri primerler tasarlandı. Bu primerler, belirlenen varyantı kapsayacak şekilde ve NCBI/HGMD veritabanında belirlenen kanonikal transkriptin 'NM' koduna dayanarak gerçekleştirildi. Primerlerin uzunluklarının 17-25 nükleotid arasında olması, AT ve C-G nükleotid dağılımlarının dengeli olması, primer çiftinin DNA'ya bağlanma sıcaklıklarının birbirine yakın olması, oligonükleotidlerin tekrar eden dizi bölgesinde bulunmaması ve herhangi bir polimorfizm içermemesi ve eğer içeriyorsa,

polimorfizmin toplum sıklığının %1'in altında olması gerektiği dikkate alındı. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları, dizi uzunlukları ve spesifiklikleri, USCS Genome Browser'ın *in silico* PZR aracı ve NIH Primer-BLAST ile kontrol edildi (**156**). Çalışma kapsamında kullanılan primer çiftlerinin listesi **Tablo 3-2**'de verilmiştir.

Tablo 3-2. Primer dizileri.

Aile no	Gen sembolü	NM kodu	Bölge	Primer F/R	Fragman boyutu (bç)	Tm (ºC)
ET01	*USP40*	NM_001365479.2	Ekzon 18	5'-TTCCAGTGGGCAAAAACTACT-3' 5'-GTCCATTTTGGGTGGTAGGT-3'	420	58 58
	PLA2G3	NM_NM_015715.5	İntron 4	5'-GCCAGAAAGAAGGGATGCT -3' 5'-CAGGAGAGGACATGCAGGA- 3'	381	57 59
	CSF1R	NM_001288705.3	Ekzon 11	5'-CAGGCTTGGAGAAGGGAA-3' 5'-CGCACACAGGTCCCTTAAGT-3'	474	56 59
ET02	*DNAJC10*	NM_018981.4	Ekzon 16	5'-GGGAAGGTTTGCCGCTAA-3' 5'-AAACAGCCAAAAGGTCTTCATTT-3'	390	58 58
ET03	*DNAJC13*	NM_015268.4	Ekzon 7-8	5'-GCCGTTCAGTGAGTTAGTTGC-3' 5'-GTCCATTCCATATTCTTTAGCCA-3'	450	60 58
ET04	*GABRR2*	NM_002043.5	Ekzon 6	5'-CGCCAGCGTTAAGACCTAT-3' 5'-CTGGGGTTAAGGCTGAAGA-3'	360	57 57
	FTL	NM_000146.4	Ekzon 2	5'-CTTCTTTGTGCGGTCGGGTA-3' 5'-CAAGACCGAACTCAATCTCCCA-3'	310	59 58
ET05	*TENM4*	NM_001098816.2	Ekzon 29	5'-GCAGAGCACAGCAAAACCAT-3' 5'-TGCTTTCCTGTTCTTGGGC-3'	340	57 57
	ABCG4	NM_022169.5	Ekzon 6	5'-CTTTTTGAAGCTGGGGTG-3' 5'-CAGGAGGCTGTGAACAGAG-3'	331	54 59
ET06	*DRD3*	NM_000796.5	Ekzon 3	5'-CAACGGTACACAGGGAGTAGG-3' 5'-GGTCGTTATTTCCCACCTGT-3'	380	60 57
	ATP1A4	NM_144699.4	Ekzon 12	5'-CAAGGATGTTGGGGTAAGCA-3' 5'-CAAGGAAACAGAAATCCGCT-3'	370	57 55
ET07	*PSEN2*	NM_000447.3	Ekzon 8	5'-GTCGGGGAAGGAAATGTTAGT-3' 5'-CTAGACCACCAGGAGTGTTCC-3'	410	58 62
ET08	*TENM4*	NM_001098816.2	Ekzon 30	5'-TTTAAAGTCCCCTCCACCG-3' 5'-TCAAGAACAGAGCCCCGTTC-3'	370	57 59
ET09	*TRPC3*	NM_001130692.2	Ekzon 6	5'-TACTGTGCTTGACGTGTAGGG-3' 5'-TTTCTTCCACCTTGCAATATTGTCT-3'	430	60 58
ET10	*CAPN6*	NM_014289.4	Ekzon 6	5'-GTTTCAAGTTGGGTGTCAGGA-3' 5'-GCACACTAGCAGTCTGGAGG-3'	395	58 61
	KCNH8	NM_144633.3	Ekzon 16	5'-CCGAAAGAAATATCACTTCCCT-3' 5'-CATGAGCTCCAGTTCGTTGT-3'	410	57 57
ET11	*ABCA13*	NM_152701.5	Ekzon 52	5'-TGCATTTTCAGGGATTCACC-3' 5'-TCGTCAATTGTTGCTAAGCC-3'	360	55 55
ET12	*LRRK2*	NM_198578.3	Ekzon 41	5'-TAAGGGACAAAGTGAGCACAGAAT-3' 5'-ACCTCTGTTCACAATGTGATAGAC-3'	440	59 59
ET13	*PINK1*	NM_032409.3	Ekzon 4	5'-GTACAGTACCTGGCACATAGC-3' 5'-GCAAAGTTAGGGGATACAGAG-3'	370	60 58
ET14	*TENM4*	NM_001098816.2	Ekzon 32	5'-TGCAGTATCCCGTGACACTC-3' 5'-CGGAAGATCTGTCGGTCAA3'	400	59 57
ET15	*LRRC3*	NM_030891.6	Ekzon 2	5'-TGGATAAGGCCTTGCCTGC-3' 5'-GGTGGGAGATCTTGTTGGCAT-3'	380	59 60

	TMEM230	NM_001330987	Ekzon 4	5'-GTACAGTACCTGGCACATAGC-3' 5'-GCAAAGTTAGGGGATACAGAG-3'	362	60 58
ET16	*GABBR1*	NM_001470.4	Ekzon 17	5'-GTCCTGCTCACATTTTCG-3' 5'-CTGGATAAATATGTGGGGAGA-3'	355	54 56
	VPS16	NM_022575.4	Ekzon 14	5'-CTCTCCTATCGCCCTCTGG-3' 5'-CTGGTAGACCCGGTGGGT-3'	422	61 61
ET17	*USP31*	NM_020718.4	Ekzon 16	5'-TCAAAGCCACACAGGGACTC-3' 5'-ACCTTGTCATCTGCTGCCTC-3'	396	59 59
ET18	*GABRP*	NM_014211.3	Ekzon 9	5'-TCAAATGGGGACACTCTGCC-3' 5'-GAGCACAGGGAATCACTGCG-3'	368	59 61
	ADCY5	NM_183357.3	Ekzon 13	5'-CATGCTGGGGAGAGACACAG-3' 5'-GCCAAAGCTGATCCCAGAC-3'	412	61 59
ET19	*HTRA2*	NM_013247	Ekzon 1	5'-GTCCTACTGTCCGCCTGC T-3' 5'-CCTGTGGCTTCAGTGCCT-3'	623	60 60
	GCH1	NM_001024024	Ekzon 6	5'-CCAGCAGCTGTCTACTCCT-3' 5'-GTACAAACAAGACCGGACAGA-3'	253	56 58

Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları olgulara ait DNA örnekleri ve tasarlanan primerler ile termal döngü cihazında gerçekleştirildi. Her bir PZR reaksiyonu için, 2.0 mM MgCl2 (Thermo Scientific), 1X tampon solüsyonu [10X (NH4)2SO4] (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Coorporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0.1-0.2 µM ileri ve geri primerler (Sentebiolab), 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve 150-200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, distile su (dH20) ile 25 µl son hacme tamamlanarak hazırlandı. Tüm işlemler soğuk blokta yapıldı. Her PZR çalışmasında, amplifiye edilen her bölge, DNA içermeyen negatif kontrol PZR ile birlikte, **Tablo 3-3**'deki PZR döngü koşullarına uygun olarak termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) çalıştırıldı.

Tablo 3-3. PZR döngü koşulları.

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	94°C	5 dakika	x1 döngü
Denatürasyon	94°C	30 saniye	
Bağlanma	Primer bağlanma sıcaklığı	30 saniye	
Uzama	72°C	45-90 saniye	x10 döngü
Denatürasyon	94°C	30 saniye	
Bağlanma	Primer bağlanma sıcaklığı	30 saniye	
Uzama	72°C	45-90 saniye	x25-30 döngü
Uzama	72°C	10 dakika	x1 döngü
Bekleme	4°C	1 saat	x1 döngü
Duraklama	10°C	∞	x1 döngü

PZR ile çoğaltılan gen bölgelerinin hedeflenen bölge olup olmadığının ve deneyin kontaminasyon durumunun kontrolü için 5 µl PZR ürünü ve 2 µl Gel Red boyası karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi. 50 baz çiftlik merdiven markörü (Sigma) eşliğinde, 1X TBE tamponunda %1,2 agaroz (Sigma) jelde, 160 Voltta 30 dakika süreyle PZR ürünleri baz çifti boyutlarına göre ayrıştırıldı. Elektroforez işlemi sonrasında, bantlar UV ışık altında görüntülendi ve kaydedildi.

PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu: PZR ürünlerinin özgünlüğü onaylandıktan sonra, saflaştırma işlemi için enzimatik yöntem uygulandı. Bu işlemde Ekzonükleaz-I (Lot:00716871-Thermo Scientific) ve Rapid Alkalin Fosfataz (04898141001-Roche) enzimleri kullanıldı. Saflaştırma işlemi, termal döngü cihazında belirli bir protokol izlenerek gerçekleştirildi: öncelikle 37°C'de 30 dakika, ardından 85°C'de 15 dakika süreyle işlem yapıldı. Saflaştırılan ürünler, sonraki işlemler için +4°C'de muhafaza edildi.

Dizi PZR Çalışması: PZR için gereken kimyasalları içeren 5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer, ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içeren BigDye v3.1, tek yönlü primer, saflaştırılmış PZR ürünleri ve distile su (dH2O) kullanılarak, son hacmi 10µl olacak şekilde bir karışım oluşturuldu. Bu karışım, her bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde, 96 örneklik MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate üzerine yerleştirildi. Daha sonra, **Tablo 3-4**'de belirtilen PZR döngü koşullarına uygun olarak termal döngü cihazında işlem yapıldı.

Tablo 3-4. Dizi PZR döngü koşulları.

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	96°C	10 saniye	
Bağlanma	50°C	5 saniye	
Uzama	60°C	4 dakika	x25
Sonlanma	4°C	∞	x1

Dizi PZR Ürünlerinin Saflaştırılması: Dizi PZR işlemi tamamlandıktan sonra, ürünler sıcaklık değeri 4°C'ye gelen cihazdan çıkarıldı. Dizi PZR ürünleri, primerler ve diğer reaktiflerin uzaklaştırılması için alkol çöktürme yöntemi kullanılarak saflaştırıldı. Ürünlerin üzerine her bir kuyucuğa 1 µl 125 mM EDTA, 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklenerek karıştırıldı. Plate, alüminyum koruyucu bant ile kapatıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından, 3810 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj

edildi. Daha sonra koruyucu bant çıkarıldı ve plate ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 saniye süreyle kısa bir santrifüj işlemi uygulandı. Sonrasında, her bir kuyucuğa 35 µl %70 soğuk etanol eklenerek, koruyucu bantla tekrar kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Ardından, koruyucu bant tekrar çıkarıldı ve plate ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 saniye süreyle kısa bir santrifüj işlemi daha uygulandı. Son olarak, her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklenerek, örnekler termal döngü cihazında 97°C'de beş dakika süreyle denatüre edildi ve ardından iki dakika soğuk blok üzerinde bekletildi.

Elektroforez Cihazına Yükleme ve Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Saflaştırılan ürünlerin dizilenmesi, ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforez cihazı (Applied Biosystem) kullanılarak yapıldı. Plate, ABI3500 cihazına yerleştirildi ve yürütme işlemi başlatıldı. Bu işlemde, daha önce kalibre edilmiş olan Dyeset adlı dizileme boya seti kullanıldı. Ön yürütme voltajı 15 kV, yürütme voltajı 13,4 kV ve injeksiyon voltajı 1,6 kV olarak belirlendi. Ön yürütme süresi 180 saniye, yürütme süresi 2.520 saniye, injeksiyon zamanı 8 saniye ve veri gecikmesi (data delay) 250 saniye olarak ayarlandı. Bu ayarlara göre ürünler yürütüldü. Kapiller elektroforez sonucunda elde edilen ham veriler, ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v3.0 programları kullanılarak analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında, analize başlamadan önce referans dizi programa yüklendi ve transkriptin ekzonik ve intronik bölgeleri programa tanıtıldı. Daha sonra, fasta formatında ilgili genomik bölgenin dizisi programa eklendi. Dizinin hedef gen bölgesindeki konumu, kullanılan primerin doğru yönde olup olmadığı, dizilenmiş baz sayısı, saflaştırma kalitesi, pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka plan kirliliği incelendi. Bu değerlendirmeler sırasında beklenen sonuçlar elde edilemediğinde, dizileme protokolü PZR aşamasından itibaren veya yeterli örnek mevcutsa saflaştırma aşamasından itibaren tekrar uygulandı. Elde edilen sonuçlar, NGS verileri ile birlikte yorumlandı.

3.2.5. *Triplet Repeat-Primed* PZR (TP-PCR)

Çalışmanın sonraki aşamasında, ilişkili klinik fenotip ile bağlantılı olduğu bilinen *NOTCH2NLC* ve *GIPC1* genlerinde bulunan tekrar artışları içeren bölgelerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu tekrar dizisi bölgelerinin analizi için genlere özgü fragman analizi ve triplet repeat-primed PZR (TP-PCR) testleri *in house* tasarlanmış, optimize edilmiş ve uygulanmıştır. Tekrar dizi testleri, belirli bölgeleri hedef alacak

şekilde gerçekleştirilmiştir: *GIPC1* geninin (NM_005716.4) 5′ UTR bölgesinde yer alan (GGC) tekrar dizisi ve *NOTCH2NLC* geninin (NM_001364013.2) ekzon 1 kodlayıcı bölgesinde bulunan (GGC) tekrar dizisi analiz edilmiştir.

Fragman analizi için, ilgili tekrar bölgelerini çevreleyen primer çiftleri tasarlanmış olup primerlerden biri FAM ile işaretlenmiştir. Triplet repeat-primed PZR (TP-PCR) için ise özel bir primer seti kullanılmıştır. Bu set üç primerden oluşmaktadır: Fragman analizinde kullanılan aynı FAM-işaretli primer, tekrar bölgesi ile 4–5 tekrar ünitesi kadar örtüşecek şekilde tasarlanmış ve insan genomunun herhangi bir bölgesi ile homolog olmayan benzersiz bir kuyruk (*tail*) dizisi içeren ikinci primer, FAM-işaretli primer ile *tail* dizisi arasında amplifikasyonu kolaylaştırmak amacıyla bu benzersiz *tail* dizisini hedefleyen üçüncü primer (**Tablo 3-5**). Fragman PZR reaksiyonu toplam 25 µL hacimde gerçekleştirilmiş olup reaksiyon karışımı; her bir primerden 0.2 µM, 0.2 mM dNTP karışımı, 2 mM $MgCl_2$, %10 DMSO, $(NH_4)_2SO_4$ içeren 1× tampon, 0.1 U Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve nükleaz içermeyen su içermektedir. Reaksiyona ayrıca 50–100 ng genomik DNA eklenmiştir. Analiz sırasında arka plan sinyalini ortadan kaldırmak amacıyla tüm reaksiyonlar şablon içermeyen kontrol (no-template control) ile paralel olarak yürütülmüştür. Termal döngü koşulları iki aşamadan oluşmuştur: başlangıçta 60 °C bağlanma sıcaklığında 10 döngü, ardından 58 °C'de 30 döngü, her döngü için 1 dakikalık uzama süresi uygulanmıştır. TP-PZR koşulları fragman PZR koşullarına benzer olup, ileri ve geri primerler 0.5 µM, tail primeri ise 0.05 µM konsantrasyonda kullanılmıştır. 0.2 mM dNTP karışımına ek olarak, dGTP yerine 7-deaza-dGTP içeren modifiye dNTP karışımından 0.05 mM ilave edilmiştir. Termal döngü protokolü iki aşamadan oluşmuştur: ilk aşamada 62 °C bağlanma sıcaklığında 10 döngü, ardından 68 °C'de 4 dakika uzama uygulanmıştır. İkinci aşamada ise 20 ek döngü gerçekleştirilmiş ve 68 °C'deki uzama süresi her döngüde 20 saniye artırılmıştır. Elde edilen tüm amplifikasyon ürünleri ABI 3500 Genetic Analyzer cihazında Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. İç boyut standartları olarak LIZ 500 veya ROX 1000 kullanılmış ve veriler GeneMapper yazılımı ile yorumlanmıştır.

Tablo 3-5. Fragman analizi ve TP-PZR için kullanılan primer çiftlerinin dizileri**.**

Fragman spesifik PZR	
GIPC1	
GIPC1-FRAGMAN F1	5'-GAAGACGCGGATTGGCTGCGAGC-3'
FAM-GIPC1-FRAGMAN-R1	5'-CAGACACATCCTTCTCGCAGAGGCCAC-3'
NOTCH2NLC	
FAM-NOTCH2NLC-FRAGMAN-F1	5'-AGGCATTTGCGCCTGTGCTTCGGAC-3'
NOTCH2NLC-FRAGMAN-R1	5'-AGCAGCGCCCACAGCAGAGCGG-3'
TP-PZR	
GIPC1	
FAM-GIPC1-TP-R1	5'-CAGACACATCCTTCTCGCAGAGGCCAC-3'
GIPC1-TP-F1	5'-CGTACGCATCCCAGTTTGAGACG $(GGC)_3$-3'
UNIQUE-R1	5'-CGTACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'
NOTCH2NLC	
FAM-NOTCH2NLC-TP-F1	5'-AGGCATTTGCGCCTGTGCTTCGGAC-3'
NOTCH2NLC-TP-R1	5'-ACGCATCCCAGTTTGAGACG $(GCC)_5$-3'
NOTCH2NLC - TP-R2	5'-ACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Kohort Özellikleri: Bu çalışmada tanımlanan tüm klinik bulgular **Tablo 4-1**'de özetlenmiştir. İndeks kohort, 14 kadın (%70) ve 6 erkekten (%30) oluşmaktadır. Hastalık başlangıç yaşı ortalama 36.8 ± 21.8 yıl (aralık, 7–67 yıl) olup, median hastalık süresi 15 yıl (aralık, 5–55 yıl) olarak hesaplanmıştır. Hareket Bozuklukları Derneği (Movement Disorders Society) kriterlerine göre bir hasta ET-plus (ET-01), iki hasta baskın titübasyon ile seyreden ET (ET-04, ET-16) ve geri kalan 17 hasta klasik ET olarak sınıflandırılmıştır.

Tremorun Dağılımı ve Motor Özellikler: Olguların büyük çoğunluğunda aksiyon/postür tremoru üst ekstremitelerde mevcuttu. Özellikle, 20 hastanın 17'sinde (%85) kollarında belirgin aksiyon veya postür tremoru saptandı (ET – 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Bu 17 olgunun sekizinde tremor yalnızca tek elde (çoğunlukla sağ elde) başlayıp zamanla ilerlerken (ET – 02, 05, 06, 07, 08, 10, 15, 16), diğer dokuzunda başlangıçtan itibaren bilateral (iki taraflı) postüral ve / ve ya kinetik tremor mevcuttu (ET – 03, 09, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20). Sadece üç olguda (%15) üst ekstremite tremoru saptanmadı (ET – 01, 04, 12); bu olgular tremoru esas olarak kraniyal bölgede (baş ve/veya ses) gösteren atipik presentasyonlardı. Başka bir deyişle, üç hastada tremor izole olarak baş ve/veya seste görülmüş, kollar etkilenmemiştir. Genel olarak baş tremoru altı hastada (%30) görülmüştür (ET – 04, 09, 11, 12, 13, 16). Baş tremoru saptanan tüm olgular kadın hastalardı ve bunların çoğunda tremor geç menopoz sonrası dönemde başlamıştı. Bu bulgu, literatürde kadın ET hastalarında kraniyal tremor görülme riskinin daha yüksek olduğuna dair verilerle uyumludur. Ses tremoru üç olguda (%15) (ET –12, 13, 16) mevcuttu ve bu olguların hepsinde aynı zamanda baş tremoru da bulunmaktaydı (*ses tremoru, ET'de genellikle baş tremoru ile birlikte ortaya çıkmaktadır*). Alt ekstremite tremoru ise nadir olup, sadece üç hastada (%15) hafif derecede saptanmıştır (ET –01, 17, 20). Bacak tremoru görülen olgularda da asıl yakınma üst ekstremite veya baş tremoru olup, bacak tutuluşu hafif ve ikincil önemdedir (*literatürde alt ekstremite tremorunun ET'de genellikle hafif seyrettiğine dair bilgiyle uyumludur*).

Tremor Parametreleri: Tremor başlangıcı genellikle asimetrik idi. Olguların 15'inde (%75) tremor tek taraflı başlangıç gösterdi (ET – 01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20); bunların büyük kısmında başlangıç sağ elde (%70) olup üç olguda sol elde başlangıç saptandı (ET –03, 11, 14). Yalnızca bir olgu, tremorun başlangıçtan itibaren bilateral olduğunu (unilateral başlangıç yok) belirtti (ET-20). Tremor şiddetine ilişkin öznel değerlendirmede, verisi mevcut olan hastaların çoğunun tremoru düşük-orta amplitüdlü olarak tanımlandı; altı olgu "düşük amplitüd", 11 olgu "orta amplitüd" tremora sahipti. Alkole karşı tremorda düzelme olup olmadığı sorgulandığında, iki hasta alkol alımının tremoru belirgin azalttığını belirtirken (ET – 02, 03), diğer olgularda belirgin bir yanıt öyküsü olup olmadığı belirlenemedi.

Eşlik Eden Nörolojik Bulgular: Tüm hastalarda sistematik nörolojik muayene yapıldı. Serebellar disfonksiyon bulgusu (*dismetri, aşırı veya rebound fenomeni gibi*) veya belirgin bilişsel bozukluk hiçbir olguda saptanmadı. Yani ET olgularında ataksi bulguları yoktu ve mental durum normal sınırlardaydı. Non-motor semptomlardan depresyon veya anksiyete bozukluğu ya da işitme kaybı gibi bir bulgu da hastaların özgeçmişinde belirgin olarak belirtilmedi; bu açıdan ET olgularımızın çoğu non-motor belirtiler yönünden nörolojik olarak sağlıklıydı.

Ek Bulgular: Bazı hastalarda ET tanısını ek bulgular tespit edildi. Altı hastada (%30) muayenede istirahat tremoru ve/veya hafif rijidite gibi parkinsonizm bulguları mevcuttu (ET – 01, 11, 15, 17, 18, 20). Bu olguların beşi klinik olarak yine de ET tanısı altında takip edilirken, bir olgu eşlik eden belirti ve bulguları nedeniyle ET-plus kategorisinde değerlendirildi (ET-01). Unilateral (tek taraflı) tremor başlangıcı yukarıda belirtildiği gibi yaygın olmakla birlikte, bu altı olgudan beşindee tremor zamanla karşı tarafta da ortaya çıkmış ancak istirahat halinde de tremor veya hafif sertlik gibi Parkinson hastalığını andıran bulgular gelişmişti. Bu durum, literatürde ET hastalarının bir alt grubunda istirahat tremoru gibi "soft" parkinsonizm bulguların görülebileceğinin belirtilmesiyle uyumludur. Bu tür olgular, ET-plus olarak adlandırılmakta ve klasik ET'den ayrılmaktadır.

Aile Öyküsü: Tremor açısından pozitif aile öyküsü 16 hastada (%80) mevcuttur. Aile öyküsü olanların çoğunda etkilenen akraba birinci derece yakın (ör. anne, baba veya kardeş) idi. Örneğin, beş olgunun anne veya babasında benzer tremor mevcuttu; üç olgunun çocuklarında tremor saptanmıştı; diğer bazı olgularda ise dede, hala/teyze veya

amca/dayı gibi ikinci derece akrabalarda tremor öyküsü vardı. Aile öyküsü negatif olan dört hastada (%20) ise hiçbir birinci veya ikinci derece akrabada tremor tanısı ya da benzer semptomlar bulunmuyordu. Klinik bulguların daha ayrıntılı dökümü **Tablo 4-2**'de özetlenmiştir.

Tablo 4-2. Olguların demografik ve klinik özellikleri.

Özellik	Değer
Olgu sayısı	**20**
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	14 / 6 (♀ %70)
Tremor başlangıç yaşı (ortalama ± SS)	36,8 ± 21,8 yıl (dağılım 7–67)
Hastalık süresi (median, aralık)	7 yıl (aralık 1–51 yıl)
Üst ekstremite tremoru mevcut	17 olgu (%85)
Baş tremoru mevcut	6 olgu (%30) – *hepsi kadın*
Ses tremoru mevcut	3 olgu (%15) – *daima baş tremoru ile birlikte*
Alt ekstremite tremoru mevcut	3 olgu (%15) – *hafif şiddette*
İstirahat tremoru/rijidite	6 olgu (%30) – *parkinsoniyen özellik*
Tremor başlangıcı tek taraflı	15 olgu (%75) – *14 sağ elde, 3 sol elde*
Ailede tremor öyküsü	16 olgu (%80)

SS: standart sapma; ♀: kadın; ♂: erkek

Tüm aile üyelerine ait klinik bilgiler toplanmış; ancak segregasyon analizi yalnızca biyolojik örnek sağlayan ve bilgilendirilmiş onam veren bireylerde gerçekleştirilmiştir. Bu bireyler arasında etkilenmemiş (sağlıklı) akrabaların yaşları 15 ile 85 arasında değişmekte olup medyan yaş 45'tir; etkilenmiş bireylerin yaşları ise 18 ile 78 arasında değişmekte olup medyan yaş 59'dur (**Tablo 4-3**).

Tablo 4-1. Olguların klinik bulguları.

					Temel Motor Bulgular				Tremor Parametreleri				Nörolojik Bulgular				Motor Dışı Bulgular
Aile	İndeks	Klinik Tanı	Cinsiyet (E/K)	Dizileme Metodu	Üst ekstremite tremoru (aksiyon / postüral)	Baş tremoru	Ses tremoru	Alt ekstremite tremoru	Asimetrik başlangıç	Başlangıç yaşı (yıl)	hastalık süresi (yıl)	Frekans	Serebellar disfonksiyon	Bilişsel bozukluk	İstirahat tremoru	Rijidite	Depresyon / Anksiyete
ET-01	II-3	ET plus	K	Solo ES + WGS	ok	hayır	hayır	mevcut (sağ bacak)	sağ dominant	57	13	düşük genlik	hayır	hayır	mevcut (sağ taraflı)	mevcut (sağ taraflı)	hayır
ET-02	III-2	ET	E	Duo ES (II:3 ve III:2)	sağ elde postüral tremor	hayır	hayır	yok	sağ dominant	18	14	NA	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-03	II-1	ET	K	Solo ES	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	hayır	hayır	yok	sol dominant	51	5	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-04	III-2	ET (titübasyon)	K	Trio ES (I:4, II:2 ve III:2)	yok	evet	hayır	yok	–	50	9	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-05	III-1	ET	K	Solo ES + Duo ES (II:1 ve III:1)	sağ elde postüral tremor	hayır	hayır	yok	sağ dominant	16	5	düşük genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-06	III-2	ET	K	Duo ES + Trio ES (II:2, II:3 ve III:2)	sağ elde postüral tremor	hayır	hayır	yok	sağ dominant	15	5	düşük genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-07	II-3	ET	K	Solo ES	sağ elde postüral tremor	hayır	hayır	yok	sağ dominant	42	5	düşük genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-08	II-2	ET	K	Solo ES	sağ elde postüral tremor, yavaş progresyon gösteren	hayır	hayır	yok	sağ dominant	40	31	düşük genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-09	II-6	ET	K	Solo ES	bilateral postüral tremor	evet	hayır	yok	–	67	9	NA	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-10	II-2	ET	K	Solo ES + Duo ES (II:2 ve III:1)	sağ elde postüral tremor	hayır	hayır	yok	sağ dominant	20	55	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-11	II-4	ET	K	Duo ES (II:4 ve II:7)	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	evet	hayır	yok	sol dominant	62	14	orta genlik	hayır	hayır	mevcut (sol taraflı)	yok	hayır
ET-12	II-3	ET	K	Solo ES	yok	evet	evet	yok	–	61	6	NA	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-13	II-1	ET	K	Solo ES + WGS	bilateral postüral tremor	evet	evet	yok	sağ dominant	59	14	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	evet
ET-14	II-2	ET	E	Solo ES	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	hayır	hayır	yok	sol dominant	20	46	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-15	II-1	ET	K	Solo ES + WGS	sağ elde postüral tremor	hayır	hayır	yok	sağ dominant	53	12	düşük genlik	hayır	hayır	mevcut (sağ taraflı)	yok	hayır
ET-16	II-1	ET (titübasyon)	K	Solo ES	sağ elde postüral tremor	evet	evet	yok	sağ dominant	63	7	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-17	II-4	ET	E	Solo ES	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	hayır	hayır	mevcut	sağ dominant	11	9	orta genlik	hayır	hayır	mevcut (sağ taraflı)	yok	hayır
ET-18	II-3	ET	K	Solo ES	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	hayır	hayır	yok	sağ dominant	16	10	orta genlik	hayır	hayır	mevcut (sağ taraflı)	yok	hayır
ET-19	III-6	ET	E	Solo ES + WGS	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	hayır	hayır	yok	sağ dominant	7	11	orta genlik	hayır	hayır	yok	yok	hayır
ET-20	II-2	ET	E	Solo ES	bilateral postüral ve aksiyon tremoru	hayır	hayır	mevcut	sağ dominant	8	13	orta genlik	hayır	hayır	mevcut (sağ taraflı)	yok	hayır

(*devamı*)

					Ailesel Özellikler		
Aile	İndeks	Klinik Tanı	Cinsiyet (E/K)	Dizileme Metodu	Pozitif aile öyküsü	ET'den etkilenen aile bireyi	Açıklamalar
ET-01	II-3	ET plus	F	Solo ES + WGS	pozitif		kızında huzursuz bacak sendromu (III-1) etkilenmemiş aile bireyleri: (II-2, II-4, II-5, III-1)
ET-02	III-2	ET	M	Duo ES (II:3 and III:2)	pozitif	anne tarafından büyükbaba (I-1) ve amcalar (II-1 ve II-2) etkilenmiş	ek bulgu: alerji etkilenmemiş aile bireyleri: (II-3, III-1)
ET-03	II-1	ET	M	Solo ES	yok		
ET-04	III-2	ET (titubation)	F	Trio ES (I:4, II:2 and III:2)	pozitif	anne (II-2), kardeşler (III-1, III-3, III-4) ve anne tarafından kuzen (II-3) etkilenmiş	titubasyon (baş tremoru) erkek kardeşlerden biri (III-4) alerjik astım ve esansiyel hipertansiyona sahiptir; diğer kardeşte (III-3) safra enzimlerinde yükselme ve karaciğerle ilişkili disfonksiyon saptanmıştır etkilenmemiş aile bireyleri: (II-1)
ET-05	III-1	ET	F	Solo ES + Duo ES (II:1 and III:1)	pozitif	baba etkilenmiş (II-1)	ek bulgu: indeks olguda (III-1) aritmi ve patent foramen ovale (PFO); babada (II-1) koroner kalp hastalığı, anjiyoplasti ve stent öyküsü etkilenmemiş aile bireyleri: (II-2, III-2)
ET-06	III-2	ET	F	Duo ES + Trio ES (II:2, II:3 and III:2)	pozitif	anne (II-2) ve teyze (II-3) etkilenmiş	propranolol hidroklorür tedavisine mükemmel yanıt
ET-07	II-3	ET	F	Solo ES	pozitif	babada 50 yaşından sonra başlayan sağ el tremoru (I-1)	etkilenmemiş aile bireyleri: (II-2)
ET-08	II-2	ET	F	Solo ES	yok		
ET-09	II-6	ET	F	Solo ES	pozitif	hala etkilenmiş (I-4)	ek bulgular: diabetes mellitus (DM), koroner kalp hastalığı etkilenmemiş aile bireyleri: (III-4, III-5)
ET-10	II-2	ET	F	Solo ES + Duo ES (II:2 and III:1)	pozitif	kız (III-1) ve erkek kardeş (II-1) etkilenmiş	bir oğulda (III-4) şizofreni tanısı konulmuştur etkilenmemiş aile bireyleri: (III-2, III-3, III-4)
ET-11	II-4	ET	F	Duo ES (II:4 and II:7)	pozitif	baba (I-1), amca (I-3) ve kardeşler (II-3 ve II-7) etkilenmiş	primidon ve propranolol hidroklorür tedavisinden belirgin bir fayda gözlenmemiştir
ET-12	II-3	ET	F	Solo ES	pozitif	baba (I-1) ve kardeşler (II-2, II-4 ve II-5) etkilenmiş	
ET-13	II-1	ET	F	Solo ES + WGS	pozitif	anne (I-1) ve erkek kardeş (II-3) etkilenmiş	ek bulgu: migren
ET-14	II-2	ET	M	Solo ES	pozitif	baba (I-1) ve kardeşler (II-1, II-4, II-5, II-6 ve II-7) etkilenmiş	propranolol hidroklorür tedavisine iyi yanıt
ET-15	II-1	ET	F	Solo ES + WGS	pozitif	anne (I-1) etkilenmiş	etkilenmemiş aile bireyleri: (II-2)
ET-16	II-1	ET (titubation)	F	Solo ES	pozitif	anne (I-1) etkilenmiş	titubasyon (baş tremoru)
ET-17	II-4	ET	M	Solo ES	pozitif	baba tarafından büyük amca etkilenmiş	
ET-18	II-3	ET	F	Solo ES	yok		etkilenmemiş aile bireyleri: (I-1, I-2, II-1, II-2)
ET-19	III-6	ET	M	Solo ES + WGS	yok		ek bulgu: hafif miyopatik özellikler
ET-20	II-2	ET	M	Solo ES	pozitif		annede (I-1) hafif el tremoru; babada (I-2) 7 yaşından itibaren erken başlangıçlı konuşma ve psikiyatrik problemler; baba tarafından bir kuzen de psikiyatrik semptomlara sahiptir etkilenmemiş aile bireyleri: (II-1)

Tablo 4-3. Etkilenmiş ve etkilenmemiş aile bireylerinde segregasyon analizi.

Aile	Indeks	Klinik Tanı	Aile Bireyi	Akrabalığı	Cinsiyet (E / K)	Muayene sırasındaki yaş (yıl) (1)	Etkilenme durumu (2)	Hastalığın başlangıç yaşı (3)	Analiz edilen genler ve genotip (4)
ET-01	II-3	ET plus	II-2	kız kardeş	K	85	etkilenmemiş	–	*USP40* (wt), *PLA2G3* (wt), *CSF1R* (wt)
			II-4	kız kardeş	K	69	etkilenmemiş	–	*USP40* (het), *PLA2G3* (wt), *CSF1R* (wt)
			II-5	kız kardeş	K	65	etkilenmemiş	–	*USP40* (wt), *PLA2G3* (het), *CSF1R* (het)
			III-1	kız	K	40	etkilenmemiş *(*huzursuz bacak sendromu)*	NA	*USP40* (het), *PLA2G3* (het), *CSF1R* (het)
ET-02	III-2	ET	II-3	anne	K	64	etkilenmemiş	–	*DNAJC10* (wt)
			III-1	erkek kardeş	E	22	etkilenmemiş	–	*DNAJC10* (het)
			I-1	anne tarafından dede	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
			II-1	dayı	E	70	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
			II-2	dayı	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
ET-04	III-2	ET (titübasyon)	III-1	kız kardeş	K	62	etkilenmiş	45	*GABRR2* (het), *FTL* (het)
			III-3	erkek kardeş	E	59	etkilenmiş	42	*GABRR2* (wt), *FTL* (het)
			III-4	erkek kardeş	E	50	etkilenmiş	48	*GABRR2* (wt), *FTL* (het)
			II-2	anne	K	NA	etkilenmiş	35	*GABRR2* (wt), *FTL* (het)
			II-1	baba	E	NA	etkilenmemiş	–	*GABRR2* (wt), *FTL* (wt)
			I-4	dayı	E	NA	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
			II-3	anne tarafından kuzen	E	NA	etkilenmiş	50	DNA örneği mevcut değil
ET-05	III-1	ET	II-1	baba	E	61	etkilenmiş	NA	*TENM4* (wt), *ABCG4* (het)
			II-2	anne	K	58	etkilenmemiş	–	*TENM*4 (het), *ABCG4* (wt)
			III-2	kız kardeş	K	18	etkilenmemiş	–	*TENM*4 (het), *ABCG4* (wt)

ET-06	III-2	ET	II-2	anne	K	50	etkilenmiş	35	*DRD3* (het), *ATP1A4* (het)
			II-3	teyze	K	47	etkilenmiş	42	*DRD3* (wt), *ATP1A4* (het)
ET-07	II-3	ET	II-2	kız kardeş	K	38	etkilenmemiş	–	*PSEN2* (wt)
			I-1	baba	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	55	DNA örneği mevcut değil
			I-3	amca	E	NA	etkilenmiş	50	DNA örneği mevcut değil
ET-09	II-6	ET	III-4	kız	K	53	etkilenmemiş	–	*TRPC3* (het)
			III-5	erkek çocuk/oğul	E	45	etkilenmemiş	–	*TRPC3* (wt)
			I-4	teyze	K	NA (*exitus*)	etkilenmiş	60	Analiz edilmedi
ET-10	II-2	ET	III-1	kız	K	51	etkilenmiş	14	*CAPN6* (wt), *KCNH8* (het)
			III-2	kız	K	49	etkilenmemiş	–	*CAPN6* (het), *KCNH8* (het)
			III-3	kız	K	48	etkilenmemiş	–	*CAPN6* (het), *KCNH8* (het)
			III-4	erkek çocuk/oğul	E	42	etkilenmemiş	–	*CAPN6* (hom), *KCNH8* (het)
			II-1	erkek kardeş	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	30	DNA örneği mevcut değil
ET-11	II-4	ET	II-7	erkek kardeş	E	72	etkilenmiş	58	*ABCA13* (het)
			II-3	erkek kardeş	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	50	DNA örneği mevcut değil
			I-1	baba	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	50	DNA örneği mevcut değil
			I-3	amca	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	60	DNA örneği mevcut değil
ET-14	II-2	ET	II-1	kız kardeş	K	78	etkilenmiş	55	*TENM4* (het)
			II-4	kız kardeş	K	63	etkilenmiş	20	*TENM4* (het)
			II-5	kız kardeş	K	61	etkilenmiş	40	*TENM4* (het)
			II-6	kız kardeş	K	58	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
			II-7	erkek kardeş	E	55	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
			I-1	baba	E	NA (*exitus*)	etkilenmiş	40	DNA örneği mevcut değil
			III-5	kız kardeşin oğlu (yeğen)	E	43	etkilenmiş	20	DNA örneği mevcut değil
			IV-1	kız kardeşin yeğeni	E	20	etkilenmiş	NA	DNA örneği mevcut değil
			IV-2	kız kardeşin yeğeni	K	18	etkilenmemiş	NA	DNA örneği mevcut değil
ET-15	II-1	ET	II-2	erkek kardeş	E	45	etkilenmiş	–	*LRRC3* (het), *TMEM230* (wt)

			I-1	anne	K	NA (*exitus*)	etkilenmemiş	60	DNA örneği mevcut değil
ET-18	II-3	ET	I-1	anne	K	54	etkilenmemiş	–	*GABRP* (wt), *ADCY5* (het)
			I-2	baba	E	52	etkilenmemiş	–	*GABRP* (het), *ADCY*5 (wt)
			II-1	erkek kardeş	E	26	etkilenmemiş	–	*GABRP* (wt), *ADCY*5 (wt)
			II-2	erkek kardeş	E	23	etkilenmemiş *(*hafif el tremoru)*	–	*GABRP* (wt), *ADCY5* (wt)
ET-20	II-2	ET	I-1	anne	K	43	etkilenmemiş	–	*HTRA2* (wt), *GCH1* (wt)
			II-1	kız kardeş	K	20	etkilenmemiş	–	*HTRA2* (wt), *GCH1* (wt)

(1) Muayene yaşı, en son klinik değerlendirme sırasındaki yaşı ifade eder.

(2) Etkilenme durumu, esansiyel tremor ile uyumlu nörolojik muayene bulgularına göre belirlenmiştir. Başlangıç yaşının üzerinde olup etkilenmemiş bireyler, değerlendirme sırasında hastalık bulgusu göstermeyen bireyler olarak kabul edilmiştir.

(3) Başlangıç yaşı yalnızca etkilenmiş bireyler için kaydedilmiştir. NA: uygulanmadı, bilgi mevcut değil.

(4) DNA örneğinin temin edilememesi nedeniyle bu bireylerde genetik analiz yapılamamıştır. wt: yabanıl tip; het: heterozigot; hom: homozigot.

4.2. Moleküler Bulgular

Entegre fragman analizi ve TP-PCR yöntemleri ile yapılan incelemelerde, *GIPC1* ve *NOTCH2NLC* genlerinde patojenik tekrar artışları saptanmamıştır (**Tablo 4-4**). *GIPC1* için tekrar uzunluğu dağılımı 10–21 tekrar (ortalama 11; modal alleller 11 ve 12) aralığında olup, *NOTCH2NLC* için ise 13–24 tekrar (ortalama 19; modal alleller 19 ve 21) aralığında dar bir dağılım göstermiştir. Bu değerlerin tamamı, tanımlanmış normal aralıklar içinde yer almakta ve patojenik eşiklerin belirgin şekilde altında kalmaktadır.

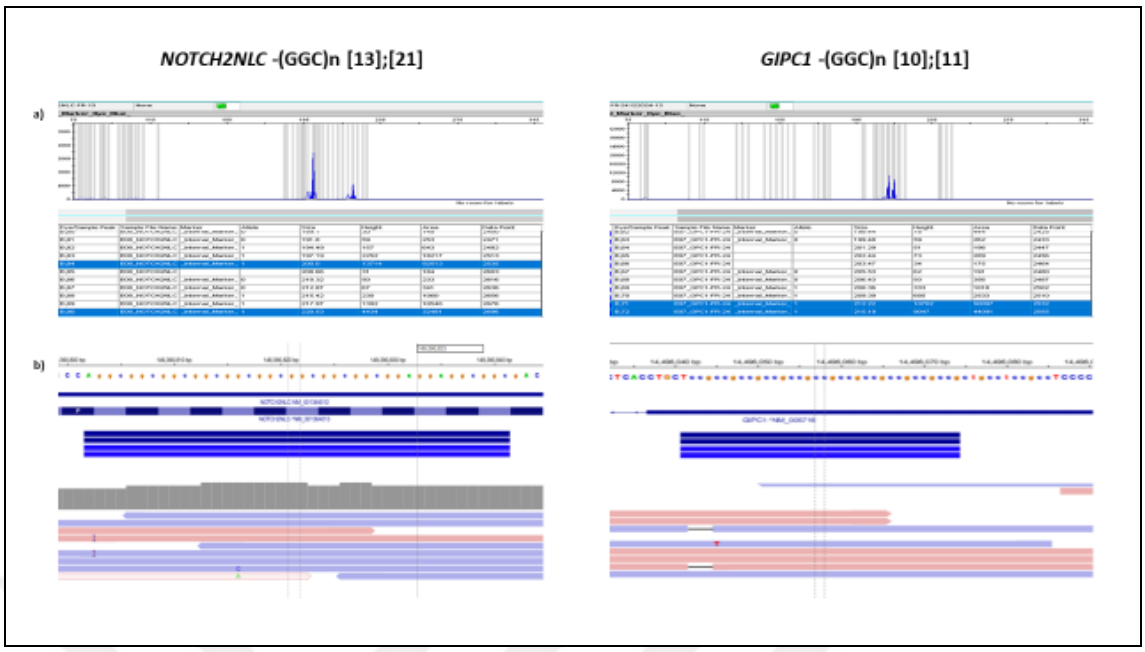
Tablo 4-4. *NOTCH2NLC* ve *GIPC1* tekrar artışlarına yönelik analizinin özeti.

Olgu	***NOTCH2NLC*** **Kodlanan bölge-(GGC)n [1]** **Normal <40** **Patogenik >41**			***GIPC1*** **5'UTR-(GGC)n [2]** **Normal <32** **Patogenik >73**		
	Allele	**Zygosity**	**Status**	**Allele**	**Zygosity**	**Status**
ET-01	**[21];[21]**	Hom.	Normal	**[11];[11]**	Hom.	Normal
ET-02	**[14];[20]**	Het.	Normal	**[11;[11]**	Hom.	Normal
ET-03	**[19];[19]**	Hom.	Normal	**[11];[13]**	Het.	Normal
ET-04	**[13];[23]**	Het.	Normal	**[10];[10]**	Het.	Normal
ET-05	**[14];[22]**	Het.	Normal	**[10];[11]**	Het.	Normal
ET-06	**[18];[21]**	Het.	Normal	**[10];[12]**	Het.	Normal
ET-07	**[18];[19]**	Het.	Normal	**[11];[12]**	Het.	Normal
ET-08	**[21];[23]**	Het.	Normal	**[11];[21]**	Het.	Normal
ET-09	**[20];[24]**	Het.	Normal	**[10];[10]**	Hom.	Normal
ET-10	**[21];[21]**	Hom.	Normal	**[10];[11]**	Het.	Normal
ET-11	**[14];[24]**	Het.	Normal	**[11];[13]**	Het.	Normal
ET-12	**[19];[20]**	Het.	Normal	**[12];[13]**	Het.	Normal
ET-13	**[13];[21]**	Het.	Normal	**[10];[11]**	Het.	Normal
ET-14	**[19];[23]**	Het.	Normal	**[10];[12]**	Het.	Normal
ET-15	**[18];[19]**	Het.	Normal	**[12];[12]**	Hom.	Normal
ET-16	**[21];[22]**	Het.	Normal	**[11];[12]**	Het.	Normal
ET-17	**[13];[23]**	Het.	Normal	**[11];[12]**	Het.	Normal
ET-18	**[13];[17]**	Het.	Normal	**[11];[12]**	Het.	Normal
ET-19	**[13];[24]**	Het.	Normal	**[12];[13]**	Het.	Normal
ET-20	**[15];[21]**	Het.	Normal	**[10];[11]**	Het.	Normal

(het: heteroziqot; hom: homoziqot)

[1] **Zhou X, Huang H, He R, *et al.***. *Eur J Neurol*. 2022;29:3600–3610.

[2] **Fan Y, Shen S, Yang J, *et al.***. *Ann Neurol*. 2022;91:704–715.



Şekil 4-1. ET-13 olgusuna ait *NOTCH2NLC* ve *GIPC1* genlerindeki tekrar bölgelerinin fragman analizi (*a*) ve tüm genom dizileme (TGD) (*b*) sonuçlarının karşılaştırmalı gösterimi.

Sekanslama stratejileri şu şekilde uygulanmıştır: Solo ED on ailede (ET-03, ET-07, ET-08, ET-09, ET-12, ET-14, ET-16, ET-17, ET-18, ET-20), Duo ED iki ailede (ET-02; II:3 ve III:2 ile ET-11; II:4 ve II:7), Trio ED bir ailede (ET-04; I:4, II:2, III:2). Kalan ailelerde aşamalı sekanslama stratejisi uygulanmıştır: ET-01, ET-13, ET-15 ve ET-19'da solo ED ardından TGD, ET-05 (II:1, III:1) ve ET-10 (II:2, III:1)'da solo ED ardından duo ED, ET-06'da (II:2, II:3, III:2) duo ED ardından trio ED yapılmıştır. Ayrıca, veri mevcut olan dört bireyde (ET-01, ET-13, ET-15 ve ET-19) elde edilen TGD sonuçları, fragman analizi ve TP-PCR ile belirlenen tekrar uzunluklarını doğrulamıştır (**Şekil 4-1**).

4.2.1. *Tier 3*: Biyolojik olarak güçlü adaylar olmakla birlikte segregasyon kanıtı bulunmayan varyantlar.

Hücresel sinyalizasyon, protein homeostazı, lipid metabolizması, iyon dengesi ve hücre adezyonunda rol alan genlerde (*CAPN6, CSF1R, DNAJC10, DRD3, KCNH8, LRRC3, PLA2G3, TENM4, TRPC3* ve *USP40*) yer alan varyantlar başlangıçta ET için potansiyel adaylar olarak değerlendirilmiş; ancak segregasyon analizleri bu varyantların

hastalıkla ilişkisi lehine değerlendirilmemiştir (**Tablo 4-5**). ET-01 ve ET-19 ailelerinde (solo ED ardından TGD) ve ET-10 ailesinde (solo ED ardından duo ED) uygulanan aşamalı analizler, ek veya ilişkili herhangi bir aday varyant ortaya koymamıştır; ET-02 ve ET-09 ailelerinde ise ek segregasyon gösteren varyant tespit edilmemiştir (**Şekil 4-2**). ET-01 ailesinde saptanan *CSF1R* (MIM#221820) varyantı, ET'de zaman zaman gözlenebilen Lewy cisimcikli demans ve Purkinje hücre kaybı gibi örtüşen nöropatolojik özellikler nedeniyle değerlendirilmiştir. ET-09'da saptanan *TRPC3* varyantı ise daha önce spinosebellar ataksi (MIM#616410) ile ilişkili bildirilen p.(Val474Cysfs*29) fonksiyon kaybı varyantı nedeniyle incelenmiştir. Ancak bu ilişki daha geniş kohortlarda doğrulanmamıştır. Bizim çalışmamızda da bu varyant segregasyon göstermemesi nedeniyle dışlanmıştır. ET-06 ailesinde segregasyon göstermeyen *DDR3* varyantının saptanması trio ED analizini gerektirmiş ve sonraki aşamada elde edilen sonuçlar **Tablo 4-7**'de sunulmuştur. *TENM4* geninin ET ile ilişkilendirildiği bilinmesine rağmen (MIM#616736), ET-05 ailesinde saptanan yeni varyant hastalıkla segregasyon göstermemiştir. Benzer şekilde ET-15 ailesindeki *LRRC3* varyantı da segregasyon göstermemiştir. Daha sonra yapılan duo ED (ET-05) ve TGD (ET-15) analizleri ile ek varyantlar saptanmış olup bunlar **Tablo 4-8**'de özetlenmiştir.

4.2.2. *Tier 2*: Yalnızca etkilenmiş bireylerde gözlenen ancak sınırlı mayoz sayısı veya ek segregasyon verisinin bulunmaması nedeniyle kanıtı sınırlı olan varyantlar

Solo ED analizleri, altı tek probandlı ailede (ET-03, ET-08, ET-12, ET-13, ET-16, ET-17) yedi gende (*DNAJC13, GABBR1, LRRK2, PINK1, TENM4, USP31* ve *VPS16*) toplam sekiz varyant saptamıştır, ancak aile üyelerinin DNA örneğinin temin edilememesi nedeniyle segregasyon analizi yapılamamıştır (**Tablo 4-6, Şekil 4-3**). ET-13 olgusunda özellikle dikkat çekici olarak *PINK1* geninde iki varyant saptanmış, ancak ebeveynlerin vefat etmiş olması ve etkilenmiş kardeşin bulunamaması nedeniyle faz tayini yapılamamıştır. Klinik değerlendirme, belirgin baş ve ses tremoru ile karakterize ET tanısını desteklemiş; istirahat tremoru veya rijidite saptanmamıştır. ET-13 olgusunda yapılan TED analizi ek aday varyant ortaya koymamıştır.

4.2.2.1. Kısmi segregasyon kanıtına sahip *Tier 2* varyantlar

Üç gende (*ATP1A4, ABCA13* ve *TENM4*) heterozigot varyantların ET-06, ET-11 ve ET-14 ailelerinde etkilenen bireylerle birlikte segregasyon gösterdiği belirlenmiştir (**Tablo 4-7, Şekil 4-4**). ET-06 olgusunda *ATP1A4* geninde bir fonksiyon kaybı varyantı (c.1804C>T; p.(Arg602)) saptanırken, ET-11 olgusunda *ABCA13* geninde (c.13663T>C; p.(Tyr4555His)) ve ET-14 olgusunda *TENM4* geninde (c.5870C>T; p.(Thr1957Met)) yanlış anlamlı varyantlar belirlenmiştir.

4.2.3. *Tier 1*: Etkilenmiş aile bireyleri ile birlikte segregasyon gösteren ve etkilenmemiş akrabalarda bulunmayan varyantlar

ABCG4, ADCY5, GCH1, FTL, GABBR2, GABRP, HTRA2, PSEN2 ve *TMEM23*0 genlerinde saptanan aday varyantlar yalnızca etkilenen aile bireylerinde bulunmuş ve sağlıklı akrabalarda saptanmamıştır (**Tablo 4-8**; **Şekil 4-5 ve Şekil 4-7**). ET-04 ailesinde iki farklı gende (*GABBR2* ve *FTL*) iki yeni varyant belirlenmiştir. Etkilenen anne ve bir kız kardeş her iki varyantı birlikte taşırken, diğer etkilenmiş kardeşler yalnızca *GABBR2*, etkilenmiş erkek kardeşler ise yalnızca *FTL* varyantını taşıdığı gösterilmiştir. ET-05 ailesinde, segregasyon göstermeyen yeni *TENM4* varyantından (c.5158A>G) sonra yapılan duo ES analizi, nadir bir *ABCG4* varyantını (c.679C>G; p.(Pro227Ala)) ortaya koymuştur. Bu varyant gnomAD veritabanında düşük sıklıkta (1/6.052 alel) ve Turkish Variome'da (2/5.148 alel) bildirilmiştir. ABC transporter domeninde (UniProt No.: Q9H172) lokalize olan bu varyant **(Şekil 4-5)**, etkilenmiş annede mevcut olup sağlıklı kardeşte bulunmamıştır. ET-15 olgusunda, başlangıçta yapılan ED ve ardından gerçekleştirilen TGD analizleri ile nadir bir *LRRC3* varyantı (c.98G>A; p.(Cys33Tyr)) ve yeni bir *TMEM230* yanlış anlamlı varyantı (c.251A>C; p.(Lys84Thr)) saptanmıştır. *LRRC3* varyantı 45 yaşındaki sağlıklı kardeşte de bulunurken, *TMEM230* varyantı saptanmamıştır. ET-18 ailesinde iki varyant belirlenmiştir: anneden kalıtılan *ADCY5* varyantı (c.2543C>T; p.(Ala848Val)) ve babadan kalıtılan *GABRP* varyantı (c.871G>A; p.(Gly291Arg)). Her iki ebeveyn sağlıklı olup, 23 ve 26 yaşlarındaki sağlıklı kardeşlerde bu varyantların her ikisi de bulunmamıştır. *GABRR2* ve *GABRP* genlerinde tanımlanan amino asit değişimlerinin olası yapısal etkilerini incelemek amacıyla Missense3D modelleme aracı ile öngörülen üç boyutlu protein yapıları oluşturulmuş ve sonuçlar **Şekil 4-8 ve Şekil 4-9**'te gösterilmiştir.

Tablo 4-5. Yedi ailede segregasyon analizi ile dışlanan başlangıçta tanımlanmış aday varyantların özeti**. (*Tier 3*)**

Olgu	Gen	pLI	o/e	Z score	Transkript	Nükleotid	Protein	dbSNP/ClinVar	ACMG classification	CADD score	REVEL score	Splice AI	Frekans (%)		Phylo P100 way
													Turkish Variome	gnomAD (max)	
01	*USP40*	0	0.93 (LOF)	NA	NM_001365479.2	c.2341C>T	p.(Arg781*)	rs566859361/-	VUS (PM2)	10.26	NA	0.29 (AL) 0.31 (DL)	0.0647	o.1148	2.5035
	PLA2G3	0	0.74 (LOF)	NA	NM_015715.5	c.782+1G>C	p.(?)	-/SCV007097403	VUS (PM2)	0	NA	0.99 (DL) 0.2 (DG)	0.0182	0	6.8636
	CSF1R	0.98	0.82 (M)	2.43 (M)	NM_001288705.3	c.1700C>T	p.(Thr567Met)	rs41529644/ VCV001058342.8	VUS (PM2, PP3)	26.7	0.866	0.03 (AG)	--	0.0329	6.87292
02	*DNAJC10*	0	1.03 (M)	-0.22 (M)	NM_018981.4	c.1508T>G	p. (Phe503Cys)	rs1173459468/-	VUS (PM2)	28.7	0.499	--	--	0.013	7.92062
05	*TENM4*	1	0.84 (M)	3.55 (M)	NM_001098816.3	c.5158A>G	p.(Thr1720Ala)	-/SCV007097405	VUS (PM2, BP4)	24.5	0.073	0.04 (AG) 0.02 (DL)	--	0.0002	3.10091
06	*DRD3*	0.66	0.86 (M)	1.09 (M)	NM_000796.6	c.277G>A	p.(Gly93Ser)	rs764829977/-	VUS (PM2)	29.7	0.527	0.05 (AG)	--	0.0003	7.3472
09	*TRPC3*	0	0.75 (M)	3.11 (M)	NM_001130698.2	c.1661T>C	p.(Ile554Thr)	-/SCV007097407	VUS (PM2, PP3, PP2)	24.9	0.824	0.08 (AL)	--	0.0001	9.02213
10	*CAPN6*	NA	NA	NA	NM_014289.4	c.860G>A	p.(Gly287Glu)	-/SCV007097408	LP (PP3, PM2)	35	0.937	-	--	0	7.77231
	KCNH8	0	0.87 (M)	1.78 (M)	NM_144633.3	c.2663T>C	p.(Met888Thr)	-/SCV007097409	VUS (PM2)	22.3	0.611	-	0.0177	0.0016	5.73657
15	*LRRC3*	0	0.97 (M)	0.24 (M)	NM_030891.6	c.98G>A	p.(Cys33Tyr)	rs1321527409	VUS (PM2, PP3)	24.6	0.936	-	--	0.0013	5.5584

Kısaltmalar: -: mevcut değil; AG: alıcı bölge kazanımı (acceptor-gain); AL: alıcı bölge kaybı (acceptor-loss); BP4: benign destekleyici (hesaplamalı kanıt); DG: donör bölge kazanımı (donor-gain); DL: donör bölge kaybı (donor-loss); LOF: fonksiyon kaybı (loss of function); LP: olası patojenik (likely pathogenic); M: missense (yanlış anlamlı) varyant; NA: uygulanamaz; o/e: gözlenen/beklenen oranı; pLI: fonksiyon kaybına intolerans olasılığı; PM2: orta düzey patojenik (kontrollerde bulunmayan); PP2: destekleyici patojenik; PP3: destekleyici patojenik (hesaplamalı kanıt); VUS: klinik önemi belirsiz varyant; Z-score: beklenen varyant sayısından sapma ölçüsü.

Tablo 4-6. Segregasyon analizi yapılamayan altı tek probandlı ailede aday varyantların özeti (***Tier 2; segregasyon verisi mevcut değil***)

Olgu	Gen	pLI	o/e	Z score	Transkript	Nükleotid	Protein	dbSNP/ClinVar	ACMG classification	CADD score	REVEL score	Splice AI	Frekans (%)		Phylo P100 way
													Turkish Variome	gnomAD (max)	
03	*DNAJC13*	1	0.81 (M)	3.39 (M)	NM_015268.4	c.805A>G	p.(Thr269Ala)	-/SCV007097411	VUS (PM2)	23.4	0.207	-	--	0	5.93381
08	*TENM4*	1	0.84 (M)	3.55 (M)	NM_001098816.3	c.5462G>A	p.(Arg1821Gln)	rs74791537	VUS (PM2)	32	0.481	0.08 (DG)	--	0.0041	3.25465
12	*LRRK2*	0	0.99 (S)	0.25 (S)	NM_198578.4	c.6000G>T	p.(Val2000=)	rs1397090256	VUS (PM2, BP7)	4.181	NA	-	--	0.0022	-0.261685
13	*PINK1*	0	0.99 (M)	0.13 (M)	NM_032409.3	c.802C>G	p.(Leu268Val)	rs372280083/ VCV000374600.45	VUS (PM2)	17.56	0.555	-	0.0744	0.066	0.58022
			1.06 (LOF)	NA		c.960-11C>T	p.(?)	rs371943401/ VCV000295003.10	LB (PM2, BP7, BP6)	10.34	NA	0.03 (AL)	0.0744	0.0658	0.42737
16	*GABBR1*	1	0.57 (M)	5.54 (M)	NM_001470.4	c.2075T>C	p.(Phe692Ser)	rs780587551/ -	VUS (PM2, PP3, PP2)	30	0.904	-	--	0.0033	8.72446
	VPS16	0	0.68 (LOF)	NA	NM_022575.4	c.1332-1G>T	p.(?)	rs373116713/ VCV001879532.23	LP (PVS1, PM2)	32	NA	0.03 (AL)	0.0747	0.0164	6.21345
17	*USP31*	0.97	0.98 (M)	0.29 (M)	NM_020718.4	c.2533A>G	p.(Ser845Gly)	rs1236242968/ -	VUS (PM2, BP4)	25.2	0.142	0.05 (AL)	0.0299	0.0004	4.58113

Kısaltmalar: -: mevcut değil; AG: alıcı bölge kazanımı (acceptor-gain); AL: alıcı bölge kaybı (acceptor-loss); BP4: benign destekleyici (hesaplamalı kanıt); DG: donör bölge kazanımı (donor-gain); DL: donör bölge kaybı (donor-loss); LOF: fonksiyon kaybı (loss of function); LP: olası patojenik (likely pathogenic); M: missense (yanlış anlamlı) varyant; NA: uygulanamaz; o/e: gözlenen/beklenen oranı; pLI: fonksiyon kaybına intolerans olasılığı; PM2: orta düzey patojenik (kontrollerde bulunmayan); PP2: destekleyici patojenik; PP3: destekleyici patojenik (hesaplamalı kanıt); VUS: klinik önemi belirsiz varyant; Z-score: beklenen varyant sayısından sapma ölçüsü.

Tablo 4-7. Üç ailede (***kısmi segregasyon kanıtına sahip Tier 2 varyantlar***) tanımlanan varyantların etkilenmiş aile bireylerinde segregasyonu.

Olgu	Gen	pLI	o/e	Z score	Transkript	Nükleotid	Protein	dbSNP/ClinVar	ACMG classification	CADD score	REVEL score	Splice AI	Frekans (%)		Phylo P100 way
													Turkish Variome	gnomAD (max)	
06	*ATP1A4*	0	0.73 (LOF)	NA	NM_144699.4	c.1804C>T	p.(Arg602*)	rs190411003/-	VUS (PM2)	44	0	-	0.1294	0.0869	3.13973
11	*ABCA13*	0	1 (M)	-0.1	NM_152701.5	c.13663T>C	p.(Tyr4555His)	-/SCV007097410	VUS (PM2, PP3)	24.8	0.856	-	0.0177	0	5.09113
14	*TENM4*	1	0.84 (M)	3.55	NM_001098816.3	c.5870C>T	p.(Thr1957Met)	rs774521396/-	VUS (PM2, PP3)	27.2	0.781	-	--	0.0018%	8.09835

Kısaltmalar: -: mevcut değil; AG: alıcı bölge kazanımı (acceptor-gain); AL: alıcı bölge kaybı (acceptor-loss); BP4: benign destekleyici (hesaplamalı kanıt); DG: donör bölge kazanımı (donor-gain); DL: donör bölge kaybı (donor-loss); LOF: fonksiyon kaybı (loss of function); LP: olası patojenik (likely pathogenic); M: missense (yanlış anlamlı) varyant; NA: uygulanamaz; o/e: gözlenen/beklenen oranı; pLI: fonksiyon kaybına intolerans olasılığı; PM2: orta düzey patojenik (kontrollerde bulunmayan); PP2: destekleyici patojenik; PP3: destekleyici patojenik (hesaplamalı kanıt); VUS: klinik önemi belirsiz varyant; Z-score: beklenen varyant sayısından sapma ölçüsü.

Tablo 4-8. Etkilenmiş aile bireyleriyle birlikte segregasyon gösteren ve etkilenmemiş bireylerde bulunmayan aday varyantlar **(*Tier 1*).**

Olgu	Gen	pLI	o/e	Z score	Transkript	Nükleotid	Protein	dbSNP/ClinVar	ACMG classification	CADD score	REVEL score	Splice AI	Frekans (%)		Phylo P100 Way
													Turkish Variome	gnomAD (max)	
04	*GABBR2*	1	0.61 (M)	4.11 (M)	NM_002043.5	c.655A>T	p.(Thr219Ser)	-/SCV007097413	VUS (PM2)	0	0.318	-	0.0178	0.0165	6.16903
	FTL	0	0.79 (M)	1.19 (M)	NM_000146.4	c.183G>C	p.(Glu61Asp)	-/SCV007097404	VUS (PM2)	23.4	0.457	-	--	0	1.91183
05	*ABCG4*	0.2	0.69 (M)	2.33 (M)	NM_022169.5	c.679C>G	p.(Pro227Ala)	rs769978545/-	VUS (PM2, PP3)	28.5	0.955	-	0.0356	0.0165	7.83917
07	*PSEN2*	0	0.85 (M)	1.36 (M)	NM_000447.3	c.710C>T	p.(Ala237Val)	rs200670135/ VCV000191772.3	VUS (PM1, PM2, PP3)	26.8	0.963	-	--	0.0134	6.09526
15	*TMEM230*	0.01	0.9 (M)	0.47 (M)	NM_001330987.2	c.251A>C	p.(Lys84Thr)	-/SCV007097405	VUS (PM2)	1.809	--	-	--	0	0.149157
18	*GABRP*	0	0.93 (M)	0.61 (M)	NM_014211.3	c.871G>A	p.(Gly291Arg)	rs751170370/-	VUS (PM2, PP3)	31	0.846	0.29 (AL)	0.0745	0.0022	9.87468
	ADCY5	1	0.69 (M)	4.48 (M)	NM_183357.3	c.2543C>T	p.(Ala848Val)	rs150642009/-	VUS (PM2, PP2)	24.9	0.197	0.08 (DL	--	0.0329	9.87723
20	*HTRA2*	0	0.74 (M)	2.37 (M)	NM_013247.5	c.187G>T	p.(Val63Phe)	rs756256747/ VCV001361285.6	VUS (PM2, BP4)	8.307	0.015	-	0.0647	0	-0.146465
	GCH1	0.36	0.39 (LOF)	NA	NM_001024024.2	c..*16+5G>A	p.(?)	rs746660567/-	VUS (PM2, PP3)	0.001	--	0.84 (DL) 0.07 (DG)	--	0.011	-0.148969

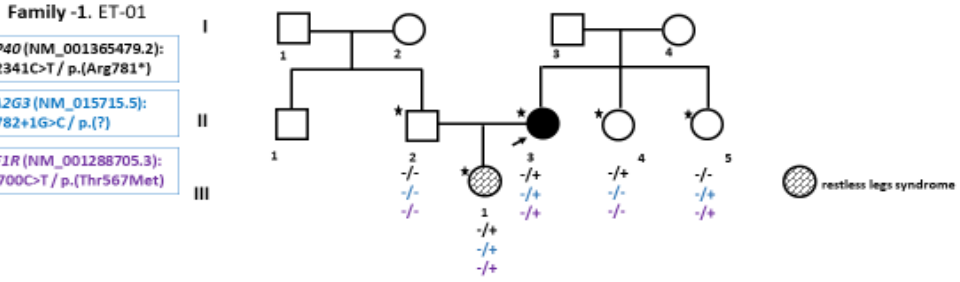
Kısaltmalar: -: mevcut değil; AG: alıcı bölge kazanımı (acceptor-gain); AL: alıcı bölge kaybı (acceptor-loss); BP4: benign destekleyici (hesaplamalı kanıt); DG: donör bölge kazanımı (donor-gain); DL: donör bölge kaybı (donor-loss); LOF: fonksiyon kaybı (loss of function); LP: olası patojenik (likely pathogenic); M: missense (yanlış anlamlı) varyant; NA: uygulanamaz; o/e: gözlenen/beklenen oranı; pLI: fonksiyon kaybına intolerans olasılığı; PM2: orta düzey patojenik (kontrollerde bulunmayan); PP2: destekleyici patojenik; PP3: destekleyici patojenik (hesaplamalı kanıt); VUS: klinik önemi belirsiz varyant; Z-score: beklenen varyant sayısından sapma ölçüsü.

Family -1. ET-01

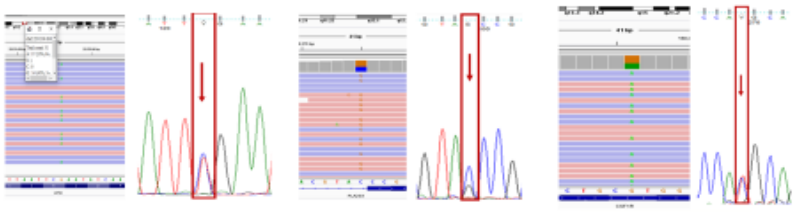
USP40 (NM_001365479.2):
c.2341C>T / p.(Arg781*)

PLA2G3 (NM_015715.5):
c.782+1G>C / p.(?)

CSF1R (NM_001288705.3):
c.1700C>T / p.(Thr567Met)



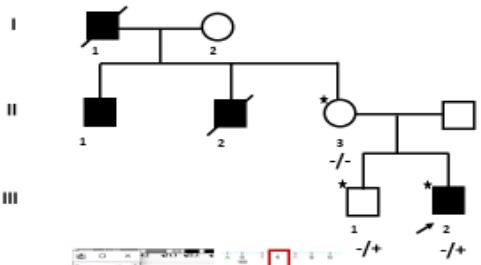
II-3:



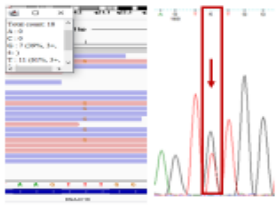
USP40 *PLA2G3* *CSF1R*

Family -2. ET-02

DNAJC10 (NM_018981.4):
c.1508T>G / p.(Phe503Cys)



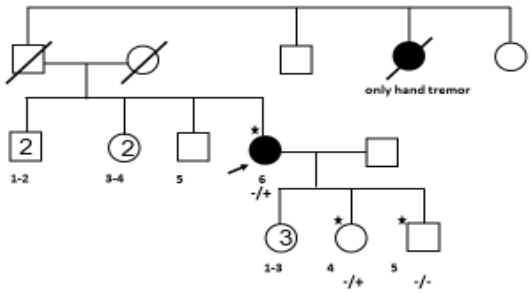
III-2:



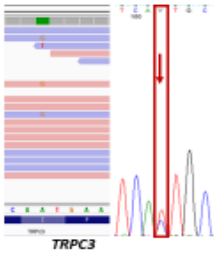
DNAJC10

Family -9. ET-09

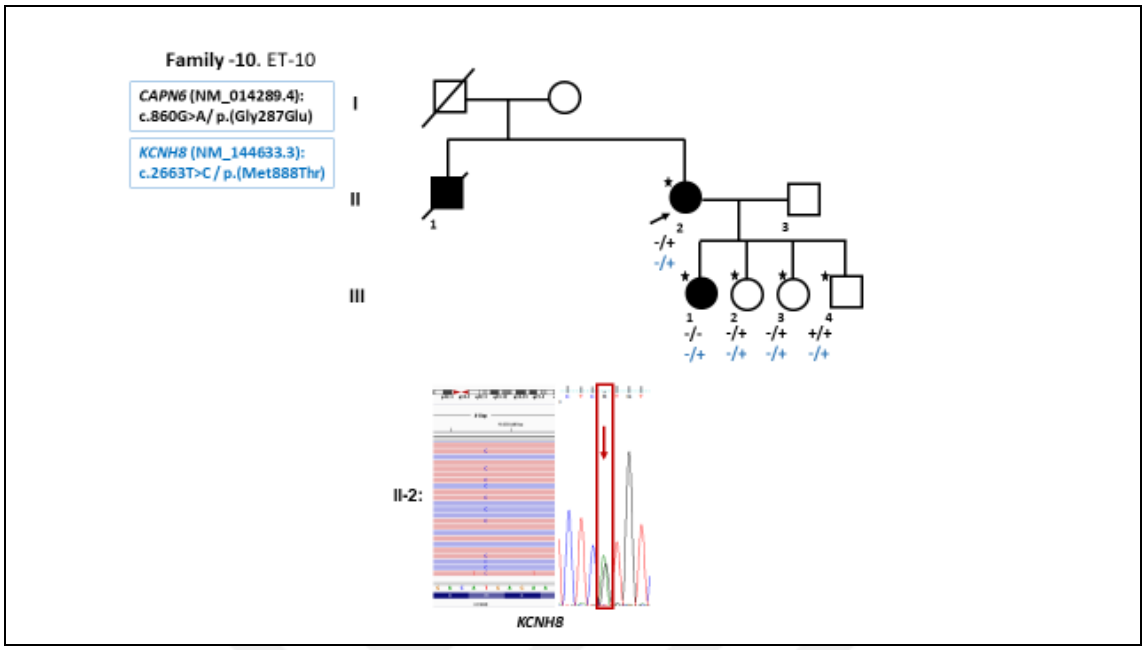
TRPC3 (NM_001130692.2):
c.1661T>C/ p.(Ile554Thr)



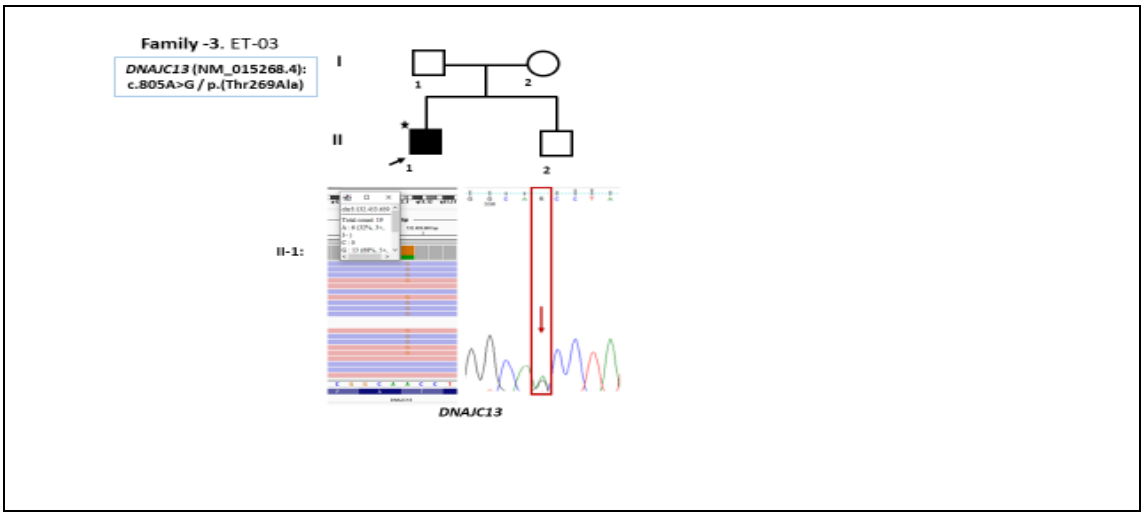
II-6:



TRPC3

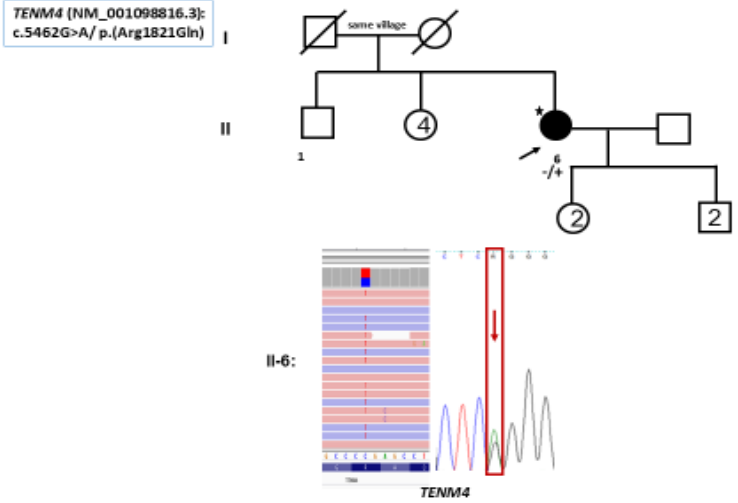


Şekil 4-2. Tablo 4-5'te yer alan dört olguya (ET-01, ET-02, ET-09 ve ET-10) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri (*oklarla gösterilmiştir*) ile birlikte sunulmuştur. Yıldız (*) ile işaretlenen bireyler DNA örneği sağlamış ve segregasyon analizine dahil edilmiştir. Bu bireyler için ilgili varyantlara ait Sanger kromatogramları gösterilmiştir. Varyant varlığı "+", yokluğu "–" ile belirtilmiştir; "+/–" heterozigot durumu, "–/–" ise varyantın tespit edilmediğini ifade etmektedir.



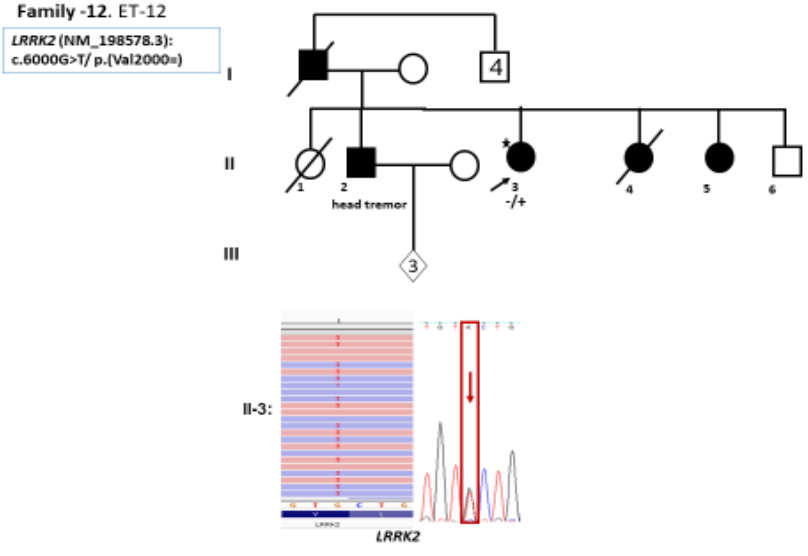
Family -8. ET-08

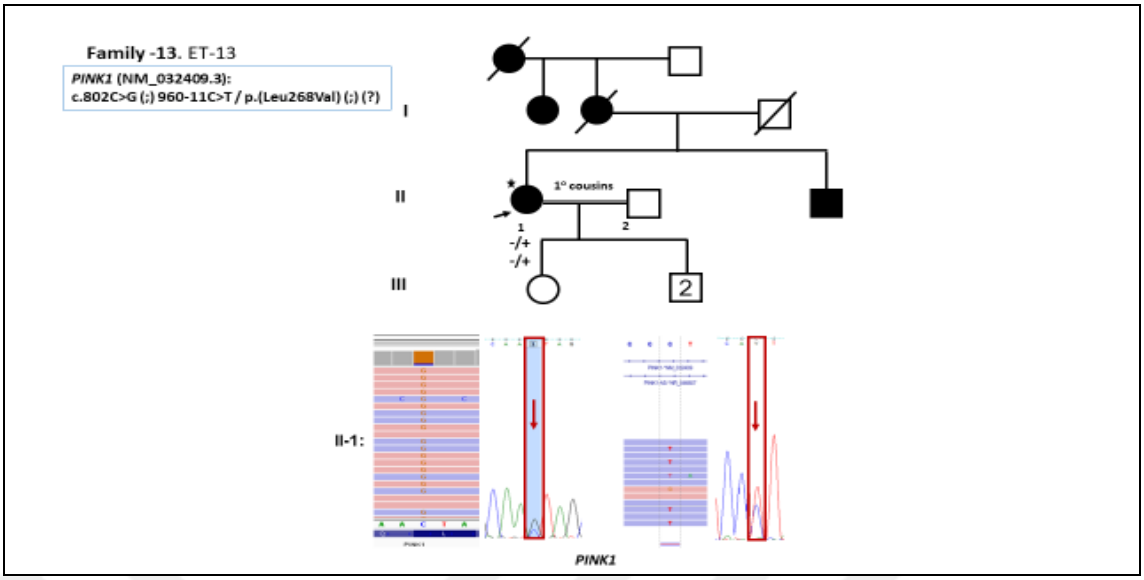
TENM4 (NM_001098816.3):
c.5462G>A/ p.(Arg1821Gln)

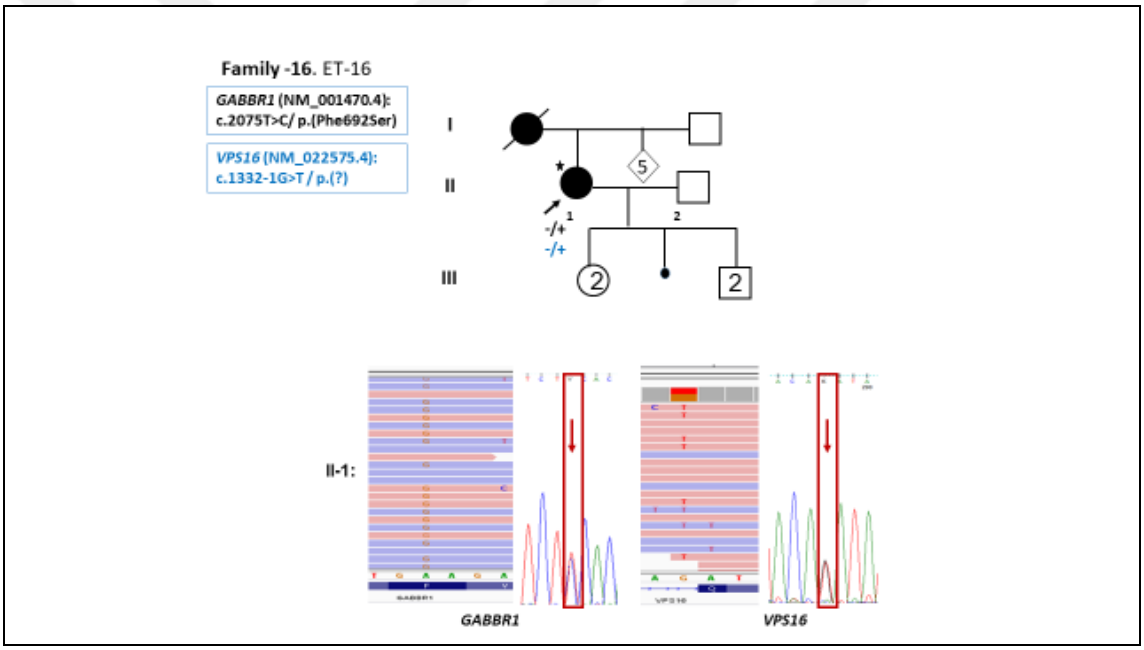


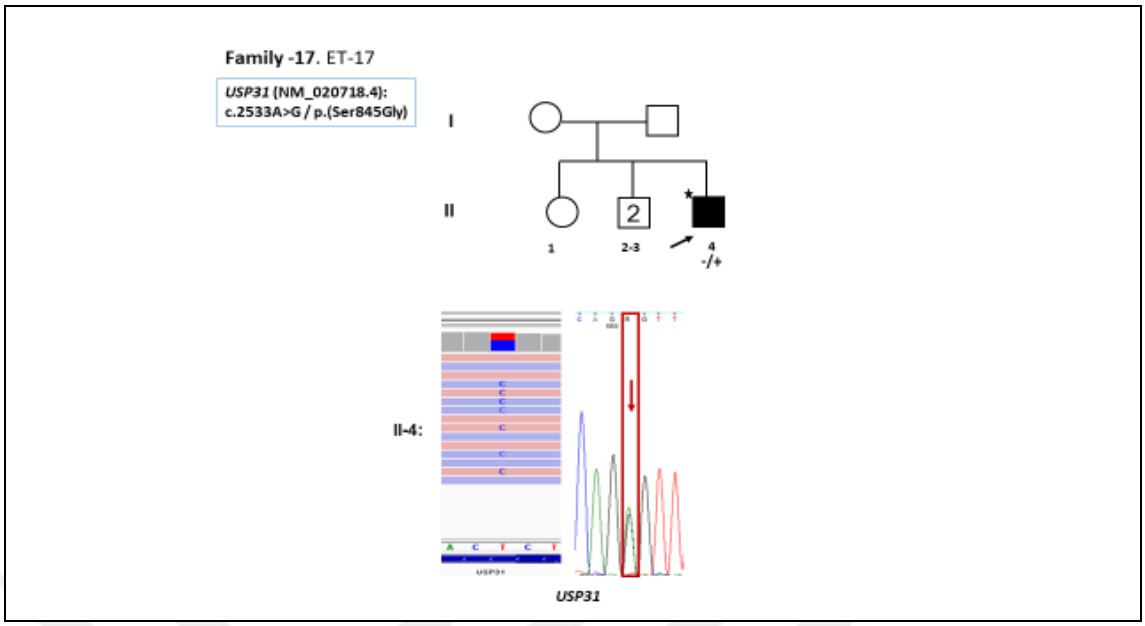
Family -12. ET-12

LRRK2 (NM_198578.3):
c.6000G>T/ p.(Val2000=)

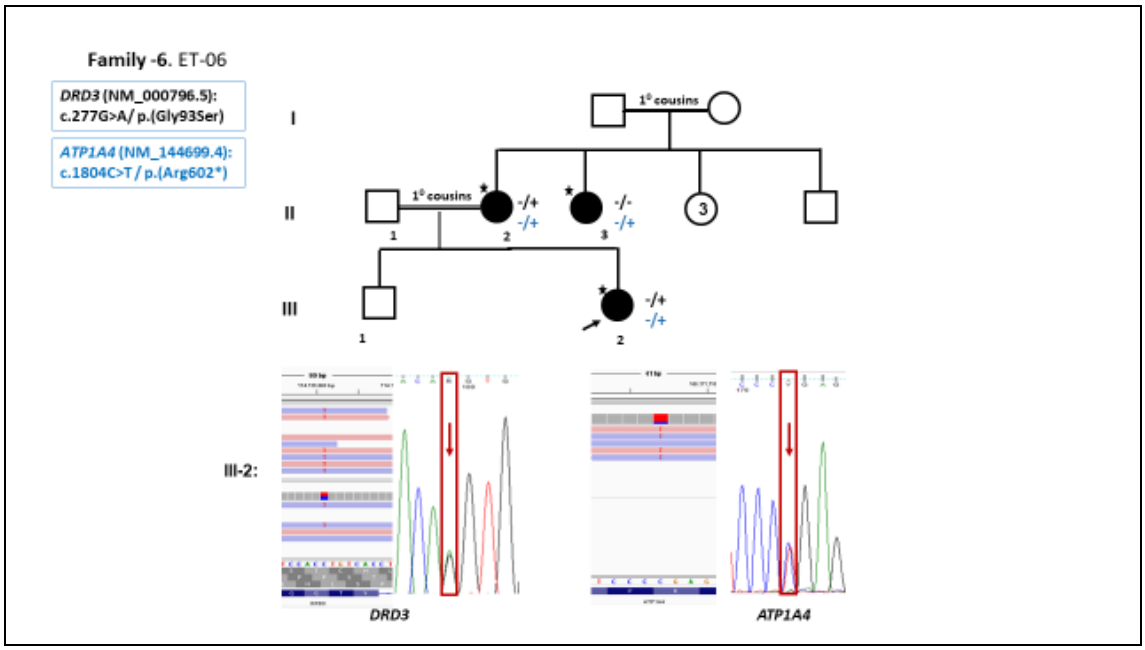


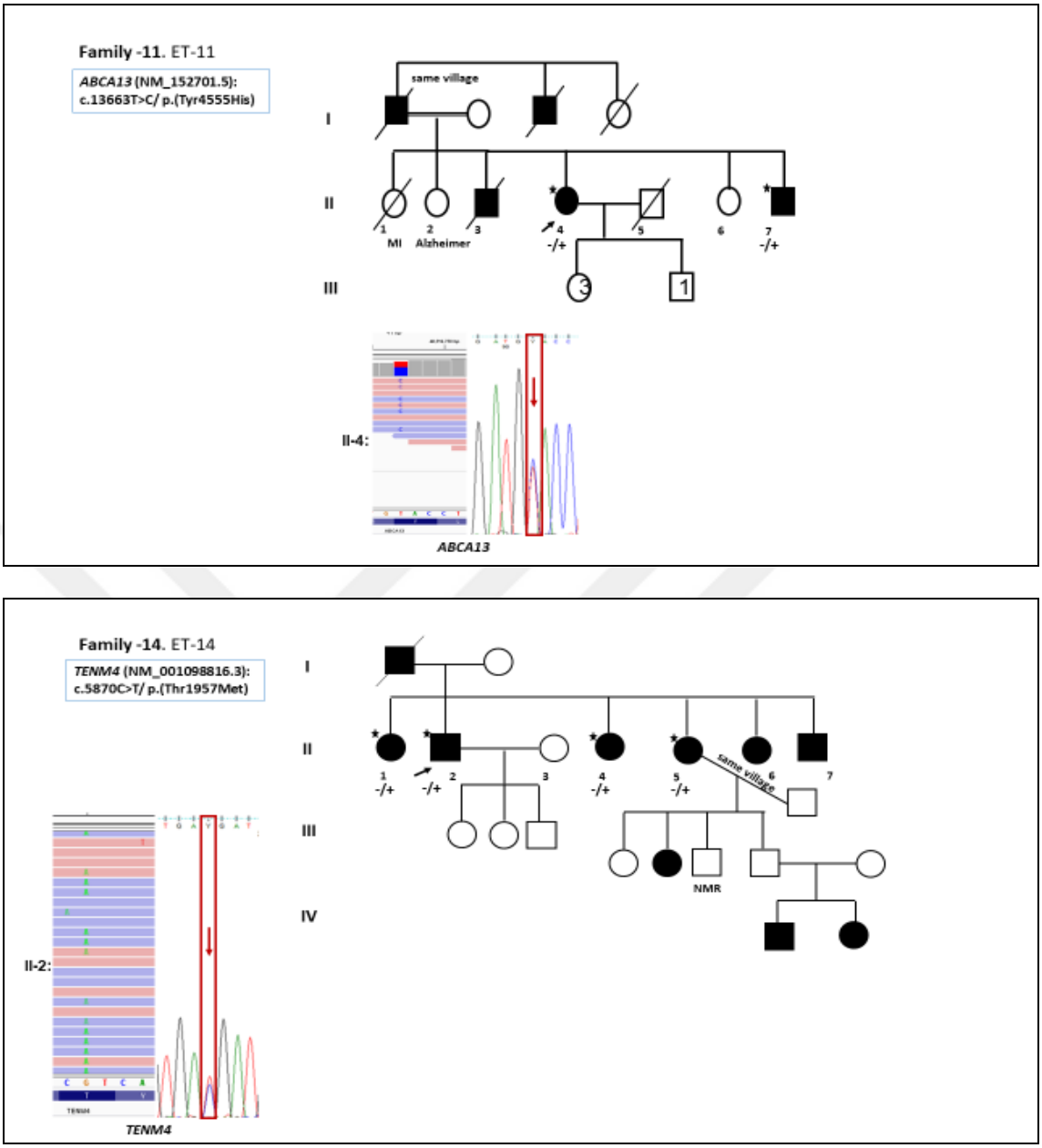

Family -13. ET-13
PINK1 (NM_032409.3):
c.802C>G (;) 960-11C>T / p.(Leu268Val) (;) (?)
I
II
III
1° cousins
1
2
-/+
-/+
2
II-1:
PINK1


Family -16. ET-16
GABBR1 (NM_001470.4):
c.2075T>C/ p.(Phe692Ser)
VPS16 (NM_022575.4):
c.1332-1G>T / p.(?)
I
II
III
5
1
2
-/+
-/+
2
2
II-1:
GABBR1
VPS16

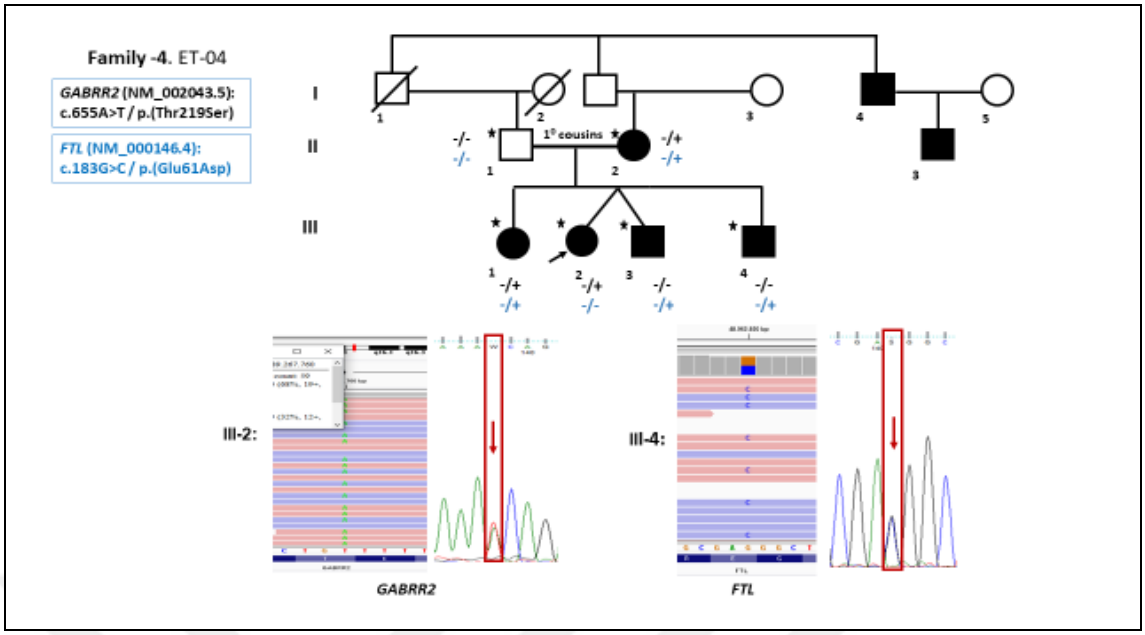


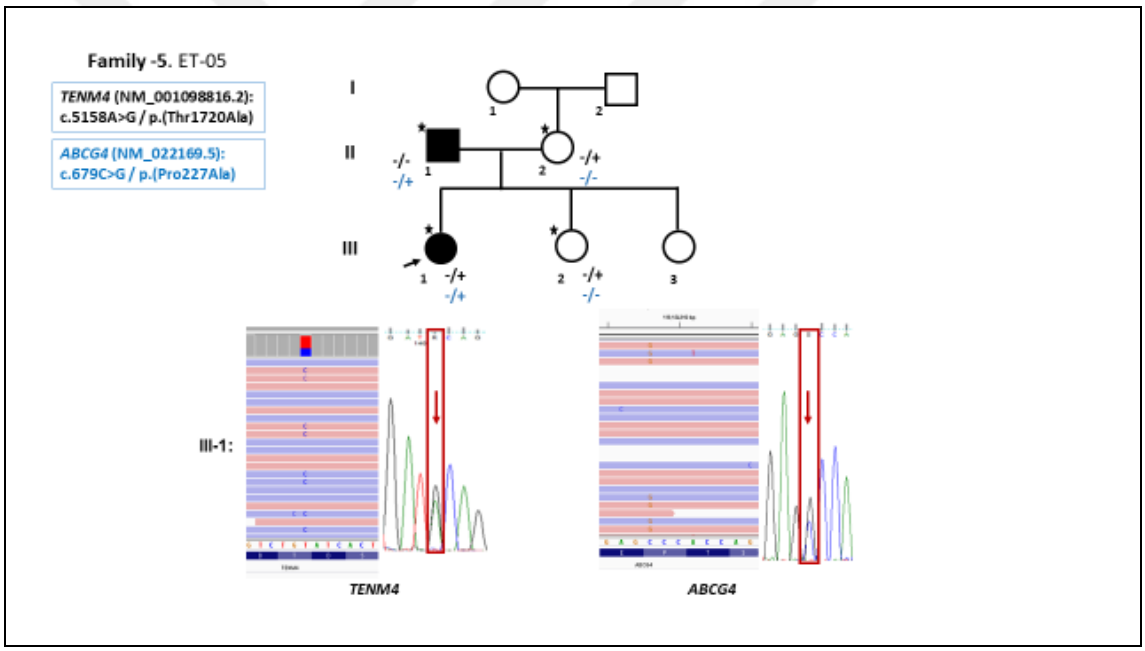
Şekil 4-3. Tablo 4-6'da yer alan altı olguya (ET-03, ET-08, ET-12, ET-13, ET-16 ve ET-17) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri (*oklarla gösterilmiştir*) ile birlikte sunulmuştur. Yıldız (*) ile işaretlenen bireyler DNA örneği sağlamış ve segregasyon analizine dahil edilmiştir. Bu bireyler için ilgili varyantlara ait Sanger kromatogramları gösterilmiştir. Varyant varlığı "+", yokluğu "–" ile belirtilmiştir; "+/–" heterozigot durumu, "–/–" ise varyantın tespit edilmediğini ifade etmektedir.

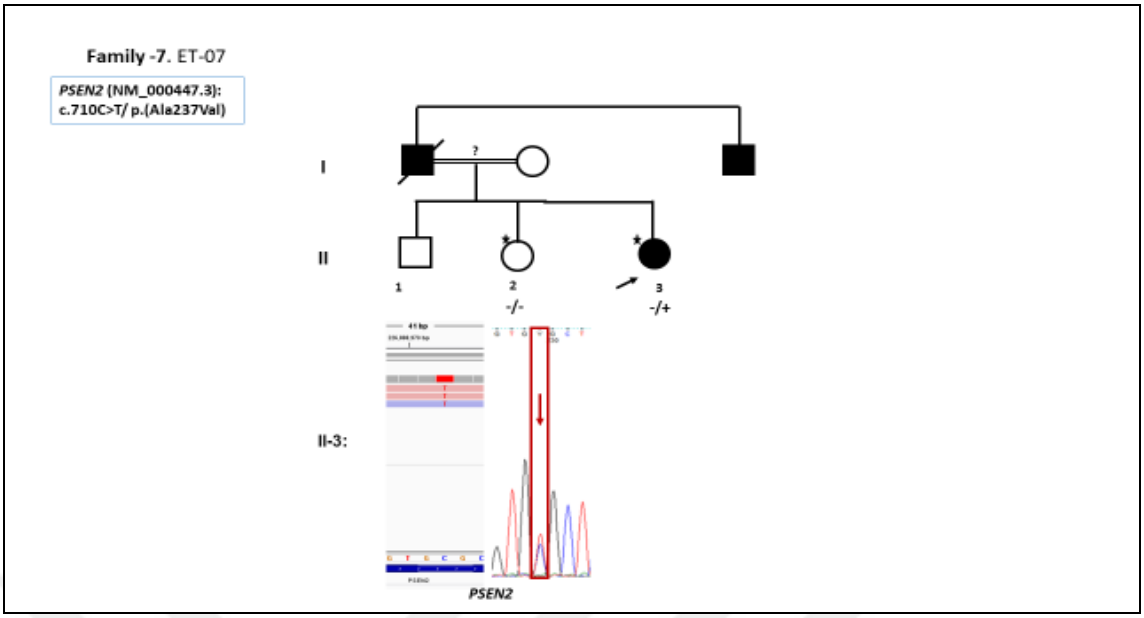




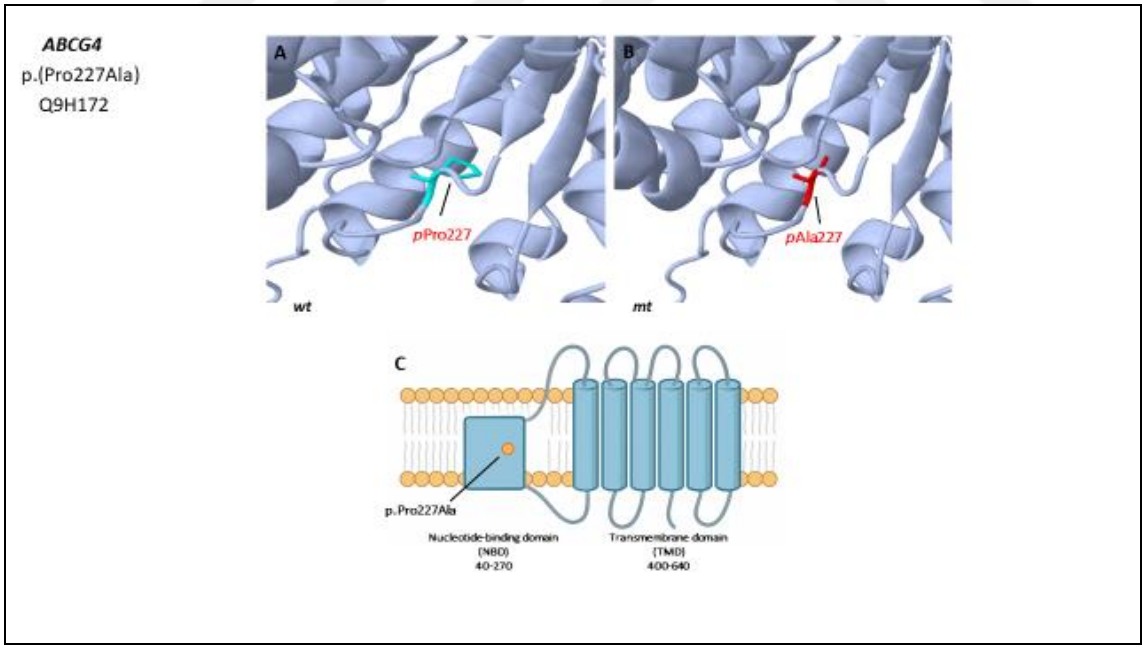
Şekil 4-4. Tablo 4-7'te yer alan üç olguya (ET-06, ET-11 ve ET-14) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri (*oklarla gösterilmiştir*) ile birlikte sunulmuştur. Yıldız (*) ile işaretlenen bireyler DNA örneği sağlamış ve segregasyon analizine dahil edilmiştir. Bu bireyler için ilgili varyantlara ait Sanger kromatogramları gösterilmiştir. Varyant varlığı "+", yokluğu "–" ile belirtilmiştir; "+/–" heterozigot durumu, "–/–" ise varyantın tespit edilmediğini ifade etmektedir.


Family -4. ET-04
GABRR2 (NM_002043.5):
c.655A>T / p.(Thr219Ser)
FTL (NM_000146.4):
c.183G>C / p.(Glu61Asp)
I
II
III
1
2
3
4
5
1º cousins
-/-
-/+
III-2:
III-4:
GABRR2
FTL


Family -5. ET-05
TENM4 (NM_001098816.2):
c.5158A>G / p.(Thr1720Ala)
ABCG4 (NM_022169.5):
c.679C>G / p.(Pro227Ala)
I
II
III
1
2
3
-/-
-/+
III-1:
TENM4
ABCG4

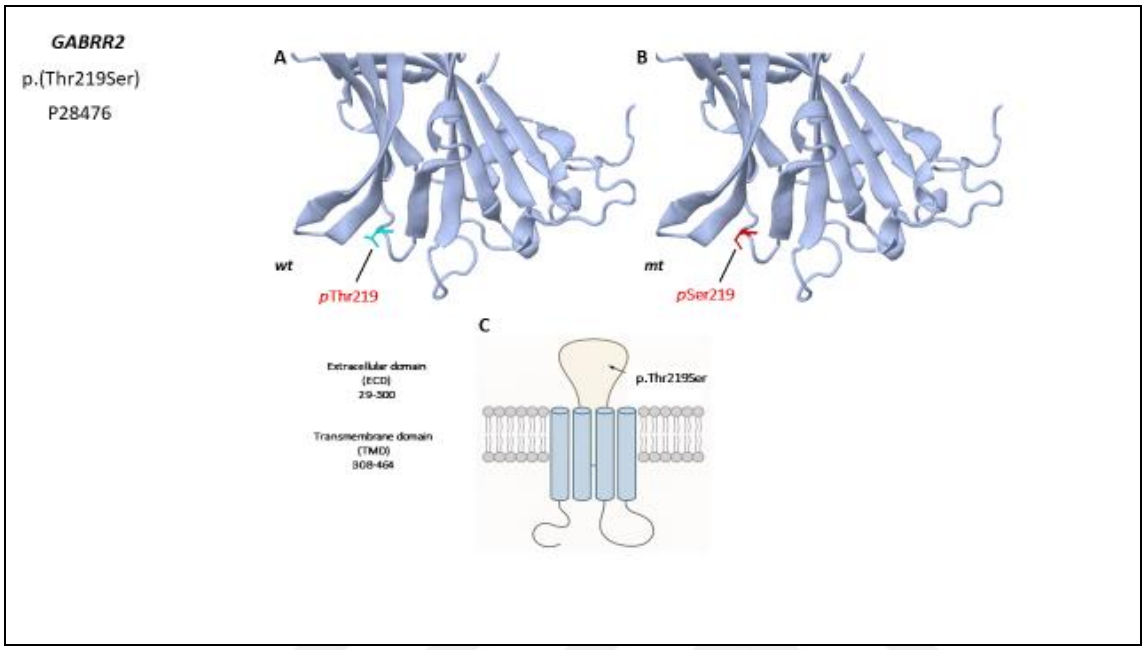


Şekil 4-5. Tablo 4-8'te yer alan üç olguya (ET-04, ET-05 ve ET-07) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri (*oklarla gösterilmiştir*) ile birlikte sunulmuştur. Yıldız (*) ile işaretlenen bireyler DNA örneği sağlamış ve segregasyon analizine dahil edilmiştir. Bu bireyler için ilgili varyantlara ait Sanger kromatogramları gösterilmiştir. Varyant varlığı "+", yokluğu "–" ile belirtilmiştir; "+/–" heterozigot durumu, "–/–" ise varyantın tespit edilmediğini ifade etmektedir.



Şekil 4-6 . *A, B.* Amino asit değişimlerinin yapısal etkisini değerlendirmek amacıyla ABCG4 proteini için öngörülen 3B protein yapıları Missense3D modelleme aracı kullanılarak oluşturulmuştur. *C.* ABCG4'ün (UniProt Q9H172) domain organizasyonunu göstermektedir; buna sitoplazmik nükleotid bağlayıcı domain (NBD) ve lipid çift tabakasını geçen altı transmembran heliks dahildir. NBD içerisinde yer alan p.(Pro227Ala) yanlış anlamlı varyantı

siyah ok ile gösterilmiştir. Bu şematik gösterim, değişime uğrayan amino asidin reverse-topoloji yarım taşıyıcı yapı içindeki konumunu vurgulamak amacıyla UniProt topolojik verileri temel alınarak oluşturulmuştur.

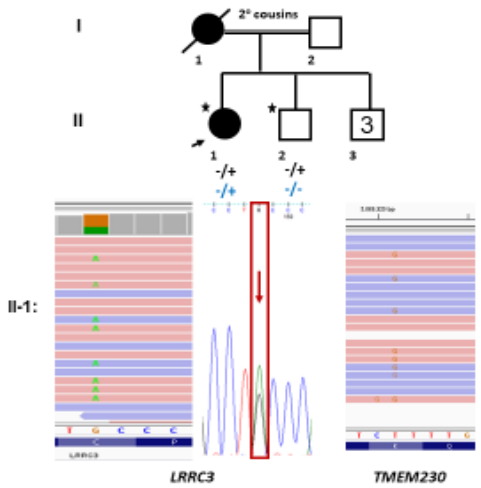


Şekil 4-8. *A, B. GABRR2* genindeki amino asit değişimlerinin yapısal sonuçlarını değerlendirmek amacıyla öngörülen 3B protein yapıları Missense3D modelleme aracı kullanılarak oluşturulmuştur. *C.* Şematik gösterim, ligand kapılı klor kanal (Cys-loop) reseptör ailesinin bir üyesi olan insan GABRR2 proteininin (UniProt P28476) öngörülen topolojik organizasyonunu göstermektedir. GABRR2 için Protein Data Bank (PDB)'ta deneysel olarak çözülmüş bir 3B yapı bulunmadığından, şekil yüksek dizi benzerliği ve yapısal korunmuşluk gösteren homolog GABRR1 alt birimi (PDB ID: 6W2J) temel alınarak modellenmiştir. Ekstrasellüler ligand bağlanma domaini (rezidüler 29–300) ve lipid çift tabakasını geçen dört transmembran α-heliks (TM1–TM4; rezidüler 308–464) gösterilmiştir. Ekstrasellüler domain içerisinde yer alan p.(Thr219Ser) yanlış anlamlı varyantı siyah ok ile belirtilmiştir.

Family -15. ET-15

LRRC3 (NM_030891.6):
c.98G>A/ p.(Cys33Tyr)

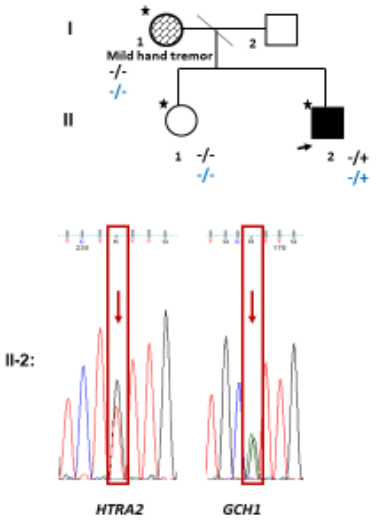
TMEM230 (NM_001330987):
c.251A>C / p.(Lys84Thr)

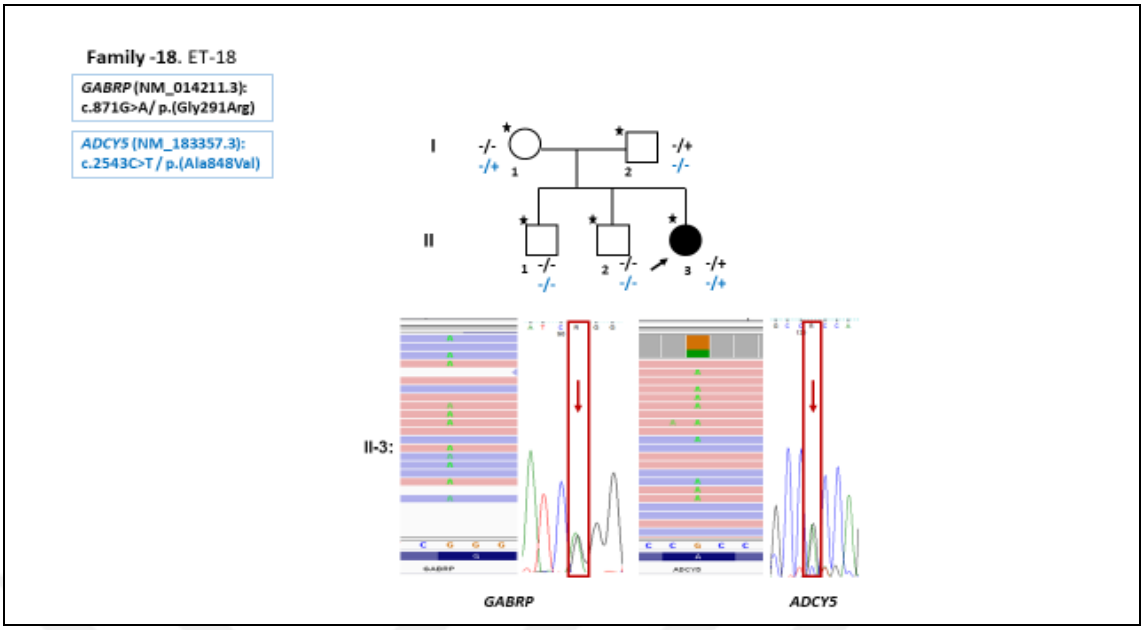


Family -20. ET-20

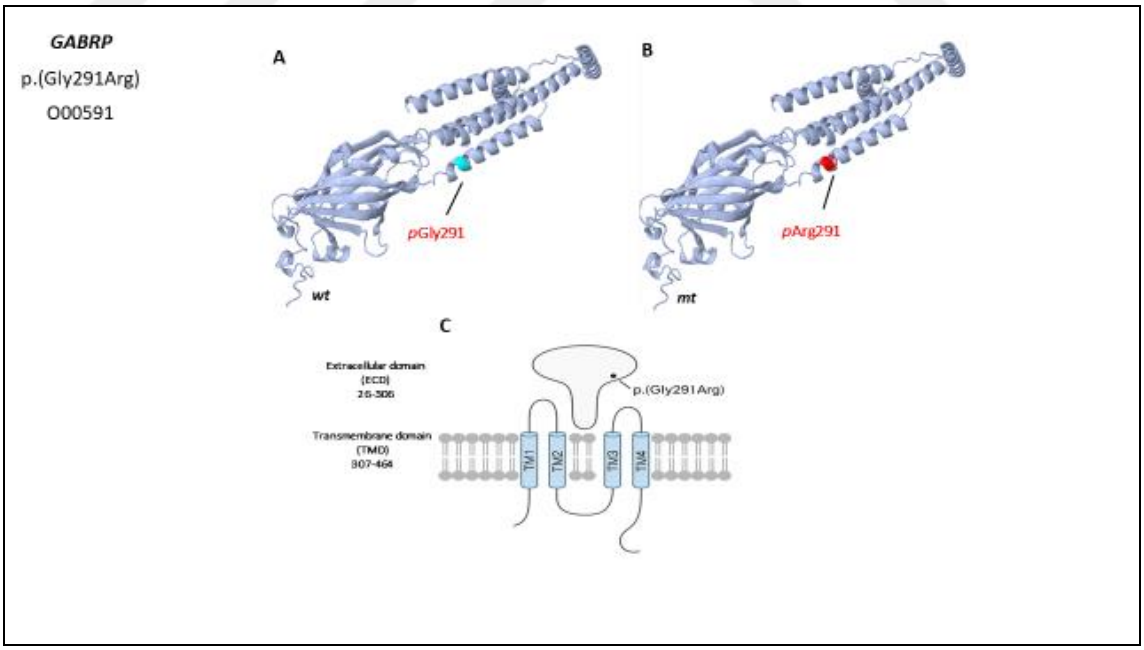
HTRA2 (NM_013247):
c.187G>T/ p.(Val63Phe)

GCH1 (NM_001024024):
c.*16+5G>A, c.*21G>A / p.(?)





Şekil 4-7. Tablo 4-6'te yer alan üç olguya (ET-15, ET-18 ve ET-20) ait soy ağaçları, indeks olgularda ekzom dizileme ile tanımlanan varyantların IGV görüntüleri (*oklarla gösterilmiştir*) ile birlikte sunulmuştur. Yıldız (*) ile işaretlenen bireyler DNA örneği sağlamış ve segregasyon analizine dahil edilmiştir. Bu bireyler için ilgili varyantlara ait Sanger kromatogramları gösterilmiştir. Varyant varlığı "+", yokluğu "–" ile belirtilmiştir; "+/–" heterozigot durumu, "–/–" ise varyantın tespit edilmediğini ifade etmektedir.



Şekil 4-9. *A, B.* İnsan GABRP proteininin (UniProt O00591) öngörülen 3B yapısı ve topolojik organizasyonu, UniProt ve yapısal domain verilerine dayanarak Missense3D modelleme aracı kullanılarak gösterilmiştir. *C.* Şekil, Cys-loop reseptör ailesine özgü olarak lipid çift tabakasını geçen dört transmembran α-heliks ile birlikte ekstrasellüler ligand bağlanma domainini göstermektedir. Ekstrasellüler domain içerisinde yer alan ve siyah ok ile gösterilen

p.(Gly291Arg) yanlış anlamlı varyantı, olası yapısal etkisini değerlendirmek amacıyla Missense3D ile modellenmiştir.

5. TARTIŞMA

ET geleneksel olarak benign bir hastalık olarak kabul edilmekle birlikte, belirgin genetik heterojenitesi ve değişken klinik ekspresyonu, yüksek penetranslı Mendelyen hastalıklarla karşılaştırıldığında tek tek varyantlar için hesaplanan patojenite skorlarının güvenilirliğini sınırlamaktadır. Tek bir güçlü nedensel varyanttan ziyade, ET'nin yaş ve çevresel faktörlerle etkileşen çok sayıda düşük penetranslı varyantın kümülatif, genetik ve çevresel bağlama bağlı etkileri sonucu olduğu düşünülmektedir (**157**). Bu model özellikle klinik anlamı belirsiz varyantlar (VUS) için önemlidir, bu varyantlar düşük penetranslı modifiye edici faktörler olarak ya da azalmış veya yaşa bağlı penetrans gösteren birincil sürücü varyantlar olarak rol oynayabilir. Bu nedenle yalnızca *in silico* patojenite tahminlerine dayanarak bir varyantın klinik önemini veya hastalıkla nedensel ilişkisini belirlemek yeterli değildir. Bu tür yorumların güvenilirliği için aile içi segregasyon analizleri, fonksiyonel veriler ve popülasyon frekansı gibi ek genetik kanıtların birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Bu veriler, ET'nin koşula bağlı ve kümülatif varyant etkileri ile karakterize poligenik veya oligogenik bir genetik mimariye sahip olduğu görüşü ile uyumludur (**158**).

ET tanısı almış 20 olgudan oluşan kohortumuzda, *ABCA13, ABCG4, ADCY5, ATP1A4, CAPN6, CSF1R, DNAJC10, DNAJC13, DRD3, FTL, GABBR1, GABBR2, GABRP, GCH1, HTRA2, KCNH8, LRRC3, LRRK2, PINK1, PLA2G3, PSEN2, TMEM230, TENM4, TRPC3, USP31, USP40* ve *VPS16* dahil olmak üzere geniş bir gen yelpazesinde nadir aday varyantlar saptanmıştır. *In silico* tahminler ve klinik sınıflandırmalar destekleyici kanıtlar sunmakla birlikte nedenselliği tam açıklayamaz, bu nedenle varyantlar ile fenotip arasındaki ilişkinin yorumlanmasında segregasyon analizi kritik önem taşımaktadır. Segregasyon analizleri, örnek alımı mümkün olan olgu alt grubunda bu varyantların aile içinde hastalık fenotipi ile birlikte kalıtımını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Etkilenen ailelerde yapılan segregasyon analizi, spesifik genetik varyantların klinik öneminin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır; ancak bu tür bulgular yorumlanırken değişken ve /veya yaşa bağlı penetransın her zaman göz önünde bulundurulması gereklidir. Her ne kadar *in silico* tahmin araçları varyantların potansiyel fonksiyonel etkilerine dair değerli bilgiler sunsa da, yüksek patojenite skorları tek başına nedenselliğin kesin kanıtı olarak kabul

edilemez. ET'nin düşük penetrans ve değişken ekspresivite ile karakterize olması, ayrıca olası çevresel modifiye ediciler ve poligenik katkılar, tanımlanan varyantların dikkatli bir şekilde yorumlanmasını gerektirmektedir. Segregasyon analizi sonuçlarına dayanarak yedi ailede *USP40, PLA2G3, CSF1R, DNAJC10, TENM4, DRD3, TRPC3, CAPN6, KCNH8* ve *LRRC3* genlerinde heterozigot olarak saptanan başlangıç aday varyantlar hastalık fenotipi ile birlikte kalıtım göstermemişlerdir (**Tablo 4-4**). Altı tekil ailede (ET-03, ET-08, ET-12, ET-13, ET-16 ve ET-17) (**Tablo 4-7**), ek aile bireylerine ulaşılamaması nedeniyle analizler yalnızca etkilenmiş bireylerle sınırlı kalmıştır. Bu olgular genelinde yedi farklı aday varyant tanımlanmış olup, bu durum ET'nin altında yatan genetik heterojeniteyi ve kompleks kalıtım paternlerini ortaya koymaktadır. ET-03`de gerçekleştirilen solo ED ile *DNAJC13* geninde novel yanlış anlamlı değişiklik, c.805A>G p.(Thr269Ala) saptanmıştır. Varyasyona yüksek derecede intolerans gösteren bir gen olan *DNAJC13* (*missense* Z-skoru=3.39, pLI=1), endozomal taşınım bozuklukları ve α-sinüklein birikimi yoluyla PH patogenezinde rol oynamaktadır. p.(Asn855Ser) *DNAJC13* varyantının ET ile ilişkilendirilmiş olması, bu genin tremor bozukluklarındaki rolünü düşündürmektedir (**159**). Ayrıca bazı ET hastalarında Lewy cisimciklerinin gösterilmiş olması, patolojik bir spektruma işaret etmektedir (**160**). Korunmuş bir transmembran domain içerisinde yer alan p.(Thr269Ala) varyantı ve yüksek CADD skoru (23.4) güçlü bir aday olmakla birlikte, orta düzey REVEL skoru (0.207) daha hafif bir etki veya düşük penetrans olasılığına işaret etmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, *DNAJC13* disfonksiyonunun ET etiyolojisinde rol oynayabileceği desteklenmektedir. ET-08 ve ET-14 olgularında, iki farklı *TENM4* varyantı saptanmıştır: c.5462G>A; p.(Arg1821Gln) ve c.5870C>T; p.(Thr1957Met). Bu varyantlar proteinin hücre-hücre etkileşimlerinde önemli rol oynayan Teneurin YD-Shell bölgesinde yer almaktadır. *TENM4* daha önce birçok ailede herediter ET ile ilişkilendirilmiştir. Değişken penetrans, gen–çevre etkileşimlerini ve PH gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarla kısmi örtüşmeyi düşündürmektedir. Nitekim bazı *TENM4* varyantlarının erken başlangıçlı PH riskini artırabileceği bildirilmiştir (**161**). *In silico* analizler bu varyantların patojenik potansiyelini desteklemektedir. ET-08 olgusunda yalnızca bir birey analiz edilmiş olsa da, p.(Thr1957Met) varyantının birden fazla etkilenmiş kardeşte bulunması ve nadirliği, bu varyantın potansiyel nedensel rolünü güçlendirmektedir.

ET-12 olgusunda heterozigot bir *LRRK2* sessiz varyantı (c.6000G>T; p.(Val2000=)) saptanmıştır. Mevcut veriler bu varyantın primer nedensel bir değişiklik olmadığını göstermektedir, ancak düşük penetranslı bir modifiye edici rolü olabilir. *LRRK2*, otozomal dominant Parkinson hastalığının en sık genetik nedenlerinden biridir ve tremor-dominant fenotiplerle güçlü şekilde ilişkilidir. ET ile ilişkisi ise zayıf ve tartışmalıdır (**162**). ET-13 olgusunda iki heterozigot *PINK1* varyantı belirlenmiştir: c.802C>G; p.(Leu268Val) ve intronik c.960-11C>T. *PINK1*, klasik olarak otozomal resesif erken başlangıçlı PH ile ilişkilidir. Ancak bazı heterozigot varyantların mitokondriyal disfonksiyon yoluyla ET ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (**163**). p.(Leu268Val) varyantı kinaz domeninde yer almakta ve VUS olarak sınıflandırılmaktadır ve hesaplamalı veriler sınırlı destek sunmaktadır (CADD: 17.56, REVEL: 0.55). İntronik varyantın kırpılmayı etkilemesi beklenmemektedir ve muhtemelen zararsızdır. Her iki varyant da Turkish Variome ve küresel veri tabanlarında son derece nadir olup, tesadüfi olarak birlikte bulunmuş olabileceklerini düşündürmektedir. Genel olarak bu bulgular, ET-13 olgusundaki *PINK1* varyantlarının kesin nedensel faktörler olmaktan ziyade aday gözlemler olduğunu göstermekte ve segregasyon analizi ile fonksiyonel çalışmalar dahil ileri düzey araştırmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

ET-16 olgusunda *GABBR1* (c.2075T>C; p.(Phe692Ser)) ve *VPS16* (c.1332-1G>T) genlerinde iki heterozigot varyant saptanmış olup, literatürde doğrudan ilişki tanımlanmamış olsa da olası digenik etkiyi düşündürmektedir. *GABBR1* varyantı inhibitör GABA-B reseptör alt birimini etkilemekte olup, hesaplamalı analizlerde güçlü patojenite kanıtı göstermekte ve yüksek derecede korunmuş bir bölgede yer almaktadır (PhyloP 8.72). Önceki çalışmalar *GABBR1* varyantlarını ağırlıklı olarak nörogelişimsel gecikme, epilepsi ve Rett-benzeri fenotiplerle ilişkilendirmiştir (**164**); ancak GABA-B reseptörleri, pre- ve postsinaptik inhibisyonu G-protein aracılı sinyal ile gerçekleştirir. Dikkat çekici olarak, iyon kanalı yapısına sahip GABA-A reseptör polimorfizmlerine yönelik önceki çalışmalar, ET sıklığı ile anlamlı bir ilişki göstermemiştir (**165**). *VPS16* varyantının kırpılmayı bozarak nöronal sağkalım için kritik olan endolizozomal ve veziküler taşınımı düzenleyen HOPS/CORVET kompleksini olumsuz etkilediği düşünülmektedir (**166**). Bir öngörü olarak, *GABBR1* varyantının GABAerjik sinyallemeyi zayıflattığını, *VPS16* varyantının ise reseptör geri dönüşümü ve yıkımını

bozarak bu etkiyi daha da artırdığı düşünülebilir. Endozomal taşınım ile inhibitör nörotransmisyonun kesişiminde yer alan bu olası *GABBR1–VPS16* sinerjisinin, nöronal hiperexsitabiliteye ve tremora yol açabileceği düşünülebilir..

ET-17 olgusunda nadir bir *USP31* varyantı (c.2533A>G; p.(Ser845Gly)) tanımlanmıştır. *USP31*, NF-κB sinyal yolunu ve apoptotik süreçleri düzenleyen bir deubikütinazdır. *USP31*, *USP24* ve *USP40* varyantlarının, PH da dahil olmak üzere nörodejeneratif ve hareket bozuklukları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (**167**). USP gen ailesinin bazı üyeleri nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiş olsa da, bu varyantın ET ile doğrudan ilişkisini destekleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Varyant VUS olarak sınıflandırılmakta olup, patojenitesinin belirlenmesi için segregasyon analizi ve fonksiyonel çalışmalar ile ilişkisinin desteklenmesi gereklidir.

Bu çalışmada belirlenen varyantların büyük çoğunluğunun, aile içi segregasyon gösterenler de dahil olmak üzere, VUS olarak sınıflandırılmış olması dikkat çekicidir. Bu durum, ET'nin basit bir Mendelyen kalıtım modelinden ziyade karmaşık bir genetik mimariye sahip olduğu hipotezini desteklemektedir. Özellikle ET-06'da *ATP1A4*, ET-11'de *ABCA13* ve ET-14'te *TENM4* varyantlarının her bir ailede etkilenen tüm bireylerde bulunması dikkat çekicidir. Ayrıca *ABCG4*, *ADCY5*, *FTL*, *GABBR2*, *GABRP*, *GCH1*, *HTRA2*, *PSEN2* ve *TMEM230* genlerindeki varyantların etkilenen aile içi bireylerde bulunup etkilenmemiş aile bireylerinde bulunmaması, bu genlerin ET ile potansiyel ilişkisine dair sınırlı da olsa destekleyici kanıt sağlamaktadır. Bu bireylerdeki aday genler, özellikle nörolojik süreçler ve hastalık mekanizmalarındaki olası rolleri dikkate alınarak translasyonel ve hücresel fonksiyonları açısından değerlendirilmiştir (**Tablo 5-1**).

Tablo 5-1. ET ile lişkili aday genlerin fonksiyonel karakterizasyonu.

Fonksiyonel Kategori	Gen	Temel Fonksiyon / Moleküler Rol	İlgili Yolak veya Süreç	ET / Sinir Sistemi ile Olası İlişki
NÖROTRANSMİSYON VE SİNAPTİK DÜZENLEME	***GABBR2*** (***168***)	GABA_B reseptörünün alt birimi olan GABBR2'yi kodlar; Gi/o-bağlı sinyalizasyon yoluyla yavaş inhibitör nörotransmisyonu düzenler	GABAerjik sinaptik iletim; cAMP düzenlenmesi	İnhibitör kontrolün bozulması tremor devrelerinde nöronal eksitabiliteyi artırabilir
	GABRP	Ligand kapılı klor	İyonotropik	İnhibitör reseptör

	(***169***)	kanalları oluşturan GABA_A reseptörünün π alt birimi	GABAerjik nörotransmisyon	kompozisyonundaki değişiklikler talamokortikal ritmin bozulmasına neden olabilir
	ADCY5 (***170***)	cAMP sentezini katalizleyen adenilat siklaz izoformu; dopamin ve adenozin reseptörleri üzerinden GPCR sinyalizasyonunu modüle eder	cAMP-bağımlı sinyal iletimi; bazal ganglion motor kontrolü	cAMP sinyalizasyonunun düzensizliği motor devre eksitabilitesini ve ritmik aktiviteyi etkileyebilir
	TENM4 (***171***)	Akson yönlendirmesi ve sinaptik organizasyonda rol alan transmembran protein	Nöronal bağlantısallık; aksonal yol bulma	Aksonal organizasyon bozukluğu serebellokortikal iletişimi değiştirebilir
	GCH1 (***172***)	Tetrahidrobiopterin (BH4) sentezinin ilk basamağını katalizleyen GTP siklohidrolaz I	Dopamin, serotonin ve nitrik oksit sentezi	BH4 eksikliği dopamin biyosentezini bozarak tremor kontrolünde rol oynayan nörotransmisyonu etkileyebilir
VEZİKÜLER VE MEMBRAN TAŞINIMI	***TMEM230*** (***173***)	Endozomal ve sinaptik vezikül taşınımını düzenleyen transmembran protein	Dopaminerjik vezikül geri dönüşümü ve ekzosit	Veziküler taşınım bozukluğu tremorla ilişkili dopaminerjik nörotransmisyonu etkileyebilir
	ABCA13 (***174***)	Lipid ve fosfolipid taşınımını düzenleyen büyük ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısı	Membran lipid homeostazı; endozomal geri dönüşüm	Lipid taşınımındaki değişiklikler vezikül yapısını ve nöronal sinyalizasyonu etkileyebilir
	ABCG4 (***175***)	Nöron ve glialarda kolesterol dışa taşınmasını düzenleyen ABC taşıyıcısı	Kolesterol homeostazı ve lipid taşınımı	Kolesterol dengesinin bozulması sinaptik membran akışkanlığını ve reseptör fonksiyonunu etkileyebilir
	ATP1A4 (***176***)	Membranlar arası iyon gradyanını sürdüren Na^+/K^+-ATPaz α4 alt birimi	İyon taşınımı; membran potansiyeli düzenlenmesi	İyon homeostazındaki bozukluk motor yolaklarda nöronal ateşleme stabilitesini bozabilir
MİTOKONDRİYAL FONKSİYON VE PROTEİN KALİTE	***HTRA2*** **(OMI)** (***117***)	Apoptozu ve stres yanıtını düzenleyen mitokondriyal serin	Mitokondriyal protein katlanma yanıtı;	Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres

KONTROLÜ		proteaz	apoptoz sinyalizasyonu	dopaminerjik nöronların hassasiyetini artırabilir
	PSEN2 (***178***)	γ-sekretaz kompleksinin bir bileşeni; APP ve Notch işlenmesini düzenler	Hücre içi sinyalizasyon; mitokondriyal fonksiyon	Nöronlarda kalsiyum homeostazı ve mitokondriyal stabiliteyi etkileyebilir
METAL VE REDOKS HOMEOSTAZI	***FTL*** (***179***)	Demir depolanması ve detoksifikasyonundan sorumlu ferritin hafif zinciri	Demir metabolizması; oksidatif stres düzenlenmesi	Artmış demir birikimi oksidatif nöronal hasara ve motor disfonksiyona katkıda bulunabilir

ET veya daha geniş anlamda motor devre fizyolojisi ile potansiyel olarak ilişkili genlerin başlıca fonksiyonel kategorilerini, moleküler rollerini ve nörobiyolojik yolaklarını özetlemektedir. Genler, nörotransmisyon ve sinaptik düzenleme, veziküler ve membran taşınımı, mitokondriyal fonksiyon ve protein kalite kontrolü ile metal ve redoks homeostazı olmak üzere başlıca fonksiyonel alanlara göre gruplandırılmıştır.

5.1. Nörotransmisyon ve Sinaptik Düzenleme ile İlişkili Genler

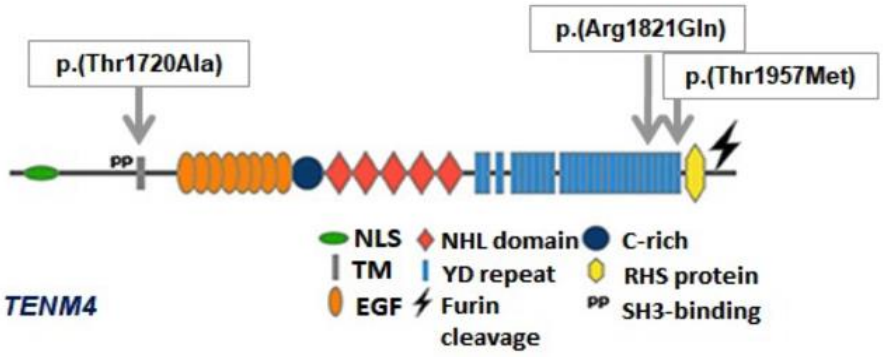
GABBR2, GABRP, ADCY5, TENM4 ve *GCH1* genleri inhibitör nörotransmisyon, hücre içi sinyal iletimi ve serebellotalamik devre bütünlüğünü düzenleyen moleküler yolaklarda birleşmektedir. Bu süreçler giderek artan şekilde ET'nin nörobiyolojisinde rol oynayan mekanizmalar olarak kabul edilmektedir.

GABBR2 (Gamma-aminobütirik asit tip B reseptör alt birimi 2), merkezi sinir sisteminde yavaş ve uzun süreli inhibitör nörotransmisyonu sağlayan GABA_B reseptörünün temel bileşenlerinden biridir. *GABBR2*'deki patojenik varyantlar çeşitli nöropsikiyatrik ve epileptik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. GABBR1 ile heterodimerizasyon sonrasında reseptör Gi/o proteinlerine bağlanarak adenilat siklaz inhibisyonuna, cAMP/PKA sinyalizasyonunun azalmasına, presinaptik Ca^{2+} kanallarının baskılanmasına ve postsinaptik GIRK potasyum kanallarının aktivasyonuna yol açar. Bu mekanizma yavaş inhibitör postsinaptik yanıtlar oluşturur ve nörotransmitter salınımını sınırlar (**168**). ET-04 ailesinde gözlenen segregasyon paternine dayanarak, her iki varyant günümüzde VUS olarak sınıflandırılmış olsa da *GABBR2* c.655A>T ve *FTL* c.183G>C varyantlarının, bağımsız olarak veya birlikte fenotipe katkıda bulunabileceği düşünülebilir. *In silico* protein yapı tahmin modellerine (Missense3D) göre, *GABBR2 p*Thr219 rezidüsü ligand bağlanma arayüzüne yakın konumda olup,

treoninin serin ile değişimi kimyasal olarak konservatif olmasına rağmen lokal hidrojen bağlarını hafif düzeyde etkileyebilir ve reseptör–ligand etkileşim dinamiklerini değiştirebilir; bu durum, *GABRR2* genindeki bu amino asit değişiminin reseptör fonksiyonu üzerinde ince düzeyde yapısal ve fonksiyonel etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir. ET-18 bireyinde, biri *GABRP* (c.871G>A), diğeri *ADCY5* (c.2543C>T) geninde olmak üzere iki nadir VUS varyantı saptanmıştır. *GABRP*, GABA-A reseptörünün π alt birimini kodlar. Bu alt birim ağırlıklı olarak periferik dokularda ifade edilse de serebellum dahil bazı beyin bölgelerinde de bulunur. GABA-A reseptör alt birim kompozisyonundaki değişiklikler inhibitör postsinaptik akımları değiştirebilir, talamokortikal osilasyonları bozabilir ve tremor oluşumu ile ilişkili hipersenkron aktiviteyi artırabilir (**169**). Ekstrasellüler domain içerisinde yer alan *GABRP* genindeki p.(Gly291Arg) yanlış anlamlı varyantının olası yapısal etkilerini değerlendirmek amacıyla *in silico* protein yapı tahmin modeli (Missense3D) kullanılarak analiz edilmiş, küçük ve nonpolar bir amino asit olan glisinin, hacimli ve pozitif yüklü bir arginin ile yer değiştirmesi, lokal protein katlanmasını bozarak ligand bağlanma dinamiklerini etkileyebileceği; söz konusu varyantın reseptör fonksiyonu üzerinde yapısal ve fonksiyonel etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir. *ADCY5* geni ise adenilat siklaz tip 5 enzimini kodlar ve cAMP sentezini katalizler. *ADCY5*'teki heterozigot fonksiyon kazanımı varyantları ailesel diskinezi, kore ve diğer hiperkinetik hareket bozukluklarının bilinen nedenleridir (MIM#606703) (**170**). Bu gen striatum ve diğer bazal ganglion yapılarında yüksek düzeyde ifade edilir ve aşırı cAMP sinyali normal nöronal ateşleme paternlerini bozabilir. Bu iki varyantın birlikte bulunması tesadüfi olabileceği gibi ortak yolaklar üzerinden modifiye edici etkiler de gösterebilir ve oligogenik etki ile uyumlu olabilir. *GABRP* varyantı GABAerjik inhibisyonu zayıflatırken *ADCY5* varyantı aşırı cAMP sinyalizasyonuna yol açabilir. Bu durum bazal ganglion-talamokortikal devrelerde uyarıcı-inhibitör dengenin bozulmasına ve tremor için gerekli osilatuvar aktivite eşiğinin düşmesine neden olabilir.

TENM4, akson yönlendirmesi ve nöronal bağlantıların oluşumunda rol oynayan teneurin ailesi proteinlerinden birini kodlar. *TENM4* varyantlarının ET ailelerinde bildirildiği ve serebellokortikal devre stabilitesini bozabileceği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (**171**). Bu durum ET'nin serebellar osilatuvar bozukluk olarak ele alındığı modellerle uyumludur. *TENM4* varyantlarının değişken penetransı

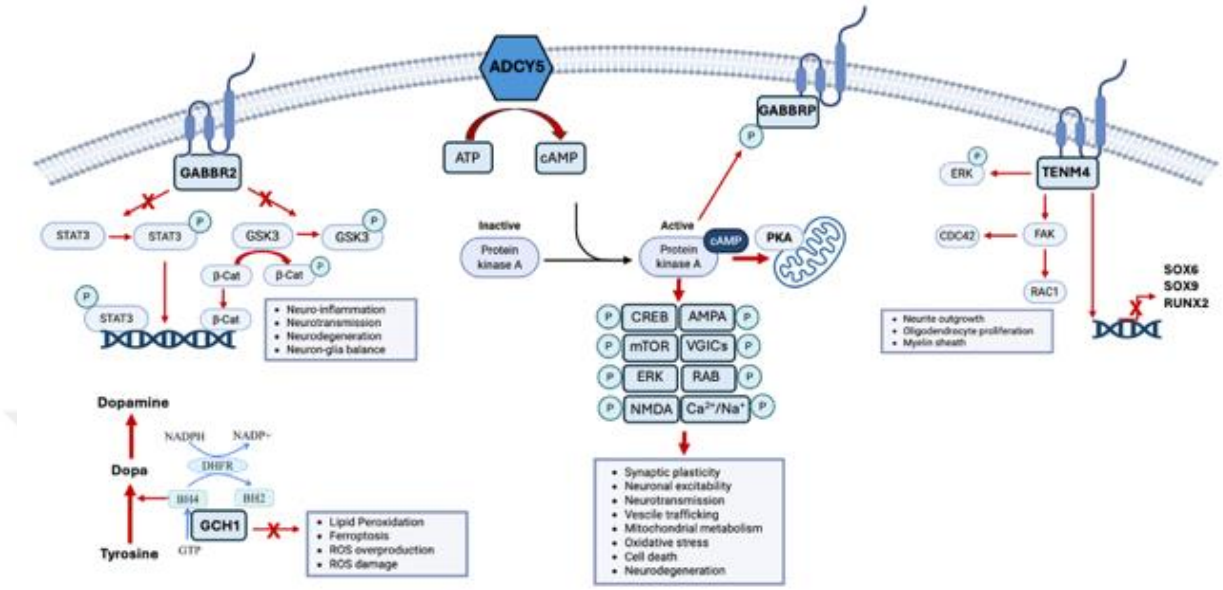
gen-çevre etkileşimlerine işaret etmekte ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklarla örtüşme göstermektedir (**171**). Çalışmamızda üç farklı *TENM4* varyantı saptanmıştır: ET-05: transmembran domainde c.5158A>G; p.(Thr1720Ala), ekstrasellüler domainde ise ET-08: c.5462G>A; p.(Arg1821Gln) ve ET-14: c.5870C>T; p.(Thr1957Met). ET-05'teki varyant segregasyon analizi ile dışlanmış, ET-08 ve ET-14'teki varyantlar ise yalnızca etkilenen bireylerde bulunmaları nedeniyle olası aday varyantlar olarak değerlendirilmiştir (**Şekil 5-1**).



Şekil 5-1. *TENM4* varyantlarının lokalizasyonu.

GCH1, dopamin, serotonin ve nitrik oksit sentezinde kofaktör olan tetrahidrobiopterin (BH4) üretiminin hız kısıtlayıcı enzimini kodlar (**Şekil 5-2**). Monoallelik *GCH1* varyantları dopa-yanıtlı distoniye neden olmakta ve ET ile örtüşen erişkin başlangıçlı tremor fenotipleri ile ilişkilendirilmektedir (**172**). BH4 homeostazındaki bozulma serebellotalamik ve bazal ganglion devrelerinde dopaminerjik sinyalleşmeyi etkileyerek tremor oluşumuna katkıda bulunabilir (**180**). ET-20 ailesinde saptanan intronik *GCH1* c.16+5G>A (rs746660567) varyantının SpliceAI analizi (skor 0.84) donör-kırpılma bölgesini bozma olasılığının yüksek olduğunu göstermiştir. Bu etkinin, 3′ *untranslated region* (UTR) içerisinde kriptik bir kırpılma bölgesinin oluşumu ile ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Bu durum, varyantın atipik lokalizasyonuna rağmen hatalı kırpılmaya, transkript instabilitesi veya *GCH1* fonksiyon kaybına yol açabilir. Bu varyant, mitokondriyal serin proteaz Omi'yi kodlayan ve protein kalite kontrolü ile stres kaynaklı apoptoz süreçlerinde rol alan *HTRA2* genindeki bir yanlış anlamlı varyantla birlikte saptanmıştır (c.187G>T; p.(Val63Phe); rs756256747) (**Şekil 5-3**). Literatürde *HTRA2* varyantlarının hem ET hem de PH spektrumunda tremor fenotipleri ile ilişkilendirildiği göz önüne alındığında,

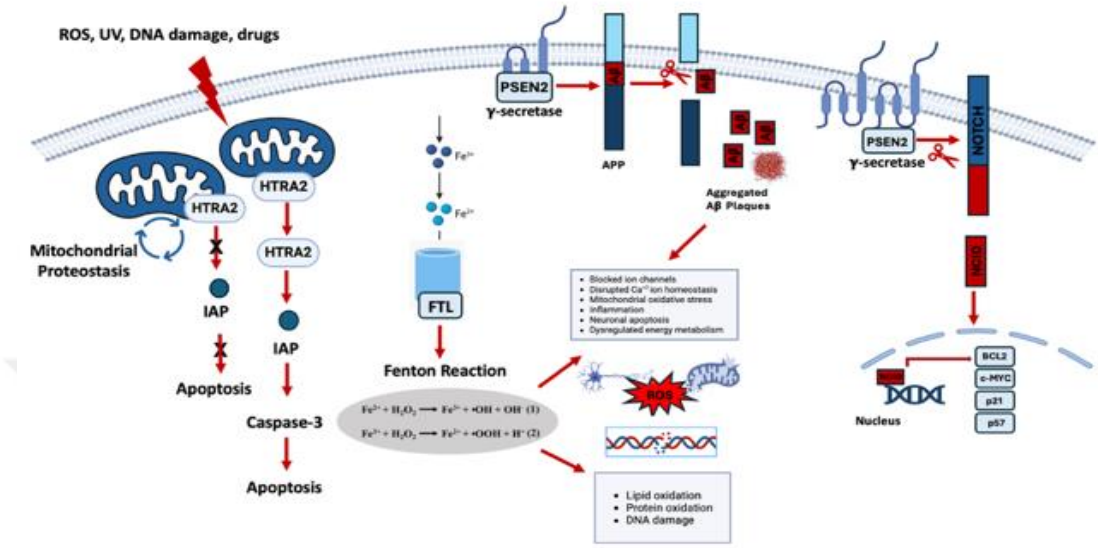
bu varyantların birlikte segregasyonu hareket bozukluklarında ortak bir patojenik mekanizmaya işaret edebilir (**177,181**).



Şekil 5-2. GABAerjik reseptörler, cAMP–PKA sinyal yolu, sitoskeletal düzenleme ve redoks homeostazı arasında bağlantı kuran entegre sinyal yolakları. *GABBR2, GABBRP, ADCY5, TENM4* ve *GCH1* genlerinin rollerini vurgulayan membran ilişkili ve hücre içi yolakların şematik gösterimi.

GABBR2 (γ-aminobütirik asit tip B reseptör alt birim 2) aracılı sinyallemenin inhibisyonu, STAT3 ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) fosforilasyonunu etkileyerek nöroinflamasyon, nörotransmisyon, nörodejenerasyon ve nöron–glia dengesi ile ilişkili β-katenin (β-Cat) bağımlı transkripsiyonu modüle eder. ADCY5 (adenilat siklaz 5), ATP'yi cAMP'ye dönüştürerek protein kinaz A (PKA) aktivasyonuna yol açar; PKA ise CREB, mTOR, ERK, NMDA/AMPA reseptörleri, voltaj kapılı iyon kanalları (VGIC'ler) ve RAB proteinleri dahil olmak üzere aşağı akım hedefleri fosforile eder. Bu süreçler sinaptik plastisite, nöronal uyarılabilirlik, vezikül taşınımı, mitokondriyal metabolizma, oksidatif stres yanıtları ve hücre sağkalımını düzenler. GABBRP (GABA tip B reseptör alt birimi psödojeni), cAMP–PKA sinyal yolunu etkileyen modülatör bir bileşen olarak gösterilmiştir. TENM4 (teneurin transmembran protein 4), FAK–CDC42–RAC1 sinyal yolunu ve ERK fosforilasyonunu aktive ederek nöron uzantılarının gelişimi, oligodendrosit proliferasyonu, miyelin kılıf oluşumu ve *SOX6, SOX9* ve *RUNX2*'nin transkripsiyonel düzenlenmesine katkıda bulunur. Buna paralel olarak GCH1 (GTP siklohidrolaz 1), tetrahidrobiopterin (BH4) biyosentezini düzenleyerek tirozin üzerinden

dopamin üretimini etkiler ve oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, ferroptozis ve reaktif oksijen türleri (ROS) dengesi üzerinde rol oynar.



Şekil 5-3. *HTRA2, PSEN2*, demir metabolizması ve γ-sekretaz sinyallemesinin mitokondriyal proteostaz, oksidatif stres ve nörodejenerasyon üzerindeki birbiriyle bağlantılı rollerinin şematik gösterimi.

Reaktif oksijen türleri (ROS), ultraviyole radyasyon, DNA hasarı ve farmasötik ajanlar gibi hücresel stres faktörleri mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyerek serin proteaz HTRA2'yi aktive eder. Homeostatik koşullarda HTRA2, mitokondriyal proteostazın sürdürülmesine katkı sağlarken, mitokondriyal stres durumunda sitozole salınarak apoptoz inhibitör proteinleri (IAP'ler) baskılar ve kaspaz-3 bağımlı apoptotik yolakları aktive eder. Demir metabolizmasındaki düzensizlik, Fe^{3+}'ün Fe^{2+}'ye indirgenmesini artırırken, ferritin hafif zinciri (FTL) hücresel demir depolanmasında rol oynar. Artmış ferro demir, Fenton reaksiyonlarını güçlendirerek hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açar; bu durum lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarını artırarak oksidatif stresi ve nöronal hasarı derinleştirir. γ-sekretaz kompleksinin katalitik alt birimi olan PSEN2, amiloid prekürsör proteininin (APP) intramembranöz kesilmesini sağlayarak hücre dışı Aβ plakları oluşturabilen Aβ peptidlerinin üretimine yol açar. Bu agregatlar iyon kanal disfonksiyonu, Ca^{2+} dengesizliği, mitokondriyal oksidatif stres, inflamasyon, enerji metabolizmasında bozulma ve nöronal apoptoz ile ilişkilidir. Ayrıca PSEN2 aracılı γ-sekretaz aktivitesi, Notch hücre içi domeinin (NCID) serbestleşmesini sağlayarak NOTCH sinyal yolunu düzenler. NCID çekirdeğe transloke olarak BCL2, c-MYC,

p21 ve p57 gibi hedef genlerin ekspresyonunu modüle eder ve böylece hücre sağkalımı, proliferasyonu ve diferansiyasyonunu etkiler.

Tüm bu kesişen yolaklar birlikte değerlendirildiğinde, mitokondriyal proteostazın bozulması, demire bağlı ROS üretimi ve γ-sekretaz düzensizliğinin nörodejeneratif süreçleri nasıl ortaklaşa tetiklediğini ortaya koymaktadır.

5.2. Veziküler ve Membran Taşınımı ile İlişkili Genler

Bu çalışmada *ABCG4* (ET-05), *ATP1A4* (ET-06), *ABCA13* (ET-11) ve *TMEM230* (ET-15) genleri aracılığıyla gerçekleşen ortak hücresel yolaklar incelenmiş ve bu görünüşte farklı membran proteinlerinin membran taşınımı, lipid homeostazı ve iyon dengesinin korunmasında nasıl birlikte rol oynadıkları değerlendirilmiştir (**173**,**174,176**). Bu genler arasında ortak olan temel özellik, hücresel membranlar boyunca veya membranlar üzerinde gerçekleşen ATP-bağımlı taşınım süreçlerinde rol almalarıdır.

TMEM230 özellikle sinaptik ve endozomal kompartmanlarda vezikül taşınımına katkıda bulunur (**173**). Benzer şekilde, *ABCA13* ve *ABCG4* (ABC taşıyıcı süper ailesinin üyeleri) lipid mobilizasyonunda rol oynar; özellikle *ABCG4* nöral dokularda kolesterol dışa taşınmasını düzenler (**174**). *ATP1A4* ise Na^+/K^+-ATPaz kompleksinin bir parçası olarak ATP-bağımlı iyon taşınımını sağlayarak membran eksitabilitesini sürdürür (**176**). ET-06 ailesinde gerçekleştirilen trio ekzom dizilemesi sonucunda *ATP1A4* geninde anlamsız bir varyant (c.1804C>T; p.(Arg602*)) saptanmıştır ve bu varyant proteinin erken trunkusyonuna yol açmaktadır. ATP1A4 çoğunlukla testiste ifade edilmekle birlikte, GTEx v8 verileri bu genin belirli ekzonlarının hipotalamus ve korteks gibi beyin bölgelerinde de ifade edildiğini göstermektedir. Bu ailede etkilenen tüm bireylerin kadın olması gonadal bir mekanizmanın olası olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle *ATP1A4*'ün belirli nöronal popülasyonlarda sınırlı ancak fonksiyonel açıdan önemli bir rolü olabilir ve haployetmezlik durumu nöronal eksitabilite eşiğini düşürerek serebellotalamokortikal osilasyonların ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir (**181**). İyon homeostazındaki bozulma ile uyumlu olarak, ET-06 ailesindeki etkilenen bireyin propranolol hidroklorür tedavisine oldukça iyi yanıt verdiği gözlenmiştir. Bu durum membran stabilizasyonu ve voltaj kapılı sodyum kanallarının

blokajının *ATP1A4* varyantına bağlı iyon dengesizliğini kısmen telafi edebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte bu varyantın Türk Variome popülasyonunda nispeten daha yüksek allel frekansına sahip olması, doğrudan nedensel bir varyanttan ziyade genetik duyarlılık faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Bir diğer ortak nokta membran kompozisyonunun düzenlenmesidir. *ABCA13* ve *ABCG4*, reseptör organizasyonu ve plazma membranı akışkanlığı için kritik olan lipid ve kolesterol dağılımını etkiler (**174**). *TMEM230* ise vezikül taşınım yolakları aracılığıyla dolaylı olarak membran kompozisyonunun düzenlenmesine katkıda bulunur (**173**). Etkin vezikül taşınımı, lipid ve iyon homeostazının koordineli bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Bu ağın herhangi bir bileşenindeki bozulma zincirleme hücresel etkilere yol açabilir ve *TMEM230* varyantları ile ilişkili değişken klinik fenotipleri açıklayabilir. ET-15 ailesinde *TMEM230* varyantı etkilenen probandda bulunurken etkilenmemiş kardeşte saptanmamış ve bu durum genotip-fenotip ilişkisini sınırlı düzeyde desteklemektedir. Literatürde dört yanlış anlamlı ve üç anlamsız *TMEM230* varyantının otozomal dominant PH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (**182,184**). Varyant taşıyan ancak hastalık göstermeyen bireyler eksik penetrans ile açıklanmıştır. Bildirilen dört yanlış anlamlı varyanttan üçü, bu çalışmada tanımlanan varyant dahil olmak üzere, *TMEM230* TED domaininde lokalizedir (UniProt Q96A57). Ancak çalışmaya katılan aile üyelerinin sınırlı olması daha kapsamlı segregasyon analizini engellemiştir. *WDFY3* (ALFY) ile ilgili son çalışmalar nadir varyantların etkilerinin genetik modifiye ediciler ile etkileşime bağlı olabileceğini göstermektedir (**184**). Bu bağlamda ET-15 ailesinde nadir *TMEM230* ve *LRRC3* varyantlarının birlikte bulunması, *LRRC3* varyantının hem etkilenmiş hem de etkilenmemiş bireylerde görülmesi nedeniyle, aileye özgü bir modifiye edici etki veya oligogenik katkıyı düşündürebilir, ancak bu durum henüz spekülatif olup fonksiyonel çalışmalarla desteklenmelidir.

ET-11 ailesinde proband ve etkilenen kardeşte *ABCA13* geninde nadir yanlış anlamlı bir varyant (c.13663T>C; p.(Tyr4555His)) saptanmıştır. Daha önce *ABCA13* varyantlarının nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif fenotiplerle ilişkilendirilmiş olması nedeniyle bu genin tremor fenotipi ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir (**174**).

ET-05 ailesinde yapılan duo ekzom analizi sonucunda *ABCG4* geninde heterozigot c.679C>G; p.(Pro227Ala) varyantı saptanmış ve bu varyant etkilenen kardeş ile birlikte segregasyon göstermiştir. Missense3D *in silico* protein yapı tahmin modellerine göre,

yapısal modelleme sonuçları bu substitüsyonun ATP bağlanma stabilitesini ve/veya domain esnekliğini lokal düzeyde hafif etkileyebileceğini düşündürmektedir. Deneysel modellerde kolesterol taşıyıcılarının (*ABCG4, ABCG1* ve *ABCA1* dahil) düzensizliğinin ateroskleroz, vasküler inflamasyon ve kardiyak lipid metabolizmasında bozulma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (**175,185**). *ABCG4* için insanlarda tanımlanmış spesifik bir fenotip bulunmamakla birlikte bu gen karaciğer ve beyinde yüksek düzeyde ifade edilir ve kolesterol taşınımında rol oynar; bu yolak nörodejeneratif hastalıklarda giderek daha fazla önem kazanmaktadır (**186**). ET-05 bireyinin aynı varyantı taşıyan babasında hem tremor fenotipinin (Parkinsoniyen özellikler dahil) hem de belirgin kardiyak hastalığının bulunması, nörolojik ve kardiyovasküler sistemleri etkileyebilen potansiyel pleiotropik bir etkiyi düşündürmektedir. Bu bulgulara dayanarak *ABCG4* genini ET için yeni bir aday gen olarak önermekteyiz.

5.3. Mitokondriyal Fonksiyon ve Protein Kalite Kontrolü ile İlişkili Genler

PSEN2 ve *HTRA2*, mitokondriyal homeostaz ve hücresel stres yanıtlarının önemli düzenleyicileridir (**Şekil 5-3**). *PSEN2* mitokondri ile ilişkili ER membranlarında lokalizedir ve kalsiyum sinyalleşmesi, reaktif oksijen türleri üretimi, mitokondriyal dinamikler ve otofajiyi düzenler; bu genin fonksiyon bozukluğu nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmiştir (**178**). *HTRA2* ise mitokondride protein kalite kontrolünü sürdürür ve ağır hücresel stres durumlarında apoptozu tetikler. Her iki proteindeki bozukluklar proteostazın bozulması ve artmış proteotoksik stres ile sonuçlanır; bu durum nörodejeneratif hastalıkların temel özelliklerinden biridir (**178,181**). Monoallelik patojenik *PSEN2* varyantları erken başlangıçlı Alzheimer hastalığına (MIM#606889) neden olur. ET-07 bireyinde saptanan *PSEN2* varyantı (c.446T>C; p.(Ile149Thr)) daha önce distoni-parkinsonizm fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir (**178**). Segregasyon verilerinin sınırlı olması kesin bir sonuca ulaşmayı engellese de ET ile olası bir ilişki tamamen dışlanamaz.

5.4. Metal ve Redoks Homeostazında Rol Alan Genler

FTL, demirin depolanması ve detoksifikasyonunu sağlayan ferritin nanokafesinin temel bileşenlerinden biri olan ferritin hafif zincirini kodlar. *FTH1* $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ dönüşümü için ferroksidaz aktivitesi sağlarken, *FTL* ferritin kompleksinin stabilizasyonuna katkıda bulunur, demir çekirdeklenmesini destekler ve uzun süreli

demir mineralizasyonunu mümkün kılar (**187**). Bu fonksiyonlar sayesinde FTL serbest demiri tamponlar, redoks dengesini korur ve oksidatif stresi sınırlar. FTL ekspresyonunun veya ferritin kompleksinin bozulması serbest demir düzeylerinin artmasına, lipid peroksidasyonu ve ferroptozise yol açabilir ve özellikle metabolik olarak aktif motor devrelerde nöronal hassasiyeti artırabilir. Bu durum *FTL* disfonksiyonunun nörodejenerasyon ve tremor patofizyolojisi ile ilişkisini açıklayabilir (**185,188**). ET-04 ailesinde saptanan *FTL* varyantı (c.183G>C; p.(Glu61Asp)), *in silico* tahmin araçlarında orta düzeyde öngörülen etkiye sahip olmakla birlikte (REVEL 0.457; konservasyon 1.91) yüksek CADD skoru (23.4) göstermekte ve katalitik demir oksidasyon bölgesini etkilemektedir. Bu nedenle varyantın hafif ancak fonksiyonel bir etkisi olabilir. *FTL*'nin nöroferritinopati gibi nadir hareket bozuklukları ile ilişkisi göz önüne alındığında bu varyantın ET fenotipine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Ardışık dizileme yaklaşımları, aday varyantlara ilişkin tamamlayıcı bilgiler sağlamıştır. Kohortumuzda, kodlayıcı ve kırpılma bölgelerine yakın alanlara odaklanan TGD, ED bulgularına ek olarak yeni patojenik varyantlar ortaya koymamıştır. Derin intronik ve düzenleyici varyantların yorumlanmasının klinik genomikte hâlen önemli bir zorluk olması göz önüne alındığında, elde ettiğimiz sonuçlar, ekzom yeniden analizinin tanısal varyantların büyük çoğunluğunu yakalayabildiğini ve kodlayıcı bölgelerde TGD ile karşılaştırılabilir performans gösterdiğini desteklemektedir. Çalışmanın sınırlılıkları arasında, aile biretlerinin katılımının kısıtlı olması ve/veya üst kuşaklardan örnek alınımının zorluğu nedeniyle segregasyon analizlerinin sınırlı kalması ve hipotez üretmeye yönelik görece küçük kohortun bulunması yer almaktadır; bu durum, istatistiksel güç hesaplaması ve yük (burden) analizi yapılmasını sınırlamıştır. Bu nedenle bazı varyantlar arka plan ya da popülasyona özgü nadir varyasyonları yansıtıyor olabilir. Objektif tremor ölçümlerinin ve uzun dönemli izlem verilerinin sınırlı olması, fenotipik karakterizasyonu kısıtlamıştır. Ayrıca, bu çalışma tanımlama, genotipik karakterizasyon niteliğinde olduğundan fonksiyonel doğrulama analizleri gerçekleştirilmemiştir. Gelecek çalışmaların, aday varyantların hastalıkla ilişkili nöronal modellerde fonksiyonel olarak değerlendirilmesine odaklanması önerilmektedir.

Bu çalışma ET'nin belirgin genetik heterojenliğini ortaya koymakta ve hastalık riskinin ortak moleküler yolaklar boyunca yer alan birden fazla varyantın birleşik etkileri sonucu ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Aday genler inhibitör

nörotransmisyon, veziküler taşınım, mitokondriyal kalite kontrolü ve iyon homeostazı gibi süreçlerde birleşmekte olup bu mekanizmalar nörodejeneratif hastalık yolakları ile de örtüşmektedir. Bulgularımız, ET patogenezinin anlaşılmasında aile temelli dizileme yaklaşımlarının ve yolak düzeyinde analizlerin önemini desteklemektedir.

6.SONUÇ

ET'den etkilenen 20 aileyi kapsayan bu kapsamlı genomik çalışmada, hastalığın belirgin bir genetik heterojenite sergilediği ve tek bir majör nedensel gen ile açıklanamayacağı ortaya konmuştur. ED, TGD, varyant kısıtlılık (*constraint*) metrikleri ve segregasyon analizlerinin entegre edilmesi sayesinde başlangıçta belirlenen geniş nadir varyant havuzu, ET patofizyolojisi ile biyolojik açıdan anlamlı olabilecek daha sınırlı bir gen grubuna indirgenmiştir. Segregasyonla uyumlu olmaması nedeniyle bazı varyantlar dışlanmış olmakla birlikte, *ATP1A4, ABCA13, TENM4, ABCG4, GABBR2, GABRP, ADCY5, PSEN2, HTRA2, FTL ve GCH1* genlerinde etkilenen bireylerde bulunan ve etkilenmemiş akrabalarda saptanmayan nadir ve potansiyel olarak zararlı varyantlar belirlenmiştir. Bu genlerin inhibitör nörotransmisyon, veziküler ve membran taşınımı, mitokondriyal kalite kontrolü, iyon homeostazı ve redoks dengesi gibi temel nörobiyolojik yolaklarda birleşmesi, ET patogenezinin sistem düzeyinde bir model ile açıklanabileceğini desteklemektedir. ET'nin muhtemelen tek bir dominant gendeki yüksek penetranslı varyantlardan ziyade, örtüşen moleküler ağları etkileyen çok sayıda düşük penetranslı varyantın kümülatif etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu genetik karmaşıklık, ET ailelerinde gözlenen değişken ekspresiviteyi, eksik penetransı ve klinik heterojeniteyi açıklayabilir. Önemli olarak, bu çalışmada tanımlanan aday genlerin bir kısmı daha geniş nörodejeneratif ve hareket bozuklukları ile de ilişkilendirilmiştir. Bu durum ortak patojenik mekanizmaların varlığını göstermekte ve ET'nin daha geniş bir nörolojik duyarlılık spektrumu içinde yer alabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, aday genlerin belirlenmesi ve ET'nin moleküler mimarisinin aydınlatılmasında aile temelli dizileme yaklaşımlarının, segregasyon analizlerinin ve yolak düzeyinde değerlendirmelerin önemini vurgulamaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmaların, bu varyantların biyolojik etkilerini doğrulamak amacıyla fonksiyonel analizlere, daha geniş ve çok etnisiteli kohortlara ve uzun okuma dizileme ile çoklu-omik yaklaşımları içeren entegre genomik stratejilere odaklanması gerekmektedir. Klinik genetik test panellerinin yolakla ilişkili genleri içerecek şekilde genişletilmesi, tanısal verimi artırabilir ve hasta yönetiminde daha kişiselleştirilmiş yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Sonuç olarak, ET'nin genetik yapısının daha iyi anlaşılması, bu yaygın ve sıklıkla yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen

nörolojik hastalık için daha erken tanı, daha doğru risk sınıflandırması ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesini mümkün kılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Louis, E. D. (2025). The association between essential tremor and Parkinson's disease: A systematic review of clinical and epidemiological studies. Journal of Clinical Medicine, 14(8), 2637. https://doi.org/10.3390/jcm14082637
2. Louis, E. D., & McCreary, M. (2021). How common is essential tremor? Update on the worldwide prevalence of essential tremor. Tremor and Other Hyperkinetic Movements, 11(1). https://doi.org/10.5334/tohm.632
3. Kapinos, K. A., & Louis, E. D. (2024). The direct medical cost of essential tremor. Neuroepidemiology, 1–7. https://doi.org/10.1159/000541968
4. Kuhlenbäumer, G., Hopfner, F., & Deuschl, G. (2014). Genetics of essential tremor. Neurology, 82(11), 1000–1007. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000211
5. Clark, L. N., Gao, Y., Wang, G. T., et al. (2022). Whole genome sequencing identifies candidate genes for familial essential tremor and reveals biological pathways implicated in essential tremor aetiology. EBioMedicine, 85, 104290. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104290
6. Liu, X., Hernandez, N., Kisselev, S., et al. (2016). Identification of candidate genes for familial early-onset essential tremor. European Journal of Human Genetics, 24(7), 1009–1015. https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.228
7. Hor, H., Francescatto, L., Bartesaghi, L., et al. (2015). Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor. Human Molecular Genetics, 24(20), 5677–5686. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv281
8. Fahn, S., & Jankovic, J. (2011). Principles and practice of movement disorders. Elsevier.
9. Jankovic, J., & Tolosa, E. (2015). Parkinson's disease and movement disorders. Lippincott Williams & Wilkins.
10. Koller, W. C., & Melamed, M. (2007). Parkinson's disease and related disorders (Vols. 1–2). Elsevier Health Sciences.
11. Sawle, G. (1999). Movement disorders in clinical practice. Isis Medical Media.
12. Watts, R. L., & Koller, W. C. (2006). Movement disorders: Neurologic principles and practice. McGraw-Hill.
13. Bhatia, K. P., Bain, P., Bajaj, N., et al. (2018). Consensus statement on the classification of tremors from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. Movement Disorders, 33(1), 75–87.
14. Vetterick, C., Lyons, K. E., Matthews, L. G., Pendal, R., & Ravina, B. (2022). The hidden burden of disease and treatment experiences of patients with essential tremor: A retrospective claims data analysis. Advances in Therapy, 39, 5546–5567.
15. Benito-León, J., & León-Ruiz, M. (2020). Epidemiología del temblor esencial. Revista de Neurología, 70, 139.

16. Song, P., et al. (2021). The global prevalence of essential tremor, with emphasis on age and sex: A meta-analysis. Journal of Global Health, 11, 04028.
17. Louis, E. D. (2000). Essential tremor. Archives of Neurology, 57, 419–432.
18. Gourie-Devi, M., Ramu, M. G., & Venkataram, B. S. (1991). Treatment of Parkinson's disease in Ayurveda (ancient Indian system of medicine): Discussion paper. Journal of the Royal Society of Medicine, 84, 491–492.
19. Sohn, Y., Jung, S., Kang, K., Jeong, M., & Jang, I. (2017). A meta-analysis of the effectiveness of acupuncture for the treatment of essential tremors. Journal of Internal Korean Medicine, 38, 419–432.
20. Kim, Y. J. (2021). How do you treat essential tremor in your practice? Medical Acupuncture, 33, 364–365.
21. GraecoMuse. (2012). A shaky beginning: Parkinson's disease in ancient history.
22. Agnelli, S. (2016). Galen on tremor, rigor, palpitation and spasm: A critical edition [Doctoral dissertation, University of Florida].
23. Louis, E. D., & Machado, D. G. (2015). Tremor-related quality of life: A comparison of essential tremor vs. Parkinson's disease patients. Parkinsonism & Related Disorders, 21, 729–735.
24. Boecker, H., et al. (1996). The effect of ethanol on alcohol-responsive essential tremor: A positron emission tomography study. Annals of Neurology, 39, 650–658.
25. Louis, E. D., et al. (2008). Historical underpinnings of the term essential tremor in the late 19th century. Neurology, 71, 856–859.
26. Elble, R. J. (2013). What is essential tremor? Current Neurology and Neuroscience Reports, 13, 353.
27. Dana, C. L. (1887). Hereditary tremor, a hitherto undescribed form of motor neurosis. American Journal of the Medical Sciences, 94, 386–388.
28. D'Angelo, E., & Casali, S. (2013). Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: From circuit operations to cognition. Frontiers in Neural Circuits, 6, 116. https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00116
29. Louis, E. D. (2001). Etiology of essential tremor: Should we be searching for environmental causes? Movement Disorders, 16, 822–829.
30. Deuschl, G., & Elble, R. (2009). Essential tremor—Neurodegenerative or nondegenerative disease: Toward a working definition of ET. Movement Disorders, 24, 2033–2041.
31. Conti, F., Battaglini, P. P., & Mora, E. (2010). Fisiologia medica. McGraw-Hill.
32. Kronenbuerger, M., Gerwig, M., Brol, B., Block, F., & Timmann, D. (2007). Eyeblink conditioning is impaired in subjects with essential tremor. Brain, 130, 1538–1551.
33. Okelberry, T., Lyons, K. E., & Pahwa, R. (2024). Updates in essential tremor. Parkinsonism & Related Disorders, 122, 106086.
34. Yoo, S.-W., et al. (2023). Exploring the link between essential tremor and Parkinson's disease. npj Parkinson's Disease, 9, 134.

35. Louis, E. D., et al. (2014). Reduced Purkinje cell dendritic arborization and loss of dendritic spines in essential tremor. Brain, 137, 3142–3148.
36. Holtbernd, F., & Shah, N. J. (2021). Imaging the pathophysiology of essential tremor: A systematic review. Frontiers in Neurology, 12, 680254.
37. Földi, T., Lőrincz, M. L., & Berényi, A. (2021). Temporally targeted interactions with pathologic oscillations as therapeutic targets in epilepsy and beyond. Frontiers in Neural Circuits, 15, 784085.
38. Boecker, H., et al. (1996). The effect of ethanol on alcohol-responsive essential tremor: A positron emission tomography study. Annals of Neurology, 39, 650–658.
39. Hallett, M., & Dubinsky, R. M. (1993). Glucose metabolism in the brain of patients with essential tremor. Journal of the Neurological Sciences, 114, 45–48.
40. Raethjen, J., et al. (2000). Multiple oscillators are causing parkinsonian and essential tremor. Movement Disorders, 15, 84–94.
41. Gironell, A. (2022). Is essential tremor a disorder of primary GABA dysfunction? Yes. In International Review of Neurobiology (Vol. 163, pp. 259–284). Elsevier.
42. Louis, E. D., et al. (2022). Characterizing Lewy pathology in 231 essential tremor brains from the Essential Tremor Centralized Brain Repository. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 81, 796–806.
43. Shill, H. A., Adler, C. H., Tremblay, C., & Beach, T. G. (2023). Lack of significant Lewy pathology in 237 essential tremor brains. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 82, 452–453.
44. Şahin, H. A., et al. (2006). Frontal functions in young patients with essential tremor: A case comparison study. Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences, 18, 64–72.
45. Critchley, M. (1949). Observations on essential (heredofamilial) tremor. Brain, 72, 113–139.
46. Helmich, R. C., Toni, I., Deuschl, G., & Bloem, B. R. (2013). The pathophysiology of essential tremor and Parkinson's tremor. Current Neurology and Neuroscience Reports, 13, 378.
47. Okelberry, T., Lyons, K. E., & Pahwa, R. (2024). Updates in essential tremor. Parkinsonism & Related Disorders, 122, 106086.
48. Raethjen, J., & Deuschl, G. (2007). Tremor. Therapeutische Umschau, 64, 35–40.
49. Hubble, J. P., Busenbark, K. L., Pahwa, R., Lyons, K., & Koller, W. C. (1997). Clinical expression of essential tremor: Effects of gender and age. Movement Disorders, 12, 969–972.
50. Rajput, A. H., & Rajput, A. (2014). Medical treatment of essential tremor. Journal of Central Nervous System Disease, 6, JCNSD.S13570.
51. Deuschl, G., Bain, P., & Brin, M. (1998). Consensus statement of the Movement Disorder Society on tremor. Movement Disorders, 13(Suppl 3), 2–23.
52. Bain, P. G., et al. (1994). A study of hereditary essential tremor. Brain, 117, 805–824.
53. Thenganatt, M. A., & Jankovic, J. (2016). The relationship between essential tremor and Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders, 22, S162–S165.

54. Cohen, O., Pullman, S., Jurewicz, E., Watner, D., & Louis, E. D. (2003). Rest tremor in patients with essential tremor: Prevalence, clinical correlates, and electrophysiologic characteristics. Archives of Neurology, 60, 405.
55. Ohara, M., et al. (2023). Long-term levodopa ameliorates sequence effect in simple, but not complex walking in early Parkinson's disease patients. Parkinsonism & Related Disorders, 108, 105322.
56. Kang, S. Y., et al. (2010). Characteristics of the sequence effect in Parkinson's disease. Movement Disorders, 25, 2148–2155.
57. Bologna, M., et al. (2020). Is there evidence of bradykinesia in essential tremor? European Journal of Neurology, 27, 1501–1509.
58. Paparella, G., et al. (2023). May bradykinesia features aid in distinguishing Parkinson's disease, essential tremor, and healthy elderly individuals? Journal of Parkinson's Disease, 13, 1047–1060.
59. Louis, E. D. (2016). Non-motor symptoms in essential tremor: A review of the current data and state of the field. Parkinsonism & Related Disorders, 22, S115–S118.
60. Sengul, Y., et al. (2015). Cognitive functions, fatigue, depression, anxiety, and sleep disturbances: Assessment of nonmotor features in young patients with essential tremor. Acta Neurologica Belgica, 115, 281–287.
61. Benito-León, J., Louis, E. D., Sánchez-Ferro, Á., & Bermejo-Pareja, F. (2013). Rate of cognitive decline during the premotor phase of essential tremor: A prospective study. Neurology, 81, 60–66.
62. Ghanem, A., et al. (2024). Prevalence of and annual conversion rates to mild cognitive impairment and dementia: Prospective, longitudinal study of an essential tremor cohort. Annals of Neurology, 95, 1193–1204.
63. Miller, J. R., et al. (2022). Depressive symptoms predict memory decline in essential tremor. Parkinsonism & Related Disorders, 98, 16–20.
64. Louis, E. D., Benito-León, J., Bermejo-Pareja, F., & NEDICES Study Group. (2007). Self-reported depression and antidepressant medication use in essential tremor: Cross-sectional and prospective analyses in a population-based study. European Journal of Neurology, 14, 1138–1146.
65. Louis, E. D., Huey, E. D., Gerbin, M., & Viner, A. S. (2012). Apathy in essential tremor, dystonia, and Parkinson's disease: A comparison with normal controls. Movement Disorders, 27, 432–434.
66. Ratajska, A. M., et al. (2022). Differential contributions of depression, apathy, and anxiety to neuropsychological performance in Parkinson's disease versus essential tremor. Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology, 44, 651–664.
67. Sengul, Y. (2020). Auditory and olfactory deficits in essential tremor: Review of the current evidence. Tremor and Other Hyperkinetic Movements, 10, 3.

68. Yaka, E. C., Ünal, M., & Dogu, O. (2024). Evaluation of hearing loss in patients with essential tremor. Neurological Sciences and Neurophysiology, 41, 95–103.
69. Louis, E. D., Bromley, S. M., Jurewicz, E. C., & Watner, D. (2002). Olfactory dysfunction in essential tremor: A deficit unrelated to disease duration or severity. Neurology, 59, 1631–1633.
70. Tsapanou, A., et al. (2024). Sleep problems as predictors of cognitive decline in essential tremor: A prospective longitudinal cohort study. Sleep Medicine, 116, 13–18.
71. Jain, S., Lo, S. E., & Louis, E. D. (2006). Common misdiagnosis of a common neurological disorder: How are we misdiagnosing essential tremor? Archives of Neurology, 63, 1100.
72. Louis, E. D. (2009). Essential tremors: A family of neurodegenerative disorders? Archives of Neurology, 66, 1631–1633..
73. Agarwal, S., & Biagioni, M. C. (2024). Essential tremor. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
74. Louis, E. D., Ford, B., Lee, H., & Andrews, H. (1998). Does a screening questionnaire for essential tremor agree with the physician's examination? Neurology, 50, 1351–1357.
75. Poewe, W., et al. (2017). Parkinson disease. Nature Reviews Disease Primers, 3, 17013.
76. Adams, R. D., Victor, M., & Ropper, A. H. (1997). Principles of neurology (6th ed.). McGraw-Hill.
77. Coria, F., et al. (2012). Nigrostriatal dopaminergic function in subjects with isolated action tremor. Parkinsonism & Related Disorders, 18, 49–53.
78. Benito-León, J., Louis, E. D., Bermejo-Pareja, F., & NEDICES Study Group. (2008). Risk of incident Parkinson's disease and parkinsonism in essential tremor: A population-based study. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 80, 423–425.
79. Iglesias-Hernandez, D., et al. (2021). "ET plus": Instability of the diagnosis during prospective longitudinal follow-up of essential tremor cases. Frontiers in Neurology, 12, 782694.
80. Ozen Barut, B., Gunal, D. I., Turkmen, Ç., Mollahasanoğlu, A., & Ankaralı, H. (2013). Clinical and cognitive profiles of patients with both Parkinson's disease and essential tremor. Acta Neurologica Belgica, 113, 117–125.
81. Batla, A. (2018). Dystonia: A review. Neurology India, 66, 48.
82. Pana, A., & Saggiu, B. M. (2023). Dystonia. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
83. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). (2024). Ataxia and cerebellar or spinocerebellar degeneration.
84. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). (2024). Multiple system atrophy.
85. Onaolapo, O. J., & Onaolapo, A. Y. (2023). B vitamins: Pyridoxal phosphate and parkinsonism. In Vitamins and minerals in neurological disorders (pp. 527–542). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89835-5.00029-6

86. Deuschl, G., Raethjen, J., Hellriegel, H., & Elble, R. (2011). Treatment of patients with essential tremor. The Lancet Neurology, 10, 148–161.
87. Ferreira, J. J., et al. (2019). MDS evidence-based review of treatments for essential tremor. Movement Disorders, 34, 950–958.
88. Lenkapothula, N., & Cascella, M. (2024). Primidone. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
89. Antonazzo, I. C., et al. (2024). Treatment patterns in essential tremor: Real-world evidence from a United Kingdom and France primary care database. European Journal of Neurology, 31, e16064.
90. Louis, E. D., & Ottman, R. (2006). Study of possible factors associated with age of onset in essential tremor. Movement Disorders, 21, 1980–1986.
91. Louis, E. D., & Ottman, R. (1996). How familial is familial tremor? The genetic epidemiology of essential tremor. Neurology, 46, 1200.
92. Lorenz, D., et al. (2004). High concordance for essential tremor in monozygotic twins of old age. Neurology, 62, 208–211.
93. Tanner, C. M., et al. (2001). Essential tremor in twins: An assessment of genetic vs environmental determinants of etiology. Neurology, 57, 1389–1391.
94. Louis, E. D., et al. (2001). Risk of tremor and impairment from tremor in relatives of patients with essential tremor: A community-based family study. Annals of Neurology, 49, 761–769.
95. Bain, P. G., et al. (1994). A study of hereditary essential tremor. Brain, 117, 805–824.
96. Gulcher, J. R., et al. (1997). Mapping of a familial essential tremor gene (FET1) to chromosome 3q13. Nature Genetics, 17, 84–87.
97. Louis, E. D., Meyers, J. H., Cristal, A. D., & Factor-Litvak, P. (2018). Caffeine consumption in first-degree relatives of essential tremor cases: Evidence of dietary modification before disease onset. Neuroepidemiology, 51, 64–70.
98. Louis, E. D., et al. (2016). Self-reported physical activity in essential tremor: Relationship with tremor, balance, and cognitive function. Journal of the Neurological Sciences, 366, 240–245.
99. Louis, E. D., et al. (2002). Elevation of blood β-carboline alkaloids in essential tremor. Neurology, 59, 1940–1944.
100. Gulcher, J. R., Jónsson, P., Kong, A., Kristjánsson, K., Frigge, M. L., Kárason, A., Einarsdóttir, I. E., Stefánsson, H., Einarsdóttir, A. S., Sigurðardóttir, S., Baldursson, S., Björnsdóttir, S., Hrafnkelsdóttir, S. M., Jakobsson, F., Benedikz, J., & Stefánsson, K. (1997). Mapping of a familial essential tremor gene (FET1) to chromosome 3q13. Nature Genetics, 17, 84–87.
101. Higgins, J. J., Pho, L. T., & Nee, L. E. (1997). A gene (ETM) for essential tremor maps to chromosome 2p22–p25. Movement Disorders, 12, 859–864.
102. Sazci, A., Ergul, E., & Bayulkem, K. (2004). Association of the C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with essential tremor in Turkey. Movement Disorders, 19, 1472–1476.

103. Higgins, J. J., Lombardi, R. Q., Pucilowska, J., Jankovic, J., Tan, E. K., & Rooney, J. P. (2005). A variant in the HS1-BP3 gene is associated with familial essential tremor. Neurology, 64, 417–421.
104. Shatunov, A., et al. (2006). Genomewide scans in North American families reveal genetic linkage of essential tremor to chromosome 6p23. Brain, 129, 2318–2331.
105. Lucotte, G., Lagarde, J. P., Funalot, B., & Sokoloff, P. (2006). Linkage with the Ser9Gly DRD3 polymorphism in essential tremor families. Clinical Genetics, 69, 437–440.
106. Stefansson, H., et al. (2009). Variant in the sequence of the LINGO1 gene confers risk of essential tremor. Nature Genetics, 41, 277–279.
107. Vilariño-Güell, C., et al. (2011). MAPT H1 haplotype is a risk factor for essential tremor and multiple system atrophy. Neurology, 76, 670–672.
108. Thier, S., et al. (2012). Polymorphisms in the glial glutamate transporter SLC1A2 are associated with essential tremor. Neurology, 79, 243–248.
109. Merner, N. D., et al. (2012). Exome sequencing identifies FUS mutations as a cause of essential tremor. American Journal of Human Genetics, 91, 313–319.
110. Unal Gulsuner, H., Gulsuner, S., Mercan, F. N., Onat, O. E., Walsh, T., Shahin, H., Lee, M. K., Dogu, O., Kansu, T., Topaloglu, H., Elibol, B., Akbostanci, C., King, M. C., Ozcelik, T., & Tekinay, A. B. (2014). Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 111, 18285–18290.
111. Hor, H., Francescatto, L., Bartesaghi, L., Ortega-Cubero, S., Kousi, M., Lorenzo-Betancor, O., Jiménez-Jiménez, F. J., Gironell, A., Clarimón, J., Drechsel, O., Agúndez, J. A., Kenzelmann Broz, D., Chiquet-Ehrismann, R., Lleó, A., Coria, F., García-Martín, E., Alonso-Navarro, H., Martí, M. J., Kulisevsky, J., Hor, C. N., Ossowski, S., Chrast, R., Katsanis, N., Pastor, P., & Estivill, X. (2015). Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor. Human Molecular Genetics, 24, 5677–5686.
112. Ortega-Cubero, S., Lorenzo-Betancor, O., Lorenzo, E., Agúndez, J. A., Jiménez-Jiménez, F. J., Ross, O. A., Wurster, I., Mielke, C., Lin, J. J., Coria, F., Clarimón, J., Ezquerra, M., Brighina, L., Annesi, G., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., Gironell, A., Martí, M. J., Yueh, K. C., Wszolek, Z. K., Sharma, M., Berg, D., Krüger, R., Pastor, M. A., & Pastor, P. (2015). TREM2 R47H variant and risk of essential tremor: A cross-sectional international multicenter study. Parkinsonism & Related Disorders, 21, 306–309.
113. Sánchez, E., Bergareche, A., Krebs, C. E., Gorostidi, V., Makarov, V., Ruiz-Martinez, J., Chorny, A., Lopez de Munain, A., Marti-Masso, J. F., & Paisán-Ruiz, C. (2015). SORT1 mutation resulting in sortilin deficiency and p75(NTR) upregulation in a family with essential tremor. ASN Neuro, 7.
114. Bergareche, A., Bednarz, M., Sánchez, E., Krebs, C. E., Ruiz-Martinez, J., De La Riva, P., Makarov, V., Gorostidi, A., Jurkat-Rott, K., Marti-Masso, J. F., & Paisán-Ruiz, C. (2015).

SCN4A pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy. Human Molecular Genetics, 24, 7111–7120.

115. Rajput, A., Ross, J. P., Bernales, C. Q., Rayaprolu, S., Soto-Ortolaza, A. I., Ross, O. A., van Gerpen, J., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Rajput, A. H., & Vilariño-Güell, C. (2015). VPS35 and DNAJC13 disease-causing variants in essential tremor. European Journal of Human Genetics, 23, 887–888.

116. Liu, X., Hernandez, N., Kisselev, S., Floratos, A., Sawle, A., Ionita-Laza, I., Ottman, R., Louis, E. D., & Clark, L. N. (2016). Identification of candidate genes for familial early-onset essential tremor. European Journal of Human Genetics, 24, 1009–1015.

117. 117–118. Müller, S. H., Girard, S. L., Hopfner, F., Merner, N. D., Bourassa, C. V., Lorenz, D., Clark, L. N., Tittmann, L., Soto-Ortolaza, A. I., Klebe, S., Hallett, M., Schneider, S. A., Hodgkinson, C. A., Lieb, W., Wszolek, Z. K., Pendziwiat, M., Lorenzo-Betancor, O., Poewe, W., Ortega-Cubero, S., Seppi, K., Rajput, A., Hussl, A., Rajput, A. H., Berg, D., Dion, P. A., Wurster, I., Shulman, J. M., Srulijes, K., Haubenberger, D., Pastor, P., Vilariño-Güell, C., Postuma, R. B., Bernard, G., Ladwig, K. H., Dupré, N., Jankovic, J., Strauch, K., Panisset, M., Winkelmann, J., Testa, C. M., Reischl, E., Zeuner, K. E., Ross, O. A., Arzberger, T., Chouinard, S., Deuschl, G., Louis, E. D., Kuhlenbäumer, G., & Rouleau, G. A. (2016). Genome-wide association study in essential tremor identifies three new loci. Brain, 139, 3163–3169.

118. Leng, X. R., Qi, X. H., Zhou, Y. T., & Wang, Y. P. (2017). Gain-of-function mutation p.Arg225Cys in SCN11A causes familial episodic pain and contributes to essential tremor. Journal of Human Genetics, 62, 641–646.

119. Yuan, L., Deng, X., Song, Z., Deng, S., Zheng, W., Mao, P., & Deng, H. (2018). Systematic analysis of genetic variants in patients with essential tremor. Brain and Behavior, 8, e01100.

120. Sazci, A., Uren, N., Idrisoglu, H. A., & Ergul, E. (2019). The rs2228570 variant of the vitamin D receptor gene is associated with essential tremor. Neuroscience Bulletin, 35, 362–364.

121. Chen, J., Huang, P., He, Y., Shen, J., Du, J., Cui, S., Chen, S., & Ma, J. (2019). IL1B polymorphism is associated with essential tremor in Chinese population. BMC Neurology, 19, 99.

122. Odgerel, Z., Sonti, S., Hernandez, N., Park, J., Ottman, R., Louis, E. D., & Clark, L. N. (2019). Whole genome sequencing and rare variant analysis in essential tremor families. PLoS ONE, 14, e0220512.

123. Sun, Q. Y., Xu, Q., Tian, Y., Hu, Z. M., Qin, L. X., Yang, J. X., Huang, W., Xue, J., Li, J. C., Zeng, S., Wang, Y., Min, H. X., Chen, X. Y., Wang, J. P., Xie, B., Liang, F., Zhang, H. N., Wang, C. Y., Lei, L. F., Yan, X. X., Xu, H. W., Duan, R. H., Xia, K., Liu, J. Y., Jiang, H., Shen, L., Guo, J. F., & Tang, B. S. (2020). Expansion of GGC repeat in the NOTCH2NLC gene is associated with essential tremor. Brain, 143, 222–233.

124. Hopfner, F., & Helmich, R. C. (2018). The etiology of essential tremor: Genes versus environment. Parkinsonism & Related Disorders, 46, S92–S96.

125. Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B. P., Sue, C. M., Tabrizi, S. J., Bertram, L., Mercimek-Mahmutoglu, S., Ebrahimi-Fakhari, D., Warner, T. T., Durr, A., Assmann, B., Lohmann, K., Kostic, V., & Klein, C. (2017). Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the International Parkinson and Movement Disorder Society task force. Movement Disorders, 32, 724–725.
126. Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. Nature Reviews Genetics, 20, 467–484.
127. Mantere, T., Kersten, S., & Hoischen, A. (2019). Long-read sequencing emerging in medical genetics. Frontiers in Genetics, 10, 426.
128. Midha, M. K., Wu, M., & Chiu, K. P. (2019). Long-read sequencing in deciphering human genetics to a greater depth. Human Genetics, 138, 1201–1215.
129. Carecchio, M., & Mencacci, N. E. (2017). Emerging monogenic complex hyperkinetic disorders. Current Neurology and Neuroscience Reports, 17, 97.
130. Reale, C., Panteghini, C., Carecchio, M., & Garavaglia, B. (2018). The relevance of gene panels in movement disorders diagnosis: A laboratory perspective. European Journal of Paediatric Neurology, 22, 285–291.
131. Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 141, 1544–1557.
132. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. (2020). Essentials of genetics. Pearson.
133. Strachan, T., & Lucassen, A. (2022). Genetics and genomics in medicine. CRC Press.
134. Mastrorosa, F. K., Miller, D. E., & Eichler, E. E. (2023). Applications of long-read sequencing to Mendelian genetics. Genome Medicine, 15(1), 42.
135. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next-generation sequencing? Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition, 98(6), 236–238.
136. Lalonde, E., Rentas, S., Lin, F., Dulik, M. C., Skraban, C. M., & Spinner, N. B. (2020). Genomic diagnosis for pediatric disorders: Revolution and evolution. Frontiers in Pediatrics, 8, 373.
137. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine, 17(5), 405–423.
138. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine, 17(5), 405–423.
139. Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y. Y., & Westbrook, M. (2020). Correction: Sherloc: A comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. Genetics in Medicine, 22(1), 240.

140. Houge, G., Laner, A., Cirak, S., de Leeuw, N., Scheffer, H., & den Dunnen, J. T. (2022). Stepwise ABC system for classification of any type of genetic variant. European Journal of Human Genetics, 30(2), 150–159.
141. Acuna-Hidalgo, R., Veltman, J. A., & Hoischen, A. (2016). New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. Genome Biology, 17, 1–19.
142. Frazer, K. A., & Schork, N. J. (2023). The human pangenome reference anticipates equitable and fundamental genomic insights. Cell Genomics, 3(7).
143. Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., et al. (2020). The Human Gene Mutation Database (HGMD®): Optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. Human Genetics, 139(10), 1197–1207. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3
144. Harrison, S. M., Riggs, E. R., Maglott, D. R., et al. (2016). Using ClinVar as a resource to support variant interpretation. Current Protocols in Human Genetics, 89(1). https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0816s89
145. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., et al. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature, 581(7809), 434–443. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7
146. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of ACMG and AMP. Genetics in Medicine, 17(5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30
147. Ellingford, J. M., Ahn, J. W., Bagnall, R. D., et al. (2022). Recommendations for clinical interpretation of variants found in non-coding regions of the genome. Genome Medicine, 14(1), 73. https://doi.org/10.1186/s13073-022-01073-3
148. Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., et al. (2004). UniProt: The universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Research, 32(Database issue), D115–D119. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131
149. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Research, 45(D1), D353–D361. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092
150. Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., et al. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. Nature Genetics, 46(3), 310–315. https://doi.org/10.1038/ng.2892
151. Schubach, M., Maass, T., Nazaretyan, L., Röner, S., & Kircher, M. (2024). CADD v1.7: Using protein language models, regulatory CNNs and other nucleotide-level scores to improve genome-wide variant predictions. Nucleic Acids Research, 52(D1), D1143–D1154. https://doi.org/10.1093/nar/gkad989

152. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., et al. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature, 581(7809), 434–443. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7

153. Jaganathan, K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou, S., McRae, J. F., et al. (2019). Predicting splicing from primary sequence with deep learning. Cell, 176(3), 535–548.e24. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.015

154. GTEx Consortium. (2020). The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. Science, 369(6509), 1318–1330. https://doi.org/10.1126/science.aaz1776

155. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3), 403–410.

156. Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., et al. (2021). Genomic markers for essential tremor. Pharmaceuticals (Basel), 14(6). https://doi.org/10.3390/ph14060516

157. Fiziev, P. P., McRae, J., Ulirsch, J. C., et al. (2023). Rare penetrant mutations confer severe risk of common diseases. Science, 380(6648), eabo1131. https://doi.org/10.1126/science.abo1131

158. Rajput, A., Ross, J. P., Bernales, C. Q., Rayaprolu, S., Soto-Ortolaza, A. I., Ross, O. A., van Gerpen, J., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Rajput, A. H., & Vilariño-Güell, C. (2015). VPS35 and DNAJC13 disease-causing variants in essential tremor. European Journal of Human Genetics, 23(6), 887–888. https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.164

159. Louis, E. D., Babij, R., Ma, K., Cortés, E., & Vonsattel, J. P. (2013). Essential tremor followed by progressive supranuclear palsy: Postmortem reports of 11 patients. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 72(1), 8–17. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31827ae56e

160. Pu, J. L., Gao, T., Si, X. L., Zheng, R., Jin, C. Y., Ruan, Y., Fang, Y., Chen, Y., Song, Z., Yin, X. Z., Yan, Y. P., Tian, J., & Zhang, B. R. (2020). Parkinson's disease in teneurin transmembrane protein 4 (TENM4) mutation carriers. Frontiers in Genetics, 11, 598064. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.598064

161. Chao, Y. X., Ng, E. Y., Tan, L., Prakash, K. M., Au, W. L., Zhao, Y., & Tan, E. K. (2015). LRRK2 R1628P variant is a risk factor for essential tremor. Scientific Reports, 5, 9029. https://doi.org/10.1038/srep09029

162. Wang, B., Wei, B., Lu, L., Liu, S., Ge, W., & Sun, M. (2025). A heterozygous variation of PINK1 is potentially associated with essential tremor in a Chinese family. Neurogenetics, 26(1), 45. https://doi.org/10.1007/s10048-025-00827-6

163. Cediel, M. L., Stawarski, M., Blanc, X., Nosková, L., Magner, M., Platzer, K., Gburek-Augustat, J., Baldridge, D., Constantino, J. N., Ranza, E., Bettler, B., & Antonarakis, S. E. (2022). GABBR1 monoallelic de novo variants linked to neurodevelopmental delay and epilepsy. American Journal of Human Genetics, 109(10), 1885–1893. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.08.010

164. García-Martín, E., Martínez, C., Alonso-Navarro, H., Benito-León, J., Lorenzo-Betancor, O., Pastor, P., Puertas, I., Rubio, L., López-Alburquerque, T., Agúndez, J. A., & Jiménez-Jiménez, F. J. (2011). GABA receptor polymorphisms and risk for essential tremor. Pharmacogenetics and Genomics, 21(7), 436–439. https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328345bec0

165. Zhen, Y., & Li, W. (2015). Impairment of autophagosome–lysosome fusion in the buff mutant mice with the VPS33A(D251E) mutation. Autophagy, 11(9), 1608–1622. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1072669

166. Wu, Y. R., Chen, C. M., Chen, Y. C., Chao, C. Y., Ro, L. S., Fung, H. C., & Lee-Chen, G. J. (2010). Ubiquitin-specific proteases USP24 and USP40 and UCHL1 polymorphisms have a synergistic effect on Parkinson's disease risk. Clinica Chimica Acta, 411(13–14), 955–958.

167. Yoo, Y., Jung, J., Lee, Y., et al. (2017). GABBR2 mutations determine phenotype in Rett syndrome and epileptic encephalopathy. Annals of Neurology, 82(3), 466–478. https://doi.org/10.1002/ana.25032

168. Wang, Y., Zhang, Y., Li, W., et al. (2025). GABAA receptor π forms channels that stimulate ERK through a G-protein-dependent pathway. Molecular Cell, 85(1), 166–176.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.11.016

169. Mencacci, N. E., Erro, R., Wiethoff, S., et al. (2015). ADCY5 mutations are another cause of benign hereditary chorea. Neurology, 85(1), 80–88. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001720

170. Hor, H., Francescatto, L., Bartesaghi, L., et al. (2015). Missense mutations in TENM4 cause essential tremor. Human Molecular Genetics, 24(20), 5677–5686. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv281

171. Lewthwaite, A. J., Lambert, T. D., Rolfe, E. B., et al. (2015). Novel GCH1 variant in dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders, 21(4), 394–397. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.01.004

172. Kim, M. J., Deng, H. X., Wong, Y. C., Siddique, T., & Krainc, D. (2017). TMEM230 is required for secretory vesicle trafficking. Human Molecular Genetics. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw413

173. Tomioka, M., Toda, Y., Kurisu, J., et al. (2012). Effects of ABCA13 variants on protein function. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 76(12), 2289–2293.

174. Yang, A., Alrosan, A. Z., Sharpe, L. J., et al. (2021). Regulation of ABCG4 transporter expression. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects, 1865(1), 129769.

175. Keryanov, S., & Gardner, K. L. (2002). Characterization of ATP1A4 gene. Gene, 292(1–2), 151–166.

176. Unal Gulsuner, H., Gulsuner, S., Mercan, F. N., et al. (2014). HTRA2 mutation in essential tremor and Parkinson disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 111(51), 18285–18290.

177. Fedeli, C., Filadi, R., Rossi, A., Mammucari, C., & Pizzo, P. (2019). PSEN2 mutants impair autophagy via Ca^{2+} dysregulation. Autophagy, 15(12), 2044–2062.
178. Baraibar, M. A., Barbeito, A. G., Muhoberac, B. B., & Vidal, R. (2012). Mutant ferritin and oxidative damage. Free Radical Biology and Medicine, 52(9), 1692–1697.
179. Jiang, X., Shao, Y., Liao, Y., et al. (2024). Mechanisms of GCH1 deficiency therapies. European Journal of Pharmacology, 967, 176379.
180. Liu, Q., Yan, X., Yuan, Y., et al. (2024). HTRA2-mediated mitochondrial quality control and inflammation. International Journal of Molecular Sciences, 25(3). https://doi.org/10.3390/ijms25031577
181. Coppola, G., Pastorino, G. M. G., Vetri, L., D'Onofrio, F., & Operto, F. F. (2020). ATP1A4 mutation in familial hemiplegic migraine. Brain Sciences, 10(6). https://doi.org/10.3390/brainsci10060372
182. Deng, H. X., Shi, Y., Yang, Y., et al. (2016). Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. Nature Genetics, 48(7), 733–739.
183. Yang, X., An, R., Xi, J., et al. (2017). TMEM230 sequencing in Parkinson's disease. Movement Disorders, 32(5), 800–802.
184. Croce, K. R., Ng, C., Pankiv, S., et al. (2025). A rare genetic variant confers resistance to neurodegeneration. Neuron, 113(22), 3780–3797.e7.
185. Baldán, Á., Tarr, P., Lee, R., & Edwards, P. A. (2006). ABCG1 and lipid homeostasis. Current Opinion in Lipidology, 17(3), 227–232.
186. Hegyi, Z., & Homolya, L. (2016). Functional cooperativity between ABCG4 and ABCG1. PLoS ONE, 11(5), e0156516.
187. Zhang, N., Yu, X., Xie, J., & Xu, H. (2021). Ferritin in neurodegenerative diseases. Molecular Neurobiology, 58(6), 2812–2823.

EK-3

Ekzom Dizileme (ES) çalışmasının ayrıntılı protokolü

Malzemeler:

	Pipetler (1000µl,200µl, 100µl, 20µl,10µl)		QIAseqFX Kit
	8-strip PCR tüpleri ve rack		IDT xGen Kit
	Dynamag -2 magnetik stant		QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200)
	Buz aküsü/soğuk blok		AMPureXP Beads
	1.5ml/2.0ml tüpler		RNase-free Water
	Realtime PCR		Buffer EB
	Thermal cycler(kapak sıcaklığı ayarlanabilir)		80% ethanol
	Vorteks		
	SpeedVac		
	Qiaexcel		

1. Gün: QIAseq FX: Whole genome library preparation
2. Gün: IDT xGEN: Hybrid Capture
3. Gün: IDT xGEN: Hybrid Capture ve NextSeq Run

Aşama #1: DNA Fragmantasyonu

DNA; nükleazsız su, 10mM Tris, Buffer EB ya da 0.1X TE de çözünmüş olmalıdır.

	Kullanılacak malzemeler		Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
	Nükleazsız Su		Kullanmadan önce tüm malzemeler vortex/spin yapılmalıdır.
	FX buffer, 10x		Master Mix buz üzerinde hazırlanmalıdır.
	Fx Enzyme Mix		Önce master mix sonra DNA'lar dağıtılmalıdır.
	DNA		Çalışma boyunca buz üzerinde çalışılmalıdır.

a. gDNA örneklerinin konsantrasyonu Qubit ile ölçülür. Eğer konsantrasyon 50 ng/uL'nin üzerinde olursa stok örnekleri ara dilüsyon ile 50 ng/uL'ye sabitlenmelidir.

10 ng/µl altındaki örnekler başlamak için uygun değildir.

b. Konsantrasyon hesaplaması şu şekilde yapılır;
   Örneğin; 50/stok konsantrasyon= stoktan alınacak örnek miktarı (µl)
   Stok kons. 35 ng/µl olduğunu varsayarsak
   50/35=1,42 µl stoktan çekilir. Üzerine 33,58 µl nükleasız su eklenerek 35 µl'ye tamamlanır.
   Vorteks ve spin yapılır.

c. 0.2'lik PCR tüpüne toplam hacim 35 µl, toplam DNA miktarı 50 ng olacak şekilde H2O+DNA karışımı hazırlanır.

Kütüphane Hazırlığı Örnek Tablo

Protokole başlamadan önce örneklere eklenecek barkodlar belirlenerek aşağıdaki tabloya işlenmelidir.

ÖrnekNo	Örnek Adı	Stok Kons. (ng/µl)	Örnek miktarı (µl)	Su miktarı (µl)	7xx index	50x index
x	x	50	1	34		
x	x	40	1,25	33,75		
x	x	30	1,6	33,4		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

a. Thermal cycler tablodaki gibi ayarlanır, program baslatılır. Blok 4 derece ulastıgı zaman program pause edilir.
b. Her örnek tüpünün üzerine 5 µl FX Buffer eklenir.
c. Her örnek tüpünün üzerine FX Enzym Mix'ten 10 µl eklenir.
d. 6-8 defa pipetaj yapıldıktan sonra kısa spin yapılır.
e. Reaksiyon tüpleri cihaza yerleştirilerek çalışma baslatılır.

Fragmantasyon PCR Protokolü		
Aşamalar	Sıcaklık [°C]	Süre [dk]
1	4	1
2	32	22
3	65	30
4	4	Hold
Kapak sıcaklığı: 37 °C		

- PCR'dan çıkan ürünler bekletilmemelidir. Doğrudan "Adapter ligation" aşamasına geçilir.

Aşama #2: Adaptör Ligasyonu

Adaptör Ligasyon PCR Protokolü	
Sıcaklık [°C]	Süre [dk]
20	15
Kapak sıcaklığı: YOK	

	Kµllanılacak malzemeler:		Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
	Nuclease free water		Çalışma boyunca buz üzerinde çalışılmalıdır.
	Ligation buffer 5x		PCR öncesi kısa vortex ile örnekler karıştırılmalıdır.
	DNA Ligase		Her bir adaptör tek-tek eklenmelidir.
	Fragmented DNA (önceki aşamadan)		Thermal cycler'in kapak sıcaklığı olmamalıdır.
	Adaptör plate		Adaptör ligasyon PCR'ı sonrası direkt clean-up işlemine geçilmelidir.
			Adaptör Plate buz üzerinde eritilerek kullanmadan önce spin yapılmalıdır

a. Fragmentasyon PCR'ından çıkan ürünler kısa spin yapılır.
b. 1,5 mL'lik tüpte adaptör ligasyon miksi aşağıdaki gibi hazırlanır kullanılmadan önce viskoz olan kimyasalların iyice karıştığından emin olunmalıdır.

Adaptör Ligasyon Miksi		
	1x [µl]	**12X (+1X Dahil Edilmiştir)**
Ligation Buffer, 5x	20	260
DNA Ligase	10	130
Nükleazsız Su	15	195
Total Hacim	45	585

c. Bir önceki aşamadan gelen PCR ürünlerinin üzerine, her bir örnek için 45 µl adaptör ligasyon miksi eklenir.
d. 10 µl'lik uzun uçlu pipetler ile dikkatlice adaptor platenin üzerindeki seal delinir ve kuyudan 5 µl çekilip adaptör ligasyon miksi dağıtılmış örneklerin üzerine eklenir ve iyice pipetaj yapılır.
e. **Adaptör plate üzerindeki seal elle açılmamalıdır. Elle açılması indexlerin karışmasına sebep olabilir**.
f. Adaptör platein üzeri her çalışmadan sonra yeni bir seal ile örtülür.

- PCR'dan çıkan ürünler bekletilmemelidir. Doğrudan "Adaptör Ligasyonu Sonrası Yıkama" aşamasına geçilir.

Aşama #3: Adaptör Ligasyonu Sonrası Yıkama

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
Nükleazsız Su	Çalışmadan önce Ampure beadler 20-30 dk önce çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmelidir.
AMPure XP	Ampure beadler kullanılmadan önce iyice alt üst edilmeli ve karıştırılmalıdır.
Lobind tüp	80%'lik etanol taze hazırlanmalıdır.
	Lobind Tüpler ile cleanup yapıldığından emin olunmalıdır.

a. Adaptör ligasyon aşamasından çıkan 100 µl örnekler spinlenir.
b. 0.2'lik tüpteki örnekler 1.5 mL'lik Lobind tüpe aktarılır.
c. Her bir tüpe 90 µl Ampure bead eklenir (0.9x) ve iyice pipetaj yapılır.
d. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon sağlanır.
e. Tüpler magnetik stand üzerinde yerleştirilir. Yaklaşık 2 dk boyunca tutµlarak beadlerin toplanması beklenir.
f. Supernatant atılır.
g. 200 µl taze hazırlanmış 80% lik ethanol eklenir ve 30 saniye beklenir.
h. Supernatant atılır.
i. İkinci defa 200 µl 80% lik ethanol eklenir ve 30 saniye beklenir.
j. Supernatant atılır.
k. Tüplerin içerisinde hiç alkol kalmaması için 10 µl'lik pipet ucu ile tüpler temizlenir.
l. Etanolün uçması için oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilir. Bu aşamada beadlerin aşırı derecede kuruyup çatlamaması önemlidir. Bunun için 5 dakikadan sonra tüpleri sürekli kontrol etmek önemlidir.
m. Kuruyan beadlerin üzerine 26 µl EB buffer ya da nükleazsız su eklenir.
n. Beadler tamamen homojen hale gelene kadar pipetaj yapılır, pipetaj yaparken pipet ile tüpün çeperine yapışmış olan beadlere temas etmemeye özen gösterilmelidir.
o. Tüpler magnetik stand üzerine koyµlarak yaklaşık 2 dakika beadlerin toplanması beklenir.
p. 23.5 µl supernatant yeni 0.2 µl PCR tüplerine alınır.

GÜVENLİ DURMA AŞAMASI: Bu aşamada örnekler -20 C'ye kaldırılabilir , +4 derecede birkaç saat bekleyebilir ya da kütüphane amplifikasyon aşamasına geçilebilir.)

Aşama #4: Kütüphane Amplifikasyon

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
Hifi Master mix, 2x (yeşil kapak)	QIAseq HiFi PCR Master Mix ve Primer Mix buz üzerinde çözdürülmelidir.
ILMN Primer Mix(10uM each)(şeffaf kapak)	Amplification Master Mix buz üzerinde hazırlanmalıdır.

a. Thermal cycler tablodaki gibi hazırlanmalıdır.

Kütüphane Amplifikasyon PCR Protokolü		
2 dakika	98°C	
20 saniye	98°C	7 döngü
30 saniye	60°C	
30 saniye	72°C	
1 dakika	72°C	
∞	4°C	

b. 1,5 mL'lik tüpte kütüphane amplifikasyon miksi aşağıdaki gibi hazırlanır.

c. Her bir purifiye edilmiş kütüphanenin (23.5µl) üzerine 26.5 µl master miks buz üzerinde eklenir, pipetaj yapılır ve spinlenir.

	Master Miks	
	1 Örnek İçin [µl]	12+1 örnek için[µl]
HiFi Master Mix, 2x	25.0	325µl
ILMN Primer Mix (10µM each)	1.5	19.5 µl
Toplam Master Miks	26.5	344.5 µl
Pürifiye Edilmiş DNA	23.5	
Toplam Hacim	50.0	

d. Tüpler termal cycler'a yerleştirilir ve kütüphane amplifikasyon PCR protokolü başlatılır.

Aşama #5: Kütüphane Amplifikasyon Sonrası Yıkama

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
Nükleazsız Su	Çalışmadan önce Ampure beadler oda sıcaklığına getirilmelidir.
AMPure XP	Ampure beadler kullanılmadan önce iyice karıştırılmalıdır.
	80%'lik etanol taze hazırlanmalıdır.

a. 0.2'lik tüpteki örnekler 1.5 mL'lik Lobind tüpe aktarılır.
b. Her bir tüpe 50 µl Ampure bead eklenir (1.0x) ve iyice pipetaj yapılır.
c. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon sağlanır.
d. Tüpler magnetik stand üzerinde yerleştirilir. Yaklaşık 5 dk boyunca tutularak beadlerin toplanması beklenir.
e. Supernatant atılır.
f. 200 µl taze hazırlanmış 80% lik ethanol eklenir ve 30 saniye beklenir.
g. Supernatant atılır.
h. İkinci defa 200 µl 80% lik ethanol eklenir ve 30 saniye beklenir.
i. Supernatant atılır.
j. Tüplerin içerisinde hiç alkol kalmaması için 10 µl'lik pipet ucu ile tüpler temizlenir.
k. Etanolün uçması için oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilir. Bu aşamada beadlerin aşırı derecede kuruyup çatlamaması önemlidir. Bunun için 5 dakikadan sonra tüpleri sürekli kontrol etmek önemlidir.
l. Kuruyan beadlerin üzerine 27 µl EB buffer ya da nükleazsız su eklenir.
m. Beadler tamamen homojen hale gelene kadar pipetaj yapılır, pipetaj yaparken pipet ile tüpün çeperine yapışmış olan beadlere temas etmemeye özen gösterilmelidir.
n. Tüpler magnetik stand üzerine koyularak yaklaşık 2 dakika beadlerin toplanması beklenir.
o. 25 µl supernatant yeni 0.2 µl PCR tüplerine alınır.

GÜVENLİ DURMA AŞAMASI: Bu aşamada örnekler -20 C'ye kaldırılabilir , +4 derecede birkaç saat bekleyebilir ya da kütüphane amplifikasyon aşamasına geçilebilir.)

Aşama #6: Hazırlanan Kütüphanelerin Kalite Kontrolü

Her örneğin Qubit ölçümü yapılır. Protokolün bundan sonraki basamağına geçebilmemiz için her bir örneğin konsantrasyonu 500 ng olmalıdır. Konsantrasyon değeri 20 ng/µl'nin altındaki örnekler toplam hacim yetmediğinden dolayı, çalışmaya devam etmek için uygun değildir.

	Kullanılacak malzemeler:		Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
	Qiaxcel High Resolution Cartridge		Çalışmadan en az 30 dk. önce Qiaxcel kartuşu oda sıcaklığına getirilmelidir.
	50bp- 800 bp size marker diluted to 2.5 ng/µl		Qiaxcel kartuşu her zaman dik pozisyonda olmalıdır ve kullanılmadığı zaman arkasındaki seal jelin kurumaması için takılı olmalıdır.
	15bp- 3 kb alignment marker		

a. QX dilüsyon buffer ile örnekler 1:2 oranında dilüe edilmelidir (2 µl sample + 4 µl QX dil. buffer).
b. OM500-20sec injection time seçilir (eğer kütüphane konsantrasyonları düşükse, OL500 kullanılabilir.
c. Size distribution aşağıdaki gibi beklenmektedir.

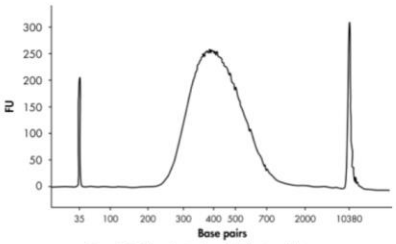


Figure 2. Capillary electrophoresis device trace data.

Not1: 120bp civarında çıkan bantlar adapter-dimer peaklerini göstermektedir ve beklenmemektedir.

Not2: Kütüphane uzunluğunun daha fazla çıkması ile sekans adapterlerinin DNA fragmentlerine eklendiğini gösterir.

Aşama #7: Örneklerin Birleştirilmesi

1. Qubit ölçümü yapılan her bir örnekten 500 ng alınarak örnekler 12 örneğe kadar tek tüpte birleştirilir. Tek tüpte birleştirilen örneklerin toplam konsantrasyonu 6000 ng'ı geçmemelidir.
2. Qubit sonuçları 500'e bölünerek örnekleri birleştirmek için gereken miktar tespit edilir. **Qubit Sonucu 20 ng/uL'nin altında olan örneklerin kütüphanenin genel dengesini bozmamak adına bir sonraki aşamaya geçirilmemesi tavsiye edilir**.

Örnekler	Qubit Sonucu (ng/µl)	500 ng olması için pipetlenecek miktar
Örnek	25	500/25=20 µl kütüphaneden alınır
S1		
S2		
S3		
S4		
S5		
S6		
S7		
S8		
S9		
S10		
S11		
S12		
	Toplam Hacim	µl

Aşama #8: Aşama #7: Kütüphanelerin kurutulması

a. Tek tüpte birleştirilen örneklerin üzerine Cot1 ve blocking oligolar ile 1.5 mL'lik tüpte aşağıdaki tabloya göre miks edilir.

Kütüphane	Yukarıdaki tablodan alınacaktır.
Human Cot DNA Cat. No: 1080768	5 µl
xGen Universal Blocking Oligos TS Miksi Cat. No: 1075474	2 µl

b. Miks kısaca vortekslenir ve spin yapılır.
c. Vacum konsantratör cihazı 60 dk 60°C olarak ayarlanır.
d. Miks tamamen uçurulur.
e. 60 dk sonunda miks tamamen uçmamış olursa 10-15 dakika kontrollü olarak süre uzatılabilir.

GÜVENLİ DURMA AŞAMASI: Bu aşamada örnekler +4 derecede bir gece bekleyebilir ya da -20 C'de bir hafta bekleyebilir.

Aşama #9 : Hibridizasyon reaksiyonu

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
xGen Exome Research Panel(cat no. 1056114)	Çalışmadan önce xGen hibridization ve wash kit oda sıcaklığına getirilmelidir.
xGen 2xHyb Buffer Enhancer(cat no. 1080581)	2x hyb. buffer içerisinde tuz kristalleri varsa tüp 65 C'ye ayarlanmış thermal blokta tuz kristalleri kaybolana kadar bekletilir. Bu süreç bir kaç saat alabilir.
xGen 2x Hyb Buffer(cat no. 1080580)	

Hibridizasyon miksi hazırlanırken kullanılan bufferlar çok yoğun olduğu için kesinlikle yavaş pipetleme yapılmalı ve son hacime dikkat edilmelidir.

Hibridizasyon Miksi	
xGen 2X Hybridization Buffer	8.5 µl
xGen Hybridization Buffer Enhancer	2.7 µl
xGen Exome Panel	4 µl
Nükleazsız Su	1.8 µl
TOTAL	17 µl

1. 0.2'lik PCR tüpünde tablodaki miks hazırlanır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
2. Hazırlanan miks vorteks ve spin yapılır.
3. Vacum konsantratörden çıkan tüpün üzerine hazırlanan miks eklenir ve pellet çözünene kadar pipetaj yapılır.
4. 1.5 mL'lik tüpte bulunan 17µl'lik solusyon 0.2mL'lik PCR tüpüne alınır, kısa spin yapılır.
5. Ardından tüp thermal cycler'a yerleştirilir ve HYB programı başlatılır.

Hybridizasyon programı:

HYB programı (kapak sıcaklığı 100°C)	
95°C	30 sn
65°C	4 saat
65°C	hold
Asla 4 C'ye getirmeyiniz!	

a. HYB programında ürünler 4-16 saat arasında kalabilir. Hybridizasyon reaksiyonu 16 saati geçmemelidir. (Çalışmanın aksamaması için hibridizasyon aşaması 15 saat gibi hesap edilmeli ve son 1 saatte Aşama 10'daki yıkama solüsyonları hazırlanmalıdır.)

b. <u>Sonraki aşamada kullanılacak bufferlar hazır olmadan tüpü HYB reaksiyonundan çıkartmayınız.</u>

Aşama #10: Bufferların hazırlanması

Aşama 11'deki streptavidinin hazırlanabilmesi için öncelikle Tüp A'nın hazırlanması yeterlidir. Tüp A hazırlandıktan sonra direkt olarak Aşama 11'e geçilir. Diğer tüpler Aşama 11'deki 45 dakikalık PCR arasında hazırlanabilir.
Tablodaki Tüp A, B ve C.. isimleri yeni boş bir tüpün üzerine yazılır.

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
xGen 2X Bead Wash Buffer (cat. no: 1072272)	**Hibridizasyon reaksiyonunun bitmesinden 2-3 saat önce hazırlamaya başlayınız.**
xGen 10X Wash Buffer (cat no. 1072266)	**Minimum 30dk önceden oda sıcaklığına çıkartınız.**
xGen 10X Wash Buffer II (cat no: 1072267)	**Eğer 10X wash buffer 1'in bulutumsu bir görüntüsü varsa, 65C termal blokta çözdürülmelidir.**
xGen 10X Wash Buffer III (cat no: 1072268)	
xGen 10X Stringent Wash Buffer (cat no: 1072269)	
Nuclease free water	
Streptavidin bead	**Streptavidin bead 30 dk önce oda sıcaklığına getirilmelidir.**

a. Steptavidin bead yıkaması için yıkama solüsyonlarını tablodaki gibi hazırlayınız.

	Buffer Hacmi (µl)	Nükleazsız Su [µl]	Son Hacim 1X [µl]
Tüp A: xGen 2X Bead Wash Buffer	160	160	320
Tüp B: xGen 10X Wash Buffer I	11	99	110
Tüp C: xGen 10X Wash Buffer II	16	144	160
Tüp D: xGen 10X Wash Buffer III	16	144	160
Tüp E: xGen 10X Stringent Wash Buffer	16	144	160
Tüp F: xGen 10X Stringent Wash Buffer	16	144	160
Tüp G: xGen 10X Wash Buffer I	17	153	170

b. Tüp E, F ve B, 65C'lik termal bloka alınır 30 dakika bekletilir.

65°C Thermal Blokta Bekletilecek Tüpler		
Tüp E 1X Stringent Wash Buffer	160 µl	65°C
Tüp F 1X Stringent Wash Buffer	160 µl	65°C
Tüp B 1X Wash Buffer I	110 µl	65°C

c. Tüp A, C, D ve G oda sıcaklığında bekletilir.

Oda Sıcaklığında Bekletilecek Tüpler		
Tüp A: xGen 1X Bead Wash Buffer	320 µl	Oda Sıcaklığı
Tüp C: xGen 1X Wash Buffer II	160 µl	Oda Sıcaklığı
Tüp D: xGen 1X Wash Buffer III	160 µl	Oda Sıcaklığı
Tüp G: xGen 1X Wash Buffer I	170 µl	Oda Sıcaklığı

Aşama #11: Bead Resuspension Miksin Hazırlanması ve Streptavidin Bead'in Yıkanması

	Kullanılacak Malzemeler:		Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
	xGen 2X Hybridization Buffer		
	xGen Hybridization Buffer Enhancer		
	Nükleazsız Su		
	Streptavidin bead		

a. Streptavidin beadler için Bead Resuspension Mix (BRM)'i 0.2 µl'lik Low-Bind tüpte aşağıdaki şekilde hazırlanmalıdır.

BRM	Hacim
xGen 2X Hybridization Buffer (cat no: 1080580)	8.5 µl
xGen Hybridization Buffer Enhancer (cat no. 1080581)	2.7 µl
Nükleazsız Su	5.8 µl
Toplam Hacim:	**17 µl**

b. Streptavidin bead çalışmaya başlamadan en az 30 dk önce oda sıcaklığına getirilmelidir.
c. 10 sn vortekslenerek Streptavidin bead karıştırılmalıdır.
d. Yeni 1.5 ml'lik low-bind tüp içerisine 50 µl streptavidin bead eklenmelidir.
e. Streptavidin bead üzerine Tüp A'dan 100 µl eklenir. **Dikkatli ve yavaş bir şekilde 10 kez pipetaj yapılır.**
f. 1.5 ml'lik tüp magnetik stand üzerine konulur ve magnetik beadlerin toplanması için 2-3 dk bekletilir.
g. Beadler supernatanttan tamamen ayrıldığında supernatant çekip atılır.
h. Tüp manyetik stand üzerinden alınır.
i. Tüp A ile e aşamasına dönülerek iki yıkama daha yapılır. (Toplamda Tüp A ile 3 defa yıkama yapılır.)
j. Tüp manyetik stant üzerinden alınır.
k. Bead üzerine 17 µl BRM eklenir ve yavaşça pipetaj yapılarak beadler çözdürülür. Bu aşamada tüpün duvarında hiç bead kalmamasına ve beadlerin kurumamasına dikkat edilir. Tüpün duvarında bead kaldığı durumlarda kısa spin yapılabilir ve tekrar karıştırılabilir.
l. HYB PCR'ı sonlandırılır.
m. BRM ile çözdürülen beadler, HYB PCR'daki ürünlerin üzerine eklenir. BRM ve PCR ürününü karıştırmak için yavaşça pipetaj yapılır.
n. BRM ile karıştırılan HYB ürünleri 45 dakika 65 C'deki termal cycler'a yerleştirilir. (Thermal cycler'ın **kapak sıcaklığı 70C** olmalıdır).
o. Thermal cycler inkübasyonu süresince 15 dakikada bir thermal cycler pauselanır ve PCR tüpüne yavaşça pipetaj yapılır.

Aşama #12: Yakalanan (Capture edilen) Bölgelerin Yıkanması

Bu aşamada Sıcak Yıkama (65C) ve Oda Sıcaklığında Yıkama olarak 2 yıkama yapılmaktadır. Step #10'da hazırlanan yıkama solusyonları kullanılacaktır.

a. 0.2 µl'lik PCR tüpü üzerine 65 C'deki termal blokda bulunan Tüp B'den 100 µl eklenir ve sakince 10 kez pipetaj yapılır. (Tüp B çok köpürdüğü için yavaşça köpük oluşturmadan pipetaj yapılmalıdır.)
b. Bu karışım yeni 1.5 ml low-bind tüpe aktarılır ve tüp magnetik stand üzerine yerleştirilir.
c. Beadlerin supernatanttan tamamen ayrılması beklenir.
d. Supernatant ortamdan uzaklaştırılır. Tüp manyetik stant üzerinden alınır.
e. 65C'de bulunan Tüp E'den 150 µl eklenir. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek pipetaj yapılır.
f. 65C'de 5 dk inkübe edilir.
g. Tüp magnetik stand üzerine alınır ve beadlerin supernatanttan tamamen ayrılması beklenir.
h. Supernatant ortamdan uzaklaştırılır.
i. 65C'de bulunan Tüp F'den 150 µl eklenir. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek pipetaj yapılır.
j. 65C'de 5 dk inkübe edilir.
k. Tüp magnetik stand üzerine alınır ve beadlerin supernatanttan tamamen ayrılması beklenir.
l. Supernatant ortamdan uzaklaştırılır.
m. Tüp G'den 150 µl alınarak beadlerin üzerine eklenir, pipetajla dikkatli bir şekilde beadler çözdürülür.
n. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilir, bu sırada 30 saniyede bir vorteks ve kısa spin yapılır.
o. Tüp magnetik stand üzerine yerleştirilir ve beadlerin tamamen süpernatanttan ayrılması beklenir.
p. Supernatant ortamdan uzaklaştırılır.
q. Tüp C'den 150 µl beadlerin üzerine eklenir, pipetaj ile beadler çözdürülür.
r. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilir, bu sırada 30 saniyede bir vorteks ve kısa spin yapılır.
s. Tüp magnetik stand üzerine konulur ve beadlerin toplanması beklenir.
t. Supernatant ortamdan uzaklaştırılır.
u. Tüp D'den 150 µl beadlerin üzerine eklenir ve beadler dikkatli bir şekilde çözdürülür.
v. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilir, bu sırada 30 saniyede bir vorteks ve kısa spin yapılır.
w. Tüp magnetik stand üzerine konulur ve beadlerin toplanması beklenir.
x. Supernatant ortamdan uzaklaştırılır. Tüp manyetik stant üzerinden kaldırılır.
y. 20 µl nukleazsız su ile beadler çözdürülür. Tüpün kenarında hiç bead kalmamasına özen gösterilir.

Aşama #13: Yakalama Sonrası (Post Capture) PCR Zenginleştirme

a. İçerisinde bead bulunan ürün yeni 0,2 lik PCR tüpüne alınır ve aşağıdaki tablodaki amplifikasyon miksi hazırlanır.

Amplifikasyon Mix	**Her Bir Reaksiyon için Hacim**
Yakalanan(Capture edilen) bead eklenmiş Ürün	20 µl
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl
xGen Library Amplification Primer	1.25 µl
Nükleazsız Su	3.75 µl
Toplam	50 µl

b. Aşağıda tabloda belirtilen Post capture PCR protokolü başlatılır.

Post Capture PCR - Kapak sıcaklığı 105°C olacak

Basamak		**Sıcaklık**	**Süre**
Polimeraz aktivasyonu		98 °C	120 saniye
Amplifikasyon	(12 Plex -9 Döngü)	98°C	15 saniye
		60°C	30 saniye
		72°C	30 saniye
Son Uzama		72°C	1 dakika
Durma		4°C	Sonsuz

GÜVENLİ DURMA AŞAMASI: Bu aşamada örnekler +4 derecede bir gece bekleyebilir.

Aşama #14: Yakalama Sonrası (Post Capture) PCR Temizliği

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
Nükleazsız Su	Çalışmadan 30 dakika önce Ampure beadler oda sıcaklığına getirilmelidir.
AMPure XP	Ampure beadler kullanılmadan önce alt üst edilerek ile iyice karıştırılmalıdır.
LoBind Tüp	80%'lik ethanol taze hazırlanmalıdır.

a. Thermal cycler'dan çıkan Post Capture PCR ürünleri, Lobind tüplere aktarılır ve üzerine 75 µl AmpureXP bead eklenir (1.5x vol) ve ürünler ile bead homojen olacak şekilde pipetaj yapılır.
b. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk inkube edilir.
c. Tüpler magnetik stand üzerine yerleştirilir ve yaklaşık 5 dk beadlerin toplanması için beklenir.
d. Ardından supernatant toplanır ve atılır.
e. 125 µl 80%'lik ethanol ile beadler yıkanır ve 1 dk bekletilir.
f. Etanol ile yıkama işlemi tekrar edilir ve tüpün içerisinde kalan alkol 10 µl'lik pipet uçları ile temizlenir. Tüplerde hiç alkol kalmamalıdır.
g. Beadler kuruması için oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilir. Bu aşamada beadlerin çatlamamasına dikkat edilir.
h. Tüp manyetik stand üzerinden kaldırılır ve kuruyan beadlerin üzerine 22 µl EB buffer ile çözülür.
i. 5 dk oda sıcaklığında inkube edilir.
j. Sonrasında tekrar magnetik stand üzerine koyularak 2 dk beadlerin temizlenmesi beklenir.
k. 20 µl supernatant yeni 0.2 µl PCR tüplerine alınır.

GÜVENLİ DURMA AŞAMASI: Bu aşamada örnekler -20 C derecede bir hafta bekleyebilir.

Aşama #15: Yakalama Sonrası (Post Capture) Temizliği Yapılmış Kütüphanelerin Kalite Ölçümü

Örnekler hem Qiaxcel ile yürütülmeli, hem de Quant Assay ile RGQ da analiz edilmelidir.

Kullanılacak malzemeler:	Çalışma öncesi yapılması gerekenler:
Qiaxcel High Resolution Cartridge	Çalışmadan önce Qiaxcel kartuşu oda sıcaklığına getirilmelidir.
50bp- 800 bp size marker diluted to 2.5 ng/µl	Qiaxcel kartuşu her zaman dik pozisyonda olmalıdır ve kullanılmadığı zaman arkasındaki seal jelin kurumaması için takılı olmalıdır.
15bp- 3 kb alignment marker	

a. QX dilüsyon buffer ile örnekler 1:2 oranında dilüe edilmelidir (2µl sample + 4µl QX dil. buffer).
b. OM500-20sec injection time seçilir (eğer kütüphane konsantrasyonları düşükse, OL500 kullanılabilir.)
c. Size distribution aşağıdaki gibi beklenmektedir.

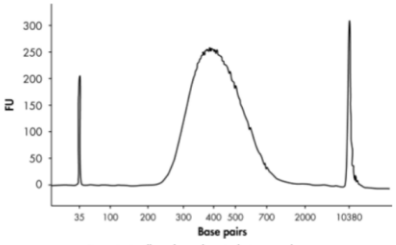


Figure 2. Capillary electrophoresis device trace data.

Aşama #16: Yakalama Sonrası (Post Capture) Temizliği Yapılmış Kütüphanelerin Kantifikasyonu

1- ILMN DNA standartını buz üzerinde eritiniz.
2- ILMN DNA standartını tabloda görüldüğü gibi 5 ayrı 0.2'lik tüpte seri dilusyon ile seyreltiniz.

Standard	Ion Torrent or Illumina DNA Standard	Dilution buffer
Std1	5 µl undiluted	45 µl
Std2	5 µl Std1	45 µl
Std3	5 µl Std2	45 µl
Std4	5 µl Std3	45 µl
Std5	5 µl Std4	45 µl

Rotor gene tüplerine her 5 dilüsyon için 3 tekrar yapılacaktır.

ILMN Standart Sulandırması:

1. ILMN standart dilusyonu için 5 adet 0.2'lik tüp hazırlayınız.
2. Her tüpün içerisine 45 µl Dilusyon buffer ekleyiniz.
3. İlk tüpün içerisine ILMN std stoğundan aldığınız 5 µl'yi ekleyip vorteks ve spin yaparak karıştırınız.
4. İlk tüpten alınan 5 µl solusyonu 2. tüpe aktarınız.
5. Aynı işlemi sırasıyla diğer tüpler için de tekrarlayınız.

Örnek için 3 dilusyon hazırlanacaktır.

Kütüphane Sulandırması:

Birinci dilusyon: 1:20, İkinci dilusyon:1:2000, Üçüncü dilusyon: 1:20.000 olacak şekilde hazırlanır.
Birinci dilusyonun amacı 2. ve 3. dilusyonlar için örnekleri hazırlamaktır, **RotorGene'e girmeyecek.**

1. Kütüphane sulandırması için 3 adet 0.2'lik tüp hazırlayınız.
2. Her tüpe sırasıyla aşağıdaki tabloda belirlenen dilüsyon miktarından ekleyiniz.
3. Ana stoktan 2 ul alarak ilk tüpe aktarın ve vorteks, spin yaparak karıştırınız.
4. Sırasıyla tabloda belirtildiği gibi dilüsyon işlemi tekrarlanır.

Dilüsyon	Kütüphane	Dilüsyon Buffer
Dilüsyon 1 (1:20)	2 µl	38 µl
Dilüsyon 2 (1:2.000)	2 µl (1:20)	198 µl
Dilüsyon 3 (1:20.000)	5 µl (1:2.000)	45 µl

PCR Miksi Hazırlama

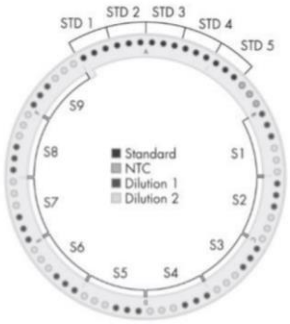
Aşağıdaki tabloda bulunan miktarlar 1 örnek içindir.
Mix hazırlarken her zaman 3 örnek fazla hazırlayınız.
Örneğin: 5 std, 1 adet kontrol, 1 adet 1:2000 ve 1:20000 dilüsyonları ile quant assay kurarken 20 adet kuyucuğa ihtiyaç duyulur. Dolayısıyla mix'i 23-25 örneklik hazırlayabilirsiniz. Bunun için alttaki tabloda bulunan kimyasalların her birini (template hariç) 25 ile çarpmanız gerekmektedir.

İçerik	Rotor Disc 100 ya da 72 well rotor
Nükleazsız Su	6.7 µl
SYBR Green ROX FAST Mastermix	10 µl
Primer mix (10 µM)	0.8 µl
Template (standard ya da kütüphane)	2.5 µl
Final Hacim:	**20 µl**

1. SYBR Green ROX FAST Mastermix'i 10-15 sn santrifuj yapınız.
2. İlk 3 solüsyon ile tüm örnekler için miks hazırlanır.
3. Hazırlanan miksi soğuk blok üzerinde tutunuz.
4. RG tüplerine 17.5µl miks dağıtılır.
5. Mix içeren tüplere ilgili örneğin (1:2000) ve (1:20.000) dilusyonlarından eklenir.
6. İlk 18 tüpe her standartın sırasıyla 3 kopyasını ve 3 kopya ntc ekleyiniz. (NTC için 17.5 µl karışımın üstüne 2.5 µl su ya da dilüsyon buffer ekleyebilirsiniz).

Rotorgene çalışmasında 5 standart ve 1 NTC (non-template kontrol) için 3 kopya olacaktır. Dolayısıyla RotorGene tüplerinin ilk 18 tanesi standartları ve ntc'yi içerecek. Her örneğin (1:2.000) ve (1:20.000) dilusyonlarından bir Rotor gene tüplerine doldurulacak.
Her örnek için (1:2000) ve (1:20.000) olmak üzere 2 mix gerekmektedir.

Örnek dağılımları aşağıdaki gibi olacaktır. Sadece her örnek dilusyonu 3 kopya yerine tek kopya olacak.



Real time PCR cihazını aşağıdaki döngüde kurunuz. 30 Döngünün sonunda florosan ışıma için data toplaması yapılacak.

Cycles	Duration	Temperature	Comments
1	10 min	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase is activated by this heating step.
30	15 s	95°C	
	5 s	68°C	
	5 s	65°C	
	60 s	60°C	Perform fluorescence data collection.

Quant Assay Analizi:

1. PCR döngüsü bittikten sonra örneklerin Ct değerlerini alınız ve "Illumina Data Analiz Programı _ 72lik rotor disk için" excel tablosunun 2. sayfasında bulunan "Raw Ct" sütununa rotorgene'den çıkan ct değerlerini yazınız.
2. Her örneğin her dilusyonu için 3 kopya Ct değeri yazılmalıdır.
3. "Library size" kısmına Qiaxcelden çıkan sonucu yazınız
4. "Sample Library Dilution" kısmına her örneğin ilk dilüsyonu için 2000 ve ikinci dilüsyonu için 20000 yazınız. Nokta kullanmayın.
5. "Result" kısmında her örnek için pM cinsinden molar konsantrasyonlara ulaşabilirsiniz. Örnek ct değerlerini standart ct değerleri ile kıyaslayarak. Ilgili örneğin 1:2000 ya da 1:20.000 konsantrasyonunu kullanmaya karar veriniz.

Örneğin:

Well1	Well2	Well3	Sample name	pM		Ave C_T (Y)
1	2	3	**std1**	20		11.4266667
4	5	6	**std2**	2		14.7
7	8	9	**std3**	0.2		18
10	11	12	**std4**	0.02		21.3
13	14	15	**std5**	0.002		24.7
16	17	18				40
19	20	21	sample library 1 dilution 1	59574.4		11.4266667
22	23	24	sample library 1 dilution 2	61309.8		14.7

Örnek 1 için ilk dilüsyonun Ct değerine ve 2. dilusyonun Ct değerine bakılır. Eğer her iki Ct değeri de standart aralığına düşüyorsa konsantrasyonu daha yüksek olan değer kabul edilir. Eğer Ct'lerden birisi standart aralığında diğeri dışındaysa aralıkta olan değer kabul edilir. Eğer her iki Ct'de standart aralığı dışındaysa bu örneğin dilusyon oranları değiştirilerek tekrar dilüsyon yapılır ve test tekrarlanır.

Yukarıdaki tabloda 1. örnek için her iki dilüsyon Ct değeri de standartlar içerisinde olduğu için konsantrasyonu daha yüksek olan ikinci dilüsyondaki konsantrasyonu kabul ediyoruz, yani bu örneğin kütüphane konsantrasyonunu 60-62 nM olarak alabiliriz.

"Result" kısmındaki konsantrasyonlar pM cinsindendir. Bu konsantrasyon değerlerini nM'a çevirmek için pM değerlerini 1000'e bölmeniz gerekmektedir.

Bu aşamadan sonra kullanılacak cihaza ve kartuşa göre örnekler gerekli dilusyonlara getirilmeli ve pool yapılmalıdır .

Aşama #17: Illumina Nextseq 550 Cihazına Örneklerin Yüklenmesi

Çalışma Öncesi Yapılacaklar

- 1 N NaOH stoğu 0.2 N'e dilüe edilir.(200 µl 1 N NaOH + 800 µl ddH2O şeklinde sulandırılır.)
- 1 M Tris stoğu 0.2 M'a dilüe edilir. (200 µl 1 M Tris + 800 µl ddH2 şeklinde sulandırılır.)
- Buz veya soğuk blok hazırlanır.
- Illumina kartuşu ile çalışmaya başlamadan, oda sıcaklığındaki su banyosunda 2 saat önceden erimesi sağlanır.
- Cihaza Quick Wash verilir.
- Reaktif kartuşuna kütüphane yüklemeden önce; reaktif kartuşu 10 kere alt üst edilerek bufferların karışması sağlanır. Reaktif kartuşun tamamen eridiğinden emin olunur. Kartuşun altı iyice kurutulduktan sonra örnek yüklenebilir.

Kütüphanenin 4 nM'a Seyreltilmesi

1. Hesaplama yapılarak Quant Assay'den alınan sonuca göre kütüphane 4 nM'a dilüe edilir.
2. Yeni 0.2 'lik PCR tüpüne dilüsyon yapılır.
3. Dilüsyon yapılırken son hacim konsantrasyona göre 40 uL olarak belirlenir.
4. Örneğin: Kütüphanenin kantifikasyon sonucu konsantrasyonu 86nM ise:

   M1.V1=M2.V2 den;

   86.x = 4 nM. 40 µl x = 1.86 µl Library + 38.14 µl ddH20 şeklinde hazırlanır.

5. Kısaca vorteks ve spin yapılır.

4 nM'lık Kütüphanenin 20 pM'a Düşürülmesi ve Kütüphane Denatürasyonu

1. Yeni LoBind 1.5'lik tüpe 4nM'lık kütüphaneden 5 µl alınır ve üzerine 5 µl 0.2 N NaOH eklenir.
2. Vorteks ve spin yapılır. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
3. 5 dk bitiminde üzerine 5 µl 0.2 M Tris eklenir. (Bu işlem denatürasyonu durdurur.)
4. Üzerine ILMN kit içeriği olan HT1 bufferdan 985 µl eklenir ve buz üstüne alınır.

20 pM'lık Kütüphanenin 1.8 pM'a Düşürülmesi

1. High output kit yüklemesi yapılacaksa son konsantrasyon **1.8 pM**, yükleme hacmi **1.3 mL** olacak şekilde ayarlanmalıdır.
2. Temiz 1.5 mL'lik tüpe, 20 pM'lik dilüsyondan 117 µl alınıp üzerine 1183 µl HT1 Bufferdan eklenir.
3. Kısaca vortekslenir, ardından spin atılır.

Kartuşun Cihaza Yüklenmesi ve Çalışmanın Başlatılması

1. Cihaz yazılımdan SHUT DOWN edilir.
2. Yazılım cihazı kapattıktan sonra, cihazın arkasındaki sigortadan cihaz kapatılır ve 30 saniye sonra tekrar sigortadan açılır.
3. Cihazın ön tarafındaki güç düğmesinden cihaz açılır.
4. Illumina yazılımının açılıp sistem kontrollerini tamamlaması beklenir.
5. Kartuş içinde 16. pozisyon 1 mL'lik boş ve temiz bir pipet ucuyla dikkatlice delinir.
   Yeni bir tip takılarak 1.3 mL'lik kütüphane belirlenen pozisyona aktarılır. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edilir varsa temiz bir pipet ucuyla dikkatlice giderilir.
6. Sekans sekmesine tıklanır ve yazılımın yönlendirdiği şekilde kartuş ve flow cell cihaza yüklenir.
7. Kurulacak çalışma ile ilgili bölümler; run ismi, recipe tipi, okuma seçenekleri aşağıdaki şekilde doldurulur.

   Recipe; NextSeq High olarak seçilir.
   Pairend seçeneği seçilir.

Read 1	Read2	Index1	Index2
151	151	8	8

8. Next'e basılarak sistem kontrollerinin geçmesi beklenir.
9. Tüm sistem kontrolleri tamamlandığında START'a basılarak çalışma başlatılır.

HAM VERİLER

FORMLAR

EK-1 ***(Form-1)***

HASTA TAKİP FORMU

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

T.C.
Tarih:
Olgu No:

Esansiyel Tremorun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması
HASTA TAKİP FORMU

Ad-Soyad:
D.T/ yaşı:
Cinsiyet:
Adres bilgileri:
Tel:

Protokol No:
DNA No:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Antenatal/Natal/Postnatal:

Öykü:

Psikososyal motor gelişme:

Aile ağacı

Klinik bulguların başlama yaşı: **Muayene yaşı:**

Fizik muayene: **Alkole Yanıt:**

Tremor					
İstirahat		Postural		Kinetik	
R	L	R	L	R	L

*** (+ low amplitude, ++ moderate amplitude 1-2cm, +++ large amplitude >2 cm, R right hand, L left hand)**

Tremor		
Baş	Çene	Ses

Arşimet spiral testi		Bradikinezi		Rijidite		Postüral dengesizlik	Hipomimia
R	L	R	L	R	L		

*** (+ mild, ++ moderate, +++ severe, R right hand, L left hand)**

Görüntüleme bulguları:

Ek tetkikler (biyokimyasal vd):

Karaciğer fonksiyon testleri: Kreatinin:

Elektrolitler: Kan Şekeri:

Tiroid Fonksiyon testleri: Vitamin B

Pozitif bulgular:

TANI:

Moleküler analizler:

EK-1: Fahn; Tolosa, Marin Klinik Tremor Derecelendirme Ölçeği:

I. Tremor: Tremorun hızı:

1. Dinlenme halinde. Baş ve gövde için, uzanmış halde iken
2. Postüral (üst ekstremite: kollar öne uzatılmış halde, bilekler hafif ekstansiyonda, parmaklar açık; alt ekstremite: bacaklar kalça ve dizlerden fleksiyona gelmiş, ayaklar dorsifleksiyonda; dil: dışarı çıkartılmış halde; baş ve gövde: oturur veya ayakta durur halde)
3. Aksiyon ve intansiyonla (üst ekstremite: parmak-burun testi veya diğer hareketler; alt ekstremite:fleksiyon postüründe ayak parmağı- parmak testi)

0- Yok
1- Hafif (amplitüdlü <0,5cm). Aralıklı olabilir
2- Orta amplitüdlü (0,5 – 1 cm). Aralıklı olabilir
3- Daha belirgin amplitüdlü (1 – 2 cm)
4- Çok büyük amplitüdlü (> 2 cm)

II. El yazısı: Hastaya standart bir cümle yazdırılır: "Bu benim en güzel yazımdır", imzası, tarih.

0- Normal
1-Hafif derecede bozulmuş, biraz düzensiz, titrek
2-Orta derecede bozulmuş, okunabilir ancak tremor görülebilir
3-Belirgin derecede bozulmuş, okunaksız
4- Ağır derecede bozulmuş. Eline, diğer eliyle destek olmaksızın kağıt üzerinde kalem tutamaz

III. Çizgi çizme (ABC): Hastadan çeşitli noktaları çizgiler çizerek fakat çapraz yapmadan birleştirmesi istenir. El ya da kolu masaya dayamadan her iki elle yaptırılır, daha az tutulmuş olan el ile başlanır

0- Normal
1- Hafif derecede titreme. Bazen çizgiler çaprazlaşabilir
2- Orta derecede titreme veya çizgilerde fazla çaprazlaşma vardır
3- Çok güçlükle yapar, çok hata vardır
4- Çizgi çizmeyi tamamlayamaz

IV. Su doldurma: Üstten 1 cm boşluk bırakacak şekilde suyla doldurulmuş, sekiz cm boyunda, sert plastik bardaklar kullanılır. Hastadan suyu bir bardaktan diğerine boşaltması istenir. Her el ayrı ayrı test edilir.

0- Normal
1- Tremorsuz bir kişiden daha dikkatli, ancak su dökülmez
2- Az miktarda su dökülür (total miktarın %10'una kadar)
3- Fazla miktarda su dökülür (>%10-50)
4- Suyun büyük miktarını dökmeden dolduramaz

V. Konuşma: Eğer varsa spastik disfoniyi içerir:
0- Normal
1- Yalnızca "sinirli" iken hafif ses titremesi
2- Devamlı, hafif derecede ses tremoru
3- Orta derecede ses tremoru
4- Ağır derecede ses tremoru. Bazı kelimeler güç anlaşılır

VI. Beslenme: (sıvılar dışında)
0- Normal
1- Hafif derecede bozulmuştur. Tüm parçaları ağzına götürebilir, dükme çok seyrektir
2- Orta derecede bozulmuştur. Bezelye ve benzeri gıdaları sık sık döker. Başını yemekle olan mesafenin yarısına kadar öne getirir.
3- Belirgin derecede bozulmuştur. Gıdayı kesemez veya beslenmek için iki elini kullanır
4- Ağır derecede bozulmuştur. Beslenmesi için yardım gerekir

VII. Sıvıları ağzına götürme:
0-Normal
1-Hafif derecede bozulmuştur. Hala kaşık kullanabilir, ancak kaşık tamamen doluysa kullanamaz
2- Orta derecede bozulmuştur. Kaşık kullanamaz. Bardak veya fincan kullanır
3- Belirgin derecede bozulmuştur. Bardak veya fincandan içebilir, ancak iki eline gereksinim vardır
5- Ağır derecede bozulmuştur. Bir kamış kullanmak zorundadır

VIII. Kişisel Temizlik:
0-Normal
1- Hafif derecede bozulmuştur. Herşeyi yapabilir, ancak normal bir kişiden daha dikkatlidir 2- Orta derecede bozulmuştur. Herşeyi yapabilir, ancak hatalıdır; tremordan dolayı elektrikli traş makinesi kullanır
3- Belirgin derecede bozulmuştur. İnce işlerin çoğunu yapamaz; örneğin iki elini kullanmadan ruj süremez veya elektrikli traş makinesiyle bile traş olamaz
5- Ağır derecede bozulmuştur. Beceri isteyen hiçbir işi yapamaz

IX. Giyinme:
0-Normal
1- Hafif derecede bozulmuştur. Herşeyi yapabilir, ancak normal bir kişiden daha dikkatlidir 2- Orta derecede bozulmuştur. Herşeyi yapabilir ancak hatalıdır
3- Belirgin derecede bozulmuştur. Düğme ilikleme, ayakkabıbağlama gibi işlerde kısmen yardım gereksinimi vardır
4- Ağır derecede bozulmuştur. Kaba işlerde dahi yardım gerekir

X. Yazı yazma:
0- Normal
1-Hafif derecede bozulmuştur, okunabilir. Mektup yazmayısürdürebilir
2- Orta derecede bozulmuştur. Okunabilir, ancak artık uzun mektup yazamaz
3- Belirgin derecede bozulmuştur. Okunaksızdır

5- Ağır derecede bozulmuştur. İmzasını atamaz

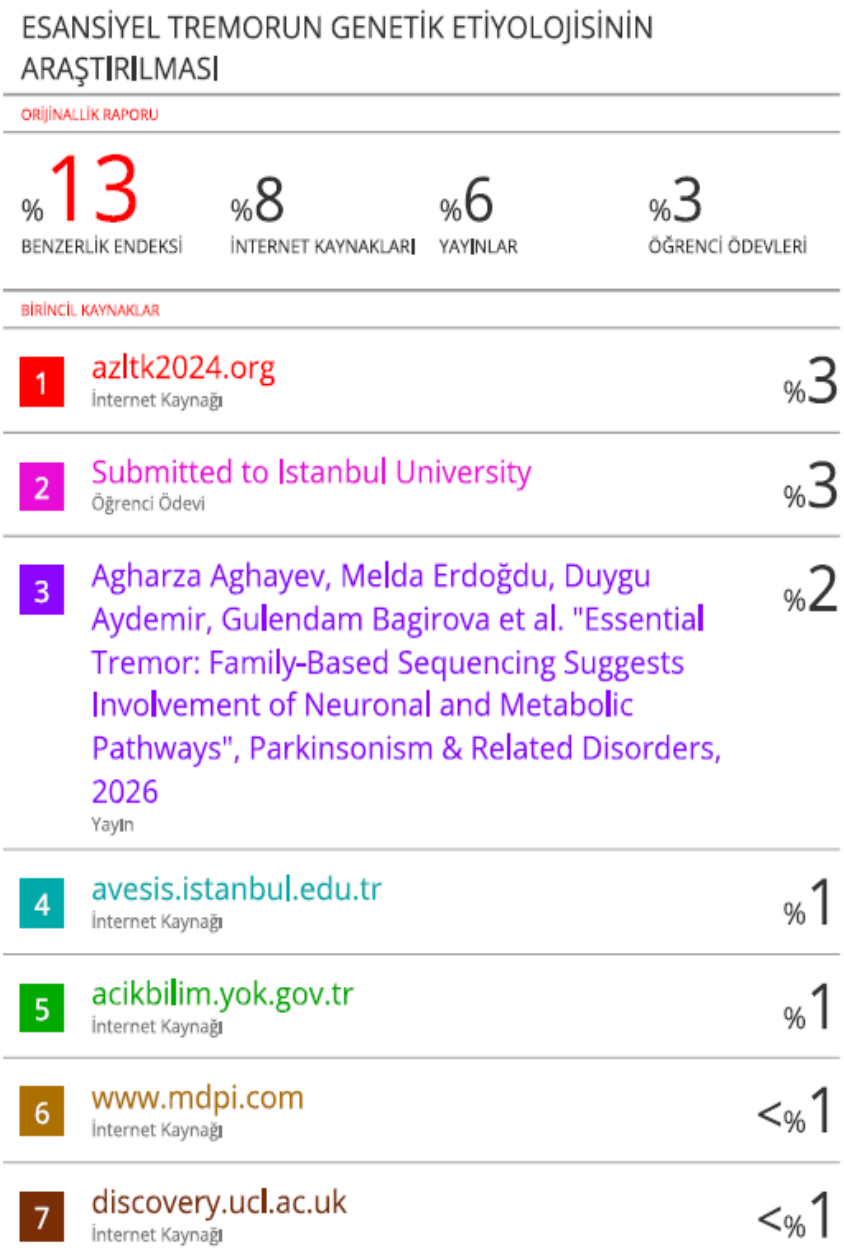
XI. Görevini sürdürme:

0- Tremor görevini yapmayı engellemez
1- Çalışabilir, ancak normal bir kişiden daha dikkatli olmak zorundadır
2- Her şeyi yapabilir, ancak hatalıdır. Tremordan dolayıperformansı eskiye göre daha kötüdür
3- Günlük çalışmasını sürdüremez. Tremordan dolayı işini değiştirmiş olabilir. Tremor, ütü yapma gibi ev işlerini kısıtlar
4- Dışarıda herhangi bir işte çalışamaz, ev işleri çok kısıtlıdır.

ETİK KURUL ONAYI

EK-2

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



ESANSİYEL TREMORUN GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%13	%8	%6	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	azltk2024.org İnternet Kaynağı	%3
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%3
3	Agharza Aghayev, Melda Erdoğdu, Duygu Aydemir, Gulendam Bagirova et al. "Essential Tremor: Family-Based Sequencing Suggests Involvement of Neuronal and Metabolic Pathways", Parkinsonism & Related Disorders, 2026 Yayın	%2
4	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
7	discovery.ucl.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1