

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİNER METABOLİK HASTALIKLAR VE SENDROMLAR  
İLE İLİŞKİLENDİRİLEMEYEN KONJENİTAL/GELİŞİMSEL  
KATARAKTLARDA YENİ NESİL DİZİLEME İLE  
MOLEKÜLER ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Doç. Dr. Hande TAYLAN ŞEKEROĞLU**

**Genetik Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2020**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her zaman yön verici, yol gösterici ve sonsuz destekleyici olan, tezimin planlanmasında, yürütülmesinde her aşamada bilgi ve deneyimini paylaşmakta hiçbir zaman tereddüt etmeyen, tez danışmanım, doktora danışmanım ama tüm bunların ötesinde hayatımın her yönünde ‘‘Akıl Hocam’’ olan Sayın Prof. Dr. Gülen Eda Utine’ye, tez konumu belirleyen, derin tecrübesi ve bilgisi ile hem yol gösterici hem de destekleyici olan Sayın Prof. Dr. Turgay Coşkun’a, proje ve laboratuvar aşamasında insanüstü enerjisi, iyimserliği, pratik zekası ve çalışkanlığı ile hem sonuçların alınmasını sağlayan hem de en kritik sorunları çözen Sayın Dr. Öğr. Ü. Ekim Taşkiran’a, beni hem özel hem de her zaman gerçek ailemin yanındaymışım gibi hissettiren Hacettepe ‘‘Genetik’’ ailesine ve bu ilham verici yola girmem için beni motive eden hocam Sayın Prof. Dr. Cumhuri Şener’e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve bana inanan eşim Mehmet Ali’ye, hayat, şükür ve motivasyon kaynaklarım olan kızım Verda ve oğlum Mehmet’e de özellikle teşekkür ederim.

Bu tez için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nden hızlı destek şeklinde projenin kabulü sonrasında avans desteği alınmıştır (Proje No: THD-2017-11983).

## ÖZET

**Taylan Şekeroğlu H., Bilinen Metabolik Hastalıklar ve Sendromlar ile İlişkilendirilemeyen Konjenital/Gelişimsel Kataraktlarda Yeni Nesil Dizileme ile Moleküler Etiyolojinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020.** Bu çalışmada amaç bilinen bir metabolik hastalık ve sendrom ile ilişkilendirilemeyen konjenital/gelişimsel kataraktı olan hastalarda yeni nesil dizileme ile moleküler etiyojini tanımlamaktır. Çalışmaya ayrıntılı genetik ve metabolik değerlendirme sonrasında izole bilateral kataraktı olan üç kız bir erkek toplam dört hasta dahil edildi. İki hastada nükleer, bir hastada total, bir hastada ise kombine lamellar ve sütüral katarakt mevcuttu. Tüm hastalara bilateral lensektomi ve ön vitrektomi uygulandı. Bir ailede akraba evliliği mevcuttu. Hastaların ve ailedeki seçilmiş etkilenmiş bireylerin periferik kanından DNA (Deoksiribonükleik Asit) izole edildi. Tüm ekzom sekanslama (WES, *Whole Exome Sequencing*) IonProton® teknolojisi ile yapıldı. Sonuçlar Sanger sekanslama ile konfirme edildi. Bir hastada *CRYBA1* geninde heterozigot c.215+1G>A, bir hastada *CRYGC* geninde heterozigot c.432C>G (p.Tyr144Ter), bir hastada *CRYGD* geninde heterozigot c.70C>A (p.Pro24Thr) bir hastada ise *CRYBB3* geninde heterozigot c.466G>A (p.Gly156Arg) mutasyonu saptandı. Tüm bu mutasyonlar ailenin seçilmiş etkilenmiş bireylerinde de gösterildi ve daha önce konjenital katarakt ile ilişkili olduğu bildirilmiş kristalin genleri üzerindedir. Bu çalışma, ülkemizde konjenital kataraktın genetik etiyojisine yönelik yapılan çalışmalarda kristalin genlerinin öncelikle düşünülmesi gerektiğini ve WES'in konjenital katarakt gibi kompleks hastalıklarda genetik temeli tanımlamakta yararlı bir teknoloji olarak kullanımını vurgulamaktadır. Ayrıca, bu çalışma benzersiz bir özelliğe sahiptir ve ülkemizde konjenital kataraktın tüm ekzom sekanslama bilgisine dair ilk bildirimdir.

**Anahtar Kelimeler:** Konjenital katarakt, lensektomi, mutasyon, tüm ekzom sekanslama, WES

**Destekleyen kurumlar:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (THD: 2017-11983)

## ABSTRACT

**Taylan Şekeroğlu H., Investigation of the Molecular Etiology of Congenital/Developmental Cataract Which Can Not Be Attributed to Known Metabolic Diseases or Syndromes by Next Generation Sequencing, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Doctor of Philosophy Thesis in Genetics, Ankara, 2020.** The aim of the study was to identify the molecular etiology in patients with congenital/developmental cataract which can not be attributed to known metabolic diseases or syndromes by next generation sequencing. A total of four patients (three girls and one boy) who had isolated bilateral cataract were enrolled in the study after detailed genetic and metabolic evaluation. Two patients had nuclear, one patient had total and one patient had combined lamellar and sutural cataract. All patients underwent bilateral lensectomy and anterior vitrectomy. One family had consanguinity. DNA (Deoxyribonucleic Acid) was extracted from peripheral blood of probands and selected affected individuals in the family. Whole exome sequencing (WES) was performed by IonProton® technology. The results were confirmed by Sanger sequencing. Heterozygous c.215+1G>A mutation in *CRYBA1* was detected in one patient, heterozygous c.432C>G (p.Tyr144Ter) mutation in *CRYGC* was detected in one patient, heterozygous c.70A>C (p.Pro24Thr) mutation in *CRYGD* was detected in one patient and heterozygous c.466G>A (p.Gly156Arg) mutation in *CRYBB3* was detected in one patient. All these mutations were also detected in selected affected individuals of the families and were located on the crystalline genes which have been previously reported to be associated with congenital cataract. The study highlights that crystalline genes should be considered in the first place when performing studies regarding the genetic etiology of the congenital cataract in our country and the implementation of WES as a useful technology in identifying the genetic basis of complex diseases such as congenital cataract. In addition, the present study has a unique property and is the first report of whole exome sequencing data in regard with congenital cataract in our country.

**Keywords:** Congenital cataract, lensectomy, mutation, WES, whole exome sequencing

**Supported by:** Hacettepe University Research Projects Management System

(THD: 2017-11983)

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Lens	4
2.1.1. Lens Embriyolojisi	4
2.1.2. Lens Anatomisi	9
2.1.3. Lens Biyokimyası	12
2.1.4. Lens Fizyolojisi	15
2.1.5. Lens Metabolizması	16
2.2. Lensin Yaşlanması	17
2.3. Konjenital Katarakt Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Sınıflandırması	19
2.3.1. Konjenital Katarakt Mutasyonları	25
2.4. Konjenital Katarakt Kliniği ve Yaklaşım	27
2.5. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS)	30

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	37
3.1. Oftalmolojik Değerlendirme:	37
3.1.1. Genetik Değerlendirme:	38
3.1.2. Metabolik Değerlendirme:	38
3.2. Laboratuvar Yöntemleri	38
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	38
3.2.2. Tüm Ekzom Dizilemesi	39
<b>4-BULGULAR</b>	42
<b>5. TARTIŞMA</b>	46
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	65
<b>7. KAYNAKLAR</b>	67
<b>8. EKLER</b>	77
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2. Dijital Makbuz	
EK-3. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-4. Çalışmada Kullanılan Onam Formları	
EK-5. Hasta Değerlendirme Formu	
<b>9.ÖZGEÇMİŞ</b>	83

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AQP0</b>	Akuaporin 0
<b>ATP</b>	Adenosine TriPhosphate
<b>BFSP 1</b>	Beaded filament structural protein 1
<b>BFSP 2</b>	Beaded filament structural protein 2
<b>cAMP</b>	cyclic Adenosine MonoPhosphate
<b>cGMP</b>	cyclic Guanosine MonoPhosphate
<b>CMOS</b>	Integrated complementary metal-oxide semiconductor
<b>CRYAA</b>	Crystalline Alpha A
<b>CRYAB</b>	Crystalline Alpha B
<b>CRYBA1</b>	Crystalline Beta A1
<b>CRYBA2</b>	Crystalline Beta A2
<b>CRYBA4</b>	Crystalline Beta A4
<b>CRYBB1</b>	Crystalline Beta B1
<b>CRYBB2</b>	Crystalline Beta B2
<b>CRYBB3</b>	Crystalline Beta B3
<b>CRYGC</b>	Crystalline Gamma C
<b>CRYGD</b>	Crystalline Gamma D
<b>CRYGS</b>	Crystalline Gamma S
<b>CYP27A1</b>	Cytochrome p450 Family 27 Subfamily A Member 1
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit

<b>dNTP</b>	Deoxynucleoside triphosphate
<b>EPHA2</b>	EPH, ephrin, receptor A2
<b>EYA2</b>	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 2
<b>FOXE3</b>	Forkhead box E3
<b>FYCO1</b>	FYVE and coiled-coil domain autophagy adaptor 1
<b>GALK1</b>	Galactokinase 1
<b>GJA3</b>	Gap Junction protein Alpha 3
<b>GJA8</b>	Gap Junction protein Alpha 8
<b>GLUT1</b>	Glucose Transporter 1
<b>GLUT3</b>	Glucose Transporter 3
<b>GWAS</b>	Genome-wide association study
<b>HSF4</b>	Heat shock transcription factor 4
<b>LIM2</b>	Lens intrinsik membran proteini 2
<b>LOD</b>	Logarithm of the odds
<b>LTBP2</b>	Latent TGF (Transforming Growth Factor) $\beta$ bağlayan protein 2
<b>MAF</b>	MAF bZIP transcription factor
<b>MIP</b>	Majör intrinsik protein
<b>NCAM2</b>	Nöral hücre adezyon molekülü-2
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>NHS</b>	NHS actin remodeling regulator
<b>PAX6</b>	Paired box 6



<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFD</b>	Persistan Fetal Damarlanma
<b>PITX3</b>	Paired like homeodomain 3
<b>PRX</b>	Periaksin
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SNV</b>	Single Nucleotide Variants
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>WDR36</b>	WD repeat domain 36
<b>WES</b>	Whole Exome Sequencing
<b>WGS</b>	Whole Genome Sequencing

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Göz küresinin transvers kesitinin şematik gösterimi.	4
2.2.	İntrauterin hayatın 22. gününde, nöral ektoderm üzerinde optik sulkusların belirgin hale gelmesi.	5
2.3.	İntrauterin hayatın 27. gününde lens plakodunun yüzey ektodermi üzerinde lokalize bir kalınlaşma olarak görülmesi.	6
2.4.	İntrauterin hayatın 29. gününde lens plakodunun katlanması, lens vezikülünün oluşmaya başlaması ve lens vezikülü üzerinde görülen lens çukuru.	7
2.5.	İntrauterin hayatın 37. gününde yüzeyden tamamen ayrılmış lens vezikülü ve içerisinde oluşmaya başlamış ilk lens fibrilleri.	7
2.6.	Lensin ön duvarında epitel hücreleri ile arkada oluşan ve üstüste yığılan lens fibrilleri. Lensin ön kısmında epitel hücreleri, arka kısmında bazal lamina olduğu dikkati çekmektedir.	8
2.7.	Göz küresi içerisinde lensin yerleşimi, lens ile vitreus arasındaki yakın ilişkiyi gösteren şematik gösterim.	10
2.8.	Lensin anatomik olarak belirli bir zonunda görülen katarakt: Lameller (Zonüler) Katarakt	23
2.9.	Lens arka kapsülünün merkezinde yer alan arka polar katarakt.	24
4.1.	Kohorttaki 1 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Anne ve baba arasındaki akrabalığa karşın katarakt etkeni CRYBA1 geninde otozomal dominant kalıtım gösteren heterozigot bir mutasyon olarak saptanmıştır (c.215+1G>A). IV.1 ve IV.2 numaralı bireylerde de aynı mutasyon hastalık nedeni olarak gösterilmiştir. Aynı mutasyonu barındıran IV.3 numaralı bireyde fenotip bulunmaması ise eksik penetrans göstermesi ile açıklanmıştır.	43
4.2.	Kohorttaki 2 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Probandda heterozigot olarak saptanan CRYGC c.432C>G (p.Tyr144Ter) mutasyonu aynı fenotipi sergileyen bireylerden II.3, II.11, III.7 ve III.8 numaralı bireylerde de hastalık nedeni olarak gösterilmiştir.	44
4.3.	Kohorttaki 3 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Probandda CRYGD geninde otozomal dominant kalıtım paterni gösteren heterozigot c.70C>A (p.Pro24Thr) mutasyonu saptanmıştır. Hastanın babasının (II.4) da aynı mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir.	44

- 4.4.** Kohorttaki 4 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Probandda *CRYBB3* c.466G>A (p.Gly156Arg) mutasyonu saptanmıştır. Aynı mutasyonun, hastanın etkilenmiş annesinde de (II.5) olduğu gösterilmiştir.

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>4.1.</b>	Çalışmaya dahil edilen hastaların ameliyat yaşları, katarakt tipleri, oküler komorbiditeleri ve aile öyküleri.	42

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lensin saydamlığını kısmen veya tamamen kaybetmesi katarakt olarak tanımlanmaktadır. Katarakt, hayat boyunca her yaş grubunda ortaya çıkabilen bir hastalıktır. Katarakt oluşumunda başlıca genetik, metabolik, enfeksiyöz ve travmatik de dahil olmak üzere pek çok etken tanımlanmıştır. Katarakt, farklı sınıflandırmaları yapılabilsede, temel olarak ortaya çıktığı zamana göre konjenital, infantil, presenil ve senil olarak dört gruba ayrılmaktadır. Çocukluk çağı kataraktları ortaya çıkma zamanı dışında ayrıca yerleşimleri ve morfolojik özelliklerine göre de sınıflandırılmaktadırlar.

Konjenital katarakt, önlenebilir körlüklerin başlıca nedenlerinden biridir (1). Çocukluk çağı körlüklerinin yaklaşık olarak 1/10'unu oluşturmaktadır (2). Konjenital kataraktlar klinik ve genetik olarak heterojendir (2, 3). Unilateral veya bilateral olabilir. Genellikle bilateraldir ve bu durumda sistemik bir hastalık ile ilişkili olma olasılığı yüksektir. Unilateral olanların ise idiyopatik olma olasılığı daha yüksektir (4, 5). Bununla beraber, kataraktların yaklaşık 1/3'ü genetik kökenlidir (6). Aynı gendeki mutasyonlar değişik yoğunluklarda ve tiplerde katarakt gelişimine neden olabilmektedir (7). En sık otozomal dominant olmak üzere, otozomal resesif veya X'e bağlı olarak kalıtılabilmektedir.

Bu tez çalışmasında birincil amaç, bilinen bir metabolik hastalık veya sendrom ile ilişkilendirilememiş konjenital/gelişimsel katarakt hastalarında moleküler etiyojijiyi aydınlatmaktır. Genetik heterojenite nedeniyle yöntem olarak tüm ekzom dizilemesi (WES, *Whole Exome Sequencing*) uygulanmıştır. WES yönteminin bilinen genlerle sınırlı olmayan moleküler çıktılarını nedeniyle ikincil bazı amaçlara da ulaşılmasını sağlayabileceği düşünülmüştür. Bunlar arasında, ülkemizde akraba evliliği sıklığının yüksek olması nedeniyle yeni resesif genlerin bulunması ve altta yatan moleküler etiyojinin varsa ilişkili olduğu diğer yolakların (metabolik hastalık, sendromlar vb.) belirlenmesi bulunmaktadır. Ülkemizde bu hasta grubunda yapılan ilk ekzom çalışması olması nedeniyle, konjenital/gelişimsel katarakt moleküler etiyojisi ile ilgili olarak toplumumuza özgü veri elde edilmesi ve daha iyi bir genetik danışma verilebilmesini sağlamak da amaçlarımız arasındadır.

Böylece bu çalışmanın başlıca amaçları;

1- Bilinen bir metabolik hastalık/sendrom ile ilişkilendirilemeyen konjenital/gelişimsel kataraktı olan dört hastada WES verilerini elde etmek,

2- Ülkemizde akraba evliliği sık olduğu için diğer toplumlarda şu ana kadar tanımlanmamış yeni resesif genleri araştırmak,

3- Yeni nesil dizileme sonrasında yeni bir metabolik hastalık veya sendrom ile ilişkili moleküler etiyojinin ortaya çıkması durumunda konjenital/gelişimsel katarakt hastalarının ön değerlendirilmesinde farklı bir bakış açısının ve algoritmanın geliştirilmesi için yol gösterici verileri elde etmek,

4- Daha önceden bilinen genler ve/veya tanımlanmış olan lokuslar dışında başka bir gen/lokus tanımlanması durumunda mevcut literatüre katkıda bulunmak,

5- Gelecekte konjenital katarakt hastalarında moleküler etiyojinin belirlenmesinde rutin olarak kullanılacak moleküler tanı sistemlerinin oluşturulmasında yol gösterici olabilecek veriler elde etmek,

6- Moleküler etiyojinin belirlenebildiği hastalarda ailelere bu zeminde ve daha güvenilir genetik danışma verebilmek,

olarak belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

İnsan lensi, şeffaf, bikonveks ve avaskülerdir. İrisin arkasında, vitreusun önünde yer almaktadır (Şekil 2.1). Lensin temel fonksiyonu, görüntünün retina üzerine odaklanmasını sağlamaktır. Lensin saydamlığını kısmen veya tamamen kaybetmesi katarakt olarak tanımlanmaktadır. Lens üzerindeki opasitenin yerleşimi ve morfolojisi kataraktın sınıflandırılmasını sağladığı gibi aynı zamanda başlangıç zamanı ve görsel prognozu hakkında da bilgi vermektedir. Ancak, bir lenste birden fazla katarakt tipi de aynı anda bulunabilmektedir.

Konjenital katarakt, doğumda veya hemen sonrasında lens üzerinde saptanan opasitedir. Konjenital katarakt gelişiminde temel faktör, lens gelişimi veya fonksiyonunun intrauterin veya erken postnatal dönemde herhangi bir nedenle duraklamasıdır (7). Konjenital katarakt, görme gelişiminin en aktif ve en hassas olduğu dönemde meydana gelmesi ve ciddi görme azlığı ile sonuçlanabilmesi nedeniyle aslında bir pediatrik oftalmolojik acildir.

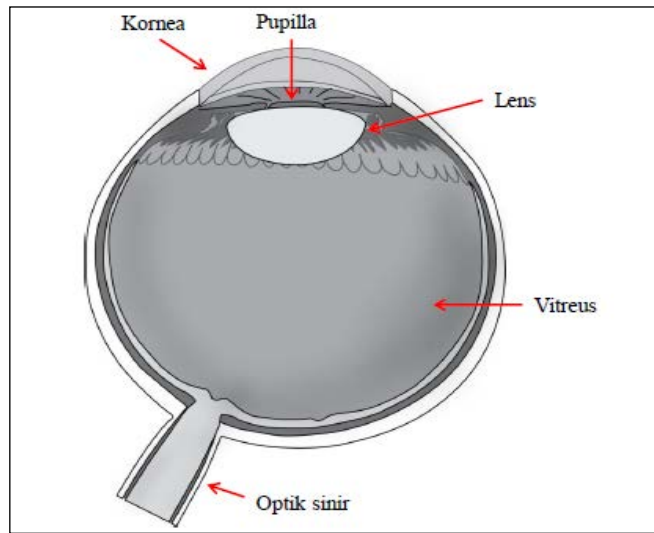
Konjenital katarakt ve diğer çocukluk çağı körlükleri nedenleri, önlenebilir körlüklerin yükünü azaltmaya yönelik dünya çapında bir girişim olan Vision 2020: The Right to Sight'in temel önceliklerinden biri olarak belirlenmiştir (8). Dünya üzerinde yaklaşık 200 bin çocuğun bilateral katarakt nedeniyle kör olduğu veya ilerleyici kısmi katarakt nedeniyle çocukluk döneminde görme sorunları yaşadığı bildirilmiştir (9).

Konjenital katarakt, pek çok ülkede çocukluk çağı körlüklerinin yaklaşık olarak %10'unu oluşturmaktadır (10). Bazı ülkelerde hala çocukluk çağı körlüklerinin en sık sebebi olmakla birlikte prevalansı %2,2-13,6 arasında bildirilmiştir (4,10). Ülkeler arasında sosyoekonomik ve sağlık hizmetlerine ulaşım kaynaklı farklılıklar konjenital katarakt prevalansının da farklı olmasına neden olmaktadır.

Wu ve arkadaşları yayınladıkları meta-analizde konjenital katarakt prevalansının en yüksek Asya'da, sonrasında ise Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Avustralya'da olduğunu bildirmişlerdir (4). Yaptıkları analizde, tanı yaşı

genellikle bir yaş sonrası, en çok görülen konjenital katarakt morfolojisi total katarakt ve en sık konjenital katarakt tipi izole ve idiyopatik katarakt olarak bulunmuştur (4).

Konjenital katarakt tiplerinden bazıları ilerleyici özellikte olup yakın takip veya erken müdahale gerektirir iken bazıları ise stabil kalma eğilimindedir. Bu klinik özellik, ameliyat veya takip kararının alınmasında oldukça önemlidir. Her lens opasitesinde ameliyat endikasyonu yoktur. Görme ekseninden uzak, boyutu küçük olan bazı opasiteler ameliyatsız olarak takip edilebilmektedir.



**Şekil 2. 1.** Göz küresinin transvers kesitinin şematik gösterimi.

## 2.1. Lens

### 2.1.1. Lens Embriyolojisi

Lensin intrauterin gelişimi pek çok basamaktan oluşmaktadır. Bu basamakların aydınlatılması katarakt etiolojisinin ve tiplerinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır.

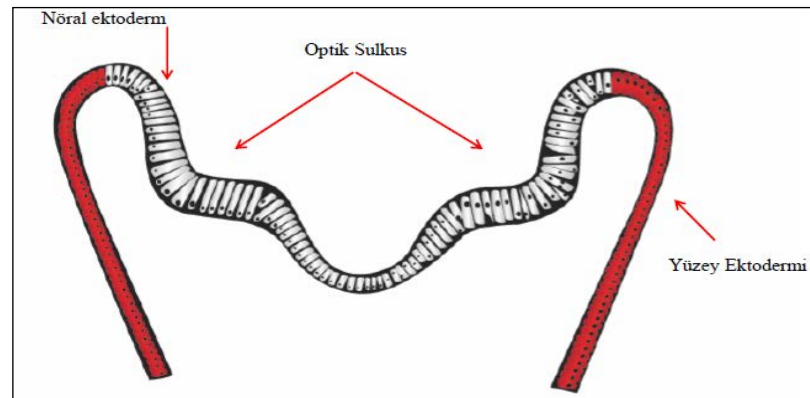
Lens intrauterin gelişimi sırasında, komşu göz dokuları ile karşılıklı bir etkileşim halindedir (11). Bu nedenle lens gelişiminde herhangi bir basamağın aksaması durumunda komşu dokular da lens ile birlikte etkilenmektedir (11). Lensin gelişmemesi durumunda ise çevre dokuların hiç gelişmediği veya gelişse bile hızla dejenere olduğu gösterilmiştir (11). Bu durum, lens ile ilgili gelişimsel sorunlar



varlığında gözün diğer yapılarında da eşlik edebilecek patolojilerin olma olasılığı nedeniyle klinik olarak oldukça uyarıcı ve önemlidir. Lensi ilgilendiren klinik sorunlar varlığında diğer oküler dokuların da ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gereklidir. Örneğin, konjenital katarakt; mikroftalmi, açı anomalileri ve bunun sonucunda glokom ile birliktelik gösterebilir. Ayrıca konjenital kataraktta gözün aksiyel uzunluğu ve lens kalınlığının da daha az olduğu gösterilmiştir (12, 13). Bunun dışında, gelişimsel problemler nedeniyle lens normalden küçük (mikrofaki), sferik (sferofaki) veya hem küçük hem de sferik (mikrosferofaki) kalabilmektedir.

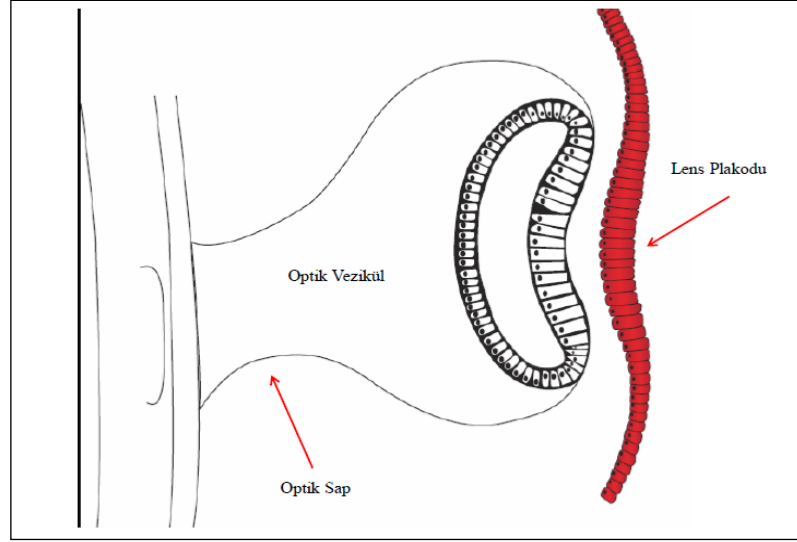
Göz küresi hayatın ilk yıllarında erişkin boyutuna ulaşır ve bu aşamadan sonra hücre çoğalması ve hücre ölümü bir dengeye ulaşır (11). Ancak, lens fibrili üretimi ömür boyu devam ettiği için lens büyümesi de devam etmektedir. Lens büyümesinin insanda bifazik paternde olduğu düşünülmektedir (14). Bu paterne göre, lens büyümesi hayatın özellikle ilk iki yılında asemptomatik olarak (belirli bir eğriye yaklaşan ama ona hiç ulaşamayan bir paternde) gerçekleşirken sonra hız azalır ve büyüme doğrusal paterne döner (14). Lens intrauterin hayatın erken dönemlerinde sferik şekilde iken yaş ile birlikte eliptik bir hal alır (14).

Göz küresinin gelişimi intrauterin hayatın yaklaşık olarak 22. gününde başlamaktadır (15). Bu dönemde embriyo yaklaşık olarak 2 mm uzunluğundadır (15). Nöral katlantıların iç yüzeyinde, optik sulkuslar sığ çukurlar şeklinde belirmeye başlar (15) (Şekil 2.2). Daha sonra bu optik sulkuslar, optik vezikülleri oluşturur.



**Şekil 2. 2.** İntrauterin hayatın 22. gününde, nöral ektoderm üzerinde optik sulkusların belirgin hale gelmesi.

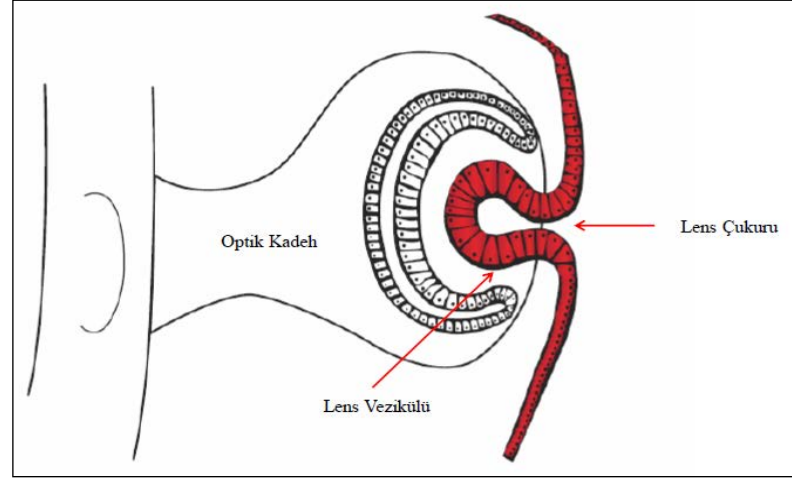
Optik veziküller 25. günden itibaren genişlemeye başlar (15). Yirmi yedinci günde, lens plakodu yüzey ektoderminde lokalize bir kalınlaşma şeklinde ortaya çıkar (15) (Şekil 2.3). Eş zamanlı olarak, optik vezikülün ön beyin ile bağlantı noktası olan optik sap oluşur. Optik vezikül katlanma süreci sonucunda optik kadehe (*optic cup*) dönüşür.



**Şekil 2. 3.** İntrauterin hayatın 27. gününde lens plakodunun yüzey ektodermi üzerinde lokalize bir kalınlaşma olarak görülmesi.

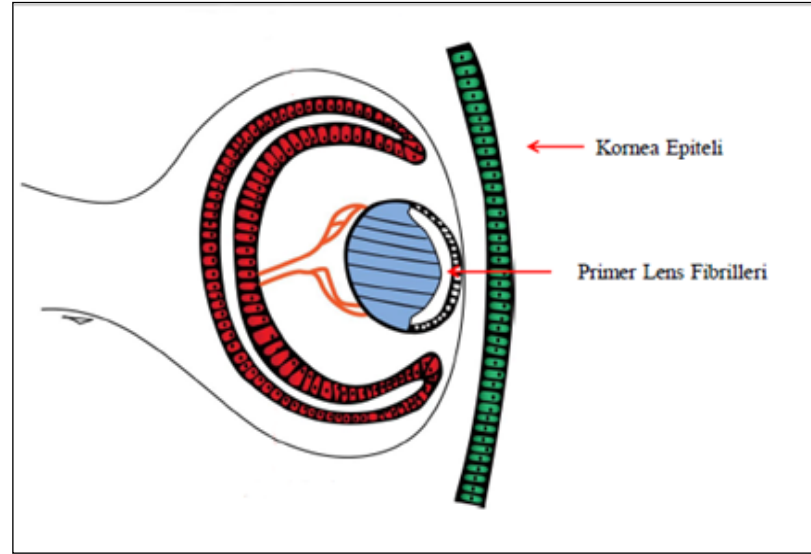
Lens plakodunun katlanması 29. günde tamamlanır ve sonuç olarak lens vezikülü oluşur. Optik kadeh, lens oluşumu ve lens fibrili oryantasyonunu da yönetmektedir (16).

Lens oluşumunun ilk bulgusu hücre boyunda uzama ve hücreler arası lakünlerde azalma sonucunda daha sıkı bir epitel bölgesinin olmasıdır (16). Lens plakodu aslında morfolojik olarak tanımlanabilen ilk lenstir (16). Lens plakodunun hemen üzerinde yüzey ektodermi kapanmadan önce ufak bir lens çukuru izlenir (Şekil 2.4).



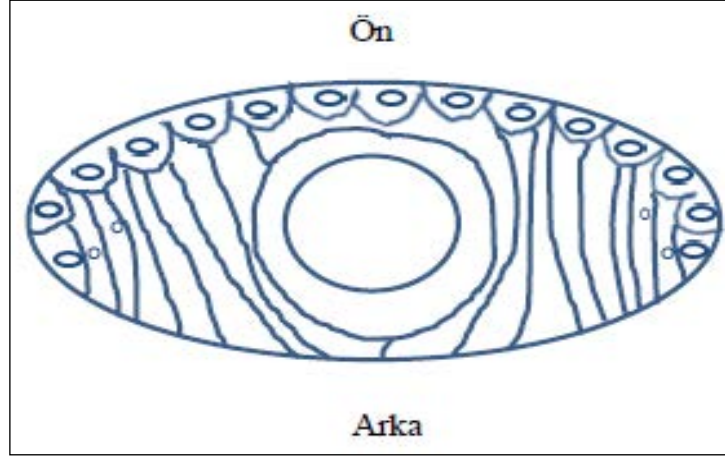
**Şekil 2.4.** İntrauterin hayatın 29. gününde lens plakodunun katlanması, lens vezikülünün oluşmaya başlaması ve lens vezikülü üzerinde görülen lens çukuru.

Sonuç olarak, lens vezikülü 36. günden itibaren yüzey ektoderminden tamamen ayrılır (Şekil 2.5). Bu dönemde lensin yüzey ektoderminden tamamen ayrılamaması kornea ile lens arasında yapışıklıkların gelişmesine neden olur.



**Şekil 2.5.** İntrauterin hayatın 37. gününde yüzeyden tamamen ayrılmış lens vezikülü ve içerisinde oluşmaya başlamış ilk lens fibrilleri.

Lens vezikülünün arka duvarında yer alan hücreler farklılaşıp uzayarak primer lens fibrillerini oluşturur, ön taraftaki hücreler ise lens epitel hücrelerine dönüşür (Şekil 2.6). Uzayan lens hücreleri arkada bazal laminaya önde lens ön epiteline doğru büyür ve lens kavitesini doldurmaya başlar (15). Lens fibrilleri içerisindeki nükleuslar öne doğru yer değiştirir ve bir nükleer kavis oluşturur.



**Şekil 2.6.** Lensin ön duvarında epitel hücreleri ile arkada oluşan ve üstüste yığılan lens fibrilleri. Lensin ön kısmında epitel hücreleri, arka kısmında bazal lamina olduğu dikkati çekmektedir.

Diğer lens fibrilleri ise ekvatoryel lens epitel hücrelerinin mitotik aktivitesi sonucunda oluşur ve sekonder lens fibrilleri adını alır (15). Bir kutuptan başlayan fibril diğer kutubun periferinde sonlanır. Sekonder lens fibrilleri, primer lens fibrilleri üzerine yığılır, sırt sırta gelir ve önde düz Y arkada ters Y şeklindeki lens sütürlerini oluşturur. Öndeki sütür lens fibrillerinin apikal uçları tarafından arkadaki sütür ise bazal uçları tarafından oluşturulur. Lensin Y sütürleri içerisindeki bölgesi nükleus, çevresindeki bölgesi ise kortekstir. Y sütürleri fetal nükleusun sınırlarını belirler. Oluşan her yeni tabaka yaşam boyunca bir önceki tabakanın üzerine yığılır. Bu nedenle başlangıçta küre şeklinde olan lens yaşlandıkça elipsoid bir hal alır. Etrafını çevreleyen mezenkim kökenli bazal lamina ise lens kapsülünü oluşturur. Lens fibrillerinin kendilerine özgü yapıları ve yerleşimleri ek olarak nükleuslarının belirli bir bölgeye göçü lensin saydam bir yapıya sahip olması açısından son derece kritiktir.

Lens avasküler bir yapıdır ve beslenmesi intrauterin dönemde tunika vasküloza lentis ile olur (15). Optik kadehte yer alan optik fissür, hiyaloid damarların lense ulaşmasını sağlar. Bu vasküler yapı kaybolduktan sonra lens önde hümör aköz arkada ise vitreus üzerinden beslenmeye devam eder.

Gelişimi sırasında lens dış etkenlere karşı son derece hassastır. Herhangi bir faktör fibrillerde dejenerasyon ve opasiteye neden olur. Eğer etkilenme sınırlı ise,

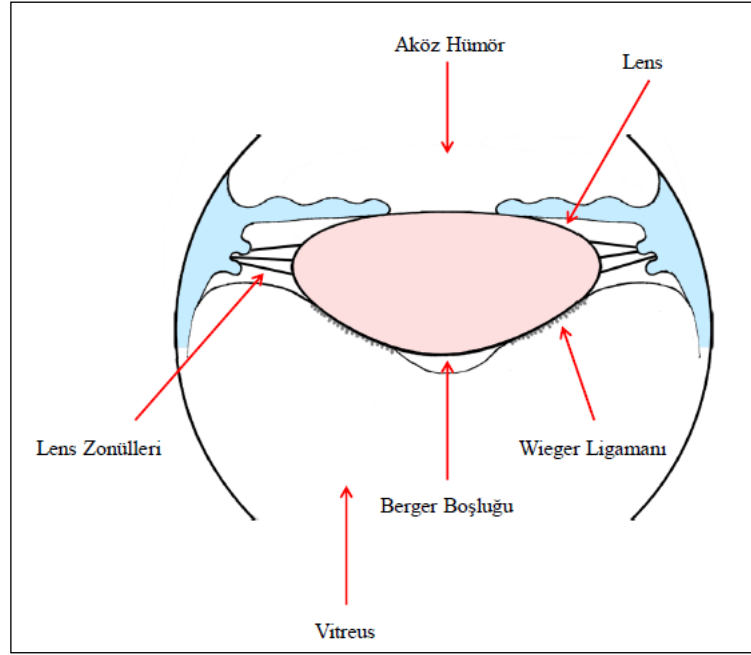
yeni sağlıklı fibriller birikir bu nedenle diğer bölgeler saydam olarak oluşmaya devam eder ve opasite lokalize olarak kalır (15).

### 2.1.2. Lens Anatomisi

Lens, gözün korneadan sonra en yüksek kırıcılık indeksine sahip olan parçasıdır. Temel olarak nükleus ve korteksten oluşmaktadır. Saydam, avasküler ve arka eğimi ön eğiminden biraz daha fazla olan bikonveks bir yapıdır. Lensin ön yüzeyinin yarıçapı 10 (8-14) mm, arka yüzeyinin yarıçapı 6 (4,5-7,5) mm, ön-arka mesafesi doğumda 3,5-4 mm, kırma indeksi 1,39, kırma gücü 15-17 diyoptri, ağırlığı ise doğumda 65 mg olarak ölçülmüştür (17).

İnsan gözünün toplam kırma gücü yaklaşık olarak 58 diyoptridir. Lens, bağlı olduğu zonüller üzerinden kırma gücünü değiştirerek yakın ve uzak görüşte netliği sağlayabilme özelliğine sahiptir. Zonüllerin gerginliği, siliyer kas ve parasempatik lifler tarafından belirlenir. Akomodasyon olarak adlandırılan bu güç, yaşla birlikte lensin sertleşmesi ve elastikiyetinin azalması ile kaybolur (17). Sonuç olarak, belirli bir yaştan sonra yakını görme zorluğu ortaya çıkar.

Lens, önde iris arkada vitreus ile komşudur. Siliyer uzantılar ile çepeçevre sarılmıştır. Lens arka yüzeyi, vitreus ön yüzeyine sirküler şekilde hiyaloidokapsüler ligament veya Wieger ligamentini oluşturacak şekilde tutunur. Bu ligamentin çevrelediği potansiyel boşluk ise Berger boşluğu veya retrolental alan olarak tanımlanır (Şekil 2.7). Bu yapı aslında gerçek bir ligament değildir. Gücü yaşla birlikte giderek azalır ve kaybolur. Bu bağlantının katarakt cerrahisi açısından oldukça büyük bir önemi vardır. Bebeklik-çocukluk dönemi katarakt cerrahisinde arka kapsülektomi ve ön vitrektomi yapılmaz ise kalan lens epitel hücreleri bu bağlantıyı zemin alarak çok hızlı bir şekilde çoğalır ve görme ekseninin tekrar kapanmasına neden olur. Oysa erişkin döneminde yapılan katarakt cerrahisinde, bu bağlantı oldukça zayıf olduğu için özellikle lens arka kapsülü ve ön vitreusa yönelik hiçbir işlem yapılmaz.



**Şekil 2.7.** Göz küresi içerisinde lentin yerleşimi, lentin ile vitreus arasındaki yakın ilişkiyi gösteren şematik gösterim

Lentin ön yüzünün merkezi ön kutup veya ön pol, arka yüzünün merkezi arka kutup veya arka pol, iki kutup arasındaki mesafe ise lentin kalınlığı olarak tanımlanır. Ön veya arka kutuptaki opasiteler “polar katarakt” olarak tanımlanır. Lentin yılda yaklaşık olarak 0,02 mm kalınlaşır (17). Lentin ön ve arka yüzünün birleştiği yer lentin ekvatorudur. Bu bölge zonüllerin temel olarak tutunduğu yer olduğu için ayrı bir öneme sahiptir. Lentin ekvatorunun çapı doğumda 6,5 mm iken ilerleyen yaş ile birlikte yaklaşık 9-10 mm’yi bulur (17).

Lenti tamamen çevreleyen lentin kapsülü, aslında lentin epiteli ve fibrilleri tarafından çevrelenen bir bazal membrandır. Önde lentin epiteli arkada ise lentin fibrilleri tarafından üretilmektedir. Tip 4 kolajen ve sülfatlanmış glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır (17). En kalın olduğu yer; ekvatorun hemen önü ve arkasıdır ve burada yaklaşık 17-28 µm kalınlığındadır (17). Mitozun en fazla gerçekleştiği bölge germinatif zon olarak da adlandırılan ekvator ve ekvatorun hemen önünde yer alan bölgedir. Lentin ön ve arka kapsülü özellikle katarakt cerrahisi sırasında müdahale edilen bölgelerdir ve sırasıyla 9-14 µm ve 2-3 µm kalınlığındadırlar (17). Çocukluk döneminde oldukça elastik bir yapısının olması katarakt cerrahisi sırasında kontrollü açıklık oluşturulmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Erişkin döneminde ise bu özelliği giderek azalır.

Lens epiteli sadece ön yüzeyde bulunan tek katlı küboidal epiteldir. Bu epitel hücreleri A hücreleri olarak tanımlanır. Ekvatora doğru silindirik hale dönüşen epitel hücreleri ise E hücreleri adını alır. Lens ekvatorundaki hücrelerin vitreus içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin etkisi ile farklılaştığı ve fibrillere dönüştüğü düşünülmektedir (11). Mitoz hızı, bölünen hücrelerin epitel içerisindeki dağılımı, hücre siklusu uzunluğu temel olarak yaşa bağlıdır (11, 18, 19). Lens epitelinin kendini yenileme özelliğinin olması nedeniyle bir grup kök hücre içerdiği de düşünülmektedir (20).

Lens içerisinde farklı gelişim evrelerinde çok sayıda lens fibrili bulunmaktadır. Lens fibrilleri yaşlandıkça ve daha derine gömüldükçe nükleuslarını kaybeder. Yüzeydeki lens fibrilleri ise tam tersine metabolik olarak oldukça aktiftirler, organel içerirler ve protein sentezlerler. Bazı organellerin degradasyonu ve lens proteinlerinin benzersiz özellikleri lens saydamlığının korunması açısından son derece önemlidir (21). Merkezde bulunan fibriller organellerini kaybettikleri için bu bölgedeki lens proteinleri vücudun muhtemelen en yaşlı proteinlerindendirler (22).

Bu kadar fazla çoğalma kapasitesine sahip hücre içermesine rağmen lenste kanserin hiç görülmemesi oldukça şaşırtıcıdır (11). Bunun hücrelerin lensin derinlerine doğru göç ederek göreceli olarak korunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. (11).

Lens, nükleus ve korteksten oluşur. Nükleus kendi içerisinde embriyonik, fetal, infantil ve erişkin olmak üzere dört kısma ayrılır. İlk oluşan primer lens fibrilleri embriyonik, bunların üzerine üçüncü aydan sonra doğuma kadar oluşan ve üst üste yığılan fibriller fetal, daha sonra birikenler ise sırasıyla infantil ve erişkin nükleusu oluştururlar. Nükleusta yer alan fibriller kortekste yer alanlara göre çok daha sıkı yerleşimlidir. Bu nedenle lensin nükleusu, korteksine göre daha serttir ve kırıcılığın en yüksek olduğu yerdir. Nükleusun sertlik derecesi katarakt cerrahisi sırasında oldukça önemlidir.

Lensin bulunduğu yerde asılı olarak kalmasında zonüller kritik bir role sahiptir. Zonüller, Zinn zonülleri veya lensin süspansuar ligamenti, lensi ekvatoryal bölgesinin 2 mm önü ve 1 mm arkası arasında olan bölgeden çepeçevre sararak

asarlar. Pars plananın pigmente olmayan siliyer epitelinden köken alırlar. Zonüllerin lens büyümesini aktif olarak kontrol ettikleri düşünülmektedir (11).

Lens zonülleri ince liflerden oluşan demetler şeklindedir (17). Zonüller  $\alpha$ -kimotripsin duyarlı fibröz kolajen olmayan proteinden oluşmaktadır (17). Fibrillin 1 ve latent TGF (*Transforming Growth Factor*)  $\beta$  bağlayan protein 2 (LTBP2) zonüllerin en önemli iki bileşenidir (23).

### 2.1.3. Lens Biyokimyası

Lensin kendisine özgü iç biyokimyası saydamlığının korunmasında oldukça kritik bir role sahiptir. Bu işleyişte herhangi bir aksama lenste opasite gelişimine neden olabilir. Lens epiteli iyon pompaları sayesinde sıvı-elektrolit dengesinin ve bu sayede lens saydamlığının korunmasını sağlamaktadır.

Lensin saydamlığı, lens fibrillerinin herhangi bir ekstraselüler matriks yerleşimine izin vermeyen mükemmel yerleşimi sayesinde sağlanmaktadır (17). Fibriller birbiri üzerine sıkıca paketlenmiştir. Nükleus içermemeleri ve herbirinden yansıyan ışığın birbirini nötralize etmesini sağlayan özel yerleşimleri nedeniyle üzerlerinde olan ışık saçılması oldukça azdır (17).

Lens fibrilleri, birbirleri ile yakın iletişim halindedirler (17). Lens fibrillerinin en önemli görevi, total lens proteinlerinin %90'ından fazlasını oluşturan kristalinleri üretmektir. Kristalinler lensin yüksek kırma indeksinden ve pek çok kendine özgü özelliğinden sorumludur. Lensin suda çözünen proteinlerinin %90'ını oluştururlar. Kristalin konsantrasyonu nükleusa göre yüzeyde çok daha yüksektir. Moleküler ağırlıklarına göre kristalinler  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere üç alt gruba ayrılabilirdikleri gibi aynı zamanda  $\alpha$  ve  $\beta\gamma$  olarak da sınıflandırılabilirler. Kristalinler özellikle  $\alpha$  ve  $\beta\gamma$  alt tipleri evrim boyunca oldukça korunmuştur (17).

Kristalinlerin  $\alpha$  grubu insanda  $\alpha A$  ve  $\alpha B$  olmak üzere iki tiptir. Normal şartlar altında  $\alpha$  kristalinler birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlı geniş agregatlar halindedirler (17).  $\alpha A$  ve  $\alpha B$  kristalinler fosforilasyon paternleri ve yapısal özellikleri açısından birbirlerinden farklılıklar göstermektedirler (22).  $\alpha A$  ve  $\alpha B$  kristalinler



küçük *heat-shock* protein ailesine aittir. Birbirleri ile %50 sekans homolojisi göstermektedirler (17).

Alfa kristalinler, diğer kristalinleri termal degradasyona karşı koruma özelliğine sahiptir ve şaperon gibi fonksiyon görürler (22). Alfa kristalinlerin apoptozisi inhibe edici etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (24, 25). Alfa kristalin mutasyonlarında şaperon ve antiapoptotik aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (26). Alfa kristalinler ayrıca yaşlanan proteinlerin birikerek ışığın saçılmasına neden olacak bir odak oluşturmalarını engeller ve bu şekilde de lensin saydamlığının korunmasını sağlarlar (22).

Beta kristalin asidik ( $\beta A1$ ,  $\beta A2$ ,  $\beta A3$  ve  $\beta A4$ ) ve bazik ( $\beta B1$ ,  $\beta B2$  ve  $\beta B3$ ) olmak üzere iki protein grubuna ayrılmaktadır ve ağırlıkları 23-35kDa arasında değişmektedir(17).  $\beta$  kristalinler de 50-200kDa ağırlığında karışık agregatlar oluştururlar (17). Diğer kristalin grubu olan  $\gamma$  kristalinler ise yüklerine göre  $\gamma A-E$  ve  $\gamma S$  olmak üzere altı alt tipe ayrılmaktadır (17). Kristalinlerde normalde 40/35/25 olan  $\alpha/\beta/\gamma$  oranı yaşa bağlı olarak değişmektedir (17).

Gama kristalinler lens nükleusunun temel proteinleri olup nükleusun dehidrate ve sert olmasını sağlarlar (22).  $\gamma\beta$  kristalinler ise "Greek key" motifindeki 4 adet antiparalel  $\beta$  tabakasından oluşmaktadır(17). Gama kristalin oldukça stabil bir moleküldür (17). Beta ve  $\gamma$  kristalinler oldukça stabil bir yapı oluştururlar ve lenste fotooksidasyon olmasını engellerler (27).  $\gamma S$  kristalin ise  $\beta$  ve  $\gamma$  kristalin arasında bir gruptur, diğer gama kristalinlerden daha geç sentezlenmeye başlar, yaşla birlikte miktarı azalır ve senil katarakt ile ilişkilidir (17, 28). Kristalinlerin bir kısmı ise ürede çözünen hücre iskeleti proteinlerine kuvvetli olarak bağlıdır. Kristalinlerin ayrıca otofaji ve doku yeniden düzenlenmesinde de rol aldığı düşünülmektedir (22).

Tüm kristalinler lense özgü değildir. Örneğin  $\alpha B$  kristalin, kalp, iskelet kası, böbrek, akciğer, beyin ve retinada gösterilmiştir (29, 30).  $\alpha A$  kristalin ise dalak ve timusta daha fazla olmak üzere pek çok dokuda bulunmaktadır (31).

Takson spesifik kristalinler ise çözünebilir proteinlerin en az %10'unu oluşturmaktadır (22). Lens içerisinde enzimatik aktiviteye de sahip oldukları düşünülmektedir (22).

Sonuç olarak kristalinler, yüksek kırma indeksleri, özel paketlenme karakterleri ve kendilerine özgü bazı özellikleri sayesinde lens saydamlığı açısından oldukça önemlidir.

Hücre iskeleti proteinleri büyük oranda lens proteinlerinin ürede çözünebilir kısmında bulunur. Aktin, vimentin, spektrin ve intermediyer filamanlar gibi mikofilamanlar ve lense özel *beaded* filamanlar bu grupta bulunur(17). Bunlar dışında alfa kristalinlerin de, hücre iskeletinin oluşması ve korunmasında rol oynadığı bilinmektedir (22). Vimentin, lenste bulunan ana intermediyer filamandır (17).

Hücre iskeleti proteinlerinin oranlarında lensin bölgesine göre değişiklikler olmaktadır.

İki sınıf *beaded* protein vardır: 90kDa ve 48kDa (17). Bu proteinlerin kristalin paketlenmesinde ve dağılımında rol aldığı düşünülmektedir(17). Fakinin (CP49) 48kDa protein olarak ve filensin de 90kDa protein olarak *beaded* filamanı oluşturmaktadırlar (17). Filensin veya fakinin mutasyonunun olduğu durumlarda lens fibrili morfolojisi normal olmasına rağmen lensin opak olduğu gösterilmiştir (17).

Suda ve ürede çözünemeyen proteinler ise membran proteinleridir ve tüm proteinlerin %2'sini oluşturur (17, 22). Bu aile, N-kaderin, kalpaktinler, nöral hücre adezyon molekülü-2 (NCAM 2), gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve ATP (*Adenosine Triphosphate*) az' lar gibi pek çok enzimi içermektedir (22). Majör intrinsik protein (MIP) en belirgin lense özgü membran proteinidir ve 12. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (22). Akuaporin ailesindedir ve akuaporin 0 (AQP0) olarak da adlandırılmaktadır (22). İyon kanalı olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Suyun lens dışına taşınması ve lensin saydamlığından sorumludur.

Lens epitel hücrelerinde bulunmaz. Adezyon, hücrelerarası iletişim ve taşımada oldukça önemli bir yere sahiptir (32).

*Gap junction* proteinleri, lens içerisinde hücreler arası iletişim ve metabolik alışverişte rol oynamaktadır (22). Sodyum, potasyum, kalsiyum, klor, cAMP (*cyclic Adenosine MonoPhosphate*), cGMP (*cyclic Guanosine MonoPhosphate*), inositol trifosfat, glukoz ve aminoasitler gibi pek çok molekül taşınmaktadır (22). Lenste *gap junction* protein A1, A8 ve A3 olarak adlandırılan ve diğer adları sırasıyla konneksin 43, 50 ve 46 olan proteinler başlıca *gap junction* proteinleridir (22).

Diğer membran proteinleri; ATPaz gibi enzimler ve kalpaktin-1 ve N-kaderin gibi proteinlerdir. ATP,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz tarafından hidrolize edilir, hücre içi  $\text{Na}^+$  düzeyini düşük,  $\text{K}^+$  düzeyini ise yüksek tutar (33).

Lenste aktin,  $\alpha$ -aktinin, ankirin, miyozin, spektrin ve vimentin gibi pek çok hücre iskeleti proteini bulunmaktadır (22). Mikrotübüllerin özellikle lens fibrillerinin şekillerinin sağlanmasında ve bölünen epitel hücrelerinde kromozomların segregasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (34). Vimentin fosforilasyonundaki sorunun katarakt oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (35).

Lens içerisinde çok sayıda proteolitik enzim de bulunmaktadır (17). Yaş ile birlikte lens içerisinde protein degradasyonu artar. Bu durumun yaşa bağlı katarakt gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir.

Lensin ekstraselüler matriksi ise lens kapsülüdür. Kapsül, epitel bazal membranından oluşur.

#### **2.1.4. Lens Fizyolojisi**

Lens fizyolojik olarak oldukça aktiftir (17). Kapsül, epitel hücrelerinin plazma membranı ve lens fibrillerinde madde geçişine karşı engeller mevcuttur. Kapsül sadece düşük molekül ağırlıklı (<50 000 kDa) proteinlere karşı geçirgendir. Epitel düzeyinde ise oldukça gelişmiş bir *gap junction* sistemi vardır. Epitel ile lens fibrili arasında iletişim temel olarak endositoz ile sağlanır. Lens fibrilleri arasında ise fibriller arası hızlı iletişimi sağlayan yine çok yaygın bir *gap junction* ağı

bulunmaktadır. Lens fibrili plazma membran proteininin %50'si su kanalı olduğu düşünülen MIP26 (AqPO) dan oluşmaktadır. AqPO lensin yıkanarak atıklardan kurtulmasında rol oynar (17).

Lensin ozmotik ve iyonik dengesi oldukça komplikedir (22).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz ve  $\text{Ca}^{2+}$  ATPaz bu dengede oldukça önemli role sahiptir.  $\text{Na}^+$  vitreustan lens ve en sonunda aköze doğru pompalanır.  $\text{K}^+$  ise lens arka kapsülünden vitreus içerisine doğru ters yönde pasif olarak hareket eder (17). Makromoleküllerin geçişinde temel bariyerler lens kapsülü ve lens ön epitelidir (22).

### 2.1.5. Lens Metabolizması

Lens avasküler bir yapı olmasına rağmen kendine özgü bir metabolizması vardır (33). Lens içerisine doğru olan sıvı akımı, glukozu fibrillere taşıırken, dışa doğru olan sıvı akımı ise hücrelerarası iletişimi devam ettirilebilmesinde son derece önemlidir (36, 37). Bu iletişimin en önemli yapıtaşlarından birisi *gap junction* bağlantılarıdır. Bu bağlantıların düzgün çalışması lens içi ozmotik ve metabolik homeostazisin işlenmesi açısından son derece kritiktir (36, 38).

Lens için en önemli enerji kaynağı aköz hümör içerisindeki glukozdur. Glukozun hücre içerisine girişi plazma membranı üzerindeki insülin bağımlı glukoz taşıma sistemi ile olur (17). Glukoz *transporter* 1 ve 3 (GLUT1 ve GLUT3) ile gerçekleşmektedir (22).

Temel metabolik yolak glikolizdir. Lensteki glukozun %80'i anaerobik glikoliz ile metabolize edilirken %10'luk kısmı pentoz fosfat yolağına girer. Normal şartlar altında glikoliz ve pentoz fosfat yolağı kullanılır ancak ortamda fazla glukoz olması durumunda sorbitol yolağı da devreye girer. Normal koşullarda glukozun %5'inden azı sorbitol yolağına kullanılır. Sitrik asit siklusu üzerinden gerçekleşen aerobik glikoliz ise mitokondri içeren tek hücre oldukları için lens epitelinde kullanılır (17). Bu siklus glukozun sadece %3'ünü kullansa da oldukça etkin enerji üretmektedir (39).

Diyabet ve galaktozemide katarakt gelişme mekanizmasının benzer olduğu, her ikisinde de aldoz redüktazın aktive olarak glukozu; diyabette sorbitole,

galaktozemide ise galaktitole çevirdiği düşünülmektedir (40). Sorbitol, sorbitol dehidrogenaz ile metabolize edilirken galaktitol birikmeye devam eder ve ozmotik dengeyi bozar (22). Ancak ‘şeker’ kataraktının gelişiminde tek mekanizmanın bu olmadığı düşünülmektedir (22). Daha fazla kabul edilen görüş, MIP26’nın dahil olduğu başka mekanizmaların etkili olduğudur (17).

Lens epitel hücresi, lens fibriline dönüştüğünde yeni protein sentezi durur.

Lens içerisinde en önemli sistemlerden biri redoks sistemidir. Lens sürekli oksidatif stres altında bulunmaktadır. Oksidatif hasarı önlemeye yönelik pek çok enzim işlev görmektedir. Glutasyon redüktaz, lens glutasyonunu sürekli olarak indirgenmiş halde tutmaktan sorumlu olduğu için son derece kritik bir enzimidir (41). Özellikle glutasyon redoks sisteminin önemli bir parçasıdır (17, 41). Glutasyon konsantrasyonu, metabolik aktivitenin en yüksek olduğu lens epitelinde en fazladır (42). Pek çok katarakt tipinde epitel ve kortekste glutasyon miktarının azaldığı gösterilmiştir (43).

## 2.2. Lensin Yaşlanması

Yaş ile birlikte, lens içinde hücre iskeleti organizasyonu bozulmaya başlar. İyon kanallarında muhtemel disfonksiyon, hücre içi  $\text{Na}^+$  konsantrasyonunda artışa ve membran potansiyelinde azalmaya neden olmaktadır (17). Lens içerisinde görülen ve kataraktın erken bulgusu olarak kabul edilen su dolu yarıklar da muhtemelen MIP26 fonksiyonunda azalma sonucunda meydana gelmektedir (17).

Lenste yaşlanma her zaman katarakt gelişmesi anlamına gelmemektedir. Yaşlanan lenste oksidasyon daha az iken, kataraktlı bir lenste proteinlerdeki sistin ve metionin uçlarında aşırı oksidasyon gerçekleşir (17).

Alfa kristalinlerin çoğu ile  $\beta$  ve  $\gamma$  kristalinlerin bir kısmı suda çözünen kısımdan çözünmeyen kısma geçer. Lens içerisindeki kristalinlerin düzenlenmesindeki herhangi bir aksama ışığın geçmesini engellemektedir.

Lens proteinlerinin serbest radikaller ile etkileşimi florofor ve seroid/lipofuskin oluşumuna neden olur (17).

Aköz içerisinde glukoz/galaktoz oranının artması anaerobik glikoliz yollarının doygunluğa ulaşmasına neden olur. Hücre metabolizmasında bozulma, hücre içi ATP ve glutatyon miktarının azalması hücre hasarına neden olur. Komşu hücreler ile bağlantıların kopması hücreler arası su birikimine ve lens üzerinde vakuollerin oluşmasına neden olur (17). Progresif hücre ölümü, çözünemeyen proteinlerin ve kromoforların birikmesi lenste opasitenin büyümesine ve nükleus renginin kırmızı hatta siyaha dönmesine neden olur (17).

Lens üzerinde görmeyi etkileyen opasite olarak tanımlanan katarakt, lense yönelik herhangi bir iç veya dış hasar sonucunda gelişebilir. Hasarın sınırlı olması durumunda sadece sınırlı sayıda lens fibrilli etkilenip yeni oluşan lens fibrilleri saydam olarak birikmeye devam edebilir. Böyle bir durumda, kataraktlı bölge lens içerisinde lokalize olarak kalır.

Katarakt genel olarak yaşa bağlı, pediatrik ve diğer nedenlere sekonder gelişen katarakt olmak üzere üç gruba ayrılabilir (44).

Konjenital katarakt gelişiminden ve nedenlerinden izleyen bölümde bahsedilecektir.

Yaşa bağlı katarakt gelişiminde, lensin normal yaşlanma sürecinden farklı olarak pek çok faktör rol oynamaktadır. Lensin çözünür olmayan komponentlerinde artış, kristalin yapısında bozulma, hücreler arası etkileşimin bozulması, protein çapraz bağlanması ve çökmesinde artış, antioksidan güçte azalma, proteolitik aktivitede artış ve ultraviyole radyasyonu bu faktörlerden bazılarıdır.

Konjenital ve yaşa bağlı katarakt dışında, sistemik hastalıklara bağlı olarak gelişen katarakt (diyabet, tiroid hastalıkları, galaktozemi vb.) patolojik katarakt, göz hastalıklarına (üveit, glokom, miyopi vb.) sekonder olarak gelişen katarakt komplike katarakt, travmaya bağlı olarak gelişen katarakt travmatik katarakt, katarakt cerrahisinden sonra geride kalan lens epitel hücrelerinin proliferasyonu ile ortaya çıkan ve arka kapsülün opasifikasyonu şeklinde görülen katarakt ise sekonder katarakt olarak adlandırılmaktadır.

### 2.3. Konjenital Katarakt Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Sınıflandırması

Görmenin gerçekleşebilmesi için, gözün kornea, lens ve diğer optik ortamlarının saydam olması ve ideal olarak her iki gözde de oluşan benzer ve iyi kalitedeki görüntünün beyine ulaştırılabilmesi gereklidir. Bu nedenle, konjenital katarakt ayrı bir öneme sahiptir. Konjenital katarakt, önemli bir görme azlığı sebebidir. Katarakt, görme gelişiminin olduğu çocukluk döneminde ciddi bir görme deprivasyonu yaratabileceği için erken dönemde tanınması ve tedavisi oldukça önemlidir. Kataraktlı lensin ameliyat ile alınmasından sonra esas tedavi aslında görme rehabilitasyonudur.

Konjenital katarakt çocukluk çağı tedavi edilebilir körlük nedenlerinin %10'unu oluşturmaktadır (45-47). Görülme sıklığı 100 bin canlı doğumda 1-6 olarak bildirilmiştir (48). Dünya üzerinde yaklaşık 200 bin çocuğun katarakta bağlı olarak kör olduğu tahmin edilmektedir (9).

Konjenital kataraktların %50'si genetik nedene bağlı olarak gelişmektedir (44). Konjenital kataraktların %30'u herediter ve bunların önemli bir kısmı da sendromik olmayan otozomal dominant olanlardır (49). Wu ve ark. yaptıkları sistematik gözden geçirme ve meta-analizde konjenital kataraktların %62,2'sinin idiyopatik, %22,3'ünün herediter, %11,5'inin ise herediter olmayan nedenlere bağlı olarak görüldüğünü saptamışlardır (4).

İntrauterin enfeksiyonlar, hamilelik sırasında ilaç veya radyasyon maruziyeti, metabolik hastalıklar ve travma konjenital kataraktın herediter ve genetik olmayan nedenleri arasında bulunmaktadır. Konjenital aniridi, mikrokornea, mikroftalmi, persistan hiperplastik primer vitreus, Marfan sendromu, Marchesani sendromu, Hallermann-Streiff-François sendromu, Wolfram sendromu, Nance-Horan sendromu, galaktozemi, Wilson hastalığı, hipokalsemi, hipo/hiperglisemi, Lowe sendromu gibi metabolik hastalıklar, trizomi 18 ve 21 gibi kromozomal hastalıklar konjenital katarakta eşlik edebilir (7). Travma, intrauterin enfeksiyonlar, radyasyon, steroid ve linezolid gibi ilaçlar, prematurite ve pek çok başka faktör de konjenital katarakt gelişiminde etkili olabilir (7). Bunlar arasında *CYP27A1* (*Cytochrome p450 Family 27 Subfamily A Member 1*) mutasyonu ile ortaya çıkan serebrotendinöz

ksantomatozis, nörolojik tablo ortaya çıkmadan önce oral kenodeoksikolik asit ile tedavi edilebilmesi, *GALK1* (*Galactokinase 1*) geni resesif mutasyonu ile ortaya çıkan galaktokinaz eksikliği ise özel diyet ile kataraktın önlenilme hatta geri dönebilme olasılığı nedeniyle oldukça önemlidir (50).

Kalıtımsal konjenital katarakt otozomal dominant, otozomal resesif veya X'e bağlı olabilmektedir (51, 52). Lens hücre proliferasyonu, farklılaşması ve maturasyonu ile ilgili genlerdeki mutasyonlar konjenital katarakta neden olabilir. Kristalin, konneksin ve akuaporin 0'ı (MIP26) içeren lens membran proteinlerini, değişik büyüme veya transkripsiyon faktörlerini, intermediyer proteinleri, membran proteinlerini etkileyen mutasyonlar bunlardan bazılarıdır (53). Mutasyonların %10'undan azı ise lipid metabolizmasında yer alan proteinler gibi diğer proteinlerde olmaktadır (54).

Konjenital kataraktın genetik nedenlerinin saptanmasında aday gen yaklaşımı, mikrodizin ve yeni nesil DNA (Deoksiribonükleik Asit) dizileme teknolojileri ile önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Katarakt genlerine yönelik yeni nesil dizileme panelleri ile olguların %63-75'inde nedensel gen saptanabilmiştir (55-57). Sun ve ark. konjenital kataraktı olan 18 hastayı değerlendirdikleri çalışmalarında tüm ekzom dizileme ile bilinen 34 gende 1545 varyant tanımlamışlardır (58). Sanger dizileme ile 11 potansiyel varyant konfirme edilmiş; bunlardan dokuz tanesi patojenik, iki tanesi ise benign olarak değerlendirilmiştir (58).

Katarakt morfolojisi, bazı durumlarda kataraktın nedeni hakkında ipucu verebilir. Kısmen rezorbe olan kataraktlarda Lowe veya Hallerman-Streiff-François sendromu, kama şeklinde veya sektörel kataraktı olan çocuklarda ise Stickler veya Conradi sendromu düşünülebilir (59).

Bilateral kataraktlarda çocukların %50'sinde bir etiyoloji saptanabilmektedir (44). Unilateral kataraktlar ise idyopatik, oküler anomaliler ile birlikte [posterior lentikonus, persistan fetal damarlanma (PFD), ön segment disgenezisi vb.], travmatik ve nadiren intrauterin enfeksiyonlara bağlı olarak gelişebilir (60). Unilateral kataraktı olan hastaların çoğunda PFD mevcuttur. PFD'si olan gözler genellikle mikroftalmiktir. PFD, hemen her zaman tek taraflıdır. Zamanla lens spontan olarak



abzorbe olabilir veya tam tersine şişerek ön kamara açısını kapatabilir ve göz içi basıncının yükselmesine neden olabilir (59). Arka segment genellikle normal olsa da hiyaloid kalıntılarındaki fibröz dokunun kasılması traksiyonel retina dekolmanına da neden olabilir (59).

Kalıtımsal pediatrik kataraktlar genel olarak;

- a) İzole
- b) Metabolik hastalıklara bağlı (galaktozemi, Fabry sendromu, Wilson hastalığı, diyabet, serebrotendinöz ksantomatozis vb.)
- c) Renal hastalıklarla birlikte (Alport sendromu vb.),
- d) Kas-iskelet sistemi hastalıklarıyla birlikte (kondrodizplazi punktata, miyotonik distrofi vb.),
- e) Dermatolojik hastalıklara bağlı (Cockayne sendromu, inkontinentia pigmenti vb.)
- f) Kraniyofasiyal anomalilerle birlikte (Hallerman-Streiff sendromu, Rubinstein Taybi sendromu, Smith-Lemli Opitz sendromu vb)
- g) Kromozomal problemlerle birlikte (trizomi 13, 18, 21) görülebilir.

Ayrıca, daha önce de belirtildiği gibi pediatrik kataraktlar kalıtımsal olmayıp intrauterin enfeksiyonlara bağlı da oluşabilir (60).

Tek taraflı konjenital kataraktlarda geniş bir sistemik tarama gerekli değildir. Eşlik edebilecek oküler patolojileri de tanımlamak açısından ayrıntılı göz muayenesi son derece önemlidir. Bilateral kataraktlarda ise ayrıntılı göz muayenesinin yanı sıra metabolik hastalıklar, intrauterin enfeksiyonlar ve sendromlar açısından değerlendirme gereklidir.

Konjenital katarakt, etiyoloji, anatomik yerleşim ve lens opasitesinin şekli de dahil olmak üzere farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar içerisinde en sık kullanılanlardan biri morfolojik sınıflandırmadır (60):

#### A-Ön Kataraktlar

##### 1-Ön Polar Katarakt

Ön kapsülde merkezde yer alır. Lens vezikülünün yüzey ektoderminden ayrılmasındaki problem nedeniyle ortaya çıkar (60). Genellikle bilateral ve sporadiktir. Görmeyi genellikle çok fazla etkilemediği düşünüldüğü için takip edilebilir.

## 2-Ön Piramidal Katarakt

Ön kamaraya doğru uzantısı olan küçük koni şeklindedir. Genellikle bilateral ve sporadiktir. Görmeyi genellikle etkilemez.

## 3-Ön Subkapsüler Katarakt

Ön kapsülün altındadır. Genellikle idiyopatik olsa da Alport sendromu ve travma mutlaka düşünülmelidir (60).

## B-Merkezi Kataraktlar

### 1-Nükleer Katarakt

Bu katarakt tipinde opasite Y sütünleri arasındaki embriyonik veya fetal nükleusu tutmaktadır (60). Unilateral veya bilateral olabilir.

### 2-Sütüral Katarakt

Y sütünlerinde olan opasitedir. Ön veya arka yerleşimli olabilir. Bilateral ise genellikle otozomal dominant kalıtıma sahiptir (60).

### 3-Lamellar (Zonüler) Katarakt

Y sütünlerin hemen dışında yer alan opasitedir (60) (Şekil 2.8). Genellikle görme prognozu iyidir. Unilateral veya bilateral olabilir. Bilateral olanlar genellikle otozomal dominant kalıtlıdır. Neonatal hipoglisemi veya galaktozemi ile birlikte olabilir (60).



**Şekil 2. 8.** Lensin anatomik olarak belirli bir zonunda görülen katarakt:  
Lameller (Zonüler) Katarakt

#### 4-Noel Ağacı Kataraktı

Işık ile muayene sırasında Noel ağacı görünümü ortaya çıkmasına neden olan küçük yansıyan parlak noktalardan oluşmaktadır. Miyotonik distrofi, psödohipoparatiroidizm ve hipoparatiroidizm ile birlikte görülebilir (60).

#### 5-Serulean (Mavi Nokta) Katarakt

Lens üzerinde çok sayıda mavi nokta şeklinde opasite mevcuttur. Genellikle otozomal dominant olarak kalıtılır ve bilateralidir. Görmeyi etkilememe olasılığı yüksektir ve ameliyatsız takip edilebilir.

#### 6-Pulverulan Katarakt

Özellikle embriyonik nükleusu tutan ve progresif özelliği olan toz şeklinde opasitedir.

#### C-Arka Kataraktlar

##### 1-Posterior Lentikonus

Arka kapsülde incelme ve bu bölgeden lensin arkaya doğru fıtıklaşması söz konusudur. Zamanla opasite gelişir. Genellikle sporadik ve unilateraldir.

## 2-Persistan Hiperplastik Primer Vitreus-Persistan Fetal Damarlanma

Primer hiyaloid vasküler sistemin kaybolmaması ve fibrotik bir hal almasıdır. Lens arka kapsülüne dokunduğu yerde genellikle nazalde nokta şeklinde opasite (Mittendorf noktası) görülür. Genellikle sporadik ve hemen her zaman unilateraldir.

## 3-Arka Subkapsüler Katarakt

Arka kapsülün önündedir. Genellikle gelişimseldir. Down sendromu, steroid kullanımı veya travma ile ilişkili olabilir.

## 4-Yağ Damlası Kataraktı

Arka lens korteksinin merkezinde bir yağ damlası şeklindedir. Özellikle retinoskopi sırasında dikkati çeker. Galaktozemi ile ilişkili olarak tanımlanmıştır.

## 5-Arka polar katarakt:

Lensin arka polünün merkezinde yer alır (Şekil 2.9). Bu bölgede arka kapsül defektinin olma olasılığı çok yüksek olduğu için ameliyat sırasında dikkatli olmak gerekir. Boyutuna ve yerleşimine göre görmeyi etkileme olasılığı vardır.



**Şekil 2. 9.** Lens arka kapsülünün merkezinde yer alan arka polar katarakt.

## 6-Total Katarakt

Down sendromu, metabolik hastalıklar veya travma ile ilişkili olabilecek tüm lensi tutan opasitelerdir.

## 7-Membranöz Katarakt

Kataraktın en ileri halidir. Lens materyali tamamen absorbe olabilir. Travma ve intrauterin enfeksiyonlar ile de ilişkili olabilir.

Total ve nükleer kataraktlar en sık görülen konjenital katarakt tipleridir (61).

Lin ve ark. lens opasitesi ile ön segment özelliklerinin ilişkisine dayanan bir konjenital katarakt sınıflandırma sistemi geliştirmişlerdir (62). Tüm lensi etkileyen opasiteyi total katarakt, lensin ön ve arka kapsülünü etkilemeyen sadece iç kısmını etkileyen kataraktı *interior* (iç) katarakt, ön kapsülü etkilemişse ön, arka kapsülü etkilemiş ise arka katarakt olarak adlandırmışlardır (62).

### 2.3.1. Konjenital Katarakt Mutasyonları

#### a. Kristalin Gen Mutasyonları

Kristalin mutasyonları otozomal dominant kataraktların yaklaşık %50'sinden sorumludur (7). Kristalin genleri olan *CRYAA*, *CRYAB*, *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA1*, *CRYGC*, *CRYGD* ve *CRYGS*'de çok sayıda mutasyon saptanmıştır (50, 53). *CRYAA*  $\alpha$ A kristalinleri, *CRYAB* ise  $\alpha$ B kristalinleri kodlamaktadır. *CRYAA* mutasyonlarının genellikle nükleer katarakt, *CRYAB* mutasyonlarının ise katarakt ve kardiyak miyopatiler ile ilişkisi olduğu bilinmektedir (7). Tüm  $\beta$ - ve  $\gamma$ -kristalin genleri arasında mutasyonlar en sık *CRYBB2* ve *CRYGD* genlerinde gösterilmiştir (7). Konjenital kataraktların %30'u  $\gamma$ -kristalin genlerinin mutasyonu ile olmaktadır (45).

#### b. Lens Membran Proteini Geni Mutasyonları

Kristalinlerden sonra konjenital kataraktın en önemli genetik sebebi konneksin mutasyonlarıdır (7). Konneksin 46 mutasyonunda fonksiyon kaybı ile ve

konneksin 50 mutasyonunda dominant negatif etki ile oluşan pulverulan katarakt tanımlanmıştır (2).

*Gap junction* proteinlerini kodlayan *GJA3* (*Gap Junction protein Alpha 3*) ve *GJA8* (*Gap Junction protein Alpha 8*) mutasyonları özellikle otozomal dominant ve zonüler pulverulan kataraktta gösterilmiştir (36, 50, 63-67).

Lens major intrinsik protein, hücre-hücre adezyonunda önemli rol oynamaktadır (7). Mutasyonlarında genellikle otozomal dominant katarakt görülmektedir (7). Lens intrinsik membran protein 2 (LIM2 veya MIP20) ise bir transmembran proteindir. Bazı *LIM2* mutasyonları otozomal resesif kataraktlar ile ilişkili olarak gösterilmiştir (68, 69).

Lens hücre migrasyonunda rol oynayan (*EPHA2*, *EPH*, *ephrin receptor A2*) mutasyonları ise dominant ve resesif kalıtmı kataraktlarda gösterilmiştir (7, 70-73).

### **c. Hücre İskeleti Geni Mutasyonları**

Lens hücre iskeleti proteinleri hücre şekli ve boyutunun korunmasında oldukça önemlidir. Lens hücreleri mikrofilaman, mikrotübül ve intermediyer filamanlar olmak üzere üç tip filaman içermektedir (7).

*Beaded* filaman yapısal proteinleri (*Beaded filament structural protein*, BFSP) lense özgü intermediyer filamanları oluşturur ve *BFSP1* (filensin) ve *BFSP2* (CP49) tarafından kodlanır (2, 7, 74). Sekonder lens fibrili farklılaşmasında rol oynar (2). Bu filaman proteinlerin lens şeklinde ve saydamlığında rol aldığı düşünülmektedir (75, 76). Mutasyonları nedeniyle katarakt izlenen dominant ve resesif olgular bildirilmiştir (7, 50).

Vimentin periferik lens hücrelerinde yüksek oranda eksprese olan ve mutasyonlarının kalıtsal katarakt ile ilişkili olduğu gösterilmiş bir başka intermediyer proteindir (56, 77).

*FYCO1* (FYVE and coiled-coil domain autophagy adaptor 1) otofajik veziküllerin mikrotübül temelli taşınmasında rol oynayan bir *scaffold* proteini kodlar (7). Bu gendeki mutasyonlar otozomal resesif kataraktlar ile ilişkilendirilmiştir (78).

Ayrıca, hücre iskeleti *scaffold* proteini olan periaksini kodlayan *PRX* (periaksin) genindeki mutasyonun da konjenital katarakt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (79).

*NHS* (*NHS actin remodeling regulator*) geni aktin yeniden düzenlenmesi ve hücre şeklinin regülasyonunda rol oynayan bir protein kodlamaktadır ve mutasyonunun erkeklerde X'e bağlı katarakta, kadınlarda ise sütünal opasitelere neden olduğu bilinmektedir (73, 80).

#### **d. Diğer Mutasyonlar**

*PAX6* (*paired box 6*) geni göz gelişiminde oldukça önemli bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır(81). Mutasyonlarında aniridi ile birlikte katarakt da görülmektedir.

*FOXE3* (*forkhead box E3*), *PITX3* (*paired like homeodomain 3*), *HSF4* (*heat shock transcription factor 4*) gibi gelişimsel regülatör genlerdeki mutasyonların da izole veya oküler/sistemik hastalıklarla birlikte konjenital katarakta neden oldukları bildirilmiştir (2, 50).

Yıllar içerisinde sekans teknolojilerinin ilerlemesi, konjenital katarakt ile ilişkilendirilen gen sayısında hızlı bir artış olmasını sağlamıştır.

#### **2.4. Konjenital Katarakt Kliniği ve Yaklaşım**

Konjenital kataraktı olan gözlerde, ortak anatomi ve birbiri ile çok yakın ve karşılıklı etkileşimin olduğu gelişim basamakları nedeniyle diğer ön segment anomalileri de sıklıkla gözlenebilmektedir (62). Lin ve ark. çalışmalarında ön yerleşimli kataraktı olan hastaların yaklaşık olarak yarısında persistan pupiller membran olduğunu, total ve ön yerleşimli kataraktı olan gözlerde ön kamara derinliğinin daha az, iç ve arka yerleşimli kataraktlarda daha fazla olduğunu göstermişlerdir (62). Konjenital katarakt, sadece lensin saydamlığını etkilemekle kalmayıp, lens büyümesini ve diğer optik özelliklerini de olumsuz etkileyerek görme kaybına neden olmaktadır (7).

Konjenital kataraktın tedavisi görme aksını etkileme miktarı ve potansiyeline göre cerrahidir. Ancak, optik aksı kapatmayan, sınırlı ve yoğun olmayan opasiteler

cerrahi tedavi olmaksızın göz tembelliğine (ambliyopi) yönelik tedavi ve refraksiyon takibi yapılarak yönetilebilmektedir. Kataraktın ilerleyici olup olmaması klinik olarak önemlidir. Posterior lentikonus, PFD, lamellar, ön ve arka subkapsüler katarakt genellikle ilerleyici özelliktedir (60). Ön polar ve nükleer kataraktlar bazen ilerleme gösterebilir.

Görme eksenini kapatan bir opasitenin tedavisi kesinlikle cerrahi iken, optik eksenin açık kaldığı ve korunduğu durumlarda hastalar yakın olarak takip edilebilir. Teorik olarak lensteki opasite ne kadar küçük ve ne kadar ön eksene yakın ise görme prognozu o kadar iyidir. Ön polar ve lamellar katarakt tiplerinde prognoz daha iyi iken, nükleer ve arka polar kataraktlarda prognoz daha kötü olarak izlenmektedir. Opasitenin boyutundan çok yoğunluğu önemlidir. Konjenital katarakt unilateral veya bilateral olabilir. Bilateral olanlar unilaterallerden daha sık görülmektedir (59). Unilateral kataraktlar, diğer gözün iyi görmesi nedeniyle geç yaşlara kadar bulgu vermeyebilmektedir. Ancak bilateral kataraktlar, her iki gözde görmenin düşük olması genellikle erken dönemde nistagmusa neden olduğu için daha erken tanınabilmektedir.

Görme gelişiminin en kritik dönemi hayatın ilk haftaları olduğu için, görmeyi engellediği düşünülen konjenital kataraktların mümkün olan en erken dönemde tedavi edilmeleri gerekmektedir. Yenidoğan döneminde göz küresinin çok küçük olması, dokuların çok elastik olması ve erken cerrahinin gözde yaratabileceği glokom gibi riskler nedeniyle cerrahinin zamanlaması oldukça kritiktir.

Çoğu konjenital katarakt olgusu çeşitli nedenlere bağlı olarak oldukça geç tanı almakta ve tanı aldığı anda görme gelişiminin kritik basamakları çoktan geçilmiş olduğu için ameliyat sonrasında görme rehabilitasyonu başarısı ciddi ölçüde düşmektedir.

Kırmızı yansıma testi, konjenital katarakt dahil olmak üzere pupil açıklığından normal dışı yansımaya neden olabilecek pek çok oküler patolojinin tanınmasını sağlayabilen bir tarama testidir. Bu test eğitimli pratisyen hekimler tarafından da uygulanabildiği, kısa sürede yapılabildiği ve son derece önemli bilgiler verdiği için konjenital katarakt olgularının tespitinde önemlidir.



Kataraktı olan bir bebekte, lens ve ön segment gelişimi birbiri ile yakın ilişkide olduğu için özellikle ön segment anomalileri başta olmak üzere diğer oküler anomalilerin eşlik edip etmediğinin tanımlanması hem yaklaşım hem de prognoz açısından son derece önemlidir. Örnek olarak, nükleer kataraktlar mikroftalmi ile birlikte olabilirken, ön polar kataraktlar genellikle astigmatizmaya neden olurlar (59). Eşlik eden oküler ve sistemik patolojiler görme prognozu açısından oldukça belirleyici olmaktadır.

Konjenital katarakt cerrahisi sonrasında görme prognozunu etkileyen pek çok faktör vardır (59):

- 1-Kataraktın başlangıç yaşı
- 2-Kataraktın unilateral/bilateral olması
- 3-Eşlik eden oküler ve/veya sistemik komorbidite
- 4-Katarakt ameliyatı yapılan yaş
- 5-Ameliyata bağlı komplikasyonlar
- 6-Ameliyat sonrasında optik rehabilitasyon ve kapama tedavisine uyum

Çocuğun kataraktının çok erken yaşta gelişmesi, geç ameliyat, ameliyat öncesinde nistagmus varlığı, unilateral katarakt, eşlik eden oküler ve sistemik hastalıklar ve ameliyat sonrasındaki rehabilitasyon programına uyumsuzluk görme prognozunu ciddi ölçüde olumsuz olarak etkilemektedir (59).

Konjenital kataraktın cerrahi tedavisi lensektomi ve ön vitrektomidir. Cerrahi sonrasında göz içi mercek yerleştirilmesi genellikle iki yaş sonrasına bırakılsa da daha erken yerleştirmeyi tercih edenler de vardır. Göz içi mercek yerleştirilmesinde temel zorluklar, mercek numarasının ölçülmesinde teknik zorluklar, büyüyen bir gözde değişen diyoptrik güce uyum sağlayabilecek numarada mercek seçiminin gerekmesi, göz içi mercek kaynaklı komplikasyonlar ve ek cerrahi olasılığını içermektedir. Bu nedenle erken cerrahilerde mercek yerleştirilmeyip hastanın optik

rehabilitasyonu özel kontakt lensler veya gözlükler ile son derece başarılı olarak sağlanabilmektedir (82).

Konjenital katarakt cerrahisi, erişkin katarakt cerrahisinden oldukça farklıdır. Ameliyat sonrasında arka kapsül opasifikasyonu, lens epitel hücrelerinin yüksek çoğalma kapasitesi nedeniyle erişkinlere göre çok daha sıktır ve bu nedenle arka kapsülektomi ve ön vitrektomi erişkin katarakt cerrahisinden farklı olarak rutin uygulanmaktadır. Arka kapsülün bırakıldığı durumlarda opasifikasyon sıklığı %40'ı bulmaktadır (83). Ameliyat sonrası inflamatuvar cevap, bebek ve çocuklarda erişkinlere göre çok daha fazla olmaktadır. Bu nedenle ameliyat sonrası ilaç kullanımı ve yakın takip çok büyük önem taşımaktadır.

## **2.5. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS)**

Günümüzde sekans verilerinin validasyonunda ve mutasyonun tanımlanmasında altın standart yöntem olan Sanger dizileme, ilk kez 1970'lerde İngiliz kimyacı Frederick Sanger tarafından geliştirilmiştir (84). Sanger bu buluşuyla Nobel ödülü almıştır. Sanger dizileme, nükleotid spesifik zincir sonlandırıcı inhibitörlerin DNA'nın spesifik sekansını tanımlaması esasına dayanmaktadır (85). Birinci jenerasyon dizileme tekniğidir (86). Bu teknolojinin en önemli kısıtlılıkları yüksek maliyeti, uzun zaman alması ve düşük çıktıya sahip olmasıdır (85). Bu nedenle geniş ölçekli dizilemeler için uygun bir teknoloji değildir (85).

Tüm genomun, önceki dizileme tekniklerine göre çok daha kısa sürede ve daha düşük maliyet ile incelenmesine olanak veren yeni nesil dizileme teknolojisi ise 2000'li yılların başlarında geliştirilmiştir (85). Maliyet ciddi anlamda azalmıştır. Tüm genom dizileme tekniğinde (Whole Genome Sequencing, WGS), genomun tamamı incelenirken, tüm ekzom dizileme tekniği (Whole Exome Sequencing, WES) ile insan genomundaki protein kodlayan tüm bölgeler (ekzom) incelenebilmektedir (85).

Bu teknikler beraberinde bazı sorunları da getirmiştir. Elde edilen veri miktarı önemli oranda artmış ancak aynı şekilde hata hızı da artmıştır. Okuma uzunluğu arttırılmaya çalışıldığında maliyet yükselmekte ve çıktı azalmaktadır (87). Ekzom

dizilemedeki sorunlardan biri de dizilemenin genin veya genomun tüm ekzonlarını kapsayamamasıdır. Hem mevcut teknolojiler ekzomun %100'ünü kapsamamaktadır hem de yönteme özgü nedenlerle okuma eksiklikleri olabilmektedir (87, 88). Gendeki spesifik ekzonların delesyonu da atlanabilmektedir (86). Bu nedenle sonuçların dikkatli bir şekilde yorumlanması çok önemlidir (87). Yeni nesil dizileme teknolojisi, yüksek homoloji gösteren bölgeler ve GC-zengin bölgelerde teknik kısıtlılığa sahiptir (88). Bulunan varyantın patojenik olup olmadığının saptanması oldukça ayrıntılı bir biyoinformatik çalışma gerektirmektedir.

Bir başka yöntem ise ekzomda hastalıkla ilgili olma olasılığı en yüksek olan bölgenin hedeflenmesidir: *Targeted exome sequencing* (86). Yeni nesil dizileme, bir hastalık için muhtemel genlerin analiz edileceği hedeflenmiş paneller şeklinde de dizayn edilebilmektedir. Ancak bu yöntemdeki en büyük sorun panellerin çok hızlı güncellenmesi gerekliliği ve her panelin güncelliğini çok hızlı bir şekilde kaybetme riskidir. DNA dizi analizi ayrıca distonilerde, hareket bozukluklarında, nadir anormal metabolik fenotiplerde, müsküler distrofilerde, doğuştan metabolik bozukluklarda, şizofrenide, makula dejenerasyonunda, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda da moleküler tanı amaçlı olarak kullanılmaktadır (86).

Ekzomun, hastalıkla ilişkili mutasyonların yaklaşık %85'ini barındırdığı tahmin edilmektedir (85, 89). Bunun nedeni monogenik hastalıkların çoğuna ekzonik mutasyonların neden olmasıdır (90, 91). Tüm bunlar tüm ekzom dizilemenin özellikle Mendelian hastalıklardaki önemini açıkça göstermektedir.

Yeni nesil dizileme teknikleri temel olarak tek nükleotit varyantları (*Single Nucleotide Variants*, SNVs) ve küçük InDel'lerin düzgün bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır ancak küçük kopya sayısı değişikliklerini tanımlayamaz (85, 86). Özellikle genetik olarak heterojen klinik durumlarda yeni nesil dizileme, oldukça fazla veri sağlaması ve tanı koyma sıklığını arttırması nedeniyle günümüzde önemli bir yere sahiptir. Ancak, ciddi bir çıktı yükü olan bu teknolojiye en son aşamada elde edilen verinin Sanger yöntemi ile konfirmasyonu gerekmektedir.

Üçüncü jenerasyon dizileme teknolojileri, tek molekül sekanslamasına yönelik olarak geliştiriliyor olsa da tüm ekzoma uygulanamaması ve oldukça pahalı

olması nedeniyle yaygın bir kullanıma henüz kavuşamamıştır (85). Genomik verinin klinik tercümesinin geliştirilmesi, teknolojilerin daha hızlı ve ucuz hale getirilmesi yeni nesil dizileme tekniklerinin gelecekte klinik pratikte daha yaygın ve güvenle kullanılmasını sağlayacaktır.

Yeni nesil dizileme, farmakogenomik alanında da kullanılmaya başlanmış ve hangi hasta için hangi spesifik ilacın etkili veya etkisiz olabileceği konusunda bazı hastalıklarda önemli bilgiler sağlar hale gelmiştir (85). Bazı genler ilaç metabolizmasında veya fonksiyonunda rol alan protein ve/veya enzimleri kodlamaktadır. Bu nedenle farmakogenomik, hangi ilaç grubunun hangi genotipte daha faydalı olacağı veya tam tersine hangi genotipte daha faydasız olacağını belirlemede oldukça önemlidir. Bu şekilde özellikli bir genotipe yönelik ilaç geliştirilebileceği gibi bazı ilaçların zaten etkisiz olacağı genotipe sahip insanlarda gereksiz yere kullanımının önüne de geçilebilecektir.

Ekzom sekanslamanın en önemli avantajları, hastalıkla ilişkisi bilinen ve henüz bilinmeyen genlerin aynı anda görüntülenmesine ve çok sayıda bireyin ekzomunun aynı anda incelenmesine olanak vermesidir (88). Tüm yeni nesil dizileme teknolojilerinde, nükleik asit kaynağı temel olarak sekans kütüphanesine dönüştürülmektedir. Uzun DNA zincirleri öncelikle küçük parçalara ayrılır ve sonrasında platforma özgü adaptörler ile aynı ortama alınır. Sonraki basamakta istenilen boyuttaki moleküller toplanırken serbest adaptörler temizlenir. En son basamakta da her iki ucunda adaptör olan molekülleri yeterli sayıda çoğaltmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) kullanılır. Adaptörler, kütüphane moleküllerini sert bir zeminde immobilize etmek için özel parçalar içerirler. Adaptörlerin biri veya ikisi birden dizilemeyi başlatan bölgeler içerir. Çalışmada kullanılan IonTorrent® teknolojisinde, yeni nesil dizileme kütüphaneleri damlalar üzerinde oluşturulur. Her fragman özel olarak çoğaltılır. DNA denature edilir ve herbiri bir DNA fragmanı içeren damlalar fiberoptik slayt üzerindeki küçük boşluklara yayılır (92). Bu teknoloji, eski teknolojiye göre pirofosfat yerine, nükleotid birleşmesi sırasında ortaya çıkan  $H^+$  iyonlarını saptar.

Auton ve ark. yaptıkları çalışmada her bir bireysel genomda popülasyon sıklığı %0,5'in altında olan 40 bin-200 bin arasında varyant olduğunu bildirmişlerdir

(93). Her genomda genetik hastalıklar ile ilişkili 24-30 varyant bulunmaktadır (93). Bu nedenle, tüm ekzom dizileme sonucunda ortaya çıkan verilerin biyoinformatik yöntemlerle değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu aşamada, "Genome Data Viewer", "Ensembl", "1000 Genomes Browser", "Variation Viewer", "ClinVar" gibi genel veya *in-house* özel veri tabanlarından faydalanılmaktadır. Ayrıca, protein fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için de SIFT, POLYPHEN2 vb. veri tabanlarının da detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.

Mutasyonlar dört ayrı seviyede patojenik olarak sınıflandırılmaktadır (86, 94):

1- Çok kuvvetli patojenik: Bu gruptaki mutasyonlar arasında *null*, *nonsense*, *frameshift* ve *splice site* mutasyonları bulunmaktadır.

2- Kuvvetli patojenik: Aynı mutasyonun benzer hastalığı olan kişilerde de bulunduğu durumdur.

3- Orta derecede kuvvetli patojenik: Proteinlerin fonksiyonel bölgelerinde olup genel popülasyonda rastlanılmayan mutasyonlardır.

4- Muhtemel kuvvetli patojenik: Aile bireylerinde mutasyon ve hastalığın birlikte yoğunlaşması durumudur.

Benign mutasyonlar ise %5'ten sık rastlanılan veya hastalıktan daha sık görülen mutasyonlardır (86, 94).

DNA mikrodizin, *Nanostring*, qPCR ve optik haritalama gibi genomik stratejiler yeni nesil dizilemeyi tamamlayıcı veya bu teknolojiye alternatif olarak kullanılabilir (87).

Yeni nesil dizilemeye alternatif genomik testlerden DNA mikrodizin analizi, hedef DNA'nın florofor ile işaretlenmesi, hibridizasyonu ve verdiği renk kodu esasına dayanmaktadır. Dizin analizleri çeşitli hastalıklara yatkınlığın araştırılmasında, genom boyu assosiasyon çalışmalarında (*Genome-wide association study*, GWAS), kopya sayısı değişikliklerinin belirlenmesinde ve ekspresyon

çalışmalarında yeni nesil dizilemeye göre daha düşük bir maliyetle kullanılabilir (87).

Diğer alternatif yöntem olan *NanoString*, kopya sayısı değişiklikleri ve tek nükleotid polimorfizmi analizlerinde oldukça yüksek çözünürlük ile çalışabilmektedir ve enzimden bağımsız hibridizasyon metodunu içermektedir (87).

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, özel olarak dizayn edilmiş prob ve primerleri kullanarak oldukça hızlı bir şekilde genotipleme, ekspresyon analizi ve gen tanımlama yapabilmektedir (87).

Optik haritalama, floresan işaretler ile özel sekansları belirlemektedir. Her probun birbirine veya bir referansa göre sıralanması izlenmektedir (87). Yeni nesil dizilemeye göre çözünürlüğü düşüktür ancak özellikle genom haritalarının oluşturulmasında kullanılmaktadır (87).

Yeni nesil dizilemede değişik yaklaşımlar kullanılabilir. *Short-read* dizileme yöntemleri temel olarak iki tanedir: bağlanarak sekanslama veya sentez ile sekanslama. Çalışmamızda IonTorrent® teknolojisi kullanılmıştır. Bu sistem sekanslama öncesinde uygun bir kütüphane hazırlığı gerektirmektedir. Hazırlık aşamasında DNA platformu özel kütüphane parçalarına ayrılır ve sonrasında spesifik adaptörlerle bağlanır. Sekans şablonları emülsiyon PCR ile bir damla veya küre üzerinde oluşturulur. Bir su-yağ emülsiyonu meydana getirilir. Bu emülsiyon her biri bir küre, bir kütüphane molekülü ve bir de amplifikasyon için gerekli tüm ajanları içeren küçük veziküller oluşturulmasını sağlar (95). Sekans adaptörlerine komplementer biri küreye bağlı biri ise solüsyonun içinde bulunan iki adet primer mevcuttur (95). Sekans kütüphane molekülleri düzgün bir şekilde sfer üzerine yerleşir ve emülsiyon PCR ile çoğaltılır (95). Sonrasında ise boş küreler temizlenerek uygun küreler sekans çipine yerleştirilir (95). Her biri bir tane amplifiye DNA fragmanı içeren küreler fiberoptik slayt üzerindeki çukurlara dağıtılır (92).

Yeni nesil dizileme, 2005 yılında pirosekanslama ile başlamış sonrasında Illumina® ve SOLID® teknolojisi geliştirilmiş en son 2010'da Ion Torrent® platformu piyasaya sürülmüştür (92). IonTorrent® teknolojisi, uzayan zincire bir

tane dNTP (*Deoxynucleoside triphosphate*) katılmasından alınan tek bir sinyale dayanmaktadır (87). Sekans sırasında katılan bazlar floresan sinyaline değil  $H^+$  iyonu salınımına göre algılanır. Her bir dNTP katılmasında bir  $H^+$  iyonu salınmaktadır. dNTP katılması önceden belirlenen bir akım sırasıyla olur. Bu teknolojiye optik algılama yoktur ve sinyal oluşması için enzimatik reaksiyon gerekmemektedir (87). Açığa çıkan  $H^+$  iyonu salınımının ortamda yarattığı pH değişimi algılanır ve nükleotid sayısı ile korele edilir (87). Her bir  $H^+$  salınımı pH'da 0,02 ünitelik bir değişime neden olmaktadır. Ortam pH'sındaki değişiklik entegre komplementer metal-oksit yarı iletken (*Integrated complementary metal-oxide semiconductor*, CMOS) ve iyon duyarlı alan etkili transistör (*Ion-sensitive field-effect transistor*) tarafından duyarlı bir şekilde algılanır (87). İşlem sırasında dNTP'ye rağmen pH değişimi olmuyorsa örnekte o nükleotid yok demektir eğer pH değişiyorsa baz örnekte var anlamına gelmektedir. Katılmayan bazlar ortamdaki yığılır ve sıra diğer baza gelir. Ancak bu durum, homopolimer uzunluklarını ölçmede sınırlı bir güvenilirlik sağlar (87). Çünkü homopolimer uzunluğu arttıkça pH değişimindeki artış hızı yavaşlar ve homopolimer bölgesinin tam anlamıyla tanımlanması zorlaşır. IonTorrent® teknolojisinin okuma uzunluğu 200-400 bp'ye, çıktı miktarı 10Gb'ye, her turda okuma sayısı 4 milyona ve çıktı miktarı 1,5-2 Gb'ye yakın olabilmektedir (87). Hata riski %1 olarak bildirilmiş ve özellikle indel hataları şeklindedir (87). Ayrıca kısa okuma uzunluğuna sahip tüm teknolojilerde olduğu gibi uzun repetitif bölgeleri, kopya sayısı değişikliklerini ve yapısal varyasyonları kaçırma riski vardır (87).

Son zamanlarda geliştirilen ve geliştirilmekte olan yeni nesil dizileme teknolojileri ile doğrudan RNA veya proteinin sekanslanması ve çok daha hassas ve bireysel tıp uygulamasına imkan verebilecek yöntemler sunulmaktadır (87).

Tüm ekzom dizilemede analiz, verilerin yorumlanması ve Sanger ile validasyon oldukça zaman alabilen bir süreçtir ve bu durum özellikle prenatal tanı gerektiren durumlarda zorluk yaratabilmektedir (96, 97).

İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasından sonra referans bir insan genomunun olması dizileme teknolojilerinin hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamıştır. Çeşitli firmalar tarafından ekzom kapsama kitleri geliştirilip kullanıma sunulmuştur.

Sanger sekanslama dizi analizinde altın standart yöntem olsa da zaman alması ve maliyeti önemli bir kısıtlayıcı özelliğidir. İkinci jenerasyon ekzom sekanslama yöntemleri tüm ekzomu inceleme veya hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen bölgeyi öncelikli olarak hedefleyerek analiz etme şeklinde olabilir. Ancak her iki durumda da tüm ekzomun kapsanamaması ve hastalık ile ilgili olma olasılığı olan tüm genlerin henüz açığa çıkarılmamış olması önemli bir engeldir. Tüm ekzom sekanslama özellikle tek nükleotit varyantları için kullanılmaktadır (86). İndel varyantları ve küçük kopya sayısı değişikliklerini atlayabilir (86). Tüm bu kısıtlılıklara rağmen spesifik bir hastalığın tanısının konfirme edilmesi, bir hastalığın moleküler etiolojisinin aydınlatılması veya gen fonksiyonlarının anlaşılması açısından tüm ekzom sekanslamanın klinik kullanımdaki önemi büyüktür.

Sonuç olarak, yeni nesil dizileme çalışmaları sonucunda ortaya çıkan verinin klinik anlam ve önemini belirlemek için ıslak laboratuvar sonrasında ayrıntılı ve uzun bir kuru laboratuvar çalışması gerekmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda ameliyatı yapılmış bilateral konjenital/gelişimsel kataraktı olan hastalar arasından, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Çocuk Metabolizma Bilim Dalı tarafından metabolik hastalıklar açısından incelenen, Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı tarafından ise genetik dismorfik sendromlar açısından değerlendirilen ve sonuç olarak bilinen bir metabolik hastalık veya dismorfik sendrom ile ilişkilendirilememiş dört hasta dahil edildi.

Bu tez çalışmasına, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını almak için GO 16/293 kayıt numarası ile başvuru yapıldı. Başvuru 31.05.2016 tarihli toplantıda GO 16/293-28 karar numarası ile onay aldı.

Etik kurul onayı alınması sonrasında tez çalışması için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne 06.12.2016 tarihinde THD-2017-11983 proje kodu ile "Hızlı Destek Projesi" olarak başvuru yapıldı. Proje, 14.02.2017 tarihinde onay aldı.

#### 3.1. Oftalmolojik Değerlendirme:

Konjenital katarakt ön tanısı konulan hastanın görme değerlendirmesi, yaşına göre ışık ve/veya obje takibi varlığı veya LEA testi ile yapıldı. El biyomikroskopisi ile ön segment anatomisi değerlendirilerek, kataraktın morfolojik tipi ve eşlik eden diğer oküler anomaliler ayrıca nistagmus varlığı kaydedildi. Pupil dilatasyonu öncesinde retinoskopi yapılarak lens üzerindeki opasitenin görme eksenini kapatıp kapatmadığı değerlendirildi. Tüm hastalarda dilatasyon sonrasında indirekt oftalmoskopi ile fundus muayenesi yapıldı. Opasitenin fundus muayenesini engellediği durumlarda ise oküler ultrasonografi ile glob içi değerlendirmesi yapılarak, konjenital katarakt dışında lökokoriye eşlik edebilecek diğer patolojiler ve PFD varlığı ekarte edildi. Tüm hastalardan intrauterin enfeksiyonlara yönelik olarak toksoplazma, rubella, sitomegalovirüs ve herpes IgM ve IgG serolojileri için kan alındı.

Oftalmolojik değerlendirme sonrasında bilateral konjenital/gelişimsel katarakt tanısı konulan hastalar Çocuk Genetik Hastalıkları ve Çocuk Metabolizma bilim dallarına yönlendirildi.

Tüm hastalara cerrahi uygulandı. Ameliyat sonrasında topikal antibiyotik ve steroid, göz içi mercek konulmayan hastalara ek olarak topikal sikloplejik damla verildi. Ameliyat sonrası erken dönemde yapılan retinoskopi sonucuna göre görme rehabilitasyonu için hastalara gözlük ve/veya kontakt lens verildi.

### **3.1.1. Genetik Değerlendirme:**

Hastalar dismorfik sendromlar açısından ayrıntılı öykü, fizik muayene ve soyağacı çizimi ile değerlendirildi. Kataraktın bir bulgu olarak eşlik ettiği kromozom hastalıkları, genetik sendromlar ve metabolik hastalıklar açısından özgül tanımlar almayan, bu tür sendromik katarakt tiplerinden birine uymayan, bunun yerine kataraktın izole olduğu düşünülen, tercihan soyağacında belirli bir Mendel kalıtım kalıbının izlenebildiği hastalar çalışmaya dahil edildi.

### **3.1.2. Metabolik Değerlendirme:**

Hastalar ayrıntılı öykü ve fizik muayene ile birlikte idrar ve kan aminoasitleri ve idrarda redükten madde analizleri yapılarak, öncelikli olarak galaktozemi başta olmak üzere olası diğer metabolik hastalıklar açısından değerlendirildi. Belirli bir metabolik hastalık tanısı almayan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Ebeveynlerden aydınlatılmış onam alınması sonrasında hastalardan kan alınarak DNA izolasyonu ve yeni nesil dizileme için genetik laboratuvarına gönderildi. Analiz süresince anne-baba ve ulaşılabilen diğer etkilenmiş bireylerden de aydınlatılmış onam ve DNA analizi için kan alındı.

## **3.2. Laboratuvar Yöntemleri**

### **3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu amonyum asetat tuzuyla çöktürme yöntemiyle veya ticari olarak elde edilen kitlerle yapıldı. Tuzla çöktürme yönteminde 10 cc'lik EDTA'lı

tüplere alınan periferik kan Falcon® tüpüne boşaltıldı. Otoklavlanmış soğuk distile su ile 50 ml'ye tamamlandı ve elde kuvvetlice çalkalandı. Yirmi dakika boyunca 1750 rpm santrifüjden sonra süpernatant döküldü ve otoklavlanmış soğuk distile suyla 45 ml'ye tamamlandı. Dipteki pelet hafifçe çalkalanarak çözdürüldü ve 1900 rpm 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek tüpe 3 ml NLB solüsyonu eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak kuvvetlice çalkalandı, kapak tekrar açılarak önceden dondurucudan çıkarılarak eritilmiş 150 µl Proteinaz-K ve 200 µl %10'luk SDS pipetlendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra tüp 16 saat süreyle 37°C etüvde bekletildi. Sürenin sonunda tüpe 3 ml amonyum asetat eklenerek kuvvetlice çalkalandı. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. İçinde DNA bulunan süpernatant pastör pipetiyle dipteki pelete dokunmadan ikinci bir Falcon® tüpüne alınarak üzerine aynı miktarda alkol eklendi. Tüp elde çalkalandıktan sonra, alkol eklenmesiyle gözle görünür hale gelen DNA yumağı pipet ucu yardımıyla toplanarak bir ependorfa konan TE tampon içine yerleştirildi. DNA çözünmesi için bir gece daha etüvde bekletildi. Ertesi sabah DNA kullanıldı veya saklama kutuları içinde 20°C'deki derin donduruculara kaldırıldı.

### 3.2.2. Tüm Ekzom Dizilemesi

Verilerin üretilmesinde laboratuvarımızda yer alan Ubuntu 10.04 işletim sistemi yüklü, 128 GB RAM ve 27 TB veri depolama kapasitesine sahip, Dual 8-core 2.9 GHz işlemcili Proton™ Torrent Server kullanıldı. Bunun yanı sıra Windows işletim sistemine gereksinim duyan üçüncü parti biyoinformatik yazılımların kullanımı için laboratuvarımızda yer alan Windows Server 2012 yüklü, 32 GB RAM ve 1.25 TB veri depolama kapasitesine sahip, 2.33 GHz Intel Xeon işlemcili IBM x3650 sunucudan yararlanıldı. İstatistiksel değerlendirmede Ion Reporter™, Torrent Variant Caller, IGV (*Integrative Genomics Viewer, Broad Institute*), R, SPSS programları kullanıldı.

Tüm ekzom dizilemesi yapılacak bireylerin DNA örneklerinin miktar ve saflık tayini için NanoDrop cihazı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Örnekler 100 ng/ul olacak şekilde dilüe edildi. Bu ölçüme ek olarak, Qubit cihazı kullanılarak florometrik miktar tayini de yapıldı. Bu aşamada Qubit dsDNA Quantitation kit

içerisindeki PicoGreen boyası kullanılarak çift zincirli DNA moleküllerinin miktarı saptandı. Örneklerden 50'şer nanogram alınarak kütüphane hazırlığına geçildi.

Tüm ekzom kütüphanesini oluşturmak için amplifikasyon temelli “*ultra-high multiplex PCR*” yöntemine dayanan Ampliseq Exome RDY Kit kullanıldı. 12 farklı primer havuzu içerisinde toplamda yaklaşık 290.000 hedef genom bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Amplifikasyon sonrası her bir hasta için primer havuzları ayrı ayrı birleştirildi. FuPa solüsyonu ile amplifikonların uçları kısaltıldı. DNA ligaz enzimi kullanılarak adaptör ve barkotların amplikonlara bağlanması sağlandı. Bu aşamanın ardından Beckman-Coulter firmasının ürettiği AmPure *bead*'ler kullanılarak kütüphaneler saflaştırıldı. Saflaştırma sonrası Qubit cihazında florometrik olarak ölçüm yapıldı. Kütüphane ölçümleri üretici firmanın belirtmiş olduğu aralıkta olduğu için (300-3000 ng/ml) hazırlanan örnekler ile emPCR aşamasına geçildi. Emülsiyon bazlı PCR uygulaması klonal amplifikasyon ile kütüphanelerin çoğaltılmasını sağladı. Ion One Touch cihazı kullanılarak yapılan bu aşama ile klonal olarak çoğaltılan ve manyetik nano partiküllere bağlanan DNA fragmanları saflaştırıldı. Bu aşamada Ion One Touch ES cihazı kullanıldı.

Yeni nesil DNA dizileme işlemi, DNA sentezinde açığa çıkan H<sup>+</sup> atomlarının meydana getirdiği pH değişimlerini aynı anda milyonlarca farklı manyetik partikül üzerinde tanıyıp kaydedebilen Ion Proton® cihazında gerçekleştirildi. emPCR sonrasında elde edilen örnekler sekans primeri ve *annealing buffer* ile birleştirildi ve dizileme için hazırlanmış olan Ion PI çiplere yüklendi.

Islak laboratuvar tamamlandıktan sonra kuru laboratuvar aşamasına geçildi. İlk önce veriler insan referans genomu ile hizalanıp karşılaştırılarak varyant çağrılması yapıldı. Dört birey için 49.500 ile 51.000 arası nadir varyant tespit edildi. Sonrasında varyant filtreleme aşamasına geçildi. Varyant analizi IonProton® içerisinde yer alan IonReporter® platformu ile gerçekleştirildi. Her hasta için bir varyant dosyası oluşturulduktan sonra, varyant filtrelemesi primer ve sekonder olmak üzere iki aşamada yapıldı. Primer filtrelemede temel olarak benign varyantlar elendi. Sekonder filtreleme ise aile ağacı, kalıtım paterni ve fenotip göz önünde

bulundurularak popülasyon ve hasta veri tabanları, farklı *in silico* programlar ve *in house* veritabanı üzerinden yapıldı ve bazı varyantlar önceliklendirildi. Sonuç olarak ön plana çıkan varyantlar Sanger sekanslama ile valide edilip etkilenmiş diğer aile bireylerinde yapılan eş zamanlı segregasyon analizi ile konfirme edildi.

## 4-BULGULAR

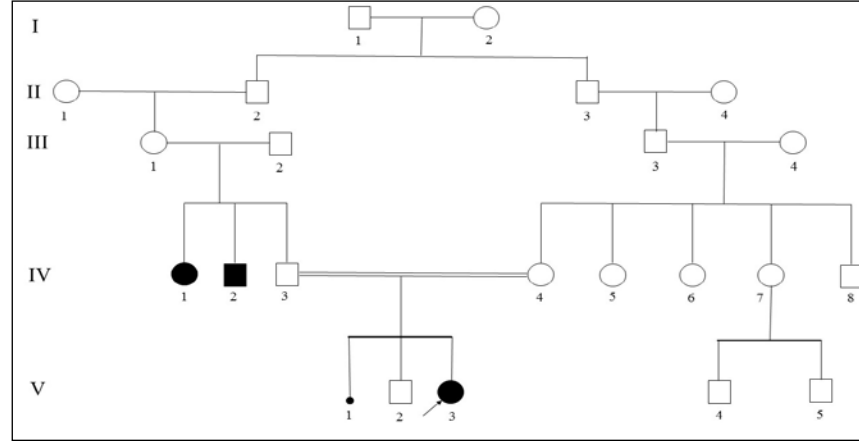
Çalışmaya bir erkek üç kız toplam dört hasta dahil edildi (Tablo 4.1). Hastaların ameliyat yaşı 2 ay-3 yaş arasında değişmekteydi. İki hastada bilateral nükleer katarakt, bir hastada bilateral total katarakt, bir hastada ise bilateral kombine lamellar ve sütüral katarakt mevcuttu. Üç hastaya bilateral lensektomi ve ön vitrektomi cerrahisi uygulandı ve bu hastalara yapay göz içi lensi konulmadı. Bir hastaya ise lensektomi sonrasında bilateral olarak yapay göz içi lensi konuldu. Ameliyat sonrasında görme rehabilitasyonu için kontakt lens ve/veya gözlük verildi. Bir hastada anne-baba akraba idi. Tüm hastalarda ailede konjenital katarakt öyküsü mevcuttu. Dört no'lu hastada ilk cerrahi sonrasında göz içi basıncının yükselmesi nedeniyle sol göze tekrar ön vitrektomi yapıldı. Takiplerde sağ gözde de glokomu gelişen hastaya, göz içi basıncının topikal antiglokomatöz damlalar ile kontrol altına alınamaması nedeniyle siklodiod laser uygulaması yapıldı.

**Tablo 4.1.** Çalışmaya dahil edilen hastaların ameliyat yaşları, katarakt tipleri, oküler komorbiditeleri ve aile öyküleri.

Hasta No	Ameliyat yaşı	Katarakt tipi	Ek oküler sorun	Aile öyküsü	Akraba evliliği
1	3 yaş	Bilateral lamellar+sütüral katarakt	-	Var	Var
2	2 ay	Bilateral nükleer katarakt	Mikroftalmi	Var	Yok
3	10 ay	Bilateral total katarakt	-	Var	Yok
4	3 ay	Bilateral nükleer katarakt	Mikroftalmi Afak glokom	Var	Yok

**1 no'lu birey:** Anne-baba arasında akrabalık olan bu bireyde daha önceki çalışmalarda katarakt ile ilişkilendirilmiş *CRYBA1* geninde heterozigot bir mutasyon saptanmıştır (Şekil 4.1). Sanger dizileme ile yapılan segregasyon çalışmasında etkilenmiş bireyin babasında da bu değişikliğin olduğu görülmüştür. Dominant

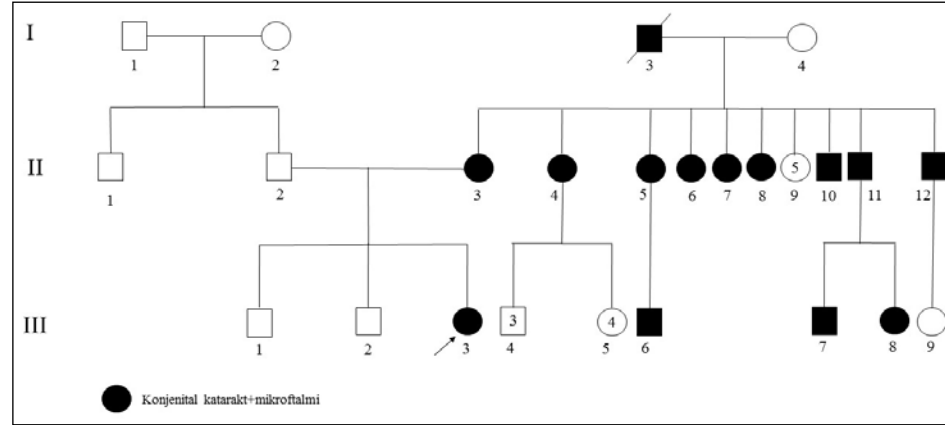
kalıtım kalıbına uyan pedigrilerde sık karşılaşılan bir durum olan “eksik penetrans” kavramı gündeme gelmiş ve bunu ortaya çıkarabilmek açısından segregasyon çalışması genişletilmiş, baba tarafından diğer etkilenmiş bireylerin DNA’sına da ulaşılmıştır.



**Şekil 4.1.** Kohorttaki 1 no’lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Anne ve baba arasındaki akrabalığa karşı katarakt etkeni *CRYBA1* geninde otozomal dominant kalıtım gösteren heterozigot bir mutasyon olarak saptanmıştır (c.215+1G>A). IV.1 ve IV.2 numaralı bireylerde de aynı mutasyon hastalık nedeni olarak gösterilmiştir. Aynı mutasyonu barındıran IV.3 numaralı bireyde fenotip bulunmaması ise eksik penetrans göstermesi ile açıklanmıştır.

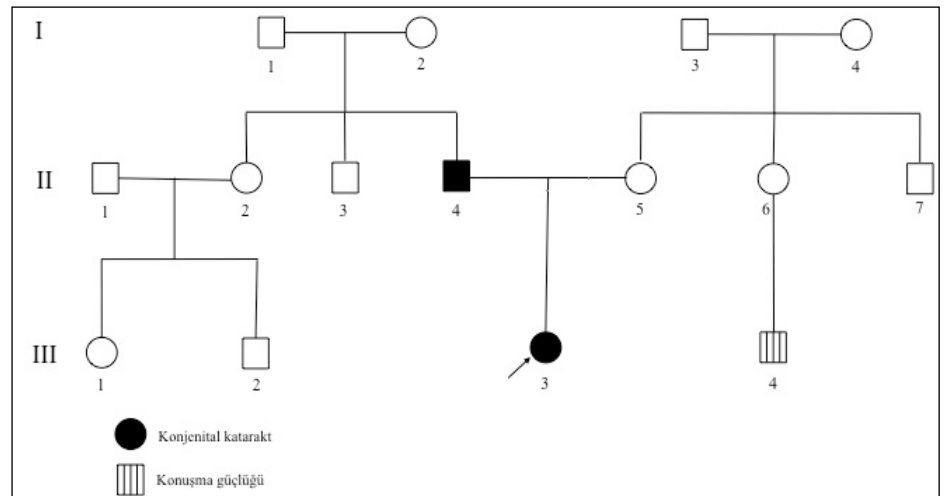
Bu birey açısından aile boyu segregasyon analizi tamamlanmıştır ve *CRYBA1* c.215+1G>A *splice site* mutasyonu bulunmuştur. Hastanın babasının iki kardeşinde de *CRYBA1* genindeki varyantın bulunduğu gösterilmiştir.

**2 no’lu birey:** *CRYGC* geninde otozomal dominant kalıtım gösteren heterozigot c.432C>G (p.Tyr144Ter) mutasyonu saptanmıştır (Şekil 4.2). Bu mutasyonu hastanın annesi, dayısı ve dayısının iki çocuğunun da taşıdığı saptanmıştır.



**Şekil 4.2.** Kohorttaki 2 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Probandda heterozigot olarak saptanan *CRYGC* c.432C>G (p.Tyr144Ter) mutasyonu aynı fenotipi sergileyen bireylerden II.3, II.11, III.7 ve III.8 numaralı bireylerde de hastalık nedeni olarak gösterilmiştir.

**3 no'lu birey:** *CRYGD* geninde otozomal dominant kalıtım paterni gösteren heterozigot c.70C>A (p.Pro24Thr) mutasyonu saptanmıştır (Şekil 4.3). Hastanın babasının da bu mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir.

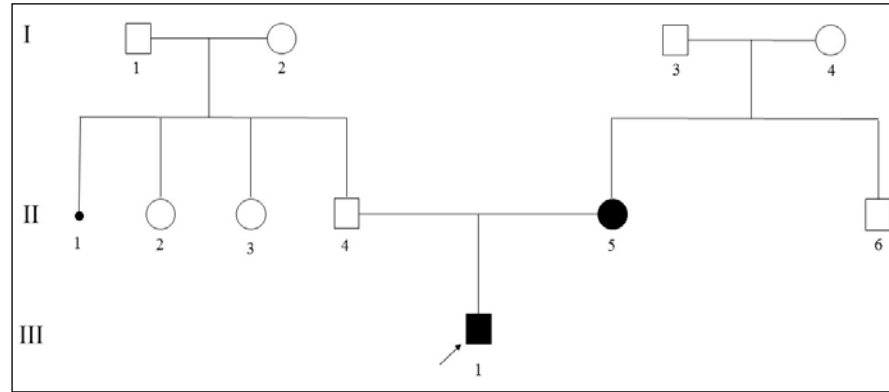


**Şekil 4.3.** Kohorttaki 3 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Probandda *CRYGD* geninde otozomal dominant kalıtım paterni gösteren heterozigot c.70C>A (p.Pro24Thr) mutasyonu saptanmıştır. Hastanın babasının (II.4) da aynı mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir.

**4 no'lu birey:** Anne baba arasında akrabalık olmayan bu bireyde daha önce katarakt ile ilişkilendirilmiş olan *CRYBB3* geninde otozomal dominant kalıtım paterni gösteren heterozigot c.466G>A (p.Gly156Arg) mutasyonu saptanmıştır (Şekil 4.4). Sanger dizilemesinde söz konusu varyant valide edilmiştir. Aile içinde



yapılan segregasyon analizinde ise; mutant allelin hastanın etkilenmiş annesinde de bulunduğu gösterilmiştir. Bu birey için de segregasyon çalışması başarılı şekilde tamamlanmıştır.



**Şekil 4.4.** Kohorttaki 4 no'lu bireyin soyağacı. Proband okla işaretlenmiştir. Probandda *CRYBB3* c.466G>A (p.Gly156Arg) mutasyonu saptanmıştır. Aynı mutasyonun, hastanın etkilenmiş annesinde de (II.5) olduğu gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Konjenital katarakt, lens gelişiminde veya fonksiyonunda aksama ya da duraklama nedeniyle meydana gelmektedir. Çocukluk çağı kataraktları sık gözlenmemesine rağmen pediatrik popülasyondaki körlüğün %5-20'sinden sorumlu olarak gösterilmektedir (98). Konjenital katarakt, erken tanı ve tedavi almadığında ciddi görme kaybı ile sonuçlandığı için pediatrik oftalmolojik açıdan ciddi morbiditesi ve ekonomik yükü olan bir acildir. Dünya üzerinde her yıl 20-40 bin çocuğun konjenital katarakt ile dünyaya geldiği bildirilmiştir (9). Konjenital katarakt olgularının yaklaşık olarak %50'sinde genetik bir neden vardır ve kalıtım en sık otozomal dominanttır (44, 51). Genetik nedenlerle ortaya çıkan ve çevresel faktörlerin kontrolü ile önlenemeyen konjenital katarakt olguları nedeniyle, genetik etiyojoloji gelişmiş sağlık sistemlerinde de önemini korumaktadır.

Genetik nedenlerle oluşan konjenital katarakt, başka klinik bulgular eşlik ettiğinde sendromik, etmediğinde izole olarak adlandırılır. Sendromik olmayan konjenital katarakt, tüm vakaların %70'ini oluşturmaktadır ve yaklaşık olarak 10 bin canlı doğumda 1-6 sıklığında görülmektedir (99, 100). Bu sıklık göz, çocuk ve genetik hekimlerinin genetik geçişli izole konjenital kataraktlar konusunda bilgi sahibi olmasını ve ortaya çıkmasını önleyecek ya da erken tanıyı sağlayacak genetik incelemelerin yapılabilmesi için aileleri yönlendirmesini gerektirmektedir. Çalışmamız bu gereklilik doğrultusunda planlanmıştır.

Rahi ve ark. Birleşik Krallık'ta yaptıkları çalışmada konjenital-infantil katarakt için kümülatif insidansın bir yaşında 2,29/10 bin, beş yaşında 2,93/10 bin, 15 yaşında ise 3,19/10 bin olduğunu, her yıl doğan 10 bin çocuktan üçünde ilk yıl içerisinde katarakt tanısı konulduğunu belirlemişlerdir (101).

Türkiye'de konjenital katarakt insidansı ve genetik etiyojojisine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Ülkemizde körler okulunda yapılan taramalarda çocukluk çağı körlüklerinin %16,3'ünün nedeninin konjenital katarakt olduğu belirlenmiştir (102). Sheeladevi ve ark. yaptıkları sistematik gözden geçirmede çocukluk çağı kataraktlarının genel prevalansının 10 binde 0,32-22,9 arasında, konjenital katarakt için ise 10 binde 0,63-9,74 arasında olduğunu saptamışlardır (98). Prevalansın düşük

gelire sahip ülkelerde 10 binde 0,42-2,05 ve düşük-orta gelir sahibi olan ülkelerde 0,32-8,49, orta-yüksek gelire sahip olan ülkelerde 0,74-22,7 ve yüksek gelire sahip olan ülkelerde ise 0,63-13,6 olduğunu belirlemişlerdir (98). Ayrıca, unilateral ve bilateral katarakt sıklığının eşit olduğunu ve cinsiyete göre farklılık göstermediğini bulmuşlardır (98). Bu sistematik gözden geçirmenin sonucu her yıl yeni 314 bin çocukluk çağı konjenital katarakt olgusu anlamına gelmektedir ki bu durum çocukluk çağı kataraktlarının ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğunu özellikle işaret etmektedir (98). Türk toplumuna ait bir insidans ve etiyoloji verisinin olmaması bu tür çalışmaların yapılması gerekliliğini açık olarak ortaya koymaktadır.

Wu ve ark. yaptıkları sistematik gözden geçirme ve meta-analizde tüm dünyada konjenital katarakt prevalansının 10 binde 2,2-13,6 arasında değiştiğini, konjenital katarakt olgularının %62,2'sinin idyopatik, %22,3'ünün herediter, %11,5'inin ise herediter olmayan nedenlere bağlı olarak geliştiğini, %62,3'ünün izole, %22,7'sinin bir oküler patoloji ile %17,3'ünün sistemik bir hastalık ile birlikte olduğunu ve en sık görülen katarakt tipinin total katarakt olduğunu bildirmişlerdir (4).

Çocukluk çağı kataraktları; aniridi, mikroftalmi veya persistan fetal damarlanma gibi oküler hastalıklar, Marfan, Marchesani, Nance-Horan, Lowe gibi sendromlar veya galaktozemi başta olmak üzere Wilson, hipokalsemi gibi metabolik hastalıklar ile birlikte de bulunabilmektedir (7).

Tedavi edilmeyen veya geç tedavi edilen çocukluk çağı kataraktları ağır göz tembelliği, görme kaybı ve körlük ile sonuçlanabilmektedir. Tedavide en kritik basamak, görme sonuçlarını olumlu yönde etkilediği için erken müdahaledir. Erken ve komplikasyonsuz bir cerrahi ve iyi bir görme rehabilitasyonuna rağmen yıllar içerisinde gelişen glokom, nistagmus ve şaşılık gibi nedenlerden dolayı fonksiyonel ve kozmetik sonucun başarısı düşebilmektedir (103). Bu nedenle erken tanı için doğumdan hemen sonra pediatrik veya oftalmologlar tarafından yapılacak kırmızı yansıma testi büyük önem taşımaktadır.

Konjenital katarakt tanısı konulduktan sonra ilk aşama altta yatan olası patolojileri ve eşlik eden sistemik sorunları araştırmak için iyi bir genel

değerlendirme yapılmasıdır. Bu nedenle ilk önce bebeğin bir pediatrist tarafından ayrıntılı fizik muayenesinin yapılması, ardından metabolik hastalıklar ve genetik sendromlar açısından değerlendirilmesi gereklidir. Ayrıca katarakt gelişimi ile doğrudan ilişkisi gösterilmiş olan konjenital enfeksiyonlar (Toksoplazma, rubella, sitomegalovirus, herpes vb.) için de laboratuvar testleri istenmektedir. Eğer özel bir metabolik durumdan şüpheleniliyorsa bu duruma yönelik ayrıntılı metabolik/genetik testler de talep edilebilmektedir. Genetik değerlendirmede ise bebek öncelikli olarak dismorfik bulgular ve tanımlanmış/bilinen sendromlar açısından değerlendirilmektedir. Klinik şüphe durumunda öncelikli olarak konvansiyonel karyotip, sonrasında ise moleküler sitogenetik, mikrodizin veya dizileme yöntemleri gibi daha ileri yöntemlere başvurulabilmektedir. Tüm bunlar göstermektedir ki, konjenital kataraktı olan bir bebeğin tanı ve takibinin her aşamasında bölümler arası işbirliği oldukça büyük bir önem taşımaktadır.

Genetik olarak incelenen konjenital katarakt ailelerinde, saptanan mutasyonların yarısının kristalin genlerinde, dörtte birinin ise konneksin genlerinde olduğu gösterilmiştir (99). Özellikle lens gelişimi aşamalarını etkileyen mutasyonların olduğu çok sayıda lokus belirlenmiştir (44). Bu mutasyonlardan bazıları; kristalin genleri (*CRYAA*, *CRYAB*, *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA1*, *CRYBA4*, *CRYGC*, *CRYGD* ve *CRYGS*), membran proteini genleri (*GJA3*, *GJA8*, *MIP* ve *LIM2*), hücre iskeleti ile ilişkili genler (*BFSP1* ve *BFSP2*) ve transkripsiyon faktör genleri (*FOXE3*, *HSF4*, *MAF*, *PITX3* ve *PAX6*) üzerinde tanımlanmıştır (104).

Konjenital kataraktın genetik etiolojisinin aydınlatılmasında aday gen çalışmaları, bağlantı analizleri, mikrodizin analizleri ve dizileme çalışmaları da kullanılabilir (7). Bu çalışmada küçük bir grup hastada konjenital katarakt etiolojisinin araştırılması ve toplumumuza özgü yeni genler olup olmadığının incelenmesi için bilateral konjenital katarakt tanısı konulmuş ve opere edilmiş, ayrıntılı değerlendirme sonrasında bilinen metabolik hastalıklar ve genetik sendromlar ile ilişkilendirilememiş dört hastada tüm ekzom dizileme yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda *CRYBA1*, *CRYBB3*, *CRYGC* ve *CRYGD* olmak üzere kristalin genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Kristalin mutasyonları otozomal dominant kataraktların yaklaşık %50'sinden sorumludur (7). Kristalinler,

lens proteinlerinin tamamına yakını oluşturmaktadır. Kristalinlerin bir kısmı şaperon görevi görürken bir kısmı ise paketlenme özellikleri sayesinde ışık saçılımını engelleyerek lensin saydamlığının sağlanmasında kritik rol üstlenmektedirler(2). Otozomal dominant kataraktların yaklaşık %50'sinden kristalin mutasyonları sorumlu olmakla birlikte, her bir kristalin geninin toplamın ne kadarından sorumlu olduğuna dair henüz güvenilir bir meta-analiz bulunmamaktadır.

Yedi ekzondan oluşan *CRYBA1* geni 17q11.2 üzerinde bulunmaktadır. Tek mRNA'dan kristalin beta A1 ve kristalin beta A3 olmak üzere iki protein kodlamaktadır. Beta A1 ve A3, beta A3 NH<sub>2</sub> terminal kolunda fazladan bulunan 17 aminoasit rezidüsü dışında birbirinin aynısıdır (105). Beta A1/A3 kristalinlerin otoproteolitik etkisi olduğu düşünülmektedir (106-108). Bu kristalinlerin, lensin saydamlığının sağlanmasında ve korunmasında kritik olan yapısal proteinler oldukları bilinmektedir. Normal bir beta A1/A3 proteini yokluğunda bazı sinyalizasyon yollarının etkileneceği ve bu durumun dolaylı olarak persistan fetal damarlanma gelişimine neden olabileceği de düşünülmektedir (109). Çalışmamızda ise *CRYBA1* mutasyonu saptanan hastada persistan hiperplastik primer vitreus tablosu mevcut değildi. Ayrıca bu mutasyonun saptandığı 1 no'lu bireyin pedigrisine bakıldığında akraba evliliği olmasına rağmen otozomal dominant kalıtım paterni gösteren heterozigot bir *splice* bölge mutasyonu olması ve bu durumun eksik penetrans olasılığını düşündürmesi özellikle önemlidir.

Wang ve ark. otozomal dominant konjenital kataraktı olan 47 aileyi inceledikleri çalışmalarında *CRYBA1/A3*'ün tüm kodlanan bölgelerini direkt dizilemişler ve birbiri ile ilişkisiz üç ailede (%6,4) glisin aminoasit ( $\Delta$ G91) delesyonu ile sonuçlanan 279-281 pozisyonlarında rekürren 3-bp delesyon mutasyonunu saptamışlardır (110). Bu değişikliğin tüm etkilenen aile bireylerinde olduğunu ve bu bireylerin tamamında bilateral simetrik nükleer katarakt olduğunu göstermişlerdir (110). Bu mutasyonun ortak ata veya *hot spot* kökenli olup olmadığını saptamak için yapılan haplotip analizinde ise her üç ailenin farklı haplotiplerinin olduğu bu nedenle de ortak ata hipotezinin uygun olmadığı gösterilmiştir (110).  $\Delta$ G91 mutasyonunun üç ailede bağımsız olarak gerçekleştiği düşünülmüş olsa da bu bölgede mutasyon sıklığının niye artmış olduğu

açıklanamamıştır (110). Beta A1/A3 kristalinin tersiyer konfigürasyonunun korunmasında glisin oldukça önemlidir (110). Bu mutasyonun, beta A1/A3 kristalinin katlanmasında bozulmaya neden olabileceği düşünülmektedir (111). Ayrıca genel hücre sinyalizasyon ağı içerisinde indirekt yollar ile katarakt patogenezinde katkıda bulunulabileceği de öne sürülmüştür (111).

Mohebi ve ark. bilateral nükleer kataraktı olan 10 yaşındaki İranlı bir kız hastanın ailesinde *CRYBA1/A3*, *CRYBB1*, *CRYBB2* ve *CRYGD* kristalin genlerinin kodlanan sekanslarını taramışlardır (111). Direkt PCR dizileme *CRYBA1/A3* geni ekzon 4'te, glisin delesyonu ile sonuçlanan *de novo* heterozigot mutasyon göstermiştir (111). Ailenin etkilenmeyen bireylerinde ise bu mutasyon gösterilememiştir (111).

Zhang ve ark. otozomal dominant konjenital kataraktı olan dört nesil Çinli bir ailenin beşi hasta sekiz bireyini değerlendirmişlerdir (105). Ayrıca herhangi bir göz hastalığı olmayan 100 kontrol de analize katılmıştır (105). Aday genlerin tüm ekzonları ve intron-ekzon birleşim bölgeleri PCR ile çoğaltılarak sekanslanmıştır (105). Sonuç olarak, glutamik asitten valine doğru değişime neden olan *CRYBA1/A3* ekzon 6'da yeni heterozigot 2-bp delesyon mutasyonu (c.590-591delAG) saptanmıştır (105).

Zhu ve ark. otozomal dominant progresif çocukluk çağı kataraktı olan dört nesil bir ailede 9 etkilenmiş, 8 etkilenmemiş toplam 17 bireyi fonksiyonel aday gen analizi yöntemi ile değerlendirmişlerdir (112). Dizileme ile saptanan *CRYBA1/BA3* intron 3'te tek baz değişiminin (IVS3+1 G>A) tüm etkilenmiş bireylerde segregе olduğu gösterilmiştir (112).

Reddy ve ark. otozomal dominant lamellar kataraktı olan beş nesilli bir ailede bağlantı analizi yapmışlardır (113). Aday gen olan *CRYBA1* geninde, glisin aminoasit delesyonu ile sonuçlanan (G91del) ekzon 4'te 3bp delesyon mutasyonu saptanmıştır (113). Mutant proteinin katlanma özelliğinin bozulduğunu ve çözünebilirliğinin azaldığını *in vitro* olarak göstermişlerdir (113). Çalışmamızdaki bireyde ise bilateral lamellar ve sütüral katarakt birlikte gözlenmiştir. Ancak diğer

aile bireylerinin katarakt tipi daha önce ameliyat olmuş olmaları nedeniyle belirlenememiştir.

Kannabiran ve ark. otozomal dominant zonüler-sütüral kataraktı olan bir ailede sadece etkilenen bireylerde direkt dizileme ile  $\beta A1/A3$  kristalin geni 3. ekzonun 5' *splice site* bölgesinde G>A değişimini göstermişlerdir (106).

Yu ve ark. otozomal dominant konjenital polimorfik katarakt olgularının olduğu dört nesilli bir ailede genetik nedene yönelik araştırma yapmıştır (114). *CRYAA*, *CRYAB*, *CRYBA1/3*, *CRYBB2*, *CRYGC*, *CRYGD*, *GJA3* ve *GJA8* direkt dizileme ile taranmıştır (114). Sonuç olarak, *CRYBA1/A3* geninde c.215+1G>A mutasyonu belirlenmiştir (114). Bu mutasyon, çalışmamızdaki hastada saptanan mutasyonla aynıdır. Bizim çalışmamızda bu mutasyonu taşıyan hastada bulunan katarakt tipi lamellar ve sütüral katarakt kombinasyonu iken Yu ve ark.larının çalışmasına bu tip kataraktlar dışında sadece sütüral katarakt, nükleer katarakt ve periferal kortikal kesafetler şeklindeki katarakt dahil değişik morfolojideki konjenital kataraktı olan hastalar da dahil edilmiştir (114).

Yang ve ark. otozomal dominant konjenital kataraktı olan bireyleri bulunan dört nesilli bir Çinli ailede fonksiyonel gen yaklaşımı-direkt dizileme ile bilinen kristalin ve konneksin genlerini değerlendirmişlerdir ve *CRYBA1/A3*'te matür mRNA'nın *splice* bölgesini etkileyen yeni IVS3+2 T-G transversiyon mutasyonu tanımlamışlar ve ayrıca transkripsiyon analizi ile bu mutasyonun *CRYBA1* mRNA'larının yanlış kırılmasına neden olduğunu da doğrulamışlardır (115). Ortaya çıkan proteinin anormal katlandığını ve stabil olmadığı için çözünemez hale geldiğini belirtmişlerdir (115). Gu ve ark. aynı şekilde otozomal dominant arka polar konjenital kataraktı olan dört nesil Çinli bir ailede *CRYBA1/A3*'te intron 3'ün 5' *splice* bölgesinde G-A değişimi şeklinde bir *splice* mutasyonu tanımlamışlardır (116).

Yang ve ark. otozomal dominant konjenital nükleer kataraktı olan beş nesilli Çinli bir ailede önce bağlantı analizi ile *CRYBA1* lokusunu belirlemişlerdir (117). Sonrasında ise sekans analizi ile genin 4. ekzonunda 91 pozisyonundaki glisin

delesyonuna neden olan ( $\Delta G91$ ) c.279-281delGAG mutasyonunu göstermişlerdir (117).

$\Delta G91$  mutasyonunu *CRYBA1/A3* geninde değişik popülasyonlarda sıklıkla bildirilmiştir ve mutasyonel bir *hot spot* olabileceği düşünülmektedir (110, 111, 113, 117-121). Ancak 1 no'lu hastada saptanan c.215+1G>A mutasyonunun literatürde sık bildirilen bir mutasyon olmadığı görülmüştür. *CRYBA1/A3* geninde farklı mutasyonlar bildirilmiş olmakla birlikte çoğunluğunun heterozigot tipte olduğu ve polimorfik kataraktlarda gösterilmiş olsa da ağırlıklı olarak nükleer ve sütüral katarakt ile ilişkili olduğu dikkati çekmektedir. Bizim çalışmamızda ise mutasyonun saptandığı hastada lamellar ve sütüral katarakt izlenmiştir. Aynı mutasyon daha önce konjenital katarakt ile ilişkili ve patojenik olarak bildirilmiştir.

Hastalarımızdan 4 no'lu bireyde saptanan kristalin beta B3 geni (*CRYBB3*) ise, kristalin beta B3 proteinini kodlamaktadır. Altı ekzondan oluşmakta ve 22q11.23 bölgesinde yer almaktadır. Bazik beta kristalin protein ailesindedir.

Chen ve ark. otozomal resesif kalıtım izlenen konjenital katarakt 83 Pakistanlı ailede konjenital katarakt ve ilişkili hastalıklarda homozigosite açısından 33 gen veya lokusu taramışlardır (122). Öncelikle homozigosite taraması sonrasında sekans analizi uygulamışlar, on ailede 9 adet hastalık ile ilişkili mutasyon bulurken, 11 ailede ise bağlantılı gende hiçbir mutasyon saptayamamışlardır (122). Bu aileler içerisinde en sık rastlanılan mutasyonlar *FYCO1* (%14), *CRYBB3* (%5,2), *GALK1* (%3,5), *EPHA2* (%2,6) genlerinde bildirilmiştir (122).

Jiao ve ark. dört akraba evliliğinden altı etkilenmiş bireyi içeren Pakistanlı geniş bir otozomal resesif nükleer konjenital katarakt ailesini incelemişlerdir (123). Genom boyu bağlantı analizi ile katarakt gelişiminde önemi bildirilmiş olan *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3* ve *CRYBB4* genlerinin bulunduğu 22q bölgesine bağlantı saptamışlardır (123). Çift yönlü Sanger dizilemesi sonrasında *CRYBB3*'te hastalık fenotipi ile segregen olan homozigot c.493G>C (p.Gly165Arg) *missense* varyasyonu saptanmıştır (123).



Li ve ark. hiçbir aile öyküsü olmayan sporadik konjenital katarakt hastalarında etkili genetik faktörleri araştırmışlar ve tek taraflı travmatik kataraktı olan bireyleri kontrol grubu olarak kullanmışlardır (124). Otuz iki adet sporadik konjenital katarakta özel varyant saptamışlar ve ayrıca bu varyantların sağlıklı kontrollerde olmadığını da göstermişlerdir (124). Örnekler içerisinde en sık mutasyon *CRYBB3* geninde, sonrasında ise *EPHA2*, *NHS* ve *WDR36* genlerinde belirlenmiştir (124). Çalışmada, *CRYBB3* heterozigot mutasyonu olan hastaların katarakt tiplerinin total, nükleer veya kortikal olduğu belirtilmiştir (124). Çalışmamızda ise *CRYBB3* mutasyonu saptanmış olan 4 no'lu hastada ise bilateral nükleer katarakt mevcuttu ve hastanın annesinde de konjenital katarakt ameliyatı öyküsü vardı ancak katarakt tipine ait bir bilgi mevcut değildi.

Reis ve ark. 23 otozomal dominant katarakt ailesinde probandlara tüm ekzom dizileme yapmışlardır (125). Bilinen 36 katarakt geni ve daha önce insanda katarakt ile ilişkilendirilmemiş olan 8 kristalin geni değerlendirilmiştir (125). Dokuz ailede *CRYAA*, *CRYBB1*, *CRYBB3*, *CRYGC*, *CRYGD*, *GJA8*, *MIP* ve *EYAI*'de mutasyonlar tanımlanmıştır (125). Düşük penetranslı dominant konjenital kataraktın olduğu bir ailede *CRYBB3*'te, c.581T>A, (p.Val194Glu) heterozigot yeni bir *missense* mutasyon bulmuşlardır (125). Daha önce herhangi bir katarakt fenotipi ile ilişkilendirilmeyen kristalin genlerinden *CRYBA2*'de de hastalık ile ilişkili olabilecek mutasyon saptamışlardır (125).

Hansen ve ark. birbirinden bağımsız 28 Danimarkalı ailede önce bağlantı analizi sonrasında ise 17 genin dizilemesini yapmışlardır. Ailelerden 20'sinde (%71) mutasyon saptanmıştır (126). En sık kristalin genleri (*CRYAA*, *CRYBB2*, *CRYBB3* ve *CRYGD*) sonrasında konneksin ve ardından transkripsiyon faktörleri olan *HSF4* ve *MAF* olmak üzere sekiz gende mutasyon saptanmıştır (126).

Riazuddin ve ark. otozomal resesif kalıtmı konjenital kataraktın olduğu iki Pakistanlı ailede *CRYBB3* homozigot mutasyonu saptamışlardır (127). Bu gende ekzon 6'de G-C değişiminin  $\beta$ B3 proteininde p.G165R değişimine neden olduğunu göstermişlerdir (127).

Literatürde *CRYBB3* genindeki homozigot ve heterozigot karakterde farklı mutasyonlar total, nükleer, kortikal dahil olmak üzere farklı konjenital katarakt morfolojileri ile birlikte bildirilmiştir. Çalışmamızda ise bilateral nükleer kataraktı olan 4 no'lu olguda heterozigot mutasyon saptanmıştır. Aynı mutasyon daha önce konjenital katarakt ile ilişkili ancak önemi bilinmeyen olarak bildirilmiştir.

Kristalin gama C geni, *CRYGC*, 2q33.3'de yer alır ve 4 ekzondan oluşur. Kristalin gama D geni, *CRYGD* ise aynı yerde bulunur ve 3 ekzondan oluşur.

Zhang ve ark. otozomal dominant nükleer kataraktı ve mikrokorneası olan bireylerin olduğu Çinli bir ailede bağlantı analizi ve sonrasında aday genlerin sekanslanması ile *CRYGC* ekzon 3'te c.470G>A (W157X) mutasyonunu bulmuşlar ve bu proteinin özellikle lens nükleusunda eksprese olması nedeniyle mutasyonunda nükleer kataraktın görülebileceğini belirtmişlerdir (128). Bu çalışmada da *CRYGC* mutasyonu saptanan 2 no'lu hastada bilateral nükleer katarakt ile birlikte mikroftalminin olması bu genin farklı mutasyonlarında da benzer klinik tablonun oluşabileceğini göstermektedir.

Yao ve ark. otozomal dominant nükleer konjenital kataraktı olan geniş bir Çinli ailede direkt sekanslama ile *CRYGC* ekzon 3'te c.327C>A (C109X) *nonsense* mutasyonunu göstermişlerdir ve bu mutasyonun  $\gamma$ C kristalinin katlanma özelliklerini bozarak çözünürlüğünü azaltabileceğini ve diğer kristalinler ile etkileşimini bozabileceğini ifade etmişlerdir (129).

Otozomal dominant pulverulan katarakt ile ilişkili olarak *CRYGC* geninde 2. ekzonda c.143G>A (p.R48H) şeklinde heterozigot *missense* mutasyon da gösterilmiştir (130).

Vanita ve Singh otozomal dominant konjenital kataraktlı bireylerin olduğu Hindistan kökenli iki ailede izole katarakt için tanımlanmış 23 geni sekanslamışlardır (131). Analiz sonucunda ailelerden birinde *CRYGD*'de c.70C>A nükleotid değişikliği şeklinde *missense* mutasyonu, akuleiform tipte kataraktı olan tüm bireylerde göstermişler ancak diğer ailede sekanslanan genlerde bir mutasyon saptayamamışlardır (131). Çalışmamızda benzer mutasyonun izlendiği hastada ise

bilateral total katarakt mevcuttu ve konjenital katarakt nedeniyle ameliyat edilmiş babasında da katarakt morfolojisi değerlendirilememiştir.

Yang ve ark. *CRYGC*, *CRYGD*, *CRYGS*, *GJA8*, *GJA3* ve *CRYAA* aday genlerinin kodlayan bölgelerini direkt sekanslamışlardır (132). Birbiri ile ilişkili olmayan iki ailede *CRYGD* geninde rekürren p.P24T mutasyonunu üç ailede ise p.Q101X, p.E104fsX4 ve p.E135X şeklinde üç yeni mutasyon bulmuşlardır (132). Aynı mutasyon, literatürde özel bir konjenital katarakt tipi olan koraliform katarakt ile birlikte tanımlanmış olsa da, yine çalışmamızdaki hastada başvuru yaşının ileri olması ve her iki gözde total opasitenin kataraktın başlangıçtaki morfolojisi ile ilgili bilgi sahibi olmayı engellemesi nedeniyle böyle bir ilişkilendirme yapılamamıştır (132).

Zhuang ve ark. otozomal dominant konjenital kataraktlı bireylerin olduğu dört nesilli bir ailede *CRYAA*, *CRYBA1*, *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYGC* ve *CRYGD* kristalin genlerinin ekzonlarını sekanslamışlardır (133). Genin 3. ekzonunda c.451\_452ins GACT heterozigot varyantı şeklinde yeni bir delesyon mutasyonu tanımlamışlardır (133). Mutant proteinin ikincil yapısının bozulmuş ve çözünürlüğünün azalmış olduğu gösterilmiştir (133).

Zhai ve ark. bilateral konjenital nükleer ve arka polar kataraktı olan iki etkilenmiş bireyin olduğu 11 bireyli üç nesilli bir ailede, *CRYGD* geni 3. ekzonunda *nonsense* c. 418C>T mutasyonunu bulmuşlardır (134). Bu mutasyonun, filogenetik olarak korunmuş arjinin rezidüsü için (p.R140X) prematür stop kodonu oluşturduğu, proteinin katlanma ve çözünürlük özelliğini etkilediği düşünülmüştür (134).

Jia ve ark. otozomal dominant koraliform kataraktı olan bir ailede WES ve bağlantı analizini kombine olarak kullanmışlar ve LOD skoru anlamlı olmayan ancak pozitif olan beş lokus bulmuşlardır (135). Bunlardan birinin ise *CRYGD* geninin 2. ekzonunda c.70C>A (p.P24T) şeklinde heterozigot *missense* mutasyon olduğunu saptamışlardır (135). Tüm ekzom dizilemenin, bağlantı analizi ile birlikte kullanılmasının özellikle aday gen havuzunu daraltmakta faydalı olabileceğini öne sürmüşlerdir(135).

VanderVeen ve ark. *CRYGD* 2.ekzonda iki ailede otozomal dominant kristalin katarakt ile ilişkili heterozigot c.109C>A (p.R36S) *missense* mutasyonunu önce tek nükleotid polimorfizmi temelli genom incelemesi ile bağlantı analizi yaparak sonrasında ise bağlantı bulunan bölgelerdeki katarakt ile ilişkili genleri sekanslayarak bulmuşlardır (136).

De Figueirêdo ve ark. katarakt fenotipi açısından varyasyon gösteren Brezilyalı bir ailede *CRYAA*, *CRYGC* ve *CRYGD* genleri direkt sekanslanmışlardır (137). *CRYGD* 3. ekzonda c.401A>G (p.Y134C) heterozigot nadir varyantını saptamışlardır (137). Aile içi segregasyon paterninin hastalık ile uyumlu bulunmaması ve varyantın konjenital kataraktı olan diğer aile bireylerinde gösterilememiş olması bu varyantın hastalık ile ilişkisi olmayan nadir bir tek nükleotid polimorfizmi olduğunu düşündürmüştür (137). Katarakt gelişiminde birden fazla genin birbiri ile kompleks etkileşimi, düşük penetrans, fenotipik heterojenite altta yatan moleküler etiyojinin saptanmasını bu çalışmada olduğu gibi oldukça zorlaştırabilmektedir. Bu nedenle bulunan varyantın hastalık ile ilişkisinin sorgulanması, ailede segregasyon olup olmadığının tespiti ve validasyonu hastalık-gen-mutasyon eşleştirmesinde ve kliniğe adapte edilmesinde en önemli basamaktır.

Sun ve ark. konjenital kataraktı olan 25 Çinli aileyi inceledikleri çalışmalarında buldukları *CRYAA*, *CRYBA1*, *CRYAB*, *CRYGS*, *GJA3* genlerindeki mutasyonlar dışında *CRYGD* 'de c.106G>C (p.Ala36Pro) heterozigot mutasyonunu otozomal dominant kalıtmalı nükleer katarakt ile ilişkilendirmişlerdir(121).

Yang ve ark. konjenital koraliform kataraktı olan bireylerin bulunduğu iki Çinli ailede *CRYGD*'nin direkt sekanslamasında 2.ekzonda c.70C>A (P24T) heterozigot mutasyonunu bulmuşlardır (138). P24T mutant proteininin çözünürlüğünün belirgin olarak azaldığını bildirmişlerdir (138). Bu mutasyonun, her ne kadar *hotspot* olarak bildirilmemiş olsa da literatürde *CRYGD* geninde sıklıkla bildirildiği dikkati çekmektedir.

Wang ve ark. otozomal dominant merkezi nükleer konjenital kataraktı olan bireylerin bulunduğu bir ailede seçilmiş olan 7 kristalin geni ve 2 *gap junction* genini sekanslamışlar ve *CRYGD* geninin 2.ekzonunda c.110G>C (p.R36P) heterozigot

*missense* mutasyonunu göstermişlerdir (139). Bu mutasyonun, proteinin lokal hidrofobisitesini arttırıp çözünürlüğünü azaltıyor olabileceğini öne sürmüşlerdir (139).

Wang ve ark. otozomal dominant nükleer konjenital kataraktlı Çinli bir ailede *CRYGD* geninde c.127T>C mutasyonu olduğunu (p.Trp43Arg) göstermişler ve bu mutasyonun  $\gamma$ D-kristalinin katlanma ve stabilite özelliklerini bozduğunu ileri sürmüşlerdir (140).

Santana ve ark., otozomal dominant nükleer veya lamellar konjenital kataraktı olan 11 ailede yaptıkları analizde ailelerden birinde *CRYGD* 2. ekzonda heterozigot *nonsense* TAC>TAG (p.Y56X) mutasyonu saptamışlardır (141).

*CRYGC* ve *CRYGD* mutasyonları sıklıkla heterozigot olarak bildirilmiştir. *CRYGC* mutasyonları genellikle nükleer katarakt ile bildirilmiştir ve çalışmamızda *CRYGC* mutasyonu saptanan hastada da nükleer katarakt saptanmıştır. *CRYGD* mutasyonları ise sıklıkla nükleer katarakt ile ilişkilendirilmiş olsa da c.70C>A (p.P24T) mutasyonları özellikle koraliform katarakt ile ilişkilendirilmiştir. Ancak çalışmamızda aynı *CRYGD* mutasyonu olan hastanın katarakt tipi total olarak belirlenmiştir. Bu hasta 10 aylıkken total katarakt tanısı alıp opere edilmiş olduğu için başlangıçta kataraktının nasıl bir morfolojiye sahip olduğu bilinmemektedir. Bu iki gende bulunan mutasyonlar daha önce patojenik olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızdaki dört hastada gösterilen mutasyonların hiçbiri daha önce *hotspot* olarak tanımlanmış bölgelerde değildir. Mutasyonları farklı aile bireylerinde de saptanmaları sonrasında ailelere ayrıntılı ve bireyselleştirilmiş genetik danışma verilebilmiştir.

Yeni nesil dizileme teknolojileri ile konjenital kataraktlı hastalarda yukarıda tartışılan kristalin genleri dışında diğer kristalin genleri ve lens proteinleri ile ilgili pek çok gende de mutasyonlar saptanmış ve bildirilmiştir.

Yeni nesil dizileme teknolojileri Mendel kalıtmımlı genetik hastalıklarda yüksek bir genetik heterojenite bulunduğu anda başvurulacak en pratik ve maliyet etkin yöntemdir. Böyle hastalıklarda genetik etiyolojiler için toplumlar arasında

farklar olduğunda da, yeni genlerin bulunması, topluma özgü panellerin tasarlanabilmesi için kullanışlıdır. Hatta kurucu etkisinin ve toplum hareketlerinin araştırılmasını planlayan çalışmalara katkıda bulunabilir. Ancak avantajlı yönleri dışında, göz önüne alınması gereken kısıtlılıkları da vardır.

Genel olarak, yeni nesil dizileme teknolojilerinin, eski teknolojilere göre üç temel avantajı bulunmaktadır: DNA fragmanlarının bakteriyel olarak klonlanması yerine hücreden bağımsız yeni nesil dizileme kütüphanelerinin oluşturulabilmesi, milyonlarca sekans reaksiyonunun aynı anda oluşturulabilmesi ve elektroforeze ihtiyaç duymadan baz tanımlamasının yapılabilmesidir (92). Bu teknoloji ile daha uygun bir maliyet ile genom taraması yapılabilmektedir. Yarı-iletken teknolojisinin geliştirilmesiyle, daha düşük maliyetle çok daha hızlı sonuçlar alınmaya başlanmıştır (92). Bu nedenle klinik pratikte de kullanım alanı bulmaya başlamış ve pek çok hastalık için yaygın olarak yeni nesil dizileme verisi elde edilmeye başlanmıştır.

Dizileme çalışmalarında ortaya çıkan ciddi veri yükü, sonuçların yorumlanması ve hastaya aktarılmasında önemli etik, sosyal ve yasal zorluklar yaratmaktadır (96). Bu durum özellikle testin çocuklarda yapılması durumunda daha belirgin hale gelmektedir. Bertier ve ark. tüm ekzom dizilemesindeki bu zorlukları; hastanın tüm ekzom dizilemeye aday olarak seçilmesi, sekans analizi, sonuçların bildirilmesi/danışmanlık ve data tercümesi/data paylaşımı olmak üzere dört kategoriye ayırmıştır (96). Tüm ekzom dizileme teknolojisinin tanı almamış tüm hastalara mı yoksa sadece belirli kriterlere uyan hastalara mı sunulması gerektiği konusunda henüz bir fikir birliği mevcut değildir (96). Test öncesinde, tüm ekzom dizileme ile elde edilecek genomik datanın klinik anlamı ile ilgili olarak hastanın bilgilendirilmesi son derece kritiktir (96). Bu nedenle hangi hastanın tüm ekzom dizilemeden nasıl bir fayda göreceğini belirleyerek teste girecek hastayı seçmek en önemli basamaktır.

Tüm ekzom dizileme sonuçlarının değerlendirilmesinde en önemli basamaklardan biri de varyantın patojenik özellik taşıyıp taşımadığına karar vermektir. Varyantın sıklığı mevcut veri tabanlarında taranır ve klasik bilgi olarak popülasyonda %1'den az görülen varyantlar nadir olarak sınıflandırılır. Ancak varyant sıklığı bir popülasyondan diğerine oldukça değişkenlik göstermekte ve bir

popülasyonda nadir görülen varyant diğer popülasyonda daha sık tanımlanabilmektedir. Patojenik olduğu düşünülen bir varyantın protein yapısını ve fonksiyonunu nasıl etkilediği de araştırılır (86). Tüm ekzom dizileme sonucunda elde edilen varyantların bir kısmının anlamı henüz bilinmiyor olabilir (*unknown significance*, US), patojenik olduğu kesin olarak bilinmesine rağmen araştırılan klinik durum ile ilişkili olmayabilir ve hastanın ilerideki hayatını etkileyebilecek potansiyelde olabilir (*incidental findings*, IF), veya başlangıçta patojenik olmayan olarak sınıflandırılan bir varyant, hakkındaki bilgi birikiminin ve bildirilen vakaların artması ile zaman içerisinde patojenik olarak sınıflandırılabilir ve hastaya verilen danışmanlığın takiplerde değiştirilmesi gerekebilir (96). Bunlar, tüm ekzom dizilemenin sağladığı inanılmaz miktardaki veri yükünün yorumlanmasını, hasta/hasta ailesine aktarılmasını oldukça zorlaştırmaktadır bu nedenle test öncesinde verilerin yorumlanması ile ilgili bilgilendirme ayrıntılı olarak yapılmalıdır.

Varyantın bir protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini belirleyebilmek için veri tabanlarının taranması, analizde en önemli basamaklardan biridir (86). Gerçek patojenik mutasyonlar toplumlarda oldukça nadirdir (86). Bir bireysel genomda sık görülen kompleks bir hastalık ile ilişkili olduğu gösterilen yaklaşık 2000, genetik hastalık ile ilişkili 24-30 varyant bulunmaktadır (86). Tüm ekzom dizileme sonuçlarının yorumlanmasında, varyantın patojenik olup olmadığı, hastalıktan sorumlu olup olmadığı, genel popülasyondaki sıklığının ne olduğu ve benzer hastalık fenotipine sahip hastalarda daha önce tanımlanıp tanımlanmadığı sorularının yanıtlanması gerekmektedir (86).

Yeni nesil dizileme, sağlam bir ıslak laboratuvar altyapısı, biyoinformatik deneyimi ve verilerin klinik tercümesini yapabilmek için ciddi bir bilgi birikimi gerektirmektedir. Çalışmada kullanılan IonTorrent® altyapısının avantajı yarı iletken teknolojisini kullanması, optik tarama ve floresan nükleotidlere ihtiyaç duymaması, hızlı sonuç vermesi iken en önemli dezavantajı homopolimerlerde hata sıklığının fazla olmasıdır (92). Yeni nesil dizileme teknolojisinin gelişmesi ile seneler içerisinde maksimum okuma uzunluğu ve yeni geliştirilen platformlarda çıktı miktarı artmış, genom başı maliyet azalmış ve dizileme süresi önemli ölçüde kısalmıştır (92). Genomun sadece kodlanan kısımlarının sekanslanmasını sağlayan

tüm ekzom dizileme yöntemi yeni nesil dizileme teknolojilerinde oldukça büyük bir öneme sahiptir. Ekzomlar, tüm genomun %2'sinden azını oluşturuyor olsa da hastalık oluşturan varyantların yaklaşık olarak %85'ini içermektedirler (142). Bu nedenle, bu teknolojinin klinik önemi çok büyüktür.

Varyant filtrelemesi, tüm ekzom sekanslamasında kuru laboratuvarın en kritik basamaklarından birisidir. Bu aşamada, kalite skoru düşük varyantlar, yaygın SNP'ler, intergenik ve 3'/5' varyantları, *splice* ile ilişkisiz intronik varyantlar, sinonim varyantlar elenir ve filtreleme temel olarak aile öyküsü ve muhtemel kalıtım paternine göre şekillendirilir (88). Ancak, her bir bireyin genomunun, referans genomdan ortalama on bin potansiyel mutasyon açısından sapma olasılığı vardır bu nedenle nedensel mutasyonu bulmak oldukça zordur (135, 143).

LaDuca ve ark. tüm ekzom sekanslamasının Mendelyan hastalıklarda yeni nesil dizileme panelleri ile karşılaştırılabilir tanısallığa başarıya sahip olduğunu ve bu panellerin tanımladığı mutasyonların %98'inden fazlasını kapsadığını belirtmişlerdir (88). Patojenik varyant tanınması en yüksek Marfan sendromunda en düşük ise X'e bağlı zihinsel yetersizlikte bulunmuştur (88). Düşük kapsamaya sahip olan patojenik varyantlar ağırlıklı olarak GC zengin bölgelerde, repetitif bölgelerde ve psödogen etkileşimi olan bölgelerde gösterilse de bazı patojenik varyantların niye düşük ekzom kapsamına sahip olduğu açıklanamamıştır (88). Bazı hastalıklarda kapsama ve maliyet nedeniyle yeni nesil dizileme panel testlerinin ilk basamakta tercih edilebileceğini belirtmişlerdir (88). Ancak yeni genlerin tanımlanabilme olasılığı tüm ekzom dizilemenin panel testlere üstünlüğüdür ve klinik fenotipin çok net olmadığı hastalıklarda tüm ekzom dizileme panel testlere göre öncelik kazanabilir (88).

Tüm ekzom dizileme ile elde edilen verilerin mevcut veri tabanlarında varyant patojenitesi, aminoasit dizilimi ve protein fonksiyonu üzerindeki etkileri açısından araştırılması ıslak laboratuvar sonrasında en önemli ve aslında en fazla zaman alan kısımdır. Bizim hastalarımızda bulduğumuz mutasyonların tümü daha önce hastalık nedeni olarak bildirilmiş genlerde tanımlanmıştır. Ancak böyle olmadığında, varyantın sıklığı, evrimsel olarak korunması veya etkilerinin protein fonksiyonu açısından oldukça yıkıcı olması tek başına patojen olarak değerlendirilmesi için yeterli değildir. Ayrıca, her varyantın penetransının %100



olmaması olasılığı, popülasyonlar arasında önemli farklılıklar göstermesi veya zaman içerisinde yeni etkilerinin saptanma olasılığı nedeniyle sürekli olarak fonksiyon güncellemesi yapılması gerekliliği kuru laboratuvar kısmının oldukça zorlayıcı olmasına katkıda bulunmaktadır.

Tüm ekzom sekanslamasında, ıslak laboratuvar sonrasında elde edilen verilerin değerlendirilmesi bir başka deyişle sekans varyantlarının sınıflandırılması oldukça önemli ve zaman alan bir süreçtir. Varyantların (1) patojenik, (2) muhtemel patojenik, (3) önemi bilinmeyen, (4) muhtemel benign ve (5) benign olarak sınıflandırılması önerilmektedir (94). Ancak ‘‘muhtemel’’ tanımının tam bir niceliksel karşılığı olmadığı gibi varyantın diğer sınıflara yerleştirilmesinde de sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Tüm laboratuvarların ortak uluslararası terminolojiyi kullanması ve ayrıca popülasyon veri tabanlarının, hastalık veri tabanlarının, *in silico* programların, diğer laboratuvarların veri tabanlarının; güncellikleri, hasta dahil etme kriterleri ve deneyimleri göz önünde bulundurularak referans alınması gerekmektedir. Hastanın pedigrisi ve bulunan veriler ile varyantın klinik önemi tespit edilirken *de novo* değişiklikler, düşük penetrans ve değişken ekspresivitenin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu nedenle sadece tüm ekzom dizileme verileri için değil tüm genom dizileme, gen panelleri, epigenetik ve transkriptom analizleri için de popülasyon verisi, *in silico* veriler, fonksiyonel veriler, segregasyon verileri, *de novo* veriler, allelik veriler ve saygın laboratuvarların verileri göz önünde bulundurularak varyantın olası etkisi ile hangi sınıfta değerlendirilebileceğine dair uluslararası standartlar geliştirilmeye çalışılmıştır (94). Ancak standartlar uygulanırken sistemin bazı hatalara açık olduğu görülmüş ve var olan kriterlerin genişletilmesi, kişisel değerlendirme hatalarının daha aza indirgenmesi, daha keskin ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi için yarı niceliksel, hiyerarşik, ve kanıta dayalı lokus yorumlaması şeklinde (*Sherloc: semiquantitative, hierarchical evidence-based rules for locus interpretation*) yeni düzenlemeler önerilmiştir (144). Sonuç olarak, sadece sekans verisinin elde edilmesi yetmemektedir. Bu verinin standartlar doğrultusunda yorumlanması ve bildirilmesi gereklidir ve mevcut sistemlerin hataya açık olabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle sistemin kendini yenilemesi ve güncellenmeye açık olması gerekmektedir.

Tüm ekzom sekanslama ile hastaların aslında %25-40'ında hastalığın genetik temeli aydınlatılabilmektedir (145). Özellikle maliyetin ciddi bir kısıtlayıcı olduğu durumlarda hasta seçimi önem kazanmaktadır. Trio analizlerinde tanısal başarı sıklığı artıyor olsa da sadece etkilenmiş bireylerin çalışılması da kabul edilebilir oranda tanı konulmasını sağlamaktadır. Otozomal resesif hastalıklarda etkilenmiş kardeşler ile ebeveynlerden birinin, akraba evliliklerinde ise etkilenmiş bir veya daha fazla bireyin çalışılması mümkündür (145). Sawyer ve ark. çocukluk çağı başlangıçlı geniş bir hastalık spektrumuna sahip bireylerden oluşan FORGE Kanada Konsorsiyumu'nu WES ile değerlendirmişler ve bilinen genlerde tanı sıklığını %23-34, tek birey incelendiğinde %23, kardeş incelemelerinde %32 ve akraba evliliği olan aileler veya izole popülasyonlarda ise %34 olarak saptamışlardır (145). Ayrıca, bu hastalarda WES öncesinde moleküler tanının konulamama nedenlerini araştırmışlardır (145). Bu nedenlerin başında hastalığın genetik heterojeniteye sahip olması gelirken, bunu atipik klinik fenotip, diğer yöntemlerde muhtemel laboratuvar hatasına bağlı olarak mutasyonun gözden kaçırılması ve hastalığın çok nadir olması gibi nedenler izlemiştir (145).

Konjenital katarakt gibi genotipik ve fenotipik olarak heterojenitesi yüksek olan hastalıklarda moleküler etiolojinin aydınlatılmasında yeterli olmayabilir ve bulunan varyantlar Sanger ile valide edilemeyebilir. Böyle durumlarda intronik bölge mutasyonları ve epigenetik değişikliklerin de göz önünde bulundurulması gerekebilir (146). WES'in yetersiz kaldığının düşünüldüğü durumlarda tüm genom dizilemesi seçeneği değerlendirilebilir.

WES ile tanı konulamayan hastalarda başka etkilenen bireylerin veya etkilenmemiş ebeveynlerin incelenmesi geniş popülasyon varyant kontrol veri tabanlarının değerlendirilmesi veya tüm genom veya RNA dizilemesi gibi ek genomik teknolojilerden faydalanılması tanı konulma sıklığını arttırabilir (145).

WES sadece tanı konulmasında değil aynı zamanda bazı hastalıklarda kişiye özel tedavilerin belirlenmesinde de kritik role sahiptir (145). Epilepsi ve zihinsel yetersizlik tanısı ile takip edilen iki kardeşte WES ile otozomal resesif folat transportu eksikliğinin tanımlanması sonucunda folinik asit tedavisi ile olumlu

sonuçların alınması WES verisi ile tedavi planlarının değiştirilmesine verilebilecek örneklerden birisidir (145, 147).

Musleh ve ark. yeni nesil dizileme teknolojilerinin konjenital katarakt klinik pratiğine entegre edilip edilemeyeceğini değerlendirdikleri çalışmalarında, pediatrik oftalmoloji ekibi tarafından hasta ilk görüldüğü anda genetik ekibine haber verilmesinin, onam alınarak kan örneğinin alınmasının ve konjenital katarakt örneklerine öncelik verilmesinin tanı zamanını kısaltabileceği belirtmişlerdir (148). Ayrıca, bir örneğin acil şartlarda üç hafta içerisinde çalışılabilmesinin mümkün olduğunu, iletişim aksaklıklarının gecikmeye neden olabileceğini de vurgulamışlardır (148). Hastanın kanının nerede ve kimler tarafından alınacağı konusundaki belirsizliğin tanıda gecikmeye neden olabileceği bu nedenle oftalmologların genetikçilere yönlendirmek yerine testi kendilerinin sunabileceği önerisinde de bulunmuşlardır (148). Aylık toplantılar ile tüm ekibin bir araya gelmesinin işbirliğinin hızlanmasını ve aksaklıkların zamanında tespit edilerek çözümlenmesini sağlayabileceğini belirtmişlerdir (148). Bu şekilde kan örneği alma süresinin 137 günden 23 güne, yeni nesil dizileme sonuçlarını verme zamanının ise 340 günden 120 güne düşürülebildiğini ve altı ay içerisinde sonuç verilebilen hasta miktarının %26'dan %71'e çıktığını göstermişlerdir (148).

Konjenital katarakt da dahil olmak üzere tüm genetik hastalıklarda moleküler tanının konulmasında en önemli basamak klinisyen ve genetikçi arasındaki işbirliğidir. Klinisyenin ayrıntılı fenotip tanımlaması sonraki basamaklara zemin teşkil edeceği için son derece önemlidir. Kuru laboratuvar aşamasında klinisyen ve genetikçinin sık sık fikir alışverişinde bulunması olası genotip-fenotip korelasyonlarının tartışılması, varyantların önceliklendirilmesi, gerekirse derin fenotipleme yapılması ve en uygun algoritmanın izlenmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda herhangi bir metabolik ve genetik sendrom ile ilişkilendirilememiş bilateral konjenital kataraktı olan tüm bireylerde kristalin genlerinde mutasyon saptanmış ve tüm ekzom verisi elde edilmiştir. Mutasyonlar WES ile probandlarda *CRYBA1*, *CRYBB3*, *CRYGC* ve *CRYGD* genlerinde saptanmış ve Sanger ile doğrulanmış, ayrıca ailelerde diğer seçilmiş etkilenmiş bireylerde de

gösterilmiştir. Saptanan mutasyonların, bilinen genlerde olmasına rağmen bildirilmiş mutasyonlardan farklı olması, literatürde bildirilmiş genlerdeki farklı mutasyonların farklı katarakt morfolojilerine neden olması popülasyonlara özgü genetiğin önemini de ortaya çıkarmaktadır. Çalışmamız ülkemizde konjenital katarakt genetik altyapısına ait bir tüm ekzom sekanslama verisi içermektedir. Bu veri, ileride yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar için zemin oluşturma ve yönlendirme potansiyeline sahip olacaktır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1-Herhangi bir metabolik veya genetik hastalık veya sendrom ile ilişkilendirilememiş konjenital kataraktı olan dört hastada tüm ekzom sekanslama yapılmıştır. Hasta ailelerinin tümünde birden fazla etkilenmiş birey ancak yalnızca birinde akraba evliliği vardır.

2- Hastaların tümünde daha önce konjenital kataraktla ilişkisi bildirilmiş olan kristalin genlerinde mutasyon bulunduğu saptanmıştır: *CRYBA1* geninde c.215+1G>A, *CRYGC* geninde c.432C>G, *CRYGD* geninde c.70C>A ve *CRYBB3* geninde c.466G>A mutasyonu bulunmuş ve Sanger dizileme ile doğrulanmıştır.

3-Hasta ailelerinde segregasyon çalışması yapılmış ve bulunan mutasyonların nedenselliği doğrulanmıştır. Ailelerde, anne-baba dışında, seçilmiş etkilenmiş bireylerde de mutasyonların varlığı gösterilmiştir.

4-*CRYBA1* genindeki mutasyonların eksik penetrans gösterebileceği 1 no'lu bireyin ailesinde gösterilmiştir. Ayrıca *CRYBA1* mutasyonu saptanan hastada persistan hiperplastik primer vitreus tablosunun bulunmaması ve katarakt tipinin literatürdeki hastalarla aynı olmaması değişken ekspresyon olabileceğini ve genotip-fenotip korelasyonunun tam olarak kurulamayacağını düşündürmüştür.

5-Hastalarımızdaki katarakt tiplerinin, literatürde sorumlu genlerdeki mutasyonlarla bildirilmiş katarakt tipi ile her zaman aynı olmaması değişken ekspresyon olabildiğinin ve genotip-fenotip korelasyonunun tam olarak kurulamayacağını düşündürmüştür.

6-Çalışmamızda incelenen az sayıda izole konjenital katarakt hastasında, bu fenotipe yol açabilecek ve daha önceden bilinmeyen yeni bir genetik mutasyon bulunmamıştır. Ancak toplumların kendilerine özgü popülasyon genetiği dinamikleri nedeniyle böyle genler ve mutasyonlar barındırabilecekleri göz önünde tutulduğunda, günümüzde yeni genlerin keşfini olanaklı kılan en pratik yöntem tüm ekzom dizileme analizidir.

7-Çalışmamızda hasta sayısı çok az ve ailelerden yalnızca birinde akraba evliliği olmakla birlikte, tüm ailelerdeki genetik etiyolojinin yeni bir metabolik hastalık veya genetik sendrom ile ilişkili olmayan, kristalinleri kodlayan genlerde heterozigot mutasyonlar şeklinde olması, bu genlerin sendromik olmayan konjenital kataraktların önemli bir kısmından sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

8-Ülkemizde ilk kez izole konjenital katarakt hastalarında tüm ekzom dizilemesi verisi elde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ülkemizde konjenital katarakt ile ilişkili diğer çalışmalar için bir referans olabilecektir.

9-Çalışmamızda hasta sayısının az olmasına karşın, tüm hastalarda kristalin genlerinde mutasyon saptanması dolayısıyla, ülkemizde konjenital katarakt etiyolojisine yönelik yapılacak genetik çalışmalarda öncelikle bu genlere bakılması gerektiği düşünülmüştür.

10-Ailelere verilen genetik danışmanlık, bulgular doğrultusunda ayrıntılandırılmış ve bireyselleştirilmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Foster A, Gilbert C. Epidemiology of childhood blindness. *Eye (Lond)*. 1992;6(Pt 2):173-6.
2. Francis PJ, Moore AT. Genetics of childhood cataract. *Curr Opin Ophthalmol*. 2004;15(1):10-5.
3. Francis PJ, Berry V, Hardcastle AJ, Maher ER, Moore AT, Bhattacharya SS. A locus for isolated cataract on human Xp. *J Med Genet*. 2002;39(2):105-9.
4. Wu X, Long E, Lin H, Liu Y. Prevalence and epidemiological characteristics of congenital cataract: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:28564.
5. Haargaard B, Wohlfahrt J, Fledelius HC, Rosenberg T, Melbye M. A nationwide Danish study of 1027 cases of congenital/infantile cataracts: etiological and clinical classifications. *Ophthalmology*. 2004;111(12):2292-8.
6. Bateman JB, Spence MA, Marazita ML, Sparkes RS. Genetic linkage analysis of autosomal dominant congenital cataracts. *Am J Ophthalmol*. 1986;101(2):218-25.
7. Li J, Xia CH, Wang E, Yao K, Gong X. Screening, genetics, risk factors, and treatment of neonatal cataracts. *Birth Defects Res*. 2017;109(10):734-43.
8. Thylefors B. A global initiative for the elimination of avoidable blindness. *Community Eye Health*. 1998;11(25):1-3.
9. Foster A, Gilbert C, Rahi J. Epidemiology of cataract in childhood: a global perspective. *J Cataract Refract Surg*. 1997;23:601-4.
10. Khandekar R. Visual disabilities in children including childhood blindness. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2008;15(3):129-34.
11. Bassnett S, Sikic H. The lens growth process. *Prog Retin Eye Res*. 2017;60:181-200.
12. Kugelberg U, Zetterstrom C, Syren-Nordqvist S. Ocular axial length in children with unilateral congenital cataract. *Acta Ophthalmol Scand*. 1996;74(3):220-3.
13. Trivedi RH, Wilson ME. Biometry data from caucasian and african-american cataractous pediatric eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4671-8.
14. Augusteyn RC. Growth of the human eye lens. *Mol Vis*. 2007;13:252-7.
15. Forrester JV, Dick AD, McMenemy PG, Roberts F. *The Eye: Basic sciences in practice. Embryology and early development of the eye and adnexa*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2008.
16. Smelser GK. *Embryology and Morphology of the Lens*. *Invest Ophthalmol*. 1965;4:398-410.
17. Forrester JV, Dick AD, McMenemy PG, Roberts F. *The Eye: Basic sciences in practice. Biochemistry and cell biology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2008.

18. Shi Y, De Maria A, Lubura S, Sikic H, Bassnett S. The penny pusher: a cellular model of lens growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;56(2):799-809.
19. Sikic H, Shi Y, Lubura S, Bassnett S. A full lifespan model of vertebrate lens growth. *R Soc Open Sci.* 2017;4(1):160695.
20. Lin H, Ouyang H, Zhu J, Huang S, Liu Z, Chen S, et al. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature.* 2016;531(7594):323-8.
21. Bassnett S. On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens. *Exp Eye Res.* 2009;88(2):133-9.
22. Hejtmancik JF, Riazuddin SA, McGreal R, Liu W, Cvekl A, Shiels A. Lens Biology and Biochemistry. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:169-201.
23. De Maria A, Wilmarth PA, David LL, Bassnett S. Proteomic Analysis of the Bovine and Human Ciliary Zonule. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(1):573-85.
24. Liu JP, Schlosser R, Ma WY, Dong Z, Feng H, Lui L, et al. Human alphaA- and alphaB-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKCalpha, RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways. *Exp Eye Res.* 2004;79(6):393-403.
25. Kamradt MC, Chen F, Cryns VL. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16059-63.
26. Andley UP, Patel HC, Xi JH. The R116C mutation in alpha A-crystallin diminishes its protective ability against stress-induced lens epithelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10178-86.
27. Chen J, Toptygin D, Brand L, King J. Mechanism of the efficient tryptophan fluorescence quenching in human gammaD-crystallin studied by time-resolved fluorescence. *Biochemistry.* 2008;47(40):10705-21.
28. Slingsby C, Croft LR. Developmental changes in the low molecular weight proteins of the bovine lens. *Exp Eye Res.* 1973;17(4):369-76.
29. Bhat SP, Nagineni CN. alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;158:319-25.
30. Dubin RA WE, Piatigorsky J. Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol* 1989;9(3):1083-91.
31. Kato K, Shinohara H, Kurobe N, Goto S, Inaguma Y, Ohshima K. Immunoreactive alpha A crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1080(2):173-80.
32. Scheuring S, Buzhynskyy N, Jaroslowski S, Goncalves RP, Hite RK, Walz T. Structural models of the supramolecular organization of AQP0 and connexons in junctional microdomains. *J Struct Biol.* 2007;160(3):385-94.



33. Mathias RT, Rae JL, Baldo GJ. Physiological properties of the normal lens. *Physiol Rev.* 1997;77(1):21-50.
34. Lee A, Fischer RS, Fowler VM. Stabilization and remodeling of the membrane skeleton during lens fiber cell differentiation and maturation. *Dev Dyn.* 2000;217(3):257-70.
35. Matsuyama M, Tanaka H, Inoko A, Goto H, Yonemura S, Kobori K, et al. Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J Biol Chem.* 2013;288(50):35626-35.
36. Li B, Liu Y, Liu Y, Guo H, Hu Z, Xia K, et al. Identification of a GJA3 Mutation in a Large Family with Bilateral Congenital Cataract. *DNA Cell Biol.* 2016;35(3):135-9.
37. White TW. Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science.* 2002;295(5553):319-20.
38. Goodenough DA. The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin Cell Biol.* 1992;3(1):49-58.
39. Trayhurn P, Van Heyningen R. The role of respiration in the energy metabolism of the bovine lens. *Biochem J.* 1972;129(2):507-9.
40. Kinoshita JH. Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Invest Ophthalmol.* 1965;4(5):786-99.
41. Lou MF. Redox regulation in the lens. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(5):657-82.
42. VN R. Glutathione and its function in the lens—an overview. *Exp Eye Res.* 1990;50(6):771-8.
43. Pau H, Graf P, Sies H. Glutathione levels in human lens: regional distribution in different forms of cataract. *Exp Eye Res.* 1990;50(1):17-20.
44. Liu YC, Wilkins M, Kim T, Malyugin B, Mehta JS. Cataracts. *Lancet.* 2017;390(10094):600-12.
45. Messina-Baas O, Gonzalez-Garay ML, Gonzalez-Huerta LM, Toral-Lopez J, Cuevas-Covarrubias SA. Whole Exome Sequencing Reveals a Mutation in CRYBB2 in a Large Mexican Family with Autosomal Dominant Pulverulent Cataract. *Mol Syndromol.* 2016;7(2):87-92.
46. Lund AM, Eiberg H, Rosenberg T, Warburg M. Autosomal dominant congenital cataract; linkage relations; clinical and genetic heterogeneity. *Clin Genet.* 1992;41(2):65-9.
47. Gilbert CE, Canovas R, Hagan M, Rao S, Foster A. Causes of childhood blindness: results from west Africa, south India and Chile. *Eye (Lond).* 1993;7 ( Pt 1):184-8.
48. Pichi F, Lembo A, Serafino M, Nucci P. Genetics of Congenital Cataract. *Dev Ophthalmol.* 2016;57:1-14.

49. Rahi JS, Dezateux C. Congenital and infantile cataract in the United Kingdom: underlying or associated factors. British Congenital Cataract Interest Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(8):2108-14.
50. Reis LM, Semina EV. Genetic landscape of isolated pediatric cataracts: extreme heterogeneity and variable inheritance patterns within genes. *Hum Genet.* 2019 ;138(8-9):847-63.
51. Deng H, Yuan L. Molecular genetics of congenital nuclear cataract. *Eur J Med Genet.* 2014;57(2-3):113-22.
52. Santana A, Waiswo M. The genetic and molecular basis of congenital cataract. *Arq Bras Oftalmol.* 2011;74(2):136-42.
53. Shiels A, Hejtmancik JF. Molecular Genetics of Cataract. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:203-18.
54. Shiels A BT, Hejtmancik JF. Cat-Map: putting cataract on the map. *Mol Vis.* 2010;16:2007-15.
55. Gillespie RL, O'Sullivan J, Ashworth J, Bhaskar S, Williams S, Biswas S, et al. Personalized diagnosis and management of congenital cataract by next-generation sequencing. *Ophthalmology.* 2014;121(11):2124-37 e1-2.
56. Ma AS, Grigg JR, Ho G, Prokudin I, Farnsworth E, Holman K, et al. Sporadic and Familial Congenital Cataracts: Mutational Spectrum and New Diagnoses Using Next-Generation Sequencing. *Human Mutat.* 2016;37(4):371-84.
57. Zhai Y, Li J, Yu W, Zhu S, Yu Y, Wu M, et al. Targeted Exome Sequencing of Congenital Cataracts Related Genes: Broadening the Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlations in 27 Chinese Han Families. *Sci Rep.* 2017;7(1):1219.
58. Sun W, Xiao X, Li S, Guo X, Zhang Q. Exome sequencing of 18 Chinese families with congenital cataracts: a new sight of the NHS gene. *PloS One.* 2014;9(6):e100455.
59. Lambert SR. Cataract and persistent hyperplastic primary vitreous. Taylor D, Hoyt GS, eds. *Pediatric Ophthalmology and Strabismus.* 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
60. VanderVeen DK. Pediatric cataract and other lens abnormalities. Wright KW, ed. *Pediatric Ophthalmology and Strabismus.* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford; 2012.
61. Perucho-Martinez S, De-la-Cruz-Bertolo J, Tejada-Palacios P. [Pediatric cataracts: epidemiology and diagnosis. Retrospective review of 79 cases]. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007;82(1):37-42.
62. Lin H, Lin D, Liu Z, Long E, Wu X, Cao Q, et al. A Novel Congenital Cataract Category System Based on Lens Opacity Locations and Relevant Anterior Segment Characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(14):6389-95.
63. Mackay D, Ionides A, Kibar Z, Rouleau G, Berry V, Moore A, et al. Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am J Hum Genet.* 1999;64(5):1357-64.

64. Rees MI, Watts P, Fenton I, Clarke A, Snell RG, Owen MJ, et al. Further evidence of autosomal dominant congenital zonular pulverulent cataracts linked to 13q11 (CZP3) and a novel mutation in connexin 46 (GJA3). *Hum Genet.* 2000;106(2):206-9.
65. Yao K, Wang W, Zhu Y, Jin C, Shentu X, Jiang J, et al. A novel GJA3 mutation associated with congenital nuclear pulverulent and posterior polar cataract in a Chinese family. *Hum Mutat.* 2011;32(12):1367-70.
66. Zhu Y, Yu H, Wang W, Gong X, Yao K. A novel GJA8 mutation (p.V44A) causing autosomal dominant congenital cataract. *PLoS One.* 2014;9(12):e115406.
67. Yu Y, Wu M, Chen X, Zhu Y, Gong X, Yao K. Identification and functional analysis of two novel connexin 50 mutations associated with autosome dominant congenital cataracts. *Sci Rep.* 2016;6:26551.
68. Shi Y, Barton K, De Maria A, Petrash JM, Shiels A, Bassnett S. The stratified syncytium of the vertebrate lens. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 10):1607-15.
69. Maher GJ, Black GC, Manson FD. Focus on molecules: lens intrinsic membrane protein (LIM2/MP20). *Exp Eye Res.* 2012;103:115-6.
70. Park JE, Son AI, Hua R, Wang L, Zhang X, Zhou R. Human cataract mutations in EPHA2 SAM domain alter receptor stability and function. *PLoS One.* 2012;7(5):e36564.
71. Shi Y, De Maria A, Bennett T, Shiels A, Bassnett S. A role for epha2 in cell migration and refractive organization of the ocular lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(2):551-9.
72. Cheng C, Ansari MM, Cooper JA, Gong X. EphA2 and Src regulate equatorial cell morphogenesis during lens development. *Development.* 2013;140(20):4237-45.
73. Brooks SP, Coccia M, Tang HR, Kanuga N, Machesky LM, Bailly M, et al. The Nance-Horan syndrome protein encodes functional WAVE homology domain (WHD) and is important for co-ordinating actin remodelling and maintaining cell morphology. *Hum Mol Genet.* 2010;19(12):2421-32.
74. Song S, Landsbury A, Dahm R, Liu Y, Zhang Q, Quinlan RA. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1837-48.
75. Lu ZQ, Sun WH, Yan J, Jiang TX, Zhai SN, Li Y. Cigarette smoking, body mass index associated with the risks of age-related cataract in male patients in northeast China. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(3):317-22.
76. Fudge DS, McCuaig JV, Van Stralen S, Hess JF, Wang H, Mathias RT, et al. Intermediate filaments regulate tissue size and stiffness in the murine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3860-7.
77. Muller M, Bhattacharya SS, Moore T, Prescott Q, Wedig T, Herrmann H, et al. Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum Mol Genet.* 2009;18(6):1052-7.

78. Chen J, Ma Z, Jiao X, Fariss R, Kantorow WL, Kantorow M, et al. Mutations in FYCO1 cause autosomal-recessive congenital cataracts. *Am J Hum Genet.* 2011;88(6):827-38.
79. Yuan L, Yi J, Lin Q, Xu H, Deng X, Xiong W, et al. Identification of a PRX variant in a Chinese family with congenital cataract by exome sequencing. *QJM.* 2016;109(11):731-5.
80. Coccia M, Brooks SP, Webb TR, Christodoulou K, Wozniak IO, Murday V, et al. X-linked cataract and Nance-Horan syndrome are allelic disorders. *Hum Mol Genet.* 2009;18(14):2643-55.
81. Zhang X, Zhang Q, Tong Y, Dai H, Zhao X, Bai F, Xu L, Li Y. Large novel deletions detected in Chinese families with aniridia: correlation between genotype and phenotype. *Mol Vis.* 2011;17:548-57.
82. Plager DA, Lynn MJ, Buckley EG, Wilson ME, Lambert SR, Infant Aphakia Treatment Study G. Complications, adverse events, and additional intraocular surgery 1 year after cataract surgery in the infant Aphakia Treatment Study. *Ophthalmology.* 2011;118(12):2330-4.
83. Jensen AA, Basti S, Greenwald MJ, Mets MB. When may the posterior capsule be preserved in pediatric intraocular lens surgery? *Ophthalmology.* 2002;109(2):324-7;discussion 8.
84. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
85. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet.* 2017;18(1):14.
86. Smith M. DNA Sequence Analysis in Clinical Medicine, Proceeding Cautiously. *Front Mol Biosci.* 2017;4:24.
87. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
88. LaDuca H, Farwell KD, Vuong H, Lu HM, Mu W, Shahmirzadi L, et al. Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels. *PloS One.* 2017;12(2):e0170843.
89. Majewski J SJ, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet.* 2011;48(9):580-9.
90. Kuhlenbaumer G, Hullmann J, Appenzeller S. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat.* 2011;32(2):144-51.
91. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:228-37.
92. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418-26.

93. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
94. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
95. Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1932-41.
96. Bertier G, Senecal K, Borry P, Vears DF. Unsolved challenges in pediatric whole-exome sequencing: A literature analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(2):134-42.
97. Atwal PS, Brennan ML, Cox R, Niaki M, Platt J, Homeyer M, et al. Clinical whole-exome sequencing: are we there yet? *Genet Med*. 2014;16(9):717-9.
98. Sheeladevi S, Lawrenson JG, Fielder AR, Suttle CM. Global prevalence of childhood cataract: a systematic review. *Eye (Lond)*. 2016;30(9):1160-9.
99. Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(2):134-49.
100. Lambert SR, Drack AV. Infantile cataracts. *Surv Ophthalmol*. 1996;40(6):427-58.
101. Rahi JS, Dezateux C, British Congenital Cataract Interest G. Measuring and interpreting the incidence of congenital ocular anomalies: lessons from a national study of congenital cataract in the UK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(7):1444-8.
102. Turan A, Recep ÖF, Abdik O, Karaatlı SM, Hasırıpı H. Türkiye’de çocukluk çağı körlükleri: Görme Engelliler Okullarındaki Tarama Sonuçları. *T Oft Gaz* 2002;32(3):397-400.
103. Gasper C, Trivedi RH, Wilson ME. Complications of Pediatric Cataract Surgery. *Dev Ophthalmol*. 2016;57:69-84.
104. Huang B, He W. Molecular characteristics of inherited congenital cataracts. *Eur J Med Genet*. 2010;53(6):347-57.
105. Zhang J, Zhang Y, Fang F, Mu W, Zhang N, Xu T, et al. Congenital cataracts due to a novel 2-bp deletion in CRYBA1/A3. *Mol Med Rep*. 2014;10(3):1614-8.
106. Kannabiran C, Rogan PK, Olmos L, Basti S, Rao GN, Kaiser-Kupfer M, et al. Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the betaA3/A1-crystallin gene. *Mol Vis*. 1998;4:21.
107. Kantorow M HJ, Sergeev YV, Hejtmancik JF, Piatigorsky J. Extralenticular expression, cAMP-dependent kinase phosphorylation of BB2-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:S205 (ARVO abstract).
108. Srivastava OP SS. Purification and characterization of a sodium deoxycholate-activatable proteinase activity, possibly associated with BA3/BA1-crystallin from human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:S421 (ARVO abstract).

109. Zigler JS, Jr., Valapala M, Shang P, Hose S, Goldberg MF, Sinha D. betaA3/A1-crystallin and persistent fetal vasculature (PFV) disease of the eye. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(1 Pt B):287-98.
110. Wang KJ, Zha X, Chen DD, Zhu SQ. Mutation Analysis of Families with Autosomal Dominant Congenital Cataract: A Recurrent Mutation in the CRYBA1/A3 Gene Causing Congenital Nuclear Cataract. *Curr Eye Res*. 2018;43(3):304-7.
111. Mohebi M, Akbari A, Babaei N, Sadeghi A, Heidari M. Identification of a De Novo 3bp Deletion in CRYBA1/A3 Gene in Autosomal Dominant Congenital Cataract. *Acta Med Iran*. 2016;54(12):778-83.
112. Zhu Y, Shentu X, Wang W, Li J, Jin C, Yao K. A Chinese family with progressive childhood cataracts and IVS3+1G>A CRYBA3/A1 mutations. *Mol Vis*. 2010;16:2347-53.
113. Reddy MA, Bateman OA, Chakarova C, Ferris J, Berry V, Lomas E, et al. Characterization of the G91del CRYBA1/3-crystallin protein: a cause of human inherited cataract. *Hum Mol Genet*. 2004;13(9):945-53.
114. Yu Y, Li J, Xu J, Wang Q, Yu Y, Yao K. Congenital polymorphic cataract associated with a G to A splice site mutation in the human beta-crystallin gene CRYbetaA3/A1. *Mol Vis*. 2012;18:2213-20.
115. Yang Z, Su D, Li Q, Yang F, Ma Z, Zhu S, et al. A novel T-->G splice site mutation of CRYBA1/A3 associated with autosomal dominant nuclear cataracts in a Chinese family. *Mol Vis*. 2012;18:1283-8.
116. Gu Z, Ji B, Wan C, He G, Zhang J, Zhang M, et al. A splice site mutation in CRYBA1/A3 causing autosomal dominant posterior polar cataract in a Chinese pedigree. *Mol Vis*. 2010;16:154-60.
117. Yang G ZX, Zhao J. A recurrent mutation in CRYBA1 is associated with an autosomal dominant congenital nuclear cataract disease in a Chinese family. *Mol Vis*. 2011;17:1559-63.
118. Qi Y, Jia H, Huang S, Lin H, Gu J, Su H, et al. A deletion mutation in the betaA1/A3 crystallin gene (CRYBA1/A3) is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. *Hum Genet*. 2004;114(2):192-7.
119. Ferrini W, Schorderet DF, Othenin-Girard P, Uffer S, Heon E, Munier FL. CRYBA3/A1 gene mutation associated with suture-sparing autosomal dominant congenital nuclear cataract: a novel phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1436-41.
120. Lu S, Zhao C, Jiao H, Kere J, Tang X, Zhao F, et al. Two Chinese families with pulverulent congenital cataracts and deltaG91 CRYBA1 mutations. *Mol Vis*. 2007;13:1154-60.
121. Sun W, Xiao X, Li S, Guo X, Zhang Q. Mutation analysis of 12 genes in Chinese families with congenital cataracts. *Mol Vis*. 2011;17:2197-206.

122. Chen J, Wang Q, Cabrera PE, Zhong Z, Sun W, Jiao X, et al. Molecular Genetic Analysis of Pakistani Families With Autosomal Recessive Congenital Cataracts by Homozygosity Screening. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(4):2207-17.
123. Jiao X, Kabir F, Irum B, Khan AO, Wang Q, Li D, et al. A Common Ancestral Mutation in CRYBB3 Identified in Multiple Consanguineous Families with Congenital Cataracts. *PloS One.* 2016;11(6):e0157005.
124. Li D, Wang S, Ye H, Tang Y, Qiu X, Fan Q, et al. Distribution of gene mutations in sporadic congenital cataract in a Han Chinese population. *Mol Vis.* 2016;22:589-98.
125. Reis LM, Tyler RC, Muheisen S, Raggio V, Salviati L, Han DP, et al. Whole exome sequencing in dominant cataract identifies a new causative factor, CRYBA2, and a variety of novel alleles in known genes. *Hum Genet.* 2013;132(7):761-70.
126. Hansen L, Mikkelsen A, Nurnberg P, Nurnberg G, Anjum I, Eiberg H, et al. Comprehensive mutational screening in a cohort of Danish families with hereditary congenital cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(7):3291-303.
127. Riazuddin SA, Yasmeen A, Yao W, Sergeev YV, Zhang Q, Zulfiqar F, et al. Mutations in betaB3-crystallin associated with autosomal recessive cataract in two Pakistani families. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(6):2100-6.
128. Zhang L FS, Ou Y, Zhao T, Su Y, Liu P. A novel nonsense mutation in CRYGC is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataracts and microcornea. *Mol Vis.* 2009;15:276-82.
129. Yao K, Jin C, Zhu N, Wang W, Wu R, Jiang J, et al. A nonsense mutation in CRYGC associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. *Mol Vis.* 2008;14:1272-6.
130. Gonzalez-Huerta LM, Messina-Baas O, Urueta H, Toral-Lopez J, Cuevas-Covarrubias SA. A CRYGC gene mutation associated with autosomal dominant pulverulent cataract. *Gene.* 2013;529(1):181-5.
131. Vanita V, Singh D. A missense mutation in CRYGD linked with autosomal dominant congenital cataract of aculeiform type. *Mol Cell Biochem.* 2012;368(1-2):167-72.
132. Yang G, Chen Z, Zhang W, Liu Z, Zhao J. Novel mutations in CRYGD are associated with congenital cataracts in Chinese families. *Sci Rep.* 2016;6:18912.
133. Zhuang X WL, Song Z, Xiao W. A Novel Insertion Variant of CRYGD Is Associated with Congenital Nuclear Cataract in a Chinese Family. *PloS One.* 2015;10(7):e0131471.
134. Zhai Y, Li J, Zhu Y, Xia Y, Wang W, Yu Y, et al. A nonsense mutation of gammaD-crystallin associated with congenital nuclear and posterior polar cataract in a Chinese family. *Int J Med Sci.* 2014;11(2):158-63.
135. Jia X, Zhang F, Bai J, Gao L, Zhang X, Sun H, et al. Combinational analysis of linkage and exome sequencing identifies the causative mutation in a Chinese family with congenital cataract. *BMC Med Genet.* 2013;14:107.

136. VanderVeen DK, Andrews C, Nihalani BR, Engle EC. Crystalline cataract caused by a heterozygous missense mutation in gammaD-crystallin (CRYGD). *Mol Vis.* 2011;17:3333-8.
137. de Figueiredo ES, Giordano GG, Tavares A, da Silva MJ, de Vasconcellos JP, Arieta CE, et al. Novel human CRYGD rare variant in a Brazilian family with congenital cataract. *Mol Vis.* 2011;17:2207-11.
138. Yang G, Xiong C, Li S, Wang Y, Zhao J. A recurrent mutation in CRYGD is associated with autosomal dominant congenital coralliform cataract in two unrelated Chinese families. *Mol Vis.* 2011;17:1085-9.
139. Wang L, Chen X, Lu Y, Wu J, Yang B, Sun X. A novel mutation in gammaD-crystallin associated with autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Mol Vis.* 2011;17:804-9.
140. Wang B, Yu C, Xi YB, Cai HC, Wang J, Zhou S, et al. A novel CRYGD mutation (p.Trp43Arg) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Hum Mutat.* 2011;32(1):E1939-47.
141. Santana A, Waiswol M, Arcieri ES, Cabral de Vasconcellos JP, Barbosa de Melo M. Mutation analysis of CRYAA, CRYGC, and CRYGD associated with autosomal dominant congenital cataract in Brazilian families. *Mol Vis.* 2009;15:793-800.
142. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(45):19096-101.
143. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061-73.
144. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med.* 2017;19(10):1105-17.
145. Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, et al, FORGE Canada Consortium; Care4Rare Canada Consortium, Majewski J, Boycott KM. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet.* 2016;89(3):275-84.
146. Wei T, Sun H, Hu B, Yang J, Qiao C, Yan M. Exome Sequencing and Epigenetic Analysis of Twins Who Are Discordant for Congenital Cataract. *Twin Res Hum Genet.* 2015;18(4):393-8.
147. Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lucke T, Hausler M, et al. Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain.* 2012;135(Pt 7):2022-31.
148. Musleh M, Ashworth J, Black G, Hall G. Improving diagnosis for congenital cataract by introducing NGS genetic testing. *BMJ Qual Improv Rep.* 2016;5(1).