Bildiri No: **TMB-080** **Doi:** 10.5606/phhb.dergisi.suppl2026.080

Tüm Ekzom Dizileme-negatif Parkinson Hastalarında PacBio HiFi Tabanlı Faz Bilgili Tüm Genom Analizi

Ümran Yaman[123]†, Özgür Öztop Çakmak[4]†, Hermione Ugolini[5], Mary Ann Santosh[5], Tuğçe Gül-Demirkale[6], A. Nazlı Başak[6], Henry Houlden[12], Sibel Ertan[4]

[1]*UK Dementia Research Institute at University College London, London, United Kingdom*
[2]*Department of Neuromuscular Diseases, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, United Kingdom*
[3]*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Nörolojik Bilimler Enstitüsü, Bilişsel Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*
[4]*Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*
[5]*Long Read Sequencing Facility, UCL Queen Square Institute of Neurology, University College London, London, United Kingdom*
[6]*Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı (NDAL-KUTTAM), İstanbul, Türkiye*
† Bu yazarlar çalışmaya eşit katkı sağlamıştır.

Parkinson hastalığı, klinik özellikleri, seyri ve genetik mimarisi bakımından belirgin heterojenite gösteren bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın önemli bir kısmı sporadik görünmekle birlikte, özellikle erken başlangıçlı ve/veya ailesel olgularda monogenik nedenlerin katkısı daha belirgindir. Bununla birlikte Parkinson hastalığı genetiği yalnızca tek nükleotid varyantları ile açıklanamaz; yapısal varyantlar, tekrar genişlemeleri, kompleks yeniden düzenlenmeler ve faz bilgisi gerektiren bileşik heterozigot düzenekler de hastalık etiyolojisinde rol oynayabilir.[1,2]

PRKN (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase, PARK2), otozomal resesif erken başlangıçlı Parkinson hastalığının en iyi tanımlanmış genlerinden biridir. Benzer biçimde ATP13A2 (ATPase 13A2), Kufor-Rakeb sendromu ve juvenil parkinsonizm ile; VPS13C (Cacuolar Protein Sorting 13 Homolog C) ise otozomal resesif erken başlangıçlı parkinsonizm ile ilişkilendirilmiştir.[3-5] Bu nedenle özellikle erken başlangıçlı, ailesel ya da tüm ekzom dizileme (WES) negatif olgularda bu genler ayrıntılı yapısal ve faz temelli analiz için öncelikli adaylardır.

Kısa okuma tabanlı dizileme yaklaşımları, tekrar açısından zengin intronik bölgelerde, büyük insersiyon ve delesyonlarda, dengeli veya kompleks yeniden düzenlenmelerde ve faz bilgisi gerektiren varyant kombinasyonlarında sınırlı kalabilmektedir. Uzun okuma tüm genom dizilemesi ise küçük varyantların, yapısal varyantların, tandem tekrarların ve haplotip/faz bilgisinin aynı veri kümesi içinde birlikte değerlendirilmesine olanak sağlar. PRKN lokusunda standart yöntemlerle gözden kaçabilen kompleks yapısal olayların uzun okuma ile çözümlenebildiği yakın zamanda gösterilmiştir.[6,7] Tandem tekrar analizinde alel uzunluğu, motif kompozisyonu ve CpG metilasyonu birlikte raporlanabilmektedir.[8] RFC1 (Replication Factor C Subunit 1) lokusunda ise kısa okuma verilerinden elde edilen pozitif sinyallerin uzun okuma ile doğrulanmasının gerekli olduğu ve motif kompozisyonunun klinik yorumda kritik olduğu Parkinson kohortlarında gösterilmiştir.[9,10]

Türkiye'den bildirilen yakın dönem Parkinson genetik çalışmaları da herediter ve erken başlangıçlı olgularda genetik çözümlemenin önemini desteklemektedir. Türk kohortlarında herediter Parkinson olgularının moleküler özellikleri, ayrıca GBA (Glucocerebrosidase) ve GLA (Galactosidase Alpha) varyantlarının dağılımı bildirilmiştir; hedeflenen panel verilerinin yeniden değerlendirilmesinin de ek katkı sağlayabileceği gösterilmiştir.[11-13] Bu çalışmalar uzun okuma kullanmasa da, Türkiye popülasyonunda genetik çeşitliliğin ve yeniden analiz ihtiyacının önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmanın amacı, WES-negatif Parkinson hastalarında PacBio HiFi tabanlı uzun okuma tüm genom dizileme verilerini kullanarak hastalıkla ilişkili aday varyantları sistematik biçimde önceliklendirmek;

özellikle yapısal varyantlar, tekrar lokusları ve faz bilgili aday varyant kombinasyonları açısından biyolojik olarak anlamlı sinyalleri belirlemek ve ileri doğrulama için en güçlü adayları seçmektir. Uzun okuma dizilemenin sağlayabileceği ek katkının, özellikle PRKN gibi yapısal varyasyon yükü yüksek genlerde ve RFC1 gibi kompleks tekrar lokuslarında daha belirgin olması beklenmektedir.[6,7,10]

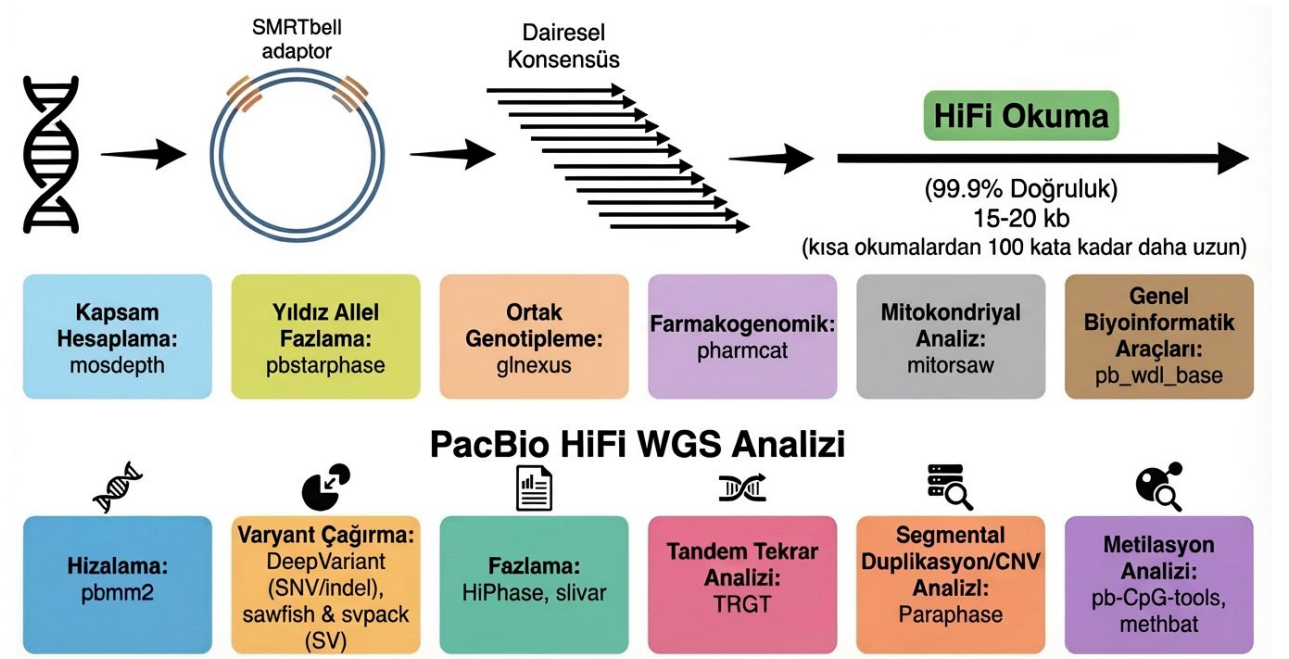
YÖNTEMLER

Hasta seçimi ve çalışma tasarımı

Çalışmaya, daha önce WES ile açıklanamamış Parkinson hastaları dahil edildi. Olgular; başlangıç yaşı, aile öyküsü, ebeveyn akrabalığı ve klinik fenotip açısından gözden geçirildi. Analitik odağı özellikle erken başlangıçlı, ailesel kümelenme gösteren, resesif kalıtım şüphesi taşıyan veya klasik kısa okuma tabanlı yöntemlerle yeterince çözümlenememiş yapısal varyant ve tekrar lokusu olasılığı bulunan hastalar oluşturdu.

PacBio HiFi kütüphane hazırlığı ve dizileme

Periferik kan örneklerinden yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA izole edildi. DNA kalite ve miktarı fluorometrik yöntemlerle değerlendirildi; fragman bütünlüğü uzun DNA kalite kontrol sistemleri ile kontrol edildi. Tüm genom kütüphaneleri SMRTbell prep kit 3.0 yaklaşımına uygun olarak hazırlandı. Bu yaklaşımda genomik DNA uç onarımı ve adaptör ligasyonu sonrası kapalı dairesel SMRTbell moleküllerine dönüştürülür; ardından PacBio Revio platformunda aynı molekülün çoklu geçişlerinden elde edilen dairesel konsensüs okumalardan yüksek doğrulukta HiFi verisi üretilir. PacBio'nun resmi prosedür dokümanları, WGS için SMRTbell prep kit 3.0 iş akışının manuel veya otomasyon uyumlu olarak uygulanabildiğini ve Revio sisteminde HiFi veri üretimi için standartlaştırılmış bir çerçeve sunduğunu belirtmektedir. Bu çalışmadaki örnekler Revio sistemi üzerinde dizilendi.



Şekil 1. PacBio HiFi tüm genom dizileme ve analiz iş akışı. DNA'nın SMRTbell adaptörleri ile daireselleştirilmesi ve dairesel konsensüs elde edilmesiyle yüksek doğrulukta HiFi okumalar üretilmektedir. Bu veriler hizalama (pbmm2), varyant çağırma (DeepVariant, pbsv), fazlama (HiPhase), tandem tekrar analizi (TRGT), SV analizi (Sawfish), CNV analizi (Paraphase) ve metilasyon analizi (pb-CpG-tools) ile çok katmanlı olarak değerlendirilir. PacBio'nun TRGT ve HiFi tabanlı analiz çerçevesi bu yaklaşımı desteklemektedir.

Biyoinformatik is akisi ve analizi

Bu çalışmada PacBio HiFi tabanlı uzun okuma tüm genom dizileme verileri analiz edildi. Veriler humanwgs_family v3.1.1 iş akışı ile işlendi. Analiz yaklaşımı, tek bir veri seti üzerinden küçük varyantlar, yapısal varyantlar, tandem tekrarlar, faz bilgisi ve 5mCpG metilasyon katmanlarını birlikte değerlendiren çok katmanlı bir çerçeveye dayanmaktadır. HiFi okumalar pbmm2 kullanılarak referans genoma hizalandı ve kapsama derinliği mosdepth ile hesaplandı. Küçük varyantlar DeepVariant tabanlı çağrılar üzerinden değerlendirildi. Yapısal varyant analizi, iş akışı tarafından üretilen fazlanmış SV çıktıları ve sawfish/svpack tabanlı sonuçlar kullanılarak gerçekleştirildi. Fazlama HiPhase ile yürütüldü ve slivar kullanılarak aile-temelli varyant önceliklendirmesi desteklendi. Tandem tekrar analizi TRGT ile gerçekleştirilmiş olup, bu araç tekrar uzunluğu, motif kompozisyonu ve destekleyici okuma yapısını birlikte değerlendirme imkânı sağlamaktadır.[8] Kopya sayısı ve segmental duplikasyon analizi Paraphase ile yürütüldü. Mitokondriyal genom varyantları mitosaw kullanılarak analiz edildi. CpG metilasyon düzeyleri pb-CpG-tools ve methbat çıktıları üzerinden özetlendi (Şekil 1).

Analizde dört ana çıktı grubu birlikte değerlendirildi:

(i) fazlanmış küçük varyant VCF dosyaları,

(ii) fazlanmış yapısal varyant VCF dosyaları,

(iii) TRGT tekrar genotipleme VCF dosyaları,

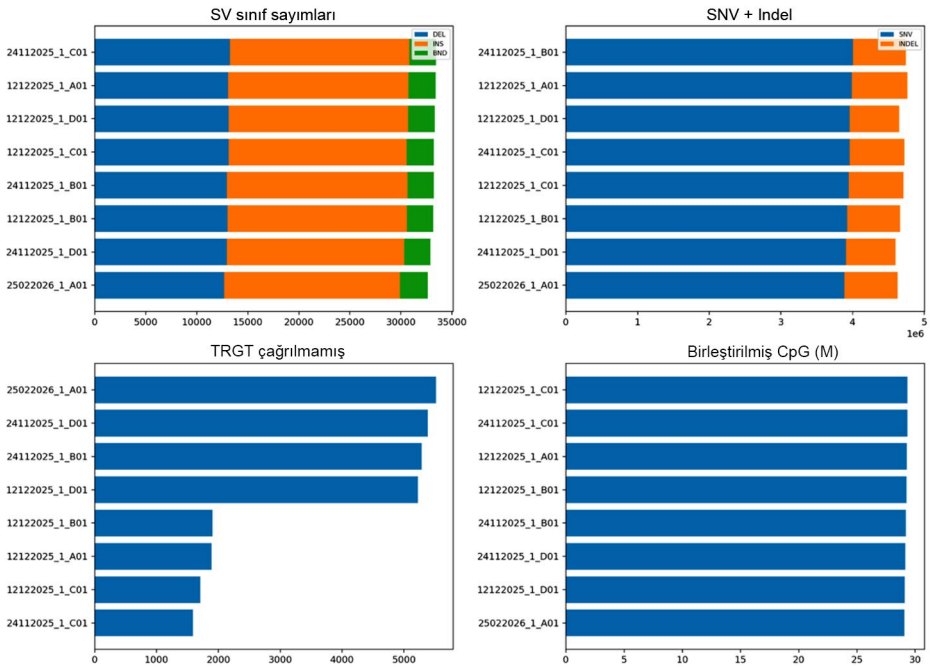
(iv) faz blokları, haplotag ve faz istatistikleri.

Aday önceliklendirme aşamasında öncelikle tersiyer filtrelenmiş küçük varyant, bileşik heterozigot ve yapısal varyant tabloları kullanıldı; ardından seçilen lokuslar için VCF ve okuma düzeyinde manuel inceleme yapıldı. İş akışı, özellikle resesif kalıtım modeli ile uyumlu adayların faz bilgisi yardımıyla daha doğru sıralanmasına olanak sağladı. Parkinson hastalığı ile ilişkili önceliklendirme aşamasında phrank[14] ile Parkinsonism HPO terimi (HP:0001300) belirtilerek ilgili lokuslar önceliklendirildi. Bu seçimin gerekçesi, bu gen ve lokusların erken başlangıçlı parkinsonizm, yapısal varyasyon, tekrar genişlemesi veya resesif hastalık modelleri ile ilişkili olmalarıdır.[3-5,9]

Kalite değerlendirmesinde ortalama genom kapsaması, eşleşen okuma oranı, okuma uzunluğu N50, okuma kalite skorları, hizalama başarımı, küçük varyant yükü, yapısal varyant sınıf dağılımı ve faz başarımı dikkate alındı (Tablo 1, Şekil 2). Yapısal varyant yorumunda varyant tipi, gen içi konum, intronik veya kodlayıcı bölge örtüşmesi, örnekler arası tekrar edebilirlik ve destekleyici okuma örüntüsü değerlendirildi. Tekrar lokuslarında TRGT tabanlı değerlendirme kullanıldı. TRGT, PacBio HiFi verisinden tandem tekrarların alel uzunluklarını, konsensus tekrar yapısını, destekleyen okumaları ve CpG metilasyonunu raporlayabildiği için yorumda yalnızca tekrar uzunluğu değil, aleller arası ayrışma, motif bileşimi, destekleyici okuma sayısı ve varsa metilasyon örüntüsü birlikte dikkate alındı.[8] RFC1 özelinde patojenite yorumunda tekrarın yalnızca

Tablo 1. Örnek bazında teknik kalite özeti; Tüm örneklerde kapsama derinliği, okuma uzunluğu ve faz performansı, yapısal varyant ve tandem tekrar analizi için yeterli düzeydedir

Örnek	Kapsama (×)	Okuma N50 (bp)	Fazlanmış baz (Gb)	Eşleşen okuma (%)	Faz blok NG50 (Mb)
12122025_1_A01	31.08	15184	2.50	99.96	0.59
12122025_1_B01	27.34	18564	2.58	99.96	1.32
12122025_1_C01	33.92	17987	2.55	99.96	1.01
12122025_1_D01	25.47	19395	2.76	99.96	1.86
24112025_1_B01	32.49	20773	2.79	99.96	2.04
24112025_1_C01	33.72	22841	2.61	99.97	2.03
24112025_1_D01	26.23	22378	2.73	99.96	2.02
25022026_1_A01	30.39	15304	2.51	99.94	0.55



Şekil 2. Örnekler arası yapısal varyant yükü ve tekrar çağrısı başarımının karşılaştırılması.

büyüklüğü değil, özellikle motif bileşimi kritik olduğundan bu lokusta boyut tek başına yeterli yorum ölçütü olarak kullanılmadı.[9,10]

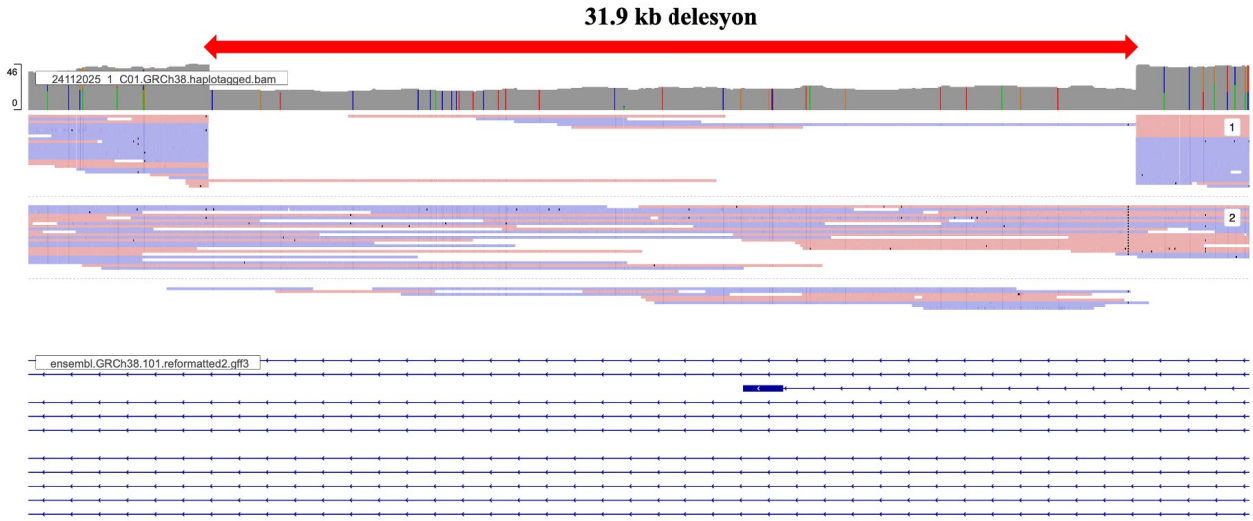
BULGULAR

Uzun okumalar tüm genom dizileme verileri teknik olarak yüksek kalite göstermiştir. Ortalama kapsama 25-34x, okuma uzunluğu N50 15-23 kb, eşleşme oranı %99.94-99.97 ve fazlanmış baz miktarı örnek başına yaklaşık 2.5-2.8 Gb olarak hesaplanmıştır. Bu kalite metrikleri, küçük varyantların yanı sıra yapısal varyantlar, tandem tekrarlar ve haplotip temelli analizler için veri setinin uygun olduğunu göstermektedir.

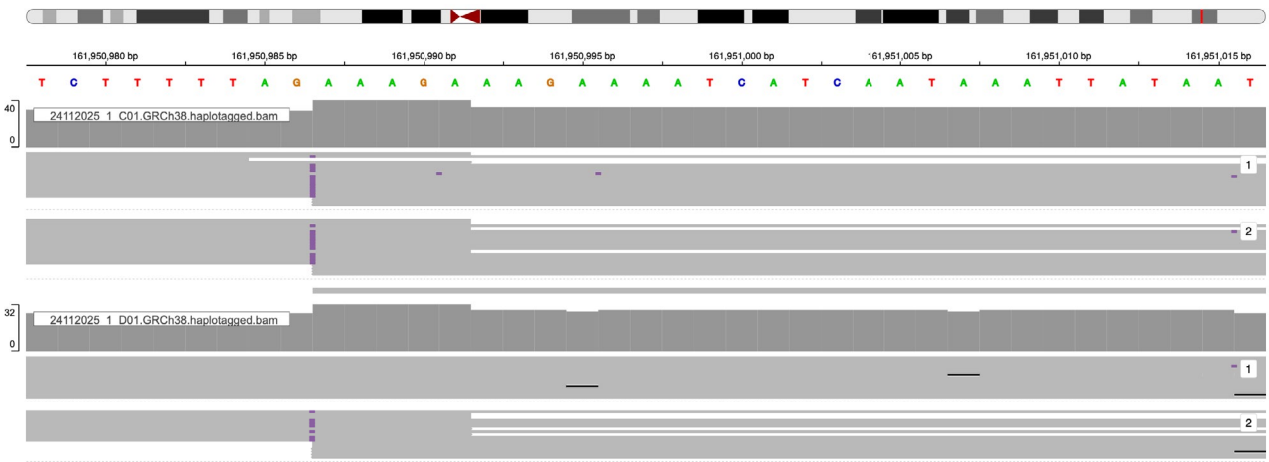
Kohort genelinde en belirgin ve tutarlı bulgular PRKN lokusunda saptanmıştır. Özellikle intron 4 ve intron 6 bölgelerinde kümelenen yapısal olaylar dikkat çekmektedir. 24112025_1_C01 örneğinde chr6:161950985 ve chr6:161951009 koordinatlarında iki breakend, chr6:162010625 ve chr6:162010748 pozisyonlarında intronik insersiyonlar ve chr6:162348868–162380769 aralığında yaklaşık 31.9 kb büyüklüğünde bir delesyon birlikte gözlenmiştir (Şekil 3, 4). Aynı lokusta birden fazla varyant tipinin birlikte bulunması, PRKN geninde kompleks bir yapısal yeniden düzenlenmeye işaret etmektedir. Benzer breakpoint koordinatlarının 24112025_1_D01 örneğinde de korunması, bu bölgenin kohort içinde tekrarlayan bir yapısal hotspot olabileceğini düşündürmektedir.

Buna ek olarak, PRKN intron 6'da chr6:162011450 koordinatında yaklaşık 200-300 bp aralığında intronik insersiyonlar birden fazla bireyde gözlenmiştir. Bu varyantlar bazı bireylerde heterozigot, bir bireyde ise homozigot olarak saptanmıştır. Aynı lokusun farklı bireylerde tekrar etmesi, bu bölgenin yapısal olarak instabil bir tekrar bölgesi olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu varyantların tek başına nedensel olup olmadığını belirlemek için RNA düzeyinde fonksiyonel analiz gereklidir.[3,6,7]

PRKN lokusunda yapılan tekrar analizleri, chr6:161950960-161951021 aralığında yer alan AGAA motifli tekrar bölgesinde alel-spesifik farklılıklar



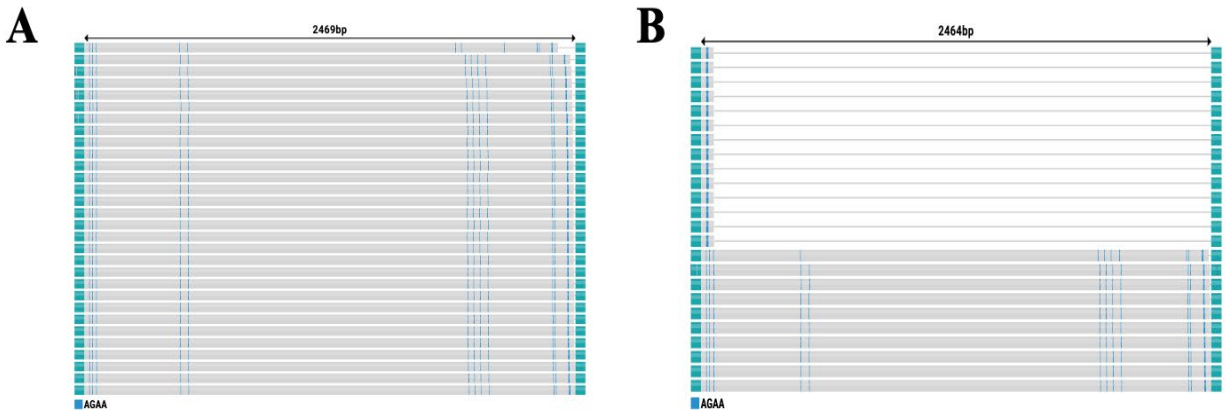
Şekil 3. 24112025_1_C01 örneğindeki PRKN lokusunda yaklaşık 31.9 kb'lik haplotip-spesifik intronik delesyon (chr6:162348868). Delesyon bölgesinde okuma kapsamasının belirgin şekilde azaldığı ve hizalanmaların kesildiği görülmektedir.



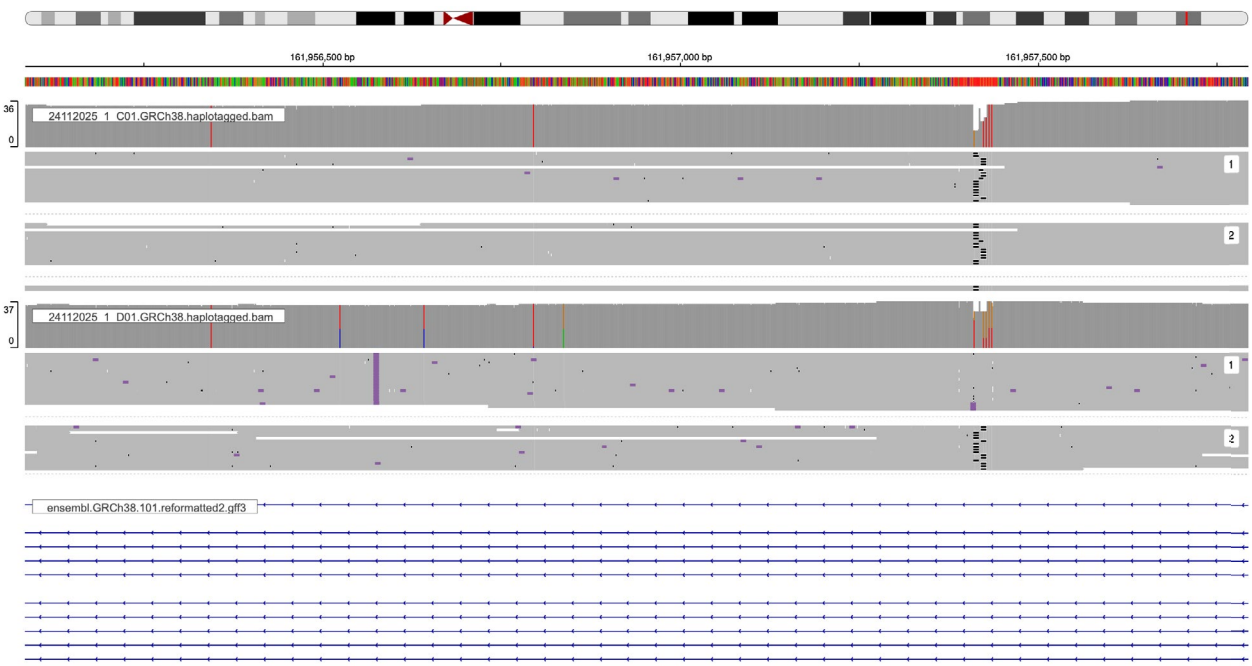
Şekil 4. PRKN lokusunda haplotip spesifik yapısal varyant kümelenmesinin örnekler arası karşılaştırması: 24112025_1_C01 örneği (üst) , 24112025_1_D01 örneği (alt). PRKN lokusunda break-end noktaları (chr6:161950985, 161951009), intronik insersiyon lokalize kompleks yapısal bozulmayı desteklemektedir.

olduğunu göstermiştir (Şekil 5). Bazı bireylerde her iki alelde genişleme gözlenirken, diğerlerinde tek allelle sınırlı kalmıştır (Şekil 6). Bu durum, aynı lokusta hem uzunluk hem de yapı açısından heterojen bir tekrar organizasyonu bulunduğunu düşündürmektedir.

PRKN dışındaki en dikkat çekici bulgular 12122025_1_C01 örneğinde saptanmıştır. Bu bireyde chr1:16861000–16994000 aralığında ATP13A2 genini de içeren yaklaşık 133 kb büyüklüğünde bir duplikasyon gözlenmiştir. Aynı bireyde ayrıca



Şekil 5. PRKN lokusunda AGAA motifli tandem tekrarın TRVZ görselleştirmesi. **(A)** 24112025_1_C01 örneğinde her iki alelin yaklaşık 2.46 kb uzunluğunda olduğu ve homozigot tekrar genişlemesi gösterdiği izlenmektedir. **(b)** 24112025_1_D01 örneğinde ise biri referans uzunluğa (~61 bp), diğeri genişlemiş (~2.46 kb) olmak üzere heterozigot bir yapı gözlenmektedir. Görselleştirme, chr6:161950960-161951021 bölgesinde AGAA motifli tekrar organizasyonunu ve okuma düzeyinde allelik dağılımı göstermektedir.



Şekil 6. PRKN lokusunda allel-spesifik tekrar yapısının IGV görselleştirmesi. 24112025_1_C01 örneği (üst), 24112025_1_D01 örneği (alt). Genişlemiş allelde motif kompozisyonunun değiştiği, hizalanmaların parçalı olduğu ve sekonder hizalanmaların gözlendiği izlenmektedir. Aynı koordinatlarda tekrarlayan kısa hizalanma boşlukları, tekrar bölgesi içinde veya komşuluğunda yer alan lokal bir delesyon/kompleks indel bileşeni ile uyumludur. Buna karşılık, diğer allel baskın olarak ATAA motifine (mor renk; insersiyon) sahip olup düzenli ve stabil bir hizalanma paterni sergilemekte ve sekonder hizalanmalar göstermemektedir.

Tablo 2. Önceliklendirilen Parkinson ilişkili aday bulgular

Örnek	Gen/lokus	Genomik konum	Bulgular	Not
24112025_1_C01	*PRKN*	chr6:161950985-162380769	BND + INS + DEL (~31.9 kb)	Kompleks yapısal yeniden düzenlenme
24112025_1_D01	*PRKN*	chr6:161950985-162011450	BND + INS	Aynı hotspot bölgesi
25022026_1_A01	*PRKN*	chr6:162011450	Homozigot INS (~287 bp)	Olası biallelik etki
12122025_1_C01	*ATP13A2*	chr1:16861000-16994000	~133 kb DUP	CDS etkisi olası
12122025_1_C01	*VPS13C*	chr15:61942023 / 61982480	Bileşik heterozigot	Fazlı varyant
24112025_1_D01	*ATXN2*	chr12:111538-111542 kb	Homozigot BND	Tekrar bölgesi etkilenmiş olabilir
Çeşitli	*PRKN*	chr6:162011450	Tekrarlayan INS	Hotspot bölgesi
Çeşitli	*LRRK2*	chr12:40247663	İntronik INS	Tekrarlayan koordinat
Çeşitli	*PLA2G6*	chr22:38189029	İntronik INS	Olası tekrar bölgesi
Tüm kohort	*RFC1*	chr4:39348424-79	Tekrarlayan INS	Muhtemel polimorfizm

BND, breakpoint (translokasyon/yeniden düzenlenme); INS, insersiyon; DEL, delesyon; DUP, duplikasyon.

VPS13C geninde (chr15:61942023 ve chr15:61982480) faz bilgisi ile desteklenen bileşik heterozigot varyant yapısı bulunmaktadır. ATP13A2 ve VPS13C genleri resesif parkinsonizm ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte, bu bulguların klinik etkisinin netleştirilmesi için ortogonal doğrulama ve fonksiyonel analiz gereklidir.[4,5]

LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2) lokusunda chr12:40247663 pozisyonunda (~472-562 bp) intronik insersiyonlar birden fazla bireyde tekrar etmektedir. Benzer şekilde PLA2G6 (Phospholipase A2 Group VI (Calcium-independent phospholipase A2 beta)) lokusunda chr22:38189029–38189139 aralığında (~1.1-1.2 kb) intronik insersiyonlar gözlenmiştir. Bu varyantların farklı bireylerde aynı koordinatlarda bulunması, bunların tekil nedensel varyantlardan ziyade tekrar bölgeleri veya yapısal hotspotlarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu bulgular temkinli şekilde aday varyant olarak değerlendirilmiştir.

RFC1 lokusunda chr4:39348424-39348479 aralığında insersiyonlar hemen hemen tüm bireylerde gözlenmiştir ve uzunluklarının 483-894 bp arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu durum, bu varyantların bireysel patojenik olaylardan ziyade kohort genelinde paylaşılan bir tekrar polimorfizmini temsil edebileceğini düşündürmektedir. Nitekim aynı varyantların tüm bireylerde bulunması teknik veya popülasyon kaynaklı bir etki olasılığını desteklemektedir.

Ek olarak, 24112025_1_D01 örneğinde ATXN2 (Ataxin 2) lokusunda chr12:111538479–111542205 aralığında birden fazla breakend olayının homozigot olarak bulunması dikkat çekicidir. Bu bölge CAG tekrar yapısını içeren kritik lokusu kapsamakta olup, orta uzunlukta tekrar genişlemelerinin Parkinson hastalığı riskini artırabileceği daha önce gösterilmiştir. Bu nedenle bu bulgunun tekrar uzunluğu açısından ayrıca değerlendirilmesi gerekmektedir (Tablo 2).

FMR1 (Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1) lokusunda yaklaşık 92 CGG tekrar uzunluğunda tek alel çağrısı ve düşük metilasyon düzeyi gözlenmiş, ancak bu bulgunun klinik anlamı sınırlı bulunmuştur. C9orf72 (Chromosome 9 Open Reading Frame 72) lokusunda ise anlamlı bir tekrar genişlemesine dair güçlü bir bulgu saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada uzun okuma tüm genom dizileme yaklaşımı kullanılarak Parkinson hastalığı kohortunda hem klasik yöntemlerle saptanması güç yapısal varyantlar hem de tekrar ilişkili genomik değişiklikler ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgular, özellikle PRKN lokusunun kohort genelinde en güçlü ve tutarlı genetik sinyal olduğunu göstermektedir. Aynı bölgede birden fazla bireyde tekrarlayan intronik insersiyonların, breakpoint kümelenmelerinin ve büyük delesyonların birlikte gözlenmesi, bu lokusun yapısal olarak instabil bir hotspot bölgesi olabileceğini düşündürmektedir. PRKN geninin geniş intronik yapısı ve rekombinasyona yatkınlığı daha önce de gösterilmiş olup, özellikle ekson 3-4 ve 6-7 bölgeleri yapısal varyantlar açısından duyarlı bölgeler olarak tanımlanmıştır.[15,16]

PRKN dışındaki bulgular daha heterojen bir yapı sergilemektedir. Özellikle bir bireyde saptanan ATP13A2 genini içeren büyük duplikasyon ve VPS13C bileşik heterozigot varyant kombinasyonu, resesif parkinsonizm ile uyumlu güçlü aday mekanizmalar olarak öne çıkmaktadır. ATP13A2 genindeki biallelik bozulmalar Kufor-Rakeb sendromu ile ilişkilendirilmiş,[4] VPS13C kaybının ise mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve Parkinson patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.[5] Bununla birlikte, mevcut bulguların klinik etkisinin netleştirilmesi için fonksiyonel doğrulama ve segregasyon analizlerine ihtiyaç vardır.

LRRK2, PLA2G6 ve ATXN2 lokuslarında gözlenen varyantlar çoğunlukla intronik ve tekrar bölgelerinde yer almakta olup, mevcut literatürde bu tür varyantların etkisi sınırlı olarak tanımlanmıştır. LRRK2 için patojenik varyantların büyük ölçüde kodlayıcı bölgelerde yer aldığı bilinmektedir,[17] PLA2G6 biallelik kayıplarının ise nörodejeneratif fenotiplerle ilişkili olduğu gösterilmiştir.[18] ATXN2 geninde ise orta uzunlukta tekrar genişlemelerinin nörodejeneratif hastalık riskini artırabileceği bildirilmiştir.[19] Bu çalışmada saptanan intronik ve yapısal varyantlar, bu genlerde potansiyel modifiye edici etkiler açısından değerlendirilmelidir.

Kohort genelinde RFC1 lokusunda gözlenen intronik insersiyonların tüm bireylerde bulunması, bu varyantların bireysel patojenik olaylardan çok paylaşılan tekrar polimorfizmleri olabileceğini düşündürmektedir. RFC1 genindeki patojenik tekrar genişlemelerinin motif-spesifik olduğu ve yalnızca belirli motiflerin hastalık ile ilişkili olduğu daha önce gösterilmiştir.[9] Bu nedenle yalnızca alel uzunluğuna dayanarak klinik yorum yapılmaması gerekmektedir.

Bu çalışma, uzun okuma genom dizilemenin özellikle yapısal olarak karmaşık ve tekrar zengin bölgelerde önemli bir çözünürlük avantajı sağladığını ortaya koymaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, uzun okuma teknolojilerinin kısa okuma yöntemleriyle saptanamayan kompleks yapısal varyantların çözümünde belirgin üstünlük sağladığını göstermektedir.[7,20]

Bununla birlikte, mevcut analiz bir pilot çalışma niteliğinde olup, örnek sayısının sınırlı olması ve bazı varyantların fonksiyonel olarak doğrulanmamış olması önemli kısıtlamalar arasında yer almaktadır.

Gelecekteki çalışmalarda, bu bulguların daha geniş kohortlarda doğrulanmasının yanı sıra, özellikle hedef bölgelerde kapsama derinliğini artırmak ve nadir yapısal olayları daha hassas şekilde yakalayabilmek amacıyla Oxford Nanopore adaptive sampling gibi hedefe yönelik zenginleştirme yaklaşımlarının kullanılması önemli bir potansiyel sunmaktadır. Adaptive sampling yönteminin, spesifik genom bölgelerinde kapsama artışı sağlayarak yapısal varyant tespitini iyileştirdiği gösterilmiştir.[21] Bu tür yaklaşımlar, PRKN gibi kompleks lokusların daha yüksek çözünürlükle incelenmesine katkı sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma Parkinson hastalığında genetik mimarinin tek genli modellerle açıklanamayacak kadar karmaşık olabileceğini ve yapısal varyantlar, tekrar genişlemeleri ve çoklu gen etkilerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Uzun okuma dizileme, özellikle erken başlangıçlı ve genetik olarak açıklanamayan olgularda tanısal verimi artırma potansiyeline sahip güçlü bir yaklaşımdır.

KAYNAKLAR

1. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. Lancet 2021;397:2284-303. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X.
2. Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. Mol Cell Probes 2016;30:386-96. doi: 10.1016/j.mcp.2016.11.001.
3. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 1998;39:605-8. doi: 10.1038/33416.
4. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. Nat Genet 2006;38:1184-91. doi: 10.1038/ng1884.

5. Lesage S, Drouet V, Majounie E, Deramecourt V, Jacoupy M, Nicolas A, et al. Loss of VPS13C function in autosomal-recessive parkinsonism causes mitochondrial dysfunction and increases PINK1/parkin-dependent mitophagy. Am J Hum Genet 2016;98:500-13. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.01.014.
6. Daida K, Funayama M, Billingsley KJ, Malik L, Miano-Burkhardt A, Leonard HL, et al. Long-read sequencing resolves a complex structural variant in PRKN Parkinson's disease. Mov Disord 2023;38:2249-57. doi: 10.1002/mds.29610.
7. Cogan G, Daida K, Billingsley KJ, Tesson C, Forlani S, Jornea L, et al. Long-read sequencing unravels the complexity of structural variants in PRKN in two individuals with early-onset Parkinson's disease. Mov Disord 2024;39:1647-8. doi: 10.1002/mds.29914.
8. Dolzhenko E, English A, Dashnow H, De Sena Brandine G, Mokveld T, Rowell WJ, et al. Characterization and visualization of tandem repeats at genome scale. Nat Biotechnol 2024;42:1606-14. doi: 10.1038/s41587-023-02057-3.
9. Cortese A, Simone R, Sullivan R, Vandrovcova J, Tariq H, Yau WY, et al. Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. Nat Genet 2019;51:649-58. doi: 10.1038/s41588-019-0372-4.
10. Alvarez Jerez P, Daida K, Miano-Burkhardt A, Iwaki H, Malik L, Cogan G, et al. Profiling complex repeat expansions in RFC1 in Parkinson's disease. NPJ Parkinsons Dis 2024;10:108. doi: 10.1038/s41531-024-00723-0.
11. Emekli I, Tepgeç F, Samancı B, Toksoy G, Hasanoğulları Kına G, et al. Clinical and molecular genetic findings of hereditary Parkinson's patients from Turkey. Parkinsonism Relat Disord 2021;93:35-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.10.024.
12. Yekedüz MK, Yilmaz R, Kayis G, Doğulu N, Öncül Ü, Abali T, et al. Genetic variants of GBA and GLA in a Turkish cohort of Parkinson's disease: A preliminary report. Parkinsonism Relat Disord 2023;110:105390. doi: 10.1016/j.parkreldis.2023.105390.
13. Kablan A, Silan F, Ozdemir O. Re-evaluation of genetic variants in Parkinson's disease using targeted panel and next-generation sequencing. Twin Res Hum Genet 2023;26:164-70. doi: 10.1017/thg.2023.14.
14. Jagadeesh KA, Birgmeier J, Guturu H, Deisseroth CA, Wenger AM, Bernstein JA, et al. Phrank measures phenotype sets similarity to greatly improve Mendelian diagnostic disease prioritization. Genet Med 2019;21:464-70. doi: 10.1038/s41436-018-0072-y.
15. Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, et al. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. Brain 2003;126:1271-8. doi: 10.1093/brain/awg136.
16. Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. Hum Mol Genet 2004;13:R127-R133.
17. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: A case-control study. Lancet Neurol 2008;7:583-90. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70117-0.
18. Tan EK, Ho P, Tan L, Prakash KM, Zhao Y. PLA2G6 mutations and Parkinson's disease. Ann Neurol 2010;67:148. doi: 10.1002/ana.21663.
19. Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, Soto-Ortolaza AI, Carrasquillo MM, DeJesus-Hernandez M, et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. Hum Mol Genet 2011;20:3207-12. doi: 10.1093/hmg/ddr227.
20. De Coster W, Weissensteiner MH, Sedlazeck FJ. Towards population-scale long-read sequencing. Nat Rev Genet 2021;22:572-87. doi: 10.1038/s41576-021-00367-3.
21. Payne A, Holmes N, Clarke T, Munro R, Debebe BJ, Loose M. Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes. Nat Biotechnol 2021;39:442-50. doi: 10.1038/s41587-020-00746-x.