



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

PRİMER KARDİYOMİYOPATİLERDE mtDNA
VARYANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET ARDA TEMENA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

2020



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

PRİMER KARDİYOMİYOPATİLERDE mtDNA
VARYANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET ARDA TEMENA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mehmet Arda Temena'nın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Primer Kardiyomiyopatilerde mtDNA Varyantlarının Değerlendirilmesi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
.../.../2020

Üye: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Üye: Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS

Üye: Doç. Dr. Ayşe Gül ZAMANI

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP

Üye: Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR (Danışman)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2020 tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Selma METİNTAŞ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Primer Kardiyomyopatilerde mtDNA Varyantlarının Değerlendirilmesi

Primer kardiyomyopatiler, kalp kasında meydana gelen bozukluklardan ortaya çıkan herhangi bir disfonksiyona sekonder gelişmeyen ve büyük ölçüde genetik altyapısı bulunduğu düşünülen bir hastalık grubudur. Kalp yetmezliğinin ve ani ölümün en önemli nedenlerinden birisi olmasına rağmen, kalp transplantasyonu haricinde mevcut tedaviler, kardiyomyopatilerde semptomların hafifletilmesi üzerine kuruludur. Son yıllarda genetik varyasyona yönelik tanı ve tedaviler göz önünde bulundurulduğunda ise, mitokondriyal DNA (mtDNA) birçok araştırmanın önemli bir konusu olmuştur. Mitokondriyal DNA üzerinde saptanan varyantların bir kısmı enerji ihtiyacı yüksek kalp, beyin gibi organlardaki hem yapısal hem de fonksiyonel sorunlarla ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla kardiyomyopatiye neden olduğu bilinen miyokard bazında meydana gelen bozuklukların, çoğunlukla biyoenerjetik yollardaki mitokondriyal etkileşimlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu yaklaşımla yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca çekirdek DNA'sından (nDNA) eksprese olan mitokondriyal proteinlerin, mtDNA'dan direkt eksprese olanlarla olan ilişkisi de son zamanlarda oldukça fazla odak haline getirilmiştir.

Çalışmamız iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada 27 pediatrik kardiyomyopati hastasında, kardiyomyopati üzerinde direkt etkisi olduğunu veya hastalığın progresyonuna katkısı olduğunu düşündüğümüz kardiyomyopati ile ilişkilendirilmiş 19 gen (*ACTA2*, *ACTC1*, *ACTN2*, *CALR3*, *CAV1*, *CAV3*, *PRKAG2*, *SLC12A3*, *SLC19A2*, *SLC25A4*, *SLC22A5*, *SLC25A20*, *SLC2A10*, *SLC2A11*, *SLC52A2*, *SLC6A2*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*) yeni-nesil sekanslama (NGS) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İkinci aşamada ise 27 pediatrik kardiyomyopati ve 31 sağlıklı pediatrik bireyden oluşan kontrol grubunun tüm mtDNA sekanslanması yine NGS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Totalde 58 bireyin mtDNA sekanslamasının yapıldığı

çalışmamız, aynı zamanda etnik/bölgesel haplogrup varyasyonlarının yorumlanması ile tüm mtDNA'nın sekanslanması ile birlikte Türkiye mtDNA haplogrup veri haritasına bu denli katkıda bulunmayı amaçlayan ilk çalışma olmuştur.

Çalışmamızın ilk kısmında, 5 hastada *CAV3*, *TNNC1*, *TNNT2* ve *SLC22A5* genlerinde önemli veya önemli olduğu düşünülen varyantlar tespit edilmiştir. Bunu takiben mtDNA analizleri kontrol grubuyla karşılaştırılarak yapıldıktan sonra; saptanan mtDNA varyantlarının analizi neticesinde toplamda birbirinden farklı 264 varyant arasından anlamlı olduğu düşünülen 41 adet; ikinci bir filtreleme sonrasında ise 20 varyant (%7,58) saptanmış ve önemleri tartışılmıştır. Ayrıca sol ventriküler noncompaction kardiyomiyopatisi olan bir olguda saptanan *MT-RNR1* genindeki tek nükleotid varyasyonu (SNV) olan m.684T>C ise bilgimiz dahilinde *novel* bir varyant olarak tespit edilmiştir.

Karmaşık etyopatogenezi açısından kardiyomiyopati ve karmaşık analizi olan mtDNA varyantları bu çalışmada birlikte değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda kardiyomiyopati gibi mitokondriyal defektlere bağlı geliştiği düşünülen hastalıkların nDNA'daki hedef genlerinde incelemesi gerçekleştirildikten sonra, hastalıkların ana nedeni olmasa bile ekspresyonunu ve penetransını değiştirebileceği yönündeki bilgilerden yola çıkarak bu hastalarda mtDNA dizilemesini, etiyolojiyi açıklayabileceğini düşündüğümüz nadir varyantlar saptadığımız için önermekteyiz. Ayrıca istatistiksel anlamlılığı artırmak için daha büyük popülasyonlarda yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır. Böylece bölgemizdeki mitokondriyal çeşitliliği daha iyi tanımlayarak ve biyoinformatik çalışmalarla uygun veri tabanları hazırlayarak hastalıkların tanısı, tedavisi veya önleyiciliği açısından yönlendirilmesine katkı sağlayabiliriz.

Anahtar Kelimeler: mtDNA, kardiyomiyopati, haplogrup, mitokondriyal hastalıklar, yeni-nesil dizileme

SUMMARY

Evaluation of mtDNA Variants in Primary Cardiomyopathies

Primary cardiomyopathies are a group of disease caused by defects in myocardium and do not develop as secondary to another dysfunction occur in myocardium, which are thought hugely related to genetic fundamentals. Even though cardiomyopathy is one of the leading causes of heart failure and sudden cardiac death among the young all over the world, present therapeutic approaches are used mostly to relieve the symptoms of the disease except heart transplantation. Indeed, considering treatments regarding genetic variations to offer a permanent solution, mitochondrial DNA (mtDNA) has been one of the important subjects for recent researches. The variants detected in mtDNA have been associated with both structural and functional complications at organs with high energy demand such as heart and brain. Defects in myocardium causing cardiomyopathy are thought to be derived from mostly mitochondrial interactions with respect to bioenergetic pathways. However, there is a limited number of researches on this subject. In addition, researches recently have been focusing on the interaction of the mitochondrial proteins expressed by both nuclear (nDNA) and mtDNA genes.

This study consists of two approaches. In first part, our research was started with the examination of 19 genes (*ACTA2*, *ACTC1*, *ACTN2*, *CALR3*, *CAV1*, *CAV3*, *PRKAG2*, *SLC12A3*, *SLC19A2*, *SLC25A4*, *SLC22A5*, *SLC25A20*, *SLC2A10*, *SLC2A11*, *SLC52A2*, *SLC6A2*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*) that are thought to directly affect or contribute to the progression of cardiomyopathies on 27 pediatric cases by next-generation sequencing (NGS). Next, whole mtDNA of 27 patients was sequenced by NGS again to make a comparison with a control group which is comprised of 31 individuals. In addition, this study has been the first large scale attempt to contribute that much to Turkey's mtDNA ethnic/geographic-associated haplogroup variation thanks to sequencing of fifty-eight person's whole mtDNA.

In the first part of the study, 4 single nucleotide-variations (SNVs) that are thought to be important were detected in 5 patients. Subsequently, after first mtDNA variant analysis in comparison with control group was performed, 41 different SNVs were detected out of 264, of which 20 (20/264; %7,58) are thought to be meaningful after second filtering variants by *in silico* evaluations. Moreover, we have identified a homoplasmic m.684T>C in *MT-RNR1* gene in one patient with left-ventricular noncompaction cardiomyopathy.

Two issues, which are cardiomyopathies with its complex etiopathogenesis and mtDNA variants with its difficult interpretation, were evaluated together within this study. We, therefore, suggest that mtDNA variants should be examined along with other target gene panels since mitochondria could alter the expressivity and the penetrance of the nDNA variations and accordingly as we detected such rare variants that could enlighten the etiology even if its effects are not the first cause of the mitochondrial suspected diseases. On the other hand, more studies conducted on large sample sizes should be carried out to improve the significance of the statistical tests. We, hereby, could contribute much more to decision making processes with respect to diagnosis, treatment and preventive medicine by defining local mitochondrial variations supported by bioinformatic analyses.

Keywords: mtDNA, cardiomyopathy, haplogroup, mitochondrial diseases, next-generation sequencing

İÇİNDEKİLER

İç Kapak	i
Kabul ve Onay Sayfası	ii
Özet	iii
Summary	v
İçindekiler	vii
Tablo Dizini	x
Şekil Dizini	xi
Simge ve Kısaltmalar Dizini	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kardiyovasküler Sistem ve Dolaşım.....	3
2.1.1. <i>Kardiyak anatomi; fizyolojisi ve fonksiyonu</i>	3
2.1.2. <i>Kardiyovasküler hastalıklar</i>	6
2.2. Kardiyomiyopatiler.....	6
2.2.1. <i>Hipertrofik kardiyomiyopati (HKMP)</i>	8
2.2.2. <i>Dilate kardiyomiyopati (DKMP)</i>	9
2.2.3. <i>Restriktif kardiyomiyopati (RKMP)</i>	9
2.2.4. <i>Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati/displazisi (ARVC/D)</i>	10
2.2.5. <i>Sol ventriküler noncompaction kardiyomiyopati (LVNC)</i>	10
2.2.6. <i>Diğer kardiyomiyopatiler</i>	10
2.3. Pediatrik Kardiyomiyopatiler.....	10
2.4. Kardiyomiyopati Epidemiyolojisi.....	11
2.5. Kardiyomiyopati Moleküler Genetiği.....	12
2.5.1. <i>DKMP moleküler genetiği</i>	14
2.5.2. <i>HKMP moleküler genetiği</i>	16
2.5.3. <i>LVNC moleküler genetiği</i>	17
2.5.4. <i>RKMP moleküler genetiği</i>	18
2.5.5. <i>ARVC/D moleküler genetiği</i>	18
2.5.6. <i>Pediatrik kardiyomiyopatilerde moleküler genetik</i>	19
2.6. Mitokondriyal Kalıtım ve Kardiyomiyopatiler.....	19
2.6.1. <i>Mitokondrilerin görevi, kalıtımı ve mitokondriyal DNA (mtDNA)</i>	19
2.6.2. <i>Mitokondriyal hastalıklar</i>	23
2.6.3. <i>Mitokondriyal kardiyomiyopatiler</i>	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27

3.1. Etik Kurul Onayı, Güç Analizi, Proje Onayı ve Araştırma Grubu.....	27
3.2. Tanı ve Örnek Toplama.....	27
3.3. Gereçler	28
3.3.1. Kullanılan aletler.....	28
3.3.2. Kullanılan kitler ve kimyasallar.....	28
3.4. Yöntem	29
3.4.1. DNA izolasyonu	29
3.4.2. Kardiyomiyopati genlerinin dizilenmesi.....	29
3.4.3. Tüm mtDNA'nın dizilenmesi.....	30
3.4.3.1. Kütüphane hazırlığı.....	30
3.4.3.2. Örneklerin çipe aktarılması.....	32
3.4.3.3. Dizileme reaksiyonu.....	33
3.4.3.4. Biyoinformatik analiz.....	33
3.4.3.5. Haplogrup analizi.....	35
3.4.3.6. İstatistiksel analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri	37
4.2. NGS Sonuçlarının Kalite Kontrol (QC) Değerlendirmesi	38
4.3. Olguların Kardiyomiyopati Gen Paneli NGS Bulguları	38
4.3.1. CAV3 geninde saptanan varyant	39
4.3.2. TNNC1 geninde saptanan varyant	40
4.3.3. TNNT2 geninde saptanan varyant	40
4.3.4. SLC22A5 geninde saptanan varyant	41
4.4. mtDNA NGS Bulguları	42
4.5. Mitokondriyal Haplogrup Analiz Bulguları	47
4.6. İstatistiksel Analiz	50
5. TARTIŞMA.....	52
5.1. Kardiyomiyopati Panelinde Saptanan SNVlerin <i>In Silico</i> Değerlendirmesi	52
5.1.1. Olgu mt3'te saptanan CAV3 varyantı: 3-8775530-G-T	54
5.1.2. Olgu mt9 ve mt10'da saptanan TNNC1 varyantı: 3-52488009-G-A	55
5.1.3. Olgu mt17'de saptanan TNNT2 varyantı: 1-201331069-T-C	57
5.1.4. Olgu mt25'de saptanan SLC22A5 varyantı: 5-131729936C-G	58
5.2. Hastalarda Saptanan mtDNA Varyantlarının Değerlendirmesi	59
5.2.1. Kontrol grubunda saptanmayan hasta grubunda tekrarlayan SNVlerin değerlendirilmesi	59

5.2.2. <i>m.12308A>G</i>	62
5.2.3. <i>Hastalara özgü mtDNA varyantlarının değerlendirilmesi</i>	63
5.2.4. <i>İstatistiksel değerlendirme</i>	67
5.3. mtDNA Haplogrup Değerlendirmesi.....	68
5.4. Kısıtlamalar.....	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR DİZİNİ	75
EKLER DİZİNİ	101
ÖZGEÇMİŞ	102

TABLO DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Yetişkin ve pediatrik popülasyonda kardiyomiyopatinin ve birkaç kardiyak hastalığın prevalansı	12
Tablo 2.2 : mtDNA'nın kodladığı fonksiyonel ve yapısal proteinler	15
Tablo 4.1 : Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri	36
Tablo 4.2 : Hasta grubunda saptanan önemli varyantların bilgileri	37
Tablo 4.3 : Kontrol grubunda saptanmayan hasta grubunda tekrarlayan varyant listesi	43
Tablo 4.4 : Kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş bir mtDNA varyantı ve frekansı	43
Tablo 4.5 : Filtreler sonrasında hasta grubunda saptanan tekrar etmeyen varyantlar	45
Tablo 4.6 : 58 bireyin haplogrup sonuçları	48
Tablo 4.7 : Saptanan mtDNA varyantlarının global frekanslarla (GeneBank) karşılaştırılmasından sonra elde edilen p ₃ -değerleri	50
Tablo 5.1 : Kardiyomiyopati panelinde hastalara ait saptanan anlamlı varyantlar ve <i>in silico</i> patojenite değerlendirmeleri	51
Tablo 5.2 : Kontrol grubunda saptanmayan mtDNA varyantlarının <i>in silico</i> patojenite değerlendirmeleri	58
Tablo 5.3 : Hastalara özgü mtDNA varyantlarının <i>in silico</i> patojenite değerlendirmeleri	61

ŞEKİL DİZİNİ	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Kardiyak dokunun enine kesit şematik görüntüsü	5
Şekil 2.2 : Primer kardiyomiyopatilerin sınıflandırması (AHA)	8
Şekil 2.3 : Kardiyomiyopatilerin sınıflandırması (ESC)	8
Şekil 2.4 : Kardiyomiyopatilerle ilişkili genler ve ilgili fenotipler arasındaki ilişkiler	14
Şekil 2.5 : mtDNA'nın genel yapısı	21
Şekil 2.6 : mtDNA Haplogrup haritası	22
Şekil 2.7 : Mitokondriyal varyantlar ve ilgili bazı hastalıklar	23
Şekil 2.8 : Mitokondriyal defektler sonucu kardiyak rahatsızlıkların oluşum mekanizması	24
Şekil 2.9 : mtDNA bölgelerine özgü tanımlanmış kardiyomiyopatiler ve diğer bazı kardiyak hastalıklar	25
Şekil 4.1 : Hasta mt3'teki <i>CAV3</i> genine ait varyantın IGV görüntüsü	38
Şekil 4.2 : Hasta mt9 ve mt10'da saptanan <i>TNNC1</i> genine ait varyantın IGV görüntüsü	39
Şekil 4.3 : Hasta mt17'de saptanan <i>TNNT2</i> genine ait varyantın IGV görüntüsü	40
Şekil 4.4 : Hasta mt25'de saptanan <i>SLC22A5</i> genine ait varyantın IGV görüntüsü	41
Şekil 4.5 : Anlamli olduğu düşünölen tüm varyantların hastalar arasındaki dağılımı	46
Şekil 4.6 : Missense varyantların hastalar arasındaki yüzdellik dağılımı	46
Şekil 4.7 : .vcf ve .fasta dosyalarından çıkan HaploGrep kalite skorları	47
Şekil 4.8 : Çalışmamız kapsamında saptanan haplogrupların yüzdellik dağılımı	49
Şekil 5.1 : mt9 ve mt10 olgularına ait pedigrri	57

Şekil 5.2	: mt20 olgusuna ait pedigri	61
Şekil 5.3	: mt3 ve mt4 olgularına ait pedigri	67

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHA	: Amerika Kalp Derneği
ARVC/D	: Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati/displazisi
ATP	: Adenozin trifosfat
CADD	: <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
Ca⁺⁺	: Kalsiyum iyonu
CAV3	: Kaveolin-3
CPVT	: Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi
DKMP	: Dilate kardiyomiyopati
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ESC	: Avrupa Kardiyoloji Topluluğu
GB	: GeneBank
HKMP	: Hipertrofik kardiyomiyopati
IGV	: Integrative Genomik Viewer
LQT	: Uzun QT
LVNC	: Sol ventriküler noncompaction kardiyomiyopati
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NCBI	: Ulusal Biyoteknolojik Bilgi Merkezi
NGS	: Yeni nesil sekanslama (<i>next generation sequencing</i>)
RKMP	: Restriktif kardiyomiyopati
SLC22A5	: OCTN2 (organik katyon transporter) kodlayan gen
SNV	: Tek nükleotid varyasyonu
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
TNNC1	: Troponin C kodlayan gen
TNNT2	: Kardiyak kas troponin T geni
UTR	: Untranslated Region

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyomiyopatiler dünya çapında kalp yetmezliğinin en önemli nedenlerinden birisi olup, halk sağlığı açısından da konu edilmektedir (Mohammed vd., 2012). Herhangi yapısal bir kalp malformasyonuna bağlı olmadan ortaya çıkan kardiyomiyopatinin (primer kardiyomiyopati) nedenleri henüz tamamen belirlenmemiş olsa da son araştırmalar çeşitli kalıtım kalıplarına uyum gösteren genetik faktörlerin dikkate değer bir rolü olduğunu göstermiştir (Jacoby ve McKenna, 2011). Bu kalıtım kalıpları arasında da her ne kadar nükleer genoma kıyasla çok daha küçük olsa da mitokondriyal genom üzerindeki çalışmalar, sadece kardiyomiyopatiler için değil, aynı zamanda diğer kompleks hastalıkların araştırılmasında da son zamanların en popüler konusu olmuş ve bu alanda çalışmalar hızla devam etmektedir (Tashiro, 2018).

Miyokard bazında mitokondri proteinlerinin önemli görevler aldığı enerji metabolizması ve biyoenerjikle ilişkilendirilmiş yollar göz önünde bulundurulduğunda, primer kardiyomiyopati grubu dahilindeki ve bu grupta olduğu şüphelenilen hastaların mitokondriyal genom açısından değerlendirilmesini amaçladık. Ayrıca böylesi kompleks ve heterojen bir profil çizen hastalıklarda *gözden kaçan kalıtsallık* (missing heritability) başlığı altında bir inceleme yapmanın idiyopatik kalmış kardiyomiyopatinin etyopatogenezinin aydınlatılmasına bir katkı sağlayacağını hedefledik.

Çalışmamıza 18 yaş altı primer kardiyomiyopati tanısı almış 32 hastada kardiyomiyopati ile ilişkili nükleer genoma (nDNA) lokalize 19 geni inceleyerek başlamayı hedefledik. Ardından bu hastaların ve 32 sağlıklı pediyatrik bireyden oluşan kontrol grubunun tüm mitokondriyal DNA (mtDNA) dizilemesini yaparak araştırmamızı sürdürmeyi planladık. Tek başına mtDNA üzerinde saptanacak varyantların kardiyomiyopati etyolojisine katkıda bulunabilmesinin yanında, nDNA üzerinde saptanmış bir varyantın ekspresivitesini artırabileceği yönündeki bilgi de (McMannus 2019) kardiyomiyopatide mtDNA dizileme çalışmasını gerekli kılmaktadır. Varyant analizi doğrultusunda biyoinformatik pipelineler aracılığıyla patojenik olduğu

düşünülen yeni aday mutasyonları tanımlamayı ve literatürle karşılaştırmamız sonrası sonuçlanacak verileri incelemeyi planladık. Özellikle moleküler tedavi, gen-terapi gibi alanlara değinen tedavi yaklaşımlarına ek bilgiler sunmak dışında, oldukça karmaşık bir konu olan mtDNA varyantlarının sınıflandırılmasına ve filtrelenmesine yönelik yeni yaklaşımlar sunmayı hedefledik. Ayrıca saptanan sonuçlar doğrultusunda aileleri de dahil eden ileri çalışmalarla, primer kardiyomyopatinin çocukluk çağındaki genetik sebebini aydınlatmayı amaç edindik.

Oldukça nadir durumlar dışında maternal aktarımı ile Mendeliyan kalıttan ayrılan mtDNA insanın ve hastalıklarının evrimsel sürecinde önemli rol oynamaktadır (Wallace, 2015). Bu amaçla, son olarak bu çalışmayla birlikte Türkiye-Anadolu mtDNA haplogrup haritasına büyük ölçüde katkıda bulunacak bilgiler sağlamayı hedefledik. Ayrıca bu veriler ile birlikte, bölgeye spesifik hastalıklara yatkınlıkların tanımlanmasına katkıda bulunabilecek bilgileri, bölgeye spesifik veri tabanı oluşturmak için ilk verileri ya da kişiselleştirilmiş tıp kapsamında yararlı olabilecek değerlendirmeler sunmayı amaçlamış bulunuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Sistem ve Dolaşım

Büyük organizmalar, hücrel metabolik substratların ve yan ürünlerinin, hücreler ve dış çevre arasındaki alışverişi ve aynı zamanda bunların vücuttaki uzak bölgelerdeki dokulara taşınabilmesi için bir dolaşım sistemine gerek duyar (Klabunde, 2012). Hücreler ve plazma arasındaki maddelerin transferi, maddelerin duvarları boyunca transferine çok az direnç gösteren yoğun kılcal ağlar ile gerçekleştirilir. Etkili bir transefer işlemi için kılcal damarlar ile ürünlerin kullanılacağı yerler arasında kısa difüzyon mesafeleri vardır. Bu sistemdeki pompalama fonksiyonu ise kanı seri olarak dört odalı bir organ olan, akciğerleri perfüze eden ve vücudun geri kalanına hizmet eden kalp tarafından sağlanır (Ganong, 2012). Kalp ve kan damarları oksijeni, besin maddelerini, atık ürünleri vücudun tüm noktalarına hızlıca taşımak ve homeostatik ısıyı her noktada muhafaza etmek için evrimleşmiştir. Bu fonksiyon dokuların canlı tutulması için çok önemlidir ve bu yüzden kardiyovasküler sistem embriyoda oldukça erken bir aşamada gelişir (Herring ve Paterson, 2018). Dolaşım sisteminde kan, atriyumlara ve daha sonra diyastol ve atriyal sistol sırasında ise kalbin ventriküllerine dolar; ventriküllerin kasıldığı ve basıncın pulmoner arter ve aorttaki basınçları aştığı sistol sırasında ise atılır. Bu sırada atriyoventriküler (AV), pulmoner ve aort kapaklarının açılıp kapanmasının doğru zamanlaması, kanın uygun bir şekilde dolaşıma dahil olmasını sağlar. Her bir kardiyak döngüde ventrikülleri terk eden kan oranına ejeksiyon fraksiyonu denir ve kalp sağlığının hassas bir göstergesi olarak kabul görmektedir (Ganong, 2012).

2.1.1. Kardiyak anatomi; fizyolojisi ve fonksiyonu

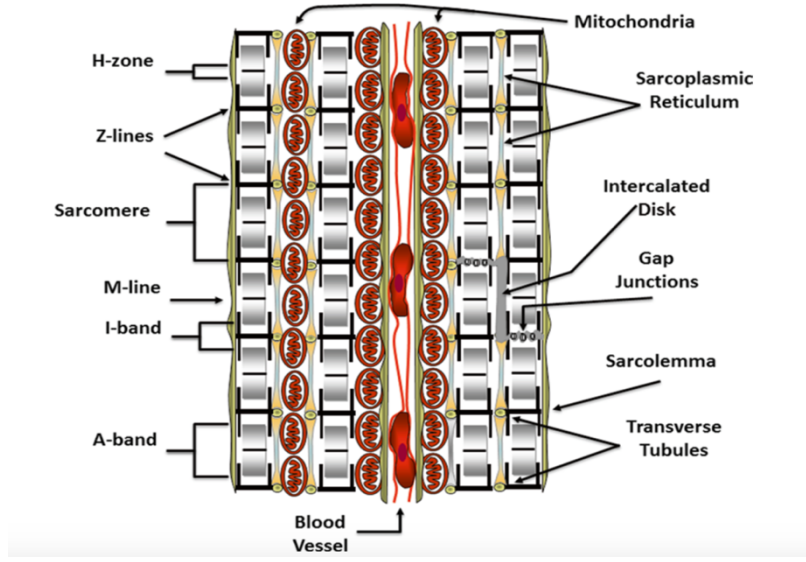
Omurgalı embriyolarındaki ilk fonksiyonel organ olan kalp iki endokardiyal tüp şeklinde yapının oluşmasıyla gelişimine başlar; dört odaya ayrılarak ve arteriyel gövdelere dolanarak gelişimini tamamlar. İnsanda, gelişimin dördüncü haftasından itibaren kalp atmaya başlar (Moorman vd., 2003). Her bir kalp atışı, kalp duvarındaki kardiyak pacemaker iletim sistemi tarafından elektriksel olarak tetiklenir. Bu sistem, sinirlerden değil modifiye

kas liflerinden oluşur. Kalp pili, yerel elektrik akımları tarafından bir kas lifinden diğerine iletilen bir elektriksel deşarj başlatır. Elektrik uyarını kalbin büyük kısmını oluşturan kardiyak miyositlere ulaştığında hücre içi Ca^{++} iyon konsantrasyonunu yükselten bir aksiyon potansiyelini ateşlerler. Ca^{++} iyonları daha sonra miyositte bulunan aktin ve miyozin filamanlarından oluşan kasılma mekanizmasını aktive eder. Kardiyak aksiyon potansiyeli, iskelet kasındaki durumun aksine neredeyse kasılma süresi boyunca devam eder. Kardiyak miyositler elektriksel olarak birbirine bağlı olmasıyla birlikte her bir kalp atışı sırasında her biri kasılır. Bu nedenle kasılma kuvvetinin, iskelet kasında olduğu gibi ek kas lifleri alınarak artırılmaz. Bunun yerine, kasılma kuvveti, hücre içi Ca^{++} seviyesinin ve diyastol içindeki liflerin gerilmesinin ayarlanmasıyla düzenlenir (Herring ve Paterson, 2018). Kalp atışını tetikleyen kardiyak elektriksel aktivite, özel bir kardiyak iletim sisteminden kaynaklanır ve bu sistem aracılığıyla miyokardın tüm kısımlarına yayılır. İletim sistemini oluşturan yapı sinoatriyal (SA) düğüm, internodal atriyal yolaklar, AV düğümü, his demeti ve Purkinje sistemi olarak dört bileşenden oluşmaktadır (Ganong, 2012).

Kalp; atriyal kas, ventriküler kas ve iletken kas lifleri olmak üzere üç ana kalp kası dokusundan (miyokard) oluşur. Atriyal ve ventriküler kas tipleri, kasılma süresinin çok daha uzun olması dışında iskelet kası ile aynı şekilde kasılır. Öte yandan, kalbin özelleşmiş iletken lifleri, sadece kasılma fibrilleri içerdikleri için sadece zayıf bir şekilde kasılır ve kalp boyunca aksiyon potansiyelleriyle kalbin ritmik atışını kontrol eden uyarıcı, iletken ve birbirine bağlı bir sistem sağlarlar (Hall & Guyton, 2011).

Kalp kası dokusu, her bir hücreyi birbirinden ayıran fakat bitişik hücrelerin zarlarınının birbirine kaynaşmasıyla oluşan interkalar disklerle birbirine bağlanmasını gerektiren sinsityum yapıdadır. Bu yapı hücreler arasında iletişimi çok kısa sürede yüksek difüzyon hızı sağlayarak önemli ölçüde hızlandırır ve bir uyarı oluştuğunda tüm hücrelere nerdeyse eş zamanlı bir şekilde yayılır (Hall & Guyton, 2011). Kardiyak kas yapısını oluşturan kardiyomiyosit adı verilen hücreler iskelet kasına benzer özellikler gösterse de yorulmayı engelleyen yoğun mitokondri oranları ve genellikle tek hücre

çekirdeği bulundurma özelliği ile iskelet kasından farklıdır. Hücre içi boşluk büyük ölçüde miyofibril adı verilen kontraktıl yapılar ile doldurulur. Hücrel fonksiyonu destekleyen çekirdek, çok sayıda mitokondri ve diğer organeller genellikle kontraktıl yapılar tarafından çevrelere doldurulmuştur (Iaizzo, 2015). Kardiyak sarkomer (kas dokusunu) yapıyı oluşturan kardiyomiyositler ve oluşturduğu yapılar Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kardiyak dokunun enine kesit şematik görüntüsü (Iaizzo, 2015)

Birincil fonksiyonu arka arkaya kasılmak olan kardiyak miyositlerin metabolik hızı son derece yüksektir. İki taneden fazla çekirdek içeren iskelet kas hücrelerinin aksine, kardiyomiyositler genellikle merkezinde bulunan bir ya da iki tane çekirdek içerir. Kardiyomiyositler iskelet kasındaki miyositlere göre, genellikle aralıklı ve nispeten kısa kasılmalar yaparlar ve kalp kası yaşam süresi boyunca saniyede bir ile üç kez kasılır. Kalp bu tekrarlayan kasılma ve gevşeme döngülerini bu denli kısa sürede yapabilmesi için, aerobik olarak üretilmesi gereken muazzam miktarda ATP'ye gereksinim duyar. Bu nedenle de kardiyak miyositler çok fazla sayıda mitokondri içerir. Oksijenin yokluğunda ise miyositler bir dakikadan daha fazla fonksiyonlarını yerine getiremez ve dolayısıyla kasılamazlar ve bu durum birçok kardiyovasküler hastalığa sebebiyet verir (Klabunde, 2012).

2.1.1. Kardiyovasküler hastalıklar

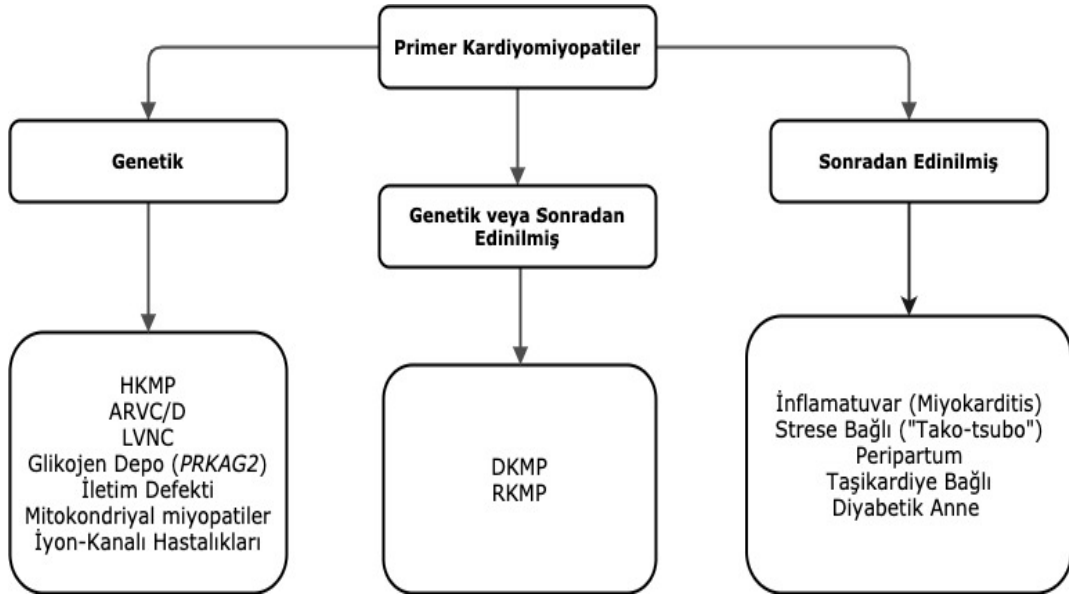
Dünya çapında kardiyovasküler hastalıklar hala en önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Örneğin, vasküler inflamasyon ve inflamasyona sekonder endotel disfonksiyon aterosklerotik lezyon oluşumuna sebep olarak miyokard enfarktüsü ile sonuçlanabilmektedir. Bir başka örnek ise, sanayileşmesi tamamlanmış fakat henüz gelişmekte olan ülkelerin diyabet ve obezite risklerinin artmasıyla sonuçlanan kardiyak disfonksiyonlardır. Miyokardı direkt olarak etkileyebilecek enfeksiyöz ajanlar olduğu da bilinmektedir. Etkili miyokard enfarktüslerinin bir sonucu olarak kalp yetmezliği ile sonuçlanmasının da önemli ölçüde genetik yatkınlıktan kaynaklandığı ise bilinmektedir. Bu nedenle, metabolik hastalıklar, gözden kaçırılan genetik sebepler ve yaş nedeniyle risk faktörü yükündeki artış, kalp hastalıkları insidansını arttırır ve fark edilmezse etkili tedaviler geliştirmek için bir zorluk oluşturur (Dimmeler, 2011). Kalp yetmezliği şiddetli seyrettiği durumlarda, mortalite oranı agresif kanser hastalarında olduğu kadar yüksektir. Ayrıca kalp yetmezliği insidansı nüfusun artan yaşı nedeniyle daha da artmaktadır bu yüzden erken teşhis ve tanı her daim önemlidir (Stewart vd., 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün Mayıs 2017 tarihli raporuna göre, kardiyovasküler hastalıklar (kalp ve kan damarlarını etkileyen tüm durumlar) her yıl yaklaşık 17,9 milyon kişinin yaşamının sonlanmasına sebep olmaktadır ve başlıca ölüm nedenidir (WHO, 17 Mayıs 2017).

2.2. Kardiyomiopati

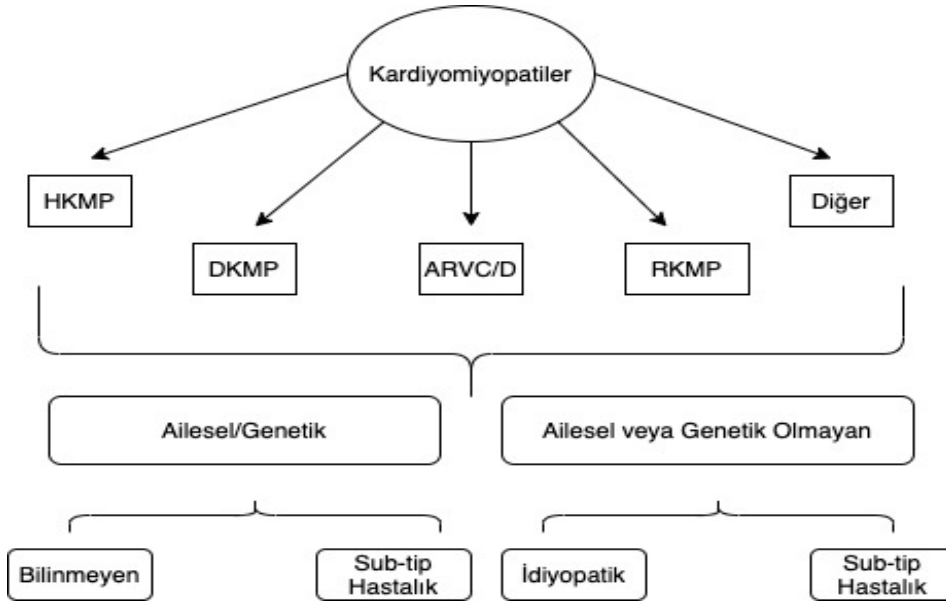
Kardiyovasküler hastalıklar başlığı altında incelenen, kardiyomiopati miyokardın mekanik ve/veya elektriksel işlev bozukluğuna neden olan çeşitli kalp kası bozukluklarıdır. Klinik bir terim olarak 'kardiyomiopati' ilk kez 1957'de, sık görülmeyen ve koroner olmayan miyokardiyal bir grup hastalığı tanımlamak amacıyla Bridgen tarafından kullanılmıştır (Brigden, 1957). 1961'de Goodwin ve arkadaşları bugün halen kullanılmakta olan kardiyomiopatinin üç farklı ana sınıfını dilate, hipertrofik ve restriktif terimleriyle belirleyerek tanımlamıştır (Goodwin vd., 1961). Kardiyomiopati nadir bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen, tüm

kardiyomiyopatilerin dünya genelindeki prevalansı hakkında farklı değerler mevcuttur. Fakat görüntüleme tekniklerindeki ilerlemeler ve ilerlemiş genetik çalışmalar ile birlikte tanılabilirliği ve farkındalığı artmaktadır (Cecchi vd., 2012).

Amerikan Kalp Derneği'nin (AHA) bünyesinde, uzman bir konseyin sıklıkla kardiyovasküler ölüme ya da progresif kalp yetmezliğine sebep olan kardiyomiyopati için geniş kapsamlı tanımını “kalp kasında ortaya çıkan fizyolojik bir disfonksiyon sonucunda anormal ventriküler hipertrofi veya dilatasyon gösteren, sıklıkla genetik temelli nedenleri bulunan heterojen bir hastalık grubu” şeklinde yapmıştır (Maron vd., 2006). Avrupa Kardiyoloji Topluluğu ise, her bir kardiyomiyopati grubunu kendi içinde genetik ve non-genetik olmak üzere iki gruba ayırmaktadır (Elliott vd., 2007). Amerika Kalp Derneği'nin sunduğu majör bir sınıflandırmada ise; kardiyomiyopati, sadece kalp kasındaki fonksiyonel durumlar ile sınırlandırılmış primer kardiyomiyopatiler ve miyokard ilişkili multi sistemik bozuklukları kapsayan sekonder kardiyomiyopatiler olarak iki ana gruba ayrılırken, primer kardiyomiyopatiler de kendi içinde genetik, karışık(mixed) ve edinilmiş(acquired) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Maron vd., 2006). İki konsey de sınıflandırmalarında genetik ve moleküler tabanlı çalışmalarını önemli bir fark faktörü olarak belirtmiş ve bunları bazı gruplar arasında kesin ayırıcı biyo-belirteçler olarak kullanılmasının gerekliliğini öne sürmüşlerdir. İki gruba ait sınıflandırma Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Primer Kardiyomiyopatilerin Sınıflandırması (Amerikan Kalp Derneği (AHA); Maron vd., 2006)



Şekil 2.3. Kardiyomiyopatilerin Sınıflandırması (Avrupa Kardiyoloji Topluluğu (ESC); Elliott vd., 2007)

2.2.1. Hipertrofik kardiyomiyopati (HKMP)

Hipertrofik kardiyomiyopati başka bir kardiyak veya sistemik hastalığın yokluğunda, dilate olmayan ve açıklanamayan sol ventrikül hipertrofisi ile karakterize olan çoğunlukla genetik alt yapısı olduğu düşünülen bir hastalıktır. HKMP tanısı, ekokardiyografi (EKO) veya kardiyak manyetik rezonansa (CMR) bağlı olarak maksimum sol ventriküler duvar

kalınlığının yaşa bağlı değişkenlik göstererek genellikle 12-15 mm boyutundan daha fazla olması ile teşhis edilir (Bernard, J. vd., 2011).

Genel olarak, HKMP hastalarının prognozu ve yıllık mortalite oranı diğer kardiyomiyopatilere göre değişkendir. Ani kardiyak tutulumla bağlı ölüm riski hastalık klinik semptom belirtmediği sürece nispeten düşüktür (Maron, 2010). Ancak yine de pediatrik olgular, genç bireyler ve sporcular için bu durum oldukça ciddi ölçüde oranları yükseltmekte olup, dikkatle inceleme altında olmaya devam etmektedir (Cecchi vd., 2012).

2.2.2. Dilate kardiyomiyopati (DKMP)

DKMP, koroner arter hastalığının tetiklemediği veya tanımlanabilir bazı sebeplerden (sistemik hipertansiyon, kapak hastalığı, ilaçlar, inflamatuvar kalp hastalıkları gibi) dolayı sol ventrikül dilatasyonu ve sistolik disfonksiyonun belli bir oranda düşmesi ile karakterizedir (Cecchi vd., 2012).

Ailesel DKMP durumlarında, birinci derece akrabada da bu kliniğin gözlemlendiği neredeyse yarı yarıya gibi bir oranla doğrulanmaktadır. Ayrıca diğer kardiyomiyopatiler gibi, birçok hastada semptomların eksikliğinden veya tespit edilemeyesinden dolayı teşhis edilmesi zor olduğundan DKMP prevalansı da çok düşük oranlardadır (Jacoby & McKenna, 2011). Ayrıca ailesel ve sporadik DKMP formları benzer morfolojik karakteristiklere ve prognoza sahiptir. Son yıllardaki tedavi ve takip olanaklarının iyileşmesine rağmen, kalp yetmezliği, atriyal ve ventriküler aritmiler, inme ve ani kardiyak ölüm nedeniyle genellikle kötü prognoza sahip bir hastalık olarak tanımlanmakta olup, ilerlemiş kalp yetmezliğinde tek seçenek kalp transplantasyonudur (Merlo vd., 2011).

2.2.3. Restriktif kardiyomiyopati (RKMP)

RKMP, normal veya çoğunlukla düşük diyastolik/sistolik hacim, normal duvar kalınlığı ve sistolik fonksiyon, diyastolik akışta belirgin bozukluk ve biatriyal dilatasyon ile kendini gösteren ve sıkışmış/kısıtlanmış sol ventrikül fizyolojisinin varlığı ile tanımlanır. Prevalansı hala bilinmemekle beraber RKMP, toplumda nadiren görülür ve çoğunlukla bu tip kardiyomiyopatinin genetik temelleri bulunmaktadır (Rapezzi vd., 2010). Bu restriktif fenotip

bazen en son aşamada HKMP'nin klinik spektrumunun bir parçası olabilmekle beraber, izole durumlarda RKMP genellikle azalmış diyastolik dolun ve düşük strok hacminden kaynaklanan kötü prognoza sahip ciddi bir diyastolik disfonksiyon şeklinde kendini göstermektedir (Zangwill vd., 2009).

2.2.4. Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati/displazisi (ARVC/D)

ARVC/D, sağ ventrikül miyokard dokusunun yağ ve fibröz doku ile yer değiştirmesi neticesinde sağ ventrikül disfonksiyonuna bağlı ventriküler aritmilerle karakterize, nadir görülen kalıtsal bir hastalıktır (Marcus vd., 2010). Bu tipin en yaygın dominant formunda, yapısal değişiklikler her zaman olmayabilir veya sağ ventrikülün lokalize bir bölgesine sınırlanmış şekilde görülebilmektedir. Ventriküler sistolik disfonksiyon ile ilişkili yaygın sağ ventrikül displazisi ve sol ventrikül tutulumuna kadar varan ilerleme ise hastalığın daha sonraki aşamalarında yaygındır (Basso vd., 2012). Ventriküler aritmiler bu hastalığın klinik ayırt edici özelliklerinden biridir fakat atriyal fibrilasyon şeklinde de görülebilmektedir (Cecchi vd., 2012).

2.2.5. Sol ventriküler non-compactio kardiyomiyopati (LVNC)

İzole LVNC, sol ventrikül dilatasyonu ve sistolik disfonksiyon ile ilişkili olabilen ve belirgin sol ventrikül trabekülleri veya derin intertrabeküler girintiler ile karakterize prevelansı hala tartışmalı olan kalıtsal bir kardiyomiyopati tipidir (Sedmera vd., 2000).

2.2.6. Diğer kardiyomiyopatiler

Sınıflandırılmamış birçok kardiyomiyopati alt tipi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları genel klinik seyir itibariyle en sık gözlemlenen HKMP ve DKMP ile benzer morfolojiler gösterebilmektedir ama belirgin değişik fizyolojileriyle bu kardiyomiyopatilerden farklılaşırlar (Cecchi vd., 2012).

2.3. Pediatrik Kardiyomiyopatiler

Pediyatrik kardiyomiyopatilerin yıllık insidansı 100.000'de 1,1 ve 1,5 arasında değişmekte olup oldukça nadir görülen bir durumdur (Lipshultz vd., 2003; Nugent vd., 2003). Kardiyomiyopatilerin 18 yaş altı bireylerde morbidite ve mortalite oranları oldukça yüksektir ve bir yaşından büyük çocuklarda kalp

transplantasyonunun en yaygın sebebidir. Ağır klinik ile seyreden semptomatik kardiyomiyopatisi olan çocukların yaklaşık %40'ına kalp transplantasyonu yapılmakta veya bu çocuklar iki yıl içinde ölmektedir (Lipshultz vd., 2003). Amerikan Kalp Derneği'nin kardiyomiyopati sınıflandırması 18 yaş altı hastalarda genetik testlerin ve RKMP, LVNC türlerinin az olması nedeniyle pediatrik popülasyona tam olarak uygulanamamaktadır. HKMP, DKMP, RKMP ve LVNC'ye ek olarak çocuklarda mitokondriyal defekte bağlı bir hipokinezi sonucunda ortaya çıkabilen HKMP örneğinde olduğu gibi fenotipik overlap durumu görülebilir veya sarkomerik HKMP'den DKMP'ye geçişler olabilmekteyken, LVNC diğer kardiyomiyopatilerle birlikte görülebilir. ARVC/D çok nadiren de olsa 10 yaşından sonra gözlemlenebilmesine rağmen, pediatrik yaş grubunda neredeyse hiç gözlemlenmediği kabul edilir (Lee M. vd., 2017).

Moleküler çalışmalar kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş bazı gen ekspresyonlarının yetişkin ve pediatrik kardiyomiyopatiler arasında az da olsa farklı olabileceğini göstermektedir. Bu durum tedavi yanıtının da iki grup arasında farklı olabileceğini düşündürmekle birlikte erken yaşta moleküler yöntemlerle koyulabilecek tanı yöntemlerinin önemini göstermektedir. Son gelişmelerle birlikte transkriptom ve epigenom çalışmaları hastalık progresyonu açısından önemli bileşenleri ortaya çıkarmakta olup, pediatrik kardiyomiyopatilerin yetişkin kardiyomiyopatilere benzerliğinin ve farklılıklarının olduğunu ortaya sunmaktadır (Stephanie M Ware, 2017).

2.4. Kardiyomiyopati Epidemiyolojisi

Doğru teşhis değerlendirmelerinin ve sınıflandırma kriterlerinin uygulanmasına dayanarak prevalans çalışmaları toplumdan topluma farklılık gösterebilmekte olup, hastalığın nadir görülmesi de prevalans çalışmaları için veri toplama aşamasını zorlaştırmaktadır. Örneğin sol ventrikül hacmi ve kontraktıl fonksiyon ölçümleri üzerinde vücut büyüklüğü, atletik antrenman ve biyolojik heterojenitenin etkisi göz önüne alındığında DKMP tanısının standartlaştırılması zor bir süreçten geçmiştir (McKenna vd., 2017). Bir başka örnek ise, HKMP'nin hangi yaşta ortaya çıkacağı durumudur ve bu da

prevalansın netliğini aynı zamanda zorlaştırmaktadır (Semsarian vd., 2015). Geniş çaplı uluslararası çalışmalara dayanarak hem pediatrik hem de yetişkin için verilen prevalanslar (LVNC hariç) Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü üzere pediatrik popülasyonda kardiyomiyopati oldukça nadir gözlemlenmektedir.

Tablo 2.1. Yetişkin ve pediatrik popülasyonda kardiyomiyopati ve birkaç kardiyak hastalığın prevalansları (McKenna vd., 2017).

Kardiyomiyopati Tipi	Pediatrik (1-Püberte)	Yetişkin (19-64 yaş)
HKMP	Nadir	1:250/500
DKMP	Nadir	1:250/500
RKMP	Nadir	Nadir
ARVC	Nadir	1:2000/5000
LQT	1:2000	1:2000
Brugada (Tip 1)	Nadir	1:2000/5000
CPVT	1:5000/10000	1:5000/10000

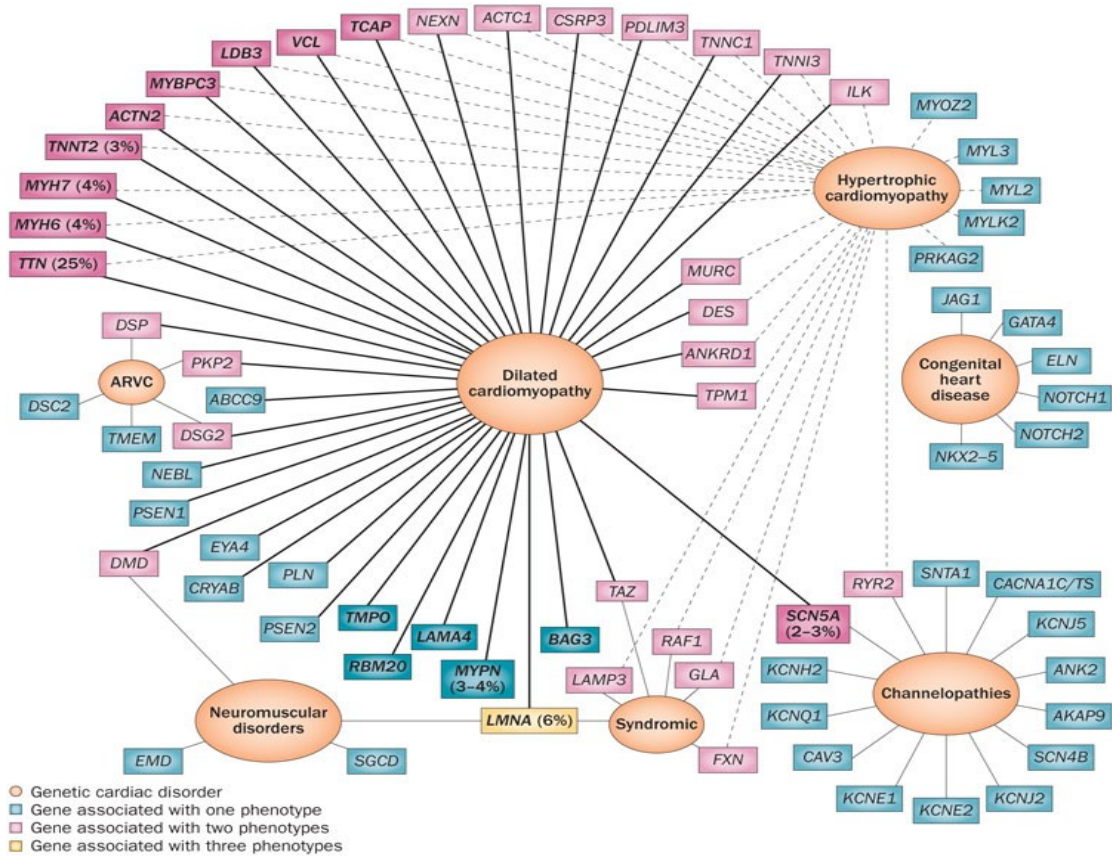
2.5. Kardiyomiyopati Moleküler Genetiği

‘Bir gen, bir hastalık’ paradigması daha fazla kardiyomiyopati olgusu tarandığında ve aile çalışmalarının artmasıyla, kardiyomiyopati açısından da sürdürülebilir görünmemektedir. Aynı mutasyon farklı bireylerde farklı yaşlarda farklı fenotiplere yol açabilir. Hatta çevresel faktörler ve gen etkileşimleri nedeniyle aynı aile içinde bile çok farklı fenotipler görülebilir. HKMP, DKMP, RKMP ve LVNC daha çok sarkomerin oluşumunda yer alan genlerdeki patojenik mutasyonlarla ilişkili düşünülürken ARVC/D ve bazı durumlarda DKMP genellikle desmozomal genler açısından ilişkilendirilmiştir (Cecchi vd., 2012). Ayrıca kardiyomiyopati hastaları birbirinden oldukça farklı fenotipler gösterebildiğinden klinik açıdan prognozu da kesin olarak belirlemek zor olmaktadır fakat spesifik genotiplere karşılık gelen belirgin kardiyomiyopati tiplerinin bulunduğunu gösteren birçok olgu da bildirilmiştir (Tobita vd., 2018). Kardiyomiyopati açısından patojenik varyantlarının bulunduğu bildirilen birçok gen literatürde yer almasına rağmen, genetik

altyapısı ve moleküler yolları hala tamamen aydınlatılamamıştır (Burke vd., 2016).

Kardiyomiyopatiler, birçok farklı genin etkileşimi ile ortaya çıkabildiğinden veya bir gende görülen farklı mutasyonlardan kaynaklanabildiğinden ve/veya tek bir gendeki mutasyondan da kaynaklanabildiğinden genetik olarak heterojenite göstermektedir. Aynı gende saptanan farklı varyantlar farklı fenotiplere neden olabilir. Örneğin, miyozin ağır zincir-7'yi kodlayan *MYH7*'de saptanan aynı patojenik varyantlar HKMP ve DKMP fenotipine ayrı ayrı neden olabilir. Ayrıca farklı genlerde saptanan varyantlar, *MYH7* ve miyozin-bağlayan protein-3'ü kodlayan *MYBPC3*'teki patojenik varyantların HKMP'ye neden olması gibi, aynı kardiyomiyopati fenotipine neden olabilmektedir (Morimoto, 2007; Watkins vd., 2011). Genel itibariyle Z-bandın ve sarkomer veya kostamer ilgili bağlayıcı proteinleri ve bileşen proteinleri, nükleer membranın, desmozomun oluşumdan etkin rol oynayan proteinleri ve mitokondriyal proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların kardiyomiyopatiye sebep olduğunu bildiren birçok literatür bulunmaktadır. Bu farklı yollara etki edebilecek birçok gen olmasından dolayı otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı ve mitokondriyal dahil olmak üzere kardiyomiyopatiler için birden fazla kalıtım modu vardır. Fakat izole ve otozomal dominant kardiyomiyopati, her yaşta birey arasında en yaygın gözlemlenen tiptir (Lee M. vd., 2017). Klinik genetik değerlendirme sonrası nöromusküler hastalığı olanlar hariç tutularak, kardiyomiyopati ilişkili birçok geni içeren panellerde taranmış tek merkezli bir çalışmada, etkilenen çocukların yaklaşık %75'inde genetik bir neden belirlenmiş olup; bu orandaki %42'lik kısmın ailesel aktarımı bulunan ve çoğunlukla sarkomerik genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı, %20,5'inin ise metabolik ve bu oranın çoğunun mitokondriyal değişimlerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Sendromik olarak sınıflandırılan ise kalan %14,5 olarak belirlenmiştir (Kindel vd., 2012). Ayrıca kardiyomiyopatilerle doğrudan ilişkili olduğu bilinen genlerdeki bazı varyantların kardiyak olmayan sistemik veya metabolik manifestoları olabildiği de bilinmektedir (Fiorillo vd., 2016; Jhang vd., 2016).

Kardiyomiyopatilerde genetik sebepler araştırılırken ciddi çevresel faktörler dışarda bırakıldığında, her yaşta hemen ortak durumlar gözlemlenmiştir. Digenik mutasyonlar, pleiotropik durumlar, bazı bildirilen poligenik vakalar, mitokondriyal kalımlar ve hastalığın heterojenitesi düşünüldüğünde ise henüz tam olarak keşfedilmemiş olan genetiği veya *missing heritability*, gen-gen etkileşimleri ve hastalık progresyonunu modifiye edici faktörler hakkında sınırlı fakat artmakta olan bilgiler bulunmakta olup, kardiyomiyopati subtiplerinde farklılaşan bazı genetik aktarımlar söz konusu olabilmektedir (Lee M. vd., 2017).



Şekil 2.4. Kardiyomiyopatilerle ilişkili genler ve ilgili fenotipler arasındaki ilişkiler (Hershberger vd., 2013)

2.5.1. DKMP moleküler genetiği

Toksik ve inflamatuvar sebeplerin dışında tutularak, DKMP'nin çoğunlukla değişken ekspresivite ve penetransa sahip otozomal dominant bir kalıtım kalıbına sahip olduğu bilinse de otozomal resesif, X'e bağlı resesif ve mitokondriyal kalıtımın belirli formlarında aktarılan şekillerde de ortaya

çıkması mümkündür (Hershberger vd., 2013). Genel olarak sitoskeletal, sarkomerik, mitokondriyal, desmozomal, nükleer membran ve RNA bağlayıcı proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar DKMP ile ilişkilendirilmiştir (McNally & Luisa, 2017).

TTN geni sarkomerin kasılma regülasyonunda ve sinyal mekanizmasında önemli rol oynayan kalpte sentezlenen yaklaşık 35,000 amino asitlik en büyük protein olan titini kodlar ve genin patojenik varyantları monoallelik ekspresyon gösterdiği için otozomal dominant aktarılır. Herhangi bir mutasyona bağlı olarak bu genden sentezlenen, prolin-glutamat-valin-lizin gibi birçok tekrarlayan bölgesi olan ve dolayısıyla çok fazla alternatif splicing doğasıyla titinin trunkat kalmasının DKMP'ye ve bazı varyanlarının diğer kardiyomiyopati türlerine de sebep olduğu bilinmektedir (Herman vd., 2012; McNally & Luisa, 2017). Son zamanlarda kısmen fonksiyonel titin üretimine sebep olan mutasyonlar, hafif ve tedavi edilebilir bir dilate kardiyomiyopati formu ile ilişkili olup bu mutasyonların genel popülasyonda %1-3 arasında değişen düşük bir frekansta olduğu gözlemlenmiştir (Herman vd., 2012; Golbus vd., 2012).

Lamin-A/C kodlayan *LMNA* geninde meydana gelen missense varyantlar ve mutasyonlar proteinin defektli oluşumuna sebep olarak primer DKMP'nin %5-8'ini oluşturur ve genin patojenik varyantları otozomal dominant bir şekilde kalıtıma katılır. Tek *LMNA* geni lamin A ve lamin C proteinlerini kodlar ve 3' ucunda meydana gelen alternatif splicing sonucunda ilk 566 amino asitleri arasında özdeş olan bu iki protein oluşur. *LMNA*'daki meydana gelen mutasyonlar, erken yaşlanmadan(progeria) miyopatilere ve DKMP'ye kadar birçok hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (Lu vd., 2011).

DES, *PLN*, *RBM20*, *SCN5A* (sırasıyla dezmin, fosfolamban, RNA-bağlayan protein-20 ve voltaj kapılı sodyum kanal alfa altbirim-5 kodlayan) ise otozomal dominant aktarımı olan DKMP ile ilişkilendirilmiş diğer genlerdendir (McNally & Luisa, 2017). Hücre iskeletini oluşturan proteinleri kodlayan X'e bağlı ve distrofini kodlayan gendeki veya müküler distrofiyle ilişkilendirilen sarkolemmal stabiliteden sorumlu bir diğer komponent olan

sarkoglikan kodlayan genlerdeki mutasyonlar DKMP oluşumuna sebep olabilmekte fakat daha çok bu hastalıkların (DMD ve BMD gibi distrofinopatiler gibi) klinik semptomları arasında yer almaktadır (McNally, 2007).

Kasılmadan sorumlu en küçük birim olan sarkomeri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar da DKMP oluşumunda rol oynar. Bunlardan *MYH7*, troponin-T2 kodlayan *TNNT2* ve tropomyozin-1 kodlayan *TPMI*'in DKMP'de yaklaşık %2-4 arasında değişen oranıyla gözlenerek en sık mutasyon geçirmiş sarkomer genleri olduğunu gösterirken, *MYBPC3* bunlar arasında daha nadir gözlenendir (Pugh vd., 2014). Bunların dışında hücre içi çeşitli yollardan etki eden farklı ontolojilere sahip 30'dan fazla gendeki mutasyonun DKMP'ye neden olduğu bilinmektedir. Mevcut sekanslama stratejileri ve genotip-fenotip korelasyonları ve kısa zamanda artmış genetik test hassasiyeti, bu hastalığın kardiyologlarla birlikte tıbbi genetikçilerle işbirliğiyle incelenmesi için temeller sağlamaktadır (Hershberger vd., 2013).

2.5.2. HKMP moleküler genetiği

Kardiyomiyositlerde meydana gelen genetik bir bozukluk sonucunda ortaya çıkan hipertrofi genellikle asimetriktir ve en sık tutulumu septumla ilişkili aort valvinde ve interventriküler septumda gözlemlenir. HKMP, otozomal dominant kalıtım paternine sahip olan, değişken penetrans ve ekspresivite gösterebilen genellikle arketipik bir tek gen bozukluğu olup, otozomal resesif, mitokondriyal ve daha nadiren X'e bağlı kalıtımla da ortaya çıkabilmektedir (Marian & Eugene, 2017). Genetik etyolojisi açısından ise sarkomerik lokasyonda kalın filamentlerin, ince filamentlerin ve Z-bant kısmının oluşumdan sorumlu genlerde ve hücre içi diğer metabolik yollarda yer alan bazı genlerde meydana gelen mutasyonların HKMP ile olan ilişkisi ortaya konmuştur (L. Wang vd., 2010).

Moleküler genetik çalışmaların başlarında, bir sarkomer proteini olan miyozin ağır zincir proteinini kodlayan *MYH7* geninde meydana gelen bir nokta mutasyonun bir ailede HKMP'ye neden olduğu belirlenmiş ve diğer genlerin de incelenmesiyle birlikte hastalığın genetik olarak heterojenik

olduğu ortaya konmuştur (Geisterfer-Lowrance vd., 1990), *MYH7* ile birlikte *MYBP3*, genetik HKMP vakalarının neredeyse yarısını açıklayan iki gendir. Delesyon veya insersiyon sebepli frameshift saptanan *MYBPC3* genindeki değişimler dışında, HKMP ile ilişkilendirilmiş birçok gende meydana gelen mutasyonların çoğu missense ve/veya loss-of-function özelliğindedir (Millat vd., 2010).

TNNT2, *TNNI3* (troponin-I3) ve *TPM1* mutasyonları, HKMP'nin etyolojisine katkıda bulunan diğer varyantlardır ve hep birlikte vakaların yaklaşık %10'luk bir kısmından sorumludur (Erdmann vd., 2003). Ek olarak *ACTC1*, *MYL2* (sırasıyla kalp kası aktin-alfa 1 ve miyozin hafif zincir-2 kodlayan) ve nadir de olsa *MYL3*, *CSRP3* (sırasıyla miyozin hafif zincir-3 ve sistein-glisin zengini protein-3 kodlayan) genlerindeki bazı patojenik varyantlar da HKMP ile ilişkilendirilmiştir. Miyokardiyal hipertrofi diğer genetik sebeplere bağlı olarak, fenokopik koşullarda da ortaya çıkabilmektedir. Fabry hastalığı, glikojen depo hastalıkları, lizozomal depo hastalıkları, mitokondriyal hastalıklar ve üçlü tekrar sendromları bu koşul için sunulmuş farklı örnekler olarak verilebilir (Marian & Eugene, 2017).

2.5.3. LVNC moleküler genetiği

LVNC, sol ventrikül (LV) miyokardında meydana gelen etyolojisi tam olarak henüz belirlenememiş genetik altyapısı olduğu düşünölen yapısal bir anormalliktir. Kardiyak gelişimin son evresinde oluşun bir bozukluk neticesinde ortaya çıktığı düşünölen bu hastalığın, kardiyak morfogenezde yer alan, incelenmiş murin genlerinden *Casz1*, *Daam1*, *Fkbp1a*, *Bmp10*, *Jmj* ve *Jarid2* ve *Mib1* proteinlerini kodlayan genlerde embriyogenez sırasında oluşun mutasyonlarının LV kompresyonuyla karakterize olduğu düşünölmektedir (Towbin & Lynn, 2017). Yine heterojen olan LVNC'nin genetik aktarımı genellikle otozomal dominanttır, ancak otozomal resesif, X'e bağlı veya mitokondriyal kalıtım da bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ise sorumlu nükleer genlerin çoğunun genellikle sarkomerik veya sitoskeletal proteinleri kodlayan olduğu görölmüştür (Towbin vd., 2015).

DKMP ve HKMP'de olduğu gibi sarkomerik genlerden *MYBPC3*, *TPM1*, *ACTC1*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2*, *MYL3* ve *MYH7*deki mutasyonlar LVNC'nin en yaygın genetik nedenidir ve diğer kardiyomiyopatilerle görülen fenotipik örtüşmenin sebebi olarak düşünülmektedir (Probst vd., 2011). *SCN5A* gibi bazı iyon kanalı genlerindeki ve *HCN4*'te (Potasyum/sodyum hiperpolarizasyon-ile-aktive siklik nükleotid-kapılı kanal 4) meydana gelen mutasyonların da LVNC fenotipine neden olduğu bildirilmiştir (Schweizer vd., 2014; Shan vd., 2008).

2.5.4. RKMP moleküler genetiği

Diğer kardiyomiyopatiler arasında en nadir gözlemlenen ama yine onlar gibi heterojen olan RKMP kalıtsal veya yine genetik altyapısı olduğu bilinen; infiltratif, depo rahatsızlıkları, infiltratif olmayan ve endomiyokardiyal başlıkları altında sınıflandırılabilen ya da bunların tümünün bir kombinasyonu olarak ortaya çıkabilen fakat etiyojisi diğerlerine göre daha az aydınlatılmış bir rahatsızlıktır (Muchtar vd., 2017).

Gen haritalama çalışmalarıyla birlikte RKMP'nin yine *TNNT2*, *TNNI3*, *ACTC1* ve *MYH7* gibi sarkomer alt birimlerinde meydana gelen mutasyonlardan meydana geldiği öne sürülmüştür. Daha önce de belirtildiği üzere bu mutasyonların çoğu otozomal dominant olarak aktarılır ve diğer kardiyomiyopatilerden sorumlu tutulan genlerle büyük ölçüde örtüşmektedir. Diğer kardiyomiyopatilerden fenotipik olarak farklılaşması farklı genetik faktörlere, gen-gen etkileşimlerine ve çevresel faktörlere bağlanmakla birlikte, transporter bir protein olan transtretin kodlayan *TTR*'de saptanan bazı patojenik varyantların ve apolipoprotein-A1 kodlayan *APOA1* mutasyonlarının infiltratif amiloidozise bağlı RKMP patofizyolojisine neden olduğu bildirilmiştir (Towbin, 2014).

2.5.5. ARVC/D moleküler genetiği

Aritmojenik kardiyomiyopati, özellikle genç hastalarda ve sporcularda ani kalp ölümüne sebep olan, çoğunlukla desmozomal proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan fakat genetik olarak yine de heterojen olan kalıtsal bir kalp kası bozukluğudur (Domenico vd., 2017).

Ayrıca genotip-fenotip korelasyon çalışmaları, hastalığın daha önce düşünüleninden çok daha geniş bir fenotipik spektruma sahip olabileceğini göstermiştir (Srijita vd., 2007).

Sendromik olmayan ARVC/D'nin çoğu otozomal dominant kalıtım kalıbı olmasına rağmen, resesif kalıtım gösterdiği durumlar da mevcuttur (Ilaria vd., 2013). Diğer kardiyomiyopatilerle ilişkilendirilmiş ortak genlerden olan *TTN*, *SCN5A* ve *LMNA* genleri de ARVC/D kliniğiyle ilişkilendirilmiştir. Fakat son yüzyılın başında artan genetik çalışmalarla birlikte özellikle dezmozomal protein komponentlerini kodlayan; *JUP*, *DSP*, *PKP2*, *DSG2*, *DSC2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ARVC/D kliniği ortaya çıktığı görülmüştür (Domenico vd., 2017).

2.5.6. Pediyatrik kardiyomiyopatilerde moleküler genetik

Çocuklarda kardiyomiyopatiye neden olan genlerdeki varyantlar erişkinlerde olduğu gibi, kardiyak olmayarak başka organları etkileyen sistemik özelliklere de sahip olabilmektedir. Örneğin, Noonan sendromu da dahil olmak üzere RASopatiler, pediatrik kardiyomiyopatilerde en sık karşılaşılan sendromik nedenlerden biridir (Jhang vd., 2016). Öte yandan doğuştan gelen bazı metabolik hatalar bazen DKMP'ye sebep olabilmektedir veya Pompe hastalığında olduğu gibi bazı depo bozukluklarında HKMP gözlemlenmesi çocukluk çağında başlayan kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca DMD'de olduğu gibi konjenital miyopatiler çocukluk döneminde hem iskelet hem de kalp kası tutulumu ile ortaya çıkabilir. İzole primer kardiyomiyopati genetiği neredeyse yetişkinlerdeki etyolojiyi açıklayabilen genlerle neredeyse tamamen uyuşmaktadır. Kalıtım kalıbı değişken olup, ailesel aktarımı olabildiği gibi, *de novo* şekilde de ortaya çıkabilmektedir (Lee M. vd., 2017).

2.6. Mitokondriyal Kalıtım ve Kardiyomiyopatiler

2.6.1. Mitokondrilerin görevi, kalıtımı; mitokondriyal DNA (mtDNA)

Çift membranlı sitoplazmik bir organel olan mitokondri, 2,5 milyar yıl önce modern ökaryotik hücrenin öncüsü olan bir α -proteobakteri tarafından

yutulması sonrası simbiyotik bir ilişki içerisinde gelişti, çekirdeği ile birlikte evrimleşerek enerji üretiminde uzmanlaştı (Wallace, 2018). Ayrıca bir hücrede ihtiyaca göre yüz ile beş bin arasında değişen sayısıyla mitokondriler kendi genetik materyallerini (mtDNA) içerir. Tüm yaşamsal faaliyetlerin temelini oluşturan hücrelerdeki enerji akışının en doğru şekilde işlemesindeki en mühim organeldir. Mitokondrinin temel görevleri; hücreye adenosin trifosfat (ATP) formunda enerji sağlamak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) jenerasyonunu ve regülasyonunu sağlamak, sitozolik kalsiyum iyonlarının belli miktarda depolanmasında görev almak, mitokondriyal permabilite geçiş por proteini (MPTP) aracılığıyla apoptozu regüle etmek olarak sıralanmaktadır (Wallace vd., 2010).

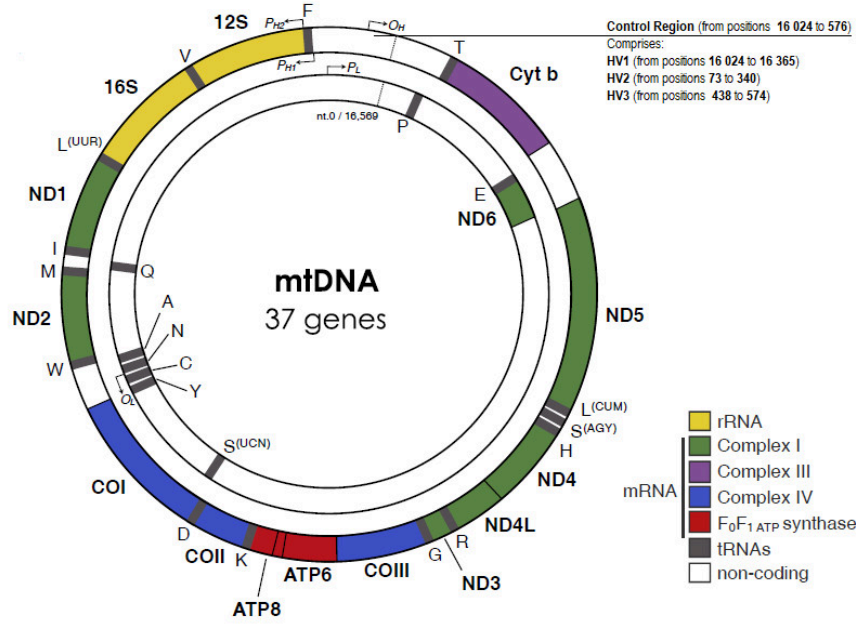
Sitoplazmik-nükleer genomun (nDNA) biparental aktarımı ve kendini kopyalayabilme yeteneği, zararlı mutasyonların popülasyona yayılabilmesine sebep olurken, mitokondriyal endosimbiyozis zamanla fonksiyonel olmaya başlayınca seçici baskı (*selective pressure*) mitokondrinin uniparental-maternal kalıtımla aktarılması yönünde etkisini gösterdi (Hoekstra, 2000; Law & Hutson, 1992). Öte yandan, çok hücreli çoğu canlıda döllenme sırasında, bir sperm sadece kendi DNA molekülüyle genetik kompozisyona katkıda bulunur. Fakat bir zigottaki sitoplazmik tüm organeller ve materyaller yumurtadan gelir. Örneğin, her bin yumurta mitokondrisi için yalnızca bir sperm mitokondrisinin yumurtaya penetre olduğu ve bu sperm mitokondrilerinin de otofagazomlar ve ubiquitin eklentileri sayesinde degrade olduğu bilinmektedir (Sato & Sato, 2012; Sutovsky vd., 1999). Sonuç olarak insanlarda da mitokondriyal genetik materyal aktarımı, maternal kalıtım kalıbına uymakta olup, Mendeliyen kalıtıma uymamaktadır. Diğer bir deyişle mtDNA'da meydana gelen bir değişimin aktarımı yalnızca anneden çocuklara geçerken, bu çocuklardan yalnızca kız çocuklar pedigrinde bu değişimi bir sonraki jenerasyona aktarabileceklerdir (Giles vd., 1980).

Mitokondriler, insanlarda 16,569 baz çiftinden (bç) oluşur, çift sarmallı ve sirküler olan bu molekül, oksijenli solunumdaki en önemli basamak olan oksidatif fosforliasyon (OXPHOS) ile ilişkili 13 protein, 22 ayrı transfer-RNA ve 2 ayrı ribozomal-RNA toplamda 37 geni kodlar. Ayrıca her mitokondrinin

kendi içinde de birkaç (2-8 kopya) mtDNA molekülü vardır. Öte yandan, mtDNA ile etkileşimde bulunan, mitokondriyal yolaklarda görev alan ve mtDNA kopya sayılarını (mtCNs) düzenleyen nDNA'da lokalize yaklaşık 1500 gen tanımlanmıştır (Anderson vd., 1981; Yamamoto vd., 2020). Tablo 2.2'de mitokondriyal proteinler, genler ve yapısına katıldıkları ETC (elektron transport zinciri) kompleksleri verilirken, Şekil 2.5'de mtDNA'nın genel yapısı verilmiştir.

Tablo 2.2. mtDNA tarafından kodlanan fonksiyonel ve yapısal proteinler (Fex vd., 2018)

Gen İsmi	GenBank ID	Protein	Kompleks
MT-ND1	4535	NADH dehidrojenaz 1	I
MT-ND2	4536	NADH dehidrojenaz 2	I
MT-ND3	4537	NADH dehidrojenaz 3	I
MT-ND4	4538	NADH dehidrojenaz 4	I
MT-ND4L	4539	NADH dehidrojenaz 4L	I
MT-ND5	4540	NADH dehidrojenaz 5	I
MT-ND6	4541	NADH dehidrojenaz 6	I
MT-CYB	4519	Sitokrom-b	III
MT-CO1	4512	Sitokrom-c oksidaz I	IV
MT-CO2	4513	Sitokrom-c oksidaz II	IV
MT-CO3	4514	Sitokrom-c oksidaz III	IV
MT-ATP6	4508	ATP sentaz-6	V
MT-ATP8	4509	ATP sentaz-8	V



Şekil 2.5. mtDNA'nın genel yapısı (Amorim vd., 2019)

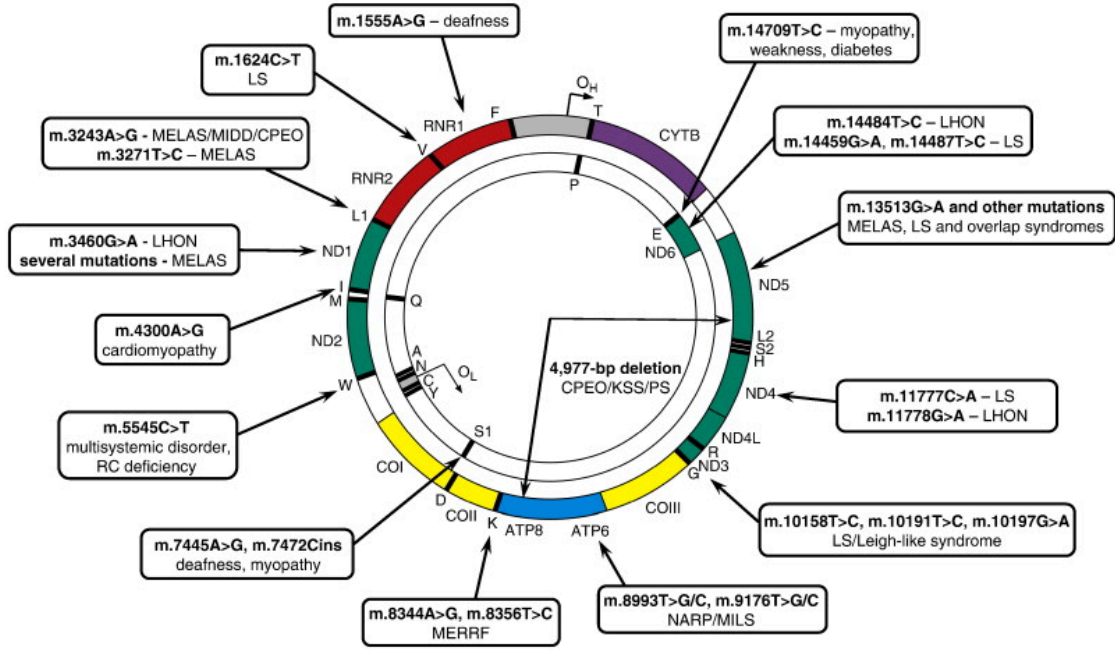
mtDNA'da meydana gelebilecek bir mutasyon oranı, sürekli ROS üretim merkezi olmasından kaynaklı olarak nDNA'dakine oranla çok daha yüksektir. Bazen belirli mtDNA varyantları hücre içerisinde ve organizmanın kendisinde belirli yüzdeler seviyelerde bulunur, bu durum heteroplazmi olarak adlandırılır. Eğer bir varyant incelenen doku içinde %99'un üzerinde bir orana sahipse o varyant homoplazmik olarak adlandırılır. Eğer bir varyantın patojenik olduğu düşünülüyorsa o varyantın heteroplazmik olması homoplazmik olması ihtimaline oranla daha yüksektir çünkü homoplazmi sabitlenmiş ve bulunduğu dokuya uyum sağlanarak seçilmiştir. Fakat heteroplazmi stabil değildir ve patojenik bir durum yaratması dolayısıyla elenerek yüzdeler oranı düşmekte veya uygun çevresel koşullarda sabitlenmeye doğru ilerlemektedir (Wallace, 2015). Öte yandan birikmiş varyantların mtDNA analizlerinde sabitlenmiş olması; yani homoplazmi durumu aynı zamanda insan popülasyonlarının genişlemesi sırasında doğal seçim ve genetik kaymanın sonucunu temsil eder. Maternal kalıtım ve rekombinasyon eksikliği nedeniyle de bir popülasyondaki, o popülasyona spesifik mtDNA varyantları, haplogruplar olarak adlandırılan bir dizi mtDNA haplotipi olarak karakterize edilir (Wallace, 2018). Makro haplogruplar yıllar içerisinde dünyanın farklı yerlerinde homoplazmik olarak yerleşmiş ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. mtDNA Haplogrup haritası (Amorim vd., 2019)

2.6.2. Mitokondriyal hastalıklar

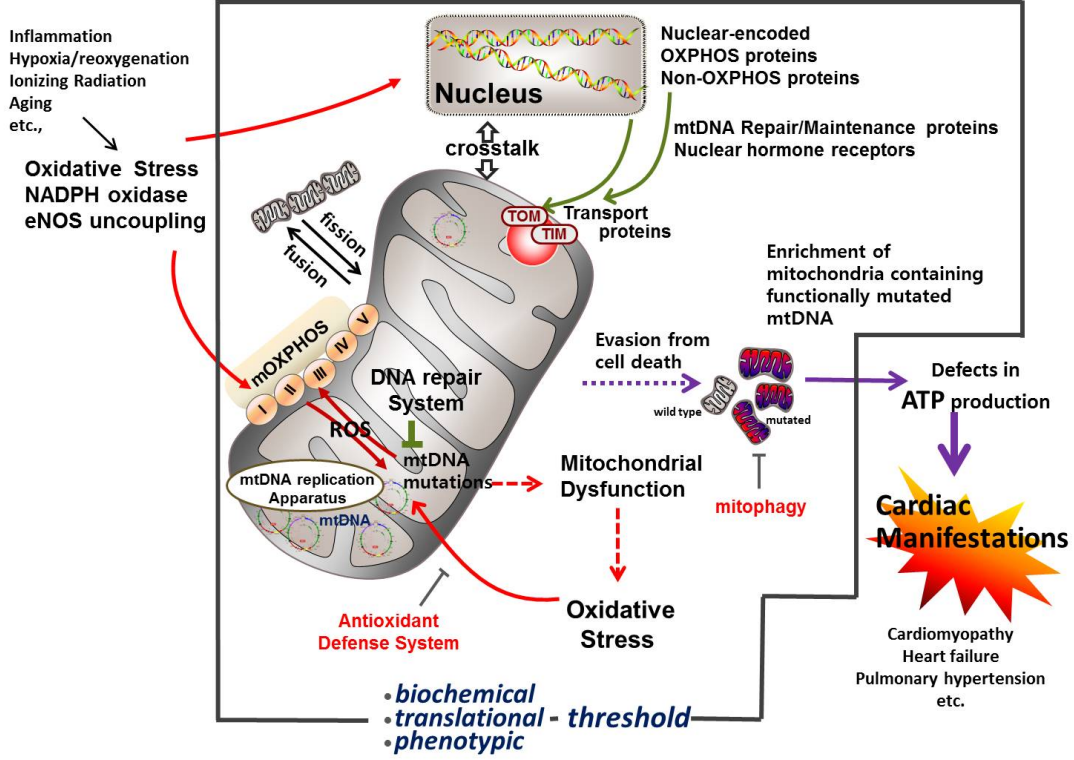
Mendeliyen kalıtım kalıbına uymayan aktarımı mitokondriyi genetik aktarım açısından özel bir yere koyarken, enerji metabolizmasındaki temel görevleri bu organelin karmaşık sistemlerde ve hastalıklarda önemini ayrıca ortaya koymaktadır. Enerji üretiminde ve akışında oluşacak herhangi bir aksama metabolik, neoplastik, dejeneratif ve yaşa bağlı ortaya çıkan hastalıklar gibi geniş hastalık gruplarında sebep olarak belirtilmiş olup, mitokondriye bağlı hastalıklar da ATP üretimi ile sonuçlanan mitokondriyal solunum zincirindeki defektler ile karakterizedir (Yamamoto vd., 2020). Mitokondriye bağlı biyoenerjetik zincirde görev alan proteinlerde, öncesinde genlerinde, oluşacak herhangi bir bozukluk ilk olarak kalp, beyin, kas gibi yüksek enerji gereksinimi olan dokuları etkilemektedir. Dolayısıyla mitokondriye bağlı defektler kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde, yaşlanmanın hız kazanmasında ve buna bağlı hastalıklarda ve farklı birçok dejenertif hastalıkta belirtilmiştir (Lane, 2011). Örneğin, mitokondriyal haplogrup N9a, Asya popülasyonlarında tip 2 diyabete karşı direnç oluşturken, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için mtDNA sub-haplogrup H5 bir risk faktörü olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca birçok mtDNA varyantı direkt olarak miyopati ve kardiyomiyopatiyle ilişkilendirilmiştir (Fuku vd., 2007; Meyers vd., 2013; Santoro vd., 2010). Şekil 2.7’de mtDNA mutasyonları ve yarattığı oldukça geniş ve birbirinden farklı patojenik durumları verilmiştir.



Şekil 2.7. Mitokondriyal varyantlar ve ilgili bazı hastalıklar (Tuppen vd., 2010)

2.6.3. Mitokondriyal kardiyomiyopatiler

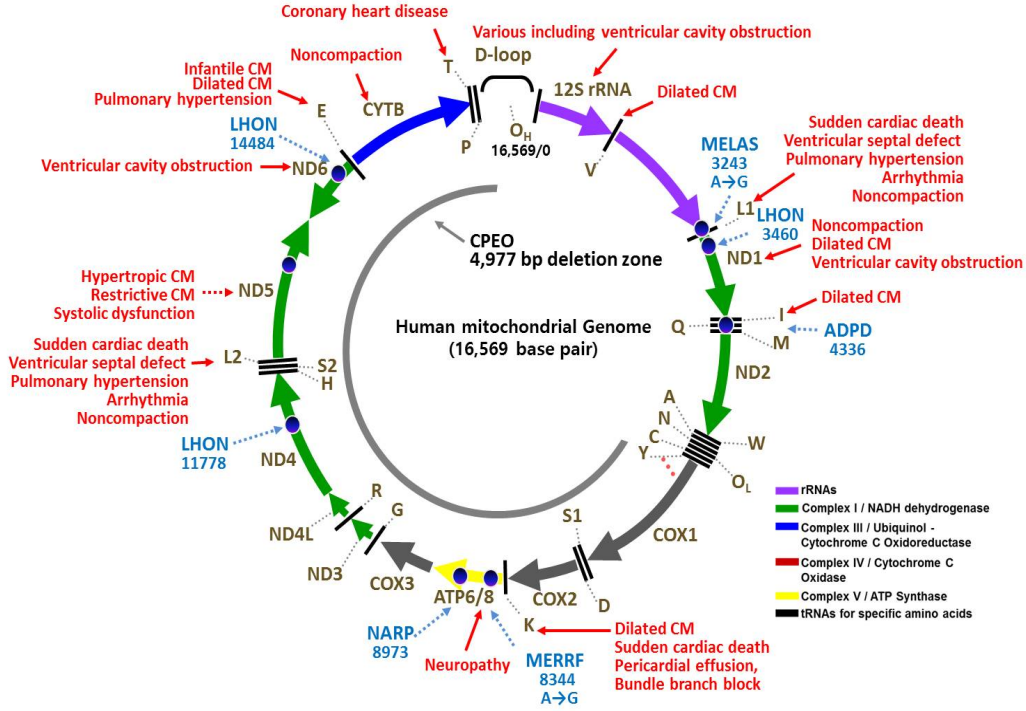
Mitokondrinin kompleks biyolojik karakteristik özelliklerinin araştırılması ve anlaşılması birçok karmaşık hastalığın etiolojisinin aydınlatılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Kardiyomiyopatiler konu alındığında, kalp kasının vücuttaki tüm organlara kan ve enerji sağlaması için yüksek seviyede aerobik metabolizmaya gerek duyduğu aşikâr olup, bu enerjinin üretiminde ve kardiyak biyoenerjetik regülasyonun sağlanmasında mitokondri anahtar bir rol üstlenmektedir (Meyers vd., 2013). Mitokondriyal defektlerin kardiyomiyopatilere neden olduğunu Peters T.J. *ve ark.*, mitokondriyal fonksiyon hasarlarının konjestif kardiyomiyopatilerin karakteristik özellikleri olduğunu bulduklarında bunu ilk defa tartışanlardan olmuşlardır (Peters vd., 1977'den aktaran Mohammed vd., 2012).



Şekil 2.8. Mitokondriyal defektler sonucu kardiyak rahatsızlıkların oluşum mekanizması (Lee vd., 2017)

Zaman içerisinde mitokondriyal DNAnın (mtDNA) merkeze alındığı yapısal çalışmalara paralel olarak son dönemde gelişen dizileme teknolojisi ile birlikte mitokondriyal genom ve kardiyomiyopatiler arasındaki ilişkiyi incelemek de birçok çalışmanın konusu olmaya devam etmektedir. Zaragoza ve ark., 2011 yılında 21 kardiyomiyopati şüphesi taşıyan veya tanı almış hastada yaptıkları çalışmada 6 olguya ait 6 novel, non-haplogrup varyant saptamış ve bunları potansiyel(likely) patojenik olarak tartışmış olup, bu varyantların belirtilmiş hastalıkların etiyolojisine kuvvetle muhtemel katkıda bulduklarını belirtmiştir (Zaragoza vd., 2011). Ayrıca mtDNA'da meydana gelen bir mutasyon sonucu primer kardiyomiyopati grubu içinde yer alan hipertrofik kardiyomiyopatiye neden olduğunu belirten vaka takdimleri de bilimsel literatürde yer almaktadır (Liu vd., 2014; Palecek vd., 2012). Ayrıca Ağustos 2019'da McManus ve ark. yayınladığı çalışmada mtDNA varyasyonlarının nDNA ekspresivitesini etkileyerek kardiyomiyopati gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu ve ayrıca fonksiyonel çalışmalarla *mild* mtDNA varyantlarının otozomal dominant hastalıklarda önemli bir modülatör

olabileceğini fare modellerinde aktarmışlardır (McManus vd., 2019). Şekil 2.8’de mitokondriyal hasarların kardiyak fenotipte nasıl oluştuğu özetlenirken Şekil 2.9’da mtDNA varyantları, bulunduğu bölgeler ve ilintili oldukları kardiyomiyopatiler ve bazı kardiyak hastalıklar verilmiştir.



Şekil 2.9. mtDNA bölgelerine özgü tanımlanmış kardiyomiyopatiler ve diğer bazı kardiyak hastalıklar (Lee vd., 2017)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Etik Kurul Onayı, Güç Analizi, Proje Onayı ve Araştırma Grubu

Planlanan çalışma için 17.05.2019 tarihinde ESOGÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurulmuş, 28.05.2019 tarihinde çalışmanın etik açıdan uygunluğu 25403353-050.99-E6845 sayılı 2019-205 numaralı karar ile onaylanmıştır. Tüm katılımcılar bilgilendirilmiş ve aydınlatılmış onam formunu imzalamıştır.

PASS11 paket programı ile yapılan, tek orana ait güven aralığı yaklaşımı ile oluşturulan biyoistatistiksel güç analizinde %95'lik güven aralığı ile en az 32 primer kardiyomiyopati olgusunun çalışmaya alınması planlanmıştır.

Tasarlanan çalışma ESOGU Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne BAP- 2019-2753 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Çalışmamıza 32 bireyden oluşan hasta grubu ve 32 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. 5 hastadan alınan örneklerden yeterli DNA elde edilememiştir. Kontrol grubundaki 1 hastanın DNA dizileme sonuçlarının kalitesinin düşük olması sebebiyle çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışmada son haliyle 27 hasta ve 31 sağlıklı kontrol analizlerde yer alarak totalde 58 birey çalışmaya alınmıştır. Aksi belirtilmediği sürece hasta grubundaki bireyler mt1, mt2, mt3... şeklinde etiketlenmiş, kontrol grubuna ise MT1, MT2, MT3... etiketleri verilmiştir.

3.2. Tanı ve Örnek Toplama

Hastalara primer kardiyomiyopati tanısı (HKMP, DKMP, RKMP ve LVNC) ESOGÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı bünyesinde Çocuk Kardiyolojisi Bilim Dalı uzmanları tarafından ekokardiyografileri çekildikten sonra konulmuştur. Tıbbi genetik değerlendirilmeleri (sendromik bulguların olmaması, pedigri analizleri) ilgili uzmanlarca yapılmış ve mor kapaklı EDTA'lı tüplere alınan 1-3 mL kan örnekleri ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ulaştırılmış ve

tezi oluşturan işlemler Moleküler Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Gereçler

3.3.1. Kullanılan aletler

- Buzdolabı (Beko)
- Pipet Seti (Gilson ve Eppendorf)
- Plastik kapaklı tüpler 0,5 ve 1,5 ml ve PCR tüpleri (Eppendorf)
- DNA İzolasyon Cihazı (MagPurix-Zinexts Life Sciences Corp.)
- Spektrofotometre (NanoDrop 1000-Thermo Fisher Scientific)
- PCR cihazı (GeneAmp PCR System 9700-Applied Biosystems)
- MicroAmp 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific)
- Microamp Clear Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorometre (Qubit Fluorometric Quantifier-Thermo Fisher Scientific)
- Ion 530 ve 540 Chip Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Ion Chef Sistemi (Thermo Fisher Scientific)
- Ion S5 Sistemi (Thermo Fisher Scientific)

3.3.2. Kullanılan kitler ve kimyasallar

- DNA İzolasyon Kiti (MagPurix-Zinexts Life Sciences Corp.)
- Ion Ampliseq Library v2.0 Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Agencourt Ampure XP 60 ml (Beckmen Coulter)
- Etanol (Merck)
- Distile su
- Ion 530 ve 540 Chef Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Ion Express Barcode Adaptors 1-16 Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Ion Express Barcode Adaptors 17-32 Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Ion Express Barcode Adaptors 33-48 Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Ion Express Barcode Adaptors 49-64 Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

3.4. Yöntem

3.4.1. DNA izolasyonu

- Hastalardan ve kontrol grubundaki bireylerden alınan periferik kan örneklerinden 400 µl kullanılmıştır. Tüm DNA izolasyonu için üretici firmanın talimatları doğrultusunda MagPurix robotik sistemi ve kartuş şeklinde olan MagPurix DNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır.
- NanoDrop aracılığıyla ölçülen, 30-100 ng/µl konsantrasyonu aralığında 100 µl total genomik DNA izole edilmiş ve bu örnekler -20°C'de saklanmıştır.
- Dizileme için DNA örneklerinin konsantrasyonları amplifikasyon aşamalarından önce 50 ng/µl geçmeyecek şekilde distile su ile seyreltilmiştir. Son konsantrasyonlar Qubit dsDNA HS Assay Kit ve Qubit florometre aracılığıyla ölçülmüştür.

3.4.2. Kardiyomiyopati genlerinin dizilenmesi

- Kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu düşünülen 19 geni içeren (*ACTA2*, *ACTC1*, *ACTN2*, *CALR3*, *CAV1*, *CAV3*, *PRKAG2*, *SLC12A3*, *SLC19A2*, *SLC25A4*, *SLC22A5*, *SLC25A20*, *SLC2A10*, *SLC2A11*, *SLC52A2*, *SLC6A2*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*) panelin optimizasyonu 2 primer pool olarak yapılmış ve ticari bir kit olarak üretici firma tarafından markete sunulmaktadır. Bu kapsamda kardiyomiyopati fenotipinin genetik altyapısını araştırmak adına ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD'de üretici firmanın (Life Technologies) belirttiği prosedüre uygun kullanılmaktadır.
- Ion Chef ve Ion S5 Sistemi kullanılarak yeni nesil dizileme yöntemi ile 19 gen dizilenmiştir. Kütüphane hazırlığı, template oluşturma kit üreticisinin verdiği talimatlara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (Thermo Fisher Scientific-Life Sciences).
- Rutin hizmet kapsamında saptanan varyantlar biyoinformatik analiz ile değerlendirilerek raporlandırılmış ve hastalara genetik danışmalarıyla birlikte verilmiştir.

3.4.3. Tüm mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) dizilenmesi

3.4.3.1. Kütüphane hazırlığı

- Ion S5 Sistemi ile uyumlu, ilk aşama kütüphane (library) hazırlığı olmuştur. mtDNA 16,569 baz çiftinden(bç) oluşmaktadır. 81 primer çiftinden oluşan 2 ayrı pool içinden hazırlanacak olan kütüphane, 163 bçlik ampikonlardan oluşturulmuştur.
- PCR aşamasında, 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix(2 µl), Precision ID mtDNA panel Pool 1 ve 2 (ayrı ayrı hazırlanmak üzere 5 µl), nükleaz içermeyen 3 µl distile su ile birlikte hazırlanarak 9 µl mix tüplere dağıtılır. Sulandırılmış ve Qubit ölçümü yapılmış gDNA (1 µl) kullanılarak total hacim 10 µl olarak ayarlanmıştır. Bu işlemler soğuk plate üzerinde yapılmıştır. PCR protokolü aşağıda belirtilmiştir:
 - 99°C enzim aktivasyonu (2 dakika)
 - 99°C denatürasyon (15 saniye) (21 döngü)
 - 60°C bağlanma/eşleşme (4 dakika) (21 döngü)
 - 4°C Hold
- Protokol tamamlandıktan sonra iki ayrı pool çoklu-pipet ile bir araya getirilmiştir.
- Primerlerin bağlandığı bölgelerden kesim aşamasının gerçekleştirilmesi için FuPa enzimi kullanmış ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır:
 - 50°C (10 dakika)
 - 55°C (10 dakika)
 - 60°C (20 dakika)
 - 4°C (Hold)
- Bu aşamadan sonra çıkan ürünler en fazla 1 saat bekletilmiştir.
- Her bir örnek için farklı barkod numaraları oligonükleotid dizileriyle etiketlenmiş ve bu işlem barkod ligasyonu olarak adlandırılmıştır. İşlem yine buzlu plate üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ion Express Barcode Adaptors 1-64 Kiti kullanılarak aşağıdaki malzemeler her bir örneğe eklenmiştir:

- 4 µl Switch Solution
- Seyreltilmiş Barcode Adapter Mix (Örnek sayısı kadar, her örneğe spesifik) 2 µl
- DNA Ligaz 2 µl
- Her bir örneğe eklenen barkodların ligasyonu için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:
 - 22°C (30 dakika)
 - 72°C (10 dakika)
 - 4°C (Hold)
- Bu aşamadan sonra örnekler -20°C'de dizileme sürecine kadar saklanmıştır.
- Elde edilen barkodlanmış PCR ürünlerinin pürifikasyonu için Agencourt Ampure manyetik boncukları ve manyetik plate kitin protokolüne göre uygulanmıştır. Bu aşamada elde edilen ürün miktarının üzerine, 1,5 katı kadar manyetik boncuk dağıtılır (45 µl). Plate vortekslenir, oda sıcaklığında birkaç dakika bekletilip ve manyetik plate üzerine alınarak burada da 5 dk bekletilmiştir. Bu sırada her bir örnek için 269 µl EtOH ve 100 µl dH₂O koymak üzere bir solüsyon hazırlanmıştır.
- Manyetik plate üzerinden bekletilen plate içinden şeffaf kısım dikkatlice çekilip, üzerine hazırlanan etanol solüsyonundan 100 µl koyulmuştur. Manyetik plate üç kez sağ-sol şeklinde hareketlendirmiştir. Ve supernatant çekilerek uzaklaştırılmıştır (Bu aşamada boncukların kuruyup çatlamaması çok önemlidir). Etanol ile yıkama işleme 2 kez tekrarlanmıştır.
- Amplifikasyon karışımı her örnek için 45 µl Amplification Mix ve 1,8 µl Primer Mix koyularak hazırlanmıştır. Alkolü çekilen boncukların üzerine bu karışımdan 45 µl hemen dağıtılmıştır. Vortekslenir, spin attırılmıştır. Birkaç dakika manyetik plate üzerinde beklettikten sonra süpernatant temiz bir plate içine aktarılıp ve 15 dk süren Amplifikasyon PCR aşamasına geçilmiştir. Protokol aşağıdaki gibidir:

- 98 °C (2 dakika)
 - 98 °C (15 saniye) (6 döngü)
 - 65 °C (1 dakika) (6 döngü)
 - 40 °C (Hold)
- Bu aşamadan sonra tekrar pürifikasyon için tekrar manyetik boncuklar kullanılmıştır bu sefer dağıtılacak miktar örnek miktarının yarısı kadardır (22,5 µl). Total hacim üzerinden (67,5 µl) etanol yıkama işlemi aynen tekrar edilmiştir.
 - En son aşamaya gelindiğinde manyetik boncukların hala bulunduğu örnek üzerine 50 µl TE solüsyonu dağıtılmıştır, vortekslenmiş ve birkaç dakika bekletildikten sonra örnekler barkodlanmış ve etiketlenmiş tüplere ölçüm için aktarılmıştır.
 - Saflaştırılmış her bir örneğe ait kütüphane ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri Qubit dsDNA HS Assay Kit aracılığıyla Qubit fluorometrede yapılmıştır. Örneklerin konsantrasyonları 500 ile 5000 ng/µl arasında olacak şekilde distile su ile sulandırılmıştır.
 - Her örnekten 10 µl alınarak tek tüp içine konulmuş ve bu tüpten 25 µl alınarak Ion Chef cihazına yüklenmiştir.

3.4.3.2. Örneklerin çipe aktarılması

- Bu aşama Ion Chef cihazı tarafından yapılmıştır.
- Ion 530 ve 540 çipleri ve kitleri dizileme işlemi öncesinde cihaza yerleştirilmiştir.
- Ion Torrent Suit Software ile kütüphane bilgileri girilmiştir. Örneklerin isimleri girilmemiş çalışmaya alınış tarihine göre MITO-1, MITO-2, ... şeklinde numaralandırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları ayrı istasyonlarda gerçekleştiği için karışıklık olmamıştır.
- Software aracılığıyla uygun referans mtDNA dizisi (hg19 NC_012920) tanımlanmıştır.
- Ion Chef aşaması 10-14 saatlik bir işlem sonrasında tamamlanmıştır.

3.4.3.3. Dizileme reaksiyonu

- Örnekler Ion S5 cihazında DNA'nın polimerizasyonu sırasında salınan hidrojen iyonlarının saptanması üstüne kurulu sentezlenirken dizileme (sequencing by synthesis) adı verilen tekniğe dayanarak dizilenmiştir.
- Ion S5 cihazına yıkama solüsyonları ve dNTP kartuşları yerleştirilmiş ve kalibrasyonları tamamlanmıştır.
- Çipler cihaza yüklenmiş ve dizileme reaksiyonu her çip için yaklaşık 4 saat sürmüştür.
- Kardiyomiyopati ve tüm mtDNA paneli her hasta ve kontrol için Ion 530 Çip üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.4.3.4. Biyoinformatik analiz

DNA dizi verilerinin 5' ve 3' uçları daha önce sistemde belirlenen kalite parametreleri göz önüne alınarak, belli uzunluklarda (primer, A adaptör, P1 adaptör ve Barkod adaptör) kesilmiş (sequence trimming) ve ham dizi verileri (UBAM) Torrent Suit Software üzerinde elde dönüştürülmek üzere hazır hale getirilmiştir.

Ham dizi verisi Torrent Suit Software üzerinden elde edilmiştir. Veri kardiyomiyopati paneli için hg19'a, mtDNA için rCRS'nin oluşturduğu hg19 (GRCh37) NC_012920.1 (*Homo sapiens*, mtDNA) mitokondriyal DNA dizisine göre hizalanmıştır (alignment). Duplikasyonların uzaklaştırılması neticesinde Coverage Analysis-plugin aracılığıyla okuma derinliği ve kalite kontrol (QC) dosyaları (coverage analysis reports) oluşturulmuştur. GATK-plugins aracılığıyla lokal hizalama ve yeniden eşleştirme sonucunda okuma verileri tekrar oluşturulmuştur. QC yeniden iyileştirilmiş(refinement) olup, SAM dosyaları her bir ampikon için elde edilebilir hale getirilmiş ve hizalama ile birlikte binary alignment map (BAM) dosyaları oluşturulmuştur. Üretilen sekanslama sonuçlarının kalitesini değerlendirmek için okuma derinliği, *strand* dengesi ve *noise* gibi performans ölçümleri kullanılmıştır.

Torrent Variant Caller-plugin ile birlikte VCF (variant call format) oluşturulmuştur. BAM dosyaları Integrative Genomic Viewer (IGV) *consensus*

modda gözden geçirilmiş, sonuç görüntüleri olarak ekran görüntüleri alınmış ve varyant validasyonları yapılmıştır. Verilere ait dosyalar (.bam, .bambai, .vcf, .gz ve .xls uzantılı dosyalar) harici bir diske yedeklenmiştir.

Anotasyon işlemi için hazır hale getirilmiş varyantları içeren dosyalar kalite skorları belirlenerek analiz edilmiştir. Okuma derinliği elde edilememiş veriler istatistiksel bütünlüğü bozmamak adına çalışmadan çıkarılmış ve hasta grubu için 27 (n=27), kontrol grubu için (n=31) olarak totalde 58 birey (n=58) çalışmaya dahil edilmiştir.

Kardiyomiyopati ilişkili nDNA genlerinde saptanan varyantların IGV üzerinden değerlendirilmesi sonrasında 3' UTR ve/veya 5' UTR bölgelerindeki varyantlar ve kodlayan bölgedeki non-synonymous varyantlar değerlendirilmeye alınmıştır. Saptanan varyantların NCBI Genomic Workbench ve Data Viewer üzerinden yerleri konfirme edilmiş ve dbSNP üzerinden "rs" numaraları alınmıştır. *In silico* değerlendirmelerinde CADD (GRCh37-v1.6), MutationTaster2, PON-P2 ve kodlamayan bölgedeki varyantlar için ayrıca FATHMM kullanılmıştır (Niroula vd., 2015; Rentzsch vd., 2018; Rogers vd., 2017; Schwarz vd., 2014).

Mitokondriyal DNA üzerinde saptanan değişimlerin bulunduğu dosyalardaki varyant değerlendirmeleri için ise, hasta grubundaki tüm varyantlar 2 veya daha fazla hastada tekrar edenler ve sadece hastaya spesifik varyantlar olarak sınıflandırılmıştır. Saptanan varyantların kontrol grubunda olup olmadığı MS Excel üzerinde belirlenmiştir. Her hastada karşılaşılan, homopolimer bir bölgede saptanan bir varyant ise analiz dosyalarında tutulmuş fakat değerlendirmeye alınmamıştır. Heteroplazmi ve homoplazmi oranları Torrent Suite Software aracılığıyla oluşturulmuş dosyalar üzerinden alınmıştır.

Nadir varyantlar açısından, hasta grubunda tekrar etmeyen varyantların analizi için 2011 yılında Zaragoza ve ark.'nın kullandığı genomik frekans eşik değeri %0,5 kullanılmıştır (Zaragoza vd., 2011). Sonrasında mitokondriyal varyantların filtrelenmesi için revize eşik değeri olarak %0,2 varsa *novel* ve nadir varyantlara daha hızlı ulaşabilmek için ve karşılaştırma

yapmak için kullanılmıştır (J. Wang vd., 2012). Dolayısıyla çalışmamızdaki ilk filtre %0,2 olarak seçilmiştir, fakat bu eşik değerinin dışında kalan lakin literatürde kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş varyantlar da değerlendirilmek üzere atlanılmamıştır. Hastalarda saptanan tüm varyantlara ait NCBI Genomic Data Viewer üzerinde tanımlanmış 'rs' numaraları olup olmadığı değerlendirilmiş ve ClinVar veri tabanında tanımlı olup olmadıklarına bakılmıştır. İkinci filtrede ise nadir varyant olarak saptanan fakat missense olanlar değerlendirilmeye alınmıştır.

MitoSuite software aracılığı ile referans genoma hizalanmış tekli okumaları içeren .bam dosyaları üzerinden Phred kalite skorları (QC) elde edilmiş ve varyantların kalite kontrolleri yapılmıştır. Phred skoru 20'nin altında (≤ 20) olan varyantlar değerlendirilmeye alınmamıştır. Ayrıca .bam dosyaları yine MitoSuite aracılığıyla .fasta dosyasına okumadaki consensus sekansı verecek şekilde çevrilmiştir (Ishiya & Ueda, 2017). Varyant analizleri .fasta dosyaları kullanılarak Mitomap-MITOMASTER üzerinden gerçekleştirilmiştir (Lott vd., 2013). Ayrıca hasta grubunda saptanan varyantlar MSeqDR üzerinden de araştırılmış, HMTDB üzerinden son olarak popülasyon verileri ve korunmuşluk yüzdeleri elde edilmiştir (Clima vd., 2017; Shen vd., 2018). Patojenite skorları .vcf dosyaları üzerinden MitImpact 3D kullanılarak değerlendirilmiştir. Mitokondriyal tRNA varyantlarının değerlendirilmesi Mitomap üzerinden MitoTIP ve Pon-mt-tRNA araçlarıyla birlikte yapılmıştır (Castellana vd., 2015; Niroula & Vihinen, 2016).

3.4.3.5. Haplogrup analizi

Çoğunlukla D-Loop bölgesindeki (kontrol bölgesinde; "CR"; HSV-1,2,3) haplogrup varyantları ve diğer bazı bölgelerdeki haplogrup olarak sınıflandırılmış varyantlar tespit edilip bölgeye özgü polimorfizmler dünya popülasyonları ile karşılaştırılmak üzere bir haritalama çalışması planlanmıştır. Bu amaçla veriden oluşturulmuş .vcf ve consensus.fasta dosyaları, mtDNA-filogenetik ağaç için PhyloTree17 (revize edilmiş rCRS) kullanan Haplogrep(v.2) üzerinden değerlendirilmiş; kalite skorlarıyla birlikte alınarak gruplandırılmıştır (Weissensteiner vd., 2016).

3.4.3.6. İstatistiksel analiz

Hastaların demografik ve klinik özellikleri için basit istatistik değerlerden; aritmetik ortalamaları, standart sapma ve hataları hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarında saptanan varyant sayılarının ortalama karşılaştırmalarını yapmak adına, normalite için Shapiro-Wilk testini takip eden Mann-Whitney U kullanılmıştır.

İlk aşamada, saptanan varyantların karşılaştırmalı istatistiksel analizleri için, güven aralığı (CI) %95 olan çalışmamızda Ki-kare analizi yapılmıştır (X^2 /Fisher's Exact Test). İkinci aşamada ise saptanan varyantların Mitomap üzerinden alınan global frekansları ile karşılaştırmak için yine Ki-kare testi (global frekansın %0,00 olduğu durumlarda Fisher's Exact Test) uygulanmıştır.

Bu analizler R-paket programları (<https://cran.r-project.org/>) ve IBM SPSS 21 üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmamızın 0-18 yaş aralığında kardiyomiyopati tanısı almış 32 pediatrik olgunun ve 32 sağlıklı pediatrik olgunun katıldığı kontrol grubundan oluşturulması planlanmıştır. Hastalardan beş tanesinin örnek miktarının çok az olmasından dolayı yeterli DNA elde edilemediği için çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu hastalar süreç içerisinde ex olduğundan tekrar örnek alımı yapılmamıştır. Kontrol grubundaki tüm bireylerden yeterli DNA elde edilmiş fakat bir tanesinin yeni nesil dizileme sonrası QC (özellikle coverage ve okuma derinliği) değerlendirmesinden geçemediği için çalışmaya dahil edilmemiştir. 27 hasta ve 31 sağlıklı bireyden oluşan çalışma grubu değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmamız nadir bir hastalık grubu üzerinde kurgulandığı için ikinci bir güç analizi uygulanmamıştır.

27 hastadan 12 tanesi kadın ve 15 tanesi erkekten oluşurken; kontrol grubunda 21 kadın ve 10 erkek bulunmaktadır; totalde 33 (%57) kadın ve 25 (%43) erkekten oluşan 58 kişilik bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Hasta grubunun tanı yaşı ortalaması $8,26 \pm 1,26$ (Standart Hata) iken, kontrol grubunun $10,03 \pm 0,85$ (Standart Hata) olarak hesaplanmıştır. 15 HKMP hastasının yaş ortalaması 10,07; beş DKMP hastasının yaş ortalaması 3,20; beş LVNC hastasının 10,80 ve iki RKMP hastasının yaş ortalaması 1,0'dır. RKMP hastaları anne tarafından birinci dereceden kuzen olup ikisine de tanı bir yaşlarında konulmuştur ve HKMP hastalarından iki tanesi ise kardeştir. Hastaların ve kontrol grubunun genel özellikleri **Tablo 4.1'de** belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri

Fenotip	Sayısı (N)	Kadın - Erkek (N)	Yaş ortalaması
HKMP	15	4 - 11	10,07
DKMP	5	5 - 0	3,20
LVNC	5	2 - 3	10,00
RKMP	2	1 - 1	1,00
Toplam	27	12 - 15	8,26 ± 1,26 (St. Hata)
Kontrol	31	21 - 9	10,03 ± 0,85 (St. Hata)
Toplam	58	33 - 25	9,21 ± 0,74 (St. Hata)

4.2. NGS Sonuçlarının Kalite Kontrol (QC) Değerlendirmesi

Kardiyomiyopati panelinde bulunan genlerin okumaları Torrent Suit Software üzerindeki QC değerlendirmesine tabi tutularak filtrelenmiştir. Tüm örnekler için yeterli okuma derinliği her baz çiftine, 20x için %98,9 olarak hesaplanmıştır.

Mitokondriyal DNA değerlendirmelerinde MitoSuite aracılığıyla .bam dosyalarından Phred kalite skorları her varyant için elde edilmiştir. Hasta grubundan 27 olgudan 27 olgu, kontrol grubundan 32 olgudan 31 olguda saptanan tüm varyantların Phred QC $\geq 20,0$ olarak saptanmış ve değerlendirilmeye alınmıştır. Kontrol grubundan 1 örnek QC değerlendirmelerini geçemediği için değerlendirmeye alınmamıştır.

4.3. Olguların Kardiyomiyopati Gen Paneli NGS Bulguları

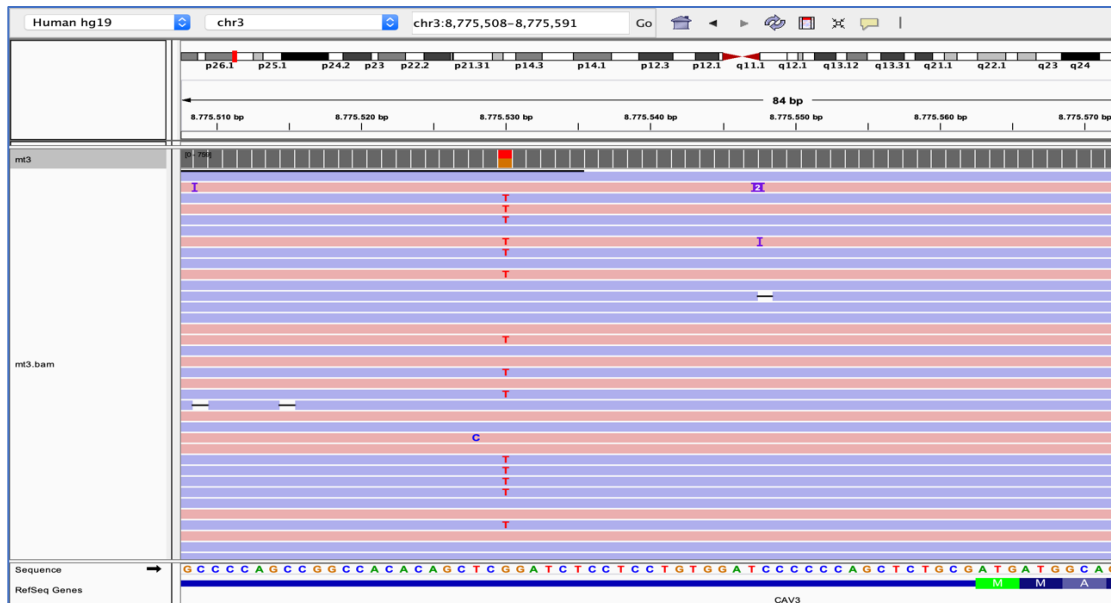
ESOGÜ Kardiyomiyopati NGS panelinde 19 gen bulunmaktadır. Bu kapsamda *ACTA2*, *ACTC1*, *ACTN2*, *CALR3*, *CAV1*, *CAV3*, *PRKAG2*, *SLC12A3*, *SLC19A2*, *SLC25A4*, *SLC22A5*, *SLC25A20*, *SLC2A10*, *SLC2A11*, *SLC52A2*, *SLC6A2*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2* genlerinin ekzonları incelenmektedir. 27 hastada NGS yöntemi ile dizilenen bu 19 genden *CAV3*, *TNNC1*, *TNNT2* ve *SLC22A5* genlerinde önemli olduğu düşünülen varyantlar tespit 5 hastada edilmiştir. Bu varyantlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Hasta grubunda saptanan önemli varyantların bilgileri.

Olgu	Fenotip	Gen	Varyant	Bölge	Referans
mt3	HKMP	CAV3	chr3:8775530G>T Heterozigot	5'UTR	GRCh37.p13 chr3
mt9	RKMP	TNNC1	chr3:52488009G>A Homozigot	Ekzon 1	GRCh37.p13 chr3
mt10	RKMP	TNNC1	chr3:52488009G>A Homozigot	Ekzon 1	GRCh37.p13 chr3
mt17	HKMP	TNNT2	chr1:201331069T>C Heterozigot	Ekzon 14	GRCh37.p13 chr1
mt25	HKMP	SLC22A5	chr5:131729936C>G Heterozigot	Ekzon 11	GRCh37.p13 chr5

4.3.1. CAV3 geninde saptanan varyant (mt3 olgusu; HKMP)

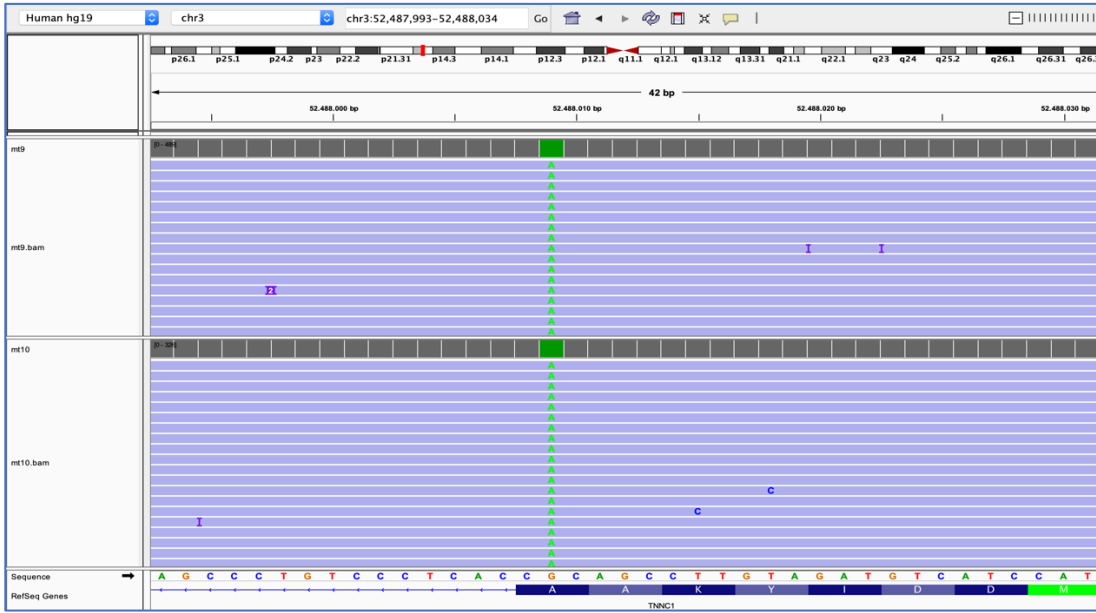
Hastalardan mt3'te CAV3 genine ait 5'UTR bölgesinde heterozigot G>T transversiyonu saptanmıştır. CAV3 geni 3. Kromozomda yer almaktadır ve bu gende saptanan varyantın referans genom GRCh37.p13 (hg19) üzerindeki lokalizasyonu 8,775,530. nükleotide denk gelmektedir. Bu değişim hg19 üzerinde g.8775530G>T, GRCh38.p12 referans genomunda g.8733844G>T şeklinde belirlenmiştir. Olguya ait IGV görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Hasta mt3'te saptanan CAV3 genine ait varyantın IGV görüntüsü.

4.3.2. *TNNC1* geninde saptanan varyant (mt9 ve mt10 olgusu; RKMP)

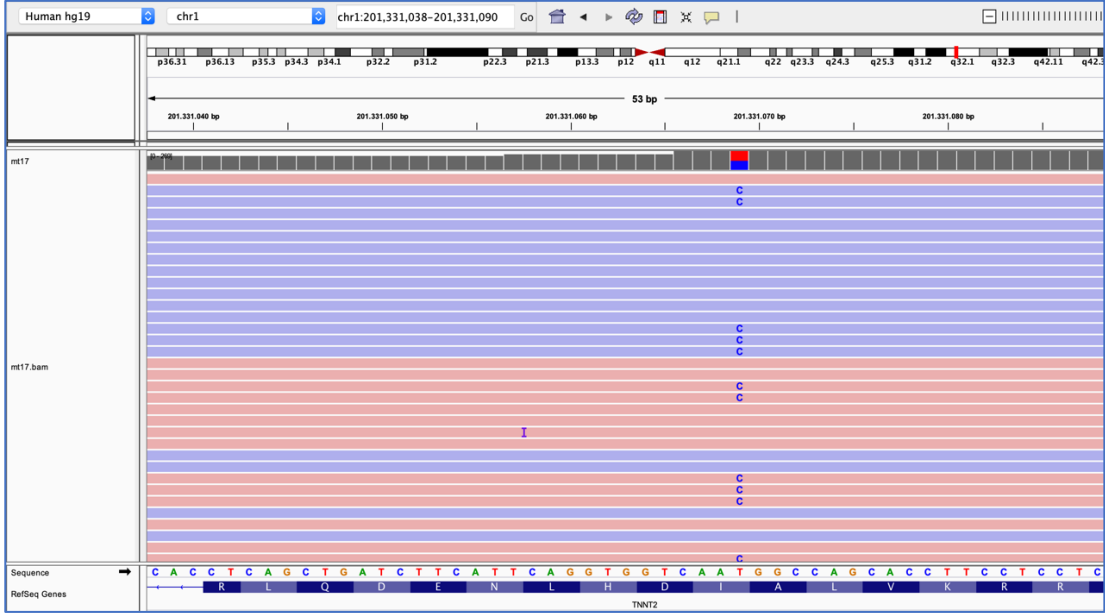
Hastalardan mt9 ve mt10'da *TNNC1* geninde heterozigot G>A transisyonu saptanmıştır. *TNNC1* geni 3. Kromozomda yer almaktadır ve bu gende saptanan varyantın referans genom GRCh37.p13 (hg19) üzerindeki lokalizasyonu 52,488,009. nükleotide denk gelmektedir. Bu değişim hg19 üzerinde g.52488009G>A, GRCh38.p12 referans genomunda g.52453993G>A şeklinde belirlenmiştir. Olguya ait IGV görüntüsü Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Hasta mt9 ve mt10'da saptanan *TNNC1* genine ait varyantın IGV görüntüsü.

4.3.3. *TNNT2* geninde saptanan varyant (mt17 olgusu; HKMP)

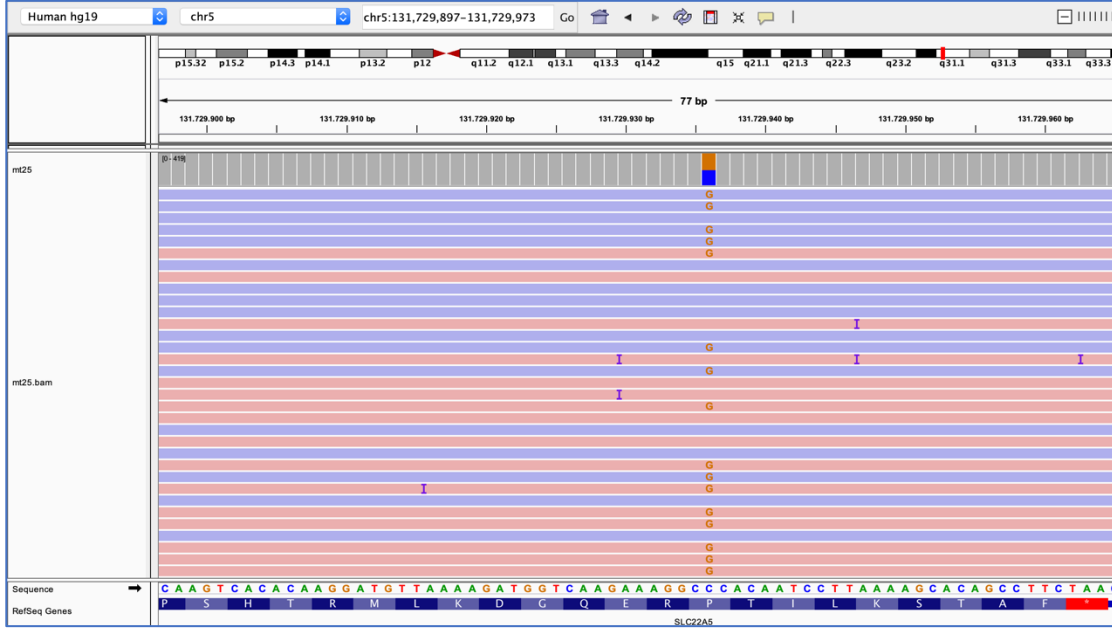
Hastalardan mt17'de *TNNT2* geninde heterozigot T>C transisyonu saptanmıştır. *TNNT2* geni 1. Kromozomda yer almaktadır ve bu gende saptanan varyantın referans genom GRCh37.p13 (hg19) üzerindeki lokalizasyonu 201,331,069. nükleotide denk gelmektedir. Bu değişim hg19 üzerinde g.8775530GT>C, GRCh38.p12 referans genomunda g.201361941T>C şeklinde belirlenmiştir. Olguya ait IGV görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Hasta mt17’de saptanan *TNNT2* genine ait varyantın IGV görüntüsü.

4.3.4. *SLC22A5* geninde saptanan varyant (*mt25* olgusu; *HKMP*)

Hastalardan mt25’de *SLC22A5* geninde heterozigot C>G transversiyonu saptanmıştır. *SLC22A5* geni 5. kromozomda yer almaktadır ve bu gende saptanan varyantın referans genom GRCh37.p13 (hg19) üzerindeki lokalizasyonu 131,729,936. nükleotide denk gelmektedir. Bu değişim hg19 üzerinde g.131729936C>G, GRCh38.p12 referans genomunda g.132394244C>G şeklinde belirlenmiştir. Olguya ait IGV görüntüsü **Şekil 4.4’de** gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Hasta mt25’de saptanan *SLC22A5* genine ait varyantın IGV görüntüsü.

4.4. mtDNA NGS Bulguları

Hasta grubunu oluşturan 27 bireyin tüm mtDNA dizilemeleri neticesinde toplam 677 varyant saptanırken, 31 kişilik kontrol grubunda toplam 767 varyant saptanmış hasta başına düşen varyant sayısının ortalaması sırasıyla $25,07 \pm 1,94$ (St. Hata) ve $24,74 \pm 2,19$ (St. Hata) olarak hesaplanmıştır.

Hasta grubundaki varyantlardan yalnızca 5 hastada saptanan 7 varyant heteroplazmik özellik göstermektedir. Bunlar; mt16’da saptanan m.16184C>T (%34), mt18’de saptanan m.8286T>C (%37,6), mt22’de saptanan m.3918G>A (%30), mt25’te saptanan m.9053G>A ve m.10045T>C (sırasıyla %87,5 ve %92,3) ve mt26’da saptanan m.16189Tdel (%66,1) şeklindedir. Çalışmamızdaki diğer tüm varyantlar homoplazmik (≥ 99) özellik göstermektedir.

Hasta grubunda birbirinden farklı 264 farklı varyant tespit edilmiştir. Hasta grubunda incelen varyantların 70 (%26,52) tanesi hasta grubunda iki veya daha fazla bireyde bulunmaktadır ve totalde 482 varyanta denk gelmektedir. Birbirinden farklı 264 farklı varyant arasından birbirinden farklı 20 tanesi (20/264; %7,58) kontrol grubunda saptanmamıştır ve hasta

grubunda tekrar etmiştir. Hasta grubunda tekrar etmeyen (hastaya özgü) varyant sayısı ise 194 (194/264; %73,48) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 194 spesifik varyant arasından kontrol grubunda çıkmayan 144 tane varyant bulunmaktadır. Hasta grubunda tekrar eden fakat kontrol grubunda saptanmayan 20 farklı varyanttan yalnız 3 tanesi HKMP tanılı iki kardeşe (mt3 ve mt4), sadece başka 3 tanesi ise RKMP tanılı iki kuzene (mt9 ve mt10) aittir. Bu durumda yüzdeler tekrar hesaplandığında (akraba varyantlarını tek bir varyant olarak kabul edersek) 64 (%24,24) tane tekrar eden ve kontrol grubunda olmayan varyant, 200 (%75,76) tane spesifik varyant karşımıza çıkmaktadır. Yine benzer şekilde bu akrabaların tekrar eden varyantları çıkarıldığında hasta grubunda tekrar eden fakat kontrolde saptanmayan 14 (%5,30) adet varyant kalmaktadır.

Kontrol grubunda saptanmayan birbirinden farklı 20 varyant ve ait olduğu hastalar, bulunduğu bölgeler Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Tablo 4.3'te verilen birbirinden farklı 20 varyant totalde 41 olguyu kapsamıştır Tablo 4.3.'te belirtilen varyantlar bu aşamada synonymous, haplogrup ve kodlanmayan bölgedeki veya kontrol bölgesindeki (CR) varyantlar elenmiştir. Geriye kalan 5 varyant (*) işareti ile belirtilmiştir.

Tablo 4.3. Kontrol grubunda saptanmayan hasta grubunda tekrarlayan mtDNA varyant listesi.

Sıra	Hastalar	Fenotip	SNV	Bölge	Frekansı
1	mt12-mt27	HKMP-LVNC	T1189C *	MT-RNR1	2/27
2	mt12-mt20-mt27	HKMP-LVNC-LVNC	A3480G	MT-ND1	3/27
3	mt9-mt10	RKMP-RKMP	A5198G	MT-ND2	2/27
4	mt9-mt10	RKMP-RKMP	G5231A	MT-ND2	2/27
5	mt3-mt4	HKMP-HKMP	T6345C *	MT-CO1	2/27
6	mt3-mt4	HKMP-HKMP	G7521A	MT-TD	2/27
7	mt2-mt17	HKMP-HKMP	G8269A	MT-CO2	2/27
8	mt20-mt27	LVNC-LVNC	G9055A *	MT-ATP6	2/27
9	mt12-mt20	HKMP-LVNC	T9698C	MT-CO3	2/27
10	mt3-mt4	HKMP-HKMP	G9966A *	MT-CO3	2/27
11	mt12-mt27	HKMP-LVNC	A10550G	MT-ND4L	2/27
12	mt12-mt27	HKMP-LVNC	T11299C	MT-ND4	2/27
13	mt9-mt10	RKMP-RKMP	C12346T *	MT-ND5	2/27
14	mt20-mt27	LVNC-LVNC	G12771A	MT-ND5	2/27
15	mt12-mt24	HKMP-DKMP	A13827G	MT-ND5	2/27
16	mt12-mt27	HKMP-LVNC	C14167T	MT-ND6	2/27
17	mt12-mt27	HKMP-LVNC	T16224C	HV1	2/27
18	mt2-mt23	HKMP-DKMP	C16287T	HV1	2/27
19	mt6-mt13	HKMP-HKMP	C16291T	HV1	2/27
20	mt5-mt6	DKMP-HKMP	G16390A	Noncoding	2/27
Top.	41	-	-	-	20/264 (%7,58)

Kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş, hasta grubunda tekrarlayan ve aynı zamanda kontrol grubunda da saptanmış bir varyant Tablo 4.4'te verilmiştir. Bu varyant (m.12308A>G) olgulardan DKMP hastası mt5 ve mt'te, HKMP hastası mt12, mt14, mt16'da ve LVNC hastası mt20 ve mt27'de saptanmıştır.

Tablo 4.4. Kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş bir mtDNA varyantı ve frekansı.

Sıra	Frekansı (n/N)	mtDNA SNV	Kontroldeki Sayısı (n/N)
1	7 (7/27)	A12308G	4 (4/31)

Hasta grubunda tespit edilen tekrar etmeyen (sadece hastalara özgü) 194 varyant arasından biyoinformatik analizler neticesinde kalite kontrolü (Phred skoru ≥ 20 ve homopolimer okuma hatasına bağlı olmayan) geçmiş varyantlar değerlendirmeye alınmıştır. Totalde 183 transisyon, 5 transversiyon, 5 insersiyon ve 1 çok-nükleotid değişimi (MNP) saptanmıştır. Öncelikle nadir varyant olarak GB'de (Mitomap üzerinden değerlendirilen GenBank veri tabanında) global frekansı %0,2'den düşük olan 52 (%26,94) varyant tespit edilmiştir. Bu 52 varyanttan, 37 tanesi (%68,52) protein kodlayan bölgede olup bunlar arasından missense mutasyon olan 8 tanesine ek olarak 4'ü synonymous ve 1 tanesi kodlanmayan frekansı %0,0 olarak verilmiş 5 varyant toplamda 13 varyant listelenmiştir.

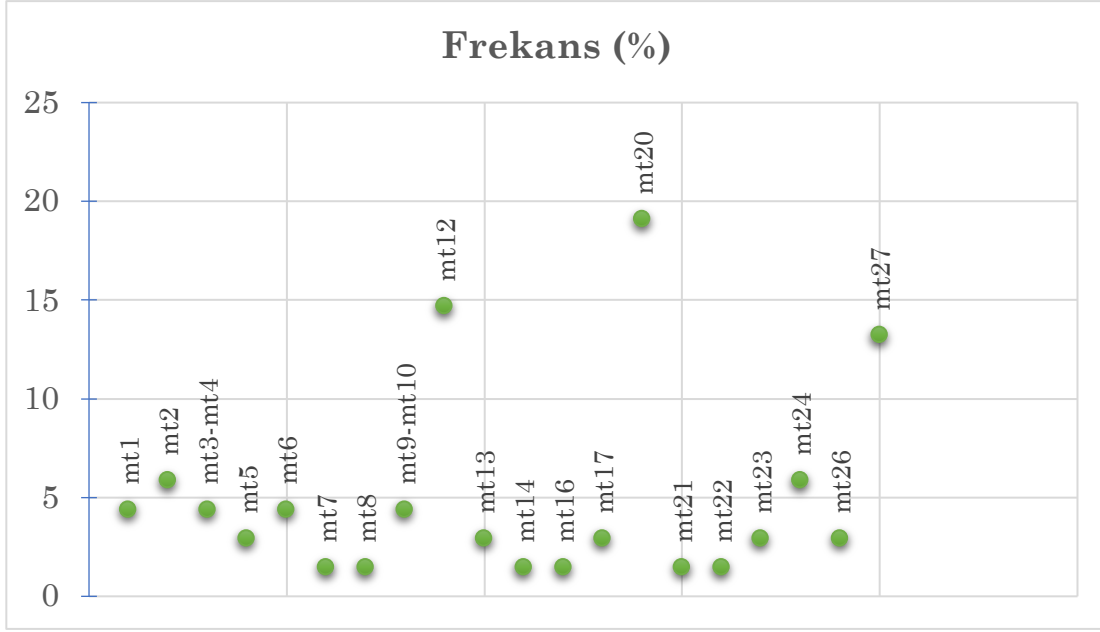
Bu listeye tRNA varyantları için; bir tanesi (MT-TH: G12192A) kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş olduğu için ve bir tanesi de *in silico* MitoTIP skoruyla %25 persentilin üstünde olduğu için totalde 2 tanesi de dahil edilmiştir. Ayrıca RNR1 geni üzerindeki değişimler için kardiyomiyopati açısından patojenite bildirilmiş 2 varyant ve 1 tane de *novel* olduğunu düşündüğümüz totalde 3 varyant da değerlendirilmeye alınmıştır. Ayrıca HV1 bölgesinde, MITOMASTER'da kardiyomiyopati ile ilişkili bir varyant da bu listeye eklenmiştir.

Bu filtreler ile birlikte 194 tekrar etmeyen varyant arasından toplam 20 varyant Tablo 4.5'te belirtilmiştir. Bu 20 varyanttan 3 tanesiyle, en çok varyant saptanan hasta mt20'ye aittir. Bu listeden synonymous olan ve kontrol bölgesinde olan varyantlar filtrelenmiş, geriye kalan 14 varyant (*) ile işaretlenmiştir.

Tablo 4.5. Filtreler sonrasında hasta grubunda saptanan tekrar etmeyen mtDNA varyantları.

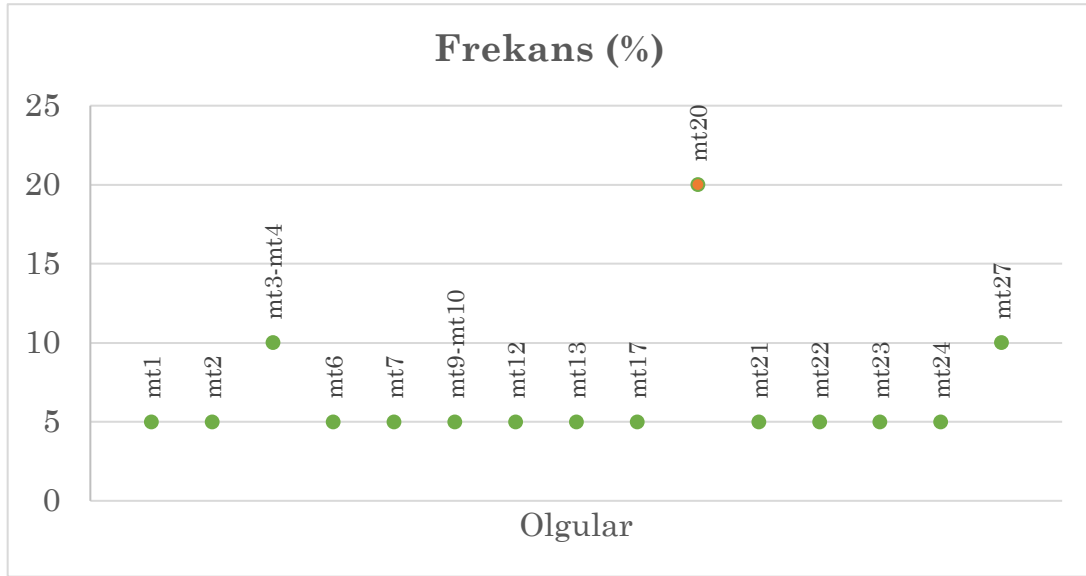
Sıra	Hasta	Fenotip	SNV	Bölge	Kontroldeki Sayısı
1	mt20	LVNC	T684C*	MT-RNR1	0
2	mt6	HKMP	T721C*	MT-RNR1	0
3	mt24	DKMP	T961C*	MT-RNR1	1
4	mt1	HKMP	T4475C	MT-ND2	0
5	mt26	LVNC	A4757G	MT-ND2	0
6	mt24	DKMP	-5895C	Non-Coding	0
7	mt20	LVNC	C6546T*	MT-CO1	0
8	mt8	HKMP	A6977G	MT-CO1	0
9	mt2	HKMP	G8743A*	ATP6	0
10	mt20	LVNC	G9948A*	MT-CO3	0
11	mt17	HKMP	A10044G*	MT-TG	0
12	mt21	LVNC	T10345C*	MT-ND3	0
13	mt2	HKMP	C11268T*	MT-ND4	0
14	mt1	HKMP	G12192A*	MT-TH	2
15	mt22	HKMP	A12490G*	MT-ND5	0
16	mt1	HKMP	A14010G	MT-ND5	2
17	mt23	DKMP	G14258A*	MT-ND6	0
18	mt7	HKMP	A14693G*	MT-TE	0
19	mt13	HKMP	T15519C*	MT-CYTB	0
20	mt26	LVNC	T16189C	MT-HV1	4
Toplam	20	-	-	-	11

Uygulanan filtreler sonrasında değerlendirilmeye alınan varyantların hepsi homoplazmiktir. Değerlendirilmeye alınmış tüm varyantların (41/264; %15,53) hastalar arasındaki dağılımı ise Şekil 4.5'teki grafikte gösterilmiştir. Şekil 4.5.'te Tablo 4.3'teki varyantlar arasından akraba olan mt3-mt4 ve mt9-mt10 tek şekilde gruplandırılarak, anlamlı olduğu düşünülen tüm varyantların (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5 dahil edilip) hastalar arasındaki paylaşımı hesaplanarak oluşturulmuştur. Bu hesaplama sonrası anlamlı olduğu düşünülen en çok varyant sayısına sahip hasta %19,12 ile mt20, ikincisi %14,71 ile mt12 ve üçüncüsü %13,24 ile mt27 olurken; mt11, mt15 ve mt25 olgularında değerlendirilmeye alınacak herhangi bir varyant saptanmamıştır.



Şekil 4.5. Anlamli olduğu düşünölen tüm varyantların hastalar arasındaki dağılımı.

İkinci bir filtre olarak; synonymous, haplogrup ve kodlanmayan bölgedeki veya kontrol bölgesindeki (CR) varyantlar elenerek (*) ile işaretlenmiş varyantların (20/264; %7,58) dağılımı ise Şekil 4.6'daki grafikte gösterilmiştir.

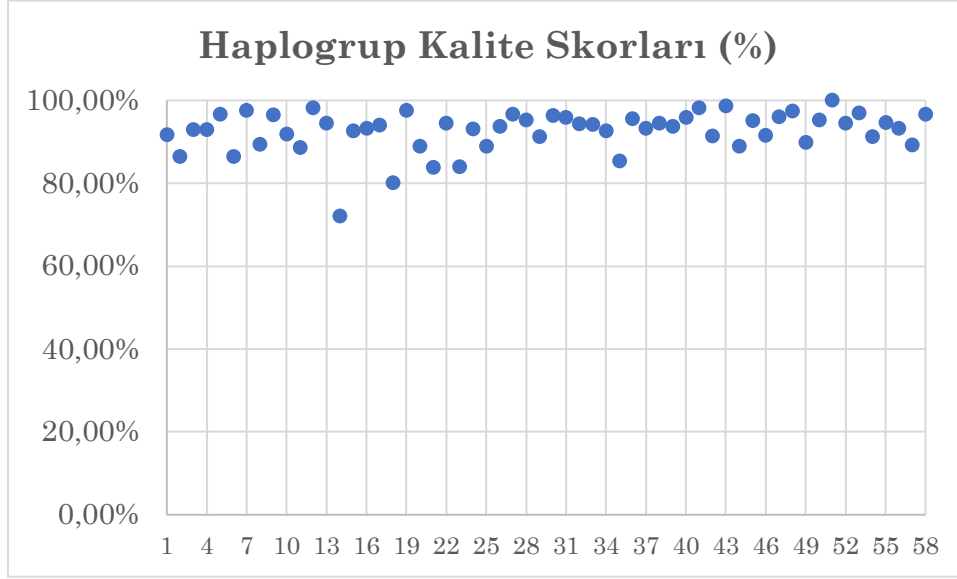


Şekil 4.6. Missense varyantların hastalar arasındaki yüzdelerik dağılımı

4.5. Mitokondriyal Haplogrup Analiz Bulguları

Haplogrep2 üzerinden yapılan analiz sonuçları hasta ve kontrol gruplarına ayrılmamıştır. Totalde 58 bireyin analizi yapılmış, kalite skorları

Şekil 4.7'de gösterilmiştir. 58 örnek için ortalama kalite skoru $92,64 \pm 0,006$ (St. Hata) olarak hesaplanmıştır.

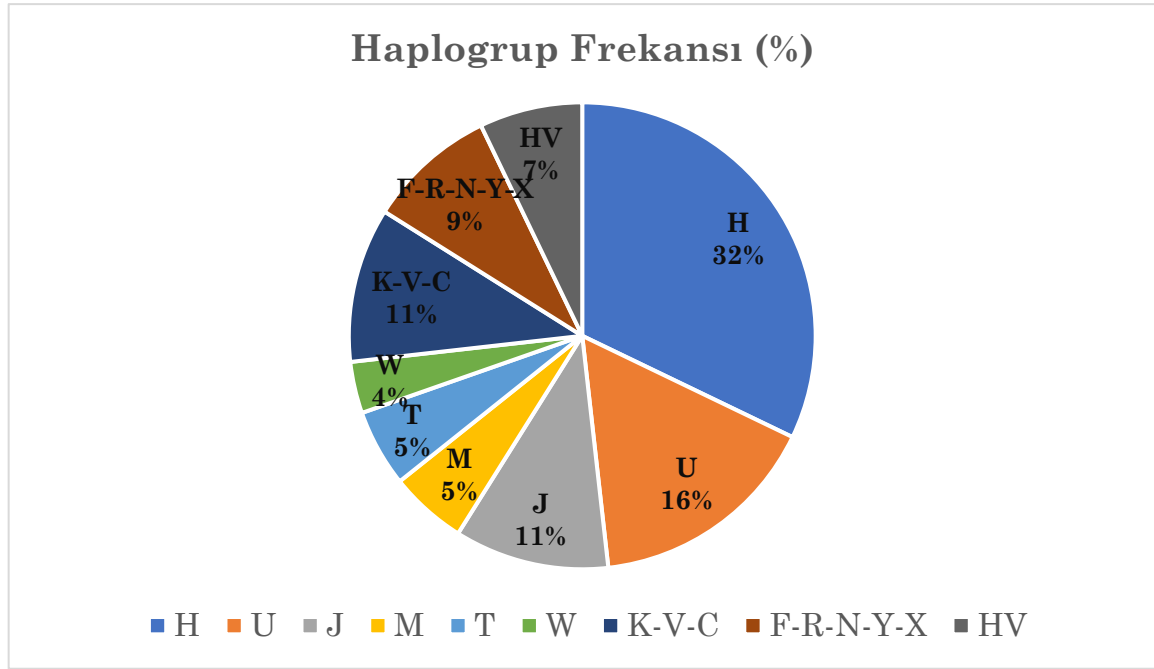


Şekil 4.7. .vcf ve .fasta dosyalarından çıkan HaploGrep2 kalite skorları.

Aynı varyantları taşıyan akraba bireylerin sadece biri çalışmaya dahil edilerek toplamda 56 birey üzerinden gerçekleşen büyük (majör) haplogrup dağılımına baktığımız zaman, en yüksek frekansta H (%32), U (%16) ve J (%11) grupları karşımıza çıkmaktadır. Tüm bireylerin haplogrupları Tablo 4.6'da verilirken, yüksek frekanslı üç grubun ve diğer saptanan grupların yüzdelik dağılımı Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. 58 bireyin haplogrup sonuçları.

Örnek No	Haplogrup	Örnek No	Haplogrup
1	HV14a	30	U3b2a1a
2	J1b4a	31	H3h5
3	J1c	32	W+194
4	J1c	33	U5a2+16362
5	U3a2a	34	H4
6	H85	35	H
7	Y1a1	36	T2b
8	W1+119	37	F1b1+152
9	J1c5	38	H14a
10	J1c5	39	M10a1a1a
11	H+16129	40	V
12	K1a4c1	41	J2b1a5
13	H34	42	H3v
14	U5b2a2	43	U4c1
15	H20	44	H4
16	U5a1	45	R0a1a1
17	H4a1a1a	46	H5a1
18	H	47	HV16
19	J1c2	48	H4
20	U8b1a1	49	H1a
21	M7b1a1a1	50	T2b4+152
22	V1a1b	51	J1c4b
23	T2c1f	52	C4d
24	U1a1a3	53	M37e
25	H	54	HV14a
26	X2	55	N1a3a
27	K1b2a	56	H11a2
28	U5a1g	57	H14a
29	HV14a	58	C4a1a4a



Şekil 4.8. Çalışmamız kapsamında saptanan haplogrupların yüzdelerik dağılımı (N=56).

4.6. İstatistiksel Analiz

Hasta grubunu oluşturan 27 bireyin tüm mtDNA dizilemeleri neticesinde toplam 677 varyant saptanırken, 31 kişilik kontrol grubunda toplam 767 varyant saptanmış hasta başına düşen varyant sayısının ortalaması sırasıyla $25,07 \pm 1,94$ (St. Hata) ve $24,74 \pm 2,19$ (St. Hata) olarak hesaplanmıştır. Toplamda ise 58 bireyde saptanan varyant sayısı ortalaması $24,90 \pm 1,46$ (St. Hata) olarak hesaplanmıştır. Ortalama varyant sayılarının istatistiksel değerini hesaplamak için; Shapiro Wilk Testi sonrası hasta ve kontrol grubundaki dağılımın normal olmadığı saptanmıştır ($p=0,009<0,05$). Bu yüzden Mann Whitney U Testi uygulanmış ve p_1 değeri elde edilmiştir. Bu neticede hasta ve kontrol grubu arasında varyant sayısı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p_1=0,907>0,05$).

İlk filtreyle elde edilen hasta ve kontrol grubunda saptanan/saptanmayan varyantlar (Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5) için uygulanan Fisher Exact Test sonrası varyantların hiçbirinde istatistiksel anlamlılık gözlemlenmemiştir (Üç farklı p_2 -değeri saptanmıştır; $p_2=0,456>0,05$; $p_2=0,195>0,05$; $p_2=0,07>0,05$).

İkinci değerlendirme ile işaretli varyantların Mitomap-GB'den alınan global frekansları ile karşılaştırılarak ikinci bir analiz uygulanmıştır. Bu ikinci kısımda Ki-kare ve/veya Fisher's Exact Testi kullanılmış ve saptanan p_3 -değerleri Tablo 4.7'de gösterilmiş ve bu uygulama sonrasında anlamlı olan ($p_3 < 0,05$) varyantlar tabloda '**' ile işaretlenmiştir. Kontrol grubunda oldukça yüksek frekansa sahip varyantlardan m.12308 ve m.16189 istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0,05$) saptanmış ve bu yüzden Tablo 4.9'a dahil edilmemiştir.

Tablo 4.7. Saptanan varyantların global frekanslarla karşılaştırılmasından sonra elde edilen p_3 -değerleri.

mtDNA SNV	Fisher's	Ki-kare	mtDNA SNV	Fisher's	Ki-kare
T684C **	0,0005	-	A3480G	0,0883	0,05507
T721C *	0,0658	0,0003	A5198G	0,002	0,00001
T961C *	0,2104	0,113	G5231A	0,1257	0,07448
T4475C	0,0005	-	T6345C **	0,0001	0,00001
A4757G	0,0005	-	G7521A	0,9999	0,8995
-5895C	0,0005	-	G8269A	0,0487	0,00541
C6546T **	0,0141	0,00001	G9055A *	0,3197	0,416391
A6977G	0,0005	-	T9698C	0,3101	0,3782
G8743A **	0,0084	0,00001	G9966A *	0,015	0,000026
G9948A *	0,0403	0,00001	A10550G	0,015	0,000026
A10044G *	0,0708	0,00006	T11299C	0,3116	0,7071
T10345C *	0,0403	0,00001	C12346T **	0,0009	0,00001
C11268T **	0,0084	0,00001	G12771A	0,0367	0,01933
G12192A *	0,0584	0,0001	A13827G	0,0001	0,00001
A12490G **	0,0219	0,00001	C14167T	0,2792	0,3369
A14010G	1	-	T16224C	0,3197	0,416391
G14258A **	0,0141	0,00001	C16287T	0,0098	0,00001
A14693G *	0,1316	0,0216	C16291T	0,1601	0,1242
T15519C *	0,0504	0,000029	G16390A	0,6692	0,7227
T1189C *	0,2225	0,2092			

5. TARTIŞMA

Kardiyomiyopati genetik olarak heterojen bir hastalık olup miyokard defekti olarak birbirine benzer şekillerde ortaya çıkabilmekte fakat son zamanlarda sınıflandırmaları ve ayırıcı tanısında artık moleküler ve genetik bilgilerin entegrasyonu sık kullanılır hale gelmiştir (McCartan vd., 2012). Hem çekirdek DNA'sı üzerinde lokalize kardiyomiyopati ile ilişkili genlerde hem de mtDNA üzerindeki varyantların incelenmesi hem kardiyomiyopatinin etyopatogenezini açıklamaya yardımcı olması hem de etnik/bölgesel farklılıkların bu tür hastalıklara yatkınlığının araştırılması açısından son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Biz de bu bağlamda çalışmamızda pediatrik kardiyomiyopati vakaları ve kontrol grubunda hastalık ilişkili nDNA'da bulunan 19 gen ve tüm mtDNA incelemesi gerçekleştirdik.

5.1. Kardiyomiyopati Panelinde Saptanan SNV'lerin *In Silico* Değerlendirmesi

Kardiyomiyopati panelinden sonra hastalarda saptanan varyantların bilgileri ve *in silico* değerleri ve Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Kardiyomiyopati panelinde hastalara ait saptanan anlamlı varyantlar ve *in silico* patojenite değerlendirmeleri.

Olgu	Fenotip	Gen	Bölge	AA Değişimi	CADD	PON - P2	Mutation Taster2	FATHMM
mt3	HKMP	CAV3	5'UTR	*	1,9	*	Polimorfizm	0,189
mt9 - mt10	HKMP	TNNC1	Mis	p.8A>V	26,2	0,605 (0,117 St. H.)	Hastalık Yapıcı	0,974
mt17	HKMP	TNNT2	Mis	p.231I>V	22,1	0,262 (0,067 St. H.)	Hastalık Yapıcı	0,952
mt25	HKMP	SLC22A5	Mis	p.549P>R	21,4	0,599 (0,087 St. H.)	Polimorfizm	0,127

Combined Annotation Dependent Depletion (CADD), bir SNV için patojeniteyi analiz ederken çok geniş veri tabanlarını birleştirip, anotasyon

için ENCODE projesinden alınan veriyi Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) ve UCSC Genome Browser ile birleştirerek gerçekleştirir. Patojenite tahmini için kullanılan birçok parametreyi (SIFT, PolyPhen2, Grantham, GERP gibi) çeşitli ağırlıklarla analiz ederek bir skor hesaplamaktadır. Eğer bir varyant için $CADD \geq 20,0$ şeklinde saptanırsa o varyant en zararlı %1'lik dilimde bulunmaktadır. $CADD = 10,0$ için bu değer %10 iken, $CADD = 30$ için bu değer %0,1'lik dilime denk gelmektedir. Kodlayan bölgede oldukça güvenilir olan bu araç için, Rentsch ve ark. CADD'ı oluşturduktan sonra, kodlanmayan ve özellikle regülatör veya splice bölgelerdeki varyantlara yönelik skorlama işlemlerinin çalışmaları hala sürmekte olduğunu belirtmişlerdir (Rentsch vd., 2018). Tablo 5.1'de gösterildiği üzere kodlayan bölgedeki değerler varyantların patojenite skorunun CADD açısından yüksek olduğu belirtmiştir. 5'UTR bölgesindeki varyant için CADD skorunun güvenilir olduğunu söylemek ölçümün daha çok yapısal protein tahmin modellerine ağırlık vermesinden dolayı mümkün değildir. MutationTaster2 ise patojeniteye dair tahminler yaparken 1000 Genomes, Ensembl, ExAc ClinVar, UniProt ve phyloP veri tabanlarını entegre etmektedir (Schwarz vd., 2014). Bu web tabanlı araç varyantlardan; CADD'ın patojenitesini yüksek olarak sınıflandırdığı *SLC22A5* üzerinde olan heterozigot varyantı polimorfizm olarak bildirmiştir. PON-P2, DNA dizilerinin evrimsel korunmuşluğunu, amino asitlerin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini, GO (Gene Ontology Project) anotasyonlarını ve varsa varyasyon bölgelerindeki fonksiyonel bilgileri birleştirerek kullanır ve algoritmasında aynı zamanda yapay zeka barındıran bir araçtır (Niroula vd., 2015). Zararlı varyantları taramak, deneysel karakterizasyonu sıralamak ve önceliklendirmek için diğer birçok araçla karşılaştırıldığında (özellikle çok kullanılan SIFT ve PolyPhen2 ile karşılaştırıldığında), PON-P2 performansı en güçlü olan araç olarak belirtilmiştir (Riera vd., 2016). Değerlere bakıldığında 0 – 1 aralığında değerlendirilen patojenite skorunun en yüksekini yine *TNNC1* üzerinde saptanan missense varyanta ait olduğu görülmektedir. Güvenilirliği yüksek çıkan başka bir araç ise Functional Analysis through Hidden Markov Models (FATHMM) v2.3'tür (Niroula & Vihinen, 2018). Bu araç ENCODE projesinin

fonksiyonel anotasyonlarını kendi bünyesindeki nükleotid bazlı modellerle (HMM) bütünleştirir. Hem kodlayan hem de kodlamayan değişkenlerle ilgili tahminler döndürmek için kullanılan bu araçta analiz edilen varyantlar, çalışmamızda saptanan *CAV3* 5'UTR varyantı gibi; FATHMM skoru $\leq 0,5$ çıkarsa benign olarak sınıflandırılır (Rogers vd., 2017).

Bu bilgiler dahilinde henüz aile taraması yapılmamış bu bireylerde, ACMG'nin sunduğu PS1 ve PS4 (güçlü olarak kabule edilen; sırasıyla amino asit değişikliğine yol açan patojenitesi bulunan varyant olma ve istatistiksel olarak kontrol grubuna göre yüksek frekansta olma durumu) kriterine göre yüksek ihtimalle patojenik olan *TNNC1* varyantı RKMP etyopatogenezine kuvvetle muhtemel etki etmektedir. Diğer varyantlardan *TNNT2*'ye ait olanının PON-P2 değerinin düşük, FATHMM ve CADD skorunun yüksek olması çelişkili bir sonuç ortaya koymuş olsa da patojenik bir varyant olma olasılığı yüksektir. Diğer iki varyanttan *CAV3*'teki tüm skorlarda benign olarak görülmekte, *SLC22A5* üzerindeki SNP için ise VUS sınıflandırmasını öne sürmekteyiz (Richards vd., 2015).

5.1.1. Olgu *mt3*'te saptanan *CAV3* varyantı: 3-8775530-G-T (GRCh37)

CAV3, diğer iki üyesiyle birlikte kaveolin protein ailesinin bir üyesi olup, diğerlerinden farklı olarak sadece çizgili kas dokusuna spesifik membranöz kaveola proteini oluşturmak üzere eksprese olmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda yayınlanan araştırmalarda, bu gende meydana gelen mutasyonların distal miyopatiden, dalgalanan kas hastalığına(rippling muscle disorder-RMD) ve Limb-Girdle müsküler distrofiye (LGMD veya RMD2) kadar bazı kas hastalıkları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Galbiati & Lisanti, 2013). Bu fenotiplerden farklı olarak kardiyomiyopati ile ilişkisi olabileceğini araştıran Hayashi ve ark.'larının, iskelet kaslarında bir rahatsızlığı bulunmayan ve HKMP'si bulunan iki erkek kardeşte *CAV3* üzerindeki hipertrofi ile ilişkili sinyal molekülleri ile etkileşen scaffold bölgesini kodlayan noktada missense bir mutasyonu saptamasıyla, genin fenotipik spektrumunda HKMP'nin de bulunduğunu öne sürülmüştür (Hayashi vd., 2004). Öte yandan 2015 yılında 97 kardiyomiyopati hatasında incelenen ve kontrol grubu

bulunduran CAV3 geninde yapılan bir araştırmada ise kardiyomiyopati etyopatogenezini etkilediğine dair bir sonuç bulunmamıştır (Stavusis vd., 2015).

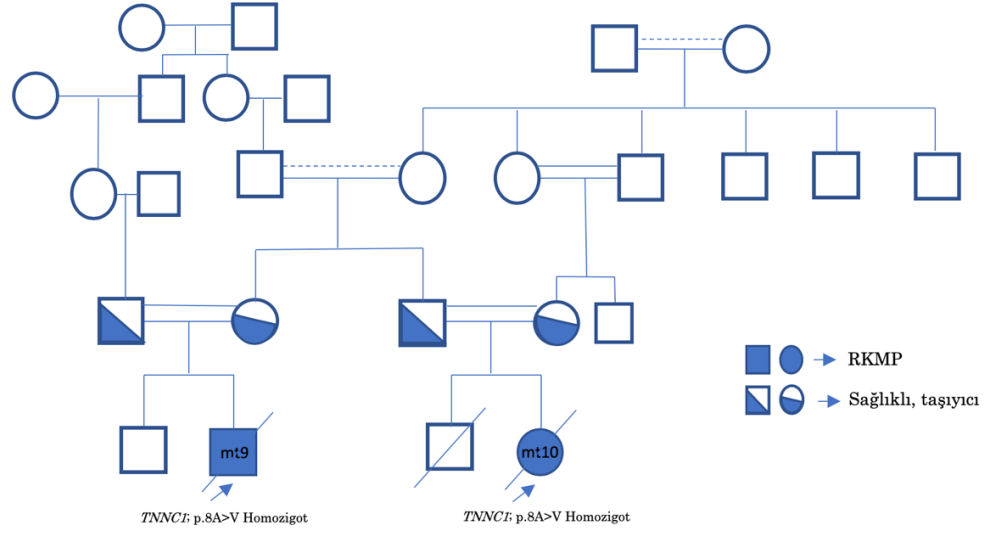
Çalışmamızda HKMP hastası mt3 olgusunda saptanan varyant, genin 5'UTR bölgesinde olup herhangi bir aminoasit değişimine sebep olmamakla birlikte bu translasyon başlatıcı kodonun 33 nükleotid önündedir (NM_033337.3:c.-33G>T). Bu varyant MutationTaster veri tabanında polimorfizm olarak sınıflandırılmıştır. dbSNP üzerinde rs72546666 ile etiketlenen bu tek nükleotid değişimi (SNP), son değerlendirmesi 2016 yılında yapılarak ClinVar üzerinde klinik önemi belirsiz varyant (VUS) olarak sınıflandırılmıştır. Buna paralel olarak bazı fare modellerinde yapılan alışmalar, Cav3 protein bozulmalarının diyastolik disfonksiyonu takip eden hipertrofik kardiyomiyopati gibi kalp tutulumu belirtileri gösterse de, insanlarda CAV3 mutasyonlarının çok büyük çoğunluğunun kardiyak fenotiplere neden olmadığı ve bildirilen vakaların primer kalp tutulumuna sahip olmadığı literatürde desteklenmiştir (Gazzerro vd., 2010). Olgumuzun kardeşi (mt4) otozomal dominant kalıtımı olduğu dşnlen bu varyantı taşımamaktadır fakat değişimin protein dizisini değiştirmediğinden, bu varyant tek başına kardiyomiyopati fenotipini açıklar nitelikte değildir.

5.1.2. Olgu mt9 ve mt10'da saptanan TNNC1 varyantı: 3-52488009-G-A (GRCh37)

izgili ve kalp kasında kontraktileden sorumlu olan ve kompleks troponin ailesinin  üyesinden biri olan troponin C proteinini (cTnC) kodlayan TNNC1'in patojenik varyantları OMIM'de dilate ve hipertrofik kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş olup, literatürde bu gende meydana gelen bildirilmiş birçok varyant bu durumu desteklemektedir (Parvatiyar vd., 2012; Pinto vd., 2011).

Çalışmamıza dahil olan anne tarafından, iki RKMP hastası kuzende, TNNC1 genlerinin birinci ekzonunda homozigot missense bir mutasyon saptanmıştır (NM_003280.3:c.23C>T, p.8A[GCG]>V[GTG]). dbSNP tarafından rs267607125 olarak etiketlenen bu varyantı ClinVar, HKMP ve DKMP

açısından olası patojenik olarak sınıflandırmıştır. Bayes sınıflayıcı yöntem kullanan MutationTaster ise varyantın tahminini hastalık yapıcı (disease causing) olarak bildirmiştir. OMIM'de HKMP açısından otozomal dominant kalımlı olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, çalışmamızdaki saptanan varyanta ek olarak aynı gende meydana gelen başka bir mutasyonla birlikte compound heterozigot durumun Ploski ve ark.'nın sunduğu bir vaka incelemesinde RKMP'ye sebep olması; bu genin patojenik varyantlarının restriktif kardiyomiyopati açısından otozomal resesif geçişi olduğunu düşündürmektedir (Ploski vd., 2016). GTEEx Portal (Release V8) üzerinde *TNNC1* geninin diğer troponin bileşenleriyle kalpteki ekspresyonu iskelet kasındakiyle aynı yüksek seviyededir ve başka bir bölgede eksprese olmamaktadır (GTEEx Consortium, 2013; 2015). Dolayısıyla troponin kompleksini oluşturan herhangi bir bileşende meydana gelebilecek herhangi patojenik bir mutasyonun kardiyak bir hastalığa ve/veya kardiyomiyopatiye sebebiyet vermesi sürpriz değildir. Diğer bir yandan her bir subtip için miyofilament fonksiyonunu etkileyen Ca^{2+} sensitivitesinin değişkenliği kardiyomiyopatinin ekspresyonel değişkenliği için bir fark yaratabilmektedir. Örneğin kasılma sırasında yüksek Ca^{2+} seviyesi kalp kasında hipertrofiyi, düşük seviye ise dilatasyonla ilişkilendirilmiştir (Willott vd., 2010). Bu durumda, sitozolik Ca^{2+} 'nın depolanmasında önemli rol oynayan mitokondrinin hastalığın tam tanısı, progresyonu ve tedavisi açısından araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Olgulara kardiyomiyopati panelinde yapılan çalışmanın raporu verilmiş olup, aile çalışması planlanmıştır. Olgular için çizilen aile ağacı Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. mt9 ve mt10 olgularına ait pedigrisi.

5.1.3. Olgu mt17'de saptanan *TNNT2* varyantı: 1-201331069-T-C (GRCh37)

İnsanlarda ve diğer omurgalılarda moleküler temelde üç adet troponin T geni tanımlanmıştır. Bunlar doku-spesifik eksprese olurlar ve *TNNT2* kalp kasında bulunan troponin kompleksine katılan ve ince aktin filamentin kontraktilitesine ek olarak kalsiyum regülasyonunda önemli derecede rol oynayan kardiyak troponin T (cTnT) proteinini kodlar (Willott vd., 2010). OMIM'de otozomal dominant kalıtım kalıbına uyan sınıflandırmasına istinaden, bu gende meydana gelen birçok varyant çalışmamızdaki kardiyomiyopati subtiplerinin hepsi ile ilişkilendirilmiştir. Menon ve ark. üç kuşak bir ailede otozomal dominant segregasyon gösteren p.I79N missense mutasyonunun, proband için RKMP olarak ortaya çıkan durumdan yola çıkarak akrabalarında ayrıca DKMP ve HKMP'ye sebep olduğunu belirleyerek tek bir genin varyantına bağlı fenotipik çeşitliliği göstermişlerdir (Menon vd., 2008). Ayrıca başka bir üç kuşak ailede Luedde ve ark.'nın yaptığı çalışmada missense bir *TNNT2* varyantının LVNC'ye sebep olduğunu bildirmişlerdir (Luedde vd., 2010).

Asimetrik sol ventrikül hipertrofisi olan olgu mt17'de saptanan varyant ekzonik bölgede olup missense bir değişimdir. *TNNT2* geninden kodlanan temelde 10 totalde 32 farklı Ensembl izoformik transkripti tanımlanmıştır ve

saptadığımız heterozigot varyant tüm transkriptlerde I[ATT]>V[GTT] dönüşümüne sebep olmaktadır (NM_001276345.2:c.691A>G, p.Ile231Val). MutationTaster bu SNP'yi hastalık yapıcı olarak değerlendirmiştir. Fakat dbSNP tarafından rs886045828 olarak etiketlenen bu varyant, ClinVar veri tabanında en eski değerlendirmesi 2016 yılında yapılmak üzere çalışmamızdaki tüm kardiyomiyopatiler için VUS olarak sınıflandırılmıştır. Ulaşılan bu veriler hasta için raporlandırılmış ve aile taraması planlanmıştır. Diğer bir taraftan, Ripoll-Vera ve ark.'nın *TNNT2* varyantlarından bazılarının diğer kardiyak hastalıklarla ya da yolaklarla ilişkili varyantlarla birleşerek hastalığın ortaya çıkış şeklini ve prognozunu etkilediğini öne sürmeleri ileriki çalışmaların planlanmasına zemin oluşturmuştur (Ripoll-Vera vd., 2016).

5.1.4. Olgu mt25'de saptanan SLC22A5 varyantı: 5-131729936C-G (GRCh37)

Organik katyon transporter ailesinin bir üyesi olan *SLC22A5 (OCTN2)*, 557 amino asitlik Octn2 proteinini kodlar; bu protein karnitine yüksek afinite göstererek sodyum-bağımlı hücre içine taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. OMIM'de bu genin patojenik varyantları otozomal resesif kalıtım göstererek primer karnitin eksikliğine sebep olduğu yönünde bilgiler mevcut olmasına ek olarak, kardiyomiyopati bu hastalığın semptomları arasında sıralanmaktadır (Heintzman vd., 2007).

Çalışmamızda LVNC gösteren mt25'te saptanan missense varyant genin 11. ve son ekzonunda saptanmıştır. 9 Ensembl transkripti kodlayan bu genin yalnızca 4 tanesi eksprese olmaktadır ve hepsinde aynı amino asit dizi değişimine sebep olmaktadır (NM_003060.4:c.1646C>G, p.549 P[CC]>R[CG]). MutationTaster bu değişimi polimorfizm olarak sınıflandırmıştır. dbSNP üzerinden rs780575908 olarak etiketlenmiş bu varyanta dair bir ClinVar verisi bulunmamaktadır. Değişimin heterozigot olması ve olguda biallelik ekspresyon gösteren karnitin düzensizliğinin bulunmaması dolayısıyla bu varyantın kardiyomiyopati ile ilişkisi olmadığı düşünülmemiştir. Fakat kardiyomiyopati fenotipinin heterojenik ve

multigenik ve/veya epistatik şekillerde ortaya çıktığı ayrıca bilinmektedir (Cecchi vd., 2012). Dolayısıyla bu varyant literatürle uyumlu olarak VUS olarak sınıflandırılmış olup, kardiyomiyopati ile ilişkisi tam olarak ortaya koyulamamıştır.

5.2. Hastalarda Saptanan mtDNA Varyantlarının Değerlendirmesi

5.2.1. Kontrol grubunda saptanmayan hasta grubunda tekrarlayan SNV'lerin değerlendirilmesi

Çalışmamızın mitokondriyal DNA varyantlarının değerlendirilmesi aşamasında ilk olarak hasta grubunda tekrar eden ve **Tablo 4.3.'te** (*) ile işaretlenmiş 5 varyantın (T1189C, T6345C, G9055A, G9966A, C12346T) MITOMASTER SNV Query üzerinden analizleri yapılarak korunmuşluk yüzdeleri (CI-conservation index) ve GenBank (GB) frekansları bulunmuştur. Ayrıca MitImpact3D üzerinden patojenite tahminleri (MToolBox DS ve MutationTaster) alınmış ve **Tablo 5.2.'de** gösterilmiştir. Son güncellemeleriyle, mitokondriyal varyant çeşitliliğinin ve belirsizliğinin fazla olması, maternal kalıtımı, anotasyon eksikliği ve transkripsiyon mekanizmasındaki farklılık nedeniyle artık CADD skoru mtDNA varyantları için desteklenmemektedir (Rentzsch vd., 2018). Bunun yerine oldukça etkili hesaplamalı algoritmalar kullanan bir meta-tahminleyici (meta-predictor) olan MtoolBox kullanılmıştır (Calabrese vd., 2014). MtoolBox skorlandırmasını eğer varyantın skoru 0,5'ten büyükse *disease* (hastalık yapıcı), 0,5'ten küçükse *neutral* (nötral), eğer yeterli veriye ulaşamaz ise *unclassified* (sınıflandırılmamış) olarak sınıflandırmaktadır.

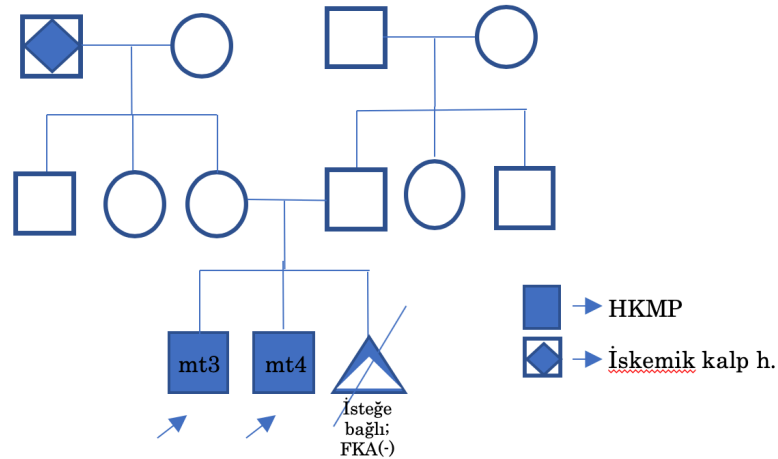
Tablo 5.2. Kontrol grubunda saptanmayan mtDNA varyantlarının *in silico* patojenite değerlendirmeleri.

SNV	Olgu	Fenotip	Gen	AA	CI	GB Fr.	Mtool Box	Mutation Taster2
T1189C *	mt12 mt27	HKMP LVNC	<i>MT-RNR1</i>	rRNA	58 %	3.17%	**	**
T6345C **	mt3 mt4	HKMP HKMP	<i>MT-CO1</i>	F148L	100 %	0.05%	0,68	Hastalık yapıcı
G9055A *	mt20 mt27	LVNC LVNC	<i>MT-ATP6</i>	A177T	75 %	4.25%	0,82	Polimorfizm
G9966A *	mt3 mt4	HKMP HKMP	<i>MT-COIII</i>	V254I	75 %	0.69%	0,07	Polimorfizm
C12346T **	mt9 mt10	RKMP RKMP	<i>MT-ND5</i>	H4Y	17 %	0.68%	0,16	Polimorfizm

Bu varyantlardan m.1189T>C olanı, mitokondride 12S (küçük ribozomal alt birimi) rRNA kodlayan *MT-RNR1* üzerinde bulunmakta olup, bu gen üzerindeki patojenik varyantlar genellikle duyma kayıplarıyla ilişkilendirilmiştir (Dai vd., 2008; Guaran vd., 2013; X. Tang vd., 2007). GB frekansının yüksek olması ve primatlar arasında korunma yüzdesinin düşük olması varyantın ClinVar üzerinde 2014 tarihindeki son değerlendirmesinde olduğu gibi benign olduğunu düşündürmekle beraber, kardiyomiyopati ile ilişkisi son literatür dahilinde bulunamamıştır. Bazı patojenik mutasyonlarının kardiyomiyopatiye sebep olduğu bilinen *MT-CO3* ve *MT-ND5* genlerine baktığımızda ise (Ayalon vd., 2013; Sazonova vd., 2016; Zhou vd., 2019), çalışmamızda bu genlerde saptanan varyantların MutationTaster2 veri tabanında polimorfizm olarak görülmektedir. MToolBox skoru oldukça düşük olan *MT-CO3* genindeki (m.9966G>A) ve *MT-ND5* genindeki (m.12346C>T) varyantlarının kardiyomiyopati açısından tek başına anlamlı olduğunu söylemek mümkün görünmemektedir.

Diğer bir taraftan, mitokondriyal solunum zincirinde Kompleks IV'ün alt birimlerinden birincisini kodlayan *MT-CO1* üzerinde tanımlı bazı mutasyonların hastalık (mitokondriyal kompleks IV bozukluğu ve/veya buna bağlı çeşitli hastalıklar; duyma kaybı, glokom gibi) yapıcı olabildiği veya bazı

hastalıklar için risk faktörü olduğu vakalar bildirilmiştir (Collins vd., 2018; Yuan vd., 2005). Örneğin, yine ClinVar üzerinde 2019'da değerlendirilen varyant Leigh sendromu açısından değerlendirilerek benign olarak belirtilmiştir. Kardiyomiyopati açısından incelendiğinde ise ilk göze çarpan Kompleks IV'ün bütünlüğünde rol alan proteinleri kodlayan birçok genin ister nDNA ister mtDNA üzerinde olsun incelenmesi gerektiğidir (Huigsloot vd., 2011). Çalışmamızda saptanan varyant %100 korunmuşluk göstermekle birlikte, MToolBox skoru $\geq 0,5$ olduğundan zararlı olabilecek kısımda; aynı zamanda MutationTaster2'de hastalık yapıcı sınıflandırılmıştır. Ayrıca düzenli aralıklarla update edilen GB üzerinden frekansı %0.05 gibi düşük bir düzeyde oluşu mt3 ve mt4 olguları için bu varyantın patojenik bir durum yaratmış olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.2. mt3 ve mt4 olgularına ait pedigrisi.

Çalışmamızda saptanan m.9055A>G varyantı Tablo 5.2'de listelenmiş varyantlar arasında GB frekansı en yüksek olan olup, MutationTaster2 üzerinde de polimorfizm olarak belirtilmiştir. Fakat MToolBox skoru bu varyantın patojenik olduğunu belirtmektedir. MT-ATP6 genindeki patojenik varyantların ilki 1992 yılında tanımlanmak üzere birçok mitokondriyal hastalığın sebebi olduğu uzun süredir bilinmektedir (Dautant vd., 2018). Bazı durumlarda, bu genin patojenik mutasyonlarının yol açtığı enerji üretiminin aksamasına bağlı olarak infant grupta Leigh sendromunun erken klinik bulgularından biri olarak sol ventrikülde hipertrofiye rastlanmaktadır (Couser

& Guçsavas-Calikoglu, 2017). Bu gende saptanan ve bizim varyantımızın aksine düşük frekanslı olan bazı varyantların kardiyomiyopati hem izole hem de kardiyomiyopatiye ilave semptomatik durumlara patojenite oluşturabileceğini belirten birçok yayın da bulunmaktadır (Alila-Fersi vd., 2017; S. Tang vd., 2010; S M Ware vd., 2009). Genin diğer hastalıklarla birlikte ortaya çıkış şeklinde kardiyak tutulumu olması bu geni önemli kılmakla birlikte tespit ettiğimiz varyant frekansının globalde oldukça yüksek olması bu varyantı kardiyomiyopati açısından patojenik olmadığını düşündürmektedir.

5.2.2. m.12308A>G

Verimizin ilk analizlerini MITOMASTER SNV üzerinden gerçekleştirirken, mitokondriyal tRNA-lösin kodlayan bölgedeki (MT-TL2) m.12308A>G varyantının fenotipik klinik özelliklerinden bir tanesinin kardiyomiyopati olduğu görülmüştür. Kontrollü yapılan bir çalışmada ise bu bölgede saptanan başka bir varyantın (m.12297T>C) pediyatrik bir DKMP vakasının etyolojisini açıkladığı öne sürülmüştür (Tessa vd., 1999). Çalışmamızda MT-TL2 geninde hasta grubunda 7/27 (%25,93) ve kontrol grubunda ise 4/31(%12,90) gibi oldukça yüksek frekansta saptanan bu varyantı (A12308G) bir literatür, ek semptomatik bulgularla ve/veya diğer mtDNA varyantlarıyla olabilecek sinerjik etkileşimiyle birlikte kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiştir (Grasso vd., 2001). Fakat son literatürde, mt-tRNA varyantlarının ACMG kriterleriyle karşılaştırmalı benign sınıflandırmalarında; MitoTIP değeri \leq %10 olan varyantların benign sınıfta kalmasını destekleyici, varyantın homoplazmik olduğu durumlarda sağlıklı 4 bireyden fazla görülmesinin ise benign olduğuna dair güçlü bir madde olduğu öne sürülmüştür (Wong vd., 2020). Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda saptanan varyantın yüksek frekansı göz önünde bulundurulduğunda ve tRNA varyantlarını skorlayan bir araç olan MitoTIP değeri $<$ %50 (%44,37) ve PON-mt-tRNA skorunun 0,41 (Likely benign) olması dolayısıyla varyantın benign olduğunu öne sürmekteyiz. Bununla birlikte hasta ve kontrol grupları arasında yapılan Ki-kare testi de bu varyantın istatistiksel olarak anlamsız olduğunu göstermiştir ($p=0.3544$; $CI=0.95$).

5.2.3. Hastalara özgü mtDNA varyantlarının değerlendirilmesi

Hastalara özgü (tekrar etmeyen) saptanmış varyantlardan 14 tanesi (Tablo 4.5.'te '*' ile işaretlenenler) değerlendirilmeye alınmış olup, bunlardan kodlayan bölgedekiler için MitImpact3D (APOGEE) ve MutationTaster değerlendirmelerine bakılmış ve CADD skorları elde edilmiştir. tRNA varyantları için ise MitoTIP ve PON-mt-tRNA kullanılmıştır, Mitomap üzerinden GB frekansları ve primatlar arasında korunmuşluk oranları (CI) elde edilmiştir. Bu değerler Tablo 5.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 5.3. Hastalara özgü mtDNA varyantlarının *in silico* patojenite değerlendirmeleri.

Olgu	Fenotip	SNV	MTool Box	Mutation Taster2	Mito TIP	PON-mt-tRNA	GB Fr.	CI
mt20	LVNC	T684C **	-	-	-	-	0,00%	75%
mt6	HKMP	T721C *	-	-	-	-	0,25%	17%
mt24	DKMP	T961C *	-	-	-	-	0,87%	42%
mt20	LVNC	C6546T **	0,28	Polimorfizm	-	-	0,05%	100%
mt2	HKMP	G8743A **	0,13	Polimorfizm	-	-	0,03%	33%
mt20	LVNC	G9948A *	0,25	Polimorfizm	-	-	0,15%	92%
mt17	HKMP	A10044G *	-	-	34,70%	0,21	0,27%	75%
mt21	LVNC	T10345C *	0,37	Polimorfizm	-	-	0,15%	50%
mt2	HKMP	C11268T **	0,68	Polimorfizm	-	-	0,03%	58%
mt1	HKMP	G12192A *	-	-	4,50%	0,12	0,22%	25%
mt22	HKMP	A12490G **	0,33	Polimorfizm	-	-	0,08%	83%
mt23	DKMP	G14258A **	0,28	Polimorfizm	-	-	0,05%	58%
mt7	HKMP	A14693G *	-	-	39,50%	0,22	0,52%	100%
mt13	HKMP	T15519C *	0,39	Polimorfizm	-	-	0,19%	58%

In silico patojenite skorlarına baktığımız zaman kodlayan bölgede MToolBox skoruna ve korunmuşluk oranına göre patojenik bir etki yaratabileceği söz konusu olan iki varyant göze çarpmaktadır; m.6546C>T ve m.11268C>T. MutationTaster bunları polimorfizm olarak skorlandırmasına rağmen, bu iki varyantın GB frekansı sırasıyla %0,05 ve %0,03 olmak üzere oldukça düşük bir oranda saptanmıştır ve m.6546C>T için o bölgede (MT-CO1) primatlar arasında tam korunmuşluk gözlemlenmiştir. Varyant filtrelemesi

sırasında, çalışmada kullandığımızın ($\leq 0,2$) aksine daha geniş olan genomik nadir eşik değerini kullanan ($\leq 0,5$), hasta grubunun çoğunluğunu kardiyomiyopatisi olan olguların oluşturduğu Zaragoza ve ark.'nın yaptığı bir çalışma, MT-CO1 geninde saptanan bizimkinden farklı missense bir mutasyonun yüksek olasılıkla miyopati ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir (Zaragoza vd., 2011). Daha önceden Kompleks IV oluşumunda rol oynayan MT-CO1'in kardiyomiyopatiler açısından önemli olduğu belirtilmiş (Huigsloot vd., 2011) ve ayrıca miyopatinin de kardiyak tutulumunu görmezden gelmek mümkün olmadığından, bu gende saptanabilecek etkili bir değişimin kardiyomiyopatiye sebep olabileceği sürpriz değildir (Finsterer & Stöllberger, 2008). Bu yüzden mt20 olgusunda saptanan m.6546C>T varyantının patojenite yaratmış olabileceğini düşünmekle beraber, patojenite skorlarının yüksek olmaması dolayısıyla bu değişimin etkisinin çelişkili olduğunu düşünmekteyiz. Fare modellerinde yapılan bir çalışmada ise *mild* MT-CO1 varyantlarının daha şiddetli fenotipik ekspresyona ve hatta ölüme sebep olan diğer mitokondriyal mutasyonlara nazaran, miyopati ve kardiyomiyopatiye sebep olsa da şiddetli bir patojenite yaratmadığını ve hayatta kaldıklarını bildirilmiştir (Fan vd., 2008). Yine Zaragoza ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı mtDNA ve kardiyomiyopati ilişkisini inceleyen çalışmada (Zaragoza vd., 2011), MT-ND4 üzerinde bir varyantı yüksek olasılıklı patojenik olarak sınıflandırmıştır. Çalışmamızda MT-ND4 üzerinde yer alan m.11268C>T için yüksek MtoolBox ($>0,5$) skoru göz önünde bulundurulduğunda bu varyantın mt2 olgusu için olası patojenik bir durum oluşturmuş olabileceğini düşünmekteyiz. GB frekansı düşük olan ($0,03$) bir diğer varyant ise m.8743G>A olarak gözlemlenmiştir. Bu SNV daha önceden bildirilmiş olup, patojenite skorları bizim de test ettiğimiz üzere düşük olduğundan benign olarak sınıflandırılmıştır (Khan vd., 2017). Ayrıca başka bir çalışma burada gerçekleşen bir transversiyonu, baz pozisyonunu oldukça fazla değişken olarak değerlendirerek (hypervariable) patojenik bir durum yaratmadığını öne sürmüştür (Soini vd., 2017). ClinVar veri tabanında MT-ND5 üzerinde meydana gelen m.12490A>G ve MT-ND6 üzerindeki m.14258G>A ise son değerlendirmeleri 2019'da yapılarak, Leigh sendromu açısından benign olarak

sınıflandırılmıştır. Biventriküler hipertrofi gösteren 21 yaşındaki bir hastada tüm ekzom analizi sonrası MT-ND5’de saptanan missense bir mutasyonun (m.13513G>A) bir aile çalışmasıyla birlikte patojenite yarattığını bildirmişlerdir (Zhou vd., 2019). Bu doğrultuda, çalışmamızda saptanan pozisyonun da korunmuşluk oranının yüksek olduğunu göz önünde bulunduracak olursak, bu varyantın kardiyomiyopati açısından patojenik bir duruma sebep olduğu savının aile çalışmasıyla desteklenmesi gerektiğini öne sürmekteyiz. MT-ND6’da meydana gelen m.14253G>A ise korunmuşluk oranının düşük olmasından dolayı birçok çalışmada etkili bir değişim olarak görülmemiştir (Caporali vd., 2018; Van Eijsden vd., 2006).

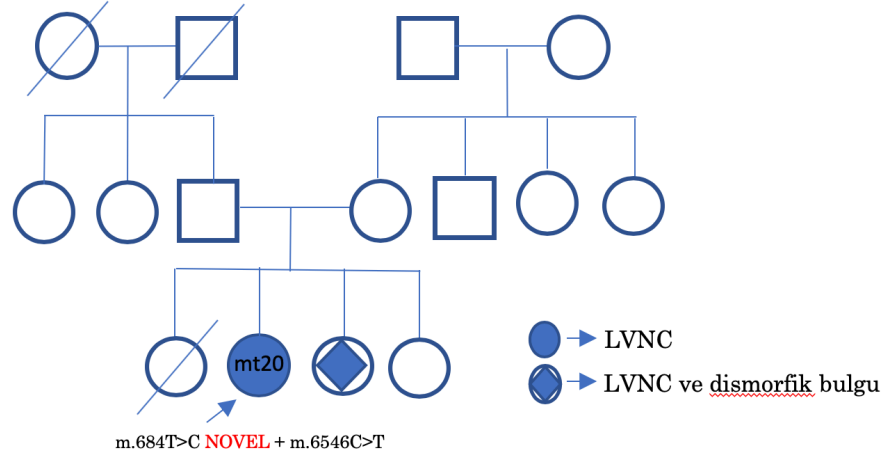
tRNA varyantlarının patojenite değerlendirmelerine baktığımızda ise; benign sınıflandırmada oldukları görülmektedir. Bu varyantlardan tRNA-Histidin kodlayan (MT-TH) bölgedeki m.12192G>A değişimi farklı iki grup çalışmasından birinde, aynı evrimsel orijine sahip mtDNA dizisine sahip (aynı haplogrupta) hastalarda; diğer çalışmada ise ek olarak bir başka mtDNA varyantı ile birlikte görüldüğünde kardiyomiyopatiye sebep olarak belirtilmiştir (Mimaki vd., 2003; Shin vd., 2000). MITOMASTER, MSeqDr, NCBI ClinVar üzerinden bu varyant araştırıldığında bu iki çalışma referans olarak verilmiştir fakat hastalarımızın haplogrup analizleri neticesinde bu referans çalışmalarla bağlantı çok uzak olarak görülmektedir. Bu yüzden mt1 olgumuzda saptanan bu varyantın kardiyomiyopati açısından patojenik olmadığını, bu varyantın kontrol grubumuzda sağlıklı iki bireyde daha saptanmış olması ile öne sürmekteyiz.

Mitokondriyal tRNA-Glisin (MT-TG) bölgesinde meydana gelen m.10044A>G için t-RNA’nın loop bölgesindeki zayıf etkileşimlerden dolayı biyoenerjetik yolları etilediği düşünülem mekanizmasıyla; birçok klinik karşılaştırma olmasına rağmen en dikkat çekici olanı bir ailede pediyatriklerde meydana gelen ani ölümle (SIDS) ilişkilendirilmiş olmasıdır (Santorelli vd., 1996; Tomari vd., 2003). Aile üyelerinin incelendiği ve farklı etnik grupların oluşturduğu kontrollü bir çalışmada bu bölgede saptanan başka bir varyantın heteroplazmik bir durumda (m.9997T>C) Bright’s hastalığına bağlı olarak kardiyak hipertrofiyi destekler bulunmuştur (Merante

vd., 1994). Aynı bölgede başka bir varyantı multisistemik bir rahatsızlıkla ilişkilendiren bir çalışma ise, yaptığı kontrollü karşılaştırmada sağlıklı bireylerde m.10044A>G saptamıştır (Poole vd., 2020). Bu varyantın bölgelere özgü (haplogrupa bağlı) olarak bir patojenite yaratabileceğini düşünmekle beraber, *in silico* skorlarının düşük olmasına bağlı olarak varyantın etkisini ileriki çalışmalarla ve aile çalışmasıyla desteklemek gerektiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki diğer mt-tRNA varyantı m.14693A>G'nin ise *in silico* skorlarının düşük olması, genellikle MELAS ile ilişkilendirilmesi ve ClinVar üzerinde benign olarak sınıflandırılması dolayısıyla kardiyomiyopati açısından bu varyantın patojenite yaratmadığını önermekteyiz.

rRNA varyantlarına baktığımızda ise bu varyantlar üzerinde saptanan bazı patojenik varyantların literatürde bazı hastalıklarla ilişkilendirildiği aşikardır fakat evrimsel olarak ribozomal RNA patojenitesini araştıran araçlarınkine benzer olan metotlar dışında (HIA), insan mitokondrisine özgü *MT-RNR1* ve *MT-RNR2* varyantlarını *in silico* değerlendirebilecek bir araç henüz geliştirilmemiştir (Elson vd., 2015; Gutell vd., 2002; Smith vd., 2013). Literatürde ise mitokondriyal rRNA mutasyonlarının mitokondriyal translasyonu etkileyerek tek başına ya da modifiye edici olarak kardiyomiyopati fenotipine sebep olabileceğini bildiren yayınlar mevcuttur (D. Li vd., 2019; S. Li vd., 2018; Santorelli vd., 1999). Çalışmamızda ise üç olguda mitokondriyal rRNA'nın 12S alt birimini kodlayan *MT-RNR1* geninde filtreler sonrasında üç ayrı varyant karşımıza çıkmıştır. HKMP olan mt6 olgumuzda saptanan m.721T>C ve DKMP olan mt24 olgumuzda saptanan m.961T>C varyantları mitokondriyal rRNA'nın 12S alt birimini kodlayan bir çalışmada LVNC ilişkili olabileceği belirtilmiştir fakat çalışmada 12S rRNA'nın konformasyonunu değiştiren saptanan diğer mutasyonlara oranla daha az etki edeceğini öne sürmüşleridir (S. Tang vd., 2010). GTEx Portal üzerinden *MT-RNR1* ekspresyon profiline baktığımızda ise sol ventrikülde bu oranın beyin haricinde diğer dokular arasında en yüksek seyreden ikinci doku olmasından dolayı bu transkripti etkileyebilecek bir değişimin, kardiyomiyopati ile ilişkili olması beklenebilir. Olgulardan mt20'de saptanan m.684T>C varyantının incelediğimiz veri tabanlarında mtDNA dizisine ulaşamadığımızdır. Bu yüzden

global frekanslarına baktığımızda, *MT-RNR1* üzerinde saptanan hastalar arasında tekrar etmeyen üç varyanttan m.684T>C olanının *novel* bir varyant olabileceğini öne sürmekteyiz. Bu olguya ait aile ağacı Şekil 5.3'te verilmiştir.



Şekil 5.3. mt20 olgusuna ait pedigrisi.

Şekil 4.1.'de de gösterildiği üzere, kardiyomiyopati ile ilişkili ve/veya anlamlı patojenik olabileceği düşünülen tüm varyantların hastalar arasındaki yayılımına baktığımızda aralarında akrabalık bulunmayan mt20, mt12 ve mt27 olguları diğer hasta olgulara oranla, bu grupta daha çok varyanta sahiptir. Bunların içinden missense olanlar filtrelenerek değerlendirildiğinde ise mt20 olgusunda diğerlerinden daha çok varyant saptandığı Şekil 4.2.'de gözlemlenmiştir.

5.2.4 İstatistiksel değerlendirme

Hasta ve kontrol grubundaki ortalama varyant sayıları arasındaki karşılaştırma sonucunda anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p_1=0,907>0,05$). Bu durum, çalışmadaki bazı örneklerin farklı zaman ve çalışma istasyonlarda (530 ve 540'lık çipler) gerçekleşmesine rağmen çalışmadaki farklı zamandaki farklı adımların varyant sayısını etkilemediğini çalışmamız açısından güçlendirmiştir.

Hasta ve kontrol grubunun varyant frekanslarının karşılaştırmalı analizlerinde Fisher's Exact Test yapılmış ve p_2 değerleri elde edilmiştir. Bu test sonrasında her bir SNV istatistiksel olarak anlamsız ($p_2>0,05$) saptanmıştır. Bu durum total örneklem sayısının ($n<30$; hasta grubu için)

düşük olması, güç analizindeki yeterli sayıya ulaşılmaması ile açıklanabilmektedir. Dolayısıyla, istatistiksel anlamlılığın, prevalansı çok düşük olsa da pediatrik kardiyomiyopatiler için daha büyük örneklemli çalışmalarda araştırılmasını öne sürmekteyiz.

Varyant frekanslarının karşılaştırmalı ikinci bir analizinde ise, çalışma verimizin global GB frekanslarıyla karşılaştırılması yapılmıştır. Hasta grubumuzda saptanan global frekanslarla yapılan karşılaştırmalı analizde Mitomap GB üzerinde kayıtlı 51192 bireyde (*Homo sapiens*, son güncelleme 01.05.2020) saptanan varyant frekansları kullanılmıştır. Bu tercih çoğu saptanan varyantın kontrol grubumuzda hiç saptanmamış olmasından doğmuştur ve yöntem olarak Ki-kare ve/veya Fisher's Exact Test kullanılarak p₃-değerleri elde edilmiş ve iki test sonucu da anlamlı (p<0,05) olan varyantlar '**' ile işaretlenmiştir. İstatistiksel olmayan değerlendirmede '*' ile işaretlenmemiş varyantlar, bir sonraki aşamada, istatistiksel olarak anlamlı olsa bile ikinci kez '**' ile işaretlenmemiştir. Olgulardan mt3-mt4 ve mt9-mt10 bireyelerine ait varyantlar, örneklem sayısından düşülerek hem 1(bir) varyantmış gibi, hem de örneklem sayısı aynı tutularak 2(iki) varyantmış gibi değerlendirilmeye alınmış ve iki test sonucundan da anlamlı bir p₃-değeri çıkmış ise '**' ile işaretlenmiştir.

Kullanılan bu yöntem sonrasında totalde 8 varyant istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) saptanmıştır. Bunlar; mt20'de m.684T>C ve m.6546C>T; mt2'de m.8743G>A ve m.11268C>T; mt22'de m.12490A>G; mt23'de m.14258G>A; mt3-mt4'te m.6345T>C; mt9-mt10 m.12346C>T şeklindedir.

5.3. mtDNA Haplogrup Değerlendirmesi

Bilgimiz dahilinde daha önce Türkiye'de (İç Anadolu Bölgesi'nde) tüm mtDNA dizi analizi neticesinde oluşturulmuş mitokondriyal haplogrup çalışması bulunmamaktadır. Türkiye'de yapılan yakın tarihli moleküler evrimsel çalışmalar mtDNA'nın sadece kontrol bölgesini (HV1-HV2-HV3) kapsarken içlerinden Mergen ve ark'nın yaptığı çalışma İç Anadolu Bölgesi'ni değerlendirmiş, diğer çalışma ise Doğu Akdeniz ile Güneydoğu Anadolu'yu değerlendirmiştir (Mergen vd., 2004; Serin vd., 2016). Fakat mtDNA'nın

kontrol bölgesi dışında kalan varyantların haplogrup olarak tanımlanıp, hatta bu haplogrup varyantlarının bazı hastalıklara yatkınlık yarattığına dair çalışmalar mevcuttur (Kofler vd., 2009; Sawabe vd., 2011).

Çalışmamız İç Anadolu Bölgesini temsil eden küçük bir örneklem olup, Mergen ve ark.'nın yaptığı çalışmaya paralel; en yaygın haplogrupları H (%38) ve U (%19) olarak bulmuştur. Yaklaşık 25 bin yıl önce Güneybatı Asya'da ortaya çıkıp ev birçok kıtaya yayıldığı düşünülen ve Avrupa'da en yaygın görülen H haplogrubu ülkemizde de yüksek bir frekansta gözlemlenmektedir (Achilli vd., 2004; Roostalu vd., 2006). Haplogrup U ise Avrupa'da düşük bir frekansta gözlemlenirken, Finlandiya kökenli bireylerde bu durum neredeyse Avrupa'nın 3 katıdır (Finnilä vd., 2000). Çalışmamızda ikinci en yüksek oranda saptanan U haplogrubunun Avrupa'ya Kuzey Anadolu üzerinden yayılmış olabileceğini düşündürmektedir. J haplogrubu, H ve U gibi R grubundan evrimleşerek ayrılmıştır. Yaklaşık 45 bin yıl önce Orta Doğu'da doğduğu bilinen bu grup, Avrupa ve Orta Doğu'daki en eski haplogruplardandır. Kuzeybatı Avrupa'da %10 civarında görülürken bu oran Orta Doğu ülkelerinde yaklaşık %20'lerde görülmektedir (Pala vd., 2012; van Oven & Kayser, 2009). Çalışmamızda saptanan %13'lük J haplogrubunun, Anadolu üzerinden Avrupa'ya yayıldığı ve bu göçün U haplogrubundan daha önce olduğu yönündeki durumu da desteklemektedir (Mergen vd., 2004).

Klinik açıdan haplogruplar son yıllarda birçok araştırmaya özellikle nörodejeneratif hastalıklar açısından ve bazı hatalıklara bölgesel/coğrafi yatkınlıkları tartışılmak üzere konu olmuştur (Chinnery & Gomez-Duran, 2018; Wallace, 2015, 2018). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda, genel toplama kıyasla bir değişkenlik gözlemlenmemiş ve en sık gözlemlenen makro haplogruplar sırasıyla H (Hasta %32; Kontrol %45), U (Hasta %20; Kontrol %13) ve J (Hasta %12; Kontrol %6,5) olmuştur. Ki-kare analizince hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca son yıllarda Avrupa kökenli geniş bir popülasyonda yapılan mtDNA haplogrupları ve iskemik kardiyovasküler hastalıkları arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma ise herhangi bir bağıntı ortaya koymamıştır (Marianne vd., 2008). Kardiyomiyopatiler açısından ise Anadolu popülasyonunda geniş ve

kontrollü bir inceleme olan çalışmamız, Marianne ark.'nın yaptığı çalışmaya paralel olarak haplogrup ve kardiyomiyopati açısından bir ilişki ortaya koyamamaktadır. Fakat bölgesel yatkınlığı araştırmak adına çok daha büyük popülasyonlarda yapılacak çalışmaların hem nadir hem de yaygın hastalıkların genetik temellerini aydınlatmak için faydalı olacağını düşünmekteyiz.

5.4. Kısıtlamalar

Bu çalışmaya alınması planlanmış 32 hasta sayısına ulaşılmış fakat 5 hastadan yeterli DNA elde edilememesi ve hastalardan tekrar örnek alınmaması sebebiyle araştırmamız 27 hasta üzerinde gerçekleşmiştir. Kontrol grubunu oluşturan 32 hasta içinden yalnızca bir hastada meydana gelen okuma hatası dolayısıyla değerlendirilmeden çıkarılmış ve toplamda 58 olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

Analizler neticesinde coverage oranının her bir baz için 100x derinlikte ortalamasının %93 üzerinde olması, 20x derinlikte %99'un üzerinde olması dolayısıyla ve homopolimerik hataların IGV görüntülemelerinden sonra analizlerden çıkartılmasıyla birlikte çalışmamızda filtreler sonrasında saptananarak tartışmaya alınan varyantların Sanger sekans konfirmasyonları planlanmıştır. Literatürde Sanger konfirmasyonu gerekmeyen varyantlar (indeller hariç) için gerekli okuma sayısının 100x derinlikte en az %99,7 olması gerektiği verilmiştir (Baudhuin vd., 2015). Aynı şekilde başka bir çalışma kullanılan yöntemle göre zor dizilenecek bölgeler dışında NGS'in bu duruma daha temkinli yaklaşarak çoğunlukla güvenilir olduğunu söylerken, başka bir çalışma Sanger dizilemenin oldukça pahalı olmasından dolayı maliyet ve zaman açısından NGS verilerinin artık güvenilir veriler olduğunu kabul etmemiz gerektiğini belirtmiştir (Beck & Mullikin, 2016; Mu vd., 2016). Çalışmamızda saptanan ve değerlendirilmeye alınmış varyantların okuma derinliğinin o bölgelerdeki baz başına ampikonlar açısından 100x için %98 ve üzerinde olması saptanan varyantların güvenilir olduğunu göstermektedir. Fakat literatür taraması ve filtreler sonrasında anlamlı kalan varyantların konfirmasyonu için Sanger dizileme planlanmıştır.

Bir diğer kısıtlama ise çalışmamızın ilk kısmını oluşturan, kardiyomiyopati genlerinin incelendiği ticari panelin kardiyomiyopati ile ilişkisi sınırlı sayıda gen bulundurmasıdır. Bu yzden, hasta grubunun ayrıca kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiş genlerin bulunduğu daha geniş bir panelde de incelenmesi planlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Amacı primer kardiyomiyopatilerde nDNA ve mtDNA varyantlarının etkisinin olup olmadığını araştırmak olan çalışmamızın ilk kısmında ekokardiyografi ve klinik genetik muayene sonrasında primer kardiyomiyopati tanısı almış 27 bireyden oluşan pediatrik bir grupta, nDNA üzerinde lokalize kardiyomiyopati ile ilişkili genler NGS ile incelenmiş ve saptanan varyantlar veri tabanlarındaki analizler neticesinde ACMG kriterlerine göre sınıflandırılmıştır. Buna göre 3 hastada (anne tarafından iki kuzende *TNNC1* üzerinde *olası patojenik* homozigot bir varyant ve bir olguda *TNNT2* üzerinde heterozigot *bir VUS (kliniği önemsiz varyant)* toplamda iki varyant saptanmıştır. Kardiyomiyositlerde oksidatif solunumla elde edilen enerjiye ihtiyacın fazla olmasına bağlı olarak mitokondri sayısındaki fazlalık mitokondriyi kalbin biyoenerjetik mekanizması açısından önemli kılmaktadır. Ayrıca bazı mitokondriyal varyantların, nDNA'da saptanan varyantların ekspresivitesini etkilediği ve kardiyomiyopatiye sebep olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda ikinci aşamada ise hasta grubumuza 31 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu eklenerek toplamda 58 bireyde tüm mtDNA dizilemesini gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizinden sonra saptanan varyantları değerlendirmek için kullanılan filtreler neticesinde 264 farklı varyant arasından patojenite yaratabilecek ve/veya kardiyomiyopati ile ilişkili olabilecek 20 farklı mtDNA varyantı tartışılmıştır (%7,58). Hastaların kendi arasındaki kıyaslamalarda bu varyantların dağılımına baktığımızda ilk filtreleme sonrasında mt20, mt12 ve mt27; varyantların ikinci filtrelemesi sonrasında saptanan 20 mtDNA varyantının analizleri doğrultusunda ise mt20, mt3-mt4 ve mt12 olgularında önemli missense varyantlar saptanmıştır. Veri tabanlarındaki karşılaştırmalar ve istatistiksel değerlendirmeler neticesinde ise oksidatif fosforilasyon ve elektron transport mekanizmasında önemli rol oynayan 4 farklı mitokondriyal gende 5 farklı varyant öne çıkmıştır; mt20 olgusunda saptanan *MT-RNR1* genindeki m.684T>C, *MT-CO1* genindeki mt3-mt4 olgularında saptanan m.6345T>C, mt20 olgusunda saptanan m.6546C>T, mt2

olgusunda *MT-ND4* geninde saptanan m.11268C>T ve son olarak mt22 olgusunda *MT-ND5* geninde saptanan m.12490A>G. Bu varyantlardan m.684T>C olanı daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup, bilginiz dahilinde *novel* bir varyant olarak ilk defa çalışmamızda tespit edilmiştir.

Kardiyomiyopatinin etiyolojisini aydınlatmak adına, nDNA'da lokalize panel dışı genlere ek olarak, mtDNA açısından filtreler ve haplogrup analizleri neticesinde önemli olduğu düşünülen varyantların tanısal ve prognostik öneminin araştırılması için ileri çalışmaların aile bireyleriyle birlikte yapılması planlanmıştır.

ACMG'nin de belirttiği üzere mitokondriyal varyantların yorumlanması karmaşık ve zorlayıcıdır (Richards vd., 2015). Çalışmamız sonucunda, mtDNA varyantlarının değerlendirilmesi sırasında veri tabanlarında varyantların klinik önemleri açısından bir yetersizlik ve çelişkiler olduğu gözlemlenmiştir. Buna istinaden bünyesinde yapay zekâ barındıran mtDNA varyantlarının incelenebileceği *in silico* araçlar ve *pipelinelar* ancak son birkaç yılda oluşturulmaya başlanmıştır. Mitokondriyal kalıtımın Mendeliyan kalıttan farklı olması, heteroplazmi&homoplazmi durumları ve coğrafi bölgelere spesifik olmasından dolayı bazı araçlar mtDNA varyantlarını bünyesinde değerlendirmekten çıkarmıştır. Bu yüzden ikincil bir amaç ile çalışmaya dahil edilen bireylerin mtDNA haplogrup haritalaması yapılmış olup; klinikte önemli olup olmadığının tartışılmasının yanı sıra, İç Anadolu Bölgesi'ne ait öncül bir haplogrup çalışması yapılmıştır. Çalışmamız Türkiye'de bilginiz dahilinde, kontrol bölgesi haricinde tüm mtDNA incelenerek yapılan en geniş kapsamlı mtDNA haplogrup araştırma olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışma ile birlikte kardiyomiyopati gibi mitokondriyal defektlere bağlı geliştiği düşünülen hastalıkların nDNA'daki hedef genlerde incelemesi gerçekleştirildikten sonra, hastalıkların ana nedeni olmasa bile ekspresyonunu ve penetransını değiştirebileceği yönündeki bilgilerden yola çıkarak ek bir inceleme olarak mtDNA dizilemesini önermekteyiz. Böylece bölgemizdeki mitokondriyal çeşitliliği daha iyi tanımlayarak ve biyoinformatik çalışmalarla uygun veri tabanları hazırlayarak hastaların tanı alması, aile taramalarıyla klinik ortaya çıkmadan önceki dönemde başlayan profilaktik

tedavi ve hayat tarzı değişiklikleri gibi erken müdahalelerle yaşam kalitesinin iyileştirilmesine ve ileri dönemde genetik tedavi seçeneklerinin araştırılmasına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J.-M., Roostalu, U., Loogväli, E.-L., Kivisild, T., Bandelt, H.-J., Richards, M., Villems, R., Santachiara-Benerecetti, A. S., ... Torroni, A. (2004). The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *American Journal of Human Genetics*, *75*(5), 910–918. <https://doi.org/10.1086/425590>
- Alila-Fersi, O., Chamkha, I., Majdoub, I., Gargouri, L., Mkaouar-Rebai, E., Tabebi, M., Tlili, A., Keskes, L., Mahfoudh, A., & Fakhfakh, F. (2017). Co segregation of the m.1555A>G mutation in the MT-RNR1 gene and mutations in MT-ATP6 gene in a family with dilated mitochondrial cardiomyopathy and hearing loss: A whole mitochondrial genome screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *484*(1), 71–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.070>
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: a review. İçinde *PeerJ* (C. 7, s. e7314). <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Ayalon, N., Flore, L. A., Christensen, T. G., & Sam, F. (2013). Mitochondrial encoded NADH dehydrogenase 5 (MT-ND5) gene point mutation presents as late onset cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, *167*(5), e143–e145. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.018>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Basso, C., Bauce, B., Corrado, D., & Thiene, G. (2012). Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(4), 223–233. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.173>
- Baudhuin, L. M., Lagerstedt, S. A., Klee, E. W., Fadra, N., Oglesbee, D., & Ferber, M. J. (2015). Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(4), 456–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.004>
- Beck, T. F., & Mullikin, J. C. (2016). Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clinical Chemistry*, 62(4), 647–654. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249623>
- Bernard, J., G., J., M. B., O., B. R., A., D. J., A., F. M., S., L. M., S., N. S., A., N. R., R., O. S., Harry, R., E., S. C., A., T. J., E., U. J., & W., Y. C. (2011). 2011 ACCF/AHA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy: Executive Summary. *Circulation*, 124(24), 2761–2796. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e318223e230>
- Brigden, W. (1957). Uncommon Myocardial Diseases. The Non-Coronary Cardiomyopathies*. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(57\)91537-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(57)91537-4)
- Burke, M. A., Cook, S. A., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2016). Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 68(25), 2871 LP – 2886. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>
- Calabrese, C., Simone, D., Diroma, M. A., Santorsola, M., Guttà, C., Gasparre, G., Picardi, E., Pesole, G., & Attimonelli, M. (2014). MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(21), 3115–3117.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Caporali, L., Iommarini, L., La Morgia, C., Olivieri, A., Achilli, A., Maresca, A., Valentino, M. L., Capristo, M., Tagliavini, F., Del Dotto, V., Zanna, C., Liguori, R., Barboni, P., Carbonelli, M., Cocetta, V., Montopoli, M., Martinuzzi, A., Cenacchi, G., De Michele, G., ... Carelli, V. (2018). Peculiar combinations of individually non-pathogenic missense mitochondrial DNA variants cause low penetrance Leber's hereditary optic neuropathy. *PLOS Genetics*, *14*(2), e1007210. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007210>
- Castellana, S., Rónai, J., & Mazza, T. (2015). MitImpact: an Exhaustive Collection of Pre-computed Pathogenicity Predictions of Human Mitochondrial Non-synonymous Variants. *Human Mutation*, *36*(2), E2413–E2422. <https://doi.org/10.1002/humu.22720>
- Cecchi, F., Tomberli, B., & Olivetto, I. (2012). Clinical and molecular classification of cardiomyopathies. *Global Cardiology Science & Practice*, *2012*(1), 4. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2012.4>
- Chinnery, P. F., & Gomez-Duran, A. (2018). Oldies but Goldies mtDNA Population Variants and Neurodegenerative Diseases . İçinde *Frontiers in Neuroscience* (C. 12, s. 682). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00682>
- Clima, R., Preste, R., Calabrese, C., Diroma, M. A., Santorsola, M., Scioscia, G., Simone, D., Shen, L., Gasparre, G., & Attimonelli, M. (2017). HmtDB 2016: data update, a better performing query system and human mitochondrial DNA haplogroup predictor. *Nucleic acids research*, *45*(D1), D698—D706. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1066>
- Collins, D. W., Gudiseva, H. V, Chavali, V. R. M., Trachtman, B., Ramakrishnan, M., III, W. T. M., Pistilli, M., Rossi, R. A., Blachon, S., Sankar, P. S., Miller-Ellis, E., Lehman, A., Addis, V., & O'Brien, J. M. (2018). The MT-CO1 V83I Polymorphism is a Risk Factor for Primary Open-Angle Glaucoma in African American Men. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Consortium, Gte. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics*, 45(6), 580–585.
<https://doi.org/10.1038/ng.2653>
- Couser, N., & Gucsavas-Calikoglu, M. (2017). *Chapter 8 - Mitochondrial disorders* (U. Garg & L. D. B. T.-B. in I. E. of M. Smith (Ed.); ss. 167–190). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802896-4.00008-0>
- Dai, D., Lu, Y., Chen, Z., Wei, Q., Cao, X., & Xing, G. (2008). Co-segregation of the T1095C with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a patient with non-syndromic hearing loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(4), 1152–1155.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.132>
- Dautant, A., Meier, T., Hahn, A., Tribouillard-Tanvier, D., di Rago, J.-P., & Kucharczyk, R. (2018). ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin. *Frontiers in Physiology*, 9, 329.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00329>
- Dimmeler, S. (2011). Cardiovascular disease review series. *EMBO Molecular Medicine*, 3(12), 697.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201100182>
- Domenico, C., Cristina, B., & P., J. D. (2017). Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 121(7), 784–802.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309345>
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühl, U., Maisch, B., McKenna, W. J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L., & Keren, A. (2007). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, 29(2), 270–276.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm342>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Elson, J. L., Smith, P. M., Greaves, L. C., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Taylor, R. W., & Vila-Sanjurjo, A. (2015). The presence of highly disruptive 16S rRNA mutations in clinical samples indicates a wider role for mutations of the mitochondrial ribosome in human disease. *Mitochondrion*, 25, 17–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.08.004>
- Erdmann, J., Daehmlow, S., Wischke, S., Senyuva, M., Werner, U., Raible, J., Tanis, N., Dyachenko, S., Hummel, M., Hetzer, R., & Regitz-Zagrosek, V. (2003). Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical Genetics*, 64(4), 339–349. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00151.x>
- Fan, W., Waymire, K. G., Narula, N., Li, P., Rocher, C., Coskun, P. E., Vannan, M. A., Narula, J., MacGregor, G. R., & Wallace, D. C. (2008). A Mouse Model of Mitochondrial Disease Reveals Germline Selection Against Severe mtDNA Mutations. *Science*, 319(5865), 958 LP – 962. <https://doi.org/10.1126/science.1147786>
- Fex, M., Nicholas, L. M., Vishnu, N., Medina, A., Sharoyko, V. V, Nicholls, D. G., Spégel, P., & Mulder, H. (2018). The pathogenetic role of β -cell mitochondria in type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*, 236(3), R145–R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0367>
- Finnilä, S., Hassinen, I. E., Ala-Kokko, L., & Majamaa, K. (2000). Phylogenetic Network of the mtDNA Haplogroup U in Northern Finland Based on Sequence Analysis of the Complete Coding Region by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis. *The American Journal of Human Genetics*, 66(3), 1017–1026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/302802>
- Finsterer, J., & Stöllberger, C. (2008). Primary myopathies and the heart. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 42(1), 9–24. <https://doi.org/10.1080/14017430701854953>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Fiorillo, C., Astrea, G., Savarese, M., Cassandrini, D., Brisca, G., Trucco, F., Pedemonte, M., Trovato, R., Ruggiero, L., Vercelli, L., D'Amico, A., Tasca, G., Pane, M., Fanin, M., Bello, L., Broda, P., Musumeci, O., Rodolico, C., Messina, S., ... Bruno, C. (2016). MYH7-related myopathies: Clinical, histopathological and imaging findings in a cohort of Italian patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0476-1>
- Fuku, N., Park, K. S., Yamada, Y., Nishigaki, Y., Cho, Y. M., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., Kato, K., Yokoi, K., Nozawa, Y., Lee, H. K., & Tanaka, M. (2007). Mitochondrial Haplogroup N9a Confers Resistance against Type 2 Diabetes in Asians. *The American Journal of Human Genetics*, *80*(3), 407–415. <https://doi.org/10.1086/512202>
- Galbiati, F., & Lisanti, M. P. (2013). *Caveolin-3 and Limb-Girdle Muscular Dystrophy*.
- Ganong, W. F. (2012). W. F. Ganong - Review of Medical Physiology. İçinde *Ganong's review of medical physiology*.
- Gazzerro, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M. P., & Minetti, C. (2010). Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *European Journal of Human Genetics*, *18*(2), 137–145. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.103>
- Geisterfer-Lowrance, A. A. T., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H.-P., McKenna, W., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*, *62*(5), 999–1006. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90274-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90274-I)
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(11), 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Golbus, R. J., J., P. M., P., F. J., M., D.-C. L., Don, W., & M., M. E. (2012). Population-Based Variation in Cardiomyopathy Genes. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 5(4), 391–399. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.112.962928>
- Goodwin, J. F., Gordon, H., Hollman, A., & Bishop, M. B. (1961). Clinical Aspects of Cardiomyopathy. *British Medical Journal*. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5219.69>
- Grasso, M., Diegoli, M., Brega, A., Campana, C., Tavazzi, L., & Arbustini, E. (2001). The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA^{Leu}(CUN) and is associated with dilated cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, 9(4), 311–315. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200622>
- Guaran, V., Astolfi, L., Castiglione, A., Simoni, E., Olivetto, E., Galasso, M., Trevisi, P., Busi, M., Volinia, S., & Martini, A. (2013). Association between idiopathic hearing loss and mitochondrial DNA mutations: A study on 169 hearing-impaired subjects. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1470>
- Gutell, R. R., Lee, J. C., & Cannone, J. J. (2002). The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(3), 301–310. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00339-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00339-1)
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). Guyton and Hall Physiology Review. İçinde *Guyton and Hall Physiology Review*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5452-8.00020-2>
- Hayashi, T., Arimura, T., Ueda, K., Shibata, H., Hohda, S., Takahashi, M., Hori, H., Koga, Y., Oka, N., Imaizumi, T., Yasunami, M., & Kimura, A. (2004). Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(1), 178–184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.101>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., & Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics*, *39*(3), 311–318. <https://doi.org/10.1038/ng1966>
- Herman, D. S., Lam, L., Taylor, M. R. G., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., Conner, L., DePalma, S. R., McDonough, B., Sparks, E., Teodorescu, D. L., Cirino, A. L., Banner, N. R., Pennell, D. J., Graw, S., Merlo, M., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Bos, J. M., ... Seidman, C. E. (2012). Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, *366*(7), 619–628. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>
- Hershberger, R. E., Hedges, D. J., & Morales, A. (2013). Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nature Reviews Cardiology*, *10*(9), 531–547. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.105>
- Hoekstra, R. F. (2000). Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance. *Human Reproduction*, *15*(suppl_2), 102–111. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.102
- Huigsloot, M., Nijtmans, L. G., Szklarczyk, R., Baars, M. J. H., van den Brand, M. A. M., HendriksFranssen, M. G. M., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A. M., Huynen, M. A., & Rodenburg, R. J. T. (2011). A Mutation in C2orf64 Causes Impaired Cytochrome c Oxidase Assembly and Mitochondrial Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, *88*(4), 488–493. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.03.002>
- Iaizzo, P. A. (2015). Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices, third edition. İçinde *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices, Third Edition*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19464-6>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ilaria, R., Barbara, B., Alessandra, R., Alessandro, Z., Kalliopi, P., Elisa, M., Federico, M., Perazzolo, M. M., Alessandra, L., Marzia, D. B., Martina, C., Andrea, N., Luciano, D., Dario, G., Sabino, I., Gaetano, T., Cristina, B., & Domenico, C. (2013). Compound and Digenic Heterozygosity Predicts Lifetime Arrhythmic Outcome and Sudden Cardiac Death in Desmosomal Gene-Related Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 6(6), 533–542. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000288>
- Ishiya, K., & Ueda, S. (2017). MitoSuite: a graphical tool for human mitochondrial genome profiling in massive parallel sequencing. *PeerJ*, 5, e3406–e3406. <https://doi.org/10.7717/peerj.3406>
- Jacoby, D., & McKenna, W. J. (2011). Genetics of inherited cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 33(3), 296–304. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr260>
- Jhang, W. K., Choi, J. H., Lee, B. H., Kim, G. H., & Yoo, H. W. (2016). Cardiac Manifestations and Associations with Gene Mutations in Patients Diagnosed with RASopathies. *Pediatric Cardiology*. <https://doi.org/10.1007/s00246-016-1468-6>
- Khan, N. A., Govindaraj, P., Soumitra, N., Sharma, S., Srilekha, S., Ambika, S., Vanniarajan, A., Meena, A. K., Uppin, M. S., Sundaram, C., Bindu, P. S., Gayathri, N., Taly, A. B., & Thangaraj, K. (2017). Leber's Hereditary Optic Neuropathy-Specific Mutation m.11778G>A Exists on Diverse Mitochondrial Haplogroups in India. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(10), 3923–3930. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20695>
- Kindel, S. J., Miller, E. M., Gupta, R., Cripe, L. H., Hinton, R. B., Spicer, R. L., Towbin, J. A., & Ware, S. M. (2012). Pediatric cardiomyopathy: Importance of genetic and metabolic evaluation. *Journal of Cardiac Failure*. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2012.01.017>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Klabunde, R. E. (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts* Second Edition. İçinde *Lippincott Williams & Wilkins*.
- Kofler, B., Mueller, E. E., Eder, W., Stanger, O., Maier, R., Weger, M., Haas, A., Winker, R., Schmut, O., Paulweber, B., Iglseider, B., Renner, W., Wiesbauer, M., Aigner, I., Santic, D., Zimmermann, F. A., Mayr, J. A., & Sperl, W. (2009). Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Medical Genetics*, *10*, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-35>
- Lane, N. (2011). Evolution. The costs of breathing. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1214012>
- Law, R., & Hutson, V. (1992). Intracellular symbionts and the evolution of uniparental cytoplasmic inheritance. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *248*(1321), 69–77. <https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0044>
- Lee M., T., T., H. D., Paul, K., A., T. J., M., W. S., D., C. S., K., C. W., L., J. J., W., R. J., D., C. C., J., A. L., K., L. A., M., L. J., M., M. E., T., T. P., D., C. J., Hiedy, R., Ashley, H., & E., L. S. (2017). Pediatric Cardiomyopathies. *Circulation Research*, *121*(7), 855–873. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309386>
- Lee, S. R., Kim, N., Noh, Y., Xu, Z., Ko, K. S., Rhee, B. D., & Han, J. (2017). Mitochondrial DNA mitochondrial dysfunction and cardiac manifestations. *Frontiers in Bioscience*, *22*(7), 1177–1194. <https://doi.org/10.2741/4541>
- Levick's Introduction to Cardiovascular Physiology, Sixth Edition. (2018). İçinde *Levick's Introduction to Cardiovascular Physiology*, *Sixth Edition*. <https://doi.org/10.1201/9781351107754>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Li, D., Sun, Y., Zhuang, Q., Song, Y., Wu, B., Jia, Z., Pan, H., Zhou, H., Hu, S., Zhang, B., Qiu, Y., Dai, Y., Chen, S., Xu, X., Zhu, X., Lin, A., Huang, W., Liu, Z., & Yan, Q. (2019). Mitochondrial dysfunction caused by m.2336T>C mutation with hypertrophic cardiomyopathy in cybrid cell lines. *Mitochondrion*, *46*, 313–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.08.005>
- Li, S., Pan, H., Tan, C., Sun, Y., Song, Y., Zhang, X., Yang, W., Wang, X., Li, D., Dai, Y., Ma, Q., Xu, C., Zhu, X., Kang, L., Fu, Y., Xu, X., Shu, J., Zhou, N., Han, F., ... Yan, Q. (2018). Mitochondrial Dysfunctions Contribute to Hypertrophic Cardiomyopathy in Patient iPSC-Derived Cardiomyocytes with MT-RNR2 Mutation. *Stem Cell Reports*, *10*(3), 808–821. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.013>
- Lipshultz, S. E., Sleeper, L. A., Towbin, J. A., Lowe, A. M., Orav, E. J., Cox, G. F., Lurie, P. R., McCoy, K. L., McDonald, M. A., Messere, J. E., & Colan, S. D. (2003). The Incidence of Pediatric Cardiomyopathy in Two Regions of the United States. *New England Journal of Medicine*, *348*(17), 1647–1655. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021715>
- Liu, Z., Song, Y., Li, D., He, X., Li, S., Wu, B., Wang, W., Gu, S., Zhu, X., Wang, X., Zhou, Q., Dai, Y., & Yan, Q. (2014). The novel mitochondrial 16S rRNA 2336T>C mutation is associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Medical Genetics*, *51*(3), 176–184. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101818>
- Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Xie, H. M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics*, *44*(1), 1.23.1-1.23.26. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0123s44>
- Lu, J. T., Muchir, A., Nagy, P. L., & Worman, H. J. (2011). LMNA cardiomyopathy: Cell biology and genetics meet clinical medicine. İçinde *DMM Disease Models and Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.006346>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Luedde, M., Ehlermann, P., Weichenhan, D., Will, R., Zeller, R., Rupp, S., Müller, A., Steen, H., Ivandic, B. T., Ulmer, H. E., Kern, M., Katus, H. A., & Frey, N. (2010). Severe familial left ventricular non-compaction cardiomyopathy due to a novel troponin T (TNNT2) mutation. *Cardiovascular Research*, *86*(3), 452–460. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq009>
- Marcus, F. I., McKenna, W. J., Sherrill, D., Basso, C., Bauce, B., Bluemke, D. A., Calkins, H., Corrado, D., Cox, M. G. P. J., Daubert, J. P., Fontaine, G., Gear, K., Hauer, R., Nava, A., Picard, M. H., Protonotarios, N., Saffitz, J. E., Sanborn, D. M. Y., Steinberg, J. S., ... Zareba, W. (2010). Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Proposed Modification of the Task Force Criteria. *European Heart Journal*, *31*(7), 806–814. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq025>
- Marian, A. J., & Eugene, B. (2017). Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, *121*(7), 749–770. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311059>
- Marianne, B., Marianne, S., G., N. B., & Anne, T.-H. (2008). Mitochondrial Haplogroups. *Circulation*, *117*(19), 2492–2501. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.756809>
- Maron, B. A., T. J., Gaetano, T., Charles, A., Domenico, C., Donna, A., J., M. A., E., S. C., & B., Y. J. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation*, *113*(14), 1807–1816. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287>
- Maron, B. J. (2010). Contemporary Insights and Strategies for Risk Stratification and Prevention of Sudden Death in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*, *121*(3), 445–456. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.878579>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- McCartan, C., Mason, R., Jayasinghe, S. R., & Griffiths, L. R. (2012). Cardiomyopathy Classification: Ongoing Debate in the Genomics Era. *Biochemistry Research International*, 2012, 796926. <https://doi.org/10.1155/2012/796926>
- McKenna, J. W., J., M. B., & Gaetano, T. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research*, 121(7), 722–730. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>
- McManus, M. J., Picard, M., Chen, H.-W., De Haas, H. J., Potluri, P., Leipzig, J., Towheed, A., Angelin, A., Sengupta, P., Morrow, R. M., Kauffman, B. A., Vermulst, M., Narula, J., & Wallace, D. C. (2019). Mitochondrial DNA Variation Dictates Expressivity and Progression of Nuclear DNA Mutations Causing Cardiomyopathy. *Cell Metabolism*, 29(1), 78-90.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.002>
- McNally, M. E. (2007). New Approaches in the Therapy of Cardiomyopathy in Muscular Dystrophy. *Annual Review of Medicine*, 58(1), 75–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.011706.144703>
- McNally, M. E., & Luisa, M. (2017). Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 121(7), 731–748. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309396>
- Menon, S. C., Michels, V. V, Pellikka, P. A., Ballew, J. D., Karst, M. L., Herron, K. J., Nelson, S. M., Rodeheffer, R. J., & Olson, T. M. (2008). Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology. *Clinical Genetics*, 74(5), 445–454. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01062.x>
- Merante, F., Tein, I., Benson, L., & Robinson, B. H. (1994). Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene. *American Journal of Human Genetics*, 55(3), 437–446. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8079988>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Mergen, H., öner, R., & öner, C. (2004). Mitochondrial DNA sequence variation in the Anatolian peninsula (Turkey). *Journal of Genetics*, 83(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/BF02715828>
- Merlo, M., Pyxaras, S. A., Pinamonti, B., Barbati, G., Di Lenarda, A., & Sinagra, G. (2011). Prevalence and Prognostic Significance of Left Ventricular Reverse Remodeling in Dilated Cardiomyopathy Receiving Tailored Medical Treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(13), 1468–1476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.030>
- Meyers, D. E., Basha, H. I., & Koenig, M. K. (2013). Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Texas Heart Institute Journal*, 40(4), 385–394. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24082366>
- Millat, G., Bouvagnet, P., Chevalier, P., Dauphin, C., Simon Jouk, P., Da Costa, A., Prieur, F., Bresson, J.-L., Faivre, L., Eicher, J.-C., Chassaing, N., Crehalet, H., Porcher, R., Rodriguez-Lafresse, C., & Rousson, R. (2010). Prevalence and spectrum of mutations in a cohort of 192 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Medical Genetics*, 53(5), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.07.007>
- Mimaki, M., Ikota, A., Sato, A., Komaki, H., Akanuma, J., Nonaka, I., & Goto, Y. (2003). A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy. *Journal of Human Genetics*, 48(1), 47–50. <https://doi.org/10.1007/s100380300005>
- Mohammed, S., Bahitham, W., Chan, A., Chiu, B., Bamforth, F., & Sergi, C. (2012). Mitochondrial DNA related cardiomyopathies. *Frontiers in Bioscience - Elite*. <https://doi.org/10.2741/e491>
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W., & Anderson, R. H. (2003). Development Of The Heart: (1) Formation Of The Cardiac Chambers And Arterial Trunks. *Heart*, 89(7), 806 LP.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Morimoto, S. (2007). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular Research*, 77(4), 659–666. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm084>
- Mu, W., Lu, H.-M., Chen, J., Li, S., & Elliott, A. M. (2016). Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6), 923–932. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.006>
- Muchtar, E., A., B. L., & A., G. M. (2017). Restrictive Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 121(7), 819–837. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310982>
- Niroula, A., Urolagin, S., & Vihinen, M. (2015). PON-P2: Prediction Method for Fast and Reliable Identification of Harmful Variants. *PLOS ONE*, 10(2), e0117380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117380>
- Niroula, A., & Vihinen, M. (2016). PON-mt-tRNA: a multifactorial probability-based method for classification of mitochondrial tRNA variations. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 2020–2027. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw046>
- Niroula, A., & Vihinen, M. (2018). How good are pathogenicity predictors in detecting benign variants? *bioRxiv*, 408153. <https://doi.org/10.1101/408153>
- Nugent, A. W., Daubeney, P. E. F., Chondros, P., Carlin, J. B., Cheung, M., Wilkinson, L. C., Davis, A. M., Kahler, S. G., Chow, C. W., Wilkinson, J. L., & Weintraub, R. G. (2003). The Epidemiology of Childhood Cardiomyopathy in Australia. *New England Journal of Medicine*, 348(17), 1639–1646. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021737>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pala, M., Olivieri, A., Achilli, A., Accetturo, M., Metspalu, E., Reidla, M., Tamm, E., Karmin, M., Reisberg, T., Hooshiar Kashani, B., Perego, U. A., Carossa, V., Gandini, F., Pereira, J. B., Soares, P., Angerhofer, N., Rychkov, S., Al-Zahery, N., Carelli, V., ... Richards, M. B. (2012). Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia. *American Journal of Human Genetics*, *90*(5), 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.003>
- Palecek, T., Tesarova, M., Kuchynka, P., Dytrych, V., Elleder, M., Hulkova, H., Hansikova, H., Honzik, T., Zeman, J., & Linhart, A. (2012). Hypertrophic Cardiomyopathy Due to the Mitochondrial DNA Mutation m.3303C>T Diagnosed in an Adult Male. *International Heart Journal*, *53*(6), 383–387. <https://doi.org/10.1536/ihj.53.383>
- Parvatiyar, M. S., Landstrom, A. P., Figueiredo-Freitas, C., Potter, J. D., Ackerman, M. J., & Pinto, J. R. (2012). A mutation in TNNC1-encoded cardiac troponin C, TNNC1-A31S, predisposes to hypertrophic cardiomyopathy and ventricular fibrillation. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(38), 31845–31855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377713>
- Peters, T. J., Wells, G., Oakley, C. M., Brooksby, I. A., Jenkins, B. S., Webb-Peploe, M. M., & Coltart, D. J. (1977). Enzymic analysis of endomyocardial biopsy specimens from patients with cardiomyopathies. *British Heart Journal*, *39*(12), 1333 LP – 1339. <https://doi.org/10.1136/hrt.39.12.1333>
- Pinto, J. R., Siegfried, J. D., Parvatiyar, M. S., Li, D., Norton, N., Jones, M. A., Liang, J., Potter, J. D., & Hershberger, R. E. (2011). Functional characterization of TNNC1 rare variants identified in dilated cardiomyopathy. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 34404–34412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.267211>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ploski, R., Rydzanicz, M., Ksiazczyk, T. M., Franaszczyk, M., Pollak, A., Kosinska, J., Michalak, E., Stawinski, P., Ziolkowska, L., Bilinska, Z. T., & Werner, B. (2016). Evidence for troponin C (TNNC1) as a gene for autosomal recessive restrictive cardiomyopathy with fatal outcome in infancy. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(12), 3241–3248. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37860>
- Poole, O. V, Horga, A., Hardy, S. A., Bugiardini, E., Woodward, C. E., Hargreaves, I. P., Merve, A., Quinlivan, R., Taylor, R. W., Hanna, M. G., & Pitceathly, R. D. S. (2020). Multisystem mitochondrial disease caused by a rare m.10038G>&t;A mitochondrial tRNA^{t;Gly} (MT-TG) variant. *Neurology Genetics*, 6(2), e413. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000413>
- Probst, S., Erwin, O., Pia, S., Matthias, G., Philipp, B., Walter, K., Felix, B., Ludwig, T., Rolf, J., & Sabine, K. (2011). Sarcomere Gene Mutations in Isolated Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy Do Not Predict Clinical Phenotype. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(4), 367–374. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.959270>
- Pugh, T. J., Kelly, M. A., Gowrisankar, S., Hynes, E., Seidman, M. A., Baxter, S. M., Bowser, M., Harrison, B., Aaron, D., Mahanta, L. M., Lakdawala, N. K., McDermott, G., White, E. T., Rehm, H. L., Lebo, M., & Funke, B. H. (2014). The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genetics in Medicine*, 16(8), 601–608. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.204>
- Rapezzi, C., Quarta, C. C., Riva, L., Longhi, S., Gallelli, I., Lorenzini, M., Ciliberti, P., Biagini, E., Salvi, F., & Branzi, A. (2010). Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview. *Nature Reviews Cardiology*, 7(7), 398–408. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.67>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., & Kircher, M. (2018). CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D886–D894. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & Committee, A. L. Q. A. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Riera, C., Padilla, N., & de la Cruz, X. (2016). The Complementarity Between Protein-Specific and General Pathogenicity Predictors for Amino Acid Substitutions. *Human Mutation*, *37*(10), 1013–1024. <https://doi.org/10.1002/humu.23048>
- Ripoll-Vera, T., Gámez, J. M., Govea, N., Gómez, Y., Núñez, J., Socías, L., Escandell, Á., & Rosell, J. (2016). Clinical and Prognostic Profiles of Cardiomyopathies Caused by Mutations in the Troponin T Gene. *Revista Espanola de Cardiologia (English Ed.)*, *69*(2), 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2015.06.025>
- Rogers, M. F., Shihab, H. A., Mort, M., Cooper, D. N., Gaunt, T. R., & Campbell, C. (2017). FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics*, *34*(3), 511–513. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx536>
- Roostalu, U., Kutuev, I., Loogväli, E.-L., Metspalu, E., Tambets, K., Reidla, M., Khusnutdinova, E. K., Usanga, E., Kivisild, T., & Villems, R. (2006). Origin&Expansion of Haplogroup H, the Dominant Human Mitochondrial DNA Lineage West Eurasia: The Near Eastern and Caucasian Perspective *24*(2)436-448

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Santorelli, F. M., Schlessel, J. S., Slonim, A. E., & DiMauro, S. (1996). Novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA glycine gene associated with sudden unexpected death. *Pediatric Neurology*, *15*(2), 145–149. [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(96\)00163-4](https://doi.org/10.1016/0887-8994(96)00163-4)
- Santorelli, F. M., Tanji, K., Manta, P., Casali, C., Krishna, S., Hays, A. P., Mancini, D. M., DiMauro, S., & Hirano, M. (1999). Maternally Inherited Cardiomyopathy: An Atypical Presentation of the mtDNA 12S rRNA Gene A1555G Mutation. *The American Journal of Human Genetics*, *64*(1), 295–300. <https://doi.org/10.1086/302188>
- Santoro, A., Balbi, V., Balducci, E., Pirazzini, C., Rosini, F., Tavano, F., Achilli, A., Siviero, P., Minicuci, N., Bellavista, E., Mishto, M., Salvioli, S., Marchegiani, F., Cardelli, M., Olivieri, F., Nacmias, B., Chiamenti, A. M., Benussi, L., Ghidoni, R., ... Franceschi, C. (2010). Evidence for Sub-Haplogroup H5 of Mitochondrial DNA as a Risk Factor for Late Onset Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, *5*(8), e12037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012037>
- Sato, M., & Sato, K. (2012). Maternal inheritance of mitochondrial DNA. *Autophagy*, *8*(3), 424–425. <https://doi.org/10.4161/auto.19243>
- Sawabe, M., Tanaka, M., Chida, K., Arai, T., Nishigaki, Y., Fuku, N., Naka Mieno, M., Kuchiba, A., & Tanaka, N. (2011). Mitochondrial Haplogroups A and M7a Confer a Genetic Risk for Coronary Atherosclerosis in the Japanese Elderly: An Autopsy Study of 1,536 Patients. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *18*(2), 166–175. <https://doi.org/10.5551/jat.6742>
- Sazonova, M. A., Shkurat, T. P., Demakova, N. A., Zhelankin, A. V., Barinova, V. A., & Orekhov, I. A. S. and A. N. (2016). Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next? İçinde *Current Pharmaceutical Design* (C. 22, Sayı 3, ss. 390–396). <https://doi.org/10.2174/1381612822666151112152335>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, *11*(4), 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Schweizer, P. A., Schröter, J., Greiner, S., Haas, J., Yampolsky, P., Mereles, D., Buss, S. J., Seyler, C., Bruehl, C., Draguhn, A., Koenen, M., Meder, B., Katus, H. A., & Thomas, D. (2014). The Symptom Complex of Familial Sinus Node Dysfunction and Myocardial Noncompaction Is Associated With Mutations in the HCN4 Channel. *Journal of the American College of Cardiology*, *64*(8), 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1155>
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R. P., & Anderson, R. H. (2000). Developmental patterning of the myocardium. *The Anatomical Record*, *258*(4), 319–337. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000401\)258:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000401)258:4)
- Semsarian, C., Ingles, J., Maron, M. S., & Maron, B. J. (2015). New Perspectives on the Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, *65*(12), 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.01.019>
- Serin, A., Canan, H., Alper, B., Korkut Gulmen, M., Zimmermann, B., & Parson, W. (2016). Mitochondrial DNA control region haplotype and haplogroup diversity in South Eastern Turkey. *Forensic Science International: Genetics*, *24*, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.011>
- Shan, L., Makita, N., Xing, Y., Watanabe, S., Futatani, T., Ye, F., Saito, K., Ibuki, K., Watanabe, K., Hirono, K., Uese, K., Ichida, F., Miyawaki, T., Origasa, H., Bowles, N. E., & Towbin, J. A. (2008). SCN5A variants in Japanese patients with left ventricular noncompaction and arrhythmia. *Molecular Genetics and Metabolism*, *93*(4), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.10.009>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Shen, L., Attimonelli, M., Bai, R., Lott, M. T., Wallace, D. C., Falk, M. J., & Gai, X. (2018). MSeqDR mvTool: A mitochondrial DNA Web and API resource for comprehensive variant annotation, universal nomenclature collation, and reference genome conversion. *Human Mutation*, 39(6), 806–810. <https://doi.org/10.1002/humu.23422>
- Shin, W. S., Tanaka, M., Suzuki, J., Hemmi, C., & Toyo-oka, T. (2000). A Novel Homoplasmic Mutation in mtDNA with a Single Evolutionary Origin as a Risk Factor for Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1617–1620. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/316896>
- Smith, P. M., Elson, J. L., Greaves, L. C., Wortmann, S. B., Rodenburg, R. J. T., Lightowers, R. N., Chrzanowska-Lightowers, Z. M. A., Taylor, R. W., & Vila-Sanjurjo, A. (2013). The role of the mitochondrial ribosome in human disease: searching for mutations in 12S mitochondrial rRNA with high disruptive potential. *Human Molecular Genetics*, 23(4), 949–967. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt490>
- Soini, H. K., Väisänen, A., Kärppä, M., Hinttala, R., Kytövuori, L., Moilanen, J. S., Uusimaa, J., & Majamaa, K. (2017). A novel MTTT mutation m.15933G>A revealed in analysis of mitochondrial DNA in patients with suspected mitochondrial disease. *BMC Medical Genetics*, 18(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0377-8>
- Srijita, S.-C., Petros, S., Deirdre, W., Angeliki, A., Elias, S., & J., M. W. (2007). Clinical and Genetic Characterization of Families With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Provides Novel Insights Into Patterns of Disease Expression. *Circulation*, 115(13), 1710–1720. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660241>
- Stavusis, J., Inashkina, I., Jankevics, E., Radovica, I., Micule, I., Strautmanis, J., Naudina, M. S., Utkus, A., Burnyte, B., & Lace, B. (2015). CAV3 gene sequence variations: National Genome Database and clinics. *Acta Neurologica Scandinavica*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Stewart, J., Manmathan, G., & Wilkinson, P. (2017). Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovascular Disease*, 6, <https://doi.org/10.1177/2048004016687211>
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402(6760), 371–372. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S., & Huang, T. (2010). Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome. *Mitochondrion*, 10(4), 350–357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.02.003>
- Tang, X., Yang, L., Zhu, Y., Liao, Z., Wang, J., Qian, Y., Tao, Z., Hu, L., Wu, G., Lan, J., Wang, X., Ji, J., Wu, J., Ji, Y., Feng, J., Chen, J., Li, Z., Zhang, X., Lu, J., & Guan, M.-X. (2007). Very low penetrance of hearing loss in seven Han Chinese pedigrees carrying the deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation. *Gene*, 393(1), 11–19. <https://doi.org/h10.1016/j.gene.2007.01.001>
- Tessa, A., Vilarinho, L., Casali, C., & Santorelli, F. M. (1999). MtDNA-related idiopathic dilated cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, 7(8), 847–848. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200380>
- The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. (2015). *Science*, 348(6235), 648 LP – 660. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>
- Tobita, T., Nomura, S., Fujita, T., Morita, H., Asano, Y., Onoue, K., Ito, M., Imai, Y., Suzuki, A., Ko, T., Satoh, M., Fujita, K., Naito, A. T., Furutani, Y., Toko, H., Harada, M., Amiya, E., Hatano, M., Takimoto, E., ... Komuro, I. (2018). Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Scientific Reports*, 8(1), 1998. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20114-9>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tomari, Y., Hino, N., Nagaike, T., Suzuki, T., & Ueda, T. (2003). Decreased cca-addition in human mitochondrial trnas bearing a pathogenic a4317g or a10044g mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16828–16833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213216200>
- Towbin, J. A. (2014). Inherited Cardiomyopathies. *Circulation Journal*, 78(10), 2347–2356. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0893>
- Towbin, J. A., Lorts, A., & Jefferies, J. L. (2015). Left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *The Lancet*, 386(9995), 813–825. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61282-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61282-4)
- Towbin, J. A., & Lynn, J. J. (2017). Cardiomyopathies Due to Left Ventricular Noncompaction, Mitochondrial and Storage Diseases, and Inborn Errors of Metabolism. *Circulation Research*, 121(7), 838–854. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310987>
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>
- Van Eijsden, R. G. E., Gerards, M., Eijssen, L. M. T., Hendrickx, A. T. M., Jongbloed, R. J. E., Wokke, J. H. J., Hintzen, R. Q., Rubio-Gozalbo, M. E., De Coo, I. F. M., Briem, E., Tiranti, V., & Smeets, H. J. M. (2006). Chip-based mtDNA mutation screening enables fast and reliable genetic diagnosis of OXPHOS patients. *Genetics in Medicine*, 8(10), 620–627. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000237782.94878.05>
- van Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*, 30(2). <https://doi.org/10.1002/humu.20921>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wallace, D. C. (2015). Mitochondrial DNA Variation in Human Radiation and Disease. *Cell*, 163(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.067>
- Wallace, D. C. (2018). Mitochondrial genetic medicine. *Nature Genetics*, 50(12), 1642–1649. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0264-z>
- Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 297–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314>
- Wang, J., Schmitt, E. S., Landsverk, M. L., Zhang, V. W., Li, F.-Y., Graham, B. H., Craigen, W. J., & Wong, L.-J. C. (2012). An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience. *Genetics in Medicine*, 14(6), 620–626. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.4>
- Wang, L., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2010). Narrative review: harnessing molecular genetics for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Annals of Internal Medicine*, 152(8), 513-W181. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-8-201004200-00008>
- Ware, S M, El-Hassan, N., Kahler, S. G., Zhang, Q., Y-W, Miller, E., Wong, B., Spicer, R. L., Craigen, W. J., Kozel, B. A., Grange, D. K., & Wong, L.-J. (2009). Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *Journal of Medical Genetics*, 46(5), 308 LP – 314. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.063149>
- Ware, Stephanie M. (2017). Genetics of paediatric cardiomyopathies. *Current Opinion in Pediatrics*, 29(5), 534–540. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000533>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)


- Watkins, H., Ashrafian, H., & Redwood, C. (2011). Inherited Cardiomyopathies. *New England Journal of Medicine*, 364(17), 1643–1656. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0902923>
- Weissensteiner, H., Pacher, D., Kloss-Brandstätter, A., Forer, L., Specht, G., Bandelt, H.-J., Kronenberg, F., Salas, A., & Schönherr, S. (2016). HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W58–W63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw233>
- WHO. (y.y.). *Cardiovascular diseases*. Tarihinde 09 Temmuz 2020, adresinden erişildi https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1
- Willott, R. H., Gomes, A. V, Chang, A. N., Parvatiyar, M. S., Pinto, J. R., & Potter, J. D. (2010). Mutations in Troponin that cause HCM, DCM AND RCM: What can we learn about thin filament function? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(5), 882–892. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.10.031>
- Wong, L.-J. C., Chen, T., Wang, J., Tang, S., Schmitt, E. S., Landsverk, M., Li, F., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, V. W., & Craigen, W. J. (2020). Interpretation of mitochondrial tRNA variants. *Genetics in Medicine*, 22(5), 917–926. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0746-0>
- Yamamoto, K., Sakaue, S., Matsuda, K., Murakami, Y., Kamatani, Y., Ozono, K., Momozawa, Y., & Okada, Y. (2020). Genetic and phenotypic landscape of the mitochondrial genome in the Japanese population. *Communications Biology*, 3(1), 104. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0812-9>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yuan, H., Qian, Y., Xu, Y., Cao, J., Bai, L., Shen, W., Ji, F., Zhang, X., Kang, D., Mo, J. Q., Greinwald, J. H., Han, D., Zhai, S., Young, W.-Y., & Guan, M.-X. (2005). Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA(Ser(UCN)) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *138A*(2), 133–140. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30952>
- Zangwill, S. D., Naftel, D., L'Ecuyer, T., Rosenthal, D., Robinson, B., Kirklin, J. K., Stendahl, G., & Dipchand, A. I. (2009). Outcomes of Children With Restrictive Cardiomyopathy Listed for Heart Transplant: A Multi-institutional Study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, *28*(12), 1335–1340. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2009.06.028>
- Zaragoza, M. V., Brandon, M. C., Diegoli, M., Arbustini, E., & Wallace, D. C. (2011). Mitochondrial cardiomyopathies: how to identify candidate pathogenic mutations by mitochondrial DNA sequencing, MITOMASTER and phylogeny. *European Journal of Human Genetics*, *19*(2), 200–207. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.169>
- Zhou, N., Tang, L., Jiang, Y., Qin, S., Cui, J., Wang, Y., Zhu, W., Zhao, W., Pan, C., & Shu, X. (2019). Whole-exome sequencing reveals a novel mutation of MT-ND5 gene in a mitochondrial cardiomyopathy pedigree: Patients who show biventricular hypertrophy, hyperlactacidemia, pulmonary hypertension, and decreased exercise tolerance. *Anatolian Journal of Cardiology*, *21*(1), 18–24. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2018.53258

EKLER DİZİNİ

Ek-1 Etik Kurul Onayı



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI

KARAR FORMU	
Başvuru Tarihi: 17.05.2019	Çalışmanın Başlığı: "Primer Kardiyomyopatlilerde mtDNA Varyantlarının Değerlendirilmesi" Çalışmacılar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı - Arş.Gör.Dr.Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP, Prof.Dr.Sevilhan ARTAN, Doç.Dr.Beyhan DURAK ARAS, Dr.Öğr.Üy.Oğuz ÇİLINGİR (Yüksek Lisans Tez Danışmanı), Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı / Çocuk Kardiyolojisi Bilim Dalı - Dr.Öğr.Üy.Pelin KÖŞGER, Arş.Gör.Dr.Hikmet KIZTANIR, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı - Arş.Gör.Dr.Ezgi SUSAM, Bio.Duygu ÇINAR, Bio.Mehmet Arda TEMENA (Yüksek Lisans Tez Sahibi)
Karar Tarihi: 28.05.2019	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Arş.Gör.Dr.Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP sorumluluğunda yürütülen "Primer Kardiyomyopatlilerde mtDNA Varyantlarının Değerlendirilmesi" başlıklı çalışmanın yapılmasının etik açıdan uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Araştırmacılara başarılar dileriz.
Karar No: 50	

Doç.Dr.Muhammed Evvah KARAKILIÇ
(Başkan)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Acil Tıp AD

Doç.Dr.Özlem ÖRSAL
(Raportör)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi
Halk Sağlığı Hemşireliği AD

Prof.Dr.Ömür ŞAYLIGİL
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD

Prof.Dr.Setenay DİNÇER ÖNER
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD

Prof.Dr.Varol SAHİNTÜRK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD

Prof.Dr.Timuçin KAŞİFOĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD / Romatoloji BD

Doç.Dr.Batu Can YAMAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi AD

Doç.Dr.Kürşat Bora ÇARMAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD /
Çocuk Nörolojisi BD

Doç.Dr.Melih VELİPAŞAOĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD

Doç.Dr.Lütfiye DEMİR
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hast. AD / Tıbbi Onkoloji BD

Doç.Dr.Merih ÖZGEN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon AD

Doç.Dr.Göknur YORULMAZ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD / Endokrinoloji
ve Metabolizma Hastalıkları BD

Doç.Dr.Ferdi KÖŞGER
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD

Dr.Öğr.Üy.Mustafa Değer BİLGEÇ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD

Av. Önder CAN
Avukat

Etik Kurul Sekreterliği
Aysun SERTTAŞ
Tel: 0 222 239 29 79 / 4690

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Mehmet Arda TEMENA

Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1992/Eskişehir

Uyruğu : T.C.

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresleri : rd.temena@gmail.com

Eğitim Durumu :

Adalet İlköğretim Okulu (1998-2005)

Eskişehir Kılıçoğlu Anadolu Lisesi (2005-2009)

Orta Doğu Teknik Üniversitesi (2009-2015) Biyolojik Bilimler

Yabancı Dil : İngilizce

Mesleki Deneyim : Biyolog / ESOGÜ Tıbbi Genetik ABD (2017-)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Türk Biyokimya Derneği
(2016-)

Yayınlar : -

Projeler : Primer Kardiyomiyopatilerde mtDNA Varyantlarının
Değerlendirilmesi (ESOGÜ-BAP-B-2019) Araştırmacı

Sözlü Konferans veya Seminerler : -