

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

# **MİTOKONDRIYAL DNA MUTASYONLARI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. GUYEM KOLBAŞI ÖZGEN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. MEHMET ALİ ERGÜN**

**ANKARA**  
**EYLÜL 2012**

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

## **MİTOKONDRIYAL DNA MUTASYONLARI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. GUYEM KOLBAŞI ÖZGEN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. MEHMET ALİ ERGÜN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
01/2011-54 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA**  
**EYLÜL 2012**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tez Sınav Tutanağı

|                                             |                                             |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Adı ve Soyadı                               | Gülyim Özyen                                |
| Baba Adı                                    | Hüseyin                                     |
| Doğum Yeri/Tarihi                           | İstanbul, 1981                              |
| Diploma Tarihi / Diploma No                 | 30.06.2004 / 0404.A-096                     |
| Mezun Olduğu Fakülte                        | CHIRAZ ADIYAN ÜNİVERSİTESİ<br>Tıp Fakültesi |
| İhtisas Yaptığı<br>Anabilim Dalı/Bilim Dalı | Tıbbi Genetik Anabilim Dalı                 |
| İhtisas Süresi                              | Yıl: 4 Ay: 3                                |
| Sınav Yapılmasını İsteyen Makam             | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı   |

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Mitokondriyal DNA Mutasyonları

JÜRİ KARARI:

Tezinin yeterli ve uygun  
olduğuna oy birliği ile karar  
verilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. E. Ferda Bursalı



ÜYE

Prof. Dr. Necmiye Yılmaz Karagöz

ÜYE

Prof. Dr. Y. Ayar Eryılmaz

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlığım süresince, bilimselliğin, huzurun, saygı ve sevginin hakim olduğu bir ortamda uzmanlık eğitimi almamı sağlayan; asistanları olmaktan onur duyduğum değerli hocalarım Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e, sayın Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e ve sayın Öğr. Gör. Dr. Esra Tuğ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocam, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e, tezimin her aşamasında esirgemediği değerli bilgileri, fikirleri, yol göstericiliğinin yanı sıra sabrı, anlayışı, güler yüzü, örnek karakteri, üzerimdeki bütün emekleri için çok teşekkür ederim.

Değerli hocam sayın Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e, eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini cömertçe paylaşmasının yanı sıra tüm desteği, anlayışı ve sabrı için, beni yüreklendirdiği ve ufkumu genişlettiği için, her ihtiyacım olduğunda yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

Değerli hocam sayın Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, bilgi ve deneyimini ilgi, sevgi ve sabırla aktardığı, manevi desteğini her zaman hissettirdiği için, güleryüzü, anlayışı ve bana örnek olan tükenmeyen enerjisi için, çok teşekkür ederim.

Değerli hocam sayın Öğr. Gör. Dr. Esra Tuğ'a, mesleki deneyimini paylaştığı, ilgi, sevgi ve yakınlığını esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Dayanışma ve sevgi içinde omuz omuza çalıştığım değerli meslektaşlarım, sevgili arkadaşlarım Dr. Altuğ Koç, Dr. Kadri Karaer, Dr. Özgür Erkal, Dr. Ayşegül Öztürk Kaymak, Dr. Büşranur Çavdarlı, Dr. Abdullatif Bakır, Dr. Gülsüm Kayhan, Dr. Bayram Taşkın, Dr. Taha Bahsi, Dr. Fatma Nihal Dilek, Dr. Hanife Çoban ve Dr. Pelin Özyavuz’a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Işıl Küçük Kiraz, Uzm. Bio. Derya Karaer, Uzm. Bio. Sezen Güntekin, Uzm. Bio. Elif Pala, Uzm. Bio. Ebru Aytekin, Selma Karakılıç, Esra Küçük, Çiğdem Şahin’e; sabırlı ve güleryüzlü sekretimiz Mehtap Tırpan’a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Kıymetli annem ve babama, üzerimdeki emekleri ve sonsuz destekleri için teşekkür ederim.

Değerli dostlarım Pınar Akal ve Ayşenur Yalçıntaş’a hayatımın her anında olduğu gibi tez dönemimde de beni yalnız bırakmadıkları için teşekkür ederim.

Kıymetli hayat arkadaşım Burak Özgen’e sevgisi, tükenmeyen sabrı ve emekleri için çok teşekkür ederim.

## KISALTMALAR

---

|                   |                                                          |
|-------------------|----------------------------------------------------------|
| AD                | Anabilim Dalı                                            |
| ADP               | Adenozin Difosfat                                        |
| ANT               | Adenin Nükleotid Translokator                            |
| ark               | Arkadaşları                                              |
| ATP               | Adenozin Trifosfat                                       |
| b.ç.              | Baz Çifti                                                |
| BOS               | Beyin Omurilik Sıvısı                                    |
| °C                | Derece Santigrad                                         |
| CO <sub>2</sub>   | Karbondioksit                                            |
| CoA               | Koenzim A                                                |
| CoQ               | Koenzim Q                                                |
| CPEO              | Kronik Progresif Eksternal Oftalmopleji                  |
| D                 | Dalton                                                   |
| DGOUK             | Deoksiguanozin kinaz                                     |
| DHO-QO            | Dihidroorotat: Koenzim Q-Oksidoredüktaz                  |
| dk                | Dakika                                                   |
| DNC               | Deoksinükleotid taşıyıcı                                 |
| dNTP              | Deoksiribonükleotid Trifosfat                            |
| ECGF1             | Platelet kaynaklı endotelial büyüme faktörü 1            |
| EEG               | Elektroensefalogram                                      |
| EKO               | Ekokardiyografi                                          |
| EMG               | Elektromiyografi                                         |
| ETF-QO            | Elektron Transfer Flavoprotein: Koenzim Q Oksidoredüktaz |
| ETZ               | Elektron Transport Zinciri                               |
| FADH <sub>2</sub> | İndirgenmiş Flavın Adenin Dinükleotid                    |
| GSEQ              | GeneChip® Sequence Analysis Software                     |
| GTPaz             | Guanozin Trifosfataz                                     |
| H <sub>2</sub> O  | Su                                                       |
| Hz                | Hertz                                                    |
| kb                | Kilobaz                                                  |
| maks              | maksimum                                                 |
| mbar              | Milibar                                                  |
| MDS               | Mitokondriyal Deplesyon Sendromu                         |
| mg                | Miligram                                                 |
| ml                | Mililitre                                                |
| µl                | Mikrolitre                                               |

|        |                                                              |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| MNGIE  | Mitokondriyal nörogastrointestinal ensefalopati              |
| MRG    | Manyetik Rezonans Görüntüleme                                |
| MRS    | Manyetik Rezonans Spektroskopi                               |
| mtDNA  | Mitokondriyal DNA                                            |
| NADH   | İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid                   |
| ng     | Nanogram                                                     |
| OXPHOS | Oksidatif Fosforilasyon                                      |
| PEO    | Progresif Eksternal Oftalmopleji                             |
| PFO    | Patent Foramen Ovale                                         |
| pmol   | Pikomol                                                      |
| POLG   | Polimeraz Gama                                               |
| PZR    | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                  |
| RFLP   | Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi                    |
| RMM2B  | p53 ile indüklenebilen ribonükleotid redüktaz                |
| rpm    | Dakikadaki Devir Sayısı                                      |
| RRM2B  | Ribonükleotid redüktaz M2 B                                  |
| rRNA   | Ribozomal RNA                                                |
| sn     | Saniye                                                       |
| SNP    | Tek Nükleotid Polimorfizmi ( Single Nucleotide Polymorphism) |
| SUCLA2 | Suksinil KoA sentetaz                                        |
| TK2    | Mitokondriyal timidin kinaz 2                                |
| TP     | Prolin tRNA geni                                             |
| tRNA   | Transfer RNA                                                 |
| USG    | Ultrasonografi                                               |
| V      | Volt                                                         |
| VEP    | Görsel Uyarılmış Potansiyel (Visual Evoked Potential)        |

---

## **TABLÖLAR DİZİNİ**

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. ETZ protein kompleksleri .....                              | 9  |
| Tablo 2. Mitokondriyal fonksiyonları düzenleyen nükleer genler ..... | 20 |
| Tablo 3. Olgu 1’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar .....         | 55 |
| Tablo 4. Olgu 2’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar .....         | 57 |
| Tablo 5. Olgu 3’te saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar .....         | 58 |
| Tablo 6. Olgu 4’te saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar .....         | 59 |
| Tablo 7. Olgu 5’te saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar .....         | 61 |
| Tablo 8. Olgu 6’da saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar .....         | 63 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Mitokondriyal hastalıkların etyolojik sınıflaması .....                                               | 12 |
| Şekil 2: Mitochip görüntüsü .....                                                                              | 47 |
| Şekil 3: Yıkama İstasyonu.....                                                                                 | 48 |
| Şekil 4: Mitochip'in tarayıcıya yerleştirilmesi .....                                                          | 48 |
| Şekil 5: Olgu 4 ve ailesine ait GSEQ analiz görüntüsü.....                                                     | 50 |
| Şekil 6: Olgu4 ve ailesine ait PZR örneklerinin BsaHI restriksiyon enzimi ile<br>kesim sonrası görüntüsü ..... | 53 |

## İÇİNDEKİLER

**Teşekkür**

**Kabul ve Onay**

**İçindekiler**

**Kısaltmalar**

**Tablolar Dizini**

**Şekiller Dizini**

|                                                                 |          |
|-----------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                            | <b>1</b> |
| <b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>                                  | <b>3</b> |
| 2.1 Tarihçe.....                                                | 3        |
| 2.2 Epidemiyoloji .....                                         | 5        |
| 2.3 Mitokondri Yapısı .....                                     | 6        |
| 2.4 Mitokondriyal Genetik .....                                 | 11       |
| 2.4.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA).....                            | 12       |
| 2.4.2 Nükleer DNA .....                                         | 18       |
| 2.5 Mitokondriyal Hastalıkların Klinik Sınıflaması.....         | 21       |
| 2.6 Mitokondriyal Hastalıklarda Tedavi .....                    | 23       |
| 2.7 mtDNA İlişkili Hastalıkların Genetik Sınıflaması .....      | 23       |
| 2.8 Mitokondriyal Sendromlar .....                              | 25       |
| 2.8.1 Leigh Sendromu (Subakut nekrotizan ensefalopati) .....    | 25       |
| 2.8.2 Leber'in Herediter Optik Nöropatisi (LHON) .....          | 27       |
| 2.8.3 NARP (nöropati, ataksi, retinitis pigmentoza) .....       | 29       |
| 2.8.4 Kearns- Sayre Sendromu (KSS).....                         | 30       |
| 2.8.5 MELAS (Miyopati, epilepsi, laktik asidoz, inme) .....     | 31       |
| 2.8.6 MERRF (Myoklonik epilepsi, düzensiz kırmızı lifler) ..... | 31       |
| 2.8.7 Pearson Sendromu .....                                    | 32       |
| 2.8.8 Alpers Sendromu .....                                     | 32       |
| 2.8.9 Mitokondriyal Deplesyon Sendromları .....                 | 33       |
| 2.9 Mitokondri ve Yaşlanma .....                                | 33       |
| 2.10 Mitokondriyal Hastalıklarda Tanı .....                     | 34       |
| 2.10.1 Laboratuvar Tanı .....                                   | 34       |

|            |                                                                    |            |
|------------|--------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.10.2     | Moleküler Tanı .....                                               | 35         |
| <b>3.</b>  | <b>GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                       | <b>40</b>  |
| 3.1        | DNA Eldesi İçin Gerekli Malzemeler .....                           | 40         |
| 3.2        | Yüksek Tuz Konsantrasyonlu DNA İzolasyon Yöntemi .....             | 40         |
| 3.3        | Mitokondri DNA'sı Mikroarray Dizileme Protokolü: .....             | 42         |
| 3.3.1      | Genomik DNA Eldesi: .....                                          | 42         |
| 3.3.2      | Long Range PZR: .....                                              | 42         |
| 3.3.3      | PZR Pürifikasyonu .....                                            | 44         |
| 3.3.4      | PZR ürünlerinin miktar tayini ve birleştirilmesi .....             | 44         |
| 3.3.5      | Fragmantasyon .....                                                | 45         |
| 3.3.6      | İşaretleme .....                                                   | 45         |
| 3.3.7      | Hibridizasyon .....                                                | 46         |
| 3.3.8      | Yıkama-Boyama-Tarama .....                                         | 47         |
| 3.4        | Değerlendirme .....                                                | 49         |
| 3.5        | Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Enzimi ile Kesim ..... | 50         |
| 3.5.1      | Primer Dizisi ve PZR Reaksiyon Şartları .....                      | 50         |
| 3.5.2      | Çoğaltılmış DNA'nın Elektroforezde Değerlendirilmesi .....         | 52         |
| 3.5.3      | PZR Ürününün Restriksiyon Enzimi ile Kesimi .....                  | 52         |
| 3.5.4      | mtDNA G3460A yanlış anlamlı mutasyonunun değerlendirilmesi ..      | 52         |
| <b>4.</b>  | <b>BULGULAR .....</b>                                              | <b>54</b>  |
| 4.1        | Olgu 1 .....                                                       | 54         |
| 4.2        | Olgu 2 .....                                                       | 56         |
| 4.3        | Olgu 3 .....                                                       | 57         |
| 4.4        | Olgu 4 .....                                                       | 59         |
| 4.5        | Olgu 5 .....                                                       | 60         |
| 4.6        | Olgu 6 .....                                                       | 62         |
| <b>5.</b>  | <b>TARTIŞMA .....</b>                                              | <b>64</b>  |
| <b>6.</b>  | <b>SONUÇ .....</b>                                                 | <b>80</b>  |
| <b>7.</b>  | <b>KAYNAKLAR .....</b>                                             | <b>82</b>  |
| <b>8.</b>  | <b>ÖZET .....</b>                                                  | <b>97</b>  |
| <b>9.</b>  | <b>SUMMARY .....</b>                                               | <b>98</b>  |
| <b>10.</b> | <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                              | <b>99</b>  |
| <b>11.</b> | <b>EKLER .....</b>                                                 | <b>101</b> |

## 1. GİRİŞ

Mitokondriyal hastalıklar, çocukluk çağında en sık görülen nörometabolik hastalıklardandır. Epidemiyolojik çalışmalara göre, mitokondriyal hastalıkların canlı doğumlardaki prevalansı 1/8,000 civarındadır (1).

Mitokondriyal hastalıklar, oksidatif fosforilasyon ve ATP üretimindeki bozulma nedeniyle çeşitli organ ve dokuları etkileyerek çok çeşitli klinik bulgulara yol açmaktadırlar. Hastalığın klinik bulguları her yaşta başlayabilir ve çeşitli sistemleri tutabilmekle beraber; santral sinir sistemi ve kas dokusu gibi enerji gereksinimi yüksek dokular, mitokondriyal bozukluklardan daha ağır etkilenmektedir.

Mitokondri içerisindeki elektron transport zincirinin (ETZ) çalışmasından sorumlu proteinlerin bir kısmı mitokondriyal DNA tarafından, kalanı ise nükleer DNA tarafından kodlanır. Bu sebeple hem mitokondriyal DNA, hem de nükleer DNA'daki bozukluklar mitokondriyal hastalıklara sebep olabilir. Nükleer DNA mutasyonları Mendelyen kalıtım gösterirken, mtDNA mutasyonları maternal geçişli veya sporadik olabilir.

İlk mitokondriyal hastalık 1962'de tanımlanmıştır (2). Sonrasında mitokondriyal hastalıkların tanı ve tedavisinde gelişmeler yaşanmış olmakla birlikte halen bulguların hastalığa spesifik olmayışı, hem mitokondriyal hem genomik DNA'nın hastalıklardaki rolü, genotip fenotip korelasyonunun tam olmayışı, değişken ekspresivite gibi sebeplerle tanısı güç bir hastalık grubudur.

Mitokondriyal hastalıkların tanısında; klinik, görüntüleme, histopatolojik bulgular ile birlikte moleküler analizler kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, klinik bulgularıyla mitokondriyal hastalık düşünülen altı olguda mikroarray ile tekrar sekanslama yöntemi kullanılarak saptanan mitokondriyal DNA polimorfizm/mutasyonlarının, mitokondriyal hastalıklarla ilişkisinin araştırılmasıdır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Tarihçe**

Mitokondri, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan, primer fonksiyonu aerobik solunumu gerçekleştirmek ve hücre içi metabolik yollarda kullanılacak hücresel enerjiyi (ATP) sentezlemek olan bir organeldir. Ayrıca, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve hücre içi sinyal iletiminde önemli rolü bulunmaktadır (3).

Mitokondri ilk kez 19. yüzyılda tanımlanmış, fonksiyonunun anlaşılması ise 1948 yılında mitokondrinin izolasyonu sonrasında gerçekleşmiştir (4).

Mitokondri ile ilgili ilk bilgiler 1841 yılında, hücre nükleusunun tanımlanmasından birkaç yıl sonra elde edilmiştir. Özgün yapısı ilk kez 1890 yılında Altmann tarafından tanımlanmış, hücre içinde yaşayan ve hayati fonksiyonları gerçekleştiren organlar olduğu bildirilmiş ve bunlara bioblast adı verilmiştir. Mitokondri terimi ise ilk kez 1898 yılında Benda tarafından kullanılmıştır; bu isim Yunanca iplik anlamına gelen “mitos” ve granül anlamına gelen “chondros” kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (5). 1912-1913 yıllarında Kingsbury ve Warburg bu yapıların hücresel solunumla ilgili olabileceğini öne sürmüştür. 1920-1930 yılları arasında sitokromlar, demir-porfirin bileşenleri (hem), flavin ve piridin nükleotidleri tespit edilmiş, iskelet kasından hazırlanan preparatların incelenmesi ve Krebs tarafından sitrik asit siklusunun tanımlanması ile mitokondri alanında yapılan çalışmalar ilerlemiştir (6).

1931 yılında Lohmann ATP'yi ilk kez tanımlamıştır; ATP'nin kas kasılması dışındaki hücresel fonksiyonunun anlaşılması ise 10 yıldan daha uzun süre almıştır. Oksidatif fosforilasyon ilk kez 1941'de Kalckar tarafından tanımlanmıştır. 1961'de Mitchell tarafından kemiozmotik hipotez tanımlanmıştır. Mitokondrinin kendine ait DNA'sı olduğu ise 1963'de Nass ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. 1981'de insan mtDNA dizisi yayınlanmış, 1988'de ilk patojenik mtDNA mutasyonu tanımlanmıştır (4, 7).

İlk mitokondriyal hastalık 1962'de Luft ve ark. tarafından, miyopati, aşırı terleme, sıcağa tahammülsüzlük, poliüri, polidipsi ve artmış bazal metabolizma hızı olan ötiroid durumda bir kadın hastada tanımlanmıştır. Bu hastada oksidatif fosforilasyon bozukluğu olduğu, kompanzasyon amacıyla hastanın mitokondrilerinin sayıca ve hacimce arttığı tespit edilmiştir. Bildirilen bu ilk vakanın ardından daha birçok hastalıkta mitokondriyal bozuklukların rolü olduğu saptanmıştır (2)

Mitokondrinin, 1.5 milyar yıl önce, ökaryotik bir hücreyle oksidatif fosforilasyon yeteneği olan prokaryotik bir hücrenin birleşmesinden köken aldığı düşünülmektedir (endosimbiyotik hipotez). Çift membranlı yapı, özgün transkripsiyon, translasyon ve protein sentezi özellikleri olan sirküler genom, iyonlar, metabolitler ve proteinlerin taşınmasını sağlayan spesifik taşıyıcıların varlığı ve oksidatif fosforilasyona ek olarak gerçekleşen çok sayıda biyolojik reaksiyon, bu hipoteze kanıt olarak gösterilmektedir (5).

## 2.2 Epidemiyoloji

Yakın zamana kadar, mitokondriyal hastalıkların oldukça nadir görülen, toplumda yaklaşık 1-2/1,000,000 sıklıkta rastlanan hastalıklar olduğu düşünülüyordu. Tüm dünyada mitokondriyal hastalıkların klinik ve laboratuvar takibinin yapıldığı sınırlı sayıda merkez vardı. 1990'larda mitokondriyal DNA sekansının tamamlanması ve takiben patolojik mitokondriyal mutasyonların tanımlanması ile mitokondriyal hastalıklarla ilgili klinik ve epidemiyolojik çalışmalar artmıştır. Tek bir patojenik mitokondriyal DNA mutasyonunun değerlendirildiği ilk çalışmada MELAS'a ( mitokondriyal miyopati, ensefalopati, laktik asidoz, inme) neden olabilen 3243A>G mutasyonunun prevalansı 16.3/10,000 olarak bulunmuştur. Tüm mitokondriyal hastalıklara yönelik ilk popülasyon temelli çalışma 1999 yılında Kuzey Doğu İngiltere'de yapılmış, kullanılan tanı kriterlerine göre çalışmaya dahil edilen bireylerde mitokondriyal hastalığa sahip olma veya hastalık riski taşıma oranı 1/8013 olarak hesaplanmıştır. Bu bireylerde en sık rastlanan bozukluklar; Leber'in hereditör optik nöropatisine (LHON) sebep olabilecek nokta mutasyonları (%50) ve mtDNA yeniden düzenlenimleri (en sık tek nükleotid delesyonları, %20) olarak belirlenmiştir. Çocuklarda yapılan ilk epidemiyolojik çalışma Darin ve ark. tarafından 2001'de batı İsveç'te yapılmış, çalışmaya 358,616 çocuk dahil edilmiştir. 16 yaş altı çocuklarda prevalans 4.7/100,000 olarak belirlenmiştir. Okul öncesi dönemde mitokondriyal ensefalomiyopatilerin insidansı 8,9/100,000 olarak bulunmuştur. Aynı dönemde Güney Avusturalya'da Skladal ve ark. tarafından yürütülen

çalışmada, mitokondriyal solunum zinciri defektlerinin doğumdaki prevalansı 5/100,000 olarak belirlenmiştir. Birbirinden çok uzak coğrafi konumlarda yapılan bu iki çalışmada hemen hemen aynı sonuçlar elde edilmiş, ortalama 1/20,000’lik bir prevalans ile solunum zinciri defektleri sık görülen kalıtsal metabolik hastalıklar arasında yerini almıştır (1).

### 2.3 Mitokondri Yapısı

Mitokondri, ışık mikroskobu ile görülebilecek boyutta olup ortalama çapı 0.5-1 mikrometre olan silindirik şekilli, hareketli bir organeldir. Hareketleri mikrotübüllerle sağlanır, bazı hücre tiplerinde uzun filamanlar boyunca hareket ederken, dokunun bir bölgesinde yüksek ATP ihtiyacı varsa mitokondriler o bölgede sabit pozisyonda kalırlar. Mikrosinematografi yöntemiyle incelendiğinde, şeklini sürekli değiştirebilme (plastisite) özelliğine sahip olduğu görülür. Farklı hücre tiplerinde mitokondri sayısı ve şekli değişkenlik gösterir, aynı hücre tipinde de farklı fizyolojik koşullarda bu değişkenlik gözlenebilir. Hücrenin enerji ihtiyacı arttıkça mitokondri sayısı artar. Örneğin dinlenme halindeki iskelet kası tekrarlayan kasılmalarla yeterince uzun süre uyarılırsa mitokondri sayısında 5-10 kat artış meydana gelir. Hücre için gerekli enerji düzeyinin stabilizasyonunda rol oynayan mitokondriyal bölünme (fizyon) ve birleşme (füzyon) olayları dış membranda bulunan GTPaz’larla regüle edilir Hücredeki mitokondri sayısı, hücrenin bulunduğu organ ya da dokuya bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte ortalama 500-2000 adettir. Yüksek enerji ihtiyacı olan ekstremsel göz kasları, kalp kası gibi dokularda ve nöronlarda mitokondri sayısı diğer dokulara kıyasla daha fazladır. Her mitokondri, birbirinden farklı özelliklere sahip iki

özelleşmiş zar yapısı içerir. Bu zarlar, hücre zarına benzer şekilde çift katmanlı lipid membranlardır. Bu iki katman, iç matriks ve daha dar olan membranlar arası boşluğu meydana getirir. Her bir zar çok sayıda özelleşmiş protein içerir. Dış membran çok sayıda porin molekülü içerir. Porin molekülleri çift katmanlı lipid membranda büyük taşıma kanalları oluşturan transport proteinleridir. Bu membran, 5,000 dalton (D) ve daha küçük ağırlıkta olan tüm moleküllerin geçişine izin verir. Uygun büyüklükteki proteinler intermembraner aralığa geçebilse de bunların büyük kısmı geçirgen olmayan iç membranı geçemez. Bu sebeple, intermembraner aralık, içerdiği küçük moleküller bakımından sitozolle kimyasal olarak denk görünse de matrikste bu moleküllerin yoğunluğu daha fazladır.

Mitokondrinin fonksiyon gören asıl bölümü matriks ve onu çevreleyen iç membrandır. İç membran özelleşmiş bir yapıya sahiptir. İki katmanlı lipid tabakaya karşı geçirgenliği önleyen bol miktarda kardiolipin içerir. Membranda aynı zamanda, mitokondriyal enzimlerin fonksiyon görmesi için gerekli olan küçük moleküllerin geçmesini sağlayan çok sayıda ve çeşitli transport proteinleri vardır. Solunum zincirinde görevli enzimler iç mitokondriyal membranda yerleşmiştir, bu sistem hücrenin ATP üretiminden sorumlu oksidatif fosforilasyonun temelini oluşturur.

İç membranda krista denen, matrikse uzanım gösteren çok sayıda katlantı bulunur. Bu katlantılar iç membranın yüzey alanını önemli ölçüde artırırlar. Enerji ihtiyacı fazla olan hücrelerdeki mitokondrilerde bu kristaların sayısı daha

fazladır. Örneğin kalp kasındaki mitokondrilerde krista sayısı, karaciğer hücresi mitokondrilerine kıyasla üç kat fazladır.

Mitokondriyal matrikste hücre metabolizmasında görevli proteinlerin yanı sıra, mitokondriyal genom, mitokondriyal ribozomlar, transfer RNA'lar (tRNA) ve mitokondriyal genlerin ekspresyonu için gerekli enzimler bulunur.

İç mitokondriyal membranda bulunan elektron transport zinciri (ETZ) üzerinde elektronlar enerji gradienti boyunca ilerlerken, hidrojen iyonları (protonlar) intermembraner aralığa pompalanır. Bu aralık, mitokondriyal matrikse kıyasla gittikçe pozitif yüklü ve asidik hale gelir. Oluşan bu gradient, kimyasal bir enerji barındırır. Mitokondriyal enerji üretimini açıklayan bu hipoteze “kemiozmotik hipotez” adı verilmiştir. Kemiozmotik potansiyelin ATP üretimi için gereken enerjiyi sağladığı ilk kez 1961 yılında İngiliz biyokimyacı Peter Mitchell tarafından ileri sürülmüş, bu çalışması ile 1978 yılında Nobel ödülü almıştır.

Mitokondri, hem piruvat hem de yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanabilir. Piruvat şekerlerin, yağ asitleri ise yağların sindirimi sonucu oluşur. Bu ürünler, mitokondriyal matriksteki enzimlerle Asetil CoA'ya çevrilir. Asetil CoA'nın asetil grupları sitrik asit siklusunda okside edilirken, karbon atomları CO<sub>2</sub>'ye çevrilir ve atık madde olarak hücreden uzaklaştırılır. Oksidasyonla açığa çıkan yüksek enerjili elektronlar, taşıyıcı moleküller olan FADH<sub>2</sub> ve NADH ile mitokondri iç membranına taşınır. İç mitokondri zarındaki katabolik olayların son aşamasında moleküler oksijen kullanılır. İç membranda oluşan büyük miktardaki

enerji, ADP ve inorganik fosfattan ATP oluşmasında kullanılır. Bu nedenle bu son reaksiyon serisine oksidatif fosforilasyon adı verilir (4).

Mitokondriyal ETZ’de beş adet protein kompleksi bulunur.

**Tablo 1.** ETZ protein kompleksleri (2)

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| Kompleks I:   | NADH: CoQ Oksidoredüktaz         |
| Kompleks II:  | Süksinat: CoQ Oksidoredüktaz     |
| Kompleks III: | CoQ: Sitokrom bc1 Oksidoredüktaz |
| Kompleks IV:  | Sitokrom C Oksidaz               |
| Kompleks V:   | ATP Sentaz                       |

Sadece ilk üç komplekste elektron taşınması gerçekleşir. 4. kompleks elektronları oksijen ile birleştirerek H<sub>2</sub>O oluşmasını sağlarken 5. kompleks ATP sentezini gerçekleştirir.

Bu 5 komplekse ek olarak elektron transport zincirinin çalışması için gerekli olan üç kompleks daha vardır. Bunlar:

- Dihidroorotat: COQ-oksidoredüktaz (DHO-QO)
- Elektron transfer flavoprotein: CoQ oksidoredüktaz (ETF-QO)
- Adenin nükleotid translokator (ANT)

ETZ’deki elektron taşıyıcılarının çoğu, görünür ışığı absorbe ederek, okside veya redükte olduklarında renk değiştirirler. Her birinin absorpsiyon spektrumu farklı olduğu için spektroskopik olarak takip edilebilir. ETZ’de görevli sitokromlar ilk kez 1925 yılında tanımlanmış ve absorpsiyon spektrumuna göre sitokrom a, b ve c olarak adlandırılmıştır (4).

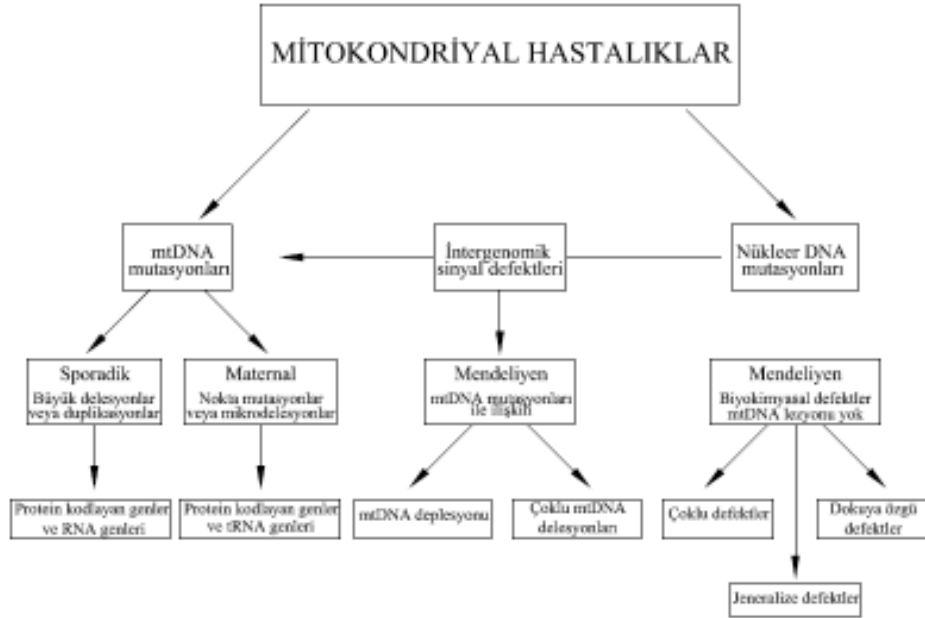
NADH dehidrojenaz kompleksi (Kompleks 1), solunumsal enzim komplekslerinin en büyüğüdür ve 40'tan fazla polipeptit zinciri içerir. NADH'tan aldığı elektronları ubikinona aktarır. Sitokrom b-c1 kompleksi (Kompleks 2) en az 11 polipeptit içeren, dimerik yapıda bir proteindir. Her bir monomer, sitokroma bağlı halde 3 hem grubu ve demir sülfür proteini içerir. Ubikinondan aldığı elektronları sitokrom c'ye aktarır, daha sonra elektronlar sitokrom oksidaz kompleksine aktarılır.

Sitokrom oksidaz kompleksi (Kompleks 3) de dimerik bir proteindir. Her bir monomer 13 farklı polipeptit zinciri, iki sitokrom ve bakır atomlarından oluşur. Sitokrom c'den elektronları tek tek alarak oksijene iletirken bir seferde dört tane elektron aktarır. Sitokrom oksidazın merkezinde bulunan demir-sülfür grubu oksijenin redüksiyonunu katalizler. Bir oksijen molekülü tek bir elektron aldığı anda, son derece reaktif olan süperoksit radikali oluşur, çevreden 3 elektron daha alarak kararlı hale geçmesi gereklidir. Bu nedenle 4 elektronla birleşmiş hale gelip zararsız olan su molekülüne dönüşmedikçe, oksijen molekülleri heme bağlı olan demir ve bakır atomlarınca hapsedilir. Oksijen molekülü 4 elektronla birleştiğinde 2 molekül su açığa çıkar. Sitokrom oksidaz reaksiyonu çoğu hücrede toplam oksijenin %90'ını kullanır, bu nedenle aerobik yaşamın devamı için zorunludur. Elektronlar ETZ boyunca aktarılırken, transfer edilen her bir elektrona karşılık bir ya da iki proton iç mitokondriyal matriksten intermembraner aralığa pompalanır. Proton sayısı, ETZ'deki enzim kompleksleri arasında değişkenlik gösterir.

NADH dehidrojenaz kompleksi ve sitokrom b-c1 kompleksi elektron başına iki protonun membrandan geçişini sağlarken, sitokrom oksidaz kompleksi elektron başına 1 protonu membran dışına pompalar. Bu farkın sebebi, elektronların ETZ boyunca ilerlemesiyle açığa çıkan enerjinin, giderek artan redoks potansiyelini aşmak için kullanılmasıdır. Protonların bu hareketinin hücrel açıdan önemli sonuçları vardır. İç mitokondriyal membranın iki tarafı arasında bir pH gradiyenti oluşur. Pozitif yüklü iyonların akışı nedeniyle membranın iç tarafı negatif, dış tarafı ise pozitif yüklü hale gelerek, bir membran potansiyeli oluşur. Membran potansiyeli ve pH farkı birlikte bir elektrokimyasal proton gradiyenti oluşturur. Bu gradiyent oksidatif fosforilasyondaki ATP sentezi için oldukça önemlidir. İç membrana bağlı bir enzim olan ATP sentaz, protonların intermembraner alandan matrikse akışını sağlayan bir kanal görevi görür. İyonlar bu kanaldan geçerken açığa çıkan enerji kullanılarak; ADP ve inorganik fosfattan, ATP sentezlenir. Elektrokimyasal protein gradiyenti ATP sentezi dışında başka hücrel olaylarda da önemlidir. Mitokondride ATP matrikse alınırken, piruvat gibi yüklü proteinler, ADP ve inorganik fosfat iç membrandan dışarı çıkarılmalıdır. Bu molekülleri bağlayan taşıyıcılar, protonların akışı sırasında açığa çıkan enerjiden yararlanmaktadır. ATP ile ADP ve inorganik fosfatın hareketini aynı taşıyıcı molekül sağlar (4).

## **2.4 Mitokondriyal Genetik**

Mitokondri fonksiyonu için gerekli proteinler mtDNA ve nükleer DNA tarafından kodlanır.



Şekil 1. Mitokondriyal hastalıkların etyolojik sınıflaması (8)

### 2.4.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA)

İnsan mitokondriyal DNA'sı halkasal yapıda, çift zincirli, 16,569 baz çifti uzunluğunda bir moleküldür. Guanin ve sitozin bazlarının dağılımına göre bu zincirler, hafif (sitozin bakımından zengin) ve ağır (guanin bakımından zengin) olarak isimlendirilir. Mitokondriyal genom; 22 transfer RNA (tRNA), 2 ribozomal RNA (rRNA) ve 13 protein kodlar. Yapısal genlere ek olarak, replikasyonda görevli bir kontrol bölgesine de sahiptir. Hafif zincirde yer alan ND6 dışında tüm rRNA ve polipeptid genleri ağır zincir üzerinde yerleşmiştir (9).

mtDNA oldukça kompakt bir yapıya sahiptir ve intron içermez. İnsan mtDNA'sı protein sentezi için gerekli bilgiye sahip olsa da replikasyon, tamir,

transkripsiyon ve translasyonda gerekli enzimlerin sentezi için nükleer DNA'ya bağımlıdır (3).

Mitokondriyal DNA bölünen ve bölünmeyen hücrelerde sürekli replike olmaktadır. Replikasyon zamanı, nükleer DNA'nın replikasyonundan bağımsızdır. mtDNA polimeraz gama (POLG), timidin kinaz 2 ve deoksiguanozin kinaz, mtDNA replikasyonundan sorumlu olup nükleer DNA'da kodlanan enzimlerdir. mtDNA üzerinde D-loop adı verilen bölge (57. pozisyon) replikasyonun başlangıç bölgesidir (3)

mtDNA yüksek oranda polimorfiktir, aynı etnik gruptaki bireyler arasında bile birçok değişim görülür. Belirli mtDNA varyasyonlarının aynı bireyde bir arada bulunması ile mtDNA haplogrupları oluşur, haplogruplar arasında oksidatif fosforilasyon kapasitesi ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumu açısından farklılıklar gözlenir (3, 10).

Mitokondriyal genetik materyal maternal yolla kalıtılır ve rekombinasyona uğramaz. Ayrıca, mtDNA'nın evrimsel süreçte değişim oranı nükleer DNA'ya göre daha fazladır. Bu nedenle zaman içinde mtDNA'da biriken sık görülen polimorfizmlerin tanımlanmasıyla geriye gidilerek ilk mitokondriyal ata olan anneye, "mitokondriyal Havva"ya ait mtDNA'nın geçirdiği evrimsel değişim izlenebilmiştir. Mitokondriyal Havva'nın yaklaşık 200,000 yıl önce Afrika'da yaşamış olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarla, mtDNA haplogrup ağacı ve mtDNA migrasyon haritası elde edilmiştir (11).

Mitokondriyal DNA'da, nükleer DNA'ya göre mutasyon sıklığı daha fazladır. Bunun sebepleri arasında; mtDNA'nın koruyucu histonlarının olmaması,

ortamda oksijen radikallerinin yoğun olması, ortamda birçok metabolitin mevcut olması, koruyucu ve onarıcı mekanizmalarının yetersiz olması sayılabilir (12).

Mitokondri, sahip olduğu dört önemli fonksiyonu nedeniyle hastalıkların patofizyolojisinde önemli role sahiptir:

- Hücrenin gereksinim duyduğu enerjinin büyük kısmının üretimi
- Reaktif oksijen radikallerinin üretilmesi ve fonksiyonlarının düzenlenmesi
- Sitozolik  $Ca^{+2}$  düzeyinin regülasyonu
- Mitokondriyal geçirgenliğin değişmesiyle apoptozisin regülasyonu (9)

mtDNA tarafından kodlanan 13 proteinin tamamı ETZ ve oksidatif fosforilasyonun (OXPHOS) alt üniteleridir. Bu proteinler normal OXPHOS aktivitesi için gereklidir. Hücrelerden mtDNA uzaklaştırıldığında, hücrede OXPHOS aktivitesinin kaybolduğu ve ATP'nin yalnızca glikoliz yoluyla sağlandığı görülür. Eğer mtDNA'sı olmayan hücreye donör mtDNA'sı yerleştirilirse, donörün hücrelerindeki benzer oranda enzim aktivitesi olduğu görülür. Yani, mtDNA tarafından kodlanan alt üniteler sadece OXPHOS'u gerçekleştirmekle kalmaz, aynı zamanda enzim aktivitesini de etkiler (3).

Mitokondriyal DNA yalnızca anneden kalıtılır ve rekombinasyona uğramaz. Matür oositlerde yaklaşık 100,000 mtDNA kopyası bulunur. Oysa, primordial germ hücrelerinin ultrastrüktürel incelemeleri sonucu yaklaşık 10 mitokondri içerdikleri gösterilmiştir. Bu durum, erken embriyogenez esnasında mitokondriyal biyogenezin durduğunu; oositteki mitokondrinin %0.01'inin gelecek kuşağa aktarıldığını göstermektedir. Göç eden primordial germ

hücrelerinde mitokondriyal replikasyon yeniden başlar ve primordiyal oositlerde mitokondri sayısı binli rakamlara ulaşır (13).

Bununla birlikte, literatürde mtDNA'nın babadan kalıtıldığı 1 olgu bildirilmiştir. mtDNA'nın babadan aktarılmama sebebinin sperm mitokondrisinin spermin kuyruk kısmında yer alması ve fertilizasyon esnasında sperm kuyruğunun ovuma ulaşmaması olmadığı; babadan gelen mitokondrilerin embriyogenezin erken döneminde elimine edilmesi olduğu belirlenmiştir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrasında infantlarda saptanabilen paternal mtDNA oranı % 0,001 kadar düşüktür, bu da ya paternal mtDNA replikasyonunun baskılandığını ya da saptanabilecek düzeylerin çok altında bir konsantrasyona kadar dilue olduğunu düşündürmüştür. Ovumun paternal mtDNA'yı elimine edememesi, embriyonun blastokist evresinde kaybıyla sonuçlanabileceği ileri sürülmektedir (3, 14).

Bir somatik hücredeki mitokondriler ortalama 50-100 mtDNA kopyası içerirler ve doku tipine göre değişmekle birlikte, bir hücrede ortalama 1,000 adet mitokondri bulunabilir. Germ hücrelerindeki toplam mtDNA sayısı ise somatik hücrelerden farklıdır. Memeli oositlerinde mtDNA kopya sayısı 100,000'e kadar çıkabilmekteyken, spermatozoalarda yaklaşık 100 kopya bulunur (14).

Bir dokuda veya hücrede yalnızca normal ya da yalnızca mutant mtDNA bulunması homoplazmi adını alırken birden fazla mtDNA türü (normal ve mutant türlerin bir arada bulunması) varlığında heteroplazmiden bahsedilir. Heteroplazmi derecesi hücreler ve dokular arasında farklılık gösterebilir. Heteroplazmik bir hücre bölündüğünde, yavru hücrelere normal ya da mutant mtDNA molekülleri rastgele dağılır. Hücrelerde mutant mtDNA yükü arttığında, mitokondriyal

fonksiyonun korunduğu belli bir eşik değere kadar hastalık belirtileri ortaya çıkmaz. Mutant mtDNA oranı arttıkça, bu eşik değeri geçilir, mitokondriyal fonksiyonlar bozulur ve hastalık belirtileri ortaya çıkar. Bazı mtDNA mutasyonları için, mitokondriyal hastalığın şiddeti için de bir kritik eşik değeri mevcuttur, mutasyon oranı bu değeri geçtiğinde hastalığın şiddeti belirgin düzeyde ve birden artar. Mitokondriyal bozukluklardan en çok etkilenen organlar; merkezi sinir sistemi, iskelet ve kalp kası, pankreas adacık hücreleri, karaciğer ve böbrek gibi enerji gereksinimi yüksek olan dokulardır (14).

Enerji sistemindeki defektlerin sonucunda ortaya çıkan bulgular arasında; körlük, demans, hareket bozuklukları, kardiyomiyopati, miyopati, böbrek fonksiyon bozukluğu sayılabilir (9).

Yapılan çalışmalarda, kuşaklar arasında heteroplazmi oranının hızlı bir şekilde değişim gösterdiği saptanmıştır. Normal ve mutant mtDNA kopyalarının sonraki kuşağa rastgele dağılımı, bu değişimi açıklamada yetersiz kalmış, mitokondriyal darboğaz (bottleneck) kavramı öne sürülmüştür. 1982’de Hauswirth ve Laipis’in tanımladığı darboğaz hipotezine göre, oogeneze sırasında, premigratuar primordial germ hücrelerinde, ya mtDNA kopya sayısı azaltılmakta ya da amplifikasyon için yalnızca birkaç mtDNA molekülü kalıp olarak kullanılmaktadır. Bu tip bir model, heteroplazmi oranlarının hızlı değişimini ve memeli türleri arasındaki mitokondriyal genotipik varyasyonu açıklayabilir. Bu darboğaz modelinde etkin olarak aktarılan mtDNA sayısı, birçok bilim adamı tarafından araştırılmıştır. Farelerle yapılan ilk çalışmalarda bu sayı 185 olarak

saptanmış, tekli seleksiyon modeli kullanılarak insanlarda yapılan son dönem çalışmalarda, Poulton ve ark. tarafından bu sayı 1-5 olarak belirlenmiştir (14).

Bununla birlikte, Cao ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada, primordiyal germ hücrelerinde mtDNA kopya sayısında azalma olmadığı gösterilmiş; kuşaklar arasındaki mtDNA varyasyonunun, bazı mtDNA alt gruplarının oosit matürasyonu esnasında replike olurken, fonksiyon bozucu ciddi mutasyonlar taşıyan mtDNA'ların eliminasyona uğramasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (15).

mtDNA'nın genetiği oldukça karmaşıktır. Farklı mitokondriyal genlerdeki mutasyonlar aynı klinik tabloya sebep olabilir, aynı gendeki mutasyonlar farklı klinik bulgulara sebep olabilir, aynı mutasyonu farklı heteroplazmi derecesinde taşıyan bireyler farklı fenotiplere sahip olabilir (9).

Patolojik mtDNA mutasyonlarının İngiltere'deki prevalansı yaklaşık 1/8,000'dir. Sebebi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, mtDNA'daki delesyonlar, klinik olarak etkilenmiş anneden yavrularına aktarılmamaktadır. Bununla birlikte, heteroplazmik mtDNA nokta mutasyonları veya duplikasyonları taşıyan anneler, çocuklarına değişen derecelerde mutant mtDNA aktarırlar (16).

Mitokondriyal hastalıklara sebep olan mtDNA değişimleri şu şekilde sınıflandırılır (17):

1. Nokta mutasyonlar

- Protein kodlayan genlerdeki mutasyonlar
- rRNA mutasyonları
- tRNA mutasyonları

## 2. Yeniden düzenlenimler

- Parsiyel delesyonlar
- Parsiyel duplikasyonlar

### 2.4.2 Nükleer DNA

mtDNA, OXPHOS proteinlerinin yanı sıra, replikasyon, transkripsiyon, translasyon ve tamirde gerekli birçok proteinin sentezi için de nükleer DNA'ya bağımlıdır. Nükleer genomdaki mutasyonlar ya mtDNA çoğalma ve tamirini, ya da fonksiyonunu bozarak mitokondriyal hastalıklara yol açmaktadır.

OXPHOS sistemine ait 85 alt ünitenin 72'sinin nükleer DNA'da kodlanmasına karşın, bu genlerin mutasyonları nadir görülür. Bunun bir sebebi, söz konusu mutasyonların ileri derecede fonksiyon bozukluğuna neden olması ve etkilenen fetusların erken dönemde kaybedilmesi olabilir. Tanımlanan mutasyonlar genellikle yenidoğan ya da erken infansi döneminde klinik bulgu verseler de, hastalık bulguları geç dönemde ortaya çıkan nadir vakalar bildirilmiştir (3).

Nükleer DNA'da oluşan primer mutasyonlar; sekonder mtDNA kaybı (depleksiyon) veya mtDNA delesyonlarına yol açarak mitokondriyal hastalıklara neden olurlar. Bu nedenle söz konusu hastalıklar klinik olarak mtDNA bozukluklarıyla seyreder fakat otozomal kalıtım paternine uyarlar (18).

Etyolojide rol alan nükleer genler, iki kategoriye ayrılır (19) :

- I. Çoklu MtDNA delesyonlarına neden olan nükleer DNA mutasyonları
  - mtDNA polimeraz gama (POLG) mutasyonları
  - Adenin nükleotid translokator 1 (ANT1) mutasyonları
  - TWINKLE (PEO1) mutasyonları
- II. MtDNA depleksiyonuna neden olan nükleer DNA mutasyonları
  - Timidin kinaz mutasyonları
  - Deoksiguanozin kinaz (DGOUK) mutasyonları
  - Suksinil KoA sentetaz (SUCLA2) mutasyonları
  - MPV17 mutasyonu
  - p53 ile indüklenebilen ribonükleotid redüktaz (RMM2B) mutasyonu
  - POLG mutasyonları

**Tablo 2.** Mitokondriyal fonksiyonları düzenleyen nükleer genler (19)

| <b>Gen</b>     | <b>Hastalık</b>         | <b>Kromozomal lokus</b> | <b>Fonksiyon</b>                                         |
|----------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------|
| POLG           | PEO/Alpers/Ataksi       | 15q25                   | Mitokondriyal DNA polimeraz                              |
| POLG2          | PEO                     | 17q23-24                | Polimeraz gama aksesuar altünite                         |
| TWINKLE (PEO1) | PEO/Ataksi              | 10q24                   | Mitokondriyal DNA helikaz                                |
| ANT1           | PEO                     | 4q34-35                 | Adenin nükleotid translokator                            |
| TP (ECGF1)     | MNGIE                   | 22q13.32                | Timidin kurtarma                                         |
| DGUOK          | MtDNA deplesyonu        | 2p13                    | Deoksiguanozin kinaz                                     |
| TK2            | MtDNA deplesyonu        | 16q22                   | Mitokondriyal timidin kinaz                              |
| DNC            | Amish letal mikrosefali | 17q25.3                 | Deoksinükleotid taşıyıcı ( tiamin pirofosfat transportu) |
| MPV17          | MtDNA deplesyonu        | 2p21-23                 | Mitokondriyal iç membran proteini                        |
| SUCLA2         | MtDNA deplesyonu        | 13q12.2-q13.3           | Suksinat-KoA ligaz                                       |
| RRM2B          | MtDNA deplesyonu        | 8q23.1                  | Ribonükleotid redüktaz                                   |

## 2.5 Mitokondriyal Hastalıkların Klinik Sınıflaması

mtDNA'nın bazı kopyalarında mutasyon olması, her zaman hastalığın klinik olarak ortaya çıkmasına sebep olmaz. Örneğin; kan örneğinde belli bir mutasyonu, saptanabilir düzeyde taşıyan bir birey geç yaşlara kadar semptom vermeyebilir, aynı mutasyonu taşıyan bir başka birey ise yaşamın ilk birkaç yılında kaybedilebilir. Heteroplazmi sonucunda ortaya çıkan bu klinik farklılık, genetik danışma ve prenatal tanıyı zorlaştırmaktadır (20).

Bir doku veya organ oksidatif fosforilasyona ne kadar bağımlı ise, mitokondriyal hastalıklardan o kadar yüksek oranda etkilenmektedir. Hastalığın başlangıç yaşı, mutasyon oranına ve biyokimyasal defektin şiddetine bağlıdır (21).

Mitokondriyal hastalıklarda klinik belirti ve bulgular izole olarak, birlikte ya da herhangi bir evrede bulunabilir.

### I. Çocukluk Dönemindeki Bulgular:

- Nörolojik Bulgular: Epilepsi, miyopati, psikomotor gerilik, ataksi, spastisite, distoni, sensorinöral sağırılık
- Gastrointestinal Bulgular: Kusma, gelişme geriliği, disfaji
- Kardiyak Bulgular: Biventriküler hipertrofik kardiyomiyopati, ritim bozukluğu
- Respiratuar Bulgular: Santral hipoventilasyon, apne
- Hematolojik Bulgular: Anemi, pansitopeni
- Renal bulgular: Renal tübüler defektler
- Karaciğer yetmezliği
- Endokrin Bulgular: Diyabet, adrenal yetmezlik

- Optik atrofi

## II. Erişkin Dönemdeki Bulgular:

- Nörolojik bulgular: Migren, inme, epilepsi, demans, miyopati, periferel nöropati, diplopi, ataksi, uyku bozuklukları, sensorinöral sağırılık
  - Gastrointestinal Bulgular: Konstipasyon, irritabl barsak sendromu, disfaji
  - Kardiyak bulgular: Kalp yetmezliğı, kalp bloğı, kardiyomiyopati
  - Solunum sistemi bulguları: Solunum yetmezliğı, nokturnal hipoventilasyon, tekrarlayan aspirasyon, pnömoni
  - Endokrinolojik Bulgular: Diyabet, tiroid hastalığı, paratiroid hastalığı, ovaryan yetmezlik
  - Oftalmolojik bulgular: Optik atrofi, ptosis, katarakt, oftalmopleji
- Mitokondriyal solunum zinciri bozuklukları şu bulguların varlığında akla

gelmelidir:

- Kas-iskelet sistemine ait olan ve olmayan klinik bulguların bir arada görülmesi
- Hastalığın hızlı ve ilerleyici seyir göstermesi
- İlgisiz organ ve dokuların bir arada tutulumu

Bulgular herhangi bir yaşta başlayabilmekle birlikte, vakaların %35'inde yaşamın 1. ayında, %45 kadarında 1 ay- 2 yaş arasında, geri kalanların ise 2 yaş sonrasında hayatın herhangi bir döneminde bulgu verdiği bildirilmiştir. Başlangıç yaşı ve ilk bulgu ne olursa olsun, tipik özellik olarak tutulan doku ve organ sayısı giderek artar, santral sinir sistemi bulgularına geç dönemde de olsa rastlanır.

Solunum zinciri bozukluklarında belirti ve bulgular, bazı yaş gruplarında belirginlik göstermekle birlikte, vakaların çoğunda bulgular üst üste bindiği için sınıflama yapılamamaktadır (22).

## **2.6 Mitokondriyal Hastalıklarda Tedavi**

Mitokondriyal hastalıklarda şifa sağlayacak bir tedavi yöntemi yoktur, semptomlara yönelik verilen tedavi hastalığın seyrini iyileştiremez. Tedavi yaklaşımı, mitokondriyal membranları, serbest oksijen radikallerinin vereceği hasardan korumak ve kofaktör desteği sağlamaktır. Bu hastalarda, doku hasarını arttırabileceği için bazı ilaçların kullanımı sakıncalıdır. Örneğin, sodyum valproat ve barbitürat kullanımının, solunum zinciri bozukluğu olan hastalarda karaciğer hasarını arttırdığı gösterilmiştir. Tetrasiklin ve kloramfenikol gibi antibiyotikler, mitokondriyal protein sentezini bozacağı için kullanılmamalıdır. Kompleks I eksikliğinde riboflavin, kompleks III eksikliğinde Vitamin K3 veya Koenzim Q verilmesinin yararlı olduğu vakalar bildirilmiştir. Sekonder karnitin eksikliği düşünüldüğünde karnitin desteği verilebilir. Membranları oksidatif hasardan korumak için C vitamini kullanılabilir (23).

## **2.7 mtDNA İlişkili Hastalıkların Genetik Sınıflaması**

Mitokondriyal DNA hastalıkları oluş mekanizmasına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır (22):

- I. mtDNA'nın yeniden düzenlenmesine bağlı sendromlar

➤ Sporadik

- Kearns-Sayre Sendromu (KSS)
- Pearson Sendromu
- Sporadik kronik progresif eksternal oftalmopleji (CPEO)
- Diabet ve Sağırılık

➤ Maternal kalıtlı

- CPEO
- Multisistemik Sendromlar

II. mtDNA'daki nokta mutasyonlarına bağlı sendromlar

➤ Sporadik

- CPEO
- Mitokondriyal ensefalopati + laktik asidoz + inme benzeri epizodlar (MELAS)
- Egzersiz intoleransı
- İzole miyopati

➤ Maternal Kalıtlı

- Protein kodlayan genlerde nokta mutasyonu
  - Leber'in herediter optik nöropatisi (LHON)
  - Leigh Sendromu
  - Nöropati, ataksi, retinitis pigmentosa sendromu (NARP)

- tRNA kodlayan genlerde nokta mutasyonu
  - Myoklonik epilepsi+ ragged red fibers (MERRF)
  - Kardiyomiyopati + miyopati
  - MELAS
  - CPEO
  - İzole miyopati
  - Diabet ve sağırılık
  - Sensörinöral sağırılık
  - Hipertrofik kardiyomiyopati
  - Tübülopati
- rRNA kodlayan genlerde nokta mutasyonu
  - Hipertrofik kardiyomiyopati
  - Aminoglikozidlerin indüklediği sendromik olmayan sağırılık

## **2.8 Mitokondriyal Sendromlar**

### **2.8.1 Leigh Sendromu (Subakut nekrotizan ensefalopati)**

Leigh Sendromu, büyük oranda klinik ve genetik heterojenite gösteren, fokal ve bilateral simetrik beyin lezyonları ile karakterize progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalarda sıklıkla bazal gangliyon, serebellum,

diensefalon ve beyin sapındaki nekroz nedeniyle santral sinir sistemi fonksiyonlarında ilerleyici kayıp görülür.

Sık görülen klinik bulgular psikomotor gerileme, nöbetler, güçsüzlük, hipotoni, trunkal ataksi, intansiyonel tremor, nistagmus, oftalmoparezi, optik atrofi ve solunum yetmezliğidir. Bazı hastalarda periferik sinir sistemi tutulumu ya da diyabet, kardiyomiyopati ve anemi gibi nöron dışı tutulum bulguları da görülebilir. Beyin sapı tutulumu, solunum yetmezliği, disfaji, rekürren kusma ya da anormal termoregülasyona sebep olabilir. Hastalar genellikle yaşamın ilk yıllarında kaybedilir. Hastalık, otozomal resesif, X'e bağlı resesif ve mitokondriyal kalıtım gösterebilir. Kan ve BOS'ta laktat yüksekliği vardır. Beyin manyetik rezonans görüntülemeye (MRG) mezensefalon, medulla oblongata, serebellum ve bazal ganglionlarda simetrik tutulum görülür. Demyelinizasyon, gliosis, fokal kistik kavitasyon alanları nöropatolojik bulgular arasındadır (24, 25, 26, 27)

Leigh Sendromu, ATP6, tRNA (Leu), tRNA (Lys), tRNA (Try), tRNA (Val), ND1, ND3, ND4, ND5, ND6 veya COXIII genlerindeki mitokondriyal mutasyonlarla; daha yüksek oranda da solunum kompleksi alt ünitelerini ve translasyon faktörlerini kodlayan nükleer DNA mutasyonlarıyla oluşur. X'e bağlı ya da sporadik Leigh Sendromu, en sık piruvat dehidrojenaz kompleksinin E1-alfa alt ünitesini kodlayan PDHA1 geninin mutasyonlarıyla meydana gelir. Leigh Sendromunda görülen polinöropati, özellikle piruvat dehidrojenaz eksikliğine bağlı formda daha sık görülür (25).

### 2.8.2 Leber'in Herediter Optik Nöropatisi (LHON)

LHON, ilk kez 1871 yılında Alman oftalmolojist Theodor Leber tarafından tanımlanmıştır. LHON ile ilişkilendirilen ilk mtDNA mutasyonu 1988'de, Douglas Wallace ve arkadaşları tarafından, ETZ kompleks I'e ait bir polipeptidi kodlayan, NADH dehidrojenaz 4 (ND4) geninde tanımlanmıştır. O zamandan bu yana, beş farklı kompleks I mutasyonu daha tanımlanmıştır; ND1 (G3460A), ND4 (G11778A) ve ND6 (T14484C) mutasyonları tüm vakaların %90-95'inden sorumludur. Tüm patojenik mutasyonlar kompleks I'de ( NADH: ubikinon oksidoredüktaz) aminoasit değişimlerine neden olur. Tam olarak anlaşılmayan bir mekanizmayla, bu değişimler sonucu retinal gangliyon hücreleri ve bunların aksonlarında akut veya subakut kayıplar meydana gelir; optik sinirde oluşan bu hasar sonucu ağır santral görme kaybı veya körlük meydana gelir. Retinal gangliyon hücrelerindeki kayıp, mutasyon taşıyan erkeklerde %50 oranında görülürken kadınların yalnızca %10-15'inde görülür; bununla birlikte aynı mutasyonu taşıyan aileler arasında penetrans farklılığı görülebilir. Diğer mitokondriyal hastalıkların aksine, LHON sadece tek sistemi tutmaktadır, çoğu hastada retinal gangliyon hücrelerinin kaybı tek klinik bulgudur. Aynı mutasyonları taşıyan nadir vakalarda, optik atrofiye ek olarak distoni, multiple skleroz benzeri hastalık ya da serebellar ataksi tanımlanmıştır.

Hastalık her yaşta ortaya çıkabilmekle birlikte, çoğu zaman yaşamın ikinci veya üçüncü dekadındaki genç erkekler etkilenir. Genellikle her iki göz de tutulur; bazen iki gözdeki bulguların görülme zamanları arasında aylar hatta yıllar olabilir.

Hastalık hızla ilerleyerek ağır görme kaybına neden olur. Erken dönem oftalmolojik değişiklikler arasında; hiperemik optik diskler, diskte psödoödem ve mikroanjiyopati vardır, son dönemde optik disk atrofisi görülür.

Tanımlanan tüm LHON mutasyonları homoplazmiktir. En sık görülen üç mutasyon arasında, sadece G3460A mutasyonu NADH: ubikinon oksidoredüktaz aktivitesinde belirgin düşüğe neden olur. Bu sonuçların aksine, ND4 veya ND6'daki mutasyonları analiz eden çok sayıda çalışmada, enzim aktivitesinde düşüş saptanmamıştır. Diğer çalışmalarda, eğer istatistiksel analiz sigara içmeyen bireylerle sınırlandırılırsa, ND4 mutasyonu taşıyan hücrelerde kompleks I aktivitesinde hafif düşüş görülebildiği bildirilmiştir. Bu durum, çevresel etkenlerin mutasyonun orta dereceli etkilerini maskeleyebilecek kadar güçlü olabileceğini göstermektedir.

Mitokondriyal haplogrupların, mutasyon taşıyıcılarında LHON klinik bulgularının ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Haplogrup, belirli bir mtDNA polimorfizm grubunun birlikte taşınmasını ifade eder. T14484C ve G11778A mutasyonu taşıyan ailelerde, Haplotip J ekspresyonunun daha fazla görülmesi, bu haplogrubun sinerjistik bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Belirli haplogrupların, mitokondriyal genlerde düşük OXPHOS kapasitesi ile ilişki ek polimorfizmler taşıdığı, bunun da LHON ekspresyonunu arttırdığı düşünülebilir. Örneğin, alt haplotipler J2b ve Jc1, sırasıyla G11778A ve T14484C mutasyonlarının yüksek penetransıyla ilişkilidir. Bazı haplogrupların frekansı belirli etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle, belirli bir haplogrubun kliniğe yansımaları, belirli coğrafik bölgelere sınırlı olabilir.

Son yıllarda, nükleer genomdaki LHON yatkınlık genlerinin araştırılmasına yoğunlaşmıştır. Erkek primer mutasyon taşıyıcılarında, hastalığın daha fazla görülmesi nedeniyle, bir X kromozomal lokusun söz konusu olabileceği düşünülmüş, yapılan çalışmalarda birçok lokus tanımlanmıştır. 2010 yılında Tayland'da yapılan bir çalışmada, sadece X kromozomu üzerinde değil, ayrıca 1, 3, 12, 13 ve 18. kromozomlarda da ilişki lokuslar bulunmuştur. Bunlar arasında en olası bölge, 3q26.2 ve 3q28 arasındaki bölgedir. Bu bölgede OPA-1 ve PARL genleri bulunur. PARL geninin kodladığı PARL proteaz, apoptoz kontrolünde OPA-1 ile birlikte çalışır. Tayland pedigrilerinde; PARL genindeki iki tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism-SNP) LHON'la ilişkili bulunmuş, fakat Çin'de yapılan başka bir çalışmada; LHON grubu ile kontrol grubu arasında SNP frekansı açısından fark saptanmamıştır. Bu sonuç, belirli etnik gruplarda yatkınlık geni allellerinin heterojen dağılımının, hastalıkla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Sigara, alkol aşırı kullanımı, beslenme ve etambutol kullanımı gibi çevresel etkenlerin LHON gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, sadece yoğun sigara kullanımının mutasyon taşıyıcılarda hastalık gelişimiyle olan ilişkisi istatistiksel olarak doğrulanabilmiştir (28).

### **2.8.3 NARP (nöropati, ataksi, retinitis pigmentoza)**

Proksimal nörojenik kas güçsüzlüğü; aksonal nöropati, ataksi ve pigmenter retinopati bulgularıyla karakterizedir. Semptomların başlangıcı, özellikle ataksi ve

öğrenme güçlüğü, sıklıkla erken çocukluk döneminde başlar. NARP sendromlu bireyler yıllar boyu stabil kalabilir, sıklıkla viral hastalıklarla ilişkili olarak klinik bulgular dönemsel olarak ağırlaşır. MT-ATP6, NARP ile ilişkili bulunan tek gendir; en sık görülen mutasyon T8993G'dir ve sıklığı %50'den fazladır, ayrıca T8993T mutasyonu da tanımlanmıştır (29).

#### **2.8.4 Kearns- Sayre Sendromu (KSS)**

Kearns-Sayre Sendromu, 20 yaşından önce başlayan bir mitokondriyal hastalıktır. Pigmenter retinopati, serebellar sendrom, işitme kaybı ve progresif eksternal oftalmopleji (PEO) gibi bulgulara ek olarak, hastalarda boy kısalığı, diyabet ve kalp bloğu da görülebilir. Hastalığa sahip bireylerde kas biyopsisinde düzensiz kırmızı lifler görülür. Hastalıkta görülen kardiyopati, iletim bozukluğu şeklindedir; anterior hemiblok olarak başlayıp parsiyel ya da tam kalp bloğuna ilerleyebilir. Adolesan ve erişkin bireylerde, pankreas tutulumu ve diyabet oldukça sık görülür. Nadir vakalarda, KSS atipik bulgularla seyredebilir. 1990 yılında yayınlanan bir makalede, 5 yaşındaki bir erkek çocukta renal tübüler asidoz ve tetani bulgularını takiben klasik ilerleyici KSS gelişmiştir. Bu hastanın böbrek dokusunda yapılan incelemede, mtDNA'da 7.5 kilobazlık (kb) bir delesyon tespit edilmiş, bu da multisistemik mitokondriyal sitopatiyle uyumlu bulunmuştur. Aynı tip büyük boyutlu delesyon/ duplikasyonlar, erken infansi döneminde multisistemik tutulum bulgularıyla seyreden, ciddi ekzokrin pankreas yetmezliğine neden olan Pearson Sendromunda da görülür. Çocukluk veya

adolesan dönemine kadar yaşayan bireylerde KSS klinik bulguları gelişebilir (30, 31).

#### **2.8.5 MELAS (Miyopati, epilepsi, laktik asidoz, inme)**

Miyopati, ensefalopati, laktik asidoz ve inme benzeri ataklarla karakterize, progresif bir hastalıktır. Çocukluk ve genç erişkinlik döneminde bulgu verir, hastaların erken dönem gelişimi genellikle normaldir. Semptomlar arasında tekrarlayıcı kusma, migren benzeri baş ağrıları ve hemiparezi, kortikal körlük ve hemianopsiye neden olabilen inme benzeri ataklar vardır. Beyin MR’da damar dağılım bölgelerine uymayan infarkt alanları görülür. En sık saptanan mutasyon tRNA lösin genindeki A3243G mutasyonudur. Buna ek olarak, bazıları protein kodlayan genlerde olmak üzere başka mutasyonlar da tanımlanmıştır (32).

#### **2.8.6 MERRF (Myoklonik epilepsi, düzensiz kırmızı lifler)**

Myoklonik epilepsi, mitokondriyal miyopati ve ataksi ile karakterize bir sendromdur. Daha az sıklıkla demans, işitme kaybı, periferik nöropati ve multipl lipomlar eşlik edebilir. Mitokondriyal tRNA lizin genindeki üç mutasyon, A8344G, T8356C ve G8363A, MERRF ile ilişkilendirilmiştir (32).

### **2.8.7 Pearson Sendromu**

İnfant döneminde bulgu veren, nadir görülen, ekzokrin pankreas disfonksiyonu, sideroblastik anemi, pansitopeni, renal tübüler defektler ve laktik asidoz ile karakterize bir sendromdur. Hastalık, çocukluk döneminde ölüme neden olabilecek kadar ağır seyredebilir. Hayatta kalan hastalarda, ilerleyen dönemde KSS klinik bulguları gelişir. Bu çocukların tüm dokularında yüksek oranda büyük mtDNA delesyonları görülür (21, 33).

### **2.8.8 Alpers Sendromu**

İnfant ve erken çocukluk döneminde bulgu veren, diffüz progresif serebral atrofi ile karakterize bir mitokondriyal sendromdur. Serebral dejenerasyon özellikle serebral korteksi etkiler, daha az sıklıkta serebellar tutulum da görülür. 1931'de Alpers'in tanımladığı bu klinik özelliklere ek olarak, 1976'da Huttenlocher, bu hastalarda karaciğer disfonksiyonunun eşlik edebildiğine dikkat çekmiştir, karaciğer tutulumu her zaman görülmez. Sendromun karakteristik bulguları; ensefalopati, dirençli epilepsi, spastisite ve eşlik edebilen karaciğer disfonksiyonudur. mtDNA'daki POLG1 mutasyonları, Alpers Sendromu ile ilişkilendirilmiştir, bununla birlikte mitokondriyal tRNA treonin mutasyonları da sendromda tanımlanmıştır (33, 34).

### **2.8.9 Mitokondriyal Deplesyon Sendromları**

Mitokondriyal DNA deplesyon sendromu (MDS) genetik açıdan heterojen bir grup hastalığı tanımlar; hepsinde belirli dokularda mtDNA miktarında azalma söz konusudur. Çocukluk dönemi solunum zinciri hastalıklarının önemli bir bölümünü oluşturur. mtDNA deplesyonu ayrıca sekonder de olabilir, örneğin, antiretroviral tedavi sonucu iyatrojenik olarak oluşabilir; bu tür deplesyon durumları sıklıkla geçicidir ve tedavi kesildiğinde normale döner.

Timidin kinaz 2 (TK2), deoksiguanozin kinaz (DGUOK), MPV17, POLG1, TWINKLE, süksinil CoA ligaz alfa alt ünitesi (SUCLG1), süksinik CoA ligaz beta alt ünitesi (SUCLA2), RRM2B, timidin fosforilaz (TYMP) genlerindeki mutasyonlar sendroma neden olabilir.

Diğer solunum zinciri bozukluklarının aksine, MDS tek bir spesifik organ tutulumuyla seyredebilir. Bu durum; analiz örneği, etkilenen dokudan alınmadığında, moleküler tanıyı zorlaştırabilir. MDS, tutulum özelliğine göre miyopatik, ensefalomiyopatik ve hepatoserebral olarak sınıflandırılabilir da genellikle bulgular ilerleyici ve örtüşme eğilimindedir (35).

### **2.9 Mitokondri ve Yaşlanma**

Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin, yaşlanmada önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Mitokondri, enerji üretiminin yanı sıra, reaktif oksijen radikallerinin üretimi, sinyal iletimi, hücre siklusunun düzenlenmesi,

oksidatif stres, termogenez ve apoptozis gibi birçok hücrel aktivitede de rol almaktadır. Mitokondri fonksiyonundaki bozulmalar; total mitokondri volümünün azalması, oksidasyon kapasitesinde azalma, lipid ve proteinlerin oksidatif hasarı ile sonuçlanır. Oluşan biyokimyasal ve biyoenerjik değişimler, hücre dinamiklerinde bozulma ve mitokondrinin düzenlediği apoptoziste artışa neden olur. Bu değişimlerin, iskelet kası kalitesindeki bozulmanın yanı sıra ektopik lipid infiltrasyonu, sistemik inflamasyon ve insülin direnci gibi yaşlanmaya bağlı diğer patolojilerin altta yatan nedeni olabileceği düşünülmektedir. Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz gibi geç başlangıçlı nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de mitokondriyal disfonksiyonun rolü incelenmektedir. Bu nedenle, mitokondriyi oksidatif stresten koruyacak yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (32, 36, 37).

## **2.10 Mitokondriyal Hastalıklarda Tanı**

### **2.10.1 Laboratuvar Tanı**

Mitokondriyal hastalıkların, klinik bulgular ve biyokimyasal testlerin sonuçları açısından heterojen bir hastalık grubu olması nedeniyle, tanı için standardize edilmiş kriterlerin varlığına gereksinim duyulmuştur. İlk kez 1996 yılında erişkin hastalar için tanı kriterleri belirlenmiştir, daha sonra bu kriterler çocuklar için modifiye edilmiştir. Bu tanı kriterlerine göre; klinik, biyokimyasal, radyolojik ve histopatolojik olmak üzere dört ana grupta sınıflanan bulgular puanlanarak, vakalar toplam puana göre mitokondriyal hastalık için düşük olasılıklı, mümkün,

muhtemel ve kesin şekilde sınıflandırılmıştır. Söz konusu tanı kriterleri ve puanlama Ek 1’de sunulmuştur (39).

OXPHOS bozukluklarında, mitokondri ve sitoplazma içinde indirgeyici ekivalanların konsantrasyonu artar, bunun sonucunda sitrik asit döngüsü fonksiyonel olarak baskılanır. Bu döngünün baskılanmasıyla, Asetil CoA üretiminin ketogenez yoluyla sağlanması ihtiyacı doğar. Bu da kandaki keton cisimlerinin miktarının artmasına neden olur. Bununla birlikte, ortamdaki insülin varlığı nedeniyle, tokluk durumunda kan keton cisimlerinin düzeyi düşüktür. Bu nedenle, solunum zinciri bozukluğu olan bireylerde, keton cisimleri düzeyinin değerlendirilmesi, beslenmeden bir saat önce veya sonra yapılmalıdır.

Persistan hiperlaktatemi, yüksek laktat/piruvat oranı ve keton cisimlerinin fazlalığı solunum zinciri bozukluğunu düşündüren bulgulardır.

Solunum zinciri bozukluklarında, kesin tanının konulabilmesi için tutulan dokularda inceleme yapılabilir. İskelet kası ve karaciğer biyopsisi, lenfosit ve lökositlerde solunum zinciri komponentlerinin aktivitelerinin değerlendirilmesi uygun olabilir. Solunum zinciri bozukluklarının karakteristik histopatolojik özelliği anormal mitokondrilerin periferik ya da intermyofibriller birikimini gösteren düzensiz kırmızı liflerdir, bununla birlikte bu bulgunun olmaması, mitokondriyal hastalığı ekarte ettirmez (23).

## **2.10.2 Moleküler Tanı**

Mitokondriyal hastalıkların moleküler tanısında izlenen algoritma, klinik değerlendirmeyi takiben metabolik inceleme ve görüntüleme çalışmaları ile başlamaktadır. Bu değerlendirmelerin sonuçlarına göre, mitokondriyal hastalık

düşünüldüğü taktirde, sık görülen mtDNA mutasyonları ve mtDNA delesyonlarının taranması ilk basamağı oluşturur.

mtDNA nokta mutasyonları çok sayıda mutasyon saptama metodu ile değerlendirilebilir; bunlar arasında PZR/restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP), PZR/ allel spesifik oligonükleotid (ASO) dot blot analizi, real time PZR , allel refraktör mutasyon sistemi (ARMS) veya direkt dizileme yer alır. Bu yöntemler arasında multipleks PZR/ASO dot blot metodu, en uygun maliyetli testtir, çünkü tüm sık görülen mutasyonların eş zamanlı analizine olanak sağlar ve heteroplazmiyi saptama hassasiyeti %0.5 kadar düşüktür. ARMS kantitatif PZR (qPZR) analizi ise gerçek zamanlı tek basamakla gerçekleşen bir analizdir ve heteroplazmiyi saptama hassasiyeti %0.1'dir. mtDNA'nın büyük delesyonları için genellikle Southern Blot analizi kullanılır. Çoğu patojenik mtDNA mutasyonu heteroplazmik olduğu için, heteroplazminin kantifikasyonu hastalık ekspresyonu ile korelasyon kurulması açısından önem taşır. Geleneksel uygulamada, PZR /RFLP analizi sonrası “foto görüntüleme” tekniği, heteroplazmi seviyelerinin tayini için kullanılmaktadır. Fakat bu teknikte radyoaktif materyalin kullanımı ve kantifikasyonun her zaman güvenilir olmaması, tekniğin dezavantajlarıdır. Bu nedenle ARMS qPZR tekniği geliştirilmiştir. Bilinen mutasyonların araştırılmasında mitokondriyal genom dizi analizinin kullanımı, mutasyon saptama oranlarını belirgin ölçüde arttırmıştır.

Mitokondriyal hastalıklara yol açan nükleer genom defektlerinin saptanmasında, genellikle aday genlerin PZR ile amplifikasyonunu takiben Sanger dizi analizi kullanılmaktadır. Dizilenecek aday genler genellikle hastanın klinik

bulguları ve biyokimyasal değerdendirmesi sonucu seçilir. Fakat mitokondriyal hastalıklarda söz konusu olan, klinik ve genetik heterojenite nedeniyle bu seçimi yapmak zordur. Bu nedenle mtDNA kopya sayısını veya solunum zinciri komplekslerinin aktivitesini hızla değerdendirebilen moleküler ve biyokimyasal yöntemler faydalı olabilmektedir. Örneğin, radyoaktif proplar kullanılan southern blot analizini takiben otoradyogramın dansitometrik analizi ile mtDNA içeriğı değerdendirilebilir. Fakat bu zor bir metoddur ve büyük miktarda DNA gerektirir. Bu sebeple, gerçek zamanlı qPZR (RT qPZR) analizleri geliştirilmiştir. Bu teknikle etkilenen dokulardaki, örneğin; karaciğer ve kas dokusundaki, mtDNA miktarı hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. mtDNA depleasyonu saptandığı takdirde, klinik bulgulara bakılarak sorumlu olduğu düşünölen nükleer genler seçilerek dizi analizi ile değerdendirilebilir. Artmış mtDNA içeriğinin saptanması, mitokondriyal disfonksiyon sonucu kompensatuar mtDNA amplifikasyonunu düşöndürür; bu durum mitokondriyal tRNA genlerinde nokta mutasyonlar veya mtDNA delesyonlarında gözlenmiştir (40, 41).

Mitokondriyal genomun analizinde güncel teknikler, mutasyon tespitinde yüksek çıktılı moleküler tekniklerin kullanılabilirliği ile sınırlıdır. Otomatize kapiller dizileyciler veya denatüre edici yüksek performanslı likid kromatografi (DHPLC) gibi hassas ve hızlı tekniklerin varlığına rağmen, 16.5 kb uzunluğundaki mtDNA'nın rutin çalışmalarda dizilenmesi zordur. Son yıllarda, mikroarray yöntemleri, mitokondriyal hastalıkların tanısında kullanılmaya başlanmıştır (42).

### 2.10.2.1 Mikroarray teknolojisi

Mikroarray teknolojisi temel olarak; DNA parçacıklarından oluşan bir matriks üzerine, hasta DNA'sının hibridize edilmesi esasına dayanmaktadır. Günümüzde tüm genomu taramak ve submikroskopik değişimleri (delesyon ve duplikasyonlar) saptamak için array tabanlı sistemler sıklıkla kullanılmaktadır. Array tabanlı sistemler ayrıca; hastalıklara sebep olan veya yatkınlık oluşturan genlerin tespitinde, mutasyon analizlerinde, meme ve kolorektal kanserler ile lenfomalar başta olmak üzere kanser araştırmalarında, yapısal kromozomal anomalilerde etkilenen lokusun tespitinde, mikrodelsyon sendromlarının tanısında, telomerik anomalilerin bulunmasında, SNP ve CNV taramalarında, genotiplendirmede ve posttranslasyonel modifikasyonların tayininde oldukça faydalı bir yöntem olarak kullanılmaktadırlar. DNA mikroarrayleri; gen ekspresyon analizlerinde, gen fonksiyonlarının anlaşılmasında, eksprese olmayan genlerin saptanmasında, yeniden dizilemede (resequencing) ve yeni gen tespitinde büyük katkı sağlamaktadır (43, 44).

1996'da Chee ve ark. standart fotolitografi ve solid faz sentezleme ile sentezlenmiş oligonükleotid probolar kullanarak ilk mitokondriyal dizileme mikroarray yöntemini geliştirmiştir. Bununla birlikte, çip hibridizasyonu için genomik DNA'nın in vitro transkripsiyonu ile RNA eldesinin gerekliliği, çip üzerine hedef mitokondri dizisinin yalnızca tek zincirinin yerleştirilebilmesi ve analizde kullanılmak üzere etkin yazılımın olmaması bu platformun kısıtlayıcı özellikleridir. Bu sebeple 2004 yılında, ilk dizaynın geliştirilmesiyle, ikinci

jenerasyon yeniden dizileme mikroarray platformu olan Mitochip Human Mitochondrial Resequencing Array 2.0 tasarlanmıştır (42).

Yeniden sekanslama tekniği, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının taranması, çeşitli kanser serilerinde TP53 geninin dizilenmesi gibi araştırmalarda kullanılmıştır (44, 45).

Mitochip, çift zincirli mtDNA'nın 29,366 bç'lik bölümünü dizileyebilir, chip hibridizasyonu için 980 bç'lik plazmid DNA dizisi kontrol olarak kullanılır. 16 kb'lık tüm kodlayan bölge tek bir seferde array'e yüklenebilir. Yöntemde, sadece 300 ng DNA'ya ihtiyaç duyulması, sadece 48 saatte sonuç verebilmesi, tekrarlayan uygulamalarda tutarlılık oranının %99.99 olması, heteroplazmiyi saptayabilmesi gibi özellikleri bu yöntemi mitokondriyal hastalıkların tanısında oldukça avantajlı hale getirmektedir (42, 46).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışmaya, Gazi Üniversitesi Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nöroloji bölümünde 2010-2012 yılları arasında değerlendirilerek klinik bulgularla mitokondriyal hastalık düşünülen 6 olgu ve anneleri dahil edilmiştir. Hasta seçiminde kullanılan tanı kriterleri EK-1’de sunulmuştur.

BAP Projesi no 01/2011-54 olan çalışmamızın Etik Kurul onayı, 29 Eylül 2010 tarihli Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’ndan 135 karar numarasıyla alınmıştır.

#### **3.1 DNA Eldesi İçin Gerekli Malzemeler**

- Otoklavlanmış bidistile su (Applichem®)
- Proteinaz K (20 mg/ml) (Applichem®)
- Lysis buffer (10 mM TrisCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH: 8.2) (Applichem®)
- SDS (sodyumdodesil sülfat) (Merck®)
- Amonyum asetat (Merck®)
- Absolü etanol (Riedel-De Haen®)
- TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH=7.5) (Applichem®)

#### **3.2 Yüksek Tuz Konsantrasyonlu DNA İzolasyon Yöntemi**

1. 5 ml. Kan 15 ml.lik steril tüpe alınır ve üzerine 15 ml’ye tamamlayacak şekilde önceden hazırlanmış otoklavlanmış soğuk bidistile su konur.

2. 2-3 dk. Hızlı olarak karıştırılır (aşağı yukarı çalkalayarak)
3. 2,200 rpm'de 10 dak. santrifüj edilir.
4. Süpernatant atılıp pelletin üzerine tekrar soğuk su ilave edilip santrifüj yapılır.
5. Arkasından yıkama işlemi 3 kez daha tekrarlanır. En son yıkama sonrasında tüpler bir kağıt havlunun üzerine ters çevrilerek süzülmesi sağlanır.
6. Süzüldükten sonra tekrar çevrilerek üzerine 35µl Proteinaz K (20 mg/ml), 1,500 µl lysis buffer, 100 µl SDS konur. Hafif hafif köpürtmeden alt üst edilerek çalkalanır
7. Bir gece 37 °C de bekletilir veya 55 °C'de 3.5 saat tutulur
8. 1,000 µl Amonyum asetat eklenir.20 kez aşağı yukarı hızla karıştırılır.10 dakika oda ısısında bırakılır.
9. 3,500 rpm de 15 dakika santrifüj edilir.
10. Üzerindeki süpernatant bir başka 15 ml'lik tüpe aktarılır.
11. Tüpün içindekinin iki katı kadar absöü etanol konur.
12. Hafif karıştırılır içindeki DNA belirginleşir.
13. DNA alınarak önceden içersine 250µl TE konan ependorflara pipet ucuyla konur.
14. 1 gün oda sıcaklığında bekletilip çözünmesi sağlanır. Çözündükten sonra - 20°C'de saklanır.

### **3.3 Mitokondri DNA'sı Mikroarray Dizileme Protokolü:**

#### **3.3.1 Genomik DNA Eldesi:**

Degrade olmamak koşulu ile herhangi bir yöntem ile elde edilebilir. Konsantrasyonu Nanodrop aleti ile ölçülür ve bütünlüğü 0.75% agaroz jelde doğrulanır.

#### **3.3.2 Long Range PZR:**

Bu yöntemle, teorik olarak 40 KB, pratikte ise genellikle 15 KB ye kadar PZR reaksiyonu yapılabilir. Mitokondriyal DNA'yı çoğaltmak için, uygun primerler ve TAKARA Long Range PZR Kit kullanılır. PZR reaksiyonu 0.75% agaroz jelde kontrol edilir.

#### Long-Range PZR protokolü:

1. PZR Primerlerinin Hazırlanması: Liyofilize haldeki primerler 100 pmol stok solüsyon halinde uygun miktarlarda nuclease-free su kullanılarak sulandırılır.

Primerler aşağıda verilmiştir:

#### Primer 1

F-5'-ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCC-3'

R-5'-ATTGCTAGGGTGGCGCTTCCAATTAGGTGC-3'

#### Primer 2

F-5'-TCATTTTATTGCCACAACCTCCTCGGACTC-3'

R-5'-CGTGATGTCTTATTTAAGGGGAACGTGTGGGCTAT-3'

2. Her bir PZR reaksiyonu için başlangıç materyali 50 ng/ $\mu$ L gDNA olmalıdır.
3. Buz üzerinde her bir PZR reaksiyonu için dNTP karışımı, 10X LA PZR Buffer II ve TaKaRa LA Taq polimeraz kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanır. Primer çifti ve DNA ile birlikte toplam reaksiyon hacmi 25  $\mu$ L olur.
4. Amplikon uzunluğuna uygun olarak PZR programı hazırlanarak reaksiyon başlatılır.

#### PZR Programı (Primer 1 için)

|      |          |     |
|------|----------|-----|
| 94°C | 2 dk     | 1X  |
| 94°C | 15 sn    | 30X |
| 68°C | 9.30 dk  |     |
| 68°C | 14.30 dk | 1X  |
| 4°C  | $\infty$ |     |

#### PZR Programı (Primer 2 için)

|      |          |     |
|------|----------|-----|
| 94°C | 2dk      | 1X  |
| 94°C | 15 sn    | 30X |
| 68°C | 8 dk     |     |
| 68°C | 13 dk    | 1X  |
| 4°C  | $\infty$ |     |

5. Reaksiyon sonunda elde edilen iki ayrı amplikon 1% TBE agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilir.

### 3.3.3 PZR Pürifikasyonu

1. Amplikonların pürifikasyonu için 96-well PZR clean-up plate kullanılır.
2. Vakum manifoldun vakum pompası ile bağlantısı ayarlanır.
3. Yıkama ve elüsyon için nuclease-free water kullanılır.
4. Yaklaşık 22 µL amplikon filtre içine çekildikten sonra iki kez 50 µL nuclease-free water ile yıkama işlemi yapılır.
5. Son olarak yine 50 µL su konulur ve 1000 rpm de shaker da elüsyonu sağlanır.
6. Her işlem 600-800 mbar vakum kuvvetinde 15 dk yapılır.

### 3.3.4 PZR ürünlerinin miktar tayini ve birleştirilmesi

1. Pürifiye edilen amplikonların konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçülür.
2. Alınacak sonuçlara göre hesaplamalar yapılır ve her iki amplikondan da eşit miktarda (pmol) olacak şekilde tek bir tüpte çalışmaya devam edilir.

#### Primer 1 amplikonu için yapılan hesaplama:

M1: 9307 bp

$$9307 \times 0,0363 \text{ (sabit sayı)} = 337.844\text{ng}$$

337.844 ng / Nanofotometrede ölçülen miktar = Birleştirilmesi gereken miktar (µL)

#### Primer 2 amplikonu için yapılan hesaplama:

M2: 7814 bp

$$7814 \times 0,0363 \text{ (sabit sayı)} = 283.648 \text{ ng}$$

283.648ng / Nanofotometrede ölçülen miktar = Birleştirilmesi gereken miktar  
( $\mu\text{L}$ )

3. Son hacim 23  $\mu\text{L}$ 'ye nuclease-free water ile tamamlanır

### 3.3.5 Fragmantasyon

1. Fragmentation Reagent uygun miktarda nuclease-free water ile sulandırılır ve 2.15  $\mu\text{L}$  Fragmentation Buffer ile birlikte örnek üzerine eklenir. Toplam reaksiyon miktarı 26.95 $\mu\text{L}$  olacak şekilde ayarlanır.
2. PZR programında reaksiyon gerçekleştirilir.

#### PZR Programı

|      |          |
|------|----------|
| 37°C | 5 dk     |
| 95°C | 15 dk    |
| 4°C  | $\infty$ |

3. İşaretleme basamağına geçilmeden fragmentlerine ayrılmış olan örnek (20-200bp) %4'lük TBE Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilir
4. Örnek bekletilmeden diğer basamağa geçilir.

### 3.3.6 İşaretleme

1. Uygun miktarlarda Labeling Reagent, TdT Buffer ve TdT kullanılarak reaksiyon için bir karışım hazırlanır ve örnek üzerine eklenir.
2. PZR programında reaksiyon gerçekleştirilir.

#### PZR Programı

|      |          |
|------|----------|
| 37°C | 2 saat   |
| 95°C | 15 dk    |
| 4°C  | $\infty$ |

### 3.3.7 Hibridizasyon

1. Arrayler oda sıcaklığına gelirken, gerekli malzemelerden uygun miktarlarda kullanılarak pre-hibridizasyon ve hibridizasyon karışımı hazırlanır.
  - Pre-Hybridization karışımı; Tris-HCl 1M pH 7,8 (1 µL), Tween-20 (1 µL), Nuclease-free water (98 µL), toplam 100 µL olacak şekilde hazırlanır
  - Hybridization karışımı ise TMAcI (5M) (62.4 µL), Tris-HCl 1M pH7,8(1 µL), Tween-20(1 µL), BSA (50mg/mL) (1 µL), HS DNA (10mg/mL) (1 µL), OCR(0.8 µL), Nuclease-free water (8.3 µL) toplam 72 µL olacak şekilde hazırlanır
2. İşaretlenmiş örnek üzerine hibridizasyon kokteyli eklenir ve PZR programında inkübasyona bırakılır.

#### PZR Programı

|      |      |
|------|------|
| 95°C | 5 dk |
| 49°C | 5 dk |
| 49°C | ∞    |

3. PZR programı bitinceye kadar arrayler içine, hazırlanan pre-hibridizasyon karışımı enjekte edilir ve fırında tutulur (49°C-60 rpm-15dk).
4. Hibridizasyon reaksiyonu bittiğinde arraylerin içinden pre-hibridizasyon karışımı boşaltılıp yerine denaturasyonu tamamlanmış örnek enjekte edilir ve 16-18 saat 49°C sıcaklıkta 60 rpm rotasyonla inkübasyona bırakılır.



**Şekil 2:** Mitochip görüntüsü

### **3.3.8 Yıkama-Boyama-Tarama**

Hibridizasyon tamamlanmadan önce gerekli malzemelerden uygun miktarlarda alınarak yıkama ve boyama solüsyonları hazırlanır.

1. Yıkama istasyonunda birinci ve ikinci boyama solüsyonları için hazırlanan Stain Bufferdan 495  $\mu$ L ilk tüpe ve 495  $\mu$ L ikinci tüpe konulur, 5 $\mu$ L SAPE ve 5  $\mu$ L Antibody eklenir. Son tüpe de 1x Array Holding Bufferdan 800  $\mu$ L konulur.
2. Yıkama İstasyonunun uygun yerlerine bu solüsyonlar ve array yerleştirilir ve bilgisayar kontrolündeki yıkama-boyama protokolü başlatılır.



Şekil 3: Yıkama İstasyonu

3. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra yine sistem bilgisayarı kontrolünde tarama işlemi yapılır ve elde edilecek veriler analiz programı (GSEQ 4.1) yardımıyla bilgisayarda değerlendirilir.



Şekil 4: Mitochip'in tarayıcıya yerleştirilmesi

### 3.4 Değerlendirme

Mitokondriyal DNA’da saptanan yanlış anlamlı mutasyonların polimorfizm/ mutasyon ayırımını yapmak için kuralsal (canonical) kriterler kullanılır (48). Bu kriterlere göre bir yanlış anlamlı mutasyonu patojenik olarak kabul etmek için başlıca 4 kriter gereklidir:

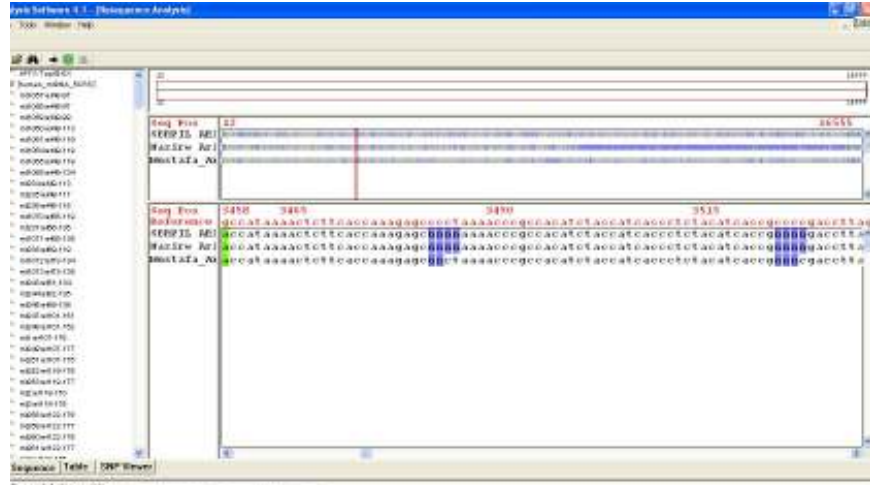
1. Mutasyonun bilinen nötral polimorfizmlerden biri olmaması
2. Mutasyondan etkilenen bölgenin evrimsel süreçte değişmeden korunan ve fonksiyonel olarak önemli bir bölgeyi etkilemesi
3. Mutasyonun heteroplazmi göstermesi (Bildirilen birkaç homoplazmik mutasyon dışında patojenik mutasyonlar genellikle heteroplazmiktir)
4. Farklı aile bireylerinde gözlenen heteroplazmi oranının hastalığın ağırlığıyla ilişki göstermesi

Bu kriterlere ek olarak, Mitchell ve ark. bir yanlış anlamlı mutasyonun patojenik olarak kabul edilmesi için fonksiyonel kriterler de belirlemiştir. Bunlar; mutasyon sonucu dokularda ölçülebilir bir biyokimyasal defekt olması ve histokimyasal olarak anormal kas biyopsi örneklerinde, sitoplazmik hibrid hücreler veya tek kas lif PZR analizleri kullanılarak patojenitenin gösterilmesidir (48).

Yeniden dizileme analizi sonucu elde edilen ham veriler (.cel uzantılı dosyalar), GeneChip® Sequence Analysis Software (GSEQ) yazılımı kullanılarak

incelenebilir dosya formatına (.chp uzantılı dosyalar) dönüştürülmüş, revize edilmiş Cambridge dizisi ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir (Şekil 5).

Analizler sonucu saptanan değişiklikler, Mitoweb online veri tabanı (www.mitoweb.org) ile karşılaştırılarak polimorfizm veya mutasyon olarak değerlendirilmiştir (49).



Şekil 5: Olgu 4 ve ailesine ait GSEQ analiz görüntüsü

### 3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Enzimi ile Kesim

Çalışma kapsamında olgu 4’de polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve kesilen parçanın uzunluk polimorfizm (RFLP; Restriction fragment length polymorphism) yöntemi kullanılmıştır.

#### 3.5.1 Primer Dizisi ve PZR Reaksiyon Şartları

mtDNA’daki, G3460 bölgesindeki yanlış anlamlı mutasyonu belirlemek için

İleri primer 5' – ATGGCCAACCTCCTACTCCT- 3'

Geri primer 5' – GCGGTGATGTAGAGGGTGAT -3' primer çifti kullanıldı.

Bu reaksiyonlar için; PZR tüpünde son hacim 25 µl olup içeriği şu şekildedir: her primerden 0.5 µl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl, PZR tamponu 2.5 µl, Taq DNA polimeraz (5 U / 50 µl) 0.3µl, DNA 5 µl (250 ng), 13.7µl distile su.

Bu PZR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı.

|                           |                 |              |
|---------------------------|-----------------|--------------|
| Başlangıç Denatürasyonu ; | 94 °C' de 5 dk  | (1 Döngü)    |
| Denatürasyon aşaması;     | 94 °C' de 30 sn | ] (30 Döngü) |
| Hibridizasyon aşaması;    | 60 °C' de 30 sn |              |
| Sentez (Uzama) aşaması;   | 72 °C' de 30 sn |              |
| Son sentez aşaması;       | 72 °C' de 5 dk  | (1 Döngü)    |

PZR için hazırlanan karışım 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Bu şekilde elde edilen tepkime karışımı otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tüm PZR'larda negatif kontrol olarak DNA içermeyen steril su kullanıldı.

### 3.5.2 Çoğaltılmış DNA'nın Elektroforezde Değerlendirilmesi

PZR sonucu oluşan DNA'yı yürütmek için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 10 µl PZR ürünü 2 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 90 voltta 90 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Ultraviyole lamba altında PZR'da kullanılan primer çiftlerine göre oluşan DNA bantları incelendi ve 215 b.ç.'lik bir ürün elde edildi.

### 3.5.3 PZR Ürününün Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

mtDNA G3460A yanlış anlamlı mutasyon analizini tanımlamak için BsaHI restriksiyon enzimi kullanıldı. BsaHI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir:

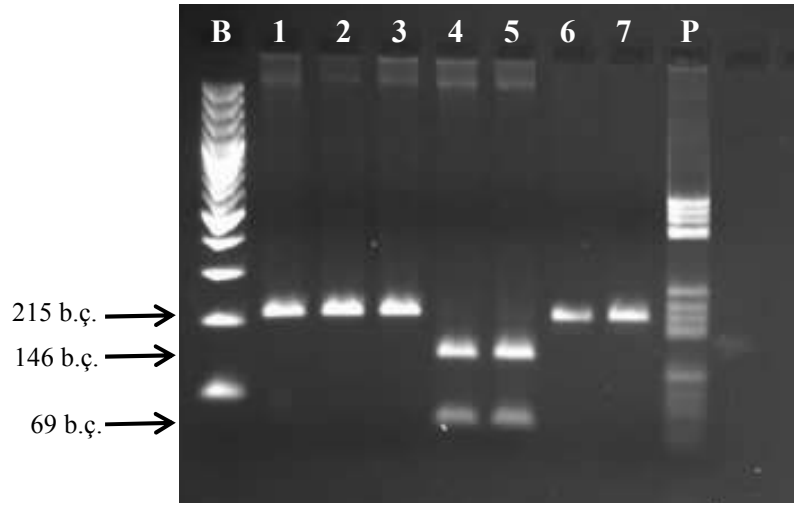


Deneyin Yapılışı: 0.2 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PZR ürünü, 1.6 µl tampon, 10 ünite BsaHI restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 37°C'lik etüvde bir gece (16 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 8 µl kesim ürünü ile 3 µl Bromfenol mavisi ile karıştırılarak %3'lük agaroz jele yüklendi. %3'lik agaroz jelde PBR322 moleküler ağırlık belirteci ve enzim kesimi yapılmamış PZR ürünü eşliğinde 120 dakika 120 V sabit akımda yürütülüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekildi.

### 3.5.4 mtDNA G3460A yanlış anlamlı mutasyonunun değerlendirilmesi

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZR sonrasında 215 b.ç. uzunluğunda bir amplifikasyon ürünü elde edildi. PZR ürünü BsaHI restriksiyon

enzimi ile kesildi. 146 ve 69 b.ç. lik iki adet bant görüldüğünde G alleli, kesim olmadığında ise (215 b.ç.) A alleli olarak isimlendirildi. Agaroz jelde elde edilen bantlar şekil 6’da gösterilmiştir.



**Şekil 6:** Olgu4 ve ailesine ait PZR örneklerinin BsaHI restriksiyon enzimi ile kesim sonrası görüntüsü

B: 50 b.ç.lik belirteç, 1: Olgu 4, 2: kız kardeş, 3: anne, 4-5: kontrol, 6-7: kesilmemiş ürün, P:PBR322 belirteci

Bu analiz sonucu, Olgu 4’ün, ve klinik bulgusu olmayan anne ve kızkardeşinin G3460A mutasyonunu homoplazmik mutant olarak taşıdığı gösterilmiştir.

## 4. BULGULAR

MitoChip Resequencing Array ile çalışmanın analizleri yapılmış, elde edilen veri GSEQ 4.1 veri analiz programı kullanılarak değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar her bir olgu için ayrı ayrı sunulmuştur.

Saptanan tüm yanlış anlamlı mutasyonlar homoplazmik olarak bulunmuştur.

### 4.1 Olgu 1

9 aylık kız hasta, polikliniğimize hipotoni, kas güçsüzlüğü ve emme güçlüğü nedeniyle yönlendirildi. Alınan öyküsünde, prenatal dönemde oligohidramnios olduğu öğrenildi. Yenidoğan döneminde yapılan işitme testinin normal olduğu öğrenildi. Rutin metabolik tarama testleri ve tiroid fonksiyon testleri normaldi. Ekokardiyografide patent foramen ovale (PFO) vardı. Dış merkezde yapılan transfontanel ultrasonografi (USG) ve üriner USG tetkikleri normaldi. Kas enzimleri normaldi. Beyin manyetik rezonans görüntülemesinde (MRG) hemisferik kortikal sulkusların frontal ve temporal lob anteriorunda bir miktar belirgin olduğu, myelinizasyonun tamamlanmamış olup yaşıyla uyumlu olduğu tespit edildi.

Manyetik rezonans spektroskopide (MRS) minimal lipit ve laktat pikleri gözlemlendi, bu görüntünün ilerleyen aylar boyunca sabit kalmasının nörometabolik hastalıklar açısından anlamlı olabileceği öğrenildi.

Hasta, mitokondriyal hastalık skorlama sistemine göre 2 puan almıştır (39).

**Tablo 3.** Olgu 1’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar

| <b>Yanlış anlamlı mutasyon</b> | <b>Olgu 1</b> | <b>Anne 1</b> | <b>Lokus</b> | <b>Polimorfizm/ Mutasyon</b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|--------------|------------------------------|
| A73G                           | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A153G                          | +             | +             | D-LOOP       | Pol                          |
| T195C                          | +             | -             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| G225A                          | +             | -             | D-LOOP       | Pol                          |
| T226C                          | +             | -             | D-LOOP       | Pol                          |
| A263G                          | +             | -             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A750G                          | +             | -             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A1438G                         | +             | -             | MT-RNR1      | Pol                          |
| G1719A                         | +             | -             | MT-RNR2      | Pol                          |
| G3705A                         | +             | -             | MT-ND1       | Pol                          |
| A4769G                         | +             | +             | MT-ND2       | Pol                          |
| C6371T                         | +             | +             | MT-CO1       | Pol                          |
| C7028T                         | +             | +             | MT-CO1       | Pol                          |
| C8393T                         | +             | +             | MT-ATP8      | Pol                          |
| A8860G                         | +             | +             | MT-ATP6      | Pol                          |
| G11377A                        | +             | -             | MT-ND4       | Pol                          |
| G11719A                        | +             | -             | MT-ND4       | Pol                          |
| G12406A                        | +             | -             | MT-ND5       | Pol                          |
| C12705T                        | +             | -             | MT-ND5       | <b>Pol/Mut</b>               |
| G13708A                        | +             | -             | MT-ND5       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A13966G                        | +             | -             | MT-ND5       | Pol                          |
| T14470C                        | +             | -             | MT-ND6       | Pol                          |
| C14766T                        | +             | -             | MT-CYB       | Pol                          |
| A15326G                        | +             | -             | MT-CYB       | Pol                          |
| G15927A                        | +             | +             | MT-TT        | <b>Pol/Mut</b>               |
| T16189C                        | +             | -             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| C16223T                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| C16278T                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| T16519C                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |

Pol: Polimorfizm; Mut: Mutasyon

Olgu 1’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlardan;

A153G, G225A, T226C, A750G, A1438G, G1719A, G3705A, A4769G, C6371T, C7028T, C8393T, A8860G, G11377A, G11719A, G12406A, A13966G,

T14470C, C14766T, A15326G, değişimleri polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

A73G, T195C, A263G, C12705T, G13708A, G15927A, T16189C, C16223T, C16278T, T16519C değişimleri polimorfizm olmasına rağmen literatürde hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

#### **4.2 Olgu 2**

Kas güçsüzlüğü ve emmede zayıflığı olan hasta, ilk kez 4 aylıkken Sağlık Ocağında rutin kontrolü esnasında görmediği fark edilerek, LHON ön tanısıyla bölümümüze yönlendirildi. Rutin metabolik testleri normal bulunan hastanın görsel uyarılmış potansiyel (VEP) testinde bilateral yanıt alınamadı. Hasta mitokondriyal skorlama sistemine göre 2 puan almıştır (39).

Olgu 2’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlardan;

A750G, T1119C, A1438G, A2706G, A4769G, A5441G, T6221C, C7028T, A8860G, A11252G, G11719A, A13629G, C14766T, A15326G, G15346A, T15941C, değişimleri polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

A73G, C150T, T195C, T204C, A263G, T961C, C3497T, A10398G ve T16217C değişimleri polimorfizm olmasına rağmen literatürde hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

**Tablo 4.** Olgu 2’de saptanan yanlış anlamli mutasyonlar

| <b>Yanlış Anlamli Mutasyon</b> | <b>Olgu 2</b> | <b>Anne 2</b> | <b>Lokus</b> | <b>Polimorfizm/ Mutasyon</b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|--------------|------------------------------|
| A73G                           | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| C150T                          | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| T195C                          | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| T204C                          | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A263G                          | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| T279C                          | +             | +             | D-LOOP       | Pol                          |
| A750G                          | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| T961C                          | +             | +             | MT-RNR1      | <b>Pol/Mut</b>               |
| T1119C                         | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A1438G                         | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A2706G                         | +             | +             | MT-RNR2      | Pol                          |
| C3497T                         | +             | +             | MT-RNR2      | <b>Pol/Mut</b>               |
| A4769G                         | +             | +             | MT-ND2       | Pol                          |
| A5441G                         | +             | +             | MT-ND2       | Pol                          |
| T6221C                         | +             | +             | MT-CO1       | Pol                          |
| C7028T                         | +             | +             | MT-CO1       | Pol                          |
| A8860G                         | +             | +             | MT-ATP6      | Pol                          |
| A10398G                        | +             | +             | MT-ND3       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A11252G                        | +             | +             | MT-ND4       | Pol                          |
| G11719A                        | +             | +             | MT-ND4       | Pol                          |
| A13629G                        | +             | +             | MT-ND5       | Pol                          |
| C14766T                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| A15326G                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| G15346A                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| T15941C                        | +             | +             | MT-TT        | Pol                          |
| T16217C                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |

### 4.3 Olgu 3

5 yaş 3 aylık erkek hastanın, 4.5 yaşına kadar gelişimi normal olan ancak, 4.5 yaşında yürümede dengesizlik şikayetinin başlaması, bunu izleyen 6 ay sonrasında başını dik tutamamaya, desteksiz oturamamaya başlaması nedeniyle polikliniğimize yönlendirildi. Kranial MRG’de serebellum ve bazal ganglionlarda intensite artışı, her iki globus pallidus ve krus serebride tutulum saptandı; bulgular mitokondriyal ensefalomyelopatik hastalıklar ile uyumlu bulundu. MRS’de her iki globus pallidusta T2A ve FLAIR sekansta hiperintens simetrik sinyal değişikliği,

spektroskopide artmış laktat piki, ılımlı serebral atrofik değişiklikler saptandı; bulgular mitokondriyal metabolik hastalık ile uyumlu bulundu. Metabolik tarama testleri normaldi. Yapılan EKO, göz muayenesi ve abdominal USG normal sınırlardaydı. Çekilen EEG’de hemisferler arası asimetri izlenmedi; bilateral temporoparietalde 2 Hzlik yavaş dalgalar izlendi. Dış merkezde yapılan kas biyopsisinde oksidaz enzim boyaları ile (NADH, SDH, COX) liflerinde yer yer düzensiz boyanma saptandı. Dış merkezde yapılan işitme testinde sağ kulak, hastanın kasılmaları nedeniyle değerlendirilemedi, sol tarafta kısmi işitme kaybı saptandı. Hastaya mitokondriyal sitopati ön tanısıyla medikal tedavi başlandı. Hasta mevcut bulgularıyla, mitokondriyal skorlama sisteminden 6 puan almıştır (39).

**Tablo 5.** Olgu 3’te saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar

| Yanlış Anlamlı Mutasyon | Olgu 3 | Anne 3 | Lokus   | Polimorfizm/ Mutasyon |
|-------------------------|--------|--------|---------|-----------------------|
| T152C                   | +      | +      | D-LOOP  | Pol                   |
| A263G                   | +      | +      | D-LOOP  | <b>Pol / Mut</b>      |
| A750G                   | +      | +      | MT-RNR1 | Pol                   |
| A1438G                  | +      | +      | MT-RNR1 | Pol                   |
| C2380T                  | +      | +      | MT-RNR2 | Pol                   |
| A2706G                  | +      | +      | MT-RNR2 | Pol                   |
| A4769G                  | +      | +      | MT-ND2  | Pol                   |
| C7028T                  | +      | +      | MT-CO1  | Pol                   |
| T7094C                  | +      | +      | MT-CO1  | Pol                   |
| G7805A                  | +      | +      | MT-CO2  | Pol                   |
| A8860G                  | +      | +      | MT-ATP6 | Pol                   |
| T9797C                  | +      | +      | MT-CO3  | Pol                   |
| A15326G                 | +      | +      | MT-CYB  | Pol                   |
| T15670C                 | +      | +      | MT-CYB  | Pol                   |
| G16129A                 | +      | +      | D-LOOP  | Pol                   |

Olgu 3’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlardan A263G, polimorfizm olmasına rağmen literatürde çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

#### 4.4 Olgu 4

İlk kez 15 yaşındayken, her iki gözde görme azlığı fark edilen hasta polikliniğimize yönlendirildi. Önce sağ gözde, 1 ay sonrasında sol gözde görme azlığı başladığı ve giderek ilerlediği öğrenildi. Göz muayenesinde her iki optik disk sınırları silik bulundu. Kranial MRG normal olarak değerlendirildi. Annesinin babaannesinde 15 yaşında bilateral görme kaybı öyküsü olduğu öğrenildi. Hasta mevcut bulgularıyla değerlendirilmiş, mitokondriyal hastalık skorlama sistemine göre 2 puan almıştır (39).

**Tablo 6.** Olgu 4’te saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar

| Yanlış Anlamlı Mutasyon | Olgu 4 | Anne 4 | Lokus   | Polimorfizm/ Mutasyon |
|-------------------------|--------|--------|---------|-----------------------|
| C64T                    | +      | -      | D-LOOP  | Pol                   |
| T152C                   | +      | +      | D-LOOP  | Pol                   |
| A263G                   | +      | +      | D-LOOP  | <b>Pol/Mut</b>        |
| A750G                   | +      | +      | MT-RNR1 | Pol                   |
| A827G                   | +      | +      | MT-RNR1 | Pol                   |
| A1438G                  | +      | +      | MT-RNR1 | Pol                   |
| T2442C                  | +      | +      | MT-RNR2 | Pol                   |
| A2706G                  | +      | +      | MT-RNR2 | Pol                   |
| G3460A                  | +      | +      | MT-ND1  | <b>Mut</b>            |
| T3847C                  | +      | +      | MT-ND1  | Pol                   |
| A4769G                  | +      | +      | MT-ND2  | Pol                   |
| C7028T                  | +      | +      | MT-CO1  | Pol                   |
| A8674G                  | +      | +      | MT-ATP6 | Pol                   |
| A8860G                  | +      | +      | MT-ATP6 | Pol                   |
| C13188T                 | +      | +      | MT-ND5  | Pol                   |
| A13731G                 | +      | +      | MT-ND5  | Pol                   |
| C14766T                 | +      | +      | MT-CYB  | Pol                   |
| A15326G                 | +      | +      | MT-CYB  | Pol                   |
| G15930A                 | +      | +      | MT-TT   | Pol                   |
| T16126C                 | +      | +      | D-LOOP  | Pol                   |
| T16519C                 | +      | +      | D-LOOP  | Pol                   |

Olgu 4’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlardan;

C64T, T152C, A750G, A827G, A1438G, T2442C, A2706G, T3847C, A4769G, C7028T, A8674G, A8860G, C13188T, A13731G, C14766T, A15326G, G15930A, T16126C, T16519C değişimleri polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

G3460A patojenik mutasyon olarak kabul edilmiştir.

A263G, polimorfizm olmasına rağmen literatürde hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

Olgu 4’te, kız kardeşi ve annesinde mikroarray tekrar dizileme yöntemi ile saptanmış olan mtDNA’daki G3460A yanlış anlamlı mutasyonu PZR-RFLP yöntemi ile doğrulanmıştır.

Bu analiz sonucu, Olgu 4’ün, ve klinik bulgusu olmayan anne ve kızkardeşinin G3460A mutasyonunu homoplazmik mutant olarak taşıdığı gösterilmiştir (şekil 6).

#### 4.5 Olgu 5

3 yaşında kız hasta, 8 aylık olana dek herhangi bir şikayeti olmaması, 8 aylıkken çığlık atma, kollarda bacaklarda sıçrayıcı tarzda kasılmalar ve bilinç kaybının eşlik ettiği nöbetlerin başlaması üzerine polikliniğimize yönlendirildi. Antiepileptik tedaviye rağmen nöbetlerinin devam ettiği öğrenildi. Kas güçsüzlüğünün yanı sıra, gelişim basamaklarının yaşıtlarına göre geriden takip ettiği, destekli oturmasının 9 aylıkken, desteksiz oturmasının 10 aylıkken, yürümesinin 17 aylıkken, konuşmasının 2 yaşındayken başladığı öğrenilen hasta, değerlendirme esnasında halen cümle kuramıyordu. Fizik muayenede karaciğer kot altı 5 cm palpe edilebiliyordu. Yapılan metabolik tarama testlerinde idrarda

laktik asit, 3 hidroksi bütirik asit ve asetoasetik asit atılımı artmış olarak bulundu. Kan piruvat düzeyi normal, laktat düzeyi yüksek saptandı. BOS laktat düzeyi normal bulundu. Kranial MRG ve MRS normal olarak değerlendirildi. Hasta, mitokondriyal hastalık skorumda 5 puan almıştır (39).

**Tablo 7.** Olgu 5’te saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar

| <b>Yanlış Anlamlı Mutasyon</b> | <b>Olgu 5</b> | <b>Anne 5</b> | <b>Lokus</b> | <b>Polimorfizm/ Mutasyon</b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|--------------|------------------------------|
| A73G                           | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A263G                          | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A512G                          | +             | +             | D-LOOP       | Pol                          |
| G709A                          | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A750G                          | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A1438G                         | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| G1888A                         | +             | +             | MT-RNR2      | Pol                          |
| A2706G                         | +             | +             | MT-RNR2      | Pol                          |
| A4026G                         | +             | +             | MT-ND1       | Pol                          |
| T4216C                         | +             | +             | MT-ND1       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A4769G                         | +             | +             | MT-ND2       | Pol                          |
| A4917G                         | +             | +             | MT-ND2       | <b>Pol/Mut</b>               |
| C7028T                         | +             | +             | MT-CO1       | Pol                          |
| G8697A                         | +             | +             | MT-ATP6      | <b>Pol/Mut</b>               |
| A8860G                         | +             | +             | MT-ATP6      | Pol                          |
| T10463C                        | +             | +             | MT-TR        | <b>Pol/Mut</b>               |
| A11251G                        | +             | +             | MT-ND4       | Pol                          |
| C11623T                        | +             | +             | MT-ND4       | Pol                          |
| G11719A                        | +             | -             | MT-ND4       | Pol                          |
| C12633A                        | +             | -             | MT-ND5       | Pol                          |
| A12634G                        | +             | -             | MT-ND5       | <b>Pol/Mut</b>               |
| G13368A                        | +             | +             | MT-ND5       | Pol                          |
| T14034C                        | +             | +             | MT-ND5       | Pol                          |
| C14766T                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| G14905A                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| A15326G                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| C15452A                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| A15607G                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| G15928A                        | +             | +             | MT-TT        | <b>Pol/Mut</b>               |
| T16126C                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| A16163G                        | +             | +             | D-LOOP       | Pol                          |
| C16186T                        | +             | +             | D-LOOP       | Pol                          |
| G16274A                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| C16294T                        | +             | -             | D-LOOP       | Pol                          |
| T16519C                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |

Olgu 5’de saptanan yanlış anlamlı mutasyonlardan;

A512G, G709A, A750G, A1438G, G1888A, A2706G, A4026G, A4769G, C7028T, A8860G, A11251G, C11623T, G11719A, C12633A, G13368A, T14034C, C14766T, G14905A, A15326G, C15452A, A15607G, A16163G, C16186T, C16294T değişimleri polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

A73G, A263G, T4216C, A4917G, G8697A, T10463C, A12634G, G15928A, T16126C, G16274A, T16519C değişimleri polimorfizm olmasına rağmen literatürde hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

#### 4.6 Olgu 6

13 yaşında kız hasta; ilk kez 1.5 yaşında bir kez atonik nöbet geğirmesi üzerine çekilen EEG’de bozukluk saptanması üzerine antiepileptik ilaç başlanarak takibe alındı. Yürümesinin 2 yaşında geğirdiği bilateral doğumsal kalça çıkığı operasyonundan sonra başladığı ve yürümenin başlamasından itibaren ataksik yürüyüşü olduğu öğrenildi. Konuşmaya 2 yaşında başlayan hastanın, başlangıçtan itibaren heceleri uzatarak, kekeleyerek konuştuğu öğrenildi. Nörolojik muayenede derin tendon refleksleri alt ekstremitelerde hiperaktif ve patolojik refleksler alınıyordu. Yapılan laboratuvar incelemelerinde kan laktat ve piruvat düzeyi normal bulunurken, BOS laktat düzeyi yüksek bulundu. Psikometrik değerlendirme sonucunda hasta “hafif mental retarde” olarak değerlendirildi. Kraniyal MRG’de solda belirgin olmak üzere her iki globus pallidus lokalizasyonunda silik patolojik sinyal artım alanları saptandı. MRS normal olarak değerlendirildi. EMG’de duyu ve motor liflerde demyelinizan ağırlıklı mikst tip

nöropati düşünülüp, iğne EMG bulguları miyopati lehine yorumlandı. Hasta, mitokondriyal hastalık skorelama sistemine göre 5 puan almıştır (39).

**Tablo 8.** Olgu 6’da saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar

| <b>Yanlış Anlamlı Mutasyon</b> | <b>Olgu 6</b> | <b>Anne 6</b> | <b>Lokus</b> | <b>Polimorfizm/ Mutasyon</b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|--------------|------------------------------|
| A263G                          | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |
| T480C                          | +             | +             | D-LOOP       | Pol                          |
| A750G                          | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A1438G                         | +             | +             | MT-RNR1      | Pol                          |
| A2706G                         | +             | +             | MT-RNR2      | Pol                          |
| G4655A                         | +             | +             | MT-ND2       | Pol                          |
| A4769G                         | +             | +             | MT-ND2       | Pol                          |
| C7028T                         | +             | +             | MT-CO1       | Pol                          |
| A8860G                         | +             | +             | MT-ATP6      | Pol                          |
| G12192A                        | +             | +             | MT-TH        | <b>Pol/Mut</b>               |
| T15115C                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| A15326G                        | +             | +             | MT-CYB       | Pol                          |
| T16311C                        | +             | +             | D-LOOP       | <b>Pol/Mut</b>               |

Olgu 6’da saptanan yanlış anlamlı mutasyonlardan;

T480C, A750G, A1438G, A2706G, G4655A, A4769G, C7028T, A8860G, T15115C, A15326G, değişimleri polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

A263G, G12192A, T16311C polimorfizm olmasına rağmen literatürde hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada, tanısal kriterlere göre mitokondriyal hastalık düşünülen 6 çocuk ve sağlıklı annelerine ait DNA örnekleri, MitoChip Resequencing Array (Affymetrix®) ile mitokondriyal DNA polimorfizmleri açısından incelenmiştir. Saptanan yanlış anlamlı mutasyonlar literatürdeki bilgilerle karşılaştırılarak, bir kısmı benign varyasyon, bir kısmı patojenik mutasyon olarak kabul edilmiş; bir kısmı da benign varyasyon olmakla birlikte literatürde çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

Mitokondriyal DNA'daki patojenik mutasyonların, etkilenen bireyler arasındaki sıklığı 1/5,000 'den fazladır. Bunun yanı sıra, genel popülasyonda da bu mutasyonlara sık rastlanmakta, fakat yaşam boyu penetransı taşıyıcılar arasında farklılık göstermektedir. Sıklıkla pediatrik hasta grubunda mtDNA mutasyonlarının tanısı için hedef mutasyon analizleri yapılmakta, bu yaklaşım hedeflenen bölge dışındaki mutasyonları göstermeyeceğinden gerçek prevalansı yansıtmamaktadır. mtDNA Sanger dizi analizi yöntemiyle kolaylıkla dizilenebilse de, total mtDNA moleküllerinin nispeten küçük bir bölümünü etkileyen mutasyonları saptamada yetersiz kalabilmektedir. Çünkü, heteroplazmi durumunda, özellikle DNA örneği kandan elde edildiği takdirde, mutant mtDNA yüzdesi Sanger yöntemiyle tespit edilemeyen sınırlarda olabilir.

Son birkaç yıl içerisinde, yeni jenerasyon dizileme teknikleri umut vaat etmektedir. Bu yeni platformlar, yüzlerce genin eş zamanlı dizilenmesine ve mutasyon analizinin daha ucuza mal edilmesine olanak sağlar (50).

Mikroarray tabanlı dizileme yöntemi, bir çip üzerine yerleştirilerek immobilize edilen kısa oligonükleotid problemlerle, dizilenmesi istenen hedef bölgenin hibridizasyonu esasına dayanır. Hibridizasyon sonrası elde edilen paternin incelenmesiyle istenen bölgenin baz dizisi belirlenmiş olur.

Mitokondriyal çipler, tüm mitokondriyal genomun incelenmesine ve olası patojenik mitokondriyal varyantların tespitine olanak sağlar. mtDNA'ya bağlı sağırılık ilişkili yeni homoplazmik mutasyonların tespit edilmesinde güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (51). Bu çipler, aynı zamanda mitokondriyal dizi varyasyonlarını yüksek bir doğruluk oranında göstermede kullanılan yüksek çıktılı bir yöntemdir. Diğer taraftan hastalıklarla ilişkili somatik mutasyonların tespitinde ve adli tıp alanında da sıkça kullanılmaktadır. Heteroplazminin tespitinde konvansiyonel dizilemeye göre daha hassas bir yöntem olmasının yanısıra popülasyon çalışmalarında haplogrupların sınıflandırılmasında da kullanıldığı bildirilmiştir. Maliyet/yarar açısından bakıldığında dizilemeyle kıyaslandığında, çip analizinin daha ucuz ve konvansiyonel yöntemlere göre daha hassas olduğu belirtilmiştir. Çip sistemlerindeki çalışmalar için az miktarda DNA (300 ng) gerekmesi ve kısa sürede sonuç vermesi büyük önem taşımaktadır (52, 53, 54).

Mitochip, standart polilitografi ve solid faz DNA sentezi ile oluşturulmuş bir mtDNA yeniden dizileme çipidir. Affymetrix Mitochip v2.0 sisteminde, insan mtDNA genomundaki 16,569 nükleotidi kapsayan 25 baz çifti uzunluğunda yaklaşık 300,000 prob kullanılır, çip hibridizasyonunda kontrol amacıyla 980 baz çifti uzunluğunda plazmid DNA'sı kullanılır. mtDNA üzerindeki her bir nükleotid

pozisyonu için 4 oligonükleotid prob kullanılır, bunlar sadece 13. bazlarında farklılık gösterir (51, 52).

İncelenmek istenen DNA örneği, PZR ile amplifie edilmesinin ardından, 200 baz çifti uzunluğunda fragmanlara ayrılır ve hibridizasyon için çipe eklenir. Hibridizasyon sonucu elde edilen floresan sinyal özel tarayıcı sistemlerle analiz edilir. Tarayıcı ile, tüm pozisyonlardaki floresan sinyal yoğunluğu değerlendirilerek genotip belirlenir. Elde edilen diziler, referans mtDNA dizisi olan revize edilmiş Cambridge referans dizisi ( rCRS) ile karşılaştırılarak mtDNA varyantları tanımlanır (55).

Mitochip metodunun klasik dizilemeye göre en büyük avantajları çalışma süresinin kısa ve maliyetin daha düşük olmasıdır. Buna ek olarak, özellikle normal ve mutant dokunun bir arada bulunduğu örneklerde, mikroarray yöntemiyle mutant allel oranı %1 iken bile saptanabilirken, klasik dizileme yönteminde mozaik örneklerde mutant allelin saptanabilmesi için en az %30 oranında bulunması gerekmektedir (56).

Mitochip'in en önemli dezavantajlarından biri insersiyon ve delesyonların bu yöntemle saptanamamasıdır (52).

Olgu 1, Olgu 2 ve Olgu 5 'de saptanan A73G yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın D-loop bölgesinde bulunmaktadır. Polimorfizm olmasına rağmen literatürde çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Çeşitli tümör dokularında yapılan bir çalışmada mide kanseri dokusunda, diğer tümör dokularına kıyasla A73G mutasyonu sıklığı %30 daha fazla bulunmuştur (57). Alzheimer hastalığı olan bireylerde yapılan bir çalışmada hastaların beyin dokularında mitokondriyal

mutasyonların sıklığı incelenmiş, A73G mutasyonu 4 hasta bireyde ve 3 sağlıklı kontrolde saptanmıştır (58). Prostat tümörü dokusunun incelendiği bir çalışmada, 16 hastadan 2'sinin tümör dokusunda, 1 benign prostat hiperplazisi dokusunda ve 1 olası preinvaziv lezyonda A73G mutasyonuna rastlanmıştır (59).

Olgu 1 ve 2'de saptanan T195C yanlış anlamlı mutasyonu, mtDNA'nın D-loop bölgesinde bulunmaktadır. Bu değişim, ABD'de yapılan bir çalışmada bipolar bozukluk ile ilişkilendirilmiştir (60). Portekiz'den bildirilen bir başka çalışmada tiroid kanserli hastalarda mtDNA mutasyonları araştırılmış, bir hastada söz konusu mutasyona rastlanmıştır (61).

Tüm olgularda saptanan A263G yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın D-loop bölgesinde bulunmaktadır. Meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada, kanserli bireylerde kontrol grubuna kıyasla A263G mutasyonunun insidansı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (62).

Olgu 1'de saptanan C12705T yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın MT-ND5 lokusunda bulunur. Portekiz'den bildirilen bir çalışmada, prostat kanseri dokuları incelenmiş, bir hastada söz konusu mutasyona rastlanmıştır (63). Hastamızda böyle bir bulgu yoktur.

Olgu 1'de saptanan G13708A yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın MT-ND5 geninde bulunur. Bu mutasyon, mitokondriyal haplogrup J ile ilişkili bir varyanttır ve bu haplogrup Kuzey İtalya toplumundaki erkeklerde uzun yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir (64). ABD'de yürütülen çok merkezli bir çalışmada haplogrup J'nin Parkinson hastalığı olan bireylerde daha az görüldüğü bildirilmiş, hastalığa karşı koruyucu etkisi olabileceği öne sürülmüştür (65). G13708A

mutasyonu daha önce LHON'lu ailelerde gösterilmiş ve primer mutasyonlarla sinerjistik etki gösteren bir sekonder mutasyon olduğu bildirilmiştir (66, 67). Avrupa toplumunda yapılan bir başka çalışmada, multipl sklerozlu bireylerde mtDNA polimorfizmleri araştırılmış, G13708A polimorfizmi artmış multipl skleroz riski ile ilişkilendirilmiştir (68).

Olgu 1'de saptanan G15927A yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın MT-TT lokusunda bulunur. Çin'de yapılan bir çalışmada, G15927A mutasyonunun, ototoksisiteye bağlı sağırlıkla ilişkili A1555G mutasyonunun ekspresivite ve penetransı üzerinde potansiyel düzenleyici etkisi olduğunu öne sürmüştür (69).

Olgu 1'de saptanan T16189C yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın D-loop bölgesinde yer alır. Çin'de Han popülasyonunda yapılan bir çalışmada 72 tip 2 diabetli hasta ve 50 kontrol dahil edilmiş; Tip 2 diabetli bireylerde T3394C, G4491A, T16519C ile birlikte T16189C frekansının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır (70). Güney Kore'de yürütülen çok merkezli bir çalışmaya 5 Asya ülkesinden tip 2 diyabetli hastalar dahil edilmiş, çalışma sonucunda T16189C varyantı artmış Tip 2 diyabet riski ile ilişkilendirilmiştir (71). Çin'de yürütülen bir başka çalışmada, T16189C polimorfizminin endometrial kanser dokusunda normal dokuya kıyasla anlamlı oranda artmış olduğunu göstermiş; bu varyantın endometrial kanserle ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (72). İngiltere'de yapılan bir çalışmada, T16189C polimorfizmi ile erişkin yaşamda başlayan insülin direnci ve artmış açlık insülini arasında ilişki bulunmuştur (73). İtalya'dan bildirilen bir çalışmada, T16189C'nin artmış metabolik sendrom riski ile ilişkisi gösterilmiştir (74). 2011 yılında Türkiye'de

yapılan bir çalışmada ise T16189C allelinin metabolik sendrom ve Tip 2 diabetle ilişkisi gösterilememiş, fakat düşük LDL düzeyi ve baskılanmış kortizol düzeyiyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (75). Avusturya’da yapılan bir çalışmada, Orta Avrupa popülasyonunda T16189C polimorfizminin koroner arter hastalığı ile ilişkisi araştırılmıştır. Koroner arter hastalığı olan bireylerde kontrol grubuna göre T16189C polimorfizmi frekansı daha yüksek bulunmuştur; benzer şekilde Tip 2 diabetli hastalarda da kontrol grubuna göre daha sık görülmüştür; bu bulgular sonucunda bu polimorfizmin koroner arter hastalığı ve diyabet patogenezinde, mitokondriyal fonksiyonları bozarak etki gösterebileceğini öne sürmüştür (76). Avusturya’da yapılan bir başka çalışmada, malign melanomlu bireyler kontrol grubuna kıyasla A16183C, T16189C, C16192T, C16270T, T195C polimorfizmlerinin frekansı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (77).

Olgu 1’de saptanan C16223T yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA’nın D-loop bölgesindedir. Çeşitli tümör dokularındaki somatik mtDNA mutasyonları incelenmiş, kanserli dokularda bu polimorfizme de rastlandığı bildirilmiştir (78).

Olgu 1’de saptanan C16278T yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA’nın D-loop bölgesinde yer alır. Avusturalya’da yapılan, over karsinomlarında mtDNA mutasyonlarının incelendiği bir çalışmada, bazı karsinom örneklerinde bu mutasyona da rastlanmış, D-loop bölgesindeki 3 kb’lık bir bölgenin over karsinomları için kritik bir bölge olabileceği öne sürülmüştür (79).

Olgu 1 ve Olgu 5’te saptanan T16519C yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA’nın D-loop bölgesinde yer alır. Çin’de yapılan, gastrik karsinomlarda mtDNA mutasyonlarının incelendiği bir çalışmada, 1 hastada söz konusu

mutasyonun varlığı tespit edilmiştir; çalışmaya dahil edilen karsinomlarda tespit edilen mutasyonların %48'inin D-loop bölgesinde bulunduğu belirtilmiş, bu durum daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (80). Polonya'da yapılan bir başka çalışmada over kanserlerinde mtDNA mutasyonları incelenmiş, incelenen olguların 3'ünde söz konusu yanlış anlamlı mutasyon tespit edilmiştir (81).

Olgu 2'de saptanan C150T yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın D-loop bölgesinde yer almaktadır. Bu değişimin sıklığı; Çin'de yapılan serviks kanseri ile ilgili bir çalışmada, HPV pozitif bireylerde HPV negatif bireylere göre artmış olarak bulunmuş, HPV enfeksiyonu zemininde gelişen servikal kanser riski ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (82).

Olgu 2'de saptanan T204C yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA'nın D-loop bölgesinde yer almaktadır. Betel bitkisinin yaprağını çiğneyen, oral kanserli vakalarda yapılan bir incelemede bir hastada söz konusu mutasyon tespit edilmiştir (83).

Olgu 2'de saptanan T961C yanlış anlamlı mutasyonu MT-RNR1 genindedir. Çin toplumunda T961C mutasyonu insidansı, aminoglikozidle indüklenen işitme kaybı vakalarında %1,7; nonsendromik işitme kaybı vakalarında %4,4 bulunmuştur (84).

Olgu 2'de saptanan C3497T yanlış anlamlı mutasyonu MT-RNR2 genindedir. Bu mutasyon, LHON'a sebep olan sekonder mutasyonlardan biridir ve primer mutasyon taşıyıcısı bireylerde hastalık başlangıcını hızlandırdığı düşünülmektedir. Hastamızda, LHON'a sebep olduğu bilinen primer

mutasyonlardan hiçbirini bulunmamaktadır. Hastamızdaki görme kaybının sebebi C3497T mutasyonu olabileceği düşünülmektedir (85).

Olgu 2’de saptanan A10398G yanlış anlamlı mutasyonu MT-ND3 genindedir. Çin toplumunda yapılan bir çalışmada, A10398G polimorfizminin varlığı, metabolik sendrom açısından yüksek riskli bulunmuştur (86). Çin’de, Han popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada A10398G polimorfizminin Tip 2 diyabet patogenezinin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (70). A10398G polimorfizmi Avrupa-Amerika kökenli kadınlarda artmış meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (87). ABD’de yürütülen çok merkezli bir çalışmada, A10398G allelinin Parkinson hastalığı açısından koruyucu etkisi olabileceği öne sürülmüş, etkilerinin aydınlatılması için ileri çalışmaların gerekliliği vurgulanmıştır (65).

Olgu 2’de saptanan T16217C yanlış anlamlı mutasyonu mtDNA’nın D-loop bölgesindedir. Primer prostat kanseri olgularında mtDNA mutasyonlarının incelendiği bir çalışmada bir vakada söz konusu mutasyon bildirilmiştir (59).

Olgu 4’te saptanan G3460A mutasyonu MT-ND1 geninde lokalizedir ve LHON’dan sorumlu üç primer mutasyondan biridir. Dünyadaki tüm LHON hastalarının %95’inde 11778, 3460 veya 14484. nükleotidlerdeki mutasyonlardan biri bulunmaktadır (88). Bu mutasyonların insidansları yaklaşık olarak; G11778A mutasyonu için %70, G3460A mutasyonu için %15, ve T14484C mutasyonu için %10’dur. Bu üç major primer patojenik mutasyonun yokluğu durumunda LHON gelişebilmesi için çok sayıda sekonder mutasyonun varlığı gerektiği öne sürülmüştür. Heteroplazmi, sekonder genomik veya mitokondriyal faktörler ve çevresel etkenler hastalık gelişimini etkileyebilmektedir (89).

Bugüne kadar yaklaşık 25 mtDNA varyantı LHON ile ilişkilendirilmiş ve primer ve sekonder mutasyonlar olarak adlandırılmıştır. 3460A, 11778A ve 14484C mutasyonları primer mutasyonlar olarak adlandırılır; LHON için kesin risk faktörleridir ve birtakım ortak özelliklere sahiptir. Kompleks I polipeptid yapısını değiştirerek kısmi bir Kompleks I yetersizliğine neden olurlar. Birçok LHON ailesinde, çok sayıda bireyde saptanmışlar fakat kontrol mtDNA örneklerinde saptanmamışlardır. Bu mutasyonlar genellikle aynı bireyde bir arada bulunmazlar. Homoplazmik ya da heteroplazmik olabilirler. 14459A ve 14495G mutasyonlar gibi diğer primer varyantlar da LHON ailelerinde gösterilmiş fakat nadir görülürler. Sekonder mutasyonların LHON'daki etkileri tartışmalıdır, bazı çalışmalarda bağlantı saptanmamıştır. 4216C ve 13708A gibi polimorfizmler LHON'lu hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha sık görülür ve büyük olasılıkla LHON ekspresyonuna katkıda bulunan predispozan etkenlerdir (90).

Hastalığın tipik klinik bulgusu ani, ağrısız, subakut veya akut görme kaybıdır. Oftalmoskopik incelemede peripapiller telenjiyektazi, mikroanjyopati, optik diskte şişme ve vasküler tortuosite görülebilir. Bununla birlikte fundus anomalileri her vakada görülmeyebilir; 14484 ve 3460 mutasyonlarını taşıyan bireylerde daha sıktır. 14484 mutasyonu taşıyan bireyler en iyi prognoza sahiptir. Yine, görme kaybının 20 yaştan önce başlaması iyi prognoza işaret eder (88, 91).

G3460A mutasyonu taşıyan bireylerde görme fonksiyonunun geri kazanılma oranı, 11778 mutasyonunu taşıyanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada, alkol ve tütün kullanımı prevalansı, G3460A mutasyonunu taşıyan bireylerde 11778 mutasyonunu taşıyanlara göre daha yüksek bulunmuş;

alkol ve tütün kullanımının hastalık seyrini kötü etkileyebilecek bir faktör olduğu öne sürülmüştür (92). Daha sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada, sigara kullanımının hastalık gelişimi ile anlamlı ilişkisi bulunamamıştır. Ağır sigara içicilerinde hastalık gelişme ihtimalinin arttığı öne sürülmüş fakat alkol kullanımı ile hastalığın ilişkisi hakkında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (93).

3460. nükleotiddeki yanlış anlamlı mutasyon sonucu 52. aminoasid olan alanin treonin ile yer değiştirmektedir. Treonine ait hidroksil gurubu, elektronegatif etkiyi arttırarak proteindeki elektrostatik etkileşmeyi bozmaktadır (94).

LHON’da görsel fonksiyonlarda klinik iyileşme oranı en fazla T14484C mutasyonunu taşıyan bireylerde olup %37-65’tir. İkinci sırada G3460A mutasyonu (%22) ve takiben G11778A mutasyonu (%5) gelmektedir. Spontan görsel iyileşmenin patofizyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, yabanıl tip alleli homoplazmik olarak taşıyan bir grup retinal gangliyon hücresinin varlığının iyileşmeden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (89).

LHON’a bazı nörolojik bulguların eşlik etmesi durumu Leber’s plus olarak tanımlanmıştır. Üç primer mutasyondan birini taşıyan bireylerde ek nörolojik anomali sıklığı %59 olarak bildirilmiştir. Klinik bulgular arasında postural tremor, motor bozukluklar, parkinsonizm, periferel nöropati, multipl skleroz benzeri ataklar, serebellar ataksi, distoni, spastisite ve hafif ensefalopati bulunur (91).

Patojenik mtDNA mutasyonlarını taşıyan tüm bireylerde görme kaybı olmaması sebebiyle, LHON'daki inkomplet penetrans diğer genetik (genomik veya mitokondriyal) veya epigenetik faktörlerle ilişkilendirilmiştir. mtDNA haplogrupları da LHON açısından önemli bir faktördür. Örneğin haplogrup J1 ile 14484 mutasyonu, haplogrup J1c ve J2b ile 11778 mutasyonu arasında ilişki gösterilmiştir. 14484 mutasyonu, haplogrup H zemininde oluştuğunda düşük penetrans gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, G3460 mutasyonu sıklığı haplogruplar arasında farklılık göstermemektedir. Mutasyon taşıyan bireylerde, haplogrupların OXPHOS üzerine etkisi incelenmiş, farklı haplogruplar arasında oksidatif kinetikler açısından fark olduğu bulunmuştur. Bu da spesifik mtDNA polimorfizmlerinin OXPHOS komplekslerinin genel kinetiğini etkileyerek, LHON mutasyonlarının patojenik potansiyelini modifiye edebileceğini göstermiştir (91).

LHON mutasyonlarını taşıyan erkeklerin %50'sinde, kadınların %10'unda klinik semptomların olması, fenotipik ekspresyonu etkileyen başka çevresel ya da genetik faktörler olduğunu düşündürmektedir. Segregasyon analizleri X kromozomuyla ilişkili bir yatkınlık allelinin varlığını öne sürmüştür. Mikrosatellit işaretleyiciler kullanılarak yapılan bir çalışmada, X kromozomu üzerinde bir bölgede azalmış penetrans ile ilişkili bir haplotip belirlemiştir. Olgu 4'te G3460A mutasyonu saptanması üzerine olgunun sağlıklı annesi ve kızkardeşi de mikroarray tekrar sekanslama yöntemi ile analiz edilmiş, onların da aynı mutasyonu taşıdığı saptanmıştır. Daha sonra homoplazmik mutasyonun varlığı PZR-RFLP yöntemi ile doğrulanmıştır. Hastanın kızkardeşi ve annesi de

mutasyonu homoplazmik olarak taşımalarına rağmen, LHON'a özgü klinik bulguları yoktur. Bunun sebebi, hastalığın erkek bireylerde penetransının daha yüksek olması ve nükleer genomdaki modifiye edici lokuslar olabilir (95).

Olgu 5'te saptanan T4216C yanlış anlamlı mutasyonu, MT-ND1 lokusunda yer alır. LHON'a sebep olduğu gösterilmiş sekonder mutasyonlardan biridir (67). NADH dehidrojenaz geninde 4216. ve 13708. nükleotidlerdeki yanlış anlamlı mutasyonlar LHON'dan sorumlu sekonder mutasyonlardır. Myelodisplastik sendrom sonrası gelişen akut lösemilerdeki mtDNA mutasyonlarını inceleyen bir çalışmada, sekonder LHON mutasyonlarının myelodisplastik sendromlu ve pankreatik karsinomalı bireylerde de tanımlandığını, olası ortak patogenezin prematür apoptozisin tetiklenmesi olabileceğini bildirmektedir (96).

T4216C yanlış anlamlı mutasyonu, haplogrup J ve haplogrup T yapısında bulunur. Güney Brezilya'da beyaz ırkta diabetik hastalarda yapılan bir çalışmada, bu haplogruplarla artmış insülin direnci ve tip 2 diabet riskinin bağlantısı gösterilmiştir (97).

Olgu 5'te saptanan A4917G yanlış anlamlı mutasyonu MT-ND2 lokusundadır; haplogrup T belirteçlerindendir, LHON'lu ailelerde bildirilen, sekonder mutasyonlardan biridir (67). İngiltere'de yapılan bir çalışmada A4917G yanlış anlamlı mutasyonu, diabetik hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuş; Tip 2 diabet ve HOMA-insulin direnci ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (97). ABD'de yapılan bir çalışmada A4917G

mutasyonunun yaşı bağımlı maküler dejenerasyon için bağımsız bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür (98).

Olgu 5'te saptanan G8697A yanlış anlamlı mutasyonu MT-ATP6 lokusundadır. Benign ve malign seyirli tiroid tümörlerinde mtDNA değişimlerini inceleyen bir çalışmada, 79 hastanın ikisinde söz konusu mutasyona rastlanmış; ATPaz 6'daki polimorfizmlerin mtDNA replikasyonunun etkinliğini bozarak, tümör gelişimine katkıda bulunabileceğini belirtmiş; ATPaz 6'daki mutasyonların Hurthle hücre transformasyonunu takip için kullanılıp kullanılamayacağını anlamak için, büyük serilerde yapılacak çalışmaların gerekliliğini vurgulamıştır (61).

Olgu 5'te saptanan T10463C yanlış anlamlı mutasyonu MT-TR genindedir. Distoni, inme benzeri epizodlar, sensorinöral işitme kaybı ve epilepsinin görüldüğü bir ailede yapılan çalışmada, T10463C değişiminin, G8697A ve A11812G değişimleriyle birlikte; tüm ailede segregasyon gösteren ve klinik durumdan asıl sorumlu olduğu düşünülen tRNA lizin genindeki mutasyona sinerjistik etki gösterdiği, fenotipi modifiye edebileceği düşünülmüştür (99). Hastamızın kol ve bacaklarındaki istemsiz kasılmalar, antiepileptik tedaviye direnç göstermektedir. Bu direncin sebebinin T10463C yanlış anlamlı mutasyonu olabileceği düşünülmektedir.

Olgu 5'te saptanan A12634G yanlış anlamlı mutasyonu MT-ND5 genindedir. Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada, tiroid kanseri hücre serilerinde mtDNA mutasyonları araştırılmış, A12634G ve C13831A

mutasyonlarının, kompleks I aktivitesini bozarak tümöral gelişime sebep olabilecek değişimler olduğu vurgulanmıştır (100).

Olgu 5'te saptanan G15928A yanlış anlamlı mutasyonu MT-TT genindedir. Almanya'da yapılan bir çalışmada, ciddi optik tutulumu olan multiple skleroz hastalarında 15928. nükleotiddeki bu değişimin sıklığı, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (101).

Olgu 5'te saptanan T16126C yanlış anlamlı mutasyonu D-loop bölgesindedir. ABD'de yapılan bir çalışmada, haplogrup J belirteçlerinden biri olan T16126C değişiminin, yaşa bağlı maküler dejenerasyonlu retina örneklerinde, kontrol grubuna göre daha sık görüldüğünü bildirmiş; bu durumu da fonksiyonel polimorfizmlerin mitokondriyal enerji üretimini değiştirmesine bağlamıştır (102).

Olgu 5'te saptanan G16274A yanlış anlamlı mutasyonu D-loop bölgesindedir. Prostat tümörü dokularında mtDNA mutasyonlarının sıklığını araştıran bir çalışmada, incelenen 16 tümör dokusundan birinde G16274A mutasyonuna rastlanmıştır (59).

Olgu 6'da saptanan G12192A yanlış anlamlı mutasyonu MT-TH genindedir. Japonya'dan yapılan bir çalışmada, LHON ile birliktelik gösteren bir kardiyomiyopati olgusu sunulmuş; hastada bir arada bulunan G11778A ve G12192A mutasyonları tartışılmıştır. Bugüne kadar bildirilen LHON vakalarında kardiyomiyopati eşlik etmediğinden, bu tabloda sorumlu olan mutasyonun G12192A mutasyonu olabileceği düşünülmüştür (103).

Olgu 6'da saptanan T16311C yanlış anlamlı mutasyonu D-loop bölgesindedir. Prostat tümörü dokularında mtDNA mutasyonlarının sıklığını

araştıran bir çalışmada, incelenen 16 tümör dokusundan birinde T16311C mutasyonuna rastlanmıştır (59).

Bu çalışmada, klinik bulgularıyla mitokondriyal hastalık tanısı almış olgular; Mitochip yeniden sekanslama yöntemi kullanılarak, tetkik edilmiştir. Mitokondriyal hastalıkların maternal kalıtım göstermesi nedeniyle çalışmaya olgularla birlikte anneleri de dahil edilmiştir. Elde edilen ham data, yönteme özgü yazılım programında uygun formata dönüştürülmüş, bulunan tüm değişimler online veri tabanı ile karşılaştırılarak mutasyon veya polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Saptanan değişimlerle ilgili literatür taraması yapılmış, literatürde tanımlanan hastalarla çalışmaya dahil edilen hastaların klinik bulguları karşılaştırılmıştır.

LHON'a spesifik G3460A mutasyonu saptanan olguda, anne ve kızkardeşinden alınan DNA örnekleri de incelenmiş, onların da bu mutasyonu taşıdığı tespit edilmiştir. Sonrasında PZR/RFLP yöntemi kullanılarak bu bireylerde mutasyonun homoplazmik olarak gösterildiği tespit edilmiş, anne ve kızkardeşte klinik bulgu görülmemesi nedeninin hastalığın kadınlarda penetrans azlığı göstermesi veya nükleer genomdaki modifiye edici genler olabileceği düşünülmüştür.

Olgu 2'de saptanan C3497T mutasyonu, Olgu 5'te saptanan G12192A mutasyonu ve Olgu 4'te saptanan G3460A mutasyonu dışında, çalışmamızda saptanan hiçbir değişim olgularımızın klinik bulgularıyla, kiminde yaş gereği, kiminde ise cinsiyet gereği, ilişkilendirilememiştir. Bununla beraber, olguların,

ileri yaşıta çıkabilecek hastalıklar yönünden izlenmesi ve bu konuda genetik danışma verilmesi planlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısının azlığı, çalışmamızın dezavantajıdır. Ayrıca nükleer genomda bulunan ve mitokondriyal hastalıklara neden olan mutasyonlar bu çalışmada incelenememiştir. Ülkemizde mtDNA mutasyonlarına ait veri tabanının bulunmaması başka bir dezavantajdır.

Mitokondriyal DNA yeniden sekanslama teknikleri, kısa sürede sonuç alınması, gereksinim duyulan DNA miktarının az olması ve güvenilirliği sebebiyle söz konusu hastalıkların moleküler tanısında oldukça değerli bir yöntemidir. Bununla birlikte, saptanan patojenik mutasyonların heteroplazmi durumunun, sekans analizi veya PZR/RFLP gibi ikinci bir analiz yöntemiyle doğrulanması gerekmektedir.

Yeniden sekanslama tekniğinin rutin uygulamada kullanımı, mitokondriyal hastalıkların moleküler tanısında hızlı ve etkin sonuç sağlayabilir. Yapılan bu çalışma ile birlikte, benzer çalışmaların yaygınlaşmasıyla, Türk toplumunda görülen mitokondriyal polimorfizm ve mutasyonlara ait bir veri tabanının temelleri atılabilecektir.

Yeniden sekanslama tekniğiyle, mtDNA ile birlikte ilişkili nükleer DNA mutasyonlarının da taranması, mitokondriyal hastalık tanısında daha güvenilir sonuçlar sağlayacak, böylece genotip fenotip korelasyonu daha iyi kurulabilecektir.

## 6. SONUÇ

Mitokondriyal hastalıklar, klinik ve genetik değişkenlik göstermesi nedeniyle tanısı güç olan bir hastalık grubudur. Söz konusu hastalıkların moleküler tanısında son yıllarda mikroarray tabanlı analiz yöntemleri oldukça etkindir. Mitochip V2.0, mitokondriyal DNA mutasyonlarını göstermede hızlı, güvenilir ve etkin bir yöntemdir.

Array tabanlı yeniden dizileme yöntemlerinin analizinde, analiz sonuçlarının yorumlanması için ayrıntılı bir literatür taramasına ek olarak hastaların klinik bulgularının değerlendirilerek literatürde bildirilen hasta bulgularıyla karşılaştırılması, tanı hakkında ailelere genetik danışmanlık verilmesi önem taşımaktadır. Tüm bu prosedür, moleküler ve klinik genetik alanlarında deneyimli tıbbi genetik uzmanları tarafından yürütülmelidir.

Yapılan çalışmada altı olgu incelenmiştir. Olgulardan bir tanesinde klinik tablodan sorumlu patojenik mutasyon tespit edilmiştir. Olgunun anne ve kız kardeşinin de aynı mutasyonu taşıdığı saptanmıştır. Daha sonra PZR/RFLP yöntemi kullanılarak bu bireylerde mutasyonun varlığı ve homoplazmik durumda bulunduğu doğrulanmıştır.

Diğer olgularda ise, klinik bulgulardan sorumlu olabileceği düşünülen yanlış anlamlı mutasyonlar tespit edilmiş, bununla birlikte literatürde genotip fenotip ilişkisini netleştirecek yeterli veri bulunamamıştır.

Ülkemizde mitokondriyal hastalıkların tanısında ileri moleküler yöntemlerin kullanımının yaygınlaşması ile, hem mitokondriyal hastalıkların tanısı, izlemi ve genetik danışmanlığı konusunda; hem de toplumumuzda sık

görülen mitokondriyal mutasyonlarla ilgili veri tabanının oluşturulup daha iyi genotip fenotip korelasyonunun kurulmasında büyük adımlar atılacaktır

## **7. KAYNAKLAR**

1. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6;1659(2-3):115-20.
2. Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*. 2007 Aug; 83(1):84-92.
3. Schapira HV. Mitochondrial disease. *Lancet*, 2006 Jul 1;368(9529):70-82.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell* 5th Edition. Garland Science; 2007.
5. Oldfors A, Tulinius M. Mitochondrial encephalomyopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Mar;62(3):217-27.
6. Scheffler IE. *Mitochondria*. 2nd Edition. John Wiley&Sons, Inc. Publication, 2007.
7. Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1188-1199
8. Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B, et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur J Neurol*. 2009 Dec;16(12):1255-64.
9. Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*. 2010 Jun;51(5):440-50.

10. Arning L, Haghikia A, Taherzadeh-Fard E, Saft C, Andrich J, Pula B, et al. Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J Mol Med (Berl)*. 2010 Apr; 88(4):431-6.
11. Ienco EC, Simoncini C, Orsucci D, Petrucci L, Filosto M, Mancuso M, et al. May “Mitochondrial Eve” and Mitochondrial Haplogroups Play a Role in Neurodegeneration and Alzheimer’s Disease? *Int J Alzheimers Dis*. 2011 Feb 22;2011:709061.
12. Johns RD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *New Engl J Med* 1995;333:638-644.
13. Shoubridge EA, Wai T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top Dev Biol*. 2007;77:87-111.
14. Thorburn DR, Dahl HH. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet*. 2001 Spring;106(1):102-14.
15. Cao L, Shitara H, Sugimoto M, Hayashi J, Abe K, Yonekawa H. New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early primordial germ cells of mice. *PLoS Genet*. 2009 Dec; 5(12).
16. Brown DT, Samuels DC, Michael EM, Turnbull DM, Chinnery PF. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am J Hum Genet*. 2001 Feb;68(2):533-6.
17. Elektronik veri tabanı: <http://www.mitopedia.org/eng/classificazione.php> (cited 2012, Aug 30)

18. Suomalainen A, Kaukonen J. Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability. *Am J Med Genet.* 2001 Spring;106(1):53-61.
19. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med.* 2008;59:131-46.
20. Robert K. Naviaux. *The Spectrum of Mitochondrial Disease. A primary care physician's guide*, 1997.
21. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb;1797(2):113-28.
22. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 May;6 (5):389-402.
23. Temel Pediatri, Türkiye Milli Pediatri Derneği, Güneş Tıp Kitabevleri, 2010, s.543
24. Finsterer J. Leigh and Leigh like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol.* 2008 Oct;39(4):223-35.
25. Finsterer J. Inherited mitochondrial neuropathies. *J Neurol Sci.* 2011 May 15;304 (1-2):9-16.
26. Filosto M, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vattei G, Rizzuto N, et al. Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep.* 2007 Jun;27 (1-3):23-30.
27. Schmiedel J, Jackson S, Schäfer J, Reichmann H. Mitochondrial cytopathies. *J Neurol.* 2003 Mar;250(3):267-77.

28. Kirches E. LHON: Mitochondrial Mutations and More. *Curr Genomics*, 2011 Mar;12(1):44-54
29. Thorburn DR, Rahman S. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. *Genereviews* [Internet], 2003 Oct 30.
30. Eviatar L, Shanske S, Gauthier B, Abrams C, Maytal J, Slavin M, et al. Kearns-Sayre syndrome presenting as renal tubular acidosis. *Neurology* 1990 Nov; 40:1761-1763.
31. Di Donato S. Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol*. 2009 May; 256(5):693-710.
32. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 23;1658 (1-2):80-8.
33. Kisler JE, Whittaker RG, McFarland R. Mitochondrial diseases in childhood: a clinical approach to investigation and management. *Dev Med Child Neurol*. 2010 May;52(5):422-33.
34. Sofou K, Moslemi AR, Kollberg G, Bjarnadóttir I, Oldfors A, Nennesmo I, et al. Phenotypic and genotypic variability in Alpers syndrome. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012 Jul;16(4):379-89.
35. Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord*. 2010 Jul;20(7):429-37.
36. Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E. Skeletal Muscle, Mitochondria and Aging: A Review. *J Aging Res*. 2012; 2012: 194821

37. Ungvari Z, Sonntag WE, de Cabo R, Baur JA, Csiszar A. Mitochondrial Protection by Resveratrol. *Exerc Sport Sci Rev*. 2011 July ; 39(3): 128–132
38. Walker UA, Collins S, Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 1996; 36:260-267.
39. Morava E, van den Heuvel L, Hol F, de Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, et al. Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. *Neurology* 2006;67:1823-26.
40. Wong LJ. Molecular Genetics of Mitochondrial Disorders. *Dev Disabil Res Rev*. 2010 Jun;16(2):154-62.
41. Dimmock D, Tang LY, Schmitt ES, Wong LJ. Quantitative evaluation of the mitochondrial depletion syndrome. *Clin Chem* 56;1119-27.
42. Maitra A, Cohen Y, Gillespie SE, Mambo E, Fukushima N, Hoque MO, et al. The Human MitoChip: A High-Throughput Sequencing Microarray. *Genome Res*. 2004 May; 14(5): 812-9.
43. Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update*, 2004 May-Jun;10(3):221-6.
44. Yoo SM, Choi JH, Lee SY, Yoo NC. Applications of DNA Microarray in Disease Diagnostics. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19 (7): 635–46.

45. Chan M, Ji SM, Yeo ZX, Gan L, Yap E, Yap YS, et al. Development of a Next-Generation Sequencing Method for BRCA Mutation Screening: A Comparison between a High-Throughput and a Benchtop Platform. *J Mol Diagn* 2012 Aug 22.
46. Elektronik veritabanı: <http://www.affymetrix.com-usersmanual> (cited 2012, Aug 30)
47. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease; *Am J Med Genet* 2001;106:18–26
48. Mitchell AL, Elson JL, Howell N, Taylor RW, Turnbull DM. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *Med Genet* 2006; 43: 175–179.
49. Elektronik veri tabanı : [www.mitoweb.org](http://www.mitoweb.org) (cited 2012, Aug 30)
50. Vasta V, Ng SB, Turner EH, Shendure J, Hahn SH. Next generation sequence analysis for mitochondrial disorders. *Genome Med.* 2009 Oct 23; 1(10):100.
51. Lévêque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P, et al. Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip. *Eur J Hum Genet.* 2007 Nov;15(11):1145-55
52. Hartmann A, Thieme M, Nanduri LK, Stempfl T, Moehle C, Kivisild T, et al. Validation of microarray-based resequencing of 93 worldwide mitochondrial genomes. *Hum Mutat* 30:115-122, 2009

53. Sigurdsson S, Hedman M, Sistonen P, Sajantila A, Syvänen AC. A microarray system for genotyping 150 single nucleotide polymorphisms in the coding region of human mitochondrial DNA. *Genomics*. 2006 Apr; 87(4):534-42.
54. Remes AM, Majamaa-Voltti K, Kärppä M, Moilanen JS, Uimonen S, Helander H, et al. Prevalence of large-scale mitochondrial DNA deletions in an adult Finnish population. *Neurology*, 2005 Mar.22; 64(6): 976-81.
55. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999 Oct; 23(2):147.
56. Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T, Olesen SH, Andersen LD, Cordon-Cardo C, et al. Evaluation of the Performance of a Sequencing Microarray Chip Using 140 Previously Sequenced Bladder Tumor Samples. *Clin Chem*. 2000 Oct; 46(10):1555-61.
57. Yoneyama H, Hara T, Kato Y, Yamori T, Matsuura ET, Koike K. Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells. *Mol Cancer Res*. 2005 Jan; 3(1):14-20.
58. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jul 20;101(29):10726-31.

59. Chen JZ, Gokden N, Greene GF, Mukunyadzi P, Kadlubar FF. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6470-4.
60. Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, et al. Mitochondrial Variants in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depressive Disorder. *PLoS One.* 2009;4(3):e4913.
61. Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA Somatic Mutations (Point Mutations and Large Deletions) and Mitochondrial DNA Variants in Human Thyroid Pathology; A Study with Emphasis on Hurthle Cell Tumors. *Am J Pathol* 2002 May, 160(5):1857–65.
62. Czarnecka AM, Krawczyk T, Plak K, Klemba A, Zdrozny M, Arnold RS, et al. Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition. *Oncol Rep.* 2010 Dec;24(6):1521-34.
63. Jerónimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, et al. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene*, 2001 Aug 23; 20 (37): 5195-8.
64. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J.* 1999 Sep; 13(12):1532-6.

65. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL et al. Mitochondrial Polymorphisms Significantly Reduce the Risk of Parkinson Disease. *Am J Hum Genet.* 2003 Apr; 72(4):804-11.
66. Johns DR. Allelic mutations of the fourth subunit of NADH dehydrogenase are not pathogenetically important in 11778-negative Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet.* 1991 Jun;48(6):1209-13.
67. Johns DR, Berman J. Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Feb 14;174(3):1324-30.
68. Yu X, Koczan D, Sulonen AM, Akkad DA, Kroner A, Comabella M et al. mtDNA nt13708A Variant Increases the Risk of Multiple Sclerosis. *Plos One*, 2008 Feb 13;3(2):e1530 .
69. Wang X, Lu J, Zhu Y, Yang A, Yang L, Li R, et al. Mitochondrial tRNAThr G15927A mutation may modulate the phenotypic manifestation of ototoxic 12S rRNA A1555G mutation in four Chinese families. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 Dec; 18(12): 1059–70.
70. Liao WQ, Pang Y, Yu CA, Wen JY, Zhang YG, Li XH. Novel Mutations of Mitochondrial DNA Associated with Type 2 Diabetes in Chinese Han Population. *Tohoku J Exp Med.* 2008 Aug; 215(4): 377-84.
71. Park KS, Chan JC, Chuang LM, Suzuki S, Araki E, Nanjo K et al. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. *Diabetologia* 2008 Apr; 51(4):602-8.

72. Liu VW, Wang Y, Yang HJ, Tsang PC, Ng TY, Wong LC, et al. Mitochondrial DNA Variant 16189T>C Is Associated With Susceptibility to Endometrial Cancer. *Human Mutat.* 2003 Aug; 22(2): 173-4.
73. Poulton J, Brown MS, Cooper A, Marchington DR, Phillips DI. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life. *Diabetologia* 1998 Jan;41(1): 54-58.
74. Palmieri VO, De Rasmio D, Signorile A, Sardanelli AM, Grattagliano I, Minerva F, et al. T16189C mitochondrial DNA variant is associated with metabolic syndrome in Caucasian subjects. *Nutrition* 2011 Jul-Aug; 27 (7-8); 773-777.
75. Aral C, Akkiprik M, Caglayan S, Atabey Z, Ozişik G, Bekiroglu N, et al. Investigation of relationship of the mitochondrial DNA 16189 T>C polymorphism with metabolic syndrome and its associated clinical parameters in Turkish patients. *Hormones (Athens)*. 2011 Oct-Dec;10(4):298-303.
76. Mueller EE, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, Kreindl T, et al. The Mitochondrial T16189C Polymorphism Is Associated with Coronary Artery Disease in Middle European Populations. *PLoS One*. 2011 Jan 26;6(1):e16455.
77. Ebner S, Lang R, Mueller EE, Eder W, Oeller M, Moser A, et al. Mitochondrial Haplogroups, Control Region Polymorphisms and

Malignant Melanoma: A Study in Middle European Caucasians. PLoS One. 2011;6(12):e27192.

78. Stafford P, Chen-Quin EB. The pattern of natural selection in somatic cancer mutations of human mtDNA. J Hum Genet 2010 Sep; 55(9): 605-12
79. Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, et al. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. Cancer Res 2001 Aug 15; 61 (16): 5998-6001.
80. Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2005 Sep; 44 (1):19-28.
81. Bragoszewski P, Kupryjanczyk J, Bartnik E, Rachinger A, Ostrowski J. Limited clinical relevance of mitochondrial DNA mutation and gene expression analyses in ovarian cancer. BMC Cancer 2008 Oct, 8:8:292.
82. Zhai K, Chang L, Zhang Q, Liu B, Wu Y. Mitochondrial C150T polymorphism increases the risk of cervical cancer and HPV infection. Mitochondrion 2011 Jul; 11(4): 559–563.
83. Tan DJ, Chang J, Chen WL, Agress LJ, Yeh KT, Wang B, et al. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Oral Cancer of Betel Quid Chewers. Ann N Y Acad Sci. 2004 Apr; 1011:310-6
84. Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with

- aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Hum Genet.* 2005 Jun; 117(1): 9–15.
85. Phasukkijwatana N, Chuenkongkaew WL, Suphavilai R, Suktitipat B, Pingsuthiwong S, Ruangvaravate N, et al. The unique characteristics of Thai Leber hereditary optic neuropathy: analysis of 30 G11778A pedigrees. *J Hum Genet.* 2006; 51(4):298-304.
  86. Juo SH, Lu MY, Bai RK, Liao YC, Trieu RB, Yu ML, et al. A common mitochondrial polymorphism 10398A>G is associated metabolic syndrome in a Chinese population. *Mitochondrion* 2010 Apr; 10(3): 294-9.
  87. Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong LJ. Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk. *Cancer Res* 2007 May 15; 67 (10): 4687-94.
  88. Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet* 1995 Feb; 32(2):81-7.
  89. Sharkawi E, Oleszczuk JD, Holder GE, Raina J. Clinical and electrophysiological recovery in Leber hereditary optic neuropathy with G3460A mutation. *Doc Ophthalmol.* 2012 Aug; 125(1): 71-4.
  90. Brown MD, Starikovskaya E, Derbeneva O, Hosseini S, Allen JC, Mikhailovskaya IE, et al. The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. *Hum Genet.* 2002 Feb; 110(2): 130-8.

91. Koilkonda RD, Guy J. Leber's Hereditary Optic Neuropathy-Gene Therapy: From Benchtop to Bedside. *J Ophthalmol.* 2011; 2011: 179412
92. Johns DR, Smith KH, Miller NR. Leber's Hereditary Optic Neuropathy, Clinical Manifestations of the 3460 Mutation. *Arch Ophthalmol.* 1992 Nov; 110(11): 1577-81.
93. Kirkman MA, Yu-Wai-Man P, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coo IF, et al. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* 2009 Sep; 132 (Pt 9): 2317-26.
94. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, et al. Leber Hereditary Optic Neuropathy: Identification of the Same Mitochondrial NDI Mutation in Six Pedigrees. *Am J Hum Genet.* 1991 Nov; 49(5): 939-50.
95. Hudson G, Keers S, Yu Wai Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus M, et al. Identification of an X-Chromosomal Locus and Haplotype Modulating the Phenotype of a Mitochondrial DNA Disorder. *Am J Hum Genet.* 2005 Dec; 77(6): 1086-91.
96. Linnartz B, Anglmayer R, Zanssen S. Comprehensive Scanning of Somatic Mitochondrial DNA Alterations in Acute Leukemia Developing from Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Res.* 2004 Mar 15; 64(6): 1966-71.
97. Crispim D, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. The European-Specific Mitochondrial Cluster J/T Could Confer an Increased Risk of Insulin-Resistance and Type 2 Diabetes: An Analysis

- of the m.4216T > C and m.4917A > G Variants. *Ann Hum Genet.* 2006 Jul;70 (Pt 4): 488-95.
98. Canter JA, Olson LM, Spencer K, Schnetz-Boutaud N, Anderson B, Hauser MA. Mitochondrial DNA Polymorphism A4917G Is Independently Associated with Age-Related Macular Degeneration. *PLoS One.* 2008 May 7; 3(5): e2091.
  99. Gal A, Pentelenyi K, Remenyi V, Pal Z, Csanyi B, Tomory G, et al. Novel heteroplasmic mutation in the anticodon stem of mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> associated with dystonia and stroke-like episodes. *Acta Neurol Scand.* 2010 Oct; 122(4): 252-6.
  100. Abu-Amero KK, Alzahrani AS, Zou M, Shi Y. High frequency of somatic mitochondrial DNA mutations in human thyroid carcinomas and complex I respiratory defect in thyroid cancer cell lines. *Oncogene*, 2005 Feb 17;24(8):1455-60.
  101. Mayr-Wohlfart U, Paulus C, Henneberg A, Rödel G. Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement. *Acta Neurol Scand.* 1996 Sep;94(3):167-71.
  102. Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S, et al. Mitochondrial DNA Haplogroups Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jun; 50(6): 2966-74.
  103. Mimaki M, Ikota A, Sato A, Komaki H, Akanuma J, Nonaka I, et al. A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA

associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy. J Hum Genet 2003, 48(1): 47-50.

## 8. ÖZET

### *“Mitokondriyal DNA Mutasyonları”*

Mitokondriyal hastalıklar, genellikle çocukluk çağında başlayan ve değişken klinik özelliklere sahip bir hastalık grubudur. Mitokondri, kendi genetik materyaline sahip, hücre içinde oksidatif fosforilasyon ve hücresel enerji üretimden primer olarak sorumlu bir organeldir. Mitokondriyal fonksiyonlardan sorumlu alt ünitelerin bir kısmı mitokondriyal DNA’da, kalanı ise nükleer DNA’da kodlanmaktadır.

Mitokondriyal DNA’daki nokta mutasyonlar, mitokondriyal hastalıkların büyük bir kısmından sorumludur. Mutasyonların tespitinde sekans analizi, PZR/RFLP, DHPLC gibi yöntemlerin yanı sıra son yıllarda mikroarray tabanlı yeniden sekanslama teknikleri kullanılmaktadır. Mikroarray tabanlı olarak geliştirilen Mitochip V2.0 yeniden sekanslama sistemi, kısa sürede sonuç verme, tüm mitokondriyal genomun tek analizde taranabilmesi, uygun maliyetli olması ve güvenilirlik oranının yüksekliği nedeniyle mitokondriyal hastalıkların moleküler tanısında oldukça etkin ve tercih edilebilir bir yöntemdir.

Bu çalışmada, klinik bulgularıyla mitokondriyal hastalık tanısı almış 6 olgu ve annelerinin mitokondriyal genomu, mikroarray tabanlı yeniden sekanslama yöntemiyle analiz edilmiş, elde edilen sonuçlarla literatürdeki veriler karşılaştırılarak genotip fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Mitokondriyal Hastalık, Mikroarray, Mitochip

## 9. SUMMARY

### *“Mitochondrial DNA Mutations”*

Mitochondrial diseases are a group of disorders that generally have childhood onset and variable clinical features. Mitochondria have its own genetic material and are the primary responsible organelles for intracellular oxidative phosphorylation and energy production. Some of the subunits that are responsible for mitochondrial functions are encoded in mitochondrial DNA while the rest is encoded in nuclear DNA.

Point mutations in mitochondrial DNA are responsible for the majority of mitochondrial diseases. Microarray based resequencing techniques are recently being used for detection of mutations, in addition to traditional methods such as sequence analysis, PCR/RFLP and DHPLC. Mitochip V2.0, a microarray based resequencing system, is an effective and preferable method for molecular diagnosis of mitochondrial diseases, for it has many advantages like short analysis duration, cost-effectiveness, reliability and ability to sequence whole mitochondrial genome in one analysis.

In this study, the mitochondrial genome of six patients, who are clinically diagnosed with mitochondrial disease, and their healthy mothers have been analysed using a microarray based resequencing method. The results were compared with literature database in order to establish genotype-phenotype correlation.

**Keyword: Mitochondrial disease, Microarray Mitochip**

## 10. ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Guyem

**Soyadı:** Kolbaşı Özgen

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 15.01.1981, İstanbul

**Eğitimi:**

2008-2012 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de Araş. Gör. Dr.

1998-2004 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi

1991-2008 Samsun Anadolu Lisesi

1986-1991 Samsun Subaşı İlkokulu

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:** Tıbbi Genetik Derneği

**Bilimsel Etkinlikleri**

**Tamamlanmış Projeler:**

2010- 2012 “Mitokondriyal DNA’daki polimorfizmlerin hastalıklarla ilişkisinin araştırılması”

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi. Araştırmacı

**Devam Eden Projeler :**

2011-2012 Oligodontili bir ailede hastalıktan sorumlu genin lokalizasyonunun araştırılması

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi. Araştırmacı

**Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

1) Ozgen G, Karaer K, Ergun MA. Akraba Evliliğinin Genetik Önemi.

Sağlığın Başkenti, Eylül 2009, s.25.

- 2) Cavdarli B, Ozgen G, Göker B, Liehr T, Ergun MA, Percin EF. A Case With Double Translocation And Sjogren Syndrome. Türkiye Klinikleri-kabul edildi.

**Ulusal bilimsel toplantılarda bildiri kitaplarında basılan sözlü sunumlar:**

- 1) Özgen G., Karaer K., Baykaner K., Perçin E.F.; A Turkish case with Cranio-Fronto-Nasal Syndrome (Sözlü sunum), 4. Dismorfoloji Günleri, İstanbul.

**Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

- 1) Ozgen G, Kaymak AO, Ergun MA, Karaoguz MY. Three Unrelated Families with Pericentric Inversion of Chromosome 12. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 2010, İstanbul. Clinical Genetics, Vol. 78, Supp. 1, November/ December 2010.

**Katıldığı Kurslar:**

- 1) Fetal-Prenatal Tanı Kursu, 2010, Nisan, Ankara

**Katıldığı Kongre / Konferans / Sempozyumlar:**

- 1) 4. Dismorfoloji Günleri, 24-25 Nisan 2009, İstanbul
- 2) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 1-5 Aralık 2010, İstanbul
- 3) 1.Uluslararası Kök Hücre Araştırmaları ve Uygulamaları Konferansı, 7-9 Ekim 2011, Kayseri

## **11. EKLER**

### **EK 1. Mitokondriyal Hastalık Tanı Kriterleri (39)**

#### **I. Klinik belirti ve bulgular ( 1 puan/ semptom, maksimum 4 puan)**

##### **A. Kas sistemi prezentasyonu (maksimum 2 puan)**

- Oftalmopleji\*
- Miyopatik yüz görünümü
- Egzersiz intoleransı
- Kas güçsüzlüğü
- Rabdomiyoliz
- Anormal EMG

##### **B. SSS prezentasyonu (maksimum 2 puan)**

- Gelişme geriliği
- Edinilen becerilerin kaybı
- İnme benzeri ataklar
- Migren
- Nöbetler
- Miyoklonus
- Kortikal körlük
- Piramidal bulgular
- Ekstrapiramidal bulgular
- Beyin sapı tutulumu

C. Multisistemik tutulum (maksimum 3 puan)

- Hematolojik sistem
- Gastrointestinal sistem
- Endokrinolojik bulgular
- Kardiyak tutulum
- Böbrek tutulumu
- Görme bozukluğu
- İşitme bozukluğu
- Nöropati
- Rekürren / ailesel olgular

II. Metabolik testler / Görüntüleme Çalışmaları (maks. 4 puan)

- Laktat yüksekliği
- Artmış laktat/ piruvat oranı
- Alanin yüksekliği
- Artmış BOS laktat düzeyi\*
- Artmış BOS proteini
- Artmış BOS alanin düzeyi\*
- İdrarda artmış trikarbon asit atılımı\*
- Etilmalonik asidüri
- MRG'de inme benzeri görünüm

- MRG'de Leigh Sendromuna özgü görünüm\*
- MRS'de artmış laktat

III. Morfoloji (maks. 4 puan)

- Düzensiz kırmızı / mavi fibriller \*\*
- COX negatif fibriller \*\*
- COX ile boyanmada azalma \*\*
- SDH ile boyanmada azalma
- SDH pozitif kan damarları\*
- Elektron mikroskopide anormal mitokondriler \*

Skorlama:

- 1: Mitokondriyal hastalığa benzemiyor
- 2-4: Mümkün mitokondriyal hastalık
- 5-7: Muhtemel mitokondriyal hastalık
- 8-12: Kesin mitokondriyal hastalık

\* Bu semptom 2 puandır

\*\* Bu bulgu, yüksek oranda bulunuyorsa, 4 puandır

## EK 2. Etik Kurul Onayı



**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KURUMSAL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU**  
**GAZİ UNIVERSITY MEDICAL FACULTY INSTITUTIONAL REVIEW BOARD**  
**ANKARA-TÜRKİYE**  
**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI**

|                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                    |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>                                    | <b>PROTOKOL ADI</b><br>* Mitokondriyal DNA'daki Polimorfizmlerin Mitokondriyal Hastalıklarla Olan İlişkisinin Araştırılması*                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI</b><br>Doç.Dr.Mehmet Ali Engün |
| <b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>                      | <b>Belge Adı</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Tarihi / değişiklik No.su</b>                                   |
|                                                             | <b>ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>Dil Türkçe</b>                                                  |
| <b>KARAR BİLGİLERİ</b>                                      | <b>Karar No: 135</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Tarih: 29 Eylül 2010</b>                                        |
|                                                             | Üniversitemiz Tıp Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; etik açıdan incelenmiş, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler yönünden bütçe dışında uygun olduğuna karar verilmiştir.<br>Komisyonun kararı, projenin bütçesi TÜBİTAK tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, TÜBİTAK kararının Komisyonumuza bildirilmesi gerekmektedir. |                                                                    |
| <b>KURUMSAL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                    |
| <b>ÇALIŞMA ESASI</b>                                        | İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU (2010 Versiyonu), BİYOTİK SÖZLEŞMESİ, KLİNİK ARAŞTIRMALAR HAKKINDA YÖNETMELİKTE DEĞİŞİKLİK YAPILMASINA DAİR YÖNETMELİK(11 Mart 2010 tarih ve 27518 sayılı)                                                                                                                                                                                                                                |                                                                    |
| <b>ÜYELER</b>                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                    |
| <b>Unvanı / Adı / Soyadı / Ek Üyelik</b>                    | <b>Uzmanlık Dalı</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Kurumu</b>                                                      |
| Prof.Dr.Ayhan OĞUZ<br>BAŞKAN                                | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları-Çocuk Onkoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | G.Ü.T.F<br>Çocuk Sağ. ve Hast.A.D.                                 |
| Prof.Dr.Canan ULUÖĞÜLÜ<br>BAŞKAN YRD.                       | Tıbbi Farmakoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | G.Ü.T.F<br>Tıbbi Farmakoloji A.D.                                  |
| Prof.Dr.Safer AYCAN<br>ÜYE                                  | Halk Sağlığı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | G.Ü.T.F<br>Halk Sağlığı A.D.                                       |
| Prof.Dr.Çağatay ÇİFTÇİ<br>ÜYE                               | Genel Cerrahi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | G.Ü.T.F<br>Genel Cerrahi A.D.                                      |
| Prof.Dr.Aysel ARICIOĞLU<br>ÜYE                              | Tıbbi Biyokimya                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | G.Ü.T.F<br>Tıbbi Biyokimya A.D.                                    |
| Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU<br>ÜYE                              | Tıbbi Biyokimya                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | G.Ü.T.F<br>Tıbbi Biyokimya A.D.                                    |
| Prof.Dr.Ömer L. BOYUNAR<br>ÜYE                              | Radyoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | G.Ü.T.F<br>Radyoloji A.D.                                          |
| Prof.Dr.Gönca AKBULUT<br>ÜYE                                | Fizyoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | G.Ü.T.F<br>Fizyoloji A.D.                                          |
| Prof.Dr.Gaipo GÜZ<br>ÜYE                                    | İç Hastalıkları - Nefroloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | G.Ü.T.F<br>İç Hast.A.D.-Nefroloji S.D.                             |
| Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU<br>ÜYE                              | Tıp Tarihi ve Etik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | G.Ü.T.F<br>Tıp Tarihi ve Etik A.D.                                 |
| Doç.Dr.Ayhan POYRAZ<br>ÜYE                                  | Tıbbi Patoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | G.Ü.T.F<br>Tıbbi Patoloji A.D.                                     |
| Doç.Dr.Binol DEMİREL<br>ÜYE                                 | Adli Tıp                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | G.Ü.T.F<br>Adli Tıp A.D.                                           |
| Hukuk Müaviri Adem GELİR<br>ÜYE                             | Hukuk Müaviri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | G.Ü. Fakültesi<br>Hukuk Müavirliği                                 |

\* Araştırma İç Bilgi

\*\* Toplantıda Bulunma