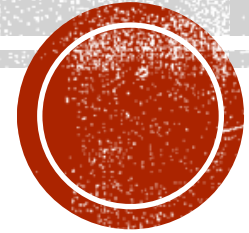


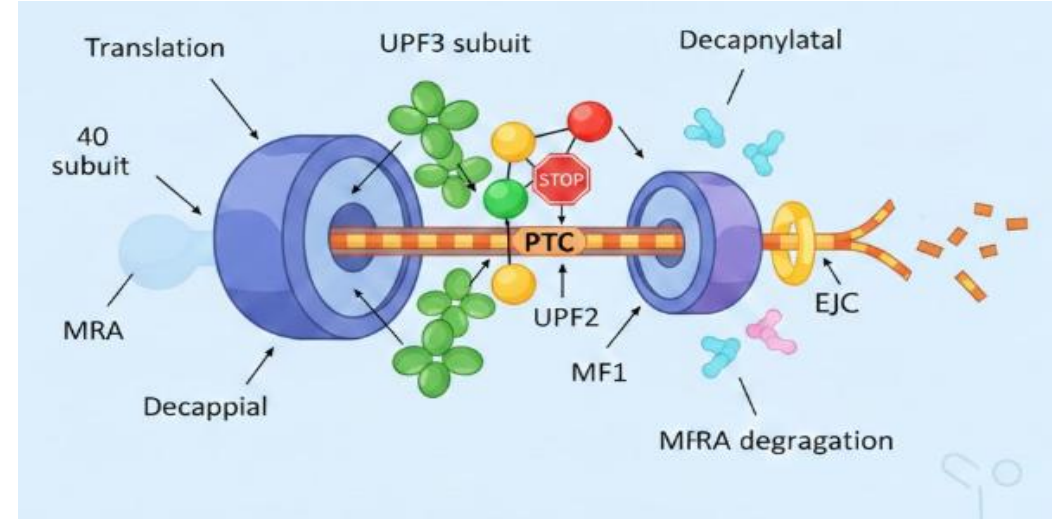
ANLAMSIZ KODON ARACILI YIKIM- HAPLOYETERSİZLİK



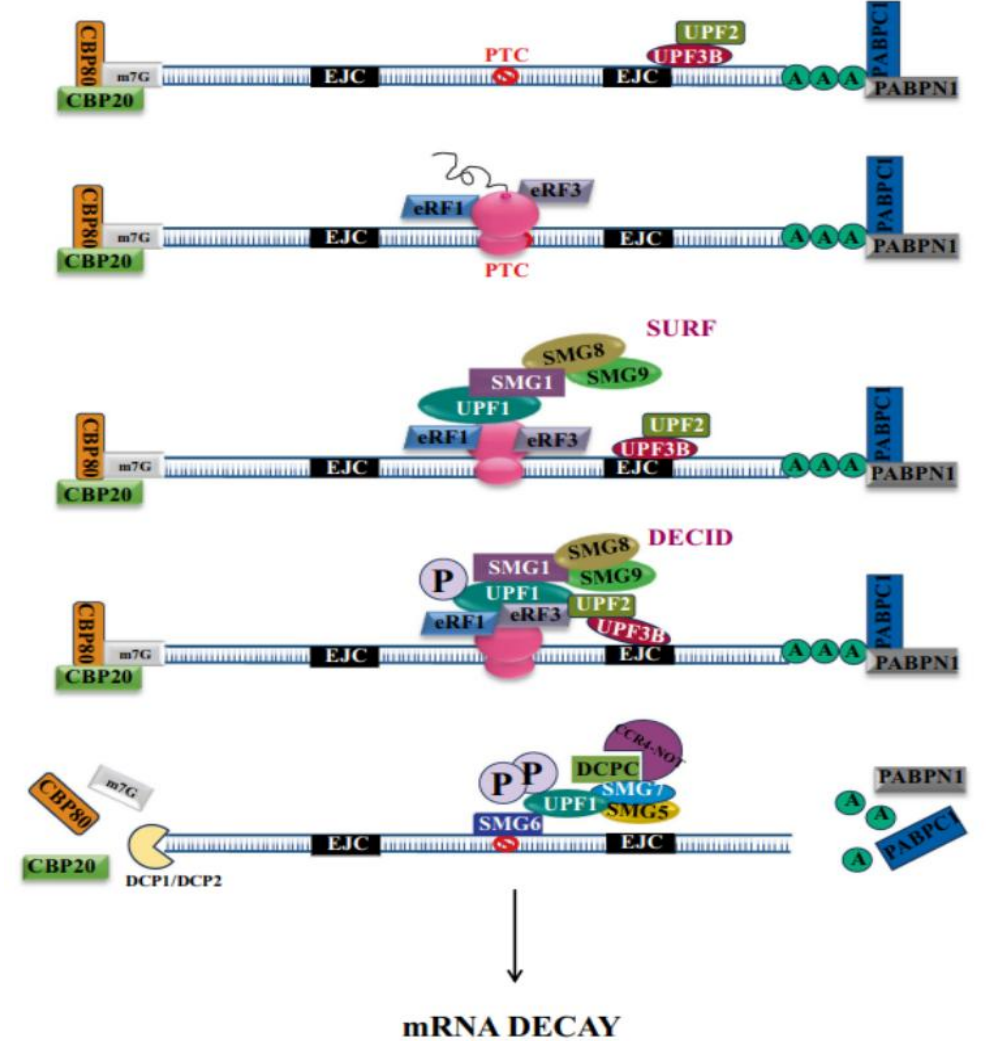
Doç. Dr. Gamze Sarıkaya Uzan
Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tıp Fakültesi
İzmir Tepecik Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD
Çocuk Nörolojisi BD

SORU: AYNI GENDEKİ FARKLI MUTASYONLAR NEDEN FARKLI KLİNİK TABLOYA YOL AÇAR?

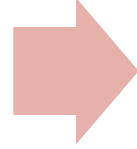
- **Anlamsız Kodon Aracılı Yıkım (Nonsense Mediated Decay):** Hatalı mRNA'ları yok eden "çöpçü" sistem.
- NMD, hücrenin "kalite kontrol" mekanizmasıdır.



- Normalde durdurma kodonu mRNA'nın son ekzonundadır.
- Daha erken bir bölgede (PTC) oluşursa, yani stop kodon son ekzon birleşim yerinden (**Exon Junction Complex - EJC**) 50-55 nükleotid önceyse, NMD proteinleri devreye girer. mRNA **hızla yıkılır**.
- Eğer bu mRNA parçalanmazsa, hücrede "trunkat" (yarım kalmış) ve muhtemelen toksik fonksiyon kazanabilecek proteinler üretilir.



**İşlevsiz
proteinlerin
ortadan
kaldırılması**



**Hücresel süreçteki
dominant negatif
etkilerin
önlenmesi**



Haplo yetersizlik





Nonsense-Mediated mRNA Decay in Human Health and Diseases: Current Understanding, Regulatory Mechanisms and Future Perspectives

Amrita Behera¹ · Gagan Kumar Panigrahi¹ · Annapurna Sahoo¹

Received: 4 March 2024 / Accepted: 24 August 2024 / Published online: 12 September 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a surveillance mechanism that is conserved across all eukaryotes ensuring the quality of transcripts by targeting messenger RNA (mRNA) harbouring premature stop codons. It regulates the gene expression by targeting aberrant mRNA carrying pre-termination codons (PTCs) and eliminates C-terminal truncated proteins. NMD distinguishes aberrant and non-aberrant transcript by looking after long 3' UTRs and exon-junction complex (EJC) downstream of stop codon that indicate the presence of PTC. Therefore, NMD modulates cellular surveillance and eliminates the truncated proteins but if the PTC escapes the surveillance pathway it can lead to potential negative phenotype resulting in genetic diseases. The alternative splicing also contributes in formation of NMD-sensitive isoforms by introducing PTC. NMD plays a complex role in cancer, it can either aggravate or downregulates the tumour. Some tumours agitate NMD to deteriorate mRNAs encoding tumour suppressor proteins, stress response proteins and neoantigens. In other case, tumours

Klinik Fenotipin Belirlenmesinde NMD'nin Çift Yönlü Rolü

- **Koruyucu Rol:** Zararlı kesintili proteinlerin üretimini engelleyerek klinik tabloyu daha hafifletirebilir.
- **Ağırlaştırıcı Rol:** Fonksiyon görebilecek bir proteini kodlayan mRNA'yı tamamen yok ederse, fenotipi ağırlaştırabilir.
- **Özetle;** NMD sadece bir RNA yıkım yolu değil, sinir sisteminin normal gelişimi ve genetik hastalıkların klinik seyri için kritik bir düzenleyicidir.



ÇOCUK NÖROLOJİSİNDE ANLAMSIZ KODON ARACILI YIKIM

- **SCN1A**
- **CDKL5**
- **MECP2**
- **STXBP1**
- **KCNQ2**

- Ne zaman devreye girer?
- mRNA'da normalden erken bir stop kodonu oluşursa:
- Nonsense (anlamsız=stop kodon) mutasyonları
- Frameshift mutasyonları
- Bazı splicing hataları

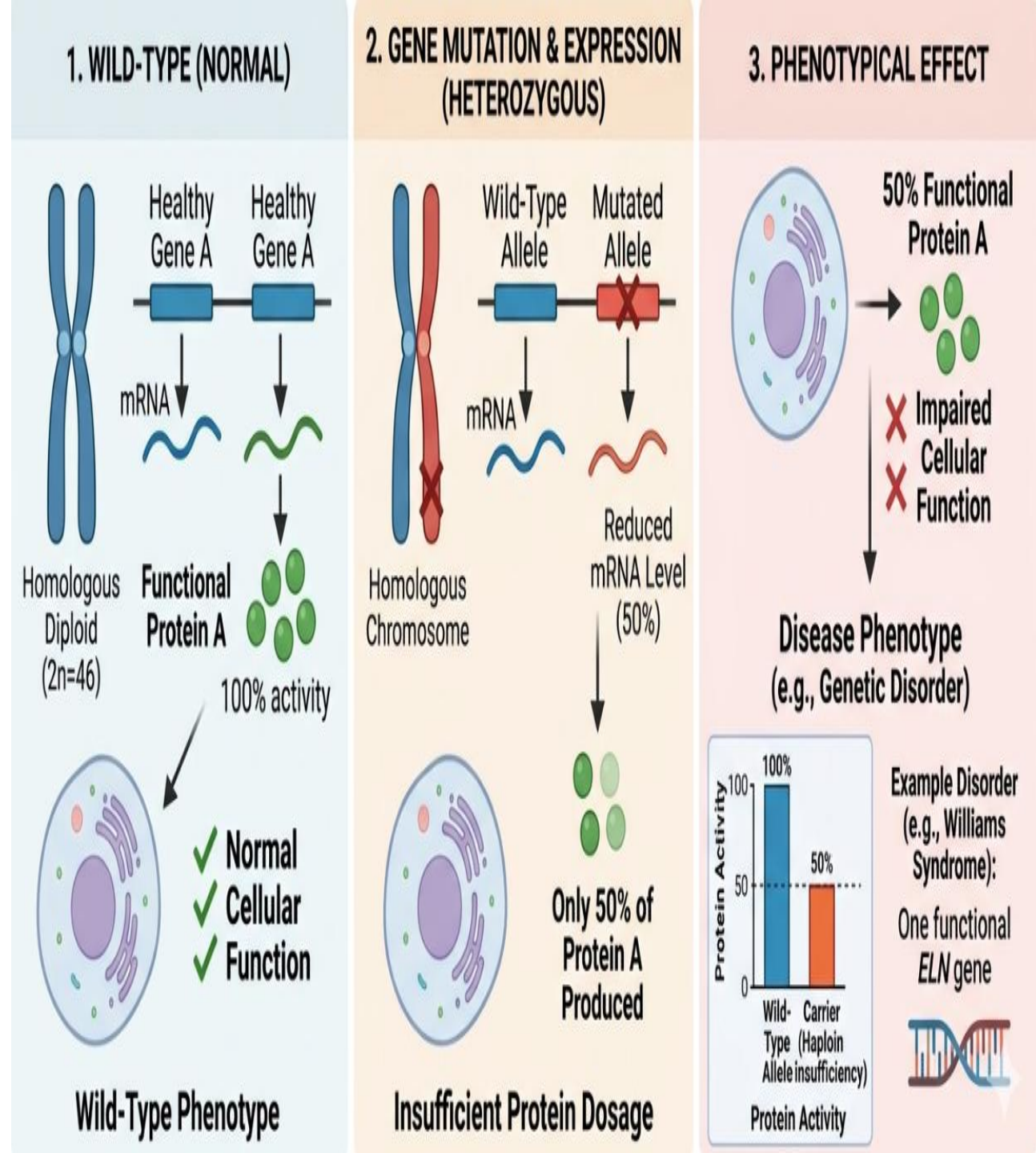


SCN1A

- **Nav1.1 sodyum kanalı** kodlar ve bu kanal **GABAerjik inhibitör interneuronlarda** yüksek ekspresyon gösterir
- **Nonsense Mutasyon Olduğunda** DNA'da erken bir **STOP kodonu** (örn. **UAG**) oluşur. **NMD devreye girer.**
- Hatalı mRNA **yıkılır**. Protein seviyesi yaklaşık %50'ye düşer

Haploinsufficiency

- Bir alel çalışıyor (%50 Nav1.1)
- Bu miktar interneuron fonksiyonu için yeterli değil



SCN1A

SODIUM VOLTAGE-GATED CHANNEL, ALPHA SUBUNIT 1;
SCN1A

Alternative titles; symbols

SODIUM CHANNEL, NEURONAL TYPE I, ALPHA SUBUNIT
SODIUM CHANNEL, BRAIN TYPE I, ALPHA SUBUNIT; NAC1
NAV1.1

HGNC Approved Gene Symbol: **SCN1A**

Cytogenetic location: **2q24.3** *Genomic coordinates (GRCh38) :* **2:165,984,641-166,149,161** (from NCBI)

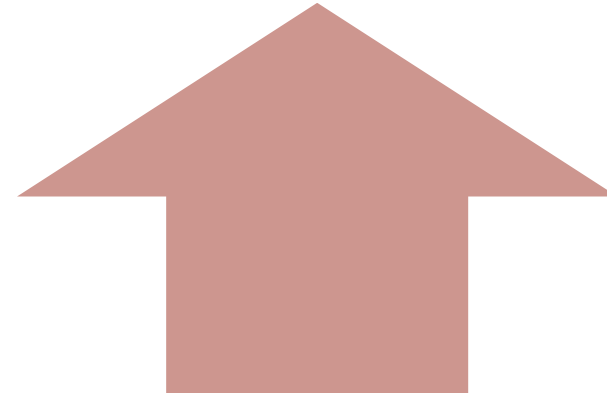
Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype	View Clinical Synopsis	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
2q24.3	Developmental and epileptic encephalopathy 6B, non-Dravet		619317	AD	3
	Dravet syndrome		607208	AD	3
	Febrile seizures, familial, 3A		604403	AD	3
	Generalized epilepsy with febrile seizures plus, type 2		604403	AD	3
	Migraine, familial hemiplegic, 3		609634	AD	3



Missense mutasyonlar
→ protein üretilir ama
fonksiyon bozulur
→ bazen daha hafif tablo

Truncating
(nonsense/frameshift) ya da
splice site mutasyonlar
→ çoğunlukla NMD devrede
→ daha ağır fenotip



OLGU 1

GEFS +

- R.M 5 yaş erkek hasta
- İlk nöbet 1 yaşında ateşli
- Toplamda 5 ateşli nöbet
- Ailede annede ve ikizinde FK öyküsü var
- Nöromotor gelişim ve nörolojik muayene normal
- EEG: normal
- Birkaç yılda bir ateşsiz nöbet var. Ancak VPA ile nöbetler kontrol altında
- Genetik analiz ***SCN1A* geninde c.1613T>C (p.Leu538Pro) heterozigot patojenik missense varyant**

NXID

OLGU 2

- B.K 6 yaş kız hasta
- İlk nöbet 4 aylıkken febril klonik status takiben 3 ay içinde 3 adet febril status
- Nörolojik gelişimi 7 aylıkken normal, EEG fokal epilepsi ile uyumlu LEV almakta.
- İzlemde nöbetler ateşsize evrildi ve VPA+LEV
- **SCN1A geninde 26.ekzonda patojenik heterozigot c.5010_5013delGTTT**
- İzlemde nöromotor gelişim geriliği gelişti
- CLB+VPA+Sitripentol ile nöbet sıklığında anlamlı düşüş
- Haftada birkaç kez miyoklonik nöbet, özel eğitim alıyor

**Dravet
sendromu**



PATOGENEZ VE ANLAMSIZ KODON ARACILI YIKIM

- **SCN1A** genindeki **c.5010_5013delGTTT** varyantı, 5010 ile 5013. pozisyonlar arasındaki 4 nükleotitte delesyon
- Okuma çerçevesi bozulur (**Frameshift**)
- Bu çerçeve kayması, **erken durdurma kodonu (Premature Termination Codon - PTC)** oluşmasına neden olur.
- **NMD devreye girer** ve mRNA yok edilir.
- Sürecin sonucunda, mutasyona uğramış olan bu kopyadan hiç protein üretilmez. Bireyde sadece sağlıklı kopyadan gelen %50 oranında fonksiyonel Nav1.1 kanalı kalır. '**Haploetersizlik**'

NMD



**Dravet
sendromu**



ÖRNEKLER

SCN2A

- Erken stop kodon → NMD mekanizması ile mRNA yıkılır, Loss of function
- Klinik: İnfantil epileptik ensefalopati, Gelişimsel gecikme
- Son ekzonda stop kodon → NMD kaçıışı
Kısalmış ama stabil kanal. Dominant-negatif veya değişken işlev
- Daha geç başlangıçlı epilepsi, bazen izole nöbet, bazen ASD ± epilepsi

STXBP1 – DEE

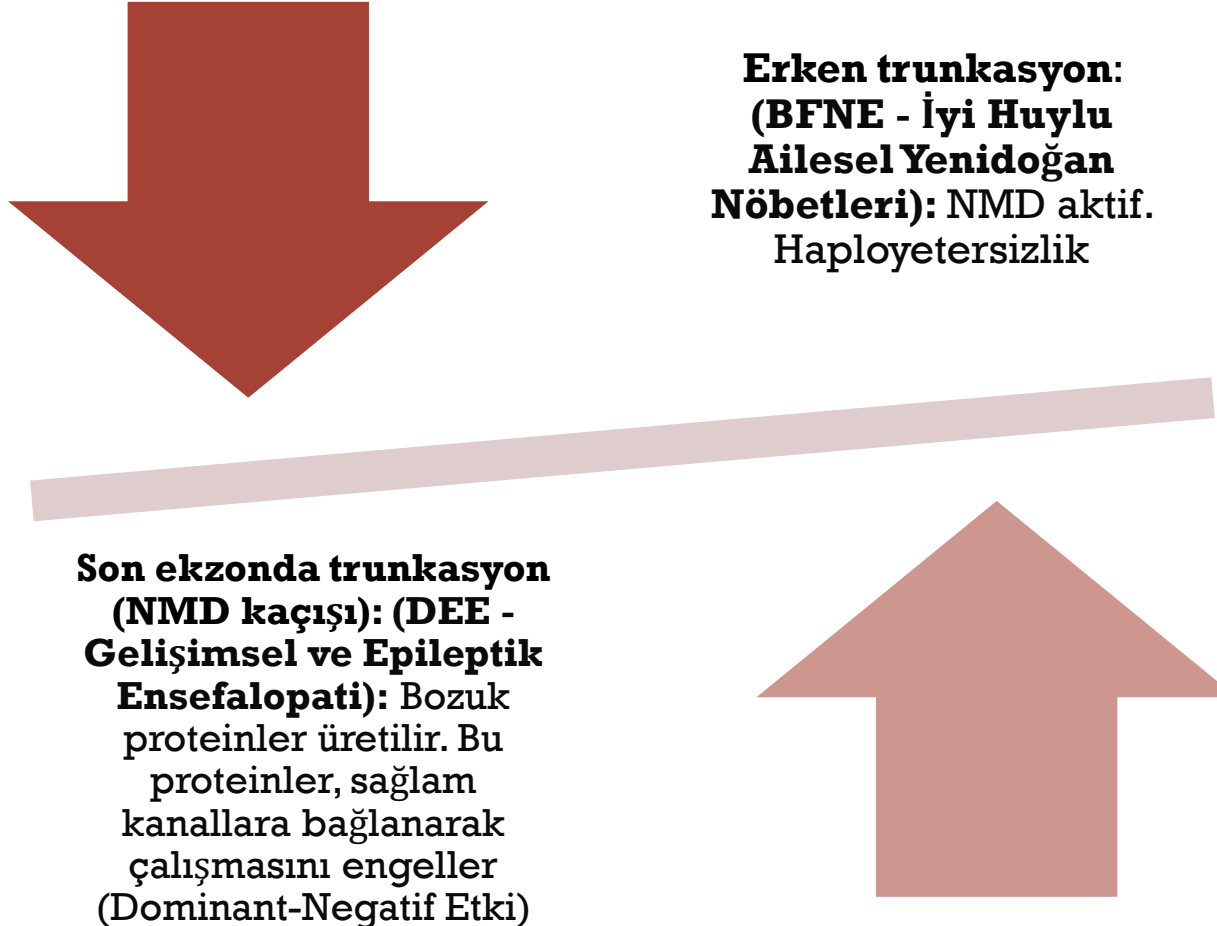
- **Varyant**
- Frameshift / nonsense
- Çoğu → **NMD**
- STXBP1 proteini **hiç sentezlenmez.**
- **Klinik;** Erken infantil epileptik ensefalopati
- Ancak missense → bazen daha hafif

Aynı gendeki farklı kliniği yaratan NMD



KCNQ2 bir iyon kanalı. Kalite kontrol mekanizması iki aşamalı, üretilen protein toksik.

Protein aşamasında da ayrı bir kalite kontrol mekanizması işlettiğini ve hatalı kanalları proteozomlar aracılığıyla yıktığını gösterir.



POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, KQT-LIKE
SUBFAMILY, MEMBER 2; **KCNQ2**

Alternative titles; symbols

POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SUBFAMILY Q, MEMBER 2

HGNC Approved Gene Symbol: **KCNQ2**

Cytogenetic location: **20q13.33** *Genomic coordinates (GRCh38) :* **20:63,400,208-63,472,655** (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype	View Clinical Synopses	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
20q13.33	Developmental and epileptic encephalopathy 7		613720	AD	3
	Myokymia		121200	AD	3
	Seizures, benign neonatal, 1		121200	AD	3

Özellik	Haployetersizlik olan KCNQ2 olgusu (Mutasyon ilk ekzonlarda)	Dominant negatif KCNQ2 varyantlı hasta (Mutasyon son ekzonlarda)
mRNA	Yıkılır (NMD)	Stabil (NMD kaçıışı)
Protein	Yok	Kısalmış
Etki	%50 doz	Aktif bozucu
Klinik	Hafif	Ağır
Tedavi yanıtı	İyi	Zor

NMD BEKLENMEZ / NMD KAÇIŞI OLASI

- **Hangi durumlarda olabilir?**

- Son ekzon
- Son ekzon-ekzon birleşimine <50 nt
- Bilinen NMD-resistant transkript

Durum	Ne olur	Klinik yorum
NMD aktif	Protein yok	İşlev kaybı (LoF)
NMD kaçışı	Kısalmış protein var	Dominant negatif etki veya İşlev kazanımı (GoF)



NMD ETKİSİ BELİRSİZ (GRİ ALAN)

Çelişkili literatür: Varyantın NMD mekanizmasını tetikleyip tetiklemediği mevcut verilerle net olmaması



Sınırdaki varyant lokasyonu: varyantın konumu NMD "kaçış" sınırına çok yakınsa veya genin birçok alternatif transkripti varsa, bu varyantın hücredeki net etkisi (mRNA'nın yok edilip edilmeyeceği) bilinmiyorsa (**RNA dizileme (RNA-seq)** veya **fonksiyonel analizler**).

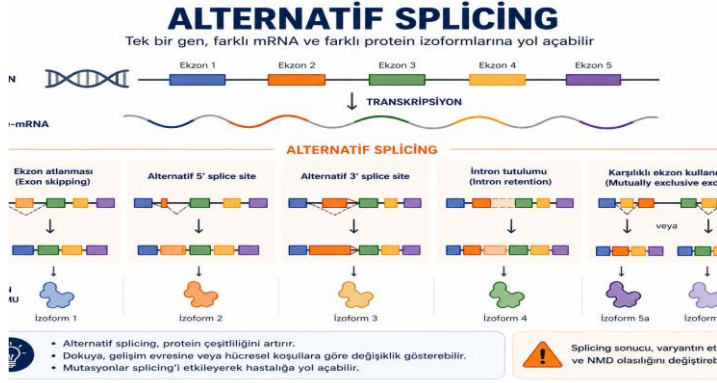


Alternatif transkriptler

Farklı transkriptler arasında değişken etki: Aynı genetik varyant, hücrenin hangi transkripti (izofomu) kullandığına bağlı olarak farklı sonuçlar doğurabilir. **İzofom Özgüllüğü:** Bir varyant, temel (canonical) transkriptte NMD'ye neden olurken, alternatif bir transkriptte (örneğin o ekzonun atlandığı bir durumda) hiçbir etki yaratmayabilir.



ALTERNATİF TRANSKRİPTLER VE İZOFOM ÖZGÜLLÜĞÜ (ISOFORM SPECIFICITY)



Doku Özgü İfade: Bir dokuda NMD %90 verimle çalıştırırken (daha hafif seyir), diğer dokuda %40 verimle çalıştırabilir (daha ağır seyir).

Ekzon Atlama (Exon Skipping): Eğer mutasyonun bulunduğu ekzon, hücre tarafından alternatif bir kırılma ile atlanırsa (exon skipping), erken sonlandırma kodonu da mRNA'dan çıkarılmış olur.

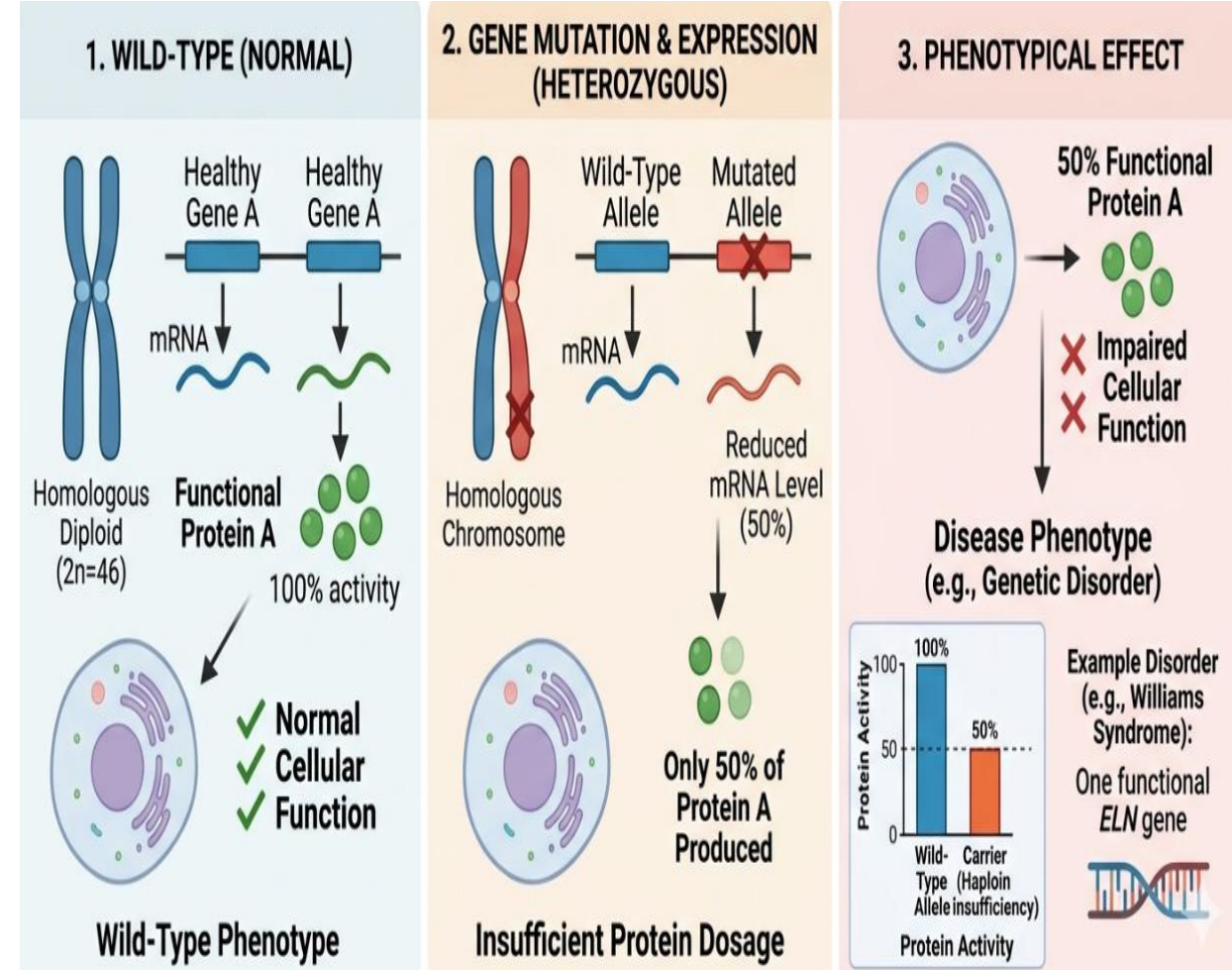
*NMD'nin etkisinin belirlenemediği bu durumlar, "**NMD kaçıışı**" (**NMD escape**) olarak adlandırılır.*

Kesin tahminin ancak fonksiyonel çalışma ile olabileceği akılda tutulmalıdır.



HAPLOYETERSİZLİK

- Normalde diploid canlılarda bir genin iki kopyası bulunur. Haployetersizlik, bir kopyanın mutasyonla işlevsizleşmesi sonucu, kalan tek sağlam kopyanın normal fenotipi sürdürmek için yeterli protein üretememesidir.
- Dominant bir kalıtım modelidir. Ancak otozomal dominant kalıtımın altında yatan mekanizma her zaman haployetersizlik değildir.



HAPLOYETERSİZLİĞE DUYARLILIĞI YÜKSEK GENLER

- Sodyum kanal genleri (SCN1A, SCN2A, SCN8A)
- Diğer iyon kanalları (KCNQ2, KCNQ3, HCN1)
- Sinaptik vezikül / presinaptik (STXBP1, SYNGAP1)
- Transkripsiyon / kromatin (ARID1B, KMT2A, SETD2)
- Diğer genler (NF1, SHANK3)

Ekspresyonu zamanla ilişkili kritik genler

Sinaptogenez genleri
Kortikal organizasyon genleri

Bu hücresel süreçler %50 protein seviyesiyle çalışamaz; minimum %70-80 protein gerekir.



PLI SKORU

- pLI (probability of loss-of-function intolerance) (pLI > 0.9 ise o gen yüksek ihtimalle haploinsufficiency mekanizmasıyla çalışıyordur).
- Bir genin haployetersizliğe ne kadar duyarlı olduğunu gösteren biyoinformatik bir değer, fonksiyon kaybına intolerans skorudur.
- Genlerin mutasyonlara ne kadar dirençli olduğunu gösterir.



Genome Aggregation Database

gnomAD v4.1.0

Search by gene, region, or variant

SYNGAP1 synaptic Ras GTPase activating protein 1

Dataset gnomAD v4.1.0 gnomAD SVs v4.1.0

Constraint

Variant co-occurrence

Genome build GRCh38 / hg38

Ensembl gene ID ENSG00000197283.18

MANE Select transcript ENST00000646630.1 / NM_006772.3

Ensembl canonical transcript ENST00000646630.1

Other transcripts

ENST00000293748.9, ENST00000636640.1, and 27 more

Region 6:33419661-33453689

External resources Ensembl, UCSC Browser, and more

Category	Expected SNVs	Observed SNVs	Constraint metrics
Synonymous	718.2	582	Z = 2.77 o/e = 0.81 (0.76 - 0.87)
Missense	1811.1	915	Z = 7.69 o/e = 0.51 (0.48 - 0.53)
pLoF	123.9	9	pLI = 1 0.04 - 0.13

Constraint metrics based on MANE Select transcript (ENST00000646630.1).

gene. Zoom in



CLINGEN HI SKORU

Skor	Anlamı
3	Yeterli kanıt (definitive)
2	Orta
1	Sınırlı
0	Kanıt yok

Curated Genes ▾ Gene-Disease Validity ▾ Dosage Sensitivity ▾ Clinical Actionability ▾ Curated Variants ▾ Statistics Downloads More ▾ ?

SYNGAP1 [View Gene Facts](#)

1 Gene-Disease Validity Classifications 2 Dosage Sensitivity Classifications 0 Clinical Actionability Assertions 0 Variant Pathogenicity Assertions 0 / 0 CPIC / PharmGKB High Level Records [Follow Gene](#)

[Curation Summaries](#) [Status and Future Work 0](#) [GenomeConnect 29](#) [External Genomic Resources](#) [ClinVar Variants](#)

[Group By Activity](#) [Group By Gene-Disease Pair](#)

Gene-Disease Validity

Gene	Disease	MOI	Expert Panel	Classification	Report & Date
SYNGAP1	complex neurodevelopmental disorder MONDO:0100038	AD ⓘ	Epilepsy GCEP ↗	Definitive	04/02/2019

Dosage Sensitivity

Gene	Disease	Working Group	HI Score & TS Score	Report & Date
SYNGAP1	complex neurodevelopmental disorder MONDO:0100038	Dosage Sensitivity WG ↗	3 (Sufficient Evidence for Haploinsufficiency)	11/09/2021

- SCN1A → HI = 3
- STXBP1 → HI = 3
- DEPDC5 → HI = 3
- KCNQ2 → HI = 2–3 (mekanizmaya bağlı)



OLGU 3

- A.S 5 yaşında erkek hasta,
- İlk olarak 1,5 yaşında iken ateşli dönemde JTK ve sonrasında afebril ve atonik vasıfta seyreden nöbet aktivitesi ile VPA başlanmış
- Denver gelişim testi: Dil ve kişisel sosyal gerilik
- OSB tanısı ile ÇPS izlemi var, nöromotor gelişim basamakları ve nihai nörolojik gelişim yaşa göre geri
- Soygeçmişinde özellik yok
- İşitme testi, Beyin MRG Normal ve Mr spektrogarfi N
- Metabolik incelemeler normal
- **SYNGAP1** geni intron 6'da c.663+2T>C (heterozigot) patojenik varyant
- Anne ve babaya ait genetik sonuçları normal

SYNAPTIC RAS-GTPase-ACTIVATING PROTEIN 1; SYNGAP1

Alternative titles; symbols

GTPase-ACTIVATING PROTEIN, RAS, SYNAPTIC, 135-KD, RAT, HOMOLOG OF RAS-GTPase-ACTIVATING PROTEIN, SYNAPTIC, 135-KD, RAT, HOMOLOG OF SYNAPTIC RAS-GTPase-ACTIVATING PROTEIN, 135-KD, RAT, HOMOLOG OF SYNGAP, p135, RAT, HOMOLOG OF; SYNGAP

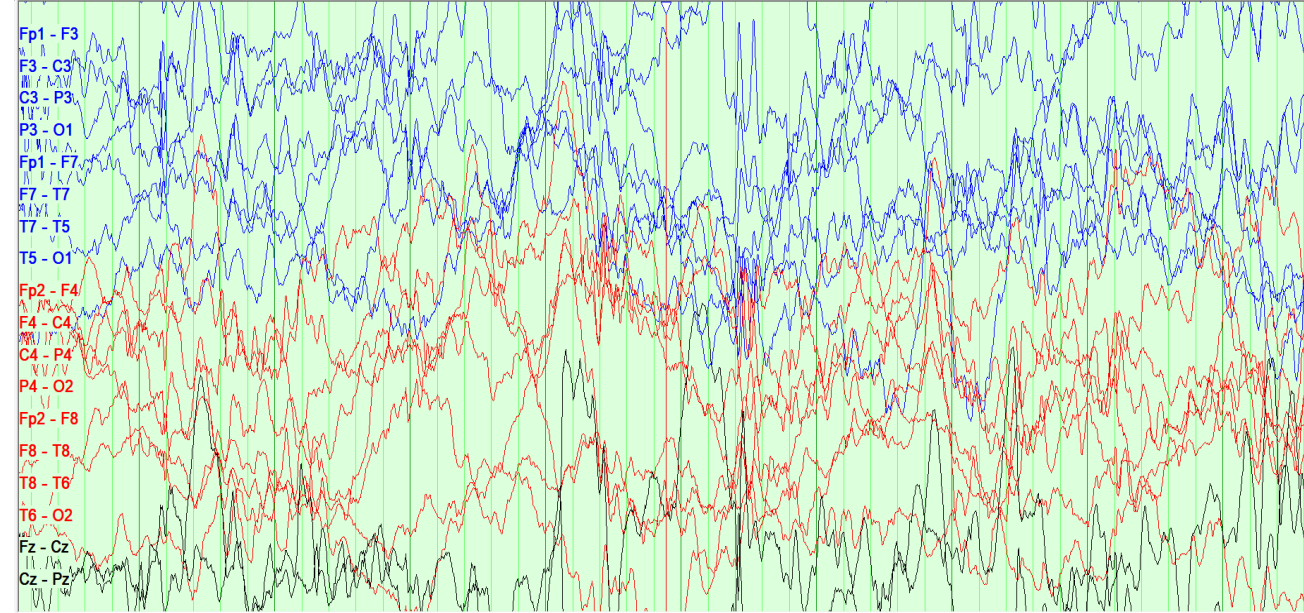
HGNC Approved Gene Symbol: **SYNGAP1**

Cytogenetic location: **6p21.32** Genomic coordinates (GRCh38) : **6:33,418,167-33,453,689** (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
6p21.32	Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 5	612621	AD	3

SYNGAP1 ilişkili nörogelişimsel bozukluk (mental retardasyon, otozomal dominant tip 5 – MRD5)



Splice site Mutasyonu: Varyant, intron 6'nın +2 pozisyonundaki klasik **GT** dizisini etkiler. Bu değişim, 6. intronun normal kırpılma (splicing) sürecini bozar.

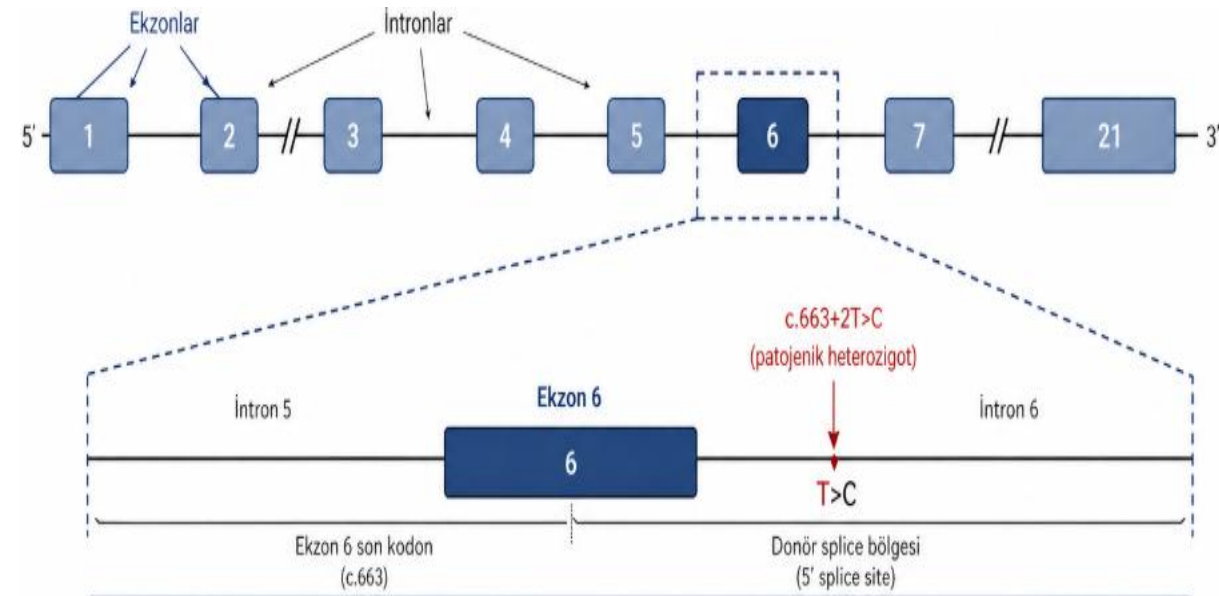


Bu tür kanonik *splice-site* mutasyonları ya **ekzon atlamasına (exon skipping)** ya da bir **kriptik splice sitesinin** kullanılmasına yol açar. Okuma çerçevesi kayar ve erken durdurma kodonu (PTC) oluşur. **NMD aktiftir.**

Varyant: c.663+2T>C (splice-site)

- ↓ Splicing bozulur
- ↓ Frameshift / erken stop kodon
- ↓ NMD (mRNA yıkımı)
- ↓ Protein üretimi yok (mutant allel)

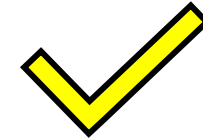
- %50 SYNGAP1 proteini
- Haployetersizlik



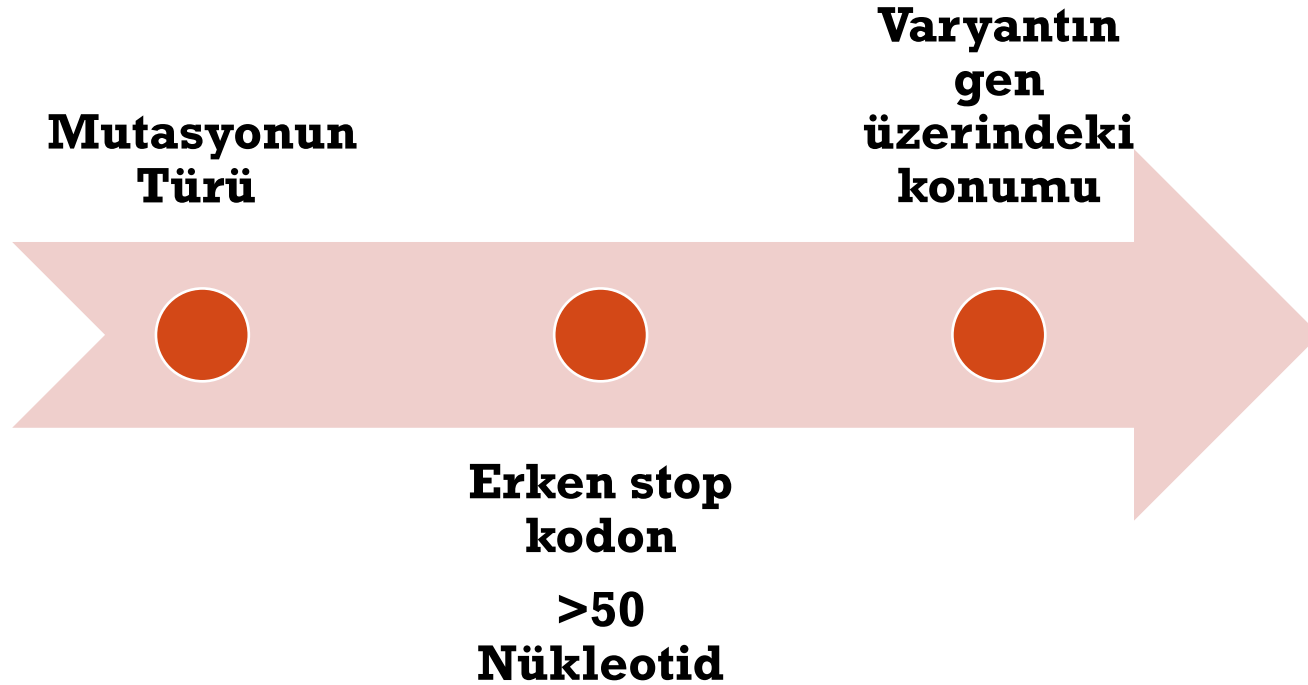
Referans (wild-type)	Ekzon 6 ... G A A A G A (c.663)	Intron 6 (5' splice donör bölgesi) +1 +2 +3 +4 +5 +6 g t a g t g a ...	Donör splice sitesi (GT kuralı)
Varyant (heterozigot)	Ekzon 6 ... G A A A G A (c.663)	Intron 6 (5' splice donör bölgesi) +1 +2 +3 +4 +5 +6 g c a g t g a ...	Splice sitesi bozulur (patojenik etki)

- Varyant: SYNGAP1: c.663+2T>C
- Lokalizasyon: Intron 6, 5' splice donör bölgesi (+2 pozisyonu)
- Deęişim: Donör bölgesinde +2. pozisyonda T yerine C
- Etki: GT kuralı bozulur → splice donör sitesi tanınmaz → mRNA kesip-yapıştırılması bozulur → fonksiyon kaybı → patojenik

NMD



BİR GENETİK RAPORA BAKINCA NMD MEKANİZMASININ ETKİNLİĞİ HAKKINDA YORUM YAPABİLİR MİYİZ?



GELECEKTEKİ TEDAVİ SEÇENEKLERİ

- *Haploinsufficiency, çocuk nörolojisindeki dominant kalıtımın en sık nedenidir.*
 - **Dozaj hassasiyeti**, fenotipik şiddeti belirleyen ana unsurdur.
- *Genetik raporda sadece varyant değil, varyantın NMD'ye girip girmediği de klinik kaderi belirler.*
- *Gelecek 10 yıl, "eksik olanı yerine koyan" hassas tıp uygulamalarına (Precision Medicine) odaklanacaktır.*

Yöntem	Hedef	Amacı
ASO (TANGO)	mRNA Splicing	Sağlam kopyadan daha fazla verim almak
CRISPRa	DNA (Promoter)	Sağlam kopyanın üretim hızını artırmak
Read-through	Ribozom	Mutasyonlu allelden protein üretilmesini sağlamak





TEŞEKKÜR EDERİM

