

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**KONJENİTAL KATARAKTLI HASTALARDA GALAKTOZ-1-
FOSFAT ÜRİDİL TRANSFERAZ ENZİM MUTASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Beri HOCAOĞLU BOZARSLAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. F. Birgül IŞIK

DİYARBAKIR 2010

Bu tez DÜBAP'ın 09-TF-71 no'lu projesiyle desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Çalışmamın gerçekleşmesindeki her aşamada değerli desteğini hissettiğim, yetişmemdeki katkıları ve gösterdiği yakın ilgisi nedeniyle değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. F. Birgül IŞIK'a,

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında ihtisasım boyunca bilgilerinden yararlandığım değerli tüm Hocalarıma, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Naime CANORUÇ'a,

Tezimin deneysel aşamasındaki yardımı ve özverili çalışmasından dolayı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç.Dr. Selahattin TEKEŞ ve Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin planlanması ve hasta seçimi için Göz Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç.Dr. Yıldırım Beyazıt ŞAKALAR'a ve Göz Hastalıkları Kliniği Doktor ve Personeline,

Tezimin yazımı sürecinde katkılarından ve desteğinden dolayı Rojda HOCAOĞLU'na, İhtisas sürem boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve tüm çalışanlara teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan Anneme, Babama ve sonsuz desteğiyle eşim Mahmut BOZARSLAN'a sevgilerimle...

Dr. Beri HOCAOĞLU BOZARSLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İç Kapak	
Önsöz.....	I
İçindekiler Dizini	II
Simgeler Ve Kısaltmalar Dizini	IV
Şekiller ve Tablolar Dizini.....	VI
Türkçe Özet.....	VII
İngilizce Özet.....	VIII
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1 Galaktoz Metabolizması.....	3
2.2 Leloir Yolağı.....	5
2.3 Leloir Yolunun Enzimleri	7
2.3.1 Galaktoz Mutarotaz (GALM).....	7
2.3.2 Galaktokinaz (GALK).....	7
2.3.3 Galaktoz-1-Fosfat Üridil Transferaz (GALT).....	7
2.3.4 Üridin difosfat galaktoz-4-epimeraz (GALE).....	8
2.4 Aksesuar Yolaklar.....	9
2.4.1 Pirofosforilaz Yolağı.....	9
2.4.2 Galaktozun Galaktitole İndirgenmesi	10
2.4.3 Galaktozun Galaktonata Oksidasyonu	10
2.5 Galaktozemi- GALT Enzimi Yetmezliği.....	10
2.5.1 Patofizyoloji... ..	11
2.5.2 Uzun Dönem Komplikasyonlar	13
2.5.3 Galaktozemide Tanı	14
2.5.4 Galaktozemide Tedavi	15
2.6 GALT Geninin Yapısı ve Mutasyonlar.....	15
2.7 En Sık Görülen Mutasyonlar.....	16
2.8 Konjenital Katarakt.....	18

3. Materyal ve Metod	19
3.1 Kan Örneklerinin Sağlanması.....	19
3.2 DNA İzolasyonu.....	19
3.3 PCR ile Örneklerin Çoğaltılması.....	20
3.4 Agaroz Jel Elektrophorezi	21
4. Bulgular	23
5. Tartışma	25
6. Kaynaklar	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bç	Baz çifti
cDNA	Complamanter Deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EC	Enzyme Commission
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GALE	Üridin difosfat galaktoz-4-epimeraz
GALK	Galaktokinaz
GALM	Galaktoz Mutarotaz
GALT	Galaktoz-1-Fosfat Üridil Transferaz
Gal-1-P	Galaktoz-1-fosfat
Glu-1-P	Glukoz-1-fosfat
GLUT	Glukoz taşıyıcı protein
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
NADPH	Nikotin amid dinükleotid fosfat
ng	Nanogram
OMİM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolution per minute

UDP	Üridin difosfat
UDP-Gal	Üridin difosfat galaktoz
UDP-Glu	Üridin difosfat glukoz
UGP	UDP glukoz pirofosforilaz
UMP	Üridin monofosfat
UV	Ultra Viyole

ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1.	Glukoz ve Galaktozun Yapısı.....	3
Şekil 2.	Laktozun Yapısı.....	4
Şekil 3.	UDP-Glukozun Yapısı.....	4
Şekil 4.	UDP-Galaktozun Yapısı.....	4
Şekil 5.	Galaktozun Metabolik Yolu.....	6
Şekil 6.	GALT Enziminin Reaksiyonu.....	8
Şekil 7.	Pirofosforilaz Yolağı.....	9
Şekil 8.	Q188R için PCR	23
Şekil 9.	Q188R için PCR-RFLP.....	24
Tablo 1.	Mutasyon analizinde kullanılan primerler ve enzimler	21

ÖZET

Galaktoz; yapısında aldehit grubu içeren altı karbon atomlu, glukozun 4. karbon epimeri olan bir monosakkarittir. Galaktozun ana kaynakları süt ve süt ürünleridir ve ince barsaklardan emildikten sonra karaciğerde metabolize edilir. Galaktoz metabolizması için Leloir yolağında dört enzim bulunmaktadır: Galaktoz mutarotaz (GALM), Galaktokinaz (GALK), Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT) ve Üridin difosfat galaktoz-4-epimeraz (GALE). GALT enzimindeki yetersizlik klasik galaktozemi olarak adlandırılan; sarılık, kusma, gelişme geriliği, katarakt, koma, sepsis ve ölümle sonuçlanabilen otozomal resesif bir hastalıktır. GALT geni 9. kromozomun kısa kolu üzerinde, p13 bölgesinde lokalize ve 11 eksondan meydana gelmektedir. GALT geninde baz değişimiyle oluşan 180'den fazla mutasyon bildirilmiştir. Q188R, arginin amino asidinin glutaminle yer değiştirdiği bir mutasyondur, Avrupalı ve Avrupa kökenli kişilerde en sık görülen mutasyondur.

Konjenital katarakt çocuklardaki tedavi edilebilir körlüğün en önemli nedenidir. İnfanitil katarakt genel olarak genetik veya metabolik hastalıklara, intrauterin enfeksiyonlara ve travmaya sekonder gelişir. GALT enzim eksikliğinde kanda yüksek miktarda Gal-1-P birikir ve galaktitole dönüşerek başta reversibl olan katarakt formasyonuna neden olur. GALT yetersizliği katarakt oluşumu için bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Galaktozemi tanısı konulup galaktoz diyetten çıkarıldığında semptomlar gerilemeye başlar.

Bu çalışmamızda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları polikliniğinde konjenital katarakt tanısı almış ve bu nedenle opere edilmiş 33 çocuk ile aynı sayıdaki sağlıklı çocukta GALT enzim mutasyonunu araştırdık. Çalışma sonucunda konjenital katarakt grubundaki iki çocukta (% 6 oranında) GALT geninde homozigot Q188R mutasyonu saptadık.

Q188R mutasyonu saptanan çocuklarda yenidoğan döneminde galaktozemi tanısı konulamadığından, katarakt gelişmiştir ve gerekli olan galaktoz kısıtlı diyet uygulanmadığından katarakt oluşumu irreversible hale dönüşmüştür. Bu nedenle göz hekimlerinin de konjenital kataraktlı hastalarda metabolik hastalık varlığını akla getirmeleri gerekir. Bu bilgiler ışığında yenidoğan döneminde diğer metabolik hastalıklar (fenilketonüri, biyotinidaz eksikliği) gibi galaktozemi taramasının da yapılmasının toplum sağlığı için faydalı olacağını düşünmekteyiz.

ABSTRACT

Galactose is a monosaccharide with a structure containing the aldehyde group and six carbon atoms. It is the fourth carbon epimer of glucose. The main sources of galactose are milk and milk products, and after intestinal absorption it is metabolized in the liver. There are four enzymes in the Leloir pathway for galactose metabolism: Galactose mutarotase (GALM), Galactokinase (GALK), galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) and uridine diphosphate galactose-4-epimerase (GALE). Classical galactosaemia is an autosomal recessive inherited metabolic disorder due to deficient GALT and it causes jaundice, vomiting, growth retardation, cataract, coma, sepsis and could be fatal. The gene encoding GALT is located on chromosome 9p13 and spans 4.3 kb of DNA arranged into 11 exons. Over 180 different base changes and diseasecausing mutations have been reported in the GALT gene. Q188R is a mutation where arginine amino acid is replaced with glutamine and is the most common in north European populations and those predominantly of European descent.

Congenital cataract is the most important cause of curable blindness in children. Infantile cataract occurs, in general, due to genetic or metabolic diseases, intrauterine infections, and trauma. With GALT enzyme deficiency, high amounts of Gal-1-P accumulates in the blood and by transforming into galactitol causes cataract formation which is reversible at first. GALT deficiency is considered as a risk factor for cataract formation. After diagnosing galactosemia and stopping the intake of galactose, symptoms begin to subside.

In this study, GALT enzyme mutation is investigated for galactosemia disease in 33 children who are diagnosed with congenital cataracts and therefore operated in Ophthalmology Clinic of Dicle University Faculty of Medicine, and in the healthy subjects of the same number. As a result, we found two children (% 6) with homozygotes for Q188R mutation in GALT gene among the incongenital cataract study group.

In children with Q188R mutation, due to not being diagnosed as galactosemia in newborn period and thus failing to apply necessary galactose restricted diet, developed cataracts irreversibly. Therefore, ophthalmologists need to think about the presence of metabolic disease in patients with congenital cataracts. Having stated this fact, we think it would be useful for public health to generalize galactosemia screening along with other metabolic diseases such as PKU, Biotinidase deficiency etc. in newborn period.

1 . GİRİŞ VE AMAÇ

Galaktoz; yapısında aldehit grubu içeren altı karbon atomlu, glukozun epimeri olan bir monosakkarittir (1). Galaktozun ana kaynakları süt ve süt ürünleridir. Bir disakkarit olan laktozun yapısında glukozla birlikte yer almaktadır. Laktoz ince barsakta emilmeden önce yapıtaşları olan monosakkaritlerine hidrolize edilir (2).

İnfanlar için esansiyel enerji kaynağı olan galaktoz, metabolize edilip CO₂, glikojen, glikolipid ve glikoproteinlere dönüştürülür (3). Galaktoz metabolizmasının esas yolağı olan Leloir yolağı dört enzim içerir: Galaktoz Mutarotaz (GALM, EC 5.1.3.3), Galaktokinaz (GALK, EC 2.7.1.6), Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz (GALT, EC 2.7.7.12) ve Üridin difosfat galaktoz-4-epimeraz (GALE, EC 5.1.3.2). Bu enzimlerin bozukluğu nedeniyle galaktozemi denilen genetik geçişli metabolik hastalıklar görülmektedir.

GALT enzimi galaktoz metabolizmasının anahtar enzimidir. Galaktoz-1-fosfat (Gal-1-P) ve UDP-Glukoz (UDP-Glu)'un, UDP-Galaktoz (UDP-Gal) ve Glukoz-1-fosfat'a (Glu-1-P) dönüştüğü reaksiyonu katalizler. GALT aktivitesindeki eksiklik nedeniyle klasik galaktozemi (OMIM 230400) (4) gelişir. Bu hastalık genellikle hayatın ilk günlerinde, anne sütü veya süt içeren mamalarla beslenme sonrası gelişir. Yapımı artan Gal-1-P metabolize edilemez, böbrek, karaciğer ve beyinde hasara neden olur (2). Kusma, diare, sarılık ve gelişme geriliğı en sık görülen semptomlardır. Erken neonatal ölüm sebebi E.coli sepsisi nedeniyledir. Katarakt genellikle tanı sırasında vardır, fakat bir haftalık yenidoğanda orta derecede ve sadece özel göz muayenesinde teşhis edilebilir. İnsidansı bütün dünyada, canlı doğumda 1/30 000-60 000 arasında olan otozomal resesif geçişli ağır seyreden bir hastalıktır (5).

Hastalık Türkiye'de otozomal resesif kalıtılan diğer metabolik hastalıklar gibi daha yüksek (1/23.775) sıklıktadır (6). Dünyada tanımlanan 180'den fazla mutasyon içinde en sık rastlanılan mutasyon 188. sıradaki glutamin amino asidinin yerine argininin geçmesi ile oluşan Q188R'dur (7) ve görülme oranı % 63'tür (8). Türkiyede'ki galaktozemik hasta allellerinde %57 ile en sık rastlanan mutasyon Q188R mutasyonudur (9). Fazla galaktoz ile beslenen hayvanlarda ve bir metabolik hastalık olan galaktozemide katarakt insidansının yüksek olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, galaktoz metabolizma bozukluğu ile idiopatik presenil katarakt arasında bir ilişkiden bahsedilmektedir. GALT mutasyonu, artmış laktaz genotipi ve

laktoz ile beslenmenin katarakt formasyonunun oluşumu üzerine sinerjistik etkisi olabilir.

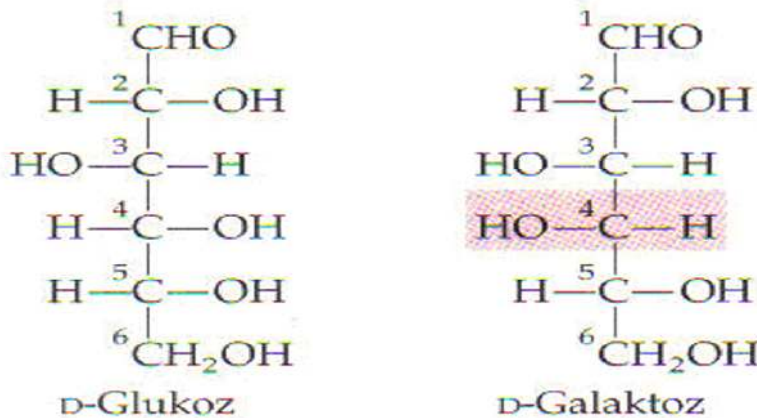
GALT mutasyonu ile katarakt arasında pozitif korelasyon olduğu ortaya çıkmıştır (10).

Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Polikliniği'nde konjenital katarakt tanısı almış çocuklarda GALT geninde en sık görülen mutasyonlar olan Q188R, K285N ve N314D mutasyonlarının analizi amaçlanmıştır.

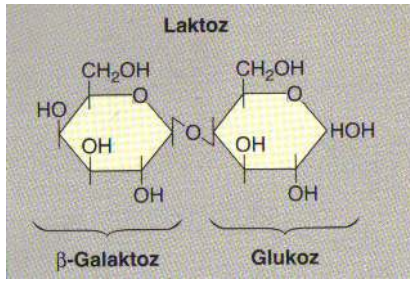
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Galaktoz Metabolizması

Normal diyetle galaktozun ana kaynağı süt ve süt ürünleridir. Süt içindeki glukoz ve glukozun 4. karbon epimeri olan galaktoz (**Şekil-1**), birlikte bir disakkarit olan laktozu oluşturmaktadır. Sindirilen laktoz (**Şekil-2**) ince barsağın fırçamsı kenar hücrelerinde laktaz tarafından hızlıca galaktoz ve glukozla hidrolize edilir. Galaktoz bazı meyve ve sebzelerde serbest formda olmasına rağmen genel olarak bir disakkarit molekülün bir parçası olarak bulunmaktadır (3). Ancak bu kaynakların diyetel galaktoz havuzuna önemli bir katkı yaptığına dair kanıt yoktur. Galaktoz ve glukoz sodyum pompası aracılığıyla enerji bağımlı bir sistemle ince barsağın proksimal kısmından emilir. Absorbe edilirken ilk girdikleri barsak epitel hücrelerinde hiçbir değişikliğe uğramadan kapillere, oradan da vena portaya geçerler. Normal bireylerde galaktoz yüklemesi, absorbe edilmesi ve kandan temizlenmesi çok hızlı gerçekleşen bir olaydır. Çeşitli çalışmalarda ^{14}C ile işaretli galaktozun çok geçmeden glukoz havuzu içinde görüldüğü ve hemen sonrasında solunum havasındaki CO_2 içinde olduğu ($^{14}\text{CO}_2$) gösterilmiştir. Galaktoz klirensi oranı ile hepatik kan akımı arasında yakın korelasyon vardır. Karaciğer fonksiyonlarının göstergesi olan galaktoz tolerans testinin başarılı kullanımı, karaciğerin galaktozun metabolize edildiği ana organ olduğuna işaret etmektedir. Bu tartışma ile ilişkili olarak genellikle eritrosit ya da amniotik sıvı hücrelerinde yapılan enzim testlerinin sonuçlarının klinik önemi göz önünde tutulmalıdır. Bu hücrelerdeki enzim yetersizliğinin derecesi karaciğerin durumunu doğru olarak yansıtamamaktadır (2).

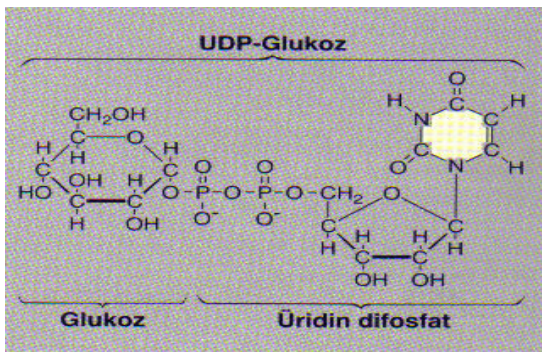


Şekil-1, D-glukoz ve D-galaktozun Yapısı (11)

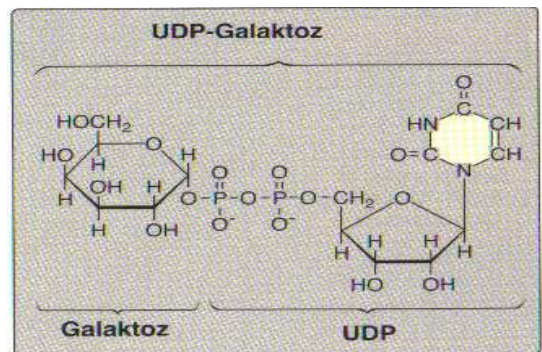


Şekil-2, Laktozun Yapısı (galaktoz β(1-4) glukoz) (11)

Galaktozun, glukozla dönüşümünde en önemli metabolik yol olan Leloir yolağı, 1949 ve 1953’li yıllarda Leloir isimli bir araştırmacı tarafından tespit edildiği için bu adı almıştır. Galaktoz metabolizmasında dört enzim bulunmaktadır: Galaktoz Mutarotaz, Galaktoz spesifik kinaz, Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz ve UDP-galaktoz-4-epimeraz enzimlerini içerir. Leloir yolağı eritrositlerde tanımlandıktan hemen sonra GALT eksikliğinin galaktozemiye neden olduğu tespit edilmiştir. Leloir yolağında galaktozun Glu-1-P’a dönüştüğü insanlardan E. Coli’ye kadar çeşitli türlerde gösterilmiştir. Bu yolağın önemi galaktozun pek çok organizma için enerjiye dönüştürülmesidir (12). β-D-galaktoz GALM ile epimeri olan α-D-galaktoza dönüştürüldükten (13) sonra hücreye girdiğinde ATP bağımlı GALK tarafından fosforillenerek Gal-1-P’yi oluşturur. Sonra GALT UDP-Glu’dan (Şekil-3) Gal-1-P’ye UMP transfer ederek iki basamaklı pingpong mekanizmasıyla, UDP-Gal (Şekil-4)ve Glu-1-P oluşturur (2). En sonunda UDP-Gal NAD bağımlı UDP-galaktoz-4-epimeraz tarafından UDP-Glu’a çevirilir. Bazı organizmalarda ve insanlarda da GALE aynı zamanda UDP-N-asetilgalaktozamin (UDP-galNAC)’i UDP-N-asetilglukozamin (UDPgluNAC)’e dönüştürür (14).



Şekil-3, UDP-Glu’nın yapısı (11)



Şekil-4, UDP-Gal’nın yapısı (11)

Organizmanın ulaşabildiği iki galaktoz kaynağı vardır. İlki, infantın intestinal laktazı tarafından laktozun bölünerek elde edilmesiyle süt emzirme döneminde sağlanır. Galaktoz spesifik transport sistemiyle ve her organa (karaciğer hariç) insulin bağımlı bir şekilde ya da insulinden bağımsız şekilde heksoz transporter sistemleri tarafından kan dolaşımına girer. İkincisi ise normal beslenme desteği olarak, galaktoz hücre içinde, UDP-glukozdan epimerizasyon ile oluşan UDP-galaktozdan oluşur. UDP-galaktoz bütün membrana bağlı glikoproteinler ve glikolipidlerin biyosentezi için şarttır. Membran glikolipidlerinin mikrodinamikleri açısından galaktozun turnover oranı protein kısmından daha yüksektir. Beyin hücreleri ve diğer pek çok hücrede glukoz ve galaktozun alımı insülin bağımlı GLUT4 aracılığıyla olur. Galaktozun beyin hücrelerine alımı insülininden bağımsız olan GLUT3 ile olmaktadır (15).

Endojen galaktozun kaynağının glukoz olduğu yıllardan beri bilinmektedir. Ancak son zamanlarda bazı şüpheler gelişmeye başlamıştır. Yüksek doz süt ve süt ürünlerinin alımı ile karşılaştırıldığında, endojen galaktoz üretimi yeterli olmasa da galaktoz metabolizması bozukluğunun uzun dönem komplikasyonlarının patogenezinde çok önemli olabilmektedir. GALT ve GALE reaksiyonlarıyla sentez edilen Glu-1-P ve devamında elde edilen UDP-Glu glikoprotein ve glikolipidlerin sentezi için substrat olarak gereken şekerler olan UDP-Glu ve UDP-Gal'ın intraselüler düzenlenmesi ve aynı zamanda hücre için sistemin kontrol noktası olarak da işlev görmektedir (14).

GALT reaksiyonuyla elde edilen glukoz-1-fosfat, ya enerji sağlamak için glikoliz yoluna girer ya da UDP glukoz pirofosforilaz varlığında UTP ile reaksiyona girerek yeni bir molekül olan UDP-Glu'yu oluşturur. Diğer ürün olan UDP-galaktoz, glikoprotein ve glikolipidlerin sentezi için galaktoz vericisi gibi davranır ya da GALE enzimi tarafından UDP-Glu'a çevrilir. Gal-1-P aynı zamanda inositol monofosfataz tarafından defosforile edilerek galaktoza dönüştürülür (16).

2.2 Leloir Yolağı

Leloir yolağı (**Şekil-5**), galaktozun glukoz-1-P'a metabolize edildiği bir metabolik yoldan öte, bir enerji kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Gal-1-P, UDP-Glu ile birlikte GALT enzimiyle Glu-1-P ve UDP-Gal'a dönüşür. Bu yolağın ara ürünlerinden biri olan UDP-Gal,

(4): Galaktoziltransferaz; (6): Aldoz redüktaz; (7): Galaktoz dehidrogenaz. (2) ve (13)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.3 Leloir Yolunun Enzimleri

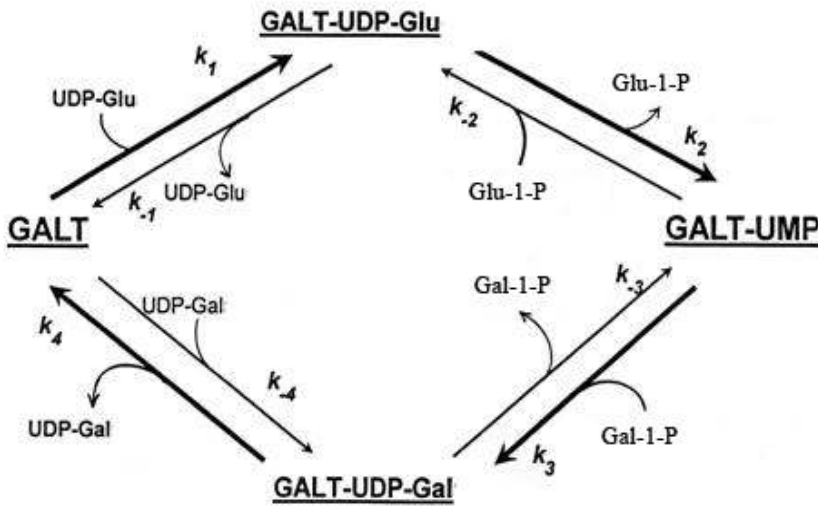
2.3.1 Galaktoz Mutarotaz (GALM, EC 5.1.3.3) : β -D-galaktozu α -D-galaktoza dönüştüren enzimdir. Aldoz epimeraz ailesine ait bir enzimdir. Enzim aktivitesi ilk olarak 1965'te E.coli'de ve yapısal olarak Thoden ve Holden (2002) tarafından Lactococcus lactis'de gösterilmiştir. Genetik kodu ise 1994'te tanımlanmıştır. Her alt ünitesi 339 amino asit içeren dimerik bir enzimdir (13).

2.3.2 Galaktokinaz (GALK, EC 2.7.1.6): Galaktoz metabolizmasındaki ikinci enzimdir. α -D-galaktozun gal-1-P'a dönüştüğü reaksiyonu katalizler. 17. Kromozomun p24 kolunda kodlanmaktadır. 8 ekson genişliğinde, yaklaşık genomik DNA'nın 7.3 kb'sını oluşturmakta ve kontrol geni özelliğini taşımaktadır. Enzim 392 aminoasit içeren ve molekül ağırlığı 42 kDa olan bir monomer yapıya sahiptir. Galaktokinaz; GHMP enzim ailesine ait diğer enzimler olan Homoserin kinaz, Mevalonat kinaz ve Phosphomevalonat kinaz ile aminoasit dizi açısından benzer moleküler yapıya sahiptir (13).

Galaktokinaz eksikliğinin ana klinik özelliği erken yaşlarda başlayan ve genellikle bilateral olan katarakttır. Doğumda ve 20. gebelik haftasında da gözlenebilmesine rağmen, genellikle yaşamın ilk haftalarında tespit edilir. Galaktokinaz eksikliğinin olduğu birkaç vakada da psödotümör serebri tanımlanmıştır. Galaktozun diyetten çıkarılması ile semptomların gerilediği görülmüştür (2).

2.3.3 Galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz (GALT, EC 2.7.7.12): Leloir yolundaki üçüncü enzim olan GALT, UDP-Glu'dan Gal-1-P'a bir UMP'nin reversible transferini sağlar. Mikroorganizmalar da, memeli hücre ve dokularında bulunur. 9. kromozomun p13 kolunda lokalizedir. Molekül ağırlığı 43 kDa'dır (18). 379 amino asitten oluşan enzimin aktif şekli bir dimer olarak bulunur. GALT aktivitesinin mekanizması için pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışmalarla bu reaksiyonun kinetiğinin 'ping-pong' tipi olduğu kanıtlanmıştır. Normal fizyolojik şartlarda (Şekil-6), UDP-Glu GALT'a bağlanarak GALT-UDP-Glu oluşur ve hemen devamında Glu-1-P salınırken GALT enzimi UMP ile bağlı kalır. Sonrasında Gal-1-P, GALT-UMP kompleksi ile tepkimeye girerek UDP-gal oluşturur. GALT enzimi, nükleotidil vericisi olarak nükleosid-di veya trifosfat kullanmaz, bu özelliği onu alıcı grup olarak fosfat

kullanan nükleotidiltransferazlar arasında benzersiz yapmaktadır (19). GALT enziminin histidin triad (HIT) süper ailesine ait olduğu gösterilmiştir. Bu ailenin üyeleri, ya nükleotid hidrolaz ya da nükleotidin α -fosforu üzerine harekete geçen transferazlar olarak işlev görürler. Ek olarak bir Zn^{+2} ve bir Fe^{+3} atomu içerir. Metal iyonlarının varlığı yapıyı kararlı hale getirir (13).

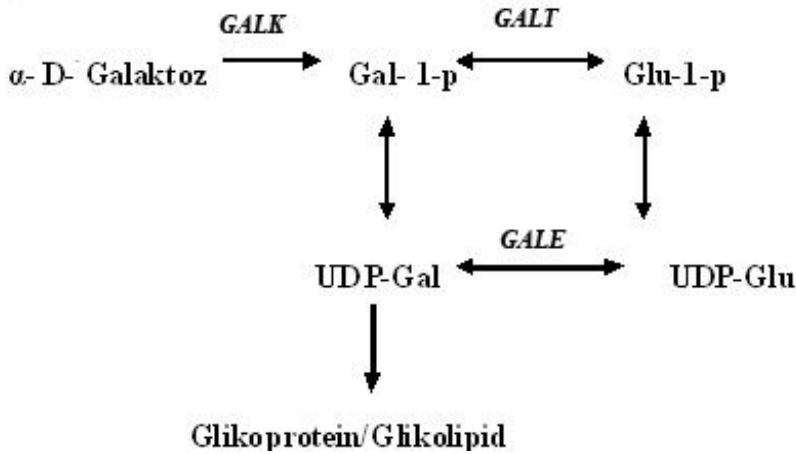


Şekil-6, GALT reaksiyonu (19)

2.3.4 Üridin difosfat galaktoz 4-epimeraz (GALE, EC 5.1.3.2): Normal galaktoz metabolizmasının son basamağındaki UDP-Glu oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonu katalizler. Enzim geni 1p36 kromozomunda lokalizedir. Genomik DNA'nın 4 kb'nı oluşturur. 11 ekson ve 348 amino asitlik bir polipeptitten oluşan enzimin molekül ağırlığı 38 kDa'dır. Aktif enzim bir dimerdir. GALE'nin kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz süper ailesine ait bir protein olduğu sanılmaktadır (13). Epimeraz eksikliği oldukça nadir görülmektedir. GALE yetmezliği saptanan kişilerde, defekt eritrositlerde ise periferik form oluşur ve kliniği hafif seyretmektedir. Eğer klasik galaktozemiye benzer daha ağır semptomları varsa generalize form olarak adlandırılmaktadır. Tedavisi ise galaktozun diyetten çıkarılmasıdır (20).

2.4 Aksesuar yollar

2.4.1 Pirofosforilaz yolağı: 1957’de Isselbacher, GALT yetmezliğinin bazı vakalarında, alternatif bir yolağın olabileceğini ileri sürmüştür (**Şekil-7**). Bu yolak daha önce Kalckar ve ark. tarafından maya mantarlarında tanımlanmıştır. Yolak reversible UTP’ye bağımlı pirofosforilaz reaksiyonu ile Gal-1-P’nin UDP-Gal’a dönüşümünü içerir. Galaktoz bu yolakta, Leloir yolağının ancak % 1’i oranında metabolize edilmektedir. Bu yolun önemi, pirofosforilaz aktivitesinin yaşla birlikte artmasıdır ve en yüksek aktivitenin yetişkin karaciğerinde görülmesidir. Bu yolun muhtemelen en önemli fonksiyonu ise oluşan UDP-Gal ve UDP-Glu’nun glikoprotein ve glikolipidlerin yapısına katılmasıdır (21).



Şekil-7, Pirofosforilaz yolağı

Bu reaksiyonlar, UDP-Gal ve UDP-Glu’un pirofosforilasyonu için alternatif yollardır. UDP-Gal pirofosforilaz düşük aktiviteye sahip olduğundan muhtemelen her iki pirofosforilasyon basamağı da UDP-Glu pirofosforilaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Gitzelmann, pirofosforilaz yolağının asıl öneminin Isselbacher’ın tanımladığının tersi yönde olduğunu düşünmektedir. Buna göre, hücrenin serbest galaktoz eksikliği ya da muhtemel GALK veya GALT yetersizliği yüzünden, ana yolak üzerinde galaktoz metabolizması tarafından üretilmediği durumlarda Glu-1-P’den önemli UDP-Gal sentezinin olduğunu ileri

sürmektedir. Ayrıca, fosfataz enzimiyle Gal-1-P'den, serbest galaktoz pirofosforilaz yoluyla tarafından üretilbildiğini ve galaktozun kısıtlanmasına rağmen GALT eksikliğinde, neden yüksek seviyelerde Gal-1-P'in olduğunu açıklamaktadır (2).

2.4.2 Galaktozun Galaktitole İndirgenmesi: GALT eksikliğinde, klasik galaktozemide olduğu gibi, galaktozun alternatif tüketim yolları önem kazanmaktadır. Galaktozun indirgenmesiyle, aldoz redüktazın katalizlediği reaksiyonla galaktitol oluşur. Oluşan galaktitol çeşitli dokulardan izole edilebilir; plazma ve idrarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ayrıca galaktozemik yenidoğanların beyin dokusunda da tespit edilmiştir. Galaktozun kısıtlanmasına rağmen vücut doku ve sıvılarında yine artmış galaktitol düzeyinin olduğu görülmektedir. Bu nedenle galaktitolün galaktozeminin uzun dönem etkilerinden sorumlu faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca hem GALK hem de GALT yetmezlikli kişilerde gelişen katarakta galaktitolün lenste biriktiğine dair pek çok çalışma vardır. Enzimlerin doku dağılımı ve substratlara affinitesi farklı olsada aldoz redüktaz (polyol: NADP + oksidoredüktaz) ve L-heksonat dehidrogenaz (L-gulonat: NADP+ oksidoredüktaz) ile metabolize olduğu bilinmektedir. Ancak aldoz redüktaz'ın daha önemli olduğu düşünülmektedir (22).

2.4.3 Galaktozun Galaktonata Oksidasyonu: Galaktozun galaktonata metabolizması tartışmalı olmasına rağmen, bu dönüşümün GALT eksikliğindeki hastalarda olduğuna ait soru işaretleri vardır. GALT yetmezlikli ratlarda yapılan çalışmalarda galaktonatın daha çok karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda biriktiği belirtilmiştir. Buna rağmen, galaktonatın galaktozeminin patolojisine katkıda bulunduğuna dair delil yoktur. D-galaktonik asit β -keto-D-galaktonik asite, o da D-ksiloz ve D-ksiloz fosfat'a dönüşerek, CO_2 'ye ayrışır. Bu bileşikler pentoz fosfat oksidatif yolunu kullanır (22).

2.5 Galaktozemi ve GALT Eksikliği

Klasik galaktozemi (OMIM 230400) GALT enzim eksikliğinin neden olduğu, sıra dışı allellik ve fenotipik heterojeniteye sahip otozomal resesif bir hastalıktır. Hastalığın ciddiyetini belirleyen en önemli neden enzimin defektif olması ve enzim yetersizliğinin miktarıdır (14). Galaktoz sindirimine intoleransın olduğu bireyler hakkında ilk makale Reuss tarafından 1908 yılında yayınlanmıştır (23). Klasik galaktozeminin GALT enzimindeki bir defekten kaynaklandığı ilk olarak Isselbacher ve arkadaşları tarafından 1956'da gösterilmiştir (24). Klasik galaktozeminin insidansı Avrupa'da 1/23 000- 40 000 dir. Amerika'da 1/50 000 ve

Japonya’da milyonda bir oranında görülmektedir (25). Türkiye’deki sıklığı ise Tokatlı’nın (2000) çalışmasına göre 1/23.775 olarak tespit edilmiştir (6).

GALT eksikliği genellikle doğumdan sonraki neonatal dönemde galaktoz içeren mamalar ve anne sütü ile beslenme sonrası gelişir. Beslenmede zorluk, kilo alamama, kusma, diare, letarji, hipoglisemi ve hipotoni ilk gözlenen belirtilerdir (21). Fizik muayenede sarılık, hepatomegali, fontanelde dolgunluk, kanama zamanı uzaması ya da çürük oluşumunda artış gözlenir. Genellikle karaciğer hastalığı şeklinde gelişir: Sarılık, hepatomegali, anormal karaciğer fonksiyon testleri-bilirubin ve transaminazlarda artış, koagülasyon testlerinde bozukluk ve asit bulunabilir. Metabolik asidoz, galaktozüri, glikozüri, albüminüri, aminoasidüri nedeniyle renal tübüler hastalık ile ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Bunlara ek olarak hemolitik anemi ve sepsis gelişebilir. Galaktozeminin erken başlayan formlarında E.coli sepsisinin sıklığı az değildir (%10) ve tanısı zordur (2,7). Galaktozemik yenidoğanlarda artmış sepsis insidansının nedeni bilinmezken, araştırmalarda nötrofil fonksiyonlarında baskılanma olduğu gösterilmiştir. Galaktoz ile inkübe edildiğinde yetişkinlere nazaran, neonatal nötrofillerinde baskılanmanın daha çok olduğu görülmüştür (26). Daha az sıklıkla, bazı bireylerde ise beslenmede bozukluk, kusma, büyümede yetersizlik ve gelişmede gecikme gibi kronik hastalık tablosu vardır. Bu fenotipik çeşitlilik ya galaktoz alımına bağlı olarak çevresel faktörlere, ya da rezidüel GALT aktivitesindeki genetik heterojeniteye bağlı olabilmektedir (2).

Katarakt genellikle tanı sırasında vardır fakat bir haftalık yenidoğanda orta derecede ve sadece özel göz muayenesinde teşhis edilebilir. Görülme oranı yaklaşık %10’dur. Kataraktın nedeni yapımı artan galaktitolün lens fibrillerinde birikip osmotik etkiyle hücreleri şişirmesidir. Galaktitol aynı zamanda nöronlarda da osmotik basıncı artırarak psödotümör serebriye yol açmaktadır (7).

2.5.1 Patofizyoloji

1. GALT reaksiyonunun bloke edilmesiyle toksik metabolitler birikir: Klasik galaktozeminin patojenik mekanizması hala tam olarak çözülememiştir. Muhtemelen en önemli faktör Gal-1-P ve galaktitolün birikimi olduğu bildirilmiştir (21). Ning ve arkadaşlarının GALT yetmezlikli farelerde yaptıkları çalışmada Gal-1-P’nin karaciğer, böbrek ve beyinde toplandığı, insanlardaki GALT yetmezliğine benzer şekilde eritrositlerde de çok

yüksek oranda biriktiği tespit edilmiştir. Ancak bu farelerde galaktoz toksisitesine ait herhangi bir kanıt bulunamamıştır (27).

2. Alternatif galaktoz metabolizmasının toksik ürünlerinin birikmesi: Eğer galaktoz GALK ve GALT reaksiyonlarındaki blok nedeniyle yeterince metabolize edilemezse, fazla galaktoz alternatif yollarla galaktitol ve galaktonata katabolize edilir. Galaktitol daha fazla metabolize edilmez, idrarla atılır. Biriken galaktonatın toksik olup olmadığı ise belirtilmemiştir, ancak pentoz fosfat şantı aracılığıyla metabolize olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan araştırmacılar, hem GALT hem de GALK yetmezlikli hastalarda galaktitolün osmotik aktivitesi nedeniyle kataraktla ilişkili olduğunu bulmuşlardır (16). Kubo ve arkadaşları, katarakt formasyonunun çoğunlukla polyol yolağı aracılığıyla serbest radikal üretimiyle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılara göre, galaktitol konsantrasyonunun hedef dokuda toplanmasının osmotik stres oluşturmak için yeterli olmadığını ancak aşırı galaktitolün aldoz redüktazı aktive ettiğini, NADPH'nın tükendiğini ve glutatyon redüktaz aktivitesinin düşmesine neden olduğunu göstermişlerdir (28). GALT yetmezlikli farelerdeki galaktitol konsantrasyonunun insanlardakinden belirgin olarak daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu duruma, normal fare dokularındaki düşük aldoz redüktaz aktivitesinin neden olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, hidrojen peroksit veya diğer serbest radikaller hücrede birikip ciddi oksidatif hasara neden olmaktadır (29). Galaktitol birikiminin neonatal dönemde katarakta ve psödötümör serebriye yol açtığı dikkate alınmalıdır (30).

3. UDP-galaktoz ve UDP-glukoz'ın eksikliği: UDP-Gal, GALT reaksiyonunun iki ürününden birisidir. GALT basamağı bloke edilince UDP-Gal'da eksiklik gelişir. UDP-Gal glikoprotein / glikolipid biyosentezi için galaktoz vericisi olduğundan UDP-Gal eksikliği bu makromoleküllerin üretiminde teorik olarak bozukluğa neden olur. Bazı çalışmalarda GALT basamağı bloke edilse bile GALT'nin varlığında UDP-Glu'nun epimerizasyonu ile UDP-Gal'un varlığını koruyabildiği, bununla beraber GALT eksikliğinde biriken fazla Gal-1-P'nin, UDP glukoz pirofosforilaz (UGP) enzimi için Glu-1-P'la yarıştığı in vitro olarak gözlenmiştir. UGP basamağı UDP-Glu üretimi için gerekli olduğundan in vivo Gal-1-P tarafından bu enzimin inhibisyonu UDP-Glu'nun bulunabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır (16).

4. Prenatal toksisite: 3. Trimester'daki galaktozemik gebelerin kord kanında ve amniotik sıvıda Gal-1-P, galaktitol ve galaktoz'un düzeylerinin yüksek olduğu bilindiğinden galaktoz toksisitesinin prenatal orijinli olduğu ileri sürülmektedir. Bu teori mantıklı olsa da galaktozun endojen üretimiyle ilgili son çalışmalar normal ve galaktozemik erişkinlerde galaktoz hasarının doğumdan sonra devam ettiğini göstermektedir (16).

5. İnositil metabolizmasındaki hasarlar: Fazla Gal-1-P'nin birikmesinin inositil monofosfatazları engellediği ve böylelikle GALT yetersiz dokulardaki sınırlı inositil fosfat dönüşümü ile normal fosfatidilinositol bisfosfat'a bağlı sinyal yollarını hasara uğrattığı düşünülmektedir. Serbest inositil gereksinimini sınırlayan beyin gibi dokularda inositil fosfat'ın indirgenmesinin zararı olabilir. Wells & Wells, fazla galaktozla beslenen ratların beyinlerinde inositil içeriğinin azaldığını göstermişlerdir (16).

6. Galaktozun endojen üretimi: Diyetle galaktozun kısıtlanmasına rağmen metabolitlerin yüksek kalmasına uzun süre bir anlam verilememiştir. Ancak endojen galaktoz sentezinin varlığı, ilk olarak 1995'te Berry ve ark.tarafından ispatlanmıştır (31). Devam eden çalışmalarda galaktozun endojen üretiminin yaşa bağımlı olduğu, en yüksek seviyenin küçük çocuklarda olduğu ve yaşla beraber % 50'den fazla azaldığı gösterilmiştir. Diğer çalışmalarda (Berry ve ark 2004) kontrol gruplarında klasik galaktozemili hastalara göre, endojen galaktoz üretim oranının çok daha düşük olduğunu ve yaşa bağlı olduğunu teyit etmişlerdir (23). Bunlarla birlikte galaktozun endojen üretimi ve özellikle Gal-1-P gibi metabolitlerinin yüksekliği, klasik galaktozeminin uzun dönem komplikasyonlarının ana nedenidir (21).

7. Anormal glikozilasyon: Klasik galaktozemili hastalarda tespit edilen glikoproteinlerdeki çeşitli anormallikler ve anormal glikozilasyon GALT yetmezliğinin uzun dönem komplikasyonlarının etyolojisinde rol aldığı ve bu anormal glikolizasyonun, galaktozu glikoprotein ve glikolipidlere katan galaktoziltransferazın substratı olan UDP-Gal'un öncül maddesi olan Gal-1-P'nin birikimiyle ilgili olabilmektedir (21).

2.5.2 Uzun Dönem Komplikasyonları

GALT yetersizliği olan hastalarda erken tanı ve tedaviye rağmen geç dönem etkileri yaygındır (32). Gecikmiş mental ve motor gelişim, verbal dispraksi (konuşma problemleri) ve hipergonadotropik hipogonadizm sıklıkla görülmektedir. GALT yetmezliği olan kişilerin %30'nda öğrenme problemleri, konuşma bozukluğu ve diğer anomaliler gelişir (33).

Bulgular, hastalarda orta dereceli serebral ve serebellar atrofi ile çok sayıda küçük hipertens lezyonların olduğunu göstermektedir. Galaktoserebrozid yapımının yetersizliğiyle birlikte, değişen myelin formasyonu nedeniyle sinyal iletiminin de etkilendiği ileri sürülmektedir (34). Galaktozemili çocukların bilişsel fonksiyonlarının sonuçları, metabolik durumdan çok genotiple ilişkili gibi görünmektedir. Gal-1-P konsantrasyonu daha çok diyetle uyumu gösterirken, hastalıktan etkilenme derecesini yansıtmaz. IQ düzeyi, Q188R için homozigot olan bireylerde heterozigotlara göre daha düşük bulunmuştur (73.6 ve 94.8) (35).

Kadınlarda sıklıkla hipergonadotropik hipogonadizm gelişmektedir. 1-12 yaşları arasındaki kızların %80'ninde over yetmezliğini gösteren FSH yüksekliği tespit edilmiştir. Bu da yapılan çalışmada bazı kadınlarda primer amenore varken bazılarında ise sekonder amenore gelişmiştir. Diğer taraftan 22 yaşın üzerindeki kadınların % 30'nda normal menstruasyon ve normal gebelik görülmüştür. Buna karşılık erkeklerdeki testiküler fonksiyonlar normal gibi görünmektedir. Bu komplikasyonların erişkin bireylerdeki günde 1 gr olan endojen galaktoz sentezinden ya da anormal galaktozilasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir (21). Bunlar dışında daha önce bahsedilen katarakt nedeniyle körlük gelişmektedir. Yapılan çalışmalarda prepubertal ve adolesan dönemdeki hem kız hem de erkek çocuklarda kemik mineral dansitesinin azaldığı tespit edilmiştir (36).

5.2.3 Galaktozemide Tanı

Klasik galaktozemide, yenidoğan tarama programları veya metabolik hastalık şüphesiyle tanı konulmaktadır. Eritrositlerde Gal-1-P, idrarda galaktitol düzeyinin belirlenmesiyle ve altın standart olan eritrositlerde GALT aktivitesinin ölçümüyle değerlendirme yapılmaktadır (37). Klasik galaktozemide kişi homozigot (G/G) ise, GALT enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre %5'ten azdır. Heterozigotluk (G/N) durumu varsa allellerden biri normaldir (N) ve GALT aktivitesi yaklaşık %50'dir (7). İşaretli ^{13}C içeren galaktozun CO_2 'ye oksidasyonunu solunum havasında ölçmek tanı yöntemlerinden biridir. ^{13}C -D galaktozun kişiye verildikten 1-5 saat sonra $^{13}\text{CO}_2$ miktarının %5'ten az olması galaktozemi lehinedir (38). Ayrıca klasik galaktozemiye neden olan GALT enzimidaki mutasyonlar için de genetik testler yapılmaktadır (7). Prenatal tanı, her üç enzim hastalığı için de mümkündür. Amniyotik sıvıda galaktitol ölçümü, koriyonik villuslarda ve kültüre edilmiş amniyon sıvı hücrelerinde GALT enzim aktivitesi bakılması ve mutasyon analizi ile prenatal tanı mümkün olmaktadır (6).

2.5.4 Galaktozemide Tedavi

Tedavideki en önemli basamak, hastalıktan şüphelenildiğinde diyetten galaktozun çıkarılmasıdır (21). Eğer laktoz ya da galaktoz yaşamın ilk üç ile onuncu günleri diyetten çıkarılırsa semptomlar hızlıca geriler ve karaciğer yetmezliği, sepsis, neonatal ölüm ve mental retardasyon gibi komplikasyonlar önlenir. Eğer tedavi gecikirse hem gelişme geriliği hem de mental retardasyon olasılığı artmaktadır (7).

2.6 GALT Geni ve Mutasyonları

GALT geni 9. kromozomun kısa kolunda p13 bölgesinde lokalizedir. GALT geninin cDNA'sı, Reichard ve Berg tarafından 1988'de klonlanmış ve tanımlanmıştır. cDNA 1295 baz uzunluğunda ve 379 amino asitten oluşan bir polipeptid olarak kodlanmıştır. Molekül ağırlığı 43 kD'dır (18). Başlama kodonu 29. bazdaki ATG ve stop kodonu 1166. bazdaki TGA'dır. Elde edilen human GALT cDNA'sı human GALT geninin tam boy halinde kopyalanmasını sağlamıştır. Gen orijinal olarak yayınlanmış, GenBank'a gönderilmiş ve No:M96264 olarak kaydedilip güncellenmiştir. Gen DNA'nın 4.3 kb genişliğinde ve 11 eksondan oluşmaktadır. İnsan GALT geni; E.coli, maya mantarı ve ratlarla kıyaslandığında, elde edilen amino asit sekansları sırasıyla % 46, 39 ve 87 oranında benzerlik göstermektedir. Bazı eksonlar, özellikle 6, 9 ve 10. eksonlar yapılarını muhafaza ederken, 1, 2, 5 ve 7. eksonlar korunamamışlardır. Human GALT geninin promoter bölgesi iki GC'den zengin Sp 1 kümesi, üç AP-1 dizisi ve CCAAT dizisi içerir. TATA box için konsensus yoktur. Bu nedenle, gen 'housekeeping' gen olarak eksprese edilmiş olabilir. Fakat düzenleyici bölgesi dokuya spesifik ve spesifik gen geliştirmede rol oynayabilir. GALT genindeki hastalığa yol açan mutasyon ve polimorfizmler ilk olarak 1991 yılında Reichardt ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (2). 180'nin üzerinde baz değişikliği bildirilmiştir. Baz değişikliklerinin çoğu missense (yanlış anlama yol açan), geri kalanı ise nonsense (anlamsız), küçük delesyon ve katılma mutasyonları ile uçların birleşmesiyle oluşan mutasyonlardır. Bahsedilen bu mutasyonların, protein yapı ve fonksiyonları üzerine etkisi beklendiği gibidir. Missense mutasyonların, biyokimyasal sonuçlarının etkisinin nasıl olacağını tahmin etmek zordur ama genellikle bu etkileri in vitro analizlerle saptanabilmektedir (7).

2.7 En sık görülen mutasyonlar

Diğer sık görülen genetik hastalıklar kistik fibrozis ve fenilketonüride olduğu gibi GALT genindeki bazı mutasyonların çoğu nadir görülür. En sık görülen mutasyonlar Q188R, K285N, S135L ve N314D'dir (2).

Q188R, GALT proteinindeki 188. sırada glutaminin yerine arginin gelmesiyle 6.eksondaki 563. nükleotide A-G değişimiyle sonuçlanır. İlk olarak 1991'de Reichardt ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Avrupa ve Kuzey Amerikadaki beyaz toplum içindeki en yaygın GALT mutasyonudur (2). Türkiye'de de % 57 ile tespit edilmiş en sık mutasyondur (9). Homozigotlarda GALT-UMP kompleksinin stabilizasyonu bozulmakta ve reaksiyonun ikinci basamağını durdurmaktadır. Bu durum artmış over yetmezliği riski ve konuşma bozukluğu ile ilişkilidir. Klasik galaktozemide genotip klinik ile uyumludur (7). Bu mutasyon türler arasında büyük oranda korunmuştur ve bir histidin-prolin-histidin üçlemesinde, enzimin katalitik tarafına yakındır. Glutaminin argininle yer değiştirmesinin GALT'ın normal biyokimyasal mekanizması üzerine etkisi, Frey ve ark.tarafından bir E.coli GALT modeli kullanılarak çalışılmıştır. Glutaminin normal hidrojen bağlarının, enzimin aktif tarafındaki histidinle bir araya gelmesi, UMP-GALT kompleksinde dengesizlikle sonuçlanmaktadır (2).

K285N, 9.eksonda 855. Nükleotide G-T değişimine yol açan bir lizin amino asidi ile aspartat amino asidinin yer değiştirdiği mutasyondur. İlk olarak Leslie ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Amino asit değişikliği türler arasında korunmuş protein bölgesinde değildir(2). Avrupa kökenli kişilerdeki sıklığı %18 olarak tespit edilmiştir (8). Karas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre K285N için taşıyıcı olanlarda, azalmış GALT enzim aktivitesi ile presenil katarakt arasında birliktelik tespit edilmiştir (39). Almanya, Avusturya, Slovenya ve Hırvatistan gibi orta Avrupa ülkelerinde en sık görülen GALT mutasyonudur. Kliniği nörolojik ve bilişsel fonksiyonlar açısından Q188R'a göre daha iyidir (7).

N314D ve Duarte Allelleri, N314D, Reichardt ve Woo tarafından bildirilen baz değişikliğidir. Önceleri polimorfizm olarak düşünülse de, mutasyonun 10. eksonda olduğu ve pek çok toplumda meydana geldiği bildirilmiştir (2). Galaktozemi olmayan kromozomlardaki sıklığı % 6-13 arasındadır (40). GALT mutasyonun en sık görülen formu N314D'dir. ABD popülasyonundaki sıklığı % 5'tir. Her iki varyant da aynı elektroforetik patternde gösterilmesine rağmen, ilave baz değişimleri genetik olarak ayırt edilebilmektedir (41). Duarte enzim varyantları iki klinik durumla ilişkilidir. D1 veya Los Angeles (LA) tipi enzim

aktivitesinde artışla karakterize bir duruma yol açar. D1 tipinde, N314D mutasyonu polimorfik varyant olan, sessiz mutasyona yol açan ve 7. eksonda tespit edilen L218L ile birlikte görülür. Bu durumun da N314D-GALT protein translasyonunda artışa neden olduğu düşünülmektedir. D2 ise Duarte tipi olarak bilinen ve enzim aktivitesinde azalma (normal GALT aktivitesinin % 14-25'i) ile kendini gösteren durumdur. (41,21). D2 için homozigot olan kişilerden alınan lenfoblastoid hücrelerde azalmış GALT dimer miktarını Lai ve ark.'ı göstermişlerdir. GALT mRNA'sında azalmaya eşlik eden olaylar incelenememiştir ancak GALT enziminde termal düzensizlik ve biyolojik yarı ömürde azalma olduğu ispatlanmıştır (2). Varyant galaktozemi de denilen Duarte galaktozemide klinik olarak klasik galaktozeminin bazı semptomları olan, erken gelişen katarakt, orta dereceli mental retardasyon, ataksi ve gelişme geriliği görülmektedir. Bunlara ek olarak konuşma bozukluğu ve kadınlarda amenore ya da erken menapoz da gelişebilmektedir (7).

S135L: 135. kodondaki bir serinin bir lösine dönüştüğü tek missense mutasyon, neredeyse sadece Afrika'lı ve Afrika kökenli Amerika'lılarda görülür. Bu mutasyon ilk olarak Reichardt ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir ve ek çalışmalarla Amerika'daki mutant GALT ilişkili kromozomların %50'sinde tespit edilmiştir. Manga ve arkadaşlarının Afrikalı siyahlarda yaptığı çalışmada Güney Afrika'daki galaktozemik hastalarda mutant GALT kromozomunun % 91'nde S135L mutasyonu saptanmıştır. Bu allelin sıklığı 600 sağlıklı siyah Güney Afrikalıda 1/150, taşıyıcılarda ise 75 kişide bir olarak tespit edilmiştir (2). ABD'deki çeşitli etnik gruplarda yapılan galaktozemi ve mutant gen taramasında ise S135L'in prevalansı 505 kişide birdir ve sıklığı % 0.10 olarak bulunmuştur (8).

Afrikalı-Amerikalı galaktozemililerin tedavilerine neonatal dönemde başlanırsa, hem homozigot olanlarda hem de heterozigotlarda hastalağın prognozu iyi seyretmektedir (7). Genel olarak S135L mutasyonu olan kişilerde neonatal hepatotoksisite ya da kronik problemler olan over yetmezliği ve mental retardasyon gelişmez. Bu hastalarda işaretli ¹³C ile yapılan çalışmalarda galaktozun CO₂'ye dönüşümü normal kontrollere yakın sonuç vermektedir. Bu durum karaciğerde rezidüel GALT aktivitesi olduğuna işaret etmektedir (42).

2.8 Konjenital Katarakt

Katarakt, şelale veya demir parmaklık anlamına gelen Latince cataracta ve Yunanca katarraktes kelimelerinden türetilmiştir. Katarakt, görmeyi zayıflatıp bozan, lens veya kapsülün üzerinde çeşitli derecelerde, komplet ya da parsiyel opaklaşma ile seyreden bir hastalıktır (43).

Konjenital katarakt, çocuklardaki tedavi edilebilir körlüğün en sık ve en önemli nedenidir. İnfantil kataraktın prevalansı 10.000’de 1.2- 6 vaka arasındadır (44). Çocuklardaki körlüğün de %10 ile 38.8’nin nedeninin konjenital katarakt olduğu tahmin edilmektedir. Her 250 yenidoğanın birinde konjenital kataraktın bazı formları görülmektedir. İnfantil katarakt genel olarak genetik veya metabolik hastalıklara, intrauterin enfeksiyonlara ve travmaya sekonder gelişir. Daha az olarak da medikal terapilerin veya radyasyon tedavisinin yan etkisi olarak meydana gelebilir. GALT eksikliğinde kanda yüksek miktarda Gal-1-P birikir. Kristal yapısındaki lenste galaktoz galaktitole dönüşür. Osmoz nedeniyle suyun lense akışıyla sonuçlanır. Lensin hidrasyonu lens fiberlerindeki normal yapıyı bozarak saydamlığın (şeffaflığın) kaybına neden olur. Lens merkezinde ilk önce yağ damlası görünümü fark edilebilir. Bu görünüm diyetten galaktoz çıkarıldığında reversibldir. Tedavi edilmezse, başlangıçtaki lameller katarakt total katarakta dönüşür. Lameller kataraktta embriyonik nükleus ve korteks normaldir. Lens dairesel bir opasite içerir. Olaya üstte yer alan kortikal fibrillerin kesafeti de katılabilir ve bunlara riders adı verilir. Lens liflerinin gelişimleri sırasında kısa bir süre toksik etkiye maruz kalması sonucunda ortaya çıktığı düşünülür. Toksik etki kalktığında saydam nükleus ve saydam korteks arasında, etkilenen lens fibrillerinin oluşturduğu lameller bir opasite kalır. Lameller katarakt neonatal hipoglisemi ve hipokalsemi de gelişebilir. Tüm doğumsal kataraktların %40’ını oluşturur. Genellikle bilateral ve simetrikler. Hayatın ilk gün ve haftalarında gelişebilir.

Lameller kataraktın, prenatal ve postnatal olmak üzere iki tipi vardır. Konjenital kataraktın tanısı intrauterin hayatta ultrasonla da konabilir. Bebeklik döneminde galaktozu diyetten çıkarmak kataraktı ve diğer problemleri önler. İleri çocukluk döneminde diyetle alınan galaktoz ciddi sorunlara ve katarakta yol açmaz. Galaktokinaz eksikliği herhangi bir sistemik problem olmadan katarakta yol açabilmektedir (43, 44).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kan Örneklerinin Sağlanması

Bu çalışmada, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Polikliniği'nde konjenital katarakt tanısı konmuş, 2 ay-9 yaş arası olan 13 kız, 20 erkek toplam 33 çocukta ve aynı sayıdaki kontrol bireyinde GALT genine ait Q188R, K285N ve N314D mutasyonlarının analizi yapıldı. Kontrol grubu daha önce herhangi bir göz hastalığı teşhisi almamış, genel kontrol amacıyla polikliniğe başvuran çocuklardan seçildi. GALT genine ait analiz için bir adet 2 cc EDTA'lı tam kan örneği alındı. Bu kanların DNA izolasyonları yapıldı ve örnekler (-20 °C'de) saklandı. İzolasyon işlemlerini takiben bütün örneklerin Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'da PCR yöntemi ile DNA amplifikasyonları yapıldı ve amplifiye edilen örnekler PCR-RFLP yöntemiyle olası mutasyonlar açısından incelendi. Restriksiyon endonükleaz digesyon yöntemi kullanıldı.

3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyon kiti:

BioTeke Whole Blood DNA Fast Extraction Kit (Spin Kolon)

Buffer BB	30 ml
Binding Buffer CB	30 ml
Inhibitor Removing Buffer IR	50 ml
Washing Buffer WB	25 ml
Elution Buffer	20 ml
İsopropil alkol	14 ml
Proteinase K	70 mg x 2
Spin-column AC	100 test
Toplama tüpleri (2 ml)	100 test

EDTA'lı tam kan tüplerinde (-20 °C'de) saklanmış örnekler oda ısısında çözünmeye bırakıldı. Bu arada 1.5 ml'lik kapaklı ependorf tüpleri, içlerine bırakılacak örneklerin numaraları ile işaretlendi. Tam kan tüpleri içerisindeki örnekler, kendilerine ait ependorf tüplerine alınmadan önce birçok defa ters yüz edilerek karıştırıldı.

Lysis solüsyon ve diğer DNA izolasyon solüsyonları tam kan tüpleri ile eş zamanlı olarak oda ısısına gelmek üzere soğutucudan çıkarıldı.

- 200 µl kan örnekleri 1,5 ml'lik ependorf tüplerine konuldu.
 - Üzerine 200 µl Buffer CB ve 20 µl Proteinaz E enzimi eklendi. Kapağı kapatılarak 10 saniye vortekslendi.
 - 42 °C'de 15 dakika inkube edildi.
 - İnkübasyondan sonra tüpe 100 µl izopropil alkol eklendi ve vortekslendi.
 - Oluşan karışım, toplama tüpünün içinde bulunan spin kolona aktarıldı. 10 000 rpm/30 sn santrifüj edildi.
 - Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı, spin tekrar yerleştirildi ve üzerine 500 µl Buffer IR eklendi. 12 000 rpm/30 sn'de santrifüj edildi.
 - Spin kolonu temiz bir toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine 700 µl Buffer WB eklenip tekrar 12 000 rpm/30 sn'de santrifüj edildi.
 - Toplama tüpü boşaltılıp, spin tekrar yerleştirildi ve ikinci yıkama için 500 µl Buffer WB eklendi. 12 000 rpm/30 sn'de santrifüj edildi.
 - Toplama tüpü boşaltıldı, spin kolonu 13 000 rpm 2 dakika santrifüj edilerek tüm alkolün uçması sağlandı.
 - Spin kolonu temiz bir 1.5 ml'lik tüpe alındı ve üzerine 100 µl daha önceden ısıtılmış Buffer EB eklendi.
 - Oda sıcaklığında 3-5 dk bekletilip 12 000 rpm/30 sn'de santrifüj edildi.
- (Bu işlemler yapılırken kullanılan pipet uçlarının ve ependorf tüplerinin steril olmasına dikkat edilmelidir).

3.3 PCR İle Örneklerin Çoğaltılması

Eksonların PCR ile çoğaltılması için 50 µl'lik hacimde PCR karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 38.8 µl H₂O, 0.5 ünite Taq Polimeraz enzimi, Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10X reaksiyon çözeltisi (50 mM KCL, 100 mM Tris-HCl Ph 9.0, 25°C'de) triton X-100, 1.5-2.5 mM MgCl₂, 2mM dNTP's, 200 ng primer ile karışım elde edildi. Kişilere ait hedef DNA 100-150 ng olacak şekilde PCR karışımına eklendi. Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 30µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Techne Cyclone PHC3 Thermal Cycler cihazında amplifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

PCR koşulları **Q188R** için, 94°C’de 5 dakikalık denatürasyon, bunu takiben 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 65.5°C’de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 2 dakika uzama ve 72°C’de 10 dakika final olmak üzere 30 döngü şeklinde gerçekleştirildi. **K285N** için, 94°C’de 5 dakikalık denatürasyon, bunu takiben 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 58.8°C’de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 2 dakika uzama ve 72°C’de 10 dakika final olmak üzere 30 döngü şeklinde gerçekleştirildi. **N314D** için 94°C’de 5 dakikalık denatürasyon, bunu takiben 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 63.7°C’de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 2 dakika uzama ve 72°C’de 10 dakika final olmak üzere 30 döngü şeklinde gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullandığımız tüm primerlerin dizileri ve restriksiyon enzimleri tablo-1’da verilmiştir.

Tablo-1, Mutasyon analizinde kullanılan primerler ve enzimler (2, 45,46)

Mutasyon	Primer	Enzim	Normal allel (bç)	Mutant allel (bç)
Q188R	5’TGGATGGGCAGGGAGGGGGT 3’ 5’TGTCAAGGGGCAAAGCAGA 3’	HpaII	348	184+164
K285N	5’TGGGGCTAGGCACTGGATGGA 3’ 5’AGGACGTCTCAAAGAGGTTGTCGTA 3’	RsaI	117+24	141
N314D	5’ATGTGGAGGCTTGGAGGTAAA 3’ 5’TTCACCTCTAGCTTTCTCCT 3’	Ava II	213+94	111+102+94

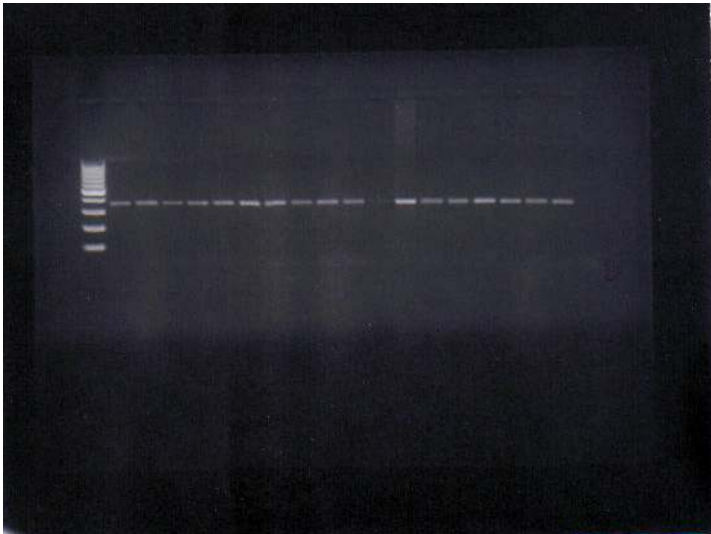
3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası spesifik amplifikasyonun ve PCR artefaktlarının olup olmadığının kontrol edilmesi için agaroz jel kullanıldı. Amplifikasyonun incelenmesi için % 2’lik agaroz jeli hazırlandı ve örnekler agaroz jel işlemine tabii tutuldu. 2 gr agaroz tartılıp, beher içinde H₂O ile 100 ml’ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda kaynatıldı. Yaklaşık 50-55°C’ye kadar soğutulduktan sonra üzerine konsantrasyonu 1 mg/μl olacak şekilde etidyum bromid eklenip karıştırıldı. Jel soğuduktan sonra jel tabağına döküldü. Elektroforeze başlamadan önce

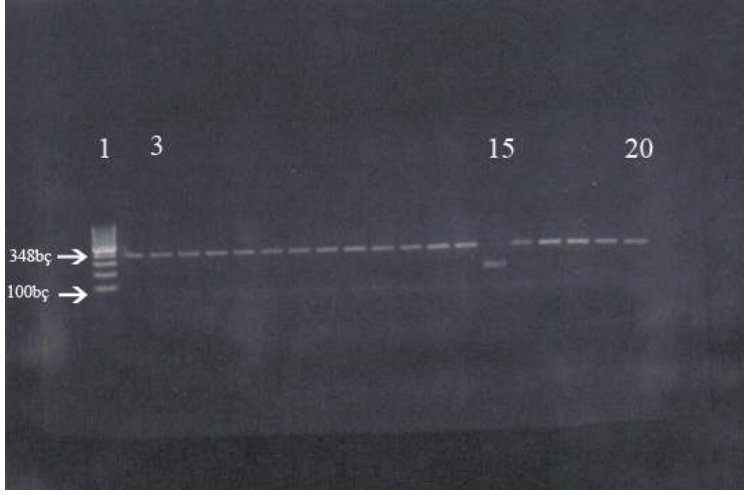
tank, taraklar ve jel yatağı temizlendi. Tankın benç üzerindeki dengesi ayarlandı. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine 1XTBE elektroforez tamponu döküldü. 8µl PCR ürünü 2µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Ayrıca her jelin bir kuyucuğuna 100 bç'lik DNA size marker yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek örnekler 30-45 dakika 80-100 Volt'ta yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel UV transilluminatör altında incelenerek amplifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildikten sonra jelin fotoğrafı çekildi (12).

4. BULGULAR

Bu çalışma Ocak-Temmuz 2010 tarihleri arasında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Polikliniği'nde konjenital katarakt tanısı almış ve bu nedenle opere olmuş, 2 ay-9 yaş arası olan 13 kız, 20 erkek toplam 33 çocuk ile aynı sayıdaki yine çocuklardan oluşan kontrol grubunda GALT genine ait Q188R, K285N ve N314D mutasyonlarının analizi yapıldı. 6. eksondaki A₅₆₃→G (glutamin→arginin) baz değişikliğinin saptanması için DNA örnekleri eksona özgü primerler ile amplifiye edildi. Amplifikasyon sonucu agaroz jelde 348 baz çift'lik (bç) amplifikasyon bandı gözlemlendi. Tüm genomik DNA örneklerinin amplifikasyonu başarılı bir şekilde uygulandı. Daha sonra bu örneklerin RFLP analizi yapıldı. Bunun için 10 µl amplifiye PCR ürünü 2 ünite HpaII restriksiyon endonükleaz enzimi ile 37°C'de 16 saat inkübe edildi ve fragmentler % 2.8'lik agaroz jel ile ayrıştırıldı. Ayrıştırma sonucu 348 bç'lik DNA fragmenti normal örnekler için 348 bç bandı ayrışırken, mutant örnekler için 184+164 bç bantlarına ayrıldı. Bütün örneklerin HpaII enzimi ile başarılı bir şekilde inkübe oldukları gözlemlendi. Sonuç olarak, konjenital katarakt grubundaki iki çocukta (% 6 oranında) GALT geninde mutant/mutant Q188R allel tespit edilirken, analizi yapılan K285N ve N314D alleleri normal/normal olarak saptandı. Q188R mutasyonu için yapılan PCR (Şekil-8) ve PCR-RFLP (Şekil-9) çalışmaları ile ilgili fotoğraflar aşağıda verilmiştir.



Şekil-8, Q188R için PCR



Şekil-9, Q188R için PCR-RFLP (1) DNA ladder, (2-14) Normal, (15) Mutant, (16-19) Normal, (20) PCR ürünü.

5. TARTIŞMA

Klasik galaktozemi (OMIM 230400) GALT (EC 2.7.7.12) genindeki yetmezlik nedeniyle gelişen otozomal resesif bir hastalıktır. Genellikle neonatal dönemde galaktoz içeren gıda ile beslenme sonrası sarılık, hepatospenomegali, hepatoselüler yetmezlik, gıda intoleransı, hipoglisemi, renal tübüler disfonksiyon, müsküler hipotoni, sepsis ve katarakt gibi belirtileri bulunmaktadır (21).

Besinlerindeki galaktoz oranı yüksek olan hayvanlarda ve kalıtsal metabolik hastalık olan galaktozemi hastalarında katarakt insidansı yüksek bulunmuştur. Galaktoz ve indirgenmiş metaboliti olan galaktitol çeşitli dokularda birikmektedir. Galaktitol konsantrasyonu, aldol redüktazın yüksek aktivitesiyle birlikte; lenslerde, overlerde ve merkezi sinir sistemindeki schwann hücreleri gibi bazı dokularda artmış olarak bulunmuştur. Lenslerde galaktitol osmotik olarak şişmeye ve katarakt formasyonuna neden olmaktadır (10).

Konjenital katarakt, çocuklardaki tedavi edilebilir körlüğün en sık ve en önemli nedenidir. Her 250 yeni doğanın birinde konjenital kataraktın bazı formları görülmektedir. İnfanital katarakt genel olarak genetik veya metabolik hastalıklara, intrauterin infeksiyonlara ve travmaya sekonder gelişir (43, 44). Polyoller, sorbitol ve galaktitol lentiküler göz dokusunda galaktozemik ve diabetik katarakt oluşumu için gerekli olduğu bilindiğinden, Jakobs ve ark. konjenital kataraktlı hastalarda, eritrositlerde sorbitol dehidrogenaz ve GALK, GALT ve GALE aktivitesini araştırmışlar, sağlıklı gruba göre kataraktlı hastaların eritrositlerinin düşük sorbitol dehidrogenaz aktivitesine sahip olduğunu göstermişler ve orijini bilinmeyen konjenital kataraktlı hastalarda plazma galaktitol ve sorbitol düzeyinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (47).

Galaktozemideki hasarın intrauterin mi olduğu ya da yaşamın sonraki evrelerinde mi başladığı açık değildir. Holton'un yaptığı araştırmaya göre galaktoz metabolizmasındaki enzimatik yolların gestasyonun 10. haftası civarında gelişmeye başladığı ve metabolitlerin anormal konsantrasyonunun fetüs 20 haftalıkken tespit edilebildiği gösterilmiştir (17). Başka bir çalışmaya göre 5 aylık klasik galaktozemili fetüsün gözlerinde katarakt değişimleri elektron mikroskopisiyle tespit edilmiştir (48). Bununla birlikte pek çok yenidoğanda diyetle galaktoz eklenmesiyle katarakt geliştiği görülmüştür (21).

Anneleri galaktozemi için heterozigot olan çocuklar ve D2 alleleline sahip kişilerde konjenital katarakt gelişme riski yüksek olabilmektedir (40).

GALT geninde N314D mutasyonu olan bireylerin %30'nda katarakta rastlanmıştır. Kataraktların yarısı hafif, geçici veya neonatal olarak değerlendirilmiş ve diyetle tedavi edilmiştir. Hastalardan 8'i cerrahi olarak tedavi edilmiştir (7).

Galaktozemi taramasında kullanılan biyokimyasal testler olan plazma galaktoz / Gal-1-P düzeyi ya da azalmış GALT aktivitesi ölçümünün dezavantajının, yüksek yanlış pozitiflik oranı olduğu düşünülmektedir. DNA doğrulama testleri ile aynı problem yaşanan kistik fibrozis ve hemoglobinopatilerdeki yanlış pozitiflik oranı düşürülmüştür. DNA doğrulama testlerinin, GALT genindeki bütün mutasyonları taramakla beraber, tarama testleri pozitif olan infantlar arasında, sayıları fazla olan taşıyıcıları, Duarte / Galaktozemi heterozigotları ve GALT genindeki benign sekans değişikliklerini yüksek oranda bulmak gibi potansiyel faydaları da vardır. Yeni doğan taraması sırasında pozitif sonuç veren 110 hastada yapılan çalışmada, 67 kişide GALT aktivitesi tespit edilememesine rağmen, normal genotip olarak bulunurken, 20 kişide en azından bir bilinen ya da yeni mutasyon (bir galaktozemi homozigot, 7 Duarte /galaktozemi, 12 taşıyıcı) bulunmuştur (46).

Galaktozemi için heterozigot olanlar doğarken asemptomatik olsalar da, yaşamın sonraki dönemlerinde over kanseri ve idiopatik presenil katarakt için artmış bir riske sahip oldukları kesindir. Yapılan çalışmalarda, konjenital ve presenil kataraktlı hastalarda GALT aktivitesinin sağlıklı gruba göre önemli oranda düşük olduğu tespit edilmiştir. GALT genindeki mutasyon ile idiopatik presenil katarakt arasında bir bağlantı olup olmadığı DNA analizi ile tespit edilebilmektedir (39).

Biz de bu çalışmalar ışığında, konjenital kataraktlı çocuklarda GALT mutasyonun analizini amaçladık. 33 konjenital kataraktlı çocuk ile yaptığımız çalışmada, iki çocukta GALT enziminde Q188R mutasyonuna rastladık. Türkiye'de galaktozeminin moleküler temeli ile ilgili ilk çalışmalar Coşkun ve ark. (1995) ve Seyrantepe ve ark. (1999) tarafından Hacettepe Üniversitesinde yapılmıştır. Ancak kataraktlı hastalarda galaktozemi taraması veya enzim mutasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Türkiye'de Coşkun ve arkadaşlarının, 18 galaktozemi hastasında Q188R ve R333W mutasyonları için yaptığı analizinde, %47.2 Q188R ve iki hastada da N314D mutasyonu tespit edilmiştir (49).

Seyrantepe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, Türkiye'deki galaktozemi hastalarının GALT enzimindeki mutasyon analizi restriksiyon endonükleaz digesyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışma ile 16 farklı galaktozemi hastasında, GALT geninde 8 homozigot ve bir heterozigot Q188R mutasyonu bulunmuş ve oranı %57 olarak verilmiştir. Bulunan oranlar Kuzey Amerika ve Avrupa'daki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. N314D mutasyonu ise

bir hastada tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalara benzer biçimde missense mutasyonu (M142K, K285N, A320T), bir stop kodonlu mutasyon (E340X) ve bir sessiz mutasyon (L218L) tanımlanırken bir adet de yeni olmaya aday T'den A'ya transversiyon (F294Y) tespit edilmiştir (9).

Seyrantepe'nin yaptığı bu çalışma Türkiye'de GALT allelleri için referans çalışma olarak değerlendirilmektedir. 32 mutant allelde 8 farklı baz değişimi gözlenmiş ve mutant kromozomların %57'sinde görülen Q188R mutasyonun sıklığının İtalyan, Çek ve Slovak halklarından bile yüksek olduğu tespit edilmiştir (2).

Bizim çalışmamıza benzer şekilde, Karas ve ark. cerrahi tedavi gören idiopatik presenil kataraktlı 30 hastada GALT geninde en sık görülen mutasyonlar olan Q188R, K285N ve N314D mutasyonlarını araştırmışlar, Q188R mutasyonu saptanmamış ancak Slovenya'da daha sık görülen K285N mutasyonu kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (%5& %0,57). Bu çalışmaya göre bozulmuş GALT aktivitesi presenil katarakt için bir risk faktörü olarak ileri sürülmüştür (39).

GALT mutasyonu, artmış laktaz genotipi ve laktoz ile beslenmenin katarakt formasyonunun oluşumu üzerine sinerjistik etkisi olabilmektedir. Bu çalışmada kataraktlı hastalarda ve kontrol grubunda, GALT ve LPH mutasyonu araştırılmıştır. 51 presenil kataraktlı hastada ve 172 sağlıklı kontrolde yapılan mutasyon taramasında 39 hastada GALT enzim mutasyonu saptanmıştır. GALT mutasyonu sıklığı diğer beyaz ırklarla uyumlu ve en sık mutasyon çeşidi ise diğer grupların aksine K285N mutasyonu olarak bulunmuştur. Bu çalışmada defektif GALT ve katarakt arasında olduğu kadar yüksek laktaz ve katarakt arasında da pozitif korelasyon olduğu sonucu çıkarılmıştır. Laktoz sindirimindeki yetersizlik kanda absorbe edilen galaktoz miktarını azaltmaktadır. Bu da dokulardaki galaktoz konsantrasyonunun daha da azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Kısmi GALT yetersizliği, laktoz intoleransı olan kişileri yatkın olduğu presenil katarakt formasyonundan korumaktadır (10).

Q188R, Avrupa toplumunda ve Avrupa kökenli olanlarda en sık görülen GALT mutasyonudur. Başlangıçta çeşitli ırklar ve etnik kökenden gelen Kuzey Amerikalı galaktozemik kişilerde mutant allellerin sayısı %25 gibi az bir oran olarak verilmesine rağmen, sonradan yapılan çalışmalarda Kuzey Amerika beyaz kökenli kişilerde mutant kromozom sıklığının %60-70 arasında olduğu belirlenmiştir (2). Avrupada ise Q188R'ın genel olarak sıklığı gerçekte %63 kadardır (8). En yüksek oran İrlanda (hem göçebe hem de diğer gruplarda) ve Britanya'da saptanmıştır ve bu oran kıtada doğuya doğru gidildikçe azalmaktadır. Orta ve Güney Amerika'nın İspanyol ve Portekiz soyundan gelenlerinde Kuzey Amerika'ya göre kısmen daha az görülmektedir. İber yarımadasındaki oran %48'dir (2) Ng ve

ark.'nın yaptığı araştırmalarda Q188R allel sıklığı Avrupa kökenlilerde %63.5 ve Meksikalı Latin kökenlilerde %50-58 olarak bulunmuştur (50).

Almanya'da Türkiyeden göç etmiş bir ailede yapılan çalışmada klasik galaktozemik iki kardeş ve normal olan diğer aile bireyleri mutasyon açısından incelenmiştir. Ebeveynleri akraba olmayan ailenin ilk çocukları, doğumdan sonraki 3. gün sepsis ve asfiksi nedeniyle kaybedilmiş, galaktozemi kliniği olan ikinci çocuk tedavi edilmiş ama diyetle uymadığı için ciddi mental retardasyon ve bilateral orta dereceli katarakt tespit edilmiştir. 3. çocukta ise normal olan bebeklik döneminden sonra okula başladığında bilişsel fonksiyonlarında gerileme ve hafif oranda katarakt geliştiği ve ebeveynler ile daha küçük kardeşlerin klinik olarak sağlıklı olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonucunda; hasta olan çocuklardaki GALT aktivitesi 0.1 µmol ve bulunan mutasyon homozigot E340X+L218L+N314D'dir. Anne ve sağlıklı diğer iki kardeşteki GALT aktivitesi 13.0 µmol ve bu mutasyonlar için heterozigot ve babanın ise E340X+L218L+N314D için heterozigot ve bununla birlikte diğer allelde N314D+G1105C+G1323A+G1391A mutasyonuna sahip olduğu görülmüş ve GALT aktivitesi 5.5 µmol olarak tespit edilmiştir. Ailenin sağlıklı üyeleri düşük GALT aktivitesine rağmen (normal aktivite: 20-35 µmol) hem mutasyonu taşıyıp hem de normal bir hayat sürmüşlerdir (51).

Schmidt ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise, çeşitli göz malformasyonuna (katarakt, lens subluksasyonu, myopi) sahip üç kardeşte galaktozemi için yapılan mutasyon analizinde, 34 yaş (E), Q188R için heterozigot; 35 yaş (K), hem Q188R hem de D2 için heterozigot ve 38 yaş (E), D2 için heterozigot sonuç bulmuşlardır. Bununla birlikte kadının 10 yaşındaki çocuğuna doğduğunda klasik galaktozemi (Q188R için homozigot) tanısı konulup, galaktoz kısıtlı diyet uygulandığından katarakt veya başka bir göz hastalığı gelişmemiştir. Presenil katarakt ve pupiller veya lensteki malformasyonlarda galaktozemi için mutasyon analizinin yapılması ve heterozigotlar için genetik danışmanlık verilmesi önerilmektedir (52).

Suzuki ve arkadaşlarının farklı etnik gruplardan klasik galaktozemili 4796 kişide araştırdıkları GALT mutasyonun sıklığı, beyaz ırk için: Q188R , %0.29; K285N, %0.062 olarak tespit edilmiştir. S135L mutasyonunun, Afrikalı-Amerikan kökenliler arasındaki sıklığı (% 0.10)'dir. Duarte (N314D) ve LA (N314D+ L218L) mutasyonları ise sırasıyla, % 5.1 ve % 2.7'dir (8).

İran'da F. Mirzajani ve ark.'nın yaptığı farklı 14 klasik galaktozemi hastası ve ailesinin genotiplendirme çalışmasında % 57.1 oranında Q188R mutasyonu tespit edilmiştir. Bulunan diğer mutasyonlar S135L, Y290S, A320T ve K285N'dir. Örnek grubu küçük olmasına

rağmen bu bulguların İran'daki galaktozemik kişilerin genetik tanısı için bir fikir verdiği görülmektedir (53).

İspanyol ve Portekiz kökenlilerde klasik galaktozeminin mutasyonal spektrumunu değerlendirmek için yapılan bir çalışmada 51 ispanyol ve 32 portekizli ailede tarama yapılmış, Q188R'in en sık görülen mutasyon olduğu tespit edilmiştir. İspanyol ve Portekiz'li popülasyonda sırasıyla %50 ve %57.8 olarak bulunmuştur. İspanya'daki prevalansın diğer Avrupa ülkelerinden daha düşük olduğu görülmüştür (54).

Japonya'da yapılan bir çalışmaya göre galaktozeminin milyonda bir görülen bir hastalık olduğu ve Avrupa'da sık görülen mutasyonların (Q188R ve K285N) Japonya'da görülmediği ve N314D dahil farklı mutasyonların tanımlandığı tespit edilmiştir (50, 2).

Lukac-Bajalo ve arkadaşlarının Slovenya toplumundaki 346 sağlıklı gönüllü ile yaptığı çalışmada, K285N sıklığı %0.29 ve Q188R ise %0.14 olarak bulunmuştur. Dünyadaki beyaz ırklarla yapılan çalışmalarda (ABD n=3244) galaktozemik bireylerdeki en sık mutasyon çeşidinin Q188R (%0.29) ve K285N (%0.062) olmasına rağmen Slovenya'da bu durum farklılık göstermektedir. Çek, Slovak, Polonyalı ve Avusturya popülasyonlarında yapılan çalışmalarda diğer Avrupa ülkelerine göre K285N mutasyonunun daha sık görüldüğü ve bunun nedeninin sayılan bu ülkelerin slavik kökeninden kaynaklanmasıdır. Heterozigot K285N mutasyonunda GALT aktivitesinin %50'si normaldir ve etkilenmiş kişilerin doğumda asemptomatik olmalarına rağmen, katarakt ve over yetmezliği gibi ciddi belirtilerin daha sonra ortaya çıktığı bilinmektedir (55).

Sonuç olarak, konjenital kataraktın galaktozemi hastalığının sık görülen semptomlarından biri olduğu bilindiğinden, göz hekimlerinin bu hastalarda bir metabolik hastalık varlığını akla getirmelerini; klasik galaktozemi sıklığının 23.775/1, Q188R mutasyon sıklığının %57 olduğu ülkemizde, yenidoğan döneminde diğer metabolik hastalıklar olan fenilketonüri ve biyotinidaz eksikliğinde yapıldığı gibi, galaktozemi hastalığı için de tarama yapılmasının toplum sağlığı açısından yararlı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Yenson M, İnsan Biyokimyası, syf 123. 1981.
2. Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosemia. İn:Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D, editors.The metabolic and moleculer bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill İnc.: p.1553-87. 2001.
3. Flint AC, Hopwood NJ, Kasa-Vubu JZ. Management quandary. Diagnostic quandary: premature ovarian failure and galactosemia variants in adolescent girls with delayed puberty J Pediatr Adolesc Gynecol. 22(5):330-5, Oct 2009.
4. Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)
5. Fridovich-Keil JL, Galactosemia: the good, the bad, and the unknown, J Cell Physiol. 209(3):701-5. Dec 2006
6. Türkmen M, Özkan P, Ünüvar T, Öztürk Y, Galaktozemili Bir Yenidoğanda Hipotiroksinemi, Güncel Pediatri 5: 85-7;2007.
7. LJ II, Galactosemia, Gene Reviews. NIH, University of Washington, Seattle. Available at: <http://www.genetests.org/profiles/galactosemia>, last update: October 26, 2010.
8. Suzuki M, West C, Beutler E, Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population, Hum Genet 109 :210–215. (2001)
9. Seyrantepe V, Ozguc M, Coskun T, Ozalp I and Reichardt JKV, Identification of Mutations in the Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase (GALT) Gene in 16 Turkish Patients With Galactosemia, Including a Novel Mutation of F294Y. HUMAN MUTATION Mutation in Brief, 235, 1999.
10. Karas-Kuzelicki N, Pfeifer V, Lukac-Bajalo J, Synergistic effect of high lactase activity genotype and galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) mutations on idiopathic presenile cataract formation. Clinical Biochemistry 41 869–874. 2008.

- 11.** Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR, Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya 3. baskı 2007.
- 12.** Elsas LJ II, Langley S, Steele E, Evinger J, Fridovich-Keil JL, Brown A, Singh R, Fernhoff P, Hjelm LN, Dembure PP, Galactosemia: A Strategy to Identify New Biochemical Phenotypes and Molecular Genotypes, Am. J. Hum. Genet. 56:630-639, 1995.
- 13.** Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism The Journal of Biological Chemistry, 278, 43885-43888. November 7, 2003.
- 14.** Ross KL, Davis CN, Fridovich-Keila, JL, Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast Molecular Genetics and Metabolism 83 103–116, 2004
- 15.** Roser M, Josic D, Kontou M, Mosetter K, Maurer P, Reutter W, Metabolism of galactose in the brain and liver of rats and its conversion into glutamate and other amino acids J Neural Transm 116:131–13916, 2009.
- 16.** Lai K, Tang M, Yina X, Klapper H, Wierenga K, Elsas LJ II, ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia Bioscience Hypotheses 1, 263e271, 2008
- 17.** Holton JB. Annotation Galactosaemia: pathogenesis and treatment, Journal of Inherited Metabolic Disease Volume 19, Number 1, 3-7, 1996.
- 18.** Wang BBT, Xu Y-K, Ng W G, Wong L-JC, Molecular and Biochemical Basis of Galactosemia MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM 63, 263–269 1998.
- 19.** Lai K, Willis AC, Elsas LJ II. The biochemical role of glutamine 188 in human galactose-1-p hosphate uridylyltransferase. J Biol Chem. Mar 5;274(10):6559-66, 1999.

- 20.** Novelli G, Reichardt JKV, Molecular Basis of Disorders of Human Galactose Metabolism: Past, Present, and Future, Molecular Genetics and Metabolism Volume 71, Issues 1-2, 62-65, 2000.
- 21.** Bosch AM, Classical galactosaemia revisited *Inherit Metab Dis* 29:516–525, 2006.
- 22.** Yager C, Ning C, Reynolds R, Leslie N, Segal S, Galactitol and galactonate accumulation in heart and skeletal muscle of mice with deficiency of galactose-1-phosphate uridylyltransferase *Molecular Genetics and Metabolism* 81 105–111, 2004.
- 23.** Schadeewaldt P, Kamalanathan L, Hammen HW, Wendel U, Age dependence of endogenous galactose formation in Q188R homozygous galactosemic patients. *Molecular Genetics and Metabolism* 81 31–44, 2004
- 24.** Lai K, Langley SD, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ II, The Duarte allele impairs biostability of galactose-1-phosphate uridylyltransferase in human lymphoblasts, *Human Mutation* Volume 11, Issue 1, pages 28–38, 1998.
- 25.** Flanagan JM , McMahon G , Brendan Chia SH, Fitzpatrick P , Tighe O, O'Neill C, Briones P, Gort L, Kozak L, Magee A, Naughten E , Radomyska B , Schwartz M, Shin JS , Strobl WM, Tyfield LA, Waterham HR , Russell H, Bertorelle G , Reichardt JKV, Mayne, PD, Croke DT, The role of human demographic history in determining the distribution and frequency of transferase-deficient galactosaemia mutations, *Heredity* 104, 148-154, February 2010 .
- 26.** Kobayashi RH, Kettelhut BV, Kobayashi AL. Galactose inhibition of neonatal neutrophil function. *Pediatr Infect Dis.*2(6):442-5, Nov-Dec, 1983.
- 27.** Ning C, Reynolds R, Chen J, Yager C, Berry GT, McNamara PD, Leslie N, Segal S. Galactose metabolism by the mouse with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Pediatr Res.* 48(2):211-17, Aug;2000
- 28.** Kubo E, Urakami T, Fatma N, Akagi Y, Singh DP, Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells:

role of AOP2, Biochemical and Biophysical Research Communications 314 1050–1056, 2004

29. Kubo E, Miyoshin, Fukuda M, Akagi Y, Cataract Formation through the Polyol Pathway is associated with Free Radical Production *Exp. Eye Res.* 68, 457- 464. 1999

30. Stambolian D, Galactose and cataract. *Surv Ophthalmol.* 32(5):333-49, Mar-Apr;1988

31. Berry GT, Nissim I, Lin MA Z, Mazur MA AT, Gibson JB, Segal S, Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia *Lancet.* 21;346(8982):Abstract, Oct 1995

32. Bosch AM, Bakker HD, de B Wenniger-Prick LJM, Wanders RJA, Wijburg FA, High Tolerance for Oral Galactose in Classical Galactosemia: Dietary Implications, Short report, *Arch Dis Child*, 89: 1034-36, 2004

33. Riehman K, Crews C, Fridovich-Keil JL, Relationship between Genotype, Activity, and Galactose Sensitivity in Yeast Expressing Patient Alleles of Human Galactose-1-phosphate Uridyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 10634-10640 April 6, 2001.

34. Dubroff JG, Ficicioglu C, Segal S, Wintering NA, Alavi A, Newberg AB, FDG-PET findings in patients with galactosaemia, *J Inherit Metab Dis* 31:533–539, 2008.

35. Shield JPH, Wadsworth EJK, MacDonald A, Stephenson A, Tyfield L, Holton JB, Marlow N, The relationship of genotype to cognitive outcome in galactosaemia *Arch Dis Child*, **83**:248–250, 2000

36. Berry GT, Galactosemia and Amenorrhea in the Adolescent *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1135: 112–117, 2008.

37. Ridel KR, Leslie ND, Gilbert DL, An Updated Review of the Long-Term Neurological Effects of Galactosemia *Pediatr Neurol.* 33(3):153-61, Sep;2005.

38. Berry GT, Singh RH, Mazur AT, Guerrero N, Kennedy MJ, Chen J, Reynolds R, Palmieri MJ, Klein PD, Segal S, Elsas LJ 2nd. Galactose breath testing distinguishes variant

and severe galactose-1-phosphate uridyltransferase genotypes, *Pediatr Res.* 48(3):323-8, Sep;2000

39. N. Karas, L. Gobec, V. Pfeifer, B. Mlinar, T. Battelino and J. Lukac-Bajalo, Mutations in galactose-1-phosphate uridyltransferase gene in patients with idiopathic presenile cataract. *J. Inherit. Metab.Dis.* 26 699-704, 2003.

40. Tyfield LA, Galactosemia and allelic variation at the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene: a complex relationship between genotype and phenotype, *Eur J Pediatr*, 159 [Suppl 3]: S204-S207, 2000.

41. Ficicioğlu C, Thomas N, Yager C, Gallagher PR, Hussa C, Duarte (DG) galactosemia: A pilot study of biochemical and neurodevelopmental assessment in children detected by newborn screening, *Molecular Genetics and Metabolism* 95, 206-212, 2008.

42. Lai K, Elsas LJ II. Structure-Function Analyses of a Common Mutation in Blacks with Transferase-Deficiency Galactosemia *Molecular Genetics and Metabolism* 74, Issues 1-2, 264-272, 2001.

43. Editors: Agarwal S. Agarwal A. Apple DJ. Textbook of Ophtalmology volum 3/182 pp, 1587-1633, 2002.

44. Özdemir G, Karel F, Konjenital Kataraktlar Epidemiyoloji, Sınıflama, Etiyopatogenez T KlinOftalmoloji, 8:135-141, 1999.

45. Kozák L, Francová H, Fajkusová L, Pijácková A, Macku J, Štastná S, Peškovová K, Martincová O, Krijt J, Bzdúch V, Mutation Analysis of the GALT Gene in Czech and Slovak Galactosemia Populations: Identification of Six Novel Mutations, Including a Stop Codon Mutation (X380R) *HUMAN MUTATION Mutation in Brief #289 Online*, 1999.

46. Item C, Hagerty BP, Mühl A, Greber-Platzer S, Stöckler-Ipsiroglu S, Strobl W. Mutations at the galactose-1-p-uridyltransferase gene in infants with a positive galactosemia newborn screening test *Pediatr Res.* 51(4):511-6, Apr;2002.

47. Jakobs C, Douwes AC, Brockstedt M, Stellaard F, Endres W, Shin YS. Plasma polyol levels in patients with cataract. *J Inherit Metab Dis.* 13(4):517-22, 1990.
48. Vannas A, Hogan MJ, Golbus MS, Wood I. Lens changes in a galactosemic fetus. *Am J Ophthalmol.* 80(4):726-33, Oct;1975
49. Coşkun T, Erkul E, Seyrantepe V, Özgüç M, Tokatlı A, Özalp İ, Short Report, Mutation Analysis of Turkish Galactosemia Patients, *J Inher. Metab. Dis.* 18 368-369, 1995.
50. Ng WG, Xu YK, Kaufman FR, et al: Biochemical and molecular studies of 132 patients with galactosemia. *Human Genetic* 94:359,1994.
51. Schuster V, Podskarbi T, Ottensmeier H, Haubner M, Shin Y S 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* 76:715–719, 1998.
52. Schmidt D, Shin Y S, Auw-Haendrich C, Tacke U, Congenital ocular malformations (lens subluxation, pupillary displacement, cataract, myopia) and classic galactosaemia associated with Q188R and/or G1391A mutations, *Acta Ophthalmologica* 10 MAR 2010.
53. Mirzajani F, Mirfakhraie R, Nabati F, Tabatabaei NN, Talachian E, Houshmand M. The first study of galactose-1-phosphate uridyl transferase mutations in Iranian galactosemia patients. *Clin Biochem.* 39(7):697-9, Jul;2006.
54. Gort L, Boleda MD, Tyfield L, Vilarinho L, Rivera I, Cardoso ML, Santos-Leite M, Gir'os M, Briones P, Mutational spectrum of classical galactosaemia in Spain and Portugal *J Inherit Metab Dis*, 29:739–742, 2006.
55. Lukac-Bajalo J, Karas Kuzelicki N, Zitnik I P, Mencej S, Battelino T. Higher frequency of the galactose-1-phosphate uridyl transferase gene K285N mutation in the Slovenian population. *Clinical Biochemistry* 40, 414–415, 2007.