

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**TANI KONULAMAYAN KALITSAL METABOLİK
HASTALIKLARDA TÛM EKZOM DİZİ
ANALİZİNİN KATKISI**

DR.ASUMAN GEDİKBAŞI

**DANIŞMAN
PROF.DR.Z.OYA UYGUNER**

GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2020

İTHAF

Bu tezi çok özlediğim harika ebeveynlerimin anısına ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Uzun soluklu doktora eğitim hayatım boyunca devam eden destekleri için tüm hocalarıma teşekkür ederim. Doktora eğitimim sırasında tanıştığım ve bana çok yardımcı olan birçok kişi bu noktaya gelmemde etkili oldu. Nereden başlasam... Öncelikle akademik hayatıma İstanbul Üniversitesi çatısı altında devam etmemi sağladıkları için minnettar olduğum, derin bilgi ve tecrübelerine her zaman hayranlık duyduğum sayın Prof. Dr. Seher Başaran ve Prof. Dr. Mübeccel Demirkol'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Bu doktora projesini üstlenmeye ve beni sürekli öğrenmeye teşvik ettikleri için, bana böylesine donanımlı bir tanı laboratuvarında öğrenme fırsatı verdikleri için, laboratuvarın içinde ve dışındaki sürekli destekleri, sadece bir bilim insanı olarak büyümeme yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda güler yüz ve güven veren bir ortamda çalışmamı sağladıkları için, başta tez danışmanım sayın Prof. Dr. Oya Uyguner olmak üzere, her konuda desteğe her an hazır olan, kas kültürlerim için bana laboratuvarını açan sayın Prof. Dr. Birsen Karaman'a, doktora eğitimime başladığım ve yarısını birlikte çalışarak geçirdiğim, erişkin genetik hastalıkları konusunda çok şey öğrendiğim, beni her zaman yüreklendiren ve sonsuz desteklerini hissettiren değerli hocalarım Prof. Dr. Şükrü Palanduz, Prof. Dr. Şükrü Öztürk ve Prof. Dr. Kıvanç Çefle'ye en içten minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar konusundaki derin bilgi ve tecrübesi ile, bir hekim olarak hastalarının ve bir akademisyen olarak asistanlarının eğitim hayatına paha biçilmez değerler katan, laboratuvarında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Gülden Gökçay başta olmak üzere, hastaları projeye dahil etme konusundaki yardımları ile projedeki coşkumu ve klinik tıp tutkumu yeniden canlandıran İTF Çocuk Beslenme ve Metabolizma ekibinin tüm üyelerine sonsuza dek minnettarım. Bu süreçte, Çocuk Sağlığı Enstitüsü'ndeki hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma destekleri için ve özellikle Çocuk Beslenme ve Metabolizma poliklinik ve laboratuvarındaki arkadaşlarıma, her gün bana yardıma hazır olduklarını hissettirdikleri için çok, çok teşekkürler. Tüm ekzom dizileme verilerinin analizinde büyük bir emek ve işbirliği ile yardımlarını sunan, her zaman şeytanın avukatlığını yaparak, beni mümkün olduğunu düşündüğümde daha fazlasını hedeflemeye ittiği için Dr. Güven Toksoy'a teşekkür etmeliyim. Doktora tez ilerleme toplantılarım sırasında tartışmalar ve yardımcı önerilerde bulunduğu için, pymol kullanım becerileri ve bu konulardaki acımasız taleplerimi tolere ettiği için ve ışığının sadece bir parçasını benimle paylaştığı için Dr. Çağrı Güleç'e çok şey borçluyum. Tıbbi Genetik AD klinik ve laboratuvarlarının, gelmiş geçmiş ve devam eden tüm ekibi; bilimsel olsun olmasın çeşitli yardımlarınız için, hiç bitmeyen sorularıma her zaman vakit ayırdığınız için ve en önemlisi arkadaşlığınız için minnettarım, sizlerle birlikte çalışmak keyifti, hepinize teşekkür ederim. Son olarak, çok özlediğim anneme ve babama, bana hayal kurmayı öğrettikleri için, kardeşlerime ve sevgili çekirdek aileme bu zorlu yolda yürürken gösterdikleri fedakarlık ve destek için, en zor zamanlarda bile beni gülümsetip devam etme gücü verdikleri ve cesaretlendirdikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Asuman Gedikbaşı, İstanbul, 2020

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-32544

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	11
ŞEKİLLER LİSTESİ	12
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	16
ÖZET	19
ABSTRACT	20
1. GİRİŞ VE AMAÇ	21
2. GENEL BİLGİLER	24
2.1. KALITSAL METABOLİK HASTALIKLAR: TANIM	24
2.2. KALITSAL METABOLİK HASTALIKLAR: SINIFLAMA.....	29
2.2.1. Ara Metabolizma Bozuklukları	29
2.2.1.1. Aminoasidopatiler.....	30
2.2.1.2. Organik Asidüriler.....	30
2.2.1.3. Amonyak Detoksifikasyon Bozuklukları.....	31
2.2.1.4. Aminoasit Transport Bozuklukları:.....	31
2.2.1.5. Peptit Metabolizması Bozuklukları	31
2.2.1.6. Karbonhidrat Metabolizması ve Transport Bozuklukları	32
2.2.1.7. Yağ Asidi Oksidasyon ve Ketogenez Bozuklukları	32
2.2.1.8. Mitokondriyal Hastalıklar.....	33
2.2.1.9. Kobalamin ve Folat Metabolizması Bozuklukları	34
2.2.1.10. Bakır, Manganez, Demir ve Çinko Kullanım ve Transfer Bozuklukları	34
2.2.2. Kompleks Moleküllerin Sentez ve Yıkım Bozuklukları	35
2.2.2.1. Lizozomal Depo Hastalıkları (LDH):.....	35
2.2.2.2. Pürin ve Pirimidin Metabolizması Bozuklukları:	42
2.2.2.3. Peroksizomal Hastalıklar:	42

2.2.2.4. İzoprenoidler ve Sterollerin Metabolizma Bozuklukları:	43
2.2.2.5. Safra Asidi ve Bilirubin Metabolizması Bozuklukları, Kalıtsal Kolestaz ve Porfiryalar:	43
2.2.2.6. Posttranslasyonel Protein Modifikasyonu Bozuklukları:	44
2.2.2.7. Lipoprotein Metabolizması Bozuklukları:.....	44
2.2.3. Nörotransmitter Bozuklukları ve İlişkili Hastalıklar:	45
2.2.3.1. Glisin ve Serin Metabolizması Bozuklukları:.....	47
2.2.3.2. Pterin ve Biyojenik Aminlerin Metabolizma Bozuklukları:.....	47
2.2.3.3. Gama-aminobütirat (GABA) Metabolizması Bozuklukları:	48
2.2.3.4. B6 Vitamini Metabolizması Bozuklukları:	48
2.2.3.5. Nörometabolik Bozukluklar:.....	49
2.2.4. KMH için Önerilen Yeni Nozoloji	50
2.3. KMH'DA KLİNİK YAKLAŞIM.....	58
2.3.1. Aile Hikayesi	58
2.3.2. Doğum Öncesi Fetal Gelişim ve Gebelik Komplikasyonları:	59
2.3.3. Klinik Bulguların Ortaya Çıkma Zamanı ve Hızlandırıcı Faktörler	60
2.3.4. KMH'da Fizik Muayene	65
2.4. MİTOKONDRİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ	66
2.4.1. Mitokondriye Özgü Kavramlar.....	66
2.4.2. Mitokondri Biyolojisi	67
2.4.3. Mitokondrinin Yapısı	68
2.4.4. Mitoproteom	69
2.4.5. Nükleer kodlanmış proteinlerin mitokondriye alınması.....	70
2.4.6. Mitokondriyal Genom	71
2.4.7. Mitokondriyal DNA Replikasyonu.....	73
2.4.8. Mitokondriyal DNA Onarımı	74
2.4.9. Mitokondriyal Transkripsiyon	75
2.4.10. Mitokondriyal Translasyon	76
2.4.11. Mitokondriyal Fonksiyon	78
2.4.11.1. Kalsiyum homeostazisinde mitokondrinin rolü	78
2.4.11.2. Demir-sülfür (Fe-S) kümesi biyogeneğinde mitokondrinin rolü	79
2.4.11.3. Koenzim Q (Ubikinon) biyosentezi	79
2.4.11.4. Hem biyosenteğinde mitokondrinin rolü	81

2.4.11.5. Apoptozda mitokondrinin rolü	82
2.4.11.6. ATP üretiminde mitokondrinin rolü	83
2.4.12. Oksidatif Fosforilasyon (OXPHOS)	84
2.4.12.1. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I	86
2.4.12.2. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi II	90
2.4.12.3. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi III	91
2.4.12.4. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi IV	94
2.4.12.5. Mitokondriyal solunum zinciri kompleks V	95
2.4.12.6. Mitokondriyal solunum zinciri süperkompleksleri	97
2.5. MİTOKONDRIYAL HASTALIKLAR	98
2.5.1. Mitokondriyal hastalıkların araştırılmasında multidisipliner yaklaşım	100
2.5.2. mtDNA ilişkili mitokondriyal hastalıklar	101
2.5.3. mtDNA nokta mutasyonları	101
2.5.4. mtDNA delesyon sendromları	104
2.5.5. İkincil mtDNA mutasyonları	105
2.5.6. Nükleer mitokondriyal hastalıklar	106
2.5.7. İzole solunum zinciri kompleks eksiklikleri	108
2.5.8. OXPHOS dışı mitokondriyal hastalıklar	114
2.5.9. Serbest mtDNA (ccf-mtDNA) ve ilişkili Hastalıklar	115
2.6. KMH TEŞHİSİ İÇİN GÜNCEL YÖNTEMLER	116
2.6.1. Biyolojik Sıvılarda Metabolit Profillerinin Analizi	116
2.6.2. KMH Tanısında Moleküler Yöntemler	120
2.6.2.1. Sanger Yöntemi ile Tek Gen Dizileme	120
2.6.2.2. Yeni Nesil DNA Dizilime Sistemleri	122
2.6.3. Ion Torrent: Entegre Yarı İletken Mikrodevre (Çip) ile Dizileme	123
2.6.4. Verilerin Değerlendirilmesi	125
2.6.5. Tüm Ekzom Dizileme (TED)	129
3. GEREÇ VE YÖNTEM	130
3.1. Klinik Değerlendirmeler	130
3.2. Moleküler Yöntemler	131
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	131
3.2.1.1. DNA Miktar ve Saflığının Ölçümü	131
3.2.2. YND ile Fragmentasyon tabanlı Tüm mtDNA Dizi Analizi	132

3.2.2.1. mtDNA Uzun PZR için Primer Tasarımı	132
3.2.2.2. mtDNA'nın Uzun PZR ile çoğaltılması	132
3.2.2.3. mtDNA Fragman Kütüphanesinin Hazırlanması	134
3.2.2.4. Hazırlanan kütüphanede E-Gel™ SizeSelect™ Agarose Gel ile boyut seçimi.....	137
3.2.2.5. Kütüphanenin çoğaltılması için protokol.....	138
3.2.2.6. Oluşturulan barkodlanmış kütüphanenin değerlendirilmesi	139
3.2.2.7. Ion Chef™ Sistemi ve Ion S5™ Sisteminde Çip Yükleme ve Dizileme İçin Otomatik Taslak Hazırlama	141
3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme için Kütüphane Hazırlama	142
3.2.3.1. Hedef gDNA bölgelerinin çoğaltılması için protokol adımları	144
3.2.3.2. Adaptörlerin bağlanması ve barkodlama, bağlı gDNA'nın saflaştırılması	145
3.2.3.3. Kütüphanenin çoğaltılması için protokol adımları	147
3.2.3.4. Qubit™ Fluorometre ile kütüphane miktarı tayini ve seyreltme faktörünün hesaplanması	148
3.2.3.5. Kalıp Oluşturma.....	148
3.2.3.6. Ion GeneStudio S5 ile dizileme için çiplerin hazırlanması ve yüklenmesi.....	149
3.2.4. Ekzom Verilerinin Analizi ve Yorumlama	151
3.2.5. YND ile mtDNA Dizileme Veri Analizi.....	153
3.2.6. YND İle Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Doğrulanması .	155
3.2.6.1. Primerlerin Tasarlanması.....	155
3.2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	155
3.2.6.3. Sanger Dizi Analizi.....	156
3.2.7. Hücre kültüründen RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi	157
3.2.7.1. Kas Kültürü.....	157
3.2.7.2. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	158
3.2.8. Protein Modelleme	159
3.3. Histopatolojik Değerlendirmeler	160
3.4. Biyokimyasal ve Radyolojik Değerlendirmeler	160
4. BULGULAR	161
4.1.1. Aile-1 & Olgu III-7 ve III-11.....	163

4.1.2. Aile-2 & Olgu IV-1ve IV-2.....	167
4.1.3. Aile-3 & Olgu III-2	173
4.1.4. Aile-4 & Olgu V-5	178
4.1.5. Aile-5 & Olgu III-1 ve III-2.....	182
4.1.6. Aile-6 & Olgu III-2	189
4.1.7. Aile-7 & Olgu IV-1	193
4.1.8. Aile-8 & Olgu III-2	196
4.1.9. Aile-9 & Olgu III-2	200
4.1.10. Aile-10 & Olgu IV-4	204
4.1.11. Aile-11 & Olgu V-1 ve V-2.....	209
4.1.12. Aile-12 & Olgu IV-1	212
4.1.13. Aile-13 & Olgu III-7.....	215
4.1.14. Aile-14 & Olgu III-6.....	218
4.1.15. Aile-15 & Olgu V-1 ve V-2.....	221
4.1.16. Aile-16 & Olgu III-3.....	224
4.1.17. Aile-17 & Olgu IV-1	226
4.1.18. Aile-18 & Olgu IV-1	227
4.1.19. Aile-19 & Olgu IV-7 ve IV-10.....	229
4.1.20. Aile-20 &Olgu V-3	231
5. TARTIŞMA.....	234
KAYNAKLAR	289
HAM VERİLER	312
FORMLAR.....	313
ETİK KURUL KARARI.....	314
PATENT HAKKI İZNİ.....	315
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	316
ÖZGEÇMİŞ	317

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Mitokondriyal işlevleri olan nükleer genlerden örnekler	71
Tablo 3-1: Mitokondriyal genomu parçalı çoğaltan primer çiftleri	132
Tablo 3-2: Long PZR için gerekli kimyasal bileşenler ve son hacimleri	133
Tablo 3-3: Long PCR termal döngü koşulları	133
Tablo 3-4: Fragmentasyon ve Pürifikasyon prosedürünün malzemeleri	134
Tablo 3-5: Fragmentasyon için kullanılan mtDNA ve kimyasallar	134
Tablo 3-6: Adaptör bağlanması ve çentik onarımı için kullanılan kimyasallar..	136
Tablo 3-7: Bağlanma işlemi için uygulanan Ligasyon PZR protokolü.....	137
Tablo 3-8: Boyut-seçim işlemi için gerekli kimyasallar	138
Tablo 3-9: Kütüphanenin çoğaltılması için gereken kimyasal hacimleri.....	138
Tablo 3-10: Kütüphanenin çoğaltılması için optimum PZR koşulları	138
Tablo 3-11: Örnek kütüphanesinin hazırlığında gereken qPZR kimyasalları ..	139
Tablo 3-12: Gerçek zamanlı PZR koşulları	139
Tablo 3-13: E. coli DH10B Kontrol Kütüphanesinin 50 µL dilüsyonuna örnek.	140
Tablo 3-14: Örnek kütüphanenin dilüsyonu	140
Tablo 3-15: Amplifikasyon için master miks içeriği	144
Tablo 3-16: Amplifikasyon için PZR döngü koşulları	144
Tablo 3-17: Amplikonların kesilmesi için uygulanan PZR koşulları.....	145
Tablo 3-18: Barkod-adaptör karışımı için gerekli malzemeler ve hacimleri.....	145
Tablo 3-19: Barkod-adaptör ligasyonu için mix hazırlama malzemeleri.....	146
Tablo 3-20: Ligasyon için uygulanan PZR koşulları	146
Tablo 3-21: Kütüphane amplifikasyonu için PZR koşulları	147
Tablo 3-22: Varyant analizindeki kolonlar ve açıklaması.....	154
Tablo 3-23: cEARS2 için tasarlanan primerler	159
Tablo 3-24:cMICOS13 için tasarlanan primerler	159
Tablo 4-1: TED analizi ile gösterilen varyantlar, genleri ve ilişkili klinik.....	162

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kalıtsal Metabolik Hastalıkların patogenezi.	24
Şekil 2-2: Lizozom ve lizozom ilişkili organel hastalıkları ve ilişkili genler	37
Şekil 2-3: Lizozomal proteinlerin kompleks işlevleri.	38
Şekil 2-4: LDH'da hücrel patogenezi örnekleri.....	40
Şekil 2-5: Yaşamın ilk yılında KMH'nin ortaya çıkma süreleri.....	61
Şekil 2-6: Nükleer kodlanan proteinlerin mitokondriye yönlendirilmesi.	70
Şekil 2-7: İnsan mitokondriyal genomu ve genler.	72
Şekil 2-8: MtDNA'nın iki yönlü replikasyon modeli.	74
Şekil 2-9: mt-tRNA'nın polisistronik transkriptlerden bölünmesi.....	76
Şekil 2-10: Sodyum-kalsiyum değiştirici ve tek yönlü kalsiyum taşıyıcı sistemi. 79	
Şekil 2-11: İnsan mevalonat yolağına genel bakış.	80
Şekil 2-12: Mitokondrinin apoptozdaki rolü.	83
Şekil 2-13: Hücrel enerji metabolizmasına genel bakış.....	84
Şekil 2-14: OXPHOS kompleksleri ve ilişkili yardımcı faktörler.	85
Şekil 2-15: Kompleks I yapısının şematik görünümü.	87
Şekil 2-16: Kompleks I fonksiyonel domainlerinin bileşenleri.	89
Şekil 2-17: Kompleks II yapısının şematik görünümü.	91
Şekil 2-18: Kompleks III kristal yapısı ve 11 yapısal alt birimi.	92
Şekil 2-19: Q (Quinol) döngüsünün, iki aşamasının şeması.	93
Şekil 2-20: Kompleks IV kristal yapısının şematik gösterimi.....	94
Şekil 2-21: Sitokrom c oksidaz fonksiyonunun şematik gösterimi.....	95
Şekil 2-22: Memeli ATP sentazının yapısı ve işlevi.....	97
Şekil 2-23: Süperkomplekslerin kristal yapıları.	98
Şekil 2-24: Mitokondriyal hastalıkların klinik heterojenitesi.	99
Şekil 2-25: Hastalık ilişkili mutasyon bildirilen mitokondriyal genler.	107
Şekil 2-26: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi kullanılarak KMH tanısı	117
Şekil 2-27: Sanger dizileme cihazı.	122
Şekil 2-28: TED analizi okuma özeti, uzunluk bilgilerinin metrik sonuçları	126
Şekil 2-29: Torrent Server arayüzünde haritalama sonuçlarının görseli.....	127
Şekil 2-30: Torrent Server Plugin ile Kapsam ve derinlik analizi.....	127

Şekil 3-1: Ion Library TaqMan Quantitation Kitiyle kütüphane ölçümü iş akışı	141
Şekil 3-2: Ion AmpliSeq™ Exome RDY iş akış şeması	143
Şekil 3-3: Amplifikasyonların birleştirilmesi	144
Şekil 3-4: Emülsiyon PCR'ın şematik gösterimi (emPCR)	149
Şekil 3-5: Thermo Scientific™ Ion Torrent Ion Chef Sistemi ve Ion GeneStudio S5 Yeni Nesil Dizileme Sistemi	151
Şekil 4-1: Aile 1 pedigrisi	164
Şekil 4-2: Olgu III-7'nin kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi	165
Şekil 4-3: Olgu III-7'nin kontrastlı kranial MRG bulguları	165
Şekil 4-4: Aile-1 moleküler analiz sonuçları	166
Şekil 4-5: <i>TK2</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	166
Şekil 4-6: Thr108Met değişiminin <i>TK2</i> proteini üzerindeki tahmini etkisi	167
Şekil 4-7: Aile 2 pedigrisi	169
Şekil 4-8: Olgu IV-1'in kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi	169
Şekil 4-9: Olgu IV-1 (a) ve IV-2'nin (b) kontrastlı kranial MRG görüntüleri	170
Şekil 4-10: Aile-2 moleküler analiz sonuçları	171
Şekil 4-11: <i>POLG</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	171
Şekil 4-12: Leu304Arg değişiminin <i>POLG</i> proteini üzerindeki tahmini etkisi	172
Şekil 4-13: Aile 3 pedigrisi	174
Şekil 4-14: Olgu III-2'in kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi	174
Şekil 4-15: Olgu III-2'nin kontrastlı kranial MRG görüntüsü	175
Şekil 4-16: Aile 3 Moleküler analiz sonuçları	176
Şekil 4-17: İndeks olgunun <i>EARS2</i> geninde saptanan varyantların genomik ve cDNA elektroferogramları	177
Şekil 4-18: <i>EARS2</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	177
Şekil 4-19: Arg107Cys değişiminin <i>EARS</i> proteini üzerindeki tahmini etkisi	178
Şekil 4-20: Aile 4 'ün pedigrisi	179
Şekil 4-21: Olgu V-3'ün kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi	180
Şekil 4-22: Olgu V-3'ün kranial MR görüntüsü	180
Şekil 4-23: Aile-4 moleküler analiz sonuçları	181
Şekil 4-24: <i>MICOS13</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	182
Şekil 4-25: Aile 5 'in pedigrisi	183
Şekil 4-26: İndeks olguya ait beyin MR görüntüsü	184

Şekil 4-27: Aile-5 moleküler analiz sonuçları.....	185
Şekil 4-28: <i>ECHS1</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	186
Şekil 4-29: Arg58His değişiminin <i>ECHS1</i> proteini üzerindeki tahmini etkisi. ...	187
Şekil 4-30: Glu68Lys değişiminin <i>ECHS1</i> proteini üzerindeki tahmini etkisi. ...	188
Şekil 4-31: Aile 6 pedigrisi.	190
Şekil 4-32: Olgunun kranial MR görüntüsü.	190
Şekil 4-33: <i>NDUFAF6</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	191
Şekil 4-34: Aile-6 moleküler analiz sonuçları.....	192
Şekil 4-35: Aile 7 pedigrisi.	194
Şekil 4-36: <i>FBXL4</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	194
Şekil 4-37: Aile-7 moleküler sonuçları.	195
Şekil 4-38: Aile 8 pedigrisi.	197
Şekil 4-39: <i>OXCT1</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	198
Şekil 4-40: Aile 8 moleküler analiz sonuçları.	199
Şekil 4-41: Aile 8 pedigrisi.	202
Şekil 4-42: <i>ALG8</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	202
Şekil 4-43: Aile 8 moleküler analiz sonuçları.	203
Şekil 4-44: Aile 10 pedigrisi.	205
Şekil 4-45: Aile 10 moleküler analiz sonuçları.....	207
Şekil 4-46: c.260C>T değişiminin <i>COX10</i> protein yapısı üzerindeki tahmini etkisi.	208
Şekil 4-47: Aile 11 Pedigrisi.....	210
Şekil 4-48: <i>CAPN3</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	211
Şekil 4-49: Aile 11 moleküler analiz sonuçları.....	211
Şekil 4-50: Aile 12 Pedigrisi.....	213
Şekil 4-51: Aile 11 moleküler analiz sonuçları.....	214
Şekil 4-52: Aile 13 Pedigrisi.....	216
Şekil 4-53: <i>DYSF</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	216
Şekil 4-54: Aile 13 Moleküler analiz Sonuçları	217
Şekil 4-55: Aile 14 Pedigrisi.....	219
Şekil 4-56: <i>DHTKD1</i> transkriptinde ekzon ve intronlar.....	219
Şekil 4-57: Aile 14 Moleküler analiz sonuçları.....	220
Şekil 4-58: Aile 15 Pedigrisi.....	222

Şekil 4-59: <i>SMARCAL1</i> transkriptinde ekzon ve intronlar	222
Şekil 4-60: Aile 15 Moleküler analiz sonuçları.....	223
Şekil 4-61: Aile 16 Pedigrisi.....	224
Şekil 4-62: Aile 16 olgu III-3 mtDNA uzun PZR agaroz jel görüntüsü	225
Şekil 4-63: Aile 17 Pedigrisi.....	227
Şekil 4-64: Aile 18 Pedigrisi.....	229
Şekil 4-65: Aile 19 Pedigrisi.....	231
Şekil 4-66: Aile 20 Pedigrisi.....	233



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AA:	Amino asit
ALT:	Alanin aminotransferaz
ASSP:	<i>Alternative Splice Site Predictor</i>
ARS:	Aminoasıl tRNA sentetaz
AST:	Aspartat Aminoransaminaz
ATP:	Adenozin tri fosfat
BH4:	Tetrahidrobiopterin
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
CDG:	<i>Congenital disorders of glycosylation</i>
CK:	Kreatin fosfokinaz
CoQ10:	Koenzim Q10
COX:	Sitokrom c oksidaz
CPEO:	Kronik progresif eksternal oftalmopleji
C/S:	<i>Cesarean Section</i>
D-Loop:	Displacement loop
DMM:	Dış mitokondriyal membran
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid
DTR:	Derin tendon refleksleri
EEG:	Elektroensefalografi
EF:	Ejeksiyon fraksiyonu
EKG:	Elektrokardiyogram
EMG:	Elektromiyografi
ERT:	Enzim replasman tedavisi
FAD:	Flavin adenin dinükleotid
FADH2:	İndirgenmiş flavin adenin dinükleotid
FGF21:	Fibroblast growth faktör 21
GBS:	Gullian-Bare Sendromu

GCMS: Gas chromatography–mass spectrometry

GDF15: Growth diferansiyon faktör 15

GSD: *Glycogen Storage Disease*

HE: Hemotoksilen eozin

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HPA: *Hyperphenylalaninemia*

IEM: *Inborn Errors of Metabolism*

IEMbase: *Inborn Errors of Metabolism Knowledgebase*

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

IMA: İntermembranöz aralık

IMM: İç mitokondriyal membran

IUGG: İntra uterin gelişme geriliği

kDa: Kilo dalton

KMH: Kalıtsal metabolik hastalıklar

KSS: Kearns-Sayre sendromu

LDH: Lizozomal Depo Hastalıkları

LHON: Leber'in Herediter Optik Nöropatisi

MAF: Minimum allel frekansı

MTDPS: MtDNA deplesyon sendromu

MELAS: Mitokondriyal miyopati, Ensefalopati, Laktik Asidoz, Strok-benzeri epizodlar

MERRF: Myoklonik Epilepsi-Ragged Red Fiber

MGT: Modifiye Gomori Trikrom

MLPA: *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

MPS: Mukopolisakkaridozlar

MR: Manyetik rezonans

mtDNA: Mitokondriyal deoksiribonükleik asit

mtRNA: Mitokondriyal ribonükleik asit

NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NARP: Nöropati, Ataksi, Retinitis Pigmentoza

NGS: *Next-generation Sequencing*

NSD: Normal servikal doğum

OA: Organik asit

OD: Otozomal dominant

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OR: Otozomal resesif

OXPHOS: oksidatif fosforilasyon

PAS: Periodik asid-Schiff

PDB: Protein database

PEO: Progresif eksternal oftalmopleji

Pi: İnorganik fosfat

PKU: *Phenylketonuria*

POLG: Mitokondriyal DNA polimeraz gama geni

PZR: Polimeaz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RRF: *Ragged red fiber*

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

SDH: Süksinat dehidrogenaz

SRT: Substrat azaltma tedavisi

TCA: Trikarboksilik asit

TED: Tüm ekzom dizileme

TGD: Tüm genom dizileme

TK2: Timidin kinaz 2

tRNA: Transfer ribonükleik asit

XR: X'e bağlı resesif

USG: Ultrasonografi

VUS: *A variant of uncertain significance*

YND: Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

Gedikbaşı, A. (2020). Tanı Konulamayan Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Tüm Ekzom Dizi Analizinin Katkısı. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları (KMH), biyokimyasal yollardaki bozuklukları kapsayan, klinik ve genetik olarak heterojenliği nedeniyle tanısal güçlükleri olan genetik hastalıklardır. En büyük payı, nükleer ve mitokondriyal patojenik varyantlarla ilişkili mitokondriyal hastalıklar oluşturur. DNA dizi teknolojilerindeki gelişmeler tanı gücünü olan bu tip hastalıkların genetik etiyolojisinin aydınlatılmasına önemli bir ivme kazandırmıştır. Bu tezin amacı, tanı konulamayan KMH'da görülen klinik fenotiplerin, moleküler etiyolojilerinin aydınlatılmasında, tüm ekzom dizileme (TED) yönteminin katkısını araştırmaktır. Çalışmaya, on dördü mitokondriyal hastalık olmak üzere 20 aileden 26 etkilenmiş olgu dahil edildi. Özgün tasarlanan fragmentasyon tabanlı mtDNA dizileme ve TED analizi için Thermo Scientific™ IonGeneStudio S5 Sistemi ve IonReporter analiz programı kullanıldı. Kültüre edilen kas/kan hücrelerinden transkript çalışmaları yapıldı. On dört farklı aileden, on sekiz etkilenmiş olguda *TK2*, *POLG*, *EARS2*, *MICOS13*, *ECHS1*, *NDUFAF6*, *FBXL4*, *CAPN3*, *DYSF*, *ALG8*, *OXCT1*, *DHTK2*, *SMARCAL1* genlerinde on sekiz farklı patojenik/olası patojenik varyant gösterilirken altı ailede genetik etiyoloji aydınlatılamadı. Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanan ve aile çalışmaları yapılan bu varyantlardan sekizi, novel veya hastalık ilişkisi daha önce bildirilmeyen çok nadir değişimlerdi; *EARS2*'de c.1283delC (p.(Pro428Leufs*)) ve c.319C>T(p.Arg107Cys), *ALG8*'de c.479A>T(p.His160Leu), *ECHS1*'de c.202G>A (p.Glu68Lys), *NDUFAF6*'da c.479delA (p.(Asn162Ilefs*27)), *OXCT1* c.1370C>T (p.Thr457Ile), c.1173-139G>T *SMARCAL1*'de c.1027_1034delTTCGAGGC (p.(F343Rfs*13)) idi. Olguların klinik, radyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik sonuçları gen ve varyant ilişkilerini destekledi. TED analizi ile tüm aileler için %65, mitokondriyal grup için %50 oranında moleküler genetik tanı sağlandı. Tüm ailelere prenatal/preimplantasyon genetik tanı olanaklarını içeren kapsamlı genetik danışma verildi. *TK2* eksikliği olan iki olgu ilaca erken erişim programına yönlendirildi. Tanı konulamayan altı ailede ise gelecek projeler dahilinde tüm genom dizi analizi yapılması planlandı.

Anahtar Kelimeler: Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları, Tüm Ekzom Dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-32544

ABSTRACT

Gedikbasi, A. (2020). Diagnostic Utility of Whole Exome Sequencing in Undiagnosed Inborn Errors of Metabolism. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Doctoral Thesis. İstanbul.

Inborn errors of metabolism (IEMs) are diseases that involve disorders in biochemical pathways and have diagnostic difficulties due to clinical and genetic heterogeneity. Mitochondrial diseases are the most common form of IEMs associated with nuclear and mitochondrial pathogenic variants. Advances in DNA sequencing technologies have given an important support to elucidating the genetic etiology of such diseases, which are difficult to diagnose. The aim of this thesis is to determine the molecular etiologies for undiagnosed IEMs using whole-exome sequencing (WES). Twenty-six affected patients from 20 undiagnosed families, 14 of which were mitochondrial disease were included. Thermo Scientific™ IonGeneStudioS5 System was used for WES and mtDNA sequencing. Transcript studies were performed from cultured muscle/blood cells. Eighteen different pathogenic/likely pathogenic variants were shown in *TK2*, *POLG*, *EARS2*, *MICOS13*, *ECHS1*, *NDUFAF6*, *FBXL4*, *CAPN3*, *DYSF*, *ALG8*, *OXCT1*, *DHTK2*, *SMARCAL1* genes in nineteen affected cases from thirteen families. All of the diagnosed variants confirmed by Sanger sequencing and segregation in families with available individuals. Altogether, three novel and five ultra-rare variants first time associated with disease in this study; *EARS2* c.1283delC ((p.Pro428Leufs*)) and c.319C>T (p.Arg107Cys), *ALG8* c.479A>T (p.His160Leu), *ECHS1* c.202G>A (p.Glu68Lys), *NDUFAF6* c.479delA (p.(N162Ifs*27)), *OXCT1* c.1370C>T(p.Thr457Ile), c.1173-139G>T *SMARCAL1* c.1027_1034delTTTCGAGGC, (p.(F343Rfs*13)). The clinical, radiological, biochemical and histopathological results of the cases supported the gene and variant associations. Molecular genetic diagnosis was achieved at a rate of 65% for all of the families and 50% of the mitochondrial disease group. Genetic result allowed two patients to receive early access to the medicine for TK2 deficiency. Genetic counseling presented for all of the families. Six of the families remain undiagnosed, and planned for whole genome sequencing in future projects.

Key Words: Metabolism, Inborn Errors, Whole Eksome Sequencing

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2018-32544

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları (KMH) veya metabolizmanın doğuştan gelen kusurları, metabolik yollardaki enzim veya taşıyıcı proteinlerin eksikliğine bağlı olarak, ilgili yolda biriken metabolitlerin toksik etkisi veya son ürünlerin yetmezliği nedeniyle farklı klinik ve biyokimyasal fenotiplerin görüldüğü heterojen, genetik bir hastalık grubudur. Genetik hastalıklar içinde bu grup, bazı hastalıklarının tedavi edilebilmesi veya bulgularının önlenmesi ile özel bir konumdadır ve tek tek nadir olarak görülseler de, binden fazla hastalığı kapsayan büyük bir gruptur. Toplumlar arasında farklılıklar görülmekle birlikte insidans 1/800-1/2500 arasında değişmektedir.

Kalıtsal metabolik hastalıklar, çoğunluğu otozomal resesif (OR), daha az sıklıkla da otozomal dominant (OD) veya X'e bağlı resesif (XR) kalıtım gösteren tek gen hastalıkları olup (monogenik), sorumlu mutasyonların büyük çoğunluğu, tek veya birkaç nükleotidi etkileyen DNA değişiklikleridir. Bu nedenle, patojenik varyantların tanımlanmasında moleküler teknikler kullanılmaktadır. Özgün fenotip ya da yenidoğan tarama testlerinin yönlendirmesi ile moleküler tanı amacıyla Sanger dizileme tekniğinin kullanımı mümkündür (Fenilketonüri gibi). Ancak, bu hastalıklar sayıca az olduğundan KMH ların moleküler tanısı Sanger dizileme yaklaşımı ile sınırlı kalmakta ve ilişkili binlerce genin varlığı, aynı bir yoldaki birçok genin benzer fenotiplere yol açabilmesi moleküler tanıda zorluk oluşturmaktadır. Oysa, ilişkili genin tanımlanması, hastaya en erken zamanda en uygun tedavinin uygulanmasına olanak sağladığı gibi ailenin bilgilendirilmesi, ailedeki diğer olası etkilenmiş ya da taşıyıcıların belirlenmesi, ailelerin sağlıklı çocuk sahibi olabilmeleri konusunda yol gösterecek genetik danışmayı da yönlendirmektedir. Moleküler yöntemlerden “yeni nesil dizileme” (YND) tekniği ile birçok genin eş zamanlı dizilenmesi (panel gen veya klinik ekzom dizileme), bilinen yaklaşık 20 bin genin ekzonlarının incelenmesine olanak sağlayan tüm ekzom dizileme (TED) ve hatta bireyin tüm genomunun dizi analizi (TGD), klinik fenotipin yönlendirici olmadığı, birçok genin benzer fenotiplerle ilişkilendirildiği olgu gruplarında önemli bir tanı aracı haline gelmiştir. Bu yöntemler, benzer özellikte olan KMH grubunda da moleküler tanıda çok önemli katkılar sağlayarak tanı oranını arttırmıştır.

Tanısal gelişmelere bağlı olarak metabolik süreçlerin daha iyi anlaşılması mümkün olmakta ve KMH için yeni tedavi seçeneklerinin ve stratejilerinin oluşturulmasına katkı sağlanmaktadır. KMH da enzim yerine koyma tedavisi (ERT), substrat azaltma tedavisi (SRT), şaperon tedavileri, koenzim - kofaktör tedavileri, spesifik hücre-organ nakli ve gen tedavileri mevcut uygulamalar arasındadır.

KMH, çocukluk çağı boyunca önemli bir hastalık yüküne ve mortaliteye neden olduğundan, tanı, tedavi ve izlemin doğru yönetilmesi, hasta için olduğu kadar, aile bireyleri, sosyal güvenlik kurumları ve dolaylı olarak tüm toplum açısından önemlidir. Detaylı bir klinik muayene, radyolojik görüntülemeler, biyokimyasal incelemeler ile ön tanıya göre hastaların semptomatik tedavilerine başlanmakta, ancak hastalığın moleküler etiyolojisi büyük oranda aydınlatılamamaktadır. Bu durum, ailelerin çaresizce çözüm arayışı nedeniyle farklı merkezlere mükerrer başvurusuna, birçok biokimyasal ve radyolojik tetkikin tekrarlanmasına, girişimsel yöntemlerle (kas/deri biyopsileri) ileri analizler yapılmasına, daha önemlisi etkin olmayan hatta potansiyel zararı olabilen tedaviler uygulanmasına neden olmakta, birden fazla etkilenmiş birey doğabilmekte, bu da ailenin ve dolaylı olarak toplumun sosyoekonomik yükünü artırmaktadır.

Moleküler genetik alanındaki gelişmeler maliyetlerin azalmasına, testlerin hızlanmasına ve erişilebilirlik oranının artmasına yol açtığından genomdaki varyantların sağlık ve hastalık üzerindeki etkilerinin anlaşılmasını sağlamış ve genomik çalışmaların, araştırma laboratuvarından klinik laboratuvara geçişini hızlandırmıştır. Genomik tıp veya bir kişinin genomik bilgisinin klinik hizmetin bir parçası olarak kullanılması, nadir görülen ve teşhis edilmesi güç hastalıkların tanısında rutin uygulamalarda giderek daha fazla yer bulmaya başlamıştır. Translasyonel tıp, yani; temel bilginin laboratuvardan kliniğe transferi, YND teknolojileriyle sağlanan büyük verilerin, klinikle birlikte yorumlanması ile “kişiselleştirilmiş tedavi” ve “önleyici tıp” uygulamalarında da önemli gelişmeler sağlamaktadır. Nadir hastalıkların moleküler temelini anlaşılması, toplumda sık görülen diğer hastalıkların patofizyolojisine ışık tutması ve hedef tedavi molekülü geliştirilmesine aracı bilgi sağlaması bakımından da önemlidir. Bu nedenle, hem nadir ve tanı konulamayan hastalıkların doğru yönetimi hem de

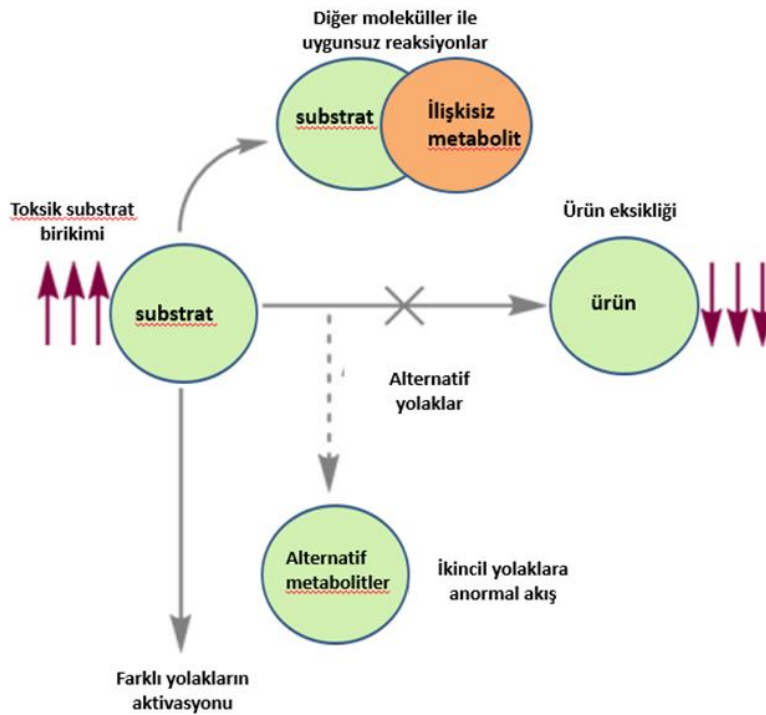
yenilikçi hedef tedavi molekülü geliştirmedeki aracı rolü nedeniyle YND teknikleri ile elde edilen büyük verinin akılcı kullanımı konusunda algoritmalar belirlenmesi gerekmektedir.

Bu tezin birincil amacı, kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında, YND teknolojisi ile tüm ekzom dizilemenin moleküler tanıya olan katkısını araştırmak, tanı konulan olguların doğru yönetimini ve ailelerindeki diğeri taşıyıcıların belirlenmesiyle, risk taşıyan çiftlerin prenatal veya preimplantasyon genetik tanı ile sağlıklı çocuk sahibi olabilme seçenekleri konusunda bilgilendirilmelerini sağlamaktır. İkincil amaç, nadir kalıtsal metabolik hastalıklar için, multidisipliner ve algoritmik bir yaklaşımla genetik tanıyı geliştirmeye odaklanmak ve YND tekniklerinin tanısal gücünü artıran maliyet etkin tanı stratejileri geliştirmektir. Böylelikle toplumumuzda sık görülen mutasyonların belirlenmesine de katkı sağlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALITSAL METABOLİK HASTALIKLAR: TANIM

Kalıtsal metabolik hastalıklar (KMH) veya metabolizmanın doğuştan bozuklukları [*inborn errors of metabolism*, IEM] kavramı, ilk kez 1902 yılında alkaptonüri hastalığı için Archibald Garrod tarafından kullanılmıştır (1). Sir Archibald Garrod, amino asitler ve monosakkaritler gibi basit aracı metabolitlerin metabolizmasındaki “nokta kusurların” neden olduğu bir grup hastalık olduğunu ifade etmiştir. DNA dizileme devrimi aracılığıyla ortaya çıkarılan muazzam genetik çeşitlilik, Garrod tarafından neredeyse 100 yıl önce öne sürülen olağanüstü görüşleri basitçe doğrulamıştır; insanlar “kimyasal olarak bireyseldir” (2). Büyük bir çoğunluğu “tek gen hastalığı” olan KMH, biyokimyasal reaksiyonlarda görevli enzim veya taşıyıcı proteinlerin eksikliği nedeniyle bloke olan metabolik yolda biriken substratın toksik metabolitlerinin etkisi veya ürünlerin yetmezliği sonucu klinik bulgu veren genetik kökenli hastalıklardır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Kalıtsal Metabolik Hastalıkların patogenezi.

(Lanpher ve ark'dan uyarlanmıştır, 2006).

Hangi hastalıkların KMH olarak kabul edileceği konusunda net bir fikir birliği oluşmamıştır. Bu terim, spesifik biyokimyasal yolaklardaki maddelerin biyosentezi veya yıkımında görevli enzimlerin kalıtsal (nadiren de novo) eksikliği sonucu genellikle biyokimyasal testler ile tanınan ve bazen de metabolik bir aracı ile tedavi edilebilen hastalıkları ifade eder. KMH tanımı primer olarak şu bozukluklardan kaynaklanan hastalıkları kapsamaz; a) Yapısal proteinler ve bunların modifikasyonu, b) Metabolik bir yolda işlevi olmayan membran kanalları veya diğer membran proteinleri, c) Hücre içi veya hücreler arası sinyal iletimi ve transkripsiyon faktörleri, d) Endokrin fonksiyon veya hormon biyosentezi (8).

KMH, yaşamın herhangi bir döneminde bulgu verebilir ve herhangi bir organ sistemini etkileyebilir. En sık görüldüğü yaş grubu yenidoğan ve süt çocukluğu dönemi olmasına rağmen patojenik mutasyonun etkisine göre, toksik madde birikimi bazen yıllar sürebilir, bulgular daha ileri yaşlarda ortaya çıkabilir ya da gebelik gibi fizyolojik süreçlerde tetiklenebilir. Yenidoğan döneminde, ilk bulgular, etkilenen metabolik yolağın ilişkili olduğu organ veya sisteme göre değişmekle birlikte, doğumdan saatler ya da günler sonra başlayan aktivitede azalma, emmeme, kusma, solunum sıkıntısı, uykuya meyil veya nöbet gibi non-spesifik bulgulardır ve çoğunlukla sepsis gibi sık görülen durumlarla karışır. Oysa ilk semptomu yakalamak erken tanı için son derece önemlidir. Hastalığın erken tanısı ile hem doğru tedavi sağlanır, hem de ailenin sonraki gebeliği için uygun genetik danışma verilebilir. Olgunun tanı konulmadan kaybedilmesi ve genetik tanı için biyolojik örneklerin saklanmaması, genetik tanı ve danışma verilememesine yol açtığından, ailenin aynı süreci tekrar tekrar yaşamasına neden olabilir. Bu sebeple özellikle yenidoğan döneminde bulgu veren KMH' a, dikkatli ve özenli yaklaşmak, genetik tanı için biyolojik örnek saklamak son derece önemlidir. Öykü, aile ağacı, geçmiş veya mevcut gebelik öyküsü de tanı için yönlendirici olabilir. Bazı hastalıklarda etkilenmiş fetus intrauterin bulgu verebilir (doğumsal kolesterol metabolizması bozuklukları; Smith-Lemli-Opitz sendromu gibi), fetus anneyi etkileyebilir (fetüste homozigot veya bileşik heterozigot yağ asidi oksidasyon bozukluğu sonucu annede HELLP (*hemolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet levels*) (9), ya da hasta anne fetusu etkileyebilir (maternal fenilketonüri) (10).

Hızla gelişen biyokimyasal ve genetik tanı teknolojileri ile KMH alanı, nadir, tedavi edilemeyen ve çoğunlukla ölümcül olan sınırlı bir gruptan, sayısı giderek artan ancak daha fazla tedavi edilebilir olan hastalıklar alanına doğru yön değiştirmiştir. Değişmeyen ise, başlangıçtaki nonspesifik klinik bulguları nedeniyle tanısı atlanan bu hastalıkların yetim doğasıdır. KMH, genellikle, sadece metabolizma uzmanı tarafından anlaşılan, çok sayıda genle ilişkili ve tanı zorluğu yaşanan bir hastalık grubudur. Karmaşık biyokimyasal yollarla ilişkili, okunması zor olan enzim ve protein kusurlarının ortaya çıkardığı garip hastalık isimlerinin olması bu hastalar için oldukça talihsiz bir durumdur. Oysa, klinik olarak farklı hastalık gruplarında, çok benzer tanı ve tedavi yaklaşımı gerektiren, tanınabilir ve acil tedavi ile hayat kurtaran metabolizma hastalıkları vardır (8). Yakın zamana kadar KMH, çocuk hastalıkları olarak kabul ediliyordu. Gerçekten de "doğuştan" terimi klinisyenlerin zihninde uzun zamandır, yenidoğanda veya en azından çocukluk döneminde başlayan bir hastalık anlamına geliyordu. Her ne kadar çocuk doktorları, şiddetli yenidoğan formlarına ek olarak, bir çok KMH'nin, ilk klinik bulguları ergenlik veya yetişkinlikte başlayan hafif formları olduğunu bilseler de, bu hastalıklar erişkinlik dönemi tıp uzmanları tarafından genellikle tanınmadığından, geç başlangıçlı formların kesin prevalansları bilinmemektedir (9). Klinisyenlerin farkındalığının artırılması, ayırıcı tanıda akla gelmesi, tedavi edilebilenlerin atlanmaması ve aileye genetik danışma verilmesi açısından önemlidir.

Patofizyolojik perspektiften, tanıda kolaylık sağlayan klasik olarak üç tip metabolik hastalık vardır: 1) İntoksikasyon tipi, 2) Enerji eksikliği ile giden tip, 3) Depo tipi olarak bilinen kompleks moleküllerin sentez ve yıkım bozuklukları. İntoksikasyon tipi bozukluklarda, etkilenen biyokimyasal yolda, metabolik blok nedeniyle biriken küçük moleküller akut veya kronik ilerleyici bir zehirlenmeye yol açar. Bu grupta amino asit (AA) katabolizması bozuklukları (fenilketonüri, akçaağaç şurubu idrar hastalığı, homosistinüri, tirozinemi vb.), organik asidüriler (OA) (metilmalonik, propiyonik, izovalerik vb.), konjenital üre döngüsü defektleri (urea cycle disorder, UCD), şeker intoleransları (galaktozemi, kalıtsal fruktoz intoleransı), metal zehirlenmesi (Wilson, Menkes, hemokromatoz vb.), ve porfiri sayılabilir. Bu gruptaki hastalıkların benzer klinik özellikleri vardır. Embriyo-fetal gelişimi etkilemezler, toksik madde birikimi için başlangıçta semptomsuz bir ara

dönem vardır ve intoksikasyonun klinik belirtileri akut (kusma, koma, karaciğer yetmezliği, tromboembolik komplikasyonlar, vb.) veya kronik (gelişime geriliği, ektopia lentis, kardiyomiyopati vb.) olabilir, yenidoğandan geç erişkine kadar herhangi bir dönemde ortaya çıkabilir. Akut metabolik atakları araya giren enfeksiyon, ateş gibi katabolik süreçler ile yasak yiyeceklerin alımı provoke eder. Bu grup hastalıklar, plazma ve idrar AA, organik asit analizi, tandem kütle spektrometrisi (tandem MS) ile asilkarnitin profili gibi metabolik testlerle kolay tanınır ve hedef gende mutasyon analizi ile tanı kesinleşir. Hastalıkların birçoğunun tedavisi vardır; toksik metabolitin acil olarak uzaklaştırılmasını takiben, tıbbi beslenme tedavisi, özel arındırıcı ilaçlar (karnitin, sodyum benzoat, penisillamin, vb.) ve vitaminlerle normal yaşam mümkündür.

İkinci tip KMH, enerji eksikliği ile giden ve özellikle karaciğer, kalp, kas ve beyin gibi enerji gereksinimi yüksek olan organları etkileyen hastalıklardır. Mitokondriyal ve sitoplazmik enerji yollarının etkilendiği iki alt grupta, klinik özellikler, tanı ve tedavi yaklaşımları farklıdır. Mitokondrial enerji eksikliği tablosunda klinik daha ağırdır, tanı ve tedavi zordur. Biyokimyasal reaksiyonları mitokondride gerçekleşen, piruvat karboksilaz (PC), piruvat dehidrojenaz (PDH) ve Krebs döngüsü kusurlarının neden olduğu konjenital laktik asidemiler, mitokondriyal solunum zinciri bozuklukları, mitokondriyal taşıyıcı veya koenzim Q10 (CoQ) sentezi bozuklukları, yağ asidi oksidasyon defektleri (Fatty acid oxidation disorders (FAODs), ketogenez ve ketoliz bozuklukları gibi hastalıklar bu gruptadır. Mitokondrial hastalıklarda karnitin, B vitamin kompleksleri gibi destek tedavileri verilse de, bu gün için etkin tedavileri yoktur. Sadece CoQ kusurları kısmen tedavi edilebilir. Bu gruptaki yaygın semptomlar arasında hipoglisemi, hiperlaktatemi, hepatomegali, ciddi jeneralize hipotoni, miyopati, kardiyomiyopati, gelişme geriliği, kardiyak yetmezlik, dolaşım kollapsı, ensefalopati ve bebeklikte beklenmedik ani ölüm sendromu görülebilir. Mitokondriyal bozukluklardan bazıları ve pentoz fosfat yolu (pentose phosphate pathway, PPP) kusurları embriyo-fetal gelişimi etkileyerek dismorfizm, displazi ve malformasyonlara neden olur. Sitoplazmik enerji eksikliği tablosu ise, sitoplazmadaki biyokimyasal yolların enzim kusurlarından kaynaklanır, daha hafif klinikle seyreder ve genellikle tıbbi beslenme tedavileri vardır. Glikoliz, glikojen metabolizması, glukoneogenez bozuklukları ve hiperinsülinizm grubu

(tümü tedavi edilebilir bozukluklar), kreatin metabolizması kusurları (kısmen tedavi edilebilir) ve PPP kusurları (tedavi edilemez) gibi hastalıkları içerir. Enerji eksikliği tipi metabolik hastalıkların teşhisi zordur ve fonksiyonel testlere dayanır, dokuda veya hücre kültüründe enzimatik analizler ve moleküler incelemeler gerektirir.

Üçüncü olarak, depo tipi KMH, kompleks molekül hastalıkları; hücreyel organelleri (lizozomlar, peroksizomlar, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı) ve kompleks moleküllerin, biyosentezi ve katabolizması ile ilgili bozuklukları içerir. Semptomlar çoğunlukla kalıcı, ilerleyicidir ve araya giren enfeksiyon veya besin alımlarından bağımsızdır. Tüm lizozomal depo hastalıkları (LDH), peroksizomal hastalıklar, hücre içi trafik bozuklukları bu gruptandır. Lizozomal depo hastalıklarının da ERT ya da SRT gibi etkin tedavileri bulunmaktadır (11).

Bu iyi bilinenler dışında, kompleks lipitler ve yağ asitlerinin sentezi, yeniden modellenmesi ve geri dönüşüm bozuklukları gibi hızla artan sayıda yeni hastalıklar tanımlanmaktadır. Kompleks moleküllerin işlenmesi ve hücre içi trafiğini etkileyerek farklı sistemleri bozan pek çok farklı mutasyon gösterilmiştir. Örneğin; *CHMP2B* mutasyonunun neden olduğu frontotemporal demans, nöronal lizozomal depo patolojisi ile karakterizedir (12). Belirgin metabolik belirteçler olmadan, ekzom dizileme ile ortaya çıkan yeni hastalıklar, endozomal/lizozomal sistemde madde birikimi ile giden LDH'nin daha geniş tanımıyla ilgili bir soruyu gündeme getirmiştir. Ek olarak, sitozolik aminoasıl tRNA sentetaz (*LARS*, *HARS*, *MARS*, *YARS*) ve hem mitokondri hem de sitozolde lokalize iki aminoasıl tRNA sentetazda (*KARS* ve *GARS*), yeni mutasyonlar rapor edilmiştir. Sitoplazmik tRNA sentetazlar, hücrenin tüm proteinleri ve dolayısıyla tüm organeller için gerekli olduğundan yeni bir KMH alanı açarlar. Aynı şey sitoplazmik protein sentezi ile ilgili diğer faktörler (örneğin, *EIF2AK3* gibi düzenleyici faktörler) ve hatta gen ekspresyonu ve kırılma ile ilişkili nükleer faktörler için de söylenebilir. Hastaların iyi tanımlanmış klinik bulgularla dikkatli gruplandırılması, metabolik ve genetik araştırmaları yönlendirecek (örn, lipidomik yaklaşımlar ve ekzom dizileme) doğru algoritmalar sağlayabilir. Bu kompleks molekül sentez ve düzenlenme kusurları, katabolik bir yoldaki enzimatik blok nedeniyle oluşan ve yapısal moleküllerin sentezini ve stabilitesini etkileyen klasik KMH'nin kavşak noktasındadır.

2.2. KALITSAL METABOLİK HASTALIKLAR: SINIFLAMA

Canlı hücre dinamik yapısını korumak için binlerce reaksiyonun gerçekleştiği bir fabrika gibi çalışır. Hücresel süreçlerde gerekli olan enerji adenosin trifosfatın (ATP) hidrolizinden sağlanır, ATP sentezi de enerji gerektirir ve bu enerji, alınan besinlerin metabolizması sırasında üretilir. Metabolizmanın amacı enerji (ATP), indirgeyici güç olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) ve biyosentezler için yapı taşları oluşturmaktır. Mitokondri iç zarında oksidatif fosforilasyon ile elde edilen enerjinin yaklaşık %60'ı mekanik iş (kas kasılması), %30'u osmotik iş (iyon transportu) ve %10 kadarı da kimyasal işlerde (biyosentez) kullanılır. Bu metabolik yollarda, protein yapılı biyolojik katalizörler olan enzimler, taşıyıcı proteinler, koenzim ve kofaktörlerin düzenlemesiyle kimyasal tepkimelerde stokiometrik bir denge sağlanır. Bir biyokimyasal yoldaki son veya ara ürünler, diğer bir yoldaki reaksiyonlar için substrat olabilir ve böylelikle karbonhidrat, lipid, protein metabolizması birbiriyle dinamik bir ilişki içindedir. İntoksikasyon tablosunda ATP üretimi azalır, enerji eksikliği görülebilir veya enerji eksikliğinde metabolik yollar bloke olacağından toksik madde birikimi oluşabilir. Hücre ve organel düzeyinde yapılan çalışmalar ile metabolizmanın moleküler temeli aydınlandıkça, tanımlanan hastalık sayıları da giderek artmaktadır. Bu nedenlerle, klinik yaklaşım için güncellenen yeni sınıflamada; i) ara metabolizma bozuklukları, ii) kompleks moleküllerin sentez ve yıkım bozuklukları, iii) nörotransmitter bozuklukları ve ilişkili hastalıklar olmak üzere üç ana grup belirlenmiştir (8).

2.2.1. Ara Metabolizma Bozuklukları

Ara metabolizmanın bozuklukları, karbonhidrat, protein ve yağ asidi metabolizması ya da mitokondrial enerji metabolizmasındaki enzim eksiklikleri nedeniyle oluşur. Ara metabolizma bozuklukları genellikle dinamiktir; enfeksiyon, stres, büyüme gibi metabolik durumdaki değişikliklerle dalgalanan bir klinikleri vardır ve sıklıkla etkin terapötik müdahalelere izin verir. Bu hastalıkların birçoğu, kan gazları, glikoz, laktat, amonyak, plazma amino asitleri, idrar organik asitleri ve açılarnitin profili gibi temel metabolik araştırmalar ile teşhis edilebilir.

Etkilenen biyokimyasal reaksiyonun metabolik fonksiyonuna dayanan farklı patojenik mekanizmalar söz konusudur;

- Toksik substratların ve bunların metabolitlerinin birikimi
- Metabolize olmayan substratların birikimi
- Reaksiyon ürünü eksikliği veya aşırı üretimi
- Hücresel enerjinin yetersiz üretimi

Ara metabolizma bozukluklarında semptomlar nonspesifik olduğundan, ayırıcı tanı için patofizyolojik mekanizmanın aydınlatılması zordur. Moleküler tanıda, hedef genlere yönelmek için, klinik bulgular ve laboratuvar testleri ile diagnostik yaklaşım belirlenmelidir.

2.2.1.1. Aminoasidopatiler

Tipik olarak sitoplazmadaki aminoasitlerin yıkım yolundaki enzim eksikliklerinden kaynaklanır. Ek olarak, dallı zincirli ketoasit dehidrojenaz (akçaağaç şurubu idrar hastalığı) veya ornitin aminotransferaz (gyrate atrofisi) gibi mitokondrial enzimlerin eksiklikleri de bu gruptandır. Koenzim A (CoA) ile aktive edilen karboksilik asitlerin, mitokondrial metabolizmasını etkileyen organik asidüriler, aminoasidopatilerden ayrı bir grup bozukluk olarak kabul edilir. Klinik bulgular, biriken toksik ara ürünlerin spesifik organ hasarı yapması ile ortaya çıkar. Tanı, plazma aminoasit düzeyi sonrası moleküler testlerle kesinleşir. Tedavide, protein kısıtlı diyet veya hepatorenal tirozinemide olduğu gibi aminoasitin yıkım yolundaki eksik enzimden bir önceki basamağı inhibe ederek toksik ürün oluşumunu önleyen ilaçlar kullanılır.

2.2.1.2. Organik Asidüriler

Birçoğu, amino asit yıkımı sırasında oluşan karboksilik asitlerin CoA ile aktive edilmiş formlarının, mitokondriyal metabolizması için gereken enzimlerin eksikliğinden kaynaklanır. En sık rastlanan organik asitler idrar analizi ile tespit edildiğinden “organik asidemisi” yerine “organik asidüri” terimi de kullanılmaktadır. Bu metabolik yol, açlıkta artmış açıl-CoA esterlerinin üretildiği, farklı tanı ve tedavi zorlukları olan yağ asidi oksidasyonu bozukluklarından ayrı olmasına rağmen, biyokimyasal olarak, organik asidürilerde bozulan bazı reaksiyonlar

mitokondriyal β -oksidasyon döngüsü reaksiyonları olan dehidrojenaz, hidrataz veya ketotiolaza paraleldir. Metabolik asidoz ve ensefalopati gibi klinik özellikler, sadece toksik ürün birikimi değil, mitokondriyal enerji üretimi ve karnitin homeostazının bozulmasından kaynaklanabilir. Tanı, idrar organik asit analizi ve kan açıl-karnitin profili ile konur. Karnitin ve glisin gibi takviyeler tedavide yardımcıdır. Biotin metabolizması bozuklukları da sıklıkla organik asidüriler arasında anılır. Biotin, mitokondriyal karboksilazların kofaktörüdür ve biyotinidaz veya holokarboksilaz sentetaz eksikliği birden fazla, farklı karboksilaz eksikliği hastalıklarına yol açar.

2.2.1.3. Amonyak Detoksifikasyon Bozuklukları

Protein yıkımı ile oluşan yüksek miktardaki azotun amonyak formu nörotoksiktir ve normalde üreye çevrilerek idrarla atılır. Üre siklusu enzim eksikliği veya diğer amonyak metabolizması bozukluklarında, ensefalopati ve hiperamonyemisinin diğer klinik bulguları görülür. Metabolik incelemeler plazma ve idrardaki amino asitlerin analizi yanı sıra idrar orotik asit düzeylerini içermelidir. Tedavide protein kısıtlı diet, esansiyel AA takviyesi, katabolik süreçlerden kaçınma ve benzoat, fenilasetat gibi preparatlar kullanılır.

2.2.1.4. Aminoasit Transport Bozuklukları:

Amino asitlerin bağırsak ve/veya böbrekten emilim eksikliği sonucu ortaya çıkan hastalıklardır (örn. Triptofan eksikliğinde Hartnup hastalığı). Böbrekten geri emilimin azalması ve idrarda çözünmeyen sistin gibi amino asitlerin artması sonucu nefrolitiazis görülebilir. Sistinüri dibazik amino asitlerden sistinin renal tubuler reabsorbsiyon bozukluğu ile karakterize OR bir hastalıktır.

2.2.1.5. Peptit Metabolizması Bozuklukları

Tripeptit glutatyon ve gammaglutamil döngüsü, hücre metabolizmasında, membranlar boyunca amino asit taşınmasından, peroksitlerin detoksifikasyonuna kadar çok sayıda fonksiyona sahiptir. Eksikliği nörolojik ve hematolojik olduğu kadar metabolik sorunlara da neden olur. Tanısal araştırmalar, idrardaki organik asitlerin ve çeşitli vücut sıvılarında glutatyonun analizini içermelidir. Tedavi büyük ölçüde semptomatiktir. Ek olarak bazı

ilaçların kullanımından kaçınılması önemlidir. Nedensel ilişki belirsiz olmasına rağmen, zihinsel geriliği olan hastalarda homokarnozin veya karnozin gibi histidin dipeptidlerinin yıkımında sorun tespit edilmiştir. İdrarın amino asit ve peptit analizi tanıya yardımcıdır.

2.2.1.6. Karbonhidrat Metabolizması ve Transport Bozuklukları

Bu gruptaki bozukluklar nispeten geniş bir klinik bulgu yelpazesi sergiler ve klinik semptomlar, toksisite, enerji eksikliği, hipoglisemi veya glikojen depolama bozukluğu nedeniyle oluşabilir.

- Galaktoz ve fruktoz metabolizması bozuklukları: Galaktoz ve fruktozun sitozolik metabolizmasındaki bozukluklar, patojenik metabolitlerin birikmesi sonucu hastalığa neden olur. Galaktozemi ve fruktozemili çocuklarda, diyetle, sırasıyla laktoz (süt, süt ürünleri) veya fruktoz (meyve, şeker) alımından sonra karaciğer ve/veya böbrekte ciddi hasarlar oluşabilir. Tedavi, galaktoz veya fruktoz alımının engellenmesini gerektirir.

- Glukoneogenez ve glikojen depolanması bozuklukları: Tipik metabolik özellikleri; nispeten kısa açlık dönemlerinden sonra hipoglisemi ve laktik asidemi görülmesidir. Değişken organ disfonksiyonu, en sık da hepatopati görülebilir. Glikojen depolanması, karaciğer büyümesine yol açar. Glikojenoz tip III gibi bazı hastalıklarda, transaminazların (Aspartat Aminotransferaz AST, Alanin aminotransferaz, ALT) ve kreatin fosfokinazın (CK) yüksekliği ile giden klinik miyopati olabilir. Tedavi, hipoglisemiden kaçınmak için sık sık yemek, mısır nişastası takviyesi veya mide tüpü ile sürekli gece beslenmesini içerir.

- Karbonhidrat transfer bozuklukları: Hücre yüzeyinde bulunan farklı glikoz ve diğer karbonhidrat taşıyıcılarının kusurlarında, klinik semptomlar, doku lokalizasyonuna bağlı olarak büyük ölçüde farklılık gösterir. Semptomlar sıklıkla gastrointestinal veya renaldir, ancak kan-beyin bariyeri boyunca glikozun taşınmasında bozukluk olursa merkezi sinir sistemi de etkilenebilir.

2.2.1.7. Yağ Asidi Oksidasyon ve Ketogenez Bozuklukları

Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu, hem tam oksidasyon yoluyla, hem de beyin için alternatif bir enerji kaynağı olan ketonların karaciğerde sentezine kaynak sağlamak yoluyla açlıkta enerji üretiminin devamı için gereken önemli

bir metabolik yoldur. Bu yoldaki bozukluklar tipik olarak açlıkla tetiklenen, komaya veya epileptik nöbetlere yol açan hipoketotik hipoglisemi kliniği ile ortaya çıkar. Ek olarak, bazı bozukluklar toksik metabolitlerin birikmesi sonucu ciddi karaciğer hastalığına ve/veya kardiyomiyopatiye neden olur. Tanıda, akut durumda alınan örneklerden, serbest yağ asitleri, idrar organik asit analizinde keton cisimleri 3-hidroksibutirat ve asetoasetatın yanı sıra açilkarnitin profili de yardımcıdır. Tedavide, açlıktan kaçınmak gerekir. Karnitin takviyesi genellikle gerekmez ve özellikle kardiyomiyopati veya hepatopati varlığında dikkatle dengelenmelidir.

2.2.1.8. Mitokondriyal Hastalıklar

Enerji metabolizması bozuklukları, mitokondriyal hastalıklar olarak anılmasına rağmen, organik asidüri veya yağ asidi oksidasyon bozukluklarında görev alan ve nükleer genom tarafından kodlanan enzimler de mitokondride görev yaptığından, ATP üretiminin birincil veya ikincil nedenlerle bozulmasına neden olan ve moleküler olarak tanımlanan hızla artan sayıda hastalığı içermektedir. Etkilenen proteinler; solunum zinciri komplekslerinin alt birimleri; piruvat dehidrojenaz enzim kompleksi ve Krebs döngüsünde substrat yıkım yollarının son bileşenleri; solunum zinciri komplekslerinin üretimi için en az 24 şaperon; mitokondriyal deoksiribonükleik asit (mtDNA), ribonükleik asit (mtRNA) ve protein sentezi bileşenleri; kofaktör biyosentezinde yer alan çok sayıda protein ve mitokondriyal homeostazın çeşitli diğer bileşenlerini içerir. Mitokondriyal hastalıklar, tipik olarak enerji eksikliği ve oldukça değişken organ disfonksiyonları bulguları ile kendini gösterir. Birçok olguda laktik asidemi ve progresif nörodejeneratif hastalıklar görülür. Araya giren enfeksiyonlar gibi metabolik stres dönemleri, hastalığın kötüleşmesini tetikleyebilir. Metabolik stres dönemlerinde örnek alınmasını gerektirdiğinden tanısal çalışmalarda algoritma belirlemek genellikle zordur. Laboratuvar çalışmaları, sık sık kan laktat düzeyleri, beyin omurilik sıvısı (BOS) laktat düzeyi, plazma amino asitleri analizini (özellikle alanin) ve son yıllarda genomik ve mtDNA'da mutasyon analizini içermelidir. Organ fonksiyonlarının ve laboratuvar görüntülemelerinin tekrar tekrar ve dikkatle incelenmesi önemlidir. Son zamanlarda, tüm ekzom dizileme yöntemi birçok hastada birincil tanısal yaklaşım olarak ortaya

çıkmaktadır. Tedavi seçenekleri sınırlıdır, ancak genellikle riboflavin, koenzim Q veya tiamin gibi çeşitli vitaminleri ve kofaktörleri içerir.

2.2.1.9. Kobalamin ve Folat Metabolizması Bozuklukları

Vitamin yapılı kofaktörlerin genetik olarak tanımlanmış veya besinsel eksiklikleri çeşitli metabolik yolları etkileyebilir ve çok çeşitli klinik semptomlara neden olabilir. Ara metabolizmada özellikle önemli olan, sitozolik metil grubu transferi için gerekli olan kobalamin (B12 vitamini) ve folattır. Folat döngüsü, kobalamin ve metionin-homosistein döngüsünü içeren hücrel metilasyon reaksiyonları, serinden S-adenosil metiyonine metil grup transferini gerektirir. Bu yolaklardaki bozukluklar, metilkobalamin eksikliği, folat döngüsünün bozuklukları, ya da homosisteinin metiyonine remetilasyon eksikliği nedeniyle oluşabilir. Sıklıkla, uygun maddenin takviyesi ile tatmin edici bir şekilde tedavi edilebilirler.

2.2.1.10. Bakır, Manganez, Demir ve Çinko Kullanım ve Transfer Bozuklukları

Bakır metabolizması bozuklukları: Birçok enzim için kofaktör olan bakır, esansiyel bir eser elementtir. Bakır homeostazı, emilimi ve taşınmasındaki bozukluklar, bakır bağımlı enzimlerin aktivitelerindeki bozukluktan ortaya çıkmaktadır. Örneğin, OR Wilson hastalığı, *ATP7B* genindeki mutasyonlarla ortaya çıkan, siroza giden hepatopati ve merkezi sinir sistemi ilişkili semptomlara neden olurken, XLR Menkes hastalığı, *ATP7A* genindeki mutasyonlarla ilişkili, nörolojik bulgular, saç, bağ dokusu ve kemik bulguları olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Tanı, serum, idrar ve karaciğer dokusunda bakır analizini içerir. Wilson hastalığında tedavide bakır yükünü azaltmak amaçlanırken, Menkes' te bakır parenteral olarak ikame edilir. Bakır homeostazı ile ilişkili tanımlanmış bir başka gen *AP1S1*, MEDNIK sendromu'nda (mental retardation, enteropathy, deafness, neuropathy, ichthyosis, keratoderma), fenotip (zihinsel gerilik, enteropati, sağırılık, nöropati, iktiyoz ve keratoderma) hem Wilson hem de Menkes hastalıklarının klinik özelliklerini birleştirir.

Manganez metabolizması bozuklukları: Karaciğer fonksiyonu ve hareket bozukluğu gibi Wilson hastalığı bulgularıyla ortaya çıkan ve mangan taşıyıcı

proteindeki değişiklerden kaynaklanan ve sonuç olarak hipermanganezeminin görüldüğü hastalık grubudur.

Demir metabolizması bozuklukları: Etkilenmiş hastalarda, yetersiz bağırsak emilimi nedeniyle demir eksikliği anemisi veya aşırı demir yükü nedeniyle hemokromatozda olduğu gibi karaciğer fonksiyon bozukluğu görülebilir. Tedavi demirin ikamesi veya uzaklaştırılması şeklindedir.

Çinko metabolizması bozuklukları: Akrodermatit enteropatika, kronik cilt problemleri, alopesi ve merkezi sinir sistemi semptomları ile karakterize SLC39A4 geni ile ilişkili OR nadir bir hastalıktır. Serum çinko seviyesi düşük olduğundan tedavide çinko takviyesi gerekir.

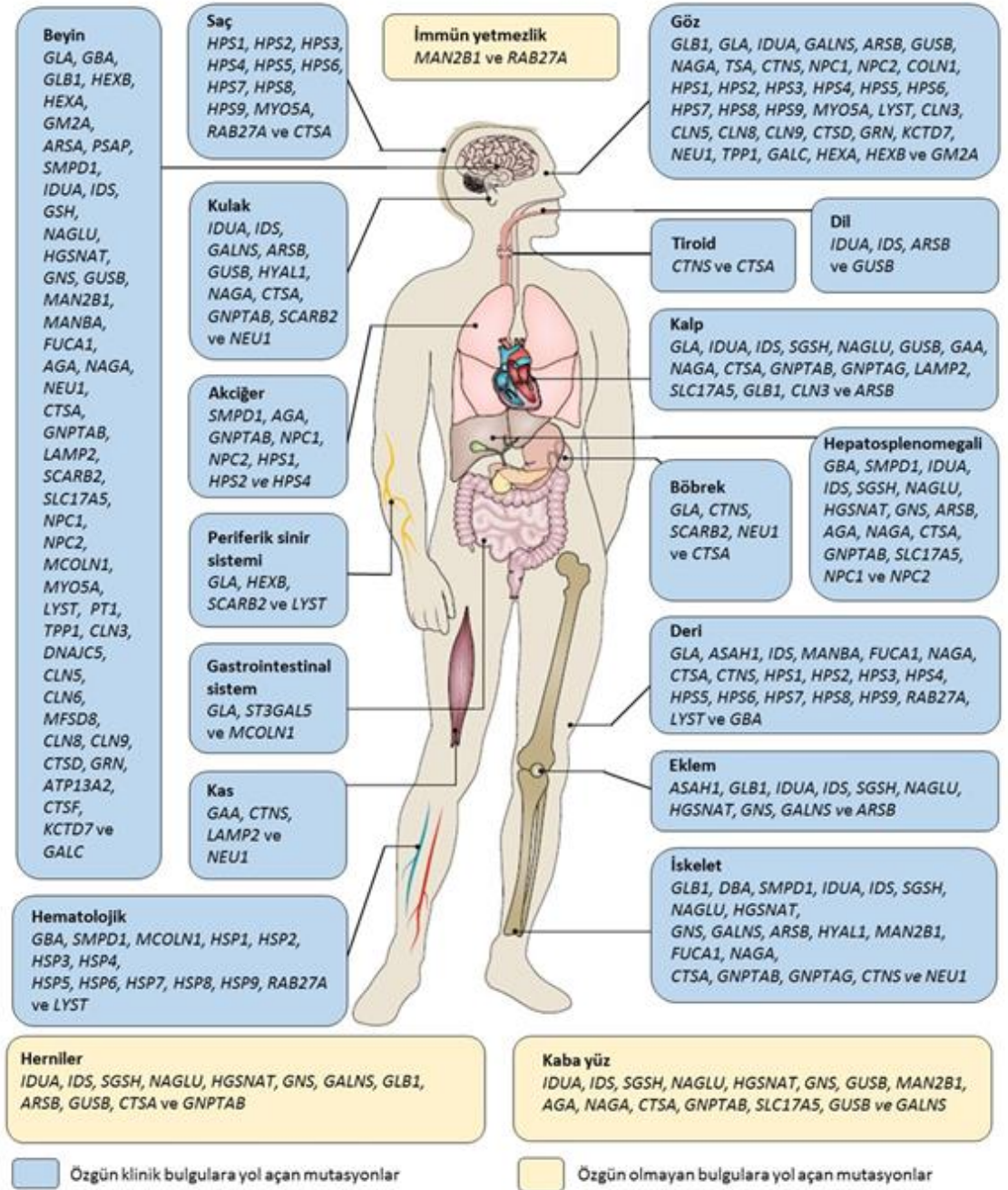
2.2.2. Kompleks Moleküllerin Sentez ve Yıkım Bozuklukları

Bu grup hastalıklar, genellikle birkaç organ sistemini etkiler ve akut metabolik krizlerden ziyade, tipik olarak yavaş ilerleyen klinik semptomlar gösterir. Genellikle temel metabolik analizlerle tanı konulamaz, özel incelemeler gerektirir. Bu sınıfın en büyük ve en önemli grubu olan lizozomal depo hastalıklarının (LDH), oldukça karmaşık olan hücresel patogenezinin aydınlanması, toplumda sık görülen örneğin demans gibi nörodejeneratif durumların patogenezinin ışık tutması bakımından önemlidir. Birçok LDH'nın onaylanmış, çoğunlukla enzim replasmanına dayanan hastalığa özgü tedavileri vardır. Bununla birlikte, küçük molekül tedavileri, substrat indirgeme ve şaperon tedavileri de geliştirilmiştir. Gen terapisi ve genom düzenleme tedavileri ise ileri klinik öncesi aşamalarda ve hatta birkaç hastalık için klinik kullanıma girmiştir (13).

2.2.2.1. Lizozomal Depo Hastalıkları (LDH):

Lizozomlar, hücre içinde mukopolisakkaridler, sfingolipidler, glikoproteinler, trigliserid ve kolesterol esterleri gibi kompleks moleküllerin yıkımını sağlayan hidrolitik enzimleri içeren, hücre içi sindirimden, geri dönüşüm ve sinyalizasyondan sorumlu asidik yapıli organellerdir. Bu enzimlerin eksikliğinde veya hidrolize olmuş moleküllerin hücre dışına taşınmasını sağlayan transport protein kusurlarında, hücre içi birikim ile hücrede genişleme ve işlev bozukluğu meydana gelir (13). Tek tek nadir görülse de, bu hastalıklar

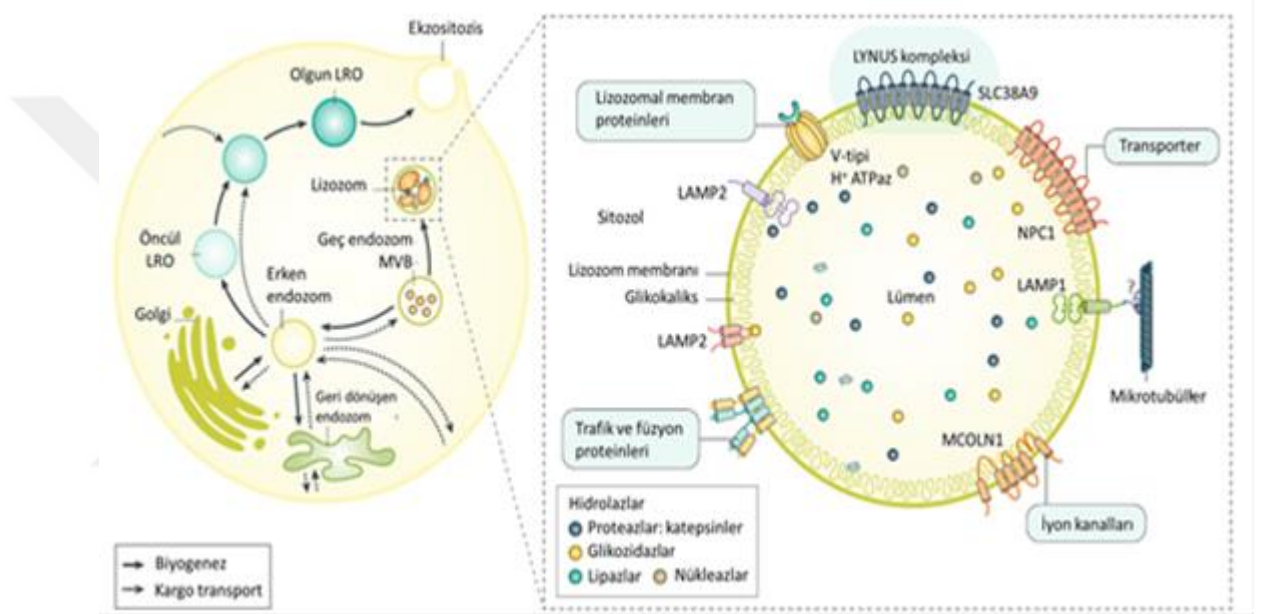
topluca 5.000 canlı doğumdan bir gözlenir. Hücrelerde biriken bileşiklerin kimyasal özelliklerine göre 70'ten fazla LDH bildirilmiştir (14). Bunların üçü X'e bağlı, geri kalanı OR kalıtım özelliğindedir. Lizozomal fonksiyonda yer alan yaklaşık 1.300 genle ilişkili olarak, birçok monogenik hastalık tarif edilmiştir. Bunlar, biyokimyasal tipte depolanan materyale göre (örneğin, sfingolipidozlar, mukopolisakkaridozlar ve glikoproteinozlar), integral membran proteinleri ile ilgili bozukluklar, lizozomla ilişkili organellerin (Lysosome-related organelles, LROs) hastalıkları ve lipofusin1-6 üretimini içeren bozukluklar olarak alt sınıflara ayrılır. LDH'lar genetik ve klinik olarak heterojen gruplardır. Sıklıkla visseromegali (karaciğer ve dalak gibi karın içi organların büyümesi) ve eşlik eden nörodejeneratif hastalıklar olarak görülür. Ancak, spesifik genetik kusur ve depolanan makromoleküllerin biyokimyasal doğasına göre değişen LDH'lar, kemik patolojisine bağlı iskelet deformiteleri ve diğer organ sistemlerini etkileyen semptomlara ek olarak farklı merkezi sinir sistemi bulguları ile ilişkili olabilir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Lizozom ve lizozom ilişkili organel hastalıkları ve ilişkili genler

Lizozomal depo hastalıkları ilişkili genlerdeki patojenik varyantlar spesifik organ tutulumlarına neden olabilir. Birçok LDH'da derin nörolojik tutulumla birlikte çoklu organ sistemlerinin tutulumu sık görülür. Mavi gölgeli kutular belirli organlarla ilgili olanları, sarı gölgeli kutular ise bir organ sistemine özgü olmayan semptomları yansıtır. (Platt, F. M ve ark. *Lysosomal storage diseases*. *Nature Reviews Disease Primers*'den uyarlanmıştır)

Lizozomlar, karbonhidratlar, lipitler, nükleik asitler ve proteinler gibi makromoleküllerin parçalanmasından ve geri dönüşümünden sorumludur ve besin algılamasını, amino asit ve iyon homeostazını ve kalsiyum sinyal yollarını kontrol eden metabolik merkezler olarak işlev görürler (13). Bu organeller sürekli dinamiktir; otofagosomlar, fagosomlar ve plazma membranı ile kaynaşarak, hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks iletişimde, hücre homeostazının korunmasına yanıtta önemli role sahiptirler (Şekil 2-3.)



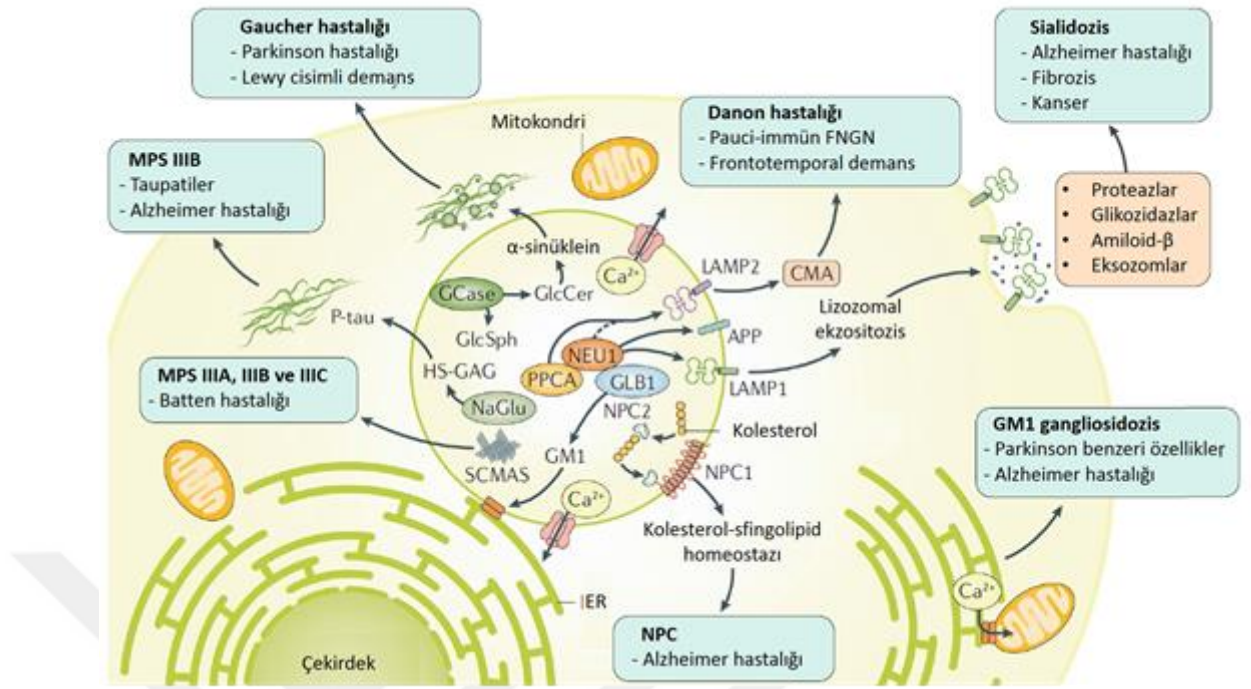
Şekil 2-3: Lizozomal proteinlerin kompleks işlevleri.

Bütünsel oklar organel olgunlaşmasını ve/veya biyogenezi yansıtırken, kesik oklar makromoleküler yükün hareketini temsil eder. (LRO, lizozomla ilgili organel; MVB, multiveziküler gövde) (Platt, F. M ve ark. Lysosomal storage diseases. Nature Reviews Disease Primers'den uyarlanmıştır).

Lizozomal hidrolazların etkisi ile hücrel makromolekülün parçalanması ve geri dönüşümü için, geç endozomlar (hücre dışı maddeler) veya otofagosomlar (hücre içi maddeler) füzyon yoluyla degradasyon amacıyla lizozoma verilir. Bu süreçte, SNARE (çözünür N-etilmaleimid duyarlı faktör aktive edici protein reseptörü) ve Rab proteinleri (trafik ve füzyon proteinleri) aracılık eder. Lizozomlar hücre içinde, dynein, kinesinler ve aktin bazlı motor miyozinler gibi mikrotübüller yoluyla, gerekli kompartmanlara taşınabilirler. NPC1, sodyum

bağlı nötr amino asit taşıyıcı 9 (SLC38A9) ve lizozomla ilişkili membran proteini 2 (LAMP2) gibi taşıyıcılar, lizozom ve sitoplazma arasında substratların taşınmasından sorumludur. NPC1, lipid substratların ve aminlerin taşınmasını kolaylaştırır, SLC38A9 arginin ve LAMP2, sitozolik substratları taşır. Mukolipin1 (MCOLN1) dahil olmak üzere iyon kanalları, lizozomların iyonik ortamını düzenler ve hücre sinyallerine katkıda bulunur. Lizozom membran proteini 2 gibi (LAMP2) lizozomal membran proteinleri, lizozom-plazma membranı birleşimi ve lizozomal enzimlerin, mikrotübüllere bağlanmasında görev yapar.

Özellikle, LDH'nin ortak ikincil metabolik yolları, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, çoğunlukla yaşlanma ile ilişkili diğer sık görülen yetişkin hastalıklarında da gösterilmiştir. Ayrıca, lizozomal enzimlerin ve substratlarının, lizozomal degradasyon veya geri dönüşümün ötesine geçen hücresel yollarda ve düzenleyici ağlarda rolleri olduğu gösterilmiştir. Önemli bazı araştırmalar, nadir pediatrik LDH'lar ile yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı) arasında paralel mekanizmaların keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Bu bulgular, hasta kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücreleri kullanan modeller de dahil olmak üzere patogenezi anlamak ve yeni tedavileri değerlendirmek için kullanılan yeni modellerin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Böylece LDH'lar ile ilgili araştırmalar, hem LDH hem de diğer yaşlılık ilişkili hastalıklarda fayda sağlayabilecek tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Şekil 2-4'te, ayrıntılı patogenetik yolların açıklandığı bazı LDH ve ilişkili hastalıkların örnekleri görülmektedir.



Şekil 2-4: LDH'da hücresel patogenezi örnekleri.

Bu moleküler yollar, yetişkin yaşlanma hastalıklarında da rol alır. Gaucher hastalığına yol açan lizozomal β -glukoserebrosidaz eksikliğinde glukozilseramid birikimi, α -sinükleinin birikimi ile karakterize olan Lewy cisimcikli demans ve Parkinson ile ilişkilidir. α -N-asetilglukozaminidazın eksikliği sonucunda heparan sülfat birikimi (Mukopolisakkaridoz tip IIIB), hiperfosforile tau proteini (P-tau) birikimi ve Alzheimer dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir. (Platt, F. M ve ark. *Lysosomal storage diseases. Nature Reviews Disease Primers*'den uyarlanmıştır).

LDH'da spesifik genetik bozukluğa ve depolanan makromolekülün biyokimyasal doğasına bağlı olarak değişken bir klinik spektrum vardır. Pediatrik dönemde dismorfik özellikler ve organomegalinin eşlik ettiği nörodejeneratif hastalıklar olarak görülse de, kemik patolojileri, boy kısalığı gibi iskelet sistemi hastalıkları veya diğer merkezi sinir sistemi ile ilişkili bulgulara da neden olabilir. Erişkin dönemde en sık görülen Gaucher hastalığı, (β -glukoserebrosidaz eksikliği) splenomegali, kemik iliği tutulumuna bağlı anemi, trombositopeni, nörolojik semptomlar (periferik nöropati, Parkinson hastalığı, vb), kas ve iskelet sistemi bozuklukları, hepatomegali ve siroz gibi birçok belirti ile seyredebilir. LDH'nın ilerleyici klinik seyri, mutasyon tipi ve mutant proteinin rezidüel

aktivitesi ile zayıf korelasyon gösterir. Aynı hastalığın değişik fenotipleri ise moleküler heterojenite ile açıklanmaktadır.

LDH, hastalığın türüne ve klinik semptomların başlama yaşına göre; konjenital veya infantil (genellikle en şiddetli prezentasyona sahip olanlar), geç infantil, çocukluk ve erişkin tip olarak sınıflandırılır. Özellikle daha uzun sağ kalım görülen hafif olgularda, klinik semptomların yaygın hastalıklarla örtüşmesi nedeniyle, tanı gecikir. Tanı araştırmaları, disostoz multipleks için iskelet sisteminin radyolojik muayenesi, hücre içi vakuoller için lökosit ve diğer hücrelerin analizi ve parankimatöz organların değerlendirmesini içerir. İdrarda anormal glikozaminoglikanlar ve oligosakkaritler araştırılabilir. Lizozomal hastalıkların tanısı dokularda, lökositlerde veya fibroblast doku kültürlerinde enzim eksikliğinin belirlenmesi ve/veya moleküler tanı yöntemleri ile yapılabilir. Son zamanlarda, yeni nesil sekanslama, özellikle de tüm ekzom sekanslamasının rutin uygulamaya girmesi tanı süresini kısaltmıştır. Prenatal tanı ve taşıyıcıların belirlenmesi birçok hastalık için mümkündür (15).

Mukopolisakkaridozlar (MPS), lizozomlar içinde spesifik bir enzim eksikliğine bağlı olarak glikozaminoglikan birikimi ile giden bir hastalık grubudur. Tipik olarak ilerleyici dismorfik özellikler, hepatomegali ve psikomotor regresyon ile karakterizedir. Bazı formlarında büyük morfolojik anomaliler olmadan zihinsel gerilik görülürken, bazılarında normal zeka ve şiddetli iskelet sistemi semptomları görülür. MPS tanısı, idrarda glikozaminoglikanların analizi, enzim analizi ve moleküler testler ile mümkündür.

Oligosakkaridozlar MPS'ye benzeyebilir, ancak birçoğu daha ciddi nörolojik semptomlar gösterir ve doğumda daha sık semptomatiktir (nonimmün hidrops). Tanıda idrarda anormal oligosakkarit paternleri gösterilir ve bunu moleküler veya enzim analizleri takip eder.

Sfingolipidozlar ve lipit depolama bozuklukları genellikle progresif nörolojik bozulma ile ortaya çıkar. Hepatomegali olabilir ancak iskelet deformiteleri ve dismorfik özellikler nadirdir. Diğer klinik paternler özellikle Fabry (ağrı ve paresteziler, anjiyokeratomlar, kardiyomiyopati ve böbrek yetmezliği) ve nonnöronopatik Gaucher hastalığında (hematom, anemi, masif splenomegali, abdominal veya kemik ağrıları) gözlenir. Nöronal seroid lipofusinozlar, epilepsi,

görme kaybı ve ilerleyici nörolojik bozulma ile seyreder. Mukolipidozlar, mukopolisakkaridozlar ve sfingolipidozların klinik özelliklerini birleştirir ve sorunlu enzim işlenmesi nedeniyle lizozomal enzimlerin birkaçının eksikliği sonucu ortaya çıkar.

Lizozomal transport kusurları: Sistinozis nefropatiye, göz ve tiroid bezi gibi pek çok organda işlev bozukluğuna neden olur. Lökosit sistin içeriği artmıştır. Sialik asit depo hastalığı, ilerleyici ensefalonöropatiye neden olur; idrarda artmış serbest siyalik asit düzeyi ile tanınır. Bu hastalıkların her ikisi de lizozom dışına transport bozukluklarıdır. Sistinozis, oral sisteamin, göz damlaları ve böbrek transplantasyonu ile tedavi edilir.

2.2.2.2. Pürin ve Pirimidin Metabolizması Bozuklukları:

Biyosentez veya yıkım için gerekli enzimlerdeki eksiklikler, nöromüsküler bozukluklar, nefrolitiazis, gut artriti, anemi ve immün sistem fonksiyon bozukluğu gibi durumlara neden olur. İdrar üre düzeyinin artması veya azalması, kreatinin ve idrar mikroskopisi gibi rutin testler veya idrar pürin ve pirimidinlerinin analizi tanıda yardımcıdır. Bazı pirimidin metabolitleri sadece idrar organik asit analizi ile tanınabilir. Nefrolitiazis, allopurinol ile önlenabilir veya tedavi edilebilir. Bazı pirimidin metabolizma bozuklukları özellikle orotik asidüri ve 5' nükleotidaz aşırı aktivitesine bağlı nükleotid tükenmesi sendromu, üridin veya triasetilüridin ile tedavi edilebilir. Pürin metabolizması bozukluklarında görülen nörolojik belirtilerin çoğu için etkili bir tedavi yoktur.

2.2.2.3. Peroksizomal Hastalıklar:

Peroksizomların yaygın biyokimyasal görevleri bulunur. Bu nedenle peroksizomal bozukluklar genellikle şiddetli, ilerleyici multisistemik bozukluklardır. Peroksizom biyogenezinin veya uzun zincirli yağ asitlerinin β – oksidasyon bozukluğu sonucu ilerleyici nörolojik hasar, Zellweger sendromu'nda olduğu gibi yapısal anomaliler ve karaciğer, bağırsak veya adrenal fonksiyon bozuklukları ile birlikte görülür. Tanı genellikle kanda veya fibroblast kültüründe çok uzun zincirli yağ asitleri analizi ile konur. Etkili bir tedavisi yoktur. Refsum Hastalığı, ekzojen fitanik asit metabolizma bozukluğudur. Yavaş ilerleyen nörolojik hasar, görme ve işitmede bozulmaya

neden olur ve genellikle yetişkinliğe kadar anlaşılmaz. Tanı, serum fitanik asit analizi ile konur ve fitanik asit kısıtlı bir diyetle tedavi edilebilir.

Eter-fosfolipid biyosentezinin kusurları rizomelik kondrodisplazi punktata'ya neden olur ve nörolojik bulgulara ek olarak ekstremitelerde proksimal kısalık ile karakterizedir. Eritrositlerde plazmalojen analizi yapılır ancak etkin bir tedavisi yoktur. Katalaz eksikliği, oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda bilinen tek enzim bozukluğudur. Oral mukozada kronik ülserlere neden olur.

Primer hiperoksalüri tip I nefrolitiazis ve nefrokalsinoza neden olan, gliksilat metabolizmasının bilinen tek bozukluğudur. Organik asit analizi veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile idrar oksalat ve gliksilat analizi ile tanı konur. Karaciğer ve böbrek nakli ile tedavi edilebilir.

2.2.2.4. İzoprenoidler ve Sterollerin Metabolizma Bozuklukları:

İzoprenoidler ve steroller birçok hücresel ve gelişimsel süreç için gereklidir. Asetil CoA 'dan kolesterol sentezinin gerçekleştiği metabolik yolaktaki enzim eksikliklerinden kaynaklanır. Sentez bozukluklarına neden olan pek çok enzim eksikliği, skualen basamağından sonradır. Skualen sentez basamağından önce sadece mevalonat kinaz eksikliğine bağlı mevalonik asidüri ve hiperimmünglobulinemi D sendromu görülür. Sterol biyosentez bozuklukları Smith – Lemli – Opitz sendromu gibi dismorfik yapısal özellikler ve zihinsel yetmezliğe neden olur.

2.2.2.5. Safra Asidi ve Bilirubin Metabolizması Bozuklukları, Kalıtsal Kolestaz ve Porfiryalar:

Safra asidi biyosentezinin genetik bozuklukları, safra asidi eksikliği veya öncül maddelerin birikimine neden olur. Progresif kolestaz, malabsorpsiyon, nörolojik disfonksiyon ve ksantomlar görülür. Safra asidinin biyosentetik yolu kısmen peroksizomlarda bulunduğundan, peroksizomal hastalıklardan etkilenir. Tanı, idrar safra asitleri analizini içerir ve tedavide safra asitleri etkilidir. Hem bilirubine metabolize olarak idrarda safra asitleri ile birlikte atılır. Spesifik enzim eksikliği veya safra kanallarına transport mekanizmalarını etkileyen genetik kusurlar direkt veya indirekt hiperbilirubinemiye neden olurlar. Bazı hastalıklar için özel tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Porfiryalar, hem biyosentez kusurlarıdır

ve sıklıkla OD olarak kalıtılırlar. Sentezin ilk birkaç basamağını etkileyen enzim eksikliklerinde nörotoksik metabolitler birikir ve tipik olarak aralıklı akut karın ağrısı gibi semptomlar çeşitli faktörlerle tetiklenir. Metabolik yolağın daha distalindeki enzim eksikliklerinde ise biriken porfirinler fotosensitivite ve dermatolojik bulgularla ilişkilidir. Tanı idrar, dışkı veya eritrositlerde porfirin ve porfirin öncülerinin analizini içerir. Hastalığın yönetimi biriken faktörlerden kaçınmaktır.

2.2.2.6. Posttranslasyonel Protein Modifikasyonu Bozuklukları:

Enzimler, transport ve membran proteinleri, hormonlar da dahil olmak üzere çoğu protein, işlevlerini yapabilmek için Golgi veya endoplazmatik retikulumda (ER) glikozilasyon veya diğer posttranslasyonel modifikasyonlara uğrar. Konjenital glikozilasyon bozuklukları (Congenital disorders of glycosylation, CDG), glikozilasyona katılan 40 farklı enzimden birinin eksikliği sonucu oluşur. Çok çeşitli yapısal anomalilere ve fizyolojik fonksiyon bozukluklarına yol açar. Tanısı belirsiz multisistemik veya nörolojik tutulumu olan tüm hastalarda CDG grubundaki bozukluklardan biri göz önünde tutulmalıdır. Glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı proteinlerin ER ve Golgi'de yeniden düzenlenmesinin bozulmasıyla ilgili hastalıklar, dismorfizm de dahil olmak üzere, iskelet sistemi anomalileri, ciddi nörolojik semptomlar, epilepsi ve zihinsel yetmezlik gibi bir dizi klinik özelliğe sahip multisistemik bozukluklardır. Bu yoldaki bozuklukların tanısı çoğunlukla tüm ekzom dizileme yoluyla çözülür. Bazıları için serumda alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi düşüklüğü veya yüksekliği yararlı bir işaret olabilir.

2.2.2.7. Lipoprotein Metabolizması Bozuklukları:

Lipoprotein metabolizmasının birçok bozukluğu, dokularda lipit birikimi ve erken ateroskleroz ile ilgili klinik semptomlara, ek olarak gastrointestinal veya periferik nörolojik bulgulara neden olur. Serum trigliserit ve lipoprotein elektroforezi yoluyla tanı konur, diyet ve ilaç tedavisine başlanır. Hiperkolesterolemide ve miks hiperlipidemilerde ksantom şeklinde lipit birikmesi ve ksantelazma oluşur, erken ateroskleroz, miyokard enfarktüsü ve serebrovasküler hastalık gibi komplikasyonlar görülür. Terapötik seçenekler arasında diyet, ilaçlar ve özellikle lipit aferezi bulunur. Şilomikronlar ve çok

düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) kullanımını etkileyen genetik bozukluklar hipertrigliseridemiye neden olarak karın ağrısı semptomları ve bazen şiddetli pankreatit nedeni olabilir. Diyetle yağ sıkı bir şekilde kısıtlanmalıdır. Yüksek yoğunluklu lipoproteinleri (HDL) etkileyen genetik bozukluklar prematüre ateroskleroz, nöropati, nefropati ve kornea bulanıklığı gibi klinik belirtilere neden olur. Tedavi semptomatiktir.

2.2.3. Nörotransmitter Bozuklukları ve İlişkili Hastalıklar:

Nörolojik semptomlar, KMH' in en yaygın özelliğidir ve ilk semptomu genellikle gelişim geriliği olmak üzere epilepsi, hareket bozuklukları, nörobilişsel bozukluklar, davranışsal ve psikiyatrik bozukluklar gibi nörolojik disfonksiyonların varlığında nörometabolik hastalıklardan söz edilir. Nörometabolik hastalıklar KMH'ın tanı koyulması en zor grubunu oluşturur (16). Nispeten yeni tanımlanmış olan bu hastalık grubuna geçmeden önce, sinir sistemini yapısal ve fonksiyonel olarak hatırlamak gerekir. Yapısal olarak, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki bileşeni vardır. Merkezi sinir sistemi beyin, beyin sapı, beyincik ve omurilikten, periferik sinir sistemi ise gangliyonlar (nöron kümeleri) ve periferik sinirlerden oluşur. İşlevsel olarak ise, sinir sistemi somatik (veya istemli) ve otonomik (veya istemsiz) olarak ayrılabilir. Somatik sinir sistemi, beyni ve omuriliği kaslara ve duyu reseptörlerine bağlayan sinirlerden oluşur istemli motor fonksiyonlardan sorumludur. Otonom sinir sistemi ise, kalp hızı, solunum hızı, sindirim, pupiller yanıt, idrara çıkma ve cinsel uyarılma gibi bilinçsiz çalışan bazı bedensel işlevleri düzenleyen bir kontrol sistemidir. Sempatik sistem (strese cevap olarak savaş ya da kaç tepkisinin kontrolü), parasempatik sistem (istirahatte homeostatik fonksiyonların kontrolü) ve gastrointestinal işlevlerle ilgili enterik sistem olarak üç otonom sistem vardır. Otonom sistemin, uyku, termo regülasyon, öğrenme, bellek, duygusal davranış gibi diğer fonksiyonları önemlidir. Sinir sisteminin karmaşık fonksiyonları nöronlar ve glial hücrelerle sağlanır ve sinir sisteminin %10'dan daha az hücresi nörondur. Glial hücreler ise astrositler, oligodendrositler, mikrogliyalardan oluşur. Nöronlar sinir impulslarını ileten tek bir akson ve diğer nöronlardan implusu alan çok sayıda dendrite sahiptir. Nöron gövdesi ve dentritler gri maddeyi, myelin kılıfına sahip

aksonlar ise akmaddeyi oluşturur. Miyelin, nöron aksonlarının yalıtımını sağlar. Beyinde oligodendrositler tarafından yapılan miyelin, periferik sinirde Schwann hücrelerinde yapılır. Aynı moleküllerin MSS ve PSS işlev farklılıkları hastalıklarının da ayırımına neden olmaktadır: Örneğin MSS'de demiyelinizasyon multiple skleroza, PSS'de demiyelinizasyon Guillain-Barre Sendromu'na yol açar. Nöronlar, sinapslar yoluyla bağlantı kurarlar. Sağlıklı bir yetişkin beyinde, yaklaşık 100 milyar nöron ve yaklaşık 100 trilyon sinaps bulunur. Sinapslarda impuls iletimi elektriksel ya da kimyasal yolla olur. Elektriksel sinaps, beyin sapı, retina ve serebral kortekste vardır, impuls iletimi çok daha hızlıdır. Kimyasal sinapslar daha sık rastlanan sinaps tipidir ve impuls iletimi nörotransmitter aracılığıyla olur. Sinyallerin beynin nöronal ağları arasında hızla ilerlemesine izin vererek, anılar, düşünceler, duyumlar, duygular, hareketler ve becerilerin hücresel temelini oluştururlar.

Nörotransmitter olarak isimlendirilen kimyasal uyarılar, sinaptik boşluğa yani iki nöron arasına doğru salınırlar. Somatik periferik sinirlerin uyarıcı nörotransmitteri, asetil kolindir (Ach) ve etkilediği membranın sodyuma karşı geçirgenliğini artırır. Ach aynı zamanda otonom sinir sisteminin parasempatik bölümünün pregangliyonik ve postgangliyonik uçlarının nörotransmitteridir. Bu nedenle otonom sinir sisteminin bu bölümü bazen kolinerjik sistem olarak tanımlanır. Sempatik bölümün pregangliyonik uç transmitteri de Ach, postganglionik ise genellikle noradrenalin (norepinefrin) ve sempatik bölüm sık sık adrenerjik sistem olarak tanımlanır. Nörotransmitterler, merkezi veya periferik sinir sisteminde sinaptik iletimde yer alan farklı kimyasal madde sınıflarına aittir. Kimyasal yapılarına göre, üç gruba ayrılabilirler: (1) Amino asit nörotransmitterleri (glisin, glutamat, γ -aminobutirik asit (GABA), monoaminler / biyojenik aminler (dopamin, serotonin, norepinefrin, epinefrin)), (2) nöropeptitler (oksitosin, vazopressin) ve (3) atipik nörotransmitterler (nörotrofik faktörler, sitokinler, karbon monoksit (CO), nitrik oksit (NO), adenosin, adenosin trifosfat (ATP), endojen kanabinoidler ve opioidler). Monoamin nörotransmitter biyosentezindeki veya yıkımındaki kalıtsal kusurlar nadir nörometabolik hastalıklara neden olur. Genel olarak, primer monoamin nörotransmitter eksiklikleri beş farklı sınıfa ayrılabilir: (1) monoamin biyosentezi, (2) monoamin katabolizması, (3) monoamin taşınması, (4) tetrahidrobiopterin (BH₄)

biyosentezi veya geri dönüşümü bozukluğu ve (5) şaperon ilişkili kusurlardır. Serotonin veya 5-hidroksitriptamin kimyasal olarak indolamin grubuna aittir ve triptofan hidroksilaz ile triptofandan üretilir. Kimyasal olarak pterinler, 2-amino-4-okso yapıları içeren pteridinlerdir. BH4 ve riboflavin dahil olmak üzere vitamin ve kofaktörlerin biyosentezi için gereklidir. İki grup pterin vardır: (1) pterin kısmına bağlı glutamat veya p-aminobenzoat içeren konjüge pterinler ve (2) pterin halkasının 6- ve/veya 7- konumunda alifatik yan zincir olan ankonjüge pterinler. BH4, omurgalılarda bulunan majör ankonjüge pterindir ve fenilalanin hidroksilaz (PAH), tirozin hidroksilaz ve triptofan hidroksilazlar, alkilgliserol monoksigenaz ve nitrik oksit sentazlar için önemli bir kofaktördür. BH4'ün *de novo* biyosentezinde üç farklı enzim görev alır; GTP siklohidrolaz, 6-piruvil tetrahydrobiopterin sentaz ve sepiapterin redüktaz.

Konjenital nörotransmitter bozuklukları, çoğunlukla erken başlangıçlı şiddetli ve ilerleyici ensefalopatilerin önemli nedenlerindendir. Nonketotik hiperglisinemi, glutamat transport defektleri, veya GABA-transaminaz eksikliği genellikle erken başlangıçlı ve tedaviye dirençli nöbetler ile seyrederek ancak piridoksin metabolizmasında etkin geliştirilen rasyonel terapiler ile tatmin edici sonuçlar alınmıştır (17).

2.2.3.1. Glisin ve Serin Metabolizması Bozuklukları:

Nonketotik hiperglisemi, erken başlangıçlı epileptik ensefalopatinin en iyi bilinen nedenlerindendir. Eşzamanlı plazma ve beyin omurilik sıvısının (BOS) amino asit analizinde, glisin seviyeleri yüksektir ve BOS-plazma oranı artmıştır. Dekstrometorfan, benzoat ve folat tedavisinin başarısı sınırlıdır. Serin biyosentezi bozuklukları nörolojik semptomlara neden olur ve tedavide serin ve glisin takviyesi yapılır.

2.2.3.2. Pterin ve Biyojenik Aminlerin Metabolizma Bozuklukları:

Biyojen aminler canlı hücrelerde aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile oluşan azotlu organik bileşiklerdir. Etkilenen çocuklarda ilerleyici gelişim geriliği ve epileptik ensefalopati görülür. İnfantil parkinsonizm gibi spesifik dopamin ve/veya serotonin eksikliği belirtileri olabilir. Dopa duyarlı distoni, okulojirik krizler veya bozulmuş vücut ısı ayarı görülebilir. Bu hastalıklar bazen hiperfenilalaninemi

olarak tanınır ama çoğunlukla sadece BOS'ta pterinler ve biyojenik aminlerin analizi ile tanı konur.

Tetrahidrobiopterin biyosentez ve geri dönüşüm bozuklukları fenilalaninin hidroksilasyonunu etkiler ve atipik veya malign fenilketonüri olarak adlandırılır. Tirozin ve triptofanın hidroksilasyonları da etkilendiğinden dopamin ve serotonin eksikliğine de neden olur. Tanısal testler, BOS'ta biyojenik aminlerin, pterinlerin ve amino asitlerin yanı sıra plazmadaki amino asitlerin ve idrardaki pterinlerin analizini içerir. Bu hastalıklar, karbidopa ve 5-hidroksitriptofan ve/veya tetrahidrobiopterin ile birlikte L-dopa ikamesi ile tedavi edilir.

Biojenik aminlerin biyosentez bozuklukları, ilerleyici ekstrapiramidal semptomlar ve ensefalopati benzeri tablo ile ortaya çıkar. Biojenik aminlerin eksikliği, L-dopa ile birlikte karbidopa ve 5-hidroksitriptofan ve/veya dopamin agonistleri ile tedavi edilir.

Monoamin transport bozuklukları, nörotransmitter bozukluklarına yol açar. Dopamin transporter eksikliği sendromu (#613135) ve veziküler monoamin transporter 2 eksikliği (#618049), OR kalıtlı ve erken başlangıçlı kore/diskinezi, orolingual diskinezi, distoni, okülojirik kriz ile çocuklukta parkinsonizm-distoniye ilerleyen hareket bozuklukları ile sonuçlanır.

2.2.3.3. Gama-aminobütirat (GABA) Metabolizması Bozuklukları:

GABA metabolizması bozuklukları, 4-aminobütirat aminotransferaz eksiklikleri bulunur. Genellikle epileptik nöbetler ve ensefalopati dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi fonksiyon bozukluğuna neden olur. Tanıda BOS'ta amino asitlerin ve GABA'nın ve idrar organik asit analizinde, süksinat semialdehid dehidrojenaz eksikliğini gösteren 4-hidroksibütirik asit yardımcıdır.

2.2.3.4. B6 Vitamini Metabolizması Bozuklukları:

Piridoksal fosfat (Pyridoxal phosphate PLP, B6 vitamini), amino asitlerin tüm transaminasyon reaksiyonlarının, bazı dekarboksilasyon ve deaminasyon reaksiyonlarının kofaktörüdür. Ayrıca dopamin ve GABA dahil olmak üzere çeşitli nörotransmitterlerin biyosentezi için de gereklidir. Hücre içi eksikliğine, primer veya sekonder biyosentez kusurları neden olabilir ve yenidoğanda antiepileptiklere dirençli epileptik ensefalopatiye yol açar. Vitamin B6 bağımlı

nöbetlerden iyi bilineni, farklı bir yolaktaki bir enzim eksikliği nedeniyle biriken delta 1-piperidin-6-karboksilat ile inaktive olmasından kaynaklanır. B6 vitamini metabolizması bozukluklarına bağlı nöbetler genellikle piridoksin veya PLP ile tedavi edilebilir.

2.2.3.5. Nörometabolik Bozukluklar:

Kreatin Biosentez veya Transport bozuklukları: Sitozolik enerji metabolizmasının merkezindeki bileşik olan kreatin, başlıca karaciğer ve böbrekte arginin, glisin ve metiyonin amino asitlerinden sentezlenir. Endojen yoldan üretilen veya diyetle alınarak sindirim kanalından emilen kreatin, iskelet kası, kalp, beyin retina gibi dokulara taşınır ve plazmadan hücre içine özel taşıyıcıları ile girebilir. Hücre içinde CK ile fosforillenerek fosfokreatin olarak enerji deposuna dönüşür. Kreatin kinaz kaslarda ve beyinde hem sitozolde hem de mitokondride bulunur. Kreatin/fosfokreatin/CK sistemi aynı zamanda yüksek enerji ihtiyacında, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun devam etmesine de katkı sağlar. Kreatin taşıyıcı moleküllerinin eksikliği SLC6A8 geninde mutasyonlarla oluşan XLR bir hastalıktır (Cerebral creatine deficiency syndrome 1, MIM#300352) (18). Mental gerilik, ağır konuşma gecikmesi, davranışsal anomaliler ve nöbetler ile prezente olur. Bu hastalarda hücre içine alım bozulduğundan ağızdan kreatin desteği ile özellikle beyin ile ilişkin semptomlarda bir düzelme sağlanamaz. Arginin-glisin amidinotransferaz ve guanidino asetat N-metiltransferaz enzimleri kreatin sentezinde anahtar basamakları katalizler. Bu enzimlerin eksikliklerinde kreatin taşıyıcıları normal olduğu için ağızdan kreatin desteğinin semptomlarda belirgin düzelme sağladığı bildirilmektedir (19). Tanı, vücut sıvılarında kreatin ve guanidinoasetat analizi veya nükleer manyetik rezonans (NMR) konur. Kreatinin, enerji metabolizmasında fosfokreatin sağlamanın yanı sıra hücre koruyucu etkileri de araştırılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile kreatin ilişkisi, Parkinson, Huntington hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Alzheimer gibi hastalıklarda çalışılmaktadır. (20).

Folat Yolağı ve Transport Bozuklukları: Dihidrofolat redüktaz eksikliği (MIM# 613839), megaloblastik anemi, ciddi gelişme geriliği ve erken başlangıçlı epileptik nöbetler gibi değişken nörolojik semptomlar ile karakterize otozomal

resesif metabolik bir hastalıktır (21). Serebral folat transport eksikliğine bağlı nörodejenerasyon (MIM# 613068) ciddi gelişme geriliği, hareket bozuklukları, epilepsi ve lökodistrofi ile kendini gösterir. Folinik asit tedavisi beyin fonksiyonlarını iyileştirip klinik semptomları tersine çevirebileceğinden, bu bozukluğun tanınması ve tanısı önemlidir. İki hastalıkta da serum folat ve plazma homosistein konsantrasyonları normal aralıktadır. Ancak, BOS'ta 5-metil-tetrahidrofolat düzeyinde belirgin bir azalma olduğundan BOS nörotransmitter analizine folat mutlaka dahil edilmelidir.

Sülfat oksidaz eksikliği: Yenidoğan döneminde tedaviye dirençli infantil nöbetler ve ensefalopati ile karakterize izole sülfat oksidaz ve molibden kofaktör eksikliklerinde, metabolik blok nedeniyle sülfat, sülfata dönüşemediği için idrarda artmıştır ve bir dipstik test olan idrar sülfat testi ile tanınır. Spesifik tedavisi yoktur.

Canavan hastalığı ve serebral organik asidüriler: L-2-, D-2- ve D-/L-2-hidroksiglutarik asidüriler; 2-ketoglutarik asidüri; fumarik asidüri ve malonik asidüri, genellikle progresif olan merkezi sinir sistemi disfonksiyonuna neden olur. Genel metabolik testlerde anormallik yoktur, ancak idrarın organik asit analizinde spesifik metabolitler saptanabilir. Bu hastalıkların moleküler kökeninin aydınlatılması, fenotipik spektrumunun belirlenmesi ve tedavi seçeneklerinin artırılması konusunda son yıllarda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Erken tanı ve müdahale, nörolojik bulguların ilerlemesinin durdurulabilmesi nedeniyle çok önemlidir.

2.2.4. KMH için Önerilen Yeni Nozoloji

Genetik tanı testlerinin hızla arttığı “klinik genom uygulamaları” çağında KMH artık sadece klasik biyokimyasal laboratuvar yöntemleriyle ölçülebilir anormalliklerle, spesifik bir yolak içindeki moleküllerin sentezi veya yıkımında yer alan monogenik durumlar olarak değerlendirilemez. Biyokimyasal yolaktaki bozukluğun, hastalık patofizyolojisine özgün olduğu her durumu içerecek şekilde tanımlanmalıdır. Bir hastalık grubunun sınıflandırılması yani, nozolojisinin ortaya konmasıyla, tanısal araştırmalar ve tedavisi için bir çerçeve sunulmuş olur. Klinik ve biyokimyasal fenotiple ilişkili tanımlanan gende mutasyon bulunamadığı durumlarda, TED veya TGD ile saptanan yeni

varyantlar veya array testleriyle saptanan büyük delesyon ve duplikasyonlar, hastalıkla ilişkili farklı gen ve yolları ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, KMH'nın, ilişki düzeyini koruyarak içeriğini sürekli güncellemek üzere, moleküler etiyolojilerine göre gruplandırılmış yeni bir sınıflama önerilmiş ve Doğuştan Metabolizma Hastalıkları Bilgi Bankası'nda (*IEMbase: Inborn Errors of Metabolism Knowledgebase*) (<http://www.iembase.org/index.asp>) yer almıştır (22). Bu sınıflamada, biyokimyasal laboratuvar testlerindeki anormalliklerle ilişkili olup olmadığına bakılmaksızın, KMH metabolik bir yolağın bozulmasına yol açan herhangi bir durum olarak yeniden tanımlanmış ve bu tanım temel alınmıştır. Böylelikle, primer enzim ya da taşıyıcı eksiklikleri veya süper-aktiviteleri yanı sıra örneğin, hiperfenilalaninemi ile ortaya çıkan ve yeni tanımlanan *DNAJC12* geni ilişkili şaperon eksiklikleri de dahil edilmiştir. Hiperfenilalaninemili (*hyperphenylalaninemia*, HPA) hastalar yeni doğan fenilketonüri (*phenylketonuria*, PKU) taraması ile tespit edilir. HPA'nın PAH veya kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH4) eksikliklerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Ancak, HPA'ın ayırıcı tanısı için mevcut yönergeler yeni tarif edilen *DNAJC12* eksikliğini içermeyebilir. Ko-şaperon *DNAJC12*, PAH'ın düzgün katlanmasından sorumlu protein HSP70 ile birlikte çalışır. Bugüne kadar tanımlanan *DNAJC12* eksikliği olan tüm hastalarda, BH4 yükleme testine kan fenilalanin düzeyleri düşmüş, düşük seviyelerde olan BOS biyojenik aminleri, BH4, L-dopa/karbidopa ve 5-hidroksitriptofan ile tedaviye yanıt vermiştir (23). Fenotipik spektrum, hafif otistik özellikler veya hiperaktiviteden ciddi mental gerilik, distoni ve parkinsonizme kadar değişebilir. Geç tanı, kalıcı nörolojik hasara yol açarken, erken teşhis ile tedavi edilen hastalar normal gelişim göstermektedir. Bu nedenle PAH ve BH4 eksikliklerinin genetik olarak dışlandığı tüm hastalarda *DNAJC12* gen varyantlarının moleküler analizi gereklidir.

Bir diğer örnek, XLR kalıtılan transkripsiyonel ko-regulatör *HCFC1* (host cell factor C1) genindeki mutasyonların neden olduğu kobalamin metabolizması bozukluğudur. Gen ürünü HCF-1, DNA'nın belirli bölgelerine bağlanan ve belirli genlerin aktivitesini kontrol etmeye yardımcı olan transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer. HCF-1 proteininin spesifik bir fonksiyonu da, B12 vitamininin özellikle *MMACHC* (metabolism of cobalamin associated C) geninin düzenlenmesinde rol oynayan genlerin aktivitesini kontrol etmektir. B12 vitamini

insanlar için hayati önemi olan bir koenzimdir. *MMACHC* geni, B12 vitaminini, adenzilkobalamin (AdoCbl) veya metilkobalamin (MeCbl) olmak üzere iki molekülden birine dönüştürmeye yardımcı olan bir protein kodlar. AdoCbl, metilmalonil CoA mutaz olarak bilinen bir enzimin normal fonksiyonu için gereklidir (kofaktör) ki bu enzim, belirli proteinleri (amino asitler), yağları (lipitler) ve kolesterolü parçalamaya yardımcı olur. MeCbl ise metiyonin sentaz olarak bilinen bir enzim için kofaktördür. Bu enzim bir amino asit olan homosisteini başka bir amino asit olan metiyonine dönüştürür. Metiyonin, pek çok protein ve diğer önemli bileşiklerin yapısında kullanılır. Kobalamin metabolizmasındaki genetik bozukluklar, kan ve idrarda metilmalonik asit ve/veya homosistein birikimi ile karakterizedir. En sık görülen kobalamin metabolizması bozukluğu, kombine metilmalonik asidemi ve hiperhomosisteinemi CblC tipi, *MMACHC* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (24). Metilmalonik asidüri ve CblC tipi homosistinüri, B12 vitamini metabolizmasının en yaygın kalıtsal hastalığıdır (25). Etkilenmiş bireylerde gelişimsel, hematolojik, nörolojik, metabolik, oftalmolojik ve dermatolojik klinik bulgular gözlenir. Bebeklik veya çocukluk hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen, bazı bireyler yetişkinlikte semptom verir. Bununla birlikte, hücresel ve biyokimyasal analize dayalı tanımlanan bazı bireylerin *MMACHC* geninde mutasyon yoktur. Ekzom sekanslama ile global bir transkripsiyonel ko-regülatör olan *HCFC1* geninde bulunan missense mutasyon ile CblX tipi olarak adlandırılan kombine metilmalonikasidemi ve hiperhomosisteinemi olan X'e bağlı bir form tanımlanmıştır (26).

Önerilen yeni nozolojide, hastalık şiddetinden bağımsız olarak her bir enzim eksikliği için tekil tanımla, örneğin, Gaucher hastalığı tip 1, 2 ve 3 gibi çoklu tanımlama yerine tek bir giriş bulunmaktadır. Çünkü bu farklı tipler büyük ölçüde enzim eksikliğinin şiddetine dayalıdır ve farklı bir patofizyolojiye bağlı değildir. Benzer şekilde, lizozomal asit lipaz eksikliği için de tek bir tanım bulunmaktadır, Wolman hastalığı ve kolesterol ester depo hastalığı için iki ayrı giriş yerine alternatif bir isimlendirme farklı bir sütunda verilmektedir. Öte yandan, aynı enzim eksikliğine bağlı olup, hastalık şiddetiyle ilişkili olmayan, açıkça tanımlanmış farklı fenotiplerin olması durumunda iki ayrı giriş olarak kabul edilmiştir. Örneğin, GM1 gangliosidoz ve Morquio sendromu tip B'nin her ikisi de B-galaktozidaz eksikliğinden kaynaklanır, ancak fenotip bariz farklıdır.

Benzer şekilde, asit seramidaz eksikliği, Farber hastalığına (değişken şiddette), aynı zamanda progresif miyoklonik epilepsi ile birlikte görülen farklı bir spinal müsküler atrofi fenotipine yol açabilir ve enzim aktivitesinin derecesi ile fenotipik tablo arasında bilinen bir korelasyon yoktur. *ATP7A* geni ile ilişkili distal motor nöropati durumunda, klinik ve metabolik bulgular Menkes hastalığı veya oksipital horn sendromu ile tamamen ilgisizdir ve gerçekten de nöropati fenotipi, ayrı bir patomekanizmaya yol açan farklı varyantlardan kaynaklanır. Bu gibi durumlarda, aynı proteindeki farklı kusurlar için ayrı girişler oluşturulmuştur. Hem OR hem de OD kalıtımın görüldüğü, MCT1 eksikliği, SCOT eksikliği, 5-oksoprolinaz eksikliği, ISCU eksikliği veya kalıtsal hiperpleksi tip 1'de olduğu gibi benzer bir hastalık mekanizmasını paylaştıkları sürece aynı girişe dahil edilmiştir. Bununla birlikte, bazı hastalıklarda, farklı kalıtım paterni tamamen farklı bir fenotip ile ilişkilidir; örneğin, süksinat dehidrogenazın alt birimlerini kodlayan genlerdeki biallelik varyantlar bir lökodistrofiye neden olurken, aynı genlerdeki heterozigot varyantlar, ailesel paraganglioma ilişkilidir, ikincisi muhtemelen HIF prolin hidroksilazların inhibisyonu aracılığıyla ortaya çıkar. Bazı durumlarda çizgi daha bulanıktır. Örneğin, OD GTP siklohidrolaz eksikliği, hiperfenilalaninemi olmadan dopa-duyarlı distoni şeklinde ortaya çıkarken, OR formu, daha şiddetli ve sistemik tetrahidrobiyopterin eksikliğine bağlı olarak daha erken başlangıçlı şiddetli nörolojik disfonksiyon ve hiperfenilalaninemiye neden olur. Bu nedenle, farklı klinik, biyokimyasal bulgulara ve farklı yönetime dayanarak, iki kalıtım modelinin girişi ayrılmıştır. Bununla birlikte, ara fenotipler de mevcuttur. Örneğin, hastalar *GCH1* genindeki biallelik varyantlarla tanımlanırlar, ancak hiperfenilalaninemi olmadan, sadece dopa-yanıtlı ekstrapiramidal semptomlar gösterir, öte yandan bazı heterozigot taşıyıcılarda fenilalanin yüklemesinde hiperfenilalaninemi ortaya çıkar, ancak bunun dışında asemptomatikler. Benzer şekilde, *MAT1A*'da dominant negatif varyantların neden olduğu OD hipermetiyoninemi için, fonksiyon kaybı varyantlarının neden olduğu OR MAT I/III eksikliğinden farklı bir giriş ayrılmıştır. Δ -1-pirolin-5-karboksilat sentaz eksikliği durumunda, predominant spastik parapleji fenotipi hem OD hem de OR kalıtım gösterebilirken, nörolojik tutulumu ve cutis laxayı içeren bir fenotip de aynı şekilde OD veya OR olarak kalıtılabilir. Cutis laxa fenotipinin veya spastik parapleji fenotipinin OD kalıtımı, dominant negatif

varyantlarından kaynaklanabilir. Bu gibi durumlarda, klinik fenotipe bağılı olarak aynı enzim eksikliği için iki giriş eklenmiştir (hem fenotip hem de kalıtım paternine dayalı dört ayrı girişe karşılık). X'e bağılı bozuklukların dominant veya resesif olarak sınıflandırılması, kadınların klasik biçimde resesif olarak tanımlanmış X'e bağılı durumlardan etkilenebildiği göz önüne alındığında sorunlu olabilir. Bununla birlikte, heterozigot kadınlarda hemizigot erkeklere kıyasla farklı fenotiplerle ortaya çıkan X'e bağılı hastalıklar için iki ayrı giriş eklenmiştir. Bu durumun örnekleri arasında, her ikisi de *NSDHL*'deki varyantların neden olduğu XLR CK sendromu veya XLD CHILD sendromunu veya her ikisi de *EBP*'deki varyantlardan kaynaklanan XLR MEND sendromunu ve XLD kondrodisplazi punctata bulunmaktadır.

Bazı proteinlerde farklı varyantlar, büyük ölçüde farklı fenotiplerin gözlemlendiği eksiklik veya süperaktiviteye yol açabilir. Örnekler arasında monokarboksilat taşıyıcı 1, δ -aminolevulinik asit sentaz, fosforibozilpirofosfat sentetaz ve glukokinaz yer alır. Ek olarak, aynı proteinde farklı varyantlar, farklı hastalık mekanizmalarına yol açabilir. Örneğin, *FTL* genindeki fonksiyon kaybı varyantları kalıtsal L-ferritin eksikliğine yol açarken, ekzon 4'te okuma çerçevesini değiştiren fonksiyon kazanımı varyantları, protein katlanmasını ve stabilitesini bozar ve nöroferritinopatiye yol açar. Ayrıca, genin 5' kodlamayan demir-duyarlı element (IRE) bölgesindeki varyantlar hiperferritinemi-katarakt sendromuna yol açar. Bu tür olgular patofizyolojinin farklı olmasına dayalı olarak ayrı girişler olarak dahil edilmiştir.

Mevcut nozolojide kullanılan bir başka ölçüt, girişlerin sadece klinik fenotipe değil, ilgili gen ürününe dayalı olarak dahil edilmesidir. Örneğin, glisin dekarboksilaz veya aminometiltransferaz eksikliğinden kaynaklanan glisin ensefalopatisi için ayrı ayrı girişler dahil edilmiştir. Benzer şekilde, birçok farklı mitokondriyal transfer RNA'daki kusurlar MELAS fenotipine yol açarken, multipl nükleer kodlanmış mitokondriyal proteinlerin yanı sıra mitokondriyal DNA genlerindeki kusurlar Leigh sendromuna yol açabilir. Bu şekilde olan her gen/proteinin dahil edilmesi için ayrı girişler eklenmiştir. Klinik bir hastalığa neden olmayan çok sayıda biyokimyasal fenotip tanımlanmıştır. Örneğin, Archibald Garrod tarafından tanımlanan ilk KMH' dan biri olan pentosüri asemptomatiktir. Klasik olarak "hastalık dışı" kabul edilen diğer KMH'lar

histidinemi, hidrokspirolinemi veya sistatyoninüridir. Buna karşılık, başlangıçta klinik olarak anlamlı olduğu düşünülen bazı biyokimyasal fenotiplerin doğruluğu sorgulanmaktadır (kısa zincirli asil-CoA dehidrogenaz ve 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz eksiklikleri gibi). Son olarak, başlangıçta klinik bulgu olmadığı düşünülen bazı KMH'lar daha sonra pterin-4- α - karbinolamin dehidrataz eksikliği gibi hastalık fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Bu durumların tümü, metabolik bozukluk terimi mutlaka bir hastalığı ifade etmediğinden, mevcut nozolojiye dahil edilmiştir. Diğer türlere kıyasla insanlarda yaygın olarak bulunan metabolik varyantlar, örneğin L-gulonolakton oksidaz eksikliği veya ürat oksidaz aktiviteleri dahil edilmemiştir.

Birçok girişin fonksiyon ve fenotipe bağlı olarak birden fazla gruba atanabileceği unutulmamalıdır. Örneğin, süksinat dehidrogenaz hem Krebs döngüsünde hem de mitokondriyal solunum zincirinin bir parçası olarak işlev görür. Bu durumlarda, spesifik fenotip, hastalık mekanizmasıyla en doğrudan ilişkili gruba dahil edilir. Örneğin, fruktoz-1,6-bisfosfataz eksikliği, glukoneogenez bozuklukları grubuna dahil edilirken, fruktoz metabolizması bozuklukları grubunda sadece çapraz referansla gösterilmiştir.

Yayınlanmamış, doğrulanmayan veya genetik bir etiyolojiye sahip olma olasılığı düşük durumlar dahil edilmemiştir. Bu durumların ya moleküler temellerinin aydınlatılmamış olması, ya onlarca yıllık raporlarda sadece az sayıda hastanın tanımlanmış ya da sadece tekil ailelerin bildirilmesine bağlı olarak iyi karakterize edilmediği düşünülmektedir. Ancak, belirtilen bu KMH'lar gelecekte kabul edilerek dahil edilebilir. Son olarak, enzimleri kodlayan genleri içeren bazı ardışık gen delesyonları genellikle, izole (tek gen) defektinden farklı bir fenotipe sahiptir. Bu duruma, *MAOA* ve *MAOB* kombine delesyonu, ardışık *ABCD1/DXS1375E* delesyon sendromu (CADDs olarak da bilinir), hipotoni-sistinüri sendromu veya kompleks gliserol kinaz eksikliği örnek verilebilir. Bunlar nozolojiye dahil edilmemiştir.

Sonuç olarak bu yayında belirlenen kriterlere göre KMH'nın tam listesi ek 1 de detaylandırılmıştır. Toplam 130 grupta 1.015 KMH tanımlanmıştır. İlave 111 KMH, doğrulamanın yetersiz olması nedeniyle nihai kategoriye alınmamıştır. En belirgin kategori 232 KMH (toplamın %22.9'u) ile mitokondriyal hastalıklar (grup 54-81) olmuştur. Diğer önemli kategoriler 188 KMH (%18.5) ile

azotlu bileşiklere (grup 1-24) ilişkin metabolizma bozuklukları, 123 KMH ile (%12.1) glikozilasyon bozuklukları (grup 115-130), 79 KMH (%7.8) ile vitamin metabolizması bozuklukları (grup 25-38), 67 KMH (%6.6) ile depo bozuklukları (grup 100-108), 46 KMH (%4.5) ile sterol ve steroid metabolizması bozuklukları (grup 95-97), 27 KMH (%2.7) ile peroksizomal bozukluklar (grup 109-113) ve 25 KMH (%2.5) ile metal metabolizması bozuklukları (grup 40-43) olarak belirlenmiştir.

KMH'lara yönelik bir nozolojiye sahip olmanın yararları sadece akademik amaçlı değil, tıp alanına, moleküler etiyolojilerine göre gruplandırılmış ve güncel olarak tanımlanmış KMH'lar için genel bir bakış açısı sunması açısından önemlidir. Bu sayede, potansiyel yeni KMH'ların tanımlanmasına ilişkin standart belirlenebilir. Aynı zamanda, hekimlere potansiyel tanılarının tam bir listesini sağlayarak çok nadir hastalıkların belirlenmesine yardımcı olabilir. Belirli bir KMH için birçok ayırıcı tanının hızlı bir hatırlatıcısı olarak rol oynayabilir, uygun kaynaklara daha ileri düzeyde danışılması konusunda yön gösterebilir ve bilgisayar tabanlı, yapay öğrenmeye dayalı tanı algoritmalarının geliştirilmesi için zemin hazırlayabilir. Son olarak, hastalıkların gruplandırılması, yeni nesil dizileme panelleri veya tüm ekzom veya genom verilerinin hedefli analizi için spesifik genlerin seçilmesine yardımcı olabilir. Nihayetinde, bu nozolojinin metabolizma alanında çalışan bireyler arasında farkındalığı teşvik edeceği ve işbirliğini büyüteceği öngörülmektedir. Ancak unutulmaması gereken, bu türden bir girişimin, genetik alanındaki ilerleme hızının bir sonucu olarak revizyona tabi olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, yeni bozukluklar keşfedildikçe ve mevcut hastalıkların patofizyolojisi hakkındaki anlayışımız gelişmeye devam ettikçe, mevcut nozolojide sık sık güncelleme yapılması, yararlılığın sürdürülmesi için büyük önem taşır. Gelecekteki iyileştirmeler için bir basamak oluşturan mevcut sürümün, *IE*Mbase üzerinden dijital olarak sürekli güncellenebilir hale getirilmesi planlanmıştır.

Günümüzde genetik temelli tanısal yaklaşımlara ağırlık verilmesi zorlukları artırmakta, her geçen gün bir bozukluğun ortaya çıktığı bu yeniçağda mevcut zorluklar "klasik" ve yeni tip KMH örnekleri ile açıklanmaktadır (27). Örneğin, konjenital glikozilasyon defektlerinin (*Congenital disorders of glycosylation*, CDG) sayısı son on yılda katlanarak artmıştır. CDG'leri, protein

veya lipit glikozilasyonu bozukluklarının görüldüğü tüm bozukluklar olarak tanımlanırsak, bu terimin kapsadığı hastalıkların sayısı önemli ölçüde artmış olur. Anormal glikozilasyon ile ilişkili Golgi trafiği bozukluklarına ek olarak, trafik hastalıkları kapsamında olan yeni metabolik hastalıklar arasında endositozu bozan fonksiyonel bozukluklar bulunur ve bunlar biyokimyasal süreçleri ve metabolizmayı açık bir şekilde etkiler. Klinik tabloda inatçı nöbetler, gelişme geriliği, mikrosefali, disostoz, osteopeni, kraniyofasiyal dismorfizm, makrositoz ve megaloblastik eritropoez görülür. Biyokimyasal bulgular arasında geçici kobalamin eksikliği, ketojenik diyet sonrası şiddetli hipertrigliseridemi, mikroalbüminüri ve kısmi katepsin D eksikliği bulunur (28). Diğer bir örnek mitokondriyal hastalıklardır ve konuyu mitokondriyal proteinleri kodlayan ve mitokondriyal fonksiyonu etkileyen genlerdeki mutasyonların primer mi yoksa sekonder mitokondriyal hastalık olarak mı sınıflandırılması gerektiğine yönelik uzun süredir devam eden tartışmaların ötesine taşır (29). Keşfedilen bu yeni genler hakkında sadece metabolik bir durumla ilişkili olmaları dışında genellikle çok az şey bilinmektedir. Bulunan varyantının patojenik olduğunu kanıtlamak daha zordur ve en azından tamamlama çalışmaları gibi fonksiyonel deneylerde kullanmak üzere güvenilir bir metabolik belirtece ihtiyaç vardır. Örneğin Sengers sendromu'nda (MIM#212350) altta yatan mutasyonun aydınlatılması, hastalık patogenezi hakkındaki yanıtlardan daha fazla soru ortaya çıkarmıştır (30). Açık biçimde kompleks lipit biyosentezinin bir hastalığı mıdır, yoksa mitokondriyal reaktif oksijen türleriyle ilgili mekanizmalar mı rol oynamaktadır? MEGDEL sendromu (MIM#614725) benzer şekilde gizemli bir arka plana sahiptir (31). Üçüncü bir bozukluk, yeni keşfedilen Kazeinolitik Peptidaz B protein homologu (CLPB) eksikliğidir ki, pleiotropik fenotiplerle ilişkili bir mitokondriyal protein yıkım bozukluğudur (32). Altta yatan hücresel yolaklar ve bu heterojen bozuklukları birleştiren metabolik belirteç 3-metil glutakonik asidin kökeni hala zorlayıcıdır (33).

Tüm bu sorunlara çözüm olarak, YND tekniklerine paralel hızla gelişen diğer tanı teknikleri arasında proteomiks, lipidomiks ve glikomiks yer alır. Bu çalışmalarda, çoğunlukla hücre kompartmanları hedeflenmektedir. Mitokondri, lizozomlar veya peroksizomlar gibi bazı organellerin primer metabolik işlevleri vardır ve bunlara ilişkin genetik bozukluklarda organelle özgü metabolik tanı,

klasik metabolik araştırmaları tamamlamak ve bazı durumlarda yerini almak için kullanılabilir. Ancak KMH'lar organellerle sınırlı kalmaz. Buna iyi bir örnek, birçok farklı molekülü, birkaç hücresel kompartmanı ve zarların sürekli olarak yeniden şekillenmesini içeren yeni "kompleks lipit bozuklukları" grubudur (34). Çoğu KMH, tek bir tıbbi uzmanlığın ötesinde multisistemik bozukluklardır. Disiplinlerarası işbirliğinin sürekli olarak güçlendirilmesi, hastaların tanı ve tedavi ve izleminin paylaşılmasını gerektirir. Büyük resmi kavrayabilecek yetkinliğe sahip "metabolizma uzmanlığının" gücü, vücuttaki biyokimyasal yolların, dahil oldukları bozukluklarla ilgili patofizyolojik mekanizmaların ve terapötik sonuçların ayrıntılı olarak kavrayabilmesinden gelir. Genetik analizler tanı sürecinde gittikçe daha önemli hale gelse de, bazen tanı özgüllüğü daha yüksek olan ve fenotip düzeyinde fonksiyonel bilgi sağlayan biyokimyasal araştırmalarla tamamlanması gerekir. Biyokimyasal testler hastalıkların izlenmesi için de önemlidir. Mitokondri, peroksizomlar, lizozomlar, endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı gibi birçok organel primer metabolik fonksiyonlara sahiptir ve bunlarla ilgili hastalıkları anlamak için ayrıntılı biyokimyasal bilgiye ihtiyaç duyulur. Tıpkı tıbbi genetik uzmanları gibi, metabolizma uzmanlarının da hastalara ve meslektaşlarına disiplinlerarası ağlarda sağladıkları hizmete ilişkin yükümlölükleri artmaktadır. Kalıtsal metabolik hastalıkları olan hastaların kompleks fenotipleri, optimum bakımın sağlanması için birçok tıbbi uzmanlığın işbirliğini gerektirir.

2.3. KMH'DA KLİNİK YAKLAŞIM

2.3.1. Aile Hikayesi

Birçok KMH, OR kalıtım kalıtıldığından, ebeveynler arasında akrabalık olması tanısai ipucu sağlayabilir. Hastalığın kendine özgü etnik veya coğrafi yapısı varsa belirli hastalıklar için toplumdaki yüksek taşıyıcılık oranı ve sonuç olarak aile ağacında etkilenen çocuk sayısının fazla olması da bilgi vericidir. KMH için tanısai araştırmalar, sıklıkla, aynı ailede ancak etkilenen ikinci bir çocuk olduğunda başlatılır. Büyük kardeşler, yani indeks olgu, benzer bir bozukluktan veya açıklanamayan akut, örneğin sepsis, ensefalopati ve ani bebek ölümü sendromu gibi nedenlerden biyolojik örnek saklanmaksızın kaybedilebilir. Özellikle ara metabolizma bozukluklarından, amonyak

detoksifikasyonu (üre siklus bozukluğu), organik asidemiler ve yağ asidi oksidasyon bozukluklarının akut ölümcül sonuçları vardır. Aile öyküsünde akrabalık, açıklanamayan yenidoğan veya süt çocuğu ölümü, kardeşte benzer bulgular, mental retardasyon, büyüme gelişme geriliği, makrosefali, beslenme bozuklukları, besin değişiklikleri sonrası kusma, dalgınlık gibi beklenmeyen bulgular, hastalık, aşı, stres sonrası irritabilite, dalgınlık, konvülsiyon, ataksi, gelişimde duraklama psikomotor gerilik, kazanılan becerilerin kaybı gibi durumlar, tekrarlayan asidoz, hipoglisemi, hiperamonyemi gibi laboratuvar bulguları, akut ensefalopati ve koma tablosu KMH tanısı için önemli bulgulardır. Tıbbi kayıtların yanıltıcı olması, tanı için önemli klinik ipuçlarını atlayabilir, bazen ailenin verdiği bilgiler daha değerli olabilir. Son yıllarda, ara metabolizma hastalıklarının başarılı tedavisi sonucunda, toksik ara metabolizma ürünlerinin birikimi engellenmiş, böylelikle hafif etkilenmiş ancak nispeten sağlıklı olarak üreme yaşına gelen kadınların oranı artmıştır. Bu kadınlar hamile kaldığında, fetüs heterozigot ve etkilenmemiş olmasına rağmen toksik metabolitlerin patolojik miktarlarına maruz kalarak zarar görme riski vardır. Özellikle maternal fenilketonüri'nin önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmesi muhtemeldir. Yenidoğan taramasının olmadığı ülkelerden gelen kadınlar, risk altında olduklarını bilmeyebilirler ve anne hafif PKU hastası olduğu halde, ancak çocuklarından birine PKU teşhisi konduktan sonra tanı alabilir. Tüm bu nedenlerle, ayrıntılı öykü alınması ve aile ağacı çizimleri KMH'ın yönetimi için son derece önemlidir (8).

2.3.2. Doğum Öncesi Fetal Gelişim ve Gebelik Komplikasyonları:

Birçok ara metabolizma bozukluğunda, biriken küçük toksik moleküller, plasenta tarafından alınıp anne tarafından metabolize edildiğinden fetüs zarar görmez. Bu tür bozukluklardan etkilenen çocuklar genellikle tamamen normal intrauterin gelişme ve normal doğum ölçüleriyle doğar. Tersine, hücrel büyüme ve gelişmeyi etkileyen mitokondriyal hastalıklar gibi enerji metabolizması bozuklukları, fetal organ gelişimini bozabilir ve intrauterin büyüme gelişme geriliği, yapısal anomaliler (özellikle serebral) ve dismorfik özelliklere neden olabilir. Gelişimsel yollar için gerekli olan kompleks moleküllerin biyosentez bozukluklarında, yapısal anomaliler ve dismorfik

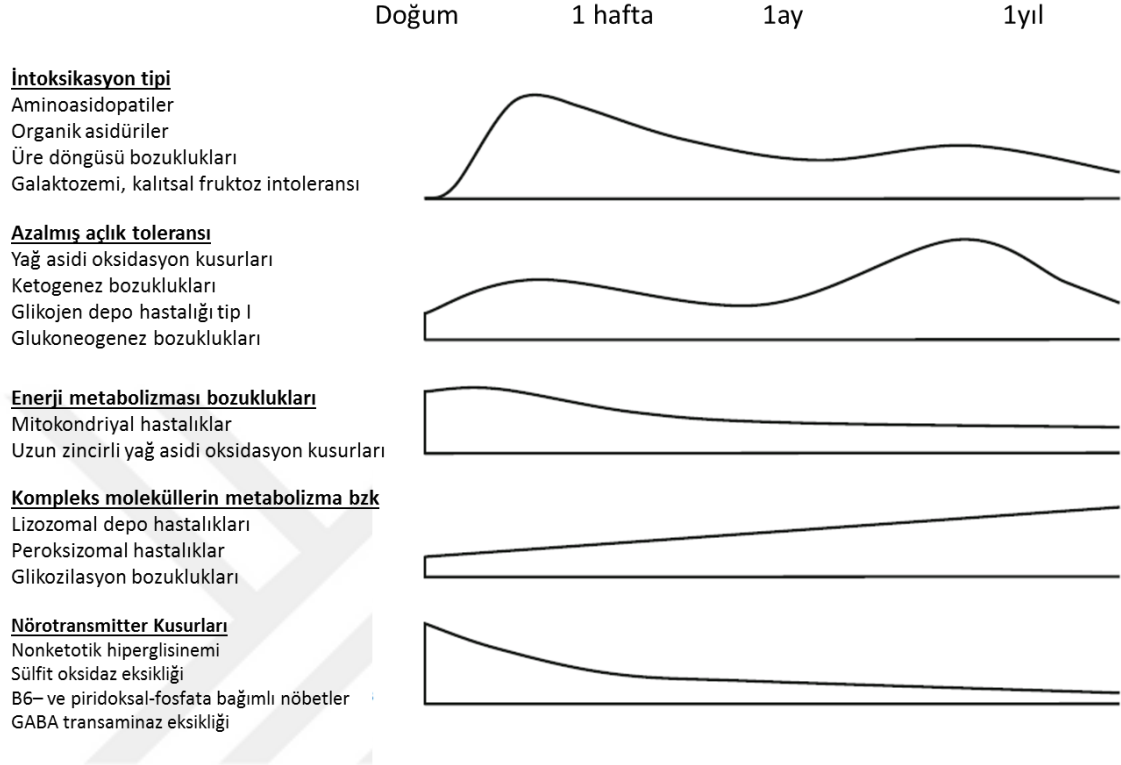
özellikler daha da belirgin olabilir. Smith-Lemli–Opitz sendromu gibi kolesterol sentez bozuklukları, kolesterol bağımlı sinyal yollarını etkileyerek intrauterin gelişimi bozması açısından önemlidir. Kompleks moleküllerin lizozomal yıkımını etkileyen Hurler hastalığı gibi depo hastalıklarında, doğumda spesifik dismorfik bulgular mevcut olabilir. Yağ asidi β -oksidasyonu, özellikle uzun zincirli hidroksi asil-CoA dehidrojenaz (LCHAD, *long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*) eksikliği veya karnitin palmitoiltransferaz II eksikliğinden etkilenen fetus taşıyan annelerde preeklampsi riski artmıştır. Akut yağlı karaciğer gelişimi sonucu yüksek karaciğer enzimleri, daha nadiren de hemoliz ve trombositopeni ile HELLP sendromu görülebilir. Bu yenidoğanlar tandem MS ile asilkarnitin profili analizinde yağ asidi oksidasyon bozuklukları açısından taranmalıdır.

2.3.3. Klinik Bulguların Ortaya Çıkma Zamanı ve Hızlandırıcı Faktörler

Genel popülasyonda yenidoğan taramasıyla erken tanısı mümkün olan fenilketonüri ve biotinidaz eksikliği gibi hastalıkların yanı sıra, KMH riski yüksek ailelerde, hekimlerin yüz yüze geldiği dört klinik grup vardır (8):

- I. Doğum öncesi ve yenidoğan döneminde görülen semptomlar: Bunlar üç ana klinik kategoride sınıflandırılabilir.:
 - İskelet sistemi malformasyonları, konjenital kalp hastalığı, visseral aplaziler ve nöral tüp defektleri gibi gerçek malformasyonlar
 - Kortikal heterotopiler, kortikal kistler gibi arka fossa anomalileri, polikistik böbrekler, karaciğer kisti gibi displaziler
 - İntrauterin gelişme geriliği, hidrops fetalis, hepatosplenomegali, mikrosefali gibi fonksiyonel işaretler
- II. Erken veya geç başlangıçlı akut ve tekrarlayan koma, ataksi, kusma, asidoz, egzersiz intoleransı gibi semptom atakları veya kalp, böbrek, karaciğer veya diğer organ yetmezlikleri
- III. Kronik ve ilerleyici nörolojik semptomlar (gelişme geriliği, mental gerilik, epilepsi, hipotoni, nörolojik ve psikiyatrik belirtiler)
- IV. Spesifik ve kalıcı organ/sistem tutulumu sonucu ortaya çıkan klinik tablolar (kardiyoloji, dermatoloji, endokrinoloji, gastroenteroloji, hematoloji vb.)

Farklı KMH gruplarının, yaşamın ilk yılında, “tipik” ortaya çıkış dönemleri
Şekil 2-5'de gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Yaşamın ilk yılında KMH'nin ortaya çıkma süreleri

(Inherited metabolic diseases. 2nd ed. Hoffmann, G. F., Springer; 2017).

Ara metabolizma bozuklukları yaşamın ilk saatlerinde genellikle asemptomatiktir. Beslenme sonrası diyetten gelen veya protein katabolizmasıyla oluşan aminoasitlerin yıkım ürünü olan azotun detoksifikasyon bozukluğu sonucu, toksik moleküllere maruziyet sonrası “zehirlenme” tablosu ile ortaya çıkarlar. Hastalığın ortaya çıkış yaşı, etken mutasyonların şiddeti ile ilişkilidir ve birkaç günden, birkaç aya değişen ve hatta yıllar süren semptomsuz dönemler olabilir. Akut aminoasidopatiler (ör. akçaağaç şurubu idrar hastalığı, MSUD), klasik organik asidemiler veya üre döngüsü kusurlarında, en sık postnatal 2-5. günler arasında ilerleyici semptomlar gelişir. Sonraki risk dönemleri ilk yılın ikinci yarısı (özellikle 6-8 ay) gece beslenmesi kesilip, protein içeriği yüksek katı gıdalara geçildiğinde ve geç ergenlik döneminde hormonal değişikliklerle düşük büyüme hızına geçilen metabolik durum değişikliği olduğunda hastalık bulguları ortaya çıkabilir. Önemli tetikleyici faktörler,

katabolik durumlara neden olan enfeksiyonlar, ateş, aşılar, gebelik, yüksek doz steroid tedavisi, cerrahi operasyon veya kazaların yanı sıra uzun süreli açlıkta da semptomlar ortaya çıkabilir. Akut veya kronik intoksikasyon tablosunun ortak bulgularında, kusma, letarji, koma ile giden tekrarlayan metabolik ataklar, karaciğer yetersizliği, asidoz, ketozis, hiperamonyemi, hipoglisemi görülür. Akçaağaç şurubu idrarı hastalığında (MSUD, *Maple syrup urine disease*) yaşamın ilk günleri semptomsuz iken, 4-5. günlerde beslenme güçlüğü başlar ve ağırlaşarak koma tablosu görülür. Opistotonus ile birlikte generalize hipertonic epizotlar, yumruk sıkma ve pedal çevirme hareketi gözlenir. Pastırma çemeni kokusu tipiktir. İdrarda ketoasitlerin varlığı nedeniyle DNPH (dinitrofenilhidrazin) testi pozitifdir. Tanıda, plazmada dallı zincirli amino asitlerde (valin, lösin, izolösin) artış görülür. Organik asidemiler yaşamın 1-4. günlerinde beslenme güçlüğü, saatler günler içinde gelişen koma, dehidratasyon, asidoz, hipotermi, gövdede hipotoni, ekstremitelerde hipertoni, yüksek amplitüdlü tremor, hiperamonyemi, anyon açığında artış, terli ayak kokusu, nötropeni, trombositopeni (sepsis ayırıcı tanısında önemli) gibi bulgularla prezente olur. Tanıda GCMS (Gas chromatography–mass spectrometry) ile idrarda organik asit analizi ve tandem MS ile asil karnitin profili yardımcıdır.

Organik asidemilerle ayırıcı tanıya giren üre döngüsü bozukluklarında ise postnatal semptomsuz bir dönemi takiben, beslenme sorunları, bilinç değişikliği, kısa süreli hipertonic dönem ve bunu izleyen hipotonik koma, hiperamonyemi, respiratuar alkaloz bulguları gözlenir. Üre döngüsü bozuklukları üzerine yapılan çalışmalarda, doğru tanıdan önce sıklıkla uzun gecikmeler olduğu, alternatif metabolik yol terapisi ve karaciğer transplantasyonu gibi etkili tedavinin varlığına rağmen sonuçların kötü olduğu bildirilmiştir (35). Organik asidüri (OA) ve üre siklus bozuklukları (UCD) hastaların klinik tabloları değişkendir ve semptomlar genellikle nonspesifiktir. Bu durum, hızlı tanı ve erken tedavi başlaması için bir zorluktur. Sepsis benzeri yenidoğan krizi olan veya geç başlangıçlı semptomları olan hastalar tanı atlanabildiği için özellikle risk altındadır. Bu hastalıkların nadir görülmesi, uzmanların yetersiz farkındalığı nedeniyle çoğunlukla gecikmiş tanı söz konusudur. Komplet enzim eksiklikleri, postnatal birkaç gün içinde ortaya çıkan hiperamonyemik krizle %50 mortal seyreder ve hayatta kalanlar da ciddi nörolojik sekeller olur ve tekrarlayan

hiperamonyemik koma tablosu ile başvurular (36). XL-OTCD (*Ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency*) dışında tüm UCD'ler OR kalıtım gösterir. Mutasyon analizinin ~% 80 yakalama olasılığı vardır ve taşıyıcıların tanımlanması, prenatal tanı, soyağacı analizi, genetik danışma ve bazı durumlarda genotip-fenotip korelasyonlarına olanak sağlar. Ayrıca gelecekteki hedef tedavi yaklaşımları için moleküler tanı önemlidir. *CPS1* geni gibi çok sayıda ekzonu bulunan genler için DNA dizi analizi güçtür ve fibroblast kültüründen RNA analizi düşünülebilir. Ancak, genellikle *CPS1D* çalışmaları için periferik kandan DNA analizi, diğer UCD'ler için RNA analizi (OTCD' de karaciğerden) sadece DNA analizi negatif olduğunda yapılır. Missense mutasyonlar ve bazı splice site mutasyonların hastalığa neden olan doğasına rağmen, prognostik kararlar hakkında yargılar sunması mutant proteinin in-vitro ekspresyon çalışmaları ile desteklenmediği takdirde zordur (37). Prenatal testler, klinik genetikçiler ve metabolizma uzmanları tarafından ortak danışmanlık gerektirir. Moleküler genetik analiz, prenatal tanıda tüm UCD'ler için tercih edilen doğum öncesi test yöntemi olsa da koryon villüs ve amniyotik sıvı materyallerinde enzim aktivite ölçümü ile de yapılabilir. Kültüre amniyotik sıvı hücreleri, fetal karaciğer hücresi veya fetal eritrositler de ayrıca kullanılabilir. NAGSD (N-asetilglutamat sentaz eksikliği), *CPS1D* (Karbamoilfosfat sentaz 1D eksikliği) ve OTCD (ornitin transkarbamilaz eksikliği) için yenidoğan taraması henüz önerilmemektedir, ASSD (argininosüksinat sentaz eksikliği), ASLD (argininosüksinat liyaz eksikliği) ve *ARG1D* (arginaz eksikliği) için ise tartışılmaktadır.

İntoksikasyon tablosuna yol açan karbonhidrat metabolizması bozukluklarından, galaktozemi, genellikle laktoz içeren (galaktoz-glikoz disakkaridi) süt tüketiminin başladığı hayatın ilk haftasında bulgu verirken, kalıtsal fruktoz intoleransı olan çocuklar meyve, sebze ve özellikle sofraya şekeri tüketiminden sonra, 6-8. aylarda semptomatik olur. Galaktoz-1-fosfat uridil transferaz (GALT) eksikliğinde ortaya çıkan galaktozemide, ana klinik bulgular hepatomegali, sarılık, kusma, tartı kaybı, gelişme geriliği, katarakt, mental retardasyon, renal fankoni sendromudur. İdrarda redüktan madde pozitifdir, galaktozüri, proteinüri tespit edilir. Kesin tanı eritrositlerde enzim analizi ve/veya moleküler analizle mutasyon tespitine dayanır. Tedavide galaktozsuz diyet

uygulanmaz ise ölümle sonuçlanır (38). Gelişmiş ülkelerde galaktozemi şu anda yenidoğan tarama programları ile erken tespit edilmekte ve diyet tedavisine uyum, klasik fenotipi ortadan kaldırmaktadır. Ancak, uzun dönemde nörolojik sorunlar ve over yetmezliği gibi geç komplikasyonlar görülebilmektedir (39). Kalıtsal fruktoz intoleransı (HFI, *hereditary fructose intolerance*) veya fruktozemi (MIM#229600), karaciğer metabolizmasından sorumlu ana enzim aldolaz B eksikliğinden kaynaklanır. Çoğu mutasyonları enzim stabilitesi ve katalitik aktiviteyi azaltan varyantlar, fruktoz, sükroz ve sorbitolün doğru şekilde metabolize edilememesine ve şiddetli organ hasarına neden olabilecek şeker toksisitesine neden olur. Erken teşhis ve beslenme tedavisi ile, nispeten iyi huylu bir hastalıktır ancak tanı konulmazsa ölümcül olabilir (40).

Enerji eksikliği yapan KMH'lar, glikojen depo hastalıkları, glukoneogenez bozuklukları, pirüvat metabolizması ve sitrik asit döngüsü bozuklukları, solunum zinciri hastalıkları ve yağ asidi oksidasyonu bozukluklarıdır. Enerji üretimi ve kullanımı ile ilgili biyokimyasal yollarda bozukluk vardır ve yoğun enerji tüketen dört ana organ olan karaciğer, kalp ve iskelet kası, beyin en çok etkilenir. Enerji eksikliği tablosunda, hipoglisemi, hipotoni, miyopati, kardiyomiyopati, kardiyak yetersizlik, gelişme geriliği, laktik asidoz dolaşım kollapsı ve ani bebek ölümü (SIDS, *Sudden infant death syndrome*) gibi klinik bulgular görülebilir. Glikojen depo hastalıkları ve glukoneogenez bozukluklarında, hiperketotik hipoglisemi, laktik asidemi, hepatomegali görülürken, orta zincirli yağ asidi oksidasyonu bozukluğu (MCAD, *Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*) enfeksiyon veya uzamış açlığı takiben hipoketotik hipoglisemi, reye benzeri tablo, kardiyomiyopati, kardiyak aritmi ile ani ölüm görülebilir. Açlık serumunda serbest yağ asitleri artmış ve β -OH bütirat düşüktür. Solunum zinciri bozukluklarında ensefalopati en yaygın ve belirgin klinik tablodur. Kazanılan becerilerin kaybı, piramidal bulgular, ataksi, distoni, tremor, optik atrofi, oftalmopleji, nistagmus, ptoz gibi göz bulguları, hipo- veya hiperventilasyon atakları görülebilir. Nöropatolojik bulgular ve radyolojik görüntülemelerde bazal gangliyonları, pons, orta beyin, talamus ve optik sinirleri tutan simetrik nekroz bölgeleri bulunur.

Enerji metabolizması bozuklukları sıklıkla doğumda semptomatiktir ancak esas olarak genetik kusurun şiddetine bağlı olarak yaşamın herhangi bir

zamanında da bulgu verebilir. Mitokondriyal hastalıkların akut dekompanseasyonu, büyük miktarda karbonhidrat alımı ve hızla emilmesi sonucu ortaya çıkarken, uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyon kusurları uzun süreli açlıkta mitokondriyal hastalığa benzer bir klinikle semptomatik hale gelebilir. Azalmış açlık toleransına sebep olan hastalıkların kliniği, genellikle gıda alımının azaldığı ve/veya uzun süreli açlık, metabolik stres gibi durumların arttığı dönemlerde, “intoksikasyon” bozukluklarının kliniği ile örtüşmektedir. Hepatik glikojen depo hastalıklarında (*glycogen storage disease* GSD Tip I ve Tip III) diyet tedavisinin amacı ekzojen karbonhidratların sağlanmasıyla, kusurlu endojen glikoz üretimine sekonder biyokimyasal anormallikleri önlemek ve normoglisemiye korumaktır.

Kompleks moleküllerin metabolizma bozukluklarında, nadiren akut metabolik kriz görülür, ancak çocukluk çağı boyunca, sıklıkla ilerleyen organ işlev bozukluğu ile prezente olurlar. Bu grupta, genellikle hızlandırıcı metabolik faktörler yoktur. Lizozomal Hastalıklarda, yenidoğan döneminde hidrops fetalis, asit, ödem görülebilirken, ilerleyen dönemde hepatosplenomegali, pansitopeni, tekrarlayan ciddi enfeksiyonlar, kaba yüz görünümü, osteoporoz, hafif psikomotor gerilik ile prezente olur. Mukopolisakkaridozlarda (MPS), kaba yüz görünümü, mental motor retardasyon, korneal opasite, eklem kontraktürleri, kemik displazisi, hepatosplenomegali, işitme kaybı görülebilir. MPS Tip I, II ve VI’da enzim replasman tedavisi yapılmaktadır.

Nörotransmitter kusurları ve ilgili bozukluklarda, klinik tablo, nörotransmitter ve reseptörlerinin ontogenetik ifadesine bağlıdır. Etkilenen çocuklar genellikle semptomatiktir. Semptomlar doğumdan hemen sonra ve hatta intrauterin epilepsi gibi doğum öncesi dönemde hastalık belirtileri başlayabilir. Genellikle hızlandırıcı faktör bulunmaz.

2.3.4. KMH’da Fizik Muayene

KMH’dan şüphelenilen her çocuk, ayrıntılı bir fizik muayene ile organ fonksiyonlarının değerlendirildiği, rutin laboratuvarlar ve görüntüleme yöntemleriyle araştırılmalıdır. Ayrıca, işitme ve görme muayeneleri yapılmalıdır. Mevcut semptomlara ve klinik seyre bağlı olarak özellikle ayrıntılı bir fizik muayene ile yeniden değerlendirme 6 ayda bir tekrarlanmalıdır. Özellikle kesin

tanı konulamadığında, tespit edilen ek bulgular büyük önem taşır. Çoklu organ sistemlerinin tutulumu, kalıtsal metabolik hastalık lehine en güçlü argümanlardan biridir. Bu, özellikle mitokondriyal, peroksizomal hastalıklar veya glikozilasyon defektleri grubunu içeren CDG sendromları gibi organel metabolizması kusurları için geçerlidir. Dismorfik özellikler veya malformasyonlar gibi yapısal anomaliler, kompleks moleküllerin metabolizması veya mitokondriyal enerji metabolizmasını etkileyen bozukluklardan kaynaklanır. Diğer ara metabolizma bozukluklarında genellikle görülmez. Organomegali genellikle lizozomal depo hastalıklarının bir göstergesi iken, izole hepatomegali çok çeşitli enzim bozukluklarında görülebilir. İdrar rengi ve kötü vücut kokusu teşhis için ipuçları sağlayabilir.

2.4. MİTOKONDRİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Mitokondriyal hastalıklar, nükleer (nDNA) veya mitokondriyal genomlardaki (mtDNA) mutasyonların neden olduğu, kalıtsal nörometabolik hastalıkların en yaygın grubudur ve yaklaşık 1/4300 kişiyi etkiler (41). Her yaş grubunda görülen bu hastalıkların semptomları, destek tedavileri ile bir miktar iyileştirilebilse de, bir çoğunun kesin tedavisi henüz yoktur. Klinik bulgular ve genetik etiyoloji son derece heterojen olduğundan, hastalığın yönetimi ve kesin tanı ile moleküler etiyolojinin aydınlatılması zordur. Sıklıkla birden fazla sistemi etkileyen fenotipik heterojenite, uzman klinisyenlerin ayrıntılı fizik muayenesini gerektirir. Yüksek çıktılı genetik tanı teknolojileri sayesinde son on yılda, tanımlanmış patojenik varyantların sayısı artmış olmasına rağmen, önemi bilinmeyen birçok varyant içeren büyük veri setleri, YND stratejileri için büyük zorluk oluşturmaktadır. İn siliko tahmin programları popülasyona özgü olabildiğinden, bulunan varyantların patojenik olduğunu doğrulamak için fonksiyonel çalışmalar gerekmektedir.

Bu tez kapsamına dahil edilen ailelerin çoğunluğunda, TED analizi ile, mitokondriyal yolaklarla ilişkili genlerde mutasyon saptandığından, mitokondrinin yapısı ve metabolik işlevleri ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

2.4.1. Mitokondriye Özgü Kavramlar

Mitokondri, tüm çekirdekli hücrelerde bulunan ve temel işlevi oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimi olan dinamik bir organeldir. Mitokondri, hücre

büyümesi ve farklılaşması da dahil olmak üzere, apoptozis, kalsiyum, azot ve yağ asidi metabolizması gibi bir çok hücrenel süreçte rol alır. Hücre içi ortama duyarlıdır ve solunum durumundaki değişimlere cevaben, fizyon (bölünme) ve füzyon (birleşme) yoluyla yeniden düzenlenme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, kendi genomu ve nükleer genomun ikili kontrolü altında olması bakımından benzersizdir. mtDNA, 16.569 baz çifti (bç) uzunluğunda olup 37 gen içerir ve yaklaşık 1200 kadar proteinden oluşan mitokondriyal proteomun yalnızca %1'ini kodlar. Oksidatif fosforilasyonda görevli enzim komplekslerinin bazı alt ünitelerini içeren 13 polipeptid, mitokondriye özgü 22 tRNA ve 2 rRNA sentezinden sorumludur. Mitokondriyal proteomun %99'u ise nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanmaktadır. Doğası gereği, mtDNA'nın çoklu kopya sayısı, aynı hücrede birden fazla tipte mtDNA varlığı ile karakterize "heteroplazmi" kavramını doğurur. Heteroplazmik mutasyon taşıyıcılarında, eşik değer aşılmadıkça, hastalığın klinik bulguları görülmez. Mitokondrial hastalık, mutant mtDNA'nın tüm mitokondrilerde bulunması (homoplazmik) durumunda ortaya çıkabilir. Bireyin mitokondrileri ovum ile aktarıldığından, -çok nadir bi-parental kalıtım örnekleri ve alternatif açıklamalar bulunsa da- mitokondrial kalıtım her zaman maternaldir (42).

2.4.2. Mitokondri Biyolojisi

Neredeyse tüm çekirdekli ökaryotik hücrelerde bulunan ve çok sayıda biyolojik yolda yer alan bu organel, ilk olarak 1800'lerde, çekirdekli hücrelerin sitoplazmasındaki hücre içi yapılar, "biyoblastlar" olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, iplikli granüle benzeyen fiziksel görünümüyle Yunanca "mitos" ve "chondros" dan "mitokondri" terimi atfedilmiştir (43).

Mitokondri, endosimbiyotik teoriye göre, yaklaşık 1.5 milyar yıl önce serbest yaşayan α -proteobakteriyel atasının, bir prokaryotik konakçı hücre tarafından fagositozu yoluyla oluşmuştur. Bu olay, konakçı metabolizması için, elektron kaynağı sağlayan α -proteobakteri tarafından üretilen hidrojen ile metabolik simbiyozla sonuçlanmış ve simbiyotun ökaryota evrimini tetiklemiştir (44). Prokaryotik ve ökaryotik genom dizileme sonuçlarının, mitokondriyal proteinlerin sadece %10-20'si için α -proteobakteriyel kökenleri desteklemesi, Margulis'in endosimbiyont hipotezinin yeniden değerlendirilmesine yol açmış ve

"preendosimbiyotik hipotezi" ile demir kükürt biyogenezi gibi belirli mitokondriyal fonksiyonları yerine getirebilen konakçıda, α -proteobakteriyel fagositozdan sonra enerji metabolizması için gelişen bir "premitokondriyon" varlığı ön görülmüştür. Genom dizilimi, endosimbiyont genomunun birçok önemli geninin, aşamalı olarak konakçı genomuna aktarıldığı ve gerekli olmayan genlerin kaybolduğunu desteklemektedir. Klasik mitokondrinin korunmuş fonksiyonları demir sülfür (Fe-S) biyogenezi ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla ATP üretimidir (45).

2.4.3. Mitokondrinin Yapısı

Elektron mikroskobu ile mitokondrilerin yüksek çözünürlüklü görüntülenmesi, son derece kıvrık bir iç membran ve pürüzsüz bir dış zar içeren, prokaryotik ultra-altyapıyı anımsatan, çift katmanlı fosfolipid yapıyı ortaya çıkarmıştır. Dış membrana gömülmüş porin, 5 kDa'a kadar olan protein ve moleküllerin pasif transportuna izin verir. İç mitokondriyal membran ise geçirgen değildir ve geniş bir yüzey alanı oluşturmak için kıvrılarak, OXPHOS sisteminin içine gömüldüğü "krista" yapılarını oluşturur. Dış ve iç mitokondriyal zar arasında intermembraner boşluk ve merkezde ise mitokondriyal matriks bulunur (42). Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve yağ asidi beta oksidasyonu dahil olmak üzere pek çok biyokimyasal reaksiyon mitokondriyal matrikste meydana gelirken, OXPHOS iç zarda gerçekleşir. Hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve farklılaşma, hücre içi kalsiyum homeostazı, hücre ölümünün düzenlenmesi gibi pek çok önemli metabolik olayda rol alması, mitokondrinin hücre içi dinamik yapısı sayesinde mümkün olmaktadır. Mitokondriler, sürekli fizyon ve füzyon geçiren dinamik organellerdir (46). Hücre içindeki sayısı, şekli ve konumu, çevresel etkiler ve enerji durumuna bağlı olarak hücre döngüsü boyunca değişime uğrar. Bir hücrede, kararlı durum mitokondriyal morfolojisini, mitokondriyal iç ve dış zarların birleşme (füzyon) veya ayrımını (fizyon) yöneten bir dizi protein düzenler. Fizyon baskın olduğunda mitokondriler, küçük parçalanmış hücre içi elemanlar olarak noktasal tarzda bulunur ve füzyon baskın olduğunda daha büyük hiperfüzyon formunda tek bir geniş trabeküler ağ oluştururlar. Sürekli bölünme ve füzyon, mitokondrinin hücre iskeleti boyunca hareket etmesine yardımcı olur. Bu şekil değişimleri hücre döngüsü sırasında

hücresinin metabolik gereksinimlerine cevap veren dinamik durumlarına cevap verir. Mitokondriyal füzyon ve fizyonun ana düzenleyicileri, dinamin ailesidir. Füzyonda, Mitofusin 1 ve 2 mitokondriyal dış zarı, OPA1 mitokondriyal iç zarı düzenlerken, mitokondriyal fizyon DRP1 (*DNM1L*) tarafından düzenlenir (47,48).

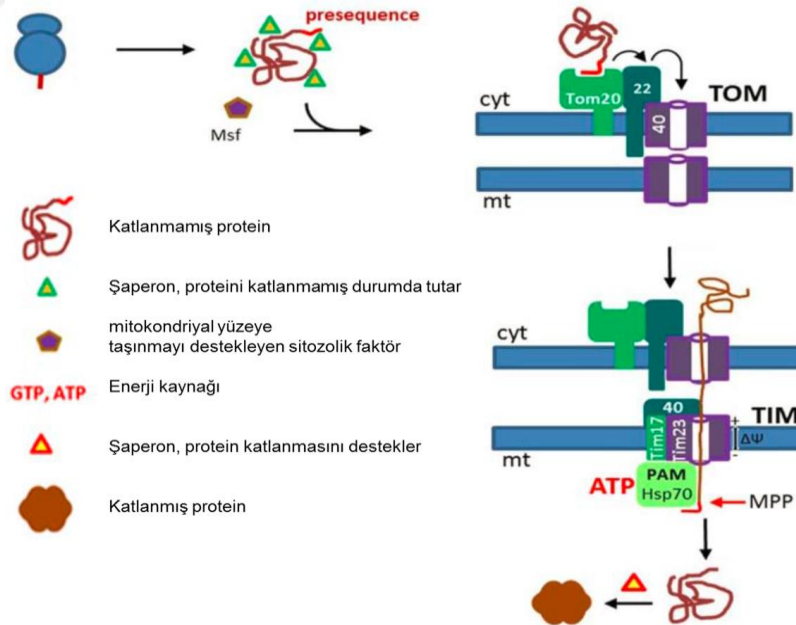
Mitokondriyal homeostazda, mitokondriyal dinamiğe ek olarak rol alan bir diğer mekanizma ise hasarlı mitokondrinin seçici olarak ortadan kaldırıldığı mitofajidir. Nöron hücrelerindeki mitokondrinin hareket bozukluğu, nöronların disfonksiyonu ve dejenerasyonuna neden olmaktadır. Bu özelliği nedeniyle çok çeşitli nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Lewy Cisimciği olarak adlandırılan intrasitoplazmik inklüzyonlar içinde tespit edilen hasarlı mitokondri, mitofaji bozukluğunun Parkinson patogeneindeki önemine işaret etmektedir. Erken başlangıçlı Parkinson Tip 2 ve 6 da, sırasıyla ubiquitin ligaz ailesi üyesi olan parkin ve mitokondriyal ser/thr kinaz ailesi üyesi olan PTEN-tarafından indüklenen kinaz-1'in (PINK-1) eksikliği görülür (49).

2.4.4. Mitoproteom

Mitoproteom bileşenleri, demir-kükürt biyogenezi, kalsiyum homeostazı, mitokondriyal DNA replikasyonu, mitokondriyal haberci ribonükleik asit (mt-mRNA) transkripsiyonu, mt-protein translasyonu ve oksidatif fosforilasyon dahil tüm mitokondriyal fonksiyonları yerine getirir (50). Mitokondrinin kendi genetik materyali doğada dairesel ve poliploid olan bakteriyel soylarını yansıtır. İnsan mtDNA sı, mitoproteomun sadece 13 polipeptidini kodlar ki bunların tamamı OXPHOS bileşenleridir. Geri kalan mitoproteom bileşenleri nükleer genomdan kodlanır, sitozolik ribozomlarda sentezlenir ve daha sonra mitokondriye geçer. İnsan mitokondriyal proteinleri kodlayan 1158 nükleer ve mtDNA geninin listesine "MitoCarta2.0 envanteri", olarak erişilebilmektedir. Mitokondriyal proteinlere odaklanan MitoCarta, mitokondriye geçici olarak lokalize olan, ekstra mitokondriyal proteinlerin genlerini içermeyebilir. Örneğin, proteomik profillemeye ile 2016' da yeni bir iç zar proteini olarak tespit edilen DMAC1 (*TMEM261* tarafından kodlanır) karmaşık bir montaj faktörü olarak işlev görür ve MitoCarta 2.0'de bulunmamaktadır (51).

2.4.5. Nükleer kodlanan proteinlerin mitokondriye alınması

Nükleer genomda kodlanan proteinlerin mitokondriye hedeflenmesi, en sık N-terminal kalıntısını içeren ve mitokondriyal import sistemi tarafından tanınan bir dizi ile olur (52). Nükleer genomdan kodlanan ve ribozomda sentezlenen proteinler, mitokondrinin uygun kompartmanına taşınana kadar şaperon (HSP70, *heat shock proteins*) etkileşimi ile katlanmadan kalırlar. Proteinlerin mitokondriyal hedefleme dizisi, dış mitokondriyal membrandaki TOM40 (*translocon of the outer mitochondrial membrane*) poru aracılığı ile transfer boyunca presipite olan TOM20 ve TOM22 tarafından tanınır. Matriks için hedeflenen proteinler, iç mitokondri zarını da geçmelidir. Elektrokimyasal gradyan ($\Delta\Psi$) yüklü proteinin tanıma dizilerini çeker ve protein TIM23 poru aracılığı ile iç zarı geçer (Şekil 2-6). Presekans translokaz ile ilişkili motor-kompleks, yeni oluşan polipeptidin matrikse ve mitokondriye salınmasını sağlar ve hedefleme dizisi MPP (*mitochondrial processing peptidase*) ile ayrılır. Son olarak, şaperon (HSP60) proteini doğal durumuna katlayarak yönlendirir (52).



Şekil 2-6: Nükleer kodlanan proteinlerin mitokondriye yönlendirilmesi.

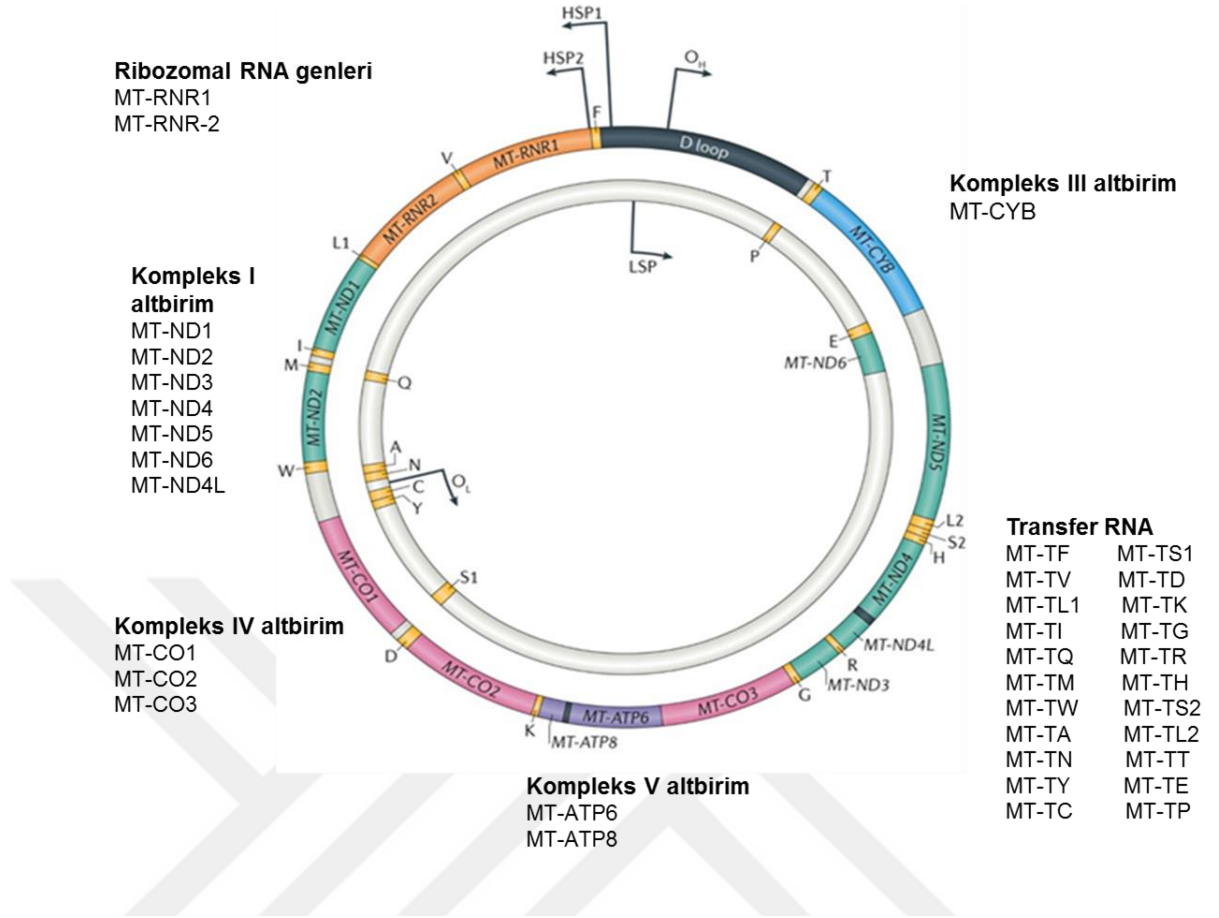
Kunze ve Berger'den, 2015 uyarlanmıştır.

Tablo 2-1: Mitokondriyal işlevleri olan nükleer genlerden örnekler
(Gorman, G. S ve ark.2016'dan uyarlanmıştır (52))

Solunum zinciri alt birimleri	Aminoasit-tRNA sentetazlar	tRNA modifikasyonu
Kompleks I: <i>NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUF1, NDUF2, NDUF9, NDUF10, NDUF11, NDUF12, NDUF13, NDUF2, NDUF6 ve NDUF11</i>	<i>AARS2, DARS2, EARS2, RARS2, YARS2, FARS2, HARS2, LARS2, VARS2, TARS2, IARS2, CARS2, PARS2, NARS2, KARS, GARS, SARS2 ve MARS2</i>	<i>MTO1, GTP3BP, TRMU, PUS1, MTFMT, TRIT1, TRNT1 ve TRMT5</i>
		Toksik bileşiklerin metabolizması
		<i>HIBCH, ECHS1, ETHE1 ve MPV17</i>
Kompleks II: <i>SDHA, SDHB, SDHC, SDHD ve SDHAF1</i>	Deoksiniükleotid trifosfat sentezi	mRNA işlenmesi
Kompleks III: <i>UQCRB, BCS1L, UQCRC2, CYC1, TTC19, LYRM7, UQCC2 ve UQCC3</i>	<i>DGUOK, TK2, TYMP, MGME1, SUCLG1, SUCLA2, RNASEH1, C10orf2, POLG, POLG2, DNA2 ve RRM2B</i>	<i>LRPPRC, TACO1, ELAC2, PNPT1, HSD17B10, MTPAP and PTC1D1</i>
Kompleks IV: <i>COA5, SURF1, COX10, COX14, COX15, COX20, COX6B1, FASTKD2, SCO1, SCO2, LRPPRC, TACO1 ve PET100</i>	Fosfolipid metabolizması	Protein kalite kontrolü ve bozunma
	<i>AGK, SERAC1 ve TAZ</i>	<i>FBXL4, AFG3L2 ve SPG7</i>
Kompleks V: <i>ATPAF2, TMEM70, ATP5E ve ATP5A1</i>	Uzama faktörleri	Mitoribozomal proteinler
Koenzim Q10 eksikliği: <i>PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ4, COQ6, COQ8A, COQ8B ve COQ9 (sekonder kusurlar ETFDH ve APTX)</i>	<i>TUFM, TSFM ve GFM1</i>	<i>MRPS16, MRPS22, MRPL3, MRP12 and MRPL44</i>
Demir-kükürt protein topluluğu	Mitokondriyal füzyon ve fizyon	ATP ve ADP taşınması
<i>ISCU, BOLA3, NFU1 ve IBA57</i>	<i>OPA1 ve MFN2</i>	<i>ANT1</i>

2.4.6. Mitokondriyal Genom

İnsan mtDNA molekülü 1981'de dizilenmiştir (53). Sadece maternal geçişi olan, 16.569 baz çifti (bp) uzunluğunda, çift sarmallı dairesel bir moleküldür. mtDNA'da, biri 16S diğeri 12S olmak üzere iki ribozomal RNA (rRNA), 22 transfer RNA (tRNA) ve 13 mesenger RNA (mRNA) (OXPHOS için gerekli olan alt birimlerin 13'ü) olmak üzere toplam 37 gen bulunmaktadır (54). Ayrıca, nükleer genomun aksine, mtDNA genleri intronik dizi içermez ve kodlamayan dizinin çoğu, üç iplikli D-loop denilen tek bir bölgede bulunur (Şekil 2-7). mtDNA molekülünün çift zinciri, nükleotid bileşimlerine ve santrifüjlemeden sonra farklı dağılımlarını yansıtan yoğunluklarına göre adlandırılır. "Ağır" (H) zincir, yüksek guanin nükleotid oranına göre isimlendirilirken, tamamlayıcı zincir "hafif" (L) olarak tanımlanır.



Şekil 2-7: İnsan mitokondriyal genomu ve genler.

~ 16.6 kb'lık dairesel, çift sarmallı bir DNA molekülüdür. DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunun düzenlenmesinde rol alan ve yer değiştirme döngüsü (D döngüsü, *displacement*) adı verilen 1.1 kb kodlamayan bölge ve 37 gen içerir. Yedi adet kompleks I (7/44), 1 kompleks III (1/11), 3 kompleks IV (3/14) ve 2 kompleks V (2/16) olmak üzere toplam 13 polipeptid alt birimi mtDNA tarafından kodlanır. MT-RNR1 ve MT-RNR2, rRNA genleridir ve sırasıyla 12S ve 16S rRNA'yı kodlar. Mitokondriyal protein sentezi için gereken toplam 22 adet tRNA genleri "Q" ve "L" gibi tek harflerle gösterilmiştir. O_H ve O_L, ağır iplikli ve hafif iplikli mtDNA replikasyonunun başlangıç bölgesini gösterir. O_H: *Origin of the heavy strand*, O_L: *Origin of the light strand*, HSP: *heavy strand supportive*; LSP: *light strand supportive*. (Gorman, G. S ve ark'dan uyarlanmıştır Nature, 2016).

İnsan mitokondrilerinde, sırasıyla dokuz monosistronik ve iki bisistronik ORFs'yi (*open reading frames*) sonlandırmak için UAA ve UAG durdurma kodonu olarak görev yapar. Ayrıca, mtDNA'nın 4 kodonu nDNA'dan farklı mesajlar taşır: i)UGA nükleer genomda "stop" kodonu iken mitokondride triptofan kodlar, ii)AGA/AGG nükleer genomda arginin kodu iken mitokondride herhangi bir mt-tRNA veya protein faktörü tarafından tanınmayan "stop"

kodonudur, iii)AUA nükleer genomda izolösün kodlarken mitokondride metionin kodonudur.

mtDNA'nın mutasyon oranı, nDNA 'nın yaklaşık 10 katıdır. Bunun sebeplerinden biri mtDNA'nın matriks içindeki zararlı reaktif oksidatif türlerine (ROS) yakın olmasıdır. nDNA, histon bağlanması yoluyla kromatin türevi nükleozomlar olarak paketlenirken, mtDNA histon içermez (55).

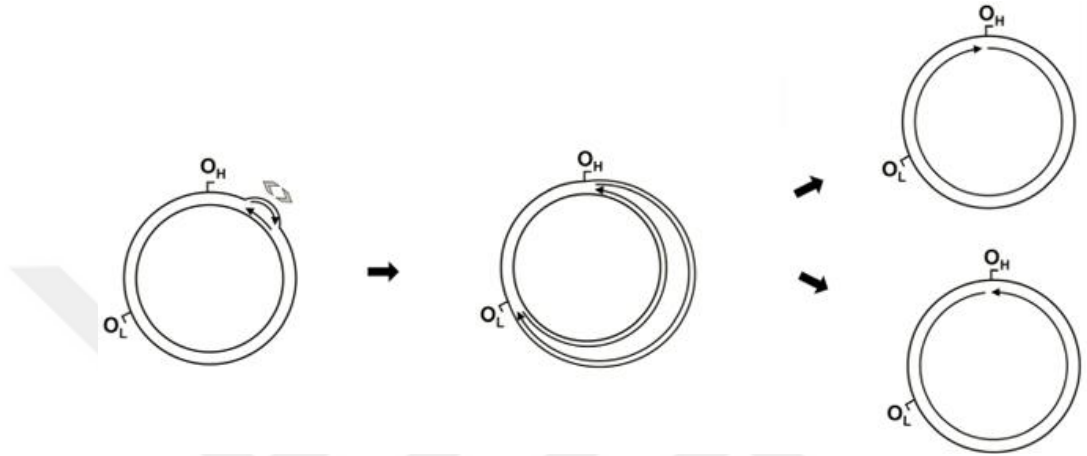
Her bir hücrenin diploid nükleer genomu olan sadece bir çekirdeği olmasına rağmen, bir hücre, her biri kendi matriksi, içinde mtDNA'nın birden fazla kopyasına sahip birçok mitokondriye sahiptir. mtDNA ile ilişkili patolojiler için önemli sonuçlar doğuran ve genetik danışmayı zorlaştıran, mtDNA kopya sayısının, bireyler arasında ve aynı kişide farklı dokular arasında büyük farklılıklar göstermesidir (54).

2.4.7. Mitokondriyal DNA Replikasyonu

mtDNA replikasyonu matrikste meydana gelir ve hücre bölünmesini takiben yeni hücreler için yavru mitokondrileri oluşturarak hücrenin metabolik dengesinin devamını sağlar. Hücre siklusu boyunca görülür ve şartlar değiştikçe metabolik ihtiyaca göre ortalama miktarı sürdürecektir şekilde devam eder. Asimetrik veya simetrik olarak gösterilen bir dizi mtDNA replikasyon modeli bulunmaktadır (56). “Zincir-yer değiştirme” modeli, “bootlace (bağcık)” veya “RITOLS” modeli ve “zincir eşleşmiş çift yönlü” model gibi tüm modeller destekleyici in vitro deneysel kanıtlara sahiptir ve in vivo olarak birbirini dışlayamazlar. İn vivo CHIP verileri, en çok asenkronize mtDNA replikasyonu modelini desteklemektedir ancak henüz tam bir fikir birliği sağlanamamıştır (57).

mtDNA replikasyonunun zincir-yer değiştirme modelinde, replikasyon, mitokondriyal genom üzerindeki iki bölgeden, asenkronize başlar ve önce ağır zincir orijininin (O_H) mtDNA'nın üçte ikisi kopyalanana kadar, tek yönlü ve kesintisiz ilerler (58). Bu noktada, hafif zincir replikasyon orjininde (O_L) bir stem-loop (kök-döngü) yapısı oluşur, RNA primerinin sentezi için POLRMT bağlı bölgeye yönlendirilmesi ile hafif zincir replikasyonu zıt yönde başlar (56). Bootlace modelinde her iki zincirin senkronize olarak ilerlediği tek bir replikasyon orjini (O_{riZ}) vardır. Ribonükleotit geçişli zincir (RITOLS) modeli de benzerdir fakat replikasyon çatalı ilerledikçe, tRNA ve mRNA transkriptleri gerideki kalıp zincire

hibridize olur. İki yönlü replikasyon modelinde, her iki zincirde ~4kb'lık mesafelerde çoklu replikasyon orijinlerinde (O_H) başlar ve mtDNA molekülü etrafında çift replikasyon çatalı oluşturarak ilerler ve yer değiştirme döngüsünün (D-loop) üçlü sarmallı yapısı, replikasyonu durdurur (58,59) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: MtDNA'nın iki yönlü replikasyon modeli.

mtDNA replikasyonu O_H 'de başlar ve yavru zincir sentezlenirken ağır ve hafif zincirleri ayırır. Hafif zincir, O_L 'a ulaşılana kadar tek sarmallı kalır. Hafif zincirin replikasyonu başlar ve her iki zincir replikasyonu tamamlanana kadar sürer (McKinney ve Oliveira, 2013'den uyarlanmıştır)

Replikasyonu kontrol eden anahtar mitokondriyal proteinler, topoizomera (Z), helikaz (PEO1), polimeraz (POLG ve POLG2) ve RNA primerleri sentezleyen RNA polimeraz (POLRMT), DNA sentezini başlatan ribonükleaz (RNASEH1), mitokondriyal DNA ligaz (LIG3) ve tek zincir RNA bağlayıcı protein mtSSB (SSBP1) olarak sayılabilir (60). Ek olarak, yavru moleküllerin sentezi için gereken uygun miktarda serbest deoksiribonükleotid 5'-trifosfatların sağlanması için deoksiguanozin kinaz (DGOUK), timidin fosforilaz (TYMP), ribonükleotit redüktaz (RRM2B) ve timidin kinaz (TK2) proteinleri de işlev görür (60).

2.4.8. Mitokondriyal DNA Onarımı

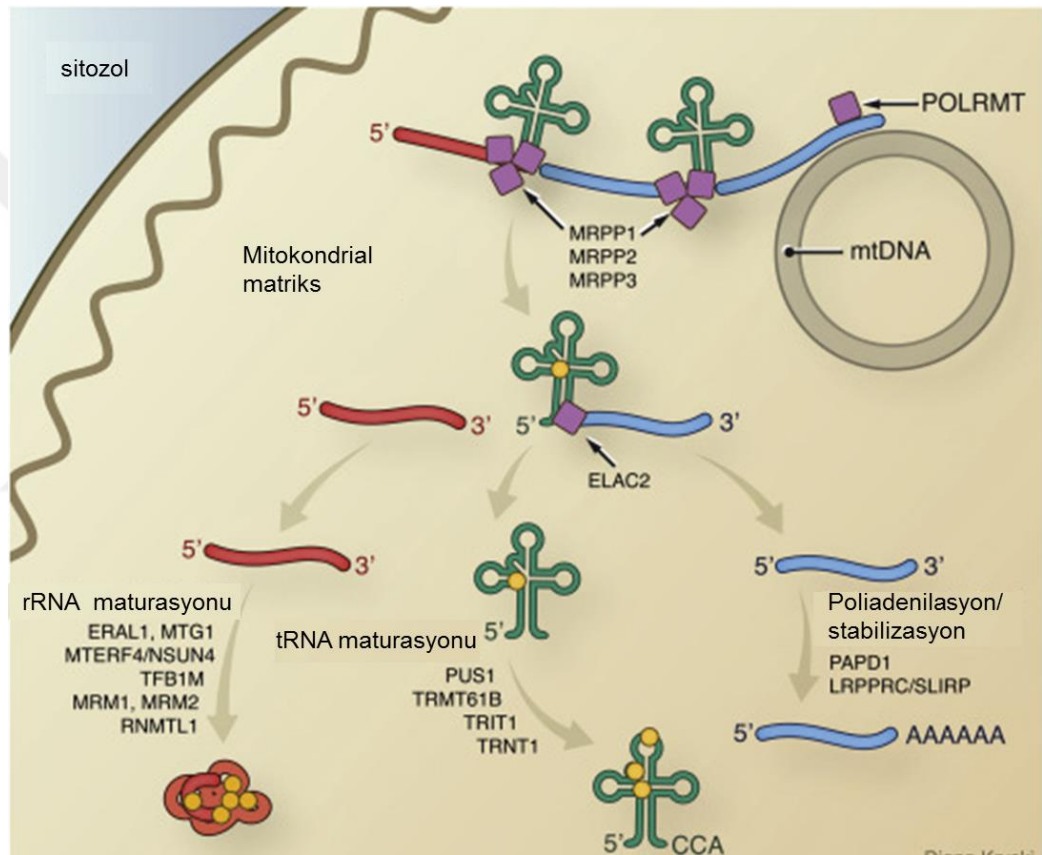
Replikasyon hataları, gama (γ) polimerazın 3'-5' eksonükleaz aktivitesi tarafından tanınarak onarılır ve replikasyon $<1 \times 10^{-6}$ bp hata oranıyla sonuçlanır. İlaveten, mitokondriyal genom onarım eksonükleaz 1 (MGME1)

tarafından, tek iplikli DNA ve serbest uçlu DNA kesilir ve böylece hasarlı mtDNA molekülleri ve eksik replikasyon ürünleri çıkarılır (61,62). mtDNA hasarı, endojen (örneğin ROS) ve ekzojen (örn. UV) kaynaklı olabilir, baz eksizyon onarımı (BER) ve çift zincirli kırık onarımı (DSBR) ile tamir edilir (63). mtDNA hasarı genellikle endojen oksidatif radikallere maruziyetten kaynaklandığından, onarım, hasarlı nükleotitin eksizyonunu, DNA uç onarımı, boşluk doldurma ve ligasyonu içeren BER yolundan geçer (64). Somatik çift sarmallı (ds) mtDNA kırılmaları, nükleer dsDNA kırılmalarına kıyasla hücre canlılığı üzerinde daha az etkiye sahip olsa da, mtDNA'nın klonal artışının hücreye zararlı sonuçları önlemek için mikrohomojoloji aracılı homolog uç birleştirme (MMEJ) onarımı kullandığına dair de kanıtlar vardır (65).

2.4.9. Mitokondriyal Transkripsiyon

mtDNA'nın, nDNA'dan bağımsız bir replikasyon ve transkripsiyon sistemi olmasına rağmen, replikasyon ve transkripsiyon için gerekli tüm enzimler nDNA tarafından kodlanmaktadır. mtDNA tarafından kodlanan genlerin transkripsiyonu, TFAM'la, POLRMT, TFB1M ve TFB2M' nin katılımı ile, hem ağır zincir transkripsiyonunun promoterları olarak anılan HSP1 ve HSP2' de, hem de hafif zincir transkripsiyonunu başlatan LSP' de, polisistronik bir şekilde gerçekleşir (Şekil 2-9) (polisistronik mRNA birden fazla genin kodlarına sahiptir) (66,67). HSP1 promotörü ile ilişkili transkript, *MTRNR1* ve *MTRNR2* (12S ve 16S rRNA'ları kodlayan), *MTTV* ve *MTTF* (mitokondriyal valin ve fenilalanin tRNA'ları) içeren kısa bir mRNA'dır. HSP2 ile ilişkili transkript, kalan genleri (12 mRNA ve 11 tRNA) kapsayan oldukça uzun bir polististronik mRNA'dır. Yapılan bazı *in vivo* çalışmalar HSP2'nin transkripsiyon başlangıcına katılımını doğrulayamamıştır ve HSP1'in ağır zincir transkripsiyonundan tek başına sorumlu olduğu düşünülmektedir (68). Hafif zincirin transkripsiyonu, bir polipeptid (*MTND6*) ve sekiz tRNA içeren, polististronik bir mRNA ile sonuçlanır (69). TFAM, POLRMT, TFB1M ve TFB2M'ye ek olarak, diğer önemli mitokondriyal transkripsiyon proteinleri arasında TEFM transkripsiyon uzama faktörü, MRPL12, büyük mitoribozom alt biriminin bir bileşeni ve MTERF1, HSP1'den üretilen transkriptlerin transkripsiyon sonlandırmasında yer alan bir DNA bağlayıcı protein bulunur (70). Mitokondrinin spesifik genetik kodlarını

kullanarak 22 tRNA ile organelle spesifik protein sentezi yapılmakta ve protein sentezi sırasında sitoplazmadan mitokondriye herhangi bir tRNA gelmemektedir. mt-tRNA molekülleri çoğu polipeptit ve rRNA kodlayan genlerin hemen 3' ve 5' yakınında yer almakta ve polisistronik transkriptlerden transkripsiyon sonrası ayrılmaları ile olgun polipeptit mRNA molekülleri meydana gelmektedir (71). tRNA'nın 5' kuyruğu RNaseP kompleksi tarafından bölünürken (sırasıyla *TRMT10C*, *HSD17B10* ve *MRPP3* tarafından kodlanan MRPP1, MRPP2 ve MRPP3 'ten oluşur) 3' ucu şu RNaseZ ile kesilir (*ELAC2*).



Şekil 2-9: mt-tRNA'nın polisistronik transkriptlerden bölünmesi.

POLRMT tarafından yapılan transkripsiyonun ardından, RNaseP ile işlenmesi sonucu mt-mRNA, mt-tRNA ve mt-rRNA molekülleri serbest kalır. Hallberg ve Larsson'dan uyarlanmıştır, 2014 (72).

2.4.10. Mitokondriyal Translasyon

Mitokondriyal translasyonun ana bileşeni ribonükleoprotein mitoribozomdur (73). Mitoribozomların, her biri çok sayıda protein bileşeni ve RNA 'dan oluşan büyük ve küçük olmak üzere iki alt birimi vardır. Mitokondrinin

bakteriyel kökeni göz önüne alındığında, mitoribozomun benzer olması şaşırtıcı değildir; buna rağmen, ökaryotik mitoribozomların bileşenleri bakteriyel ribozomdan belirgin şekilde farklıdır (74). Evrim sırasında ökaryotik mitoribozomlar, bakteriyel ribozomların sahip olduğu büyük RNA yapılarının çoğunu kaybetmiştir, ancak insan mitoribozomunun çözölmüş kristal yapısı önemli ölçüde yüksek bir protein içeriğine sahiptir (75). Bu ilave proteinler, hem bakteriyel hem de sitoplazmik ribozomlarda homologları olmayan, mitoribozomlara özgüdür (76). Aslında, sitozolik 80S alt birimde protein/RNA oranı (%30 protein/%70 RNA) mitoribozomun karşılık gelen (55S) alt biriminde (%30 RNA ile %70 protein) tersi gibidir.

Mitokondriyal mRNA proteinlerinin translasyonu, mitokondriyal matrikste dört korunmuş anahtar aşama ile gerçekleşir:

1) Başlama: mRNA mitoribozom'a bağlanır ve uygun başlangıç kodonu, küçük mitoribozomal alt birim (mt-SSU) ve başlatma faktörü mtIF3'ten oluşan bir başlatma kompleksi ile tanınır. Mitokondriyal başlatma faktörü mtIF2, posttranslasyonel modifiye bir metionin tRNA'ya bağlanmayı sağlar. Bu metionin modifikasyonu, metionil-tRNA formiltransferaz (*MTFMT*) ile formillenme ve metiyonine özgü mt-tRNA sentetaz (*MARS2*) ile aminoasillenme ile sağlanır. Formilleme, mtIF2'ye olan afinitiyi artırır ve uzama sırasında translasyonun başladığı mt-SSU ve mRNA ile stabil bir başlangıç kompleksi oluşturur (77).

2) Uzama: Bu aşamada amino asitler, kendisine spesifik bir mitokondriyal tRNA molekülü tarafından, büyüyen polipeptit zincirine eklenir. Üç temel uzama faktörü bilinmektedir -mitoribozomun A-bölgesine aminoasıl-tRNA'yı ileten mitokondriyal translasyon uzama faktörü Tu (TUFM / EF-Tumt), guanin nükleotid değişim faktörü Ts (TSFM / EF-Tsmt) ve translokasyon sırasında mRNA ve tRNA hareketini koordine eden mitokondriyal uzama faktörü G1 (GFM1 / EF-G1mt) (77).

3) Sonlanma: Mitoribozom, A bölgesinde durdurma kodonlarından (UAA, UAG, AGA veya AGG) biriyle karşılaştığında translasyon durur. Bu noktada mitokondriyal bırakma faktörü (mtRF1a) mitoribozomla bağlanır ve

olgun proteini serbest bırakır. C12orf65 ve ICT1 gibi diğer önemli proteinler de translasyon sonlandırmasında yer alır (76).

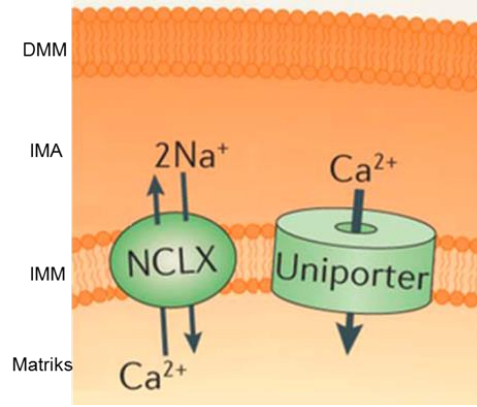
4) Geri Dönüşüm. Translasyonun son adımı, mitokondriyal ribozomun geri dönüşümünü indükleyen faktörlerle (MTRF1/RF1mt ve MRRF/RRF1mt) mitoribozomun serbesleşmesini içerir. Mitokondriyal uzama faktörü G2 (GFM2 / EFG2mt) ile mRNA ve tRNA yı bir sonraki translasyona hazırlık için mitoribozomdan ayırır (78).

2.4.11. Mitokondrial Fonksiyon

Oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezi en bilinen fonksiyonu olmakla birlikte, mitokondrinin kalsiyum homeostazı, hem ve demir-kükürt kümesi biyogenezi ve apoptoz da dahil olmak üzere birçok temel hücrel fonksiyonu vardır (79,80,81).

2.4.11.1. Kalsiyum homeostazisinde mitokondrinin rolü

Dış mitokondriyal membran (DMM) kalsiyuma geçirgendir ve sitoplazmik kalsiyum arttığında, mitokondriyal intermembranöz aralıkta (IMA) kalsiyum konsantrasyonu artar. İç mitokondriyal membran (IMM) ise seçici geçirgendir ve kalsiyumu matrikse geçirmek için, iç zara gömülü mitokondriyal kalsiyum *uniporter* (MCU) işlev görür ve böylelikle matrikse kalsiyumun aşırı geçişini önler (Şekil 2-10). MCU por yapısı oluşturan dimerize bir proteindir ve açık durumu MICU1, MICU2 ve EMRE (*Essential MCU Regulator*) tarafından negatif olarak düzenlenmiştir. Düşük kalsiyum seviyelerinde kalsiyumun matrikse alınımı inhibe olur. Sitoplazma / IMA'da yüksek kalsiyum konsantrasyonları altında ise dimerize MICU1-MICU2 kompleksine kalsiyum bağlanır ve MCU porlarının açılmasını uyarır. IMA ve matriks arasındaki voltaj farkı ~ 200mV'dır, yani pozitif yüklü kalsiyum iyonları negatif yüklü matrikse doğru akarak Ca^{++} konsantrasyonunu dengeler (82). Kalsiyumun matriksten dışa verilmesi ise aktif transportla olur ve sodyum-kalsiyum değişim proteini, NCLX (*SLC24A6*) veya Ca^{+2}/H^{+} değişim proteini, HCLX (*LETM1*) rol alır (83,84).



Şekil 2-10: Sodyum-kalsiyum değıştirci ve tek yönlü kalsiyum taşıyıcı sistemi

(Kamer ve Mootha, 2015 'den uyarlanmıştır.)

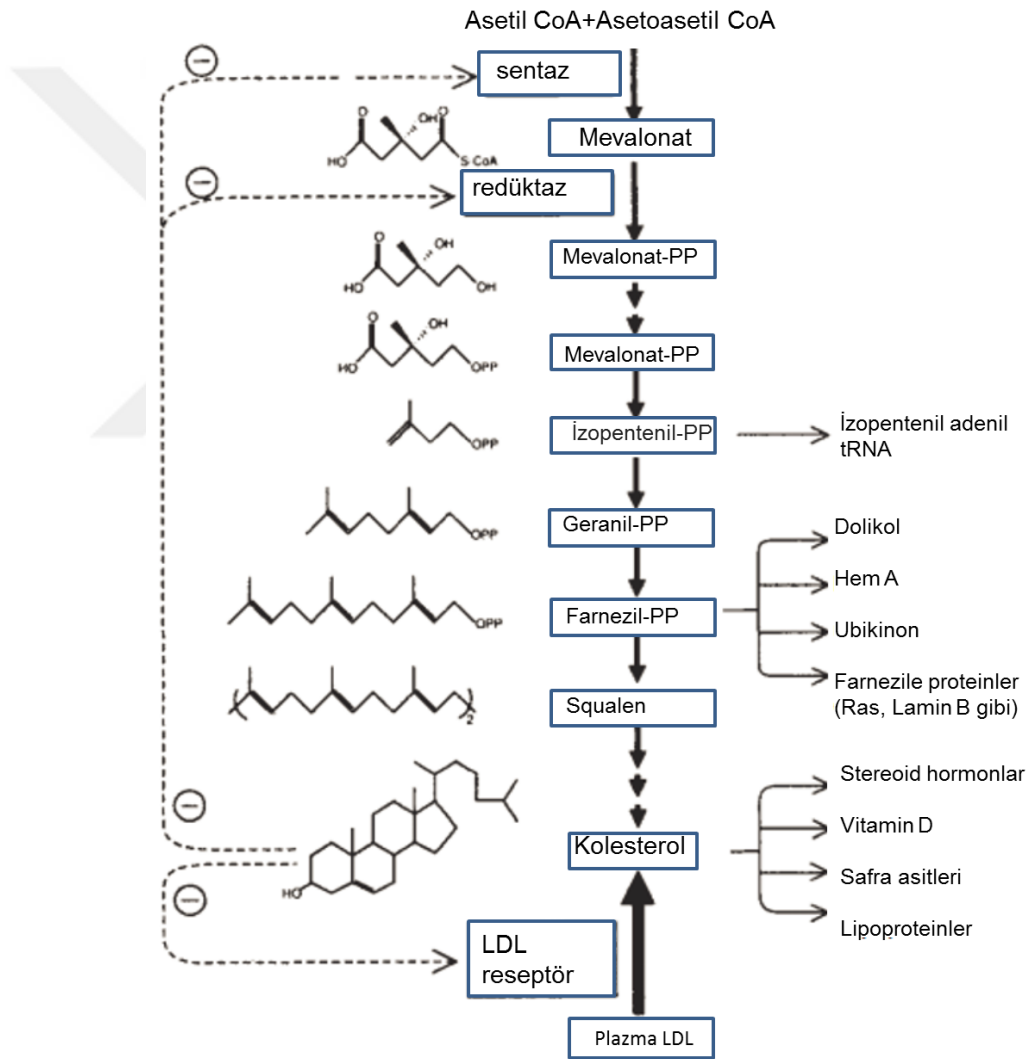
2.4.11.2. Demir-sülfür (Fe-S) kümesi biyogenezinde mitokondrinin rolü

Fe-S kümesi biyogenezi, en dejenere mitokondri formları tarafından bile gerçekleştirilen evrimsel olarak korunmuş, temel bir mitokondriyal işlevidir (85). Memeli Fe – S kümeleri, demir ve inorganik sülfürden oluşan inorganik kofaktörlerdir. Proteinlerin sisteinil ligandlarına bağlanarak proteinlere redoks reaksiyonlarına girme kabiliyetleri de dahil olmak üzere çeşitli yetenekler kazandırır ve böylece mitokondriyal solunum zinciri içindeki kullanımlarını destekler (86). Solunum zinciri kompleksleri I, II ve III' te 12 mitokondriyal Fe-S kümesi, akonitaz ve ek olarak çekirdek ve sitosol de Fe-S küme proteinleri vardır (87,88). Mitokondriyal Fe-S küme biyosentezi sistemi, prokaryotik hücrelerinkine benzer ve ilk adımlar, demir verici frataksin (*FXN*), kükürt donörü sistein desülfüraz (*NFS1*) ile ISD11 içeren LYR motifi (*LYRM4*) ve bir bağlanma iskelesi, ISCU kompleksi içerir. Fe-S kümesi konfigürasyonları için gerekli elektronlar, ferredoksinler (*FDX1/FDX2*) ve ferredoksin redüktaz (*FDXR*) tarafından sağlanır (89). Fe-S kümeleri alıcı proteinlere, doğrudan veya bir ara şaperon sistemi yoluyla yerleştirilir.

2.4.11.3. Koenzim Q (Ubikinon) biyosentezi

Koenzim Q (CoQ)'nun önemli miktarı mitokondride sentezlenir ve yapısında bulunan poli izoprenoid yan zincirli benzokinon halkası, CoQ'nun hücre zarının fosfolipid çift katmanı içinde stabilizasyonunu sağlar. İnsanlarda CoQ, on adet izoprenoid birime sahiptir (CoQ10) ve IMM içindeki mevalonat yolağında bir COQx enzim kompleksi tarafından sentezlenir (Şekil 2-11)

(90,91). CoQ biyosentezi, kolesterol sentez yolunun önemli bir düzenleyicisi olan hidroksimetilglutaril-koenzimA (HMG-CoA) redüktaz ile (HMGCoA' nın mevalonata dönüştürülmesinde rol alır) kompleks içindeki birçok enzimin düzenleyici kontrolü altındadır. Diğer düzenleyiciler arasında, CoQ sentezinin sondan bir önceki basamağından sorumlu olan ve stres koşulları altında PPAR α ve NF κ B tarafından inhibe edilen CoQ7 (COQ7) ile CoQ sentezini fosforilasyon yoluyla ATP bağımlı bir feedback (geri besleme) döngüsünde düzenlediği hipoteziyle CoQ8 (ADCK3) yer alır (92,93).



Şekil 2-11: İnsan mevalonat yolağına genel bakış.

De novo ubiquinol sentezi substrat olarak asetil Co A kullanılarak (glikolizden sonra üretilir) mitokondri içinde gerçekleşir. (Goldstein and Brown, 1990'dan uyarlanmıştır.).

2.4.11.4. Hem biyosentezinde mitokondrinin rolü

Hem molekülleri, birkaç metabolik proteinin temel prostetik gruplarıdır. Bunlar, sitokromların hayati bileşenleri olan demir içeren siklik tetrapiroller ve hem B formunu bulunduran hemoglobin ve miyoglobin proteinleridir. Heme biyosentezi, sitozolik ve mitokondriyal substratların ve enzimlerin koordinasyonunu gerektiren dört aşama ve sekiz biyosentetik reaksiyon içerir: 1) tek bir pirol halkasının başlangıç sentezi, 2) tetrapirollerin (porfirin halkası) komplet birleşimi, 3) yan zincir modifikasyonları ve son olarak 4) fonksiyonel heme yapısı için tetrapiröl halkasına demir eklenmesidir (95).

1. Piroller için karbon ve azot kaynağı, glisin ve süksinil koA'nın dekarboksilasyonu ile oluşan 5-aminolevulinik asittir (ALA). Enzim ALA sentaz (ALAS) ve kofaktör piridoksal fosfattır. Memeli ALA sentazlarının iki izoformu vardır, ALAS1 tarafından kodlanan *housekeeping* ve eritroide özgü form, ve ALAS2'nin kodladığı mitokondriyal form. Daha sonra ALA, IMM glisin değişim proteini SLC25A38 tarafından IMM'ye alınır. ALA dehidrataz (ALAD), iki ALA molekülünün birleşmesiyle porfobilinojen (PBG) oluşur. Bu birim tek pirol halkasını temsil eder.

2. Dört PBG molekülü, doğrusal 1-hidroksimetilbilan oluşturmak için porfobilinojen dehidrataz (PBGD) enzimiyle birleştirilir. Uroporfirinojen III sentaz (UROS), 1 hidroksimetilbilanı siklik üroporfirinojen III'e dönüştürür. Takiben üroporfirinojen III dekarboksilaz ile koproporfirinojen III'e dönüşür (CPIII).

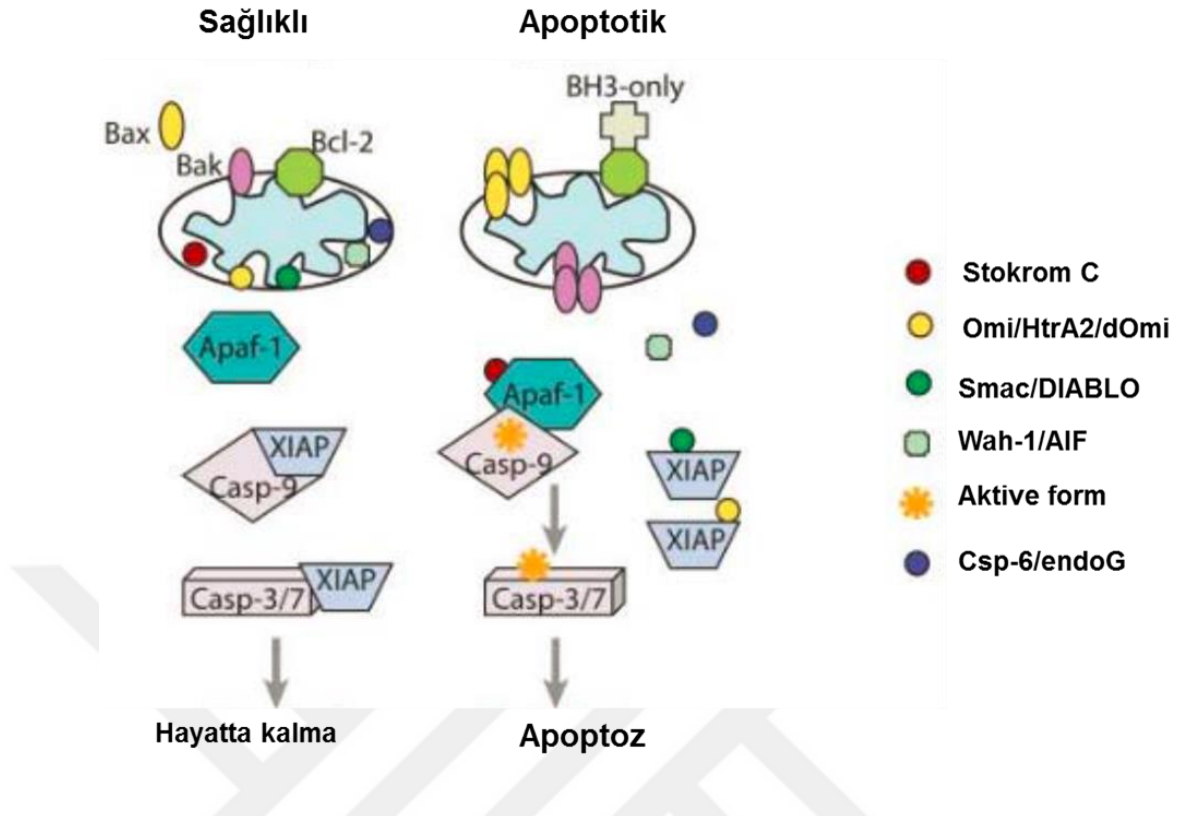
3. CPIII, dış mitokondriyal membran boyunca, muhtemelen IMS içinde meydana gelen hem biyosentezinin son aşamaları için taşıyıcı protein yoluyla geri taşınır. Koproporfirinojen III oksidaz, protoporfirinojen IX üretmek için propionat gruplarından ikisini vinil gruplarına dönüştürür ve bu daha sonra protoporfirinojen IX oksidaz (PPO) ile protoporfirin IX'a dönüştürülür.

4. Hem biyosentezinin son aşaması, hem B oluşturmak için protein ferroşelataz (FECH) içeren Fe-S kümesi tarafından protoporfirin IX yapısına demir eklenmesini içerir.

2.4.11.5. Apoptozda mitokondrinin rolü

Apoptoz, organizmaların işlevini yitiren hücreleri programlı olarak yok etme yöntemidir. Bcl-2 ailesi proteinleri, genellikle apoptozda kritik bir erken basamak olan mitokondriyal dış zar geçirgenliğini düzenler. Bu globüler α -sarmal proteinler, anti- veya proapoptotik etkilerine göre sınıflandırılır. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve A1 dahil olmak üzere antiapoptotik aile üyeleri, BH1 ila BH4 olmak üzere dört korunmuş Bcl-2 homoloji domainine sahiptir. Proapoptotik aile üyeleri ise iki kategoriye ayrılır: "multidomain" veya "BH1-3" (BH1, BH2 ve BH3 bölgelerini içerir) ve "sadece BH3" proteinleri (96). Bcl-2 ailesi proteinlerinin dış zar geçirgenliğini tam olarak nasıl düzenlediği hala belirsizdir. Genetik ve biyokimyasal çalışmalar, BH1–3 proteinlerinin (Bax, Bak ve benzer şekilde, belki de Bok) birçok apoptoz formu ve mitokondriyal dış zar geçirgenliği için gerekli olduğunu göstermektedir. Dahası, "sadece BH3" proteinleri, apoptozu indüklemek için multidomain proteinlerin (Bax, Bak) yukarı yönde hareketini etkiliyor gibi görünmektedir.

Hücre stresi ile, mitokondriyal güdümlü apoptoz, bir hücre ölümü sinyal kaskadını tetikleyen Bcl-2 proteinlerinin BH3 aracılı bölünmesini takiben ortaya çıkar. IMA'dan salınan sinyal molekülleri, apoptoz baskılayıcılarının inhibisyonuna ve pro-apoptotik başlatıcı ve efektör kaspazların aktivasyonuna neden olarak, hücre büzülmesine, kromatin yoğunlaşmasına ve nükleer zarın parçalanmasına neden olur; hücre fragmanları fagosite edilir ve geri dönüşüme uğrar (Şekil 2-12) (97).

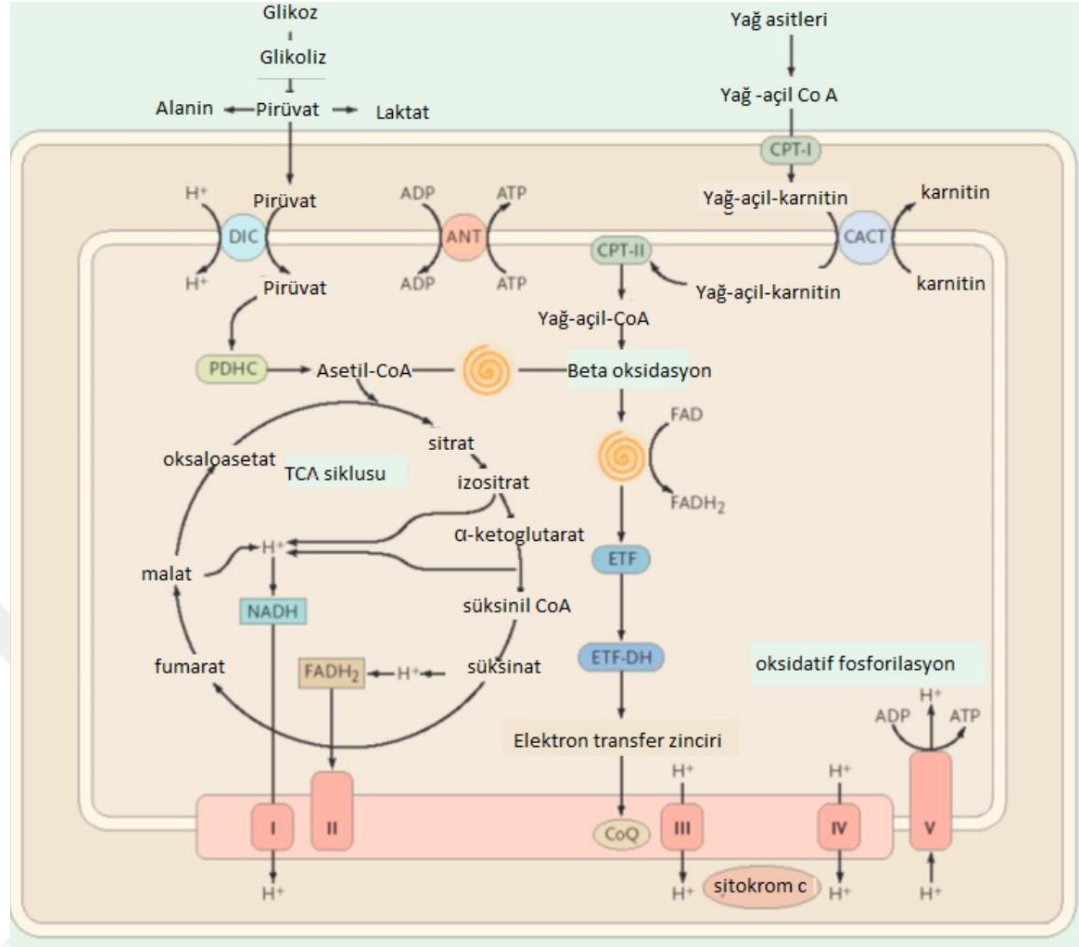


Şekil 2-12: Mitokondrinin apoptozdaki rolü.

Apoptozun aktivasyonu "BH3-only" proteininin transkripsiyonel up-regülasyonu ile başlatılır. Bu da, BAX'ın sitozolden mitokondriye taşınmasını yönlendirmek için Bcl-2'ye bağlanır. Proapoptotik efektörlerin oligomerizasyonu, BAK ve BAX, dış mitokondriyal membranda VDAC1 mega porların oluşumuna aracılık eder ve smac / DIABLO ve sitokrom c salınır. Sitokrom C'nin sitosolik bağlanması, başlatıcı kaspazı (CASP9) etkinleştiren APAF1'i aktive ederken, smac / DIABLO apoptoz inhibitörü XIAP'ı baskılar. Pro-apoptotik efektör kaspazların downstream aktivasyonu hücre ölümünü tetikler. APAF1: apoptotik proteaz aktive edici faktör 1, CASP: kaspaz; AIF: apoptoz indükleyen faktör; smac / DIABLO: kaspazın ikinci mitokondriyal kaynaklı aktivatörü/ düşük pI direk IAP bağlayıcı protein, XIAP: X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü. (Wang ve Youle, 2009'dan uyarlanmıştır).

2.4.11.6. ATP üretiminde mitokondrinin rolü

Sitozolda meydana gelen glikoz metabolizmasının ilk aşaması olan glikoliz hariç, diğer tüm ATP üretim süreçleri, mitokondrinin matriksinde veya İMA'da gerçekleşir (Şekil 2-13). Mitokondrilerin hemen hemen tüm ATP üretiminin yapıldığı yer olması, onlara "hücrenin enerji santrali" lakabını kazandırmıştır.



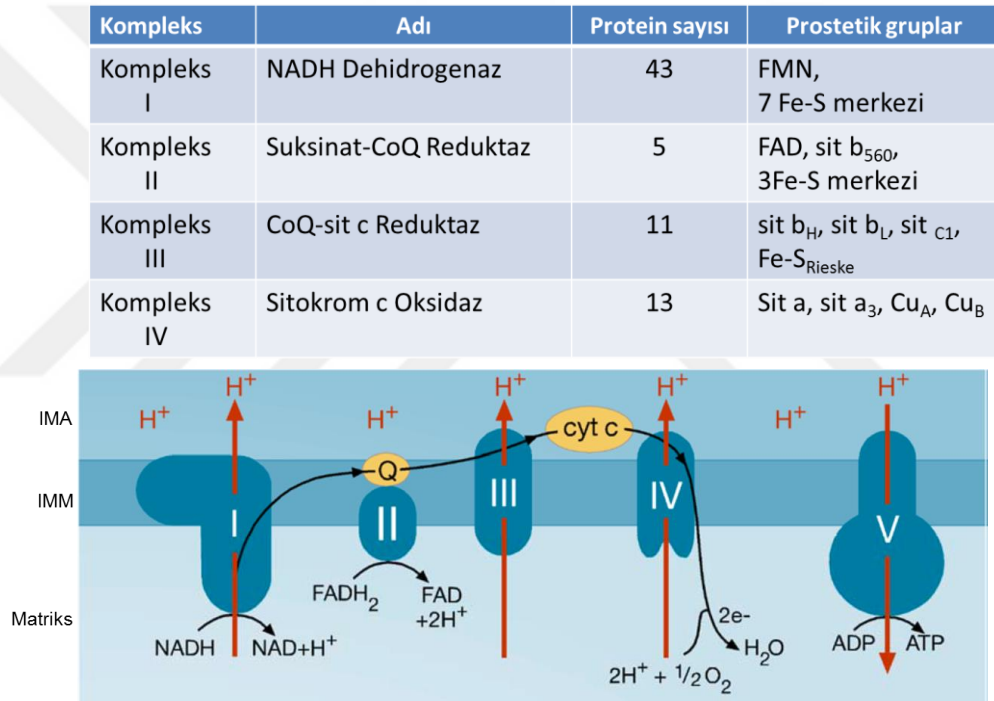
Şekil 2-13: Hücresel enerji metabolizmasına genel bakış.

Glikoliz sırasında glikoz, NADH ve FADH₂ üreten bir dizi reaksiyonun meydana geldiği trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne giren pirüvata dönüşür. Bunlar mitokondriyal solunum zinciri için substrat görevi görür. Diyet kaynaklı yağ asitlerinden ATP üretimi, asil karnitin ve β oksidasyon yollarıyla gerçekleşir. (CPT1: *Carnitine palmitoyltransferase I*, ANT: *Adenine nucleotide translocator*, CACT; *Carnitine-acylcarnitine translocase* ETF-DH: *Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase*, (DiMauro ve Schon, 2003).

2.4.12. Oksidatif Fosforilasyon (OXPHOS)

İnsanda, organik moleküllerin oksidasyonlarının en son basamağı, solunum zincirinde gerçekleşir. Elektronların, enzimlerin kofaktörleri olan NADH ve FADH₂'den O₂'ye taşınması sırasında oluşan proton gradyanının gücü ile ATP sentezlenmesine oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) denir (98). OXPHOS sistemini oluşturan beş multimerik protein kompleksi I-V, aerobik koşullar altında bir dizi redoks reaksiyonu yoluyla, hücresel ATP'nin büyük çoğunluğunu sentezlemekten sorumludur. Substratlar, NADH ve FADH₂, sırasıyla kompleks I ve II yoluyla solunum zincirine girer ve elektronlarının kompleks III'e transferi

için kofaktör ubikinona (Q) geçmesi ile NAD / FAD'a indirgenir. Bu yüksek enerjili elektronların komplekslerden aktarılması, protonların kompleks I, III ve IV tarafından matriksten IMM boyunca IMA'ya eşzamanlı pompalanmasına yol açar (Şekil 2-14) (99). Protonların, proton-zengin matriksten çıkması ve proton bakımından fakir IMA'ya geçmesi, IMM boyunca elektrokimyasal bir gradyan ve proton hareket kuvveti oluşturur. ATP sentezini yönlendiren bu kemiosmotik çekimdir ve protonlar ATP sentazın yarı kanallarından geçerken, ADP ve inorganik fosfattan ATP oluşturmak için moleküler motoru çalıştırır. Kemiosmotik teorinin formülasyonu 1978 yılında Profesör Peter Mitchell'e Nobel Kimya Ödülü kazandırmıştır.



Şekil 2-14: OXPHOS kompleksleri ve ilişkili yardımcı faktörler.

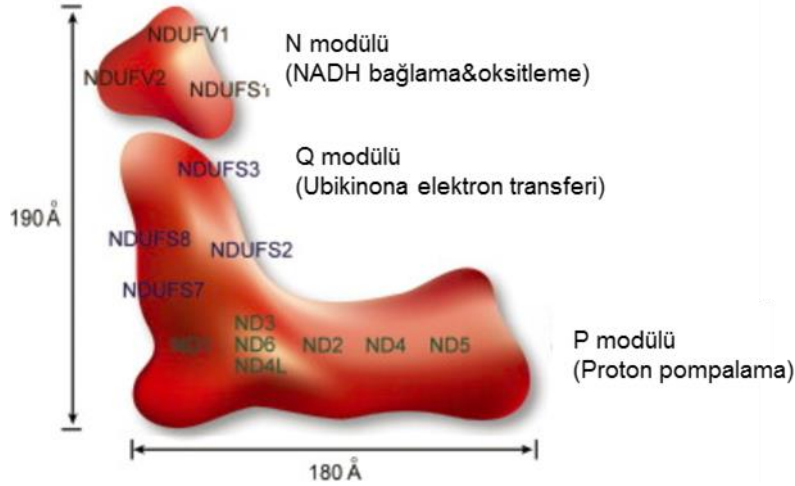
Multimerik protein kompleksleri I-IV, solunum zinciri boyunca, Koenzim Q10 ve sitokrom (cyt c) ko-faktörlerin indirgenmesiyle elektronları taşır. Elektron transferi, iç zar boyunca protonların (H⁺) IMA'ya transferi ile eşleşmiştir ve oluşan proton hareket gücünü, kompleks, V ATP sentezinde kullanır (99).

OXPHOS sistemi, 86 yapısal alt birime ve kompleks bağlanma veya biyogenez için gerekli en az 60 proteine sahiptir (örn. posttranslasyonel modifikasyon).

2.4.12.1. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I

Kompleks I, (NADH: ubikinon oksidoredüktaz) holoenzimi, ~1MDa olup, solunum zincirindeki ilk ve en büyük multimerik komplekstir. Erken elektron mikroskopu çalışmaları, kompleks I'in, iç membrana gömülü bir kola ve matrise çıkıntı yapan bir hidrofilik periferik kola sahip olan L şeklinde bir konformasyona sahip olduğunu ortaya koymuştur (100). Kompleks I, 45 yapısal alt birimden ve kademeli olarak bağlanan N, Q ve P ile gösterilen üç fonksiyonel modülden oluşur. 1:1 stokiyometride 43 alt birim bulunurken, 2:1 stokiyometride NDUFAB1 bulunur (101). En az on altı protein, kompleks I montajı veya biyogenezinde rol almıştır (102). İnsan ve bakteri kompleks I arasında korunan ve kompleks I fonksiyonları olan NADH oksidasyonu, ubikinon indirgenmesi ve proton pompalama için gerekli modülleri barındıran 14 “çekirdek” alt birim vardır. mtDNA ile kodlanan, yedi hidrofobik alt birimin hepsi çekirdek alt birimleri temsil ederken, geri kalan yedi polipeptid, hidrofildir ve nükleer genom tarafından kodlanmıştır (103,104) (Şekil 2-15). Kalan 30 memeli 'süpernumere' veya 'aksesuar' alt birimi evrimsel olarak kazanılmış olup, düşük taksonlarda bulunmalarına rağmen bunların 25'inin CRISPR/Cas9 ve TALEN knock-out yoluyla OXPHOS fonksiyonu için kritik olduğu gösterilmiştir (101). Sadece NDUFV3, NDUFA7, NDUFA12, NDUFS4 ve NDUFS6 eksik hücre hatları hayatta kalabilmiş ve OXPHOS kapasitelerinin bozulmadan kaldığı görülmüştür. Bu veriler, memeli kompleksi I'in çözülmüş kristal yapısı ile birlikte, kompleks I mimarisinin net bir resmini sunmuştur. Ayrıca yapı ve işlevinde önemli bir rol oynayan kritik alt birimlerini ortaya çıkarmıştır.

Kompleks I birleşik yapısının son modelinde, mitokondriyal protein sentezini inhibe etmek için kloramfenikol tedavisini takiben çeşitli zaman noktalarında elde edilen kompleks I düzeneği ara bileşiklerinin kompleksom profillerinden yararlanmıştır. Bu da, her bir bağlayıcı ara maddesindeki proteinlerin aydınlatılmasına ve Q, proksimal P (a)/(b) -, distal P (a)/(b) ve N modüllerinden montaj (birleşme) adımlarının karakterize edilmesine izin vermiştir (105).



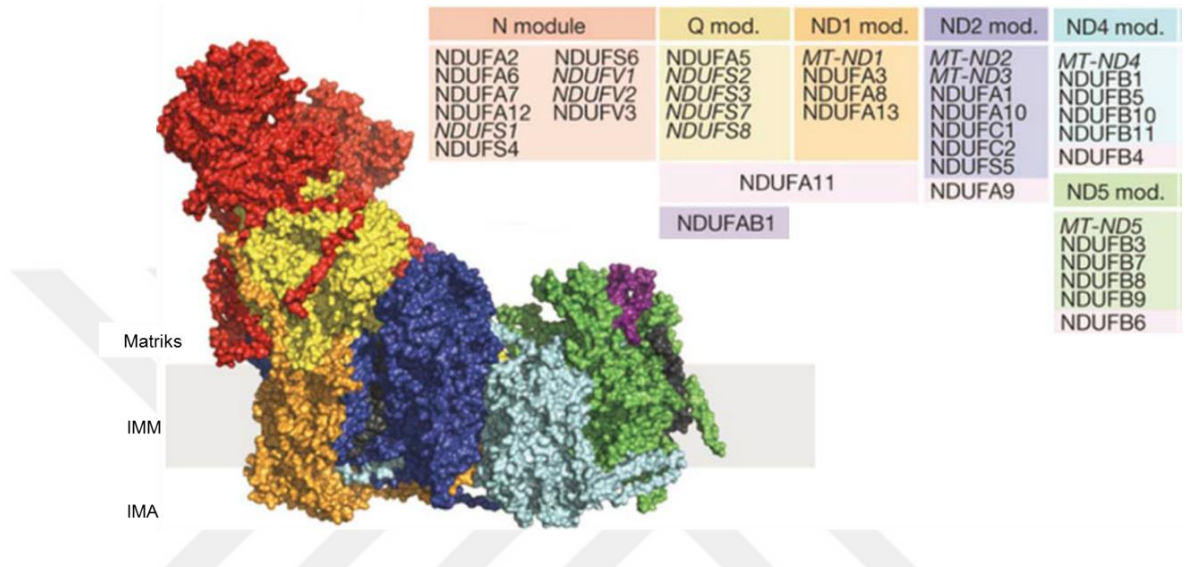
Şekil 2-15: Kompleks I yapısının şematik görünümü.

3 fonksiyonel modülün ve 14 korunmuş çekirdek alt birimin konumu detaylandırılan şekilde, P modülü IMM'da gömülüdür ve yedi mtDNA kodlanmış alt birimi (ND1-6) içerir. Q ve N modülü ise matrise çıkıntı yapar ve sırasıyla ubikinon indirgeme ve NADH oksidasyonu işlevlerini yerine getirir (Mimaki ve ark.'dan, uyarlanmıştır.)

Q modülü, Fe-S içeren NDUFS7 ve NDUFS8 alt birimlerini, iki ek 'çekirdek' alt birimi (NDUFS2, NDUFS3) ve NDUFA5 'aksesuar' alt birimini içerir. Bu modül ilk tanımlanan modeldir (105). TIMMDC1, NDUFAP3 ve NDUFAP4 montaj faktörlerinin işbirliğiyle, proksimal P(a) modülü oluşmaya başladığında mtDNA tarafından kodlanan ND1 proteini eklenir. NDUFAP13, NDUFAP8 ve NDUFAP3 daha sonra dahil edilir, ardından NDUFAP2 ve Q / P(a) alt montajını tamamlayan NDUFAP9 ve NDUFAP1 gelir.

Proksimal P(b) ve distal P(a)/(b) modülünün kalan bileşenleri ayrı ayrı oluşur. Montaj faktörleri NDUFAP1, ECSIT, ACAD9 ve COA1, proksimal P (b) modül montajının ilk aşamalarında NDUFAP1, NDUFAP2 ve ND2'ye aracılık eder. TMEM186 ve TMEM126B tarafından şaperon edilen ND3; ND6 ve ND4L en son dahil edilmiştir (105). Distal P (a) kolunun erken montaj aşamaları NDUFAP5, NDUFAP10 ve NDUFAP11 konjugasyonunu takiben NDUFAP6'yı içerir. Daha sonra TMEM70, ATP5SL ve FOXRED1, ND4 ve NDUFAP1'in dahil edilmesini modüle eder. NDUFAP4, NDUFAP10 ve NDUFAP5 bu distal P kol iskelesine monte edilir. En distal P (b) modülü alt birimleri NDUFAP2, NDUFAP3, NDUFAP7, NDUFAP8, NDUFAP9, NDUFAP1 ve ND5, montaj faktörlerinden net bir işbirliği olmaksızın bir alt modül oluşturur.

kümesini geçer. Her Fe-S kümesi artan bir indirgeme potansiyeline sahiptir, böylece Q modülündeki NDUF87 içindeki terminal (N2) Fe-S kümesinden, ubikinona (CoQ10) aktarılmadan önce kompleks boyunca elektron transferini kolaylaştırır.



Şekil 2-16: Kompleks I fonksiyonel domainlerinin bileşenleri.

Kompleks I; N modülü (kırmızı), Q modülü (sarı) ve proksimal P modülü (ND1/ND2 modülleri, turuncu ve indigo) ve distal P modülü (ND4/ND5 modülleri, camgöbeği ve yeşil) (Stroud ve ark., 2016).

Q modülünün NDUF87 ve NDUF88 alt birimleri arasındaki bir cep, ubikinon bağlama ve ubikuinole indirgenme bölgesi olarak önerilmiştir (112). Bir kez indirgendiğinde, ubikinol (QH₂), IMM içine diffüze olur ve böylece müteakip kompleks III deki elektron alıcısına elektron transferi kolaylaşır. Q'nun QH₂'ye indirgenmesi, iki protonun mitokondriyal matriksten, intermembranöz boşluğa translokasyonu ile eşleşmiştir (113). Bu şekilde her okside NADH molekülü başına IMA'ya verilen iki elektron, elektrokimyasal gradyana ($\Delta\Psi$) kompleks I yoluyla dört proton katkıda bulunur.

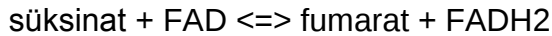
Membrana gömülü P modülü, Q bağlama bölgesinden P kolunun uzak kısmına uzanan ve proton translokasyonu için önemli olduğu düşünülen merkezi eksenli polar rezidülerle 78 transmembran heliks barındırır (114). Transmembran heliksler, N2'den ubikinona elektron transferine yanıt olarak,

domain içinde konformasyonel kaymalar yaratır; bu, subunit benzeri üç antiporter (ND2, ND4 ve ND5) içindeki kanallar boyunca, matriksten IMA'ya proton translokasyonunu yönlendirir (114).

Kompleks I, ATP sentaz fonksiyonu için, iç mitokondriyal membran boyunca proton konsantrasyon gradyanına katkıda bulunan üç OXPHOS kompleksinden ilkidir.

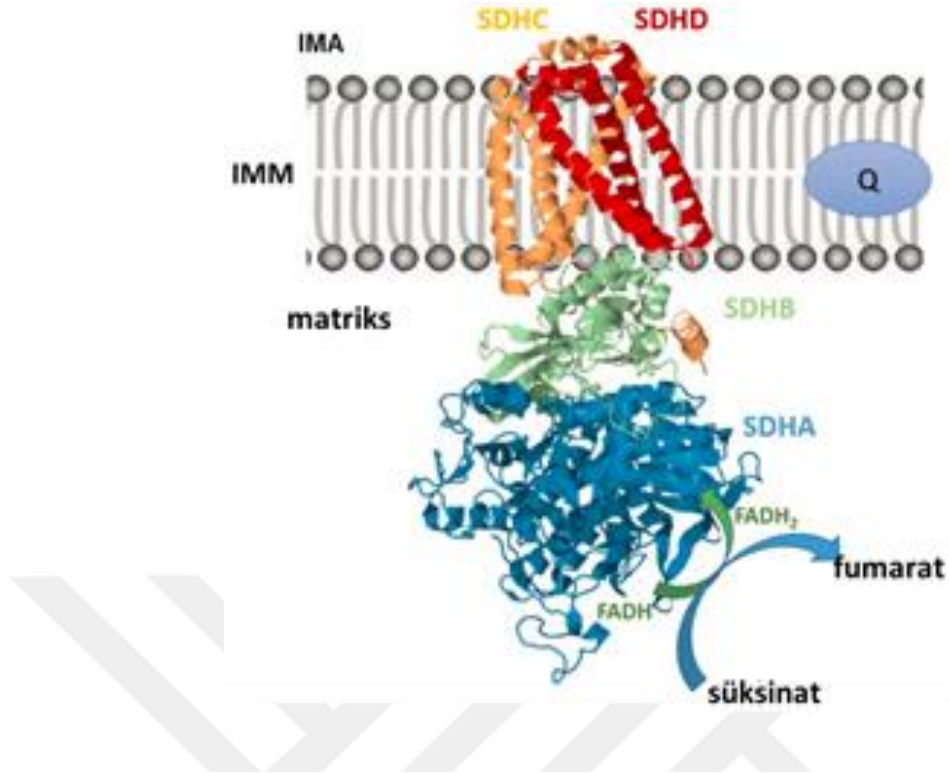
2.4.12.2. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi II

Kompleks II (süksinat: ubikinon oksidoredüktaz), ~260kDa büyüklüğündedir ve nükleer kodlanan 4 alt birimden oluşur. Soluble katalitik flavoprotein (Fp, SDHA) ve demir sülfür (Ip, SDHB) alt birimleri mitokondriyal matrikse doğru çıkıntı yapar ve SDHC ve SDHD alt birimleri ile IMM'a bağlıdır (115) (Şekil 2-17). Kompleks II, ATP sentezinde çift rol oynar - trikarboksilik döngü içinde süksinat ve fumaratın geri dönüşümlü oksidoredüksiyonu ve solunum zinciri içinde ubikinon ve ubikuinolün geri dönüşümlü oksidoredüksiyonu. Süksinat dehidrojenaz, süksinatın oksidasyonunu geri dönüşümlü katalizler, fumaratın süksinata indirgenmesini fumarat redüktaz katalizler; böylelikle geri dönüşümlü reaksiyon aşağıdaki gibidir:



TCA döngüsünü ve solunum zincirini birbirine bağlayan tek kompleks olarak, kompleks II hız sınırlama potansiyeline sahiptir ve süksinat dehidrojenaz ile fumarat indirgenmesi redoks potansiyelinin kontrolü altındadır; redoks potansiyeli >-60mV, hızlı fumarat indirgeme oranı ile ilişkiliyken, -60 ve -80 mV katalitik oran arasında yavaşlar ve bu şekilde metabolik hızın kontrolüne izin verildiği düşünülmektedir (116,117).

SDHA, kovalent bağlı bir kofaktör, flavin adenin dinükleotidi (FAD) içerir. FAD, FADH₂ substratı tarafından verilen elektronlar için ilk akseptör görevi görür; daha sonra SDHB içindeki üç Fe-S kümesinden aşağıya, SDHC ve SDHD alt birimleri arasındaki Q bağlayan bölgeye geçer ve Q'u QH₂'yi oluşturacak şekilde indirger (118).



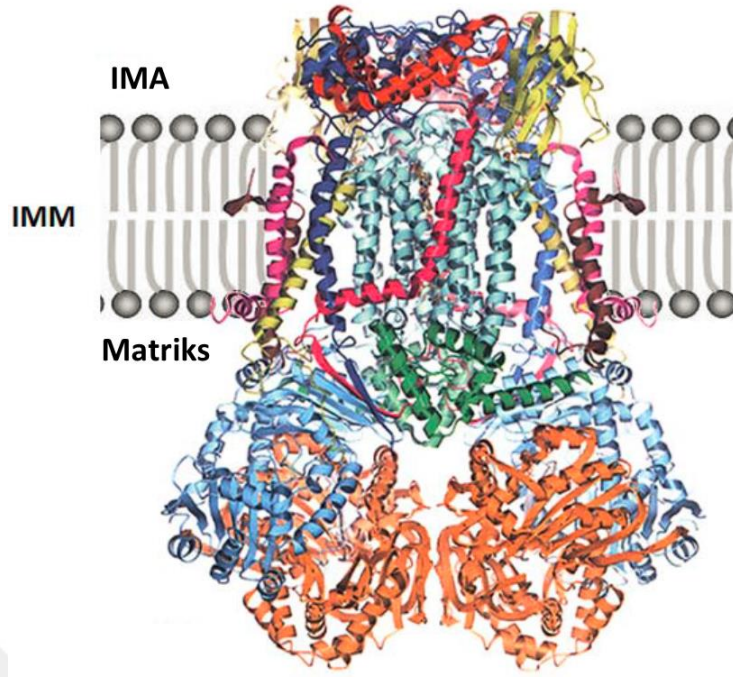
Şekil 2-17: Kompleks II yapısının şematik görünümü.

SDHA (mavi), SDHB (yeşil) SDHC (turuncu) ve SDHD (kırmızı). Elektron taşıyıcı ubiquinon (Q), FADH₂'den elektronların alıcısı olarak görev yapar (Alston, C. L, 2017'den uyarlanmıştır)

Hem b grubu SDHC ve SDHD alt birim arasındaki arayüze yerleşmiştir. Her biri bağlayıcı bir histidin kalıntısı içeren bu prostetik grup, kısmen düşük bir redoks potansiyeline sahiptir. Elektron transferinde yer almazken, reaktif oksijen türlerini nötralize ederek bir antioksidan görevi görebilir (119).

2.4.12.3. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi III

Kompleks III (ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz), mitokondriyal solunum zincirinin üçüncü enzimidir. Bu holoenzim 11 alt birimden oluşur ve ~480kDa boyutundadır. Katalitik merkezler sitokrom b (MTCYB), sitokrom c1 (CYC1) ve Rieske proteini (UQCRFS1) artı iki fonksiyonel hem parçası - sitokrom bL (b566) ve sitokrom bH (b562) içinde bulunur. Kompleks III'ün kristal yapısı çözülmüştür (120) (Şekil 2-18). Görevi, protonları matriksten IMA'ya aktararak proton hareket kuvvetine katkıda bulunurken, elektronları ubikunolden sitokrom c'ye Q döngüsü yoluyla transfer etmektir (121).

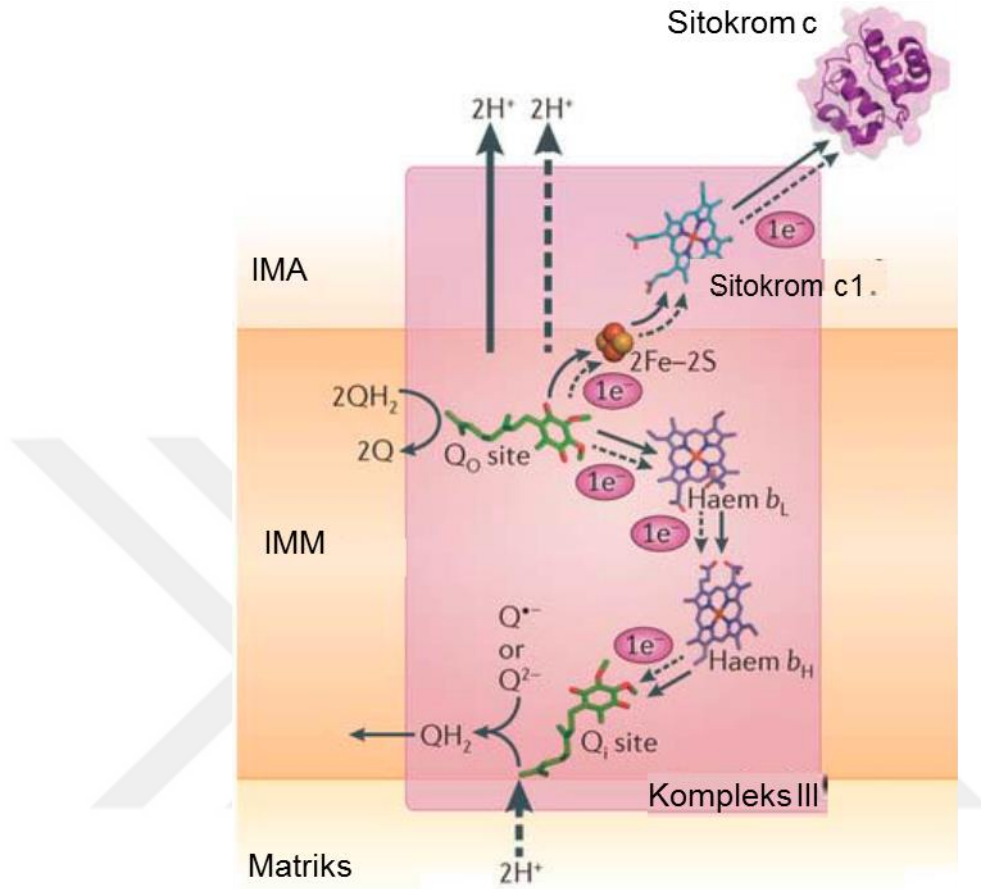


Şekil 2-18: Kompleks III kristal yapısı ve 11 yapısal alt birimi.

Çekirdek 1 (mavi), Çekirdek 2 (turuncu), sitokrom b (camgöbeği), Sitokrom c1 (koyu mor), Rieske demir-sülfür proteini (sarı), menteşe proteini (yeşil), alt birim 7 (koyu pembe),ubikinon bağlayıcı protein (kırmızı), alt birim 9 (şeftali), alt birim 10 (bordo), alt birim 11 (pembe). (Yu ve ark 1999 'dan uyarlanmıştır).

Kompleks I ile NADH oksidasyonundan veya kompleks II ile FADH₂ oksidasyonundan sonra üretilen Q'nun redükte formu (ubiquinol veya QH₂), Rieske alt biriminin p.His182 kalıntısı ve sitokromun b p.Glu272'si yoluyla kompleks III içindeki Q_o bölgesine bağlanır (122). Orijinal QH₂, protonlarının ve elektronlarının serbest bırakılmasından sonra tamamen oksitlenir ve Q_o bölgesinden uzaklaşır; QH₂'den salınan iki protonu IMA'ya pompalanır ve iki elektron kompleks III içindeki prostetik gruplara transfer edilir (Şekil 2-19) (123). Bir elektron, Rieske proteini içindeki Fe-S kümesi tarafından kabul edilirken, ikinci döngü elektronu, sitokrom b içindeki hem grubu tarafından alınır ve bir yarı kinon radikali Q⁻ oluşturmak için Q1 bölgesinde bulunan ikinci bir Q molekülüne transfer edilir. Q döngüsünün ikinci bir dönüşü Q_o bölgesine bağlı ikinci bir QH₂ kullanarak, ilave bir redükte sitokrom c üretir, ilave iki protonu IMA'ya aktarır. İkinci bir döngü, elektronunu yarı kararlı bir QH₂ molekülü oluşturmak üzere yarı kinon radikale Q⁻ aktarır Bu da serbest bırakılır ve Q_o bölgesinde bağlanarak geri dönüştürülebilir ve bir elektron kaybını önlemeye ek

olarak, iki protonu matrinden çıkarır, böylece IMM boyunca elektrokimyasal gradyana ($\Delta\Psi$) katkıda bulunur (121).



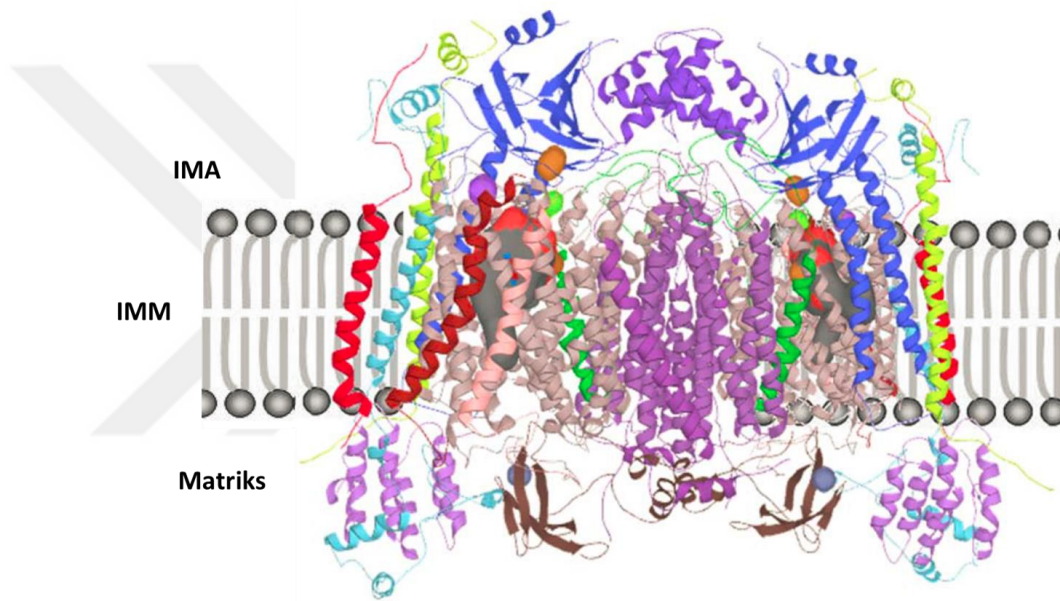
Şekil 2-19: Q (Quinol) döngüsünün, iki aşamasının şeması.

Q, CoQ10'un ubikinon formunu ve QH₂, ubikinol (dihidroksikinon) formunu temsil eder. Koenzim Q10'un (CoQ10) ardışık oksidasyon ve redüksiyonu, protonların bir lipid tabakası boyunca matriksten IMA'ya geçişini sağlar (Sazanov, 2015'den uyarlanmıştır).

Sitokrom c (CYCS), kompleks III içindeki sitokrom b ile solunum zincirindeki kompleks IV arasındaki elektron taşıyıcı olarak işlev gören, hem içeren bir proteindir. Sitokrom c biyogenezi, holositokrom c sentaz (HCCS) ile posttranslasyonel modifikasyona uğrar. Bu enzim, sitokrom c proteininin korunmuş CXXCH motifine kovalent olarak bağlıdır (124). Elektron transferindeki rolüne ek olarak, sitokrom c'nin mitokondriden salınması apoptozun ilk adımı olarak işlev görür (125).

2.4.12.4. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi IV

Solunum zincirinin dördüncü kompleksi sitokrom c oksidaz (COX), elektron transfer zincirinin son enzim kompleksini temsil eder. ~200kDa olan holoenzimin kristal yapısı, 13 yapısal alt birimin etkileşimini ortaya koyar ve kompleks IV birleşim ve biyogeneğinde rol oynayan en az 26 ilave protein içerir (Şekil 2-20) (126-128). Kompleks IV, IMM içine gömülü bir dimer olarak işlev görür ve katalitik çekirdek COX1, COX2 ve COX3'ten oluşur; bunlar redoks prostetik gruplarında iki bakır molekülü (CuA ve CuB), iki hem grubu (a ve a₃), bir magnezyum iyonu ve bir çinko iyonunu içerir (129).

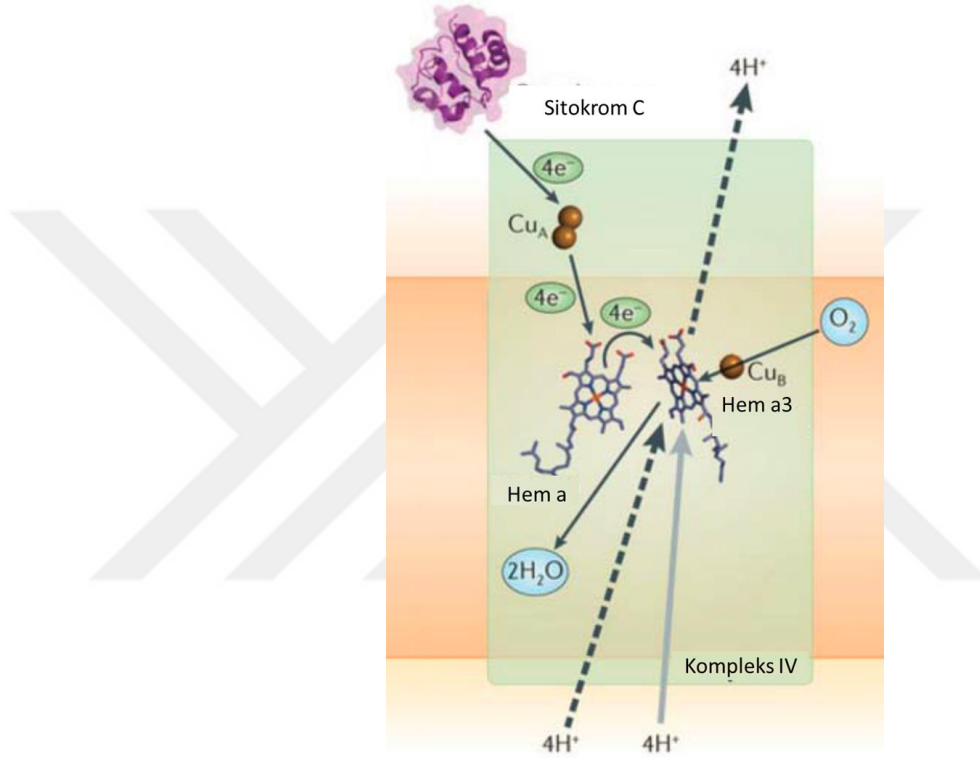


Şekil 2-20: Kompleks IV kristal yapısının şematik gösterimi.

13 alt birim; bej: COX1, koyu mavi: COX2, mor: COX3; gökmavisi: COX4, leylak: COX5A; Kahverengi COX5B; yeşil COX6A2; menekşe: COX6B1; sarı: COX6C; koyu mor: COX7A1, kırmızı: COX7B, koyu kırmızı: COX8B, pembe: COX7C. (Alston, C. L, 2017'den uyarlanmıştır)

Kompleks III ile indirgeme sonrasında, tek elektron taşıyıcısı sitokrom c kompleks IV'e bağlanır ve ilk elektron alıcısının bakır parçasına CuA'ya elektronunu vererek oksitlenir. Elektron, moleküler oksijeni bağlayabilen bir binükleer merkez oluşturan hem a₂ ve CuB kompleksine aktarılmadan önce, başlangıçta heme a' ya, aktarılır. Takiben, dört sitokrom c molekülünü oksitlemek için bu işlemin dört tekrarını içeren bu reaksiyon iki molekül su üretir (Şekil 2-21). Kristal yapı çözünürlüğünde son zamanlarda yapılan iyileştirmeler,

terminal oksijen indirgenmesinden önce, matriks türevi protonları depolamak için yeterli kapasite sağlayan ve Mg^{2+} iyonu da içeren büyük bir su kümesi tanımlamıştır (130). Oksijenin indirgenmesi için her protonun matristen çıkarılmasıyla eş zamanlı olarak, matriks proton havuzundan ikinci bir protonun IMA'ya aktarımının, $\Delta\Psi$ 'ya katkıda bulunduğu düşünülmektedir (131).



Şekil 2-21: Sitokrom c oksidaz fonksiyonunun şematik gösterimi.

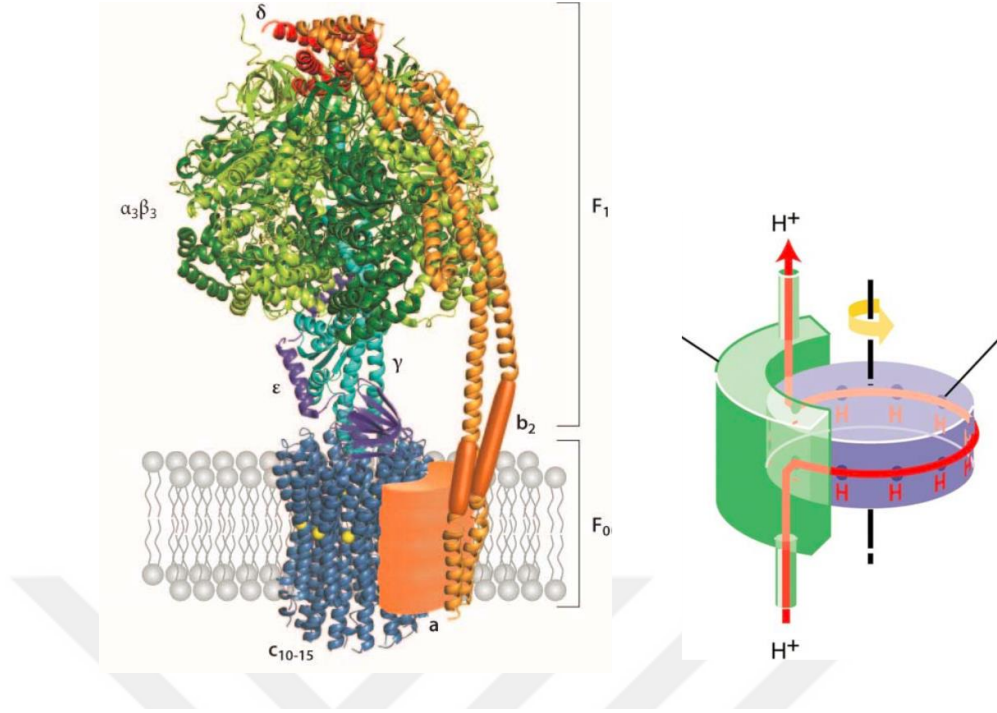
Genel reaksiyon (kesintisiz oklar) dört sitokrom c'nin oksidasyonundan iki molekül su ($2H_2O$) üretimini ve matriksten protonların hareketini katalize eder. Protonlar hem oksijeni indirgemek hem de IMA'ya geçerek $\Delta\Psi$ 'ye katkıda bulunmak için matriksten çıkarılır (sırasıyla gri ve kesikli oklar). (Sazanov, 2015'den uyarlanmıştır).

2.4.12.5. Mitokondriyal solunum zinciri kompleks V

Kompleks V ya da ATP sentaz, ~600 kDa olup, 13 yapısal alt birim ve biyogenez için en az 3 ilave protein içerir. Bu F1-F0 holoenzimi, IMM içine gömülü F0 ve matrikste çıkıntı yapan F1 alt biriminden oluşur (Şekil 2-22). Kristal yapının çözülmesi, onu izleyen Boyer'in öne sürdüğü ATP sentezi mekanizmasının doğrulanması için kritiktir. Enzim içindeki yapısal değişiklik, ATP oluşturmak için ADP fosforilasyonunu sürdürür (132-135).

Kristal yapı, Boyer'in kompleks V' in moleküler motor olarak işlev gördüğü hipotezini ve kompleks zincirinin redoks reaksiyonları yoluyla, kompleks I, III ve IV tarafından üretilen proton itici gücün ATP sentezini tetiklediğini güçlendirdi. Protonlar, membran gömülü F₀ alt birimi içindeki dönme türbini gözeneğinden potansiyel gradyandan aşağı doğru akmak için proton hareket kuvvetini kullanır. F₀ alt birimi, c halkasını oluşturan 12 'c' alt biriminden ve matriksten veya IMA'dan, IMM'nın orta noktasına kadar uzanan iki yarım kanal içeren bir 'a' alt biriminden oluşur (Şekil 2-21). Matriks çıkıntılı alt birim F₁ içindeki moleküler döner makine, $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ alt birimlerinden oluşur; α ve β alt birimleri ADP ve Pi bağlayabilir ancak sadece β alt birimleri katalitik aktiviteye sahiptir (132).

“Bağlanma değişimi mekanizması” ATP sentezi ve salınma yöntemini açıklar. Temel varsayım, üç β alt birimin her birinin farklı bir yapısal konfirmasyon benimsemesi (açık, gevşek veya sıkı) ve sırayla bu durumların her biri arasında geçiş yapmasıdır; 360 ° tam rotasyon ATP sentezini protona bağlı bir şekilde katalizler (132).



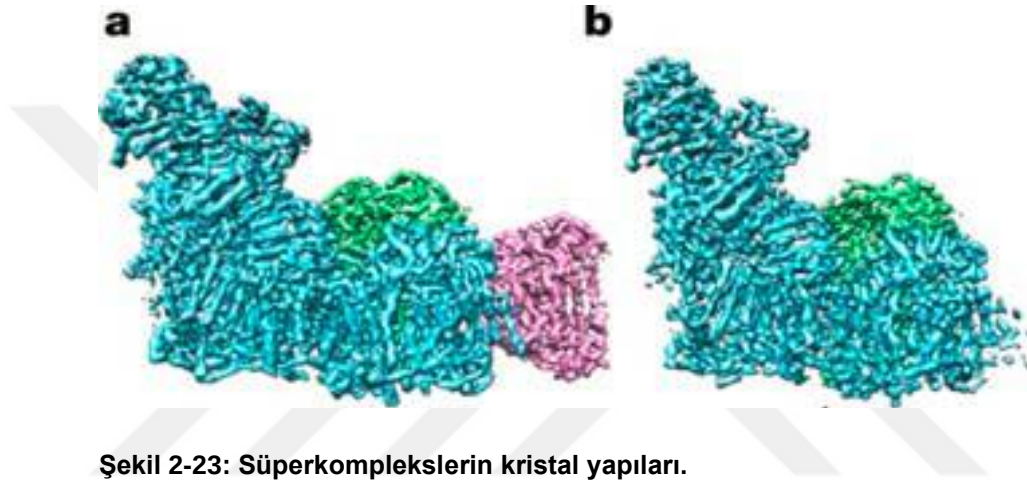
Şekil 2-22: Memeli ATP sentazının yapısı ve işlevi.

ATP sentazının kristal yapısı ile "a" alt biriminin şematik birleşimi görülmektedir. F1 alt birimleri: kırmızı: δ , yeşil: α / β ; turkuaz γ , mor: ϵ . F0 alt birimleri: Şeftali: a, turuncu: b; mavi: c. Alt birim "a" içindeki iki yarım kanal, İMA'dan yakalanan protonlar için giriş noktası sağlar. Göçen protonlar, c subuniti arayüzünde, korunmuş yüklü kalıntılara bağlanır ve nötralizasyon sonrası hidrofobik IMM'ya doğru hareket ederler. Bu hareket (sisteme proton girişinin tekrarı ile) c-halka motorunun dönüşünü sağlar ve proton bağlayıcı yüklü kalıntının yeniden iyonlaşmasıyla matrikse girdiği yer olan ikinci yarı kanala ulaşana kadar devam eder. (Walker, 2013 ve von Ballmoos ve ark., 2009'dan uyarlanmıştır).

2.4.12.6. Mitokondriyal solunum zinciri süperkompleksleri

Solunum zincirinin kompleksleri, bağımsız olarak işlev görmesine rağmen, elektron transport zinciri, proton gradientinin üretimi için, komplekslerin işbirliğini gerektirir. Dahası, mitokondrinin dinamik doğası gereği, artan enerji ihtiyacı gibi dış uyaranlara cevap vermeleri gerekir (138). IMM içinde, mitokondriyal kompleks konumlarının yakınlığının elektron transferini geliştirdiğini öneren "katı hal" teorisi veya IMM içindeki mobil elektron taşıyıcılarının yakınlık gereksinimini ortadan kaldırdığını öneren polarize "akış" modeli de dahil olmak üzere solunum zinciri kompleksleri arasındaki etkileşimleri detaylandıran çeşitli teoriler vardır (139,140). Her iki modelin de bir değeri olduğu açıktır, ancak hızlı elektron transferi ve eşzamanlı proton pompalama, I / III2 süper kompleks ve 1.7 MDa I/III2 / IV respirazom şeklinde yakın solunum birimlerinin oluşumunu kolaylaştıran "katı hal" ve "plastisite"

modellerine destek verir (141). BN-PAGE'den elde edilen kanıtlar fonksiyonel bir respirazomu doğrulamış (147) ve mitokondriyal süper komplekslerin kristal yapıları rapor edilmiştir. KI/KIII, KI/KIV ve KIII/KIV arasındaki hayati süper kompleks etkileşimleri ortaya koymaktadır (142,143). Mitokondriyal solunum zincirinin, süper komplekslerinin bildirilen yakın atomik kristal yapısı (Şekil 2-23), birçok mitokondriyal hastalık mekanizmasının tam olarak anlaşılması için kritik olacaktır.

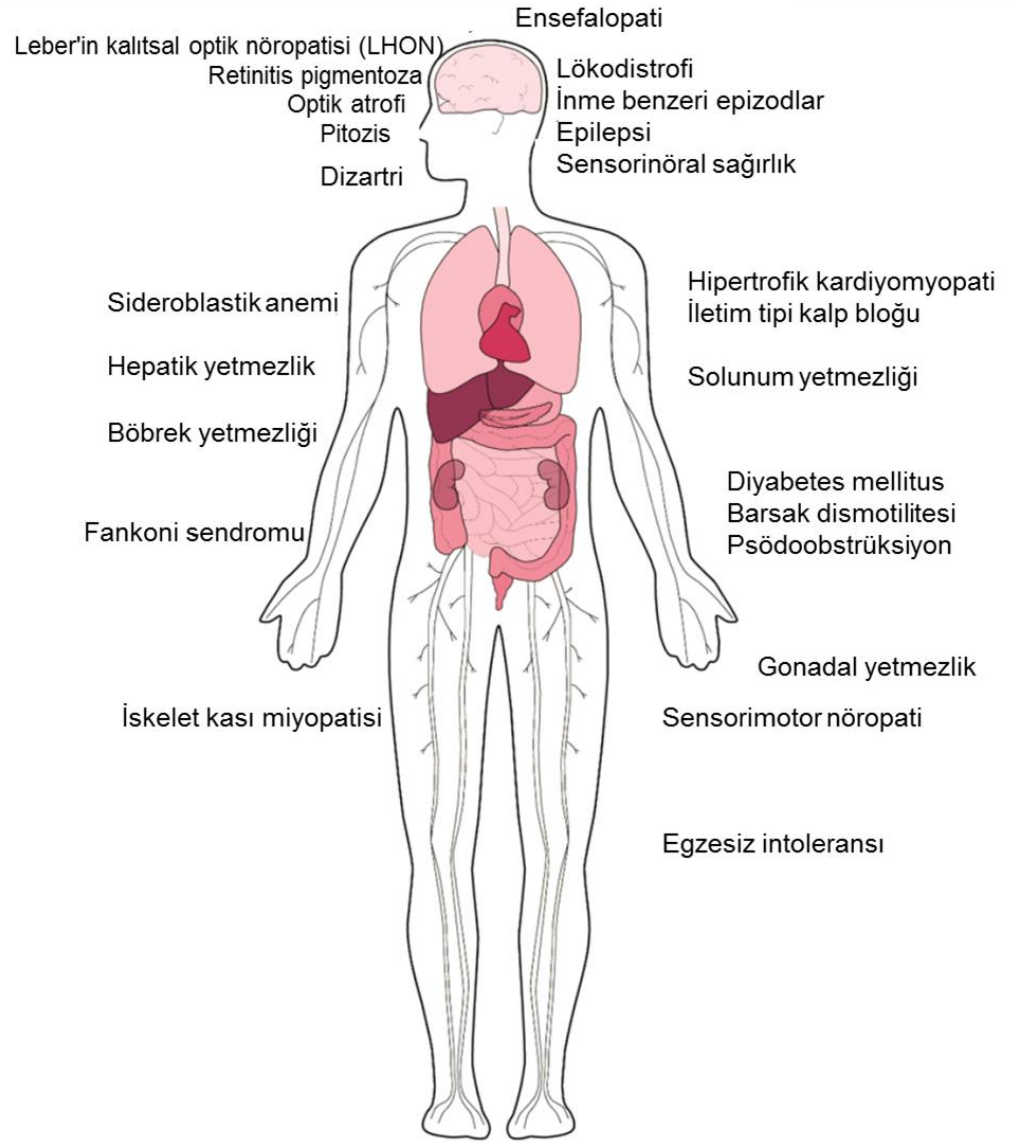


Şekil 2-23: Süperkomplekslerin kristal yapıları.

a. CI / III2 / IV respirazom ve b. CI / III2 süperkompleksi. Kompleks I: turkuaz; kompleks IV: pembe; kompleks III: yeşil (Letts ve ark, 2016 'dan uyarlanmıştır).

2.5. MİTOKONDRIYAL HASTALIKLAR

“Mitokondriyal hastalık” şemsiye terimi, klinik olarak heterojen olan primer mitokondriyal bozuklukların tümünü ifade eder ve en çok etkilenen doku ve organlar en yüksek enerji gereksinimine sahip olanlardır (Şekil 2-24). Semptomlar her yaşta ortaya çıkabilir ve izole veya multisistemik bir sendromun parçası olabilir (144).



Şekil 2-24: Mitokondriyal hastalıkların klinik heterojenitesi.

Yaygın olarak etkilenen organlar (beyin, kalp, kas, karaciğer, böbrekler, pankreas ve gastrointestinal sistem) ve ilişkili klinik semptomlar gösterilmiştir (Alston, C. L, 2017'den uyarlanmıştır).

Mitokondriyal hastalıktan şüphelenilen olgular üç gruba ayrılabilir;

1. Spesifik mtDNA mutasyonların neden olduğu bilinen sendromlar (MERRF, LHON, MELAS vb)
2. Özel bir sendroma uymayan, ancak mtDNA defektini düşündüren, miyopati, karaciğer fonksiyon bozukluğu, oftalmopleji, sağırılık ve ataksi gibi klinik bulguları olan hastalar

3. Mitokondrial fonksiyon bozukluğunu düşündüren atipik klinik prezentasyon; diğer nedenlerle açıklanamayan nörolojik ve/veya ekstrapnörolojik bulgular: renal, gastrointestinal (dismotilite, disfaji ve psödoobstrüksiyon), endokrinopati (özellikle hipoparatiroidizm ve diyabet), hipertrofik kardiyomiyopati (145).

Mitokondriyal hastalıklar için kesin bir tedavi yoktur. Bazı hastalarda diğerlerinden daha hafif bulgular olmasına rağmen, özellikle klinik olarak etkilenen çocuklar için prognoz genellikle daha sıkıntılıdır (146,147). Tedavisi olmadığından, kalıtsal mitokondriyal hastalıktan etkilenen aileler için üreme danışmanlığı sağlanması hayati bir öneme sahiptir. Mevcut yaklaşım, prenatal genetik tanı (koryonik villus biyopsisi (KVB) ve amniyosentez) veya *in vitro* fertilizasyon ile preimplantasyon genetik tanımı içerir. Ne yazık ki, genetik heterojenite ile birlikte birçok mitokondriyal hastalıkta genotip-fenotip korelasyonlarının olmaması, yaklaşık 1150 genin potansiyel aday gen havuzuyla ilişkili olması, genetik tanı koymanın karmaşık bir süreç olması, birçok hasta için güçlükler oluşturması anlamına gelir.

2.5.1. Mitokondriyal hastalıkların araştırılmasında multidisipliner yaklaşım

Şüpheli mitokondriyal hastalığın laboratuvar araştırması karmaşıktır ve algoritmalar, moleküler genetik taramaya rehberlik etmesi için klinik ve fonksiyonel çalışmaları içeren multidisipliner bir yaklaşım gerektirir (148). Elektrokardiyogram (EKG), Elektromiyografi (EMG) ve Elektroensefalografi (EEG) gibi sinir iletim çalışmaları, kan ve idrar analizi (klinik biyokimya) ve manyetik rezonans (MR) görüntüleme gibi rutin klinik araştırmaların hepsi mitokondriyal etiyolojiyi araştırmak için faydalı araçlardır. Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi aktiviteleri spektrofotometrik olarak değerlendirilebilir ve tek bir kompleks veya kombine kompleks eksikliğinin tanımlanması, moleküler analiz için ilgili aday genlerin öngörülebilmesi için önemini korumaktadır (149). Benzer şekilde, seri kesitli kas biyopsi örneklerinin histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal analizi, mitokondriyal patolojinin önemli kanıtlarını sağlar ve belirli bir patolojik mekanizmanın göstergesi olabilir (150). Hasta kas biyopsisinin histokimyasal ve biyokimyasal analizi genetik testlerin

yönlendirilmesinde kritik öneme sahiptir, ancak yeni stratejiler tanısal verimi artırmayı amaçlamaktadır. Bazı semptomlar altta yatan genetik kusurdan bağımsız olarak tedavi edilebilirken (örn., Pitozun cerrahi olarak düzeltilmesi veya antikonvülsanlarla nöbet kontrolü), aile üyelerinin taşıyıcılık testi ve üreme seçeneklerine erişim gibi diğer müdahaleler moleküler analiz olmadıkça yapılamaz.

Mitokondriyal ve nükleer genomların mitoproteoma katılımı düşünüldüğünde, mitokondriyal disfonksiyon, mtDNA veya nDNA daki genetik mutasyonlardan kaynaklanabilir. Ek olarak, primer, konjenital bir durum veya sekonder olarak yaş ilişkili somatik mutasyona bağlı ortaya çıkabilirler (151).

2.5.2. mtDNA ilişkili mitokondriyal hastalıklar

Diploid olan ve Mendelian kalıtım yasalarına uyan nDNA' dan farklı olarak, mtDNA sadece anneden kalıtılır (152). mtDNA'nın çoklu kopya sayısı, mtDNA ile ilişkili genetiğin benzersiz bir yönü olan heteroplazmiye neden olur. Heteroplazmi, mutant ve vahşi tip mtDNA moleküllerinin bir arada olduğu durumda ortaya çıkar. Homoplazmi, tüm mtDNA moleküllerinin aynı genotipe sahip olduğu durumdur. Heteroplazmik mutasyonlar genellikle değişken bir eşik değerine sahiptir, bu da hücrenin kusurlu mtDNA moleküllerini tolere edebileceği düzeyde olabilir (153). Mutasyon yükü bu eşiği aştığında, metabolik disfonksiyon ve ilişkili klinik semptomlar ortaya çıkar. Nokta mutasyonları ve büyük ölçekli mtDNA delesyonları, primer mtDNA hastalığının en yaygın iki nedenini temsil eder, her ikisi de maternal kalıtmalı olarak veya embriyonik gelişim sırasında *de novo* ortaya çıkar.

2.5.3. mtDNA nokta mutasyonları

mtDNA nokta mutasyonları (küçük indel mutasyonları dahil), tahmini 200'de 1 yaygınlığı ile mitokondriyal hastalıkların önemli bir nedenidir (154). 270'in üzerinde farklı mtDNA nokta mutasyonu bildirilmiştir ve hemen hemen her mtDNA genini etkiler. Klinik spektrum, nonsendromik sensorinöral işitme kaybından, Mitokondriyal Ensefalopati Laktik Asidoz ve İnme benzeri ataklar (MELAS)'a kadar değişen semptomlarla ilişkilendirilmiştir (155). Klinik semptomlar çocuk veya yetişkinlikte ortaya çıkabilir, mutasyonlar kalıtsal olabilir (~% 75 vaka) veya *de novo* (~% 25 vaka) ortaya çıkabilir (156). Maternal

yolla kalıtılan mtDNA defektlerinde, sıklıkla, oositleri mitokondriyal darboğazın seçim etkileri nedeniyle değişen mutasyon oranları içermesine rağmen, mtDNA mutasyon yükü hücrel işlev bozukluğu için gereken eşiğin altında kalan ve klinik olarak etkilenmemiş bir anne öyküsü vardır (157). Bu nedenle doğum öncesi test edilmesine rağmen sonraki gebeliklerde tekrarlama riskini tahmin etmek neredeyse imkansızdır. Korion villus biyopsisi veya amniyosentezde kullanan dokular, doğru bir mtDNA heteroplazmi analizi sağlayabilir (158). De novo mtDNA nokta mutasyonlarının rekürrens riski çok düşüktür, ancak maternal oositlerde gonadal mozaizm riski vardır (156). mtDNA nokta mutasyonları nedeniyle ortaya çıkan ve bilinen sendromlar aşağıda özetlenmiştir;

a) Leber'in Herediter Optik Nöropatisi (LHON) (# 535000): mtDNA'daki patojenik varyantların neden olduğu bilateral, ağrısız, subakut, merkezi görme kaybı ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. LHON vakalarının yaklaşık% 95'i üç patojenik mtDNA dizisinden birini taşır. Elektron transport zincirinin kompleks I alt birimlerini kodlayan genleri içeren varyantlar: MT-ND4 m.11778G> A, yüksek oranda korunmuş bir amino asidi (p.Arg340His) değiştirir; MT-ND1 m.3460G> A, orta derecede korunmuş bir amino asiti (p.Ala52Thr) değiştirir ve MT-ND6 m.14484T> C, zayıf korunmuş bir amino asiti (p.Met64Val) değiştirir (159). Bu hastalık için bugüne dek 18 farklı allelik varyant tanımlanmıştır. LHON bir enzim eksikliğinden değil, elektron transportunun bir yerde inhibe edilmesinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Bu inhibisyon nDNA 'dan da kaynaklanabilir. Ayrıca erkeklerde X'e bağlı mutant bir genin varlığı da çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur.

b) Leigh Sendromu (#256000) (Subakut Nekrotizan Ensefalomyelopati): İnfantlarda görülen laktik asidemi, hipotoni, ataksi, retinitis pigmentosa ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır. Leigh sendromu oldukça heterojen olup oksidatif fosforilasyon ve ATP oluşumunda rol oynayan mitokondriyal solunum zinciri kompleksleri I, II, III, IV ve V dahil olmak üzere enerji metabolizmasında yer alan hem nükleer hem de mitokondriyal kodlu genlerde mutasyonlar tanımlanmıştır

(160). Bu nedenle kalıtım OR veya mitokondrial olabilir. Örneğin Kompleks I'de mitokondrial (*MTND2*, *MTND3*, *MTND5*, ve *MTND6*) ve nükleer (*NDUFS1*, *NDUFS3*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFA2*, *NDUFA9*, *NDUFA10*, *NDUFA12*, *NDUFAF6*, *NDUFAF5*) olmak üzere çok sayıda ilişkili gen bulunur.

c) Nöropati, Ataksi, Retinitis Pigmentoza (NARP) (# 551500):

Nörodejeneratif bir hastalık olan NARP, proksimal kaslarda zayıflık, gelişme geriliği, nöropati, ataksi, nöbetler ve retinitis pigmentosa ile karakterizedir. Bu patolojinin Leigh hastalığından farkı heteroplazmik bir mutasyon olması ve hastalığın ileri yaşlarda görülmesidir. *MTATP6*'daki heteroplazmik mutasyonlardan kaynaklanır. Çocuklukta gelişme geriliği, psikomotor gerilik ve anksiyete atakları ve daha sonra işitme kaybı, optik atrofiye bağlı körlük ve retinitis pigmentosa, ataksi ve klonik spazmlar dahil olmak üzere farklı nörolojik belirtiler geliştiren NARP sendromlu 40 yaşında bir erkek hastada, *MTATP6* geninde tanımlanan yeni mutasyon ve sırasıyla kan ve kasta % 26 ve% 85 heteroplazmikti (161).

Mitokondriyal tRNA Genlerindeki Tek Nükleotid Mutasyonları:

d) Myoklonik Epilepsi-Ragged Red Fiber (MERRF) (#545000):

Miyoklonik epilepsi, mitokondriyal miyopati, sensorinöral tip işitme kaybı, demans, ataksi, hipoventilasyon ve orta dereceli kardiomiyopati ile giden bir hastalıktır. Mitokondriyal miyopati ve düzensiz kırmızı kas lifleri görülür. *MTTK*, *MTTL1*, *MTTH*, *MTTS1*, *MTTS2*, *MTTF* genlerinde mutasyon tanımlanmıştır. Hastalık mutant mitokondriyal DNA yüzdesi ile orantılıdır. Yaş ilerledikçe oksidatif fosforilasyon kapasitesi düşer ve gerekli minimum enerjinin altına indiğinde semptomlar ortaya çıkmaya başlar (162).

e) Mitokondriyal miyopati, Ensefalopati, Laktik Asidoz, Strok-benzeri epizodlar (MELAS) (# 540000):

Mitokondriyal miyopati, ensefalopati, laktik asidoz ve inme benzeri atakları içeren MELAS sendromu, değişken bir klinik fenotipi olan genetik olarak heterojen mitokondriyal bir hastalıktır. Hastalığa, nöbetler, hemiparezi, hemianopsi, kortikal körlük ve epizodik kusma gibi merkezi sinir sistemi tutulumunun özellikleri eşlik eder. MELAS sendromuna *MTTL1*, *MTTQ*, *MTTH*, *MTTK*, *MTTC*,

MTTS1, *MTND1*, *MTND5*, *MTND6* ve *MTTS2* dahil olmak üzere farklı genlerdeki mutasyonlar neden olabilir. MELAS'a neden olan en yaygın mutasyon ise, *MTTL1* genindeki c.3243A>G değişimidir (163).

f) Letal Infantil Mitokondriyal Miyopati (LIMM) (# 551000):

Postpartum ağır laktik asidoz, hipotoni, kalp ve iskelet kaslarında mitokondriyal miyopati ve yeni doğan döneminde solunum yetmezliğine bağlı ölümün görülebildiği heterojen bir hastalık grubudur. mtDNA treonin tRNA genindeki *MTTT* mutasyonlardan kaynaklanır (164).

2.5.4. mtDNA delesyon sendromları

Tek ve büyük ölçekli mtDNA delesyonları, toplum sıklığı 1.2/100.000 olan üç ana ilişkili fenotipe sahiptir. **Kronik progresif eksternal oftalmopleji (CPEO)** (~%65), **Kearns Sayre Sendromu** (~%30) ve **Pearson sendromu** (<%5) (165). Pearson sendromu, tek büyük ölçekli mtDNA delesyonları ile ilişkili en şiddetli klinikdir; hastalar erken dönemde sideroblastik anemi ve pankreas fonksiyon bozukluğu ile başvururlar ve bebeklik döneminde genellikle mortaldır (166). Kearns Sayre sendromlu hastalar 20 yaşından önce pitoz ve/veya PEO ve pigmenter retinopati ile başvururlar. Miyopati, ataksi veya kardiyak iletim kusurları dahil olmak üzere çoklu sistem tutulumuna sahip olabilirler (165). Progresif eksternal oftalmopleji (PEO), iskelet kasında çok sayıda mitokondriyal DNA delesyonu ile karakterizedir. En yaygın klinik özellikler, yetişkinlerde dış göz kaslarının tutulumu ve egzersiz intoleransıdır. Ek semptomlar değişkendir; katarakt, işitme kaybı, duysal aksonal nöropati, ataksi, depresyon, hipogonadizm ve parkinsonizmi içerebilir. Hem otozomal dominant hem de otozomal resesif kalıtım görülebilir ve otozomal resesif kalıttır klinik genellikle daha şiddetlidir (167).

Diferansiyel şiddet kısmen heteroplazmi düzeyine ve delesyon büyüklüğüne bağlanabilir ve Kearns Sayre hastaları genellikle CPEO hastalarına kıyasla daha büyük delesyonlara sahiptir (168). Delesyonlar tipik olarak 1-10 kb arasında değişir ve genelde 4977bp (m.8470_13446del) delesyonu görülür ki buna, iki 13bp'lik doğrudan tekrar bölgesi arasındaki (m.8470-8482 ve m.13447-m.13459) mtDNA eksizyonu neden olur (169).

Nükleer gen yeniden düzenlemelerinden farklı olarak, büyük ölçekli mtDNA delesyonları, embriyonik gelişim sırasında sıklıkla sporadik olarak ortaya çıkar ve düşük tekrar riskine sahiptir (170). Büyük ölçekli bir mtDNA delesyonunu taşıyan ve klinik olarak etkilenen kadınların düşük bir kalıtım riski vardır (<%10) ve prenatal test riskli gebelikler için bilgilendiricidir (171).

2.5.5. İkincil mtDNA mutasyonları

mtDNA delesyonları ve nokta mutasyonları primer mtDNA defektlerini temsil ederken, sekonder defektler mitokondriyal hastalığın diğer bir yaygın formudur. mtDNA tamir bozukluğu, transkripsiyon, translasyon veya proteinlerin sitoplazmadan mitokondriye transferi gibi yardımcı süreçlerin bozulması, nicel (mtDNA kopya sayısının azalması, deplesyon) veya kalitatif etkilere neden olabilir (mtDNA genom bütünlüğünü etkileyen çok sayıda büyük mtDNA delesyonları). Bunlar nükleer genleri etkileyen mutasyonlardan kaynaklanır ve Mendel kalıtım (veya *de novo*) modeline uyarlar. Mitokondriyal DNA tükenmesi sendromları (MTDPS) klinik ve genetik olarak heterojendir ve çoğu otozomal resesif hastalıklardır. *TK2* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS2; *DGUOK* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS3; *POLG* genindeki mutasyondan kaynaklanan MTDPS4A ve MTDPS4B; *SUCLA2* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS5; *MPV17* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS6; *C10ORF2* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS7; her ikisi de *RRM2B* genindeki mutasyondan kaynaklanan MTDPS8A ve MTDPS8B; *SUCLG1* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS9, *AGK* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS10, *MGME1* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS11, MTDPS12A ve MTDPS12B, *SLC25A4* ve *FBXL4* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS13; *OPA1* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS14; *TFAM* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS15; *POLG2* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS16; *MRM2* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS17; *SLC25A21* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS18; ve *SLC25A10* genindeki mutasyonun neden olduğu MTDPS19.

2.5.6. Nükleer mitokondriyal hastalıklar

Mitoproteom genlerinin çoğu nükleer genom tarafından kodlanır ve Mendel kalıtım özelliği gösterir. *De novo* (172,173), X-bağılı (174,175), OD (176) ve OR (172,176) kalıtım olguları literatürde bildirilmiştir. İlk nükleer mitokondriyal gen mutasyonu, 1995 yılında kompleks II'nin bir yapısal alt birimini kodlayan *SDHA*'da tanımlanmış (177) ve o zamandan beri mitokondriyal hastalık aday genlerinin keşfinde çok büyük ilerleme kaydedilmiştir. Hastada DNA analizleri ile, genlerin patolojiye katılımları doğrulanırken, yeni aday genleri ortaya çıkarmak için hastalık modellerine yeni proteomik ve transkriptomik yaklaşımlar uygulanmaktadır (178,179,180). Etkilenmiş birden fazla aile üyesiyle yapılan geleneksel bağlantı analizi yaklaşımı, TED gibi çoklu paralel dizileme stratejilerine yol göstermiş, etkilenen bireyle sağlıklı kardeş (paired) veya proband-ebeveyn üçlüsü (trio) gibi yaklaşımlar yardımı ile, 20 yıldan beri yeni hastalık genlerini ortaya çıkması hızlanmış ve tanımlanan gen sayısı artmıştır. Mitoproteomdaki ~1150 proteinden, 270'in üzerinde gende mutasyon bildirilmiştir (Şekil 2-25) ve sadece yeni genler değil, aynı zamanda insan hastalıklarıyla halihazırda ilişkili genleri içeren alternatif yollarda, yeni mekanizmalar da bildirilmektedir (181). Muhtemelen klinik olarak etkilenen dokulardaki değişen heteroplazmi seviyeleri nedeniyle, daha ciddi klinik fenotiplerin sıklıkla resesif mutasyonlarla ilişkili olduğu düşünülür ve bu nedenle mtDNA mutasyonları erişkinlerde, nükleer gen defektleri ise pediatrik vakalarda daha sık görülmektedir (98).

OXPHOS Enzymes			DNA, RNA & Protein synthesis		Substrate	Cofactors	Homeostasis					
Complex I	NDUFA1	Complex II	SDHA	Replication	POLG	PDHA1	SLC19A3	Lipid	TAZ			
	NDUFA2		POLG2		MT-TA		SLC25A19		AGK			
	NDUFA9		C10orf2		MT-TC		TPK1		SERAC1			
	NDUFA10		MGME1		MT-TD				DNAJC19			
	NDUFA11		DNA2		MT-TE							
	NDUFA12	Complex III	SDHD	tRNAs	RNASEH1	PDHC	DLAT	Lipoic acid	LIAS	Protein import	TIMM8A	
	NDUFA13		CYC1		MT-TF		PDK3		LIPT1		AIFM1	
	NDUFB3		UQCRB		MT-TG				DLD		GFER	
	NDUFB9		UQCRC2		MT-TH						PMPCA	
	NDUFB11		MT-CYB		MT-TI						XPNPEP3	
NDUFS1	cytochrome c oxidase		Nucleotides	ABAT	Krebs cycle	ACO2	FeS clusters	BOLA3	Protein quality	HSPD1		
NDUFS2		COX4I2		DGUOK		FH		FDX1L		CLPB		
NDUFS3		COX6A1		MPV17		IDH3B		ISCA2		CLPP		
NDUFS4		COX6B1		RRM2B		MDH2		ISCU		LONP1		
NDUFS6		COX7B		SAMHD1				LYRM4		PITRM1		
NDUFS7		COX8A		SLC25A4				NFU1		AFG3L2		
NDUFS8		NDUFA4		SUCLA2				NFS1		SPG7		
NDUFV1		TACO1		SUCLG1				NUBPL		SACS		
NDUFV2		MT-CO1		TK2								
MT-ND1		MT-CO2		TYMP				AnapI.		PC		
Complex II	MT-ND2	ATP synthase	MT-CO3	RNA metabolism	ELAC2	Ketone bodies	ACAT1	Coenzyme Q	ADCK3	Fission, Fusion	DNM1L	
	MT-ND3		HSD17B10		HMGL		ADCK4		GDAP1			
	MT-ND4		TRMT10C		HMGCS2		COQ2		COQ4		MFF	
	MT-ND4L		MTAP		OXCT1		COQ6		COQ7		MFN2	
	MT-ND5		LRPPRC				COQ9		COQ9		OPA1	
	MT-ND6		GTPBP3				PDSS1		PDSS2		SLC25A46	
			MTO1								STAT2	
			PNPT1								ATAD3A	
			TRMT5									
			TRNT1									
Complex III		Assembly		Translational regulation	PUS1	Fatty acid oxidation	CPT1A	Biotin	BTD	Unclear function	SQSTM1	
			TRIT1		GARS		CPT2		HLC		SCO1	SCSTM1
			TRMU		HARS2		HADH		COA6		SCO2	APOPT1
					KARS		HADHA				COX10	CHCHD10
					LARS2		HADHB				COX15	FBXL4
					IARS2		SLC22A5				PPOX	OPA3
					MARS2		SLC25A20				SLC25A38	
					NARS2		ETFA				CYC	
					QSL1		ETFB				HCCS	
					PARS2		ETFDH					
Complex IV		ATP syn.		Ribosomes	RARS2	pi	PPA2	Haem		Inhibitors	ETHE1	
			MRPS7						COASY		D2HGDH	
			MRPS16						PANK2		L2HGDH	
			MRPS22						SLC25A1		SLC25A1	
			MRPS23						SLC25A42		ECHS1	
			MRPL3								HIBCH	
			MRPL12								HTT	
			MRPL44								TXN2	
			MT-RNR1									
			MT-RNR2									
Complex V		FAD NADP		SAM		Fe		Fe				

Şekil 2-25: Hastalık ilişkili mutasyon bildirilen mitokondrial genler.

Listelenen genler, protein işlevine göre sınıflandırılmıştır ve kırmızıyla gösterilen genler mtDNA, siyahlar nDNA'yı ifade ederken, mor gölgeli genler, metabolik hastalık tablosu olmaksızın tümörjenizde yer alan genlerdir (Mayr ve diğerleri, 2015).

2.5.7. İzole solunum zinciri kompleks eksiklikleri

İzole bir solunum zinciri kompleks eksikliğinin, histokimyasal ve biyokimyasal kanıtı, beş OXPHOS kompleksinden birinin yapısal bir alt birimini veya bir yardımcı faktörünü etkileyen bir mutasyonu düşündürür. Her bir kompleks için yapısal alt birimler ve yardımcı faktörler hakkındaki mevcut bilgiler ve ilişkili gen sayısı her geçen gün artmaktadır.

1) İzole kompleks I eksikliği

İzole kompleks I eksikliği, %70-80'i nükleer gen ilişkili pediyatrik hastaların yaklaşık %30'unun biyokimyasal fenotipini temsil eder (182,183). Kompleks I eksikliğiyle ilişkili klinik semptomlar heterojendir, ancak prognoz tipik olarak hızlı ilerler ve kötüdür. Laktik asidoz, kardiyomiyopati veya lökodistrofi ile birlikte yaygın bir özelliktir.

Bu güne kadar, 19/37 yapısal alt birim ve 10/19 birleştirme faktöründe mutasyonlar tespit edilmiştir ve bildirilen hemen hemen tüm mutasyonlar, azalmış kompleks I birleşimi ve aktivitede karşılaştırılabilir bir azalma ile ilişkilidir. Ancak istisnai olarak p.Asp446Asn *NDUFS2* mutasyonunun, sadece katalitik bir defekt oluşturduğu görülmektedir (184). Gen boyunca bildirilen diğer *NDUFS2* varyantlarının bu etkiyi yeniden gösteremediği göz önüne alındığında bu bulgu ilginçtir (185). Dahası, bir birleşim hatası olmaksızın, yani N modülünün kaybı olmaksızın, Q domaini içindeki lokasyonu göz önüne alındığında NADH aktivitesinin kaybı mekanizmasını açıklamak zordur ancak fonksiyonel kanıtlar p.Asp446Asn mutasyonunun patojenitesini desteklemektedir (184).

İzole bir kompleks I eksikliği ile ilişkili en yaygın bulgular, fatal infantil laktik asidoz, Leigh sendromu, kardiyomiyopati ve lökoensefalopati'dir. Birinin olmaması tanıyı dışlamaz veya birlikte görülebilirler. Örneğin Ngu ve arkadaşları, üçü hipertrofik kardiyomiyopati ile birlikte olan Leigh sendromu ile uyumlu MR değişiklikleri ile başvuran beş *NDUFS2* eksikliği olan hastayı raporlamıştır (184). Laktik asidoz, *NDUFS2*, *NDUFS6*, *NDUFS8*, *NDUFV1*, *NDUFA11*, *NDUFB3*, *NDUFAF3* ve *NDUFAF5*'te bialelik mutasyonlarla ilişkili olarak bildirilen pediyatrik kompleks I eksikliği olan hastalarda yaygındır. Fatal

infantil laktik asidoz ile ilişkili genel bir genotip-fenotip korelasyonu eksikliği olmasına rağmen, *NDUFS6*, birincil aday gen olarak düşünülebilir (186).

Kardiyomiyopati yaygın bir klinik semptomdur. *ACAD9* mutasyonları patogenezi için anahtar aday geni temsil etmektedir (187), ancak *NDUFB11*, *NDUFAF* ve çok sayıda mtDNA varyantı dahil olmak üzere diğer genler de dahil edilmiştir (188,189). Her ne kadar 7 adet kompleks I yapısal alt birim mtDNA ile kodlanmış olsa da, kardiyomiyopati bu genlerdeki mutasyonlarla ilişkili görünmemektedir (183). Genetik olarak en heterojen mitokondriyal hastalık olan Leigh sendromu, şimdiye kadar 75'ten fazla gendeki mutasyonlar ile ilişkilendirildi ve bunların en az 23'ü kompleks I proteinlerini kodlamaktadır (4 bağlanma faktörü ve 19 yapısal alt birim) (190).

Tipik olarak, çalışmalar kompleks I eksikliği mutasyonlarının çoğunun özel ve tekrarlayıcı olmadığını bildirdiğinden (191), kompleks I eksikliğinin genetik tanısına rehberlik eden az sayıda genotip-fenotip korelasyonu çalışması bulunmaktadır. Örneğin; p.Trp22Arg *NDUFB3* (192), p.Gly212Val *TMEM126B* Avrupa kurucu mutasyonları ve p.Cys115Tyr *NDUFS6* Kafkasya Yahudi kurucu mutasyonudur (193). Literatürden elde edilen sonuçlar, *NDUFS2* ve *ACAD9* mutasyonlarının önemli bir tanı oranını oluşturduğunu gösterse de, genetik tanı eğilimlerinin artması ile daha büyük YND veri setlerinden daha net verilerin ortaya çıkması muhtemeldir (194). Tanı merkezlerinin, hastalık insidansı ile ilgili epidemiyolojik çalışmaları kolaylaştırmak için genetik tabanlı veri setlerini yayınlamaya devam etmesi çok önemlidir.

II) İzole kompleks II eksikliği

Kompleks II eksikliği nadirdir ve literatürde bildirilen <50 hasta ile mitokondriyal hastalıkların % 2-8'ini oluşturur (195). Biallelik mutasyonlar, ağırlıklı olarak merkezi sinir sistemini veya kalbi etkileyen (hipertrofik kardiyomiyopati, lökodistrofi, LS ve ensefalopati) konjenital metabolik bulgularla ilişkilendirilmiştir (196). Heterozigot mutasyonlar ise özellikle feokromositoma ve paraganglioma gibi kanser yatkınlığı ile ilişkilidir (197). Başlangıçta *SDHA* ve *SDHAF1* ilişkili mitokondriyal hastalık ve *SDHB/SDHC/SDHD/SDHAF2* ilişkili kanser duyarlılığının farklı genotip-fenotip ilişkilerine sahip olduğuna inanılsa da, *SDHx* mutasyonları için heterozigot ailelerin etkilenmemiş akrabalarında

tümörün ortaya çıkışının izlenme çalışması genotip-fenotip örtüşmesi kanıtını ortaya çıkarmaktadır (198).

Bu gün için, metabolik hastalarda, *SDHA*, *SDHB*, *SDHD* ve *SDHAF1*'deki mutasyonlar tanımlanmasına karşın, tüm *SDHx* genlerindeki mutasyonlar (*SDHAF1* hariç) tümör oluşumunda rol almıştır (199). Nükleer OXPHOS alt birim mutasyonlarının çoğunluğu resesiftir; ancak optik atrofiyle ilişkilendiren dominant *SDHA* mutasyonları, kardiyak disfonksiyonu olan ve olmayan iki vakada bildirilmiştir (200).

III) İzole kompleks III eksikliği

Egzersiz intoleransı, izole kompleks III eksikliği ile ilişkili baskın bir klinik fenotiptir ve hastaların >%50'sinden mtDNA'dan kodlanan tek alt birimi etkileyen *MTCYB* mutasyonları sorumludur (201). *MTCYB* mutasyonları ile ilişkili diğer klinik bulgular kardiyomiyopati ve ensefalomiyopatidir, ancak bunlar daha azdır.

Gelişim geriliği, ensefalopati, laktik asidoz karaciğer fonksiyon bozukluğu, renal tubulopati ve kas zayıflığı gibi bulgularla, nükleer kodlanan yapısal alt birimlerin dördünde ve beş yardımcı faktörde patojenik mutasyonlar bildirilmiştir (202). Birleşim faktörü *BCS1L*'deki mutasyonlar, *MTCYB*'dekilerden sonra kompleks III eksikliğinin en sık nedenidir ve 25'ten fazla farklı mutasyon bildirilmiştir (203). Mutasyonlar, izole ensefalopatiden, bir çok sistemi tutan GRACILE sendromu'na (büyüme geriliği, aminoasidüri, kolestaz, aşırı demir yükü, laktik asidoz ve erken ölüm) kadar değişen fenotipik heterojenite ile ilişkilidir.

Tamamı "ataksi plus" fenotipi ile başvuran ve *TTC19* mutasyonu bulunan 12 hasta bildirilmiştir. Ataksi, dengesiz yürüme gibi kaba motor veya düğme ilikleme, yazı yazma gibi ince motor işlerde zorluk, konuşma bozukluğu, istemsiz nistagmus veya yutma güçlüğü gibi kas koordinasyon zayıflığını gösteren nöral dejenerasyonla ilişkili (serebellum) bir bulgudur. Erken veya geç başlangıçlı semptomlarla (başlangıç yaşı aralığı: 7 ay - 45 yıl) değişken fenotip ve progresyonu olan bu hastalıkta, bazı hastalar hızla ilerleyen bir seyirle semptomların başlamasından birkaç ay ila birkaç yıl sonra kaybedilirken,

diğerleri on yıllarca hayatta kalabilmektedir. Her hastada, biallelik çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonları taşıyan null aleller tespit edilmiştir (202).

İlginç bir şekilde, çok az sayıda rapor edilmesine rağmen (örneğin, *CYC1* için $n = 2$), biallelik kompleks III gen mutasyonları ile ilişkili klinik tabloların çoğu hafiftir ve ilgili amino asitler yüksek evrimsel korunma gösterir. Hastalığın başlangıcında, yanıt olarak gelişen metabolik semptomlarla (hipoglisemi, laktik asidoz ve karaciğer fonksiyon bozukluğu) başvuran hastalar bildirilmiştir. Benzer bir tablo *UQCRB* mutasyonları için söz konusudur ve homozigot c.338_341del çerçeve kayma mutasyonu olan sadece bir vaka bildirilmiştir. Hepatik tutulum, hipoglisemi ve laktik asidozlu bir gastroenterit nöbetinden sonra sunulan vakanın, homozigot null alelleri olmasına rağmen, kalıcı zarar görmeden iyileştiği bildirilmiştir (204). *UQCRQ* mutasyonları da benzer şekilde nadirdir. Çoklu akraba evliliği olan bir ailede çok sayıda etkilenen bireyde c.208C> T s.Ser45Phe, missense varyantı Leigh benzeri bozukluk ile gelişme geriliğinin erken başlangıç bulgularını açıklamıştır. Bu tablo, birçok erken başlangıçlı mitokondriyal bulgunun aksine, devam eden nörolojik bozulma ve ölümle ilişkili değildir ve etkilenen bazı bireyler otuzlu yaşlarında halen hayattadır (205).

IV) İzole kompleks IV eksikliği

İzole kompleks IV eksikliği, izole kompleks I eksikliğinden sonra ikinci en yaygın mitokondriyal biyokimyasal bozukluktur. Genellikle erken başlangıçlı ve hızla ilerleyen tablolar, özellikle Leigh sendromu (ve Leigh benzeri) ve ciddi ensefalomiyopati ile ilişkilidir. Sekiz yapısal alt birimde patojenik mutasyonlar bildirilmiştir, ancak bugüne kadar bildirilen mutasyonların büyük çoğunluğu birleşme veya biyogenezde yer alan proteinlerden birinde ortaya çıkmaktadır. Bu güne kadar 17 COX biyogenez faktörü mitokondriyal hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Bu yolakta, iki genel kurucu mutasyon (founder) bildirilmiştir; bunlar; Fransız-Kanada nüfusu içindeki *LRPPRC* geninde 28'de 1 taşıyıcı frekansı ile gösterilen varyant (206) ve diğeri; Lübnan popülasyonunda tanımlanan *PET100* geninde başlatıcı metiyonini ortadan kaldırdığı öngörülen - c.3G>C değişimidir (207). Bazı proteinler, COX biyogenezinin spesifik yönleri ile bağlantılıdır (örn., Bakıra bağlı COX2 biyogenezinde yer alan COA6 (208).

Klinik tablolar, çoğunlukla erken başlangıçlı olup, kalp ve merkezi sinir sistemini etkiler ve yıkıcıdır. *SURF1* geni, Leigh sendromunun en yaygın nedenlerinden biridir ve 80'den fazla farklı *SURF1* mutasyonu fenotip ile ilişkilendirilmiştir (209). Diğer fenotipler arasında *COA6* mutasyonlarıyla ilişkili kardiyomiyopati ve biallelik *COX6A1* varyantlarıyla ilişkilendirilen daha hafif bir Charcot Marie Tooth fenotipi sayılabilir (210).

NDUFA4 başlangıçta kompleks I alt birimi olarak önerildi, ancak COX eksikliği olan bir hastada *NDUFA4* varyantlarının varlığı ve destekleyen fonksiyonel çalışmalarla kompleks IV'ün I alt birimi olduğu gösterildi (211). Kompleks IV'e geçişinin ardından, COX işlevindeki rolüyle ilgili tartışmalar başladı ve mevcut görüş, COX biyogenezinde rol almak yerine aslında yapısal bir kompleks IV alt birimini temsil edebileceğini düşündürdü (211,212).

V) İzole kompleks V eksikliği

İzole kompleks V eksikliği, mitokondriyal hastalığın daha nadir formlarından biridir. En sık, mtDNA'da kodlanan iki alt birimden biri olan "a" alt birimini kodlayan *MTATP6* geninde m.8993T>C/G ve m.9176T>C/G mutasyonları görülür ve LS veya daha hafif nörojenik ataksi, retinitis pigmentosa (NARP) sendromu ile ilişkilidir (213). Klinik semptomlarla ilişkili eşik, hem m.8993T>C/G hem de m.9176T>C/G mutasyonları için yüksektir ve ciddi şekilde etkilenen bireyler genellikle %97 mutant yükünü aşmaktadır. Bugüne kadar, sadece dört nükleer kompleks V geninde, mutasyon rapor edilmiştir. Ataksi ve kardiyomiyopati de dahil, çeşitli klinik fenotiplerle, laktat ve 3-metilglutakonik (3-MGA) asidüri gibi anormal metabolit atılımı ile birlikte görülür. En yaygın nükleer defektler *TMEM70* genindedir ve çok sayıda laktik asidoz ve kardiyomiyopati vakalarına neden olan bir Roma kurucu mutasyonunu da içerir. Diğer *TMEM70* mutasyonları, farklı toplumlarda bildirilen ensefalopati ve kataraktlarla ilişkilidir (214). Kompleks V eksikliğinin diğer nadir nedenleri, laktik asidozlu iki pediatrik hastada, dismorfik özellikler ve 3-MGA ile tanımlanan *ATP12*'deki mutasyonlardır (215). Yakın zamanda, *TIMM50* mutasyonları ciddi zihinsel yetersizlik, epilepsi ve 3-MGA ile ilişkili olarak kompleks V eksikliğine bağlanmıştır. *TIM50*, *TIM23*'ün bir bileşenidir ve nükleer kodlanmış proteinlerin

IMM'ye translokasyonunda rol oynar, kompleks V fonksiyonundaki özel rolü henüz belirlenmemiştir (216).

VI) Çoklu solunum zinciri defektleri

Mitokondriyal fonksiyon, yaklaşık 1150 nükleer kodlanan gen tarafından düzenlenir ve sürdürülür, bu nükleer gen ürünleri, sitozolik translasyonla ve bir mitokondriyal hedefleme dizisi aracılığıyla mitokondriye yönlendirilir. Fe-S küme biyosentezi, mtDNA tamiri, mitokondriyal mRNA transkripsiyonu ve protein translasyonunda yer alan genlerdeki defektler tipik olarak çoklu solunum zinciri komplekslerini içeren eksikliklere neden olur. Genellikle, bu genler, hasta DNA örneklerinin TED analizi ile tanımlanmıştır ve açıklanan mitokondriyal yolların her birindeki mutasyonları tanımlamak için TED başarıyla kullanılmaktadır.

Literatürde çok sayıda mitoribozom alt birimini etkileyen mutasyon bildirilmiştir. Bunlar, mitoribozomal büyük alt birim mutasyonları olan *MRPS16*, *MRPL3*, *MRPL12*, *MRPL44* (217-220) ve küçük alt birim *MRPS22* mutasyonlarıdır (221). *MRPL3* ve *MRPL44* mutasyonlarının her ikisi de erken başlangıçlı kardiyomiyopati ve çoklu OXPHOS enzim eksiklikleri ile ilişkilidir, *MRPL44* mutasyonlarında merkezi sinir sistemi tutulumunu içeren multisistemik bir tutulum söz konusudur. *MRPL12* mutasyonları büyüme geriliği ve nörolojik regresyon ile ilişkilidir ve *MRPS16* mutasyonları korpus kallozum agenezisi ve dismorfik özellikleri olan bir hastada bildirilmiştir. *MRPS22* mutasyonları ayrıca Cornelia de Lange sendromunda gözlemlenenlere benzer şekilde ek kardiyak ve böbrek tutulumu ile dismorfik özelliklere neden olur.

Nükleer olarak kodlanan mitoribozom alt birimlerindeki mutasyonlar, literatürdeki her hastalık geni için bildirilen tek veya birkaç vaka ile, mitokondriyal hastalığın nadir bir nedeni olarak görünmektedir. Buna karşılık, diğer mitokondriyal yolları etkileyen mutasyonlar oldukça yaygındır. Örneğin, *ELAC2* mutasyonlarını taşıyan beş farklı aileden (biri çoklu akraba evliliği olan) 10 hasta rapor edilmiştir (222). Hastaların çoğunda erken başlangıçlı kardiyomiyopati bulunmasına karşın akraba evliliği olguları öncelikli olarak mental gerilik ile başvurmuştu. *ELAC2*, mitokondriyal RNaseZ enzimini kodlar ve bu enzim polisistronik mRNA transkriptinden, mitokondriyal tRNA moleküllerinin 3' ucunu ayırır.

Mitokondriyal metiyonil-tRNA formiltransferazı kodlayan *MTFMT*'deki mutasyonlar, bugüne kadar 13 aileden 15 hastada bildirilen çoklu OXPHOS eksikliklerinin en yaygın nedenlerinden biridir (223). Prevalans kısmen kırılma hatasına (p.Arg181Serfs * 5) neden olan ve MAF = 0.0011 olan ortak bir c.626 C>T kurucu mutasyonundan kaynaklanmaktadır. *MTFMT*, mitokondriyal translasyon başlangıcı için gerekli olan başlangıç metiyonininin translasyon sonrası modifikasyonundan sorumludur. Etkilenen hastalar erken başlangıçlı Leigh ile sıklıkla gelişim geriliği, hipotoni ve/veya ataksi ile başvururlar.

Mitokondriyal aminoasit tRNA-sentetazlar (mt-aaRS'ler), tRNA molekülünün aynı kökenli amino asidi ile konjüge edilmesi için gereken bir enzim ailesidir ve birlikte çoklu OXPHOS eksikliklerinin ortak nedenlerini temsil eder. İnsan mitokondriyal protein sentezi için toplam 19 farklı mt-aaRS gereklidir; bunlardan ikisi hem sitozol hem de mitokondride işlev görür.

mt-aa tRNA sentetazları ile ilişkili klinik tablolar, Charcot Marie Tooth (*GARS* ve *KARS* mutasyonları), Perrault sendromu (*HARS2* ve *LARS2* mutasyonları) ve pontocerebellar hipoplazi (*RARS2* mutasyonları) dahil olmak üzere oldukça çeşitlidir. *DARS2* mutasyonları, yüksek laktat, beyin sapı, omurilik tutulumu ve lökoensefalopati ile ilişkilidir. Otuzdan fazla ailede mutasyon bildirilmiştir (224).

Şekil 2-24'te gösterilen genlerdeki mutasyonlar çok sayıda OXPHOS bileşenine dahil olmaları göz önüne alındığında beklenen bir sonuç olarak çoğunlukla çoklu OXPHOS eksiklikleri ile ilişkili olsa da, izole kompleks eksikliklerinde, tanı için zorlayıcı yeni durumlar gözlenebilir (225).

2.5.8. OXPHOS dışı mitokondriyal hastalıklar

Tüm mitokondriyal hastalıklarda, OXPHOS disfonksiyonunu gösteren kanıt yoktur. Fakat sürekli yükselen laktat, anormal idrar organik asit profilleri (örn. 3-MGA), MR'da anlamlı nöroradyolojik bulgular ve multisistem tutulumu da dahil olmak üzere mitokondriyal hastalık tanısını güçlendiren kanıtlar bulunur. Bu tür mitokondriyal bozukluklarda TED analizi ile tanımlanan genetik sebepler arasında, trikarboksilik döngüsünün (TCA) enzim defektleri (örn. ACO2) veya kofaktör transport bozuklukları (örn. SLC19A3) yer alır (226,227). Aconitase (ACO2), TCA'da sitrat izositrat geri dönüşümlü reaksiyonu katalize eden bir

mitokondriyal Fe-S proteinidir. Çocukluk çağında başlayan serebellar-retinal dejenerasyon sendromu olan yedi hastada biallelik mutasyonları bildirilmiştir (228). Bazılarının metabolik profilleri bozulmuş, asidoz ve hiperglisemi rapor edilmişken, diğerlerinde ise laktatlar tutarlı bir şekilde normal aralıkta ve metabolik tabloda kayda değer bir değişim olmamıştır (kan laktat <2.0mM).

Tiamin taşıyıcısını kodlayan *SLC19A3*'deki mutasyonlar, biyotin/tiamin cevaplı bazal gangliyon hastalığına (BTBGD) neden olur. İlişkili semptomlar, primer bazal gangliyonları etkileyen beyin lezyonlarıyla korele olarak akut ve tekrarlayan ensefalopati ataklarını takiben kademeli olarak nöroregresyon gelişimidir. *SLC19A3* mutasyonlarında, tiaminin plazma membran transportunda bozukluk olmasına rağmen, sonuçta mitokondriyal tiamin türevlerinin (tiamin pirofosfat) kaybedilmesi Leigh benzeri patolojiye neden olur. *SLC19A3* mutasyonları rapor edilen 50'den fazla hasta ile yaygındır (227,229,230) ve tedavinin mümkün olduğu bir mitokondriyal hastalık formunu temsil eder. Tiamin takviyesinin, hastalık progresyonunda düzelme ve bazı durumlarda iyileşme sağladığı gösterilmiştir (231).

2.5.9. Serbest mtDNA (ccf-mtDNA) ve İlişkili Hastalıklar

Mitokondri, yüksek miktarda organel stresine ve genom hasarına maruz kalmasına rağmen, katlanmamış protein cevabı (UPRmt), biyogenez, mitokondriyal füzyon ve fizyon, mitofaji gibi birçok farklı mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasının koordineli bir şekilde çalışması ile işlevsel ve yapısal bütünlüğü korunan bir organeldir (232). Mitokondriyal strese bağlı organel hasarı ve/veya apoptoz sırasında permeabilite artışı ile lineer mtDNA fragmanlarının organelden vücut sıvılarına çıkması, hücre dışı serbest mtDNA (circulating cell-free mtDNA/ccf-mtDNA) olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller tarafından indüklenen oksidatif stresin, organel DNA'sının hidrolizine neden olduğu gösterilmiştir (233).

Son yıllarda ccf-mtDNA'nın özellikle sistemik dolaşımdaki etkisini inceleyen çok fazla sayıda araştırma yapılmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi tarafından tanınan kuvvetli bir sinyal olup, inflamatuvar cevabı başlatmada önemli olduğu bilinmektedir (234). ccf-mtDNA'nın sistemik inflamasyon ve mitokondriyal hasar arasındaki bağlantıda merkezi rol üstlenebileceği

gösterilmiştir (235). Otoimmün hastalıklardan, kalp ve karaciğer hastalıklarına, travma ve enfeksiyonlardan kansere, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklardan psikiyatrik hastalıklara kadar, birçok farklı hastalık grubunda, vücut sıvılarından elde edilen örneklerde ccf-mtDNA miktarındaki değişimlerin prediktif amaçlı kullanımı araştırılmaktadır (234,235).

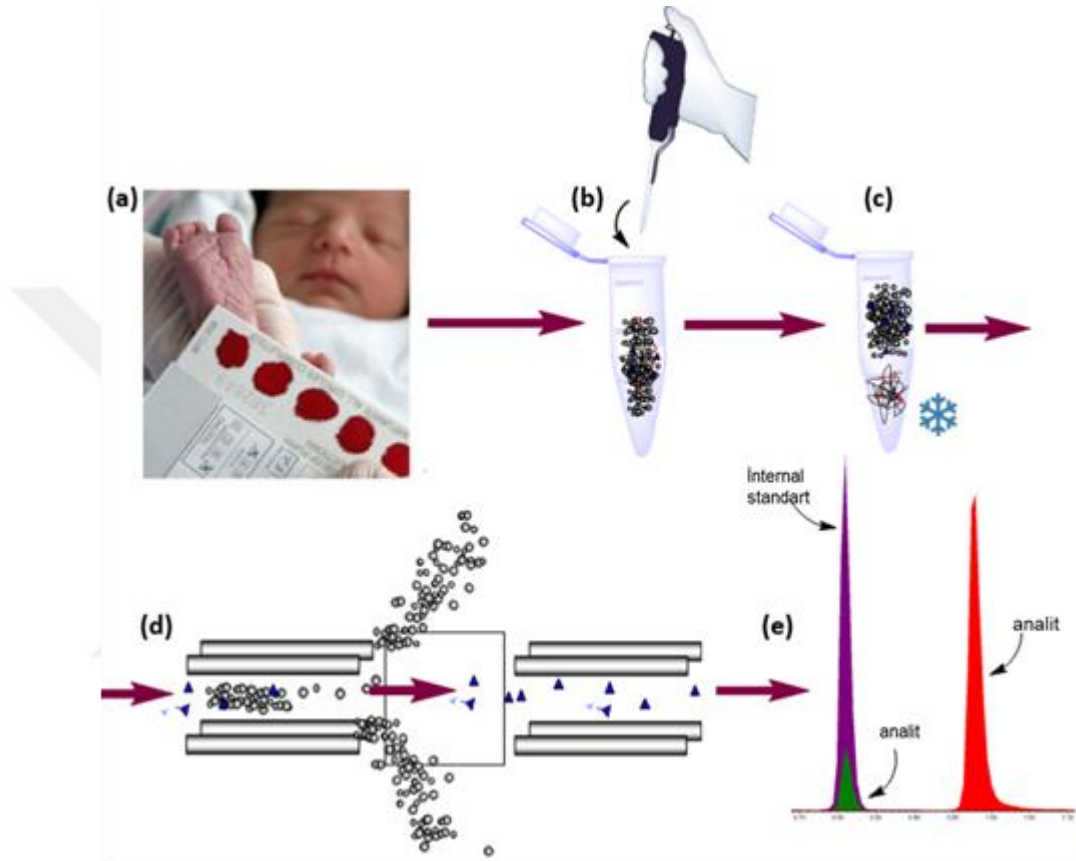
2.6. KMH TEŞHİSİ İÇİN GÜNCEL YÖNTEMLER

Yeni teknolojilerin ortaya çıkması, KMH'nin altında yatan patojenik mekanizmaların keşfi ve hastalıkların anlaşılmasında kritik bir öneme sahiptir. Aynı teknikler, klinikte bu hastalıkların teşhisinde de devrim yaratmıştır. Tandem kütle spektrometresinin hızı ve basitliği, rutin neonatal taramanın verimli ve uygun maliyetli bir şekilde yapılmasını sağlamıştır (236). YND teknolojisindeki gelişmeler, testin maliyetini, diğer laboratuvar yöntemleri ile karşılaştırılabilir düzeye getirse de, bireysel ve toplumsal düzeyde etik ve mali etkileri, yeni doğan taraması boyutunun dikkatli şekilde değerlendirilmesini gerektirir (237).

2.6.1. Biyolojik Sıvılarda Metabolit Profillerinin Analizi

KMH'nin araştırılması, teşhisi ve izlenmesi için birincil yöntem, vücut sıvılarındaki metabolitlerin analizidir. Bu testler, KMH'nin altında yatan temel ilkeye dayanmaktadır; bir enzimin disfonksiyonunun, metabolik bir yolda bir bloğa neden olması sonucu, yukarı yönde molekül birikimi ve aşağı yönde molekül eksikliğinin gösterilmesi. Klasik örnek, fenilalanin hidroksilaz (PAH) eksikliğinin neden olduğu fenilketonüridir. Fenilalaninin tirozine dönüşümünde bozulma sonucu, etkilenen bir hastadan alınan biyolojik sıvılarda amino asit konsantrasyonlarının analiz edildiğinde, yüksek seviyelerde fenilalanin ve düşük seviyelerde tirozin ortaya çıkar (238). Aslında, birçok metabolit sınıfı, belirli bir KMH'nin tanısı veya daha geniş bir alt grubun göstergesi olarak bu yöntemle analiz edilebilir. İlişkili biyolojik yolaklarda, benzer fizikokimyasal özellikleri paylaşan nispeten küçük molekül grupları,örneğin, organik asitler, açilkarnitinler, nörotransmitter amin metabolitleri, yağ asitleri ve vitaminler eşzamanlı olarak analiz edilir. Bu tetkiklerin çoğu, her bir analitin konsantrasyonunu ölçmek için kütle spektrometrisini kullanır. Kütle spektrometrisi (MS), kuru kan örneği dahil tam kan, plazma, idrar ve beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi biyolojik sıvılarda düşük konsantrasyonlarda bulunan çok sayıda metabolitin eşzamanlı ölçümüne

izin veren analitik bir tekniktir (Şekil 2-26). Kütle spektrometri, analitleri moleküler kütleleri ve yüklerine göre tanımlayan ve kantitasyonunu yapan bir tekniktir. Önce, moleküllerin gaz fazındaki iyonlara dönüştürülmesi, sonra oluşan iyonların kütle/yük (m/e veya m/z) değerlerine göre ayrılarak kaydedilmesi esasına dayanır.



Şekil 2-26: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi kullanılarak KMH tanısı.

(a) Metabolit analizinde kuru kan örneği, tam kan vb biyolojik örnekler kullanılır (b) Numune hazırlarken kullanılan internal standart her analitin miktarının belirlenmesini sağlar (c) Numune kirliliğini önlemek için ön işlemlerle proteinler çökeltilerek uzaklaştırılır (d) Numuneler, her molekülün fizikokimyasal özelliklerine dayanan bir ayırım için HPLC veya UPLC sistemine enjekte edilir. Takiben, öncü iyonlar oluşturmak için iyonize edilmek üzere kütle spektrometresine girerler. Hedeflenen öncü iyonlar seçilir ve ürün iyonu oluşturmak için argon gazı ile çarpışır (*collision cell*). (e) Bu analitlerin miktarı, alıkonma sürelerine (rt) ve kütle-yük oranına (m/z) göre, konsantrasyonu bilinen bir internal standart sinyali ile karşılaştırılarak ölçülür.

Kütle spektrometre, örnek içindeki moleküllerin tanımlanması için, metabolitin türüne göre değişen (gaz veya sıvı) kromatografik bir ayırma metodu ile birlikte kullanılır. Açılıkarnitinler gibi bazı analitler için önden

kromatografik ayırma olmadan, tandem kütle spektrometresi (MS/MS) analizi yapılır (239). Bu cihaz, tarama modunda çalıştırıldığında, tüm metabolit profilinin değerlendirilmesini sağlar, ilaç artefaktları ve interfere eden bileşiklerin ayrımını kolaylaştırır. MS/MS sistemi ardışık iki kütle analizörü içerir (tandem, MS1 ve MS2). Bu iki kütle analizörü arasında bir çarpışma odacığı yer alır. Kısaca özetlenirse, başlıca ESI (elektrosprey iyonizasyonu) yöntemi ile moleküler iyonların oluşması sağlanır. MS1 de moleküller kütle ve yüklerine göre analiz edilerek sadece istenen iyon(lar) geçirilir (öncül, intakt moleküler iyonlar). Çarpışma odacığında moleküller parçalanır (ürün iyonlar). Parçalanmanın derecesi odacığa gönderilen gazın (argon/azot) miktarı, odacığa giren moleküllere ve gaza uygulanan enerji miktarına bağlıdır. MS2 de fragman iyonlar yine kütle ve yüklerine göre analiz edilerek istenen iyonlar detektöre sunulur. Bilgisayar ortamında algoritmalar kullanılarak MS2 de ayrılan ve detektörde ölçülen ürün iyonlar, başlangıçta MS1 tarafından ayrılmış olan öncül iyonları ile ilişkilendirilir.

Tandem kütle spektrometresiyle sıvı kromatografisinin bağlanması, daha fazla analitik özgüllük sağlar. Bu amaçla, genellikle yüksek performanslı (HPLC) veya ultra performanslı sıvı kromatografi (UPLC) kullanılır. UPLC, HPLC ile karşılaştırıldığında, daha küçük sabit faz parçacıklarını kullanır ve daha yüksek basınçlarda çalışarak üstün analit çözünürlüğü, daha hızlı analiz sağlar. MS/MS'nin aksine, HPLC-MS/MS ve UPLC-MS/MS, her molekül için üç seviyeli tanımlama sağlar ki bu da daha yüksek özgüllükle kompleks bileşiklerin üstün özellikli analiziyle sonuçlanır. İlk olarak, HPLC/UPLC sistemi, bileşikleri fizikokimyasal özelliklerine göre ayırır. Bu sistem tipik olarak non-polar silika bazlı bir sabit faz ve bir elüsyon mobil fazı içerir. Mobil fazın bileşimi polaritelerine göre analitleri ayırtmak için kademeli olarak değiştirilir. Bileşiği oluşturan parametrelerin sayının değişmesi gradyan ve mobil fazın akış hızını değiştirir. Böylece her molekülün alıkonma süresi (retention time), sıvı kromatografi sütununda analit tanımlamasının ilk seviyesini oluşturur.

Kromatografik ayırmanın ardından, bileşikler sırayla kütle spektrometresine girer ve yüklü gaz fazı iyonları oluşturmak için iyonize edilir. Genellikle biyolojik sıvılarda, bir sıvı matriks içindeki polar moleküllerin analizine

en uygun teknik olan elektrosprey iyonizasyonu (ESI) yaygın olarak kullanılır. İlk olarak sıvı numune, yüklü damlacıklardan oluşan ince bir aerosol oluşturmak için, yüksek sıcaklık ve voltaj sağlayan ince bir kapiler aracılığıyla yüksek basınçta pompalanır. Daha sonra, yüksek ısıda azot gazı akışı yardımıyla, bu damlacıklar içindeki çözücü buharlaşarak gaz fazı iyonları oluşturulur (öncü iyonlar). En uygun hassasiyeti sağlamak için, ölçülecek moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak, hedeflenen iyonla özgü, pozitif veya negatif bir yük verilebilir. İyonizasyonun ardından, öncü iyonlar ilk quadrupole girer. Diagnostikte en çok kullanılan, yüksek ayırım gücüne sahip, kuadropol (dört kutuplu) kütle spektrometreleri, manyetik alan yerine iyon demeti yoluna birbirine paralel olarak hizalanmış ve içinden geçen dört silindirik metal çubuktan oluşan bir sistemi kullanır. Bu dört silindirik çubuğa hem doğru akım hem de değişken radyo frekansı (rf) gerilimi (~500 kHz) uygulanır (241). Bu voltaj, hedeflenen ilgili analitin öncü iyonuna karşılık gelen, belirli bir kütle-yük (m/z) oranına sahip iyonların geçişine izin vermek için ayarlanabilir. Bu seçim, analit tanımlamanın ikinci seviyesini oluşturur. Bununla birlikte, kompleks bir biyolojik numunede belirli bir m/z 'ye sahip iyon üretecek birden fazla metabolitin bulunması muhtemeldir. Bu nedenle, çoğu klinikte, kütle spektrometrisine dayalı analizlerde, üçlü dört kutuplu bir kütle analizörü kullanılır. Bu sistemde, ilk dört kutuptan geçen ilk seçilen öncü iyonlar bir çarpışma hücresi içinde argon gazı ile bombardıman edilerek türe özgü bir iyon ürünü oluşturmak için parçalanır. İlk quadrupolle aynı şekilde, ikincide, yalnızca ilgilenilen analitin tahmini m/z 'sine sahip ürün iyonlarını seçilir. Bu da, üçüncü seviye tanımlamayı sağlar. Hem öncü iyon hem de ürün iyonlarının tutulma süresi (RT) ve m/z değerleri kombine edilerek, metabolitleri tanımlanır ve ölçülür. Ancak belli bir m/z değerinde olan iyonlar, sabit bir rf geriliminde çubuklar arasından geçerek dedektöre ulaşırlar. Spektrum rf gerilimini değiştirerek kaydedilir.

Bu tür analizlerin, özellikle klinik laboratuvar ortamında biyolojik sıvılardaki metabolitlerin farklı konsantrasyonlarını ölçmek için birçok avantajı vardır. Bunlar arasında; yüksek örnek verimi, tek bir testle birden fazla molekülü analiz etme yeteneği ve geleneksel radyo-immünolojik testlere kıyasla daha düşük maliyet sayılabilir. Bu nedenle özellikle üçüncü basamak sevk merkezlerinde, LC-MS / MS kullanımındaki artış hızlı olmuştur (242). Ancak,

KMH tanısı için bu metodolojilerin bir sınırlaması; bulguların bir hastalığa spesifik değil, çok sayıda olası bozukluğa işaret etmesidir. Örneğin, uzun süreli piruvat birikiminin göstergesi olan plazma yüksek alanin konsantrasyonu (450 $\mu\text{mol/L}$), mitokondriyal hastalıklar için tanısaldır. Bununla birlikte, sadece belirli genetik varyantlarda veya fizyolojik stres zamanlarında bu değere yükseldiğinden hiperalaninemisinin mitokondriyal disfonksiyon için duyarlılığı düşüktür. Ayrıca çevresel faktörlere bağlı spesifik olmayan aminoasidiüriler, yanlış yorumlanabilir. Örneğin, karbonhidrat veya protein açısından zengin bir öğün sonrası kan vermek veya renal tübüler disfonksiyonun bir sonucu olabilir.

Özel Biyokimyasal Testler: Bu sınıftaki testlerin örnekleri arasında konjenital glikozilasyon bozuklukları için transferrin izoelektrik odaklama, mukopolisakkaridozlar için glikozaminoglikan ve Fabry hastalığı için globotriasilseramid analizi gibi analizler bulunur. Alternatif olarak, belirli enzimlerin aktivitesi doğrudan değerlendirilebilir. Örneğin lizozomal hastalık şüphesinde lökositlerdeki 7 ila 11 enzimin aktivitesini ölçen taramalar yapılabilir. Bu analizler, izotopik veya floresan etiketli substratlar kullanılarak sırasıyla kütle spektrometresi ve spektrofotometri kullanılarak gerçekleştirilebilir (243). Kolorimetrik kimyasal reaksiyonlar için spektrofotometre kullanılabilir (244). Enzim analizleri spesifik enzim kusurunun fonksiyonel gösterimi için kesin bir sonuç sağlar. Etkilenen hastada pozitif sonuç tanısaldır ve rezidüel enzim aktivitesinin derecesi, prognostik bilgi sağlayabilir. Sonraki adım, etkilenen ailelerde, yeni gebeliklerde prenatal tanı imkanı için patojenik varyantların tanımlanmasıdır.

2.6.2. KMH Tanısında Moleküler Yöntemler

2.6.2.1. Sanger Yöntemi ile Tek Gen Dizileme

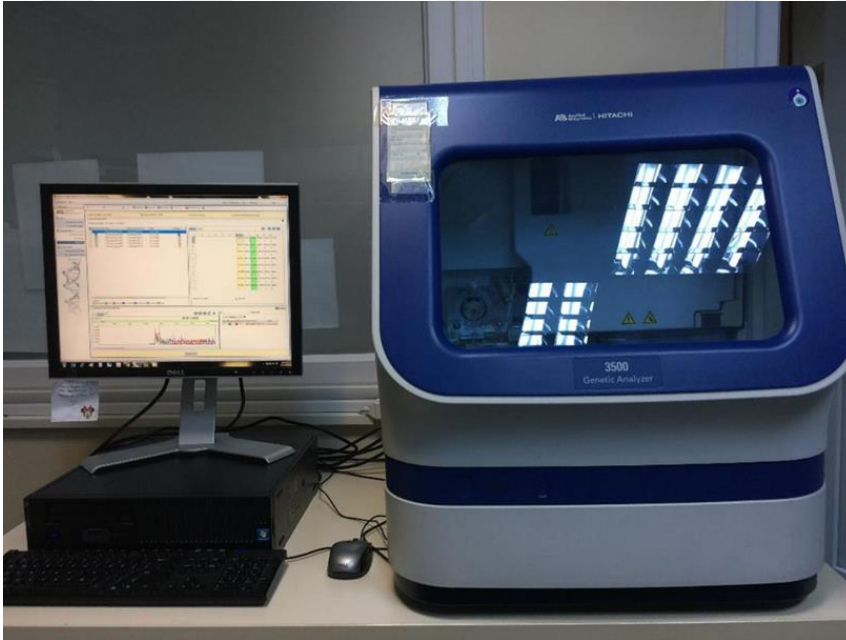
Büyük çoğunluğu otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıkları olan KMH'da, genetik tanı için geleneksel yaklaşım, aday genin tüm eksonları ve ekson-intron sınır bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu (çoğaltılması) sonrası Sanger dizilemeyi içerir. Bu yaklaşım, klinik ve biyokimyasal tanı varlığında uygulanabilir (PKU, Galaktozemi vb), ancak heterojen gruplarda aday gen belirleme gerekliliği vardır. Sanger dizileme yöntemi, yıllar süren kademeli iyileştirmeler ve otomasyondaki gelişmelerle,

1000 baz çifti uzunluğuna kadar olan sekansları, %99.999'a varan hassasiyetiyle ve oldukça düşük bir maliyetle dizileyebilmektedir (245).

DNA dizileme teknolojisi, 1977'de Sanger'in "zincir sonlandırma" veya "dideoksi" tekniğinin geliştirilmesiyle hızla ilerlemiştir. Zincir sonlandırma tekniğinde, DNA zincirinin monomerleri olan dNTP'lerin kimyasal analogları kullanılır. DNA zincirlerinin uzatılması için kullanılan ve 3' hidroksil grubu bulunmayan dideoksiribonükleotitler (ddNTP), bir sonraki dNTP'nin 5' fosfatıyla fosfodiester bağı kuramaz ve zincir uzaması durur. DNA polimerizasyon reaksiyonlarına, düşük konsantrasyonlarda, sentezi 3' uçtan durduran tek tip radyoaktif veya floresan işaretli ddNTP'ler eklendiğinde, tüm uzayan zincirlerin işaretli bazla biteceği diziler üretilmiş olur. Her bir ddNTP bazını içeren dört paralel reaksiyon gerçekleştirilir ve ürünler bir poliakrilamid jelin dört şeridi üzerinde yürütülerek otoradyografi ile nükleotit dizisi ortaya çıkarılır. Sanger'in dideoksi zincir sonlandırma yöntemi, yıllarca DNA dizilemede kullanılan en yaygın teknoloji olmuştur. İlerleyen yıllarda, reaksiyonun dört yerine bir tüpte yapılmasını sağlayan florometrik ölçüm ve kapiller elektroforez gibi gelişmeler, ilk ticari DNA dizileme cihazının geliştirilmesini sağlamıştır. Leroy Hood tarafından geliştirilen ve Applied Biosystems tarafından üretilen, ABI PRISM serisi otomatize sistemler, çok sayıda örneğin eş zamanlı dizilenmesini sağlamıştır (246). Bu yöntemle, 1990 yılında Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (*National Institutes of Health – NIH*) tarafından İnsan Genom Projesi başlatılmıştır.

Otomatize Sanger dizileme sistemleri, kapiller elektroforez ile veri ünitesinden oluşur (Şekil 2-27). Veri ünitesi, elektroforez ile bağlantıyı kuran ve toplanan verilerinin değerlendirildiği programları içeren bilgisayar sistemidir. Hazırlık için gereken reaksiyon kiti içerisinde, PZR için gerekli kimyasallar ile 4 baz için eşit miktarda ddNTP içeren miks bulunur. Bu ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir. Ortak bir PZR protokolü ile tekrarlı döngüler sonucu, her biri işaretli dört ddNTP'den biriyle sonlanan farklı uzunluklarda DNA fragmanları oluşur. Bu DNA parçalarının nükleotit dizisi, cihazın kapiller elektroforez kısmında, boyutlarına göre hizalanmaları ile belirlenir. Her bir hasta örneği, anot ve katot arasında uzanan ve çapı nanometre ölçülerindeki cam kapillerlere yüklenir ve kapiller polimerle doldurulduktan sonra, negatif yüklü

fosfat gruplarına sahip DNA dizileri pozitif yüklü anoda doğru ilerler. Oluşan elektrik alanında, her bir DNA fragmanının yükü ve elektroforetik göç hızı, içerdiği nükleotitlerin sayısına bağlıdır. Sistemde, anot ucuna yakın yerde bir lazer lambası bulunur. Sonlanma nükleotiti, kapillerin sonuna ulaştığında, floresan işaretli ddNTP (A, T, G ve C), lazerle uyarılır ve spesifik dalga boyunda bir ışık yayar. Bu ışık detektör tarafından kaydedilir ve dizileme cihazının yazılımı ile matematiksel olarak değerlendirilerek bir grafikte görüntülenir. Elektroferogram adı verilen, dizileme sonucunun okunduğu bu grafik, gözle veya çeşitli yazılımlarla incelenebilir. Hastanın DNA dizisi, referans dizi ile karşılaştırılarak hastalık ilişkili olabilecek bazı değişimleri tespit edilir (247).



Şekil 2-27: Sanger dizileme cihazı. 8 kapilleri olan bir kapiller elektroforez ile veri ünitesinden oluşur (Applied Biyosistem ABI 3500 Serisi).

2.6.2.2. Yeni Nesil DNA Dizilime Sistemleri

İnsan genom projesi sırasında, Sanger dizilemenin hız maliyet gibi sorunları nedeniyle, daha kısa sürede daha fazla dizileme yapabilen yeni yöntemler geliştirme ihtiyacı doğmuştur. Farklı biyokimyasal yöntemlere dayalı olan, ancak temelde kitlesel paralel dizileme prensibiyle çalışan otomatize sistemler (next-generation sequencing, NGS), artan hız ve düşük maliyetle tanı

oranlarını her geçen gün artırarak, moleküler tanı laboratuvarlarındaki yerini almıştır.

Yeni nesil dizilemeye (YND) geçişte ilk yöntem, pirodizileme tekniğinde, DNA polimeraz reaksiyonu sırasında, DNA zincirinin 3' ucuna dNTP eklenirken açığa çıkan pirofosfatın (PPi), kemilüminesans yöntemle ölçümüne dayanır. Biyokimyasal olarak, iki enzimatik basamaktan oluşur: (I) ATP sülfirilazın katalizlediği reaksiyonla ATP sentezi, (II) ATP lüsiferaz enziminin, lüsiferin ve ATP'yi substrat olarak kullanarak lüsiferini oksilüsiferine dönüştürmesi ile ölçülebilir ışık yayması olarak özetlenir. dNTP'nin zincire her eklenmesiyle oluşan ışımaya kamera tarafından algılanır. Pål Nyrén tarafından geliştirilen bu teknik, Sanger yöntemindeki radyoaktif işaretli ddNTP'ler yerine, doğal nükleotitler kullanılması ve elektroforez gerektirmemesi gibi avantajlara sahiptir. Bu teknikteki zayıf nokta ise, üst üste aynı nükleotitin okunma sayısıdır. Salınan ışığın yoğunluğu, homopolimerin uzunluğunu gösterebilir ancak tekrar dizisi dört veya beş nükleotitin üzerinde olduğunda doğrusal olmayan gürültülü bir okuma oluşur. İlk başarılı ticari YND teknolojisi sayılan Pirodizileme, 2005 yılında, Jonathan Rothberg tarafından kurulan ve daha sonra Roche tarafından satın alınan bir biyoteknoloji şirketi olan 454 Life Sciences tarafından geliştirilerek otomatize edilmiştir (247).

2.6.3. Ion Torrent: Entegre Yarı İletken Mikrodevre (Çip) ile Dizileme

Moleküler tanı laboratuvarlarında tanısal amaçlı kullanılan ikinci nesil dizileme platformlarından biri, Jonathan Rothburg tarafından geliştirilen başka bir Life Technologies ürünü Ion Torrent, floresan veya parlaklık ölçümünü kullanmadığından ilk "ışık sonrası sıralama" teknolojisidir (248). Emülsiyon polimeaz zincir reaksiyonu (PZR) ile üretilen ve DNA fragmanlarının klonal popülasyonlarını taşıyan manyetik bilyeler kullanılır. Sırasıyla her bir nükleotit birleşmesi yani polimerizasyon sırasında, protonların (H^+ iyonlarının) salınmasından kaynaklanan pH farkının ölçülmesi esasına dayanır. Cihazın optik bileşeni yoktur, çip ile arayüz oluşturmak için bir elektronik okuyucu pano, sinyal işleme için bir mikroişlemci ve çip üzerinde reaktiflerin akışını kontrol etmek için bir akışkan sisteminden oluşur (249).

Kısaca, DNA fragmente edilir, adaptör bağlanır ve adaptör bağlı diziler kütüphane oluşturmak üzere manyetik bilyeler üzerinde emülsiyon PZR ile çoğaltılır. Emülsiyon PZR'da (emPZR), reaksiyon yağlı su damlalarının içindeki manyetik bilyeler üzerinde gerçekleşir. Genomik DNA fragmanlarının, her iki ucuna oligonükleotit diziler ligasyon ile eklenir ve bilyelere kovalent olarak bağlanmış oligonükleotitlerin karşılığı olan bu adaptörler, DNA fragmentleri ile hibridize olarak bilyelere bağlanır. Ortalama bir DNA molekülü bir boncuk üzerinde olacak şekilde, her bir manyetik boncuğu bir klonal DNA popülasyonu kaplayarak DNA kütüphanesi oluşturulur. Klonal olarak kalıp DNA fragmanlarının bağlı olduğu manyetik bilyeler, dizileme primerleri ve DNA polimeraz ile birlikte çipin yükleme portuna pipetlenir. Teorik olarak, her bir bilyenin, ayrı bir sensör mikrokuyusuna denk gelecek şekilde yüklenmesi için santrüfleme yapılır. Otomatik analiz sırasında, iyon dzilleme, için dört nükleotitin hepsi kademeli olarak eklenir ve eklenen nükleotit, kalıp DNA bazının tamamlayıcısı ise, polimeraz tarafından sentezlenen zincire dahil edilir (250). Dizi primerinin uzunluğu bir baz artarken, gelen nükleotit trifosfatın hidrolizi her nükleotit için tek bir protonun serbest kalması ile sonuçlanır. Serbest proton, eklenen nükleotit sayısı ile orantılı olarak, çözeltinin pH'ında değişime neden olur (tek baz 0.02 pH birimi). Bu değişim, kuyucukların altındaki sensör tarafından algılanır, voltaja dönüştürülür ve elektronik olarak sayısallaştırılır. Sinyal üretimi ve tespiti 4 saniyede gerçekleşir. Her bir nükleotidin geçişinden sonra, kalan nükleotitlerin temizlenmesi için bir yıkama gerçekleşir. Kuyuların küçük boyutu difüzyona ve saniyenin onda biri zamanda, belirli sıraya göre kuyuya girip çıkmaya izin verir. Yıkama, reaktiflerin enzimatik olarak uzaklaştırılması ihtiyacını ortadan kaldırır. Her ardışık nükleotit akışı için oluşan sinyali işleme ve ham gerilimi baza dönüştürmek için, (baz çağırma, base calling) fiziksel bir model kullanılır. Bu model her kuyucuktan elde edilen ham sinyalleri çıkartır, düzeltir, sinyal kaybını önler ve o kuyudaki diziye uygun doğru bazı çağırır. Her okumada kullanılan iki sinyal tabanlı filtreler düşük doğrulukta okumaları engeller. İlk filtre, bir birleşme olayının ölçüldüğü akışların oranıdır ve bu değer alışılmadık derecede büyük olduğunda (ilk 60 okumanın % 60'ından büyük) okuma klonal değildir. İkinci filtre, gözlemlenen sinyal değerlerinin, fazlama modeli tarafından öngörülenlerle eşleşme ölçüsünün derecesini ölçer.

Eşleşme derecesi düşük ise daha yüksek hata oranları olacağından filtreden geçemez. Son olarak, baz başına tahmin edilen kalite değerleri, Phred yönteminin bir uyarlamasını kullanarak, tahmin edilen sinyal değeri ile gözlemlenen sinyal arasındaki uyumu ölçer. Ion Torrent S5 sistemi ile tüm genom, ekzom, transkriptom, metagenom ve hedef gen panellerinin dizilemesi yapılabilmektedir.

2.6.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Ion Torrent sisteminde her birinin altında ion sinyali alıcısı bulunan sık yerleştirilmiş milyonlarca kuyucuğa sahip çip üzerinde dizileme yapılmaktadır. Sistem dizileme sırasında amplikonlara dNTP bağlandığında her bir kuyucuktan çıkan H⁺ ionlarını algılayarak ham verilere dönüşmektedir. Ham veriler sinyal işleme, baz isimlendirme, haritalama ve varyant isimlendirme basamaklarından oluşan bir iş akışı ile işlenmektedir (251).

1. Sinyal işleme: bu aşamada alınan ion sinyalleri voltaja dönüştürülülerek DAT dosyasında toplanmaktadır.

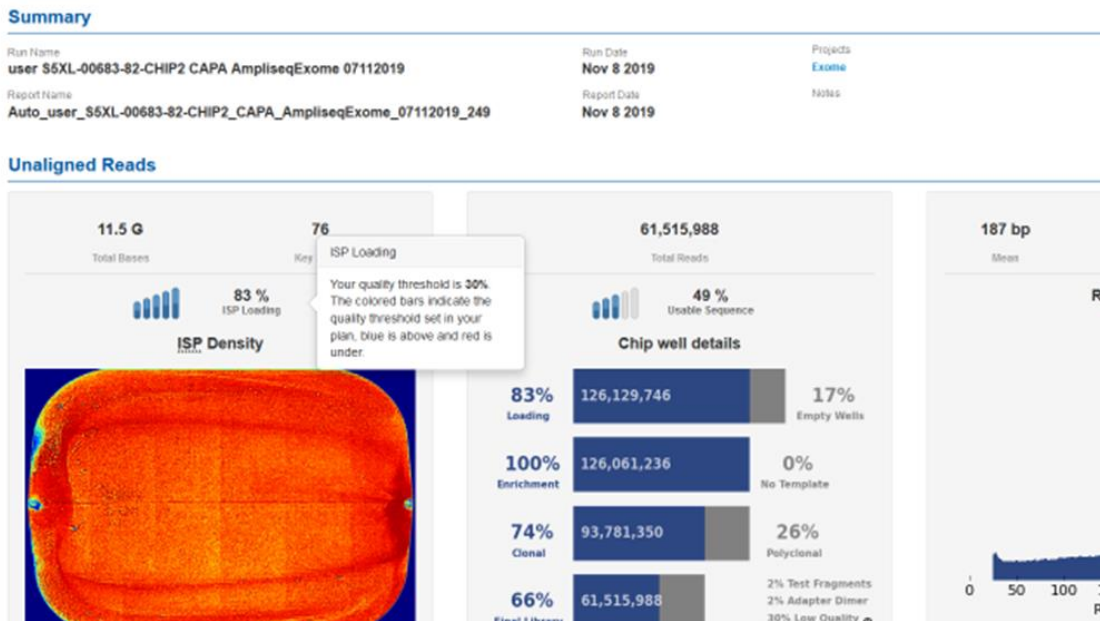
2. Baz isimlendirme (base calling): dNTP akışı sırasında kuyularda her bir dNTP bağlandığında işaretlenen bazlar WELLS dosyasında toplanmaktadır. Baz isimlendirilirken hangi kuyucuktaki amplikonlara, hangi dNTP'nin, kaç tekrarla bağlandığı ionogram grafiği olarak görülebilmektedir. Sistemde, ionogram verisi haritalanmamış BAM (Binary Alignment Map file) dosyası formatına çevrilerek saklanmaktadır.

3. Haritalama: ionogram okuması sonrası BAM dosyasına dönüştürülen dizi bilgileri her bir amplikon için referans genomla eşleştirilerek haritalanmış BAM-BAI dosyasına dönüştürülmektedir. Torrent Server haritalamada özgün olarak yazılmış Torrent Mapping Alignment Program-TMAP algoritmasını kullanmaktadır (252). Bu kalite değerlendirmeleri sonucunda ortalama kaç bazın hangi kalite değerinde haritalandığı, haritalanan ortalama baz sayısı, en uzun haritalama ve haritalanan bölgenin derinlik bilgileri verilmektedir. Bu basamakta sistem referans genoma haritalanan ve haritalanamayan toplam baz sayısını ve yüzdesini, okumaların ortalama doğruluk yüzdesini vermektedir.

4. Varyant isimlendirme (variant calling) - Amplikonlar haritalandıktan sonra referans genomla eşleşmeyen baz/bazlar varyant olarak isimlendirilirler. Bu veriler VCF (Variant Call Format) dosyasında toplanır (253,254).

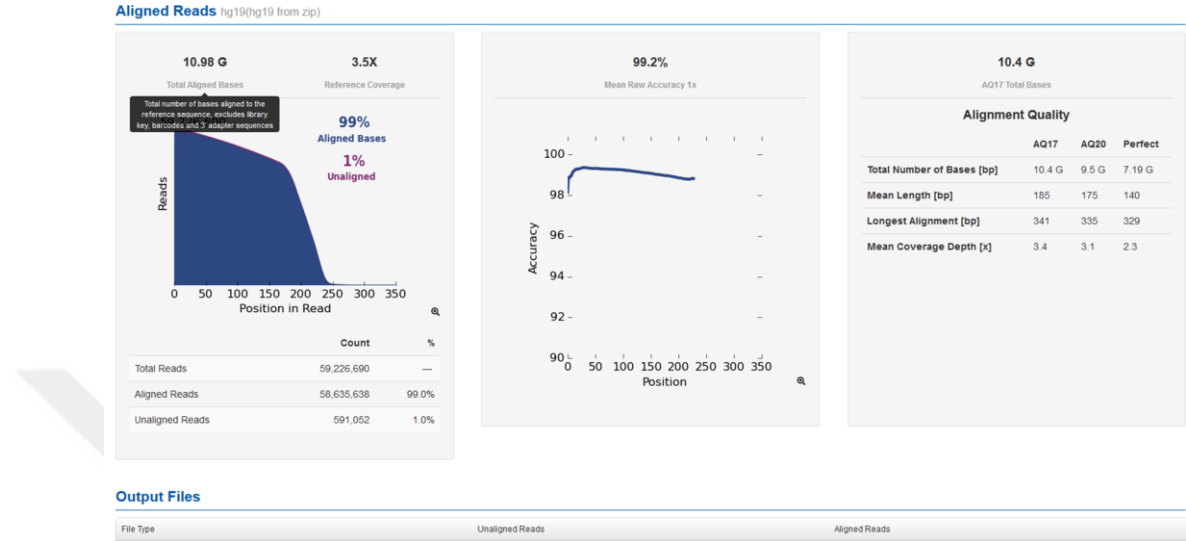
Tüm bu aşamaları yaparken sistem birçok filtreleme ve kalite değerlendirme parametreleri kullanmaktadır. Bu işlemde 3' uçlarından kalite değerlerine göre okuma kalitesi düşük bazlar kırılarak (trimleme) optimum kalitede baz içeren diziler elde edilir.

Dizileme sonrası; Torrent Server'in arayüzünden çalışmanın metrik sonuçları görülebilir. (I) Ion Sphere Particles-ISP'in (üzerinde emPZR'de çoğalmış amplikonlar olan kürecikler) yoğunluğu: yüklenen ISP yüzdesine göre hesaplanan toplam baz sayısı, anahtar sinyal (ardışık gelen bazların sayısını belirlemede kullanılır) ve çip kuyucuklarına yüklenen ISP yüzdesi bilgileri, (II) ISP özet bilgileri-toplam okuma sayısı, kullanılabilir okuma sayısı, dolu ve boş kuyucukların, zenginleştirme, klonalite, kullanılabilir kütüphane ürünleri, test fragmanları, adaptör dimerleri ve düşük kaliteli ürünlerin yüzde bilgileri, (III) Okuma uzunluğu bilgileri; aritmetik ortalama, ortanca ve tepedeğer okuma değerlerinin (bç olarak) grafik görüntüsü Şekil 2-28 'de görülmektedir.



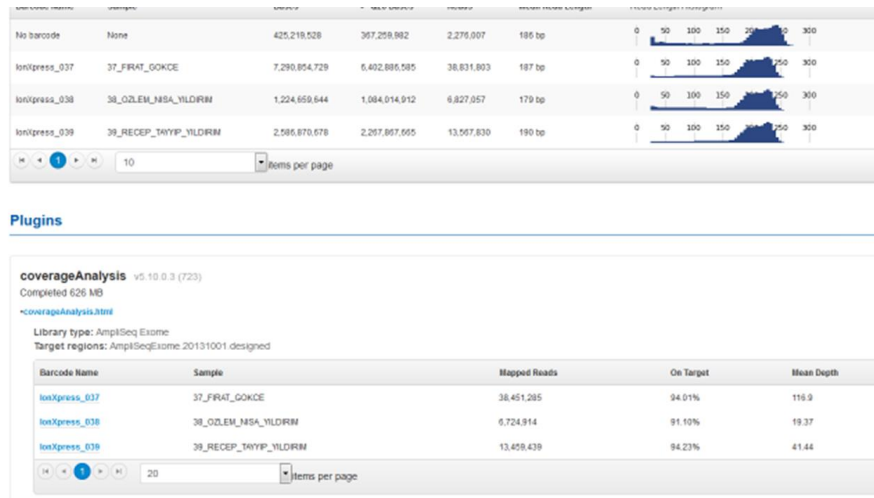
Şekil 2-28: TED analizi okuma özeti, uzunluk bilgilerinin metrik sonuçları haritalama, kapsam ve derinlik, varyant isimlendirme sonuçları da görülmekte,

analiz için gerekli dosyalar indirilebilmektedir. Haritalamada eşleştirilen ve eşleştirilemeyen baz yüzdeleri, eşleştirilmenin ortalama doğruluk bilgileri, haritalamanın kalite değerleri görülmektedir (Şekil 2-29).



Şekil 2-29: Torrent Server arayüzünde haritalama sonuçlarının görseli

Kapsam (*coverage*) ve derinlik (*coverage deep*)-hedef genomik bölge ile eşleştirilen bölgelerin ne kadar derinlikte (kaç tekrarla) okunduğu Torrent Server'de *coverageAnalysis* ek programı (*Plugin*) ile incelenir. Bu program her çip için örnek bazında haritalama, kapsam ve derinlik hedef bölgenin yüzde kaçının kapsandığını ve dizi özgünlüğünü bilgilerini sunar (Şekil 2-30).



Şekil 2-30: Torrent Server Plugin ile Kapsam ve derinlik analizi.

Varyant isimlendirme - Torrent Server programı variantcaller ek programı ile varyant isimlendirmesi yapabilmektedir. Bu program her çip için olgu bazında hedef bölgede yerleşik olan bazların tek (SNP) ve çoklu (MNP) nükleotid değişimi (polimorfizmi), insersiyon ve delesyon olarak varyantları tanımlar. Programın varyant isimlendirme için gerekli filtreleme parametrelerinden geçen ve referans genomla eşleşmeyen bazlar sistemde varyant olarak okunmaktadır. Baz olarak isimlendirilemeyen ve/veya referans genomla eşleşmemesine rağmen varyant filtreleme parametrelerinden geçmediği için varyant olarak isimlendirilemeyen bazlar *no call* olarak isimlendirilmektedir. Sisteme varyant değerlendirmesi açısından kontrol etmesi istenen hedef baz lokasyonları hot spot dosyası olarak yüklenmiş ise varyant raporlandırmasında bu noktalar hakkında detaylı bilgi verilir. Bu bilgilerde okunan bazın referans, varyant ya da *no call* olarak durumunun nedenleri raporlandırılır. Ancak hot spot dosyasında bulunmayan lokasyonlarda saptanan No Call noktaları, geri plan dosyalarında raporlandırılmaktadır. Bu bölgeler IGV penceresinden incelenerek, hangi parametreden dolayı okunamadı ise o parametrenin durumu manuel olarak değerlendirilebilmektedir. Hot spot dosyasında yer alan No Call'ların öncelikli olarak IGV'den incelenmesi, eğer gerçek bir değişimden şüphelenilirse ve bu varyant mutasyon olarak tanımlanmış ise Sanger dizileme ile doğrulanması gerekmektedir. variantCaller ek programında her bir örneğin varyant detayı farklı formatlarda sunulmaktadır. Aynı zamanda bu bilgiler IGV programında açılabilir şekilde bağlantı içermektedir (255, 256).

Bu değerlendirmelerden sonra her olgunun dizi verileri IonReporter analiz programına aktarılır ve yeniden varyant isimlendirme ve değerlendirme için analiz ettirilir. Varyantların saptanmasından sonra analiz programında diğer veritabanlarından alınmış olan bilgiler de kullanılarak olgularda saptanan her bir varyant için biyoinformatik yorumlama (variant annotation) ve raporlama yapılabilir.

2.6.5. Tüm Ekzom Dizileme (TED)

YND, genetik varyantları tanımlamak, genom yapısını ve işlevini anlamak için çeşitli yaklaşımlar ortaya koymuştur. Nadir genetik hastalıkları olan bireylere uygulandığında bu yaklaşımlar yeni gen keşfini ve hasta teşhisini büyük ölçüde hızlandırmıştır. Klinik tanının yönlendirici olmadığı tanısall yaklaşımlarda, tüm ekzom dizileme en yaygın kullanılan dizileme yöntemidir. Ekzom, protein kodlayan, genom parçası olup, RNA ve ardından intron kırılması ile transkript oluşturan gen bölgelerinin tamamıdır. Bu bölgeler insan genomunun % 2'sinden daha azını temsil etmesine rağmen bilinen patojenik varyantların çoğunu içerir. Dolayısıyla, sadece bu bölgelerin dizilenmesi, bireyin, intronlar dahil tüm genom dizisinin belirlenmesi olarak tanımlanan tüm genom dizilemeye (TGD) göre uygun maliyetli bir alternatiftir. Hem TED hem de TGD, panel gen dizilemeye göre, hastalığa neden olan genlerdeki yeni varyantları saptama avantajına sahiptir. Olası bir hastalık sınıfının, önceden tanımlanmış gen veya mutasyon olması gerekmez. Ancak, bulunan yeni varyantın aile çalışması fonksiyonel çalışma yapılarak doğrulanması gerekir. Panel gen dizileme ve tüm ekzom dizilemenin her ikisi de yalnızca ekzonik bölgeleri hedeflediğinden, derin intronik veya düzenleyici bölgelerdeki herhangi bir patojenik mutasyon tanımlanmayacaktır. Ayrıca, YND teknolojilerinin kısa dizilemeler yapması nedeniyle (~150bç) kopya sayısı değişiklikleri, genomik yeniden düzenlemeler tespit edilemeyebilir. Tüm genom diziliminin bir avantajı da bu tip yapısal değişiklikleri tespit edebilmesidir. Fakat elde edilen çok sayıda varyantın, filtrelenmesi ve yorumlanması uzun süreli bir işlem olacağından, tüm genom dizilemenin araştırma dışında, tanısall yaklaşım olarak rutin uygulamaya girmesine henüz zaman vardır (257).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, 2018-2019 yıllarında İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Beslenme ve Metabolizma BD tarafından takip ve tedavi altında olup, moleküler genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik AD'a yönlendirilen veya Tıbbi Genetik AD'a başvuran, mevcut klinik, radyolojik ve laboratuvar bulguları ile henüz kesin tanısı konulamamış, bilgilendirilerek gönüllü onamları alınan 20 farklı aileden toplam 26 olgu dahil edildi. Bu çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 08.06.2018/872 tarih ve sayısı ile onaylanmıştır.

3.1. Klinik Değerlendirmeler

Tüm olgular, Tıbbi Genetik polikliniğinde, ayrıntılı öykü, fizik muayene, radyolojik ve laboratuvar bulguları ile bütünsel olarak değerlendirildi. En az üç kuşak sorgulanarak aile ağaçları çizildi. Ebeveynlerin yaşı, gravida (G, gebelik sayısı), parite (P, doğum sayısı), abortus (A, düşük sayısı), yaşayan (Y) çocuk sayısı gibi verileri kaydedildi. Mevcut radyolojik, histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler genetik testleri ile kesin tanısı konulamamış olan olgu ve aileler tez kapsamına alındı. Olgu seçiminde, aynı ailede birden fazla bireyde benzer bulguları olan ve/veya prenatal/preimplantasyon genetik tanı isteği olan üreme çağındaki çiftlere öncelik verildi. Projeye dahil edilen ailelerin ondördü, Çocuk Beslenme ve Metabolizma BD'da klinik, radyolojik ve biyokimyasal olarak mitokondrial hastalık ön tanısı ile takip ediliyordu (Aile 1,2,3,4,6,7,10,11,12,13,16,17,18,19). Bir olgu ketoliz defekti veya mitokondrial hastalık ön tanıları ile izleniyordu (Aile 8). İki ailede CDG şüphesi ile takip edilen birer indeks olgu vardı (Aile 9 ve 20). Diğer bir ailede, iki etkilenmiş olgu on yıl önce Tıbbi Genetik polikliniğinde tetkik edilmiş ancak tanı konulamamıştı (Aile 5). Bir diğer olgu, esansiyel tremoru ve kreatin kinaz (CK) yüksekliği olan, metabolik myopati şüphesiyle Nöroloji AD'dan yönlendirilen genç erişkin bir olguydu (Aile 14). Ağır büyüme gelişme geriliği olan iki etkilenmiş kardeş, klinik ön tanı olmaksızın dış merkezden Tıbbi Genetik polikliniğine yönlendirilen olgulardı (Aile 15). Mitokondrial hastalık klinik tanısı olan olgulara, özgün tasarlanan primerler ile uzun polimeraz zincir reaksiyonu (*Long-range PZR*)

sonrası, fragmentasyon tabanlı YND ile tüm mtDNA dizilemesi yapıldı. Ardından tüm olgulara TED analizi gerçekleştirildi. Aralarında akrabalık olmayan bir ailede anne–baba ve indeks olgu olmak üzere üçlü (trio) analiz yapıldı (Aile 3), diğer ailelerde, akrabalık durumu, benzer etkilenmiş kardeş veya sağlıklı kardeş varlığına göre ikili (*paired*) (Aile-2, Aile 5, Aile 11, Aile 15) ve kalan diğer ailelere de tekli (*solo*) TED analizleri yapıldı.

3.2. Moleküler Yöntemler

Yeni nesil dizileme ile uzun PZR sonrası özgün geliştirilen fragmentasyon tabanlı mtDNA dizileme ve TED ıslak laboratuvar çalışmaları, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD laboratuvarında, Thermo Scientific™ Ion GeneStudio S5 Sistem platformunda yapıldı. Torrent server yazılımına aktarılan veriler, patolojiye özgü bir akış şeması oluşturularak Ion Reporter analiz programında incelendi.

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Hastalardan, steril K₃EDTA'lı tüplere alınan, 3 ml periferik venöz kan örneklerinden, solüsyon/manyetik boncuk bazlı otomatik sistemle (MagPurix 12s Instrument, Automated Nucleic Acid Purification System) özgün kitler kullanılarak (MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200,Cat.Op02001-48), üretici firma protokollerine uygun olarak genomik DNA izolasyonları yapıldı.

3.2.1.1. DNA Miktar ve Saflığının Ölçümü

Genomik DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/μl) ile 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon ölçümleri UV spektrofotometresi ile yapıldı (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer). A₂₆₀/A₂₈₀ oranı 1,80-1,89 değeri ideal kabul edildi. A₂₆₀/A₂₈₀ değerleri 1,80'den daha az olan örnekler protein kontaminasyonu nedeniyle manuel olarak tekrar çöktürülerek saflaştırıldı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı 1,89'den fazla olan örnekler ise RNase enzimi ile muamele edilerek fazla olan ribonükleik asitler parçalandı. Hazırlanan genomik DNA'lar, tüm verileri DNA bankasına kaydedilerek -20 oC 'de saklandı.

YND analizi için, DNA yoğunluğu 1,6-2,0 ng/μl olacak şekilde miliQ su ile (18MΩ) gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (Qubit dsDNA HS Assay Kit) florometrik

yöntemle (Qubit® 3.0 Fluorometer) tekrar ölçüldü ve final DNA yoğunluklarının yeni nesil dizileme için istenen aralıkta (1,6 - 2ng/µl) olması sağlandı.

3.2.2. YND ile Fragmentasyon tabanlı Tüm mtDNA Dizi Analizi

3.2.2.1. mtDNA Uzun PZR için Primer Tasarımı

Öncelikle, 16.569 baz çiftinden oluşan mtDNA' yı parçalı çoğaltan, 5077 bç, 4393 bç, 5465 bç, 5540 bç uzunluğunda 4 çift primer tasarlandı. Her bölgenin özgünlüğü, UCSC In-Silico PCR, NCBI Primer-BLAST ve IDT OligoAnalyzer Tool kullanılarak incelendi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Mitokondriyal genomu parçalı çoğaltan primer çiftleri

Primer	Hedef bölge	dizi	tm	boyut
ChrM-1F	<u>chrM:1+5072</u> 5072 bp	5'- CGATGGATCACAGGTCTATCA-3'	58.5	5077
ChrM-1R		gatcacaggtctatca 5'- GGTTATGTTAGGGTTGTACGGTAGAA -3'	60.7	
		ttgaccaacggaacaagttacc		
ChrM-2F	<u>chrM:4951+9343</u> 4393 bp	5'- CCATCATAGCAGGCAGTTGA 3'	59.8	4393
ChrM-2R		5'- CCTAGTATGAGGAGCGTTATGGAGT- 3'	61.2	
ChrM-3F	<u>chrM:8904+14368</u> 5465 bp	5'- CCACTTCTTACCACAAGGCACA -3'	62.4	5465
ChrM-3R		5'- GGTGCTGTGGGTGAAAGAGTAT- 3'	60.4	
ChrM-4F	<u>chrM:13958+2928</u> 5540 bp	5' - GCCTTCTTACGAGCCAAAA 3'	58.1	5540
ChrM-4R		5' - GGTAACCTTGTTCCGTTGGTCAA -3'	61.2	

3.2.2.2. mtDNA'nın Uzun PZR ile çoğaltılması

Hedef bölge çoğaltma işlemi Thermo Scientific™ Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi, dNTP Mix (25 mM each) nükleotidleri, tasarlanılan ileri ve geri yönlü oligonükleotidler kullanılarak yapıldı. Kullanılan enzim, kimyasallar ve uygulanan protokol Tablo 3-2 ve Tablo 3-3'de belirtildiği gibidir.

Tablo 3-2: Long PZR için gerekli kimyasal bileşenler ve son hacimleri

Kimyasal Bileşenler	Final Konsantrasyon	Hacim (50 µL)
dH ₂ O	-	33,1 µl
5x Phusion HF Buffer	1x	10 µl
dNTP (25mM)	0,2 mM	0,4 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µM	2,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µM	2,5 µl
Phusion High Fidelity DNA Polimeraz	-	0,5 µL
DNA Miktarı	-	1 µL

Tablo 3-3: Long PCR termal döngü koşulları

Termal döngü adımı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30 sn	1
Çift Zincir Ayrılması	98 °C	30 sn	10
Primer Bağlanma	62/64 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	4 dk	
Çift Zincir Ayrılması	98 °C	30 sn	35
Primer Bağlanma	60/62 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	4 dk	
Son Uzama	72 °C	10 dk	1
Saklama	4 °C	∞	1

PZR ürünlerinin filtre purifikasyonu

mtDNA örneklerinin purifikasyon işlemi Roche High Pure PCR Product Purification Kit'i kullanılarak filtreleme tekniğiyle yapıldı. (Version: 17, Content version: April 2017, Cat. No. 11 732 676 001). Elüsyon için son hacim 50 µL olarak belirlendi.

Bant boyu kontrolü için agaroz jel görüntülemesi

Purifikasyon sonrası, örnekler bant boyunun uygunluğu ve nonspesifik bant kontrolü açısından elektroforez ile kontrol edildi. Sigma Agarose A-5093 ve 1X TBE tamponu (Tris, Borik asit ve EDTA çözeltisi) kullanılarak %0,7'lik, 80 kuyuluk jel hazırlandı. Her bir bölge için 5 µl örnek 3 µl yükleme boyası karışımı ve son kuyuya bant boyu kontrolü için marker (O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder) yüklendi. Elektroforezde 90 V'da 60 dk yürütüldü. UV transilluminatörde görüntüleme sağlandı.

3.2.2.3. mtDNA Fragman Kütüphanesinin Hazırlanması

Fragmantasyon işlemi, Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Kat. No. 4471269) kullanılarak yapıldı. Önerilen DNA girdisi kütüphane başına 50-100 ng olup, her bir örnek için 4 bölgenin tek tüpte birleştirilme işlemi yapıldıktan sonra, son hacim 35 µL olacak şekilde örnekler dH₂O eklendi.

Kütüphane boyutu 400 baz okuma uzunluğunda seçildi ve medyan fragman boyutu 350-450 bp olacak şekilde fragmentasyon işlemi yapıldı. Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer ve Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II ile prosedüre uygun olarak enzim kesimi gerçekleştirildi.

Tablo 3-4: Fragmentasyon ve Pürifikasyon prosedürünün malzemeleri

Kimyasal reaktif	Miktar
Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer	5 µL
Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II	10 µL
Ion Shear™ Plus Stop Buffer	5 µL
Low TE	25 µL

Diğer malzemeler:

- Nükleaz içermeyen su
- 1.5 mL Eppendorf LoBind™ Tüpleri
- 0.2 ml PCR tüpleri
- 37 ° C ısı bloğu
- Agencourt™ AMPure™ XP Reaktifi
- Taze hazırlanmış% 70 etanol
- Manyetik Rak (DynaMag™-2 Magnet)
- Kontrol DNA – E. coli DH10B Genomik Kontrol

Öncelikle aşağıdaki reaktifler, belirtilen sırayla 1.5 mL Eppendorf LoBind™ tüpüne eklendi, ardından 5 saniye vortekslenerek kuvvetlice karıştırıldı ve pulse santrifüj yapıldı.

Tablo 3-5: Fragmentasyon için kullanılan mtDNA ve kimyasallar

İçerik	Hacim (50–100 ng DNA için)
mtDNA, 50-100 ng	x µL
Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer	5 µL
Nuclease-free Water	35 – x µL
Total	40µL

10 µL Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II numuneye eklendi. Reaksiyon, 8-10 kez yukarı ve aşağı pipetlenerek karıştırıldı. Tüpler ısı bloğunda 37 °C'de numunelerin seçmiş olduğumuz 350-450 bazlık medyan fragment boyutuna indirgenmesi için 2 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan hemen sonra 5 µL Ion Shear™ Stop Buffer eklendi, ardından en az 5 saniye vortekslendi. Reaksiyon tüpü buz üzerinde bekletildi.

Fragmente edilen DNA'nın saflaştırılması için protokol adımları

- 500-baz ve altındaki okumalar için uygun olan 99 µL Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (1.8X numune) eklendi.
- Boncuk süspansiyonu DNA ile karıştırması için 5 kez yukarı ve aşağı pipetlendi. Pulse santrifüj uygulandı, sonra karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Tekrar pulse santrifüj uygulandı, daha sonra tüp genomik materyalin tutulması için DynaMag™-2 magnet manyetik rakına yerleştirildi, 3 dakika boyunca veya çözeltideki kahverengi ton kaybolana kadar bekletildi, ardından boncuk pelleti bozulmadan süpernatant atıldı.
- Tüpü manyetik raktan çıkarmadan, 500 µL taze hazırlanmış %70 etanol eklendi. Boncukları çalkalamak için tüp manyetik rak ile 3-4 kez döndürülerek 30 saniye inkübe edildi. Pelet bozulmadan süpernatant atıldı. Bu adım tekrar edildi.
- Etanol kalıntısını uzaklaştırmak için, pulse santrifüj uygulandı, manyetik raka geri yerleştirildi, pelleti bozmadan 20 µL pipetle kalan süpernatant atıldı.
- Manyetik rak üzerinde tutularak, boncuklar oda sıcaklığında 5 dakika hava ile kurutuldu.
- Tüp manyetik raktan çıkarıldı, boncukları dağıtmak için pellete 25 µl low TE eklendi. Süspansiyon pipetlenerek karıştırıldı, sonra 10 saniye vortekslendi.
- Pulse santrifüj uygulandı, daha sonra tüp manyetik rakta en az 1 dakika veya çözelti berraklaşana kadar bekletildi. Elüe edilmiş olan DNA içeren süpernatant, pelleti dağıtmadan, yeni bir 0.2 mL PCR tüpüne aktarıldı.

Adaptörlerin bağlanması, barkodlama, çentik-onarımı ve bağlı DNA'nın saflaştırılması Bu prosedür için Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit içinde bulunan kimyasal bileşenler:

- 10X Ligaz Buffer
- DNA Ligaz
- Nick Repair Polymerase
- dNTP mix ve Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit içindeki bileşenler
- Ion Xpress™ P1 Adaptörü
- Ion Xpress™ Barkocod X (kütüphane başına 1 barkod adaptörü)

Diğer materyaller:

- 0.2 mL PCR tüpleri
- Thermal cycler (96-Well Thermal Cycler)
- Nükleaz İçermeyen Su
- Agencourt™ AMPure™ XP Reaktifi
- Taze hazırlanmış% 70 etanol
- Manyetik Rak (DynaMag™-2 magnet)

Adaptör bağlanması ve çentik onarımı için protokol adımları

- Reaktifler, 0.2 mL'lik bir PZR tüpünde, aşağıdaki barkodlu kütüphanler için olan reaksiyon tablosuna göre birleştirildi ve ardından pipetaj ile karıştırıldı. Her bir örnek için ayrı Ion Xpress™ Barcode X kullanıldı. Yaklaşık 25 µL mtDNA, hazırlanan karışım ile muamele edildi.

Tablo 3-6: Adaptör bağlanması ve çentik onarımı için kullanılan kimyasallar

Kimyasal bileşen	Miktar
10X Ligase Buffer	10 µL
Ion Xpress™ P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress™ Barcode X (1 barcode adapter per library)	2 µL
dNTP Mix	2 µL
dH ₂ O (18 MΩ)	49 µL
DNA Ligase	2 µL
Nick Repair Polymerase	8 µL
mtDNA (50–100-ng DNA)	~25 µL
Total volüm	100 µL

Tablo 3-7: Bağlanma işlemi için uygulanan Ligasyon PZR protokolü

İşlem	Derece	Süre
Karışma	25 °C	15 dk
Uzama	72 °C	5 dk
Saklama	4 °C	∞

- Tüm reaksiyon karışımı saflaştırılma aşaması için yeni bir 1.5 mL Eppendorf LoBind™ tüpüne aktarıldı.

Adaptör bağlı ve çentik onarımı yapılmış DNA'nın saflaştırılması için protokol adımları

- 400-600 baz okuması için 100 µL (1X sample volume) Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi numuneye eklendi. Boncuk süspansiyonu DNA ile karışması için vortekslendi, sonra pulse santrifüj yapıldı. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Pulse santrifüj uygulandı ve ardından DynaMag™-2 magnet manyetik rakında 3 dakika boyunca veya çözelti berraklaşana kadar bekletildi. Pellet bozulmadan süpernatant atıldı.
- Bir önceki pürifikasyon adımları aynen tekrarlandı ancak %70 etanol ile yıkama adımı ikinci bir yıkama sağlamak için iki kez yapıldı. Son aşamada elüe edilmiş DNA içeren süpernatant, pelleti bozmadan yeni bir 1.5 mL Eppendorf LoBind™ tüpüne aktarıldı.

3.2.2.4. Hazırlanan kütüphanede E-Gel™ SizeSelect™ Agarose Gel ile boyut seçimi

İşlem Size-select the library with the E-Gel™ SizeSelect™ Agarose Gel protokolüne uygun olarak yapıldı. Kütüphane boyutu 400 baz-okuması (400-base-read) uzunluğunda belirlendi. Örnekler 25 µL yüklendi ve geri kazanım kuyucukları 25 µL deiyonize su ile dolduruldu. Marker kuyusuna 10 µL kullanıma hazır E-Gel™ Sizing (Invitrogen 50 bp) DNA Ladder yüklendi.

E-Gel™ SizeSelect™ 2% Agarose Gel, E-Gel™ iBase™'e yerleştirildi. Protokolde belirtildiği gibi Run SizeSelect 2% programında yürütme işlemi gerçekleştirildi ve optimizasyon sağlanan 20 dk 58 sn sonra örnekler toplandı. Numune pipetle temiz bir 1.5 mL Eppendorf LoBind™ tüpüne geri konuldu.

Tablo 3-8: Boyut-seçim işlemi için gerekli kimyasallar

Low TE (from Ion Plus Fragment Library Kit)
E-Gel™ iBase™ unit and E-Gel™ Safe Imager™ transilluminator combo kit
E-Gel™ SizeSelect™ 2% Agarose Gel
Invitrogen 50-bp DNA Ladder - Cat.No. 10416-014 (400-base-read libraries)
dH ₂ O (18 MΩ)

3.2.2.5. Kütüphanenin çoğaltılması için protokol

İşlemler, Amplify and purify the library protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. PZR işlemi için Veriti™ 96-WellThermal Cyclers (Catalog number: 4375786) kullanıldı. Kullanılan malzemeler Tablo 4.1.7’de PZR protokolü Tablo 4.1.8’de belirtilmiştir.

Tablo 3-9: Kütüphanenin çoğaltılması için gereken kimyasal hacimleri

Kimyasal	Miktar
Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity	100 µL
Library Amplification Primer Mix	5 µL
Unamplified library	25 µL

Tablo 3-10: Kütüphanenin çoğaltılması için optimum PZR koşulları

İşlem	Derece	Süre	Döngü
Çift Zincir Ayrılması	95 °C	5 dk	1
Çift Zincir Ayrılması	95 °C	15 sn	8
Primer Bağlanma	58 °C	15 sn	
Uzama	70 °C	1 dk	
Saklama	4 °C	∞	1

Kütüphanenin saflaştırılması için protokol

- Her numuneye 50-100 ng DNA girdisi, 400-500 baz-okuma kütüphanesine uygun olarak 130 µL Agencourt™ AMPure™ XP Reagent eklendi.
- Boncuk süspansiyonunu DNA ile karışması için vortekslendi. Pulse santrifüjden sonra karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

- Pulse santrifüj uygulandı, daha sonra DynaMag TM -2 manyetik rakında 3 dakika boyunca veya çözelti berralaşana kadar bekletildi. Sonra çıkarılarak pellet bozulmadan süpernatant atıldı.
- Diğer basamaklar yıkama iki kez olacak şekilde tekrarlandı. Elüe edilmiş DNA içeren süpernatant, pelleti bozmadan yeni bir 1.5 mL Eppendorf LoBind TM tüpüne aktarıldı.

3.2.2.6. Oluşturulan barkodlanmış kütüphanenin değerlendirilmesi

Ion Library TaqMan® Quantitation Kit (Cat. No. 4468802) kullanılarak gerçek-zamanlı PZR yapılmıştır. Bu kit, Ion Library kitleri kullanılarak hazırlanan çoğaltılmış kütüphanelerin ölçümü için kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) reaktiflerini içerir.

Tablo 3-11: Örnek kütüphanesinin hazırlığında gereken qPZR kimyasalları

Malzeme ve ürün	Miktar
Ion Library TaqMan® qPCR Mix, 2X	10 µL
Ion Library TaqMan® Quantitation Assay, 20X	1 µL
Nuclease-free Water (15 µL'ye tamamlanır)	
E. coli DH10B Control Library	

Tablo 3-12: Gerçek zamanlı PZR koşulları

İşlem	Derece	Süre
İnkübasyon	50 °C	2 dk
Polimeraz aktivasyonu	95 °C	20 sn
40 döngü	95 °C	1 sn
	60 °C	20 sn

İş akışı Şekil 4.1.2.'de gösterilmektedir. E. coli DH10B Kontrol Kütüphanesi bir dizi standart oluşturmak için seri olarak seyreltilir. Hazırlanan örnek kütüphanesi, Kontrol Kütüphanesi standartları aralığı dahilinde bir konsantrasyona seyreltilir. Hem Kontrol Kütüphanesi standartlarının hem de seyreltilmiş numune kütüphanesinin qPCR'sinden sonra, numune kütüphanesinin konsantrasyonunun hesaplandığı standart bir eğri oluşturulur.

Seri Dilüsyonların Hazırlanması

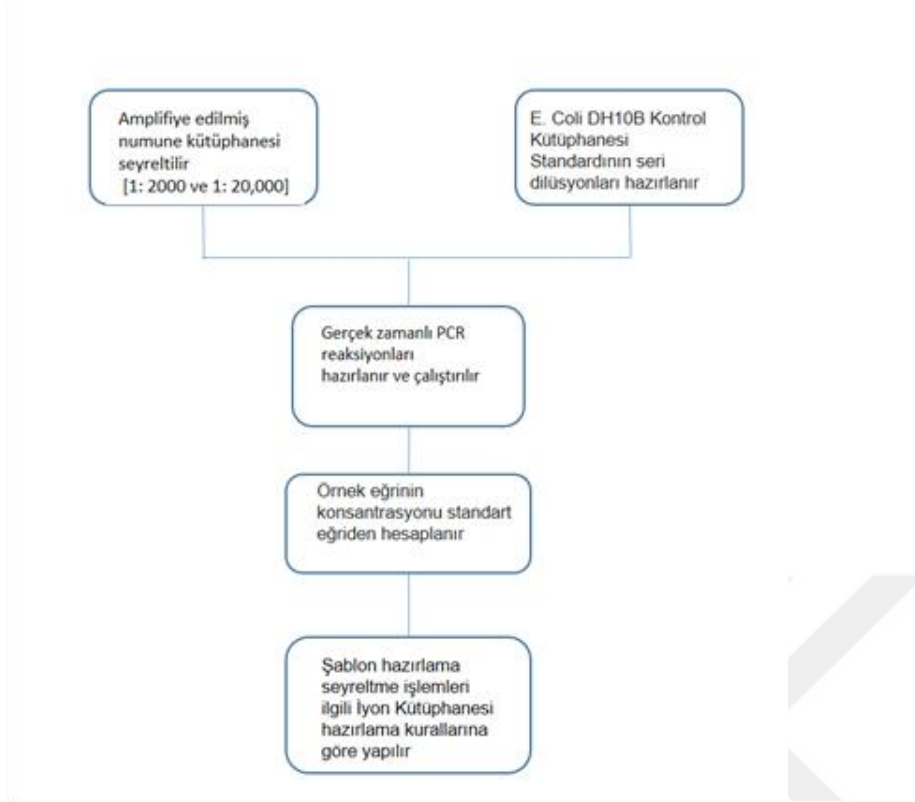
Tüm dilüsyonlar buz üzerinde hazırlandı. E. coli DH10B Kontrol Kütüphanesi'nin seri dilüsyonları, aşağıdaki örnek tabloda gösterildiği gibi nükleaz içermeyen su ile Kontrol Kütüphanesinden (~ 68 pM stok konsantrasyonu) beş ardışık 10 kat seyreltme ve yine örnek tabloda gösterildiği gibi, numune kütüphanesinin üç ardışık dilüsyonu hazırlandı. qPZR sonuçlarına göre örneklerin pM cinsinden değerleri hesaplanıp, Ion Chef'e yüklemeden önce bütün örnekler 100 pM'a eşitlenmiştir.

Tablo 3-13: E. coli DH10B Kontrol Kütüphanesinin 50 µL dilüsyonuna örnek

Standart	Kütüphane girdisi	Nükleaz free su	Seyreltme faktörü	Konsantrasyon
1	5 µL (undiluted)	45 µL	0,1	6.8 pM
2	5 µL Std 1	45 µL	0,01	0,68 pM
3	5 µL Std 2	45 µL	0,001	0,068 pM
4	5 µL Std 3	45 µL	0,0001	0,0068 pM
5	5 µL Std 4	45 µL	0,00001	0,00068 pM

Tablo 3-14: Örnek kütüphanenin dilüsyonu

Standart	Kütüphane girdisi	Nükleaz free su	Seyreltme
1	1 µL (undiluted)	19 µL	1:20
2	1 µL örnek 1	99 µL	1:2000
3	5 µL örnek 2	45 µL	1:20.000



Şekil 3-1: Ion Library TaqMan Quantitation Kitiyle kütüphane ölçümü iş akışı

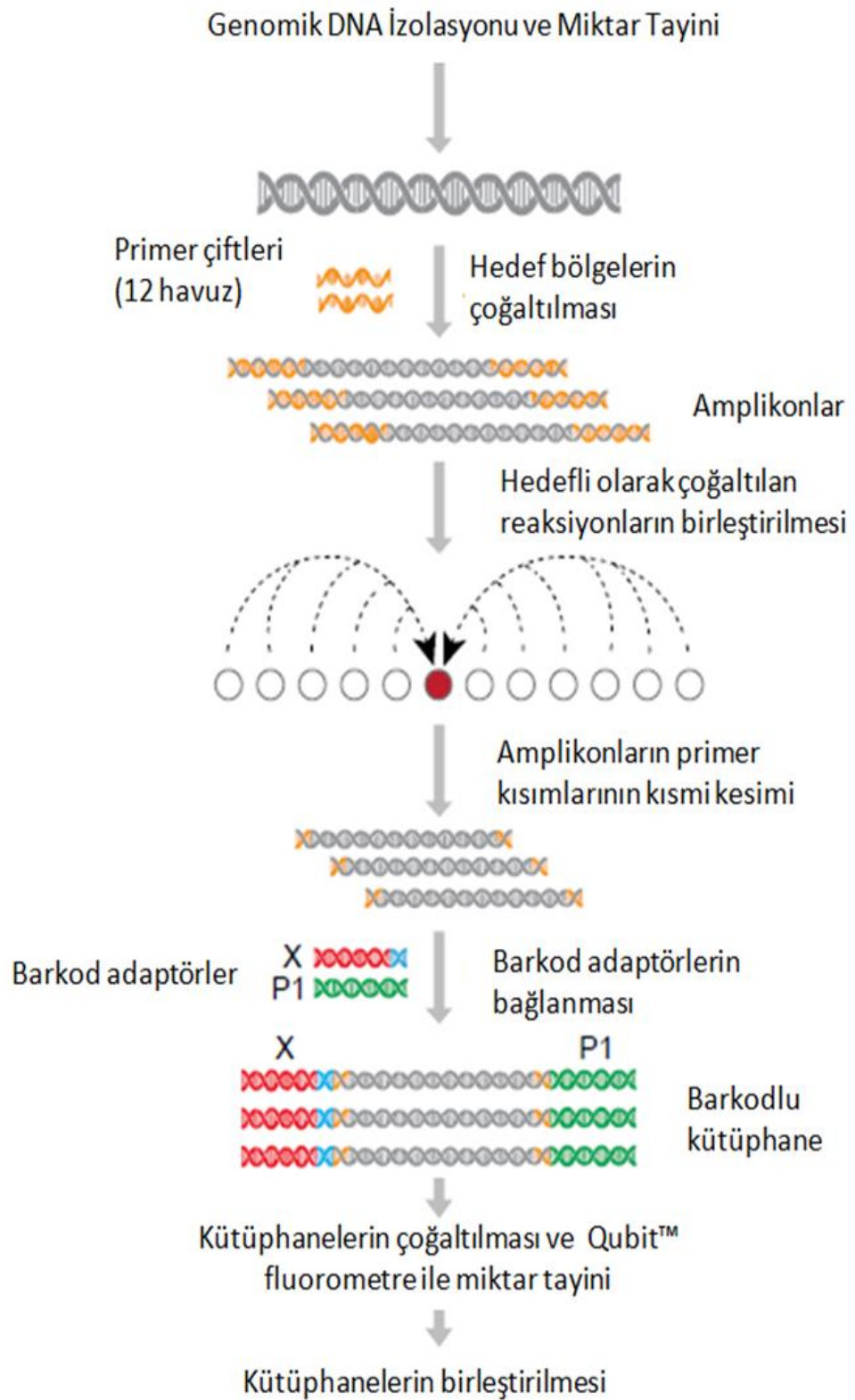
3.2.2.7. Ion Chef [™] Sistemi ve Ion S5 [™] Sisteminde Çip Yükleme ve Dizileme İçin Otomatik Taslak Hazırlama

Ion 510 [™] kiti (Kat. No. A34461) kullanılarak, Torrent Suite [™] yazılımında çip yükleme için taslak hazırlanması işlemi, dizileme sistemlerinin planlanan şekilde çalışması ve kontrolü için oluşturulan dijital talimatların oluşturulmasıdır. Planlanan çalışmalar iş akışı boyunca örneklerin çiplere yüklenmesi için Ion Chef [™] 'de taslak hazırlanmasından Ion S5 [™] de dizileme ve takiben veri analizini içerir. Her çip, Ion Chef [™] de kendi çalışma planını gerektirir. Planlama ekranında “Ampliseq Designer” da çalışılmak istenen uygulama “mtDNA” olarak seçildi ve planlanan protokole uygun yükleme işlemi gerçekleşen çip Ion S5 [™] dizileme cihazına yüklendi. Gerekli olan kit ve solüsyonlar yerleştirildikten sonra ekrandan ilgili plan seçilerek başlama komutu verildi.

3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme için Kütüphane Hazırlama

DNA izolasyonu, yoğunluk ve kalite kontrolü için yapılan işlemler mtDNA için olan prosedürle aynıdır. Her ekzom kütüphanesi için DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/µl olacak şekilde 50-100 ng genomik DNA kullanılmıştır.

Ion GeneStudio S5 platformunda YND tekniğiyle genomik DNA'yı dizilemek üzere ekzom kütüphanelerinin hazırlanması amacıyla Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit 1×8™ (Cat. No. A38262) kullanılmıştır. Ion Xpress™ Barcode Adapters Kits™ (Cat. No. 4474517; 1-96 arası tüm adaptör seti) ile barkodlu kütüphanler oluşturulmuştur. Oluşturulan barkodlu kütüphaneler birleştirilerek tek bir Ion chip'e yüklenmiş, dizileme süresi ve maliyet açısından avantaj sağlanmıştır.



Şekil 3-2: Ion AmpliSeq™ Exome RDY iş akış şeması

3.2.3.1. Hedef gDNA bölgelerinin çoğaltılması için protokol adımları

- Her örnek için aşağıdaki tablodaki malzemeler ile master mix hazırlandı.

Tablo 3-15: Amplifikasyon için master miks içeriği

Kit içeriği	Miktar
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	14 µL
50–100 ng gDNA	≤ 56 µL
Nuclease-free Su	70 Ml'e kadar

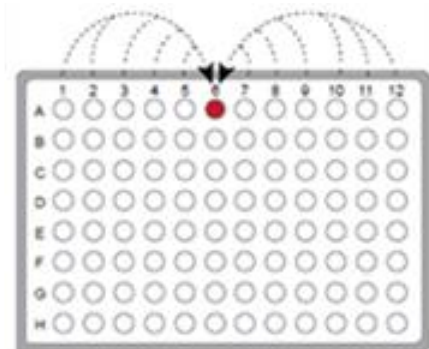
- Karışım vortekslenerek karıştırıldı ve kısaca santrifüj edildi.
- Ion AmpliSeq™ Exome RDY *plate* çıkartıldı.
- Her bir örnek için, *plate* in tek bir yatay sırasına (12 kuyucuk) master mix'den alınan 5-µL'lik alikuotlar dağıtıldı.
- MicroAmp™ Şeffaf Yapışkan Film sızdırmazlık sağlayacak şekilde *plate* üzerine uygulandı ve *plaka* kısa süre santrifüj edildi.
- Plate* üzerine MicroAmp™ Optik Film Sıkıştırma Pedi yerleştirilerek *plate* termal döngü cihazına yüklendi, sonra 5 -µL hacim için aşağıdaki koşullarda PZR gerçekleştirildi:

Tablo 3-16: Amplifikasyon için PZR döngü koşulları

Basamak	Adım	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	Enzimi aktive etmek için	99°C	2 dakika
Döngü (10 döngü)	Denatürasyon	99°C,	15 saniye
	Bağlanma ve Uzatma	60°C	16 dakika
Bekleme	-	10°C	Bekleme

Hedefli olarak çoğaltılan reaksiyonların birleştirilmesi için protokol adımları

- Damlacıkları toplamak için *plate* kısa süre santrifüj edildi, ardından yapışkan film çıkarıldı.
- Her bir örnek (sıra) için 12 hedef amplifikasyon reaksiyonu, 1–5 ve 7–12. kuyucuklardan 6. kuyucuğa aktarılarak birleştirildi (Şekil 3.3).



Şekil 3-3: Amplifikasyonların birleştirilmesi

Amplikonların Kısmi Olarak Kesilmesi

- Birleştirilmiş hedef amplifikasyon reaksiyonlarının her birine 6 µL FuPa Reaktifi eklendi.
- *Plate* MicroAmp™ Şeffaf Yapışkan Film ile kapatıldı, pipetaj ve hafif vorteks ile karıştırıldı, ardından damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi.
- *Plate* in üzerine MicroAmp™ Optik Film Sıkıştırma Pedi yerleştirildi, termal döngü cihazına yüklendi ve ardından aşağıdaki koşullarda PZR gerçekleştirildi:

Tablo 3-17: Amplikonların kesilmesi için uygulanan PZR koşulları

Sıcaklık	Zaman
50°C	20 dakika
55°C	20 dakika
60°C	20 dakika
10°C	Bekleme

3.2.3.2. Adaptörlerin bağlanması ve barkodlama, bağlı gDNA'nın saflaştırılması

Seçilen her barkod ve her adaptör için dilüsyon 1:4 olacak şekilde Ion P1 Adaptörü ve Ion Xpress™ Barkod X karışımı hazırlandı. Aşağıdaki hacimlerle oluşturulan bu karışımdan 6 µL ligasyon reaksiyonuna eklendi.

Tablo 3-18: Barkod-adaptör karışımı için gerekli malzemeler ve hacimleri

Malzemeler	Miktar
Ion P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress™ Barcode X[1]	2 µL
Nuclease-free su	4 µL
Toplam	8 µL

Ligasyon için protokol adımları

- *Plate*, içeriğin toplanması için kısa süre santrifüj edildi.
- *Plate* üzerindeki yapışkan film çıkarıldı, ardından kesilmiş amplikonları içeren her kuyuya aşağıdaki sırayla aşağıdaki bileşenleri eklendi.

Tablo 3-19: Barkod-adaptör ligasyonu için mix hazırlama malzemeleri

Malzemeler	Miktar
Switch Solution	12 µL
Ion Xpress™ Barcode Adapters mix (barkodlu kütüphaneler için)	6 µL
DNA Ligase	6 µL
Total miktar (kesilmiş ~60 µL amplikon dahil)	~84 µL

- Plaka yeni bir MicroAmp™ Şeffaf Yapışkan Film ile kaplandı, vortekslendi, ardından damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi.
- Plakanın üzerine MicroAmp™ Optik Film Sıkıştırma Padi yerleştirildi, plaka termal cycler'a yüklendi ve ardından aşağıdaki koşullarda PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3-20: Ligasyon için uygulanan PZR koşulları

Sıcaklık	Zaman
22°C	30 dakika
68°C	5 dakika
72°C	5 dakika
10°C	Bekleme

Barkodlanan ürünlerin pürifikasyonu

- *Plate* üzerindeki kaplama çıkarıldı, ardından her kütüphaneye 80 µL (yaklaşık 1X numune hacmi) Agencourt™ AMPure™ XP Reaktifi eklendi. Boncuk süspansiyonunu ve DNA'yı karıştırmak için pipetleme yapıldı.
- Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- *Plate DynaMag™ –96* manyetik plakaya (*Kat. No. 12331D*) yerleştirildi, sonra 5 dakika boyunca veya çözelti temizlenene kadar inkübe edildi ve çıkarılarak pellet bozulmadan supernatant atıldı.
- Taze hazırlanmış %70 etanol 150 µL eklendi, boncukları yıkamak için *plate* manyetik içinde yan yana hareket ettirildi ve daha sonra mıknatıs çıkarılarak supernatant atıldı. İkinci bir yıkama için bu adım tekrarlandı.
- Manyetik *plate* üzerinde tutularak, boncuklar oda sıcaklığında 5 dakika hava ile kurutuldu.

İyon AmpliSeq™ Exome RDY kütüphaneleri, doğru miktar tayini için yeterli materyal elde etmek üzere önce çoğaltılır.

3.2.3.3. Kütüphanenin çoğaltılması için protokol adımları

- İyon AmpliSeq™ kütüphanesini içeren *plate* manyetik plakadan çıkartıldı ve her boncuk pelletine 50 µl 1X Library Amp Mix ve 2 µl 25X Library Amp Primers eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı.
- *Plate* MicroAmp™ Şeffaf Yapışkan Film ile kapatılarak vortekslendi ve ardından damlacıkları toplamak için santrifüj edildi.
- Plakaya bir MicroAmp™ Optik Film Sıkıştırma Pedi yerleştirildi, thermal cycler cihazında aşağıda verilen koşullara göre çalıştırıldı.

Tablo 3-21: Kütüphane amplifikasyonu için PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	98°C	2 dakika
5 döngü	98°C	15 saniye
	64°C	1 dakika
Bekleme	10°C	Bekleme

Çoğaltılan kütüphanenin pürifikasyonu için protokol adımları

- Plaka, kuyuların altındaki içerikleri toplamak için kısa süre santrifüj edildi, ardından plaka üzerindeki kaplama çıkarıldı.
- Yaklaşık 50 µL örnek içeren her bir plaka kuyucuğuna 25 µL (0.5X numune hacmi) oda sıcaklığına getirilmiş Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi eklendi, boncuk süspansiyonu ve DNA'nın karışması için pipetleme yapıldı.
- Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Plaka en az 3 dakika veya çözelti beraklaşana kadar DynaMag™ –96 mıknatista tutuldu.
- Her kuyucuktaki amplikonları içeren süpernatant, pelet bozulmadan yeni bir 96-kuyucuklu PCR plakasının tek bir kuyucuğuna aktarıldı ve pelet atıldı.
- Önceki adımdaki süpernatanta, 60 µL (1.2X orijinal numune hacmi) Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi eklendi, boncuk süspansiyonu ve DNA'nın karışması için pipetleme yapıldı.
- Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Plaka en az 3 dakika veya çözelti beraklaşana kadar DynaMag™ –96 mıknatista tutuldu.
- Plaka 3 dakika boyunca veya çözelti berraklaşana kadar mıknatista tutuldu. Çıkarıldıktan sonra amplikonların bağlı olduğu pelet bozulmadan süpernatant atıldı.
- Her kuyucuğa 150 µl taze hazırlanmış %70 etanol eklendi, boncukları yıkamak için plaka mıknatıs içinde yan yana hareket ettirildi ve daha sonra mıknatıs çıkarılarak süpernatant atıldı. İkinci bir yıkama için bu adım tekrarlandı.
- Plakayı mıknatista tutularak, boncuklar oda sıcaklığında 5 dakika hava ile kurutuldu.
- Plaka mıknatistan çıkartılarak 50 µL Low TE eklendi ve karışım pipetle karıştırıldı.
- Plaka MicroAmp™ Şeffaf Yapışkan Film ile kaplandı, vortekslendi ve damlacıkları toplamak için santrifüj edildi.
- Oda sıcaklığında en az 2 dakika inkübe edildi.

- Daha sonra plaka en az 2 dakika boyunca mıknatısa yerleştirildi. Bu aşamada istenen amplikonları içeren süpernatantın alikvotu Qubit™ fluorometre ile kütüphane miktar tayini ve sulandırma faktörünün belirlenmesi için kullanıldı.

3.2.3.4. Qubit™ Fluorometre ile kütüphane miktarı tayini ve seyreltme faktörünün hesaplanması

Çoğaltılmış kütüphanelerden (300–1,500 ng/mL verimlilikte) Qubit™ dsDNA HS test kiti (Kat.Nos. Q32851 veya Q32854) ve Qubit™ fluorometre cihazı (Kat. No. Q33226) ile analiz edildi.

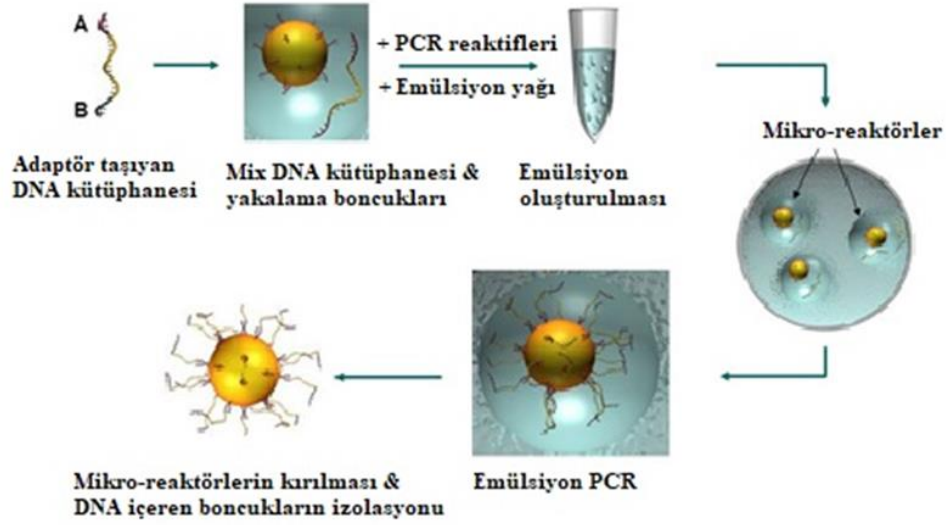
Çoğaltılmış kütüphanenin konsantrasyonunun belirlenmesi

- Qubit™ dsDNA HS buffer kullanılarak, Qubit™ dsDNA HS reaktifi için 1: 200 oranında çalışma seyreltmesi yapıldı. Her kütüphane ve standart için 200 µL seyreltilmiş reaktif hazırlandı.
- 190 µL seyreltilmiş Qubit™ dsDNA HS reaktifi ile 10 µL çoğaltılmış Ion AmpliSeq™ exome kütüphanesi birleştirilerek karıştırıldı ve en az 2 dakika inkübe edildi.
- Her bir Qubit™ dsDNA HS Standardını, 190 µL seyreltilmiş Qubit™ dsDNA HS Reaktifi ile 10 µL seyrelterek hazırlandı.
- Qubit™ Fluorometrede konsantrasyon ölçüldü.
- Hesaplanan kütüphane konsantrasyonuna bağlı olarak, yaklaşık ~ 100 pM'ye eşdeğer ~ 22 ng/mL) konsantrasyona ulaşacak şekilde seyreltme faktörü belirlendi.
- Kütüphane ~ 22 ng / mL'ye seyreltilerek kütüphanelerin birleştirilmesi ve şablon hazırlama aşamısına hazır hale getirildi.

3.2.3.5. Kalıp Oluşturma

Bu çalışmada kullanılan Thermo Fisher Scientific Ion Torrent YND platformunda kalıp (template) oluşturma emülsiyon PCR (emPCR) ile sağlanır. Kalıp hazırlanması ve dizileme çipine yüklenmesi işlemi, otomatize Ion chef robotik sisteminde gerçekleştirilmiştir. Kütüphane oluşturulduktan sonra elde edilen ürünler, üzerlerindeki barkodlara spesifik oligolar içeren manyetik kürecikler ile yakalanır ve bir yağ süspansiyonunda karıştırılarak her bir yağ damlası içine 1 küre düşecek şekilde dağıtılır ve bu yağ kürelerinin içerisinde PCR işlemi gerçekleşir (Şekil 3-4).

Emülsiyon Bazlı Klonal Amplifikasyon



Şekil 3-4: Emülsiyon PCR'ın şematik gösterimi (emPCR). Ion Torrent platformunda bu işlem, aynı zamanda robotik kütüphane hazırlığı da yapabilen Ion Chef™ Sistemi ile gerçekleştirilmektedir.

3.2.3.6. Ion GeneStudio S5 ile dizileme için çiplerin hazırlanması ve yüklenmesi

Ion Chef™ Sistemi (Cat. No. 4484177), GeneStudio™ S5 dizileme ile kullanım için otomatik, yüksek verimli kalıp hazırlama ve çip yüklemeyi otomatik olarak sağlar. Ion 540™ Kit – Chef (Cat. No. A30011) zenginleştirilmiş, kalıp pozitif Ion Sphere™ Parçacıklarının (ISP'ler) hazırlanması ve Ion Chef™ Cihazını kullanarak bir Ion 540™ Chip'e yüklenmeleri için kullanılır. Yüklü çipler Ion GeneStudio S5 cihazında dizilenir. Ion Chef™ Sistemi, çip hazırlama iş akışı boyunca örnek ve reaktif izlenebilirliğini sağlamak için Torrent Suite™ Yazılımı ile ağ entegrasyonuna sahiptir (Şekil 3-5).

Ion GeneStudio S5 System ile dizileme için Ion 540™ Kit – Chef and Ion Chef™

Sistem adımları:

- Kalıp hazırlama ve dizileme cihazlarının kontrolünü sağlayan Torrent Suite™ Software'de "plan new run" özelliği ile tüm işlemler, akış sayısı, kit türleri, barkodlar, numune bilgileri ve referans dosyaları gibi ayarlar girilerek dijital olarak ayarlandı. Bu şekilde örneklerin, çipler ve

reaktiflerin Ion Chef™ cihazında kalıp hazırlanmasından Ion GeneStudio S5 üzerinde dizileme ve sonraki veri analizine kadar iş akışı boyunca takibi sağlandı.

- Kütüphaneler birleştirilmeden önce ayrı ayrı 100 pM'a getirildi, sonra eşit hacimlerde birleştirildi. Ion AmpliSeq™ Exome RDY kütüphane örnekleri nükleaz içermeyen su ile konsantrasyon 50–100 pM olacak şekilde dilüe edildi ve cihaza yükleme yapmadan önce -20 reaktifleri oda sıcaklığına getirildi.
- Dilüe edilmiş kütüphane örnekleri Ion 540™ Chef Reagents kartuşunda bulunan library sample tube) (barkodlu tüpler) içine eklendi.
- Pipet ucu rafları ve PCR plakası, reaktifler ve çözelti kartuşları, her biri 25 µL seyreltilmiş kütüphane içeren kütüphane tüpleri, kurtarma tüpleri ve zenginleştirme kartuşları, kalıp hazırlığı ve dizileme için kullanılacak çipler sırasıyla üretici talimatlarına uygun şekilde Ion Chef™ cihazına yüklendi ve başlatıldı.
- Program bittiğinde, hazırlanan çipler Ion Chef™ cihazından alınarak dizileme cihazına yüklendi ve dizileme işlemi başlatıldı.

Dizileme

Dizileme işlemi için, her biri pH değişimlerini ölçebilen iyon sensörüyle kaplanmış milyonlarca mikrokuyucuk içeren yarı iletken çip kullanır. Boncuklara bağlanan kalıp DNA, her bir kuyuyu doldurur ve dNTP'lerin akışı başlar. Verilen nükleotid kalıp ipliğe komplementer olduğu durumda yeni oluşan ipliğin yapısına eklendikçe hidrojen iyonu salınımı olur ve bunlar iyon sensörleri tarafından algılanır. Okumaların çevrimi paralel olarak gerçekleşerek doğru ve yüksek çıktılı dizilemeye olanak sağlar. Ion GeneStudio S5 System ile 24 saatte dizileme işlemi gerçekleşir.



Şekil 3-5: Thermo Scientific™ Ion Torrent Ion Chef Sistemi ve Ion GeneStudio S5 Yeni Nesil Dizileme Sistemi

3.2.4. Ekzom Verilerinin Analizi ve Yorumlama

Dizleme sonrası, veriler, IonReporterUploader eklentisi kullanılarak Torrent Suite™ yazılımı aracılığıyla Ion Reporter™ yazılımına otomatik olarak aktarıldı. Hedef bölgelere ve *hot spot* bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, Ion Reporter™’da analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, filtrelere tabi tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. Değişimlerin tamamı, *Integrative Genomics Viewer* (IGV) kullanılarak genomik düzeyde görüntülendi. Ion Reporter’da genel veya özel veritabanlarından aktarılan kolonlardaki bilgiler analiz sırasında varyantların değerlendirilmesinde kullanıldı. Ek açıklama kolonu ve bu kolonların açıklamaları Tablo 3-22’de verilmiştir.

Veri analizinde ilk olarak mitokondrial hastalığa neden olan 1158 gendeki (MitoCarta 2.0) (258), ExAC kontrol popülasyonunda $< 0,5\%$ küçük bir allel frekansına sahip (259,260) ve önceliklendirmede Ensembl Variant Effect Predictor ile orta ila yüksek ihtimalli varyantlar filtrelendi (261). Ortaya çıkan tek nükleotid varyantları (SNV’ler) ve küçük eklenme/silinmeler (indeller), stop kodon, çerçeve kayması, kırılma hatası ve yanlış anlamalı olmak üzere öncelik sırasına göre listelendi ve patojenite açısından incelendi. Daha önce ClinVar’da (262) ve/veya HGMD (*Human Gene Mutation Database*) (263), OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) (264), GeneCARD (265) gibi veri tabanlarında

yayınlanmış literatürlerde tutarlı bir şekilde patojenik olarak rapor edilmişlerse, klinik bulgular da uyumlu ise bu SNV ve indeller patojenik kabul edildi. Daha önce dbSNP'de tanımlanmamış (266) veya tanımlı ancak hastalık ilişkisi bildirilmemiş çok nadir ve yeni varyantların patojenitesi American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) yönergelerine uygun olarak (267), (I) hesaplama verilerine, yani kullanılan in siliko araçlarının tümü veya çoğunluğu tarafından zararlı olacağı tahmin edilen; (II) popülasyon verileri, yani kontrol popülasyonunda, kalıtım modeline göre nadir hastalığa neden olan varyantla uyumlu bir sıklığa sahip; (III) alelik veriler, yani patojenik bir varyantla trans halinde olan veya varsayımsal bileşik heterozigot vakalar, çift heterozigotluk durumlarına göre incelendi. İn siliko tahmin araçları ile, aday genlerin işlevleri, ekspresyon paternleri, fenotipik etkisi, türler arası evrimsel korunmuşluğu, protein yapısı, posttranslasyonel modifikasyonları, inhibitörleri, gen-gen ve protein-protein etkileşimleri, varyantın proteine etkisi ve hastalık ilişkisini ele alan on anahtar soru soruldu (268). Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) (269), Prediction of functional effects of human nsSNPs PolyPhen (=Polymorphism Phenotyping) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (270), Scale – invariant feature transform (<http://sift.jcvi.org/>) (271), UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome.ucsc.edu/index.html>) (272) gibi veritabanları kullanılarak değerlendirildi. Şüpheli patojenik varyantlar için, hastaların klinik bulguları, hastalığın başlangıcı ve doğal seyri, manyetik rezonans görüntü (MRI) bulguları ve/veya kas histopatolojisiyle eşleşen bir hastalıkla ilişkili gende tanımlanan nadir ve zarar verici varyantlar kabul edildi. Patojenik olduğu düşünülen ve klinik ilişkili bulunan varyantlar, Sanger dizileme yöntemi ile doğrulandı. Kalıtım paternine uygun segrege olup olmadığını göstermek için anne baba çalışmaları yapıldı. Patojeniteyi desteklemesi için, varsa sağlıklı kardeş veya akrabalarından etkilenmiş olgulara da aynı bölge için Sanger dizileme yapıldı. Belirsiz önemi olan varyantlar (VUS) için de Sanger dizileme yöntemi ile doğrulama sonrası aile çalışması yapılmıştır. Olgunun çözülmüş sayılması için, resesif bir gende bilinen veya şüphelenilen iki patojenik varyantı veya dominant bir gende (en az) bilinen veya şüphelenilen bir patojenik varyantı taşıması gerekiyordu. Kalan çözülmemiş vakalar daha nadir durumları tanımlamak için klinik ilişkili diğer

fenotipler de dahil olmak üzere diğer genlerdeki olası patojenik varyantlar için tekrar analiz edildi.

3.2.5. YND ile mtDNA Dizileme Veri Analizi

Ensembl veritabanı BioMart'dan mitokondrial genoma ait bilinen varyantlar *Excel* formatında indirildi ve hastalarda saptanan varyantlar bu veri ile karşılaştırılarak analiz edildi. MtDNA varyantlarını tanımlamak için GenBank erişim numarası NC_012920.1 olan ve 16.569 baz çifti içeren revize edilen Cambridge Referans Sekansı (rCRS) kullanıldı. Olgularda Mitomap veri tabanında patojenik olarak kabul edilen 93 varyanttan herhangi birine rastlanmadı. TED analizinde nDNA mutasyonu saptanamayan ve klinik özellikleri mtDNA patojenitesini destekleyen olgular için, Mitomap'te bir hastalıkla olası ilişkisi bildirilen yaklaşık 700 mtDNA varyantı için yapılan analizde klinik ilişkili variant bulunmadığından delesyon analizi planlandı (273,274). (<https://mitomap.org/MITOMAP/ConfirmedMutations>).

Tablo 3-22: Varyant analizindeki kolonlar ve açıklaması

Kolon	Açıklama
Lokus	Varyantın kromozomal lokasyon bilgisini içerir.
Genler	Varyantın bulunduğu gen/genleri belirtir.
Genotip	Varyantın genotip bilgisini içerir.
Ref	İlgili genomik lokalizasyondaki referans nükleotid bilgisini içerir.
Gözlenen allel	Referans allele göre değişiklik gösteren nükleotid bilgisini içerir.
Lokasyon	Genetik değişikliğin gen bölgesindeki karşılığını gösterir. Örneğin; ekzonik, intronik, intergenic (genler arası) ... vb.
Transkript	Varyantın bulunduğu genin NCBI transkript kodunu gösterir.
Kodlayan	Varyantın cDNA düzeyindeki adlandırmasını belirtir.
Amino asit değişimi	Varyantın protein düzeyindeki değişimini gösterir.
Tip	Varyant türünü belirtir. Örneğin; SNV (Single Nucleotide Variation), INDEL (Küçük insersiyon/delesyon), CNV (Copy Number Variation) vb.
Variant Etkisi	İlgili genetik değişikliğin protein üzerindeki etkisini göstermektedir. Örneğin; synonymous (sessiz), missense (yanlış anlamlı), nonsense (anlamsız), stoploss (Stop kodonu kaybı)
DRA	Varyantın bulunduğu genin “Disease Research Area” (DRA) veri tabanındaki karşılığını gösterir.
DGV	Database of Genomic Variants; genomik düzeydeki yapısal anomalileri araştırmak için kullanılan veritabanıdır.
ClinVar	NCBI ClinVar veritabanından gözlemlenen varyantın etkisinin değerlendirilmesi. Örneğin; Uncertain significance (önemi belirsiz), Likely benign, Benign, Pathogenic, Likely pathogenic şeklinde veriler bulunmaktadır.
UCSC common SNPs	Varyantın UCSC veri tabanındaki “UCSC Common SNPs” sekmesindeki karşılığını belirtir
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
SIFT	Bir varyantın bir protein üzerindeki fonksiyonel etkisinin tahmini.
Allele Coverage	Gözlemlenen her allel için ayrı ayrı okuma derinliğinin sayısal değerini verir.
Allele Ratio	Gözlemlenen her allel için ayrı ayrı okuma derinliğinin yüzdesini verir.

3.2.6. YND İle Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Doğrulanması

3.2.6.1. Primerlerin Tasarlanması

Primerlerin tasarlamasında; seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi içermemesine, ileri (forward), geri (reverse) primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla $\pm 2 - 5^{\circ}\text{C}$ fark), içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18 – 22 nükleotid içermesine ve gen bölgesinde beklenen mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsamasına, dizi analizinde $\sim 30 - 50$ bazın iyi okunamayabileceği gözetilerek özen gösterildi. Özgünlük, UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome.ucsc.edu/index.html>)' den in silico PZR interaktif sistemi ile test edildi (272).

3.2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), %0 – 10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 μM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 μM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH₂O) ile 50 μl 'ye tamamlanarak hazırlandı. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'i ile birlikte çalışıldı.

PZR; 95°C de 10 dk denatürasyon, ardından 95°C de 30 sn denatürasyon, primerlerin T_m (Temperature of Melting)'e göre değişen 64°C den 52°C ye kadar ve 30 sn lik bağlanma ısılarında ve 70°C de 45 – 90 sn (1 kb/1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 35 – 40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk'lık uzama ile, PZR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 μl alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 8 $\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

PZR Saflaştırması

Saflaştırma işlemi için Exonuclease – I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında PZR protokolü ile 37 °C de 15dak. , 85°C de 15 dak. ardından 4°C ye getirildi. Saflaştırılan ürünler cihazdan alınarak bir sonraki işlem için +4°C’de karanlıkta saklandı.

3.2.6.3. Sanger Dizi Analizi

PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan ampikonların dizi analizi, Tıbbi Genetik A.D. laboratuvarında bulunan ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi. Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı. 5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP’leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR’da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (dizi okuma kalitesi için seçilir) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH₂O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı. BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden temizliği için dizi reaksiyon ürünlerinin saflaştırıldı ve ABI3500 cihazına yüklemek için en yüksek hızda kısa santrifüj yapıp denatüre edildikten sonra yürütme işlemine geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi.

Kapiller elektroforezi sonucunda alınan piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı. Elektroferogramda pik rengi, adenin yeşil, guanin siyah, sitozin mavi ve timin kırmızı ile gösterildi. Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v2.7 (ABI) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde UCSC Genome Browser, Ensembl Genome Browser gibi web sitelerinden yararlanıldı.

SeqScape v2.7 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri

program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemten sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v2.7 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Tüm sonuçlar YND sonuçları karşılaştırıldı.

3.2.7. Hücre kültüründen RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi

Çerçeve kayması veya kırılma hatasına yol açması beklenen varyantların mRNA düzeyindeki etkilerini veya alternatif transkripti göstermek için kandan veya kültüre kas hücrelerinden izole edilen total RNA'dan, "random" heksamer primerleri ile sentezlenen cDNA'da Sanger dizileme ve mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için kantitatif PZR analizleri yapıldı.

3.2.7.1. Kas Kültürü

Histolojik inceleme amacıyla planlanan biopsi işlemi sırasında steril koşullarda uygun biyopsi teknikleri ile alınan kas doku örneğinden, 20mg kadarı moleküler analizler için 5ml bazal medium konmuş steril doku tüpüne alındı. Kimlik bilgisi ve doku tipi yazılı olan steril petri kabına aktarıldı. Doku, steril pensetle tutularak bistüri ile ince kesitler halinde parçalandı. Üstüne filtrelenerek 2-3 ml tripsin EDTA ilave edildi ve 1 saat CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Tripsin steril bir pipetle uzaklaştırılarak, dokunun üstüne 2-3 ml kollegenaz V eklendi, doku bir iğne yardımı ile iyice parçalandı ve CO₂'li inkübatörde 2 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda, uzun süreli hücre kültürü ekim işlemi hazırlıklarına başlandı. Kullanılacak medyumlar, +4°C'den çıkarılarak 37 °C inkübatöre koyuldu. Hasta laboratuvar numarası, kültür kabı adı, ekim tarihi yazılarak, steril polistren 12-15 ml lik tüpe yapıştırıldı. Ekim işleminden en az 5 dk önce laminar flow açılarak hava sirkülasyonu oluşması sağlandı. İçinde Tripsin EDTA bulunan

petri kabı içine koyulan biyopsi materyali 1 saat 37°C de inkübe işlemi tamamlandıktan sonra tripsin pastör pipeti ile çekilerek uzaklaştırıldı. Petriye 2-3 ml kollegenaz tip IV çözeltisi koyuldu ve 3 saat boyunca 37°C CO₂ li etüve kaldırıldı. Süre sonunda tüm materyal steril bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1200 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj olan tüpte, üst sıvının tümü bir behere döküldü, kalan dip materyali üzerine yeterli materyal varsa (>20mg) 11 ml, yoksa (<20mg) 7 ml, materyal çok az ise (<10 mg) 3,5 ml medyum eklendi ve steril pastör pipeti ile pipetaj uygulanarak flasklara ekildi. Flaskların ağzı ve kapağı bünzen bek alevinden geçirilerek kapalılık kontrol edildi ve tekrar 1,5 tur açılarak kapağı gevşek şekilde (etüvde CO₂ sirkülasyonu sağlaması için) CO₂ li etüve kaldırıldı. Kültür kontrolleri ekimden sonraki 4. günden itibaren her ikinci gün sabah 8:30 da yapıldı ve kültür kontrol-karar tablosuna göre işlem yapıldı. Ekimi yapılan kültürler 4. gün etüvden çıkarıldı kapakları sıkıca kapatılarak inverted mikroskopta üremeleri kontrol (ilk kontrol) edildi. (I) kültürün durumu >3 koloni ise yeterli, <2 koloni 1 ml ise medyum eklendi, (II) yapışma yeterli değilse tüpte bekletilen medyumlu hücreler santrifüjde çevrilip tekrar flaska ekildi, (II) kalınlaşmış kültür 1 ml tripsinle sub kültür yapıldı. Bir kaç pasajla elde edilen kas hücrelerinden, bekletilmeden RNA izolasyonu yapıldı ve son pasaj sıvı nitrojende donduruldu.

3.2.7.2. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu için, QIAamp RNA Blood Mini kiti ve RNA pürifikasyonu sırasında DNA denaturasyonu için QIA RNase-Free DNase Set kullanıldı. Üretici firmanın, örnek türüne göre kan veya hücre kültüründen RNA izolasyonu talimatlarına uygun olarak total RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi (Fermentas Revert Aid First Strand, K 1621) yapıldı. Elde edilen cDNA'lar spesifik bölgeler için tasarlanan primerler kullanılarak optimum PZR koşulunda çoğaltıldı ve Sanger dizileme yöntemi ile analiz edildi.

Tablo 3-23: cEARS2 için tasarlanan primerler

cEARS2_2-3F	EXON 2-3 cDNA	5'-GGC TAG AGG ACA CAG ATC AGA CT-3'	23	59	80
cEARS2_2-3R		5'-GAT GCC TGC CCA CTC CA-3'	17	61,9	
cEARS2_8-9F	EXON 8-9 cDNA	5'-GAT ATG CTG AAT GGA GAA CTG AA-3'	23	58,3	109
cEARS2_8-9R		5'-GTC CTT GCT GCT GTC CAC T-3'	19	59	
Kontrol olarak					
cFUS_5-6F	EXON 5-6 cDNA	5'-CAG CAA AGC TAT GGA CAG CA-3'	20	60,2	116

Tablo 3-24:cMICOS13 için tasarlanan primerler

		Seq 5'---3'		Cal;
c.MICOS13_1-2F	Exon 1-4 F&R	5'-GCT GAT GAG GTT CCT CAT CA-3'	20	60;58,7
c.MICOS_F2		5'-GTT CCT CAT CAA GGG AAG T-3'		54
c.MICOS-F1alt		5'-GAA GTG AAT GCG TGC TCG GA-3'		
c.MICOS13_4R		5'-CGC CTT CAC ATA CTC CCA-3'	18	56;58,1

3.2.8. Protein Modelleme

Yanlış anlamlı değişimlerin proteinlerin üç boyutlu yapısına olan etkisinin in siliko tahmini için web tabanlı I-Tasser tahmin programı kullanıldı. Proteinin Ensembl'dan elde edilen referans dizisi ile, bu diziden üretilen varyant protein dizisi I-Tasser programı aracılığı ile, PDB dosyalarına çevrildi (*Protein database*) (278). Normal ve mutant proteinlere ait PDB dosyaları *Discovery Studio Visualizer* programı ile görselleştirildi (279). Proteinin 3D görüntüsünde, değişime uğrayan aminoasitin kimyasal yapısı ve kurduğu hidrojen bağları görünür hale getirildi. Normal ve mutant yapı karşılaştırılarak değişimin fonksiyonel etkisi tahmine dayalı olarak değerlendirildi.

3.3. Histopatolojik Değerlendirmeler

Hastaların dosyalarında bulunan histopatolojik incelemeler, İstanbul Tıp Fakültesi Coşkun Özdemir Nöromusküler Hastalıklar İnceleme Laboratuvarında yapılmıştır. Serum fizyolojikle nemlendirilmiş gazlı bez içinde patoloji laboratuvarına ulaştırılan kas biyopsileri sıvı nitrojende dondurulmuş ve cryotome cihazında kesitler alındıktan sonra -80°C'de saklanmıştır. Değerlendirme için 8 µm kalınlığında kesitlere Hematoksilen Eozin (HE), Modifiye Gomori trikrom (MGT), PAS, oil red-O (ORO), miyofosforilaz boyaları ve oksidatif enzim boyaları (NADH-TR, SDH, COX, COX/SDH) uygulanmıştır. Projeye dahil edilen olgulara ait kas biyopsilerinden, arşiv preparatları bulunanlar yeniden değerlendirilmiş ve görüntüleri alınmıştır.

3.4. Biyokimyasal ve Radyolojik Değerlendirmeler

Hastaların dosyalarından elde edilen biyokimyasal veriler İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Beslenme ve Metabolizma Laboratuvarında çalışılmıştır. Tandem MS ile karnitin açıl karnitin profili, kantitatif aminoasit analizleri, GCMS ile organik asit analizi sonuçları değerlendirildi. Mitokondrial hastalıklarda kan laktat düzeyleri, pirüvatın transaminasyonuna bağlı olarak yükselen alanin düzeyi, idrar organik asitlerinde laktat ve malat, süksinat, 2-okzaloglutarat ve fumarat gibi TCA ara ürünlerindeki artmış atılımlar kayıt edildi. Kas ve karaciğer tutulumunu işaret eden CK, AST, ALT düzeyleri not edildi. Keton cisimlerinden 3-OH-bütirat ve asetoasetat düzeyleri değerlendirildi. Klinik tanısı CDG olan hastanın transferrin izoelektrik odaklama elektroforezi sonuçları kayıt edildi.

Hasta dosyalarında bulunan, İTF Radyoloji AD veya dış merkezlerde çekilen MR görüntülerinde, mitokondriyal hastalığın tipine ve santral sinir sistemi tutulumuna bağlı olarak değişen bulgular, pediatrik radyolog tarafından yeniden değerlendirildi. İnme benzeri lezyonların nonvasküler dağılımı, diffüz beyaz cevher hasarı, bilateral gri cevher ve bazal ganglia, beyin sapı tutulumu gibi mitokondriyal hastalığın santral sinir sisteminin tipik bulguları kayıt altına alındı. Sinir kas tutulumu olan hastaların dosyalarında mevcut olan EMG ve EEG raporları ile kardiyak tutulum açısından çekilen EKO ve EKG sonuçları da değerlendirmeye alındı.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde, 2018-2019 yıllarında, moleküler genetik araştırma ve genetik danışma amacıyla yönlendirilen 20 aileden 26 etkilenmiş olgu değerlendirildi. Ebeveynlerin akrabalık durumu, etkilenmiş veya sağlıklı kardeş varlığına göre, tekli, ikili ve üçlü TED analizleri yapıldı. Onüç farklı gende (*TK2*, *POLG*, *EARS2*, *MICOS13*, *ECHS1*, *NDUFAF6*, *FBXL4*, *OXCT1*, *ALG8*, *CAPN3*, *DYSF*, *DHTK2*, *SMARCAL*) 18 farklı ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen varyant saptandı (Tablo 4-1). Bu varyantlardan, dokuzu yanlış anlamlı, beşi kırılma bölgesi ve dördü çerçeve kayması tipinde idi. On varyant daha önce literatürde tanımlanmıştı, sekizi ise ilk kez bu çalışmada tanımlanan veya hastalık ilişkisini destekleyen novel varyantlardı. Tamamı Sanger dizileme ile doğrulandı ve kalıtım modeline uygun olarak segrege olduğunun gösterilmesi için aile çalışmaları yapıldı. Bir ailede, veri tabanlarında önemi bilinmeyen nadir bir varyant olarak sınıflandırılan *COX10* geninde gösterilen değişim, in silico analiz programları patojenik tahmini vermesine ve protein modelleme ile değişimin gücü desteklenmesine rağmen, aile çalışması ile segrege olmadığı tespit edildi. Mitokondriyal hastalık düşünülen olgularda, özgün tasarlanan Long PZR sonrası YND yöntemi ile yapılan fragmentasyon tabanlı tüm mtDNA dizi analizlerinde, Mitomap'te bildirilmiş veya hastalık ilişkisi olduğu düşünülen bir varyanta rastlanmadı.

Tablo 4-1: TED analizi ile gösterilen varyantlar, genleri ve ilişkili klinik

Olgular	Kalıtım OMIM no	Gen Adı	Alel 1	Alel 2	İlişkili Klinik
Aile 1 Olgu III-7 ve III-11	OR # 609560	<i>TK2</i>	c.323C>T; p.Thr108Met	c.323C>T; p.Thr108Met	Mitokondrial DNA Deplesyon Sendromu 2, Miyopatik Tip
Aile 2 Olgu IV-1 ve IV-2	OR # 258450	<i>POLG</i>	c.911T>G; p.Leu304Arg	c.911T>G; p.Leu304Arg	Mitokondrial DNA Delesyonu ile Progresif Eksternal Oftalmopleji
Aile 3 Olgu III-2	OR # 614924	<i>EARS2</i>	c.319C>T; p.Arg107Cys	c.1283delC	Kombine Oksidatif Fosforasyon Eksikliği 12
Aile 4 Olgu V-5	OR # 618329	<i>MICOS13</i>	c.260-2A>G null	c.260-2A>G null	Kombine Oksidatif Fosforasyon Eksikliği 37
Aile 5 Olgu III-1 ve III-2	OR # 616277	<i>ECHS1</i>	c.161G>A; p.Arg54His	c.202G>A; p.Glu68Lys	Mitokondriyal kısa zincirli enoyl-CoA hidrataz 1 eksikliği
Aile 6 Olgu III-2	OR # 618239	<i>NDUFA6</i>	c.479delA p.E160fs	c.420+784C>T null	Mitokondriyal Kompleks I Eksikliği, Nükleer Tip 17
Aile 7 Olgu IV-1	OR # 615471	<i>FBXL4</i>	c.1444C>T p.R482W	c.1444C>T p.R482W	Mitokondriyal DNA Deplesyon Send.13 Ensefalomyopatik
Aile 9 Olgu III-2	OR # 245050	<i>OXCT1</i>	c.C1370G p.T457R	c.1173- 139G>T null	Suksinil CoA: 3 oxoacid CoA transferaz eksikliği
Aile 8 Olgu III-2	OR # 608104	<i>ALG8</i>	c.A479T p.H160L	c.A479T p.H160L	Konjenital Glikozilasyon Bozukluğu Tip 1h
Aile 11 Olgu IV-4	OR # 253600	<i>CAPN3</i>	c.550delA p.Thr184Argfs sTer36	c.550delA p.Thr184Argfs Ter36	Limb Girdle Musküler Distrofi Tip2A
Aile 12 Olgu V-1 ve V-2	OR # 253600	<i>CAPN3</i>	c.1992+1G> C null	c.1992+1G>C null	Limb Girdle Musküler Distrofi Tip2A
Aile 13 Olgu IV-1	OR # 253601	<i>DYSF</i>	c.5885-1G>A null	c.5885-1G>A null	Limb Girdle Musküler Distrofi Tip2B
Aile 14 Olgu III-7	OR # 204750	<i>DHTKD1</i>	c.2158G>A; p.Gly729Arg	?	2-Aminoadipik 2- Oksoadipik Asidüri?
Aile 15 Olgu V-1 ve V-2	OR # 242900	<i>SMARCAL1</i>	c.1027_1034 delTTTCGAG GC p.F343Rfs*1 3	c.1027_1034de ITTCGAGGC p.F343Rfs*13	Schimke immünoosöz displazi

4.1.1. Aile-1 & Olgu III-7 ve III-11

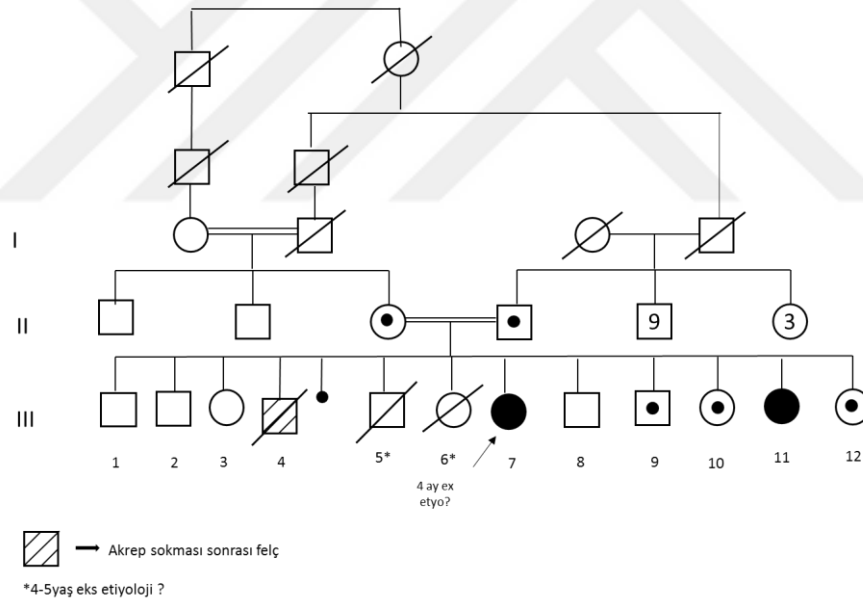
Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında 1,5 derece kuzen evliliği bulunan anne ve babanın sekizinci ve onikinci gebeliklerinden doğan, 29 yaş ve 18 yaşında iki kız kardeş mitokondrial hastalık klinik öntanısıyla Beslenme ve Metabolizma polikliniğinde izlenirken, moleküler tanı amacıyla Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi (G13P12A1Y9). Aile öyküsünde, indeks olgu (III-7) ve etkilenmiş kardeşi (III-11) dışında, dördüncü gebelikten olan erkek çocukları, 4 yaşında akrep sokması sonrası felç olmuş ve 15 yaşında solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmiş. Beşinci gebelikten olan 5 yaşında diğer bir erkek çocukları enfeksiyon sonrası yürüyememiş ve bir süre sonra eks olmuş, altıncı gebelikten olan 5 aylık bir kız çocukları da yine enfeksiyon sonrası kaybedilmiş (Şekil 4-1). Olgunun dayı oğlunun, iki erkek bir kız olmak üzere 3 çocuğu da 4-5 yaşlarında enfeksiyon sonrası eks olmuş. Amca oğlunun kızı da lipid depo miyopatisi (mitokondrial değişikliklerle beraber) nedeniyle eks olmuş. İndeks olgu, prenatal takipsiz olup, postnatal sorunsuz NSD ile vaktinde doğmuş. Mental motor gelişim basamakları normaldi ve sık baş ağrısı atakları dışında bir özellik yoktu. İlk kez 17 yaşında köpek ısırması sonrası başlayan kas güçsüzlükleri, zamanla önce kol ve bacaklarda artmış. Sonrasında, merdiven inip çıkma, yürüme, yutma, nefes alma ve konuşma güçlükleri başlamış. 20 yaşında yapılan EMG’de yaygın miyojen tutulum ve miyopati lehine bulgular saptanmış. EKO normal ve ejeksiyon fraksiyonu (EF) %60 olan hasta, solunum güçlüğü nedeniyle 22 yaşından itibaren geceleri solunum destek cihazı kullanmaya başlamış (Bipap, iki seviyeli pozitif havayolu basıncı).

2016’da İTF Nöroloji’de yapılan kas biopsisinde mitokondrial miyopati lehine bulgular (ragged red lifler) saptanması üzerine (Şekil 4-2), İTF Beslenme ve Metabolizma polikliniğine yönlendirilmiş. Kranial MR bulguları normal olan hastanın (Şekil 4-3) biyokimyasında, CK:941U/L↑, laktat:2,49mmol/L↑ saptanmış. Kantitatif aa analizinde arginin, treonin, sistin, triptofan düşük ve idrar organik asit analizinde mitokondrial hastalıkla uyumlu atılımlar tespit edilmiş. Dış merkezde yapılan mtDNA analizinde, klinikle ilişkili varyant bulunmamış. MNGIE sendromu (Mitokondrial Nörogastrointestinal Ensefalopati)

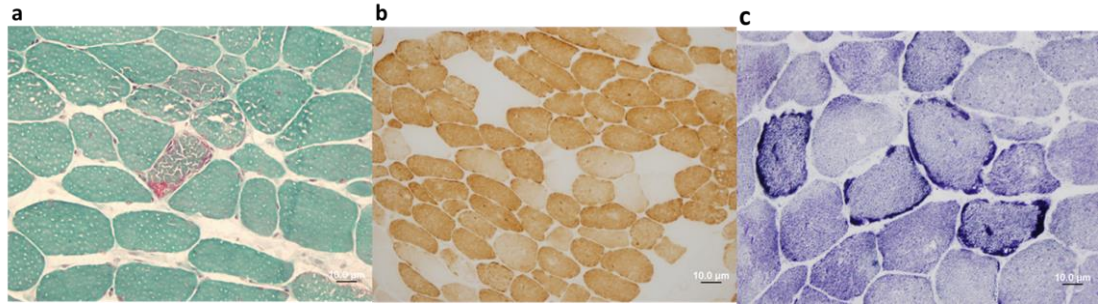
şüphesi ile yapılan *TYMP* tüm gen analizinde herhangi bir patjenik değişim saptanmadığı raporlanmış. Hasta destek tedavisi ile takibe alınmış (Vit B12, B1,B2, B6, KoenzimQ-10, karnitin, α -lipoik asit). Velofarengal yetmezlik sonucu, yutma güçlüğü ve malnütrisyon gelişen hasta, son bir buçuk yıldır, PEG (Perkütan Endoskopik Gastrostomi) ile besleniyor. Progresif kas güçsüzlüğü ve kas atrofisi olan hasta tekerlekli sandalye kullanıyor.

Olgunun kızkardeşi 18 yaşında (III-11) ve benzer öykü ile halsizlik, güçsüzlük, çabuk yorulma gibi klinik şikayetler başlamış. Fizik muayenede astenik vücut yapısı, kollarda ve bacaklarda kas güçsüzlüğü mevcuttu (3-4/5). EKO, göz ve işitme testlerinde pitozis dışında patolojik bulgu saptanmadı. Destek tedavisi ve takipleri Beslenme ve Metabolizma Polikliniğinden süren hasta, genetik kökenin araştırılması için 14.05.2019 tarihinde projeye dahil edilmiştir.



Şekil 4-1: Aile 1 pedigrisi.

İndeks olgu (III-7) ve etkilenmiş kardeşi III-11 ile, taşıyıcı anne (II-3), baba (II-4) ve kardeşlerini (III-9, III-10, III-12) gösteren pedigrisi.



Şekil 4-2: Olgu III-7'nin kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi.

Subsarkolemmal yerleşimli mitokondrial birikimler (Ragged-Red lifler) (a) ve mozaik paternde COX eksikliği izlenmektedir (b). SDH (c) ve NADH-TR yoğun ragged-red liflerde mitokondrial birikimlere uyan alanlarda PAS pozitif ve aynı liflerde nötral lipid globülleri seyrek ve belirgindir (ITF, Nöromusküler Hastalıklar İnceleme Lab)

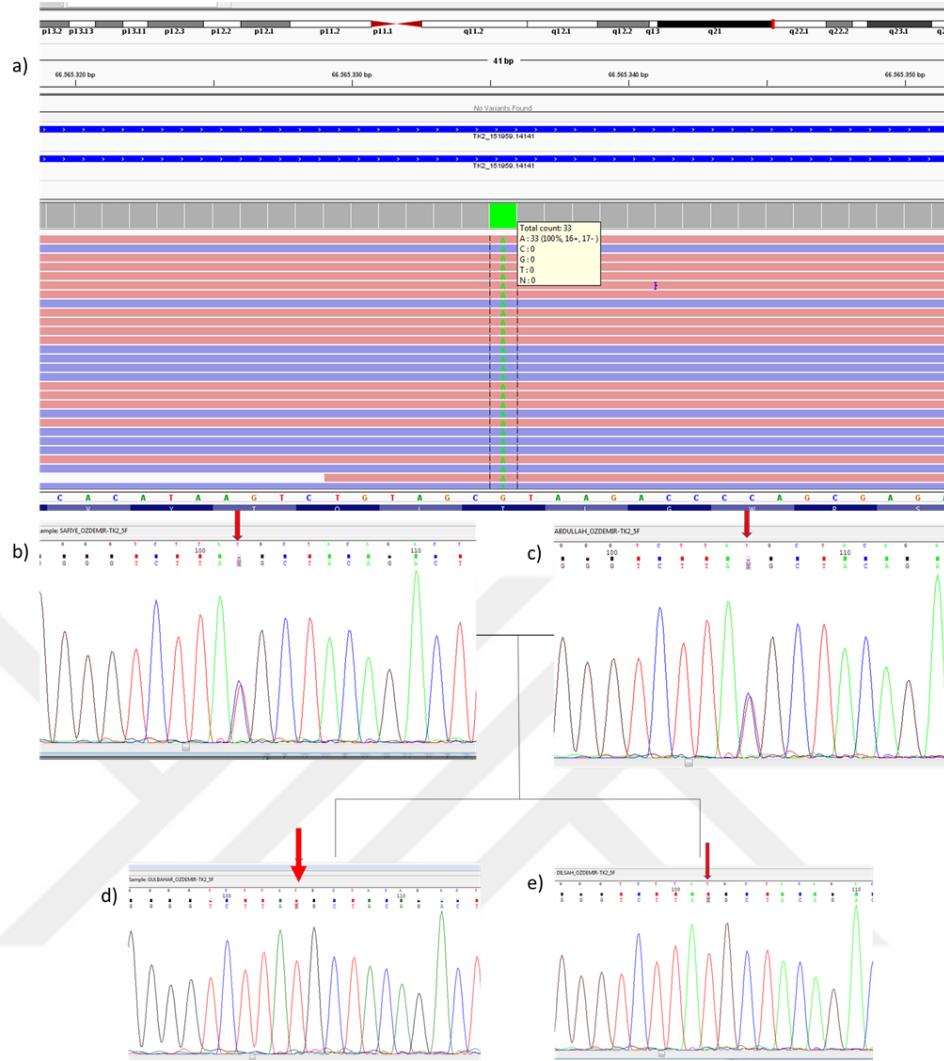


Şekil 4-3: Olgu III-7'nin kontrastlı kranial MRG bulguları.

Bilateral serebral hemisferlerde sulkus ve fissürlerin derinlikleri doğaldır. Mitokondrial hastalıklarda etkilenmesi beklenen bilateral bazal ganglionlar, thalamus, kapsüla interna-eksterna ve sentrum semiovale normal değerlendirilmiştir (ITF Radyoloji).

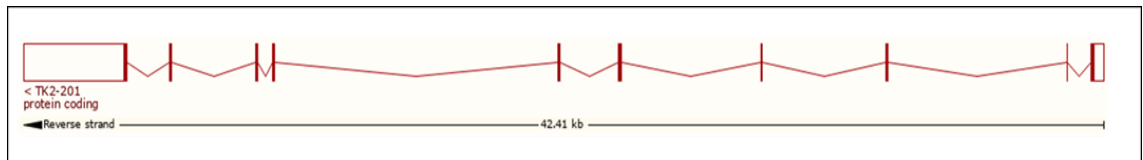
Moleküler Bulgular

İndeks olgu ve etkilenmiş kardeşinde yapılan TED analizinde, *TK2* geninde (Thymidine kinase 2, 16q21, NM_004614, NP_004605) exon 5'te homozigot c.323C>T (p.Thr108Met) değişimi saptandı. Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, c.323C>T değişimi için anne, baba ve III-9,10,12 numaralı kardeşlerin, heterozigot formda taşıyıcı oldukları belirlendi (Şekil 4-4). *TK2* geninde gösterilen bu varyant daha önce miyotokondriyal DNA Tükenme Sendromu 2 (Miyopatik Tip MTDP2) ilişkilendirilmiştir (300). *TK2*'nin HGMD'de tariflenen transkript varyantının Ensembl görüntüsü Şekil 4-5 (277) ve *TK2* proteininin normal ve mutant 3 boyutlu görüntüleri Şekil 4-6'da görülmektedir (278,279).



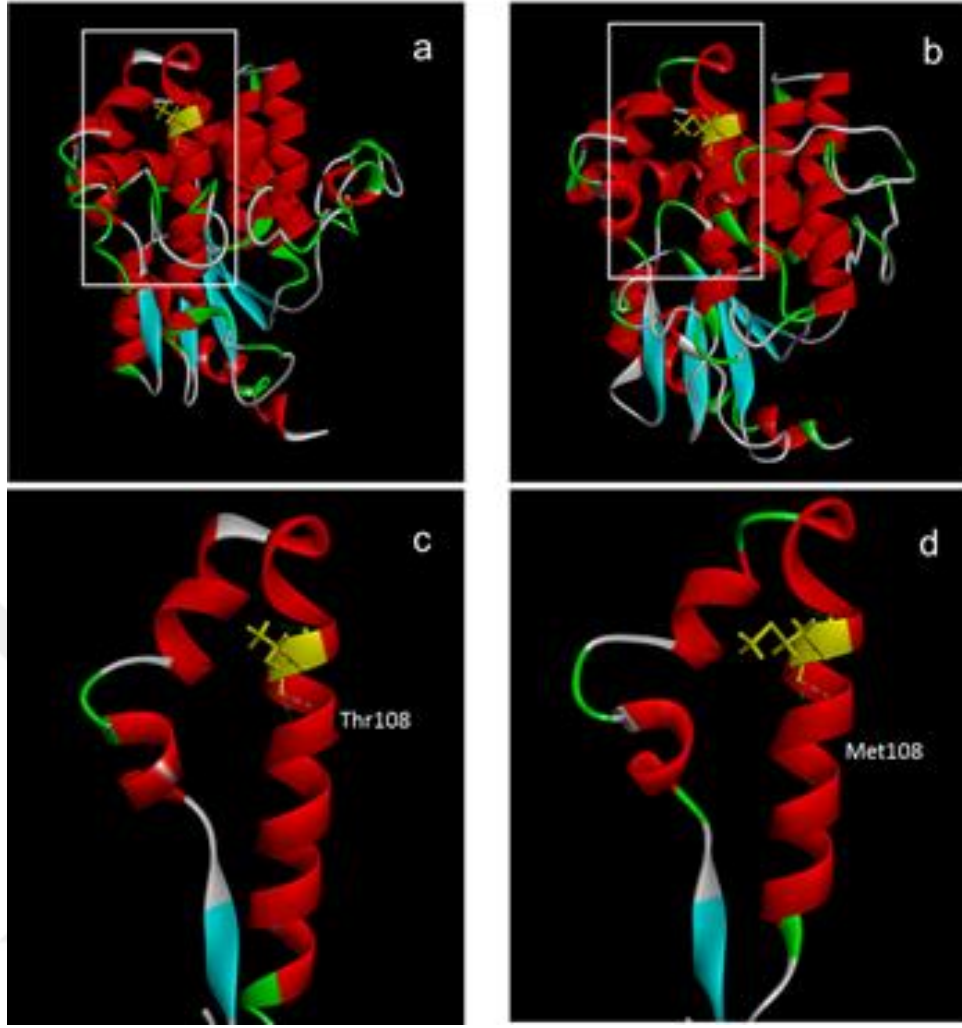
Şekil 4-4: Aile-1 moleküler analiz sonuçları.

Olgu III-7'de YND ile saptanan değişimin (TK2:c.323C>T) IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü (a) ve Sanger dizileme ile doğrulanması ile anne ve babada heterozigot (b,c), indeks (d) ve etkilenmiş kardeşteki (e) homozigot formdaki elektroferogram görüntüsü.



Şekil 4-5: TK2 transkriptinde ekzon ve intronlar

TK2 geni (*Thymidine kinase 2*) (MIM*188250) 6q21 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan 10 ekzonlu bir gendir. En büyük transkripti 4,824 bç. uzunluğundadır ve 265 aa'lık bir TK2 polipeptidini kodlar. TK2 timidin, deoksitisidin ve deoksiüridini fosforile eden bir monomerik mitokondriyal deoksiribonükleosit kinazdır.



Şekil 4-6: Thr108Met değişiminin TK2 proteini üzerindeki tahmini etkisi

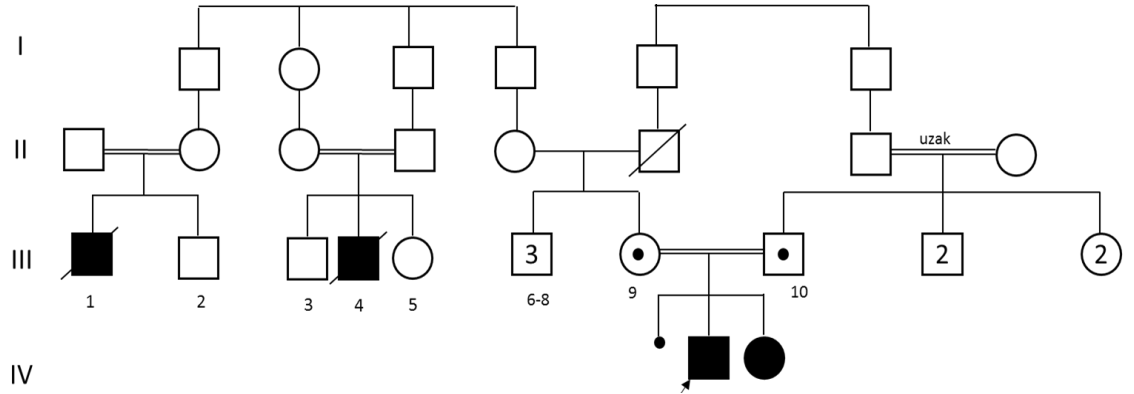
Normal (a) ve mutant (b) proteinin 3 boyutlu peptit yapısının pymol görüntüsü. Normal proteindeki Thr108 (c) ve mutant proteindeki Met108'nin (d) alfa-heliks oluşumuna katılan hidrojen bağları arasında fark olmadığı ve yan zincirlerinden kaynaklanan herhangi bir molekül içi etkileşimin oluşmadığı gözlenmektedir. Protein-ligand veya protein-protein etkileşimi gibi moleküller arası etkileşimde değişim söz konusu olabilir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*)

4.1.2. Aile-2 & Olgu IV-1ve IV-2

Öykü ve Klinik Bulgular

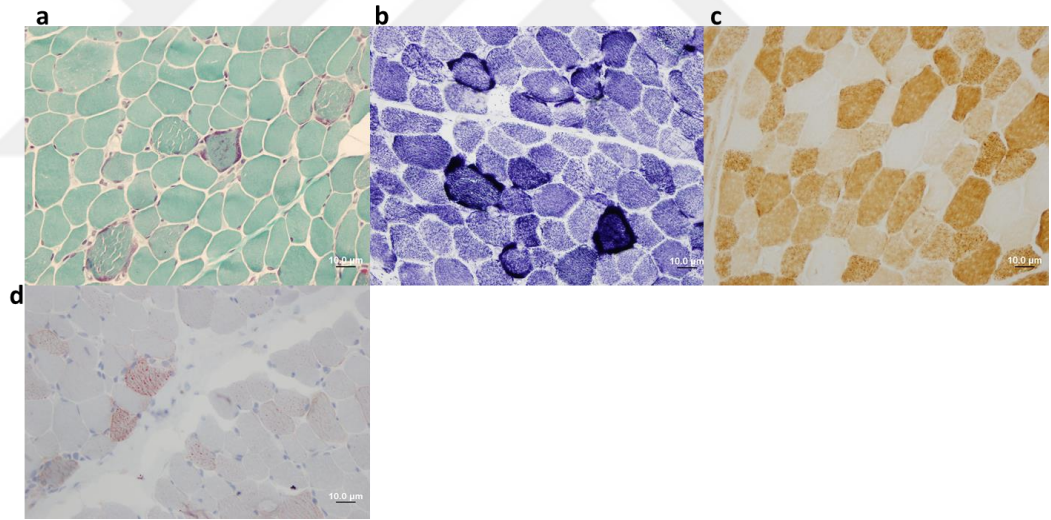
Aralarında ikinci derece kuzen akrabalığı olan çiftin, ikinci ve üçüncü gebeliğinden olan her ikisi de etkilenmiş 17 yaşında erkek ve 15 yaşında kız hasta, kas güçsüzlüğü, kas zayıflığı, yürüme güçlüğü, göz kapağı düşüklüğü şikayeti ile Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi. Annenin ilk gebeliği 21 yaş 28.GH'da inutero mort fetalis, 23 yaşındayken ikinci gebeliğinden erkek olgu ve

25 yaşındayken üçüncü gebeliğinden kız olgu doğmuş (G3P2A1) (Şekil 4-7). Poliklinik değerlendirmesinde; birinci olgunun prenatal takiplerinde özellik yok, termde normal servikal doğum (NSD) ve asfiksi öyküsü bildirilmemiştir. Nöromotor gelişim (NMG) özellikleri normal (baş tutma: 2 ay yürüme: 1 yaş) tarif edildi. Olgu, 5-6 yaşlarında diz ağrısı ve hareketlerde azalma nedeniyle dış merkezde değerlendirilmiş. Patolojik bulgu saptanmamıştır. Yedi yaşında gözlük kullanmaya başlamış ve 9,5 yaşında göz kapaklarında düşüklük (pitozis) nedeniyle İTF'ye yönlendirilmiş. Göz hareketleri olmadığı söylenerek çocuk nörolojiye yönlendirilmiş. EKO normal, EMG'de distal lifleri etkileyen polinöropatinin eşlik ettiği miyopatik tutulum saptanmıştır. Biyokimyasında laktat: 4 mmol/L ↑ , CK:270 ↑. Kas biopsisinde mitokondrial miyopati lehine bulgular, çok sayıda ragged red, daha fazla SDH yoğun, COX negatif lif mevcut ve bu lifler içinde nötral lipid birikimi ve artmış lizozomal aktivite görülmüş (Şekil 4-8). Hücrelerin glikojen ve fosforilaz içerikleri normalmiştir. Kranial MR, spinal MR normal (Şekil 4-9) ancak orbita MR'ında kas grubu kalınlıklarında simetrik azalma saptanmıştır (miyopati, atrofi ?). Mitokondrial destek tedavisi (karnitin, B2, B50 kompleks ve CoQ10) ve yürüme güçlüğü nedeniyle fizik tedavi rehabilitasyonuna başlanmıştır. Göz kapaklarında düşüklük olan kız kardeşinde de aynı bulgular olduğundan ortak etiyoloji düşünülerek, Kearns-Sayre ön tanısı ile istenen mtDNA delesyon testi, dış merkezde MLPA analizi ile negatif sonuçlanmış (Dışmerkez-2015). Her iki kardeşin tedavi takipleri Beslenme ve Metabolizma Polikliniğinden sürmekte iken genetik kökeninin araştırılması için 14.05.2019'de projeye dahil edilmiştir.



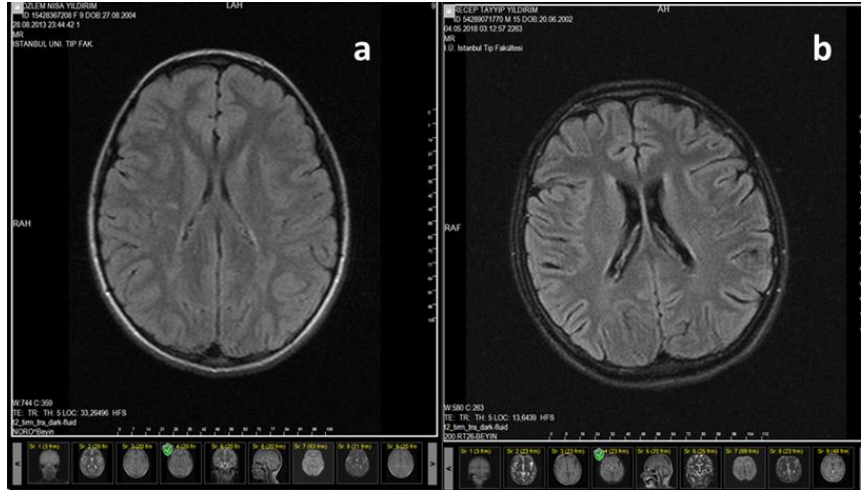
Şekil 4-7: Aile 2 pedigrisi.

İndeks olgu (IV-1) ve etkilenmiş kardeşi (IV-2) ile, taşıyıcı anne (III-9), babayı (III-10) gösteren aile ağacı. Ebeveynlerin kuzenleri olan III-1 numaralı olgu 17 yaşında solunum yetmezliği nedeniyle ve III-4 numaralı olgu 11 yaşında göz kapağı düşüklüğü nedeniyle yapılan operasyon sırasında kaybedilmişti.



Şekil 4-8: Olgu IV-1'in kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi.

Kesitlerde çok sayıda ragged-red (a), daha fazla sayıda SDH yoğun (b), COX negatif lif mevcuttu (c). Bu lifler içinde nötral lipid birikimi (d) ve artmış lizozomal aktivite gözleniyordu (ITF, Nöromusküler Hastalıklar İnceleme Lab).



Şekil 4-9: Olgu IV-1 (a) ve IV-2'nin (b) kontrastlı kranial MRG görüntüleri

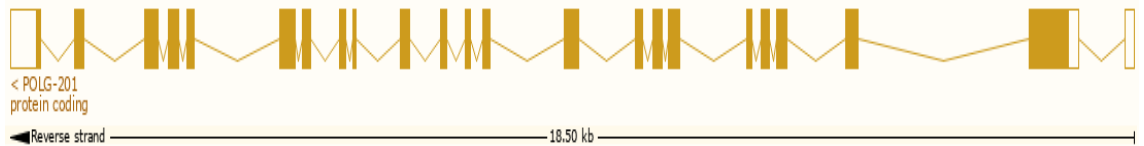
Mitokondrial hastalık lehine bulgu saptanmamıştır. Olgu IV-1'de bilateral sentrum semiovalede birkaç adet hiperintens lezyon. (ITF Radyoloji)

Moleküler Bulgular

İndeks olgu ve etkilenmiş kardeşinde yapılan TED analizinde, *POLG* geninde (15q25, DNA polimerase gamma, catalytic subunit, NM_002693.3, NP_002684.1) exon 4'te homozigot c.911T>G (p.Leu304Arg), (rs121918044) değişimi saptandı. Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 4-10). Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, c.911T>G değişimi için anne ve babanın heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi. *POLG* geninde gösterilen bu varyant daha önce mitokondrial depleksyon sendromları ile ilişkilendirilmiştir (304). Şekil 4-11'de *POLG*'nin HGMD'de (280) tariflenen transkript varyantının Ensembl görüntüsü (277). Şekil 4-12'de ise proteinin normal ve mutant 3 boyutlu görüntüleri görülmektedir (278,279).

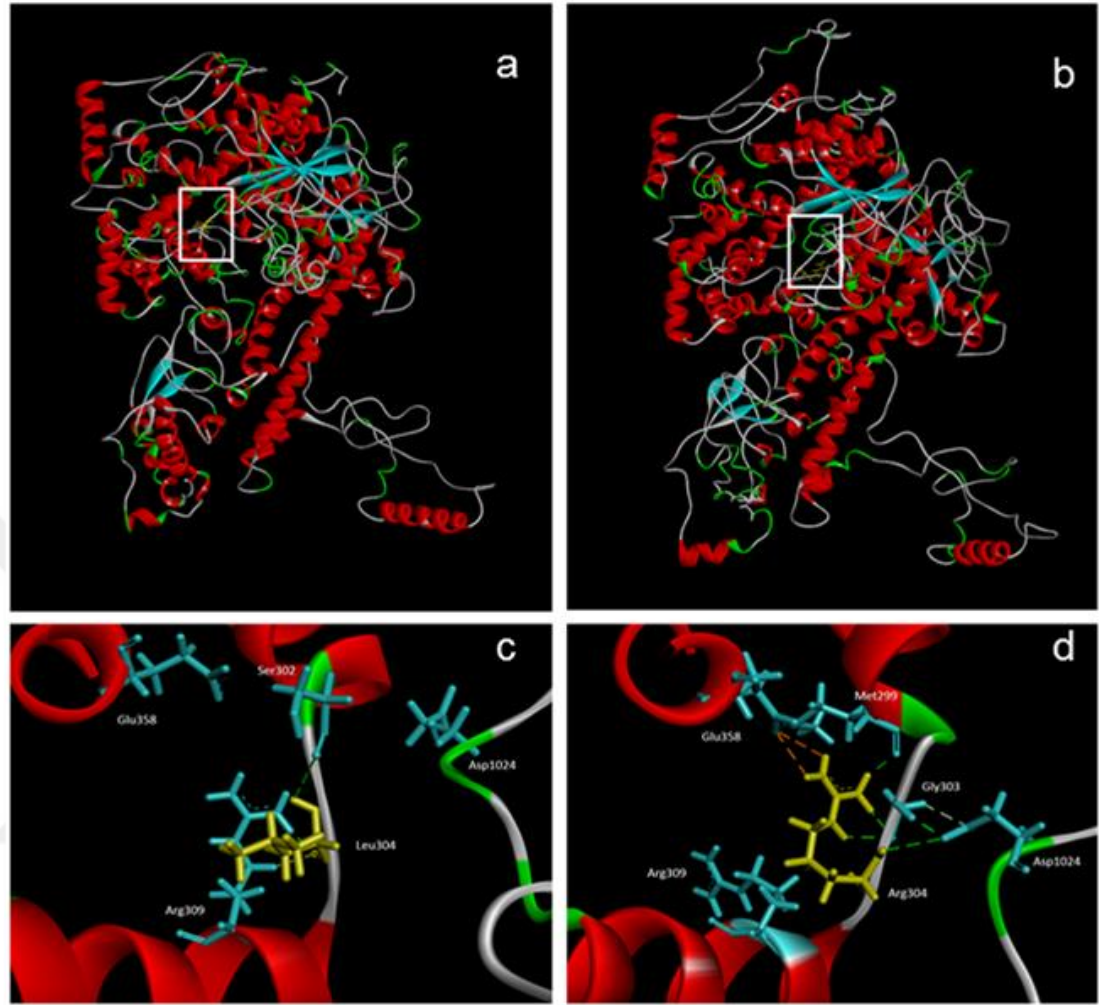


Şekil 4-10: Aile-2 moleküler analiz Olgu IV-1'de YND ile saptanan varyantın (*POLG*: c.911T>G) IGV görüntüsü (a) ve aynı değişimin sanger dizileme ile doğrulanması. Anne ve babada heterozigot (a,b), indeks (d) ve etkilenmiş kardeşte (e) homozigot formda elektroferogram görüntüsü.



Şekil 4-11: POLG transkriptinde ekzon ve intronlar

POLG geni (DNA polimeraz gamma, catalytic subunit) (MIM*174763) 15q26.1 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 23 ekzonlu bir gendir. En büyük transkripti 4,487 bç. uzunluğundadır ve 1,239 aa'lık bir polipeptidi kodlar. *POLG* proteini, bir C-terminal polimeraz ('pol') domaini ve bir amino terminal eksonükleaz ('ekzo') domaininden oluşur. Ekzo domaini, enzime bir düzeltme aktivitesi sağlayarak mitokondriyal DNA replikasyonunun doğruluğunu artırır (277).



Şekil 4-12: Leu304Arg değişiminin POLG proteini üzerindeki tahmini etkisi.

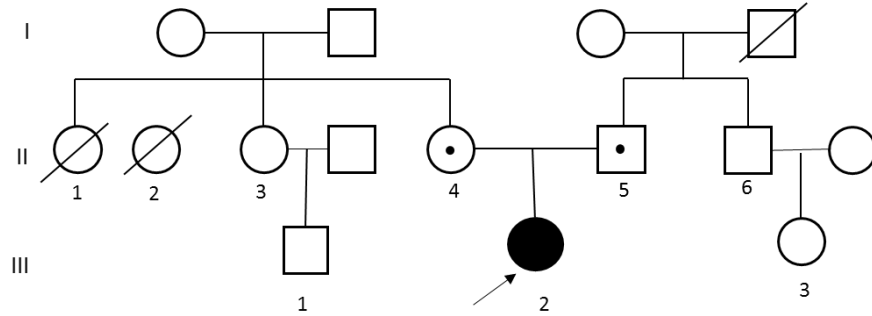
Normal (a) ve mutant (b) proteinin 3 boyutlu peptit yapısının pymol görüntüsü. Normal proteinde, non-polar özellikteki Leu304, bazik özellikli Arg309 ile etkileşim halindeyken (c), mutant proteindeki bazik özellikli Arg304, bazik özellikli Arg309 ile etkileşimini kesip, asidik özellikli Glu358 ve Asp1024 ile bağlantı kurmaktadır (d). (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*) (278,279).

4.1.3. Aile-3 & Olgu III-2

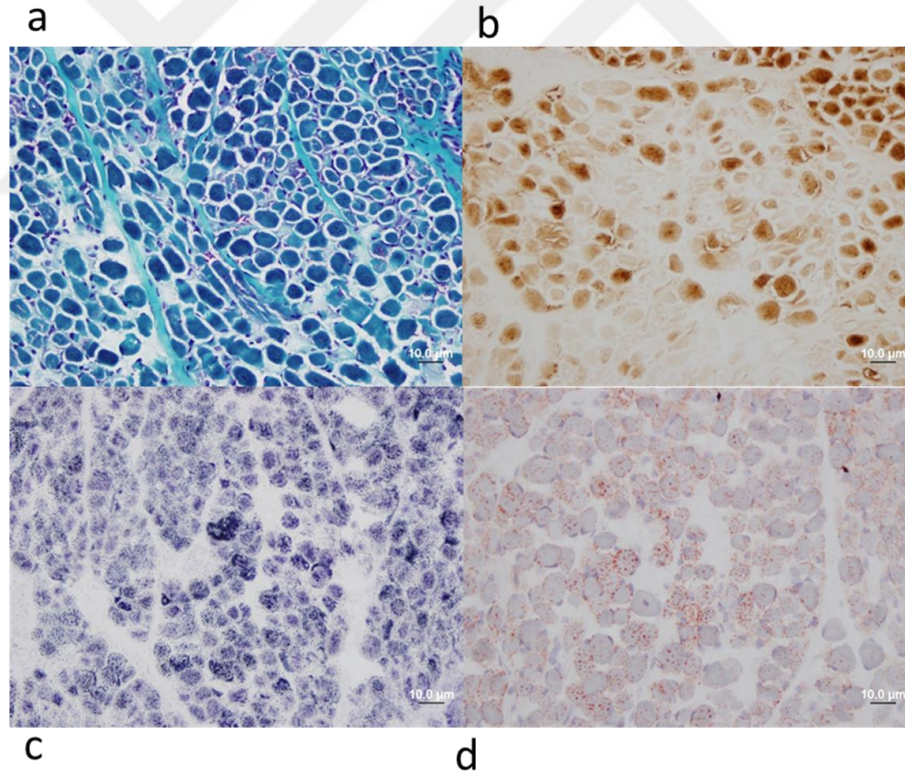
Aralarında akrabalık olmayan 33 yaşındaki baba ile 27 yaşındaki annenin, ilki biyokimyasal gebelik olmak üzere ikinci gebeliğinden olan tek çocuğu (G1P1A0) (Şekil 4-13). Olgu, 1,5 yaşında, başını tutamama, hipotoni, epileptik nöbetler, mitokondrial hastalık lehine görüntüleme ve laboratuvar bulguları ile Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi. Prenatal izleminde, 24. haftadan sonra bebek hareketleri azalmış ancak ek patolojik ultrason bulgusu saptanmamış. Termde (40+7 GH) sezaryen ile (C/S) ile 2495 g tartı (3p), 51 cm boy (75p) ile doğmuş. Postnatal 12.saatte hipoglisemi (K.Ş 40mg/dl) ve emme güçlüğü nedeniyle 11 gün yoğun bakımda (YB) tetkik edilmiş. Taburculuk sonrası evde ateşsiz havale geçirmesi nedeniyle tekrar 40 gün YB yatışı olmuş. Tetkiklerinde; kan laktatı yüksek (11,6 mmol/L N: 1,1-2,3), EEG de düzensizlik, kranial MR da hipoglisemik ensefalopatik bulgular, tüm batin ultrasonografide (USG) sol böbrek pelvikalisijel sistem grade 1 hidronefroz, EKO da küçük atrial septal defekte (ASD), sınırda sol ventrikül sistolik fonksiyonu varmış. Kontrol önerisi ile taburcu edilmiş. Taburculuk sonrası konvülsiyon nedeniyle antiepileptik tedavi başlanmış. Metabolizma polikliniğine yönlendirilen hastanın metabolik tetkiklerinde kan laktatı yüksek, idrar organik asit analizinde mitokondrial hastalık ile uyumlu atılımlar olması üzerine, kas biopsisi yapılmış. Biopsi sonucunda, serpinti halinde kas lifleri ragged red özelliğinde ve lipid birikimi ile seyreden mitokondrial miyopati lehine bulgular saptanmış (Şekil 4-14). Yapılan nörolojik muayenesinde belirgin hipotoni ve kranial MR'da talamus, serebellum ve beyin sapında difüzyon kısıtlaması mevcutmuş (Şekil 4-15). Tedavi ve takibi Beslenme ve Metabolizma Polikliniğinden süren olgu, genetik araştırma amacıyla projeye dahil edildi.

03.04.2019 tarihinde yapılan 1,5 yaş muayenesinde, tartı 8680gr (3-10p), boy 77 cm (10-15 p), baş çevresi 47,2 cm (50p) saptandı. Genel durum stabil, solunum rahat, kalp tepe atımı ritmik, ek ses üfürüm yok, batin rahat, hepatosplenomegali yoktu. Nazogastrik sonda ile besleniyordu. Hipotonisite var ve derin tendon refleksleri (DTR) artmıştı. Olgunun nöromotor gelişimi kronolojik yaşından geri ve göz teması sınırlıydı. Mevcut klinik bulgular ve laboratuvar değerlendirmeleri ile ayırıcı tanıda ilk sırada mitokondrial hastalık yer aldı.

İndeks olgunun tek olması ve akrabalık olmaması nedeniyle trio TED analizi ve mtDNA dizi analizi planlandı.

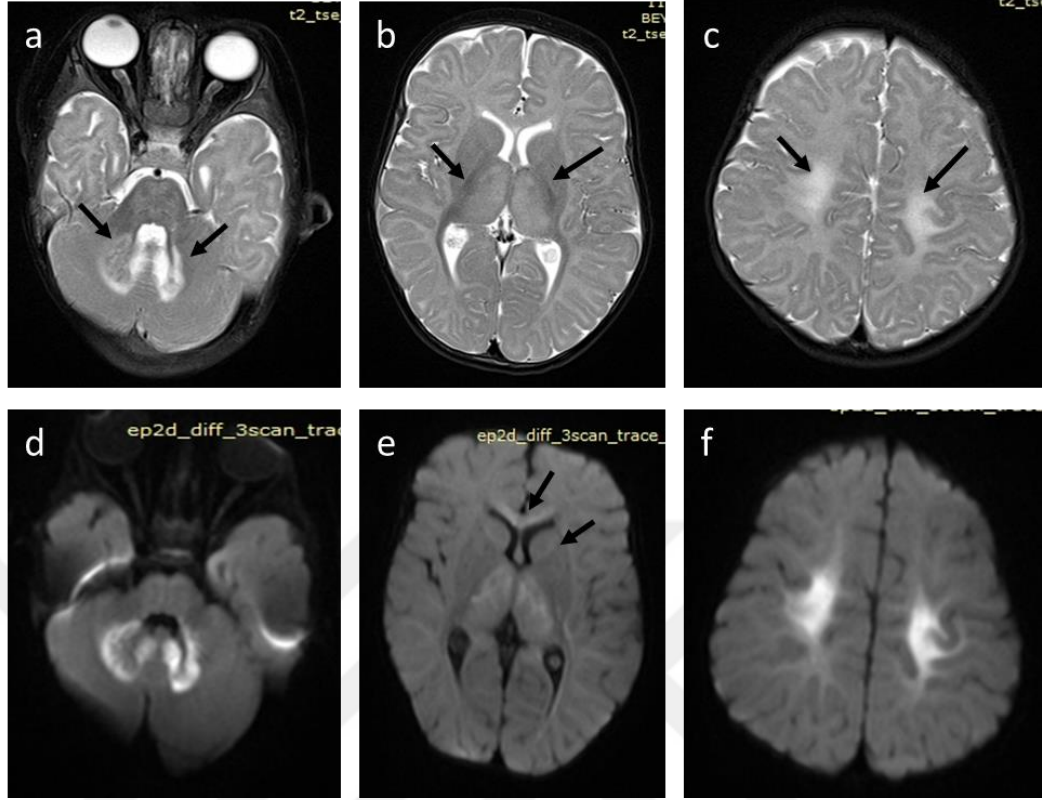


Şekil 4-13: Aile 3 pedigrisi. İndeks olgu (III-2) ve taşıyıcı anne (II-4), babayı (II-5) gösteren aile ağacı. İndeks olgunun annesinin ilk iki gebeliğinden olan iki kardeşi (II-1 ve II-2) 1 yaşından önce bilinmeyen bir nedenle kaybedilmiş.



Şekil 4-14: Olgu III-2'in kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi.

Kas lifleri yuvarlaklaşmış, çapları farklı ve serpinti halinde ragged-red özelliğindiydi (a).COX negatif (b) SDH ile serpinti halinde bazı kas liflerinde yoğun boyanma izleniyordu (c). Kas liflerinin büyük kısmında lipid globülleri oldukça iri ve seyrek (d). (ITF, Nöromusküler Hastalıklar İnceleme Lab).

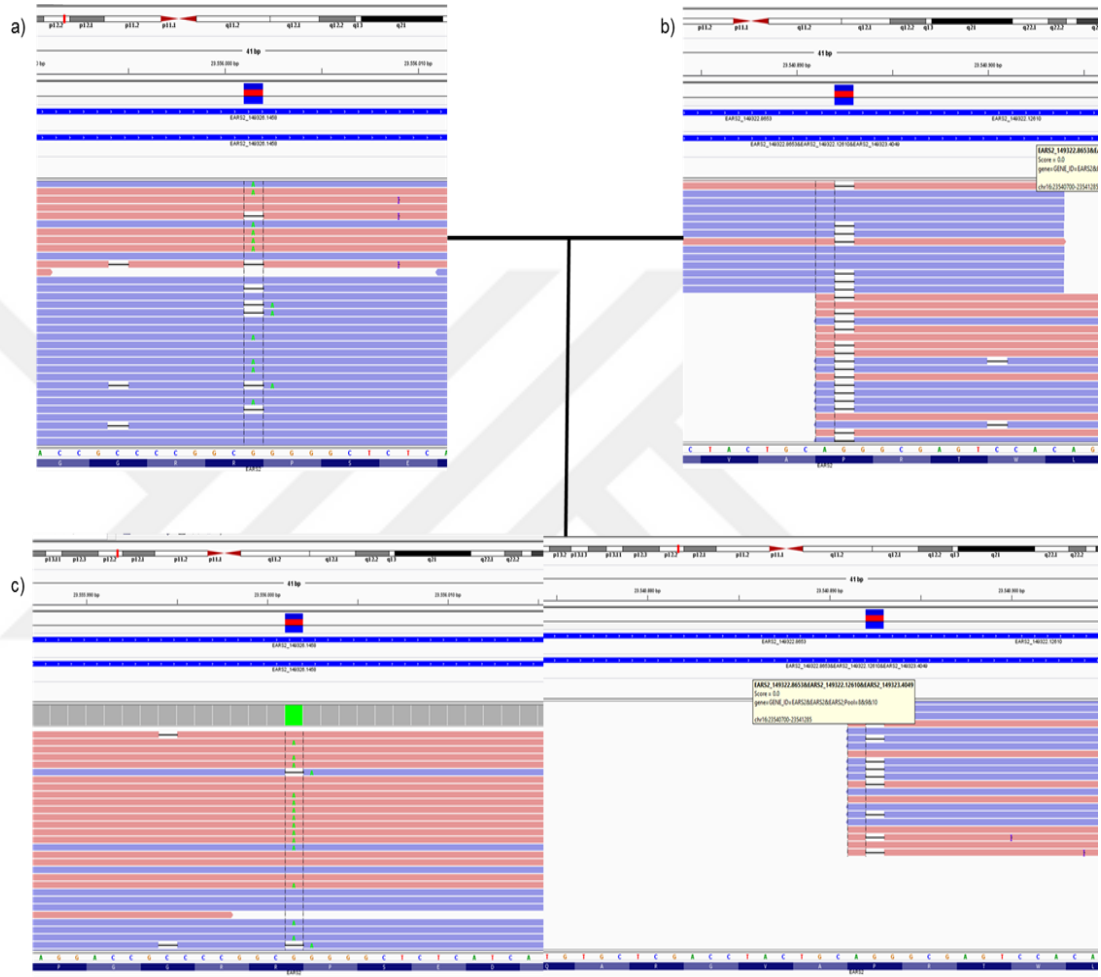


Şekil 4-15: Olgu III-2'nin kontrastlı kranial MRG görüntüsü Bilateral dentat nükleus, talamus ve periventriküler derin ak maddede (siyah oklar) simetrik T2A patolojik sinyal artışları izlendi (a-c). Difüzyon ağırlıklı sekanslarda aynı bölgelerde ayrıca korpus kallozum ve kaudat nükleuslarda (siyah oklar) difüzyon kısıtlılığı olduğu görüldü (d-f). Bulgular mitokondrial hastalık lehine değerlendirildi (Dış merkez, 2019).

Moleküler Bulgular

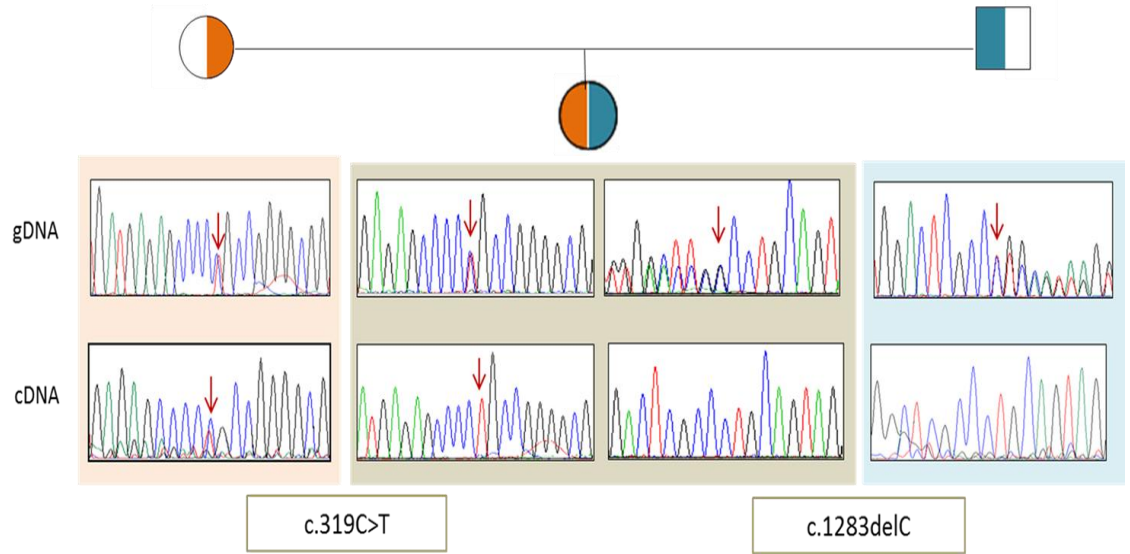
İndeks olguda, TED analizi ile *EARS2* geninde (16p12.2, glutamyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial, NM_001083614.2, NP_001077083.1) exon 3'te heterozigot c.319C>T (p.Arg107Cys) ve exon 7'de heterozigot c.1283delC (p.Pro428Leufs*3) değişimi saptandı. Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, annenin c.319C>T değişimini ve babanın c.1283delC değişimini taşıdığı belirlendi (Şekil 4-16) İndeks anne ve babanın periferik kandan elde edilen total tRNA 'dan reverse transkriptaz ile elde edilen cDNA'dan yapılan incelemede indekste delesyonlu allelin mRNA yıkımına uğradığı gözlemlendi (Şekil 4-17). Bu testte saptanan *EARS2* varyantlarından c.319C>T değişimi daha önce çok nadir varyant olarak veri tabanlarında bildirilmiş (rs1355685453), c.1283delC değişimi

ise daha önce bildirilmemiştir. Şekil 4-18'de *EARS2*'nin HGMD'de (280) tariflenen transkript varyantının Ensembl görüntüsü (277). Şekil 4-19'de ise proteinin (glutamyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial) normal ve mutant 3 boyutlu görüntüleri görülmektedir (278,279).



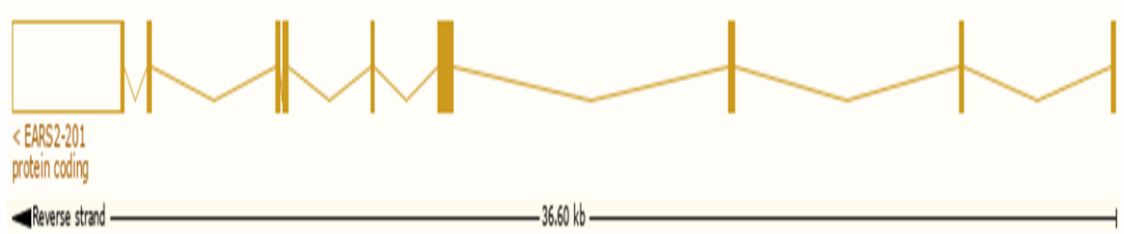
Şekil 4-16: Aile 3 Moleküler analiz sonuçları.

Annede heterozigot c.319C>T varyantı (a), babada heterozigot c.1283delC varyantı (b) ve indeks olguda (c) birleşik heterozigot saptanan varyantların (*EARS2*: c.319C>T ve c.1283delC) IGV görüntüleri.



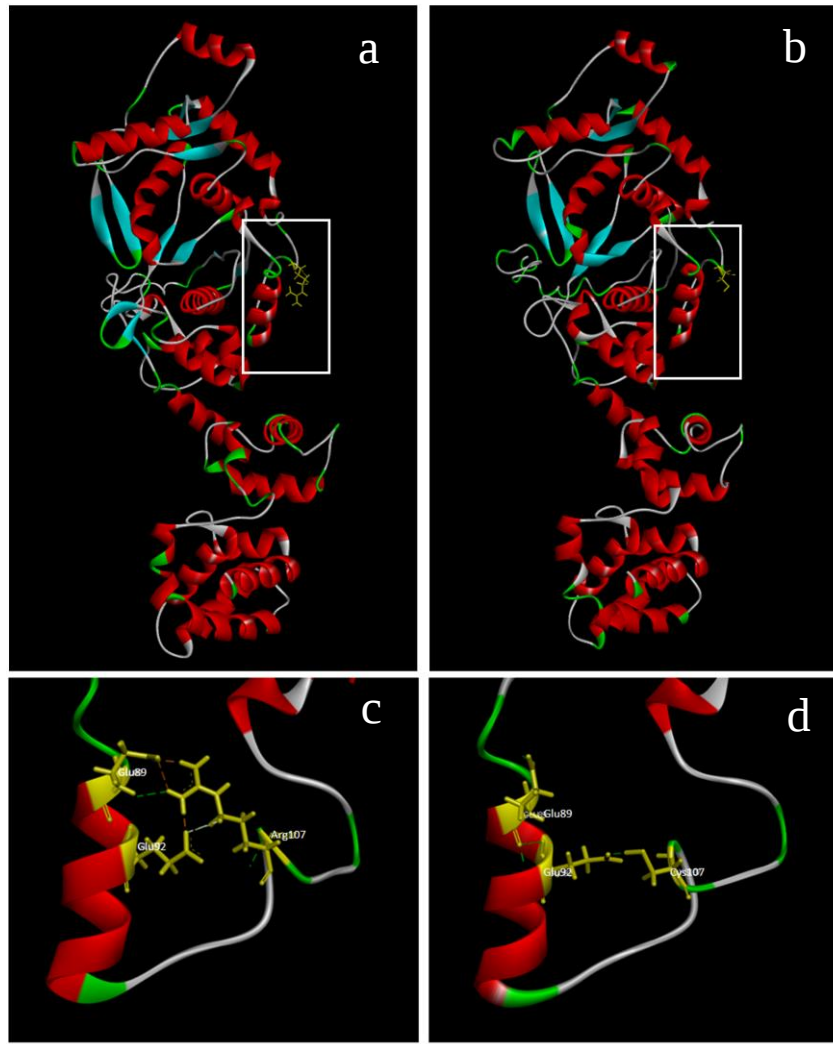
Şekil 4-17: İndeks olgunun *EARS2* geninde saptanan varyantların genomik ve cDNA elektroferogramları.

Periferik kan örneğinden elde edilen total RNA'dan «random» heksameri dizilimdeki primerler ile sentezlenen cDNA'da Sanger dizileme elde edilen elektroferogram görüntülerinde ise olguda sadece yanlış anlamlı mutasyon taşıyan allelin, babada ise sadece normal allelinin varlığı, delesyon tipi mutasyonun mRNA yıkımına uğradığını desteklemektedir.



Şekil 4-18: *EARS2* transkriptinde ekzon ve intronlar

EARS2 geni (Glutamil-tRNA sentetaz 2, Mitochondrial) (MIM*612799) 16p12.2 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 9 ekzonlu bir gendir. En büyük transkripti 5,196 bç. uzunluğundadır ve 523 aa'lık bir polipeptidi kodlar. Glutamil-tRNA sentetaz, mitokondriyal protein translasyonu için tRNA aminoaçilasyonunu, iki aşamalı bir reaksiyonda glutamatın tRNA'ya (Glu) bağlanmasını katalize eder: glutamat önce Glu-AMP oluşturmak için ATP tarafından aktive edilir ve ardından tRNA'nın (Glu) alıcı ucuna aktarılır (277).



Şekil 4-19: Arg107Cys değişiminin EARS proteini üzerindeki tahmini etkisi.

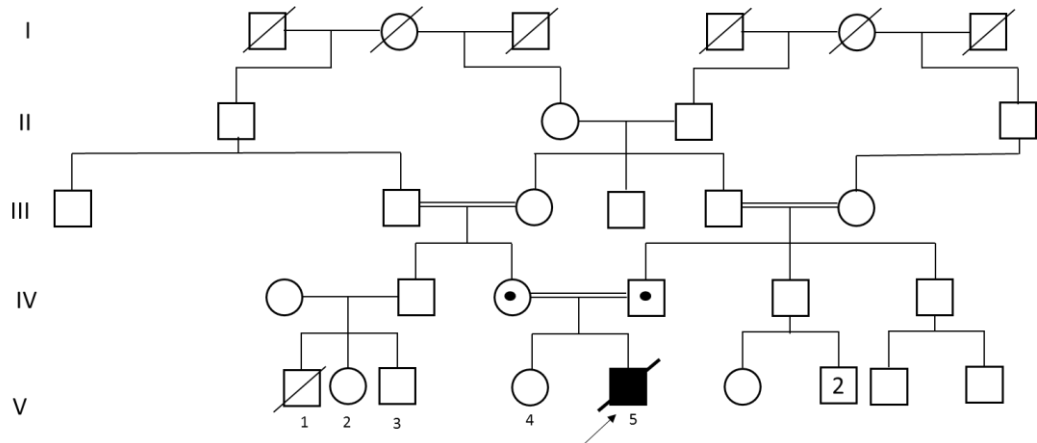
Normal (a) ve mutant (b) proteinin 3 boyutlu peptit yapısının pymol görüntüsü. Normal proteinde gözlenen Arg107 ve Glu89 arasındaki etkileşim (c) mutant proteinde (Cys107) gözlenmemektedir (d). (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*) (278,279).

4.1.4. Aile-4 & Olgu V-5

Öykü ve Klinik Bulgular

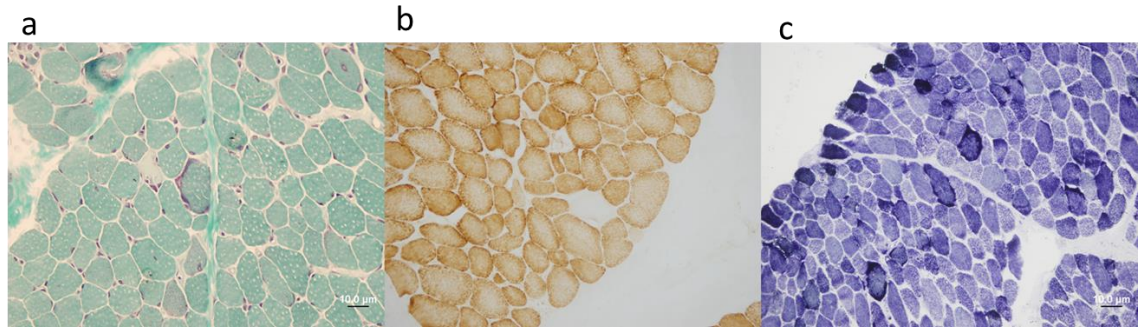
Aralarında akrabalık olan (1. kuzen) çiftin, ikinci gebeliğinden olan, 1 yaşında erkek olgu, hepato-ensefalopatik klinik ve laboratuvar bulguları nedeniyle genetik açıdan değerlendirilmek üzere Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi. Ailenin ilk gebeliğinden 13 yaşında sağlıklı kız çocukları var, ikinci gebelikten olan olgunun, prenatal takiplerinde 35.GH' da büyüme durmuş ve miadında NSD ile 2 hafta geri (IUGG) 2360 gr (<3p) ve 43 cm (<3p) doğmuş

(G2P2A0Y1) (Şekil 4-20). Postnatal 3. gün emmeme, sarılık, dehidratasyon, solunum sıkıntısı ve ağır metabolik asidoz/hiperamonyemi bulguları ile dış merkez yenidoğan YB ünitesinde sepsis ve metabolik hastalık ön tanısıyla 1 ay takip edilmiş. İdrarda redüktan maddde +2, karaciğer fonksiyon testleri (KFT) ve amonyak yüksekliği saptanmış. Takip önerilerek taburcu edilmiş. Anne sütü alamayan olgunun, motor gelişimi geriydi (baş tutma 9 ay ve desteksiz oturma yok). Beş aydan sonra tartı alımı durmuş, KFT’de bozulma ve laktat yüksekliği nedeniyle İTF Çocuk kliniğine yönlendirilmiş. Kolestaz ve metabolik hastalık yönünden tetkik edilen hastada, INR ↑, ALP↑,AFP↑, laktat ↑, idrarda redüktan madde (++) , monosakkarit ince tabaka kromatografisinde (MTLC) galaktoz (-), tandem MS’de alanin 673↑(134-542), İOA analizinde 4-OH fenil laktik asit↑ ve 8 aylıkken yapılan KC biyopsisinde hepatosteatoz, kas biyopsisinde mitokondrial hastalık lehine bulgular saptanmış (Şekil 4-21). EEG’ de multifokal epileptik aktivite varlığı ve beyin MR’da kortikal beyaz cevherde iskemiye sekonder kistik alanlar ve serebellar vermis inferioru hipoplazik görünümdeydi (Şekil 4-22). Göz teması olmayan olgunun yapılan göz muayenesinde, göz dibinde tuz biber manzarası saptanmış ve retinitis pigmentosa açısından moleküler analiz istenmiş. Mevcut bulguları ile mitokondrial hastalık klinik tanısı ile takip edilen olgu, beslenmenin azalması, genel metabolik durumun bozulması nedeniyle yatarak tedavi edilmekteyken, ağır metabolik asidoz ve solunum yetmezliği nedeniyle 15 aylık iken kaybedildi.



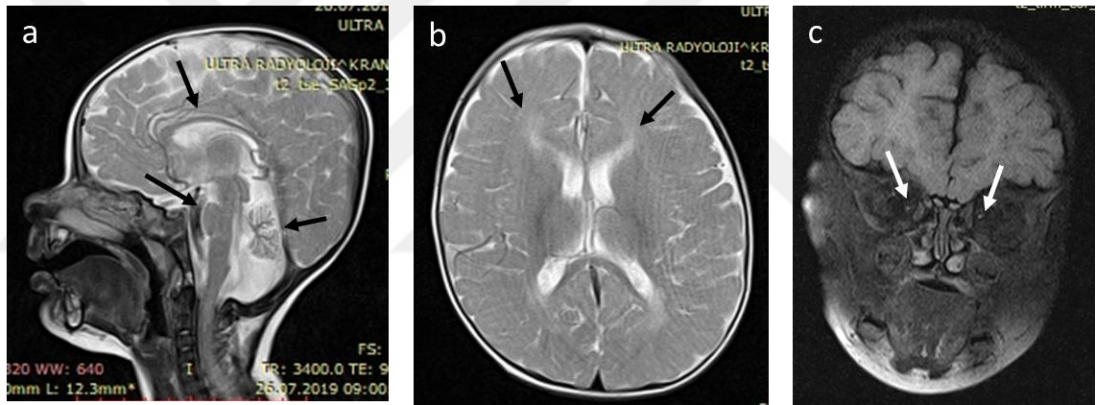
Şekil 4-20: Aile 4 ‘ün pedigrisi.

İndeks olgu (V-5) ve sağlıklı kardeşi (V-4). Olgu V-1 prematür doğum sonrası neonatal dönemde kaybedilmiştir.



Şekil 4-21: Olgu V-3'ün kas dokusu insizyonel biopsi histolojik incelemesi.

Ragged-red lifler (a), COX negatif (b) ve SDH ile yoğun boyanma (c) gösteren ve mitokondrial miyopati lehine değerlendirilen bulgular. (ITF, Nöromusküler Hastalıklar İnceleme Lab).



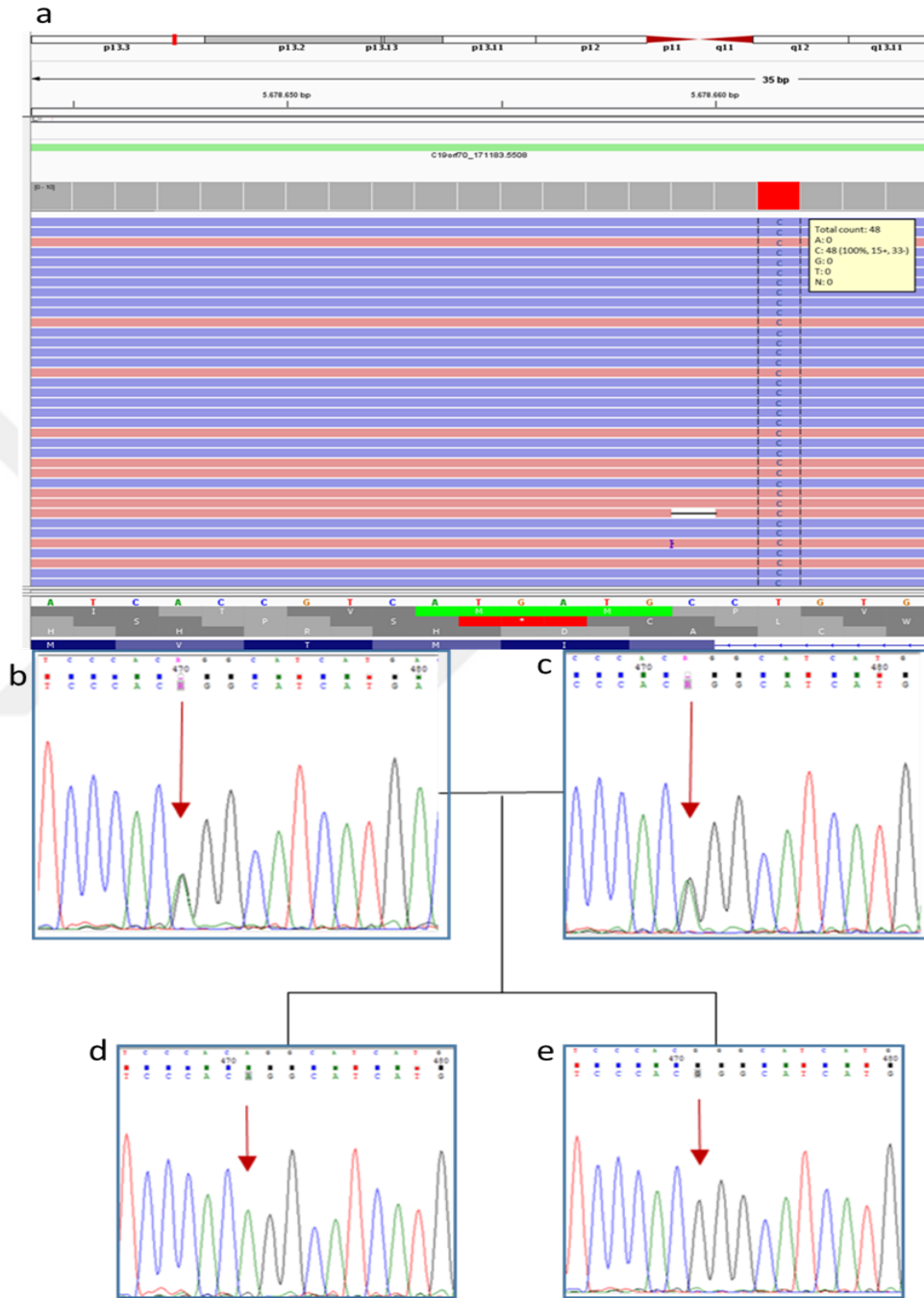
Şekil 4-22: Olgu V-3'ün kranial MR görüntüsü.

T2A sagittal sekanslarda(a) serebellumda ve beyin sapı ile korpus kallozumda (siyah oklar) atrofi olduğu izlendi. T2A aksiyal sekanslarda (b) bilateral periventriküler derin ak madde içinde (siyah oklar) simetrik sinyal artışı mevcuttu. T1A koronal sekanslarda optik sinirlerin (beyaz oklar) bilateral atrofik olduğu saptandı (Dış merkez, 2019).

Moleküler Bulgular

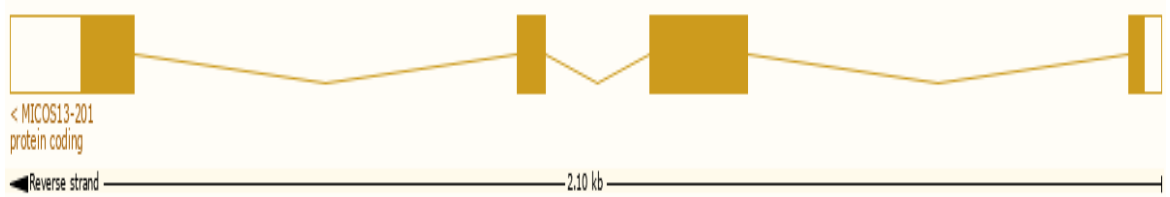
İndeks olguda yapılan TED analizinde, *MICOS13* geninde (19p13.3, Mitochondrial Contact Site And Cristae Organizing System, 13-Kd Subunit, NM_205767.2, NP_991330, rs1064797230) intron 3'te homozigot c.260-2A>G değişimi saptandı. Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, c.260-2A>G değişimi için anne ve babanın heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi (Şekil 4-23) *MICOS13*

geninde gösterilen bu varyant daha önce hastalıkla ilişkilendirilmiştir (325). Şekil 4-24'de *MICOS13*'ün HGMD'de (280) tariflenen transkript varyantının Ensembl görüntüsü görülmektedir (277).



Şekil 4-23: Aile-4 moleküler analiz sonuçları.

İndeks olgu V-1'de *MICOS13* c.260-2A>G değişiminin IGV görüntüsü (a). Sanger dizileme ile doğru varyantın elektroferogram görüntülerinde aynı değişim için anne ve baba heterozigot (b,c), indeks (e) homozigot mutant ve sağlıklı abla (d) homozigot normaldir.



Şekil 4-24: MICOS13 transkriptinde ekzon ve intronlar

MICOS13 geni (Mitochondrial Contact Site And Cristae Organizing System, 13-Kd Subunit) (MIM* 616658) 19p13.3 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 4 ekzonlu bir gendir. 516 bç. uzunluğundadır ve 118 aa'lık bir polipeptidi kodlar. MICOS kompleks subunit MIC13 proteini, mitokondriyal iç zarın büyük bir protein kompleksi olan MICOS kompleksinin bileşenid olup, krista bağlantılarının, iç zar mimarisinin ve dış zarla temas bölgelerinin oluşumunun korunmasında önemli roller oynar (277).

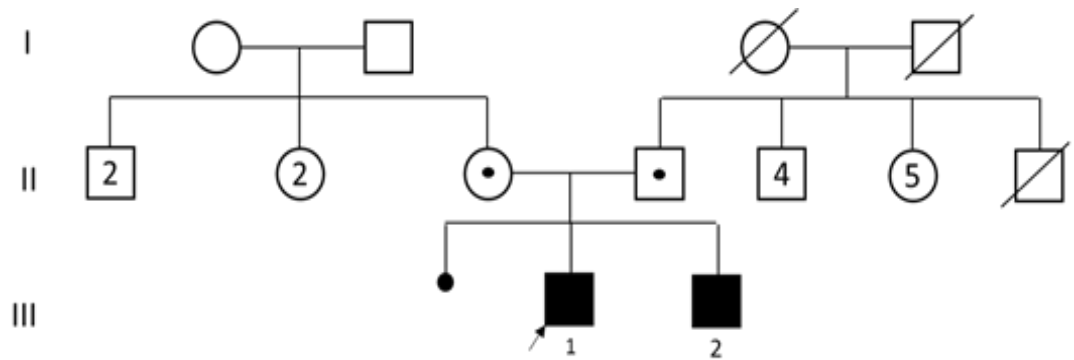
4.1.5. Aile-5 & Olgu III-1 ve III-2

Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık olmayan çiftin ikinci ve üçüncü gebeliklerinden doğan, 12 ve 10 yaşında etkilenmiş iki erkek kardeş (G3P2A1) (Şekil 4-25), progresif nöromotor gelişim geriliği, spastisite, trunkal hipotoni ve beyin MR'da bazal ganglion tutulumu nedeniyle Tıbbi Genetik AD'da takipli iken, ileri moleküler genetik araştırma amacıyla projeye dahil edilmiştir. Aile öyküsünde, birinci olgu (III-1) bir yaşındayken, Nöroloji AD tarafından Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirilmiş. Prenatal takiplerinde özellik olayan olgu, termde ve makat gelişi nedeniyle C/S ile doğmuş. Doğum ağırlığı 3300 g ve postnatal öyküsünde özellik bulunmuyor. Emmesi iyi ve anne sütü alan olgu, başını 2. ayda tutmuş ve ilk 3 ay nöromotor gelişimi normal seyretmiş. Üç aydan sonra dengesizlik başlamış ve başını tutmakta zorlanmış. Sekiz aylıkken desteksiz oturamayan olgunun yapılan nörolojik muayenesi sonrası ve beyin MR' da X'ALD (Adrenolökodistrofi) düşündüren bulgular saptanmış (T2 Flair hiperintens sinyal değişiklikleri, periventriküler ak madde tutulumu). Üç aya kadar normal olup, üç aydan sonra başlayan nöromotor gerilik nedeniyle Nöroloji ile birlikte yeniden değerlendirilmiş ve hastada ön planda organik asidemiler, ikinci planda Metakromatik Lökodistrofi ve son olarak ALD ön tanısıyla tetkik edilmeye başlanmış. Doğumsal metabolik hastalık selektif taraması ve idrar organik asit

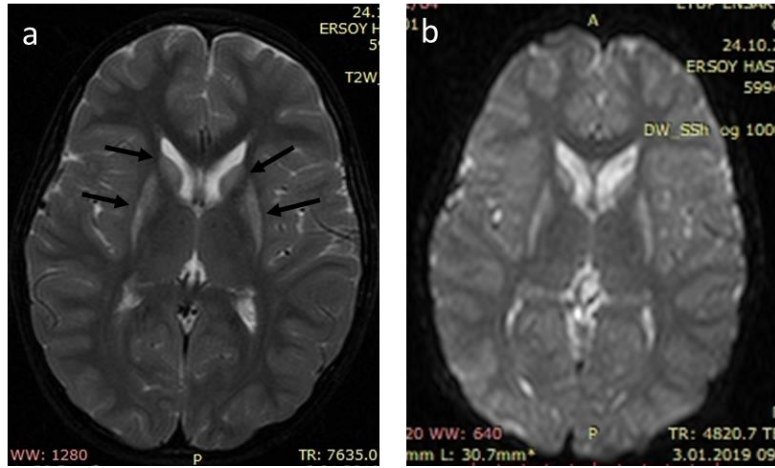
testinde ketonüri dışında patolojik değer saptanmamış olan olgunun, yurt dışında analiz edilen Lizozomal enzimlerden Arilsülfataz A ve Beta galaktozidaz aktivitelerinde de normal saptanmış. Peroksizomal hastalıklar açısından VLCFA analizi istenmiş ancak o tarihte yapılamamış. Henüz tanı konulamamışken üçüncü gebelik olmuş ve aile, 25.GH 'dan itibaren izlenmiş. Patolojik USG bulgusu olmayan olgu, termde 3200 gr doğmuş. Başını 2 aylıkken tutmuş. 6 aylıkta hipotonisite ve ağabeyi ile benzer fakat daha hafif klinik bulgularla çocuk nörolojisi tarafından değerlendirilen olgunun beyin MR bulgularında hipoksik iskemik metabolik sekel yorumu yapılmış (Şekil 4-26). Ancak yapılan metabolik testlerinde patoloji saptanmamış. Sosyal iletişimi ağabeyinden daha iyi olan olgunun da henüz tanısı konulamamışken, aile takibi bırakmış.

Her iki olgu 01.10.2018 tarihinde Tıbbi Genetik kliniğinde değerlendirildi. Nöromotor gerilik, spastisite, distonik kasılmaları olan her iki kardeş Beslenme ve Metabolizma polikliniğine konsülte edildi. Klinik bulguları ve metabolik testleri ile iyi tanımlanmış bir KMH'ya işaret etmeyen olgulara hastalığın genetik temelini araştırmak amacıyla TED analizi yapıldı.



Şekil 4-25: Aile 5 'in pedigrisi.

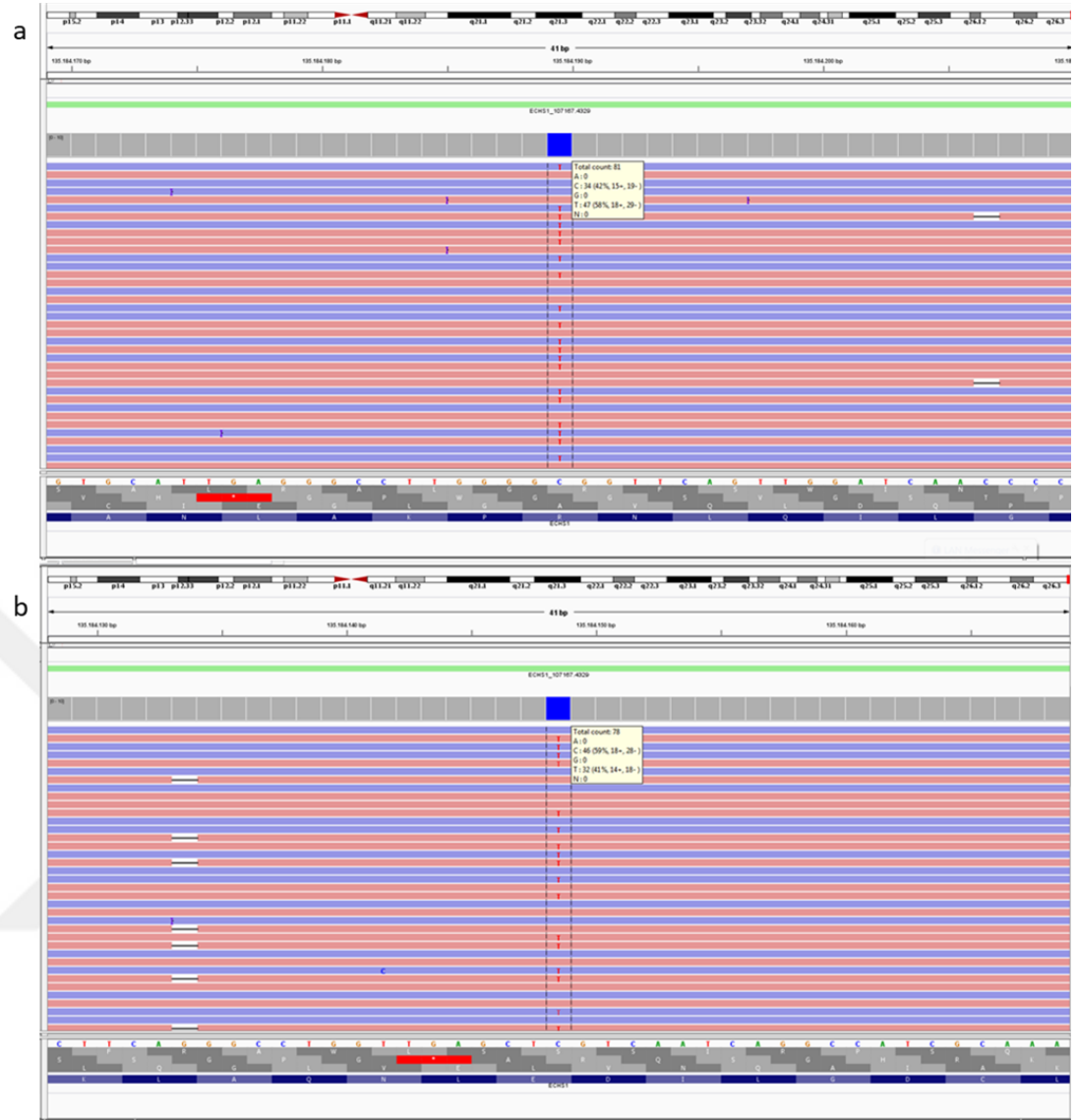
İndeks olgu (III-1) ve etkilenmiş kardeşi (III-2)



Şekil 4-26: İndeks olguya ait beyin MR görüntüsü. T2A sekanslarda (a) ve difüzyon ağırlıklı sekanslarda (b) bilateral simetrik putamen ve kaudat nükleuslarda (siyah oklar) patolojik sinyal artışı ve difüzyon kısıtlılığı izlendi (Dış merkez,2019).

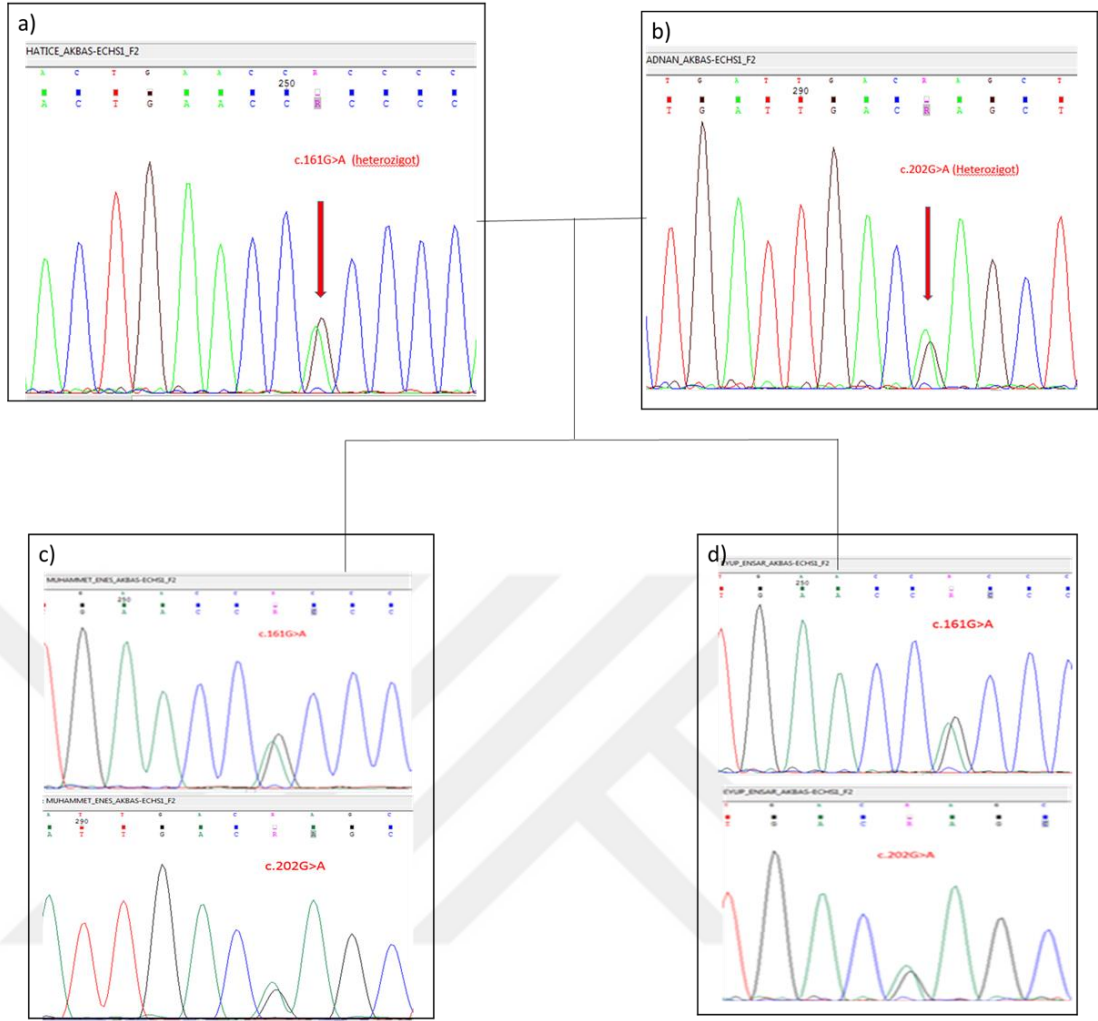
Moleküler Bulgular

İndeks olgu ve etkilenmiş kardeşine ikili yapılan TED analizinde, *ECHS1* geninde (enoyl-CoA hidratase, short chain 1, 10q26.3 NM_004092, NP_004083) exon 2’te heterozigot c.202G>A; p.Glu68Lys ve heterozigot c.161G>A (p.Arg54His) değişimi saptandı. Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, c.161G>A değişimi için anne ve c.202G>A değişimi için babanın heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi (Şekil 4-27) *ECHS1* geninde gösterilen bu değişimlerden c.161G>A daha önce “Mitochondrial short-chain enoyl-CoA hidratase 1 deficiency “ ile ilişkilendirilmiştir (334). Diğer değişim c.202G>A (rs1276839756) ise toplumlarda çok nadir olarak ve heterozigot formda gösterilen bir varyanttır (TOPMed*; 62.500 bireyde 1 heterozigot %0,0008). İn siliko analiz programları (Varsome, PolyPhen, PROVEAN, SIFT) patojenik tahmini vermektedir ve bilinen bir hastalık ilişkisi yayınlanmamıştır. Şekil 4-28’de *ECHS1*’nin HGMD’de (280) tariflenen transkript varyantının Ensembl görüntüsü (277). Şekil 4-29 ve Şekil 4-30’da de ise proteinin (short-chain enoyl-CoA hidratase) normal ve mutant 3 boyutlu görüntüleri görülmektedir (278,279).

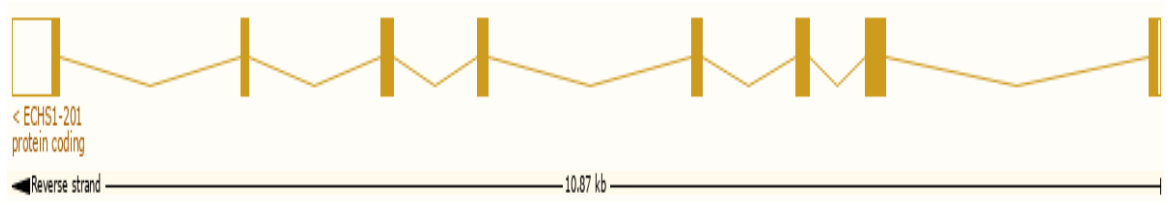


Şekil 4-27: Aile-5 moleküler analiz sonuçları.

ECHS1'de exon 2'te heterozigot heterozigot c.161G>A (p.Arg54His) (a) ve heterozigot c.202G>A; p.Glu68Lys değişiminin IGV görüntüleri.

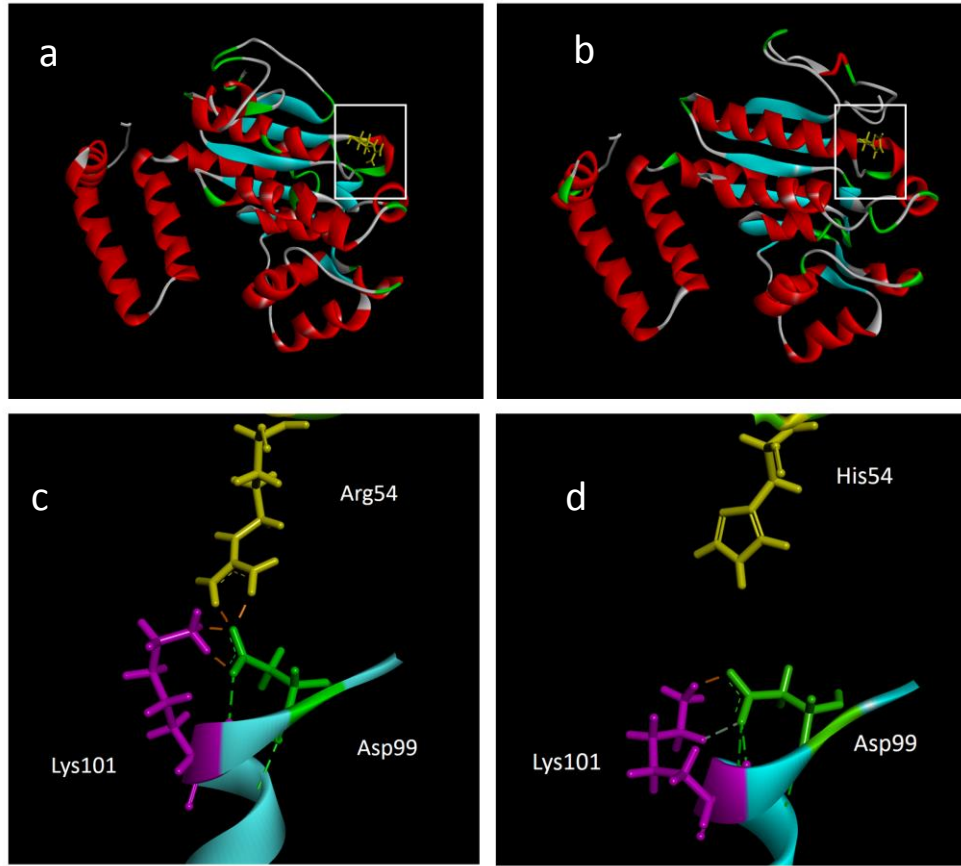


Şekil 4-27: Aile-5 moleküler analiz sonuçları devamı. Indeks olgu III-1 (c) ve III-2'de (d) Sanger dizileme ile bileşik heterozigot formda saptanan varyantların (*ECHS1*: c.161G>A ve c.202G>A) elektroferogram görüntüsü. Aynı değişimler için anne (c.161G>A) (a) ve baba (b) (c.202G>A) heterozigot taşıyıcı görülmektedir.



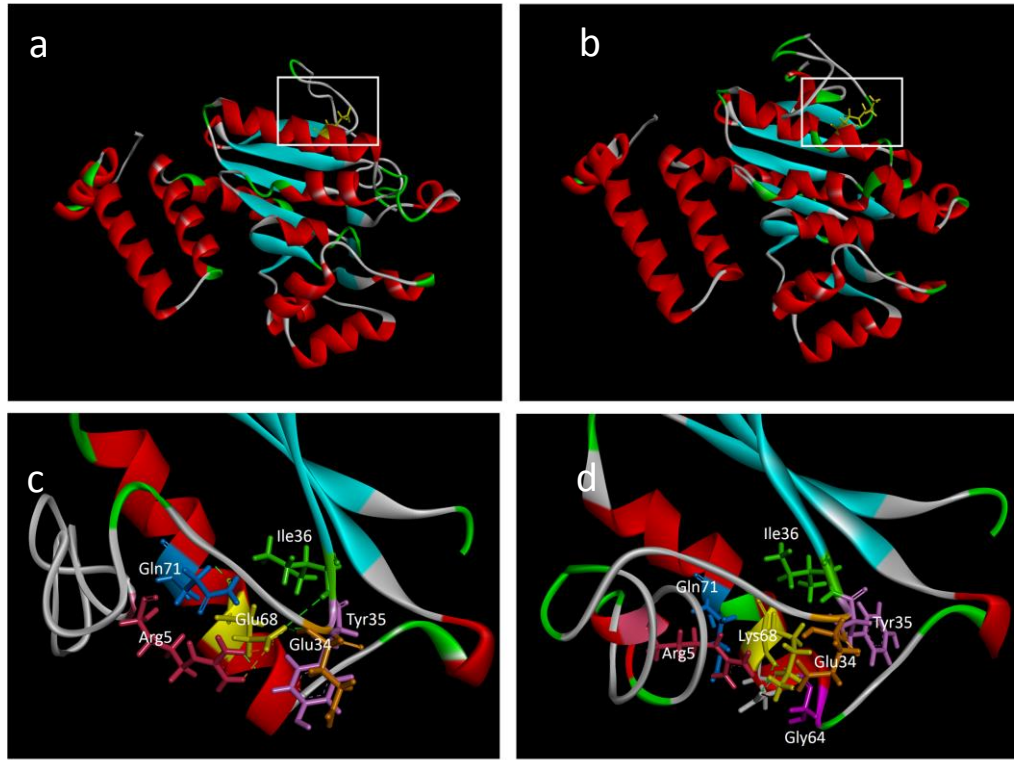
Şekil 4-28: *ECHS1* transkriptinde ekzon ve intronlar

ECHS1 geni enoyl-CoA hidratase, short chain 1) (MIM* 602292) 10q26.3 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 8 ekzonlu bir gendir. 1,277 bç. uzunluğunda ve 290 aa'lık bir polipeptidi kodlar. Bu enzim, mitokondriyal yağ asidi beta oksidasyonundaki ikinci adımı katalize eder, ayrıca izolösin ve valinin katabolik yollarında da aktiftir (277).



Şekil 4-29: Arg58His değişiminin ECHS1 proteini üzerindeki tahmini etkisi.

Normal (a) ve mutant (b) proteinin 3 boyutlu peptit yapısının pymol görüntüsü. Normal proteinde, bazik özellikteki Arg58 ve bazik özellikli Lys101, asidik özellikli Asp99 ile etkileşim halindeyken (c), mutant proteindeki His54, bazik olmasına rağmen küçük boyutu nedeniyle Asp99 üzerindeki etkisini kaybetmekte, Asp99 üzerindeki Lys101 etkisi baskın hale gelmektedir (d). (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*) (278,279).



Şekil 4-30: Glu68Lys değişiminin ECHS1 proteini üzerindeki tahmini etkisi.

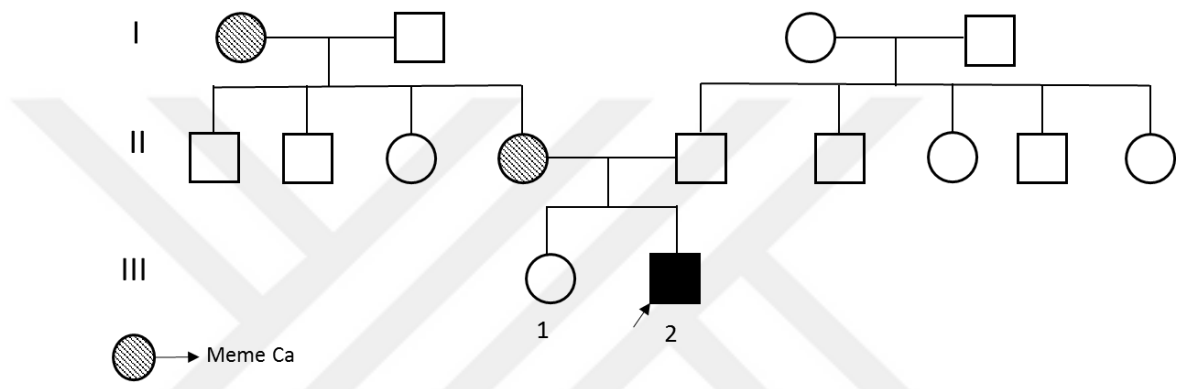
Normal (a) ve mutant (b) proteinin 3 boyutlu peptit yapısının pymol görüntüsü. Normal proteinde, asidik özellikteki Glu68, bazik özellikli Arg5 ile etkileşirken (c), mutant proteindeki Glu68 yerine geçen bazik Lys68, bazik Arg5 ile bağlantısını koparıp asidik Glu34 ile etkileşime geçmektedir (d). (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*) (278,279).

4.1.6. Aile-6 & Olgu III-2

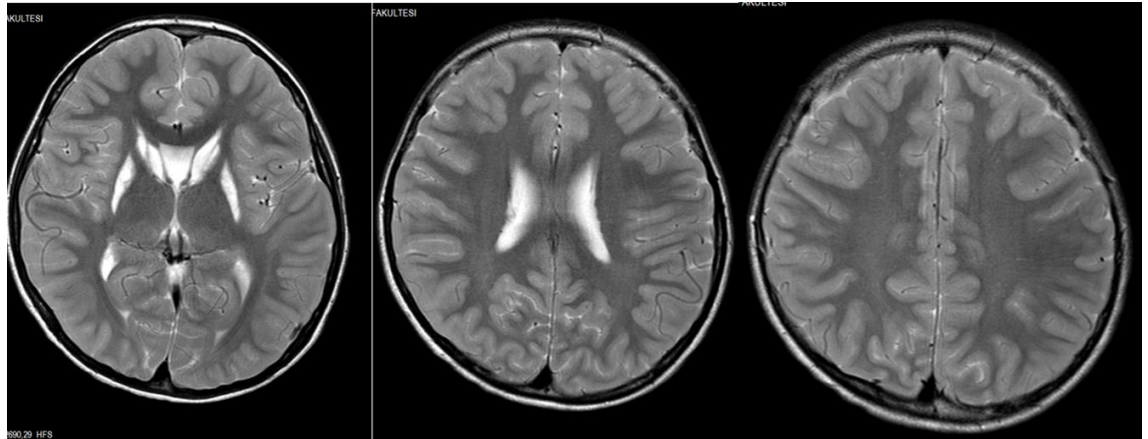
Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık olmayan çiftin ikinci gebeliğinden olan 16 yaşında erkek olgu yürüyememe, konuşamama, distonik kasılmalar, skolyoz ve ellerde kontraktür şikayetleri ile Tıbbi Genetik kliniğinde değerlendirildi (G2P2A0) (Şekil 4-31). Prenatal takipleri normal ve miadında C/S ile 3600 gr 51 cm doğan olgunun postnatal sorunu olmamış. İki yaşa kadar anne sütü alan olgunun, baş tutma 1. ay, desteksiz oturma 6. ay, yürüme 16. ay ve konuşması 13. ayda başlamış. Üç buçuk yaşına kadar mental ve motor gelişimi tamamen normal tarif edilen olgunun bu yaşta sık sık düşme ve konuşma bozukluğu başlamış. Kazanılan becerilerin kaybı nedeniyle nörolojik açıdan tetkik edilen olgunun 4 yaş kranial MR ve MR spektroskopisi (MRS) incelemesinde simetrik olarak her iki putamende T1 posterior da hipointens, anterior da hiperintens, FLAIR ve T2 görüntülerde hiperintens sinyal ile karakterize lezyonlar izlenmiştir (Şekil 4-32). Bu bölgede MR spektroda, kolin, kreatinin pikleri normal ancak laktat piki bifazik artmıştır (dış merkez). İlk planda mitokondrial hastalık ve putamen tutulumu nedeniyle Leigh sendromunun hafif varyantları (o yaşta klinik bulgular hafif olduğundan), ve ayırıcı tanıda Kearns-Sayre varyantları ile organik asidemiler düşünülmüştür (Dış merkez, 2008). Biyokimyasal testlerde, laktat/pirüvat oranı $15,47/1,30 \text{ mg/dl} = 11,8$ (>20 mitokondrial hastalık) olan hastanın plazma aminoasit analizinde spesifik bulgu saptanamamıştır. Göz muayenesinde görmenin 0,7 düzeyinde olması dışında patolojik bulgu saptanamamış ve işitme testi normal değerlendirilmiş. EEG’de, uyanıklıkta normal, uykuda santral frontal temporal bölgede nadir keskin diken dalga aktivitesi gözlenmiş. Kardiyolojik muayenesinde, EKO’da hafif mitral yetmezlik dışında bulgu saptanamamış. Kas biopsi histopatolojik incelemesinde mitokondrial hastalık lehine bulgu saptanamamış (İTF,2009). Hastanın 8 yaşındaki EMG’de miyogen tutulum tespit edilmiş ve MR/MR spektroskopisinde de yine putamen lezyonları ve Leigh sendromu lehine laktat piki gözlenmiştir (İTF,2013). Beslenme ve Metabolizma polikliniğinde ilk kez 2016 yılında dengesiz yürüme, dizatrik konuşma, hafif yutma güçlüğü, hafif skolyoz, ekstremitelerde tonus artışı ve spastisite bulguları ile değerlendirilen olgunun mtDNA dizi analizinde klinikle ilişkili bir değişim saptanamamıştır (Gazi Tıp, 2016). Olgunun Tıbbi Genetik polikliniğinde yapılan

16 yaş muayenesinde, bağımsız yürüyemiyordu (tekerlekli sandalyede) ve tüm ekstremiteler hipertontikti. Distonik kasılmaları artmış olan olgunun ellerinde kontrkatürler gelişmiş ve skolyozu artmıştı. Fizik tedavi ile özel eğitim alan olgunun ders başarısının iyi olduğu öğrenildi ve göz teması kuruyordu. Solunum, kalp ve sindirim sistemi muayeneleri doğaldı. Mevcut klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları ile mitokondrial hastalıklar açısından TED analizi yapıldı.



Şekil 4-31: Aile 6 pedigrisi. Etkilenmiş olgu (III-2) ve sağlıklı ablası (III-1)

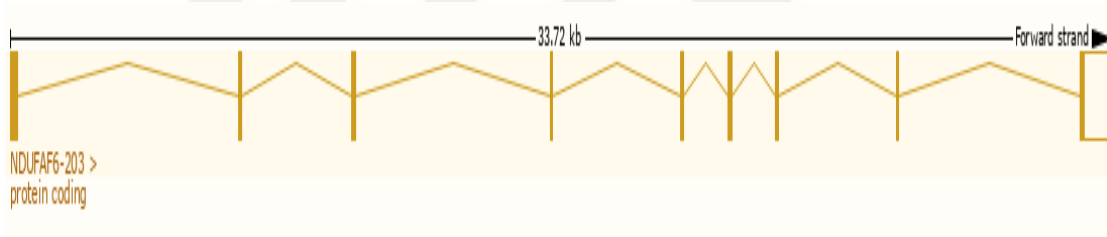


Şekil 4-32: Olgunun kranial MR görüntüsü.

Bilateral putamen ve kaudat nükleuslarda volüm kaybı ve simetrik patolojik sinyal değişiklikleri görülmektedir (İTF Radyoloji)

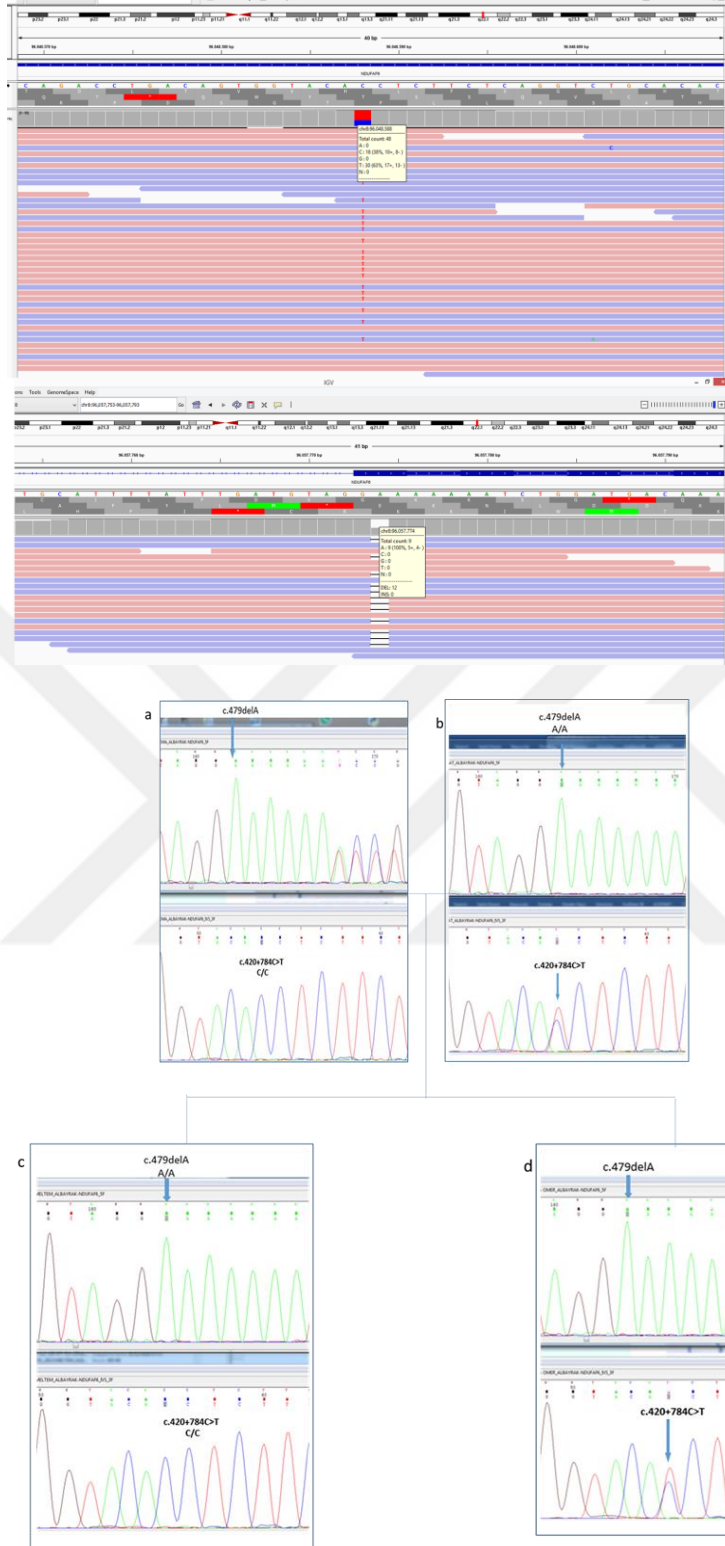
Moleküler Bulgular

İndeks olguya yapılan TED analizinde, *NDUFAF6* geninde (Şekil 4-33). (NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Complex I, Assembly Factor 6, 8q22.1 NM_152416.4, NP_689629.2) exon 5'te heterozigot c.479delA (p.(N162Ifs*27)) ve intron 3'te heterozigot c.420+784C>T (rs749738738) değişimi saptandı. Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı ve segregasyon için ebeveyn çalışması yapıldı (Şekil 4-34). *NDUFAF6* geninde gösterilen bu değişimlerden c.420+784C>T daha önce "Mitochondrial complex I deficiency, nuclear type 17" ile ilişkilendirilmiştir (370). Diğer değişim c.479delA ise toplumlarda çok nadir olarak ve heterozigot formda gösterilen bir varyanttır (rs774800472). İn siliko analiz programları patojenik tahmini vermektedir ve şimdiye kadar bir hastalık ilişkisi bildirilmemiştir.



Şekil 4-33: *NDUFAF6* transkriptinde ekzon ve intronlar

NDUFAF6 (NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 6) (MIM* 612392) 8q22.1 bölgesinde yerleşik, düz zincirden transkribe olan, 9 ekzonlu bir gendir. 1,795 bç. uzunluğunda ve 333 aa'lık bir polipeptidi kodlar. Bu protein, mitokondriyal solunum kompleksi I'in erken montaj aşamalarında önemli rol oynayan protein ökaryotlarda yüksek oranda korunur (277).



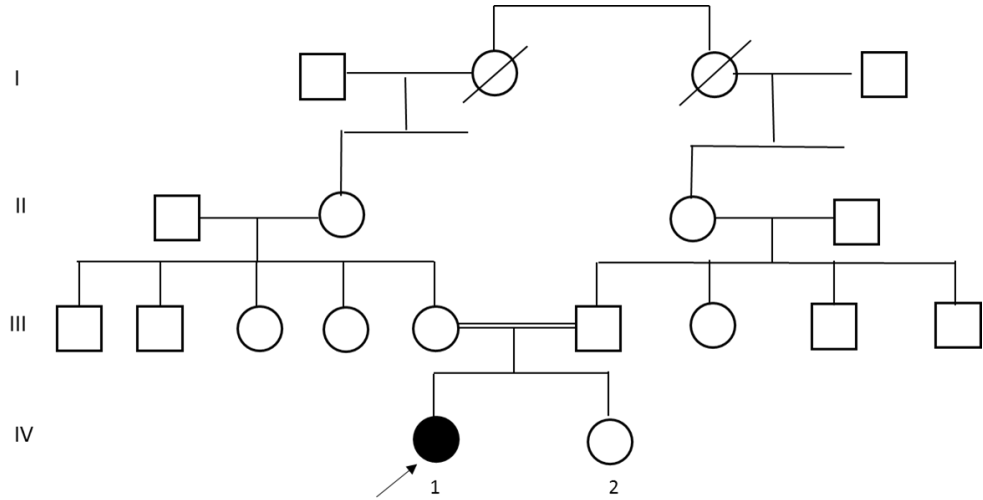
Şekil 4-34: Aile-6 moleküler analiz sonuçları.

İndeks olgu III-2'nin TED analizinde exon 5'te heterozigot c.479delA ve intron 3'te heterozigot c.420+784C>T değişimlerinin IGV görüntüleri. Sanger dizileme annenin c.479delA için heterozigot (a), babanın c.420+784C>T için heterozigot (a) ablanın homozigot normal (c) ve indeks olgunun birleşik heterozigot formda elektroferogram görüntüleri.

4.1.7. Aile-7 & Olgu IV-1

Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında ikinci derece kuzen evliliği olan çiftin ilk gebeliğinden olan 8 yaşında kız olgu nöromotor gelişim geriliği, konuşamama, kas güçsüzlüğü nedeniyle genetik araştırma için tarafımıza yönlendirildi (G2P2A0) (Şekil 4-35). Prenatal takiplerinde 29. haftadan itibaren 2 hafta geriden gelişim gösteren olgu miadında C/S ile, 2700 gr 48 cm doğmuş. Postnatal sorunu olmayan olgunun zaman zaman beslenme zorluğu olmuş ve sekiz ay anne sütü almış. Üç aylıkken kasık fıtığı nedeniyle opere edilen, kontrolleri sırasında hipotoni ve motor gelişimde gerilik olduğu farkedilmiş. Baş tutma 5 ay, desteksiz oturma 1 yaş, sıralama 2,5 yaş ve yürüme 3 yaşta olmuş. On beş aylıkken inatçı kusmaları, sebat eden AST, ALT yüksekliği ve metabolik atakları nedeniyle, il dışından İTF Çocuk Beslenme ve Metabolizma BD'a yönlendirilmiş. Nöromotor gelişim geriliği saptanan olgunun, yapılan tetkiklerinde metabolik asidoz, yüksek laktat ve kas biopsisinden yapılan enzimatik analizde kompleks 4 eksikliği saptanmış. Kranial MR'da ak madde, derin gri çekirdekler ve beyin sapı yapılarını içine alan ensefalopati lehine bulgular görülmüş. Kardiyolojik muayenesinde, kardiyomiyopati saptanan olgu halen takip altında ve kapril tedavisi alıyor (İTF Çocuk Kardiyoloji). Konuşmaya ancak terapi ile 5 yaşında başlamış ve kısa cümle kurması 7 yaşı bulmuş. Halen özel eğitimi devam eden olgunun Denver gelişim testi sonuçlarının %50 geri olduğu ifade edildi. Yedi yaş on aylıkken Tıbbi Genetik polikliniğinde değerlendirilen olgunun, boy 113 cm (<3p) kilo 19 kg (3p) idi. Kas gücü tüm ekstremitelerde azalmıştı (3/5). Konuşmayan, ancak birkaç kelime söyleyebilen olgunun bakışları donuk ve göz teması sınırlıydı. Kalın, dağınık kaşlar, kısa palpebral fissürler, basık burun kökü ve düz filtrumu olan olguya sağlıklı kardeşi ile birlikte ikili TED analizi yapıldı.

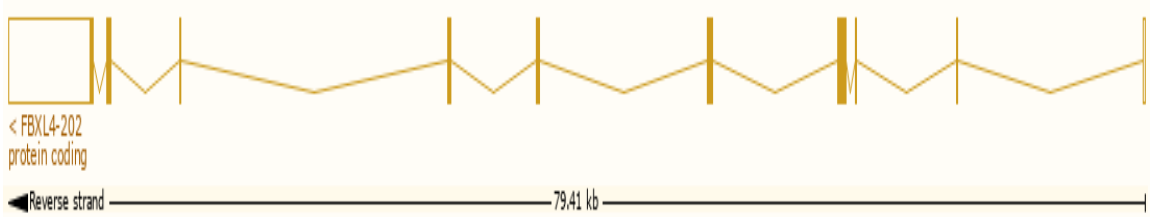


Şekil 4-35: Aile 7 pedigrisi.

İkinci kuzen evliliği ürünü olan etkilenmiş olgu (IV-1) ve sağlıklı kardeşi (IV-2).

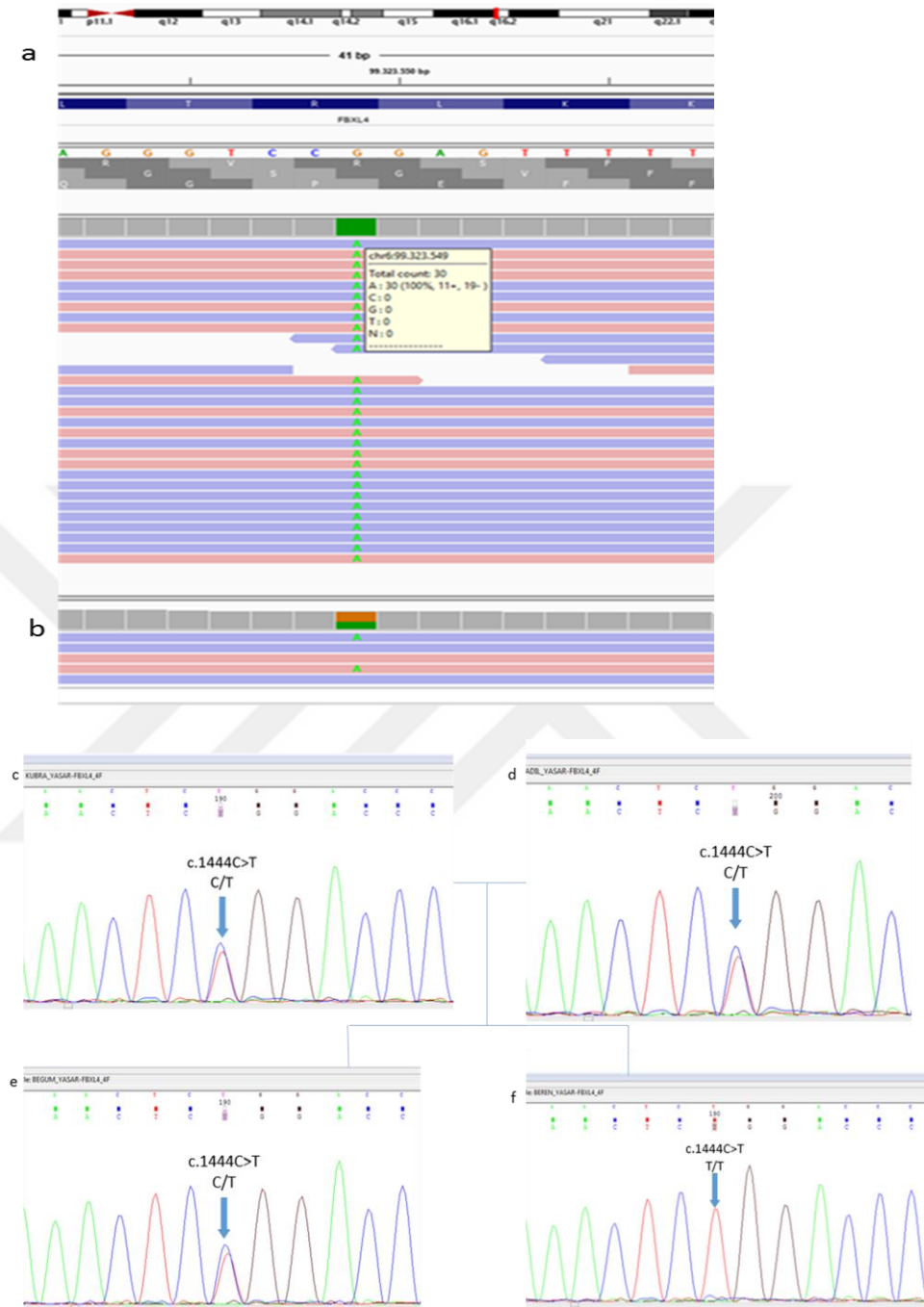
Moleküler Bulgular

İndeks olguya sağlıklı kardeşiyle birlikte yapılan ikili TED analizinde, *FBXL4* geninde (Şekil 4-36) (F-Box and Leucine-Rich Repeat Protein 4, 6q16.1 NM_001278716.1, NP_001265645.1) exon 8'de homozigot c.1444C>T (p.Arg 482Trp) değişimi saptandı (Şekil 4-37). Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı ve segregasyon için ebeveynlerden kan alındı. *FBXL4* geninde gösterilen bu değişim daha önce "Mitochondrial DNA depletion syndrome 13, encephalomyopathic type" ile ilişkilendirilmiştir (374) (rs398123061).



Şekil 4-36: *FBXL4* transkriptinde ekzon ve intronlar

FBXL4 (F-Box and Leucine-Rich Repeat Protein 4) (MIM*605654) 6q16.1 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 7 ekzonu kodlanan 10 ekzonlu bir gendir. 8058 bç. uzunluğunda ve 621 aa'lık bir polipeptidi kodlar. (277).



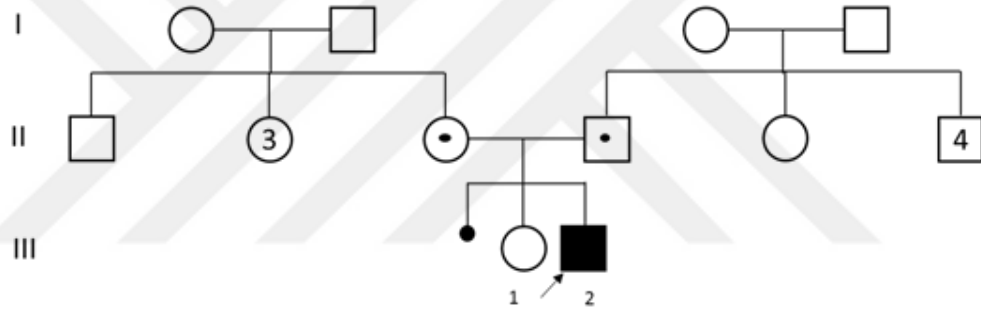
Şekil 4-37: Aile-7 moleküler sonuçları. İndeks olgu IV-1’de homozigot (a) ve sağlıklı kardeşi IV-2’de heterozigot (b) c.1444C>T değişiminin IGV görüntüleri (a). Sanger dizileme ile aynı değişimin anne (c), baba (d) ve sağlıklı kardeşte (e) heterozigot ve indeks olguda (f) homozigot formda bulunan elektroferogram görüntüleri.

4.1.8. Aile-8 & Olgu III-2

Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık olmayan çiftin (aynı köy) üçüncü gebelik ürünü olan 1,5 yaşında erkek olgu, solunum yolu enfeksiyonu ve gastroenterit sonrasında gelişen ağır ve dirençli metabolik asidoz nedeniyle YB ünitesinde tedavi altına alındı ve akut tedaviden sonra çocuk metabolizma servisinde yatarak genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik AD'na konsülte edildi. Ailenin ilk gebeliği 16. GH'da intrauterin mort fetal ile sonuçlanmış. İkinci gebelikten doğan 5 yaşında sağlıklı kız çocukları var, üçüncü gebelikten olan olgumuzun prenatal takipleri normal tarif edildi (G3P2A1) (Şekil 4-38). Postnatal ağlamayan olgu sekiz gün YB ünitesinde takip edilmiş. Onbirinci aya kadar psikomotor gelişimi normal tarif edilen olgunun 11. ayda solunum yolu enfeksiyonu sonrası gelişen metabolik atak nedeniyle beş gün YB ünitesinde tedavisi yapılmıştır. Metabolik asidoz, laktat yüksekliği (8 mg/dl), anyon açığı 20, idrar ketonu +3, kan ketonu +2 ölçülen olgunun sıvı tedavisine rağmen asidozunun dirençli seyretmesi ve ketozisin persiste olması nedeniyle ön tanıda organik asidemiler ve ketoliz bozuklukları düşünülmüş. Bu sırada yapılan metabolik tetkiklerinde idrar-kan aminoasidi nonspesifik, tandem MS normal ve idrar OA ketozis ile uyumlu bulunmuş, metabolik durumu düzelen olgu idrar keton takibi önerilerek taburcu edilmiş. Bir ay sonra akut gastroenterite sekonder hipovolemik şok ve metabolik asidoz nedeniyle tekrar YB ünitesine alınan olgunun genel durumu daha kötüymüş ve hipoksik atakları nedeniyle nöbetleri olmuş. Nörolojiye danışılan hastanın nörometabolik hastalık açısından tetkik edilmesi istenmiş. Metabolik asidi düzelen ancak solunum sıkıntısı devam eden olgu bu defa respiratuvar asidoz nedeniyle entübe edilmiş. Kontrastlı kraniyal MR'da serebellar atrofi gözlenen hastanın epileptik nöbetleri devam etmiş. Çocuk nöroloji takibinde ağır bronkokonstrüksiyon bulguları olup servikal GBS (Gullian-Bare Sendromu varyantı) beyin sapı tutulumu ön tanısıyla izlenmeye başlanmış. Göğüs hastalıkları tarafından kistik fibrozis genetik taraması istenmiş. EEG'sinde yaygın ensefalopati ve şüpheli epileptik odağın varlığı gözlenmiş. Tüm batin USG incelemesi normal ve servikal GBS açısından çekilen servikal vertebra MR normal sonuçlanmış. Beyin MR'da kortikal iskemik lezyonlar saptanan olguda ayırıcı tanıda tekrar organik asidemiler ve özellikle MMA (metilmalonik asidemi)

düşünülmüş. Mitokondriyal hastalık açısından yapılan kas biyopsisinde kompleks enzim aktivitelerinden kompleks 4 düşük bulunmuş, ancak histopatolojik incelemede miyopati bulgusu saptanmamış. Distal aksonal nöropati, tek taraflı diyafragma paralizi olan ve GBS ön tanısıyla IVIG verilen hasta, kepra tedavisi esnasında arrest olmuş ve resüstasyon ile döndürülmüş. Ailenin isteği ile İTF YB ünitesine nakledilen olguya trakeostomi açılmış ve atipik GBS tanısı ile izlenmiş. İVİG alımı ile genel durum düzelince trakeostomi ile taburcu edilmiştir. Sonrasında hastanın tekrar bir metabolik asidoz atağı ile YB yatışı olmuş ve kalıtsal metabolik hastalık ön tanısıyla çocuk metabolizma servisinde izlenmiştir. Yan olguda, moleküler inceleme amacıyla sağlıklı kardeşi ile birlikte TED analizi yapılmıştır.



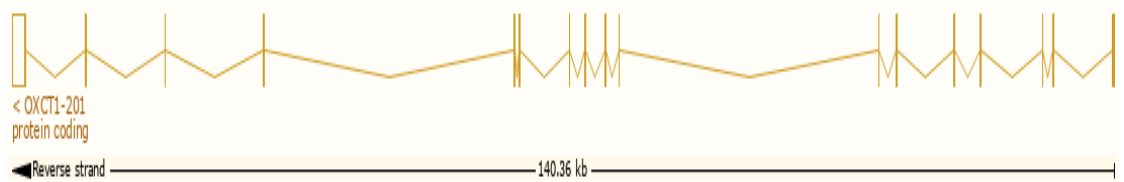
Şekil 4-38: Aile 8 pedigrisi.

Akraba olmayan ancak aynı köyden olan ebeveynler ve indeks olgu (III-2).

Moleküler Bulgular

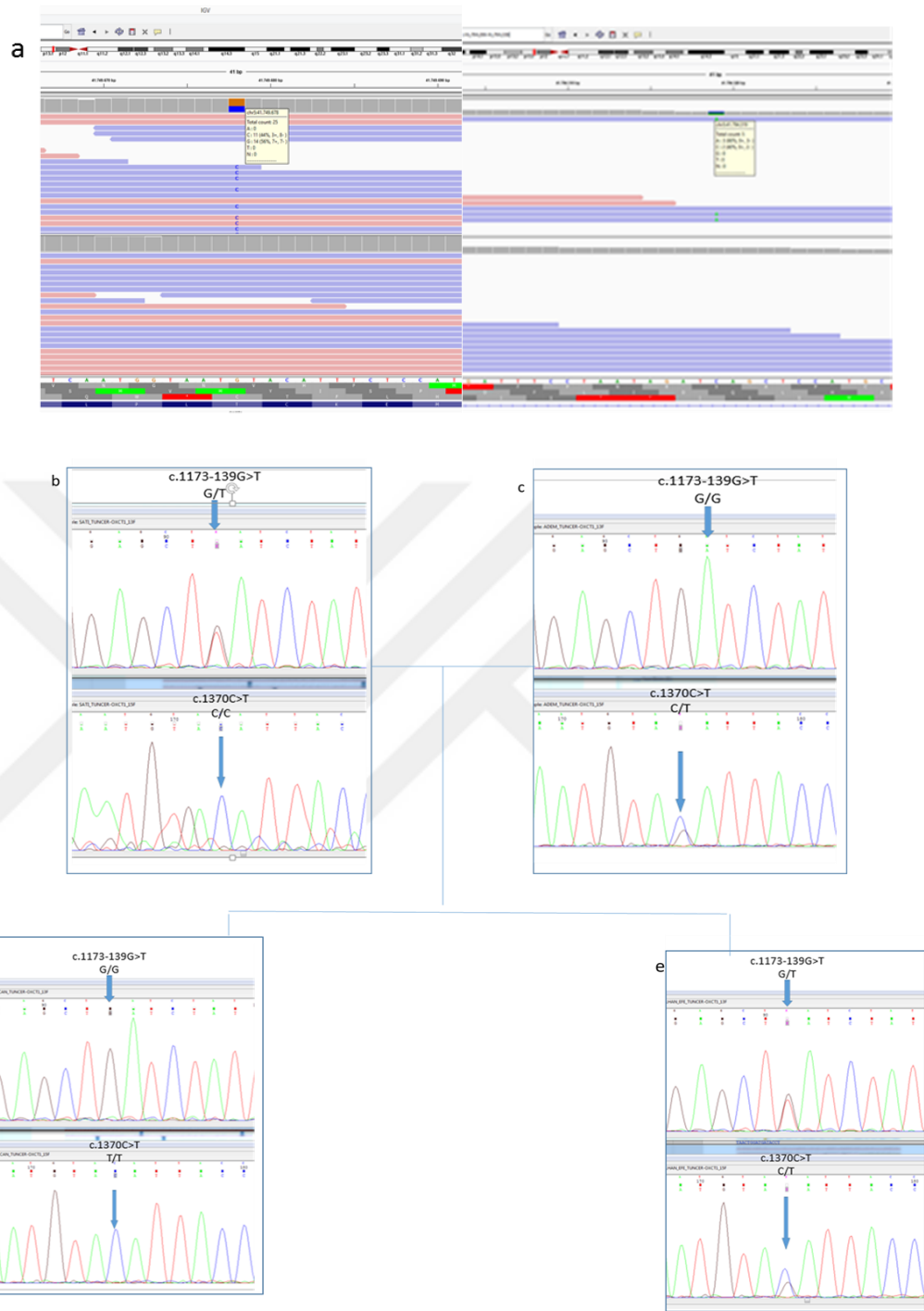
İndeks olguya sağlıklı kardeşiyle birlikte yapılan ikili TED analizinde, *OXCT1* geni (Şekil 4-39) (3-Oxoacid CoA Transferase 1, 5p13.1, NM_000436.3: NP_000427.1) exon 15'de heterozigot c.1370C>T; p.Thr457Ile değişimi (rs369643387) ve intron 12'de heterozigot c.1173-139G>T değişimi saptandı (rs145673650) (Şekil 4-40). Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı ve segregasyon için ebeveynlerden kan alındı ve varyantların birleşik heterozigot formunda olduğu gösterildi. *OXCT1* genindeki patojenik varyantlar, süksinil CoA: 3-oxoacid CoA transferaz (SCOT) eksikliği ile ilişkilidir (MIM# 245050). Her iki değişim veritabanlarında çok nadir rastlanan ve önemi

bilinmeyen varyant (VUS) olarak sınıflandırılmıştır. İn siliko programlar patojenik tahmini vermektedir. Hastanın öyküsü, klinik ve laboratuvar bulguları ketoliz defekti ile uyumluydu ve fibroblastta Süksinil-CoA: 3-oksoasit CoA transferaz (SCOT) enzim aktivitesi analizi planlandı.



Şekil 4-39: *OXCT1* transkriptinde ekzon ve intronlar

OXCT1 (3-Oxoacid CoA Transferase 1) (MIM* 601424) 5p13.1 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 17 ekzonlu bir gendir. 3294 bç. uzunluğunda ve 520 aa'lık bir polipeptidi kodlar (277). Keton cismi kullanımının ilk adımında görevli süksinil-CoA: 3-oksoasit-CoA transferaz (SCOT veya *OXCT1*), homodimer olarak işlev gören bir mitokondriyal matris enzimidir. CoA'nın süksinil-CoA'dan asetoasetata geri dönüşümlü transferini katalize eder.

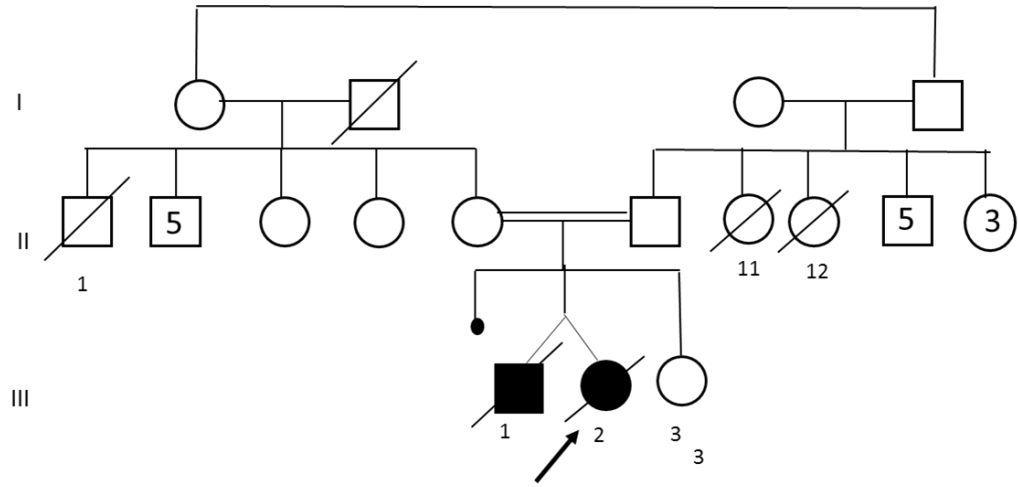


Şekil 4-40: Aile 8 moleküler analiz sonuçları. İndeks olguda exon 15'de heterozigot c.1370C>T değişimi ve intron 12'de heterozigot c.1173-139G>T değişiminin bileşik heterozigot, ve sağlıklı ablasında homozigot normal IGV görüntüsü (a) Sanger dizileme annenin c.1173-139G>T için heterozigot (b), babanın c.1370C>T için heterozigot (c) ablanın homozigot normal (d) ve indeks olgunun birleşik heterozigot formda (e) elektroferogram görüntüleri.

4.1.9. Aile-9 & Olgu III-2

Aralarında birinci derece kuzen evliliği olan 21 yaşında sağlıklı anne ile 25 yaşında sağlıklı babanın ikinci ve ikiz gebelik ürünü olan 39 günlük kız olgu, kaba yüz görünümü, karın şişliği, solunum güçlüğü, hemanjiyom varlığı nedeniyle genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik kliniğine konsülte edildi. İlk gebelik abortus ve ikincisi spontan ikiz gebelik olan, prenatal takiplerinde özellik saptanmayan gebelikte, SAT'a göre 36, USG'ye göre 33+2 GH'da fetal distress nedeniyle C/S ile doğum olmuş. Her iki bebek de solunum sıkıntısı nedeniyle yenidoğan YB ünitesinde izlenirken, erkek bebek 5. günde barsak obstrüksiyonu, enfeksiyon nedeniyle (nekrotizan enterokolit?) kaybedilmiş. Kilo 2820 gr, boy 48 cm ve baş çevresi 36 cm olan olgumuzun batın USG ve kranial USG'si normalmiş. Üfürüm nedeniyle yapılan EKO'da küçük müsküler ventriküler septal defekt (VSD), sekundum ASD, solda periferik pulmoner stenoz (PS) saptanmış ve 3 ay sonra kontrol önerisiyle 10. gün taburcu edilmiş. Taburculuktan 1 hafta sonra, karında şişme şikayeti ile başvuran hastaya acil müdahale gerekmemiş ve dört gün sonra yeniden başvurusunda ayakta direk batın grafisinde barsak ansları dilate, batın USG'de serbest mayi izlenmiş ancak operasyon planlanmamış. Sepsis bulguları gelişen olgu, özel bir hastanenin yenidoğan YB ünitesinde tedavi altına alınmış. Kraniyal MR'da retroserebellar alanda BOS mesafesi artmış (araknoid kist?, megasisterna magna?), sağ vertebral arter ince saptanmış. Boyun bölgesindeki şişlik nedeniyle çekilen boyun USG'de sağ parotis submandibuler bölge sağ servikal zincir düzeyinde cilt ve cilt altı dokuda ödem-enflamasyon saptanmış. Tüm batın USG'de perihepatik ve perisplenik alanda barsak ansları arasında serbest sıvı izlenmiş. Anne isteği ile İTF Çocuk bölümüne başvuran olgu, çocuk endokrin, gastroenteroloji, hematoloji, göz ve Tıbbi Genetik AD'a konsülte edilmiş. Sürrenal yetmezlik, hipotiroidi, abdominal USG'de periportal ödem ve hemanjiyom, AST ve ALT yüksekliği, hipokrom mikroster anemi, trombositopeni, boyunda hemanjiyom ve gözde bilateral katarakt saptanmış. Tıbbi Genetik polikliniğinde yapılan muayenesinde tartı 2730 gr. (-1,37 SD), boy 49 cm (-0,19 SD), bç 35 cm (0,36 SD) olup dismorfik bulguları vardı. Rölatif makrosefali, alında iki adet hemanjiyom, burun kökünde ve yanakta milia saptandı. Ön fontanel 4x4 cm açık, arka fontanel kapalıydı. Yüksek alın ve alında hipertrikoz

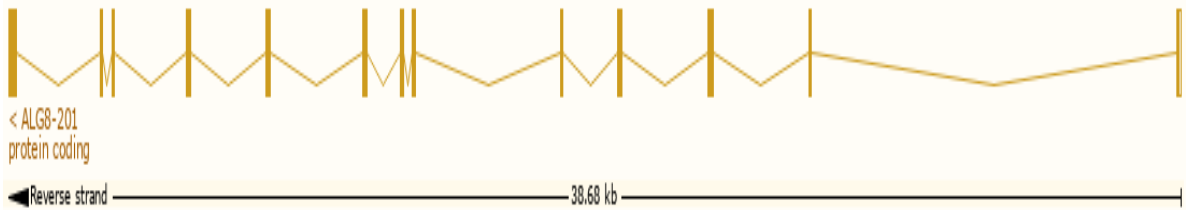
mevcuttu. Periorbital bölgede bitemporal basıklık ve periorbital ödem, çökük supraorbital kemerler gözlemlendi. Gözde bilateral lökom, antevort burun kanatları mevcuttu. Oral bölgede ankiloglosi, mikroretrognati ve dili dışarıda izlendi. Oral kavitede yüksek damak saptandı. Kulak üst kurüsü genişti. Boyun bölgesinde bol ense derisi ve düşük ense saç çizgisi görüldü. Karın muayenesinde batın distandü olup, organomegali saptanmadı. Deri ve lökomotor sistem muayenesinde sol arkus kosta altında 2x1 cm hemanjiyom, interskapular alanda solda iki parçalı hemanjiyom gözlemlendi. Uyluk bölgesinde cilt kırışıktı. Ayakta bilateral üçüncü parmak düşük yerleşimliyd. Haricen dişi olgunun sakral bölgede hipertrikozu, gluteal mongol lekeleri ve kliteromegalisi vardı. Nörolojik muayenesinde moro refleksi (+), palmar yakalama (+), DTR normoaktif ve klonusu vardı. Dinlemekle 2/6 sistolik üfürümü saptandı. Mevcut bulgularla karyotip analizi mikraarray ve Noonan sendromu açısından rasopati paneli planlanarak 3 ay sonra kontrol önerildi. Çocuk beslenme ve metabolizma konsültasyonunda birinci derece kuzen evliliği ve eks ikiz kardeş öyküsü, prematürite, bilateral katarakt, umbilikal herni, makroglosi, makrosefali, yetersiz tartı alımı, hafif kaba yüz, hemanjiyomlar, mongol lekesi, hipokortizolemi, hipotroidi, kardiyak bulgular, CK, AST yüksekliği, LDL düşüklüğü, transfüzyon gerektiren anemi bulguları ile değerlendirilen olgudan, metabolik tetkikler istenmiş. DMH selektif tarama, tandem MS ve KAA testlerinde özellik saptanmayan olgunun lizozomal enzim paneli normal sonuçlanmış, transferrin izoelektrik fokuslama analizinde anormal sialotransferrin paterni izlenmiştir. Karında şişlik, idrar miktarında azalma ve morarma ile birlikte olan kasılma şikayetleri ile İTF Çocuk gastroda yatarak tedavi altına alınan olgunun üst GIS endoskopik biyopsisinde fibrozis saptanmış. Asit ve portal hipertansiyon, ekzokrin pankreas yetmezliği olan hasta için, gastro ve metabolizma konseyinde konjenital glikolizasyon defektleri (CDG) açısından genetik araştırma planlanmıştır. Karyotip analizi ve YND ile rasopati panelinde herhangi bir pozitif bulgu saptanmayan olgu 7 aylık iken çoklu organ yetmezliğinden kaybedilmiştir. Ailenin CDG açısından moleküler genetik araştırması yapılmadan üçüncü gebelik gerçekleşmiştir (G3P3A1Y1) (Şekil 4-41). Prenatal takipleri normal, miadında C/S ile doğan ve postnatal sorunsuz olan kız olgu ile birlikte, 7 aylık kaybedilen kız olguya ikili TED analizi uygulanmıştır.



Şekil 4-41: Aile 8 pedigrisi. Annenin, erkek kardeşi olan II-1 numaralı olgu ve babanın kız kardeşleri olan II-11 ve II-12 numaralı olgular, postnatal 3-6 aylarda etiyolojisi bilinmeksizin kaybedilmiştir. İndeks olgu 7 aylık ve ikiz eşi postnatal 5. Gün kaybedilmiştir. Olgunun III-3 numaralı kız kardeşi, 5 aylık ve halen bilinen bir şikayeti olmayıp, takipleri normaldir.

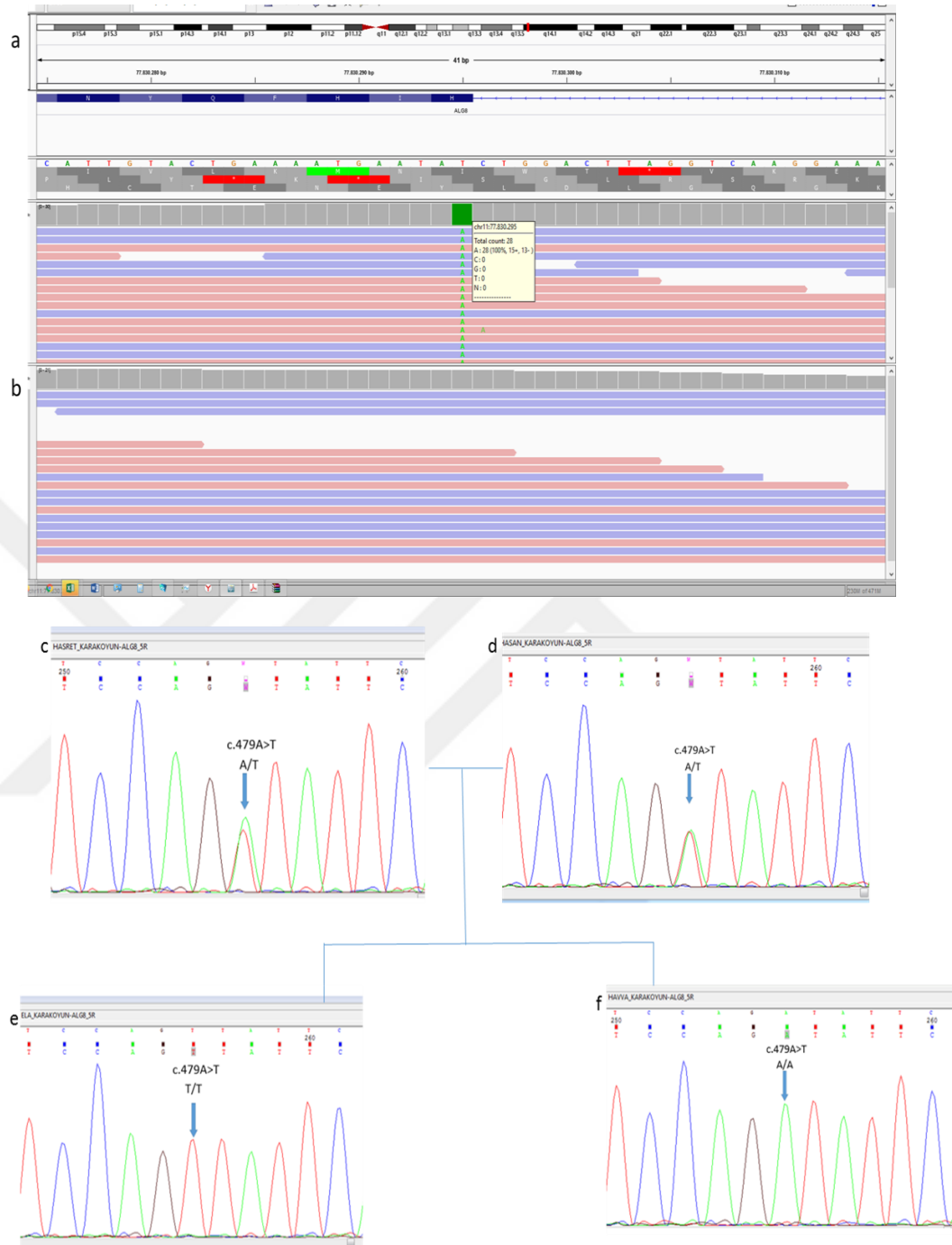
Moleküler Bulgular

İndeks olguya, sağlıklı değerlendirilen yenidoğan kardeşiyle birlikte yapılan ikili TED analizinde, *ALG8* geninde (Şekil 4-42) (Alpha-1,3-Glucosyltransferase, 11q14.1, NM_024079.5, NP_076984.2) exon 5’de homozigot c.479A>T (p.His160Leu) değişimi saptandı (Şekil 4-43). Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı ve anne babanın aynı değişimi heterozigot formda taşıdıkları gösterildi. “Congenital disorder of glycosylation, type 1h” (MIM# 608104) ile ilişkili *ALG8* geninde gösterilen bu varyant daha önce bildirilmemiş, ACMG kriterlerine ve diğer veri tabanlarına göre patojenik tahmini veren novel bir değişimdir.



Şekil 4-42: *ALG8* transkriptinde ekzon ve intronlar

ALG8 (Alpha-1,3-Glucosyltransferase) (MIM*608103) 11q14.1 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 13 ekzonlu bir gendir. 1,637 bç. uzunluğunda ve 526 aa’lık bir polipeptidi kodlar (277). Alfa-3-glukoziltransferaz *ALG8*, proteinlerin N-glikozilasyonunda kullanılan lipid bağlı oligosakarit öncüsüne ikinci glikozu ekler.



Şekil 4-43: Aile 8 moleküler analiz sonuçları.

İndeks olgu III-2 (a) ve sağlıklı kardeşi III-3'ün (b) IGV görüntülerinde, indeks olguda homozigot formda saptanan c.479A>T değişimini sağlıklı kardeşin taşımadığı görülüyor (b). Sanger dizilemede aynı değişimi, anne (c) ve babanın (d) heterozigot, indeks olgunun birleşik heterozigot (e) formda taşıdığını ve sağlıklı kardeşin (f) bu değişimin bulunmadığını işaret eden elektroferogram görüntüleri.

4.1.10. Aile-10 & Olgu IV-4

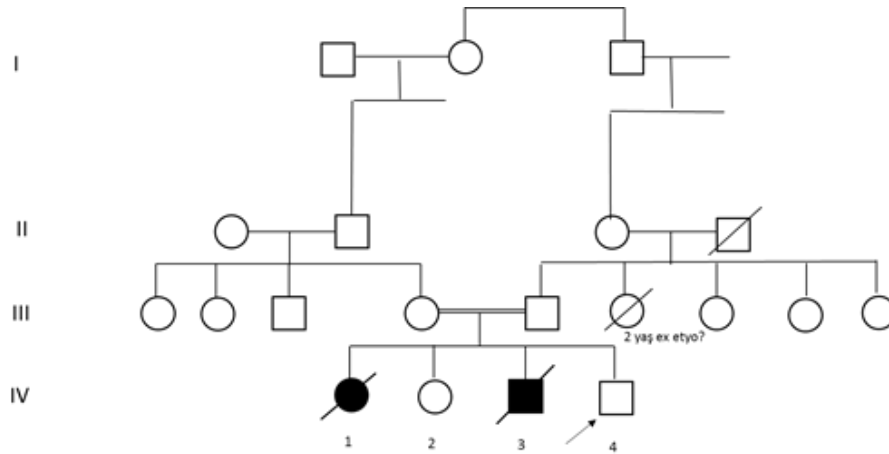
Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında 2.derece kuzen evliliği olan çiftin dördüncü gebeliğinden olan 3 aylık erkek olgu (G4P4A0Y2), ailede metabolik hastalıktan eks olan iki kardeş öyküsü olması, hafif hipotoni nedeniyle moleküler genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi (Şekil 4-44). Prenatal takipleri normal olan ve C/S ile 37 haftalık doğan olgunun postnatal öyküsünde, hipoglisemi nedeniyle kan şekeri takibi dışında özellik yoktu. İlk bir ay sadece anne sütü, sonrasında mama desteği ile beslenen olgunun büyüme gelişmesi, motor fonksiyonları normal değerlendirildi. Aile öyküsünde, ilk gebelikten olan kız olgunun prenatal takiplerinde üçlü tarama testi riski (AFP ve uE3 MOM değerleri yüksek) dışında özellik yoktu. Postnatal uzamış sarılık nedeniyle 3 gün fototerapi alan ve 35 günlükken kalça USG sırasında batında yaygın sıvı (asit) saptanan olgu, masif asit ve hepatosplenomegali, koagülopati, KC fonksiyon bozukluğu, tirozinemi tip 1 şüphesiyle 1 ay dış merkezde yatarak tetkik ve tedavi görmüş. Ardından, plörezi olmuş, konvülziyonları başlamış ve IÜTF çocuk YB ünitesine sevk edilmiş. Koagülopati, anemi, trombositopeni nedeniyle CDG analizleri yapılmış ancak özellik saptanmamış. Kranial MR'da, distrofik kalsifikasyonlar ve diffüz nekrotizan lökoensefalopati saptanmış. Kemik iliği aspirasyonunda blue histiosit görülmesi üzerine depo hastalıkları Nieman Pick Tip C düşünülmüş ancak KC biopsisi desteklememiş, biopside lobüler alanda mikroabseleşme ve santral nekroz alanları içeren hepatit bulguları saptanmış. Biyokimyasında LDH yüksek, laktik asit yüksek, Tandem MS 'de tirozin metabolitleri (KC fonk bzkluğuna sekonder ?) ve organik asit analizinde 4OH-Fenil pirüvik asit ve laktik asit saptanan hasta 2,5 aylık iken eks olmuş. Tıbbi Genetik AD'a konsülte edilen ve aile isteği ile otopsi yapılan olguda, ön planda mitokondrial hastalık ve Aicardi-Goutieres sendromu düşünülmüş. Karyotip analizi 46,XX olarak normal değerlendirilmiş.

İkinci gebelikten olan sağlıklı bir kız çocuk sonrası, ailenin üçüncü gebeliğinin prenatal takiplerinde, üçlü testte ilk gebeliktekine benzer bir risk saptanmış. Termde, C/S ile 2850 gr doğan olgunun metabolik tarama tetkikleri

normal değerlendirilmiş. İkinci gün sarılık nedeniyle fototerapi almış. Kırk günlükken batında gaz, ateşli enfeksiyon öyküsü olan olgu, üç aylıkken akut karaciğer yetmezliği tablosu ile İÜTF Çocuk Kliniğinde tetkik ve tedavi altına alınmış. Metabolik hastalık, primer hemofagositik sendrom için tetkikleri yapılan hastanın Beutler testi 120. dk'da floresans vermesi nedeniyle GALT geni analizi için Tıbbi Genetik AD'a konsülte edilmiş. Sanger dizi analizi ile Galaktozemi tanısı dışlanan hastanın, yurt dışında çalışılan kuru kan örneğinde lizozomal enzimlerden beta-glukosidaz, asit sfingomyelinaz ve beta-galaktozidaz aktiviteleri normal sonuçlanmış. Kaybedilen ilk olguya benzer pozitif bulgular ile (asit, hepatomegali, KC enzim yüksekliği, koagülopati (INR yüksekliği, anemi, trombositopeni, laktat yüksekliği) tedavi altında olan olgu da sekizinci ayda kaybedilmiş.

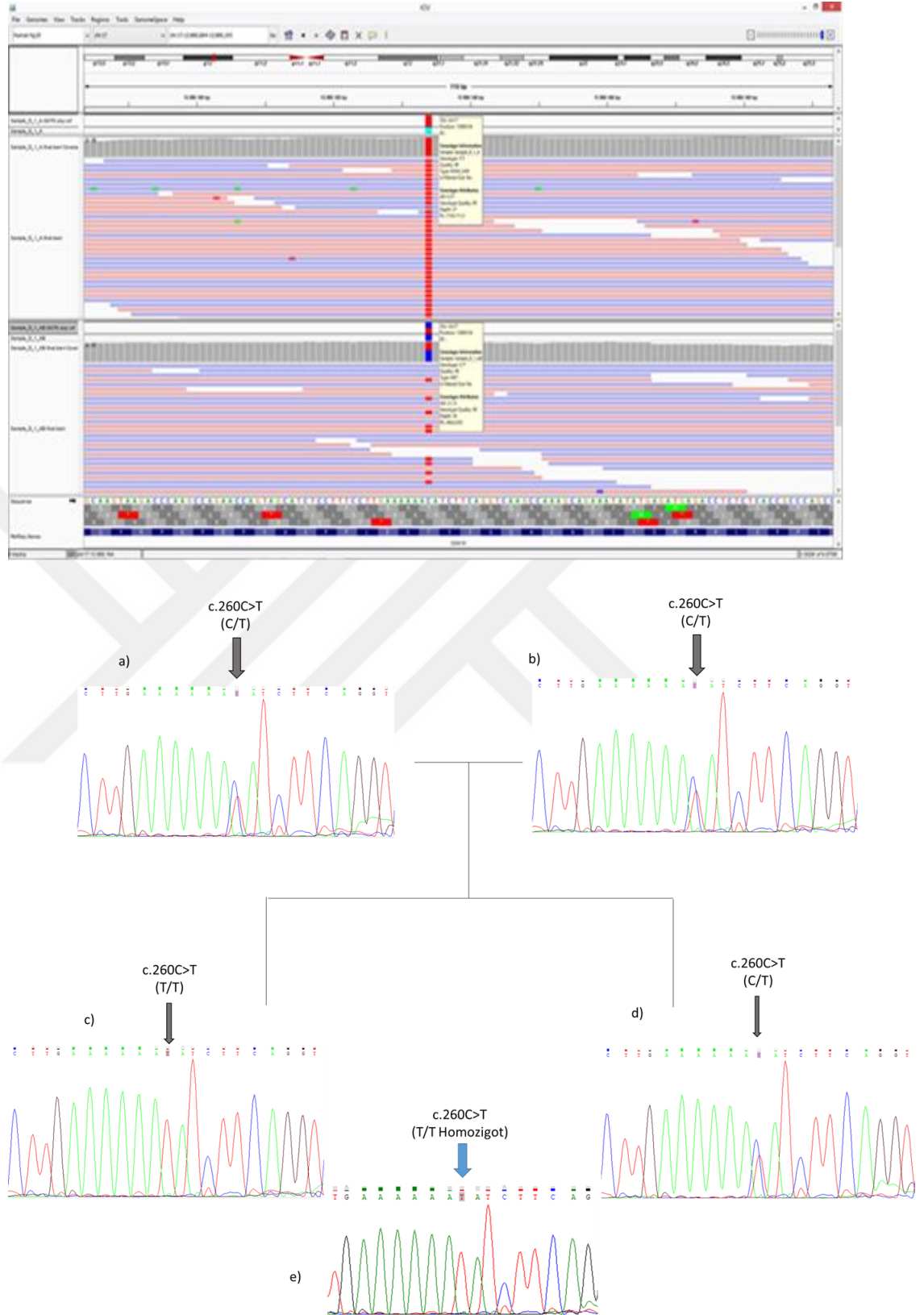
Dördüncü gebelikten olan 3 aylık erkek olgu Tıbbi Genetik polikliniğinde görüldü. Prenatal öyküsünde özellik olmayan ve 37.GH'da C/S ile doğan olgunun (3600 gr ve 49cm) büyüme gelişmesi normal değerlendirildi. Ailede iki benzer etkilenmiş ve eks olmuş kardeş öyküsü nedeniyle yönlendirilen olguya eks olan ikinci kardeşin DNA örneği ile birlikte paired TED analizi yapıldı.



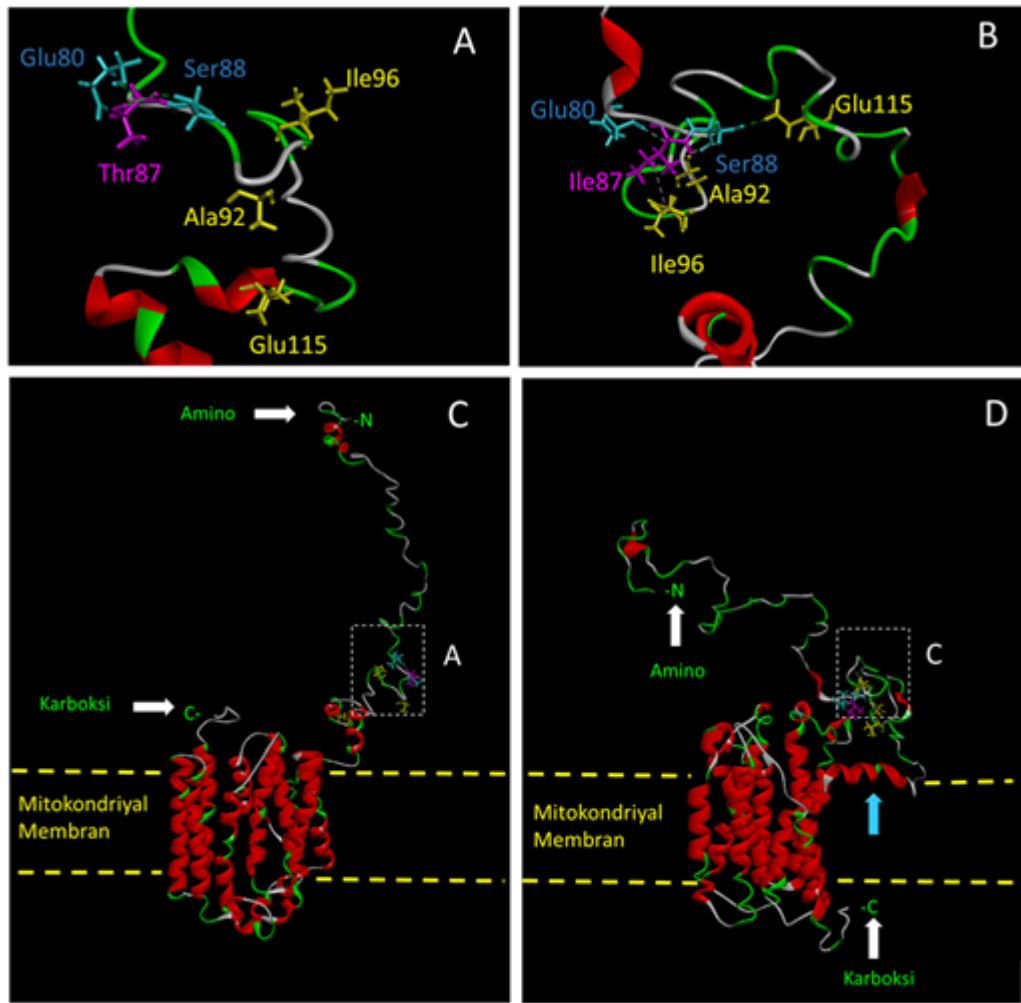
Şekil 4-44: Aile 10 pedigrisi.

Moleküler Bulgular

Genetik araştırma için başvuran olgu (IV-4) ve eks olan kardeşinde (IV-3) yapılan *paired* TED analizinde, *COX10* geninde (17p12-p11.2, Cytochrome c oxidase assembly factor heme A:farnesyltransferase *COX10*, NM_001303.4, NP_001294.2) exon 3'te indeks olguda homozigot c.260C>T (p.Thr87Ile) değişimi saptandı (rs144000161). Sağlıklı kardeşte bu değişim heterozigot formda gözlemlendi. Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, c.260C>T değişimi için anne ve babanın heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi (Şekil 4-45). Şekil 4-46'da proteinin normal ve mutant proteinin, 3 boyutlu peptit yapısının pymol görüntüsü izlenmektedir. Ailenin eks olan ilk olgusunun otopsi örneğinden DNA elde edilememesi üzerine, yaşayan diğer sağlıklı kardeşte yapılan Sanger dizi analizinde, indeks olgudaki varyant homozigot formda saptandı. Böylece, söz konusu varyant segregasyonla dışlandı ve gelecek projeler dahilinde TGD analizi yapılması planlandı.



Şekil 4-45: Aile 10 moleküler analiz sonuçları. Anne baba ve sağlıklı kardeşin heterozigot formda taşıdığı değişimin, eks olguda ve sağlıklı abladaki homozigot elektroferogram görüntüleri



Şekil 4-46: c.260C>T değişiminin COX10 protein yapısı üzerindeki tahmini etkisi.

Normal (A) ve mutant (B) proteinin 3 boyutlu peptid yapısının pymol görüntüsü. Treonin 87 (Thr87), yakınında bulunan Glu80 ve Ser88 ile etkileşim halindedir (A). Polar özelliğe sahip olan treonin yerine non-polar izolösinin (Ile87) geçmesi, Ala92 ve Ile96 ile non-polar nitelikte iki yeni etkileşimin ortaya çıkmasına ve peptid zincirin bükülmesine yol açar (B). Bükülmenin etkisiyle birbirine yaklaşan Ser88 ve Glu115 arasında oluşan yeni polar etkileşim, peptid zincirde ikinci bir bükülmeye neden olur. Non-polar Ile87-Ala92, Ile87-Ile96 ve polar Ser88-Glu115 etkileşimleri sonucu ortaya çıkan bükülme, ilk transmembran alfa-heliks yapısında bozulmaya yol açar (D'deki mavi ok). Bunun sonucunda da, proteinin membran topolojisi bozulması beklenir (D'deki beyaz oklarla gösterilen amino ve karboksi uçlar) (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*) (278,279).

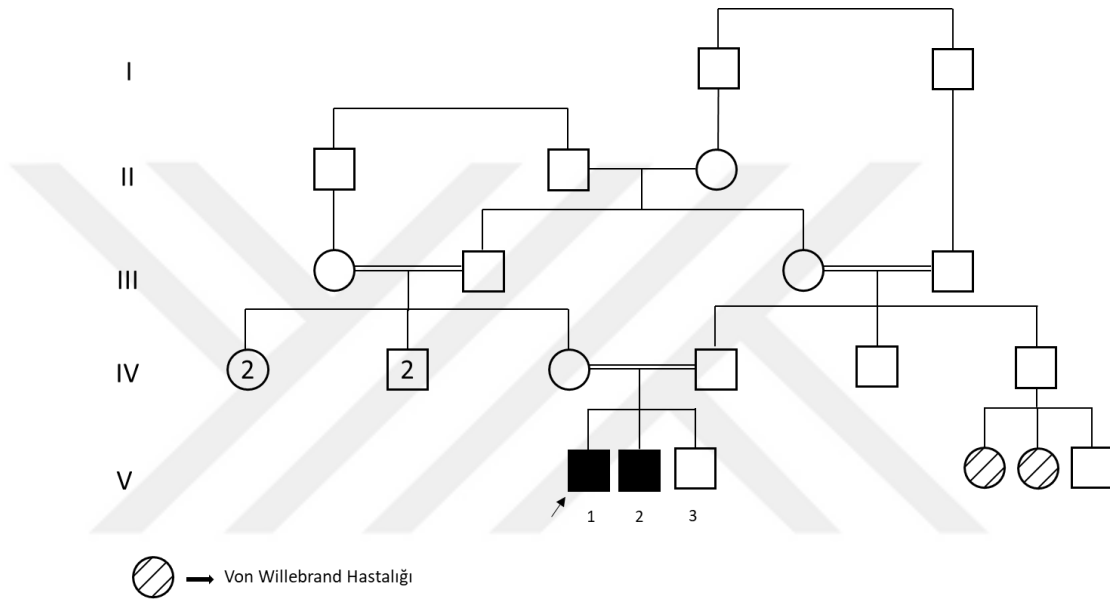
4.1.11. Aile-11 & Olgu V-1 ve V-2

Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık olan (1. kuzen) çiftin, birinci ve ikinci gebeliğinden olan, her ikisi de etkilenmiş 19 ve 16 yaşında erkek olgu (G3P3A0) yürüme güçlüğü, kas güçsüzlüğü şikayetleri ile Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi (Şekil 4-47). Aile öyküsünde ilk gebelikte, prenatal takiplerinde özellik olmayan ve postmatür (10 gün) NSD ile 4300 gr (97p), 48cm (25p) doğan olgunun, nöromotor gelişimi normal tarif ediliyor. Baş tutma 1-2 ay, desteksiz oturma 6 ay, yürüme 10 ay, konuşma 1 yaş, tuvalet eğitimi 1,5-2 yaş, ilk diş 8. ayda başlamış. Aile, birinci olgu 12 yaşındayken boy kısalığı ve kilo alamama nedeniyle İTF Çocuk AD'a başvurmış. Tetkiklerinde CK yüksekliği saptanmış. 14 yaşındayken de yürümenin bozulması nedeniyle İTF Nöroloji AD'da takibe alınmış. EMG'de miyojen tutulum, CK: 4267 U/L ↑, AST: 901 U/L ↑, ve ALT:144 ↑ saptanmış. Multipleks PZR ile DMD delesyon ve duplikasyonları negatif sonuçlanan hastanın (DETA), kas biopsisinde miyopati bulguları saptanmış. 17 yaşında, Tıbbi Genetik kliniğine DMD/BMD açısından yeniden değerlendirilmek üzere yönlendirilmiş. 2017'de yapılan DMD MLPA ve dizi analizi normal sonuçlanmış ve BMD %95 dışlanmış. Mentali normal olan hastanın, merdivenden çıkarken, oturduğu yerden kalkarken ve yokuş çıkarken zorlanması oluyormuş. Govers bulgusu pozitif ve psödohipertrofi saptanmamış. Fizik muayenede, yukarı çekik palpebral fissürler, malar hipoplazi dışında dismorfik bulgu yoktu. Tüm kaslar atrofik, winged scapula gözlemlendi. DTR azalmış ve tüm kas grupları 3-4/5, el kasları 4-5/5 kuvvetindeydi.

İkinci olgu, prenatal takiplerinde özellik olmaksızın, miadında, NSD ile 4000 gr, 50cm. doğmuştu (V-2). Postnatal uzamış sarılık nedeniyle 10 gün küvözde kalmış, 18 ay anne sütü almış. Mental motor gelişim normal tarif ediliyor. Baş tutma 2 ay, desteksiz oturma 6 ay, yürüme 12 ay, konuşma 18 ayda başlamış. Ağabeyinde kas hastalığı olması nedeniyle 2015 te CK testi yapılmış yüksek çıkınca takibe alınmış. EMG'de miyojen tutulum (2017, CTF), CK: 4925 IU, AST: 70 IU, ALT: 68 IU (2017,İTF), DMD dizi analizi negatif (2017, GETAM, CTF) çıkmış. Kas biyopsisinde mitokondrial miyopati bulguları saptanması üzerine (2018, İTF Patoloji) Beslenme ve metabolizma polikliniğine

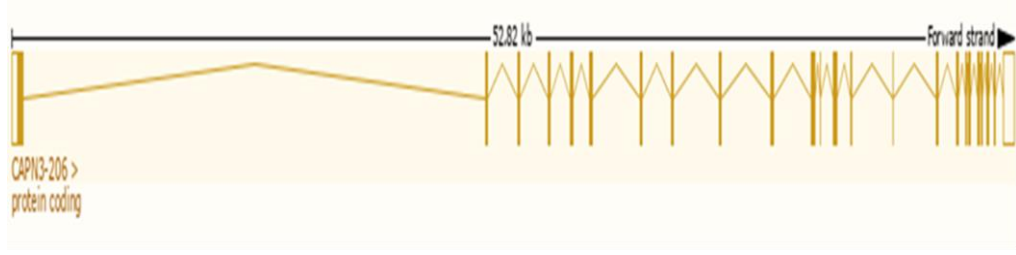
yönlendirilen olgulara destek tedavisi başlanmış. İkinci olguya sık ishal şikayeti ile İTF Çocuk Gastroenterolojide kolonoskopi yapılmış ve biopsi sonucu inflamatuvar barsak hastalığı tanısı konularak tedavi başlanmış (2018,İTF). EKO ve işitme testi normalmiş. Her iki kardeşin tedavi takipleri Beslenme ve Metabolizma Polikliniğinden sürmekte iken, genetik kökenin araştırılması için 14.05.2019 tarihinde projeye dahil edilmiştir.



Şekil 4-47: Aile 11 Pedigrisi.

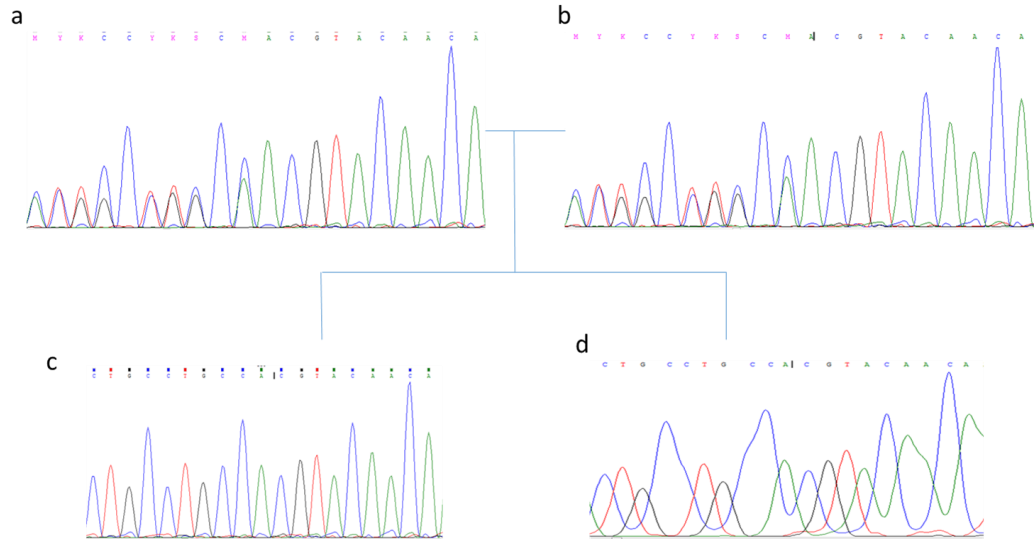
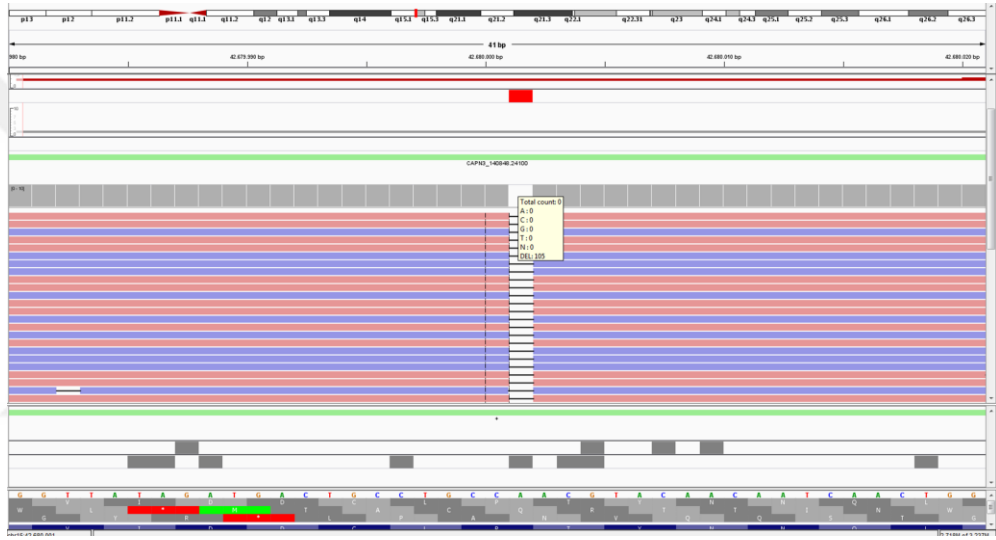
Moleküler Bulgular

İndeks olgu ve etkilenmiş kardeşinde yapılan TED analizinde, *CAPN3* geninde (Şekil 4-48) (Calpain 3, 15q15.1, NM_000070, NP_000061) ekzon 4'de homozigot c.550delA (p.Thr184ArgfsTer36) değişimi saptandı. Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, c.550delA değişimi için anne ve babanın heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi (Şekil 4-49). *CANP3* geninde gösterilen bu varyantın daha önce Limb Girdle tip 2A (LGMDR1) ile ilişkisi bildirilmiştir (347).



Şekil 4-48: CAPN3 transkriptinde ekzon ve intronlar

CAPN3 (Calpain 3, Calcium-Activated Neutral Protease 3, Muscle-Specific, Large Subunit) (MIM*114240) 15q15.1 bölgesinde yerleşik, düz zincirden transkribe olan, 24 ekzonlu bir gendir. 3,315 bç. uzunluğunda ve 821 aa'lık bir polipeptidi kodlar (277).

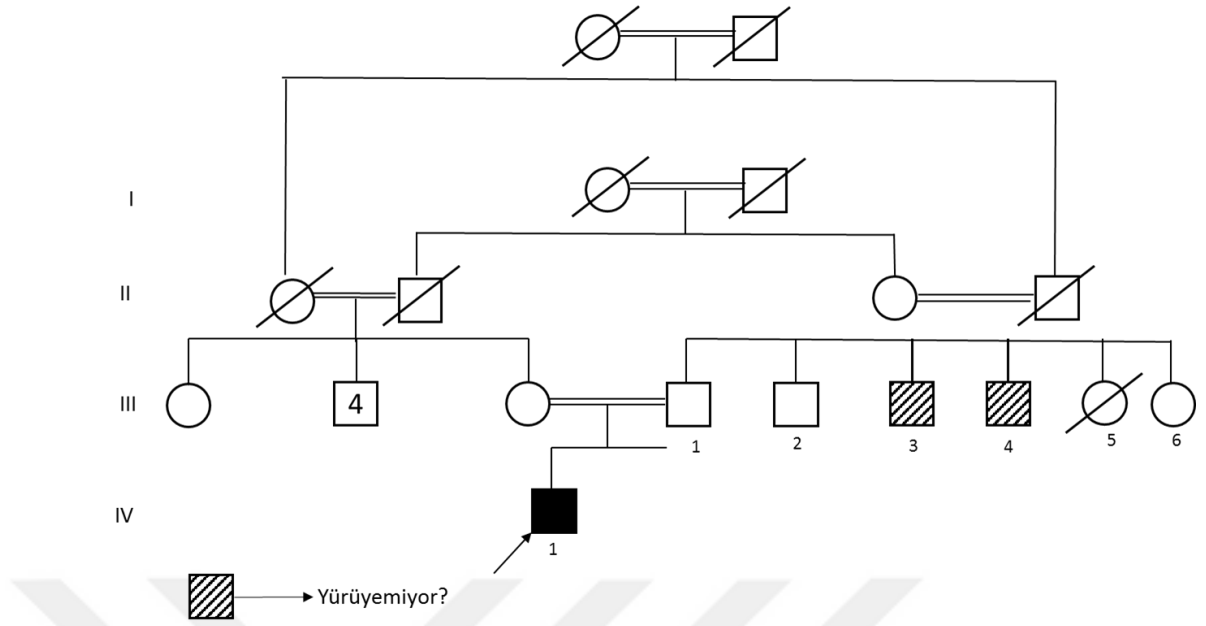


Şekil 4-49: Aile 11 moleküler analiz sonuçları. Aile 11 moleküler analiz sonuçları. c.550delA'nın IGV görüntüsü ve anne (a) ve babada (b) heterozigot formda görülen değişimin, her iki kardeşteki homozigot elektroferogram görüntüleri.

4.1.12. Aile-12 & Olgu IV-1

Öykü ve Klinik Bulgular

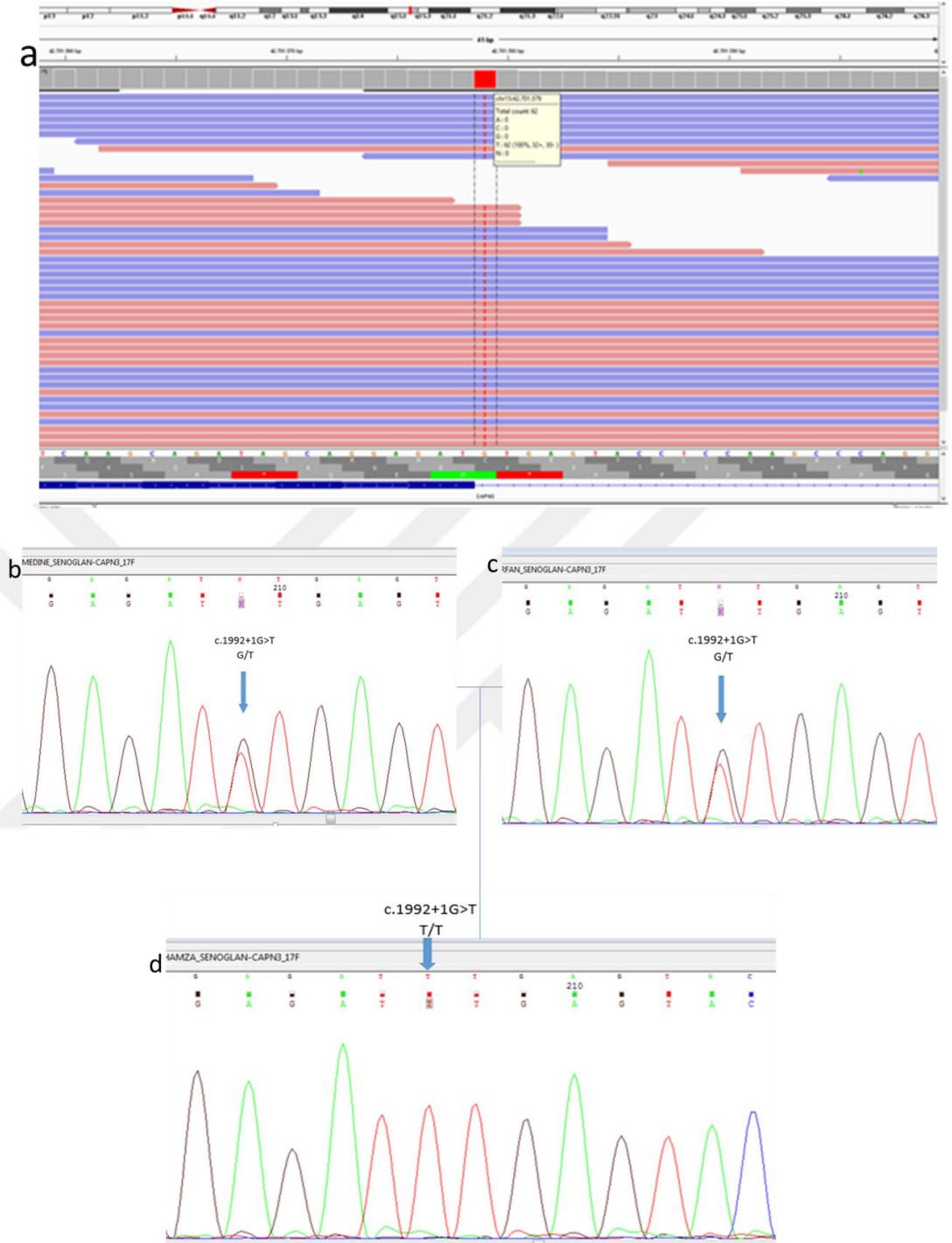
Aralarında birinci kuzen evliliği olan çiftin ilk gebelik ürünü olan 20 yaşında erkek olgu yürüyememe her dört extremitede kaslarda atrofi ve her iki ayakta valgus deformitesi nedeniyle genetik araştırma için Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi (G4P1A0Y1) (Şekil 4-50). Prenetal takiplerinde sorun olmayan ve miyadında NSD ile doğan olgunun mental motor gelişimi normal tarif edildi. 5-6 yaşlarında çabuk yorulma koşamama ve merdiven çıkmada zorlanma şikayetleri başlamış ve ilk kez 10 yaşında çocuk doktorununa başvurmuşlar ancak tanı konulamamış. İstanbul'da başvurdıkları çocuk metabolizma uzmanı (dış merkez) tarafından mitokondriyal hastalık ön tanısı ile İTF Çocuk Metabolizmaya yönlendirilmiştir. İlkokula başladığında yürüme bozukluğu ve ayaklarda valgus deformitesi nedeniyle 2008 ve 2010 yıllarında iki defa operasyon geçirmiştir. İTF çocuk metabolizma polikliniğinde, mitokondriyal miyopati şüphesiyle takip edilen hasta moleküler genetik araştırma için Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirilmiştir. Yapılan muaynesinde, ayaklarda bilateral pes equino varus deformitesi ve kas gücünde azalma saptandı (3/5). Tekerlekli sandalye kullanıyordu. Tandem MS'te C5 karnitin üst sınırdan, biyokimyasal tetkiklerinde kas enzimleri yüksek (AST: 188U/L, ALT:127U/L , CK:3928 U/L, idrar organik asit analizinde laktik asit ve betahidroksibütirik asit yüksek saptandı. Moleküler tanı amacıyla, olguya TED analizi yapıldı.



Şekil 4-50: Aile 12 Pedigrisi İndeks olgunun 48 ve 47 yaşlarında iki amcası yürüyemiyor ancak etiyolojisi bilinmiyor.

Moleküler Sonuçlar:

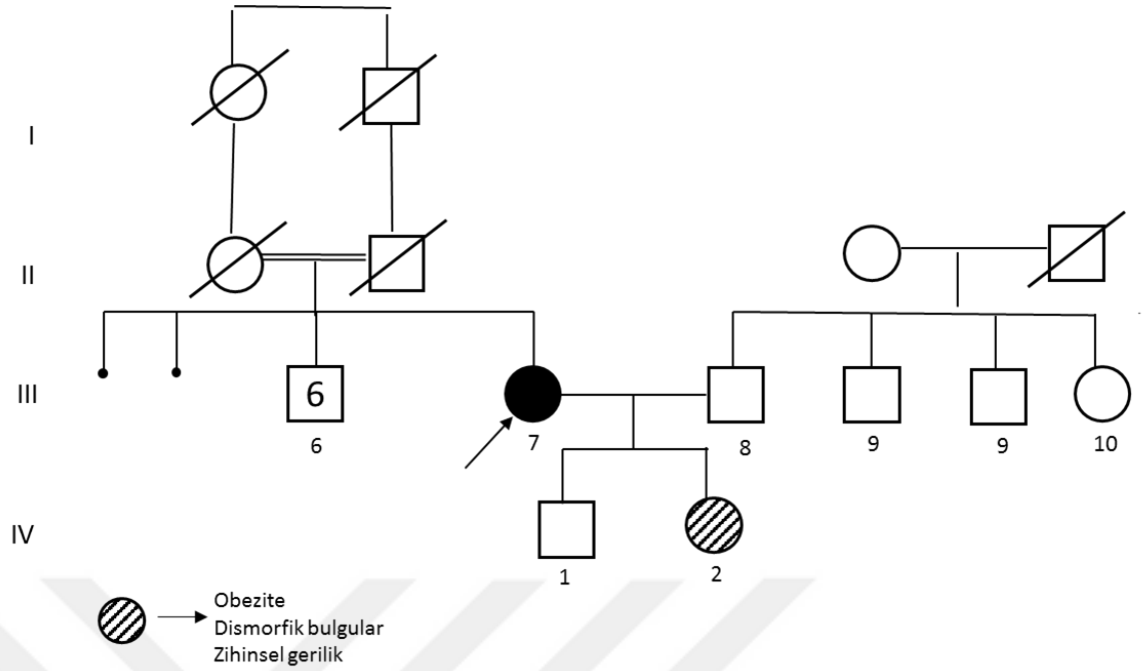
İndeks olguya yapılan yapılan TED analizinde, *CAPN3* geninde (Şekil 4-48) (Calpain 3, 15q15.1, NM_000070, NP_000061) ekzon 17'de homozigot c.1992+1G>T değişimi saptandı (Şekil 4-51). Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, c.1992+1G>T değişimi için anne ve babanın heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi *CANP3* geninde gösterilen bu varyantın daha önce Limb Girdle tip 2A ile ilişkisi bildirilmiştir (275).



Şekil 4-51: Aile 11 moleküler analiz sonuçları. İndeks olguda *CANP3* geninde homozigot saptanan c.1992+1G>T değişiminin IGV görüntüsü. Sanger dizileme ile aynı değişim için, anne (b) ve babanın (c) heterozigot, indeks olgunun (d) homozigot olduğunu gösteren elektroferogram görüntüleri.

4.1.13. Aile-13 & Olgu III-7

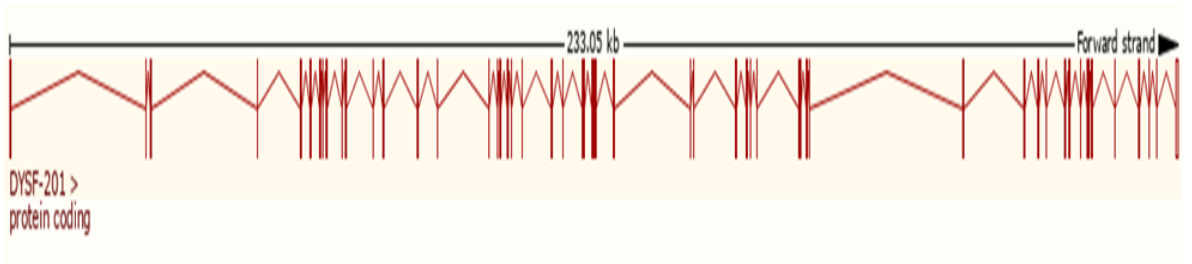
42 yaşında kadın hasta, kas güçsüzlüğü, yürüme güçlüğü ve kalp hastalığı nedeniyle moleküler genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik AD'a yönlendirildi (G9P7A2) (Şekil 4-52). Aralarında birinci kuzen evliliği olan çiftin beşinci gebelik ürünü olarak NSVY miyadında doğan, mental motor gelişim basamakları normal olan hastanın, klinik öyküsünde, 15 yaşında el ve ayak bileklerinde şişme şikayeti nedeniyle olan başvurusunda, akut eklem romatizması tanısı ve tedavisi (Penedur enjeksiyon/ay) dışında özellik yoktu. Beş yıllık takipten sonra şikayetleri gerilemiş. Yirmi ve 22 yaşlarındaki iki gebeliğinden olan, NSD ile doğan iki çocuğu var. İlki 21 yaşında sağlıklı erkek ve ikincisi, obezite, dismorfik bulgular ve zihinsel yetmezliği olan 19 yaşında bir kız olgu. Kas güçsüzlüğü ile ilgili şikayetleri ilk kez 24 yaşında başlamış ve çabuk yorulma merdiven çıkarken güçlük ve hipotoni nedeniyle takip altına alınmış. Olgunun yürüme güçlüğü'nün artması üzerine yapılan EMG'de miyopatik değişiklikler saptanmış (İTF,2010). O tarihli kas biopsisinde mitokondrial değişikliklerle birlikte primer lipid depo hastalığı ve primer mitokondrial miyopati tanıları ile mitokondriyal miyopati açısından takip ve tedavi altına alınmış (İTF, 2010). Yapılan mtDNA dizi analizinde hastalık ilişkili varyant tespit edilmemiş (2012, DETAE). Aynı yıl gövde, kol ve ellerde eritemli sedef tarzı lezyonlar nedeniyle yapılan biopside interfaz dermatit bulguları eritema multiforme ile uyumlu bulunmuş ve tedavi görmüş (Cerrahpaşa TF,2010). Kas güçsüzlüğü artan hastaya tekrar kas biopsisi yapılmış, seyrek nektorik lifler, şüpheli perifasiküler atrofi ve iki lifteki infiltrasyon, inflamatuvar miyopati açısından şüpheli bulunmuş ancak tanı koydurucu olmamıştır (Hacettepe TF,2013). Olgunun mtDNA dizilemesi de tekrarlanmış ve patojenik varyant tespit edilmemiştir (2018, Gazi TF). Halen kardiyomiyopati tanısıyla kardiyolojiden de takip edilen hasta, mitokondriyal destek tedavisi almaktadır ve moleküler genetik araştırma için projeye dahil edilmiştir. Tıbbi Genetik polikliniğinde değerlendirilen hastanın, bulgularının progresyon gösterdiği, yürüme güçlüğü'nün arttığı, normalin 10 katı CK yüksekliği (1973↑), ve hafif laktat yüksekliği (2,2↑) olduğu görüldü ve moleküler genetik araştırma için TED analizi yapıldı.



Şekil 4-52: Aile 13 Pedigrisi. İndeks olgunun kızınde obezite, dismorfik bulgular ve zihinsel yetmezlik gibi fenotipik özellikler vardı.

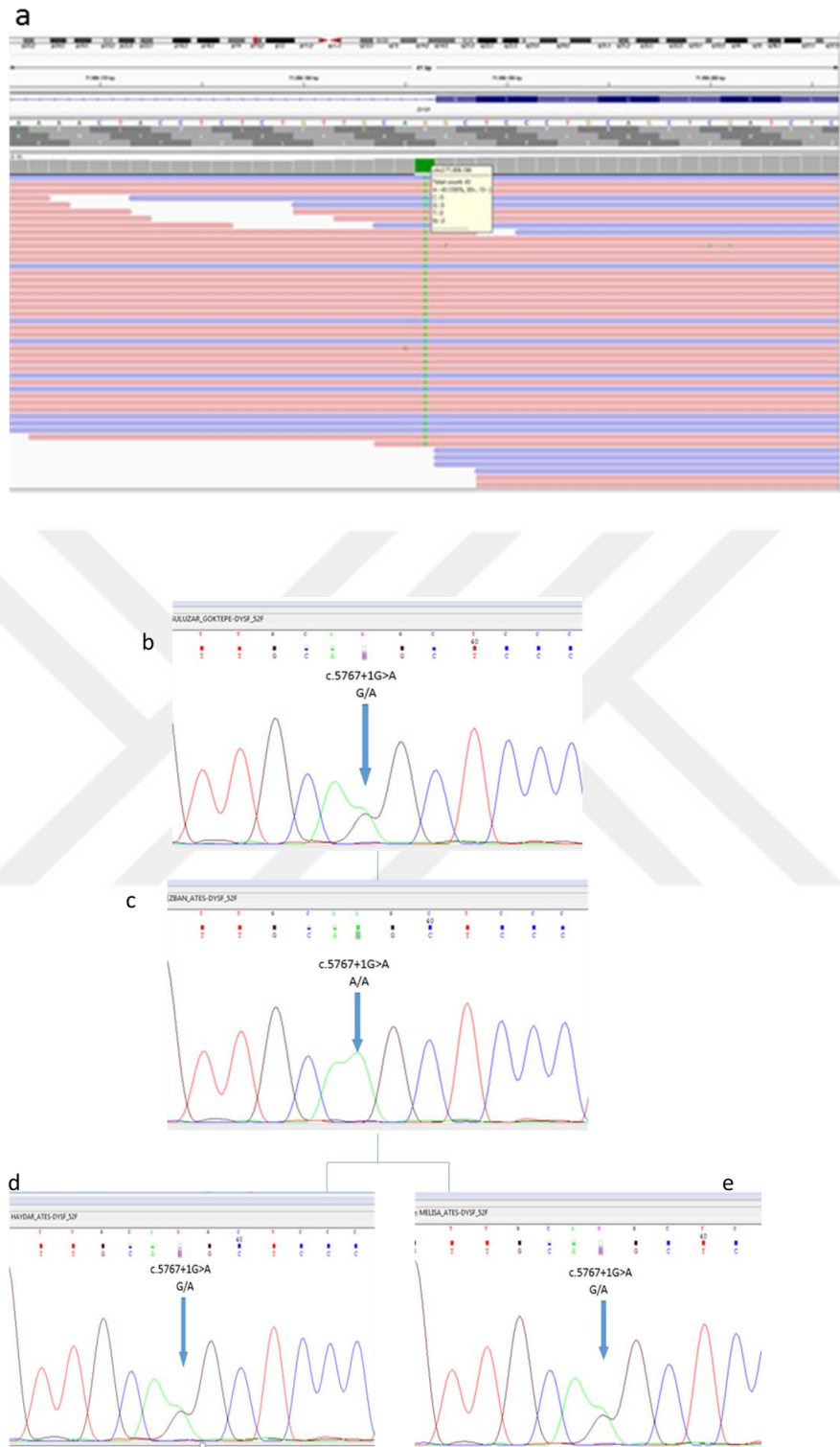
Moleküler Bulgular

İndeks olguya yapılan yapılan TED analizinde, *DYSF* geninde (Şekil 4-53) (Dysferlin; 2p13.3-p13.1 NM_003494, NP_003485.1) ekzon 52'de homozigot c.5767+1G>A değişimi saptandı (Şekil 4-54). Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için ebeveynlerde yapılan incelemede, c.5767+1G>A değişimi için annenin heterozigot formda taşıyıcı olduğu belirlendi. *DYSF* geninde gösterilen bu varyantın daha önce Muscular Dystrophy, Limb-Girdle, TYPE 2B; LGMD2B ile ilişkisi bildirilmiştir (276).



Şekil 4-53: *DYSF* transkriptinde ekzon ve intronlar

DYSF (Dysferlin) (MIM * 603009) 2p13.3-p13.1 bölgesinde yerleşik, düz zincirden transkribe olan, 55 ekzonlu bir gendir. 6,796 bç. uzunluğunda ve 2,080 aa'lık bir polipeptidi kodlar (277). Disferlin, kas lifi onarımında önemli bir rol oynar.



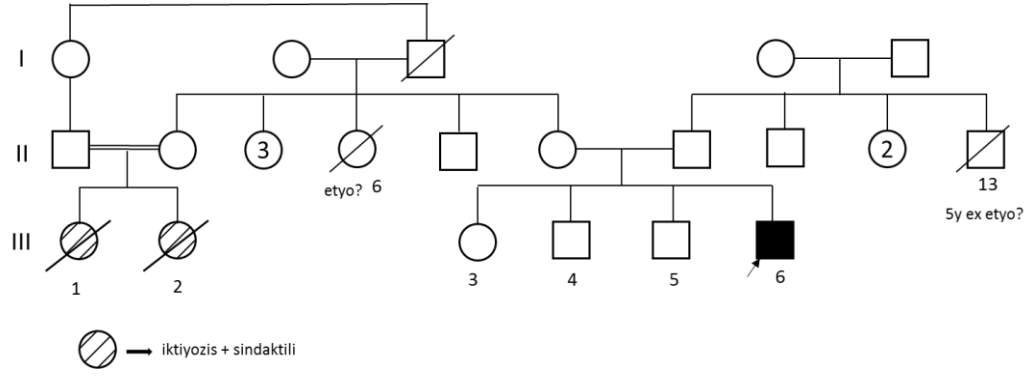
Şekil 4-54: Aile 13 Moleküler analiz Sonuçları İndeks olguda c.5767+1G>A değişiminin IGV görüntüsü (a). Sanger dizileme ile, bu değişim için, olgunun homozigot (b) olduğunu, annesinin (c) ve her iki çocuğunun ise (d,e) heterozigot formda taşıdıklarını gösteren elektroferogramlar.

4.1.14. Aile-14 & Olgu III-6

Öykü ve Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık olmayan 56 yaşında sağlıklı baba ve 53 yaşında sağlıklı annenin dördüncü gebelik ürünü olan 18 yaşında erkek olgu (G4P4A0) (Şekil 4-55), CK yüksekliği ve ellerde tremor şikayetiyle Tıbbi Genetik kliniğine konsülte edildi. Antenatal takipleri yapılmayan olgunun doğumu evde gerçekleşmiş ve postnatal adaptasyon sorunu tariflenmiyor. İlk kez 7 yaşında ellerinde titreme olduğu farkedilmiş, üçüncü basamak dış merkezlerde tetkik edilmiş, ancak sebep bulunamamış. Her hangi bir tedavi almayan olgu, 14 yaşında esansiyel tremoru nedeniyle İTF Nörolojiye başvurmuş ve dideral başlanmış. Bir süre kullanıp bırakmış ve 17 yaşında şikayetin artması nedeniyle tekrar İTF Nörolojiye başvurduğunda CK:10492 U/L saptanması üzerine BMD ön tanısı ile Tıbbi Genetik AD'a moleküler araştırma amacıyla yönlendirilmiş. Distrofin geni dizi analizi ve MLPA ile yapılan moleküler analizlerde herhangi bir patojenik varyant veya delesyon/duplikasyon saptanmamış ve tanı dışlanmıştır (İTF,2018). EMG'de ılımlı miyopati bulguları olan hastanın EKO'su normal ve kranial MR'da sağ lateral ventrikülün sola göre hafif efase görünümde olması dışında bulgu gözlenmemiş.

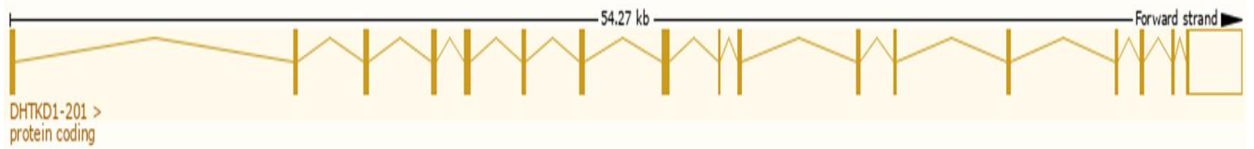
Esansiyel tremoru ve CK yüksekliği sebat eden olgunun 12.07.2019 tarihli Tıbbi Genetik poliklinik muayenesinde, astenik vücut yapısı, kas gücü her 4 ekstremitte proksimal ve distalde 5/5, tonus doğal, DTR normal, serebellar muayenesi doğaldı. Metabolik miyopatiler açısından incelenmek üzere Metabolizma BD'a konsülte edildi ve idrar organik asit testinde, spesifik bir hastalığı işaret eden atılımları olmadığı ancak tandem, kantitatif aa ve VLCFA testleriyle yeniden değerlendirilmesi istendi. Patolojik inceleme için çocuk nöroloji tarafından planlanan kas biopsisi sırasında, mRNA düzeyinde DMD moleküler analizi yapılabilmesi için, alınan deltoid kas örneği kültüre edildi. Kültüre kas hücresinden yapılan RNA izolasyonundan elde edilen cDNA'da, herhangi bir patojenik dizi değişimi saptanmadı. Histopatolojik incelemede, distrofin ve disferlin normal ancak hafif miyopatik değişiklikler saptanan olgu, bulguların moleküler kökeninin araştırılması için projeye dahil edildi.



Şekil 4-55: Aile 14 Pedigrisi.

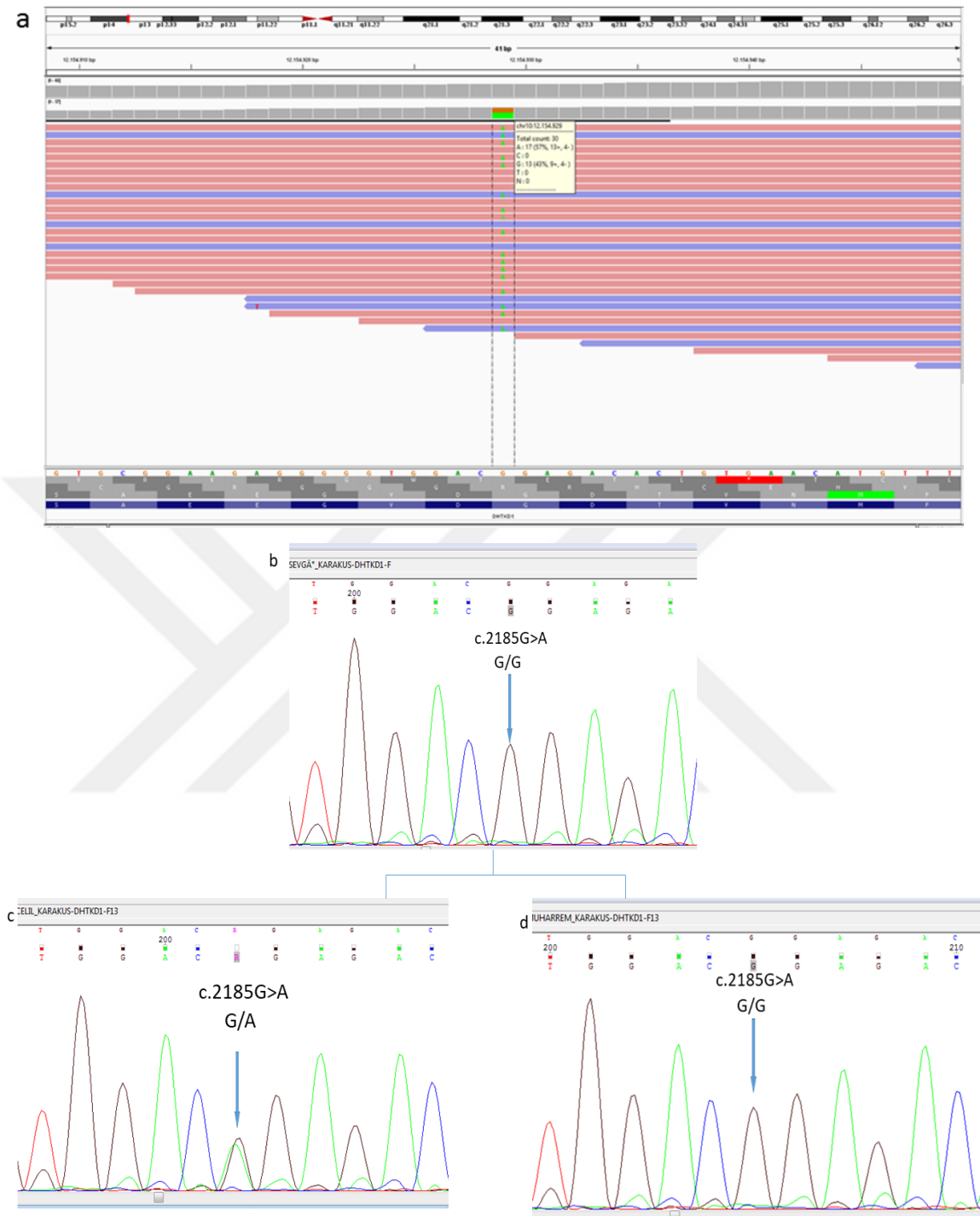
Moleküler Bulgular

İndeks olguda yapılan TED analizinde *DHTKD1* geninde (Şekil 4-56) (10p14, Dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1, NM_018706.7, NP_061176.3) ekzon 13'te heterozigot c.2185G>A (p.Gly729Arg), değişimi saptandı (rs117225135) (Şekil 4-57). Bu değişim Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon için annede ve olgunun sağlıklı ağabeyinde yapılan incelemede, c.2185G>A değişimini taşımadıkları belirlendi. *DHTKD1* geninde gösterilen bu varyantın daha önce 2-aminoadipik 2-oxoadipik asidüri ile ilişkisi bildirilmiştir (354).



Şekil 4-56: *DHTKD1* transkriptinde ekzon ve intronlar

DHTKD1 (Dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1) (MIM*614984) 10p14 bölgesinde yerleşik, düz zincirden transkribe olan, 17 ekzonlu bir gendir. Transkripti 5,173 bç. uzunluğunda ve 919 aa'lık bir polipeptidi kodlar (277). *DHTKD1*'in, proteine bağlı lipoil gruplarının indirgenmesinde görevli bir tiamin difosfata bağımlı 2-okso asit dehidrojenaz olduğu tahmin edilmektedir.



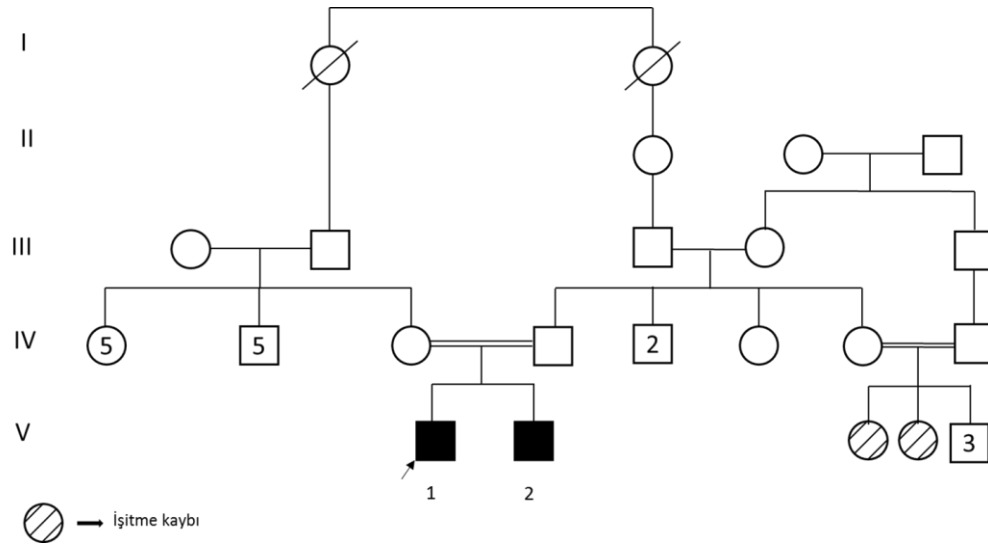
Şekil 4-57: Aile 14 Moleküler analiz sonuçları

İndeks olguda c.2185G>A değişiminin IGV görüntüsü (a). Sanger dizileme ile, bu değişim için olgunun annesi (b) ve ağabeyinin (d) homozigot normal olduğunu, kendisinin ise değişimi heterozigot formda taşıdığını gösteren elektroferogramlar.

4.1.15. Aile-15 & Olgu V-1 ve V-2

Öykü ve Klinik Bulgular

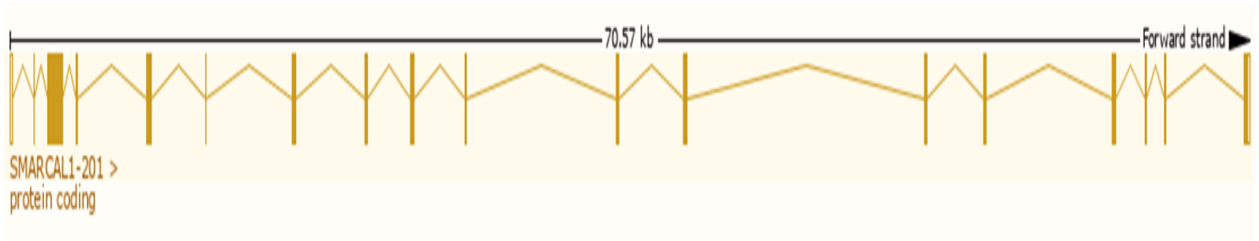
Aralarında 1,5.derece kuzen evliliği olan çiftin, ilk ve ikinci gebeliğinden olan 3 yaşında ve 10 aylık olan erkek olgu ağır büyüme gelişme geriliği nedeniyle genetik araştırma amacıyla dış merkezden Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi (G2P2A0) (Şekil 4-58). Anne 24 yaşındayken spontan gebelikle olan ilk olgunun antenatal takipleri 6. aya kadar normalmiş. Sonrasında bebek hareketleri azalmış ve son kontrolünde suyunun bittiği söylenerek acil C/S ile doğum gerçekleşmiş. Postnatal kardiyak arrest ve resüstasyon öyküsü olan olgu, prematür sorunları nedeniyle 65 gün yenidoğan YB ünitesinde kalmış. Anne sütü ile beslenmiş ve taburculuk sonrası ilk 6 ay kilo alımı 400gr/ay olmuş ancak sonra durmuş. Büyüme gelişme geriliği nedeniyle Çocuk Endokrin ve Metabolizma, Çocuk Gastroenteroloji bölümlerinde sürekli takip altındaymış. Başını dik tutma, oturma, yürüme gibi motor gelişim basamakları normal vaktinde olmuş (2 ay, 8 ay, 18 ay). Konuşma yok, sadece anlamlı sesler çıkarmaya başlamış. Yenidoğan tarama testinde saptanan kısmi biotinidaz eksikliği nedeniyle biotin tb kullanıyor. İkinci olgumuz annenin 26 yaşındaki spontan gebeliğinden olan ve benzer antenatal özellikleri gösteren, 6. ayda suyun bitmesi ile acil C/S ile doğan ve prematürite nedeniyle 56 gün yenidoğan YB öyküsü olan 10 aylık erkek olgu. Her iki olgu büyüme gelişme geriliği nedeniyle Tıbbi Genetik polikliniğinde değerlendirildi. İlk olgunun yapılan muayenesinde, kilo 7 kg (-7,5SD) ve 69 cm boy (-6,68 SD), ön fontanel açık (1 cm) arka fontanel kapalı, seyrek ve ince saçlar, belirgin alın, sağ gözde içe bakan şaşılık, bulböz nasal tip, hafif düz filtrum, ince üst dudak, kaşlar ve kirpikler belirgin ve belirgin büyük kulakları vardı. Sistemik muayenesinde retrakte testisler dışında bulgu saptanmadı. Radyolojik bulgularında, tüm iskelet sisteminde proporsiyonel kısalık mevcuttu. İkinci olgunun muayenesinde kilo 5 kg (-5,79 SD) boy 56 cm (-4,32), ö fontanel açık (3cm) arka fontanel kapalıydı. Kromozom analizi ve mikroarray testi normal sonuçlanan olgulara paired TED analizi planlandı.



Şekil 4-58: Aile 15 Pedigrisi.

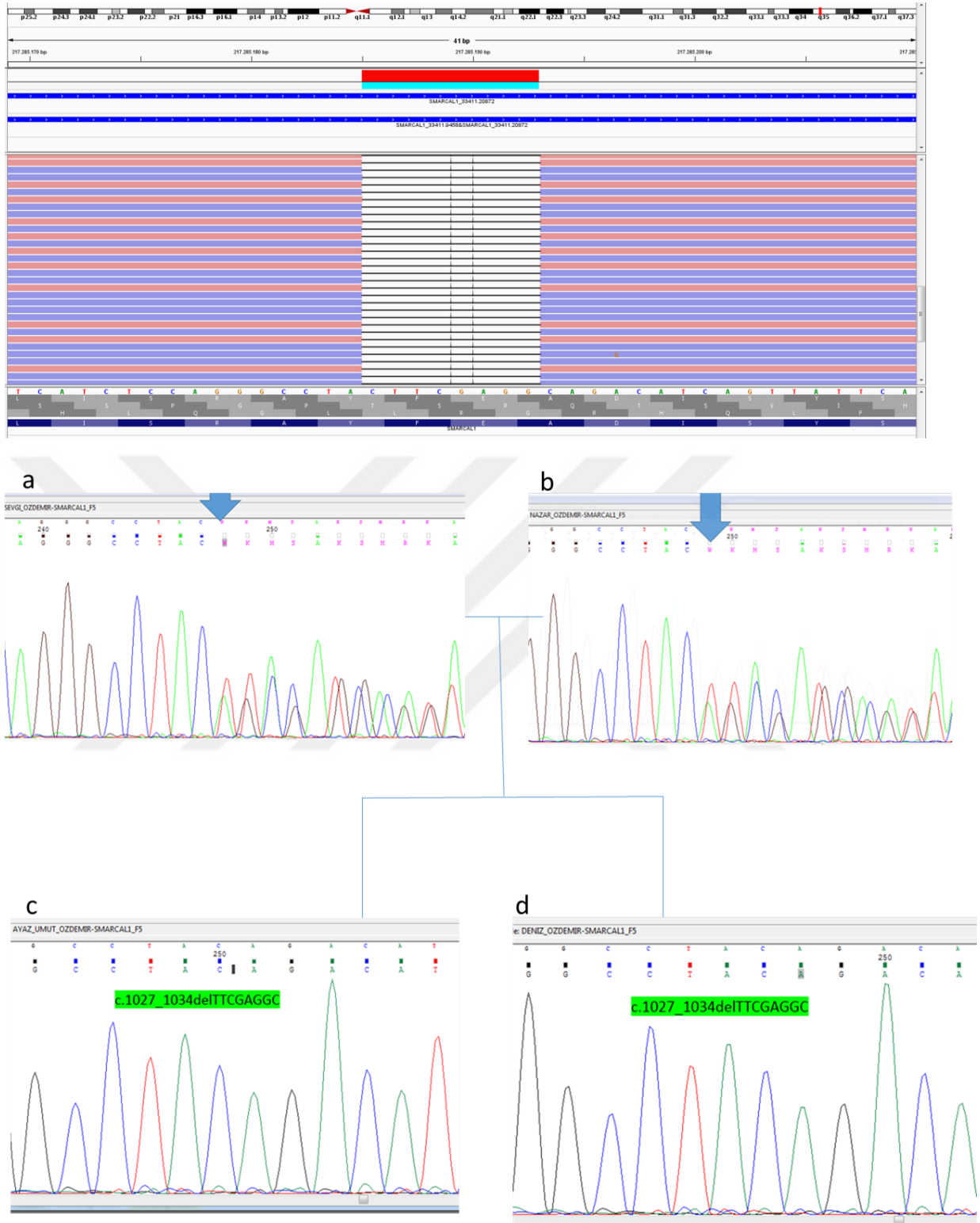
Moleküler Bulgular

İndeks olgu ve etkilenmiş kardeşinde yapılan TED analizinde *SMARCAL1* geninde (Şekil 4- 59) (2q35, SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a like 1 NM_014140, NP_054859.2) ekzon 5'te homozigot c.1027_1034delTTTCGAGGC (p.F343Rfs*13) varyantı saptandı (Şekil 4-60). Bu varyantın her iki olguda homozigot, anne ve babada ise heterozigot formda bulunduğu Sanger dizi analizi ile doğrulandı. *SMARCAL1* (SIOD, MIM#242900) genindeki bi-allelilik patojenik varyantlar Schimke immune-kemik displazisi ile ilişkilendirilmektedir. Ailede saptanan ve daha önce tanımlanmamış olan bu variantın, gen transkriptinde kodlanan dizide sekiz nükleotit kaybı ile çerçeve kayması ve erken dur kodonu oluşturması beklendiğinden patolojik olarak yorumlandı.



Şekil 4-59: *SMARCAL1* transkriptinde ekzon ve intronlar

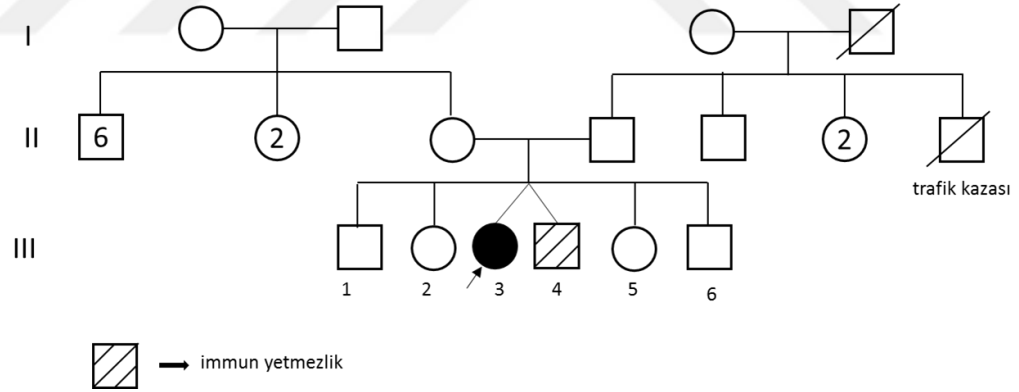
SMARCAL1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a like 1) (MIM*614984) 2q35 bölgesinde yerleşik, düz zincirden transkribe olan, 18 ekzonlu (kodlayan 16) bir gendir. Transkripti 3,201 bç. uzunluğunda ve 954 aa'lık bir polipeptidi kodlar (277).



Şekil 4-60: Aile 15 Moleküler analiz sonuçları. c.1027_1034del'in IGV görüntüsü ve anne (a) ve babada (b) heterozigot formda görülen değişimin, her iki kardeşteki homozigot elektroferogram görüntüleri.

4.1.16. Aile-16 & Olgu III-3

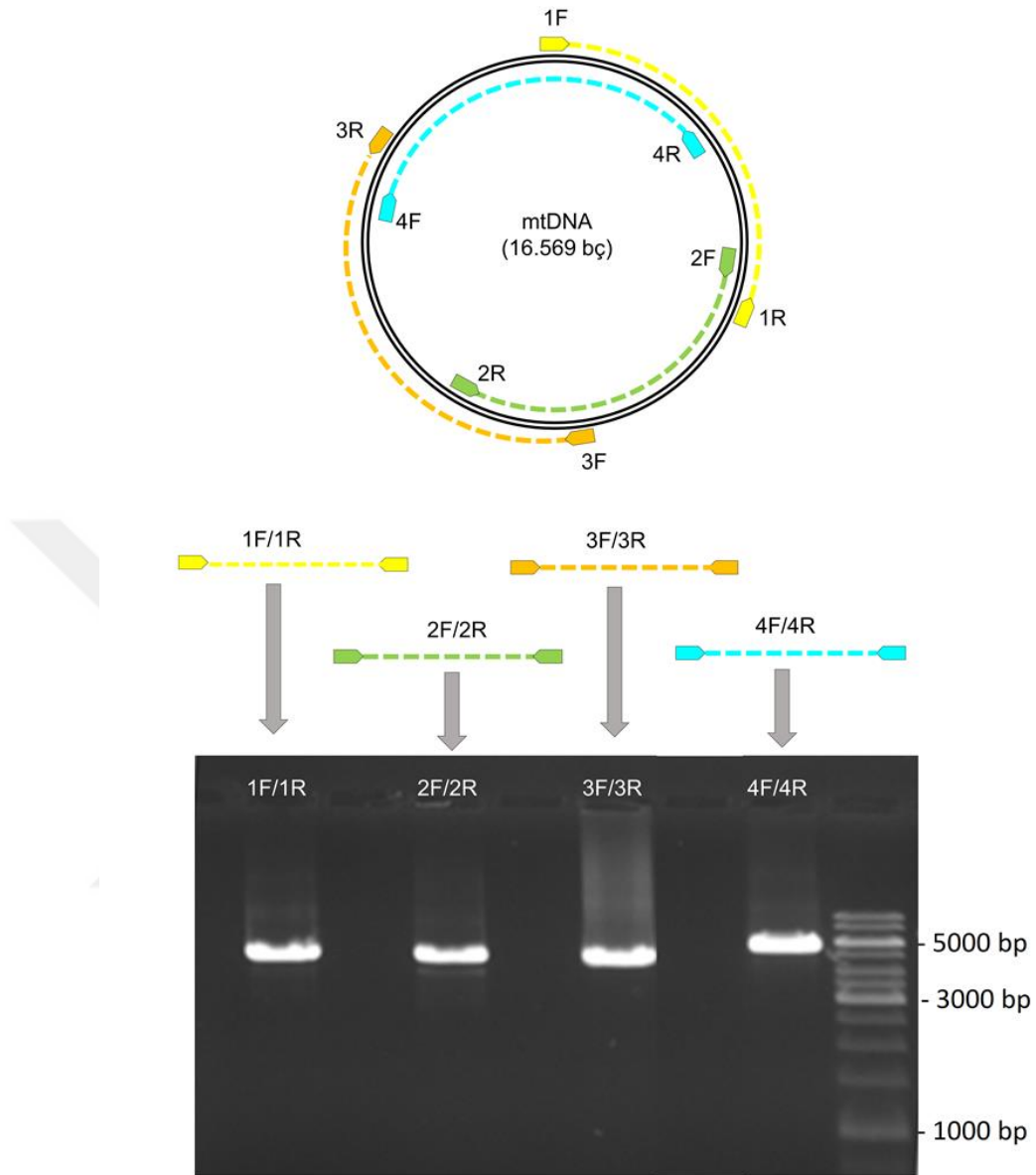
Onbeş yaşında kız olgu, progresif pitozis ve kas biopsisinde mitokondrial miyopati lehine bulgular olması nedeniyle, moleküler genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik AD'a yönlendirildi. Aralarında akrabalık olmayan çiftin 3'üncü ve ikiz gebelik ürünü olarak NSD ile vaktinde doğmuş (G5P5A0Y6) (Şekil 4-61). Prenatal takipsiz ve postnatal sorunsuz olan olgunun mental motor gelişim basamakları normal tarif ediliyor. İlk kez ilkokul 1'inci sınıfta bacak ağrısı nedeniyle tetkik edilmiş, romatizma olduğu söylenmiş fakat kesin tanı konulamamış. Sekizinci sınıfta göz kapaklarında düşme başlamış (pitozis), bir sonraki yıl ilerlemiş, iştahı azalmış ve kilo kaybı başlamış. Yapılan kas biopsisinde; 14-15 adet ragged red lif, 6-7 adet SDH yoğun lif ve yine 11-12 adet COX negatif lif izlenmesi üzerine, mitokondrial miyopati ile uyumlu bulunmuş (İTF,2015). Dış merkezde yapılan mtDNA dizi analizinde patojenik bir değişim saptanmamıştır (Gazi Tıp,2018). Son 2 yıldır İÜTF Metabolizmadan takip edilen olgu moleküler genetik araştırma amacıyla projeye dahil edilmiştir.



Şekil 4-61: Aile 16 Pedigrisi.

Moleküler Bulgular

İndeks olguya yapılan TED analizinde moleküler etiyolojiyi açıklayan bir varyant gösterilemedi. MtDNA dizi analizi için, özgün tasarlanan primerlerle yapılan uzun PZR ile, dört bölgeye ait uygun bant boyunda görüntü alındı (Şekil 4-62). YND ile yapılan tüm mtDNA dizi analizinde MITOMAP veri tabanında patojenik olarak bildirilen değişimlere rastlanmadı. Hastanın Kearn Sayre ile uyumlu klinik özellikleri nedeniyle delesyon analizi planlandı.



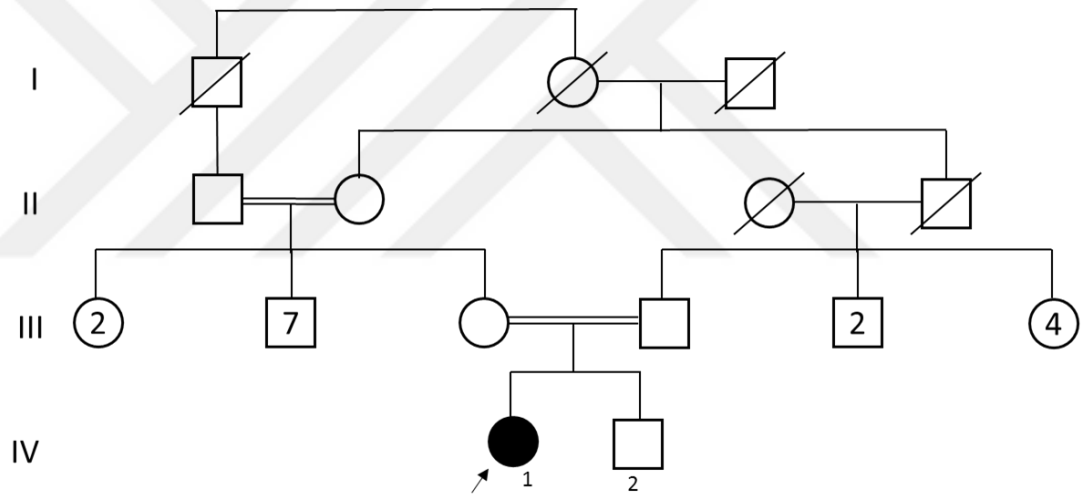
Şekil 4-62: Aile 16 olgu III-3 mtDNA uzun PZR agaroz jel görüntüsü

4.1.17. Aile-17 & Olgu IV-1

Aralarında birinci derece kuzen evliliği olan çiftin ilk gebelik ürünü olan 4 yaşında kız olgu, yürüyememe, konuşamama şikayeti ve mitokondriyal hastalık lehine laboratuvar ve klinik bulguları ile genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik AD'ya yönlendirildi.

Olgu ilk kez 2016 yılında 14 aylıkken, gelişim geriliği, hipotoni ve nedeni bilinmeyen ateş şikayetiyle yatarak tetkik ve tedavi altındayken Tıbbi Genetik kliniğine konsülte edilmişti. Spontan gebelikle olan, antenatal sorun tarif etmeyen, 38. GH'da C/S ile 3750gr doğan olgunun postnatal adaptasyon sorunu da olmamış (G2P2A0) (Şekil 4-63). İlk 6 ay anne sütü alan, sonra mama ve ek gıda ile beslenen olgunun, tartı alımı normalmiş. Doğumdan beri aile tarafından kas gevşekliği olduğu farkedilmiş ancak patolojik olduğu düşünülmemiş. Baş kontrolü 3. ay, desteksiz oturma 7. ayda olmuş ancak 8. ayda başlayan ateşli hastalıkları (ÜSYE, İYE) nedeniyle bu becerileri kaybetmiş. Hırıltılı solunum, öksürük kesilmeksizin, onuncu aydan sonra ateşleri kontrol altına alınamaz olmuş ve 12 aylık iken İTF'de yatarak takip ve tedavi altına alınmış. IVIG tedavisi ile ateşi düşen ancak 2 hafta sonra tekrar yükselen olgunun ateşli nöbetleri ve uykuda sağ elde titreme şeklinde olan ve 10 sn süren nöbetleri olmuş. EEG'de spontan uyku trasesinde organizasyon bozukluğu ile multifokal yüksek amplitüdlü keskin yavaş dalga aktivitesi şeklinde patolojik deşarj raporlanmış (İTF, 2016). Kranial MR'da yaşa göre hafif gecikmiş miyelinizasyon, korpuz kallozum diffüz ince, MRS'te laktat piki yok ancak bulgular mitokondriyal hastalık açısından şüpheli bulunmuş. EMG'de ılımlı miyojen tutulum, kas biopsisinde lipid birikim miyopatisi ve tip II lif atrofisi gözlenmiş (İTF, 2016). Kas dokusunda kompleks IV enzim aktivitesi düşük saptanmış (30 U/grprotein N:112-351, Kompleks IV/Sitrat Sentaz:0,3 N: 1,1-5) (Hacettepe, 2016). Kemik iliği aspirasyon biopsisinde depo hastalığı lehine bulgu saptanmayan olgunun, tandem MS, KAA, İOA, CDG, VLCFA gibi metabolik tetkiklerinde özellik saptanmamış, CK normal (70 U/L) bulunmuş. mtDNA dizi analizinde (Gazi,2017) ve >4800 gene ait dizilemeyi içeren klinik ekzom analizinde (İntergen,2017) moleküler etiyolojiyi açıklayacak bir değişim saptanmamış. Farklı bir merkezde yapılan ekzom analizinde de *KCNT1* geninde tek allelde gösterilen değişim annede de görülmüş (Biruni Üniv, 2018).

Hasta 4 yaşında Tıbbi Genetik polikliniğinde tekrar değerlendirildiğinde, motor gelişiminde; bir buçuk yaşında tekrar oturmaya başladığı, 3 yaş 10 aylıkken sıraladığı ancak halen yürüyemediği, aldığı fizik tedaviden fayda gördüğü öğrenildi. Hecceleme 3 yaş 9 ayda başlamış ancak halen konuşmuyordu. Kranial MR'da korpus kallozum özellikle posteriorda belirgin inceydi (Hacettepe, 2018) ve idrarda 2 yıldır devam eden proteinüri mevcuttu (biopsi yapılmamış). Halen, femoral katetere sekonder tromboz öyküsü nedeniyle (2 yaşında) enapril ve mitokondrial destek tedavisi alan hasta, moleküler etiyojinin araştırılması için projeye dahil edildi. mtDNA ve TED analizi yapıldı. Her iki analizde de ilişkili patojenik varyant saptanmaması üzerine TGD analizi planlandı.



Şekil 4-63: Aile 17 Pedigrisi.

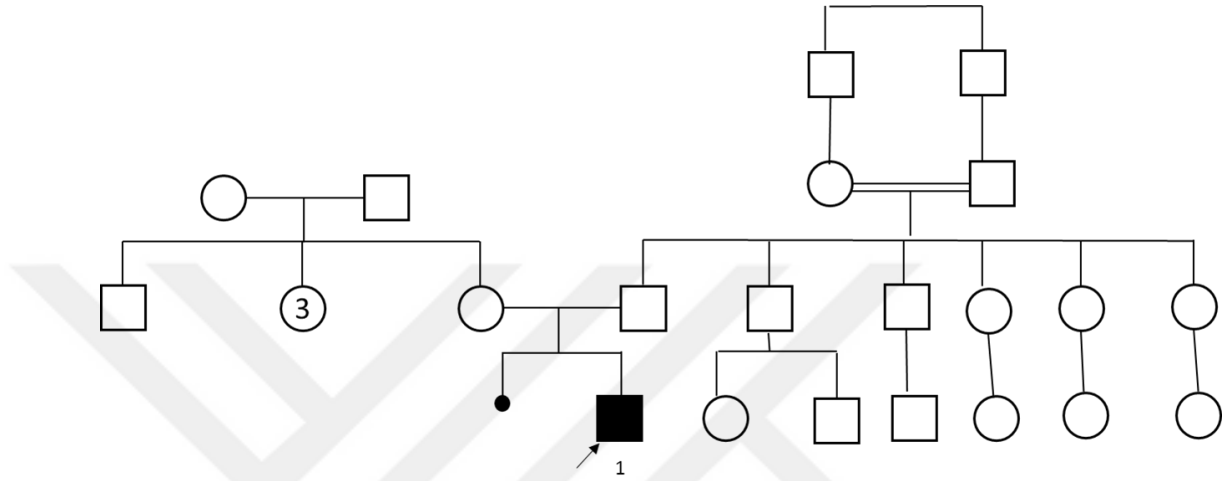
4.1.18. Aile-18 & Olgu IV-1

Sekiz yaşında erkek olgu, nöromotor gerilik, büyüme gelişme geriliği, hipotoni, lipid birikim miyopatisi, miyoklonik nöbet öyküsü ile Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalında mitokondrial hastalık klinik tanısı ile izlenmekte iken, moleküler etiyojinin araştırılması amacıyla Tıbbi Genetik AD'a konsülte edildi. Aralarında akrabalık olmayan (farklı şehir) sağlıklı 33 y anne ile 36 y babanın ikinci gebelik ürünü olarak 41.GH'da NSVY ile doğmuş (G2P1A1) (Şekil 4-64). Prenatal takiplerinde ve postanal öyküsünde özellik olamayan olgunun, emmesi

iyiymiş ve 1,5 aylıkken gülümsemiş. Anne ilk üç ay gelişimin normal olduğunu, kas gevşekliği olmadığını ifade ediyor. İki buçuk aylıkken her gün uykuda miyoklonik jerkleri oluyormuş ancak anne nöbet olduğunu anlamamış. Üç aylıkken başını tutmadığı için çocuk nörolojisine başvuran olgu, bir ay sonra kontrole çağırılmış. Beş aylıkken nöbetleri nedeniyle Göztepe EAH'de 21 gün YB yatış öyküsü var. Fenobarbital tedavisi başlanarak taburcu edilen hastaya, yapılan kas biopsisinde lipid depo miyopatisi saptanması üzerine Çocuk Metabolizma takibi önerilmiş (İTF,2011). Mitokondrial destek tedavisi başlanan olgunun, mitokondrial hastalık açısından ilgili branşlarla birlikte takipleri yapılmış. 4-5 yaşlarında strabismus nedeniyle göz takibine alınmış ve iki yıldır gözlük kullanıyor. Batın USG de böbrekte saptanan grade I-II ekojenite artışı nedeniyle nefrolojiden takipli ancak proteinüri saptanmıyor. Dört yaşında fenobarbital azaltılarak kesilmiş, ve tekrar nöbet geçirme öyküsü olmamış. EKO'su normal olan hastanın kranial MR'da her iki periventriküler derin beyaz cevherde, T2 ağırlıklı ve FLAIR sekansta hiperintens ve T2 ağırlıklı sekansta hipointens diffüz simetrik sinyal değişimleri, derin ak maddeyi tutan metabolik hastalık düşündürmektedir. Yapılan mtDNA dizi analizinde klinik durumun moleküler temeleini aydınlatacak güçte patojenik değişim saptanmamıştır. Metabolik tetkiklerinde zaman zaman laktat yüksekliği olan hastanın son analizinde N (İTF, 2017), tandem ve kaa normal ve İOA analizinde nonspesifik atılımlar saptanmış. Total hekzozaminidaz aktivitesi normal olan olgu (Düzen Lab) moleküler genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik AD' a yönlendirilmiştir. 8 yaş 1 aylık erkek olgunun, tartı 16 kg (-3,83 SD) , boy 110 cm (-3,4 SD) ve BÇ: 49,5 cm (-2,5SD) ile büyüme gelişme geriliği ve nöromotor geriliği gözlemlendi; baş kontrolü 3 yaş, desteksiz oturma 3,5 yaş (FTR ile), emekleme 4 yaş, sıralama olmamış ve halen destekle yürüyor (elinden tutarak). Heccelemeye 4 yaşında başlayan olgunun, 20 kelimesi var ancak dizartrik konuşuyordu. Trunkal hipotoni saptanan olguda DTR normoaktif ve babinski negatifti. Gözlerde dışa bakış kısıtlıydı.

Konvansiyonel karyotip analizi normal olan hastanın (46,XY, dışımerkez), yapılan array CGH analizinde klinik olarak anlamlı herhangi bir kopya sayısı değişikliği saptanmamış (İTF, 2018). Frajil X sendromu için yapılan FMR-1 geni tekrar sayısı analizi FRAXA-30 CGG, normal olarak raporlanmış (Haseki, 2017).

Mevcut öykü, klinik bulgular, görüntüleme ve laboratuvar testleri ile hastaya *solo* TED analizi yapıldı. Ancak mevcut kliniğin moleküler temelini açıklayacak herhangi bir patojenik varyant saptanmadığından TGD analizi planlandı.



Şekil 4-64: Aile 18 Pedigrisi.

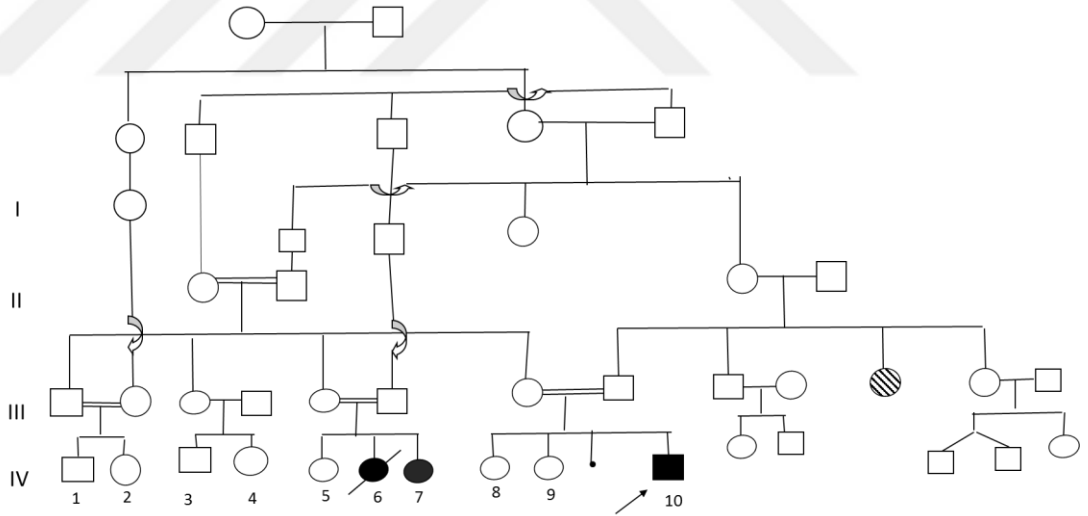
4.1.19. Aile-19 & Olgu IV-7 ve IV-10

Dört yaşında kız olgu sık düşme, koşamama, oturduğu yerden kalkma ve merdiven çıkmada güçlük, CK yüksekliği ve eks kardeş öyküsü olması nedeniyle genetik araştırma ve danışma için Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi. Aralarında ikinci derece kuzen akrabalığı olan çiftin üçüncü gebelik ürünü (G3P3Y2) (Şekil 4-65). Birinci gebelikte, antenatal ve postnatal öykü doğal ve 12 yaşında sağlıklı kız (IV-5), ikinci gebelikte, antenatal takiplerinde bebek hareketleri azmış ve 38.GH'da C/S ile doğan kız olgunun, postnatal hipotoni ve uzamış sarılık nedeniyle 10 gün YB yatış öyküsü var. Motor gelişimi geri, hipotonisi ve hepatosplenomegalisi olan bu kardeşe 3 yaşında yapılan karaciğer biopsisinde GSD Tip 3 patolojik tanısı konmuş ancak moleküler olarak doğrulanmamış. Sık akciğer enfeksiyonu geçiren olgu 3,5 yaşında solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmiş (IV-6). Üçüncü gebelikten olan olgumuz (IV-7) 33 haftalık C/S ile doğmuş ve postnatal adaptasyon sorunu ve YB yatışı olmamış. Baş tutma 3. ay, desteksiz oturma 7. ay ve yürüme 18. ayda başlayan olgunun, mental gelişimi normal değerlendirilmiş. Eks kardeş öyküsü nedeniyle

GSD tip 3 ve 1a için yapılan *AGL* ve *G6PC* geni dizi analizinde mutasyon saptanmamış (Ege TF). Yedi aylıkken yapılan tetkiklerde serum kas enzimleri yüksek saptanan olgunun değerleri giderek yükselmiş (CK: 6430↑, AST:242↑, ALT:150↑, LDH:968). İdrar OA analizinde laktat ve süksinik asit atılımı 2 kat ve 4-OH fenil laktik asit atılımı 5 kat yüksek saptanmış. Tüm batın USG'de karaciğer normal değerlendirilen olguya, kas biopsisi yapılmış ve mitokondrial solunum zinciri enzim aktiviteleri düşük raporlanmış (Hacettepe, 2017), ancak histopatolojik incelemede spesifik miyopatik değişiklik gözlenmemiş (İTF, 2017). Hem mitokondriyal yapı ve fonksiyonu değerlendiren boyamalar, hem de distrofler açısından yapılan immünhistokimyasal incelemelerde normal kas dokusu ile benzer patern gözlenmiş ve sonuç "kas liflerinin çapında hafif değişiklikler" olarak raporlanmış. Kranial MR ve EKO'su normal olan olgunun iki farklı dış merkezde yapılan klinik ekzom dizileme analizinde patojenik varyant saptanmamış (Ege TF ve İntergen) .

İlk olgunun kuzeni (IV-10) ve aralarında akrabalık olan çiftin (1.kuzen), dördüncü gebelik ürünü 13 aylık erkek olgu, motor gelişimde gecikme (baş tutma 6. ay, destekli oturma 8. ay) ve aile hikayesinde eks kuzen öyküsü olması nedeniyle, genetik araştırma amacıyla Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirildi. Annenin ilk iki gebeliğinden 14 ve 10 yaşlarında iki kız çocuğu var (IV-8,9), üçüncü gebelik abortus (17. hafta) ve dördüncü gebelik olgumuz (IV-10). Antenatal takiplerinde sorun olmayan, NSD ile preterm doğan (36.GH) olgunun postnatal adaptasyon sorunu olmamış. İlk yirmi gün emmesi zayıf olduğundan formül mamayla beslenmiş, ancak sonra emmeye başlamış. Halen tamamlayıcı beslenme ile anne sütü alıyor. Başını tutması geciktiği için ilk kez beşinci ayında çocuk Nörolojisi tarafından değerlendirilen olgunun CK'sı yüksek (CK:3210) EMG, EEG, göz ve kardiyolojik muayeneleri normal sonuçlanmış (İTF, 2018). Çocuk Metabolizma' ya konsülte edilen olgu, mitokondriyal hastalık açısından tetkik edilmiş, Tandem MS normal ve İOA analizinde nonspesifik atılımları olan hastaya mitokondriyal destek tedavisi başlanmış. Halen Çocuk Nörolojisi ve Çocuk Metabolizma tarafından takip edilen olgunun, dış merkezde yapılan klinik ekzom analizinde patojenik varyant saptanmamış (Bezmi Alem,2019). Genetik araştırma için 07.03.2019 tarihinde Tıbbi Genetik kliniğine yönlendirilen olgunun yapılan 13. ay muayenesinde, tartı 8,3 kg (10-25p), boy 74 cm (50-75p), baş

çevresi 46,4 cm (50p), motor gelişimi geri (baş kontrolü 8. ay, desteki oturma 10.ay ve destekle dikiliyor) ve mental gelişimi normaldi. Halen sıralamıyor sadece destekle dikilebiliyo ve ayakta pes planovalgus deformitesi vardı. Her iki olgunun dış merkezlerde yapılan TED verileri yeniden ve karşılaştırmalı analiz edildi. Miyopati ilişkili genlerde saptanan yanlış anlamlı varyantların birleşik heterozigot formda ve veri tabanlarında önemi bilinmeyen veya muhtemel benign olarak görülmesi olgulardaki kliniğin moleküler kökenini açıklayamadı. Olgularla ilgili olarak, üçüncü nesil dizileme için ilgili firma ile irtibat kuruldu ve yeni bir proje kapsamında TGD analizi yapılması düşünüldü. Ayrıca, hastalardan dış merkezden istenen FGF-21 ve GDF-15 testi için, mitokondriyal hastalıklarda yeni biyobelirteçler olarak kabul edilen FGF-21 ve GDF-15'in ELISA yöntemi ile analizi için kit temin edildi ve mitokondriyal hastalık düşünülen olgular, diğer miyopati olguları ve sağlıklı kontrollerle birlikte prediktif bir kesme değeri hesaplanacak şekilde çalışılması planlandı.



Şekil 4-65: Aile 19 Pedigrisi.

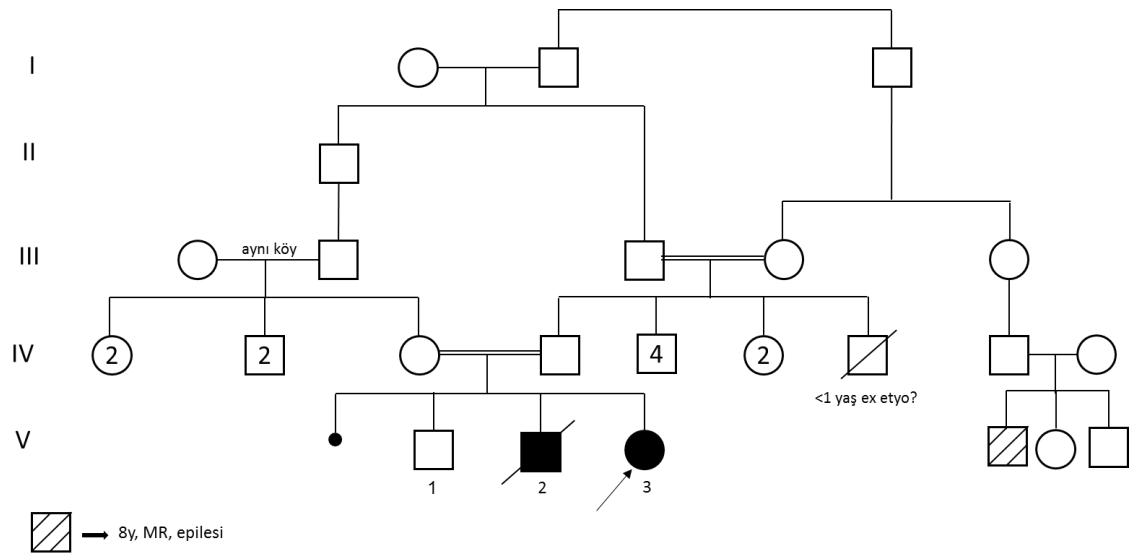
4.1.20. Aile-20 & Olgu V-3

Aralarında 1.5 derece kuzen evliliği olan 24 yaşında sağlıklı anne ile 29 yaşında sağlıklı baba'nın dördüncü gebelik ürünü olarak doğan 4.5 aylık dişi olgu, disformik bulgular, psikomotor gerilik, glokom, megakornea, mikrosefali

epileptik nöbetler, nakil gerektiren ve sebahat eden pansitopeni bulguları ile Tıbbi Genetik AD' a konsülte edildi (G4P3A1) (Şekil 4-65). G1: spontan abortus, G2: 4 yaşında sağlıklı erkek, G3: 37. GH' da NSD ile 2600gr tartı 48cm boy ile doğmuş. Perinatal asfiksi öyküsü yok. Postnatal ikinci haftada halsizlik trombositopeni ve emme güçlüğü nedeniyle yatarak tedavi görmüş (Tekirdağ DH). Kranial BT' de bilateral serebral ve serebellar hemisferlerde iskemi lehine hipodens alanlar, sol parieto-okspital fissürde kalsifikasyon izlenmiş. Göz muayenesi enfeksiyon dışında (Burkholderia cepacia üremiş) normal raporlanmış. Metabolik testlerinde, İOA hafif etanolamin artışı, KAA' da aspartik asitte orta derece artış dışında özellik yokmuş. Opistotonus, araknodaktili, trombositopeli (40.000), aPTT uzun (86sn) ve intrakranial kanama nedeniyle postnatal 20. günde eks olmuş. G4: Olguya olan son gebelik özel hastanede düzenli takipli, tarama testleri normal ancak 31. haftada polihidroamnios saptanmış. 38. GH' da NSVY ile 2630 gr tartı ve 48 cm boyda doğmuş. Trombositopeni ve megalokornea nedeniyle yatarak izlenen hastada, pansitopeni (Hb: 9-11 mg/dl, trombosit 60.000, lenfosit 1000) görülmüş. Hastanın yapılan nörolojik muaynesinde opustotonus postüründe DTR normal solda klonus gözlenmiş. Tonik spazmları nedeniyle antiepileptik başlanmış. Kranial MR' da korpus kallozumda incelmeye, sağ glob boyutlarında artış, ROP' da sağda megalokornea, korneal ödem, retina ön ve arka kamarada hemoraji, posteriorda sineşi, dekolman ve glokom saptanmış. Karaciğer ve batin USG normal olan hasta, ilgili branşlara izlem önerisi ile 4 ay sonra taburcu edilmiş. Akut lösemi paneli, DEB testi ve MPL gen dizi analizi (bilinen mutasyonlar) normal sonuçlanmış. Hematoloji ve Metabolizma takibi önerisiyle taburcu olmuş. İTF Çocuk hematolojiye 5000 trombosit sayısı ile başvuran hastaya trombosit infüzyonu yapılmış. Tıbbi Genetik AD' a konsülte edilen 4,5 aylık olgunun yapılan muayenesinde tartı 4,63 kg (-3,11 SD) boy 57,5cm (-2,64SD) baş çevresi 37,5cm (-3,41SD) genel durum iyi, şuur açık ve aktifti. Ön fontanel 1x2cm, arka fontanel kapalı, belirgin oksiput, sarı kızıl saçlar, açık sarı kaşlar, göz muayenesinde kornealar büyük ve bulanık, megalokornea, sağ sklera hemorajik, basık burun kökü, dar ve yüksek damak, hipoplastik lobüllü belirgin kulaklar izlendi. Pektus ekskavatum, ayırık inverted meme başları, 2/6 sistolik üfürüm mevcuttu. Solunum sesleri doğal, batin rahat hepatosplenomegali

olamayan ve haricen dişi olgunun, gövde opustotonus postüründe, ekstremiteler hipotonik, DTR normoaktif, solda klonus, başını tutamıyor ve ışığa dönmesi yoktu.

Ayrıca tanıda psikomotor gerilik ve pansitopeni nedeniyle Jacobsen sendromu (11q23.3 delesyon sendromu) düşünüldü ancak bu amaçla yapılan array-CGH analizinde 15q11-2q14'de, 23706111_34104221 baz çiftleri arasında LOH (heterozigozite kaybı) dışında özellik saptanmadı (İTF,2018). Ebeveynler arasında akrabalık olması nedeniyle genom boyunca başka bölgelerde de LOH saptanabilme ihtimali ile imprinted genlerin yer aldığı bu bölgede, PWS/AS bölgesi metilasyona özgü PCR yöntemi ile incelenerek normal metilasyon düzeyinde maternal ve paternal bi-allel kalıtım saptandı (İTF,2018). Benzer etkilenmiş eks kardeş öyküsü, pansitopeni (kronik trombositopeni ağırlıklı), tonik spazmlar, göz bulguları (hemoraji, megalakornea, dekolman) kızıl saç, disformizm, büyüme gelişme geriliği ve mikrosefali nedeniyle izlenen olgu YB'da kalp ve solunum desteği almaktadır. Özgün tanısı olmayan olgudan periferik yayma, kemik iliği biyopsisi istendi ve sonuçları ile birlikte ileri molekül analiz planlandı. Kromozom analizi ve mikroarray testi normal sonuçlanan olguya TED analizi yapıldı. Ancak mevcut kliniğin moleküler temelini açıklayacak herhangi bir patojenik varyant saptanmadığından TGD analizi planlandı.



Şekil 4-66: Aile 20 Pedigrisi.

5. TARTIŞMA

Tanı konulamayan KMH'nin büyük bir grubunu mitokondrial hastalıklar oluşturmaktadır. Bu durum hem klinik heterojenite hem de mitokondrial genetiğin kendine has tanı zorluklarından kaynaklanır. Yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişmesi, mitokondrial hastalıkların tanısal başarısını artırmış, klinisyenlerin bu tür hastalıklara karşı daha duyarlı olması ve sürekli artan sayıda hastalığın tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Günümüzde, patojenik mtDNA mutasyonlarının yanı sıra, mtDNA bütünlüğünü değiştiren, nükleer genlerle ilgili Mendel kalıtımına uyan mekanizmalar aydınlatılamaya devam etmektedir. Güncel çalışmalar, algoritmanın değişmesini, YND ile yapılan moleküler analizlerin, kas biopsisi gibi girişimsel işlemleri gerektiren biyokimyasal ve patolojik incelemelerin öncesinde yapılmasını önermektedir. Bu projeye dahil edilen olguların da bir çoğu (14/20) mitokondrial hastalık şüphesi olan ancak henüz moleküler etiyojinin aydınlatılamadığı olgulardı ve ailelerin yarısında moleküler etiyoji "mitokondriyal hastalık" temelinde çözümlenmiştir.

Mitokondriyal patolojiler, yani mitokondri içinde aktif olan proteinler için gerek nDNA, gerekse mtDNA tarafından kodlanan genlerdeki mutasyonlar nedeniyle mitokondriyal metabolizmayı etkileyen genetik hastalıklar 1988 yılından itibaren ilgi çekmeye başlamıştır. 1988'de, iki farklı araştırmacı grubu tarafından, sırasıyla mitokondriyal miyopati olan hastalardan alınan kas biyopsilerinde mtDNA'da büyük ölçekli delesyonlar ve mtDNA tarafından kodlanan NADH dehidrogenaz kompleks subunit 4 geninde (*MTND4*), maternal kalıtım gösteren Leber'in hereditör optik nöropatisi (LHON) ile ilişkili bir nokta mutasyonu tanımlanmıştır (281,282). Yine aynı yıl Kearns-Sayre sendromunun (KSS) genetik etiyojisinde mtDNA delesyonlarının rolü olduğu ortaya konmuştur (283). Bu gelişmelerin ardından, Mendel genetiğinden ayrı, mtDNA'nın aşağıdaki üç özelliğine dayalı yeni bir "mitokondriyal genetik" kavramı ortaya çıkmıştır (284,285):

(I) Poliplazmi, homoplazmi, heteroplazmi: Her hücre yüzlerce veya binlerce mitokondri içerir ve her mitokondri mtDNA'nın çoklu kopyalarını

barındırır (poliplazmi). Normal hücreler aynı mtDNA (homoplazi) kopyalarına sahiptir, ancak mtDNA'da mutasyon olan hastalarda mutant ve normal tip mtDNA'lar rasgele dağılım (heteroplazmi) gösterir. Heteroplazminin önemli bir sonucu olarak solunum zincirinde bozulmaların izlenmesi ve hastalığın ortaya çıkması için kritik sayıda mutant mtDNA gereklidir (eşik etkisi). Dolayısıyla, mitokondrinin tüm dokularda bulunduğu da göz önüne alındığında, mtDNA hastalıkları herhangi bir dokuyu veya tüm dokuları etkileyebilen, oldukça heterojen klinik tablolara neden olur. KSS, MELAS (mitokondriyal ensefalomiyopati, laktik asidoz ve inme benzeri ataklar), MERRF (miyoklonik epilepsi ve düzensiz kırmızı lif hastalığı), NARP/MILS (nöropati, ataksi, retinitis pigmentoza/maternal kalıtım gösteren Leigh sendromu) dahil multisistem bozuklukları mtDNA hastalıklarının tipik örnekleridir. Bununla birlikte, tek tek dokuların etkilenebileceği nadir durumlar vardır, örneğin *CYTB* genindeki mutasyonlara bağlı iskelet kası miyopatisi durumunda, iskelet kasında mutant *CYTB*'nin mutasyon yükünün eşik etkisini aşarak diğer dokulara kıyasla orantısız olarak yüksek olduğu varsayılmıştır (286). Ancak tipik olarak mtDNA ile ilişkili hastalıklar heterojen bir klinik bozukluk grubudur.

(II) Maternal kalıtım: mtDNA'daki çoğu patojenik küçük mutasyonlar maternal olarak kalıtılır (287). Mutant bir mtDNA taşıyan etkilenmiş veya etkilenmemiş bir anne, erkek ve kız tüm çocuklarına bunu geçirebilir ve hastalık, anne soyundan gelen tüm üyelerde az ya da çok şiddetli bir şekilde ortaya çıkabilir. Bu nedenle, maternal akrabalarda kısa boy, egzersiz intoleransı, diabetes mellitus veya migren baş ağrısı gibi “hafif bulgular” dahil aile öykülerinin alınması önemlidir. Aile öyküsü, maternal olarak kalıtılan mtDNA nokta mutasyonlarını daha çok sporadik olgularda görülen büyük ölçekli tek mtDNA delesyonlarının neden olduğu hastalıklardan ayırt edilmesini sağlar (288). mtDNA'da maternal kalıtımın araştırıldığı yakın zamanlı bir makalede akrabalık ilişkisi olmayan birden fazla nesli kapsayan üç ailede, yeni nesil tüm mtDNA dizileme ile paternal mtDNA'ya ilişkin değişken heteroplazmi (%24-%75) gösterilmiştir (289). Patojenik paternal mtDNA mutasyonu geçişinin etkisi halen araştırma konusudur, çünkü aynı çalışmada maternal kalıtımın yaygınlığını koruduğu ve test edilen tüm ailelerde paternal geçişin mtDNA'ya sınırlı bir katkı sağladığı gösterilmiştir. Aslında, embriyo gelişimi sırasında, muhtemelen halen

bilinmeyen otozomal dominant bir genle ilişkili mutasyona bağlı olarak paternal mtDNA'nın ortadan kaldırılmasına yol açan tam olarak anlaşılmamış mekanizmalar olabileceği öngörülmektedir.

(III) Mitotik segregasyon: mtDNA için heteroplazmik olan hücreler bölündükçe, gelecek nesle geçen mtDNA'nın mutasyon yükü normal tip ya da mutant tip lehine olmak üzere farklılaşabilir ve böylece hem genotip hem de fenotip zaman içinde değişebilir (290).

Üç teknik sayesinde mtDNA ile ilişkili hastalıkların tanısında değerli ipuçları sağlanmıştır. İlk teknik, histokimyasal olarak sitokrom c oksidaz/sodyum dehidrogenaz (COX/SDH) çift boyama yöntemidir. COX eksikliği mtDNA hastalıklarının ayırt edici özelliğidir. COX-negatif lifler, SDH ile yoğun boyanır ve kompensatuvar olarak mitokondriyal proliferasyon nedeniyle, Gomori trikrom boyama ile "düzensiz kırmızı lifler" (*ragged red fiber*) olarak görülürler. COX'un kahverengi boyası, normal liflerde SDH'nin mavi boyasına üstün gelirken, COX negatif lifler parlak mavi bir renk ("düzensiz mavi lifler") ve COX eksikliği olan lifler daha hafif mavimsi bir renk ile boyanır (291). Mitokondriyal hastalıkları olan hastalarda COX/SDH çift boyamanın genellikle kas biyopsilerinde tanısız olarak yararlı olduğu kanıtlanmıştır ve mtDNA ile ilişkili ensefalomiyopati hastaların beyin kesitlerinde aynı derecede değerlidir. İkinci ve daha duyarlı teknik, yeni bir mtDNA mutasyonunun PCR ile amplifiye edilmesine dayanmaktadır (292). Bu yöntem COX-negatif ve normal görünümlü kas liflerindeki normal tip ve mutant mtDNA'nın nispi yüzdelerini tespit eder. Bu sonuçlar yeni mtDNA varyantlarının patojenitesine dair ipuçları sunar. Üçüncü teknik, sitoplazmik hibrid fibroblast hücre hatlarının oluşturulmasını temel almıştır (293). Bu heteroplazmik veya homoplazmik hibridler MELAS, MERRF ve KSS'deki biyokimyasal sonuçları ve fonksiyonel eşik etkilerini değerlendirmek için ayırt edici modeller sağlamıştır. Hibrid hücre hatları, mtDNA ile ilişkili hastalıkların tedavisinde farklı yaklaşımları test etmek için çeşitli terapötik stratejilerde kullanılmıştır.

Mitokondriyal hastalıklarda, iki genom arasındaki ortaklık eşit değildir ve genetik köken ezici bir şekilde mtDNA bakımını, çoğalmasını ve bütünlüğünü kontrol eden nükleer genom lehinedir. mtDNA'yı etkileyen nükleer genlerdeki patojenik mutasyonlar mtDNA tükenmesi veya çoklu mtDNA delesyonları ile

karakterize edilen iki grup mitokondriyal hastalığa yol açar. Bu hastalıkların Mendelyan genetik kökenleri ortaktır ancak mtDNA hasarının "eşik etkisi" nedeniyle fenotipik heterojenite görülür. MtDNA tükenmesi kavramı, ilk kez 1991 yılında Carlos Moraes tarafından tanımlandı ve etkilenen bebeklerden alınan farklı dokularda kısmi mtDNA azalması gözlemlendi (294). MtDNA bütünlüğünü etkileyen Mendelian genetik kusurlar, çeşitli kombinasyonlarda mtDNA tükenmesini ve mtDNA'nın çoklu delesyonunu kapsamaktadır. DNA'nın yapı taşları olan deoksिनүkleozit trifosfatların (dNTP'ler) intramitokondriyal havuzunun ve mitokondriyal nükleik asit biyosentezinin kontrolünde çoklu nükleer genler yer alır. Timidin kinaz 2'yi kodlayan *TK2* genindeki mutasyonlar, en yaygın nedenler arasındadır. Wang tarafından bildirilen yaklaşık 200 hastalık mitokondriyal tükenme sendromu grubunda, *TK2* mutasyonları olan hastaların çoğunda infantil başlangıçlı formu gözlemlenmiştir. Doğumda veya doğumdan hemen sonra genel zayıflık, solunum yetmezliği ve 1 ila 3 yaş arasında ölümle sonuçlanan, iskelet kasında şiddetli mtDNA tükenmesi görülür (295,296). Son yıllarda, bu bebekler için hayat kurtaran bir tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir. Oral deoksिनүkleozitler (*TK2* enziminin substratları) farelerde mtDNA tükenmesini iyileştirmede ve artan yaşam süresinde etkinlik göstermiştir. Bu tedavi, dünya çapında 16 hastada kullanılmış ve elde edilen sonuçlar, bir klinik denemeyi başlatmıştır (297,298). *TK2* genindeki mutasyonlar, infantil başlangıçlı miyopatinin yanı sıra, iskelet kasında çok sayıda mtDNA delesyonunun eşlik ettiği, daha geç başlangıçlı klinik prezentasyonlar da göstermektedir. *TK2* gen mutasyonlarına sahip geç başlangıçlı hastalardan oral deoksिनүkleosid tedavisine cevap veren yetişkin hastalar da bildirilmiştir (298).

Çalışmamıza dahil edilen **aile 1**'deki 2 kardeş olguda ***TK2*** geninde (Timidin Kinaz 2) exon 5'te homozigot c.323C>T (p.Thr108Met) değişimi saptandı. Sonuç geç başlangıçlı miyopatik form mtDNA delesyon sendromu kliniği ile uyumluydu.

Timidin kinaz 2 (*TK2*), replikasyon için mtDNA'ya katılan ve pirimidin nükleozitlerinin (timidin ve deoksitisidin) monofosfatlarına dönüşümünü katalize eden, nDNA tarafından kodlanan bir mitokondriyal enzimdir. Mitokondriyal dNTP havuzu, mitokondri iç zarı yüklü moleküllere karşı geçirimsiz olduğundan sitozolik havuzdan ayrılır. Mitokondride de novo dNTP sentez yolağı bulunmaz.

Çizgili kas hücreleri gibi replike olmayan hücrelerde mtDNA sentezi için gerekli dNTP havuzu sadece deoksiribonükleosit kinazlar gibi mitokondriyal kurtarma yolağı enzimlerine bağlıdır. Dört insan deoksiribonükleosit kinazından ikisi, deoksiguanozin kinaz (dGK) ve timidin kinaz-2 (TK2) mitokondride eksprese edilir (299). TK2'nin otozomal resesif eksikliği ilk olarak 2001 yılında şiddetli miyopati, yüksek kreatin kinaz, mitokondriyal solunum zinciri aktivitesinin çoklu eksikliği ve kas dokusundaki düşük mtDNA kopya sayısı olan dört çocukta Saada ve ark. tarafından tanımlanmıştır (300). Bu çalışmada TK2'deki iki patojenik varyant, 90. pozisyonundaki histidinin ve 181. pozisyonundaki izolösünün asparajine dönüşmesine neden olmuştur. Bu bireylerde, TK2'nin kas mitokondrilerindeki aktivitesinin, sağlıklı kontrollerdeki ortalama değerin %14-45'ne kadar azaldığı tespit edilmiştir. TK2'deki bu mutasyonlar, mitokondriyal DNA deplesyonu için yeni bir etiyolojiye işaret etmiş ve mitokondriyal deplesyon patogeneğinde mitokondriyal dNTP havuzunun önemini vurgulamıştır. Sitoplazmik hibrid yöntemi mitokondriyal olmayan kalıtımı desteklemiştir. mtDNA replikasyonu veya promotörlerle ilişkili diğer mutasyonlar dışlanmıştır. MtDNA deplesyonu olan bir ailede bağlantı analizi, mitokondriyal transkripsiyon faktörü A, nükleer solunum faktörü1, mitokondriyal tek sarmallı DNA bağlayıcı protein ve endonükleaz G'nin tutulumunu dışlamıştır. Sitoplazmik havuzdan farklı olarak mitokondriyal dNTP havuzunun mtDNA deplesyonu patogeneğinde rol oynadığı öne sürülmüştür. mtDNA instabilitesinin tespit edildiği artan sayıda mitokondriyal hastalık, TK2, dGK, RRM2B veya TYMP eksiklikleri de dahil olmak üzere mitokondriyal deoksinükleotid havuz dengesizliği ile ilişkilendirilmiştir.

TK2'deki patojenik değişimlerin mtDNA deplesyon sendromu ile ilişkilendirildiği ilk çalışmada beyin, karaciğer, kalp ve böbrek sistemi dahil diğer organların klinik veya biyokimyasal tutulumu bildirilmemiştir. Mitokondriyal solunum zincirinde yer alan I, III, IV ve V komplekslerinin enzimatik aktivitesi kaslarda önemli ölçüde azalırken, mtDNA tarafından kodlanan proteinler içermeyen tek kompleks olan kompleks II'nin aktivitesi nispeten normal bulunmuştur. Bu çalışmada etkilenen bireylerin farklı dokularındaki mtDNA/nDNA oranının, sağlıklı bireylerle karşılaştırılması hastalığın organlara özgü doğasını desteklemektedir. Mitokondriyal kinazlar, TK2 ve dGK (*DGUOK*) ve

sitozolik deoksisitidin kinaz (dCK), evrimsel olarak yakından ilişkilidir. dGK genindeki mutasyonlar da TK2'deki mutasyonlara ek olarak mtDNA depleksiyonunun bir nedenidir. Ayrıca timidin fosforilaz genindeki mutasyonlar, mitokondriyal nörogastrointestinal ensefalomiyopati (MNGIE) sendromu olan hastalarda mtDNA depleksiyonuna neden olur.

Mitokondriyal DNA depleksiyon sendromu (MTDPS); ortak olarak mtDNA'ya ilişkin kantitatif bir kusurun gözleendiği klinik olarak heterojen bir kalıtsal hastalık grubudur. MtDNA değişimleri, tükenme, deleksiyon ve nokta mutasyonlarını içerebilir. MTDPS 'li bireylerin aile öyküsü genellikle otozomal resesif kalıtıma işaret eder. Tip 2 (MIM#609560 miyopatik tip), TK2 geni ile ilişkilidir ve etkilenen kişilerin çoğu yenidoğan döneminde kas güçsüzlüğü, karaciğer yetmezliği veya laktik asidemi ile ilişkili renal tübulopati ile başvurmuş ve yaşamlarının ilk yıllarında kaybedilmiştir. Diğerlerinde, motor regresyon ile ilişkili izole miyopati veya erken çocukluk döneminde başlayan yavaş ilerleyen ensefalomiyopati izlenmiştir. Daha geç başlangıçlı olgularda (>12yaş) bulgular siliik olmakla birlikte çocuklukta başlar (yavaş koşma) ve tüm hastalarda zamanla yürüme zorlaşır ve solunum için ventilatör desteği gerekir. Ek belirtiler, pitoz, PEO, disfaji, dizatri/disfoni, solunum yetmezliği, kardiyomiyopati, periferik nöropati ve işitme kaybıdır.

Yakın zamanda yapılan bir analizde, 25'i yeni tanı olmak üzere 92 hastadan oluşan bir kohortta TK2 eksikliğinin bulguları ve doğal öyküsü geriye dönük olarak incelenmiştir (295). Bu analiz sonucunda klinik ve moleküler genetik bulgulara dayanarak, farklı sağkalım gözlenen üç fenotipi tanımlanmıştır: (1) şiddetli mtDNA depleksiyonu, sık nörolojik tutulum ve erken mortaliteye hızlı progresyon ile infantil başlangıçlı miyopati (medyan başlangıç sonrası sağkalım (median *post-onset surviva IPOS*) 0.58 ila 2.33 yıl) (%42); (2) mtDNA depleksiyonu, generalize zayıflığın orta ila şiddetli progresyonu ve en az 13 yıl medyan POS ile çocukluk çağı başlangıçlı miyopati (%40.2) ve (3) başlangıçta hafif ekstremitte zayıflığı ve 23 yıllık medyan POS ile solunum yetmezliğine yavaş ilerleyen geç başlangıçlı miyopati (%17.4). TK2 eksikliğinde başlangıç yaşı, progresyon hızı ve POS üç klinik alt tipi tanımlayan önemli değişkenlerdir. Sinir sistemi tutulumu sıklıkla infantil başlangıç formunun klinik

seyrini zorlaştırırken, ekstraoküler kas ve yüz tutulumu geç başlangıç formunun karakteristiğidir. İskelet kası biyopsilerinin incelenmesi infantil başlangıçlı ve çocukluk başlangıçlı miyopatilerde şiddetli mtDNA depleksiyonunu ortaya koyarken, geç başlangıçlı miyopatide mtDNA kopya sayısında kısmi azalma veya multipl mtDNA depleksiyonlarını göstermiştir. Birkaç *TK2* mutasyonu spesifik klinik formlarla ilişkili olmasına rağmen (örn. infantil başlangıçlı olgularda protein trunkasyonu ve geç başlangıçlı miyopatide yanlış anlamalı), 12 mutasyon genel olarak farklı fenotiplerle ilişkilendirilmiştir. Mutasyon tipine ve protein lokasyonuna dayalı genotip-fenotip korelasyonları açıkça tanımlanamamıştır. Bu çalışmada en sık, p.Thr108Met varyantı, heterojen kliniği olan 13 hastada (üç infantil başlangıçlı, altı çocukluk başlangıçlı ve dört geç başlangıçlı birey) homozigot formda saptanmıştır. Substrat bağlanma bölgesi (ekson 5 tarafından kodlanır) ve aktif bölge (ekson 8) mutasyonların sık görüldüğü bölgelerdir. Varyantların genomik lokalizasyonuna dayanarak 5. ekzonun bir hotspot olduğu doğrulanmıştır ve 8. ekzonda *TK2* patojenik varyantlarının sık gözlemlendiği bildirilmiştir (301). Ekson 5, deoksiniükleozid kinaz alanında enzim dimerizasyonu ve nükleozid tanıma için gerekli olan $\alpha 4$ sarmalını kodlar. Ekson 8 ise, ATP ve kataliz fosfat gruplarının bağlanması için gerekli olan başlık bölgesinin bir bileşeni olan $\alpha 8$ sarmalını kodlar (302). Klinik tablonun çeşitliliği nedeniyle *TK2* eksikliğine yetersiz tanı konabilir. Tanı ölçütlerinin ve klinik bulguların değişkenliğine ilişkin artan farkındalık hastalığın daha iyi tanınmasına yol açabilir. Pre-klinik çalışmalarda *TK2* H126N knock-in fare modelinde pirimidin deoksiniükleozid monofosfatlar ve deoksiniükleozid terapilerinin güvenliliği ve etkililiğinin gösterilmesiyle özellikle önem kazanmıştır (303). Aile 1'de olgu III-7 ve III-11, heterojen bir klinik fenotipe sahipti, büyük kardeşte miyopatik bulguların başlangıç yaşı 16-17 olarak tarif edilirken, küçük olan 10 yaş sonrası bulgu vermişti. Miyopati dışında, disfaji, dizatri/disfoni, solunum güçlüğü mevcuttu ve nörolojik tutulum yoktu. *TK2* eksikliği olan hastada CK seviyeleri yükselebilir ancak normal CK, *TK2* eksikliğini dışlamaz. Miyoglobülin ve rabdomiyoliz nadirdir. Bizim hastamızda da ılımlı bir CK yüksekliği vardı. Literatürde %69-77 pozitif olarak bildirilen, kas biopsisinde mitokondrial miyopati lehine bulgular, çok sayıda *ragged red* lif, COX negatif ve daha SDH yoğun lifler mevcuttu. Daha önce mtDNA analizi ve MNGIE için *TYMP* gen analizi yapılmış

ancak mutasyon saptanmamıştı. Çalışmamızda TED analizi ile ekzon 5'te saptanan ve daha önce bildirilmiş olan c.323C>T (p.Thr108Met) değişimi ile tanının kesinleşmesi, hastalara ilaca erken erişim şansı sağladı. Ebeveynleri birinci derece kuzen olan ve akraba evliliğinin sık olduğu bu ailede, moleküler tanı diğer bireylere taşıyıcılık testi ve genetik danışma ile prenatal veya preimplantasyon tanı olanaklarını sundu.

Çalışmamız kapsamında **aile 2**'de, etkilenmiş iki kardeş olguda, *POLG* geninde (mtDNA polimeraz gama, katalitik subunit) exon 4'te homozigot c.911T>G (p.Leu304Arg, rs121918044) değişimi saptandı. Her iki olgunun kliniği, göz kaslarının tutulumu ile başlayan ve progresyon gösteren miyopati ile uyumluydu. Göz hareketini kontrol eden kasların tutulumuna bağlı olarak göz kapaklarında sarkma (pitoz) mevcuttu. Nöromotor retardasyonu olmayan ve 5-6 yaşlarına kadar normal büyüme gelişme gösteren olguların, bu yaşta başlayan progresif eksternal oftalmopleji (PEO) bulguları, literatürden farklı olarak erken başlangıçlı ve progresif tipteydi. Etkilenmiş büyük kardeş, 18 yaşında solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmişti.

Progresif eksternal oftalmoplejide, *POLG* genindeki mutasyonlar, diğer *POLG* ilişkili hastalıklarda görülen genel mtDNA tükenmesinden ziyade, etkilenen kas dokusunda büyük mtDNA delesyonlarına neden olmaktadır. mtDNA delesyonlarının PEO spesifik belirti ve semptomlarına nasıl yol açtığı tam olarak belirlenememiştir ancak göz kaslarının, enerji için özellikle oksidatif fosforilasyona bağımlı olması nedeniyle özellikle etkilendiği öne sürülmüştür (304,305).

POLG geni, polimeraz gama (pol γ) enziminin, aktif alfa alt birimini kodlar. Pol γ , mitokondride aktif olan ve mtDNA'yı kopyalayabilen tek DNA polimerazdır. DNA polimerazlar ayrıca DNA onarımında kritik roller oynarlar. mtDNA replikasyonu, topoizomerazlar ve RNaz H aktiviteleriyle birlikte çekirdek replikasyon proteinleri DNA polimeraz γ , mitokondriyal tek zincirli DNA bağlayıcı protein ve Twinkle mtDNA helikazı içeren replikomdaki proteinlerin işbirliği ile gerçekleşir. İnsan Pol γ , kromozomal lokusta 15q25'teki *POLG* tarafından kodlanan 140kDa'lık bir katalitik alt birim olan *POLG* ve dimer oluşturan ve kromozomda 17q24.1'deki *POLG2* tarafından kodlanan 55 kDa'lık bir aksesuar

alt birim olan POLG2'den oluşur. POLG, DNA polimeraz, 3'→ 5' ekzonükleaz ve 5'-deoksiriboz fosfat liyaz aktivitelerine sahiptir (306). Bu alt birim, bağlayıcı bölgede karboksi terminal polimeraz alanına bağlanan bir amino terminal ekzonükleaz alanı içerir. POLG2, katalitik alt biriminin DNA afinitesini artırarak polimeraz işlenebilirliğini artırır (307). Van Goethem ve arkadaşları 2001 yılında OR ve OD kalıtlı, mtDNA'da delesyonların olduğu PEO ilişkili 4 *POLG* mutasyonu yayınladılar (304). Bir ailede, bileşik heterozigot formda bulunan iki yanlış anlamalı mutasyondan biri bizim olgularımızda homozigot formda bulunan ekson 4' de c.911T>G (p.Leu304Arg) değişimi, diğeri ise ekson 7'de c.1399G>A (p.Ala467Thr) değişimidir. 229 kontrolden üçü A467T için heterozigottu (allel T frekansı % 0.6), L304R mutasyonları ise hiçbir kontrol örneğinde gözlenmedi. Erişkin başlangıçlı OD formda, pitozis ve yavaş seyirli kas zayıflığı varken, OR formda klinik heterojen ve daha ağır seyirliydi. 2003 ve 2005 arasında, çeşitli raporlarda ataksisi olan hastalarda *POLG* mutasyonları saptanmıştır (308,309). Ayrıca, Alpers-Huttenlocher sendromunun (AHS) *POLG*' deki resesif mutasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (310). Norveç ve Fin popülasyonlarındaki *POLG* mutasyonlarının yüksek sıklığı, ataksi sendromlarında birinci basamak tanı olarak *POLG* testinin yapılmasına neden olmuştur. *POLG* 'deki patojenik varyantların, moleküler temelleri bilinmeden çok önce klinik olarak tanımlanan çakışan fenotiplere neden olduğu bildirilmiştir. *POLG* mutasyonları, bir Londra kohortunda PEO olgularının ~% 25'ini ve büyük bir İtalyan kohortunda olguların ~% 10'unu etkilemiştir. *POLG* mutasyonu tespit edilen 46 yetişkin hastadan oluşan bir serinin %83'ünde PEO bildirilmiştir ve bu olguların yarısından fazlasında ensefalomiyopati gözlenmiştir. *POLG* ile ilişkili hastalıkların başlangıç yaşı, bebeklikten geç yetişkinliğe kadar değişir ve *POLG* mutasyonları en az altı ana sendromdan sorumludur (311). AHS, çocukluk çağında başlayan ilerleyici ve şiddetli ensefalopati, inatçı epilepsi ve karaciğer yetmezliği ile karakterizedir. Çocukluk çağında miyoserebrohepatopati spektrumu (MCHS), gelişim geriliği, laktik asidoz, miyopati ve karaciğer yetmezliği ile prezente olur. Tipik olarak oftalmoplejinin eşlik etmediği, miyoklonik epilepsi, miyopati, duyuşal ataksi (MEMSA), spinoserebellar ataksi ve epilepsi (SCAE) kliniği gösterir. Ataksi nöropati spektrumu mitokondriyal

resesif ataksi (MIRAS) ve duysal ataksi, nöropati, dizartri ve oftalmopleji içerir (SANDO).

İnsan DNA Polimeraz Gama Mutasyon Veritabanında *POLG* geninde 300'den fazla patojenik varyant bildirilmiştir. *POLG* mutasyonlarının sonucunda multipl mtDNA delesyonları ve mtDNA depleasyonu meydana gelir. *POLG* mutasyonları için doğrudan genotip-fenotip korelasyonları belirgin değildir. Aynı mutasyon sıklıkla mtDNA delesyonlarına, mtDNA depleasyonuna veya her ikisine birden yol açabilir ve bu da fenotipin gözlemlenen mutasyonlara göre öngörülmesini zorlaştırabilir. Örneğin, en yaygın *POLG* mutasyonu olan p.A467T için homozigotluk, çocukluk çağında başlayan ölümcül AHS'den MEMSA, ANS ve SANDO'ya kadar bir dizi fenotip ile ilişkilendirilmiştir. Nöronlarda mtDNA depleasyonunun epilepsi gelişiminde tetikleyici olduğu ileri sürülmüştür ve ön veriler, *POLG* mutasyonunun neden olduğu mtDNA fenotipi ile klinik fenotip arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (312). Örneğin, şiddetli mtDNA depleasyonu olan bir çocukta AHS, multipl mtDNA delesyonu olan bir hastada ise SANDO izlenmiştir ve her iki bireyin de homozigot p.A467T *POLG* genotipine sahip olduğu belirtilmiştir (313).

Mutasyonların Pol γ yapısı üzerinde modellenmesi, patojenik nitelikteki varyantların beş ayrı bölgede kümелendiğini ortaya koymuştur (314). AHS tablosunun oluşması için, iki farklı korunmuş bölgeyi etkileyen mutasyonların bir kombinasyonun gerektiği görülürken, ataksi fenotiplerinin, *POLG2* tarafından kodlanan aksesuar alt birimiyle etkileşimi modifiye eden, intrinsik proses alanını etkileyen bölgelerle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Bu beş ayrı kümeye dayanarak, bilinen mutasyonların klinik sonuçlarını öngörmeye yardımcı olmak için bir *POLG* Patojenite Öngörü Sunucusu oluşturulmuştur (315). Bununla birlikte, aynı *POLG* mutasyonlarına sahip hastalarda *POLG* ile ilişkili hastalığın başlangıç yaşı ve progresyonu birkaç dekad sürebilir ve bu da öngörülerini zorlaştırır. Shamima Rahman ve arkadaşları, bulguların, genetik modifiye ediciler (nDNA veya mtDNA), bağışıklık disfonksiyonu, viral enfeksiyon ve mitokondriyal toksinler gibi çevresel etkiler dahil olmak üzere diğer faktörlerin etkisiyle hastalığın fenotipinin değiştiğini kaydetmiştir (316).

Mitokondriyal hastalığa ek olarak, mtDNA mutasyonları yaşlanma sürecinde rol oynar ve çeşitli kanıtlar DNA polimeraz hatalarının mtDNA mutasyonunda belirgin bir rol oynadığını göstermektedir (317). mtDNA'daki mutasyonlar, spontan DNA replikasyonu hataları veya onarılmamış mtDNA hasarları nedeniyle ortaya çıkabilir. POLG, yüksek nükleotid seçiciliği ve ekzonükleolitik proofreading sayesinde, sentezlenen 500.000 nükleotid başına sadece bir kez meydana gelen nükleotid insersiyon hata olayları ile olağanüstü yüksek doğrulukta DNA replikasyonu sergiler (318). Replikasyon doğruluğuna katkıda bulunan intrinsik 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi, POLG'nin korunmuş ekzonükleaz I motifinde Asp198 ve Glu200'in alanine değişmesiyle tamamen ortadan kalkabilir. In vivo mutasyon spektrumunun in vitro insan Pol γ tarafından üretilen hata spektrumu ile karşılaştırılması, mtDNA'daki nokta mutasyonlarının temel tetikleyicisi olan Pol γ'ye bağlı biyosentetik hataları güçlü biçimde göstermiştir. Ayrıca, yaşa özgü mtDNA dizilerinin analizi, mutasyon paternlerinin, oksidatif hasarın etkilerinden çok polimeraz hatalarıyla daha uyumlu olduğunu ortaya koymuştur (319). Bu nedenle, Pol γ'ye bağlı spontan replikasyon hataları mtDNA'daki baz yer değiştirme mutasyonlarının çoğundan sorumludur ve yaşlanma sürecinde mtDNA'da nokta mutasyonlarının ve delesyonlarının birikmesine yol açabilir (317).

Çalışmamız kapsamında, **aile 3**'de tek indeks olguda, anne baba arasında akrabalık yoktu ve üçlü (trio) TED analizi ile **EARS2** geninde (mitokondriyal glutamil-tRNA sentetaz 2) exon 3'te heterozigot c.319C>T (p.Arg107Cys) ve exon 7'de heterozigot c.1283delC (p.Pro428Leufs*3) değişimi saptandı. Paternal alelde saptanan p.Pro428Leufs*3 değişimi daha önce bildirilmemişti. Hastamızın klinik öyküsünde erken başlangıçlı hipoglisemik nöbetler vardı ve 1,5 yaşında, başını tutamama, hipotoni, epileptik nöbetler nedeniyle Beslenme ve Metabolizma polikliniğinde takip ve tedavi altındaydı. Genetik olarak tanımlanmamış infantil başlangıçlı mitokondriyal ensefalopatilerin çoğunluğunda, mitokondriyal DNA ile ilişkili solunum zinciri komplekslerinin çoklu defektlerine ilişkin biyokimyasal özellikler göze çarpmaktadır ve YND ile küçük hasta gruplarında, tek bir ailede ve hatta tek bir hastada yeni hastalık lokuslarının tanımlanması sağlanmıştır. Bu yöntemle her geçen gün artan sayıda mutasyon bildirilen **ARS** gen ailesi, mitokondriyal

aminoasil-tRNA sentetazları kodlar. Mitokondriyal aminoasil-tRNA sentetazlar, yeni sentezlenen polipeptit zincirine amino asit eklenmesini katalizleyen bir enzim grubudur ve translasyonda önemli rol oynarlar. Protein sentezi ve ekspresyonunun doğruluğunu sağlarken, oksidatif fosforilasyon enzimlerinin fonksiyonuna da katkıda bulunurlar (320). Bu gen ailesinde, şimdiye kadar 19 gen tanımlanmıştır ve bu genlerin 16'sındaki biallelik varyantlar hastalık ile ilişkilendirilmiştir (321). Klinik fenotipler değişkendir. Nörolojik bulguları, erken başlayan şiddetli merkezi sinir sistemi hastalığı, sensörinöral işitme kaybı ve beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) lökodistrofidir. Ek olarak, karaciğer, böbrek, göz ve kalp tutulumları bildirilmiştir.

Mitokondriyal aminoasil-tRNA sentetaz eksikliklerinin tanısı moleküler genetik araştırmalara dayanmaktadır. Steenweg ve ark'ın, MRG bulguları benzerlik gösteren 12 olguyu içeren çalışmasında, sorumlu genleri tanımlamak için, kas ve fibroblastlarda oksidatif fosforilasyon bozukluğunu gösteren biyokimyasal ve morfolojik özelliklere dayanarak mitokondriyal hastalık tanısı konulan bir hastaya ekzom dizileme uygulanmıştır (322). Veriler, MitoP2 SVM skoru >1 ve resesif kalıtım paterni dikkate alınarak incelendiğinde, tek aday gen olarak mitokondriyal DNA translasyonunda yer alan ve glutamat (E) için spesifik olan mitokondriyal glutamil-tRNA sentetazı kodlayan *EARS2* tespit edilmiştir. Maternal allelede p.Arg168Gly değişikliğine neden olan yanlış anlamlı c.502A>G ve Leu insersiyonuna neden olan c.1279_1280insTCC mutasyonları ve paternal allelede, p.Arg108Trp değişikliğine neden olan c.322C>T mutasyonu tespit edilmiştir. Her iki ebeveyn de karşılık gelen alleller için heterozigot bulunmuştur. Bu hastanın beyin MR görüntülemesi, periventriküler sınırı korunan geniş simetrik serebral beyaz cevher anormallikleri ve talamus, orta beyin, pons, medulla oblongata ve serebellar beyaz cevherin simetrik sinyal anormalliklerini göstermiştir. Proton manyetik rezonans spektroskopisinde laktat artışı görülmüştür. Bu görüntüleme paterni, 3000'den fazla vakanın MR görüntüsünü içeren Amsterdam lökoensefalopati veritabanında taranmış ve akrabalık ilişkisi olmayan 11 olgu ile eşleştirilmiştir. Bu hastalarda, *EARS2* geni dizilendiğinde birleşik heterozigot allelik mutasyonlar saptanmıştır. Bu 12 hastanın hepsi şiddetli MR anormallikleri ve vücut sıvılarında laktat artışı ile birlikte infantil başlangıçlı ve hızla ilerleyen bir klinik sergiliyordu . Yazarlara

göre bu sonuçlar yeni bir spesifik mitokondriyal hastalık durumunun varlığına dair kanıt sağlamıştır; talamus ve beyin sapı tutulumlu lökoensefalopati ve yüksek laktat, "LTBL" (*Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate*) olarak tanımlanmıştır. MR görüntü paterninin, genetik tanıya giden yolda tanı için standart biyokimyasal çalışmadan daha güvenilir bir ipucu sunduğu belirtilmiştir. Hastalardaki ortak MR görüntü paterni, yaşamın ilk yılında gelişim geriliği ile karakterize nörolojik sendrom ile ilişkili bulunmuştur. Çoğu hastada, açık, hızlı nörolojik bozulma başlamadan önce gelişim geriliği gözlenmiştir. Klinik olarak hafif gruptaki hastalarda sonraki yıllarda MR görüntülemeye belirgin iyileşme ve azalan laktat seviyeleri izlenmiştir, buna karşılık şiddetli olarak tarif edilen grup MR görüntülemeye beyin atrofisi ve kalıcı laktat artışları ile karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, bu ciddi şekilde etkilenen hasta grubu da zamanla klinik stabilizasyon göstermiştir. İyileşme büyük olasılıkla ilk atağın neden olduğu beyin hasarının şiddetine bağlıdır. Hasar şiddetli ve geri döndürülemezse, ciddi kalıcı beyin atrofisi ortaya çıkar. Hücresel bozukluk, önemli derecede sinir hücresi sağkalımı ve iyileşmesi ile uyumluysa, beyin gelişimi ve olgunlaşması meydana gelir ve bu da klinik iyileşmeye yol açar. Bu veriler *EARS2* mutasyonlarının özellikle beyin gelişimini etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmada hastalarda ciddi klinik bozulma, beyin anormallikleri ve mitokondriyal yolakta temel bir bileşenin bozulmasına rağmen, mutant enzimin fonksiyonel yeterliliğinin kısmen korunduğunu gösteren tutarsız biyokimyasal değişimler izlenmiştir. Diğer mitokondriyal ARS'lerdeki (örneğin *DARS2* ve *RARS2*) mutasyonlar da, aynı biyokimyasal tutarsızlığa işaret eder (323,324). Yazarlar mitokondriyal DNA translasyon kusurlarında, özellikle mitokondriyal ARS'leri içerenlerde, hastalık belirti penceresinin dar olduğunu belirtmişlerdir. Bu yolak yaşam için gereklidir, dolayısıyla çoğu mutasyon ya ekstrauterin sağkalıma olanak sağlamayacak kadar etkilidir ya da belirgin bir fenotipe neden olamayacak kadar hafif etkilidir. Sonuç olarak, etkilenen bireyler nadirdir ve seçilmiş ve izin verilen bir mutasyon grubu sergiler. Bu durumun bu hasta grubundaki birleşik heterozigot mutasyonların, genellikle daha zararlı bir değişikliğe yol açan bir nonsense mutasyon ve daha hafif bir missense mutasyondan oluşmasını açıklayabileceği belirtilmiştir. Olgumuzda tespit edilen birleşik heterozigot mutasyon da benzer

özelliği sergilemiştir. İlginç bir şekilde, benzer moleküler genetik durumlar, yani homozigot mutasyonların olmaması veya bileşik heterozigot fonksiyon kaybı artı hafif değişikliklerin predominant kombinasyonu, mutant *DARS2* ve *RARS2* taşıyan hastalarda da ortaya çıkar (323,324). Bu da, izin verilen dar pencerenin, farklı mitokondriyal ARS mutasyonlarında ortak bir patofizyolojik mekanizmanın altında yatan genel bir durum olabileceğini düşündürmektedir. İlginç bir klinik gözlem, birçok mitokondriyal bozuklukta görülen aşırı ve rastlantısal klinik heterojenliğinin aksine, mitokondriyal ARS'leri kodlayan genlerdeki mutasyonların genellikle spesifik klinik sendromlarla ilişkili olmasıdır. *DARS2* mutasyonlarında beyin sapı ve omurilik tutulumlu lökoensefalopati ve yüksek laktat (LBSL), *RARS2* mutasyonlarında pontoserebellar hipoplazi tip 6 (PCHD-6) ve *EARS2* mutasyonları ile ilişkili LTBL örnek olarak verilebilir. Olgumuzun MR görüntüleme bulguları ve kliniği literatürle karşılaştırıldığında, nöromotor geriliğe rağmen nispeten iyi bir gelişme göstermiştir.

Al Balushi ve ark. tarafından yayınlanan yakın zamanlı retrospektif bir olgu bildirisinde mitokondriyal aminoasil-tRNA sentetaz eksiklikleri olan hastaların fenotip ve genotipleri bildirilmiştir (320). Burada *EARS2* eksikliği olan hastada yaşamın ilk yılında global gelişim geriliği, genel distoni ve diskinezi kaydedilmiştir. Bu hastada doğumda apgar skorları düşük bulunmuş, doğum sırasında resüsitasyon uygulanmış ve hipoksik-iskemik ensefalopati tanısı konmuştur. Serum AST ve plazma laktat seviyeleri hafifçe yükselmiştir. Bu hastada tüm ekzom dizileme ile patojen olduğu öngörülen c.293C>T (p.Ala98Val) mutasyonu homozigot formda bildirilmiştir. Bu çalışmada *EARS2* eksikliğinde beyin MRG'sindeki ilk FLAIR görüntülerinde izole bilateral globus pallidus değişiklikleri gösterilmiştir, ancak hipoksinin nöro-görüntüleme özellikleri veya *EARS2* eksikliğinin diğer tipik MRG özellikleri saptanmamıştır. *DARS2* eksikliği olan hastalarda nispeten normal bilişsel işlevler ve spastisite ile kaba motor gelişimde gecikme belirgin özellikler iken, *EARS2* ve *PARS2* eksikliği olan hastalarda bilişsel işlev bozukluğu ve hareket bozuklukları izlenmiştir. *EARS2* ve *PARS2* eksikliği olan hastalarda nöbetler tek bir anti-epileptik ilaçla iyi kontrol edilmiştir. *EARS2* ve *RARS2* eksikliği olan hastalarda hafif AST yüksekliği ve *PARS2* eksikliği olan hastada karaciğer fonksiyon bozukluğu bulunmuştur. Yazarlar tüm ekzom dizileme sayesinde gelecekte

mitokondriyal aminoasil-tRNA sentetaz eksikliklerine ilişkin muhtemelen daha fazla hasta tanımlanmasını beklemektedir. Önemi bilinmeyen varyantların patojenitesinin yorumlanması zor olabildiğinden, genetik tanının doğrulanmasında mitokondriyal aminoasil-tRNA sentetaz eksikliği olan hastaların fenotip, genotip ve beyin görüntüleme özelliklerinin entegre bir yaklaşımla kullanımı yararlı olacaktır. Farklı, nadir ve potansiyel olarak zararlı varyantların benzer fenotipi paylaşan ve akraba olmayan hastalarda keşfedilmesi, genotip-fenotip nedenselliğini göstermek için altın standarttır.

Çalışmamızda aile 4'deki indeks olguda yapılan TED analizinde, **MICOS13 geninde** (*Mitochondrial Contact Site And Cristae Organizing System, 13-Kd Subunit*) intron 3'te homozigot c.260-2A>G değişimi saptandı. Bu varyantın hastalıkla ilişkisinin ilk kez bildirildiği, akraba evliliği ürünü olan Irak'lı bir olguda, bu homozigot kırılma bölgesi (splice site) mutasyonu, ekson 4'ü 21 bç eksilten ve ekson 4'ün 44 bç silinmesiyle çerçeve kaymasına neden olarak erken dur kodonu oluşturan iki anormal transkripte neden olmuştu (325). Bizim olgumuzda da, kültüre kas hücrelerinden elde edilen RNA ve cDNA'dan, transkript dizisinin belirlenmesi için Sanger yapıldı ancak kaliteli okuma alınamadığından yeniden primer dizayn edilmesi planlandı. İlk bildirilen olgunun hastamızla benzer hepatoensefalopatik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları vardı ve 22 aylıkken kaybedilmişti Olgumuz, postnatal üçüncü gün emmeme, sarılık, solunum sıkıntısı, ağır metabolik asidoz ve hiperamonyemi bulguları ile YB ünitesinde metabolik hastalık ön tanısıyla 1 ay tedavi almıştı ve sonrasında ilerleyen klinik bulguları ile beslenme ve metabolizma polikliniğinde takip altındaydı. 15 aylık iken ağır metabolik asidoz ve solunum yetmezliği nedeniyle kaybedildi.

Yakın zamanda tanımlanmış mitokondriyal temas bölgesi ile krista organizasyon sistemi (MICOS) kompleksi mitokondriyal membran yapısını dinamik olarak düzenler. MICOS kompleksindeki kusurlar sadece mitokondriyal mimariyi değil, aynı zamanda füzyon, metabolik sinyalizasyon, lipid trafiği ve hücresel elektrik homeostazını da etkiler (326). Mitokondri, farklı iç bölmeler oluşturan iki zarı kapsayan karmaşık bir topoloji sergilemektedir. Mitokondriyal iç zar (IMM, *inner mitochondrial membrane*), oksidatif fosforilasyon için gerekli solunum komplekslerinin varlığının bir sonucu olarak protein bakımından

olağanüstü yoğundur. IMM, iç sınır membranı (IBM, *inner boundary membrane*) ve cristae membranları dahil olmak üzere morfolojik ve bileşimsel olarak farklı alt alanlara sahiptir. Bu karmaşık mimari, krista bağlantıları (CJ, *cristae junctions*) ve temas bölgeleri (CS, *contact sites*) olarak adlandırılan yapılar tarafından korunur. Krista membranları, krista kavşakları olarak da adlandırılan dar açıklıklar ile iç sınır membrandan ayrılır, böylece fonksiyonel ayrılmış bölmeler oluşur ve bunlar protein taşınması, oksidatif fosforilasyon ve apoptoz gibi çok sayıda mitokondriyal yolak için gereklidir. İç membran organizasyonunda yer alan bu protein kompleksinin mayalarda ve insanlarda yüksek oranda korunduğu ve mayalarda solunum fonksiyonu için önemli olduğu keşfedilmiştir. Kanıtlar, MICOS'un CJ'leri oluşturmaya ve/veya stabilize etmeye ve mitokondri içerisindeki cristae'nin yerleşimini, dağılımını ve kopya sayısını belirlemeye yardımcı olduğunu göstermektedir. Fizyolojik enerji ve oksijen mevcudiyetindeki değişikliklerin cristae ve CJ'lerin morfolojisini etkilediği bildirilmiştir (327). MERRF sendromu, fatal neonatal laktik asidoz, mtDNA kusurları ve hipertrofik kardiyomiyopati gibi birçok mitokondriyal hastalığa mitokondriyal ultrastrüktürdeki değişiklikler ve CJ kaybı eşlik eder (328). Bu nedenle, CJ'lerin ve CS'lerin nasıl oluştuğu ve düzenlendiğinin ortaya konması, sağlık ve hastalık durumunda cristae dinamiklerinin için çok önemlidir. Guarani ve ark., cristae bağlantıları ile ilişki proteinleri sistematik olarak taramışlar ve QIL1 olarak adlandırılan daha önce bilinmeyen bir proteini bulmuşlardır. Sonrasında, QIL1'in MIC10 adı verilen bir proteinin cristae bağlantılarını dış membrana sabitleyen protein kompleksine bağlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar insan MICOS'unun sistematik proteomik analizi ile QIL1'i (C19orf70) yeni bir korunmuş MICOS alt birimi olarak belirlemiştir. QIL1 depleksiyonunun, insan hücre kültürlerinde ve in vivo olarak *Drosophila* kasında ve nöronlarında CJ yapısını bozduğu gösterilmiştir. Spesifik olarak, yapılan bu araştırmalarda hücrelerdeki QIL1/MIC13 kaybı, insan MIC10, MIC26 ve MIC27 proteinlerinde destabilizasyonuna yol açmış ve sonuç olarak IMM'de şiddetli morfolojik kusurlar meydana gelmiştir (325). Diğer çalışmalarda bazı MICOS alt birimlerinin genetik olarak yokluğunun, mitokondriyal parçalanmaya, solunumun azalmasına, CJ kaybına ve IBM bağlantısı kesilen konsantrik IMM yığınlarının oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (329). Ayrıca, bazı MICOS alt birim

protein seviyesindeki değişiklikler, mutasyonlar ve protein modifikasyonları, diyabetik kardiyomiyopati, epilepsi, Parkinson hastalığı ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (330). Bir çalışmada, insan hücrelerindeki MIC10/MINOS1 protein etkileşimlerinin proteomik analizi kullanılarak, IM çekirdek alt birimlerine ek olarak, OM proteinleri SAMM50, MTX1, MTX2 ve şaperon DNAJC11 tanımlamıştır (331). Aynı zamanda faredeki DNAJC11 mutasyonlarının mitokondriyal bozulmaya, krista anormalliklerine ve motor nöron patolojisine yol açtığı saptanmıştır.

Zeharia ve ark., hepatosellüler disfonksiyonun eşlik ettiği ağır nörodejeneratif bozukluk ile başvuran ve akraba evliliği olan bir aileden gelen kız ve erkek kardeşte, ilk defa insanda bir MICOS alt biriminde mutasyon tanımlamışlardır (332). Kız olgu, sorunsuz bir gebelikten sonra 42. gebelik haftasında normal vajinal yolla doğmuştur. Gestasyonel yaşına göre küçük (2600 g, 5-10. persentil) olduğu tespit edilmiştir. Apgar skorları sırasıyla 1 ve 5 dakikada 9 ve 10 olarak kaydedilmiştir. Üç aylıkken büyüme-gelişme geriliği için değerlendiren hastanın, nörolojik muayenesinde, istemli hareketlerin yokluğu, trunkal hipotoni, baş kontrolünün gecikmesi, ekstremitte spastisitesi, hareketli periferik tendon refleksleri ve pozitif Babinski bulgusu tespit edilmiştir. Fundoskopi muayenesi bilateral optik atrofiyi göstermiştir. Bir yaşında, beyin MRG'de serebellar ve vermis atrofişi saptanmıştır. Diğer sistemlerde tutulum gözlenmemiş olup, ekokardiyografi normal olarak bildirilmiştir. Hasta vejetatif kalmış ve gastrostomi ile beslenmeye başlamıştır. 2.5 yaşında başlayan tedaviye dirençli miyoklonik nöbetler nedeniyle 5 yaşında kaybedilmiştir. Erkek kardeşte benzer bulgular bildirilmiştir ve 12 aylıkken beslenme yetmezliği ve koma ile hastaneye yatan hasta 3 gün sonra kaybedilmiştir. Her iki hastada da pik düzeylerde plazma alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi ve pıhtılaşma sorunları ile karaciğer fonksiyonlarının bozulduğu bildirilmiştir. Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu ve peroksizomal biyogenez kusurları ile protein glikozilasyon kusurları, normal açılakarnitin ve çok uzun zincirli yağ asitleri profili ile plazma transferrin izoelektrofoküsleme testi ile dışlanmıştır. Plazma laktat düzeylerindeki sürekli artış her iki hastada da mitokondriyal solunum zinciri kusurunu düşündürmüştür. Laktat 4–6 μM (referans: 1.3 μM), alanin seviyesi 464 μM (referans: 350 μM) idi. İdrarda organik asit analizinde, 3-metilglutakonic

ve 3-metilglutarik asitlerin atılımındaki artış gözlenmiştir. Kas mitokondrial enzim aktiviteleri normal sınırlarda bulunmuştur. Ancak karaciğer dokusundaki anormal enzimatik patern, mtDNA tarafından kodlanan proteinlerin sentezinde bir kusur olduğuna işaret etmekle birlikte, erkek kardeşin fibroblastlarında mtDNA/ nDNA oranının normal aralıkta olması yanı sıra kandan analiz edilen mtDNA'nın normal bulunması yazarların karaciğer dokusundaki mitokondriyal solunum zinciri kusurunun mtDNA replikasyonundaki bozulmanın bir sonucu olmadığını düşünmesine yol açmıştır. Homozigot haritalama ve ekzom dizileme ile, bu iki hastanın, MICOS kompleksinin bir bileşeni olan MICOS alt birimlerinin stabilitesi için gerekli olan 118 amino asitlik proteini kodlayan *QIL1/MIC13* (*C19orf70*) genindeki c.44delC, p.Gly15Glufs*75 varyantı için homozigot olduğu bulunmuştur. Ebeveynleri ve iki sağlıklı kız kardeşin heterozigot taşıyıcı olduğu tespit edilmiştir. Hasta fibroblastlarında, hem MICOS alt birimleri *QIL1/MIC13* hem de *MIC10* saptanmamıştır, ancak *MIC60*'ın sağlıklı kontrole benzer düzeyde olduğu gösterilmiştir. Yazarlar insandaki *QIL1/MIC13* eksikliğinin, MICOS kompleks bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte krista morfolojisinde bozulma ve mitokondriyal solunum disfonksiyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır. Bu nedenle, kardiyolipin yeniden şekillenme kusurlarıyla sonuçlanan *TAZ* veya *DNAJC19* varyantları ve mitokondriyal fosfolipid metabolizması kusuruyla sonuçlanan *SERAC1* varyantları dahil olmak üzere, 3-metilglutakonik asidüri ile ilişkili IMM düzenleyici etkenlerin bozulduğu, artan sayıdaki hastalıklar grubuna dahil edilmiştir (333).

Olgumuzunda da literatürde bildirilen klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları mevcuttu. Karaciğer fonksiyon bozukluğunu destekleyen biyokimyasal sonuçları vardı. Tandem de alanin yüksek ve MRG'de serebellar vermis inferioru hipoplazik görünümdeydi. İndeks olgudaki homozigot değişimi, akraba olan ebeveynleri heterozigot formda taşıyordu ve sağlıklı olan ablasında bu varyant saptanmadı. Aileye, bir sonraki gebelik için preimplantasyon ve prenatal genetik tanı olanakları konusunda genetik danışma verildi.

Çalışmamızda aile 5'deki indeks olgu ve etkilenmiş kardeşinde yapılan paired TED analizinde, *ECHS1* geninde (enoyl-CoA hydratase, short chain 1) exon 2'te heterozigot c.202G>A; p.Glu68Lys ve heterozigot c.161G>A (p.Arg54His) değişimi saptandı. Aralarında akrabalık olmayan çiftin 12 ve 10

yaşında etkilenmiş iki oğlu progresif nöromotor gelişim geriliği, spastisite, trunkal hipotoni ve beyin MR'da bazal ganglion tutulumu nedeniyle Tıbbi Genetik polikliniğinde tetkik ediliyordu.

ECHS1 tarafından kodlanan kısa zincirli enoil-CoA hidrataz (SCEH veya ECHS1), yağ asitlerinin ve valin gibi esansiyel amino asitlerin oksidasyonunda rol oynayan çok fonksiyonlu bir mitokondriyal matriks enzimidir. ECHS1, doymamış trans2-enoil-CoA türlerini, çift bağa bir molekül su ilavesiyle karşılık gelen 3(S)-hidroksi asil-CoA'ya dönüştürür. Oldukça geniş bir substrat özgüllüğü gösterir, ancak kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyon spiralinin anahtar bileşeni olan krotonil-CoA'ya karşı en yüksek aktiviteye sahiptir. ECHS1, ayrıca izolösin ve valinin katabolik yollarında da aktiftir. Valin katabolizmasında, metakrilil-CoA'yı (S)-3-hidroksiizobütiril-CoA'ya ve akrilol-CoA'yı 3-hidroksipropionil-CoA. Dönüştürür.

Haack ve ark.'ın 2015 yılında yaptığı çalışmada, mitokondriyal enerji metabolizmasında bozulma şüphesi olan 435 bireyden oluşan bir kohortta tüm ekzom dizileme uygulanmış ve birleşik heterozigot veya homozigot *ECHS1* mutasyonları taşıyan ve akrabalık ilişkisi bulunmayan 10 hasta bildirilmiştir (334). Bu kohortta saptanan 13 farklı *ECHS1* mutasyonundan sadece biri, c.431dup, p.Leu145Alafs*6, erken protein trunkasyonu ve fonksiyon kaybını öngörmüştür. Tespit edilen diğer tüm mutasyonlar, ECHS1 fonksiyonunun tamamen kaybının embriyonik dönemde ölümcül olabileceğini gösterecek şekilde yanlış anlamlı (missense) varyantlardır. c.268G>A, p.Gly90Arg varyantı hariç, hepsinin hastalığa neden olduğu tahmin edilmektedir (MutationTaster2) (335). Tüm varyantlar nadir olmasına rağmen (MAF < 0.05%), biri bizim ailemizde de saptanan c.161G>A olmak üzere, üç mutasyon birden fazla ailede tanımlanmıştır (c.161G> A, p.Arg54His, n = 3; c.176A> G, p.Asn59Ser, n = 2 ve c.476A> G, p.Gln159Arg, n = 2) ve tüm bu olgularda diğer allelde farklı mutasyonlar saptanmıştır. Ek olarak, akrabalık ilişkisi olan bir ailede homozigot durumda c.476A> G, p.Gln159Arg mutasyonu bulunmuştur. Bununla birlikte, bu analizde *ECHS1* geni için mutasyonel bir hotspot bildirilmemiştir, tanımlanan mutasyonlar, ekzon 1 ve 7 hariç, *ECHS1*'deki 8 kodlayan ekzonun tümüne dağılmış görünmektedir. Bu çalışmada, bir alleli olgumuzdaki varyant olan c. [161G> A ; 817A> G] p.[Arg54His ; Lys273Glu] mutasyonu, akrabalık ilişkisi

olmayan ebeveynlere sahip bir erkek çocukta rapor edilmiştir. Apgar skorları 1 dakika sonra 8 ve 5 dakika sonra 9 olarak kaydedilen hastada, doğumda hafif generalize kas hipotonisi ve beşinci aya kadar beslenme sorunları gözlenmiştir. Daha sonra klinik durumu kötüleşmiş ve dinmeyen ağlama nöbeti ve yutkunma problemleriyle birlikte ciddi ensefalopati gelişmiştir. EEG'de 1 ve 3 yaşında hiperaritmi ve multifokal epileptik aktivite görülmüştür. Hastalık boyunca ekstremitelerde ekstenel hipotoni ve hipertoni izlenmiştir, zamanla distonik hareketler azalmış ancak nöromotor gelişim geriliği devam etmiştir. Laboratuvar testlerinde kronik demir eksikliği anemisi bulguları ve 6 yaşında yapılan fizik muayenede mikrosefali, skolyoz ve kas hipotonisi saptanmıştır. Çocuk 7.5 yaşında akciğer enfeksiyonu sırasında solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmiştir. Bir yaşındaki beyin MRG'sinde kaudat çekirdeği, korpus kallozum, mezensefalon ve pons atrofisi saptanmıştır. Bu değişikliklerin 4 yaşında ilerleyici olduğu tespit edilmiş, özellikle frontal ve temporal loblarda bilateral olarak beyaz ve gri cevher beyin atrofisini takiben subaraknoid boşluk ve ventriküler sistemin genişlemesi izlenmiştir. Beyin MR spektroskopisi, bazal gangliyonlarda en belirgin olmak üzere genel bir azalma ortaya koymuş, ancak laktat yükselmesi rapor edilmemiştir. 1 ve 4 yaşlarında kardiyak ultrasonda yapısal veya fonksiyonel patoloji görülmemiştir. İskelet kası örneğinin biyokimyasal analizinde, solunum zinciri kompleksleri I-V için normal sitrat sentaz (CS) aktivitesi, ancak genel ATP üretiminde azalma gözlenmiştir. Hastalardan elde edilen fibroblast hücre dizilerinde immüno blotting, enzim aktivite ölçümü ve palmitat yükleme testi gerçekleştirilmiştir. ECHS1 protein seviyelerinde ve 2-enoil-CoA hidrataz aktivitesindeki azalma ilgili mutasyonların patojenitesi için ilave kanıtlar sağlamıştır. Bizim olgularımızda da olduğu gibi, serum asilkarnitin profilleri büyük ölçüde normal olmakla birlikte, hasta fibroblastlarında in-vitro palmitat yüklemesi, kısa zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal β -oksidasyonundaki fonksiyonel kusuru gösterecek şekilde butirilkarnitin artışını ortaya koymuştur. Valin katabolik yolağında potansiyel bir akriloyl-CoA türevi olan 2-metil-2,3-dihidroksibütiratın idrarla atılımı, valin oksidasyonunun bozulmasına işaret edecek şekilde önemli ölçüde artmıştır. Serum laktat yükselmiş ve beyin manyetik rezonans görüntülemesinde, mitokondriyal enerji metabolizması bozukluklarında görülen beyaz cevher

değişiklikleri veya Leigh benzeri bir patern izlenmiştir. Hastalar, yaşamın ilk yılında hastalık başlangıcı ile neonatal ölümden erişkinlikte sağkalıma kadar değişen heterojen bir fenotip göstermiştir. En belirgin klinik özellikler sırasıyla ensefalopati sağırılık, epilepsi, optik atrofi ve kardiyomiyopati olarak kaydedilmiştir. ECHS1 eksikliğinin yeni Leigh benzeri bir sendrom olduğu, ancak Leigh sendromunun diğer formlarından klinik ve biyokimyasal olarak ayırt edilebildiği ortaya konmuştur. ECHS1 eksikliğindeki şiddetli klinik tabloya rağmen, kas ve deri biyopsi örneklerinde sadece dört hastada piruvat oksidasyonu ve ATP üretiminde hafif değişimler ve NADH:CoQ oksidoredüktazda (solunum zincirinin kompleks I) veya sitokrom c oksidaz (solunum zincirinin kompleks IV) aktivitesinde artış izlenmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, tüm bu hastalar kaybedilmiş, oysa bu analizlerde değişiklikler olmayan hastalar yaşamaya devam etmiştir. Bizim hastalarımız da potnatal 3. ayda başlayan gerileme progresif olarak devam etmiş, ancak metabolik testlerinde hafif laktat yüksekliği dışında pozitif bulgu saptanmamıştır. Distoni, vertikal nistagmus bulguları ile beyin MRG de bazal ganglion, putamen tutulumları ECHS1 eksikliğini desteklemektedir.

ECHS1 eksikliğinde, primer OXPHOS eksikliğine benzeyen uzun zincirli asil-CoA dehidrojenaz eksikliği (LCHAD, *long-chain 3-hydroxyl-CoA dehydrogenase*) ve mitokondriyal üç işlevli protein eksikliği (MTP, *Mitochondrial trifunctional protein*) ile de klinik örtüşme saptanmıştır. LCHAD ve MTP eksikliğinde, gelişme geriliği, hipotoni ve lipid depolama miyopatisi, epilepsi kardiyomiyopati, yenidoğanlarda ve bebeklerde ani ölüm sık görülür. ECHS1 eksikliğinin aksine, LCHAD/MTP eksikliği olan bireylerde genellikle hepatik disfonksiyon, retinopati ve periferik nöropati görülür, ancak genellikle distoni ve sensörinöral işitme kaybı yoktur. İlginç bir şekilde, uzun zincirli yağ asitleri ve asil-CoA'nın birikmesinin, LCHAD ve MTP eksikliği olan bireylerde enerji metabolizmasını inhibe eden mitokondriyal toksinler olarak hareket ettiği düşünülmektedir (336).

ECHS1 eksikliği ve 3-hidroksiizobutiril-CoA hidrolaz (HIBCH) eksikliği olan bireylerin nörolojik fenotipleri çarpıcı şekilde benzerdir. Yakın zamanda Leigh hastalığı ve HIBCH eksikliğine benzer klinik ve biyokimyasal değerleri olan iki kardeş ECHS1 mutasyonları bildirilmiştir (337). Her ikisinde

de doğumdan kısa süre sonra generalize hipotoni, emme güçlüğü, solunum yetmezliği ve gelişme geriliği ortaya çıkmıştır. Ağır bir klinik seyirle her ikisi de 4 ve 8 aylıkken kaybedilmiştir. ECHS1 ve HIBCH eksikliği arasındaki klinik ve biyokimyasal benzerliklere rağmen, ECHS1 eksikliği olan hastaların fibroblastlarında veya kas biyopsi örneklerinde HIBCH eksikliği olanlara göre oksidatif fosforilasyon bozukluğu daha nadirdir. Bununla birlikte, saptanabilir OXPHOS eksikliği olan ECHS1 hastalarında ciddi hastalık tablosu rapor edilmiş ve bebeklik veya erken çocukluk döneminde kaybedilmişlerdir.

Fitzsimons ve ark, Leigh sendromu kliniği ile bebeklik döneminde başvuran, akrabalık ilişkisi olan iki aileden dört hastada (bir Pakistanlı ve bir İrlandalı gezgin), GC/MS ile idrar organik asit analizinde, eritro-2,3-dihidroksi-2-metilbütirat ve 3-metilglutakonat (3-MGC) seviyelerinde artış gözlenmiştir (338). LC-MS/MS ile analiz edilen metakriil-CoA ve akrilol-CoA ile ilişkili metabolitlerin idrarda artan atılımı ECHS1 eksikliğini düşündürmüştür ve bu sonuç hasta fibroblastlarında doğrulanmıştır. Her iki ailenin de *ECHS1* geninde homozigot patojenik varyantlar olduğu gösterilmiştir (Pakistanlı ailede c.476A>G (p.Gln159Arg) ve İrlandalı ailede c.538A>G (p. Thr180Ala). Bu değişimlerden, c.538A>G varyantının önceden Kanada kökenli bir kurucu mutasyonu temsil ettiği varsayılmıştır, ancak bu çalışmada tüm genom dizileme verilerinden elde edilen SNP'ler kullanılarak yapılan genotipleme analizinde daha önce bildirilen Kanadalı hastalar ve İrlandalı aile için ortak bir haplotip çalışması, bu varyantın İrlanda kökenini desteklemiştir. Bu çalışmada dört hastanın hepsi benzer klinik ve biyokimyasal özellikler ile progresyon göstermiştir. Hepsinde merkezi hipotoninin erken görülen ortak bir bulgu olduğu belirtilmiş ve ağır gelişim geriliği gözlenmiştir. Her olguda progresif beslenme sorunları belirgindir ve süreç ilerledikçe, nöbetler ve apneik atakların daha sık ve şiddetli hale geldiği kaydedilmiştir. Dört hastanın beyin görüntülemesinde bazal ganglionlarda Leigh sendromu ile uyumlu, progresif bilateral simetrik lezyonlar görülmüştür. Dört hastanın üçünde serebral ve serebellar atrofi ve sol bazal gangliyonun MRS'sinde çift laktat piki tespit edilmiştir. Hastalar 13 aylık, 21 aylık, 28 aylık ve 4 yaşında kaybedilmiştir.

Haack ve ark. yeni tanımladıkları bu hastalıkta, β -oksidasyon kusurunun ve valin metabolizmasındaki blok nedeniyle, toksik metakriil-CoA ve akrilol-CoA

birikimi ve toksik 2-enoilCoA bileşiklerinde artışın diyetten etkilendiği göz önüne alındığında, ECHS1 eksikliği için tedavinin mümkün olabileceğini öne sürmüşlerdir. ECHS1 eksikliğinde etkilenen tüm amino asitler (valin, izolösin ve lizin) esansiyel amino asitlerdir ve diyetle alımlarının katabolizmalarını etkilemesi beklenmektedir. Hastalarımızın da Beslenme ve Metabolizma Polikliniğinde beslenme tedavisi planlanması için takip altına alınması sağlanmış, ayrıca yeni gebelik planı olan aileye preimplantasyon ve prenatal tanı olanakları konusunda da kapsamlı bir genetik danışma verilmiştir.

Çalışmamızda **aile 6** 'da indeks olguda TED analizinde *NDUFAF6* geninde (NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Complex I, Assembly Factor 6) exon 5'te c.479delA ve intron4'de c.420+784C>T varyantı saptandı. *NDUFAF6* veya eski adıyla *C8orf38* geni, ökaryotlar arasında yüksek oranda korunmuş olan ve mitokondriyal solunum zinciri kompleksi 1'in erken birleşme aşamasında önemli rol oynayan bir mitokondriyal proteini kodlar. *NDUFAF6*'daki bialelik yanlış anlamlı mutasyonlar, mitokondriyal kompleks I eksikliğine bağlı Leigh sendromu vakalarıyla ilişkilendirilmiştir (369,370,371). Leigh sendromunun en sık nedeni oksidatif fosforilasyon kusurlarıdır ve yakın tarihli bir makalede *NDUFAF6* en sık mutasyona uğrayan nükleer genlerden biri olarak tanımlanmış olup, azalmış kompleks I aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (372). Bianciardi ve arkadaşları, *NDUFAF6*'da patojenik heterozigot yanlış anlamlı varyantı (c.532G> C: p.A178P) ve mutasyona uğramış alelin neredeyse tek alelelik transkripsiyonel düzeyde ekspresyonunu, Leigh sendromu ve mitokondriyal kompleks I eksikliği görülen bir hastada tanımlamıştır. Otozomal resesif bir kalıtım modeli varsayılmış, ancak ikinci patojenik varyant gösterilememiştir. (370). Cataina ve ark. Leigh sendromundan etkilenen ve aynı heterozigot yanlış anlamlı mutasyonu barındıran iki kardeş ve biri önceden Biancardi tarafından bildirilen vaka olmak üzere farklı aileden diğer iki olguda, ikinci alelik mutasyonun tüm etkilenmiş bireylerde bulunan derin intronik bir varyant olduğuna dair kanıt sunmuşlardır. mRNA analizi sayesinde, intron 4'de görülen derin intronik varyantın (c.420+784C>T) alternatif bir kırılma bölgesinin oluşumundan sorumlu olduğunu göstermişlerdir (373). İntronik varyantın etkilerini değerlendirmek için aile üyelerinin taze kan örneklerinden RNA

ekstrakte edilmiş ve cDNA sentezlenmiştir. cDNA amplifikasyonu (ekson 3'ten ekson 7'ye) ve dizileme için tasarladıkları özgün primer çiftini kullanmışlar ve hem kardeşlerin hem de annelerinin örneklerinde ek bir transkript saptamışlardır. Bu transkript, alternatif kırılma izoformlarına karşılık gelmiş (örn. ENST00000520757.1 veya XM_005250791.1), fazladan 124 nükleotid uzunluğunda bir ekson ve transkriptin erken bir stop kodon oluşması nedeniyle veri tabanlarında prematür anlamsız değişim aracılı yıkıma (decay) uğrayacağı tahmin edilmiştir. İlginç bir şekilde, alternatif kırılma alıcı bölgesi, rs749738738 varyantının 11 nükleotit aşağısına yerleşmiştir ve *insiliko* tahminler, mutant diziye bir alıcı alan oluşturmak için yüksek skor vermektedir. Diğer ailede de transkriptin alternatif kırılma izoformunun artan ekspresyonu, hastanın fibroblastlarından saflaştırılan RNA üzerinde de doğrulanmıştır. NGS kullanılarak *NDUFAF6* transkriptlerinin analizinde, bu varyantı olmayan kontrol örneklerindeki düşük ifade düzeyleriyle karşılaştırıldığında, intronik varyantı olan bireylerde alternatif izoformun aşırı ifade edildiği doğrulanmıştır. *İnsiliko* tahminlerine uygun olarak, transkript verileri intronik varyantın, alternatif kırılma olayını teşvik ettiğini, böylece genin fonksiyonel olmayan varyant izoformunun ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Benzer bir klinik sergileyen İtalya'dan üç akraba olmayan ailede, oldukça nadir görülen iki varyantın belirlenmesi, aileler ve ortak kurucu alleller arasında bildirilmemiş veya bilinmeyen ilişki olasılığını artırmış ve *NDUFAF6* genomik bölgesinde bulunan 7 tagSNP'yi kullanarak bir haplotip analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm hastalar ortak *NDUFAF6* alellerini barındıran aynı haplotipi göstermiş, bununla birlikte, kromozom 8 üzerinde bulunan çevre genlerde oldukça farklı varyant profili kurucu etkinin yakın zamanda oluşmadığını düşündürmüştür.

Üç yaşından sonra kazanılan becerilerin kaybı, yürüyememe, konuşamama, distonik kasılmalar, skolyoz, ellerde kontraktür gibi literatürde bildirilen olgularla benzer klinik özellikleri olan olgumuzda da, aynı derin intronik varyant, daha önce hastalık ilişkisi bildirilmemiş olan c.479delA (p.E160f) (rs774800472) değişimi ile birleşik heterozigot formda gösterilmiştir. Çerçeve kaymasına sebep olan ikinci patjenik değişimle birlikte bu sonuçlar, MR bulgularının da desteklediği Leigh Sendromu ile uyumlu bulunmuş ve moleküler etiyoloji “Mitokondriyal kompleks I eksikliği, nükleer tip 17” olarak aydınlanmıştır.

Bu tip, olgumuzla aynı derin intronik değişimin bildirildiği diğer *NDUFAF6*-mutant vakalarında da ortak gözlenen, etkilenen yapılara bağlı olarak izole serebellar veya ekstrapiramidal belirtiler, erken çocukluk döneminde kazanılan beceri kaybı ile başlangıç (1-5 yıl) ve stabil veya yavaş ilerleyen seyirle, bilişsel tutulum ve nöbetlerin görülmediği bir Leigh sendromudur.

Kodlanmayan bölgelerinin hastalıklarla ilişkisini gösteren varyantlarla ilgili çalışmalar hızla artmaktadır. Bu olguda elde edilen sonuçlar, TED veri analizinin, transkript/protein üzerinde zayıf bir öngörülebilir etkiye sahip olanlar dahil tüm nadir varyantları hesaba katması gerektiğine işaret etti. mRNA analizinin tamamlayıcı bir strateji olarak TED'e entegre edilmesi, tanımlanmış varyantların, özellikle de kırılmayı ve transkriptlerin stabilitesini etkileyen zararlı etkilerinin gösterilmesi bakımından son derece yararlı olacaktır.

Çalışmamızda **aile 7**'de indeks olgu ve sağlıklı kardeşinde yapılan ikili TED analizinde, *FBXL4* geninde (F-Box and Leucine-Rich Repeat Protein 4) exon 8'de homozigot c.1444C>T; p.R482W değişimi saptandı. Daha önce Gai ve arkadaşları tarafından Suudi Arabistanlı akraba ebeveynlerden doğan 3 kardeşte homozigot formda tanımlanan bu varyant, proteinde evrimsel olarak korunmuş amino asit kalıntıları içerir. Lösinden zengin tekrar domaininde p.arg482trp değişimiyle sonuçlanır (374). Homozigot haritalama ve ardından tüm ekzom dizi analizi ile gösterilen bu varyant, 242 Suudi ekzomunda, 4.500 Avrupa kontrol havuzunda veya Exome Variant Server veritabanında bulunmuyordu. Bu çalışmaya dahil edilen tüm olgular, farklı klinik ağırlıkta, erken başlangıçlı laktik asidemi, hipotoni, ensefalomiyopatinin neden olduğu gelişme geriliği, MR da beyaz cevher, derin gri çekirdekler ve beyin sapı yapılarında değişken tutulum ve serebral atrofi gibi ortak özellikleri taşıyordu. Olgumuzdaki c.1444C>T; p.R482W değişiminin görüldüğü üç kardeş olgudan ilki, Arap kökenli sağlıklı birinci kuzen ebeveynlerin ilk çocuğuydu. Dört yaşında şiddetli laktik asidoz atağı sırasında kaybedilen bu çocuk için kayıtlar yetersizdi. İkinci erkek kardeş 9 yaşındaydı ve aralıklı plazma laktat yüksekliği, şiddetli bilişsel gerilik (IQ 50) ve egzersiz intoleransı, hafif yüz dismorfizmi vardı ancak mikrosefali yoktu. Altı aylık olan üçüncü erkek kardeşte doğumda neonatal depresyon, tekrarlayan şiddetli laktik asidoz vardı ancak büyüme parametreleri ve yüz görünümü normaldi. Ebeveynler kas ve cildi biyopsisini reddetti. Aynı

mutasyonda bile gözlenen bu klinik heterojenite, bildirilen diğer yanlış anlamlı mutasyonlarda da mevcuttu. Bizim olgumuzda intrauterin 26. haftada başlayan gelişme geriliği, hipotoni, motor gelişim basamaklarında gerilik vardı ancak postnatal dönemde laktik asit yüksekliği ile giden ağır bir metabolik kriz tariflenmedi. Metabolik açıdan değerlendirilmek üzere 15. ayda İTF' ye yönlendirildiğinde laktik asit yüksek, KAA da alanin yüksek ve OA analizinde mitokondrial hastalıkla uyumlu atılımları tespit edilmişti. Kas biopsisinde kombine OXPHOS enzim eksikliği vardı ve histopatolojisi lipid depo miyopatisi olarak raporlanmıştı. Hipertrofik kardiyomiyopati nedeniyle kardiyoloji takibindeydi. Şu an 9 yaşında, Denver gelişim testi %50 geri, verbal becerisi kısıtlı ve konuşma terapisi ile ancak bir kaç cümle kurabiliyor.

FBXL4, bir kısmı fosforilasyon bağımlı ubiquitinasyon ve/veya G protein reseptör bağlanmasında rol oynayan F-box protein ailesinin bir üyesidir. Adını ilk olarak gözleendiği siklin F'den (CCNF;MIM*600227) alan F kutusu, SKP1'i (S-Phase Kinase-Associated Protein 1) bağlayan yaklaşık 40 amino asitlik bir motiftir. FBXL4 gibi F-box proteinleri, fosforilasyon bağımlı ubiquitinasyonda işlev gören SCF'ler (SKP1, cullin, F-box proteinleri) adı verilen modüler E3 ubiquitin protein ligazlarının bileşenleridir. Bu aile, lösin açısından zengin tekrarlara (FBXL'ler, ör., SKP2), WD40 domaine (FBXW'ler, ör., BTRCP) sahip C terminali içerebilir veya tanınabilir motifler içermiyebilir (FBXO'lar, ör., CCNF) (375). FBXL4'ün mitokondriye hedeflendiği ve zarlar arası boşlukta lokalize yaklaşık 400 kDa'luk bir protein kompleksine katıldığı gösterilmiştir (374). Bu veriler, FBXL4'ün biyoenerjetik homeostazın ve mtDNA bakımının kontrolündeki rolünü kuvvetle desteklemektedir. Kombine OXPHOS enzim eksikliğine neden olan *FBXL4* mutasyonlarının, erken bebeklik döneminde başlayan mitokondriyal ensefalomiyopati ile mtDNA tükenme sendromu 13 (MTDPS13) ile ilişkilendirildiği bir başka çalışmada, fatal ensefalopati, laktik asidoz ve kasta mtDNA tükenmesi bulguları ile başvuran Suudi Arabistan'dan 3 farklı ailede, TED ve segregasyon analizi yoluyla, *FBXL4*' de OR, anlamsız ve kırılma hatası mutasyonları belirlenmiştir (376). *FBXL4*'ün mitokondride lokalize olan bir F-box proteini olduğu ve bu proteindeki fonksiyon kaybı ve kırılma hatası mutasyonlarının ciddi bir solunum zinciri enzim eksikliğine, mitokondriyal membran potansiyeli kaybına ve dinamik mitokondriyal ağ ve nükleoid

dağılımında bir bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir. Yabanıl tip *FBXL4* transkriptinin, etkilenen bireylerden alınan fibroblast hücre dizilerinde ekspresyonu, mitokondriyal biyokimyasal eksikliğin düzeltilmesine yol açarak mtDNA kopya sayısının seviyelerini tamamen kurtardığından, *FBXL4*'teki mutasyonların hastalığa neden olduğu ve *FBXL4*'ün mtDNA bütünlüğünü ve stabilitesini korumada olası bir role sahip bir mitokondriyal protein olduğunu göstermektedir.

Klinik, morfolojik, biyokimyasal, görüntüleme bulguları ile değerlendirilen ve *FBXL4* mutasyonu bildirilmiş olan 21 kişiyi kapsayan çalışmada, fenotip genotip korelasyonu net olarak tanımlanamamıştır (377). Yenidoğan/erken infantil dönem başlangıçlı laktik asidoz, hipotoni, beslenme sorunları ve gelişme geriliği ilk başvurudaki karakteristik özellikler olup dismorfik yüz özellikleri, hastaların % 67'sinde tarif edilmiştir. Yedi çocuk kaybedilmiş (ortalama yaş 37 ay) ve 11 çocuk yaşıyordu (ortalama 46 aylık takip yaşı), üç çocuk edilememiştir. Hayatta kalanların tümünde şiddetli psikomotor gerilik vardı. Yeni doğanlarda beyin görüntüleme spesifik değildi, ancak daha sonra başlayan, hızla ilerleyen beyin atrofisi ifade edilmiştir. Yüksek kan laktatı ve metabolik asidoz tüm bireylerde gözlemlenmiş, %45'inde kreatin kinaz yüksekliği görülmüştür. Hastalık seyri sırasında tipik semptom paterni genellikle nörobilişsel bozukluk, psikomotor gerilik ve gelişim geriliği olup sadece kaç kişide, mitokondriyal hastalığın sinir sistemi tutulumu ile ilişkilendirilen nöbetler, işitme, konuşma ve hareket bozuklukları gibi özellikler bulunuyordu. Mitokondriyal OXPHOS fonksiyonunu destekleyen ilaç tedavileri etkili olmamıştır. Bir başka çalışmada, Norveçli bir ailede akraba olmayan ebeveynlerin 3,5 yaşındaki tek erkek çocuğunda, klinik, biyokimyasal ve serebral MR'da MTDPS13 ile uyumlu özelliklerle birlikte *FBXL4*'te yeni bir yanlış anlamlı varyant bildirilmiştir (378). c.1442T>C; p.Leu481Pro değişimi, veritabanlarında, 149 Norveç kontrolü, 440 kişiden elde edilen tüm ekzom veri havuzunda bulunmadı ve *insilikoda* protein işlevi için zararlı tahmini vermiştir. Kas dokusunda (kompleks I-IV) ve kültüre deri fibroblastlarında (kompleksler I-V) kompleks enzimlerinin aktivitesi normaldi ancak kasta mtDNA tükenmesi gösterilerek bu varyantın öngörülen patojenitesi doğrulanmıştır. Bu çalışmada mitokondriyal ensefalomiyopati gibi klinik

endikasyon varlığında kompleks enzimlerinin aktivitesi normal olsa bile *FBXL4* sekanslaması yapılması gereği önerilmiştir.

Erken başlangıçlı ensefalopati, laktik asidoz, hipotoni ve hafif yüz dismorfizmi paterni (belirgin alın,kalın dağınık kaşlar, kısa palpebral fissürler, geniş burun kökü, köprü ve geniş burun tabanı) gibi bulgular *FBXL4* için moleküler genetik incelemenin yapılmasını düşündürmelidir. mtDNA'daki 37 gende hastalık ilişkili çok sayıda patojenik varyant bildirilmesine rağmen, mitokondrial hastalıkların birçoğu aslında özellikle mitokondri hedefli proteinleri kodlayan nükleer genlerden kaynaklanır. Geniş aile veya akrabalık ilişkisi olan pedigrilerde, bağlantı analizi yoluyla yapılan klinik-moleküler araştırmalar mitokondriyal hastalıklara neden olan çok sayıda varyantın tanımlanmasına katkıda bulunmuş ve bunların % 96'sı mitokondriye lokalize proteinlerle ilişkili gösterilmiştir. Bu çalışmalar mitokondriyal proteom bileşenlerini aydınlatmanın yanı sıra organel biyoenerjitiği ve homeostaz mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır.

Çalışmamızda **aile 8**'de indeks olgu ve sağlıklı kardeşinde yapılan TED analizinde *OXCT1* (3-Oxoacid CoA Transferase 1) geninde exon15'te c.1370C>T; p.Thr457Ile (rs369643387) ve intron 12'de c.1173-139G>T (rs145673650) değişimleri birleşik heterozigot formda saptandı ve anne baba incelemesinde bu değişimleri heterozigot formda taşıdıkları gözlemlendi. Her iki değişim, veri tabanlarında önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılan nadir varyantlar olup, in siliko programlar patojenik tahmini vermektedir. *OXCT1* genindeki patojenik varyantlar Süksinil-CoA: 3-ketoasit CoA transferaz (SCOT) eksikliği ile ilişkilidir (379). SCOT eksikliği, keton cismi katabolizma bozukluğuna neden olan nadir kalıtsal bir metabolizma hastalığıdır. Mutasyonun şiddetine ve rezidüel enzim aktivitesine göre değişen şiddette klinik bulgular, epizodik veya kalıcı ketozis ile karakterizedir. Açlık, ateşli hastalıklar, kusma ve ishal gibi ketojenik stresler hem serbest yağ asidi oksidasyonunu hem de keton cismi sentezini indükler. Ketoliz kusurları olan hastalarda, keton cisimlerinin birikimi fatal ketoasidoza neden olabilir veya enerji tükenmesi nedeniyle beynin etkilenmesi sonucu psikomotor gerilikle sonuçlanabilir.

Dolaşımdaki keton seviyeleri, enerji metabolizmasının önemli bir parametresidir. İki ana keton cismi olan asetoasetat (AcAc) ve 3-hidroksibutirat

(3HB), özellikle glikoz alımının düşük olduğu uzamış açlık sırasında veya enfeksiyonlar gibi katabolik süreçlerde karaciğerden ekstrahepatik dokulara (özellikle beyin) enerji taşınmasında önemlidir. Dört karbonlu karboksilik asitlerdir, dolayısıyla kanda birikmeleri ketoasidozla sonuçlanır. Total kan keton cismi (TKB) seviyeleri, açlık süresi ve ketojenik stres gibi klinik öykü varlığında glikoz, insülin ve serbest yağ asitleri (*free fatty acids*, FFA) ile paralel değerlendirilmelidir. AcAc, mitokondriyal matriksin redoks durumuna bağlı olarak değişken bir TKB fraksiyonundan sorumludur. FFA/TKB oranı özellikle keton cismi metabolizmasının değerlendirilmesi için faydalıdır. Ketogenez (keton cismi sentezi) ve yağ asidi oksidasyonundaki kusurlarda oran 2,5 üzerinde, ketoliz (keton cismi yıkımı) kusurlarında ise 0,3'ün altındadır (380). Yağ dokusundan salınan FFA, hepatositlerde, yağ asidi beta oksidasyonu ile bol miktarda asetil-CoA (AcCoA) ve asetoasetil-CoA'ya (AcAcCoA) dönüşür. Mitokondriyal 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA Sentaz (HMG-CoA sentaz (mHS) ile 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA'ya (HMG-CoA) metabolize edilirler. Daha sonra, HMG-CoA'dan HMG-CoA liyaz (HL) ile AcAc, üretilir. AcAc kısmen 3HB'ye indirgenir. Hem AcAc hem de 3HB kan dolaşımıyla, ekstrahepatik dokulara geçer ve 3HB, AcAc'ye geri dönüşür. Ekstrahepatik dokularda, süksinil-CoA: 3-oksoasit CoA transferaz (SCOT) tarafından asetoasetil-CoA'ya aktive edilir. Daha sonra, mitokondriyal asetoasetil-CoA tiolaz (T2), bir asetil grubunu serbest CoA'ya aktarır ve iki molekül asetil-CoA sentezlenmiş olur. Bu adımlar ekstrahepatik dokularda ketonlardan enerji üretimi için gereklidir. Beyin yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanamadığından, keton cisimleri, açlıkta beyin metabolizmasının önemli bir substratıdır.

Keton cismi metabolizmasında, sentezi ve kullanımını kapsayan ve klinik olarak önemli dört KMH; ketogenez defektlerinde mitokondriyal HMG-KoA sentaz (mHS, *HMGCS2*) ve HMG-CoA liyaz (HL, *HMGCL*) eksikliği, ketoliz defektlerinde süksinilCoA: 3-oksoasit CoA transfeaz (SCOT, *OXCT1*) eksikliği ve mitokondriyal asetoasetil-CoA tiyolaz (T2, *ACAT1* geni) eksikliğidir.

İlk kez 1972'de tanımlanan SCOT eksikliği, ketoliz bozukluğu nedeniyle, klinik olarak aralıklı ketoasidotik ataklar ve epizodlar arasında asemptomatik durumla karakterize, OR kalıtım özelliğinde nadir bir KMH'dır. İlk 1996'da olmak üzere bu güne kadar yaklaşık 30 hastada *OXCT1*'de 36 farklı patojenik varyant

bildirilmiştir (381). Bu varyantların 30'u yanlış anlamlı veya anlamsız nokta mutasyonları, 2'si kırılma bölgesi ve biri büyük delesyon olmak üzere 4'ü indeldir (HGMD Professional version 2020.3). Kalıcı ketozis, yani hastanın iyi beslendiği ve aç olmadığı asemptomatik dönemlerde bile her zaman idrarda keton varlığı SCOT eksikliği için patognomoniktir ancak tüm SCOT eksikliği olan hastalarda bulunmaz. Yenidoğan taramasında SCOT eksikliği saptanmaz. Kan ve idrardaki yüksek keton cisimcikleri hariç, hastaların nonspesifik olmayan laboratuvar sonuçları vardır. Sahip oldukları SCOT enzim aktivitesine bağlı olarak, hastalarda epizodik veya kalıcı ketosis bulunabilir. Hastaların yaklaşık yarısı yenidoğan döneminde ilk ketoasidotik ataklarını geçirir. İdrar organik asit analizinde 3HB ve AcAc atılımında artış dışında karakteristik atılım bulunmayabilir. Tam idrar testinde keton pozitifliği veya kanda keton pozitifliği basit uyarıcı testlerdir ve tekrarlayan ataklar SCOT enzim analizine yönlendirebilir.

Sasai ve arkadaşları, 5 yıldan uzun süre (2008–2012), şiddetli ketoasidoz ile başvuran hastaları araştırmışlar ve olguların dördünde heterozigot *OXCT1* varyantı belirlemiştir (382). Heterozigot durumlarını doğrulamak için, *OXCT1* geni üzerinde başka bir alelde büyük delesyonların veya insersiyonların varlığını dışlayan multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyon (MLPA) analizi yapılmıştır. cDNA'nın dizi analizi ile tam uzunlukta SCOT, yabanıl tip cDNA klonlarının, mutant cDNA klonlarla makul oranlarda mevcut olduğunu göstermişlerdir. Takip eden 2 yıl boyunca (2013-2014), ketoasidoz ile başvuran altı hastada daha *OXCT1*'de çeşitli varyantlarını göstermişlerdir. Bu veriler, *OXCT1* varyantı için heterozigot taşıyıcıların, ketojenik streslerle birlikte şiddetli ketoasidotik epizodlar geliştirebileceğini göstermektedir. Bu olguların başlangıç yaşı 11 ay ile 6 yaş arasında değişmekte ve tamamı bir enfeksiyon sonrası tetiklenen ketoasidoz sonrası letarji ve koma tablosu ile başvurmuştur. Olgumuzun postnatal ağlamama ve 8 gün YB yatış öyküsü dışında 11. aya kadar gelişimi normal tarif edildi. İlk atağını 11. ayda üst solunum yolu enfeksiyonu sırasında geçirmiş, metabolik asidoz, idrar ketonu +3, kan ketonu +2 ölçülen olgunun sıvı tedavisine rağmen asidozunun dirençli seyretmesi ve ketozisin persiste olması nedeniyle ön tanıda organik asidemiler ve ketoliz bozuklukları düşünülmüştü. Kesin tanı konulamayan olgunun, 1,5

yaşında iki kez daha gastroenterit sonrası atakları olmuş, ikinci atak sırasında arrest sonrası resüstasyonla dönmüş ve trakestomi ile taburcu edilmiştir. Bu aşamada sağlıklı kardeşi ile birlikte TED analizi yapılan olguda saptanan c.[1370C>T] ; [1173-139G>T] değişimlerinin GnomAD'deki alel frekanslarının çok nadir olduğu görüldü (sırasıyla, 0.000004003 ve 0.0009874) (383). Her iki değişim de önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılmıştı (384) ve in silico programlar patojenik tahmini veriyordu (385,386). *Alternative Splice Site Predictor* (ASSP) programı, intronik değişim için alternatif ekson izoformunu öngörüyordu (387). Bu veriler, hastanın öyküsü, enfeksiyonu takip eden metabolik atakları, kan ve idrarda keton pozitifliği, ataklar arasındaki dönemlerde beslenme tedavisi ile asemptomatik olması gibi klinik özellikleri moleküler genetik analiz sonucunu destekler nitelikteydi. Daha önce hastalık ilişkisi bildirilmemiş olan bu değişimler için, fibroblast SCOT enzim aktivitesi, mRNA çalışması gibi fonksiyonel analizlerin yapılması planlandı. Hastanın trakeostomisi kapatıldı ve nöromotor gelişimi normal değerlendirildi. Halen 2 yaş 8 aylık olan olguda verbal gerilik dışında bir özellik bulunmamaktadır.

Epizodik ketozis veya bebeklik döneminde yüksek anyon açığıyla metabolik asidozun görülmesi, keton metabolizmasının kalıtsal hastalığının teşhisi için ipuçları sağlayabilir. Keton cisimleriyle ilgili bir metabolik bozukluktan şüphelenmek, SCOT eksikliğinin teşhisinde ilk adımdır. SCOT eksikliği konusunda artmış farkındalık ve metabolik krizlerin genel yönetiminde daha fazla deneyim sayesinde çoğu hasta nörolojik sekel ve ölüm olmaksızın iyi bir prognoza sahip olmaktadır.

Çalışmamızda **aile 9'da** indeks olgu ve sağlıklı kardeşinde yapılan TED analizinde *ALG8* geninde exon 5'de homozigot c.479A>T; p.His160Leu değişimi saptandı. Bu gen, *ALG6/ALG8* glukoziltransferaz enzim ailesinin bir üyesi olan dolikil-fosfatglukoz 1-mannoz 9-N-asetilglukozamin (Dol-P-Glc: Glc (2) Man (9) GlcNAc (2) -PP-Dol-alfa-2) glukoziltransferaz enzimini kodlar ve bu enzim, endoplazmik retikulumda (ER) proteinlerin N-glikozilasyonu için ikinci glikoz kalıntısının lipid bağlı oligosakarit (LLO) öncüsüne eklenmesini katalize eder. Bu gendeki mutasyonlar, konjenital glikozilasyon tipi 1h (CDG-1h) ile ilişkilendirilmiştir (MIM # 608104). Glikozilasyon, monosakkaritlerin, glikoprotein veya glikolipid gibi bir alıcı moleküle tek tek eklendiği temel ve karmaşık bir

hücrel süreçtir. Her canlı organizmada bulunur ve evrimsel süreçte sıkı bir şekilde korunur. İnsanda, glikozilasyon reaksiyonlarından biri genetik olarak bozulursa, Konjenital Glikozilasyon Bozuklukları (CDG) ortaya çıkar ve ilk kez 1980'de Belçikalı çocuk doktoru Jaak Jaeken tarafından, iki hastasında tanımlanmıştır (388).

Glikozilasyon, proteinlerin doğru olgunlaşması ve işlevi için gerekli olan monosakkarit aktivasyonu, proteinlere ve lipitlere glikan eklenmesini sağlayan enzim katalizli bir işlemdir. CDG'ler 4 ana gruba ayrılmıştır ve (I) Protein N-glikozilasyon, (II) protein O-glikozilasyon, (III) kombine glikozilasyon kusurları (çoklu yolak tutulumu) ve (IV) glikosfingolipid ve glikozilfosfatidilinizitol (GPI) ankrajı sentez hataları gibi bozuklukları içerir (389). Protein N-glikozilasyonundaki kusurlar ise iki alt gruba ayrılır: CDG-I bozuklukları, glikan sentezi (sitozol ve ER) kusurlarını ve CDG-II, glikan işlenmesindeki (Golgi) kusurları içerir. Jaeken ve arkadaşları 2008'de, gen adına atıfta bulunan bir yeni isimlendirme önermiştir; gen adı (italik değil)- şemsiye isim CDG örneğin ALG8-CDG, vb. Bu isimlendirmenin tehlikesi, o genin ne olduğu hakkında hiçbir bilgi olmaması halinde fizyolojik işlev ve tedavilerin mantığı ile bağlantının kesilmesi potansiyelidir (390).

Bu güne kadar, bir çoğu N-glikosilasyon kusurlarını içeren yüzelliden CDG tanımlanmıştır ve çoğu ultra nadir hastalıklardır. En sık tipi, yaklaşık 1000 hasta bildirilen ve tahmini prevalansı 1:100.000 olan PMM2-CDG'dir (önceki isimlendirme: CDG-Ia). Tanı, birden fazla organ sistemini etkileyen bir klinik prezentasyon ve tipler arasındaki fenotipik heterojenite nedeniyle genellikle zordur. Çoğu hastada dismorfik yüz özellikleri, anormal yağ dağılımı, değişen şiddette pıhtılaşma ve endokrin kusurları bulunur. Nörolojik, kalp, gastrointestinal, hepatik, renal, hematolojik, immünolojik ve iskelet system anomalileri farklı CDG türlerinde bildirilmiştir. Klinik spektrumdaki veriler küçük hasta gruplarına dayandığından, hastalığın doğal seyri hakkında kapsamlı bir bilgi sağlanamamıştır. Çoğunlukla, N-glikozilasyon bozukluğu için ilk biyokimyasal tarama serum transferinin izoelektrik odaklanma veya kütle spektrometrisi ile gerçekleştirilir. Anormal transferrin glikozilasyon paterni, sitoplazma, endoplazmik retikulum veya Golgi'de glikozilasyonun bozulduğunu gösterebilir. CDG tip 1'de glikan sentezinde bir azalma varken, CDG tip 2'de

trunke glikanlar vardır. Tip I CDG, lipide bağlı oligosakaritlerin birleşmesinde veya bunların yeni oluşan glikoproteine aktarılmasında bir kusurun olduğu bozuklukları içerirken, tip II CDG, proteine bağlı glikanların kırılması, uzaması ve işlenmesindeki kusurları içerir (390). Nükleotid şekerlerin oranındaki azalma mix paterne yol açabilir. Golgi ile ilgili birçok CDG'de kesin biyokimyasal patogeneze tam olarak anlaşılmamıştır. Ayrıca O-glikozilasyon bozuklukları, lipid glikozilasyon bozuklukları, GPI ankraj sentez bozuklukları ve bazı N-glikozilasyon bozuklukları dahil birçok CDG'de serum transferrin profili olabilir. Matris destekli lazer desorpsiyonu/ionlaşma-uçuş süresi (MALDI-TOF) analizi, tip II CDG'deki kusurlar hakkında daha fazla bilgi sağlayabilir. Anormal transferrin profilleri, CDG ile ilişkili patojenik varyantları tanımlamak için, hedefli CDG gen panelleri veya ekzom/genom dizilemeyi gerektirir.

Klinik ve laboratuvar bulguları CDG ile uyumlu olan olgumuzda TED ile gösterilen novel varyant, literatürde daha az sıklıkla bildirilen, ağır karaciğer ve GIS bulguları ile mortal seyreden ALG8-CDG (=CDG-Ih) ile ilişkilidir. İlk kez 2003' te Chantret ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (391). Araştırmacılar, GIS semptomları olan ancak SSS semptomu olmayan hastanın fibroblastlarında başlıca Man9GlcNAc2-PP-dolichyl birikimi olduğunu, ancak, endoplazmik retikulum glukozidaz inhibitörü castanospermine varlığında, Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl'in baskın olduğunu göstermiştir. Northernblot analizi, hastadan alınan hücrelerin, bu reaksiyonu katalize eden dolikilP-glikoz: Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolikil 3-glukosiltransferaz (hALG8p) enzimini kodlayan mRNA'nın normal miktarın sadece % 10-20'sine sahip olduğunu ortaya çıkardı. Genomik DNA hALG8 dizilemesi, ekson 4'de bir alelde bir baz delesyon ve diğerinde ibir baz nersiyon göstermiş olup her iki mutasyonun da erken stop kodona neden olarak, ciddi şekilde trunke proteinler oluşturacağı tahmin edildi. Muhtemelen her iki transkript de nonsense aracılı mRNA bozunmasına neden oluyordu. Hastanın hücreleri vahşi tip hALG8 cDNA ile başarıyla tamamlandı ve bu mutasyonların temelinde CDG Ih olarak önerdikleri yeni CDG I alt türünün yattığı sonucuna vardılar.

Höck ve ark tarafından 2015 yılında 3 yeni vaka ve 12 geçmiş literatürden bildirilen olguların çoğunda beyin tutulumu, karaciğer patolojisi, gastrointestinal semptomlar, dismorfizm (brakidaktili dahil), göz tutulumu

(özellikle katarakt) ve cilt semptomları vardı (389). Pıhtılaşma bozuklukları, protein kaybettiren enteropati, ödem ve sıklıkla masif çoklu organ tutulumu nedeniyle çoğu hasta yaşamın ilk yılında kaybedilmişti. Araştırmacılar, ALG8-CDG'li hastaların yenidoğan başlangıçlı ve benzer klinik özelliklerle hayatın ilk yılında kaybedildiklerini ve bu nedenle yetersiz teşhis edildiğini savunmuştur. ALG8-CDG hastalarında erken ayırt edici semptomlar, dismorfizm, gastrointestinal semptomlar ve vakaların yaklaşık% 50'sinde katarakt olarak bildirilmiştir. Bu nedenle erken çoklu organ tutulumu olan tüm bebeklerde (örn.katarakt, immün olmayan hidrops, koagülopati) serum veya plazmada CDG sialotransferrinleri için tarama sonrası tanının doğrulanması için moleküler genetik test önermişlerdir. Prenatal hidrops, ödem ve kataraktı olan bir hasta ile daha önce aynı bulguları olan tip 1 patern ve katarakt ile teşhis koyulan başka bir çift kardeşin aynı kökeni paylaşması (Tirol bölgesi) kurucu bir mutasyonu akla getirmiş ve ALG8'de iki heterozigot mutasyon (ekson 2'de c.139A> C, p.Thr47Pro ve c.1090C> T, p.Arg364Ter) gösterilmiştir. Bu çalışmada özetlenen 15 hastada tespit edilen 30 allelden 12'si (% 40) c.139A>C olarak bildirilmiştir. Olgumuzun ikiz eşinin postnatal beşinci günde barsak obstrüksiyonu ve nekrotizan enterokolit nedeniyle kaybedilmesi, olgumuzda, konjenital katarakt, kalp, karaciğer, barsak gibi multisistemik tutulum ve dismorfik özelliklerin olması, serum transferrin izoelektrik fokuslama testinin paterni, ALG8'deki değişimin CDG tip1h ile ilişkisini desteklemektedir. Tespit edilen c.479A>T;p.His160Leu değişiminin, genomik lokalizasyonu beşinci ekzonun ilk bazı olması nedeniyle kırılma hatasına yol açması beklenir. Bu variant, GnomAD'de bulunmuyordu ve ACGM kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırılmıştı. PolyPhen, Provean gibi tahmin programları da patojenik tahmini veriyordu. Ebeveynler bu değişim için heterozigot taşıyıcı ve beşinci ay muayenesinde sağlıklı değerlendirilen kardeş homozigot normaldi. Aile tekrar gebelik planladığından, tekrar riski ve prenatal/preimplantasyon genetik tanı konularında genetik danışma verildi. Bu nadir hastalık grubu için, sadece aşırı fenotiplerin tanınması, az sayıda varyant sınıflandırması, glikan analiz metodolojisindeki sınırlamalar ve ekspresyonun zamana ve doku tipine göre değişmesi gibi zorlukları çözmeye yardımcı olmak için fonksiyonel çalışmaların önemi giderek artmaktadır.

CDG'de N-Glikozilasyon için, şu anda mevcut olan tedavi seçeneklerinin çoğu semptomatik ve bazı tiplerde önemli ölçüde iyileşme sağlayan tedavilerdir (392). Diyet takviyesi en yaygın uygulanan tedavilerden biridir. Takviye bileşikleri monosakkaritlere ek olarak aktive şekerler, nükleotid şekerler ve eser elementler de içerebilir. Şeker takviyesinde tedavi stratejisi, eksojen monosakkaritlerin alımı yoluyla, glikozilasyonun bozulması sonucu etkilenen yolların atlatılması veya düzenlenmesini sağlamaktır. Yüksek doz mannozun oral takviyesi MPI-CDG'de en eski ve başarılı tedaviyi temsil eder. SLC35C1-CDG'de fukoz takviyesi Golgi'de fukozilasyonu kolaylaştırabilir. Galaktoz takviyesi, PGM1-CDG'de iki pilot çalışmada ve SLC35A2-CDG, SLC39A8-CDG ve TMEM165-CDG'de küçük vaka çalışmalarında faydalı klinik etki göstermiştir. Gal takviyesi in vitro olarak endoplazmik retikulumda, glikan sentezi ve galaktosilasyonu düzenlemektedir. Aktive şeker bileşikleri, farmakolojik şaperonlar, enzim tedavileri, gen terapileri ve transplantasyon gibi yeni terapötik yaklaşımlar, klinik öncesi araştırma altındadır gelecekteki uygulamalar için büyük umut vaat etmektedir (390).

Çalışmamızda **aile 10**'da kaybedilmiş olan indeks olgu ve sağlıklı kardeşinde yapılan paired TED analizinde, **COX10 geninde** (Cytochrome c oxidase assembly factor heme A:farnesyltransferase COX10) exon 3'te indeks olguda homozigot c.260C>T (p.Thr87Ile) değişimi saptandı. Sağlıklı kardeşte ise bu değişim heterozigot formdaydı. COX10 geninde gösterilen bu varyant, görünüşte sağlıklı bir popülasyonda, yatkınlık taramasının parçası olarak ICSL'de (Illumina Clinical Services Laboratory) tanımlandı. İnsan Genom Mutasyonları Veritabanında (HGMD) 1 Haziran 2018'den önce bildirilmemişti ve bu nedenle bir puanlama sistemi aracılığıyla sınıflandırma için adaydı. Varyant alel frekansı, hastalık prevalansı, penetrans tahminleri ve kalıtım modeli kullanılarak, bu varyantın patojenik etkisini ve sıklığını değerlendirmek için otomatik hesaplanan skora göre, bu varyantın hastalığa neden olma ihtimali göz ardı edilemediğinden hastalıkla ilişkisi daha fazla araştırma gerektirmekteydi. Gen, cDNA değişikliği ve amino asit değişikliği için yapılan literatür araştırmasında hiçbir yayın bulunamadığından, bu hastalık için önemi bilinmeyen bir varyant olarak sınıflandırılmıştı. İn-sliko protein modeli patojenik

tahmini veriyordu. Bu nedenle, Sanger dizileme ile konfirmasyon ve aile çalışması için bölgeye özgü primer dizayn edildi. Söz konusu variantın, indeks olguda homozigot, anne, baba ve sağlıklı kardeşte heterozigot formda olması OR kalıtım modeli ile uyumluydu. Ailenin ilk gebeliğinden olan ve benzer bulgularla kaybedilen ilk olgunun otopsi dokusundan DNA elde edilemedi. İkinci gebelikten olan sağlıklı kızlarında yapılan Sanger dizi analizinde de aynı varyantın homozigot formda tespit edilmesi üzerine bu hastalık için patojen olmadığı sonucuna varıldı.

Mitokondriyal solunum zincirinin terminal kompleksi olan sitokrom c oksidaz (COX), indirgenmiş sitokrom c'den moleküler oksijene elektron transferini katalize eder. İzole COX eksikliği, insanlarda solunum zinciri kusurlarının en sık nedenidir ve Leigh sendromu, karaciğer yetmezliği ve ensefalomiyopati gibi çeşitli klinik belirtilere neden olur (340). Bu klinik heterojenlik muhtemelen multimerik protein olan COX'un, 13 alt birim polipeptidinin ekspresyonunda yer alan çok sayıda nükleer genden ve bunların daha sonra işlenmesi, fonksiyonel komplekse birleşimi süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Altbirimlerin üçü katalitik bölgeyi oluşturur ve mtDNA tarafından kodlanır (subunit I-III). Alt birimler içinde yüksek oranda korunan I ve II, enzimin katalitik aktivitesi için esas olan iki bakır bağlama bölgesi (CuA,B) ve iki hem parçası içerir (hem a, a₃). Kalan 10 daha az korunan alt birim, nDNA tarafından kodlanır ve yapısal olarak stabilite, enzim aktivitesini modüle edilmesi ve her bir alt birimin işlevsel bir holoenzime montajında görev alır. Bu yardımcı proteinlerin kendileri COX kompleksinin bir parçası değildir, transkripsiyon, translasyon, yapısal alt birimlerin sentezi ve membrana eklenmesi, şaperon aracılı işlenmesi ve prostetik grupların eklenmesi dahil holoenzim biyogenezinin farklı aşamalarında görev alırlar (341).

Yirmi yıl öncesine kadar, COX eksikliğine neden olan sadece iki nükleer gen mutasyonu tanımlanmışken (*SURF1*,*SCO2*), Valnot ve arkadaşları 2000 yılında, akrabalık ilişkisi olan geniş bir ailede genetik bağlantı analizi ile, bir enzim eksikliğine neden olan üçüncü bir nükleer gende mutasyon bildirmiştir (340). Genom boyu homozigozite çalışması, hastalık genini kromozom 17p13.1 – q11.1 bölgesinde işaret etmişti ve bu bölge, COX montajında yer alan proteinleri kodlayan iki geni, *SCO1* ve *COX10*'u kapsıyordu. Mutasyon analizi

ve ardından mayada yapılan fonksiyon çalışması, COX eksikliğini *COX10* genindeki homozigot yanlış anlamlı bir mutasyonu gösterdi. Bu gen, protohemin, enzimin prostetik grubu olan hem O'ya dönüşümünde C2 pozisyonunda bir vinil grubun farnesilasyonu yoluyla ilk adımı katalize eden heme A: farnesiltransferazı kodlar. Olgular, şiddetli kas güçsüzlüğü, hipotoni, ataksi, pitoz, piramidal sendrom bulguları ve epilepsi gibi klinik özellikler sergiliyordu ve kalp ultrasonu normaldi. Kan ve BOS laktatı yüksek, ve GC/MS ile idrar organik asit analizinde laktat ve Krebs döngüsü ara ürünleri yüksekti. Artmış idrar amino asitleri proksimal tübülopatiyi düşündürüyordu. Kas, lenfosit ve fibroblast kültürlerinde izole COX eksikliği tespit edildi. Olguların büyüğü 2 yaşında, küçüğü ise 3 yaşında kaybedilmişti. Daha sonra 2003 yılında Antonicka ve arkadaşları tarafından, biri anemi ve klasik Leigh sendromu ve diğeri anemi, sensörinöral işitme kaybı, fatal infantil hipertrofik kardiyomiyopati ile başvuran ve izole COX eksikliği olan iki hastada, *COX10* geninde patojenik mutasyonlar bildirilmiştir. Bu çalışma, bu gendeki mutasyonların erken başlangıçlı izole COX eksikliği ile ilişkili neredeyse tüm klinik fenotiplere neden olabileceğini göstermiştir (341). Fenotipik olarak Leigh benzeri bulgular ile başvuran ve azalmış COX aktivitesi saptanan başvuran 5 aylık bir olguda, *COX10* geni başlangıç kodonunda (ATG) homozigot mutasyon tespit edilmiştir (342). İkinci bazda T>C değişimi, protein translasyonu için başlangıç kodonunun kaldırılmasıyla sonuçlanmış ve hasta 9 aylıkken kaybedilmiştir. Bir başka çalışmada 37 yaşında erişkin bir kadın hastada, miyopati, demiyelinizan nöropati, erken yumurtalık yetmezliği; kısa boy, işitme kaybı, pigmenter makülopati ve renal tübüler disfonksiyon ile seyreden ve nispeten hafif bir klinik fenotip ile ilişkili izole COX eksikliği tespit edilmiştir (343). TED analizinde, daha önce fatal infantil COX eksikliği ile ilişkisi bilinen bir patojenik (c.1007A> T; p.Asp336Val) ve bir yeni mutasyonu (c.1015C> T; p.Arg339Trp) saptanmıştır. Bu bulgular, *COX10* mutasyonlarının, yetişkinlerde mitokondriyal hastalık nedeni olabildiğini göstermiş, nükleer düzenleyici genler, epigenetik fenomen ve/veya çevresel faktörlerin, azalmış COX aktivitesinin neden olduğu hastalık fenotipini etkileyebildiği ve değişken klinik ciddiyeti açıklayabildiği ileri sürülmüştür. Bizim ailemizde de, postnatal birinci ayda başlayan ağır karaciğer yetmezliği ile prezente olan, mitokondriyal hastalık lehine bulguları olan ve 2,5 ay

ve 8,5 aylıkken kaybedilen iki kardeşin bulunduğu olgulardan birinde saptanan *COX10* genindeki homozigot c.260C>T değişiminin, sağlıklı kardeşte de homozigot formda saptanmasından ötürü, bu hastalık için patojen olmadığı anlaşıldı ve TED veri analizi ile patojen varyant analizine devam edilmesi planlandı.

Çalışmamıza dahil edilen **aile 11**'de akraba evliliği ürünü olan ve mitokondrial miyopati nedeniyle takip edilen 19 ve 16 yaşlarındaki iki etkilenmiş kardeşte yapılan TED analizinde, ***CAPN3* geninde** (Calpain 3) ekzon 4'de homozigot c.550delA (p.Thr184ArgfsTer36) değişimi saptandı. Daha önce Limb Girdle Musküler Distrofi Tip 2A (LGMD) ile ilişkisi bildirilen ve ülkemizde de sık gözlenen bu değişimi, ebeveynler heterozigot formda taşıyordu. Her iki kardeş, 10 yaş civarı başlayan yürüme güçlüğü ve CK yüksekliği nedeniyle tetkik edilmiş, yapılan moleküler analizlerde BMD/DMD'nin dışlanması ve kas biopsisinde mitokondrial miyopati lehine bulgular saptanması üzerine beslenme ve metabolizma polikliniğine yönlendirilmişti.

Ekstremit-kuşak kas distrofisi (LGMD) terimi, ilk kez Walton ve Nattrass (1954) tarafından kas distrofileri sınıflandırmasının bir alt grubu olarak önerilmiştir. Pelvik, skapular ve proksimal ekstremit kaslarında, ilerleyici simetrik atrofi, kas zayıflığı ve yüksek serum kreatin kinaz ile karakterizedir. Semptomlar genellikle yaşamın ilk yirmi yılında başlar ve hastalık yavaş yavaş ilerler, genellikle başlangıçtan 10 veya 20 yıl sonra yürüme yeteneğinin kaybına neden olur (344). Bununla birlikte, seyir oldukça değişkendir. Hem otozomal dominant hem de resesif kalıtım bildirilmiştir. Otozomal resesif ekstremit-kuşak kas distrofileri (LGMD2), klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalık grubudur. LGMD2'lerin bir alt grubu olan LGMD2A, tüm popülasyonlarda LGMD2'nin en yaygın formu kabul edilmektedir. Klasik olarak kalpainopati olarak da adlandırılan LGMD2A, kalsiyuma bağımlı bir sistein proteaz olan kalpain 3 enzimini kodlayan *CAPN3* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Richard ve ark. 1995 yılında 24 ekzondan oluşan insan *CANP3* geninin genomik organizasyonunu tanımlamıştır. LGMD2A ailelerinde bu genin sistematik olarak taranması sonucunda ortaya çıkan 15 farklı mutasyon, *CANP3* genindeki mutasyonların LGMD2A'dan sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu

hastalığın yapısal bir kusurdan ziyade bir enzimatik bir kusurdan kaynaklanan bir kas distrofisi olduğu kaydedilmiştir.

Kalpainler, hücre içi kalsiyum ile modüle edilen (Ca^{2+} sinyallerine yanıt verir), lizozomal olmayan sistein proteazlarıdır. Protein substratlarının kısmi hidrolizi ile işlevlerini geri döndürülemez bir şekilde değiştirirler. Bazı kalpainler her yerde eksprese edilirken diğerleri dokuya özgüdür. Kalpainlerin çok sayıda fizyolojik ve patolojik olaya karıştığı düşünülmektedir. İki tipinin, hastalık ilişkisi tespit edilmiştir; (i) kalpain-3, uzuv kuşağı kas distrofisi tip 2A'ya neden olur ve (ii) kalpain-10 insüline bağımlı olmayan diyabette rol oynar. Kalpain ailesinin bir üyesi olan kalpain-3'ün, lens ve beyinde bazı izoformları tanımlanmış olmakla birlikte, tam uzunlukta klasik CAPN3 formu başlıca iskelet kasında eksprese edilir. Dikkat çekici bir şekilde, kalpteki ekspresyonu iskelet kasından en az 100 kat daha düşüktür ve türler arasında değişkenlik gösterir. Enzim kasta muhtemelen ortak işlevleri paylaştığı dev bir protein olan titin (*TTN*, *LGMD2J*) ile etkileşime girerek pasif bir enzim olarak bulunur (345). Kalpain-3'ün, substrat erişimi için katalitik bölgeyi serbest bırakmak üzere otoliz yoluyla bir peptidini uzaklaştırarak kendiliğinden aktive olduğu gösterilmiştir (346). Otoliz aktivasyon sürecinde rol almasına rağmen mutant proteinlerin tümü otolitik aktivitelerini kaybetmez. Kalpain 3 işlevlerinin yakın zamanda tanımlanan modelinde, otolizden sonra proteaz aktivitesini eski haline getirmek için moleküller arası komplementasyon (tamamlama), mutasyonların patojenik etkisine yeni bir yön vermiştir (347). Kalpain 3'ün kesin işlevleri ve *LGMD2A*'ya nasıl neden olduğu tam olarak anlaşılamamasına rağmen çeşitli kanıtlar hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinde bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Amets Saenz ve ark., *LGMD2A* hastalarında kas hücresi protein döngüsündeki patofizyolojik mekanizmayı aydınlatmayı ve terapötik hedeflerin kas dejenerasyonunu durdurabileceğini öne sürmüştür. *LGMD2A* hastalarının olgun miyotüplerinde, transmembran integrin $\beta 1A$ izoformundan miyoblast füzyonu ve kas lifi olgunlaşması sırasında normal fizyolojik koşullar altında görülen $\beta 1D$ izoformuna geçişte bir kusur olduğunu göstermiştir. Wnt yolağının bir proteini olan frizzled-related proteinin, integrin $\beta 1D$ ekspresyonunu düzenlediğini ve *FRZB*'nin susturulmasının integrin $\beta 1D$ ekspresyonunu, kontrollerde bulunan seviyelere yükselttiğini bulmuşlardır. Bu bulgu, Wnt yolağının potansiyel

hedefler olarak önerilen diğer yollara ek olarak LGMD2A için terapötik bir seçenek sunabileceğini düşündürmektedir (348).

Türkiye’de 2006 yılında 93 LGMD2 ailesinin dahil edildiği çalışmada, 29 LGMD2A’lı ailenin 21’inde (%22.6) *CAPN3* geninde altısı yeni ve dokuzu önceden bildirilen olmak üzere 15 mutasyon tespit edilmiş, aile 11 de saptanan c.550delA (%40) ve p.R490Q (%10) mutasyonlarında kümelenme gözlenmiştir. Aileler arasında ve hatta aile içi bireylerde klinik heterojenite vardır ve mutasyon tipi ile klinik fenotip arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır c.550delA mutasyonu hem orta hem de hafif fenotiple ilişkilidir (349).

Çalışmamızda **aile 12 olgu IV-1’de** yapılan TED analizinde de yine *CAPN3*’de ekzon 17’de homozigot c.1992+1G>T değişimi saptanmıştır. *CAPN3*’deki İntronik *CAPN3* mutasyonlarının transkripsiyonel ve translasyonel etkilerini araştıran bir seri vaka çalışmasında, bu varyant üç farklı LGMD2A hastasında tespit edilmiş ve farklı mutant allellere sahip bir bileşik heterozigot formda bulunduğu, bu değişimin translasyonel seviyedeki zararlı etkisi, protein yokluğu veya hemen hemen hiç yokluğu ile bağlantılı gösterilmiştir (275). Bu varyantın, kanonik eklenme bölgesini ortadan kaldırdığı ve kasta ekson 17’nin (r.1915_1992del; p.P639_D664del) atlanmasına neden olduğu gösterilmiş ve bu sonuç, bir hastanın kan mRNA’sında da doğrulanmıştır. Ortaya çıkan transkript muhtemelen kararsızdır ve sadece spesifik primerler (atlayan) ile tespit edilebildiği için zayıf bir şekilde ifade edilmiştir. Bu mutasyonu çevreleyen bölgedeki en az üç kriptik ekleme bölgesi, SSPP analizinden yüksek bir skor elde etmiş, ancak bunlardan sadece birinin, *splice* spesifik primerlerle kas ve kan cDNA’sında etkin bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir. Bu kriptik eklenme yeri, intron 17’ye 31 baz çiftinin eklenmesine yol açan anormal bir transkript oluşturmuştur.

Kalpainopatilerin henüz etkin bir tedavisi yoktur ancak gen terapisi gibi tedavi yaklaşımlarının gündeme gelmesiyle, 2017 yılında, 9 ülkeden 18 araştırmacı ve iki aile derneği temsilcisinin katıldığı uluslararası bir toplantıda bir çok klinik araştırma tartışılmıştır (345). Fransa’da yapılan çalışmaların sonuçlarına göre kalpainopati oranı, genetik olarak test edilen tüm LGMD’lerin yaklaşık %20’sidir. Hastalık çoğunlukla erken ergenlik döneminde başlamakla beraber, başlangıç yaşı erken çocukluktan yetişkinliğin ortasına kadar

değişmektedir. Klinik patern homojen olmakla birlikte, klasik tablonun yanı sıra, fenotipte varyasyonlar gözlemlemek mümkündür. Fransa, Bask bölgesi ve Reunion adaları popülasyonlarını içeren, genetik olarak tanımlanmış 85 LGMD2A hastasının verilerinin derlendiği çalışma, yaşamın ikinci on yılında başlayan, yavaş ilerleyen, cinsiyet ve mutasyon tipine bağlı olarak değişkenlik gösteren klinik hastalık tanımını doğrulamaktadır. *Null* mutasyonlar (CAPN3 açık okuma çerçevesi kaybı ve dolayısıyla kalpain proteini yokluğuna neden olan) daha ciddi bir fenotipe yol açarken birleşik heterozigot mutasyon taşıyanlar en az etkilenenlerdir. Kas zayıflığı, gövdenin ekstenel kaslarında ve alt ekstremitenin proksimal kaslarında belirgin olarak simetrik ve baskındır. İspanya Nöromusküler Bozukluk kayıtlarından (NMD-ES) 83 kalpainopati hastasının klinik ve genetik verilerinin derlendiği bir çalışmada, son muayenede hastaların %97'sinde alt ekstremitelerde kas güçsüzlüğü üst ekstremitelere göre daha şiddetli bulunmuştur ve hastaların %64'ünde skapular kanatlanma saptanmıştır. Bu kohortta saptanan en yaygın mutasyon, Bask bölgesindeki hastalarda görülen yüksek prevalans nedeniyle genellikle “Bask mutasyonu” olarak bilinen p.Arg788Serfs14* olmuştur. Diğer sık görülen mutasyonlar p.Gly222Arg ve p.Arg748Gln olarak bildirilmiştir. İngiltere’de, 56 İngiliz LGMD2A hastasından oluşan bir kohortta, daha önce bildirilen insidans çalışmalarıyla uyumlu şekilde, LGMD2A’nın, LGMD popülasyonunun %21’ini temsil ettiğini bildirilmiştir ve hiçbir hastada kalp tutulumu görülmemiştir. Homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlar neredeyse tüm hastalarda doğrulanmıştır. Otuzbeş kalpainopati hastasından oluşan bir Alman kohortta, İngiltere kohortuna benzer şekilde, juvenil başlangıçlı hastalarda daha hızlı progresyon bildirmiştir. En sık karşılaşılan mutasyonlar, bizim hastamızda da homozigot formda saptanan c.550delA (p.Thr184ArgfsTer36) ve c.1468C>T (p.Arg49Trp) olmuştur. 2 null alleli olan hastalar için medyan semptom başlangıç yaşı, bir veya sıfır null alleli olan hastalardan daha düşük bulunmuştur. MRG bulguları, distrofin ilişkili kompleks proteinlerini (distrofin ve sarkoglikanlar) kodlayan genlerdeki mutasyonların baskın olarak ön uyluk kaslarını etkilediğini, enzim fonksiyonu olan proteinlerdeki (kalpain-3 ve FKRP *fukutin-related protein*) mutasyonların baskın olarak arka uyluk kaslarını etkilediğini göstermiştir. Bununla birlikte, kalpainopatide, hastalık sırasında, anterior kompartman da

etkilenebilir ancak dikkat çekici bir şekilde, ciddi MRG değişikliklerinin aksine, bazı hastalar kırklı yaşlarında iyi yürüyebilmektedir.

İtalya'da da en sık görülen LGMD tipi LGMD2A olarak bildirmiştir. Motor fonksiyonlar, yaş (gençte iyi), cinsiyet (kadınlarda iyi), Western Blott'ta rezidüel protein varlığı ve çerçeve kayması/null allel sayısı (0, 1 ve 2'den daha iyi) ile korelasyon göstermiştir. Ekzon 11'deki spesifik mutasyonlar, nispeten geç bir yaşta hastalık başlangıcı ve normal bir CAPN3 ekspresyonunun (otokatalitik kusur) gözlemlendiği özgün bir fenotip ile ilişkili bulunmuştur. LGMD2A, Brezilya'da da LGMD vakalarının yaklaşık %32'sine karşılık gelen yaygın form olarak izlenmiştir. Toplam 31 farklı mutasyon tanımlanmıştır ve ailelerde akrabalık oranı çok yüksektir (% 72). p.Arg788Serfs*14 (Bask mutasyonu) ve p.Arg110* mutasyonları gibi Avrupa ve ABD'deki en yaygın mutasyonlardan bazıları Brezilya'da daha sık görülmüştür. Mutasyon tipi ve proteinin korelasyonu gösterilmiş, nonsense mutasyonlar proteinin tamamen yokluğunu gösterirken, bazı mutasyonlar kasta bir miktar kalpain 3 proteininin varlığı ile uyumlu bulunmuştur. İlginç bir şekilde, p.Lys254del ve p.Arg490Trp gibi bazı spesifik mutasyonlar, kasta neredeyse normal kalpain 3 varlığını göstermiştir.

Hollanda'da 2019 yılında yapılan bir çalışmada kalpainopatinin ülkedeki en büyük OR LGMD alt grubu olduğu tespit edilmiştir. CAPN3 geni dizilenmiş ve delesyon/duplikasyon taramaları MLPA analizi ile gerçekleştirilmiştir. CAPN3'te kırk dokuz farklı mutasyon tespit edilmiştir. Çoğu mutasyon, sadece bir kez bulunan ve CAPN3 geni boyunca dağılmış farklı mutasyon tipleridir. En sık görülen mutasyonlar, c.1981del, p.Ile661, c.550delA (p.Thr184Argfs*36), c.759_761del (p.Lys254del), c.640G>A (p.Gly214Ser) olarak kaydedilmiştir. Hastalarda genellikle diğer allelde büyük bir delesyon ya da duplikasyonla birlikte yeni varyantlar tespit edilmiştir (350).

Sadece anormal bir proteinin üretilmesi ile sonuçlanan tekil CAPN3 varyantları dominant LGMD2A'ya neden olur. Kalpain-3'ün tamamen kaybolduğu bazı LGMD2A olgularının aksine, ciddi ölçüde azalmış seviyelerde olmakla beraber normal tip proteinler dominant formda kısmen bulunabilir. Bu nedenle dominant kalpainopati fenotipinin resesif formdan daha hafif olabileceği bildirilmiştir. Hastalığın başlangıç yaşı daha geçtir ve kas zayıflığı daha hafiftir. Ayrıca, plazma CK seviyeleri her zaman yükselmez.

Sonuç olarak, çoğu ülkede LGMD2A genellikle LGMD'nin en sık görülen formudur. Hastaların çoğu, uyluğun posterior kompartımanının önemli, seçici bir tutulumu olan klasik bir klinik fenotip gösterir. Hastalık seyri genellikle yavaştır, ancak erken başlangıç ile daha yüksek bir şiddet arasında olası bir korelasyon vardır. Solunum fonksiyonu hastaların bir kısmında tehlikeye girebilir. Kardiyak sorunlar nadiren görülür ve muhtemelen rastlantısalıdır. LGMD2A'da nadiren ortaya çıksada, solunum fonksiyonunun değerlendirilmesi ve izlenmesi tedavi standartlarının bir parçası olmalıdır. Günümüzde, bilinen tüm LGMD genlerini veya bilinen tüm miyopati genlerinin analizi, tüm ekzom dizileme gibi farklı stratejiler de dahil olmak üzere *CAPN3* analizi için NGS kullanılabilir. *CAPN3* mutasyon spektrumu geniştir, şu anda iyi karakterize edilmiş kurucu mutasyonlar dahil olmak üzere 400'den fazla farklı patojenik varyant rapor edilmiştir. Kalpainopatinin moleküler tanısı, sekonder eksikliklerden de kaynaklanabileceğinden karmaşıktır. Kalpain gen mutasyonu olmadan kalpain ekspresyonunda sekonder azalmanın (sekonder kalpainopatiler) diğer limb-girdle kas distrofilerinden nadir olmadığı belirtmiştir. Bu olgularda *FKRP*, *ANO5*, *TTN* genlerinde primer genetik kusur tanımlanmıştır. Klinik tablo primer formdan oldukça farklıdır. Örneğin *TTN* mutasyonu taşıyan hastalar yaygın kontraktürler ve kas biyopsisinde inklüzyon cisimciği ile ayırt edilebilir (351). Bu nedenle uzmanlar tanı ve araştırma amaçlı kas biyopsilerinin değerini vurgulamaktadır. Primer kalpainopati tanı algoritmasında NGS kullanılmasına rağmen, biyopsi analizi, protein ekspresyonu ve klinik seyir arasındaki korelasyonun daha iyi anlaşılması ve hastalara prognostik bilgi sağlanması için çok yardımcıdır.

Kalpainopatiler üzerine yapılan çalıştayda Kalpain-3'e ilişkin iki farklı terapi tartışılmıştır (345). İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerinin (MSC) ve umbilikal kordondan elde edilen kök hücrelerin, C3KO farede kalpain-3 ekspresyonu ve fonksiyonel kapasitenin artırılması amacıyla kas içine greftleme yeteneği değerlendirilmiştir. İncelenen hayvanların kaslarında uygulama sonrasında western blot analizi ile kalpain 3 proteini saptanmamıştır. Bununla birlikte, bazı testler, enjekte edilen hücrelerin faydalı bir etkisi olabileceğini düşündürmüştür. MSC hücrelerinin kas rejenerasyonunun rejeneratif intrinsik süreçlerine olası parakrin etkisi tartışılmıştır. İyi bir miyojenik potansiyele sahip farklı hücre kaynaklarından ekstrakte edilen hücre dışı veziküllerin rejeneratif

potansiyeli incelenmeye devam etmektedir. İkinci bir strateji olarak iskelet kasında gen transferi için mevcut standart araç olan rekombinant Adeno-İlişkili Viral (rAAV) vektörlerin kullanıldığı bir dizi deneyde, LGMD2A için gen transferine dayalı terapötik bir strateji geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kalpain-3'ün sürdürüldüğü bir murin modelinin iskelet kasına, CAPN3 eksprese eden rAAV vektörlerinin lokal enjeksiyonlarından sonra, iskelet kaslarında etkili bir CAPN3 transgen ekspresyonu gözlenmiştir (352). Kardiyak toksisite oluşması nedeniyle ikinci nesil vektörler tasarlanarak yeniden uygulama yapılmış ve bu etkiler baskılanmıştır. AAV9-kalpain-3 vektörlerine ilişkin devam eden bir biyo-dağılım ve güvenlik çalışmasının sonuçları umut verici olmakla beraber, iskelet kasındaki kalpain-3'ün fonksiyonunu daha iyi anlayabilmek için daha fazla prelinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda **aile 13 olgu III-7**'de *DYSF* geninde ekzon 52'de homozigot c.5767+1G>A değişimi saptandı. Disferlin genindeki patojenik varyantlar Myoshi miyopati (MM) ve Limb-girdle müsküler distrofi LGMD-Tip 2B ile ilişkili bununmuştur (276). Disferlin kalsiyum (Ca²⁺) aracılı sarkolemma hasarı tamirinde rol oynayan bir membran proteindir. Disferlinin vezikül-membran füzyonunda görev yaparak, kas hücre membran tamiri ve kas hücre rejenerasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir CAPN3 gen mutasyonu sebebi ile görülen kalpain 3 eksikliğine bağlı LGMD-Tip2A'ya benzer klinik gösterir. Kalpain proteini disferlinopatili hastalarda da düşük bulunabilir.

Çalışmamızda **aile 14 olgu III-6**'da astenik vücut yapısı, CK yüksekliği (10492 U/L) ve tremoru olan 18 yaşında erkek olguda, BMD/DMD moleküler analiz ile dışlanmış ve TED analizinde ***DHTKD1*** geninde (Dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1) ekzon 13'de heterozigot c.2185G>A (p.Gly729Arg) değişimi saptanmıştır. *DHTKD1* geninin, OR 2-aminoadipik 2-oxoadipik asidüri (MIM# 204750) ve OD Charcot-Marie-Tooth Disease, Aksonal, Tip 2Q; CMT2Q (MIM# 615025) ile ilişkisi bildirilmiştir.

Olgunun, mükerrer hastane başvurularının nedeni yedi yaşından beri devam eden ellerindeki tremor olmakla birlikte, bu süreçte tespit edilen ve sebat eden CK yüksekliği nedeniyle, BMD/DMD açısından yapılan moleküler analizlerde patojenik değişim saptanmamış. İğne EMG'de hafif miyojen tutulum ve histopatolojik incelemede hafif miyopati bulguları saptanan olgu, ılımlı bir kas

hastalığı olarak değerlendirilerek tanı için TED'e yönlendirildi. Metabolik miyopatiler açısından Beslenme ve Metabolizmaya konsülte edilen olgunun idrar organik asit analizinde spesifik bir hastalığı işaret etmeyen 3-metiladipik asit atılımı vardı (14 mmol/mol kre referans değeri:0). Kanda ve idrarda kantitatif aminoasit analizi yapılması planlandı.

Olgumuzda heterozigot formda tespit edilen p.Gly729Arg değişimi, birleşik heterozigot formda *DHTKD1*'in fonksiyon kaybı ile birlikte 2-aminoadipik 2-oksoadipik asidüri ile ilişkilendirilmiştir (353,354). Danhauser ve arkadaşları tarafından sunulan ilk çalışmada, etkilenen iki bireyden ilkinin ekzom dizilemesi, *DHTKD1* geninde, bir alelde başlangıç kodonunda metiyonin mutasyonu (c.1A>G) [p.Met1?] ve diğer alelde yanlış anlamlı mutasyon (c.2185G>A [p.Gly729Arg]) olmak üzere birleşik heterozigot değişimi göstermiştir. İlk mutasyon, c.1A>G, başlangıç kodonunu etkiler ve sonraki AUG üçlüsüne kadar 160 nükleotidinin çerçeve dışı kalmasına neden olarak işlevsel olmayan bir protein ekspresyonuna neden olur. Diğer etkilenmiş bireyin dizi analizinde, *DHTKD1*'de aynı yanlış anlamlı mutasyon, dur kodonuna neden olan anlamsız bir mutasyonla birlikte (c.1228C> T [p.Arg410 *]) saptanmıştır. Her iki birey de bir alelde tahmini bir fonksiyon kaybı mutasyonu taşıdığından, paylaşılan yanlış anlamlı mutasyonunun *DHTKD1* aktivitesi üzerindeki etkinliği belirsizdi. Lentiviral sistem kullanılarak gerçekleştirilen tamamlayıcı fonksiyonel çalışmalarda, p.Gly729Arg varyantının taşıyıcılarından izole edilen fibroblastlara, vahşi tip *DHTKD1* cDNA'sı içeren ekspresyon vektörü transferi ile artmış 2-oksoadipat seviyelerinin normalize edildiği gösterilmiş ve sonuçlar kusurlu lizin metabolizmasına işaret etmiştir. L-lizin yıkımı, mitokondriyal, sitozolik ve peroksizomal yollardaki enzimleri içeren karmaşık ve çok adımlı bir katabolik süreçtir. L-hidroksilizin ve L-triptofanın yıkım yolları ile sırasıyla 2-aminoadipik-6-semialdehit ve 2-oksoadipat seviyelerinde birleşir. Bu veriler *DHTKD1*'in, 2-oksoglutarat-dehidrojenaz enzim kompleksinin (OGDHc) bir parçası olduğunu ve bu amino asitlerin yıkım yolunda, 2-oksoadipatın glutaryl-CoA'ya dekarboksilasyonunda rol aldığını göstermiştir. Düşük *DHTKD1* aktivitesinin, 2-oksoadipat ve 2-oksoaminoadipat seviyelerinde artışa neden olarak, MSUD gibi aminoasidopatilerden daha hafif ve nonspesifik bulgulara neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu olgularda, hafif psikomotor gerilik ve dikkat

eksikliği hiperaktivite sendromu, konuşmanın gecikmesi ve ılımlı hipotoni gibi klinik bulgular bildirilmiştir. Hastalığın genetik temelini daha iyi tanımlamak için, biyokimyasal bulguları olan on hastadan oluşan bir kohortta *DHTKD1* geni dizilenmiştir (354). *DHTKD1*'in moleküler analizinde, ekson/intron bağlantı bölgeleri dahil 17 eksonun tümü Sanger yöntemi ile dizilenmiş, fibroblast mevcutsa, tanımlanan mutasyonun etkisi qPCR ile mRNA seviyesinde ve immüno blot ile protein seviyesinde gösterilmiştir. Bu çalışmada dokuz yeni mutasyon rapor edilmiştir (üç yanlış anlamlı, iki anlamsız, iki kırılma hatası, bir delesyon ve insersiyon). Daha önce bildirilen ve bizim olgumuzda da saptanan değişim, vakaların çoğunda görülmüştür. Sadece tek alelde p.Gly729Arg değişimi olan ve ikinci alelde değişim saptanamayan 2 yaşında bir erkek çocukta ılımlı bir psikomotor gerilik ve myoklonik epileptik nöbetler tarif edilmiştir. Klinik bulgular heterojen olup, erken başlayan PMG, epilepsi, ataksi, mikrosefali, gelişme basamaklarında gecikme, davranış bozukluğunu ile ağırdan normale yakın fenotipe kadar geniş bir spektrum sergiliyordu. Bu geniş fenotip yelpazesi bazı araştırmacıların, 2-ketoadipik asidürinin gerçek bir hastalık mı, yoksa yalnızca biyokimyasal anormalliklerin neden olduğu bir tanı önyargısı mı olduğunu sorgulamasına yol açtı (355). Stiles ve arkadaşları, *DHTKD1*'de birleşik heterozigot veya homozigot mutasyonları olan iki farklı aileden dört ketoadipik asidürili olgudan, c.915G>C; p.Gln305His varyantını homozigot taşıyan üç kardeşin asemptomatik kaldığını bildirdiler. Bu varyant, genel popülasyonda % 0,05'lik bir minör alel frekansına (MAF) sahipti. Diğer olguda, 15 aylıkken motor gerilik, atipik nörolojik muayene bulguları, nöbet benzeri ataklar tespit edildi. TED analizi olguda, birleşik heterozigot formda c.2185G>A (p.Gly729Arg) ve c.2143C>T (p.Arg715Cys) değişimini gösterdi. 4 yıllık bir süre boyunca takip edilerek gelişme eğrileri kaydedilen olguda, son değerlendirmede işitsel dikkat için 1 persentilin altında ve okuma bozukluğu teşhis edildi. Diğer üç kardeşte henüz semptom vermeyen 2-ketoadipik asidüri, çocuklukta klinik belirtiler belirgin olmadan ortaya çıkmış olabilir. Bu asemptomatik bireylerin daha sonra yaşamlarında bir klinik fenotip geliştirecek olma olasılığını dışlamak, veya *DHTKD1* geninde belirli mutasyonların hastalığa neden olduğu, diğerlerinin olmadığını söylemek zordur. Bu çalışmalar *DHTKD1*'in belki de geç başlangıçlı başka fenotiplerle ilişkisi olabileceğini

düşündürmektedir. Örneğin, Xu ve arkadaşları 2012'de, bir Çin ailesinde 5 nesilde OD formda segregе olan, Charcot-Marie-Tooth Nöropatisi tip 2 (CMT2) fenotipi (#615025) ile ilişkili *DHTKD1* geninde fonksiyon kaybına neden olan ekzon 8'de c.1455T>G (p.Tyr485*) varyantını tanımlamıştır (356). Başlıca semptomlar, distal alt ekstremitelerde güçsüzlük, distal ön kollarda ve ellerde kas atrofisi, azalmış derin tendon refleksleri, hafif ila orta derecede derin duyu bozukluğu ve yürüme güçlüğü içeren çalışmada, hastaların mRNA'sı normalin yarısı kadar eksprese olmuştu. İn-vitro olarak *DHTKD1* susturulmasının, ATP, NAD⁺ ve NADH seviyelerinin azalmasıyla kanıtlanan bozulmuş enerji üretimine yol açtığı gösterilmiştir. Çeşitli hücre dizilerinde *DHTKD1* ifadesinin azaltılması, ve farelerde metabolomik/proteomik çalışmalar bu proteinin 2-aminoadipik asit bağlantısı yoluyla glukoz homeostazı, mitokondriyal fonksiyon ve enerji üretiminde bir rol oynadığını düşündürmektedir (357).

Olgumuzdaki en önemli bulgu olan tremor, "vücut parçasının istemsiz, ritmik, salınımlı hareketi" olarak tanımlanır ve esansiyel tremor (ET), tüm dünya popülasyonunda yaklaşık %1 oranında bildirilen en yaygın hareket bozukluğudur. Etiyopatogenezi halen aydınlanmamış olsa da genetik değişimlerin neden olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Klasik olarak "iyi huylu" bir motor bozukluk olarak kavramsallaştırılmasına rağmen, artan bir araştırma grubu, ET'nin ne tek başına bir antite, ne de iyi huylu olmadığını ifade etmektedir (358). Sınıflandırmaya yönelik yaklaşım, dört ana özelliği tanımlar: etkilenen anatomik bölge (örn. bacak, el), aktivasyon (dinlenme, postüral), frekans (hareketin hızı, Hz olarak tanımlanır) ve genlik (hareketin ne kadar büyük olduğu). Abartılı bir fizyolojik titreme esansiyel tremor olabileceği gibi, etiyolojiye göre de tanımlanabilir (Parkinson, Wilson gibi bir hastalığın semptom kümesinin parçası olarak). Charcot-Marie-Tooth Nöropati tip 2, hereditör motor-duyusal nöropatinin (HMSN) en sık formudur ve bu güne kadar 90 kadar genle ilişkili bir çok alt tipi tanımlanmıştır. CMT Aksonal, OD tip 2Q *DHTKD1* ile ilişkilendirilmiştir (359). HMSN ile ilişkili tremor, klinik olarak esansiyel tremora benzer şekilde, genellikle postüraldır. HMSN'deki hareket bozuklukları ile ET arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, klinik özelliklerdeki örtüşme, ailede tremor öyküsünün yüksek sıklığı ve tremorun ciddiyeti ile periferik nöropati

arasında bir ilişkinin olmaması, HMSN'deki titremenin patojenik olarak ET ile ilişkili olduğunu, belki de CMT ve ET genlerinin bağlantısı olduğunu düşündürmektedir (360).

Sonuç olarak olgumuzda tek alelde saptanan c.2158G>A; p.Gly729Arg değişiminin, literatürde klinik bulgusu olan hastalarda gözlenen en sık ortak varyant olması fenotip ile ilişkisini desteklemektedir. Bu varyantın, Genom Toplama Veritabanında (*Genome Aggregation Database*, gnomAD) Finlandiya dışı Avrupa popülasyon frekansı %0,3 (125.736'de 347) olarak belirtilmiştir ve ClinVar'da muhtemel patojenik / önemi belirsiz (ID 39564) olarak listelenmiştir. Mevcut bilgilere dayanarak, p.Gly729Arg varyantının CMT hastalığına ilişkin klinik önemi kesin olarak belirlenemez, ancak 2-aminoadipik 2-oksoadipik asidüri ile ilişkili olarak patojenik olması muhtemeldir. G729R varyantı, Ekzom Toplama Konsorsiyumu ExAC'ta (*The Exome Aggregation Consortium*) hiç bir bireyde homozigot bildirilmemiş, Finlandiya dışı Avrupa kökenli bireylerde 151 / 66.498 alelde gözlenmiştir (% 0.23). Bu dizi değişikliği, DHTKD1 proteininin (p.Gly729Arg) kodon 729'unda glisini arginin ile değiştirir. Glisin orta derecede korunur ve glisin ile arginin arasında fizikokimyasal fark vardır. Polarite, yük, boyut ve/veya diğer özellikler bakımından farklılık gösterdiğinden ikincil protein yapısını etkileme olasılığı yüksektir. Bu değişim, korunmayan bir pozisyonda meydana gelse de, in-siliko analizler, bu varyantın muhtemelen protein yapısına/fonksiyonuna zarar verdiğini öngörür. Literatürde, 2-aminoadipik 2-oksoadipik asidürlü bireylerde, nadir görülen yanlış anlam ve fonksiyon kaybı varyantları ile kombine ve zıt kromozomda (trans olarak) gözlenmiştir. Bu bulgu otozomal resesif kalıtımla uyumludur ve bu varyantın hastalığa katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. ClinVar, bu varyant için bir giriş içermektedir (Varyasyon Kimliği: 39564). Yanlış anlamlı değişikliklerinin protein yapısı ve işlevi üzerindeki etkisini tahmin etmek için geliştirilen algoritmalar, bu yanlış anlamlı değişimin potansiyel etkisi konusunda hemfikir değildir. Bu nedenlerden dolayı bu varyant patojenik olarak sınıflandırılmıştır.

Olgumuzun aile taramasının tamamlanması ve kalıtım modelinin belirlenmesi, plazma 2-ketoadipik, 2-aminoadipik ve 2-hidroksiadipik asit düzeylerinin ölçümü, derin fenotipleme ve TED verisinin yeniden analizi sonrasında varyantın olası etkisinin tekrar değerlendirilmesi planlandı.

Çalışmamızda **aile 15** 'da indeks olgu ve etkilenmiş kardeşinde yapılan TED analizinde *SMARCAL1* geninde ekzon 5'te homozigot c.1027_1034delTTTCGAGGC (p.F343Rfs*13) varyantı saptandı. *SMARCAL1* protein işlevinde fonksiyon kaybına yol açması beklenen bu patojenik varyantın, hastalığın kalıtım modeli ile uyumlu olması, destekleyen radyolojik ve laboratuvar bulgularının olması (idrarda proteinüri ve flowsitometrik olarak saptanan T hücre yetmezliği) Schimke immün-kemik displazisi tanısını desteklemiş ve kardeşlerdeki bulguların genetik kökenini açıklamıştır. Tarafımıza il dışından başvuran her iki olguda, ağır büyüme gelişme geriliği dışında henüz semptom olmadığından, hastane başvurularında, bu geriliğin sık nedenleri tetkik edilmiş, ancak herhangi bir tanı konulamamış ve nadir hastalıklar açısından araştırma yapılmamıştır. Radyolojik tetkiklerde orantılı kısalık saptanması, bizim muayenemizde de iskelet displazisi ilişkili ön tanıları akla getirmedığından, sitogenetik ve moleküler sitogenetik incelemelerden sonra TED analizine geçilmiştir. Patojenik varyantın saptanmasından sonra, hastalığın böbrek ve immün sistem tutulumunu araştırmak için idrarda protein tayini ve kanda flowsitometrik inceleme istenmiş ve elde edilen patolojik bulgular moleküler tanıyı doğrulamıştır. Bu olgularda yapılan TED analizi, moleküler inceleme ile klinik tanı olanağı sağlamıştır.

Gen regülasyonu, replikasyon, rekombinasyon ve DNA onarımında, nükleozom katlanmasını/sıkışmasını düzenlemek için, kromatinin yeniden modellenmesinde, birkaç multiprotein kompleksi işlev görür. Bu kompleksler tipik olarak, iyi korunmuş SNF2 protein ailesinin bir üyesini içerir. Tüm SNF2 ailesi proteinlerinde, helikazlarda bulunan motiflere benzer 7 motife sahip yaklaşık 400 amino asitli SNF2 domaini vardır. SNF2 domaininde, bir nükleotit bağlama sahası, bir fosfat bağlama döngüsü (Walker A ve B kutuları olarak da adlandırılır), bir DEAD kutusu ve DNA ve ATP bağlama motifleri bulunur. Coleman ve arkadaşları, 2000 yılında SNF2 domainine benzer diziler içeren preteinler için, veritabanını araştırarak ve ardından RT-PCR ile HARP olarak adlandırdıkları *SMARCAL1*'i kodlayan bir cDNA elde etti. Fare homologuna %72 özdeş olan ve tahminen 954-amino asitten oluşan *SMARCAL1* proteini, korunmuş bir C-terminal SNF2 alanına sahiptir (361).

Her hücre bölünme döngüsünde, genomun tam ve doğru duplikasyonu için DNA kalıp hasarı, replikasyon ve transkripsiyonel mekanizmalar arasındaki çarpışmalar ve replikasyonu zor DNA dizileri dahil, replikasyon stresi oluşturan faktörlerin giderilmesi gerekmektedir. Hücreler bunların üstesinden gelmek üzere, duran replikasyon çatallarını sabitleyen, onaran ve yeniden başlatan özel enzimler içeren çok yönlü replikasyon stres yanıtını kullanır. SMARCAL1, ZRANB3 ve HLTF dahil olmak üzere bu enzimler DNA bağımlı ATPazların SNF2 ailesinin üyeleridir (362). Bu enzimlerin hepsi SNF2 tip ATPaz domainine sahiptir, ancak DNA bağlanması ve aktivitesi için gereken aksesuar domainlerde farklılık gösterir. SMARCAL1, replikasyon proteini A'ya (RPA) doğrudan bağlanma kabiliyeti nedeniyle bu enzimler arasında benzersizdir. Spesifik olarak, replikasyon çatalı yapılarına RPA bağlanma konumu, SMARCAL1'i inhibe edebilir veya aktive edebilir. RPA bağlanması, hücrelerde SMARCAL1'in replikasyon stres yanıtı fonksiyonlarının en azından bir kısmı için kritiktir.

DNA replikasyonu, onarımı, rekombinasyonu, telomer bakımı ve DNA hasarına hücresel yanıtın düzenlenmesinde yer alan RPA kompleksi, DNA metabolizmasında önemli bir rol oynar. SMARCAL1'in, protein-protein etkileşimi (PPI) ağında RPA kompleksinin alt birimlerini kodlayan iki *RPA2* ve *RAP1* geni ve replikasyon stresine hücresel yanıt ve DNA onarımında yer alan ATR-ATRIP protein kinaz kompleksini kodlayan genlerle güçlü bir etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir (363). Endojen replikasyon stresinin bir kaynağı telomerik DNA'nın TTAGGG tekrarlarıdır. Telomerler, olağandışı DNA yapıları oluşturabildikleri için replikasyon mekanizmalarını zorlayabilir. Poole ve arkadaşlarının çalışmasında, SMARCAL1 eksikliği olan hücrelerin telomer ile ilişkili DNA hasarı biriktirdiği ve yüksek düzeyde ekstrakromozomal telomer DNA'sı (C-daireleri) içerdiği tespit edilmiştir. SMARCAL1'in telomerlerdeki aktivitesi, RPA ile etkileşim gerektirmediği için, kromozomal replikasyondaki genom-bakım aktivitesinden ayrılabilir. Bu telomer bütünlüğünü sürdürme fonksiyonunun SMARCAL1'e özgü olduğu kaydedilmiştir. Araştırmacılar SMARCAL1 mutasyonlarının neden olduğu bir hastalık olan Schimke immün osseöz displazi (SIOD) ile ilişkili fenotipleri etkileyecek, daha önce bilinmeyen bir SMARCAL1 fonksiyonunu tanımladıklarını belirtmişlerdir (362).

Schimke immüno-osseöz displazi (SIOD), spondiloepifizeal displazi, böbrek fonksiyon bozukluğu ve T-hücre immün yetmezliğini kapsayan tanısal özelliklere sahip otozomal resesif bir pleiotropik bozukluktur. Bu klinik durumların yanı sıra hastaların bir kısmında hipotiroidizm, epizodik serebellar iskemik ve kemik iliği yetmezliği görülür. F. Boerkoel ve arkadaşları genom boyu bağlantı haritalaması ve pozisyonel aday yaklaşımı kullanarak, SMARCAL1 (SWI/SNF2 ile bağlantılı, matrisle ilişkili, aktin bağımlı kromatin düzenleyicisi, alt aile A-benzeri 1) mutasyonlarının SIOD'dan sorumlu olduğunu belirlemiştir. Yazarlar şiddetli hastalığı olan bireylerde iki allelde nonsense, çerçeve kayması veya insersiyon mutasyonları, hafif hastalığı olan bireylerde ise her bir allelde missense mutasyon tespit etmişlerdir. Bu gözlemler bazı missense mutasyonların SMARCAL1 fonksiyonunun kısmi olarak korunmasına izin verdiğini ve dolayısıyla daha hafif hastalığa neden olduğunu göstermektedir (364). SIOD fenotipik heterojenlik gösterir ve hastalık şiddeti SMARCAL1 inaktivasyon derecesi ile orantılıdır. İnfanitil başlangıçlı, erken dönemde ölümcül olan şiddetli hastalığa sahip hastalarda en az bir SMARCAL1 fonksiyon kaybı mutasyonu (delesyon, nonsense veya çerçeve kayması) taşır, oysa daha az şiddetli fenotip ve ikinci 10 yılda hayatta kalma oranı muhtemelen birleşik missense mutasyonlarla ilişkilidir. Bununla birlikte, Elizondo ve ark. subelüler yerleşimi, enzimatik aktiviteyi, protein seviyelerini veya kromatin bağlanmasını etkilediği gösterilen missense mutasyonların şiddetli fenotiplere neden olabildiğini bildirmiştir. Öte yandan çerçeve kayması ve trunkasyon mutasyonlarının hafif bir fenotipe yol açabildiği bulunmuştur ve genotip-fenotip korelasyonlarının büyük ölçüde öngördürücü olmadığını düşündürmektedir. Aynı SMARCAL1 mutasyonlarının hastalığın hem hafif hem de şiddetli olgularında görüldüğü keşfedilmiştir ve meyve sineklerinde, farelerde ve insanlarda SIOD fenotiplerini şekillendiren çevresel faktörlere ilişkin kanıtlar bulunmuştur (363). Dolayısıyla, bir SMARCAL1 mutasyonunun etkisi sadece SMARCAL1 genotipine değil, aynı zamanda çevresel ve genetik arka plan varyasyonlarına da bağlıdır.

SIOD hastalarında SMARCAL1 protein fonksiyonunun bulunmaması veya bozulması, perinatal veya ergenlik döneminde ortaya çıkan böbrek gelişim anomalilerine neden olabilir. Erişkin böbrekte SMARCAL1, glomerulus, nefron

tübülleri ve toplama kanallarında eksprese edilir ve SMARCAL1 proteininin podositlerin ve endotelial hücrelerin bakımında ve bütünlüğünde rol oynadığını gösterir. Özellikle, SMARCAL1 ile etkileşen ilk 15 genin hepsinin benzer bir renal temporal ekspresyon paterni gösterdiği tespit edilmiştir (363). Ek olarak, SIOD olgularında mutasyonlar SMARCAL1'in helikaz ATP bağlayıcı ve C-terminal domainlerinde toplanmıştır. Arg645 bölgesi, çeşitli amino asit değişikliklerine sahip tekrarlayan duyarlı bir SMARCAL1 lokusu olma eğilimindedir ve diğer biallelik bölge (c.2141+5G), helikaz C-terminal alt domainin bir kısmını kodlayan ekzon 13'e yakındır. Her ne kadar SMARCAL1 genindeki biallelik mutasyonların SIOD'nin genetik etiolojisindeki yeri bildirilmiş olsa da, moleküler tanı olguların aşırı nadir olması nedeniyle zorlayıcıdır. Jin ve ark.'ın çalışmasında hastanın aşırı derecede hafif ve karakteristik olmayan fenotipi (asemptomatik proteinüri ile sınırlı böbrek fonksiyon bozukluğu olan, ancak nörolojik bulgu veya tekrarlayan enfeksiyon olmayan) ile kesin tanıya ulaşamamıştır ve hastalık doğrulanmadan önce TED uygulanan ve genetik teste dayanarak tanı konulan ilk olgu olmuştur. Sonuç olarak, yeni bir maternal kırılma hatası mutasyonu (c.2141+5G>A) ve bilinen bir paternal mutasyon (c.1933C>T; p.Arg645Cys) tanımlanmıştır. Başlangıçta karakteristik bir fenotipe göre SIOD tanısı konulan hastalara kıyasla, genetik tarama ile tanı konulan SIOD probandlarında, daha hafif bir ekstrarenal fenotip ve daha iyi bir 10 yıllık hasta sağkalımı izlenmiştir (365). TED'in, özellikle nadir görülen hastalıklarda, klinik semptomların hastalık tanısına olanak tanımayacak kadar hafif seyrettiği kişilerde patojenik mutasyonları etkili bir şekilde tanımlayabildiği bilinmektedir (366,367). TED'in genetik test olarak kullanıldığı daha önce bildirilen tek SIOD hastasında moleküler tanı şiddetli nörogelişimsel gecikme, fasiyel dismorfizm ve spondiloepifizal kemik displazisi ile birlikte fenotipe dayalı ilk tanıdan sonra gerçekleştirmiştir (368). Yazarlar çalışmalarının, TED'in çok nadir görülen hastalıkların erken tanısında yüksek performanslı bir araç olduğunu bir kez daha kanıtladığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde bizim olgumuzda da, ağır büyüme geriliği nedeniyle, Endokrin ve Metabolizma tarafından takip edilen olgunun, tarafımıza başvurduğunda çekilen iskelet sistemi grafilerinde saptanacak düzeyde displazik kemik yapısı bulunmuyordu. Ancak bu durum teknik çekim hatalarından (yön, dozaj vb) kaynaklanabilir. Ayrıca proporsiyonel

bir kısalık vardı ve literatürle uyumlu dar pelvis yapısı mevcuttu. Küçük kardeşte henüz hafif düzeyde olmak üzere her iki olguda proteinüri saptandı. (büyük olgu 2000 mg/L, küçük kardeş 157 mg/L). Her iki kardeşte, flowsitometrik incelemede T hücre yetmezliği tespit edildi ve küçük olgu sitomegalovirüse bağlı akciğer enfeksiyonu nedeniyle, bir kaç ay YB tedavisine rağmen kaybedildi. Aileye moleküler tanı sayesinde, immün yetmezlik açısından ek aşılar ve önlemlerle enfeksiyondan korunmasına yönelik ve yine proteinüri açısından nefrolojik takip önerilerini içeren kapsamlı bir genetik danışma verildi. Aynı bilgiler il dışındaki sürekli bakım veren hastane doktorları ile de paylaşıldı. Yeni gebelik planı olan aileye, hem kendileri hem de diğer akrabalarının taşıyıcılık riski açısından, OR kalıtım özelliğinde olan bu hastalık için prenatal ve preimplantasyon tanı olanakları konusunda da genetik danışma verildi.

Rutin laboratuvarlarda tanısal amaçlı TED uygulamalarının sayısı her geçen gün artmaktadır. Türkiye’de akraba evliliği nedeniyle nadir hastalıklara sık rastlanmaktadır. Türkiye Aile Yapısı Araştırması (TAYA) 2011 verilerine göre, Türkiye genelinde akraba evliliklerinin oranı %21.3 iken, kentte %19.8, kırdada ise bu oran %24.6’dır (393). YND tekniklerinin ortaya çıkışı tanısal paradigmayı değiştirse de, hastaların dikkate değer bir yüzdesi teşhis edilmeden kalmaktadır. Farklı klinik ortamlarda, hastalık tipine ve hasta seçimine bağlı olarak, TED’in nadir Mendelian hastalıkların % 30-50'sinde tanıyı sağladığı tahmin edilmektedir (394). Yüksek verimli YND teknolojisi, patojenik değişimi taşıyan alellerin belirli genlerde biriktiğini ortaya koyarken, nadir hastalıklarda yeni nedensel genlerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. Ancak öncesinde biyolojik bir çalışma olmadan, TED ile tek bir vakada yeni bir gen ve patojenik varyant bulma olasılığı düşüktür. Ortalama bir birey yaklaşık 20 nadir, "işlev kaybı" varyantı taşır (MAF $\leq$ 0.1) ve bunlardan dördü kırılma hatasına yol açar (395). YND ile hastalıkların tanısında yeni gen tanımlamak, nadir fakat iyi tanımlanandan patolojilerin tanısından daha zordur. Böyle bir teşhisin sağlanmadığı "ekzom-negatif" vakalar için, ekzomdan bir sonraki adımı seçmek, büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. Negatif ekzom sonuçlarının nedenleri arasında; patojenik varyantın somatik mozaiklik vakalarında gözden kaçabilmesi; kodlayan bölgede olup teknik nedenlerle iyi tespit edilememesi, önemi bilinmeyen bir varyantın filtrelemede seçilmemesi, patolojiden sorumlu

olan iki veya daha fazla gende birden fazla varyantın olması, yapısal bir varyantın ekzom dizileme yoluyla düzgün bir şekilde yakalanmaması, ya da varyantın ekzonik olmadığı durumlarda okunamaması olarak sayılabilir ve bu durumlarda tanı konulamayabilir (394). Protein kodlayan bölgeler için, TGD, yalnızca TED ile yakalanamayan değişimleri yakalama fırsatı sağlar ve özellikle yapısal varyantların daha güvenilir bir şekilde tespit edilmesine izin verir. TGD, özellikle nörogelişimsel bozukluklarda %3 ek ek katkı sağlasa da, TED ve TGD için tanısı oran %35-50'yi geçmemektedir.

RNA dizileme (RNA-seq), RNA düzeyini ve transkript çeşitliliğini ölçmek için altın standart haline gelmiştir. Nadir Hastalıklardaki tanısı gücü, hem kodlayan hem de kodlamayan varyantların gen ekspresyon seviyesini ve alternatif kırılma sonuçlarının değerlendirmesini sağladığı için umut vaatmektedir. Özellikle, nöromusküler ve mitokondriyal hastalıklarda patojenik kırılma varyantlarının tespit edilmesinde faydalıdır, ancak RNA dizileme ve diğer fonksiyonel genomik testlerin potansiyel bir sınırlaması, gen ifadesinin çevreye, hücre tipine ve duruma bağlı olmasıdır. Gen ifadesi çalışmak, bir sonraki adım yaklaşımıdır, ancak sadece ekzom negatif vakalardaki varyantların etkilerini aramak için potansiyel bir pencere açar. Yanlış anlamlı varyantlar gibi bazı değişimler, gen ekspresyonunu etkileyebilir. Proteom, metabolom veya epigenom gibi diğer analiz yöntemleri, bu tür varyantların sonuçlarını değerlendirmede yardımcı olabilir. "Ekzom negatif" vakalar için, sağlıklı kontrollerden elde edilen verilerle tamamlanan çeşitli veri türlerine sürekli erişim imkanı, nadir hastalıkların teşhis gücünü her geçen gün artırmaktadır.

YND ile hedefli mitokondriyal gen panelleri, tüm ekzom ve tüm genom dizileme ve son zamanlarda mtDNA ve nDNA'nın kombine analizi gibi farklı genetik yaklaşımlar sayesinde, mitokondriyal hastalıklarda da tanı oranı artmış, 290'dan fazla ilişkili gen tanımlanmıştır. Tanısı etkinliğin artmasının yanında, yeni mekanizmaların ortaya çıkması ve yeni bulguların tanınmasını da sağlanmaktadır. Ancak halen, mtDNA varyant değerlendirme kriterleri yeterince standardize edilememiştir ve bu durum varyant patojenite raporlamasında zorluklara yol açmaktadır. mtDNA uzmanlarından oluşan uluslararası bir çalışma grubu, Mitokondriyal Hastalık Dizi Veri Kaynağı Konsorsiyumu

(*Mitochondrial Disease Sequence Data Resource Consortium*) olarak bir araya gelmiş ve ClinGen'den uzman paneli statüsü almıştır. Bu grup, 2015 ACMG ve varyantların klinik yorumu için yaygın olarak kullanılan diğer standart ve rehberleri referans alarak, mtDNA varyant sınıflandırmasıyla ilgili özel bir kılavuz hazırlamıştır (396).

Sonuç olarak bu çalışmada, projeye dahil edilen ailelerden %65'ine TED ile moleküler genetik tanı sağlandı. Sadece mitokondriyal hastalık grubu olarak baktığımızda ise %50 oranındaydı. Tespit edilen 18 varyantın sekizi *novel* veya daha önce hastalık ilişkisi bildirilmeyen çok nadir değişimlerdi. Mitokondriyal miyopati düşünülen üç hastada moleküler tanının ekstremiter-kuşak kaslar distrofisi (iki kalp hastalığı, bir disferlinopati) olarak sonuçlanması, bu grubun ayırıcı tanıda göz önünde tutulması gerektiğini ve moleküler tanının, hem hastanın doğru izlemi hem de yeni tedavi olanaklarından faydalanması açısından önemli olduğunu ortaya koydu. Moleküler tanı sağlanan ailelerde, gerekli olmayan tanısal incelemelerin ve efektif olmayan tedavilerin kesilmesi ve hastalığın seyri sırasında ortaya çıkması muhtemel komplikasyonlarının takip edilebilmesi sağlandı. Gebelik planı olan ailelere doğum öncesi tanı seçenekleri konusunda genetik danışma verildi. Aileler, hastalıkları konusundaki yeni çalışmalar ve tedavideki olası gelişmeler konusunda bilgilendirilmek üzere takibe alındı. Hastalığın kaynağının bilinmesinin ve bu konuda yapılan bilgilendirmelerin hasta ve hasta ailesi üzerinde yarattığı pozitif etki gözlemlendi.

KAYNAKLAR

1. Garrod, A. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *The Lancet* 1902; 160(4137): 1616-1620.
2. Garrod, A. E. The Croonian lectures on inborn errors of metabolism. Lecture II. Alkaptonuria. *Lancet*, 1908; 2: 73-79.
3. Brunetti-Pierri N., Parenti G., Andria G. Inborn Errors of Metabolism. İçinde: Buonocore G., Bracci R., Weindling M. Editörler. *Neonatology*. Milano: Springer; 2012. pp. 949-966.
4. Sanderson, S., Green, A., Preece, M. A., & Burton, H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Archives of disease in childhood*, 2006; 91(11): 896-899.
5. Arpacı, T., Altay, N., Toruner, E. K., & Gunduz, M. Symptoms and Problems in Children with Inherited Metabolic Diseases and Factors Affecting the Caregiver Burden of Mothers. *Comprehensive child and adolescent nursing*, 2019; 21:1-15.
6. Park, K. J., Park, S., Lee, E., Park, J. H., Park, J. H., Park, H. D., ... & Kim, J. W. (). A population-based genomic study of inherited metabolic diseases detected through newborn screening. *Annals of laboratory medicine*, 2016; 36(6): 561-572.
7. El-Hattab, A. W. Inborn errors of metabolism. *Clinics in perinatology* 2015; 42(2): 413-439.
8. Hoffmann, G. F., Nyhan, W. L., Zschocke, J., Editörler. *Inherited metabolic diseases*. 2nd ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2017.
9. Goel, A., Jamwal, K. D., Ramachandran, A., Balasubramanian, K. A., & Eapen, C. E. Pregnancy-related liver disorders. *Journal of clinical and experimental hepatology* 2014; 4(2), 151-162.
10. Yıldız, Y., & Sivri, H. S. (2019). Maternal phenylketonuria in Turkey: outcomes of 71 pregnancies and issues in management. *European journal of pediatrics*, 178(7), 1005-1011.
11. Kulalı, F., Köse, M., Çelık, T. C., Ergon, E. Y., Kalkanlı, O. H., Çolak, R. ve ark. *Inborn errors of metabolism: a three-year experience*. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Dergisi, 2019; 9(2); 143-148.
12. Clayton EL, Mizielińska S, Edgar JR ve ark. (2015) Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation is characterised by neuronal lysosomal storage pathology. *Acta Neuropathol* 130:511–523.
13. Özkaya, B., Canda, E. E., & Uçar, S. K. Lysosomal Lipid Storage Disease from the Perspective of General Pediatricians. *The Journal of Pediatric Research*, 2016; 3(2): 70-75.
14. Platt, F. M., d'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., & Tiffet, C. J. Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018; 4(1): 1-25.
15. Saudubray JM., Baumgartner MR., Walter J., Editörler. *Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment* 6th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016.
16. Karimzadeh, P. Approach to neurometabolic diseases from a pediatric neurological point of view. *Iranian journal of child neurology*. 2015; 9(1); 1-16.
17. Köse, M., & Çoker, M. Primer nörotransmitter metabolizma kusurları. *İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*. 2017; 27(3): 169-178.
18. van de Kamp, J. M., Mancini, G. M. S., Pouwels, P. J., Betsalel, O. T., Van Dooren, S. J. M., de Koning, I., ve ark. Clinical features and X-inactivation in females heterozygous for creatine transporter defect. *Clinical genetics*. 2011; 79(3); 264-272.
19. Bediz, C. Ş., & Günay, E. Kreatin Desteğinin Egzersiz ve Hastalıklardaki Yeri. *Türkiye Klinikleri Public Health-Special Topic*. 2018; 4(1); 31-41.
20. Alimohammadi-Kamalabadi, M., Eshraghian, M., Zarindast, M. R., Aliaghaei, A., & Pishva, H. Effect of creatine supplementation on cognitive performance and apoptosis

- in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016; 19(11); 1159-65.
21. Banka, S., Blom, H. J., Walter, J., Aziz, M., Urquhart, J., Clouthier, C. M. Ve ark. Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 2011; 88(2); 216-225.
 22. Ferreira, C. R., van Karnebeek, C. D., Vockley, J., & Blau, N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genetics in Medicine*. 2019; 21(1); 102-106.
 23. Blau, N., Martinez, A., Hoffmann, G. F., & Thöny, B. (2018). DNAJC12 deficiency: a new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninemias. *Molecular genetics and metabolism*, 123(1), 1-5.
 24. Fischer, S., Huemer, M., Baumgartner, M., Deodato, F., Ballhausen, D., Boneh, A., ... & Grünewald, S. (2014). Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the CblC defect. *Journal of inherited metabolic disease*, 37(5), 831-840.
 25. Lerner-Ellis, J. P., Tirone, J. C., Pawelek, P. D., Doré, C., Atkinson, J. L., Watkins, D., ... & Dunbar, G. V. (2006). Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nature genetics*, 38(1), 93-100.
 26. Yu, H. C., Sloan, J. L., Scharer, G., Brebner, A., Quintana, A. M., Achilly, N. P., ... & Watkins, D. (2013). An X-linked cobalamin disorder caused by mutations in transcriptional coregulator HCFC1. *The American Journal of Human Genetics*, 93(3), 506-514.
 27. Morava, E., Rahman, S., Peters, V., Baumgartner, M. R., Patterson, M., & Zschocke, J. Quo vadis: the re-definition of "inborn metabolic diseases". *J Inherit Metab Dis*. 2015; 38; 1003–1006.
 28. Stockler, S., Corvera, S., Lambright, D., Fogarty, K., Nosova, E., Leonard, D., ... & Selby, K. (2014). Single point mutation in Rabenosyn-5 in a female with intractable seizures and evidence of defective endocytotic trafficking. *Orphanet journal of rare diseases*, 9(1), 141.
 29. Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet*. 2012;379(9828):1825-1834.
 30. Mayr, J. A., Haack, T. B., Graf, E., Zimmermann, F. A., Wieland, T., Haberberger, B., ... & Moroni, I. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 90(2), 314-320.
 31. Wortmann, S. B., Vaz, F. M., Gardeitchik, T., Vissers, L. E., Renkema, G. H., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., ... & Rodenburg, R. J. (2012). Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nature genetics*, 44(7), 797-802.
 32. Kanabus, M., Shahni, R., Saldanha, J. W., Murphy, E., Plagnol, V., Van't Hoff, W., ... & Rahman, S. (2015). Bi-allelic CLPB mutations cause cataract, renal cysts, nephrocalcinosis and 3-methylglutaconic aciduria, a novel disorder of mitochondrial protein disaggregation. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(2), 211-219.
 33. Wortmann, S. B., Ziętkiewicz, S., Kousi, M., Szklarczyk, R., Haack, T. B., Gersting, S. W., ... & Strom, T. M. (2015). CLPB mutations cause 3-methylglutaconic aciduria, progressive brain atrophy, intellectual disability, congenital neutropenia, cataracts, movement disorder. *The American Journal of Human Genetics*, 96(2), 245-257.
 34. Lamari, F., Mochel, F., & Saudubray, J. M. (2015). An overview of inborn errors of complex lipid biosynthesis and remodelling. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(1), 3-18.
 35. Häberle, J., Boddaert, N., Burlina, A., Chakrapani, A., Dixon, M., Huemer, M., ... & Servais, A. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet journal of rare diseases*. 2012; 7(1); 32-
 36. Kölker, S., Cazorla, A. G., Valayannopoulos, V., Lund, A. M., Burlina, A. B., Sykut-Cegielska, J., ... & Barić, I. (2015). The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(6), 1041-1057.

37. Kölker, S., Valayannopoulos, V., Burlina, A. B., Sykut-Cegielska, J., Wijburg, F. A., Teles, E. L., ... & Arnoux, J. B. (2015). The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(6), 1059-1074.
38. NYHAN, William; BARSHOP, Bruce; OZAND, Pinar. *Atlas of Metabolic Diseases* Second edition. CRC Press, 2005.
39. Demirbas, D., Coelho, A. I., Rubio-Gozalbo, M. E., & Berry, G. T. (2018). Hereditary galactosemia. *Metabolism*, 83, 188-196.
40. Bouteldja, N., & Timson, D. J. (2010). The biochemical basis of hereditary fructose intolerance. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(2), 105-112.
41. Boggan, R. M., Lim, A., Taylor, R. W., McFarland, R., & Pickett, S. J. Resolving complexity in mitochondrial disease: Towards precision medicine. *Molecular genetics and metabolism*. 2019: 128(1-2); 19-29.
42. Alston, C. L. Improving the genetic diagnosis of mitochondrial disease using custom next-generation sequencing strategies. 2017, Doctoral dissertation, Newcastle University.
43. Benda, C. Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertrebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. 1898:73; 393–398.
44. Ochman, H. and Moran, N.A. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*. 2001: 292(5519); 1096-9.
45. Gray, M.W. The pre-endosymbiont hypothesis: a new perspective on the origin and evolution of mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014: 6(3); a016097.
46. Brown, G. C., Murphy, M. P., Scott, I., & Youle, R. J.. Mitochondrial fission and fusion. *Essays in Biochemistry*. 2010: 47; 85-98.
47. Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. and Rojo, M. (2002) 'Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins', *Mol Biol Cell*, 13(12), pp. 4343-54.
48. van der Bliek, A.M., Shen, Q. and Kawajiri, S. 'Mechanisms of mitochondrial fission and fusion', *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5(6);, p. [ePub].
49. Chu C.T., A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Human Molecular Genetics*, 2010; 19:28-37
50. Calvo, S. E., Clauser, K. R., & Mootha, V. K. (2016). MitoCarta2. 0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1251-D1257.
51. Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., ... & Salim, A. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*, 538(7623), 123-126.
52. Kunze, M., & Berger, J. The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. *Frontiers in Physiology*. 2015: 6; 259.
53. Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., ... & Schreier, P. H. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290 (5806); 457-465.
54. Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., ... & Turnbull, D. M. Mitochondrial diseases. *Nature reviews Disease primers*, 2016: 2(1); 1-22.
55. Lagouge, M., & Larsson, N. G. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal medicine*, 273(6), 529-543.
56. Young, M.J. and Copeland, W.C. 'Human mitochondrial DNA replication machinery and disease', *Curr Opin Genet Dev*. 2016: 38; 52-62.
57. Fuste, J. M., Shi, Y., Wanrooij, S., Zhu, X., Jemt, E., Persson, Ö., ... & Falkenberg, M. In vivo occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication. *PLoS Genet*. 2014: 10(12); e1004832.

58. McKinney, E.A. ve Oliveira, M.T. 'Replicating animal mitochondrial DNA', *Genet Mol Biol.* 2013: 36(3); 308-15.
59. Reyes, A., Kazak, L., Wood, S. R., Yasukawa, T., Jacobs, H. T., & Holt, I. J. Mitochondrial DNA replication proceeds via a 'bootlace' mechanism involving the incorporation of processed transcripts. *Nucleic acids research.* 2013: 41(11); 5837-5850.
60. Copeland, W. C. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 2012; 47(1): 64-74.
61. Kornblum, C., Nicholls, T. J., Haack, T. B., Schöler, S., Peeva, V., Danhauser, K., ... & Wieland, T. Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nature genetics.* 2013: 45(2); 214.
62. Uhler, J. P., Thörn, C., Nicholls, T. J., Matic, S., Milenkovic, D., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. MGME1 processes flaps into ligatable nicks in concert with DNA polymerase γ during mtDNA replication. *Nucleic acids research.* 2016: 44(12); 5861-5871.
63. Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012: 13(10); 659-671.
64. Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., & LeDoux, S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity—critical analysis and update. *Cold Spring Harbor perspectives in biology,* 2013: 5(5); a012641.
65. Tadi, S. K., Sebastian, R., Dahal, S., Babu, R. K., Choudhary, B., & Raghavan, S. C. Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. *Molecular biology of the cell.* 2016: 27(2); 223-235.
66. Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., & Attardi, G. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1982: 79(23); 7195-7199.
67. Mazunin, I. O., Levitskii, S. A., Patrushev, M. V., & Kamenski, P. A. Mitochondrial matrix processes. *Biochemistry (Moscow).* 2015: 80(11); 1418-1428.
68. Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., ... & Temiakov, D. Human mitochondrial transcription revisited only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *Journal of Biological Chemistry.* 2010: 285(24); 18129-18133.
69. Montoya, J., Gaines, G. L., & Attardi, G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell.* 1983; 34(1), 151-159.
70. Minczuk, M., He, J., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., ... & Holt, I. J. TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic acids research.* 2011: 39(10); 4284-4299.
71. Van Haute, L., Pearce, S. F., Powell, C. A., D'Souza, A. R., Nicholls, T. J., & Minczuk, M. Mitochondrial transcript maturation and its disorders. *Journal of inherited metabolic disease.* 2015: 38(4), 655-680.
72. Hällberg, B. M., & Larsson, N. G. Making proteins in the powerhouse. *Cell metabolism.* 2014: 20(2); 226-240.
73. Schmeing, T. M., & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature,* 2009: 461(7268); 1234-1242.
74. O'Brien, T.W. Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene.* 2002: 286(1); 73-9.
75. Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S.H. and Ramakrishnan, V. 'Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome', *Science.* 2015: 348(6230); 95-8.
76. Mai, N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. and Lightowlers, R.N. 'The process of mammalian mitochondrial protein synthesis', *Cell Tissue Res.* 2017: 367(1); 5-20.
77. Christian, B.E. and Spremulli, L.L. 'Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria', *Biochim Biophys Acta.* 2012) 1819(9-10), pp. 1035-54.

78. Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., ... & Takeuchi, N. EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis. *Molecular cell*, (2009: 35(4); 502-510.
79. Duchen, M.R. 'Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death', *J Physiol*, 2000: 529(1); 57-68.
80. Stehling, O. and Lill, R. 'The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013: 5(8); a011312.
81. Barupala, D.P., Dzul, S.P., Riggs-Gelasco, P.J. and Stemmler, T.L. 'Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors', *Arch Biochem Biophys*, 2016: 592; 60-75.
82. Kamer, K.J. and Mootha, V.K. 'The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015: 16(9); 545-553.
83. Palty, R., Silverman, W. F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., ... & Khananshvil, DNCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, . 2010: 107(1); 436-441.
84. Jiang, D., Zhao, L. and Clapham, D.E. 'Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter', *Science*, 2009: 326(5949);144-7.
85. Shiflett, A.M. and Johnson, P.J. 'Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists', *Annu Rev Microbiol*. 2010: 64; 409-29.
86. Gakh, O., Ranatunga, W., Smith, D. Y., Ahlgren, E. C., Al-Karadaghi, S., Thompson, J. R., & Isaya, G. Architecture of the human mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. *Journal of Biological Chemistry*. 2016: 291(40); 21296-21321.
87. Rouault, T.A. (2015) 'Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(1), pp. 45-55.
88. Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J. and Walden, W.E. ('Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly (CIA) System: Factors, Mechanism, and Relevance to Cellular Iron Regulation', *The Journal of Biological Chemistry*, 2010: 285(35); 26745-26751.
89. Maio, N. and Rouault, T.A. Mammalian Fe-S proteins: definition of a consensus motif recognized by the co-chaperone HSC20, *Metallomics*. 2016: 8(10); 1032-1046.
90. Rashid, R., Ameer, F., Kalbacher, H., Scanduzzi, L. ve Zaidi, N. Aberrant de novo cholesterologenesis: Clinical significance and implications, *Clin Chim Acta*. 2015: 450; 356-61.
91. Alcazar-Fabra, M., Navas, P. and Brea-Calvo, G. Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure, *Biochim Biophys Acta*, 2016: 1857(8); 1073-8.
92. Cascajo, M. V., Abdelmohsen, K., Noh, J. H., Fernández-Ayala, D. J., Willers, I. M., Brea, G., ... & Siendones, E. RNA-binding proteins regulate cell respiration and coenzyme Q biosynthesis by post-transcriptional regulation of COQ7. *RNA biology*, 2016: 13(7); 622-634.
93. Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., Drouot, N., ... & Anheim, M. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 2008: 82(3); 661-672.
94. Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 'Regulation of the mevalonate pathway', *Nature*. 1990: 343(6257); 425-30.
95. Barupala, D. P., Dzul, S. P., Riggs-Gelasco, P. J., & Stemmler, T. L. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe–S cluster cofactors. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2016: 592; 60-75.
96. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell*, 2005. 17(4), 525-535.

97. Wang, C. and Youle, R.J. 'The role of mitochondria in apoptosis*', *Annu Rev Genet.* 2009: 43; 95-118.
98. DiMauro, S. and Schon, E.A. 'Mitochondrial respiratory-chain diseases', *N Engl J Med.* 2003: 348(26); 2656-68.
99. Alston, C. L., Rocha, M. C., Lax, N. Z., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of pathology.* 2017: 241(2); 236-250.
100. Grigorieff, N. 'Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice', *J Mol Biol.* 1998: 277(5); 1033-46.
101. Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., ... & Salim, A. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature.* 2016: 538(7623); 123-126.
102. Alston, C. L., Compton, A. G., Formosa, L. E., Strecker, V., Oláhová, M., Haack, T. B., ... & Cassiman, D. Biallelic mutations in TMEM126B cause severe complex I deficiency with a variable clinical phenotype. *The American Journal of Human Genetics.* 2016: 99(1); 217-227.
103. Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C. and Zickermann, V. 'Structure and function of mitochondrial complex I', *Biochim Biophys Acta.* 2016: 1857(7); 902-14.
104. Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., ve Ryan, M.T. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012: 1817; 851–862.
105. Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H.J., Arnold, S., Brandt, U. And Nijtmans, L. 'The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I', *Cell Metab.* 2017: 25(1); 128-139.
106. Pierrel, F., Bestwick, M. L., Cobine, P. A., Khalimonchuk, O., Cricco, J. A., & Winge, D. R. COA1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *The EMBO Journal*, 2007: 26(20); 4335-4346.
107. Čížková, A., Stránecký, V., Mayr, J. A., Tesařová, M., Havlíčková, V., Paul, J., ... & Vrbacký, M. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Nature genetics.* 2008: 40(11); 1288-1290.
108. Nouws, J., Te Brinke, H., Nijtmans, L.G. and Houten, S.M. 'ACAD9, a complex I assembly factor with a moonlighting function in fatty acid oxidation deficiencies', *Hum Mol Genet*, 2014a: 23(5); 1311-9
109. Floyd, B. J., Wilkerson, E. M., Veling, M. T., Minogue, C. E., Xia, C., Beebe, E. T., ... & Gromek, K. A. Mitochondrial protein interaction mapping identifies regulators of respiratory chain function. *Molecular cell*, 2016: 63(4), 621-632.
110. Rhein, V.F., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I.M. and Walker, J.E. 'NDUFAF7 methylates arginine 85 in the NDUFS2 subunit of human complex I', *J Biol Chem*, 2013: 288(46); 33016-26.
111. Varghese, F., Atcheson, E., Bridges, H.R. and Hirst, J. 'Characterization of clinically identified mutations in NDUFV1, the flavin-binding subunit of respiratory complex I, using a yeast model system', *Human Molecular Genetics*, 2015: 24(22); 6350-6360.
112. Angerer, H., Nasiri, H.R., Niedergesass, V., Kersch, S., Schwalbe, H. and Brandt, U. 'Tracing the tail of ubiquinone in mitochondrial complex I', *Biochim Biophys Acta*, 2012: 1817(10); 1776-84.
113. Ripple, M.O., Kim, N. and Springett, R. 'Mammalian Complex I Pumps 4 Protons per 2 Electrons at High and Physiological Proton Motive Force in Living Cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 2013: 288(8); 5374-5380.

114. Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M. ve Sazanov, L.A.
Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I, *Nature*, 2016: 538(7625); 406-410.
115. Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. and Rao, Z.
Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II, *Cell*, 2005: 121(7); 1043-57.
116. Cecchini, G. Function and structure of complex II of the respiratory chain, *Annu Rev Biochem*, 2003: 72; 77-109.
117. Sucheta, A., Ackrell, B.A., Cochran, B. and Armstrong, F.A. Diode-like behaviour of a mitochondrial electron-transport enzyme, *Nature*, 1992: 356(6367); 361-2.
118. Lee, G.Y., He, D.-Y., Yu, L. and Yu, C.-A. 'Identification of the Ubiquinone-binding Domain in QPs1 of Succinate-Ubiquinone Reductase', *Journal of Biological Chemistry*, 1995: 270(11); 6193-6198.
119. Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C.,
Byrne, B., Cecchini, G. and Iwata, S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation', *Science*, 2003: 299(5607); 700-4.
120. Yu, C. A., Tian, H., Zhang, L., Deng, K. P., Shenoy, S. K., Yu, L., ... & Deisenhofer, J. Structural basis of multifunctional bovine mitochondrial cytochrome bc 1 complex. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 1999: 31(3); 191-200.
121. Mitchell, P. 'Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle', *FEBS Lett*, 1975: 56(1); 1-6.
122. Kessl, J. J., Lange, B. B., Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Hill, P., Meunier, B., ... & Trumpower, B. L. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2003: 278(33); 31312-31318.
123. Sazanov, L.A. 'A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015: 16(6); 375-388.
124. Babbitt, S. E., San Francisco, B., Mendez, D. L., Lukat-Rodgers, G. S., Rodgers, K. R., Bretsnyder, E. C., & Kranz, R. G. Mechanisms of mitochondrial holocytochrome c synthase and the key roles played by cysteines and histidine of the heme attachment site, Cys-XX-Cys-His. *Journal of Biological Chemistry*, 2014: 289(42); 28795-28807.
125. Manickam, P., Kaushik, A., Karunakaran, C. and Bhansali, S. 'Recent advances in cytochrome c biosensing technologies', *Biosens Bioelectron*, 2016: 87; 654-668.
126. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., ... & Yamaguchi, H. Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science*, 1998: 280(5370); 1723-1729.
127. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., ... & Yoshikawa, S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 1996: 272(5265); 1136-1144.
128. Rak, M., Bénit, P., Chrétien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., El-Khoury, R., ... & Rustin, P. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clinical Science*, 2016: 130(6); 393-407.
129. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., ... & Yoshikawa, S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 1995: 269(5227); 1069-1074.
130. Yano, N., Muramoto, K., Shimada, A., Takemura, S., Baba, J., Fujisawa, H., ... & Yoshikawa, S. The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome c oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 2016: 291(46); 23882-23894.
131. Belevich, I., Verkhovsky, M. I., & Wikström, M. Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature*, 2006: 440(7085); 829-832.

132. Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. and Walker, J.E. (1994) 'Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria', *Nature*, 370(6491), pp. 621-8.
133. Stock, D., Leslie, A.G.W. and Walker, J.E. (1999) 'Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase', *Science*, 286(5445), pp. 1700-1705.
134. Kayalar, C., Rosing, J. and Boyer, P.D. (1977) 'An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and Exchange reaction inhibitions', *J Biol Chem*, 252(8), pp. 2486-91.
135. Gresser, M.J., Myers, J.A. and Boyer, P.D. (1982) 'Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model', *J Biol Chem*, 257(20), pp. 12030-8.
136. Walker, J.E. (2013) 'The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown', *Biochem Soc Trans*, 41(1), pp. 1-16.
137. von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. and Dimroth, P. (2009) 'Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases', *Annu Rev Biochem*, 78, pp. 649-72.
138. Liesa, M. and Shirihai, O.S. 'Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure', *Cell Metab*, 2013: 17(4); 491-506.
139. Chance, B. and Williams, G.R. (1955) 'Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state', *J Biol Chem*, 217(1), pp. 409-27.
140. Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. and Gupte, S.S. (1986) 'The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport', *J Bioenerg Biomembr*, 18(5), pp. 331-68.
141. Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N. & Yang, M. (2016) 'The architecture of the mammalian respirasome', *Nature*, 537(7622), pp. 639-43.
142. Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A. and Enriquez, J.A. (2008) 'Respiratory active mitochondrial supercomplexes', *Mol Cell*, 32(4), pp. 529-39.
143. Letts, J.A., Fiedorczuk, K. and Sazanov, L.A. (2016) 'The architecture of respiratory supercomplexes', *Nature*, 537(7622), pp. 644-648.
144. Lightowlers, R.N., Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2015) 'Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain?', *Science*, 349(6255), pp. 1494-9.
145. Koç F., Sarıca, Y. Mitokondrial Hastalıklar: Klinik Özellikleri-Hastaya Yaklaşım. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2003; 12(5):14-31.
146. Gorman, G. S., Schaefer, A. M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E. L., Alston, C. L., ... & Taylor, R. W. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology*, 77(5), 753-759.
147. Skladal, D., Halliday, J. and Thorburn, D.R. (2003) 'Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children', *Brain*, 126(Pt 8), pp. 1905-12.
148. McFarland, R., Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2010) 'A neurological perspective on mitochondrial disease', *Lancet Neurol*, 9(8), pp. 829-40.
149. Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M. and Taylor, R.W. 'Biochemical assays of respiratory chain complex activity', *Methods Cell Biol*, . 2007: 80; 93-119.
150. Rocha, M.C., Grady, J.P., Grunewald, A., Vincent, A., Dobson, P.F., Taylor, R.W., Turnbull, D.M. and Rygiel, K.A. A novel immunofluorescent assay to investigate oxidative phosphorylation deficiency in mitochondrial myopathy: understanding mechanisms and improving diagnosis' *Sci Rep*, 201: 5; 15037.
151. Greaves, L.C., Nooteboom, M., Elson, J.L., Tuppen, H.A., Taylor, G.A., Commane, D.M., Arasaradnam, R.P., Khrapko, K., Taylor, R.W., Kirkwood, T.B., Mathers, J.C. and Turnbull, D.M. 'Clonal expansion of early to mid-life mitochondrial

- DNA point mutations drives mitochondrial dysfunction during human ageing', *PLoS Genet*, 2014; 10(9); e1004620.
152. Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 1980; 77(11); 6715-6719.
 153. Stewart, J.B. and Chinnery, P.F. 'The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease', *Nat Rev Genet*, 2015; 16(9); 530-42.
 154. Chinnery, P.F., Elliott, H.R., Hudson, G., Samuels, D.C. and Relton, C.L. (2012) 'Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases', *Int J Epidemiol*, 41(1), pp. 177-87.
 155. Schon, E.A., DiMauro, S. and Hirano, M. 'Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations', *Nat Rev Genet*, 2012; 13(12): 878-90.
 156. Sallevelt, S. C., de Die-Smulders, C. E., Hendrickx, A. T., Hellebrekers, D. M., de Coo, I. F., Alston, C. L., ... & Smeets, H. J. De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk. *Journal of medical genetics*, 2017; 54(2): 73-83.
 157. Wilson, I. J., Carling, P. J., Alston, C. L., Floros, V. I., Pyle, A., Hudson, G., ... & Samuels, D. C. Mitochondrial DNA sequence characteristics modulate the size of the genetic bottleneck. *Human molecular genetics*, 2016; 25(5): 1031-1041.
 158. Nesbitt V, Alston CL, Blakely EL, Fratter C, Feeney CL, Poulton J, Brown GK, Turnbull DM, Taylor RW, McFarland R. A national perspective on prenatal testing for mitochondrial disease. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(11):1255-9.
 159. Marotta, R., Chin, J., Chiotis, M., Shuey, N., & Collins, S. J. Long-term screening for primary mitochondrial DNA variants associated with Leber Hereditary Optic Neuropathy: incidence, penetrance and clinical features. *Mitochondrion*. 2020.
 160. Lake, N. J., Compton, A. G., Rahman, S., Thorburn, D. R. Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann. Neurol*. 2015; 79: 190-203.
 161. Lopez-Gallardo, E., Solano, A., Herrero-Martin, M. D., Martinez-Romero, I., Castano-Perez, M. D., Andreu, A. L., ... & Montoya, J. NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein. *Journal of medical genetics*, 2009; 46(1): 64-67.
 162. Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M. S., Seibel, P., Ballinger, S. W., Wallace, D. C. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA-lys mutation. *Cell* 1990;.61:931-937,
 163. Malfatti, E., Laforêt, P., Jardel, C., Stojkovic, T., Behin, A., Eymard, B., ... & Meune, C. High risk of severe cardiac adverse events in patients with mitochondrial m. 3243A> G mutation. *Neurology*, 2013; 80(1): 100-105.
 164. Yoon, K. L., Aprille, J. R., Ernst, S. G. Mitochondrial tRNA-thr mutation in fatal infantile respiratory enzyme deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1991;176: 1112-1115.
 165. Mancuso, M., Orsucci, D., Angelini, C., Bertini, E., Carelli, V., Comi, G. P., ... & Mongini, T. Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. *Journal of neurology*, 2015; 262(5): 1301-1309.
 166. Rötig, A., Cormier, V., Blanche, S., Bonnefont, J. P., Ledeist, F., Romero, N., ... & Saudubray, J. M. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *The Journal of clinical investigation*, 1990; 86(5): 1601-1608.
 167. Filosto, M., Mancuso, M., Nishigaki, Y., Pancrudo, J., Harati, Y., Gooch, C., ... & Hirano, M. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase γ . *Archives of neurology*, 60(9), 1279-1284.
 168. Holt, I. J., Harding, A. E., Cooper, J. M., Schapira, A. H. V., Toscano, A., Clark, J. B., & Morgan-Hughes, J. A. (1989). Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA.

- Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 26(6), 699-708.
169. Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M. ve DiMauro, S. 'A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA', *Science*, 1989; 244(4902): 346-9.
 170. Chinnery, P. F., DiMauro, S., Shanske, S., Schon, E. A., Zeviani, M., Mariotti, C., ... & Jaksch, MRisk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *The Lancet*, 2004; 364(9434): 592-596.
 171. Nesbitt, V., Alston, C. L., Blakely, E. L., Fratter, C., Feeney, C. L., Poulton, J., ... & McFarland, RA national perspective on prenatal testing for mitochondrial disease. *European Journal of Human Genetics*, . 2014; 22(11): 1255-1259.
 172. Harel, T., Yoon, W. H., Garone, C., Gu, S., Coban-Akdemir, Z., Eldomery, M. K., ... & Lupski, J.R. Recurrent de novo and biallelic variation of ATAD3A, encoding a mitochondrial membrane protein, results in distinct neurological syndromes. *The American Journal of Human Genetics*, 2016; 99(4): 831-845.
 173. Thompson, K., Majd, H., Dallabona, C., Reinson, K., King, M. S., Alston, C. L., ... & Fraenkel, N. D. Recurrent de novo dominant mutations in SLC25A4 cause severe early-onset mitochondrial disease and loss of mitochondrial DNA copy number. *The American Journal of Human Genetics*, 2016; 99(4): 860-876.
 174. Fernandez-Moreira, D., Ugalde, C., Smeets, R., Rodenburg, R. J., Lopez-Laso, E., Ruiz-Falco, M. L., ... & Arenas, J. X-linked NDUFA1 gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Annals of neurology*, 2007; 61(1): 73-83.
 175. Sperl, W., Fleuren, L., Freisinger, P., Haack, T. B., Ribes, A., Feichtinger, R. G., ... & Prokisch, H. The spectrum of pyruvate oxidation defects in the diagnosis of mitochondrial disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, (2015; 38(3), 391-403.
 176. Tang, S., Wang, J., Lee, N. C., Milone, M., Halberg, M. C., Schmitt, E. S., ... & Wong, L. J. C. (2011). Mitochondrial DNA polymerase γ mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *Journal of medical genetics*, 48(10), 669-681.
 177. Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., ... & Rötig, A. (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature genetics*, 11(2), 144-149.
 178. Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Dröse, S., Schwamb, B., ... & Brandt, U. (2012). Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell metabolism*, 16(4), 538-549.
 179. Arroyo, J. D., Jourdain, A. A., Calvo, S. E., Ballarano, C. A., Doench, J. G., Root, D. E., & Mootha, V. K. (2016). A genome-wide CRISPR death screen identifies genes essential for oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*, 24(6), 875-885.
 180. Floyd, B. J., Wilkerson, E. M., Veling, M. T., Minogue, C. E., Xia, C., Beebe, E. T., ... & Gromek, K. A. (2016). Mitochondrial protein interaction mapping identifies regulators of respiratory chain function. *Molecular cell*, 63(4), 621-632.
 181. Nouws, J., Nijtmans, L., Houten, S. M., van den Brand, M., Huynen, M., Venselaar, H., ... & Willems, P. (2010). Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell metabolism*, 12(3), 283-294.
 182. Kirby, D., Crawford, M., Cleary, M. A., Dahl, H. H., Dennett, X., & Thorburn, D. R. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology*, 1999; 52(6): 1255-1255.
 183. Swalwell, H., Kirby, D. M., Blakely, E. L., Mitchell, A., Salemi, R., Sugiana, C., ... & Turnbull, D. M. Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *European Journal of Human Genetics*, 2011; 19(7): 769-775.
 184. Ngu, L. H., Nijtmans, L. G., Distelmaier, F., Venselaar, H., van Emst-de Vries, S. E., van den Brand, M. A., ... & Smeitink, J. A. A catalytic defect in mitochondrial respiratory chain complex I due to a mutation in NDUFS2 in a patient with Leigh syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2012; 1822(2): 168-175.

185. Tuppen, H. A., Hogan, V. E., He, L., Blakely, E. L., Worgan, L., Al-Dosary, M., ... & Jones, S. (2010). The p. M292T NDUFS2 mutation causes complex I-deficient Leigh syndrome in multiple families. *Brain*, 133(10), 2952-2963.
186. Kirby, D. M., Salemi, R., Sugiana, C., Ohtake, A., Parry, L., Bell, K. M., ... & Ryan, M. T. (2004). NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 114(6), 837-845.
187. Dewulf, J. P., Barrea, C., Vincent, M. F., De Laet, C., Van Coster, R., Seneca, S., ... & Nassogne, M. C. (2016). Evidence of a wide spectrum of cardiac involvement due to ACAD9 mutations: report on nine patients. *Molecular genetics and metabolism*, 118(3), 185-189.
188. Shehata, B. M., Cundiff, C. A., Lee, K., Sabharwal, A., Lalwani, M. K., Davis, A. K., ... & Gibson, G. (2015). Exome sequencing of patients with histiocytoid cardiomyopathy reveals a de novo NDUFB11 mutation that plays a role in the pathogenesis of histiocytoid cardiomyopathy. *American journal of medical genetics Part A*, 167(9), 2114-2121.
189. Fassone, E., Taanman, J. W., Hargreaves, I. P., Sebire, N. J., Cleary, M. A., Burch, M., & Rahman, S. (2011). Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAB1 cause fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of medical genetics*, 48(10), 691-697.
190. Lake, N. J., Compton, A. G., Rahman, S., & Thorburn, D. R. (2016). Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology*, 79(2), 190-203.
191. Pagniez-Mammeri, H., Loublier, S., Legrand, A., Bénit, P., Rustin, P., & Slama, A. (2012). Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin: I. Structural genes. *Molecular genetics and metabolism*, 105(2), 163-172.
192. Alston, C. L., Howard, C., Oláhová, M., Hardy, S. A., He, L., Murray, P. G., ... & Monavari, A. A. (2016). A recurrent mitochondrial p. Trp22Arg NDUFB3 variant causes a distinctive facial appearance, short stature and a mild biochemical and clinical phenotype. *Journal of medical genetics*, 53(9), 634-641.
193. Spiegel, R., Shaag, A., Mandel, H., Reich, D., Penyakov, M., Hujeirat, Y., ... & Shalev, S. A. (2009). Mutated NDUFS6 is the cause of fatal neonatal lactic acidemia in Caucasus Jews. *European journal of human genetics*, 17(9), 1200-1203.
194. Haack, T. B., Haberberger, B., Frisch, E. M., Wieland, T., Iuso, A., Gorza, M., ... & Hennermann, J. B. (2012). Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *Journal of medical genetics*, 49(4), 277-283.
195. Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmüller, H., ... & Invernizzi, F. (2009). SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nature genetics*, 41(6), 654-656.
196. Jain-Ghai, S., Cameron, J. M., Al Maawali, A., Blaser, S., MacKay, N., Robinson, B., & Raiman, J. (2013). Complex II deficiency—a case report and review of the literature. *American journal of medical genetics Part A*, 161(2), 285-294.
197. Timmers, H. J., Gimenez-Roqueplo, A. P., Mannelli, M., & Pacak, K. (2009). Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine-related cancer*, 16(2), 391.
198. Hensen, E. F., Siemers, M. D., Jansen, J. C., Corssmit, E. P. M., Romijn, J. A., Tops, C. M. J., ... & Vriends, A. H. J. T. (2011). Mutations in SDHD are the major determinants of the clinical characteristics of Dutch head and neck paraganglioma patients. *Clinical endocrinology*, 75(5), 650-655.
199. Costa, M. H. S., Ortiga-Carvalho, T. M., Violante, A. D., & Vaisman, M. (2015). Pheochromocytomas and paragangliomas: clinical and genetic approaches. *Frontiers in endocrinology*, 6, 126.
200. Courage, C., Jackson, C. B., Hahn, D., Euro, L., Nuoffer, J. M., Gallati, S., & Schaller, A. (2017). SDHA mutation with dominant transmission results in complex II

- deficiency with ocular, cardiac, and neurologic involvement. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 173(1), 225-230.
201. Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Xie, H. M., Chalkia, D., Sarmady, M., ... & Wallace, D. C. (2013). mtDNA variation and analysis using MITOMAP and MITOMASTER. *Current protocols in bioinformatics*, 44(1), 1-23.
 202. Mordaunt, D. A., Jolley, A., Balasubramaniam, S., Thorburn, D. R., Mountford, H. S., Compton, A. G., ... & Friend, K. (2015). Phenotypic variation of TTC19-deficient mitochondrial complex III deficiency: a case report and literature review. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(6), 1330-1336.
 203. Fernández-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2015). Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Frontiers in genetics*, 6, 134.
 204. Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., ... & Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Human genetics*, 113(2), 118-122.
 205. Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., ... & Birk, O. S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *The American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1211-1216.
 206. Oláhová, M., Hardy, S. A., Hall, J., Yarham, J. W., Haack, T. B., Wilson, W. C., ... & Brown, G. K. (2015). LRPPRC mutations cause early-onset multisystem mitochondrial disease outside of the French-Canadian population. *Brain*, 138(12), 3503-3519.
 207. Lim, S. C., Smith, K. R., Stroud, D. A., Compton, A. G., Tucker, E. J., Dasvarma, A., ... & Mowat, D. (2014). A founder mutation in PET100 causes isolated complex IV deficiency in Lebanese individuals with Leigh syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 94(2), 209-222.
 208. Stroud, D. A., Maher, M. J., Lindau, C., Vögtle, F. N., Frazier, A. E., Surgenor, E., ... & Warscheid, B. (2015). COA6 is a mitochondrial complex IV assembly factor critical for biogenesis of mtDNA-encoded COX2. *Human molecular genetics*, 24(19), 5404-5415.
 209. Wedatilake, Y., Brown, R. M., McFarland, R., Yapliito-Lee, J., Morris, A. A., Champion, M., ... & Land, J. M. (2013). SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet journal of rare diseases*, 8(1), 96.
 210. Tamiya, G., Makino, S., Hayashi, M., Abe, A., Numakura, C., Ueki, M., ... & Terashima, T. (2014). A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *The American Journal of Human Genetics*, 95(3), 294-300.
 211. Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O., & Enríquez, J. A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell metabolism*, 16(3), 378-386.
 212. Pitceathly, R. D., Rahman, S., Wedatilake, Y., Polke, J. M., Cirak, S., Foley, A. R., ... & Woodward, C. E. (2013). NDUFA4 mutations underlie dysfunction of a cytochrome c oxidase subunit linked to human neurological disease. *Cell reports*, 3(6), 1795-1805.
 213. Pfeffer, G., Blakely, E. L., Alston, C. L., Hassani, A., Boggild, M., Horvath, R., ... & Chinnery, P. F. (2012). Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(9), 883-886.
 214. Spiegel, R., Khayat, M., Shalev, S. A., Horovitz, Y., Mandel, H., HersHKovitz, E., ... & Elpeleg, O. (2011). TMEM70 mutations are a common cause of nuclear encoded ATP synthase assembly defect: further delineation of a new syndrome. *Journal of medical genetics*, 48(3), 177-182.
 215. De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., ... & Van Coster, R. (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *Journal of medical genetics*, 41(2), 120-124.
 216. Shahrouh, M. A., Staretz-Chacham, O., Dayan, D., Stephen, J., Weech, A., Damseh, N., ... & NISC Intramural Sequencing. (2017). Mitochondrial epileptic

- encephalopathy, 3-methylglutaconic aciduria and variable complex V deficiency associated with TIMM50 mutations. *Clinical genetics*, 91(5), 690-696.
217. Galmiche, L., Serre, V., Beinat, M., Assouline, Z., Lebre, A. S., Chretien, D., ... & Brunelle, F. (2011). Exome sequencing identifies MRPL3 mutation in mitochondrial cardiomyopathy. *Human mutation*, 32(11), 1225-1231.
 218. Serre, V., Rozanska, A., Beinat, M., Chretien, D., Boddaert, N., Munnich, A., ... & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2013). Mutations in mitochondrial ribosomal protein MRPL12 leads to growth retardation, neurological deterioration and mitochondrial translation deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(8), 1304-1312.
 219. Carroll, C. J., Isohanni, P., Pöyhönen, R., Euro, L., Richter, U., Brillhante, V., ... & Battersby, B. J. (2013). Whole-exome sequencing identifies a mutation in the mitochondrial ribosome protein MRPL44 to underlie mitochondrial infantile cardiomyopathy. *Journal of medical genetics*, 50(3), 151-159.
 220. Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., ... & Elpeleg, O. (2004). Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 56(5), 734-738.
 221. Baertling, F., Haack, T. B., Rodenburg, R. J., Schaper, J., Seibt, A., Strom, T. M., ... & Prokisch, H. (2015). MRPS22 mutation causes fatal neonatal lactic acidosis with brain and heart abnormalities. *Neurogenetics*, 16(3), 237-240.
 222. Akawi, N. A., Ben-Salem, S., Hertecant, J., John, A., Pramathan, T., Kizhakkedath, P., ... & Al-Gazali, L. (2016). A homozygous splicing mutation in ELAC2 suggests phenotypic variability including intellectual disability with minimal cardiac involvement. *Orphanet journal of rare diseases*, 11(1), 139.
 223. Haack, T. B., Haberberger, B., Frisch, E. M., Wieland, T., Iuso, A., Gorza, M., ... & Hennermann, J. B. (2012). Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *Journal of medical genetics*, 49(4), 277-283.
 224. Diodato, D., Ghezzi, D., & Tiranti, V. (2014). The mitochondrial aminoacyl tRNA synthetases: genes and syndromes. *International journal of cell biology*, 2014; 787956.
 225. Taylor, R. W., Pyle, A., Griffin, H., Blakely, E. L., Duff, J., He, L., ... & Yarham, J. W. (2014). Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *Jama*, 312(1), 68-77.
 226. Spiegel, R., Pines, O., Ta-Shma, A., Burak, E., Shaag, A., Halvardson, J., ... & Shalev, S. (2012). Infantile cerebellar-retinal degeneration associated with a mutation in mitochondrial aconitase, ACO2. *The American Journal of Human Genetics*, 90(3), 518-523.
 227. Zeng, W. Q., Al-Yamani, E., Acierno, J. S., Slaughter, S., Gillis, T., MacDonald, M. E., ... & Gusella, J. F. (2005). Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in SLC19A3. *The American Journal of Human Genetics*, 77(1), 16-26.
 228. Metodiev, M. D., Gerber, S., Hubert, L., Delahodde, A., Chretien, D., Gérard, X., ... & Desguerre, I. (2014). Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy. *Journal of medical genetics*, 51(12), 834-838.
 229. Flønes, I., Sztromwasser, P., Haugarvoll, K., Dölle, C., Lykouri, M., Schwarzlmüller, T., ... & Bindoff, L. A. (2016). Novel SLC19A3 promoter deletion and allelic silencing in biotin-thiamine-responsive basal ganglia encephalopathy. *PLoS One*, 11(2), e0149055.
 230. Ylberg, S., Naess, K., Eriksson, M., Stranneheim, H., Lesko, N., Barbaro, M., ... & Wickström, R. (2016). Biotin and thiamine responsive basal ganglia disease—a vital differential diagnosis in infants with severe encephalopathy. *European Journal of Paediatric Neurology*, 20(3), 457-461.

231. Ortigoza-Escobar, J. D., Molero-Luis, M., Arias, A., Oyarzabal, A., Darín, N., Serrano, M., ... & Casado, M. (2016). Free-thiamine is a potential biomarker of thiamine transporter-2 deficiency: a treatable cause of Leigh syndrome. *Brain*, 139(1), 31-38.
232. Aydınoğlu, A. T., Mengeş, E. A., & Hayta, B. B. Serbest Mitokondriyal DNA'nın Sistemik Dolaşımdaki Rolü ve Hastalıkların Patogenezinin Etkisi. *ACU Sağlık Bil Derg* 2019.
233. García, N., García, J. J., Correa, F., & Chávez, E. (2005). The permeability transition pore as a pathway for the release of mitochondrial DNA. *Life sciences*, 76(24), 2873-2880.
234. West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 389-402.
235. Boyapati, R. K., Tamborska, A., Dorward, D. A., & Ho, G. T. (2017). Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases. *F1000Research*, 6.
236. Millington, D. S., Kodo, N., Norwood, D. L., & Roe, C. R. (1990). Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 13(3), 321-324.
237. Kanungo, S., Patel, D. R., Neelakantan, M., & Ryali, B. (2018). Newborn screening and changing face of inborn errors of metabolism in the United States. *Annals of translational medicine*, 6(24).
238. Vockley, J., Andersson, H. C., Antshel, K. M., Braverman, N. E., Burton, B. K., Frazier, D. M., ... & Berry, S. A. (2014). Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*, 16(2), 188.
239. Rinaldo, P., Cowan, T. M., & Matern, D. (2008). Acylcarnitine profile analysis. *Genetics in Medicine*, 10(2), 151-156.
240. Dass, C. (2007). Modes of Ionization içinde Fundamentals of contemporary mass spectrometry (Vol. 16:15–65. John Wiley & Sons.
241. Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.
242. Grebe, S. K., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory—where to from here?. *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(1), 5.
243. Blanchard, S., Sadilek, M., Scott, C. R., Turecek, F., & Gelb, M. H. (2008). Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for mucopolysaccharidosis I. *Clinical chemistry*, 54(12), 2067-2070.
244. Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
245. Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145.
246. Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., ... & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674-679.
247. Gedikbasi, A (2020). Doğumsal Metabolizma Hastalıklarında Genetik Tanı Yöntemleri
İçinde Konukoğlu, D. editor. Doğumsal Metabolizma Hastalıklarının Moleküler Temelleri ve Laboratuvar Yaklaşım. Anadolu Nobel tıp Kitabevleri: Elazığ; 2020. pp. 451-475.
248. Heather, James M.; Chain, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016; 107.1: 1-8.
249. Rothberg, J., Hinz, W., Rearick, T. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011; 475, 348–352.
250. Glenn, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*. 2011;11, 759-769.
251. Bagirova, G., Fanconi anemili olgularda ilişkili genlerin yeni nesil dizileme teknolojisi ile taranması ve mutasyonların saptanması. Tez (yüksek lisans), İstanbul Üniversitesi, 2016

252. TMAP Frequently Asked Questions.
253. <https://ioncommunity.thermofisher.com/docs/DOC-3266>
254. <https://ioncommunity.thermofisher.com/docs/DOC-3271>
255. Torrent Suite™ Analysis Report Guide for use with Torrent Suite™ Software v5.0.
256. Technical Notes Torrent Suite™ Software 4.0.2.
257. Reid, E. Cellular And Molecular Investigations Of Undiagnosed Neurometabolic Disorders, Doctoral Thesis. Institute of Child Health University College London, 2016
258. Calvo, S.E., Klauser, C.R., Mootha, V.K. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins (2015). *Nucleic Acids Research* [doi: 10.1093/nar/gkv1003].
259. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... & Tukiainen, T. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291.
260. Karczewski, K. J., Weisburd, B., Thomas, B., Solomonson, M., Ruderfer, D. M., Kavanagh, D., ... & Birnbaum, D. (2017). The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic acids research*, 45(D1), D840-D845.
261. McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R., Thormann, A., ... & Cunningham, F. (2016). The ensembl variant effect predictor. *Genome biology*, 17(1), 122.
262. Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., ... & Karapetyan, K. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic acids research*, 46(D1), D1062-D1067.
263. Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S., ... & Cooper, D. N. (2003). Human gene mutation database (HGMD®): 2003 update. *Human mutation*, 21(6), 577-581
264. Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D1038-D1043. doi:10.1093/nar/gky1151. PMID: 30445645.
265. Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., ... & Kaplan, S. (2016). The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current protocols in bioinformatics*, 54(1), 1-30.
266. Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1), 308-311.
267. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Voelkerding, K. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405-423.
268. Hutchins, J. R. (2014). What's that gene (or protein)? Online resources for exploring functions of genes, transcripts, and proteins. *Molecular biology of the cell*, 25(8), 1187-1201.
269. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):361-2.
270. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7:Unit7.20 (2013)
271. Lindeberg, T. (2012). Scale invariant feature transform.
272. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002 Jun;12(6):996-1006.
273. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database.
<http://www.mitomap.org>, 2019
274. Lott, M.T., Leipzig, J.N., Derbeneva, O., Xie, H.M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., and Wallace, D.C. 2013. mtDNA variation and analysis using

- MITOMAP and MITOMASTER. *Current Protocols in Bioinformatics* 1(123):1.23.1-26.
275. Nascimbeni, A. C., Fanin, M., Tasca, E., & Angelini, C. (2010). Transcriptional and translational effects of intronic CAPN3 gene mutations. *Human mutation*, 31(9), E1658-E1669.
 276. Krahn, M., Bérout, C., Labelle, V., Nguyen, K., Bernard, R., Bassez, G., ... & Ollagnon-Roman, E. (2009). Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. *Human mutation*, 30(2), E345-E375.
 277. Zerbino, D. R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Bhai, J., ... & Gil, L. (2018). Ensembl 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D754-D761. <http://nov2020.archive.ensembl.org>
 278. J Yang, Y Zhang. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43: W174-W181 (2015).
 279. BIOVIA, D. S. (2015). Discovery studio modeling environment. San Diego, Dassault Systemes, Release, 4.
 280. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Chapman M, Evans K, Azevedo L, Hayden M, Heywood S, Millar DS, Phillips AD, Cooper DN (2020) The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet epub. PubMed* 32596782.
 281. Holt, I.J., Harding, A.E., Morgan-Hughes, J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717–719.
 282. Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., ... & Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242(4884), 1427-1430.
 283. Zeviani, M., Moraes, C. T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E. A., & Rowland, L. P. (1988). Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 38(9), 1339-1339.
 284. DiMauro, S.; Schon, E.A. Mitochondrial respiratory-chain diseases (Mechanisms of Disease). *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 2656–2668.
 285. DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V., & Hirano, M. (2013). The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nature Reviews Neurology*, 9(8), 429-444.
 286. Andreu, A. L., Hanna, M. G., Reichmann, H., Bruno, C., Penn, A. S., Tanji, K., ... & Morgan-Hughes, J. (1999). Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 341(14), 1037-1044.
 287. Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 77(11), 6715-6719.
 288. Chinnery, P. F., DiMauro, S., Shanske, S., Schon, E. A., Zeviani, M., Mariotti, C., ... & Jaksch, M. (2004). Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *The Lancet*, 364(9434), 592-596.
 289. Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., ... & Chen, S. M. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13039-13044.
 290. DiMauro, S. (2019). A Brief History of Mitochondrial Pathologies. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5643.
 291. Tanji, K., & Bonilla, E. (2001). Optical imaging techniques (histochemical, immunohistochemical, and in situ hybridization staining methods) to visualize mitochondria. *Methods in cell biology*, 65, 311-332.
 292. Moraes, C. T., Ciacci, F., Bonilla, E., Jansen, C., Hirano, M., Rao, N., ... & DiMauro, S. (1993). Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA (Leu (UUR)) gene an etiologic hot spot?. *The Journal of clinical investigation*, 92(6), 2906-2915.

293. King, M. P., & Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246(4929), 500-503.
294. Tritschler, H. J., Andreetta, F., Moraes, C. T., Bonilla, E., Arnaudo, E., Danon, M. J., ... & Shanske, S. (1992). Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA. *Neurology*, 42(1), 209-209.
295. Garone, C., Taylor, R. W., Nascimento, A., Poulton, J., Fratter, C., Domínguez-González, C., ... & Hirano, M. (2018). Retrospective natural history of thymidine kinase 2 deficiency. *Journal of medical genetics*, 55(8), 515-521.
296. Wang, J., Kim, E., Dai, H., Stefans, V., Vogel, H., Al Jasmi, F., ... & Long, C. (2018). Clinical and molecular spectrum of thymidine kinase 2-related mtDNA maintenance defect. *Molecular genetics and metabolism*, 124(2), 124-130.
297. Lopez-Gomez, C., Levy, R. J., Sanchez-Quintero, M. J., Juanola-Falgarona, M., Barca, E., Garcia-Diaz, B., ... & Hirano, M. (2017). Deoxycytidine and deoxythymidine treatment for thymidine kinase 2 deficiency. *Annals of neurology*, 81(5), 641-652.
298. Hirano, M., Emmanuele, V., & Quinzii, C. M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in biochemistry*, 62(3), 467-481.
299. Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S., & Elpeleg, O. (2001). Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature genetics*, 29(3), 342-344.
300. Wang, L., Munch-Petersen, B., Sjöberg, A. H., Hellman, U., Bergman, T., Jörnvall, H., & Eriksson, S. (1999). Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS letters*, 443(2), 170-174.
301. Chanprasert, S., Wang, J., Weng, S. W., Enns, G. M., Boué, D. R., Wong, B. L., ... & Alcalá, F. J. C. (2013). Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene. *Molecular genetics and metabolism*, 110(1-2), 153-161.
302. Mancuso, M., Filosto, M., Bonilla, E., Hirano, M., Shanske, S., Vu, T. H., & DiMauro, S. (2003). Mitochondrial myopathy of childhood associated with mitochondrial DNA depletion and a homozygous mutation (T77M) in the TK2 gene. *Archives of neurology*, 60(7), 1007-1009.
303. Garone, C., Garcia-Diaz, B., Emmanuele, V., Lopez, L. C., Tadesse, S., Akman, H. O., ... & Hirano, M. (2014). Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO molecular medicine*, 6(8), 1016-1027.
304. Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J., & Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics*, 28(3), 211-212.
305. Man, C. Y. W., Chinnery, P. F., & Griffiths, P. G. (2005). Extraocular muscles have fundamentally distinct properties that make them selectively vulnerable to certain disorders. *Neuromuscular Disorders*, 15(1), 17-23.
306. Copeland, W. C., & Longley, M. J. (2014). Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA repair*, 19, 190-198.
307. Sweasy, J. B., Lauper, J. M., & Eckert, K. A. (2006). DNA polymerases and human diseases. *Radiation research*, 166(5), 693-714.
308. Van Goethem, G., Luoma, P., Rantamäki, M., Al Memar, A., Kaakkola, S., Hackman, P., ... & Suomalainen, A. (2004). POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology*, 63(7), 1251-1257.
309. Van Goethem, G., Martin, J. J., Dermaut, B., Löfgren, A., Wibail, A., Ververken, D., ... & Ceuterick, C. (2003). Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscular disorders*, 13(2), 133-142.
310. Naviaux, R. K., & Nguyen, K. V. (2004). POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 55(5), 706-712.

311. Rahman, S., & Copeland, W. C. (2019). POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nature Reviews Neurology*, 15(1), 40-52.
312. Neeve, V. C., Samuels, D. C., Bindoff, L. A., van den Bosch, B., Van Goethem, G., Smeets, H., ... & De Vries, M. (2012). What is influencing the phenotype of the common homozygous polymerase- γ mutation p. Ala467Thr?. *Brain*, 135(12), 3614-3626.
313. Rajakulendran, S., Pitceathly, R. D., Taanman, J. W., Costello, H., Sweeney, M. G., Woodward, C. E., ... & Fratter, C. (2016). A clinical, neuropathological and genetic study of homozygous A467T POLG-related mitochondrial disease. *PLoS One*, 11(1), e0145500.
314. Euro, L., Farnum, G. A., Palin, E., Suomalainen, A., & Kaguni, L. S. (2011). Clustering of Alpers disease mutations and catalytic defects in biochemical variants reveal new features of molecular mechanism of the human mitochondrial replicase, Pol γ . *Nucleic acids research*, 39(21), 9072-9084.
315. Nurminen, A., Farnum, G. A., & Kaguni, L. S. (2017). Pathogenicity in POLG syndromes: DNA polymerase gamma pathogenicity prediction server and database. *BBA clinical*, 7, 147-156.
316. Meyer, J. N., Leung, M. C., Rooney, J. P., Sendoel, A., Hengartner, M. O., Kisby, G. E., & Bess, A. S. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *toxicological sciences*, 2013; 134(1): 1-17.
317. Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., & Attardi, G. (1999). Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*, 286(5440), 774-779.
318. Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A., & Copeland, W. C. (2001). The fidelity of human DNA polymerase γ with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38555-38562.
319. Kennedy, S. R., Salk, J. J., Schmitt, M. W., & Loeb, L. A. Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage. *PLoS Genet*, 2013; 9(9): e1003794.
320. Al Balushi, A., Matviychuk, D., Jobling, R., Salomons, G. S., Blaser, S., & Mercimek-Andrews, S. (2020). Phenotypes and genotypes of mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase deficiencies from a single neurometabolic clinic. *Jimd Reports*, 51(1), 3-10.
321. Diodato, D., Ghezzi, D., & Tiranti, V. (2014). The mitochondrial aminoacyl tRNA synthetases: genes and syndromes. *International journal of cell biology*, 2014.
322. Steenweg, M. E., Ghezzi, D., Haack, T., Abbink, T. E., Martinelli, D., Van Berkel, C. G., ... & Strom, T. M. (2012). Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate 'LTBL' caused by EARS2 mutations. *Brain*, 135(5), 1387-1394.
323. Edvardson, S., Shaag, A., Kolesnikova, O., Gomori, J. M., Tarassov, I., Einbinder, T., ... & Elpeleg, O. (2007). Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *The American Journal of Human Genetics*, 81(4), 857-862.
324. Scheper, G. C., Van Der Klok, T., Van Andel, R. J., Van Berkel, C. G., Sissler, M., Smet, J., ... & Schiffmann, R. (2007). Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nature genetics*, 39(4), 534-539.
325. Gödiker, J., Grüneberg, M., DuChesne, I., Reunert, J., Rust, S., Westermann, C., ... & Rodenburg, R. J. (2018). QIL1-dependent assembly of MICOS complex—lethal mutation in C19ORF70 resulting in liver disease and severe neurological retardation. *Journal of human genetics*, 63(6), 707-716.
326. Guarani, V., McNeill, E. M., Paulo, J. A., Huttlin, E. L., Fröhlich, F., Gygi, S. P., ... & Harper, J. W. (2015). QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife*, 4, e06265.

327. Lorente, M., Mirapeix, R. M., Miguel, M., Longmei, W., Volk, D., & Cervos-Navarro, J. Chronic hypoxia induced ultrastructural changes in the rat adrenal zona glomerulosa. *Histology and histopathology*. 2002;17:185–190.
328. Götz, A., Isohanni, P., Liljeström, B., Rummukainen, J., Nikolajev, K., Herrgård, E., ... & Suomalainen, A. (2012). Fatal neonatal lactic acidosis caused by a novel de novo mitochondrial G7453A tRNA-Serine (UCN) mutation. *Pediatric Research*, 72(1), 90-94.
329. van der Laan, M., Bohnert, M., Wiedemann, N., & Pfanner, N. (2012). Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends in cell biology*, 22(4), 185-192.
330. Zerbes, R. M., Van Der Klei, I. J., Veenhuis, M., Pfanner, N., Van Der Laan, M., & Bohnert, M. (2012). Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biological chemistry*, 393(11), 1247-1261.
331. Alkhaja, A. K., Jans, D. C., Nikolov, M., Vukotic, M., Lytovchenko, O., Ludewig, F., ... & Deckers, M. (2012). MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Molecular biology of the cell*, 23(2), 247-257.
332. Zeharia, A., Friedman, J. R., Tobar, A., Saada, A., Konen, O., Fellig, Y., ... & Elpeleg, O. (2016). Mitochondrial hepato-encephalopathy due to deficiency of QIL1/MIC13 (C19orf70), a MICOS complex subunit. *European Journal of Human Genetics*, 24(12), 1778-1782.
333. Wortmann, S. B., Kluijtmans, L. A., Rodenburg, R. J., Sass, J. O., Nouws, J., Van Kaauwen, E. P., ... & Walter, K. (2013). 3-Methylglutaconic aciduria—lessons from 50 genes and 977 patients. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(6), 913-921.
334. Haack, T. B., Jackson, C. B., Murayama, K., Kremer, L. S., Schaller, A., Kotzaeridou, U., ... & Wieland, T. (2015). Deficiency of ECHS 1 causes mitochondrial encephalopathy with cardiac involvement. *Annals of clinical and translational neurology*, 2(5), 492-509.
335. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, 11(4), 361-362.
336. Tonin, A. M., Ferreira, G. C., Grings, M., Viegas, C. M., Busanello, E. N., Amaral, A. U., ... & Wajner, M. (2010). Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life sciences*, 86(21-22), 825-831.
337. Peters, H., Buck, N., Wanders, R., Ruiter, J., Waterham, H., Koster, J., ... & Pitt, J. (2014). ECHS1 mutations in Leigh disease: a new inborn error of metabolism affecting valine metabolism. *Brain*, 137(11), 2903-2908.
338. Fitzsimons, P. E., Alston, C. L., Bonnen, P. E., Hughes, J., Crushell, E., Geraghty, M. T., ... & Walsh, R. (2018). Clinical, biochemical, and genetic features of four patients with short-chain enoyl-CoA hydratase (ECHS1) deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(5), 1115-1127.
339. Gerards, M., Sallevelt, S. C., & Smeets, H. J. (2016). Leigh syndrome: resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Molecular genetics and metabolism*, 117(3), 300-312.
340. Valnot, I., von Kleist-Retzow, J. C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J. W., Mehaye, B., ... & Rötig, A. (2000). A mutation in the human heme A: farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics*, 9(8), 1245-1249.
341. Antonicka, H., Leary, S. C., Guercin, G. H., Agar, J. N., Horvath, R., Kennaway, N. G., ... & Shoubridge, E. A. (2003). Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Human molecular genetics*, 12(20), 2693-2702.

342. Coenen, M. J., van den Heuvel, L. P., Ugalde, C., ten Brinke, M., Nijtmans, L. G., Trijbels, F. J., ... & Smeitink, J. A. (2004). Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 56(4), 560-564.
343. Pitceathly, R. D., Taanman, J. W., Rahman, S., Meunier, B., Sadowski, M., Cirak, S., ... & Woodward, C. E. (2013). COX10 mutations resulting in complex multisystem mitochondrial disease that remains stable into adulthood. *JAMA neurology*, 70(12), 1556-1561.
344. Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougèrouse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., ... & Hillaire, D. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 81(1), 27-40.
345. Lostal, W., Urtizberea, J. A., Richard, I., Alonso-Jiménez, A., Carlier, R. Y., Carson, V., ... & Guglieri, M. (2018). 233rd ENMC International Workshop:: Clinical Trial Readiness for Calpainopathies, Naarden, The Netherlands, 15–17 September 2017. *Neuromuscular Disorders*, 28(6), 540-549.
346. García Díaz, B. E., Gauthier, S., & Davies, P. L. (2006). Ca²⁺ dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry*, 45(11), 3714-3722.
347. Ono, Y., Shindo, M., Doi, N., Kitamura, F., Gregorio, C. C., & Sorimachi, H. (2014). The N-and C-terminal autolytic fragments of CAPN3/p94/calpain-3 restore proteolytic activity by intermolecular complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), E5527-E5536.
348. Balci, B., Aurino, S., Haliloglu, G., Talim, B., Erdem, S., Akcören, Z., ... & Topaloglu, H. (2006). Calpain-3 mutations in Turkey. *European journal of pediatrics*, 165(5), 293-298.
349. Sáenz, A., Azpitarte, M., Armañanzas, R., Leturcq, F., Alzualde, A., Inza, I., ... & Navarro, C. (2008). Gene expression profiling in limb-girdle muscular dystrophy 2A. *PloS one*, 3(11), e3750.
350. Ten Dam, L., Frankhuizen, W. S., Linssen, W. H., Straathof, C. S., Niks, E. H., Faber, K., ... & Voermans, N. (2019). Autosomal recessive limb-girdle and Miyoshi muscular dystrophies in the Netherlands: The clinical and molecular spectrum of 244 patients. *Clinical genetics*, 96(2), 126-133.
351. De Cid, R., Yaou, R. B., Roudaut, C., Charton, K., Baulande, S., Leturcq, F., ... & Crikui, A. (2015). A new titinopathy: Childhood-juvenile onset Emery-Dreifuss-like phenotype without cardiomyopathy. *Neurology*, 85(24), 2126-2135.
352. Bartoli, M., Roudaut, C., Martin, S., Fougèrouse, F., Suel, L., Poupiot, J., ... & Richard, I. (2006). Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Molecular Therapy*, 13(2), 250-259.
353. Danhauser, K., Sauer, S. W., Haack, T. B., Wieland, T., Stauffer, C., Graf, E., ... & Meitinger, T. (2012). DHTKD1 mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria. *The American Journal of Human Genetics*, 91(6), 1082-1087.
354. Hagen, J., Te Brinke, H., Wanders, R. J., Knecht, A. C., Oussoren, E., Hoogeboom, A. J. M., ... & Duran, M. (2015). Genetic basis of alpha-aminoadipic and alpha-ketoadipic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 38(5), 873-879.
355. Stiles, A. R., Venturoni, L., Mucci, G., Elbalalesy, N., Woontner, M., Goodman, S., & Abdenur, J. E. (2015). New cases of DHTKD1 mutations in patients with 2-ketoadipic aciduria. In *JIMD Reports*, Volume 25 (pp. 15-19). Springer, Berlin, Heidelberg.
356. Xu, W. Y., Gu, M. M., Sun, L. H., Guo, W. T., Zhu, H. B., Ma, J. F., ... & Chen, Y. (2012). A nonsense mutation in DHTKD1 causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 in a large Chinese pedigree. *The American Journal of Human Genetics*, 91(6), 1088-1094.

357. Xu, W., Zhu, H., Gu, M., Luo, Q., Ding, J., Yao, Y., ... & Wang, Z. (2013). DHTKD1 is essential for mitochondrial biogenesis and function maintenance. *FEBS letters*, 587(21), 3587-3592.
358. Shura R.D, Hurley R.A, Taber K.H. Essential Tremor: More Than a Motor Disorder? *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 2018;30:2, A4-90.
359. Nam, S. H., & Choi, B. O. (2019). Clinical and genetic aspects of Charcot-Marie-Tooth disease subtypes. *Precision and Future Medicine*, 3(2), 43-68.
360. Cardoso, F. E., & Jankovic, J. (1993). Hereditary motor-sensory neuropathy and movement disorders. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 16(9), 904-910.
361. Coleman, M. A., Eisen, J. A., & Mohrenweiser, H. W. (2000). Cloning and characterization of HARP/SMARCAL1: a prokaryotic HepA-related SNF2 helicase protein from human and mouse. *Genomics*, 65(3), 274-282.
362. Poole, L. A., Zhao, R., Glick, G. G., Lovejoy, C. A., Eischen, C. M., & Cortez, D. (2015). SMARCAL1 maintains telomere integrity during DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), 14864-14869.
363. Jin, J., Wu, K. K., Liu, W. Z., Chen, M. X., Jiang, S., Wang, Z., & Li, X. W. (2019). Whole exome sequencing identified a novel biallelic SMARCAL1 mutation in the extremely rare disease SIOD. *Frontiers in Genetics*, 10, 565.
364. Boerkoel, C. F., Takashima, H., John, J., Yan, J., Stankiewicz, P., Rosenbarker, L., ... & Cordeiro, I. (2002). Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. *Nature genetics*, 30(2), 215-220.
365. Lipska-Zietkiewicz, B. S., Gellermann, J., Boyer, O., Gribouval, O., Zietkiewicz, S., Kari, J. A., et al. (2017). Low renal but high extrarenal phenotype variability in Schimke immuno-osseous dysplasia. *PLoS One* 12:e0180926. doi: 10.1371/journal.pone.0180926.
366. Sarin, S., Javidan, A., Boivin, F., Alexopoulou, I., Lukic, D., Svajger, B., ... & Bridgewater, D. (2015). Insights into the renal pathogenesis in Schimke immuno-osseous dysplasia: A renal histological characterization and expression analysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(1), 32-44.
367. Krabbenborg, L., Vissers, L. E. L. M., Schieving, J., Kleefstra, T., Kamsteeg, E. J., Veltman, J. A., ... & Van der Burg, S. (2016). Understanding the psychosocial effects of WES test results on parents of children with rare diseases. *Journal of genetic counseling*, 25(6), 1207-1214.
368. Simon, A. J., Lev, A., Jeison, M., Borochowitz, Z. U., Korn, D., Lerenthal, Y., & Somech, R. (2014). Novel SMARCAL1 bi-allelic mutations associated with a chromosomal breakage phenotype in a severe SIOD patient. *Journal of clinical immunology*, 34(1), 76-83.
369. Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., ... & Hill, D. E. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112-123.
370. Bianciardi, L., Imperatore, V., Fernandez-Vizarra, E., Lopomo, A., Falabella, M., Furini, S., ... & Mari, F. (2016). Exome sequencing coupled with mRNA analysis identifies NDUFAF6 as a Leigh gene. *Molecular genetics and metabolism*, 119(3), 214-222.
371. Kohda, M., Tokuzawa, Y., Kishita, Y., Nyuzuki, H., Moriyama, Y., Mizuno, Y., ... & Kato, H. (2016). A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *PLoS genetics*, 12(1), e1005679.
372. Ogawa, E., Shimura, M., Fushimi, T., Tajika, M., Ichimoto, K., Matsunaga, A., ... & Mori, M. (2017). Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 40(5), 685-693.

373. Catania, A., Ardisson, A., Verrigni, D., Legati, A., Reyes, A., Lamantea, E., ... & Moroni, I. (2018). Compound heterozygous missense and deep intronic variants in NDUFAF6 unraveled by exome sequencing and mRNA analysis. *Journal of human genetics*, 63(5), 563-568.
374. Gai, X., Ghezzi, D., Johnson, M. A., Biagosch, C. A., Shamseldin, H. E., Haack, T. B., ... & Gorza, M. (2013). Mutations in FBXL4, encoding a mitochondrial protein, cause early-onset mitochondrial encephalomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 93(3), 482-495.
375. Winston, J. T., Koepp, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (1999). A family of mammalian F-box proteins. *Current Biology*, 9(20), 1180-S3.
376. Bonnen, P. E., Yarham, J. W., Besse, A., Wu, P., Fageih, E. A., Al-Asmari, A. M., ... & Smith, F. (2013). Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance. *The American Journal of Human Genetics*, 93(3), 471-481.
377. Huemer, M., Karall, D., Schossig, A., Abdenur, J. E., Al Jasmi, F., Biagosch, C., ... & Hauser, N. (2015). Clinical, morphological, biochemical, imaging and outcome parameters in 21 individuals with mitochondrial maintenance defect related to FBXL4 mutations. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(5), 905-914.
378. Barøy, T., Pedurupillay, C. R. J., Bliksrud, Y. T., Rasmussen, M., Holmgren, A., Vigeland, M. D., ... & Strømme, P. (2016). A novel mutation in FBXL4 in a Norwegian child with encephalomyopathic mitochondrial DNA depletion syndrome 13. *European journal of medical genetics*, 59(6-7), 342-346.
379. Kassovska-Bratinova, S., Fukao, T., Song, X. Q., Duncan, A. M., Chen, H. S., Robert, M. F., ... & Kondo, N. (1996). Succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT): human cDNA cloning, human chromosomal mapping to 5p13, and mutation detection in a SCOT-deficient patient. *American journal of human genetics*, 59(3), 519.
380. Fukao, T., Mitchell, G., Sass, J. O., Hori, T., Orii, K., & Aoyama, Y. (2014). Ketone body metabolism and its defects. *Journal of inherited metabolic disease*, 37(4), 541-551.
381. Kim, Y. A., Kim, S. H., Cheon, C. K., & Kim, Y. M. (2019). A Rare Cause of Life-Threatening Ketoacidosis: Novel Compound Heterozygous OXCT1 Mutations Causing Succinyl-CoA: 3-Ketoacid CoA Transferase Deficiency. *Yonsei medical journal*, 60(3), 308-311.
382. Sasai, H., Aoyama, Y., Otsuka, H., Abdelkreem, E., Naiki, Y., Kubota, M., ... & Fujiki, R. (2017). Heterozygous carriers of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase deficiency can develop severe ketoacidosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 40(6), 845-852.
383. Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G. et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581, 434–443 (2020).
384. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. Christos Kopanos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E. Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, and Andreas Massouras. *Oxford Bioinformatics*, bty897, 30 October 2018. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>.
385. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* 7(4):248-249 (2010).
386. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7(10): e46688.
387. Wang M. and Marín A. 2006. Characterization and Prediction of Alternative Splice Sites. *Gene* 366: 219-227.
388. Jaeken, J., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E., & Eeckels, R. (1980). Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency,

- increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?: 90. *Pediatric Research*, 14(2), 179-179.
389. Höck, M., Wegleiter, K., Ralser, E., Kiechl-Kohlendorfer, U., Scholl-Bürgi, S., Fauth, C., ... & Keldermans, L. (2015). ALG8-CDG: novel patients and review of the literature. *Orphanet journal of rare diseases*, 10(1), 1-8.
 390. Verheijen, J., Tahata, S., Kozicz, T., Witters, P., & Morava, E. (2020). Therapeutic approaches in congenital disorders of glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genetics in Medicine*, 22(2), 268-279.
 391. Chantret, I., Dancourt, J., Dupré, T., Delenda, C., Bucher, S., Vuillaumier-Barrot, S., ... & Durand, G. (2003). A deficiency in dolichyl-P-glucose: Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl α 3-glucosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9962-9971.
 392. Ondruskova, N., Cechova, A., Hansikova, H., Honzik, T., & Jaeken, J. (2020). Congenital disorders of glycosylation: Still "hot" in 2020. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 129751.
 393. BEŞPINAR, F. U., & BEŞPINAR, L. Z. (2017). Türkiye’de hane halkı yapıları ve evlilik pratiklerinde ikili resim: geleneklerin yani sıra değişimin yansımaları. *Nüfusbilim Dergisi*, 39(1), 109-149.
 394. Frésard, L., & Montgomery, S. B. (2018). Diagnosing rare diseases after the exome. *Molecular Case Studies*, 4(6), a003392.
 395. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... & Tukiainen, T. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291.
 396. McCormick, E. M., Lott, M. T., Dulik, M. C., Shen, L., Attimonelli, M., Vitale, O., ... & Stanley, C. M. (2020). Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Human Mutation*, 41(12), 2028-2057.

HAM VERİLER

FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TANI KONULAMAYAN KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARDA TÜM EKZOM DİZİ ANALİZİNİN KATKISI

ORIJINALLIK RAPORU

%4	%4	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.slideserve.com İnternet Kaynağı	%1
2	assets.thermofisher.com İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	acibadem.dergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
8	atlasgeneticsoncology.org İnternet Kaynağı	<%1

Özel İlgi Alanları (Hobileri):