

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**KLASİK GALAKTOZEMİ'DE GALT GENİ MUTASYON SPEKTRUMU
VE GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. İREM KALAY

DANIŞMAN

PROF. DR. ZEHRA OYA UYGUNER

İKİNCİ DANIŞMAN

DR. ÇAĞRI GÜLEÇ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2019

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra nezaketi ve iyi niyetiyle bana örnek olan, çalışmalarına her daim ışık tutup ufkumu açan, tez sürecimde bana her konuda destek olan sevgili danışman hocam sayın Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER'e,

Tez çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen ve tezimi büyük bir özveri ile okuyan, tecrübesi ve çalışma disiplinine her zaman hayran olduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Seher BAŞARAN'a,

Uzmanlık eğitimimin ilk anlardan itibaren samimiyeti ve değerli tecrübeleri ile bana destek olmuş sevgili hocam Doç. Dr. Birsen KARAMAN'a

Engin bilgisini esirgemedi uzmanlık eğitimim boyunca bana birçok şey öğreten, tezimin her aşamasında emeği olan, sadece eğitimime değil yaptığı ağabeyliğiyle bana her konuda destek olan çok değerli ikinci tez danışmanım sayın Dr. Çağrı GÜLEÇ'e

Tezimi Çocuk Beslenme ve Metabolizma bölümü ile birlikte yürütmeme destek olan sayın Prof. Dr. Mübeccel DEMİRKOL'a, çalışmamın başından itibaren bana her konuda yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gülden Fatma GÖKÇAY'a ve tüm ekibine

Uzmanlık eğitimim ve tez dönemim boyunca sabırla bana pekçok konuda destek olan, arkadaşlıklarını ve bilgilerini esirgemeyen tezimi hazırlamama çok büyük katkıları olmuş Dr. Güven TOKSOY, Dr.Fatih TEPGEÇ, Dr.Volkan KARAMAN, ile aynı ortamı paylaştığım tüm değerli laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma,

Beni bu günlere getiren, çalışmam boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkür ederim...

Dr. İrem KALAY

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TTU-2018-31142

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİİ
BEYAN	İV
İTHAF	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	XII
ÖZET	XIV
ABSTRACT	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. METABOLİK YOLAKLAR.....	4
2.1.1. Leloir yolu	4
2.1.2. Aksesuar Yollar	6
2.1.2.1. Pirofosforilaz yolu	6
2.1.2.2. Galaktoz galaktitol yolu.....	7
2.1.2.3. Galaktoz galaktonat yolu	7
2.2. GALAKTOZEMİ	7
2.2.1. KLASİK GALAKTOZEMİ	9
2.2.1.1. Patogenez.....	9
2.2.1.2. Klinik Bulgular	10
2.2.2. KLİNİK VARYANT GALAKTOZEMİ.....	11
2.2.3. DUARTE GALAKTOZEMİ (BİYOKİMYASAL VARYANT GALAKTOZEMİ)	
.....	11
2.2.3.1. Laboratuvar Bulguları.....	12
2.2.3.2. Biyokimyasal Tanı.....	12
2.2.3.3. Genetik Tanı	14
2.3. GENETİK TANI YÖNTEMLERİ	16
2.3.1. DNA Dizileme Yöntemleri.....	16
2.3.1.1. Sanger Dizileme	17

2.3.1.2. MLPA	18
2.4. TEDAVİ	22
2.4.1. GALAKTOZEMİDE TAKİP	25
2.4.2. PROGNOZ	27
2.5. GENETİK DANIŞMA	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Protokolü	29
3.2. Sanger Dizileme Protokolü.....	31
3.3. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Protokolü.....	32
3.3.1. Denatürasyon ve Hibridizasyon aşaması.....	32
3.3.2. Ligasyon aşaması.....	33
3.3.3. MLPA PZR reaksiyonu	34
3.3.4. Kapiler Elektrophorez ile Fragmanların saptanması.....	34
3.3.5. Kapiler Elektrophorezin Değerlendirilmesi	34
3.4. Biyoinformatik değerlendirmeler	35
4. BULGULAR	36
4.1. KLİNİK BULGULAR.....	36
4.2. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZ SONUÇLARI	39
4.3. MLPA Sonuçları:.....	46
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR.....	59
ETİK KURUL KARARI.....	68
.....	68
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Klasik galaktozemi fenotipleri [4].	9
Tablo 2: İdrarda bulunup pozitif reaksiyona neden olabilen indirgeyici maddeler.	13
Tablo 3: Galaktozemi genotipine göre beklenen enzim aktivite oranları.	15
Tablo 4: Galaktozemide serbest ve yasak olan yiyecekler.....	23
Tablo 5: Primer çiftlerinin dizileri, oligomer miktarları, çalışma sıcaklıkları ve okuma uzunlukları.....	30
Tablo 6: Termal döngü protokolü	31
Tablo 7: Prob yerleşimleri, dizileri ve ligasyon bölgeleri (SALSA MLPA probemix P156-B2 kullanım talimatı sayfasından alındı)	33
Tablo 8: Tanı anındaki bulgu yüzdesi ve uzun dönem bulgu yüzdesi.	39
Tablo 9: Klasik Galaktozemide homozigot mutasyon taşıyanların genotip fenotip ilişkisi	42
Tablo 10: Klasik Galaktozemide birleşik heterozigot mutasyon taşıyanların genotip fenotip ilişkisi	43
Tablo 11: Klinik variant ve Duarte varyantların genotip fenotip ilişkisi	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Galaktoz ve glukoz monosakkaridlerinden oluşan laktozun yapısı	3
Şekil 2: Glukoz ve Galaktozun açık yapısı. Galaktozu glukozdan farklı yapan, 4 numaralı karbona bağlı hidroksil ve hidrojenin konumu renklendirilmiştir.	3
Şekil 3: Galaktoz metabolizması.....	4
Şekil 4: A.Galaktoz Mutorotaz enziminin üç boyutlu yapısı B. Galaktokinaz enziminin üç boyutlu yapısı [9].	5
Şekil 5: Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz enziminin üç boyutlu yapısı [9].....	5
Şekil 6: UDP-galactose 4-epimeraz enziminin üç boyutlu yapısı.....	6
Şekil 7: Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (<i>GALT</i>) geninin bulunduğu 9p13 kromozomunun diagramı [42].	14
Şekil 8: Sanger dizileme prensibi [60].	18
Şekil 9: Primerler, UBA (uzunluğu belirli aralık) ve hedefe özgü dizinin demonstrasyonu ...	19
Şekil 10: Hedef DNA denaturasyonu.....	20
Şekil 11: Hibridizasyon.....	21
Şekil 12: Ligasyon.....	21
Şekil 13: Ligasyon sonrası hedeften ayırma ve problemlerin amplifikasyonu	21
Şekil 14: Prob karışımı ile yapılan çalışmada piklerin ortalama yüksekliklerini gösteren temsili resim (SALSA MLPA probemix P156-B2 kullanım talimatı sayfasından alındı).....	35
Şekil 15: Galaktozemi tarama testine yönlendiren klinik bulgular.	36
Şekil 16: Aile#7: Aralarında akraba evliliği olmayan ailenin 2. çocuğu olan olgu (III:3). Anne baba arasında akrabalık olmamasına rağmen homozigot c.546G>C (p.Q188R) mutasyonu saptandı.	37
Şekil 17: Aile#10: Aralarında akrabalık olmayan ailenin ilk çocukları olan olgu (III:1). Olguda ve kardeşinde birleşik heterozigot p.Q188R ve p.K285N mutasyonları saptandı.....	37
Şekil 18: Aile#15: Aralarında akrabalık olmayan ailenin ilk çocukları olan olgu (III:1). Olguda ve kardeşinde homozigot p.Q188R ve p.N314D mutasyonları saptandı.....	38
Şekil 19:Aile#40: Aralarında 2. dereceden kuzen evliliği olan ailenin üçüncü çocuğu (III:1) Novel homozigot c.200delG (p.R67Pfs*19) varyantı saptandı.....	38

Şekil 20: Saptanan varyantların ekzon/intronlara göre dağılımı.....	40
Şekil 21: <i>GALT</i> geninde saptanan varyantların sıklığı.....	41
Şekil 22: Saptanan novel (üst) ve bilinen (alt) varyantların ekzonik dağılımı ve novel varyantların elektroferogram görüntüleri	45
Şekil 23: p.V243I değişiminin patojenik tahminini gösteren PolyPhen-2 analiz sonucu (solda) ve <i>GALT</i> proteininin üç boyutlu yapısındaki yerleşimi (sağda).....	46
Şekil 24: Delesyon duplikasyon saptanmayan olgu#75'in MLPA analizinde fragman görüntüleri	46
Şekil 25: Delesyon duplikasyon saptanmayan olgu#75'in MLPA analizinde bar görüntüleri	47
Şekil 26: p.R67Pfs*19 (c.200delG) mutasyonunun <i>GALT</i> protein ürünü üzerindeki sonucu. Protein dizisinde 67. konuma kadar normal protein (üstte) ile uyumlu devam eden mutant proteinin (altta) aminoasid dizisi bu noktadan sonra değişmekte ve 85. kodonda protein sentezi sonlanmaktadır.	52
Şekil 27: p.S236Rfs*30 (c.708_709delGT) mutasyonunun <i>GALT</i> protein ürünü üzerindeki sonucu. Protein dizisinde 236. konuma kadar normal protein (üstte) ile uyumlu devam eden mutant proteinin (altta) aminoasid dizisi bu noktadan sonra değişmekte ve 264. kodonda protein sentezi sonlanmaktadır.....	53
Şekil 28: : a. p.V243I değişiminin <i>in silico</i> analiz programı olan PolyPhen'de “zararlı” olarak değerlendirilmesi gösterilmektedir. b. Valin 243 konumunun türler arasındaki korunmuşluğunu göstermektedir.....	54
Şekil 29: <i>E. coli</i> ' deki kodon kullanım frekansları. Oklarla gösterilen kodonların her ikisi de lösin (Leu) aminoasidini kodlamasına rağmen UUA kodonunun tanıyan tRNA'nın frekansı 1.0 iken CUA'nın frekansı 0.3'tür.	56
Şekil 30: Heterozigot N314D-delGTCA polimorfizmini taşıyan babanın <i>GALT</i> enzim aktivitesi 20.0 μ mol iken birleşik heterozigot N314D-delGTCA; N314D-g.1721C mutasyonu taşıyan çocukta <i>GALT</i> enzim aktivitesi 23.4 μ mol' dür [106]......	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACMG: American Collage of Medical Genetics)

AD: Anabilim Dalı

BD: Bilim Dalı

CG: Sitozin-Guanin

CNV: Kopya sayı değişikliklerini

D: Duarte

ddNTP: dideoksiribonükleotidler

dH₂O: Distile su

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP: deoksiribonükleotidlere

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

fs: frame shift

FSH: Follicle-stimulating hormone

G/G: homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyon genotipi

G/N: heterozigot mutasyon genotipi

Galaktoz-1-P: Galaktoz-1-Fosfat

GALE: UDP-glucose 4-epimerase

GALM: Galaktoz mutarotaz

GALT: galaktoz-1-fosfat üridil transferaz

GALK: galaktokinaz

gDNA: genomik DNA

Glikoz-1-P: Glikoz-1-Fosfat

HGMD: Human Genome Mutation Database

HiDi: Highly deionized

in/del: insersiyon/delesyon

IQ: Intelligence Quotient

İRM: İdrarda redüktan madde

İTF: İstanbul Tıp Fakültesi

LC-MS/ MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LH: Luteinleştirici Hormon

Mg: Magnezyum

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

N/N: Homozigot *wild tipe*

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NM: Number of mutation

OMİM: Online Mendelian Inheritance in Man

OR: Otozomal Resesif

POY: Prematür ovaryen yetmezlik

PPi: Pirofosfat

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

SD: Sanger dizileme

TBE: Tris-borate-EDTA

Tm: Melting temperature (Erime sıcaklığı)

UBA: Uzunluğu belirli aralık

UDP: Uridine diphosphate

UTP: Uridine-5'-triphosphate

YND: Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

Kalay, İ. (2019). Klasik Galaktozemi’de *GALT* Geni Mutasyon Spektrumu ve Genotip-Fenotip İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Amaçlar: Klasik galaktozemi, galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkan, otozomal resesif bir hastalıktır. İlişkili genetik varyantlar 11 ekzonlu *GALT* geninde DNA dizi analizi ile saptanabilen küçük mutasyonlar olmasına rağmen %1 oranında büyük delesyonlar da bildirilmektedir. Bu çalışmada, klasik galaktozemi klinik tanısı alan olgularda genetik etiyolojinin açıklanması, genotip-fenotip ilişkisinin araştırılması, toplumumuzdaki *GALT* geni mutasyon spektrumunun belirlenerek moleküler genetik analiz için uygun yaklaşımın kararlaştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya, klinik ve biyokimyasal bulgularla klasik galaktozemi tanısı alan 90 olgu dâhil edildi. Olgularda ilk aşamada *GALT* geninde Sanger dizi analizi ile küçük varyantlar, kalıtım modeli ile uyumlu varyant saptanmayanlarda ikinci aşamada MLPA tekniği ile büyük mutasyonlar araştırıldı.

Bulgular: Olguların %90’ında dizi analiz yöntemi ile 17’si daha önce tanımlanmış dördü novel (p.R67Pfs*19, p.S236Rfs*30, p.S156*, p.V243I) varyant saptandı, MLPA analizi ile herhangi bir delesyon/duplikasyon saptanmadı. Olgu grubumuzda en sık (%42) ekzon 6’da p.Q188R, ardından ekzon 10’da p.E340* (%15) ve p.R67Pfs*19 (%8) saptandı.

Tartışma: Toplumumuzdaki p.Q188R sıklığı Avrupa sonuçları ile uyumluydu. Literatürde Türkiye polülasyonuna özgün olduğu bildirilen p.E340*, çalışmamızda en sık saptanan ikinci varyant oldu. Üçüncü sıklıkla saptadığımız p.R67Pfs*19 ise novel değişimdi. Bu sonuçlarla, *GALT* geninde sadece ekzon 6 ve 10’un dizilenmesi ile olguların yaklaşık %65’ine moleküler tanı verilebileceği gösterildi. Çalışmamızda MLPA analizinde büyük mutasyon saptanmaması, olgulardaki ön tanıdan daha sonra uzaklaşmış olması ile açıklanabilir. Klinik olarak galaktozemi ön tanısı alan ve *GALT* geninde dizi analizinde patojenik varyant saptanmayan olguların MLPA analizi öncesinde klinik açıdan yeniden değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Klasik galaktozemi, *GALT* geni, Duarte varyantı

Proje desteği: İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Proje No: TTU-2018-31142

ABSTRACT

Kalay, İ. (2019). The Contribution of Molecular Genetic Methods to the Diagnosis of Classical Galactosemia and Investigation of Genotype-Phenotype Correlation. İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics. İstanbul.

Objective: Classical galactosemia is a disorder caused by pathogenic *GALT* gene variants leading to deficiency of galactose 1-phosphate uridyl transferase enzyme. This condition is inherited in an autosomal recessive pattern. Although most of the pathogenic variants identified are small sequence alterations, gross mutations have also been reported (1%) in *GALT* gene, which has 11 exons. We aimed to reveal genetic ethiology of patients with classical galactosemia and investigate the frequency and distribution of gross and small *GALT* mutations for molecular diagnostic approach and search for genotype-phenotype correlation. **Material-Methods:** Clinically diagnosed 90 patients with galactosemia were included in this study. DNA samples were isolated from peripheral blood and algorithmic testing strategy for *GALT* gene (NM_000155.3) was performed with Sanger sequencing in all study group, and MLPA in selected patients with normal sequencing result.

Results: We identified 17 known mutations and four novel variants (p.R67Pfs*19, p.S236Rfs*30, p.S156*, p.V243I) in 90 patients, but no gross alteration by MLPA analysis. In this study, the most common mutations are p.Q188R(42%) in exon 6, p.E340* (15%) in exon 10 and p.R67Pfs*19 in exon 2. The mutation detection rate was 90% through Sanger sequencing.

Conclusions: According to our results, the frequency of p.Q188R in Turkish population was the most common mutation as in Europe. Second most frequent mutation was p.E340* which is known to be specific for population in Turkey. The third most frequent mutation (8%) was a novel single nucleotide deletion leading to protein truncation (p.R67Pfs*19), found to aggregate in patients from eastern Turkey. It may be concluded that an algorithmic analysis of exons 6 and 10 would delineate molecular genetic diagnosis for 65% of the patients. The negative MLPA result may be explained by drift away from the pre-diagnosis after clinical re-evaluation of the patients. In the case that there is no pathogenic variant is found in sequencing, clinical re-evaluation should be considered before MLPA.

Key words: Classical galaktosemia, *GALT* gene, Duarte variant

Project support: The Research Fund of İstanbul University. Project No: TTU-2018-31142

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klasik galaktozemi (OMIM #230400), galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz (GALT) enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkan, otozomal resesif (OR) geçişli bir hastalıktır. Avrupa’da hastalık sıklığı 1/23 000 ila 1/44 000 arasında değişmektedir [1]. GALT enzim aktivitesinin ağır eksikliğinde dokularda ve vücut sıvılarında galaktoz, galaktoz-1-fosfat ve galaktitol birikir. Birçok olguda yenidoğan döneminde galaktoz alımından sonra sarılık, karaciğer ve dalakta büyüme, karaciğer yetersizliği, beslenme sorunları, hipoglisemi, böbrek tübüllerinde işlev bozukluğu, kas tonusunda azalma, sepsis ve katarakt görülür. Artmış galaktoz-1-fosfat karaciğer, böbrek, beyin, dil, lens ve deri fibroblastlarında birikerek bu dokularda hasara neden olur. Yenidoğan döneminde galaktitol birikimine bağlı olarak psödötümör serebri ve katarakt oluşumu gözlenir. Yenidoğandaki artmış sepsis sıklığının kökeni tam olarak açıklanamamış ancak olgularda nötrofil fonksiyonlarının baskılandığı gösterilmiştir. Erişkin hastalarda en sıklıkla sözel dispraksi, bilişsel yetersizlik, ataksi ve ovaryan yetmezlik bulguları görülür [2], [3].

Laktozsuz diyetle başlanmasıyla birlikte, hasarın derecesine bağlı olarak klinik iyileşme (ikterde azalma, katarakta gerileme, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında normale dönüş) görülebilir. Tedaviye erken başlanması, bulgularda hızlıca gerilemeyi sağlarken zamanında tanı konulamayan olgularda erken ve uzun dönemde yaşamı olumsuz yönde etkileyecek sonuçlar görülebilir [4], [5]. Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz enzim eksikliğinin bir ucunda yukarıda belirtilen klinik tablo yer alırken, diğer ucunda bulgu vermeyen olgular bulunabilir. Genetik heterojenitenin oluşturduğu bu farklı fenotipler, GALT enzim eksikliği altında üç alt grup altında toplanır; klasik galaktozemi, klinik varyant galaktozemi ve biyokimyasal varyant galaktozemi (Duarte varyantı).

Galaktozemi, 9. kromozomda (9p13) yerleşik *GALT* genindeki biallelik mutasyonlarla ilişkilidir [4]. *GALT* geni 11 ekzonlu bir gen olup, klasik galaktozemi fenotipi sıklıkla p.Q188R ve p.K285N mutasyonları ile ilişkilidir. Klinik varyant galaktozemiden ise çoğunlukla Afrika kökenli popülasyonda p.S135L mutasyonu sorumludur [4]. Duarte varyantında başlıca c.-119_-116delGTCA ve c.940A>G (p.N314D) değişimleri aynı allelde gözlenir [6]. *GALT* geninde 300’ün üstünde mutasyon bildirilmiştir. Yanlış anlamlı, dur kodonu, çerçeve kayması, kırılma hatası, indel ve büyük delesyon/duplikasyonlar bugüne kadar bildirilmiş mutasyon tipleridir. Küçük mutasyonların tespitinde hedefe yönelik ya da tüm gen dizi analizi yöntemleri kullanılabilirken, büyük delesyon ve duplikasyonların tespitinde hedefe yönelik

delesyon/duplikasyon analiz yöntemleri (kantitatif PCR, uzun-aralıklı PCR, MLPA, hedefe yönelik array) kullanılabilir. Klinik ve biyokimyasal olarak tanı alan galaktozemi hastalarının ~%95'inde sekans analiziyle *GALT* geninde mutasyon gösterilebilmektedir [4].

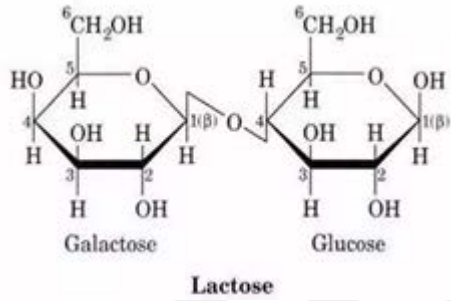
Çalışmamıza, 70'i retrospektif, 20'si prospektif olmak üzere, klinik galaktozemi tanısı ile moleküler genetik tanı ve genetik danışma amacıyla yönlendirilen toplam 90 olgu dahil edildi. Moleküler analizler, Sanger dizileme ve MLPA tekniği ile gerçekleştirildi.

Bu çalışmanın amacı, klasik galaktozemi olgularında Türk popülasyonundaki mutasyon frekansını saptamak, genotip-fenotip ilişkisi araştırmak ve moleküler genetik tanı algoritmasının oluşturulmasına katkı sağlamaktır.

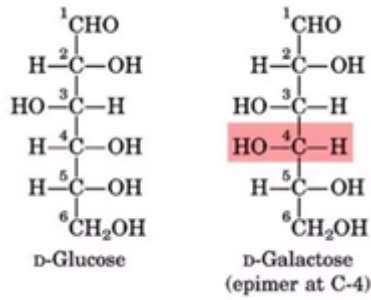
2. GENEL BİLGİLER

2.1. GALAKTOZ METABOLİZMASI

İnsanlar için galaktozun besinsel en büyük kaynağı süt ve süt ürünleridir. Laktoz (galaktozil beta 1,4 glukoz) (Şekil 1.) sütte bulunan ana enerji kaynağıdır. Laktozun sütteki miktarı memelinin cinsine göre % 2 ile 6 arasında değişiklik gösterir. Diyetle alınan laktoz ince barsak mukoza hücrelerinde laktaz enzimi ile hidrolize edilerek monosakkaritlerine; glukoz ve galaktoza (Şekil 2) ayrılır [7]. Süt ürünleri dışındaki gıdalarda galaktoz içerir [8].



Şekil 1: Galaktoz ve glukoz monosakkaritlerinden oluşan laktozun yapısı

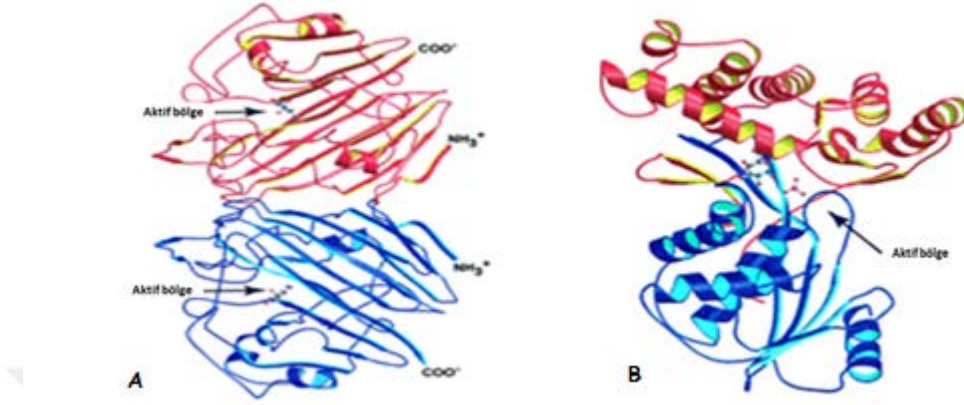


Şekil 2: Glukoz ve Galaktozun açık yapısı. Galaktozu glukozdan farklı yapan, 4 numaralı karbona bağlı hidroksil ve hidrojenin konumu renklendirilmiştir.

Laktoz ince barsakta hidrolize edilerek galaktoz ve glukoz oluşturulur. Glukozun hücre içine alımı insuline bağımlı iken, galaktozun ve fruktozun hücre içine girişi insulinden bağımsızdır. Sodyum/glukoz-galaktoz taşıyıcısı (SGLT1) aracılığıyla galaktoz ince barsak epitelinden emilir. Hücre içine alınan D-galaktozun fruktoz gibi metabolize edilmesi için fosforile edilmesi gerekir. Galaktozun fosforile edilerek galaktoz-1-fosfata çevrilmesinde pek çok dokunun özgün metabolik yolları vardır. Vücutta farklı dokularda galaktoz

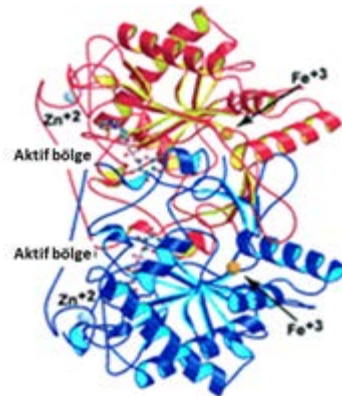
Leloir yolunun ilk enzimi olan galaktoz mutorotaz (Şekil 4-A) aktivitesi ilk kez 1965 yılında *E. coli*'de gösterilmiştir. Galaktoz mutorotaz enzimini kodlayan GALM geni ise 1994 yılında tanımlanmış olup insanda 2p22.1'e bulunduğu gösterilmiştir. Bu enzim beta-D-galaktozu alfa-D-galaktoza dönüştürür. Sonrasında GALK enziminin (Şekil 4-B) α -D-galaktozu fosforile etmesi ile galaktoz-1-fosfat (galaktoz-1-P) oluşur. Bu enzimin eksikliği erken yaşta başlayan

katarakt ile karakterize Tip II Galaktozemi olarak adlandırılır. GALK1 geni 17q24'de lokalizedir.



Şekil 4: A. Galaktoz Mutorotaz enziminin üç boyutlu yapısı B. Galaktokinaz enziminin üç boyutlu yapısı [9].

GALT enzimi, üridin monofosfat molekülünün UDP-glukozdan galaktoz-1-fosfata transferini katalize eder. Bu enzimin eksikliği Tip I Galaktozemiye (Klasik Galaktozemi) neden olmaktadır. GALT, histidin triad enzim süper ailesine ait olan dimerik yapıda bir enzimdir. Enzimin nükleotit transferaz ve hidrolaz aktivitesi vardır ve her alt ünitesi 348 aminoasit, çinko ve demir atomu içermektedir. Wedekind ve arkadaşları 1995 yılında enzimin üç boyutlu yapısını tanımlamışlardır (Şekil 5).



Şekil 5: Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz enziminin üç boyutlu yapısı [9].

GALE enzimi (Şekil 6), UDPglikoz ve UDPgalaktozu birbirlerine dönüştürür. Enzimin tam eksikliği, klinik tablosu klasik galaktozemiye benzeyen Tip III Galaktozemiye neden olur. Genelde enzimin parsiyel eksikliği görülür ve daha selim seyirli bir klinik gözlenir. GALE geni insanda 1p36-p35’de bulunur.



Şekil 6: UDP-galactose 4-epimeraz enziminin üç boyutlu yapısı

UDP galaktoz; glikoproteinler, glikolipitler ve glikozaminoglikanların sentezinde kullanılır ve bunların metabolize edilmesi sonucu endojen galaktoz üretiminde rol oynar. UDP glikoz ise glikojen sentezinde anahtar rol oynar [9].

Leloir yolu, galaktozun enerji kaynağı olarak kullanılmasında ana yoldur. Bu yoldaki enzimler; karaciğer başta olmak üzere eritrositler, lökositler, fibroblastlar, böbrek hücreleri, kas hücreleri, intestinal mukoza ve overler gibi birçok dokuda bulunurlar. Fetal dönemde galaktoz-1-fosfat üridil transferaz enzimi birçok dokuda gestasyonun 10. haftasından sonra saptanabilir. Enzim aktivitesi ikinci ve üçüncü trimesterde postnatal dönemdeki aktiviteye yaklaşık düzeydedir. Bu veriler enzim eksikliğinin intrauterin dönemde de hasar bırakacağını göstermektedir [10].

2.1.2. Aksesuar Yollar

2.1.2.1. Pirofosforilaz yolu

1957’de Isselbacher tarafından galaktoz-1-P’nin UDP galaktoza dönüştürülmesinde alternatif bir yol olarak tanımlanmıştır (Şekil 3). Leloir yolağında metabolize edilen galaktozun %1’i kadar galaktoz metabolize edilir. Bu yolağın en önemli işlevi glikoproteinlerin ve

glükolipitlerin yapısına katılmak üzere UDP glüköz ve UDP galaktozun pirofosfarilasyonudur. Bu iki pirofosfarilasyon reaksiyonu UDP-glüköz pirofosforilaz enzimi tarafından katalize edilir. Pirofosforilaz aktivitesi yetişkin ve fetal karaciğerde, böbrek ve iskelet kaslarında saptanmıştır.

Gitzelmann adlı araştırmacı, Isselbacherin tanımladığı pirofosfarilasyon yolunun ters yönde çalışması hakkında araştırmalarda bulunmuştur. Bu yolla; galaktozun diyetle alınmadığı, galaktozun metabolize edilemediği, GALK ve GALT enzimlerinin eksikliği durumlarında UDP-galaktozdan glüköz-1-fosfat üretilir. Galaktoz-1-fosfattan da fosfataz enziminin aktivitesi sonucu galaktoz oluşabilir. Bu da bize, endojen bir galaktoz üretim mekanizmasının var olduğunu ve galaktoz kısıtlaması yapıldığı halde neden GALT enzim eksikliğinde galaktoz-1-fosfat birikimi olduğunu göstermektedir [7], [11], [12].

2.1.2.2. Galaktoz galaktitol yolu

Galaktoz aldoz redüktazın etkisiyle, idrarla atılabilen galaktitole dönüştürülür. Bununla beraber galaktitolün dokularda birikmesinin yarattığı osmotik basıncın galaktozemi hastalarında katarakt ve psödotümör serebri patogeneğinde rol aldığı da düşünülmektedir [11], [14].

2.1.2.3. Galaktoz galaktonat yolu

Galaktoz dehidrogenaz enzimi galaktozu galaktonata dönüştürür, galaktonat idrarla atılır. Aynı denek koşullarında normal ve GALT enzim eksikliği olan deneklere galaktoz yüklemesi yapıldığı zaman, hasta bireylerde idrardan galaktonat atılımının altı kez artmış olduğu gösterilmiştir [11]. Günümüzde, galaktozemili süt çocuklarında nükleer magnetik rezonans spektroskopisi ile galaktonat ölçümü yapılabilmektedir [15].

2.2. GALAKTOZEMİ

Galaktozemi ilk kez 1908 yılında Von Ruess tarafından tanımlanmıştır. 'Bebekte Aşırı Şeker' adlı makalesinde hepatomegali şikayeti olan bebeğin diyetinden süt ürünleri çıkarıldıktan sonra idrarında galaktoz bulunmadığı gözlenmiştir. Bu hastalığa "galactosuria" adı verilmiştir. Bir süre sonra bebek sekonder hastalıklardan dolayı kaybedilmiş ve yapılan otopsi sonucu ölüm sebebi siroz olarak açıklanmıştır. O tarihte galaktozemi hastalığının varlığı bilinmediğinden ölüm sebebi farklı nedenlere bağlanmıştır. Galaktozemi ile ilgili ilk detaylı tarif 1917' de Goppert tarafından yapılmıştır. Hastada mental gerilik, hepatomegali, sarılık, büyüme geriliği, idrarda albumin ve şeker atılımının olduğunu; diyetten galaktozun çıkarılması ile hastanın

bulgularının normale geldiğini bildirmiştir. Hastanın büyük kardeşinde doğumdan birkaç gün sonra sarılık, hepatomegali geliştiği, sünnetten birkaç gün sonra hayati tehlike taşıyan bir kanama tablosu geçirdiği ve altı haftalıkken öldüğü bildirilmiştir. Otopside karaciğerde büyük bir tümör saptanmış ve sifilize bağlı olduğu sanılmıştır. Ancak Wassermann reaksiyonu negatif olduğundan bu tanıdan uzaklaşmış ve ölümün nefrite bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu hastanın diğer kardeşinin de preterm doğum sonrası sarılık ve hepatomegali bulguları ile dört haftalıkken öldüğü bildirilmiştir. Goppert bu hastaların karaciğere bağlı bir hastalık geçirdiklerini not etmiş ve hastanın diyetindeki laktozun diğer şekerler ile değiştirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Mason ve Turner tarafından 1935 yılında hastalık tekrar hatırlanmış ve detaylı araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Leloir da şeker molekülleri üzerine çalışmış ve 1970 yılında kimya dalında Nobel ödülü kazanmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında tıp literatüründeki galaktozemi hastalığı tanımlanmıştır [16].

GALT enzimi eksikliği, klinik – biyokimyasal fenotip olarak üç gruba ayrılır.

1. Klasik Galaktozemi
2. Klinik Varyant Galaktozemi
3. Biyokimyasal Varyant Galaktozemi (Duarte Varyantı)

Bu sınıflama, rezidüel eritrosit GALT enzim aktivitesine göre yapılır (Tablo 1). Klasik galaktozemi ve klinik varyant galaktozemi, klinik prezentasyonu olan hastalıklar olarak değerlendirilir. Biyokimyasal varyant galaktozemide ise sıklıkla hastalık fenotipi oluşmaz. Bu üç fenotipin etiyolojisinde farklı mutasyonlar yer alır.

Tablo 1: Klasik galaktozemi fenotipleri [4].

<u>Klasik Galaktozemi</u>	<u>Klinik Varyant Galaktozemi</u>	<u>Biyokimyasal Varyant Galaktozemi (Duarte)</u>
•Galaktoz-1-P : >10mg/dL (120mg/dL düzeyinde) •Galaktoz : >10mg/dL (90-360 mg/dL düzeyinde) •GALT enzim aktivitesi <%1 •Klinik ; Erken semptomlar Geç semptomlar	•Galaktoz-1-P : >10mg/dL •Galaktoz : >10mg/dL •GALT enzim aktivitesi :%1-10 •Klinik ; Erken semptomlar	•Galaktoz-1-P : 1-30 mg/dL •Galaktoz : >10mg/dL •GALT enzim aktivitesi :%14-25 •Klinik ; Beklenmez

2.2.1. KLASİK GALAKTOZEMİ

Klasik galaktozemi (OMIM#230400) GALT enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkan bir karbonhidrat metabolizması bozukluğu olup otozomal resesif kalıtım gösterir. *GALT* geni 9p13 kromozomu üzerindedir. Hastalık insidansı 1/40.000 ila 1/60.000 arasında olup, ülkemizde 1/23.775 olarak bildirilmiştir [17][18].

2.2.1.1. Patogenez

GALT enzim aktivitesinin ağır eksikliğinde dokularda ve vücut sıvılarında galaktoz, galaktoz-1-P ve galaktititol birikir. Komplikasyonların ortaya çıkmasında galaktitol ve galaktoz-1-P birikimi muhtemelen en önemli faktörlerdir [9]. Galaktonat oluşumu da artar fakat idrarla atıldığı için dokularda birikmez [19]. Yakın dönemdeki çalışmalar galaktozemi hastalarında hücre içinde kritik görevler üstlenen inositol düzeylerinin de etkilendiğini ortaya koymuştur [20].

Uzun dönem komplikasyonlarının etiyolojisinde glikozilasyonun bozulmasının da etkili olduğu öne sürülmektedir [2]. Sağlıklı insan hücrelerinde UDP galaktoz ve UDP glikoz arasında bire üç oranı korunurken, galaktozemi hastalarında bu oran bozulmaktadır. UDP galaktoz ve UDP glikoz glikoziltransferazlar için şeker verici olarak görev yapar. Bu nedenle galaktozemi hastalarında, protein ve lipid glikozilasyonu da bozulduğundan glikolipit ve glikoprotein sentez sorunlarının da uzun dönem komplikasyonlara yol açtığı düşünülmektedir [19].

Yenidoğan döneminde psödötümör serebri ve katarakt oluşumundan galaktitol birikimi sorumlu tutulmaktadır. Yenidoğan sepsis sıklığının artma nedeni bilinmese de hastalarda nötrofil fonksiyonlarının baskılandığı gösterilmiştir. Hepatik, renal ve serebral sorunların patogenezinin galaktoz-1-P ve galaktitol birikimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir [21].

Yenidoğan bir bebek kalori gereksiminin %20'sini laktozdan sağlar. Laktoz, doğada yalnız sütte bulunan süt şekeri de denilen bir disakkarittir. Birer monosakkarit olan glukoz ve galaktozdan oluşur. Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz enzimi olmadığında bebek galaktoz-1-fosfatı metabolize edemez. Artmış galaktoz-1-fosfat karaciğer, böbrek, beyin, dil, lens, deri fibroblastlarında birikir ve hasara neden olur [11], [12], [22]. Bu hasarlanma heterozigot annenin diyetinden transplasental olarak geçen galaktoz veya fetusta endojen olarak üretilen galaktoz nedeni ile de prenatal olarak başlayabilir.

2.2.1.2. Klinik Bulgular

Hastalar doğumdan hemen sonra sağlıklı görünümde olsalar da anne sütü ya da laktoz içeren formül mama ile beslenme başladıktan birkaç gün sonra sarılık, beslenme isteğinde azalma, tartı kaybı, kusma ilk klinik bulgular olarak göze çarpar. Yenidoğan veya küçük bir bebekte; sarılık, hipoglisemi, letarji, konvülziyon, irritabilite, beslenme zorluğu, kilo alamama, aminoasitüri, katarakt, vitröz kanama, hepatosplenomegali, hepatosellüler yetmezlik, renal tubüler disfonksiyon bulguları görüldüğünde galaktozemi akla gelmelidir.

Galaktozemi tanısında intrakranial basınç artışı ve serebral ödem ilk belirti olabilir ve sıklıkla letarji ve belirgin hipotoni görülür [11], [12]. Biriken galaktoz-1-fosfatın yarışmalı inhibisyonu ile fosfoglukomutaz enziminin baskılanması, glikojenin glukoz dönüşümünün geçici engellenmesine yol açar ve hipoglisemi oluşur. Hipoglisemi ile birlikte letarji artar ve konvülziyonlar görülebilir.

Katarakt doğumu izleyen ilk günlerde oluşmaya başlar, günler haftalar içerisinde ilerler. Doğumda var olan veya bir yaşına kadar görülen katarakta konjenital katarakt denir [11]. Galaktozemili bazı hastalarda çok nadir bir durum olan vitröz hemoraji gelişebilir [23].

Galaktozemili hastalarda lökositlerin bakterisidal aktivitesi baskılandığından E. coli sepsisi riski artmıştır. Septisemiye bağlı ölüm olabilir. Yenidoğan döneminden itibaren kanama bozuklukları ve koagülopati görülebilir. Fizik muayenede kan alınan bölgelerde sızıntı şeklinde kanama, morluklar ve bombe fontanel saptanabilir.

Erişkin hastalarda en sık görülen komplikasyonlar sözel dispraksi, ılımlı bilişsel yetersizlik, ataksi ve ovaryan yetmezliktir [20]. Kadınlarda galaktozeminin uzun dönem komplikasyonları arasında en sık görülen klinik %80 oranı ile primer ovaryan yetmezliktir [24]. Waggoner ve arkadaşlarının çalışmasında 17 yaşın üzerindeki galaktozemi tanılı 34 kadının 8'inde primer amenore saptamıştır. Menarş için ortalama yaşın 14 olarak (10-18 yaş arası)

saptandığı hastaların birçoğunda sekonder amenore geliştiği bildirilmiştir. Çocuk doğurma çağılarına gelen kadınların birçoğu infertil olmasına rağmen, çocuk sahibi olabilen az sayıda hasta da mevcuttur. Kadınlarda ovaryan problemlere karşın erkeklerde testis fonksiyonlarında bir problem olmaz. Boy uzaması gecikse de hastaların erişkin boyları normal sınırlar içindedir. Hastaların kemik mineral yoğunluklarının azaldığı tespit edilmiştir. Böbrekte galaktoz-1-fosfat birikimine bağlı renal Fanconi sendromu gelişebilir. Birçok hastada konuşma bozuklukları, daha az bir kısmında motor fonksiyon ve dengede bozulma izlenir [25].

2.2.2. KLİNİK VARYANT GALAKTOZEMİ

Klinik varyant galaktozemi fenotipinin bazı yönleri, klasik galaktozemi fenotipi ile ortaktır. Katarakt, karaciğer hastalığı (tutulumu), ılımlı bilişsel yetersizlik, ataksi, gelişme geriliği görülebilmektedir. Tedavi edilmeyen infantlarda beslenme problemleri, siroz kanama bozuklukları gelişebilir. Klinik varyant galaktozemi, homozigot p.S135L mutasyonu olan Afrika kökenli insanlarda bildirilmiştir. p.[S135L];[Q188R] birleşik heterozigotluk durumunda ise yine klasik galaktozemiye göre daha hafif bir klinik beklenmektedir. Afrika kökenli toplumlarda p.S135L alleli görülme prevalansı %1'dir [26]. Bu varyant, yeni doğan tarama programı ile gözden kaçabilmektedir. Diyet tedavisi ile komplikasyonların birçoğu engellenebilmektedir. Uzun dönem takiplerde, klasik galaktozemide sık görülen bir komplikasyon olan prematür over yetmezliğinin klinik varyant galaktozemi olgularında görülmediği bildirilmiştir [4].

2.2.3. DUARTE GALAKTOZEMİ (BİYOKİMYASAL VARYANT GALAKTOZEMİ)

Duarte galaktozemi, klinik bulgu oluşturmaması beklenmeyen, yalnızca biyokimyasal parametrelerle normal popülasyondan ayrılan selim seyirli bir durum olarak kabul edilmektedir. Klinik bulgulara neden olduğu düşünülmemektedir. Duarte galaktozemi tanısı alan 6-12 yaş arasındaki 350 çocukla yapılan bir çalışmada, uzun vadede kontrol olgularıyla aralarında belirgin bir fark olmadığı gösterilmiştir [6]. Fakat Duarte galaktozemili az sayıda çocuğun katıldığı çalışmada etkilenmemiş çocuklara göre işitsel hafızalarının daha zayıf olduğu gösterilmiştir [27].

Biyokimyasal varyant galaktozemi, Duarte-1 (D1) ve Duarte-2 (D2) olmak üzere iki farklı form içerir. Farklı allellerden kaynaklanan bu iki formda da klinik prezentasyon beklenmezken, D1'de GALT enzim aktivitesi normal ya da artmış, D2'de ise enzim aktivitesinin %25-50 oranında azalmış olması beklenmektedir [28].

Galaktozemi varyasyonları içinde en sık görülen formu, yenidoğan taramalarında sıklıkla saptanan D2 galaktozemidir. Galaktozeminin yenidoğan tarama programında olduğu ülkelerde Duarte galaktozeminin klasik galaktozemiye göre on kat daha fazla tespit edildiği ifade edilmektedir [29]. Bu hastalar bir allelde kısmen etkilenmeye neden olan Duarte-2 değişimi diğer allelde ise klasik galaktozemi mutasyonu taşımaktadır [29]. Duarte galaktozemi tanısı almış 1-6 yaş arasındaki çocuklarla yapılan çalışmada, galaktoz kısıtlaması yapılmayan grupta galaktoz-1-P düzeyinin artmadığı, diğer galaktoz metabolitlerinin arttığı belirlenmiştir. Çocuklarda klinik ya da gelişimsel sorun saptanmamıştır [30]. İlerleyen yıllarda bu grupta komplikasyonların görülme ihtimali merak konusudur. Lakin Duarte galaktozemi hastalarında galaktoz kısıtlaması gerekliliğini kanıtlayan yeterli klinik veri yoktur [31].

2.2.3.1. Laboratuvar Bulguları

Hastalığıdaki laboratuvar bulguları; indirekt ya da miks hiperbilirubinemi, kan galaktoz düzeyinin yüksekliği, hipoglisemi, anormal pıhtılaşma testleri, artmış transaminazlar ve fenilalanin, tirozin, metiyonin başta olmak üzere bazı amino asitlerde artış laboratuvar bulguları arasında göze çarpar. Renal tübüler hasar sonucu hiperkloremik metabolik asidoz, galaktozüri, glikozüri, amino asidüri, albuminüri, fosfatüri ve hipofosfatemi ortaya çıkabilir. En erken gelişen laboratuvar bulgularından birisi renal fonksiyon bozukluğunun göstergesi olan albuminüridir. Laktoz alımının ilk bir iki gününde belirir ve galaktozun diyetten çıkarılması ile hemen kaybolur [11], [15].

2.2.3.2. Biyokimyasal Tanı

Galaktozeminin biyokimyasal tanısı, eritrositlerde galaktoz-1-fosfat konsantrasyonunun artması ve GALT enzim aktivitesinin azalmasıyla konur. Klasik galaktozemide, galaktoz-1-fosfat konsantrasyonu 10 mg/dL'den yüksektir. GALT aktivitesi çok düşüktür ya da hiç yoktur. Klinik varyant galaktozemide ise, enzim aktivitesi %1'in üzerindedir ancak %15'i geçmez [32].

Galaktoz idrarla atılan indirgen özellikte bir şekerdir. İdrarda redüktan madde bakılması, bakırın indirgenme prensibine dayanır ve galaktozemi şüphesinde tanısal yaklaşım için yapılacak ilk testtir. Bu test yanlış negatif ya da pozitif sonuçlar verebilir. Çünkü anne sütüyle beslenme sonrasındaki birkaç saat içinde bile galaktoz idrarda saptanamayabilir. Eğer hasta beslenemiyorsa ve intravenöz sıvı tedavisi altındaysa idrarda galaktoz çıkmayacaktır. Bunun yanı sıra galaktozüri karaciğer hastalığı olan hastalarda da gözlenir. Diğer indirgen şekerlerde testin pozitif sonuç vermesine neden olur. İdrarda indirgen madde saptanan hastalarda

monosakkarid ince tabaka kromatografisi yapılarak hangi indirgen şekerin idrarda atıldığı tespit edilmelidir (Tablo 2) [21].

Tablo 2: İdrarda bulunup pozitif reaksiyona neden olabilen indirgeyici maddeler.

İDRARDA SAPTANAN İNDİRGEN MADDELER
Monosakkaritler (Glukoz , Fruktoz)
Disakkaritler (Galaktoz, Laktoz, Maltoz)
Pentozlar (Arabinoz, Riboz)
İlaçlar (Salisilatlar, Sefalosporin, Nalidiksik asit, Sülfonamidler)
Vitaminler (Askorbik asit)
Sistein
Homogentisik asit

GALT enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan en basit yöntem Beutler testidir. 1966 yılında Beutler ve Baluda tarafından geliştirilmişlerdir. Bu floresans testi, filtre kâğıdına alınan kan örneğindeki GALT enziminin NADP indüklenmesine yol açarak uzun dalga boyundaki ultraviyole ile floresans vermesine dayanır. Floresansın şiddeti enzim aktivitesi ile orantılıdır [28], [30]

Hızlı bir yöntemdir ancak filtre kâğıdına alınmış kan örneğinde enzim aktivitesinin sıcaklık ve nemden olumsuz etkilenmesi gibi dezavantajları vardır. Bu testin 1/1000-1/5000 sıklığında yalancı pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Son dört ayda kan transfüzyonu yapılmışsa GALT enzim aktivitesini ölçen testler yalancı negatif sonuç verir [36]. Glukoz-6-fosfataz ve fosfaglukomutaz eksiklikleri de bu testle saptanabilir. Bu enzimler testte beklenen değişimin olması için gerekli enzimlerdir. GALK ve GALE enzim eksiklikleri bu testle saptanamamaktadır. Enzim eksikliği için homozigot olan bireylerde hiç floresans izlenmezken, Duarte varyantında sağlıklı kişilere göre geç floresans verir [11].

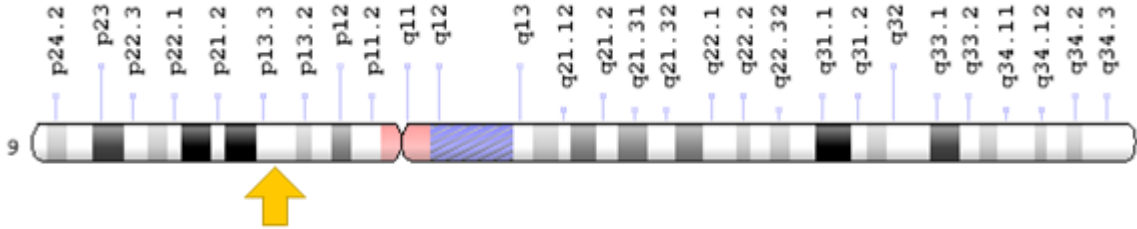
Eritrosit lizatlarında kantitatif olarak GALT aktivitesinin bakıldığı daha özel testler de vardır. Enzim aktivitesi farklı yöntemlerle ölçülebilir. Altın standart radyoizotop yöntemidir, bununla birlikte spektrofotometrik yöntem ve LC-MS/ MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) de enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılabilir. Enzim düzeyinin bakıldığı testler bebeğin beslenmesinden bağımsızdır ve doğumdan sonra herhangi bir zamanda alınan kan örneğinde bu test uygulanabilir. Ancak kan transfüzyonu sonrasında yalancı negatif sonuç verir. Bu durumda tanı için idrar galaktitol düzeyi, eritrosit galaktoz-1-fosfat düzeyi yol gösterici olabilir. Deri fibroblastlarında da enzim çalışması yapılabilir. Postmortem uygun

şekilde alınıp saklanmış karaciğer veya renal korteks dokuları da enzim çalışması için uygundur [11], [37]

Prenatal tanı için GALT enzim aktivitesi koryon villus hücrelerinde ya da amnion sıvısı hücrelerinde ölçülebilir ve amnion sıvısında galaktitol miktarı belirlenebilir. Holton ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada galaktozemili fetusların 10. ve 25. gestasyon haftalarında amniyotik sıvılarında galaktitol birikimi gösterilmiştir. Aynı çalışmada galaktozemili hastaların idrarlarında galaktitol miktarının arttığı da rapor edilmiştir [11]. Erken hamilelik döneminde galaktitol birikiminin gösterilmesi prenatal tanı için önemlidir.

2.2.3.3. Genetik Tanı

Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz geni (NM_000155) 9p13.3 kromozomunda bulunan 11 ekzonlu bir gendir ve 43kDa'luk protein ürünü kodlar [38], [39] (Şekil7). Klasik galaktozemi, *GALT* genindeki homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır [2]. HGMG Mart, 2019 verilerine göre *GALT* geninde tanımlı 340 mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonların 328'i dizi analizi ile saptanabilen yanlış anlamlı, anlamsız, kırılma hatası ve insersiyon/delesyon (in/del) tipi mutasyonlardır. Dokuz tanesi ise Array/MLPA ile saptanabilecek büyük delesyonlardır.



Şekil 7: Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (*GALT*) geninin bulunduğu 9p13 kromozomunun diagramı [42].

Beyaz popülasyondaki galaktozemi hastalarının %70'inde p.Q188R ve p.K285N yanlış anlamlı (*missense*) mutasyonları bulunur ve klinik prezantasyon oluşturur [11]. Afrika-Amerikalı hastaların %62'sinde daha hafif hastalığa yol açan p.S135L mutasyonu görülür. Klasik galaktozemiye neden olan bir diğer mutasyon ise %2.6 oranında izlenen p.L195P mutasyonudur [39]. Duarte galaktozemide en önemli genetik varyasyonlardan biri olan p.N314D mutasyonu ABD'de 5% oranında izlenmektedir [39], [40].

Galaktozemi hastası yada taşıyıcısı olmayan biri, GALT enzim üretimi için iki normal gen taşır. Bu kişinin genotipi N/N olarak sembolize edilir ve enzim aktivitesi normal düzeydedir. Klasik galaktozemisi olan hastalar ise her iki ebeveyninden de mutant birer allel alır. Bu kişinin genotipi G/G olarak sembolize edilir ve enzim aktiviteleri çok düşüktür. Klasik galaktozemi de (G/G) GALT enzim aktivitesi %5'in altındadır ve eritrosit galaktoz-1-fosfat düzeyleri 10 mg/dl'nin üzerindedir. Klasik galaktozemi taşıyıcılığında ise bir allelde normal, diğerinde klasik galaktozemi mutasyonu olan bir allel yer alır. Bu kişinin genotipi G/N olarak adlandırılır ve enzim aktivitesi normalden az ama klinik prezentasyon oluşturacak ya da özel diyet yönetimi gerektirecek kadar düşük değildir. Duarte galaktozemi ise klasik galaktozeminin bir varyantıdır. Klasik galaktozemi ile ilişkili komplikasyonlar Duarte galaktozemide beklenmez [41]. Duarte Galaktozemili çocuk, bir ebeveyninden klasik galaktozemi genini (G) ve diğerinden Duarte değişken genini (D) alır. Duarte varyantında genotip D/G şeklinde adlandırılır ve GALT enzim aktivitesinin %25-50 arasında bulunduğu bildirilir (Tablo3). D/N genotipi, Duarte galaktozemi taşıyıcısında yaklaşık %75 enzim aktivitesi, D/D genotipinde (homozigot Duarte galaktozemi) ise yaklaşık %50 enzim aktivitesi olduğu bildirilmektedir [4].

Tablo 3: Galaktozemi genotipine göre beklenen enzim aktivite oranları.

GEN	ZİGOSİTE	GALT AKTİVİTESİ
NORMAL	N/N	%100
KLASİK GALAKTOZEMİ	G/G	%0
DUARTE 2	D2/D2	%50
KLASİK / DUARTE 2	G/D2	%25
DUARTE 1 LOS ANGELES VARYANT	D1/D1	%125

Klasik galaktozemiye neden olan alleller arasında en sık izlenen p.Q188R mutasyonudur (%54-70) [43], [44]. 188. kodondaki bu mutasyon enzimin yapısında glutamin aminoasidi yerine arginin gelmesi ile sonuçlanır [45]. Afrikalı Amerikalılarda ise en çok izlenen mutasyon %50'lik oranla p.S135L'dir [44], [46]. Ülkemizde de doğu Avrupa bölgesinde olduğu gibi p.K285N

mutasyonu tüm diğer Avrupa ülkelerine göre daha sık görülür [47], [48]. Klasik galaktozemiye neden olan bir diğer mutasyon ise %2.6 oranında izlenen p.L195P'dir [39] Galaktozemide izlenen en önemli genetik varyasyonlardan biri olan Duarte galaktozemi, p.N314D varyantının galaktozemi mutasyonu ile birleşik heterozigotluğunda oluşur [49]. ABD'de %5 oranında izlenen bu varyant, GALT enzim aktivitesini %25'e kadar azaltmaktadır [39], [40].

2.3. GENETİK TANI YÖNTEMLERİ

2.3.1. DNA Dizileme Yöntemleri

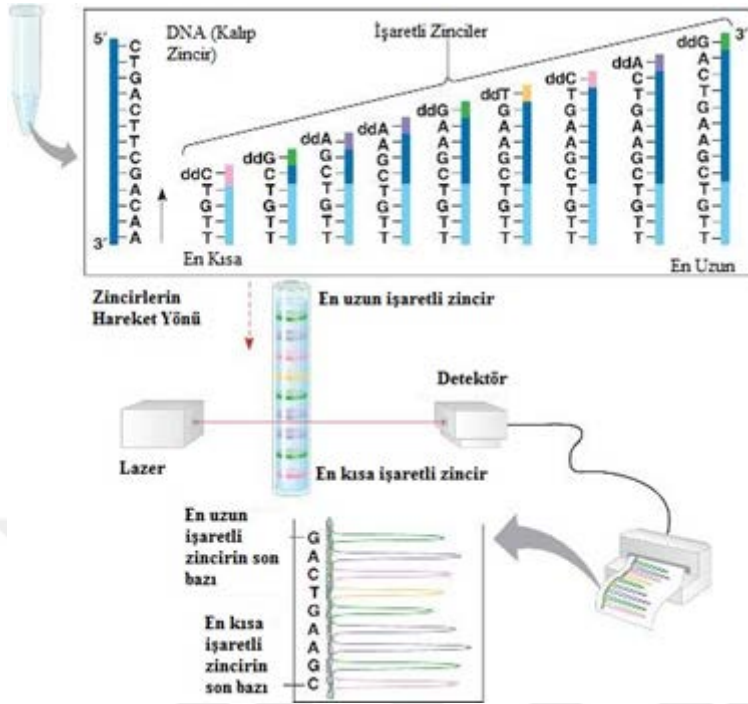
DNA dizileme, DNA zincirinin nükleotid diziliminin sırasının ve nükleotidin ne olduğunun belirlenmesi işlemidir. 1976'da Maxam ve Gilbert [50] tarafından geliştirilen uçları boyalı zincirlerin kimyasal olarak kırılması işlemi 1977'de Sanger ve ark. [51] tarafından geliştirilip zincir sonlandırma metoduna dönüştürülmüştür ve halen günümüzde altın standart olarak kullanılan DNA dizileme teknolojisinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. 1986 yılında Smith ve ark. [52] tarafından nükleotidlerin farklı florofoforlarla işaretlenmesi ve işaretli nükleotidlerin poliakrilamid jel elektroforezinde bir detektör yoluyla saptanmasını sağlayan yöntemler ile DNA dizilemesinin otomatize edilmesinin önü açılmıştır. 1995 yılında Fleischmann ve ark. [53] haemophilus influenzae'nın tüm genomuna ait diziyi bu teknikle yayınlamıştır. Bu yayındaki sorumlu kişi Venter'in daha sonra kurduğu Celera şirketi ile Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün ortak çalışmaları sayesinde "İnsan Genom Projesi" tüm insan genomunu dizileyerek halka açık veri tabanlarında paylaşmış ve 2000 yılı Haziran ayında projeyi tamamlanmışlardır [54]. Ancak günümüzde bu projede kullanılan referans diploid insan genomlarının etnik farklılıklarından dolayı halen boşluklar bulunmaktadır. Bunlar özgün bir kromozomda karşılığı olsa da henüz lokalizasyonu ve oryantasyonu tam olarak yerleştirilememiş olanlar ile herhangi bir kromozoma bağlantılanamamış olan dizilerdir. Güncel referans insan genomu 2017 yılında kullanıma açılmış olan GRCh38'dir (Genome Reference Consortium human assembly 38, patch release 12), Bu referansa açık veri tabanı olan <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> dan ulaşılabilmektedir.

İnsan Genom Projesi kapsamında yapılan tüm genom dizileme çalışmaları her klonun bağımsız çoğaltılması ve dizilenmesi gereksinimlerinden dolayı 10 yıldan fazla sürmüştür. Sonuçları değerlendirildiğinde Sanger dizileme (SD) yönteminin tüm genom dizileme işlemleri

için yetersiz kaldığı maliyet ve süreyi azaltıp verimliliği arttıracak yeni yöntemlere ihtiyaç duyulduğu ortaya çıkmıştır [55]. Bu sebeple YND (Yeni Nesil Dizileme) veya ikinci nesil dizileme olarak adlandırılan çok fazla sayıda klonun eş zamanlı olarak çoğaltılmasına ve analiz edilmesine olanak sağlayan dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu tekniğin kullanımı, tüm genomun, ekzomun ya da özelleştirilmiş panel gen testlerinin geliştirilmesine ve birçok hastanın eş zamanlı incelenmesine olanak sağlayarak hastalıkların genetik etyopatogenezezlerinin hızla ve daha uygun maliyetlerle aydınlatılmasına, genetik tanı için yaklaşımların çeşitlenmesine olanak sağlamıştır [56], [57].

2.3.1.1. Sanger Dizileme

SD olarak tanımlanan ve günümüzde dizileme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilen dizileme yöntemi, Sanger ve ark. 1977 yılında geliştirilmiş ve yayınlanmıştır [51]. Zincir sonlandırma yöntemi olarak tanımlanan SD yönteminin temelinde yeni oligonükleotid zinciri oluşumu sırasında ortamdaki diğer deoksiribonükleotidlere (dNTP) ilaveten reaksiyonda 3' hidroksil grubuna sahip olmayan dideoksiribonükleotidler (ddNTP) bulunmakta, bu nükleotidlerin DNA Polimeraz I' i inhibe etmesi ve zinciri sonlandırması beklenmektedir. Sanger ve ark. [58] dört farklı karışım tübünün her birine farklı işaretli ddNTP koyup, bu karışımlara primer bağlanmış tek zincirli kalıp DNA'yı, DNA polimeraz ve dNTPleri eklemiştir. Çoğaltılma esnasında ddNTP'ye maruz kalan oligonukleotid dizilerinin boyu, ddNTP'nin yeni oluşan diziye dahil olması ile sonlandığından ve bu durum tesadüfi olduğundan farklı uzunluklarda zincirler elde edilmektedir. Daha sonra her tüpte oluşan oligonukleotidler akrilamid jelde yürütülerek fragman boyutlarına göre ayrışmaktadır (Şekil 8). 1986 yılında Smith ve ark. nın [59] her bir ddNTP'yi farklı floroforlarla işaretleyerek bu floroforların bir dedektör aracılığıyla saptaması yöntemini geliştirmesi sayesinde otomasyon sistemlerinin ortaya çıkması sağlanmıştır (Şekil 2.4). Günümüzde otomatize edilmiş kapiller sistemleri ile aynı anda çoklu dizi örneklerinin dizilenmesi mümkün olmaktadır.



Şekil 8: Sanger dizileme prensibi [60].

Sanger Dizi Analizinde Karşılaşılabilecek Sorunlar

1) Dizi kalitesi (iyi saflaşmamış DNA örneği, spesifik olmayan PCR, CG zengin bölgeler, AT zengin bölgeler, primer yerleşimlerinin iyi olmaması, dizi reaksiyonu hataları, yanlış primer ile dizi, PCR ve dizi reaksiyonunda saflaştırma problemleri).

2) OR geçişli hastalıklarda bir allelede büyük delesyon olması sonucu varyantın homozigot gibi görünmesi ya da primer bağlanma bölgesinde polimorfizm bulunması nedeniyle sadece mutasyon taşıyan ya da taşımayan tek allelin dizilenmesi sonucu (allel-drop out) yanlış tanı oluşması.

Sanger Dizi Analizinde Karşılaşılabilecek Sorunlar İçin Önlemler

1) Dizi tekrarı (DNA'nın yeniden saflaştırılması, PCR'de Mg^{++} , T_m ısıları, denatüran ajan kullanılması/kullanılmaması, tekrar analizleri).

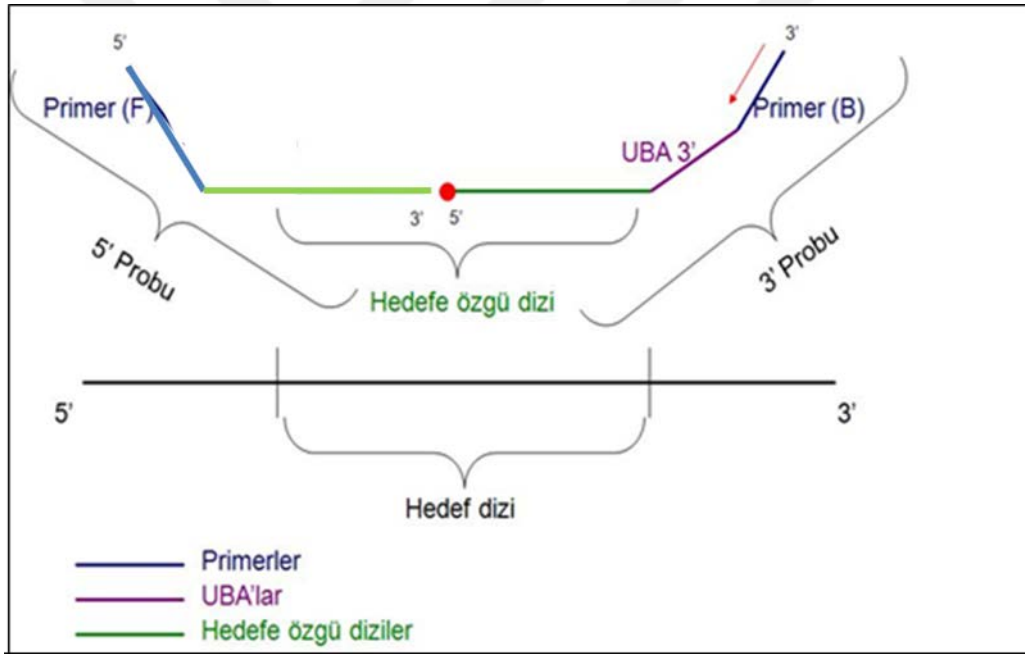
2) Homozigot varyant taşıyanlarda testin ebeveynlerde de uygulanarak, aynı mutasyon için heterozigot taşıyıcı olduklarının gösterilmesi.

2.3.1.2. MLPA

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği 2002 yılında MRC-Holland firması tarafından DNA'daki kopya sayılarını değerlendirmek üzere viral RNA'ların

saptanması için kullanılan ligasyon bağımlı PZR tekniğinin modifiye edilmesiyle geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Teknik, hedefteki özgün dizilerin, prob ligasyonu ardından yapılan çoklu PZR ürünlerinin kapiller jel elektroforezi ile eşzamanlı olarak değerlendirilmesi esasına dayanır [62].

MLPA işleminde her bir hedef bölgeye ortak özellikler içeren özgün probler tasarlanmıştır. Problar iki ana parçadan oluşmaktadır. Bunlardan 5' tarafta bulunan oligonükleotid sırasıyla ileri primer dizisinin eşlenik motifini ve hedef alınan DNA dizisinin eşlenik motifini içeren dizilerden (20-30 bp) oluşmaktadır. Probun 3' parçasını oluşturan oligonükleotid ise sırası ile hedef alınan DNA dizisinin komşu eşlenik motifini (25-43bp) devamında fragmanların farklı boyda oluşmasını sağlayacak dolgu dizisini (UBA) (19-370 bp) ve sonunda geri primerin eşlenik dizisini taşımaktadır (Şekil 9).



Şekil 9: Primerler, UBA (uzunluğu belirli aralık) ve hedefe özgü dizinin demonstrasyonu

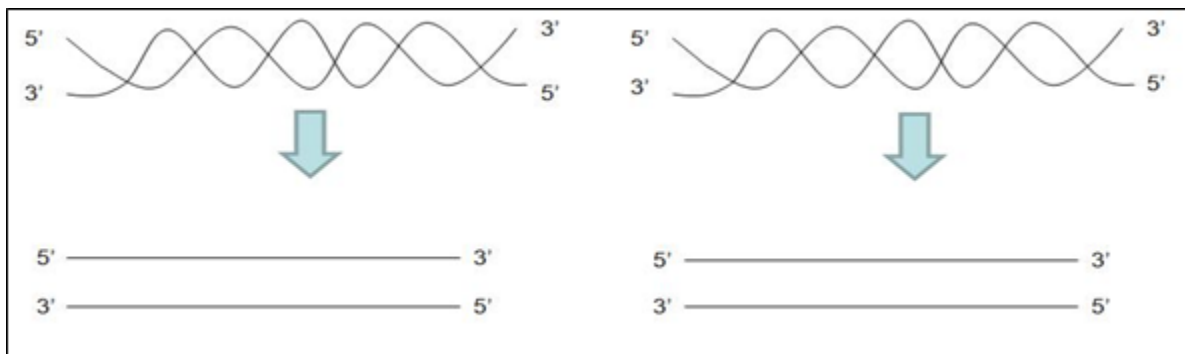
İşlem basamakları temel olarak 5 aşamadan oluşur;

- 1) Hedef DNA denaturasyonu
- 2) Hedef bölgeler ile onlara özgün spesifik problemlerin hibridizasyonu,
- 3) Hibridize olan problemlerin ligasyonu
- 4) Ligasyona uğramış problemlerin amplifikasyonu (PZR ile çoğaltılması)

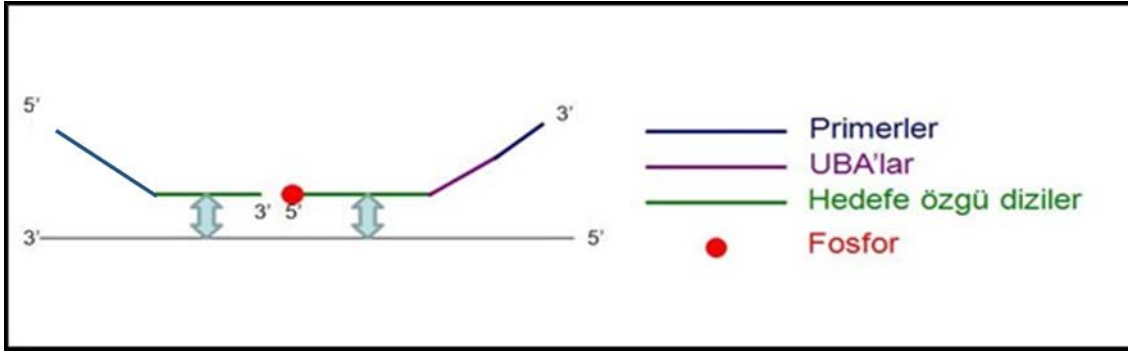
5) oğaltılan ürünlerin kapiller elektroforezde fragman analizi ile değeriendirilmesi (sinyal eldesi)

İlk aşamada, DNA denatüre edilerek, araştırılacak bölgelerin her birine özgü ikişer parçadan oluşmuş farklı oligonükleotid prob içeren karışım ile bir gece inkübasyona bırakılır (Şekil 10) ve hibridizasyondan (Şekil 11) sonra birbirine komşu bölgelere hibridize olan prob parçaları Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD) bağımlı ligaz kullanılarak ligasyon (problar arasındaki boşluğun fosfodiester bağı kurularak kapanması) işlemine tabi tutulur (Şekil12) Ligasyonla birleşmiş olan problar PZR ile çoğaltılırlar (Şekil 13). PZR ile çoğaltılan farklı probların fragman ürünleri kapiller elektroforez kullanılarak ayrıştırılır ve kontrol ürünlerinden gelen sinyallerle kıyaslanarak değeriendirilir. Probların özgün bağlanma bölgelerindeki mutasyonların varlığında ya da tüm hedeflerin delesyona uğraması halinde hibridizasyon gerçekleşmediği için ligasyon ile prob parçaları bağlanmayıp PZR işleminde çoğaltılamayacağından fragman elde edilemez ve sinyal alınmaz [62].

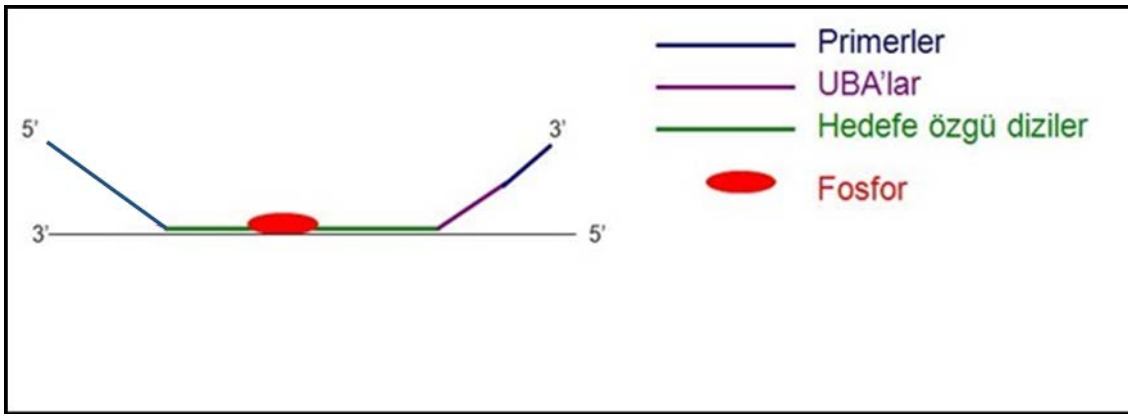
Yapılan tüm işlemler için 20 ng DNA'nın yeterli olması, birçok olguda aynı anda 50'den fazla hedef bölgenin delesyon ve duplikasyonlarının taranması, uygulamanın kolaylığı, düşük hata payı ve maliyeti MLPA'nın avantajı arasında yer almaktayken, kapiler elektroforez cihazına ihtiyaç duyması, küçük nokta mutasyonlarını, çoğu inversiyon ile dengeli translokasyonlar ile prob dışındaki diziye özgü kopya sayı değışikliklerini (CNV) tespit edememesi, hedefe yönelik olması ve kontaminasyona açık olması dezavantajlarıdır.



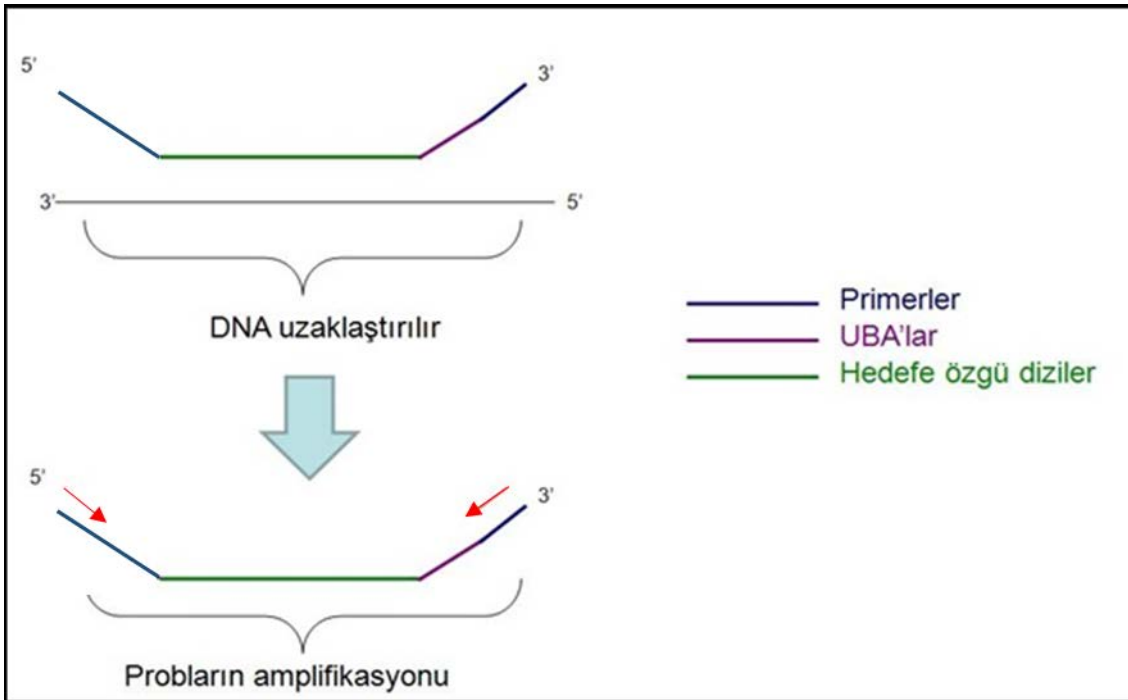
Şekil 10: Hedef DNA denaturasyonu



Şekil 11: Hibridizasyon



Şekil 12: Ligasyon



Şekil 13: Ligasyon sonrası hedeften ayırma ve problemlerin amplifikasyonu

MLPA Analizinde Karşılaşılabilecek Sorunlar

- 1)DNA kalitesinin iyi olmaması ve tuz konsantrasyonunun yüksek olması
- 2)Prob bağlanma bölgesindeki varyasyonlar nedeniyle ligasyon olmaması ya da atipik bantların elde edilmesi
- 3)Uygun olmayan referansların (kontrol örneklerinin) kullanılması sonucu değerlendirilemeyen sonuçların eldesi

MLPA Analizinde Karşılaşılabilecek Sorunlar İçin Önlemler

- 1)DNA örneklerinin yeniden saflaştırılması ve gerekirse, ampikon dizileme çalışmasının spesifikasyonlara uygun olarak tekrarlanması
- 2)Sinyal alınamayan tek ekzon bölgesinin Sanger yöntemi ile dizilenmesi
- 3)Farklı kontrol örnekleriyle çalışılması

2.4. TEDAVİ

Galaktozemi şüphesi ortaya çıktığı andan itibaren galaktoz içeren tüm besinler diyetten çıkarılmalıdır. Laktoz içeren süt ve süt ürünlerinin yanı sıra galaktozun önemli kaynaklarından biri de kuru baklagillerdir. Ayrıca nukleoprotein içeren besinler de (sakatatlar) galaktozun önemli kaynaklarındandır. Sebze ve meyvelerde de serbest galaktoz, galaktonlar, galaktolipitler bulunur. Soya sütü ve peyniri, fermante edilmemiş soya ürünleri (et analogları ve tofu), çekirdekler (kabak, susam çekirdekleri vb.), 20 mg/100g'dan fazla serbest galaktoz içeren sebze ve meyveler, turşu, kahve, domates, portakal suyu, siyah sütsüz çikolata, balın diyetteki yeri tartışmalıdır [63]. Hastalara kazein hidrolizatlarından (Alimentum®, Pregestimil®) ve laktoz içeren ilaçlardan uzak durmaları gerekmektedir. Anne sütü, inek sütü veya formüller, önemli miktarda laktoz dolayısıyla galaktoz içerdiklerinden bu hastalarda kullanılmamaları gerekir. Süt çocukluğu döneminde laktozsuz kazein hidrolizatları içeren özel formüller veya oligosakkaritleri ayrılmış formüller kullanılabilir. Galaktozemili vakalara dışarıdan kalsiyum desteği gereklidir [64], [65].

Laktozsuz diyet başlanmasıyla birlikte klinik iyileşme görülür; ikter azalır, katarakt tamamen kaybolabilir, karaciğer ve böbrek fonksiyonları normale döner. Erken tanı ve tedavi galaktozemi prognozunu iyileştirir, öte yandan uzun dönem izlemde hastalarda primer ve sekonder amenore ile birlikte over yetersizliği görülebilir. Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde galaktoz kısıtlaması hiçbir zaman sorgulanmamış ve tedavinin önemli bir parçası

olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte uzun dönem diyet tedavisi kapsamı hakkında görüş birliği yoktur. Çok sıkı diyet uygulanmasına rağmen eritrositlerde galaktoz-1-P düzeylerinin normale dönmemesi ve prenatal tanı alıp, diyet tedavisine uyum gösteren hastalarda bile uzun dönem komplikasyonların görülmesi diyet kısıtlamalarının ne miktarda olması gerektiği konusunda tartışmaları ortaya çıkarmıştır [66]. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda süt ve süt ürünleri dışındaki yiyeceklerle alınan galaktoz miktarının endojen üretilen galaktoz yanında çok önemli yer tutmadığı, uzun dönem komplikasyonları etkilemediği, bu nedenle de çok katı diyet uygulamanın gerekli olmadığı belirtilmiştir [67]. Galaktozemide serbest ve yasak olan yiyecekler Tablo 4’ de verilmiştir.

Tablo 4: Galaktozemide serbest ve yasak olan yiyecekler.

ŞEKERLER	YASAK	SERBEST
	Galaktoz	Glukoz
	Laktoz	Fruktoz
	Galaktozidler	Sakkaroz
		Dextrin-Maltoz
SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİ	YASAK	SERBEST
	Anne sütü	Nutramigen
	Tüm hayvan sütleri	Galactomin
	Tüm süt ürünleri	Pregomin
	(tereyağı, yoğurt, peynir)	
	Tüm süt içeren besinler	
ETLER	YASAK	SERBEST
	Ciğer	Tavuk etleri
	Beyin	Balık
	Dil	Yumurta
	Sosis	
	Jambon	

	Sucuk	
UNLU GIDALAR	YASAK	SERBEST
	Sütlü ekmek	İrmik-bulgur
	Pastalar	Tüm unlar
	Bisküvi	Makarna-pirinç
	Kekler	Hamur-yufka (sütsüz)
		Ekmek (sütsüz)
YAĞLAR	YASAK	SERBEST
	Tereyağ	Bitkisel yağ
		Sütsüz margarin
SEBZE VE MEYVALAR	YASAK	SERBEST
	Bakla	Yasak olanların dışındaki
	Fasulye	Tüm sebzeler
	Bezelye	Tüm meyvalar
	Mercimek	Evde yapılan meyva suları
	Kırmızı pancar	Evde yapılan sebze çorbaları
ŞEKERLİ GIDALAR	YASAK	SERBEST
	Dondurma	Sütsüz sulu dondurma
	Sütlaç	Evde yapılan sütsüz-tereyağsız hamurlu-şekerli gıdalar
	Çikolata	Ceviz
	Sütlü Şekerlemeler	Badem, fındık
	Sakız	
	Karamel	
BAHARATLAR	YASAK	SERBEST
	Soslar	Tuz
	Ticari mayonez	Biber

Aileler laktoz kaynaklarını tanımayı öğrenmelidir. Konserve ürünlerin, laktoz içermediğine dair bildirim yoksa, çocuklara sunulmaması gerektiği anlatılmalıdır. Sert peynirler, fermentasyonu sağlayan mikroorganizmalar şekerleri tükettiğinden, galaktoz ve laktoz içermez. Ülkemizde de Kars'ta yapılan gravyer peyniri sert peynir türlerinden biridir [21].

Galaktozemide diyet tedavisi dışında birçok tedavi modalitesi de çalışma halindedir. Yaklaşık 15 yıl önce GALK inhibisyonunun klasik galaktozemi için potansiyel bir tedavi olabileceği fikri ortaya atılmıştır [68]. Bu sayede klasik galaktozemide toksik etki gösterdiği düşünülen galaktoz-1-P oluşumunun azaltılacağı düşünülmüştür. Galaktokinaz enzimi inhibe edilerek ölümcül sonuçlar doğurabilecek klasik galaktozemi hastalarında daha hafif klinik bulgular gösteren GALK eksikliği oluşturulacaktır. Yakın zamanda umut vadeden GALK inhibisyonu sağlayan ilaçlar geliştirilmiştir [69]. Fakat hastaların ilaçları ömür boyu kullanmaları gerektiği göz önüne alınacak olursa geliştirilen ilaçların iyi tolere edilebilmeleri, uzun dönem yan etkilerinin ihmal edilebilir olması ve ucuz olmaları gereklidir [21].

2.4.1. GALAKTOZEMİDE TAKİP

Galaktozemi hastaları izleyecek ekipte; çocuk metabolizma hastalıkları uzmanı veya metabolik hastalıklar konusunda deneyimli bir pediatrist, diyet uzmanı, nörolog, çocuk ve ergen ruh sağlığı uzmanı, psikolog, endokrinolog, göz hastalıkları uzmanı, konuşma terapisi uzmanı ve genetik uzmanı bulunmalıdır [16].

Tüm sınırlı diyet alan çocuklarda yapılan uygulamalarda olduğu gibi, çocuğun büyüme ve gelişmesi sık aralıklarla izlenmeli, beslenme programı, aldığı enerji ve besin öğeleri bakımından değerlendirilmelidir [70]. Antropometrik ölçümler ilk bir yaş içinde ayda bir, dört yaşına kadar üç ayda bir ve daha sonra altı aylık aralar ile tekrarlanmalıdır [71].

Galaktozemili hastaların nöromotor gelişimleri de yakından izlenmelidir [1], [72],[73]. Birçok çalışmada erken ve başarılı tedavi edilen galaktozemili vakalarda da IQ seviyesinde etkilenme ve konuşma güçlükleri olabilmektedir [67], [69]. Bunun nedeni olarak intrauterin yaşamda etkilenme, tedavi başlanana kadar geçen kısa süre içerisinde etkilenme, diyetle galaktozun yetersiz veya aşırı kısıtlanması, endojen galaktoz sentezi ve UDP galaktoz eksikliği düşünülmektedir [12], [77]. Çok sayıda hastada dil gelişimiyle ilgili problemler tespit edilmiştir. Dil gelişiminin erken dönemde değerlendirilerek gerekirse konuşma terapisi başlanması önemli fayda sağlayacaktır.

Katarakt için ilk tanı anında değerlendirme yapıldıktan sonra takipte diyetle uyum sorunu yaşanmıyorsa ve anormal bulgular yoksa tekrar değerlendirme gerekli değildir [78]. Kız çocukları hipergonadotropik hipergonadizim açısından ergenlik dönemi öncesinde değerlendirilmeli ve FSH, LH ve östrojen ölçümleri yapılmalıdır. Hipogonadizmi olan kız çocukları endokrinologlar tarafından değerlendirilip tedavi edilmelidir [79]. Başlıca kalsiyum kaynağı süt ve süt ürünlerinden olduğundan, galaktozemili hastaların kalsiyum alımlarının yeterli olup olmadığı kontrol edilmelidir ve gerekirse elementer kalsiyum desteği yapılmalıdır. Yapılan çalışmalarda ilk bir yaşa kadar soya bazlı ve kazein hidrolizatı içeren mamalar kalsiyum kaynağı açısından yeterli olmakla beraber, bir yaşından sonra kalsiyumla zenginleştirilmiş soya bazlı mamalar kullanılması veya elementer kalsiyum desteği verilmesi gerektiği belirtilmiştir [73]. Yeterli kalsiyum, D vitamini ve K1 vitamini alımına ek olarak kızlarda östrojen desteği osteoporoz riskini azaltır.

İzlemde Kullanılan Parametreler:

1. İdrarda redüktan madde aranması [11], [71]
2. Kan galaktoz ve eritrosit galaktoz-1-fosfat düzeyleri [11], [22]
3. Kan ve idrar galaktitol düzeyleri [11], [22]
4. Teknik olanakları yeterli olmayan merkezler için hastaların idrarında redüktan madde olup olmaması izlemde değerlendirilebilir.

Eritrosit galaktoz-1-P düzeyi tedavinin takibi için en sık kullanılan biyokimyasal parametredir. Tanı anında düzeyi çok yüksektir. Tedavi altında ancak haftalar içinde düzeyi düşer. Kan galaktoz ve eritrosit galaktoz-1-P düzeyleri ilk 6 ay içinde haftada bir, 6-12 ay arasında iki haftada bir, daha sonra ayda bir ölçülmelidir. Eritrosit galaktoz-1-P düzeyleri 2-3 mg/dl düzeyinde tutulmaya çalışılmalıdır.

Protein alımının yeterli olup olmadığının anlaşılabilmesi için, ilk bir yıl içinde serum albumin konsantrasyonunun en az altı ayda bir kez, daha sonra ise en az yılda bir ölçülmesi gerekir. Serum albumin konsantrasyonu düşük ise protein alımında %5-10 artış yapılmalıdır [11], [71].

Anemi de beklenen komplikasyonlardan olduğu için hastalar 6, 9 ve 12. aylarda ve daha sonra altı ay aralarla demir eksikliği açısından araştırılmalıdır. Eğer yetersizlik varsa, değerlendirmede kullanılan parametreler normale dönene kadar demir preparatları kullanılmalıdır [71].

Son çalışmalarda erken çocukluk yaşlarında oldukça yüksek miktarlarda olan endojen galaktoz yapımının yaş ilerledikçe azaldığı gösterilmiştir [81]. Altı yaşından küçük çocuklarda 20-25 mg/kg/gün olan endojen galaktoz yapımı erişkinlerde 10 mg/kg/gün altına inmektedir. Güncel bilgilere göre p.Q188R mutasyonunu homozigot taşıyan bir erişkin günde yaklaşık 20mg/kg galaktoz alımını tolere edebilmektedir [82]. Endojen galaktoz yükü yaşla orantılı azaldığından ve yaşla galaktoz toleransı arttığından buna uygun diyet protokollerinin geliştirilmesi gerekmektedir [83].

Galaktozemide diyet tedavisi ömür boyu sürdürülür [12].

2.4.2. PROGNOZ

Uzun yıllar galaktozun diyetten çıkarılmasının etkili bir tedavi olduğu ve uzun dönem komplikasyonları engelleyeceği düşünülmüştü. Lakin uzun dönem takipler sonucunda sıkı diyet uygulayan hastalarda bile komplikasyonların ortaya çıktığı gözlemlendi. Komplikasyonların ortaya çıkmasının ana sebebinin erişkinlerde günde bir grama yaklaşan endojen galaktoz üretimi ve buna bağlı olarak galaktoz metabolitlerinin sürekli yüksek düzeyde kalması olduğu düşünülmektedir [81]. Yapılan çalışmalarda komplikasyonların ortaya çıkmasının iki aylıktan geç olmamak kaydıyla tanı anında hastanın yaşından, hastalığın ilk tanı sırasındaki şiddetinden ve diyetle gösterilen uyumdan bağımsız olduğu gösterilmiştir [79]. Hastalığın oluşturduğu zararın fetal dönemden itibaren başlayıp başlamadığı hala tam olarak açıklanamamıştır. Galaktoz metabolizmasıyla ilgili yolaklar yaklaşık 10. gestasyon haftasında gelişir. Hasta fetuslarda onyedinci gestasyon haftasında yüksek düzeyde metabolitler tespit edilmiştir. Yine de pek çok hasta yenidoğanda katarakt ancak diyetle galaktoz alımı sonrası ortaya çıkmıştır. Azalmış kemik dansitesi, hipergonadotropik hipergonadizim uzun dönemde ortaya çıkabilecek komplikasyonlardandır. Çoğu hastada çocukluk ve erken ergenlik döneminde büyüme gecikse de erişkin boyları genelde normaldir.

Konuşma becerisinde gerilik, sözel dispraksi, görsel algı-uzaysal konumlama becerilerinde problemler ve bilişsel yetersizlik gözlenir. Özellikle erkeklerde olmak üzere bazı hastalarda içe dönük kişilik yapısı ve depresyon ortaya çıkmıştır. Tremor, ataksi, distoni ve koreiform hareketler bildirilmiştir. Kırk yedi erişkin galaktozemi hastası ile yapılan çalışmada vakaların % 60'ından fazlasında tremor, distoni, serebellar ve pirimidal bulgulara rastlanmıştır [84]. Az sayıda hastada serebellar disfonksiyonla giden daha ağır nörolojik tutulum gözlenmiştir. Kraniyal görüntülemelerinde beyaz cevherde lezyonlar, serebral ve serebellar atrofi saptanmıştır.

UDP-galaktoz eksikliğine bağlı olarak sfingolipitlerin galaktozilasyonunun bozulmasının uzun dönem nörolojik komplikasyonların ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Klasik galaktozemili kadınların neredeyse hepsinde gecikmiş menarş, birincil ya da ikincil amenore, oligomenore, doğurganlıkla ilgili sorunlar veya prematür menapozla kendini gösteren ovaryan yetmezlik ortaya çıkar. Endokrinolojik problemlerin şiddeti ve ortaya çıkış yaşı değişkenlik göstermektedir. Erken tanı koyulması ya da tedavi başlanması yetmezlik gelişmesini geciktirir, ama engellemez[84]. Ovaryan yetmezliğin nedeni tam olarak bilinmemektedir. İki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Birincisi biriken metabolitlerin yumurtalıklara toksik etki yapması, ikincisi hormonların ve reseptörlerin anormal glikozilasyon sonucu fonksiyonlarının bozulmasıdır [85]. Erken çocukluk döneminde hipergonadotropizm, yetmezlik lehine ilk ipucu olabilir. Erkek gonadal fonksiyonları olumsuz etkilenmez.

Klasik galaktozemi hastalarında spontan hamilelikler olabilmektedir. Hamilelik boyunca galaktoz metabolitleri belirgin olarak artmaz. Doğum sonrası ilk haftada galaktoz düzeyi yükselir sonrasında kademeli olarak düşer. Klasik galaktozemi tanılı annelerin çocuklarında patolojik bulgu gözlenmemiştir.

Klasik galaktozemi tanılı kadınlarda gonadal yetmezliğe bağlı düşük kemik mineral yoğunluğu iyi bilinen bir komplikasyondur. Bununla beraber galaktozemili 40 çocukla yapılan çalışmada kemik mineral yoğunluklarının belirgin olarak düşük olduğu gözlenmiştir [65]. Bu çocukların kalsiyum alımı, plazma kalsiyum düzeyleri ve D vitamini metabolitleri normal sınırlardayken IGF-1 düzeyleri, kemik yapımı ve yıkımı belirteçleri düşüktür. Bundan yola çıkarak galaktozemi hastalarında kemik metabolizmasında azalmanın kemik mineral yoğunluğunu olumsuz yönde etkilediği öne sürülmektedir. Kemik mineral yoğunluğunun düşmesine kollajen galaktozilasyonunun bozulmasının etken olduğu düşünülmektedir.

2.5. GENETİK DANIŞMA

Hastalık ilk teşhis edildiği anda ebeveynlere ayrıntılı bilgi verilmeli, hasta çocuğun ve ebeveynlerin kan örneklerinden DNA izole edilerek DNA bankasında saklanmalıdır. Bu örneklerden yapılacak moleküler çalışmalarla saptanan mutasyon ile hastalığın gidişi arasında bir dereceye kadar ilişki kurulabilir. Bu genetik bilgi daha sonra prenatal teşhis amaçlı da kullanılabilir.

Hastalık otozomal resesif kalıtıldığından, taşıyıcı bir çift için her gebelikte benzer hasta çocuk riski %25'tir. Bu konuda ebeveynler bilgilendirilmelidir. Hasta bir ebeveynin hasta çocuğa

sahip olma riski, eşinin de hasta olmasına, eşi sağlıklı ise taşıyıcı olmasına ya da sağlıklı eşinden gelen allelde *de novo* bir mutasyon oluşması gibi durumlara göre değişir. Prenatal tanı gebeliğin 16-17. haftalarında amniyon sıvısında radyoizotop dilüsyon yöntemi ile galaktitol ölçümü, amniyotik hücre kültürlerinde GALT aktivitesi ölçülerek veya biliniyorsa özgün mutasyon aranarak yapılabilir [28].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Beslenme ve Metabolizma polikliniğimizde 1990-2018 yılları arasında klasik galaktozemi tanısı alarak izlenen, 70'i retrospektif ve 20'si prospektif olmak üzere toplamda 90 indeks olgu ve 16 aile bireyi çalışmaya dahil edildi. Retrospektif hasta grubunda *GALT* geni dizi analizi 2018'e kadar İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD tarafından çalışılmış olup hasta bilgileri ve sonuçları dosyalarından derlendi.

Temmuz 2018 den sonraki 20 olgu, onamları alınarak çalışmaya dâhil edildi. Olguların, detaylı anamnezleri alınıp, aile ağacı hazırlanarak dosyaları açıldı. Genetik analiz için, indeks olgulardan EDTA'lı tüpe 2 ml periferik kan örneği alındı. Ticari kit ile DNA izolasyonu yapıldı (Zinexts/Magpurix). Elde edilen DNA örneğinin kalitesi ve yoğunluğu Nanodrop (Thermo Scientific- Nanodrop 2000c) cihazında ölçülerek, laboratuvarımızda kullanılan DNA Bankası kayıt programına kaydedildi ve bankalama protokolüne uygun olarak -20 C° de donduruldu.

Retrospektif 70 olguda *GALT* geninin tüm ekzonları dizilenmişti. Bu olguların mutasyon dağılımı incelendiğinde mutasyonların %65'inin ekzon 6 ve ekzon 10 da bulunduğu tespit edildi. Bu sebeple çalışmaya dâhil edilen prospektif 20 hastada öncelikle bu ekzonların dizilenmesi bu ekzonlarda mutasyon saptanamayan olgularda ikinci aşamada diğer 9 ekzonun dizilenmesi ve bunlarda da mutasyon saptanamayan olguların *GALT* genindeki delesyon/duplikasyonları araştırmak amacıyla MLPA analizi akış şeması olarak belirlendi. Kliniği açıklanamayan varyant (heterozigot mutasyon, Duarte varyantı vs.) saptanan tüm olgularda da MLPA analizi yapıldı.

3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Protokolü

GALT geninin 11 ekzonu için toplamda 5 çift olarak tasarlanmış primer çiftleri PZR reaksiyonu için kullanıldı (Tablo5) Her primer çiftine özgü protokoller primerlerin Tm ısılarına

ve çoğaltılan bölgenin hangi nükleotidler bakımından zengin olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterdi.

Tablo 5: Primer çiftlerinin dizileri, oligomer miktarları, çalışma sıcaklıkları ve okuma uzunlukları

Primer Adı	Okuma Bölgesi ve Yönü	Primer Dizisi	Oligomer Miktarı	Tm Çalışma Sıcaklığı	Okuma Uzunluğu
GALT-F1	Ekson 1	5'-GGA TTC TGC AGT AGG CAG CT-3'	20	62	477
GALT-R1	Foreward	5'-GCC TGC AGA CTG TAC GCC T-3'	19	60	
GALT-F2-5	Ekson 2-5	5'-GCA GGC CAA TTG GCG CT-3'	17	64	1146
GALT-R2-5	Foreward & Reverse	5'-CCA AGT CAA CTC CCT CCT GA-3'	20	62	
GALT-F6-7	Ekson 6-7	5'-GTC AGG AGG GAG TTG ACT TGG T-3'	22	61	693
GALT-R6-7	Foreward & Reverse	5'-GGA TAG GAA GTC ATC AAG GTG ACA-3'	24	61	
GALT-F8-9	Ekson 8-9	5'-CCT GGG CAC ATT CTT TTC TT-3'	20	59	565
GALT-R8-9	Reverse	5'-CCC TCA GTC CCA GCA TCT-3'	18	58	
GALT-F10-11	Ekson 10-11	5'-CAA CAC CAT TTC TGG GCT CCT-3'	21	64	1726
GALT-R10-11	Foreward & Reverse	5'-GCC TCA GCC ACA ACC AAG A-3'	19	62	

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Biomatik), 25 mM MgCl₂ (Biomatik), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,1µM - 0,5µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Biomatik) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH₂O) ile 25 µl'ye tamamlandı. PZR'da amplifiye

edilen her bir bölge, DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol) eşliğinde yapıldı. PZR işlemleri, termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) tasarlanan protokole uygun programda çalıştırıldı (Tablo 6). PZR sonrasında amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak, 2 µg/ml gliserol/bromofenol mavisi boya karışımı ile birlikte %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 150 V'da, 30 dk yürütüldü. Görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat) amplifikasyonu saptanan ürünlere, Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) ile enzimatik PZR pürifikasyonu yapıldı. Purifiye olmuş ürünler dizi PZR reaksiyonuna kadar 4°C'de karanlıkta saklandı.

Tablo 6: Termal döngü protokolü

AŞAMANIN ADI	SÜRE	SICAKLIK	TEKRAR
gDNA Denatürasyonu	10 dk	95 C°	1
PZR Fragment Denatürasyonu	30 sn	95 C°	10
Primer Bağlanması	30 sn	Primer T _m (C°) + 2 C°	
Elongasyon	30 sn - 2 dk	72 C°	
PZR Fragment Denatürasyonu	30 sn	95 C°	30
Primer Bağlanması	30 sn	Primer T _m (C°)	
Elongasyon	30 sn - 2 dk	72 C°	
Elongasyon	10 dk	72 C°	1

3.2. Sanger Dizileme Protokolü

Her dizi PZR reaksiyonu için, BigDye Buffer (PZR reaksiyonları için gerekli kimyasallar karışımı), BigDye v3.1 (dNTP, ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz karışımı), dizilenecek bölgeye ait tek yönlü primer, dH₂O ve purifiye edilmiş PZR ürünü karışımı (son hacmi 10µl) plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde kendine özel ayrılan bir kuyucuğa yerleştirildi. Plak termal döngü (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) cihazında işleme tabi tutuldu.

Dizi reaksiyonu ardından ürünlerin karışımında bulunan diğer ürünlerden temizlenmesi için plak içerisindeki kuyucuklarına, ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklenerek plak koruyucu bantla kapatılarak oda ısısında 15 dak. bekletilerek ardından 3810 rpm’de 45 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak kuyucuk ağızları üste gelecek biçimde çevrilerek 1100 rpm’de 30 sn. kısa santrifüj edildi. Her bir kuyucuğa 35 µl %70’lik etanol eklenerek plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm’de 15 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak hızlı vakum konsantratöründe (SpeedVac Concentrator/Thermo Scientific SAVANT DNA 120) yaklaşık 40 dakika eklenerek etanol uzaklaştırıldı. Süre bitip alkolün tamamı uçurulduğunda, her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon tamponu [(dH₂O ya da HiDi formamid (Highly Deionized Formamid)] eklenerek örnekler 95 °C de 5 dakika denatüre edildi.

3.3. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Protokolü

3.3.1. Denatürasyon ve Hibridizasyon aşaması

İşlem öncesi DNA örnekleri yoğunlukları 25-30 ng/µl olacak şekilde her çalışma öncesi yeni hazırlanmış TE çözeltisi (pH:8.0) içinde seyreltildi. MLPA ticari kiti (P156 - lot B2-0317/MRC-Holland) ile gelen SALSA Prop karışımı ve MLPA tamponu oda ısısında bekletilerek çözülmeleri sağlandı. Kit içerisinde bulunan prob/ekzon bölgeleri Tablo 7 ve prob dizileri Tablo 8’de gösterilmektedir. Her örnek için ilgili prop karışımına özgü 200 µl’lik etikenlendirilmiş PZR tüpleri hazırlandı. Bu tüplere, her bir örnekten 3.4 µl DNA eklendi ve termal döngü cihazında MLPA için hazırlanmış protokolün ilk aşamasında 98°C’ de 5 dakika denatüre edildi. Bu sırada örnek başına 1,5 µl prob ve 1,5 µl Salsa Tamponu (%10 pipetajda olası kayıp için eklenerek) içeren ana-çözelti hazırlanıp pipetaj yardımıyla karıştırıldı. Her çalışmada üç referans örnek çalışmaya eklendi. Denatürasyon sonrasında termal döngü cihazında 25°C lik aşamaya geçmiş tüplere, ana-çözeltiden 3 µl eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından PZR protokolü bir sonraki aşamaya aktarılarak hibridizasyon aşamasına geçildi.

Tablo 7: Prob yerleşimleri, dizileri ve ligasyon bölgeleri (SALSA MLPA probemix P156-B2 kullanım talimatı sayfasından alındı)

Uzunluk	Prob	Ekzon	Ligasyon bölgesi	Prob dizisi (24nt)	Sonraki proba uzaklık
328	08075-L07856	DNAI1 geni		ACTCCAGCCAAT-TCCTCGACACCT	132.3 kb
		Başlangıç kodonu	117-119 (ekzon1)		
291	05030-L04416	Ekzon 1	90-91	GGCCCTGCAGAT-TTCCAGCGGAT	0.5 kb
166	05031-L04417	Ekzon 2	251-252	GTGCTGGTGTCA-GCTCACC GCATG	0.4 kb
256	10650-L11968	Ekzon 3		CTAGCCTATCCT-TGTCGGTAGGTG	0.2 kb
211	05033-L04419	Ekzon 4	465-466	ATCATCCCCTTT-TCCAAGCAAAGT	0.2 kb
239	05034-L04420	Ekzon 5	576-577	TTGTTGATGCAT-GGGCCTCAGTCA	0.2 kb
193	05035-L04421	Ekzon 6	627-628	TCTGATAGATCT-TTGAAAACAAAG	0.2 kb
154	05036-L04422	Ekzon 7	700-701	CAGCAGTTTCCT-GCCAGATATTGC	0.4 kb
172	05037-L04423	Ekzon 8	814-815	GGAACGTCTGGT-CCTAACCAGTGA	0.2 kb
220+	05038-L04424	Ekzon 9	958-959	CATCATGAAGAA-GCTCTTGACCAA	0.5 kb
178	05345-L05032	Ekzon 10	1120-1121	TGTCCGGAAT-CATGGTTGGCTA	0.9 kb
274	05040-L04426	Ekzon 11	1208-1209	CTTCCTGAGGTT-CATTACCACCTG	3.6 kb
		Bitiş kodonu	1254-1256 (ekzon 11)		
316	05041-L04427	IL11RA geni		CCTAGAGGCTAT-GGACACTCTGCT	

3.3.2. Ligasyon aşaması

Bu aşama için her bir örnek başına 3 µl Ligaz Buffer A, 3 µl Ligaz Buffer B, 1 µl Ligaz 65 enzimi ve 27,6 µl dH₂O içeren ligasyon karışımı hazırlandı. Soğuk panelde muhafaza edilen bu ligasyon karışımından 34,6 µl hibridizasyon aşamasının ardından 54°C bekleme ısısına geçen termal döngü cihazında bulunan tüpe pipetaj yapılarak eklendi. Ardından tüpler 54°C 15 dakika bekletilerek PZR reaksiyonu için hazır hale getirildi.

3.3.3. MLPA PZR reaksiyonu

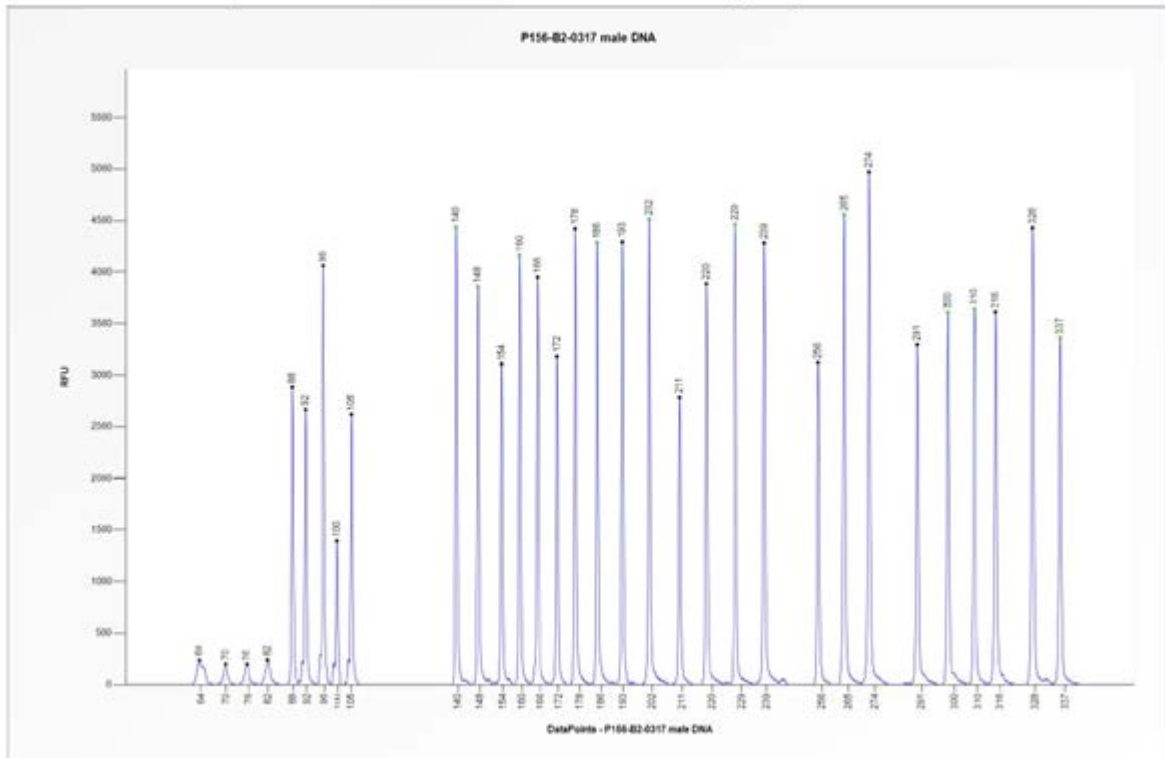
PZR aşaması için örnek başına 2 µl ilişkili SALSA PZR primeri, 0,5 µl SALSA polimeraz enzimi ve 7,5 µl dH₂O olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı. Hazırlanan PZR karışımından 10 µl termal döngü cihazında 60°C’de bekleme aşamasında olan tüplere pipetaj yoluyla aktarılıp PZR protokolü bir sonraki aşamaya aktarılarak PZR işlemi başlatıldı.

3.3.4. Kapiler Elektroforez ile Fragmanların saptanması

PZR işlemi ardından termal döngü cihazında 4°C’de bekleyen ürünler -4°C’ ye alındı. Bu sırada her bir örnek için 0,2 µl LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9,5 µl formamid (Highly Deionized - Hidi) içeren yükleme tamponu hazırlandı. ABI3500 cihazı için uygun olan plakta (USA Scientific-800-522-8477) her bir kuyuya 0,3 µl örnek ve 9,7 µl yükleme tamponu eklendi. Plak, kendisine uygun septa (AB Applied Biosystems-182901S9R) ile kapatılarak plak santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 1200RPM de 2 dakika çevrildi. Santrifüjün ardından kapiller elektroforez cihazında yürütme ayarları düzenlenerek yürütme işlemine geçildi. (Yürütme voltajı; 13,4kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (data delay): 250 sn. Kapiller sıcaklığı 60 °C.). “.fsa” formatındaki ham veri analiz programına aktarıldı.

3.3.5. Kapiler Elektroforezin Değerlendirilmesi

Cihazdan “.fsa” formatında elde edilen ham veri Coffalyser.Net (v.131211.0000)(MRC-Holland) adlı ticari program kullanılarak değerlendirildi. Programın kite özgü ayarları yapılarak örnekler yüklendi. Değerlendirme aşamasında referans örneklerle göre pik şiddeti (Şekil14) oranları 0,7 ve altı için delesyon, 1,30 ve üstü için duplikasyon olarak değerlendirildi.



Şekil 14: Prob karışımı ile yapılan çalışmada piklerin ortalama yüksekliklerini gösteren temsili resim (SALSA MLPA probemix P156-B2 kullanım talimatı sayfasından alındı)

3.4. Biyoinformatik değerlendirmeler

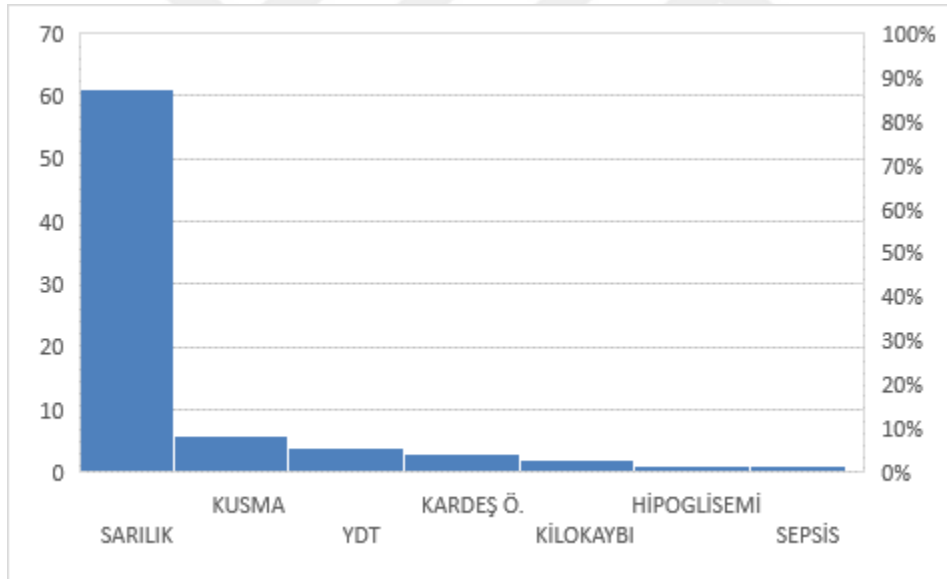
MLPA veya Sanger dizi analizleri sonucunda saptanan, ancak veri tabanlarında kayıtlı olmayan varyantların patojenik olma olasılıklarını hesaplayabilmek için MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT(<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>) gibi *in silico* tahmin araçları kullanıldı. İlgili varyantın patojenite skoru, ACMG (American Collage of Medical Genetics) rehberindeki ölçütlere göre değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Beslenme ve Metabolizma polikliniğinde 1990-2018 yılları arasında Klasik Galaktozemi klinik tanısı ile izlenen ve moleküler genetik tanı ve genetik danışma istemi ile Tıbbi Genetik AD'a yönlendirilen toplam 90 olgu retrospektif ve prospektif olarak incelendi.

4.1. KLİNİK BULGULAR

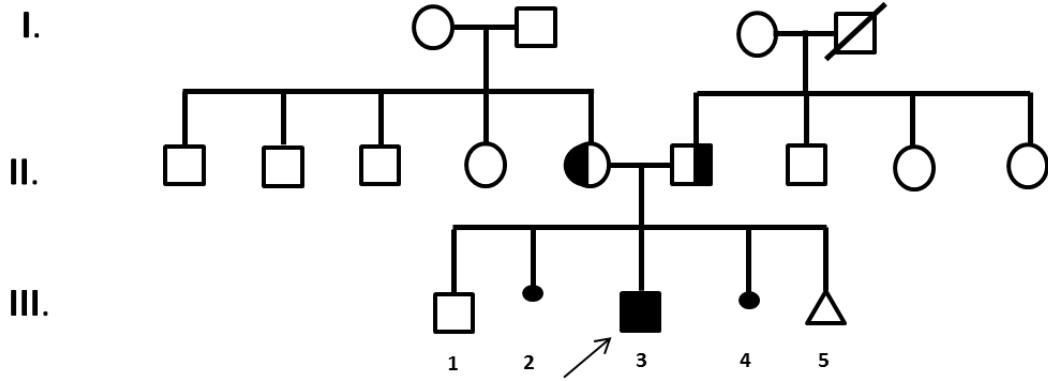
Çalışma grubunu 58 (%64,4) erkek ve 32 (%35,6) dişi oluşturdu. Olguların %85'i doğumdan sonraki ilk haftada bulgu vermişti. İlk 15 günde galaktozemi için tarama testi yapılmasına yol açan nedenler sıklıklarına göre Şekil 15 de gösterildi. Olguların %75'inde sarılık en sıklıkla saptanan bulgu oldu.



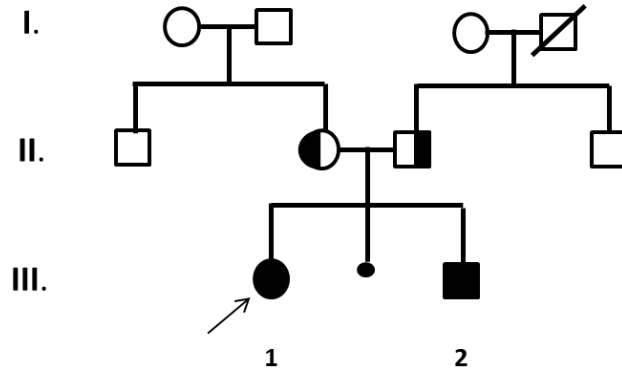
Şekil 15: Galaktozemi tarama testine yönlendiren klinik bulgular.

Seriye oluşturan hastaların %48'i ilk 15 günde (erken), ilk bir ay içinde ise olguların %84'ü tanı almıştı. Olguların yaklaşık %99 u bir yaşın altında tanı alırken bir olgu 13 yaşında tanı almıştı. En erken tanı alma yaşı üç gündü. Olguların %66'sında akraba evliliği, %28'inde galaktozemili kardeş/akraba öyküsü, 26 ailede birden fazla etkilenmiş çocuk öyküsü mevcuttu ve akraba evliliği oranı bu ailelerde %84 idi. Akraba evliliği olmamasına rağmen dört ailede birden fazla etkilenmiş çocuk öyküsü mevcuttu.

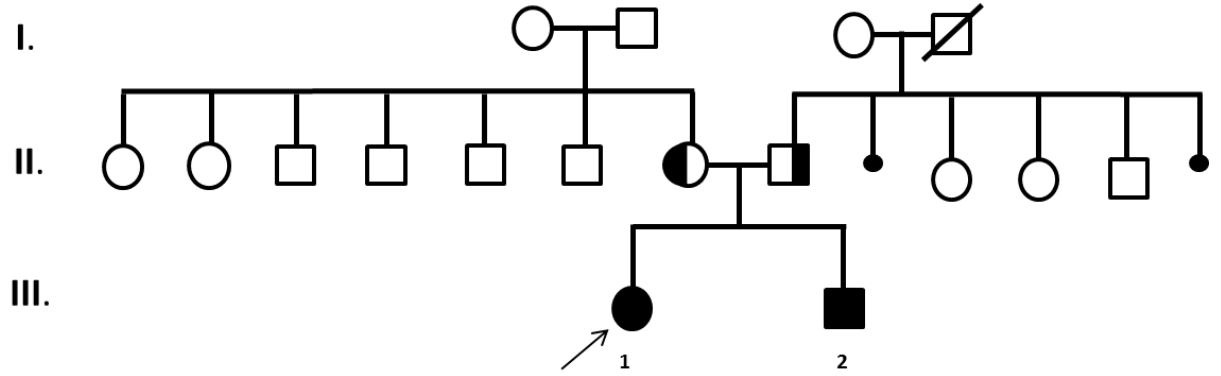
Serimizdeki olgulara ait aile ağaçlarından örnekler Şekil 16,17,18,19' da gösterilmektedir.



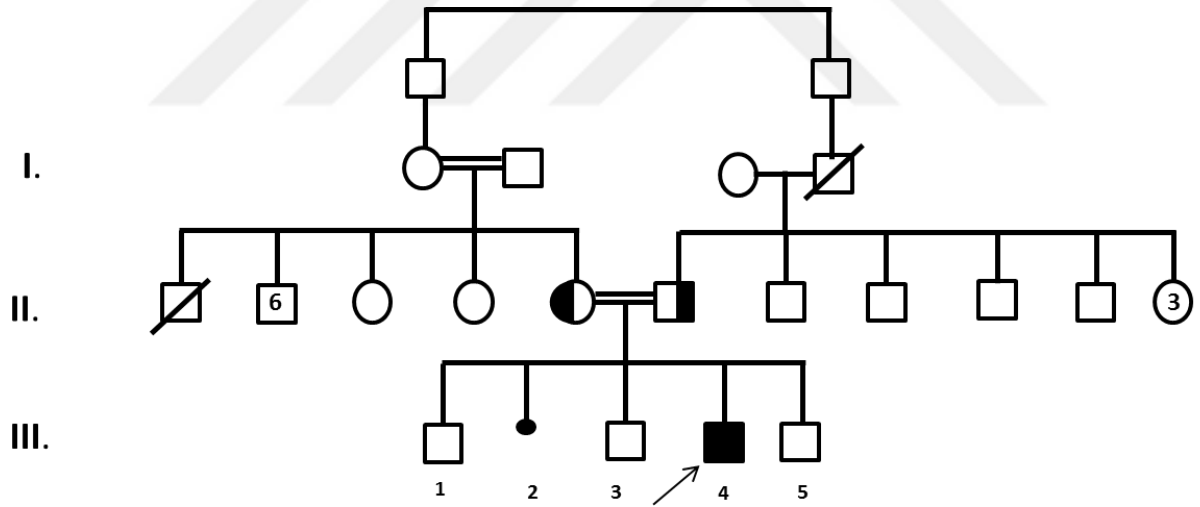
Şekil 16: Aile#7: Aralarında akraba evliliği olmayan ailenin 2. çocuğu olan olgu (III:3). Anne baba arasında akrabalık olmamasına rağmen homozigot c.546G>C (p.Q188R) mutasyonu saptandı.



Şekil 17: Aile#10: Aralarında akrabalık olmayan ailenin ilk çocukları olan olgu (III:1). Olguda ve kardeşinde birleşik heterozigot p.Q188R ve p.K285N mutasyonları saptandı.



Şekil 18: Aile#15: Aralarında akrabalık olmayan ailenin ilk çocukları olan olgu (III:1). Olguda ve kardeşinde homozigot p.Q188R ve p.N314D mutasyonları saptandı.



Şekil 19: Aile#40: Aralarında 2. dereceden kuzen evliliği olan ailenin üçüncü çocuğu (III:1) Novel homozigot c.200delG (p.R67Pfs*19) varyantı saptandı.

Hastalarda tanıda en sıklıkla (%16) saptanan bulgu karaciğer fonksiyonlarında bozulmaydı ve bunu %13 ile kolestaz takip etmekteydi. Galaktoz-1-P ve galaktitol birikimine bağlı oluşan uzun dönem bulgular içinde ise en sık (%28) bilişsel gerilik gözlendi (Tablo 9).

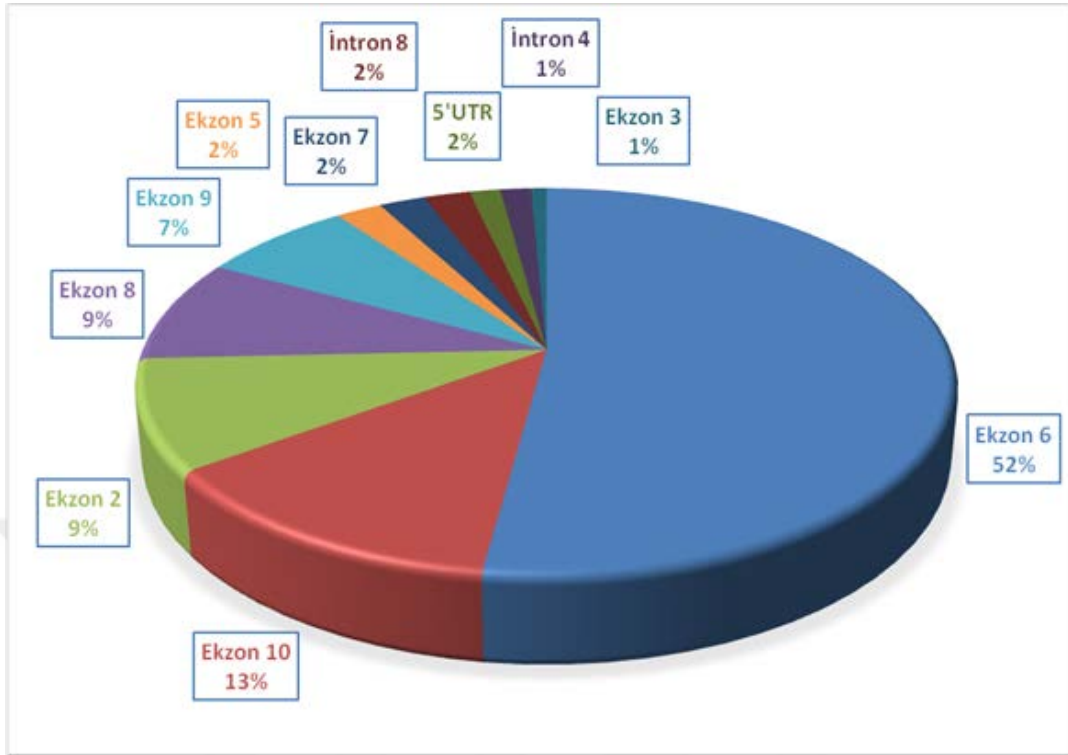
Tablo 8: Tanı anındaki bulgu yüzdesi ve uzun dönem bulgu yüzdesi.

Tanı Anındaki Bulgu	Sayı	Yüzde
Transaminaz yüksekliği	45	16%
Kolestaz	35	13%
Hepatomegali	34	12%
Koagülasyon bozukluğu	29	11%
Sepsis	28	10%
Katarakt	22	8%
Anemi	19	7%
Tartı alımında sorun	19	7%
Tubulopati	12	4%
Letarji	12	4%
Hipoglisemi	11	4%
Hiponatremi	11	4%

Uzun Dönem Bulgular	Sayı	Yüzde
Entelektüel kapasitede azalma	23	28%
Kemik mineralizasyonunda azalma	18	22%
Konuşma Bozukluğu	10	12%
Katarakt	8	10%
Psikotik davranış	8	10%
Hepatomegali	5	6%
Karaciğer fonksiyon bozukluğu	3	4%

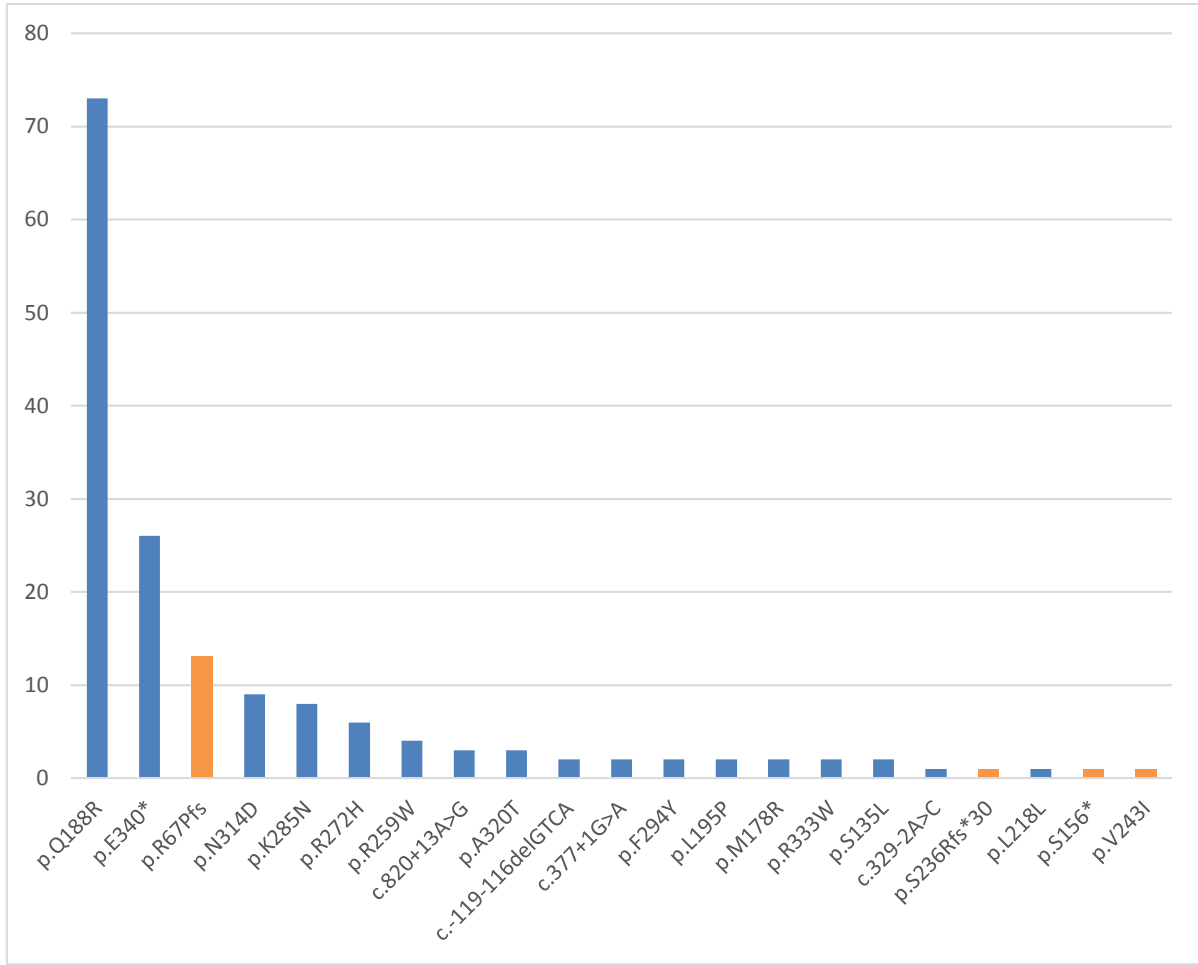
4.2. MOLEKÜLER GENETİK ANALİZ SONUÇLARI

Çalışma grubumuzdaki 90 olgunun 81'inde Sanger dizileme ile GALT geninde hastalık ilişkili 21 farklı varyant saptandı (%90). Saptanan varyantların 17 si bilinen, dördü ise daha önce tanımlanmamış ancak *in silico* analizlerde patojenik olarak değerlendirilen varyantlar idi. Bu varyantların ekzonlara göre dağılım sıklıkları Şekil 20' de gösterilmektedir.



Şekil 20: Saptanan varyantların ekzon/intronlara göre dağılımı.

Olguların 67'sinde (%83,9) mutasyon homozigot, 11'inde (%13,5) birleşik heterozigot formda idi. Üç olguda (%3,7) ise mutasyon heterozigot olarak saptandı. Akraba evliliği olmayan 10 hastada homozigot mutasyon saptandı, hepsinde de ebeveynlerin aynı ilden geldiği öğrenildi. GALT geni ekzon dağılımlarına göre saptanan varyantların %65'nin ekzon 6 ve 10'da yer aldığı gözlemlendi. GALT geninde en sık saptanan mutasyon ekzon 6'da yer alan yanlış anlamlı (missense) c.546G>C (p.Q188R) (%42) mutasyonu idi. İkinci sıklıkla saptanan varyant c.1018G>T (p.E340*) idi ve bunu Duarte varyantı ilişkili c.940A>G (p.N314D) izledi. (Şekil 21).



Şekil 21: GALT geninde saptanan varyantların sıklığı

(Mavi barlar; tanımlanmış mutasyonlar, turuncu barlar; novel varyantları temsil etmektedir).

Olgularda saptanan varyantlara göre klinik tanı; olguların 70'inde (%86) klasik galaktozemi, 2'sinde (%2) klasik galaktozemi taşıyıcısı, 1'inde (%1) klinik varyant galaktozemi, 1'inde (%1) Duarte 2 varyant galaktozemi, 1'inde (%1) Duarte 1 varyant galaktozemi ve 4'ünde (%5) Duarte varyant galaktozemi taşıyıcısı olarak belirlendi.

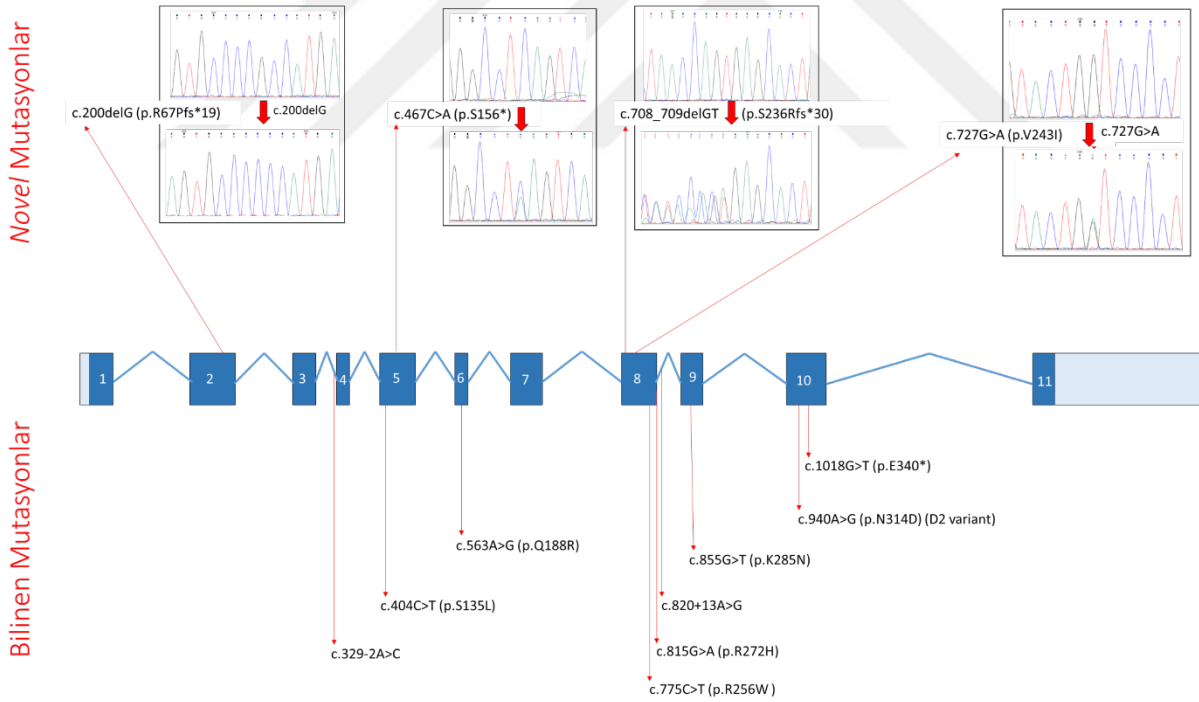
Seriye oluşturan olgulara ait klinik bulgular, saptanan mutasyonlar klasik galaktozemi homozigot mutasyon taşıyanlar, klasik galaktozemi birleşik heterozigot mutasyon taşıyanlar ve Duarte varyantları olmak üzere Tablo 9-10-11'de gösterilmektedir.

Tablo 11: Klinik variant ve Duarte varyantların genotip fenotip ilişkisi

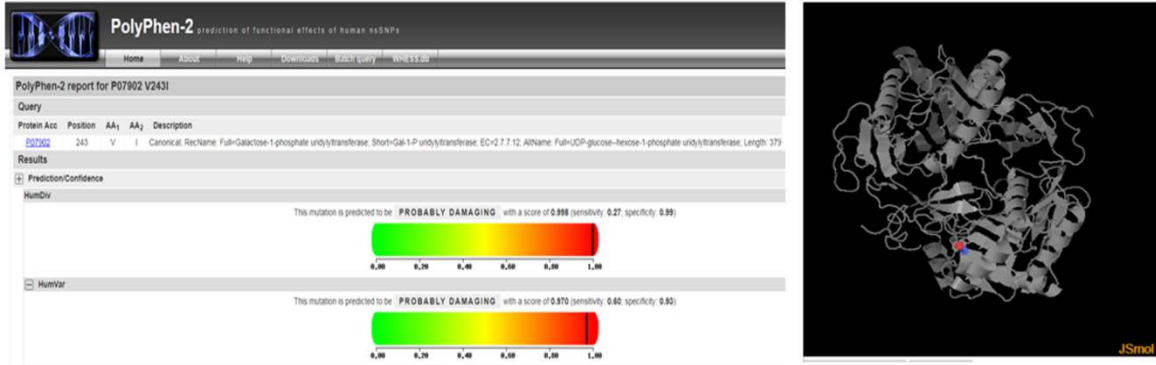
FENOTİP	KLİNİK VARYANT GALAKTOZEMİ	DUARTE VARYANT GALAKTOZEMİ - D1	DUARTE VARYANT GALAKTOZEMİ - D2	DUARTE VARYANT GALAKTOZEMİ TAŞIYICI
ZİGOSİTE	HOMOZİGOT	HETEROZİGOT	HETEROZİGOT	HETEROZİGOT
MUTASYON	p.[S135L];[S135L]	p.[N314;L218L];[N314;L218L]	p.[N314D];[V243I]	p.[N314D];c.[-119_-116delGTCA]
	c.[404C>T];[404C>T]	c.[1018G>T];[546G>C];[1018G>T];[546G>C]	c.[940A>G];[270G>A]	c.[940A>G];[940=]
HASTA SAYISI	n=1	n=1	n=1	n=2
TANI ANINDA BULGULAR				
Hepatomegali	1\1	1\1	0\2	0\2
Transaminaz yüksekliliği	1\1	1\1	0\2	0\2
Koagülasyon bozukluğu	0\1	0\1	0\2	0\2
Hipoglisemi	0\1	0\1	0\2	0\2
Kolestaz	0\1	1\1	0\2	1\2
Tubulopati	1\1	0\1	0\2	0\2
Hiponatremi	1\1	0\1	0\2	0\2
Katarakt	1\1	0\1	0\2	0\2
Anemi	1\1	1\1	0\2	0\2
Sepsis	0\1	0\1	0\2	0\2
Letarji	0\1	0\1	0\2	0\2
Tartılamında sorun	0\1	0\1	0\2	0\2
UZUN DÖNEM BULGULAR				
Katarakt	1\1	0\1	0\2	0\2
Sözel apraksi	0\1	0\1	0\2	0\2
Hepatomegali	0\1	1\1	0\2	0\2
Karaciğer fonksiyon bozukluğu	0\1	1\1	0\2	0\2
Siroz	0\1	0\1	0\2	0\2
Ovarian yetmezlik	0\1	0\1	0\2	0\2
Entelektüel kapasitede azalma	1\1	0\1	0\2	0\2
Kemik mineralizasyonunda azalma	0\1	0\1	0\2	0\2
Psikotik davranış	0\1	0\1	0\2	0\2
Beyaz cevher bulguları	0\1	0\1	0\2	0\2

Seride saptanan 21 varyantın 13'ü missense, 3'ü splice site, 2'si non sense, 2'si frameshift, 1'i indel tipte idi. Missense varyantlar 115 allelde, nonsense varyantlar 27 allelde, frameshift varyantlar 14 allelde, splice site varyantlar 2 allelde ve indeller ise 6 allelde saptandı.

Saptanan dört novel varyanttan biri ekzon 2'de “dur” kodonuna yol açan tipte anlamsız c.467C>A (p.S156*), ikisi ekzon 2 ve 8'de çerçeve kayması ve erken dur kodonuna yol açan c.200delG (p.R67Pfs*19), c.708-709delGT (p.S236Rfs*30), biri de ekzon 5'de yanlış anlamlı c.270G>A (p.V243I) varyantlar idi (Şekil 22). Novel yanlış anlamlı varyant c.270G>A (p.V243I) *in silico* analiz programlarında değerlendirildiğinde (MutationTaster, SIFT, PolyPhen-2 HumVar) “zararlı değişim” tahmini verdi (Şekil 23).



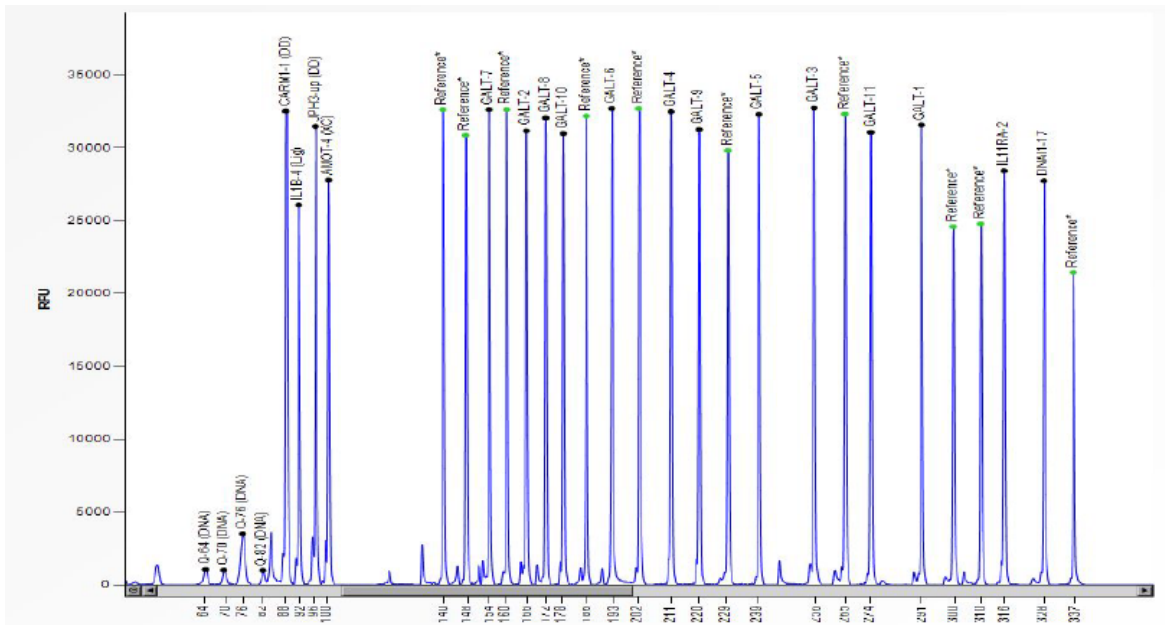
Şekil 22: Saptanan novel (üst) ve bilinen (alt) varyantların ekzonik dağılımı ve novel varyantların elektroferogram görüntüleri

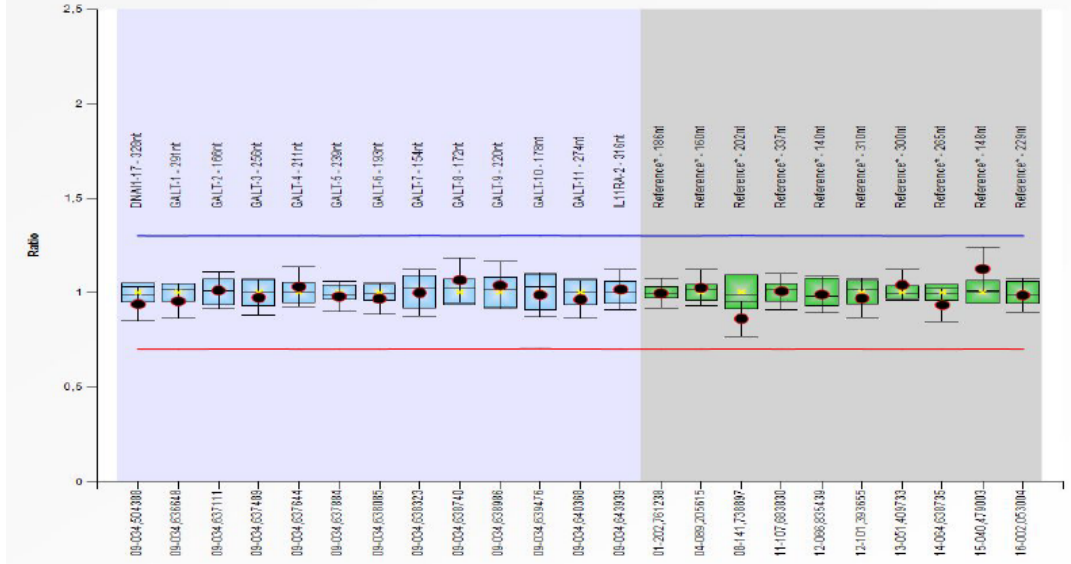


Şekil 23: p.V243I değişiminin patojenik tahminini gösteren PolyPhen-2 analiz sonucu (solda) ve GALT proteininin üç boyutlu yapısındaki yerleşimi (sağda).

4.3. MLPA Sonuçları:

Sanger dizi analizinde mutasyon saptanmayan veya kliniği açıklamayan varyant saptanan (Duarte varyantı ve heterozigot varyant bulunan) 19 hasta MLPA çalışmasına dâhil edildi. Çalışmada elde edilen ölçüm değerleri kalite standartları açısından referans değerler ile uyumluydu (Şekil 24). Bu analiz sonuçlarına göre incelenen bölgelerde herhangi bir delesyon ya da duplikasyon saptanmadı (Şekil 25).





Şekil 25: Delesyon duplikasyon saptanmayan olgu#75'in MLPA analizinde bar görüntüleri

5. TARTIŞMA

Galaktozemi, galaktozun metabolize edildiği yoldaki üç enzimden (GALK, GALT ve GALE) birinin eksikliği sonucu ortaya çıkan bir karbohidrat metabolizması hastalığıdır. Galaktozeminin klasik şekli GALT eksikliğinden kaynaklanır. İlk kez 1935 yılında Mason ve Turner tarafından GALT'ın en sık galaktozemi ilişkili enzim olduğu bildirilmiştir. Bu enzim, 9. kromozomun kısa kolu üzerindeki GALT geni tarafından kodlanmaktadır. Klasik galaktozeminin görülme sıklığı dünya genelinde 1/40 000 ile 1/60 000 arasında değişirken ülkemizde yapılan bir çalışmada sıklık 1/23 775 olarak bildirilmiştir [87]. Olgu grubumuzda %66 olan akraba evliliği oranı, Atik ve arkadaşlarının [83] çalışmasında %50, Öztürk ve arkadaşlarının [88] çalışmasında ise %57,1 idi. Saptanan bu oranlar Türkiye ortalamasının (%23,2) çok üzerindedir. OR kalıtılan diğer hastalıklarda olduğu gibi bu metabolik bozukluğunda ülkemizde diğer batı ülkelerine oranla daha sık görülmesi akraba evlilikleri ile ilişkilendirilir. Bu konuda ülkemizde farkındalık yaratılması önemli bir toplum sağlığı konusudur.

Kalıtım modeli cinsiyetten bağımsız olmasına rağmen, galaktozemi hastalığının erkeklerde daha sık saptanması dikkat çekicidir. Atık ve Öztürk'ün çalışmalarında [83] %64,3 olan erkek oranı çalışmamızda da %64,4 olarak gözlenmiştir.

Postnatal ilk 15 günde tanı alan hastalar “erken tanı” olarak nitelendirilir. Bizim çalışmamızda hastaların %48'i erken tanı hasta grubuna girmektedir. Krantz ve arkadaşlarının [89] 148 olguda yaptığı çalışmada erken tanı oranı %57,8, Shah ve arkadaşlarının serisinde [90] %29, Schweitzer ve arkadaşlarının çalışmasında ise [91] %61,5 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde henüz yeni doğan tarama programında yer almayan bu metabolik hastalığın tanısındaki gecikmenin uzun dönem komplikasyonları göz önünde bulundurulduğunda yenidoğan tarama programına eklenmesinin önemi anlaşılmaktadır.

Hastalarımızda ilk tanı sürecinde en sıklıkla gözlenen klinik bulgu sarılıktır (%75). Tüm serilerde benzer şekilde sarılık en sık görülen bulgu (%64,3 - 82) olarak bildirilmiştir [16] [90] [48]. Biriken toksik metabolitlerin neden olduğu hastalık tablosu sonucu gelişen beslenme güçlüğü ve kusma, klasik galaktozemide sık görülen semptomlardır. Bu seride de kusma ve beslenme güçlüğü sarılıktan sonra sık karşılaşılan bulgulardır. Waggoner ve arkadaşları [24] 240 olgu içerisinde beslenme güçlüğü sıklığını %76, kusma sıklığını ise %47 olarak bildirmişlerdir. Ülkemizde diğer ülkelere göre daha sık görülen klasik galaktozeminin yeni doğan döneminde sarılık, beslenme güçlüğü ve kusma şikâyeti olan hastaların ayırıcı tanısında akla gelmesi, bu hasta grubunda erken tanı oranını artması, erken tanı ve tedavi ile uzun dönem komplikasyonlarının azaltılması bakımından önemlidir.

Klasik galaktozemide Galaktoz-1-P'nin karaciğerde birikmesi ve toksik etkisi karaciğer hastalığına yol açmaktadır. Çalışmamızda, karaciğer hastalığının klinik ve laboratuvar bulguları olan transaminaz yüksekliği hastaların %16'sında, kolestaz %13'ünde, hepatomegali %12'sinde, koagülasyon parametrelerinde bozulma %11'inde saptanmıştır. Shah ve arkadaşlarının serisinde [90] hepatomegali %41, karaciğer yetersizliği %29, Coşkun ve arkadaşlarının serisinde [48] hepatomegali %72,2 olarak bildirilmiştir. Hepatomegali ve hepatoselüler yetersizliğin sık olarak bildirildiği galaktozemili hastalarda çalışmamızda da belirlendiği gibi tanı anında en çok etkilenen organ karaciğerdir. Uzun dönem komplikasyonlar içinde ise hepatomegali sıklığının gerilediği, %6 oranında gözlenen hepatomegali ve %4 oranında gözlenen karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk ile dikkat çekmektedir.

Diyet tedavisi uygulansa dahi, galaktozeminin, uzun vadede nörogelişimsel bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir [92]. Çalışmamızdaki, erken dönem tanı alan hastaların büyük bölümü diyet tedavisi ile kontrol altında olmasına rağmen, bilişsel gerilik, hastalarımızın uzun dönem komplikasyonları arasında en sık (%28) saptanan patoloji olarak göze çarpmaktadır. Bunun yanı sıra çalışma grubumuzda uzun dönem komplikasyonlarından, kemik mineralizasyonunda azalma %22, sözel apraksi %12, katarakt %10, psikotik davranışlar %10 oranında izlenmiştir. Waisbren ve arkadaşlarının [92] diyet tedavisi uygulanan 33 galaktozemili yetişkin ile yaptığı çalışmada farklı oranlarda katarakt (21%), kemik mineralizasyonunda azalma (%24), tremor (%46), ataksi (%15), disartri (%24), ve konuşma bozukluğu (%9) da izlenmiştir. Literatürdeki çalışmanın en çarpıcı yanı hastaların %39’unda depresyon, %67’sinde ise anksiyete bozukluğunun saptanmış olmasıdır. Bizim çalışmamızda galaktozemiye eşlik eden depresyon ve anksiyete bozukluğu sıklıkla gözlenmemiş olsa da, galaktozemi hastalarının takip edildiği multidisipliner ekipte çocuk gelişim uzmanının ve çocuk psikiyatristinin bulunmasının önemli katkı sağladığı düşünülmektedir [93].

Galaktozemi tanısı ile takip edilen kız hastalarda prematür ovaryan yetmezlik (POY) sıklıkla izlenen bir komplikasyondur. Badik ve arkadaşlarının [94] klasik galaktozemi (G/G) ve Duarte varyant galaktozemi (D/G) hastaları üzerinde yaptığı çalışmada, klasik galaktozemi hastalarının %80’inde POY gözlenirken, Duarte galaktozemilerin hiçbirinde bildirilmemiştir. Çalışma grubumuzda 15 yaş üstünde 9 dişi olgu bulunmaktaydı. Bu olgu grubunda yalnızca üç hastada (~%33) POY tespit edilmişti ve bu olgular klasik galaktozemi mutasyonu taşımaktaydı. Çalışmamızdaki POY oranının literatüre göre düşük bulunması, 15 yaş üstü olgularımızın sayısının düşük olması ve bir kısmının da uzun dönem takiplerini sürdürmemeleri nedeniyle ileri komplikasyonlarının bilinmemesi ile açıklanabilir. Klinik ve Duarte varyantı olan olgularımızın yalnızca biri dişiydi ve ergenliğe girmemişti (9yaş). POY, uzun süreli etkilerinden dolayı galaktozeminin takibini yapacak olan multidisipliner ekipte pediatrik endokrinoloji uzmanının önemini arttırmaktadır.

Bu çalışma kapsamında incelenen toplam 90 olgunun %90’ında *GALT* geninde hastalık ilişkili varyant saptanmıştı. Bu oran, Özgül ve arkadaşlarının Türk popülasyonundaki 52 hastalık serisinde “*resequencing microarray*” yöntemiyle yaptıkları çalışmada %97,3 [86] olarak bildirilmiştir. Sanger dizi analizi ile Brezilya’dan 30 hastalık bir seride yapılan çalışmada mutasyon saptanma oranı %93 [107], Fransa’dan 210 hastalık bir seride ise %99 olarak

bulunmuştur [108]. Serimizde saptanan mutasyon oranının bu çalışmalara göre nispeten daha düşük olmasının nedenleri araştırıldığında en önemli faktörün moleküler sonuç alınamayan olguların (n:9) klinik olarak tekrar değerlendirildiğinde galaktozemi tanısından uzaklaşmış olması düşünüldü. Bu grup (sarılık ve idrarda redükten madde pozitifliği nedeniyle GALT enzim eksikliği düşünülen), GALK ve GALE eksikliği gibi diğer galaktozemi türleri ve idrarda redükten madde pozitifliği yapan diğer metabolikler açısından tekrardan değerlendirilmelidir. Beutler testinin patolojik ya da geç florasan verebileceği ve testin yanlış pozitiflik oranının yüksek olduğu bu nedenle tanı testi değil yalnızca bir tarama testi olduğu önemle vurgulanmalıdır.

GALT, 11 ekzonlu bir gen olup 667 bp uzunluğundaki 11. ekzon en uzun, 49 bp uzunluğundaki 4. ekzon en kısa ekzondur . HGMD veritabanında *GALT* geninde 337 tanımlı mutasyon bildirilmektedir (27.06.19).

Serimizde en yüksek mutasyon oranı (%52) en sık saptanan p.Q188R mutasyonunun da yer aldığı 6. ekzondur. Bunu %13 ile p.E340* ve p.N314D mutasyonlarının yer aldığı ekzon 10 takip etmektedir. Sadece bu iki ekzonun dizilenmesiyle tanı oranının yaklaşık %65 olduğu görülmektedir. Algoritmik bir yaklaşımla önce ekzon 6 ve 10'nun dizilenmesi mutasyon saptanamadığı durumda kalan dokuz ekzonun dizilenmesi hem ekonomik hem de iş gücü açısından tasarruf sağlayacağı görülmektedir.

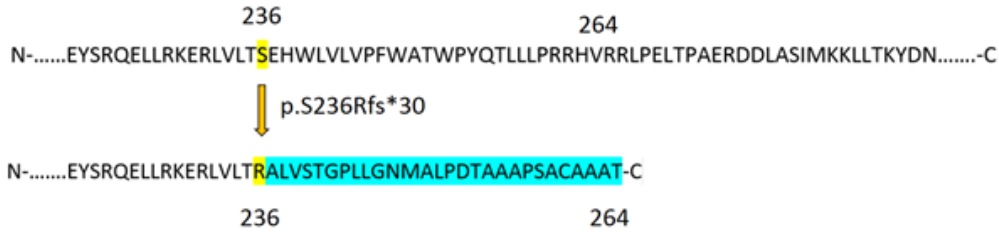
Serimizde, homozigot p.Q188R mutasyonu taşıyan 33 olgunun 7'sinde (%21), homozigot p.E340* mutasyonu taşıyan 10 olgunun 1'inde (%10), homozigot p.R272H mutasyonu taşıyan 3 olgunun 1'inde (%33), p.K285N mutasyonu taşıyan 2 olgunun birinde (%50) akraba evliliği mevcut değildi. Homozigot mutasyon taşıyan indeks olguların aralarında akrabalık olmadığını belirleyen anne babası detaylı sorgulandığında memleketlerinin aynı olduğu tespit edildi ki bu da uzak akrabalık varlığına işaret edebilir. Serimizdeki homozigot mutasyon saptama oranının %83,9 olması, %66'lık yüksek akraba evliliği oranı ile ilişkili olarak açıklanabilir. Birleşik heterozigot mutasyon saptanan 10 hastanın dördünde akrabalık ilişkisi bilinmekteydi. Bu olgularda saptanan mutasyonlardan üçü p.Q188R, ikisi p.E340*, ve birer olgu ise p.N314D, c.-119_-116delGTCA ve c.820+13A>G mutasyonları idi. Bu bulgu Türk populasyonundaki sıklıkları için gösterge olabilir.

GALT geninde en sıklıkla saptanan mutasyon Avrupa’da olduğu gibi ülkemizde de p.Q188R dir. Avrupa ülkelerinde bu mutasyonun sıklığı %45- 93.6 arasında değişmektedir. Bu oran İrlanda da %93.6 [95], İngilterede % 77 [96] Hollanda’da % 58.5 [1], İspanya’da %50 [97], Almanya’da %69 [98], Avusturya’da %60 [44], Polonya’da %51.3 [99] ve Macaristanda %45 [100] olarak bildirilmiştir. Bizim olgu grubumuzda p.Q188R mutasyon oranı %45 olarak belirlendi. Türk populasyonundaki diğer çalışmalarda da benzer şekilde oran %47-57 arasında bildirilmiştir [48] [101]. En yüksek oranın İrlanda’daki %93.6’lık oran ve en düşük oranın da Macaristan’daki %45 ve Türkiye’deki ortalama %50’lik oran olduğu dikkate alındığında, p.Q188R mutasyon sıklığının Avrupa’nın batısından doğusuna doğru azalma gösterdiği anlaşılmaktadır [102]. Bu durum diğer tüm OR hastalıklar için de geçerli olan adalar gibi kapalı toplumlarda (İrlanda) aynı bir mutasyonun taşıyıcılık sıklığının açık toplumlara göre daha yüksek olması ile açıklanabilir. Homozigot p.Q188R mutasyonu taşıyan olgu grubunda en sıklıkla saptanan erken dönem bulgusu karaciğer fonksiyonlarında bozulma, uzun dönem komplikasyonlarında ise bilişsel geriliktir.

Olgu grubumuzda p.Q188R’den sonra %16’lık oranla en sıklıkla saptanan mutasyon, protein sentezinde erken sonlanmaya yol açan p.E340* mutasyonudur. İlk defa Gathof ve arkadaşları [103] tarafından 1995 yılında tanımlanan p.E340* mutasyonunun, Türk toplumunda özgün bir mutasyon olduğu 56 olguluk bir seri sonuçlarına dayanarak ileri sürülmüştür [86]. 16 olguluk bir diğer çalışmada da aynı mutasyon bir olguda saptanmıştı [101]. Serimizde de bu mutasyonun ikinci sıklıkla saptanması bu görüşü desteklemektedir. Schuster ve arkadaşları [104] ciddi klinik tablo ile başvuran ve homozigot p.E340* mutasyonu saptanan iki Türk galaktozemi hastasının takibinde olgulardan birinde mental retardasyon geliştiğini bildirmiştir. Serimizde dört indeks ve bir kardeş olgudaki homozigot p.E340* mutasyonuna p.N314D varyantı *cis* formunda eşlik ettiği gözlenmiştir. Özgül ve arkadaşları [86] p.E340*, p.N314D ve p.L218L varyantlarının haplotip oluşturup bir ortak bir atadan kalıtıldığı, ancak “kurucu etkisini” destekleyecek yeteri kadar veri olmadığını bildirmişti. Gathof ve arkadaşları da [103] üç hastadan birinde p.E340* varyantına eşlik eden p.N314D varyantını tespit ettiklerini bildirmişlerdi. Bu üç hastanın izleminde polimorfizm taşıyan hastanın homozigot p.E340* taşıyanlara nazaran daha iyi bir klinik tablo çizdiği belirtilmişti. Serimizde de p.[E340*; N314D] haplogrup taşıyan grupta yalnızca bir hastada uzun dönem komplikasyon gelişmiş olup, diğer hastaların polimorfizm taşımayan gruba göre daha hafif seyrettiği görülmüştür. Homozigot p.E340* varyantını taşıyan

olduğu öne sürülmüştü. Serimizde bu varyant tüm olgularda p.Q188R varyantı ile birleşik heterozigot (p.[Q188R];[K285N]) formda bulunmuştur. Bu mutasyonu taşıyan iki olguda da tanı sürecinde karaciğer fonksiyonlarında bozulma dikkati çekmekteydi. İki olguda da uzun dönem komplikasyonu izlenmemiştir. Çalışmamızdaki diğer birleşik heterozigot kombinasyonlarında da uzun dönemde komplikasyon saptanmamış olup, hasta sayısının az olması nedeniyle p.K285N taşıyanların kliniğinin daha hafif seyrettiği yönünde bir yorum yapılamamaktadır.

Olgu#13'te birleşik heterozigot olarak p.[K285N] varyantı ile birlikte saptanan p.S236Rfs*30 varyantı çerçeve kaymasına neden olmaktadır (c.708_709delGT) ve bu varyant daha önce tanımlanmamıştır.. Translasyonda çerçeve kayması ve takiben erken “dur” kodonu oluşumuna yol açan iki bazlık delesyon oluşan bu varyantın, “non-sense” aracılı mRNA yıkımı mekanizması nedeniyle protein ürünü vermemesi ve patojenik olması beklenmektedir (Şekil 27). Bu iki varyantın aile içi segregasyon analizi yapılarak annenin p.S236Rfs*30 için, babanın ise p.K285N için taşıyıcı olduğu belirlenerek indeks olgunun birleşik heterozigot formda (*trans*) olduğu gösterilmiştir. Bu olguda gözlenen erken dönem bulgular karaciğer fonksiyon bozukluğu, sepsis ve kilo kaybı idi. Henüz 6 yaşındaki olguda uzun döneme ait herhangi bir komplikasyon tespit edilmemiştir.



Şekil 27: p.S236Rfs*30 (c.708_709delGT) mutasyonunun GALT protein ürünü üzerindeki sonucu. Protein dizisinde 236. konuma kadar normal protein (üstte) ile uyumlu devam eden mutant proteinin (altta) aminoasit dizisi bu noktadan sonra değişmekte ve 264. kodonda protein sentezi sonlanmaktadır.

Olgu#14'de saptanan birleşik heterozigot formdaki p.[E340*;N314D];[S156*] varyantlarından p.S156* (c.467C>A) varyantı daha önce tanımlanmamış novel bir değişimdir. Translasyonda “dur” kodonu oluşturan anlamsız değişikliğe yol açacağından patojenik olarak

değerlendirilmiştir. Bu olguda erken dönem bulguları koagülasyon bozukluğu, kolestaz ve anemidir. 1989 doğumlu (10 yaş) olan olguda henüz uzun dönem komplikasyonu tespit edilmemiştir.

Olgu#62’de saptanan birleşik heterozigot formdaki p.[N314D];[V243I] varyantlarından p.V243I (c.727G>A) varyantı da daha önce tanımlanmamış novel bir değişim idi ve *in silico* analiz programları (Mutationtaster, SIFT, PolyPhen) “zararlı” tahmini vermektedir (Şekil 28). Literatürde aynı pozisyondaki G>T değişimi (p.V243F) daha önce “hastalık ilişkili” mutasyon olarak bildirilmişti (HGMD/LSMD). Olguda saptanan diğer bir değişim olan p.N314D Duarte varyantı olarak bilindiği için D/G allelleri ile olgu Duarte galaktozemi varyantı olarak tanı almıştır. Yeni doğan taramasıyla tanı alan bu olguda uzun dönemde herhangi bir komplikasyon gözlenmemiştir.



Şekil 28: **a.** p.V243I değişiminin *in silico* analiz programı olan PolyPhen’de “zararlı” olarak değerlendirilmesi gösterilmektedir. **b.** Valin 243 konumunun türler arasındaki korunmuşluğunu göstermektedir.

Klinik varyant galaktozemi ile uyumlu p.S135L varyantı, Kent ve arkadaşlarının Afrika kökenli 17 olgudaki çalışmasında [39] bu varyant %48 oranında saptanmıştır. Bu mutasyonu

taşıyan ve tedavi almayan olgularda bilişsel gerilik olduğu bildirilmiştir. Gerard Berry'nin derlemesine [4] göre kliniğin hafif seyretmesi beklenen bu varyantı homozigot olarak taşıyan olgumuzun (olgu#45) tanı bulguları, karaciğer fonksiyon bozukluğu, hepatomegali, tübülopati, hiponatremi, katarakt ve anemi gibi ağır bulgulardır. Tedaviye uyumu da iyi olmayan olguda uzun dönem komplikasyonlarından kataraktın devam ettiği ve bilişsel gerilik saptanmış 19 yaşındaki olgumuzda POY bulgusu gözlenmemiştir. Olgumuz gibi benzer olguların toplanarak ileri çalışmalarla *GALT* aktivitesi etkileyebilecek diğer faktörlerin (modifiye edici genler, epigenetik faktörler, vs) incelenmesi uygun olacaktır.

Duarte varyant galaktozemide, p.N314D polimorfizmi p.L218L varyantı ile birliktelik gösterdiğinde “D1 varyantı”, c.-119_-116delGTCA, c.378-27G>C, c.508-24G>A ve c.507+62G>A varyantları ile birliktelik gösterdiğinde “D2 varyantı” olarak adlandırılmaktadır [86]. Çalışmamızda p.N314D polimorfizm allel frekansı %10 olarak saptanmış, toplam 16 allelde saptanan p.N314D polimorfizminin 11 olguda p.E340* varyantı ile birlikte aynı allelde yer aldığı aile içi segregasyon analizi ile gösterilmiştir. Bu sonuç, bu iki varyantın haplotip oluşturduğunu öne süren Özgül ve arkadaşlarının çalışması ile de uyumludur [86].

Duarte varyantları ile ilgili Elsas ve arkadaşlarının yaptığı fonksiyonel çalışmada [106] D1 varyantı p.L218L sessiz mutasyonunun *GALT* enzim aktivitesinde artışa ve D2 varyantı c.-119_-116delGTCA promoter bölge delesyonunun *GALT* enzim aktivitesinde azalışa sebep olduğu gösterilmiştir. D1 varyantında, genomik DNA'da 1721. pozisyonadaki C >T baz değişimi sonucu “CUA” olan kodon “UUA” ya dönüşmekte (p.L218L), fakat her iki kodon da lösin kodladığı için aminoasit düzeyinde herhangi bir değişiklik oluşturmamaktadır. Bununla birlikte traslasyon mikroçevresinde “CUA” kodonunu tanıyan tRNA'nın tRNA'lar içindeki oranı %0.3 iken, “UUA” kodonunu tanıyan tRNA'nın oranı %1'dir (Şekil 29). Bu bilgiler ışığında “UUA” kodonunu taşıyan mRNA ile kodlanan protein oluşumunun daha hızlı olması sonucu *GALT* enziminin beklenenden hızlı sentezleneceği öngörülmektedir (Şekil 30).

	Çodon	Amino asit ²	% ³	Ratio ⁴	Çodon	Amino asit	%	Ratio	Çodon	Amino asit	%	Ratio	Çodon	Amino asit	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Tyr (Y)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G

Şekil 29: *E. coli*' deki kodon kullanım frekansları. Oklarla gösterilen kodonların her ikisi de lösün (Leu) aminoasidini kodlamasına rağmen UUA kodonunun tanıyan tRNA'nın frekansı 1.0 iken CUA'nın frekansı 0.3'tür.

	RBC GALT aktivitesi	Genotip	Allel 1	Allel 2
Baba	20.0 ←	D/N	N314D-delGTCA	Normal
Anne	18.3	LA/G	N314D-g1721C → T	Q54X
Proband	6.8	D/G	N314D-delGTCA	Q54X
Kardeş	23.6	LA/D	N314D-g1721C → T	N314D-delGTCA
Kardeş	23.4 ←	LA/D	N314D-g1721C → T	N314D-delGTCA
Normal	27 ± 6 (5)	N/N	Normal	Normal

Şekil 30: Heterozigot N314D-delGTCA polimorfizmini taşıyan babanın GALT enzim aktivitesi 20.0 μ mol iken birleşik heterozigot N314D-delGTCA; N314D-g.1721C mutasyonu taşıyan çocukta GALT enzim aktivitesi 23.4 μ mol' dür [106].

Los Angeles varyantı olarak da bilinen D1 varyant galaktozemi serimizde yalnızca bir olguda (olgu#11'de) birleşik heterozigot p.[E340*];[L218L] varyantları olarak saptanmıştı. Literatürde p.E340*, p.L218L ve p.N314D varyantlarının haplotip oluşturduğu öne sürülmekteydi [86], oysa olgumuzda p.N314D varyantı gözlenmedi. Bu durum rekombinasyon sırasında p.N314D'nin haplotip bloğundan kopmuş olması ile açıklanabilir. Olgu#11'in erken dönem bulguları hepatomegali, karaciğer fonksiyon bozukluğu, kolestaz ve anemi, uzun dönem bulguları da hepatomegali, karaciğer fonksiyon bozukluğunun sürmesi idi. Olgunun klinik

bulgularının Los Angeles varyantı için beklenenden ağır olması, ikincil bir hastalık olasılığını düşündürmektedir.

D2 varyantı olan Olgu#52 c.[-119_-116delGTCA;940A>G] değişimlerini taşımaktadır. Olgunun tekrarlanan GALT enzim aktivite ölçümleri; 177 mU/g hb (>308), 439 mU/g hb (>308) ve 366 mU/g hb (>308) olarak saptanmış ve yalnızca bir ölçümde düşük olduğu görülmüştür. Bu olgunun tanı bulgusu kolestaz olup uzun dönemde komplikasyon gelişmemiştir.

GALT geninde büyük delesyon/duplikasyon görülme sıklığı %1 olarak bildirilmekte, büyük delesyonların Askenazi yahudilerinde diğer toplumlara göre daha sık saptandığı vurgulanmaktadır [4]. Bu çalışmada, büyük delesyon/duplikasyon değişimleri MLPA analizi ile değerlendirildi ve olgularda herhangi bir değişim saptanmadı. Dizileme ve MLPA analizinde mutasyon saptanmayan bu olguların klinik açıdan tekrar değerlendirilmesinde klasik galaktozemi tanısından uzaklaşılmıştı. Gerek bu durum gerekse olgu sayımızın azlığı nedeniyle büyük delesyon/duplikasyon değişimlerinin Türk popülasyonu için sıklığı hakkında bu çalışma sonucunda bilgi verilemez.

Bu çalışmanın amacı, klinik ve biyokimyasal olarak Klasik galaktozemi ön tanısı alan hastalarda moleküler genetik analizleri ile tanı konulması, ailelere uygun genetik danışma verilmesi, ön tanının desteklenmediği olgularda ömür boyu sürmesi gereken diyet tedavisinin tekrar gözden geçirilmesi, ayrıca serimiz sonuçları ile genotip-fenotip korelasyonunun yapılması, Türk popülasyonu için mutasyon sıklıklarının belirlenerek klasik galaktozemi için laboratuvar çalışmasına yön verecek akış şemasının belirlenmesi idi.

Çalışmamızda klinik ve Duarte varyant genotipinin hafif fenotiple ilişkili olduğu, klasik galaktozemi için tanımlanmış mutasyonların fenotipik bulguları genel olarak beklendiği gibi olmakla beraber klinik varyant ve D1 varyantı taşıyan iki olguda beklenene göre daha ağır bulgular gelişmiştir. Bu da genin aktivitesini etkilebilecek diğer faktörlere işaret etmektedir. Serimizde klasik galaktozemi hastalarında mutasyon tipinden bağımsız en sık rastlanan erken dönem bulgusu karaciğer fonksiyon bozukluğu idi ve bu nedenle moleküler çalışmada gerektiğinde tüm ekzonların incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Serimiz sonuçları Türk populasyonundaki klasik galaktozemi moleküler tanısında öncelikle ekzon 6 ve 10'nun Sanger dizileme ile hastaların %65'ine tanı konulabildiğini göstermiştir. Ekzon ve 6 ve 10'un dizilenmesi ile tanı konulamayan hastalarda (%35) diğer ekzonların dizilenmesi, mutasyon bulunmayan hastalarda delesyon/duplikasyon analizlerine başlanmadan önce hastaların klinik açıdan yeniden değerlendirilmesinin iş gücü ve maliyet açısından önemli olacağını düşünmekteyiz.

Klasik galaktozemide diyet tedavisinin uzun dönem komplikasyonlarından korunmada yüz güldürücü sonuçlarının olduğu bilindiğinden ülkemizdeki yüksek akraba evliliği oranı göz önünde bulundurularak galaktozeminin yeni doğan tarama kapsamına alınması önerilmelidir. bu şekilde erken tanı ve erken tedavi şansı sunulan hastaların daha az etkilenmesi sağlanabilir ve ülke bütçesine sağlık harcamaları açısından katkıda bulunulabilir.

KAYNAKLAR

- [1]A. M. Bosch et al., "Identification of novel mutations in classical galactosemia," *Hum. Mutat.*, vol. 25, no. 5, pp. 502–502, May 2005.
- [2]A. M. Bosch, "Classical galactosaemia revisited," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 29, no. 4, pp. 516–525, Aug. 2006.
- [3]M. J. Bennett, "Galactosemia diagnosis gets an upgrade." *Clinical Chemistry*, 2010.
- [4]G. T. Berry, *Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia*. University of Washington, Seattle, 1993.
- [5]W. JH, *Inborn Metabolic Diseases - Diagnosis and Treatment*, 4th ed. New York: Springer Verlac, 2006.
- [6]J. L. Fridovich-Keil, M. J. Gambello, R. H. Singh, and J. D. Sharer, *Duarte Variant Galactosemia*. University of Washington, Seattle, 1993.
- [7]S. Segal, "Komrower Lecture. Galactosaemia today: the enigma and the challenge.," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 21, no. 5, pp. 455–71, Aug. 1998.
- [8]P. B. Acosta and K. C. Gross, "Hidden sources of galactose in the environment.," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 154, no. 7 Suppl 2, pp. S87-92, 1995.
- [9]H. M. Holden, I. Rayment, and J. B. Thoden, "Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 45, pp. 43885–43888, Nov. 2003.
- [10] J. B. Holton, "Effects of galactosemia in utero.," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 154, no. 7 Suppl 2, pp. S77-81, 1995.
- [11] T. L. Holton JB, Walter JH, "Galactosemia," 8th ed., V. D. Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Ed. New York: McGraw Hill, 2001, pp. 1553–87.
- [12] J. B. Holton, "Galactosaemia: pathogenesis and treatment.," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 3–7, 1996.
- [13] C. Jakobs, S. Schweitzer, and B. Dorland, "Galactitol in galactosemia.," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 154, no. 7 Suppl 2, pp. S50-2, 1995.
- [14] A. C. J. Hutchesson et al., "Biochemical monitoring of treatment for galactosaemia: Biological variability in metabolite concentrations," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 22, no. 2, pp. 139–148, 1999.

- [15] S. L. Wehrli, G. T. Berry, M. Palmieri, A. Mazur, L. Elsas, and S. Segal, "Urinary Galactonate in Patients with Galactosemia: Quantitation by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy," *Pediatr. Res.*, vol. 42, no. 6, pp. 855–861, Dec. 1997.
- [16] S. U. Atik, S. Gürsoy, T. Koçkar, H. Önal, and S. E. Adal, "Clinical, molecular, and genetic evaluation of galactosemia in Turkish children.," *Turk Pediatr. Ars.*, vol. 51, no. 4, pp. 204–209, Dec. 2016.
- [17] F. Hazan, "Tek gen hastalıkları," in *Tıbbi Genetik Laboratuvar ve Klinik*, 1., C. Ozgur, Ed. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2017, pp. 255–271.
- [18] F. Porta et al., "Neonatal screening for biotinidase deficiency: A 30-year single center experience.," *Mol. Genet. Metab. reports*, vol. 13, pp. 80–82, Dec. 2017.
- [19] J. L. Fridovich-Keil, "Galactosemia: The good, the bad, and the unknown," *J. Cell. Physiol.*, vol. 209, no. 3, pp. 701–705, Dec. 2006.
- [20] M. Tang, S. I. Odejinmi, H. Vankayalapati, K. J. Wierenga, and K. Lai, "Innovative therapy for Classic Galactosemia — Tale of two HTS," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 105, no. 1, pp. 44–55, Jan. 2012.
- [21] kolektif, "Yurdakök Pediatri," Y. Murat, Ed. Güneş Tıp Kitabevleri, 2018.
- [22] G. R., "Disorders of Galactose Metabolism," 4th ed., V. Fernandes J, Saudubray JM and D. B. G, Eds. New York: Springer, 2001, pp. 102–9.
- [23] O. Saygılı, A. Dai, Y. Koçluk, and A. Mete, "Konjenital katarakt," *Gaziantep Tıp Derg.*, vol. 16, pp. 6–8, 2010.
- [24] D. D. Waggoner, N. R. Buist, and G. N. Donnell, "Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases.," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 13, no. 6, pp. 802–18, 1990.
- [25] M. E. Rubio-Gozalbo et al., "The natural history of classic galactosemia: lessons from the GalNet registry," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 14, no. 1, p. 86, Dec. 2019.
- [26] B. D., S. T., K. H., L. K., and E. L.J., "Prevention of a molecular misdiagnosis in galactosemia," *Genet. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 178–182, 2006.
- [27] M. E. Lynch, N. L. Potter, C. D. Coles, and J. L. Fridovich-Keil, "Developmental Outcomes of School-Age Children with Duarte Galactosemia: A Pilot Study," in *JIMD reports*, vol. 19, 2014, pp. 75–84.
- [28] L. J. Elsas, "Prenatal diagnosis of galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT)-deficient galactosemia," *Prenat. Diagn.*, vol. 21, no. 4, pp. 302–303, Apr. 2001.

- [29] P. M. Fernhoff, "Duarte galactosemia: how sweet is it?," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 7, pp. 1045–6, Jul. 2010.
- [30] C. Ficicioglu, C. Husa, P. R. Gallagher, N. Thomas, and C. Yager, "Monitoring of biochemical status in children with Duarte galactosemia: utility of galactose, galactitol, galactonate, and galactose 1-phosphate.," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 7, pp. 1177–82, Jul. 2010.
- [31] C. Ficicioglu et al., "Duarte (DG) galactosemia: A pilot study of biochemical and neurodevelopmental assessment in children detected by newborn screening," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 95, no. 4, pp. 206–212, Dec. 2008.
- [32] Kolektif, *Tıbbi Genetik Laboratuvar ve Klinik*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2017.
- [33] E. Beutler, "Galactosemia: screening and diagnosis.," *Clin. Biochem.*, vol. 24, no. 4, pp. 293–300, Aug. 1991.
- [34] A. Fujimoto, Y. Okano, T. Miyagi, G. Isshiki, and T. Oura, "Quantitative Beutler test for newborn mass screening of galactosemia using a fluorometric microplate reader.," *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 6 Pt 1, pp. 806–10, Jun. 2000.
- [35] U. G. Jensen, N. J. Brandt, E. Christensen, F. Skovby, B. Nørgaard-Pedersen, and H. Simonsen, "Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: a retrospective study.," *Clin. Chem.*, vol. 47, no. 8, pp. 1364–72, Aug. 2001.
- [36] M. Pasquali, C. Yu, and B. Coffee, "Laboratory diagnosis of galactosemia: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)," *Genet. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2018.
- [37] T. A., "Galaktozemi taraması," *Katkı Pediatr. Derg.*, vol. 21, no. 2, pp. 214–23, 2000.
- [38] L. J. Elsas et al., "Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 56, no. 3, pp. 630–9, Mar. 1995.
- [39] K. Lai, S. D. Langley, R. H. Singh, P. P. Dembure, L. N. Hjelm, and L. J. Elsas, "A prevalent mutation for galactosemia among black Americans.," *J. Pediatr.*, vol. 128, no. 1, pp. 89–95, Jan. 1996.
- [40] L. J. Elsas, P. P. Dembure, S. Langley, E. M. Paulk, L. N. Hjelm, and J. Fridovich-Keil, "A common mutation associated with the Duarte galactosemia allele.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 54, no. 6, pp. 1030–6, Jun. 1994.
- [41] M. Suzuki, C. West, and E. Beutler, "Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population.," *Hum. Genet.*, vol. 109, no. 2, pp. 210–5, Aug. 2001.

- [42] "Genetics Home Reference." [Online]. Available: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GALT#location>.
- [43] L. J. Elsas et al., "Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 56, no. 3, pp. 630–9, Mar. 1995.
- [44] S. Greber-Platzner et al., "Molecular heterogeneity of classical and duarte galactosemia: Mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis," *Hum. Mutat.*, vol. 10, no. 1, pp. 49–57, 1997.
- [45] L. J. Elsas, S. Langley, E. M. Paulk, L. N. Hjelm, and P. P. Dembure, "A molecular approach to galactosemia.," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 154, no. 7 Suppl 2, pp. S21-7, 1995.
- [46] H. Henderson, F. Leisegang, R. Brown, and B. Eley, "The clinical and molecular spectrum of galactosemia in patients from the Cape Town region of South Africa.," *BMC Pediatr.*, vol. 2, p. 7, Sep. 2002.
- [47] L. Kozák et al., "Presence of a deletion in the 5' upstream region of the GALT gene in Duarte (D2) alleles.," *J. Med. Genet.*, vol. 36, no. 7, pp. 576–8, Jul. 1999.
- [48] T. Coskun, E. Erkul, V. Seyrantepe, M. Özgüç, A. Tokatli, and I. Özalp, "Mutational analysis of Turkish galactosaemia patients.," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 18, no. 3, pp. 368–9, 1995.
- [49] H. C. Lin, L. T. Kirby, W. G. Ng, and J. K. Reichardt, "On the molecular nature of the Duarte variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT).," *Hum. Genet.*, vol. 93, no. 2, pp. 167–9, Feb. 1994.
- [50] A. M. Maxam and W. Gilbert, "A new method for sequencing DNA.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 74, no. 2, pp. 560–4, Feb. 1977.
- [51] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, Dec. 1977.
- [52] W. W. Smith et al., "Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 51, pp. 18676–18681, Dec. 2005.
- [53] R. D. Fleischmann et al., "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd.," *Science*, vol. 269, no. 5223, pp. 496–512, Jul. 1995.
- [54] J. C. Venter et al., "The Sequence of the Human Genome," *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5507, pp. 1304–1351, Feb. 2001.

- [55] E. P. Consortium, "The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project," *Science* (80-.), vol. 306, no. 5696, pp. 636–640, 2004.
- [56] M. N. Bainbridge et al., "Whole-Genome Sequencing for Optimized Patient Management," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 87, pp. 87re3-87re3, Jun. 2011.
- [57] S. B. Ng et al., "Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes," *Nature*, vol. 461, no. 7261, pp. 272–276, Sep. 2009.
- [58] F. Sanger and A. R. Coulson, "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.," *J. Mol. Biol.*, vol. 94, no. 3, pp. 441–8, May 1975.
- [59] L. M. Smith et al., "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis," *Nature*, vol. 321, no. 6071, pp. 674–679, Jun. 1986.
- [60] "Biology 1151: Principles of Biological Science," 2010. [Online]. Available: <http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch20/termination.html>.
- [61] P. T. Luoma et al., "Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 14, pp. 1907–1920, Jul. 2005.
- [62] J. P. Schouten, C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, F. Diepvens, and G. Pals, "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 12, pp. 57e – 57, Jun. 2002.
- [63] U. N. Wiesmann, B. Rosé-Beutler, and R. Schlüchter, "Leguminosae in the diet: the raffinose-stachyose question.," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 154, no. 7 Suppl 2, pp. S93-6, 1995.
- [64] M. E. Rubio-Gozalbo, S. Hamming, M. J. P. G. van Kroonenburgh, J. A. Bakker, C. Vermeer, and P. P. Forget, "Bone mineral density in patients with classic galactosaemia.," *Arch. Dis. Child.*, vol. 87, no. 1, pp. 57–60, Jul. 2002.
- [65] B. Panis et al., "Bone metabolism in galactosemia," *Bone*, vol. 35, no. 4, pp. 982–987, Oct. 2004.
- [66] S. C. Van Calcar, L. E. Bernstein, F. J. Rohr, C. H. Scaman, S. Yannicelli, and G. T. Berry, "A re-evaluation of life-long severe galactose restriction for the nutrition management of classic galactosemia," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 112, no. 3, pp. 191–197, Jul. 2014.
- [67] A. M. Bosch, H. D. Bakker, L. J. M. de B. Wenniger-Prick, R. J. A. Wanders, and F. A. Wijburg, "High tolerance for oral galactose in classical galactosaemia: dietary implications," *Arch. Dis. Child.*, vol. 89, no. 11, pp. 1034–1036, Nov. 2004.

- [68] T. J. McCorvie and D. J. Timson, "The structural and molecular biology of type I galactosemia: Enzymology of galactose 1-phosphate uridylyltransferase," *IUBMB Life*, vol. 63, no. 9, p. n/a-n/a, Sep. 2011.
- [69] M. Tang, K. Wierenga, L. J. Elsas, and K. Lai, "Molecular and biochemical characterization of human galactokinase and its small molecule inhibitors," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 188, no. 3, pp. 376–385, Dec. 2010.
- [70] Ö. G. Köksal G, *Metabolik Hastalıklarda Beslenme*. Ankara: Klasmat Matbaacılık, 2008.
- [71] C. T., "Galaktozemili hastaların uzun süreli izlemi," *Katkı Pediatr. Derg.*, vol. 20, no. 4, pp. 447–53, 2003.
- [72] C. Lambert and A. Boneh, "The impact of galactosaemia on quality of life--a pilot study," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 27, no. 5, pp. 601–8, 2004.
- [73] K. R. Ridel, N. D. Leslie, and D. L. Gilbert, "An Updated Review of the Long-Term Neurological Effects of Galactosemia," *Pediatr. Neurol.*, vol. 33, no. 3, pp. 153–161, Sep. 2005.
- [74] S. E. Waisbren, T. R. Norman, R. R. Schnell, and H. L. Levy, "Speech and language deficits in early-treated children with galactosemia," *J. Pediatr.*, vol. 102, no. 1, pp. 75–7, Jan. 1983.
- [75] A. L. Webb, R. H. Singh, M. J. Kennedy, and L. J. Elsas, "Verbal Dyspraxia and Galactosemia," *Pediatr. Res.*, vol. 53, no. 3, pp. 396–402, Mar. 2003.
- [76] A. Robertson, R. H. Singh, N. V Guerrero, M. Hundley, and L. J. Elsas, "Outcomes analysis of verbal dyspraxia in classic galactosemia," *Genet. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. 142–8.
- [77] G. T. Berry, I. Nissim, Z. Lin, A. T. Mazur, J. B. Gibson, and S. Segal, "Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia," *Lancet (London, England)*, vol. 346, no. 8982, pp. 1073–4, Oct. 1995.
- [78] L. Welling et al., "International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 40, no. 2, pp. 171–176, Mar. 2017.
- [79] N. V Guerrero, R. H. Singh, A. Manatunga, G. T. Berry, R. D. Steiner, and L. J. Elsas, "Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia," *J. Pediatr.*, vol. 137, no. 6, pp. 833–41, Dec. 2000.
- [80] P. J. Rutherford, D. C. Davidson, and S. M. Matthai, "Dietary calcium in galactosaemia," *J. Hum. Nutr. Diet.*, vol. 15, no. 1, pp. 39–42, Feb. 2002.

- [81] P. Schadewaldt, L. Kamalanathan, H. W. Hammen, and U. Wendel, "Age dependence of endogenous galactose formation in Q188R homozygous galactosemic patients.," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 81, no. 1, pp. 31–44, Jan. 2004.
- [82] A. Bosch et al., "Oral galactose loading does not affect clinical or biochemical parameters in classical galactosemia," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 25, 2002.
- [83] S. U. Atik, S. Gürsoy, T. Koçkar, H. Önal, and S. E. Adal, "Galaktozemi tanılı olgularımızın klinik ve genetik değerlendirilmesi.," *Turkish Pediatr. Arch. Pediatr. Ars.*, vol. 51, no. 4, 2016.
- [84] N. D. Leslie, "INSIGHTS INTO THE PATHOGENESIS OF GALACTOSEMIA," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 23, no. 1, pp. 59–80, Jul. 2003.
- [85] B. van Erven et al., "Fertility preservation in female classic galactosemia patients," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 8, p. 107, Jul. 2013.
- [86] R. K. Özgül et al., "Galactosemia in the Turkish population with a high frequency of Q188R mutation and distribution of Duarte-1 and Duarte-2 variations," *J. Hum. Genet.*, vol. 58, no. 10, pp. 675–678, Oct. 2013.
- [87] M. Demirkol, T. Baykal, G. Hüner, G. Şarbat, Z. İnce, and G. Kurdoğlu, "Newborn screening for biotinidase deficiency: a pilot study from İstanbul," *Diagnosis Treat. Inborn Errors Metab. Contrib. to an Equal Oppor. Child. Asia Eur. İstanbul Turkish Soc. PKU İstanbul Branch*, pp. 23–26, 1996.
- [88] Y. ÖZTÜRK, B. ERDUR, and Y. TOKGÖZ, "Klasik galaktozemili olgularda klinik özellikler," *Turkiye Klin. J. Pediatr.*, vol. 19, no. 1, pp. 16–19, 2010.
- [89] S. Schweitzer-Krantz, "Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial issue of galactosaemia," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 162, no. 0, pp. S50–S53, Dec. 2003.
- [90] V. Shah, S. Friedman, A. M. Moore, B. A. Platt, and A. S. Feigenbaum, "Selective screening for neonatal galactosemia: an alternative approach.," *Acta Paediatr.*, vol. 90, no. 8, pp. 948–9, Aug. 2001.
- [91] S. Schweitzer, "Newborn mass screening for galactosemia.," *Eur. J. Pediatr.*, vol. 154, no. 7 Suppl 2, pp. S37-9, 1995.
- [92] S. E. Waisbren et al., "The adult galactosemic phenotype," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 35, no. 2, pp. 279–286, Mar. 2012.

- [93] C. S. Gubbels et al., "Psychosocial developmental milestones in men with classic galactosemia," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 34, no. 2, pp. 415–419, Apr. 2011.
- [94] J. R. Badik et al., "Ovarian function in Duarte galactosemia," *Fertil. Steril.*, vol. 96, no. 2, p. 469, Aug. 2011.
- [95] M. Murphy et al., "Genetic basis of transferase-deficient galactosaemia in Ireland and the population history of the Irish Travellers," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 7, no. 5, pp. 549–554, Jul. 1999.
- [96] L. Tyfield et al., "Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene," *Hum. Mutat.*, vol. 13, no. 6, pp. 417–430, 1999.
- [97] L. Gort et al., "Mutational spectrum of classical galactosaemia in Spain and Portugal," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–742, Dec. 2006.
- [98] Y. S. Shin, J. Zschocke, A. M. Das, and T. Podskarbi, "Molecular and biochemical basis for variants and deficiency forms of galactose-1-phosphate uridyltransferase," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 22, no. 3, pp. 327–9, May 1999.
- [99] C. Zekanowski, B. Radomyska, and J. Bal, "Molecular characterization of Polish patients with classical galactosaemia," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 22, no. 5, pp. 679–82, Jun. 1999.
- [100] I. Milánkovics et al., "Molecular and clinical analysis of patients with classic and Duarte galactosemia in western Hungary," *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 122, no. 3–4, pp. 95–102, Feb. 2010.
- [101] V. Seyrantepe, M. Ozguc, T. Coskun, I. Ozalp, and J. K. V Reichardt, "Identification of mutations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene in 16 Turkish patients with galactosemia, including a novel mutation of F294Y," *Hum. Mutat.*, vol. 13, no. 4, p. 339, 1999.
- [102] L. Kozdík et al., "Mutation analysis of the GALT gene in Czech and Slovak galactosemia populations: Identification of six novel mutations, including a stop codon mutation (X380R)," *Hum. Mutat.*, vol. 15, no. 2, pp. 206–206, Feb. 2000.
- [103] B. S. Gathof et al., "Characterization of two stop codon mutations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene of three male galactosemic patients with severe clinical manifestation," *Hum. Genet.*, vol. 96, no. 6, pp. 721–5, Dec. 1995.
- [104] V. Schuster, T. Podskarbi, H. Ottensmeier, M. Haubner, and Y. S. Shin, "Simultaneous occurrence of various mutations and polymorphisms in cis and in trans of the galactose-1-

- phosphate uridyltransferase gene in a Turkish family with classical galactosemia,," J. Mol. Med. (Berl)., vol. 76, no. 10, pp. 715–9, Sep. 1998.
- [105] S. F. Dobrowolski, R. A. Banas, J. G. Suzow, M. Berkley, and E. W. Naylor, "Analysis of common mutations in the galactose-1-phosphate uridyl transferase gene: new assays to increase the sensitivity and specificity of newborn screening for galactosemia,," J. Mol. Diagn., vol. 5, no. 1, pp. 42–7, Feb. 2003.
- [106] L. J. Elsas, K. Lai, C. J. Saunders, and S. D. Langley, "Functional Analysis of the Human Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase Promoter in Duarte and LA Variant Galactosemia," Mol. Genet. Metab., vol. 72, no. 4, pp. 297–305, Apr. 2001.
- [107] D. F. Garcia vd., "Clinical profile and molecular characterization of Galactosemia in Brazil: identification of seven novel mutations", BMC Med. Genet., c. 17, sayı 1, s. 39, Ara. 2016.
- [108] A. Boutron vd., "Mutation spectrum in the French cohort of galactosemic patients and structural simulation of 27 novel missense variations", Mol. Genet. Metab., c. 107, sayı 3, ss. 438–447, Kas. 2012.