T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE MİTOKONDRİYAL POLİMORFİZMLERİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Neslihan DÜZKALE

Tez Yöneticisi
Doç.Dr. Abdulgani TATAR

Uzmanlık Tezi
ERZURUM 2012

İÇİNDEKİLER

ONAY ..... **IV**
ÖZET ..... **V**
SUMMARY ..... **VI**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **VII**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **VIII**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **IX**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Gen ve Genom 4
2.1.1. Gen Polimorfizmi 7
2.1.2. Mutasyon 10
2.1.2.1. Mutasyon Tipleri 10
2.1.2.2. Mutasyonların Proteinler Üzerindeki Yapısal Etkileri 11
2.1.2.2.1. Sinonim ve Sessiz Mutasyonlar 11
2.1.2.2.2. Non-Sinonim Mutasyonlar 11
2.1.2.3. DNA'nın Kodlamayan Bölgelerinin Mutasyonları 12
2.1.2.4. Mutasyonların Proteinler Üzerindeki Fonksiyonel Etkileri 13
2.1.2.5. Genotip-Fenotip Korelasyonu 13
2.2. Apoptozis 14
2.2.1. Hücre-Yüzey Ölüm Reseptörleri Aktivasyonu İle Oluşan Apoptozisin Ekstrensek Yolu 15
2.2.2. Mitokondri Bağımlı Apoptozisin İntrensek Yolu 15
2.2.3. Bcl2 Proteinleri- Apoptozisin İntrensek Yolunun Regülatörleri 16
2.2.4. IAP_s ve anti-IAP Proteinleri 17
2.2.5. Apoptozis ve p53 18
2.2.6. Apoptozis ve Kanser 20
2.3. Mitokondri 20
2.3.1. Elektron Transport Zinciri 22
2.3.2. Mitokondriyal DNA (mtDNA) 25
2.3.2.1. Mitokondriyal DNA'nın Kalıtımı 26

2.3.2.2. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyon, Transkripsiyon ve Translasyonu 28
2.3.2.2.1. Replikasyon 28
2.3.2.2.2. Transkripsiyon 29
2.3.2.2.3. Translasyon 31
2.3.3. Oksidatif Stres, Mitokondriyal Disfonksiyon Ve Yaşlanma 33
2.3.4. MtDNA Polimorfizmi 36
2.3.5. mtDNA Mutasyonları 42
2.3.6. Mitokondri ve kanser 46
2.4. Hematolojik Maligniteler 49
2.4.1. Miyelopoez ve Myeloid Kök Hücreler 49
2.4.2. Lenfopoez ve Lenfoid Kök Hücreler 51
2.4.3. Akut Lösemiler 54
2.4.3.1. Tanım 54
2.4.3.2. Epidemiyoloji 54
2.4.3.3. Sorumlu Faktörler 54
2.4.3.4. Patobiyoloji 56
2.4.3.5. Sınıflama 56
2.4.3.6. Morfoloji 58
2.4.3.7. Hücre Yüzey Markırları 58
2.4.3.8. Sitogenetik ve Moleküler Biyoloji 59
2.4.4. Kronik Lösemiler 62
2.4.4.1. Kronik Miyeloid Lösemi 63
2.4.4.1.1. Tanım 63
2.4.4.1.2. Epidemiyoloji 63
2.4.4.1.3. Moleküler Patogenez 63
2.4.4.1.4. Sitogenetik 64
2.4.4.2. Kronik Miyelomonositik Lösemi 64
2.4.4.3. Saçlı Hücreli (Hairy Cell) Lösemi 64
2.4.4.4. Kronik Lenfositik Lösemi 65
2.4.4.4.1. Tanım 65
2.4.4.4.2. Epidemiyoloji 65
2.4.4.4.3. Patobiyoloji 65

2.4.4.4.4. Genetik 66
2.4.4.5. Diğer Kronik Lenfositik Lösemiler 66
2.4.4.5.1. Prolenfositik Lösemi (PLL) 66
2.4.4.5.2. Küçük Lenfositik Lenfoma (SLL) 67
2.4.4.5.3. T Hücreli Lösemiler 67
2.4.5. Hematolojik maligniteler ve mitokondri ilişkisi 67
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 68
2.6. Restriksiyon Enzimleri 70
2.6.1. Restriksiyon Enzimlerinin Doğal Fonksiyonu 70
2.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) 72
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi 73
3. MATERYAL VE METOD 74
3.1. Materyal 74
3.1.1. Çalışma Grubu 74
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 74
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar 75
3.1.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 76
3.1.5. Primer Çiftlerinin ve Restriksiyon Enzimlerinin Seçilmesinde Yararlanılan İnternet Siteleri 76
3.1.6. Mitokondriyal DNA Polimorfizmleri Çalışmasında Kullanılan Primer (Oligonükleotid) Çiftleri 77
3.2. Metod 78
3.2.1. Kandan DNA Izolasyonu 78
3.2.2. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonunun Kantitatif Ölçümü 79
3.2.3. PCR Ürünlerinin Elde Edilmesi 79
3.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi 80
3.2.5. Restriksiyon Enzim Muamelesi 81
3.2.6. Kullanılan İstatistik Yöntemler ve Bilgisayar Programları 82
4. BULGULAR 83
4.1. Laboratuvar Bulguları 84
5. TARTIŞMA 104
KAYNAKLAR 114

ONAY

Anabilim Dalımız Arş. Gör. Dr. Neslihan Düzkale'nin "Hematolojik Malignitelerde Mitokondriyal Polimorfizmlerin Araştırılması" konulu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun, 18.08.2011 tarihli ve 7 sayılı oturumunda **69** nolu kararı ile onaylanmış olup, Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Kurulu'nun 14.09.2011 tarih ve 3. oturumunda **29** nolu kararı ile Doç. Dr. Abdulgani TATAR danışmanlığında tez olarak çalışılması uygun görülmüştür. Bu tez çalışması 2009/305 sayılı BAP projesi ile desteklenmiştir.

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE MİTOKONDRİYAL POLİMORFİZMLERİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; hematolojik malignite tanısı almış olan hastalarda, muhtemel mtDNA polimorfizmlerinin varlığının araştırılarak, bu kanser türüne olan yatkınlıktaki mevcut öneminin belirlenmesidir.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Hematoloji Anabilim Dalı'nın ortak çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya hematolojik malignite tanısı almış 80 hasta ve kontrol grubu olarak 80 sağlıklı birey olmak üzere toplam 160 kişi dahil edilmiş ve mitokondriyal genomun 6 bölgesine ait 13 tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism; SNP) araştırılmıştır. Bu hastaların kanlarından mtDNA izolasyonu yapılarak mtDNA polimorfizmleri incelenmesi PCR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde, hastalık tipi ile mtDNA polimorfizm sonuçları ki-kare ile test edilip, istatistiksel önemlilik düzeyi $p< 0,05$ alınmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen SNP'ler ve bulundukları gen bölgeleri: Sitokrom b-15315 (C>T), NADH dehidrojenaz subunit 5-13704 (C>T), 12S rRNA -740 (G>A), 12S rRNA -680 (T>C), Sitokrom c oksidaz I-7319 (T>C), Sitokrom c oksidaz I- 7444 (G/A), Sitokrom c oksidaz II- 7660 (G>A), Sitokrom c oksidaz II- 7975 (A>G), $tRNA^{lizin}$- 8310 (T>C), Sitokrom c oksidaz II- 8014 (A>G, A>T), Sitokrom c oksidaz II- 8252 (C>G, C>T), Sitokrom c oksidaz II- 8113 (C>A) ve Sitokrom c oksidaz II- 8152 (G>A) şeklindedir. 12 hastada ND5- 13704 bölgesinde polimorfik yapı tespit edilmiş olup, bu bölgenin polimorfizmleri hasta grubunda, kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.001$). Sitokrom c oksidaz II- 8252 bölgesinde hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de polimorfizm ve heteroplazmik polimorfizmlere rastlanmış fakat bu bölgedeki polimorfizmleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0,895$).

Tüm bu bulgular baz alındığında mtDNA ND5- 13704 (C>T) polimorfizminin hematolojik malignitelere olan yatkınlıkta potansiyel bir risk markırı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Mitokondriyal DNA polimorfizmi, NADH dehidrojenaz 5, hematolojik maligniteler, PCR-RFLP

THE INVESTIGATION OF MITOCHONDRIAL POLYMORPHISMS ON HEMATOLOGIC MALIGNITIES

SUMMARY

The aim of this study was to investigate possible polymorphisms of mitochondrial DNA in the patients diagnosed as hematologic malignancy and to determine the importance of this polymorphisms on tendency to these malignancies.

This study was carried out between Hematology Department and Medical Genetics Departments of Medical Faculty of Atatürk University. Totally 160 subjects; 80 patients diagnosed as hematologic malignancy and 80 healthy control group were recruited in this study and 13 SNPs on 6 regions of the mitochondrial DNA were studied. Mitochondrial DNA isolation was performed from these subjects blood and polymorphisms were identified by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. Chi-square test was used for the evaluation the mtDNA polymorphism and the disease type. The statistical significant level was accepted as $p<0,05$. SNPs studied and their gene locations: cytochrome b-15315 (C>T), NADH dehydrogenase subunit 5- 13704 (C>T), 12S rRNA -740 (G>A), 12S rRNA -680 (T>C), cytochrome c oxidase I- 7319 (T>C), cytochrome c oxidase I- 7444 (G>A), cytochrome c oxidase II- 7660 (G>A), cytochrome c oxidase II- 7975 (A>G), $tRNA^{lysine}$- 8310 (T>C), cytochrome c oxidase II- 8014 (A>G, A>T), cytochrome c oxidase II- 8252 (C>G, C>T), cytochrome c oxidase II- 8113 (C>A) ve cytochrome c oxidase II- 8152 (G>A).

Polymorphisms were identified in the region of ND5- 13704 in 12 patients and these polymorhisms were statistically significant when compared to control group ($p= 0.001$). Polymorphisms and heterozigot polymorphisms were identified in both patient and control groups in the cytochrome c oxidase II- 8252 region but these polymorphisms were not evaluated as statistically significant ($p= 0.895$).

Based on these findings, we propose which mtDNA 13704 polymorphism may be a potential risk marker towards hematologic malignancies susceptibility.

Key Words: Mitochondrial DNA polymorphism, NADH dehydrogenase 5, hematologic malignancy, PCR-RFLP

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri 9
Tablo 2.2. Hücresel ATP üretiminde mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan gen sayısı 24
Tablo 2.3. Nükleer genom ve mitokondriyal genom karşılaştırılması 32
Tablo 2.4. Mitokondriyal genomda polimorfizmlerin dağılımı 41
Tablo 2.5. mtDNA mutasyonlarından kaynaklanan bazı hastalıklar 45
Tablo 2.6. Miyelopoezde Rol Oynayan Faktörler: 50
Tablo 2.7. Lenfopoezde Rol Oynayan Faktörler 51
Tablo 2.8. Akut Lösemiler WHO sınıflaması 57
Tablo 2.9. AML'de görülen bazı sitogenetik anomaliler 60
Tablo 2.10. Sitogenetik olarak normal AML ile ilgili gen mutasyonları 60
Tablo 2.11. ALL'de görülen bazı moleküler ve sitogenetik anomaliler 61
Tablo 2.12. Myeloproliferatif hastalıkların sınıflandırılması 62
Tablo 2.13. Restriksiyon enzimleri sınıflandırma 70
Tablo 3.1. Mitokondriyal DNA polimorfizmi için kullanılan primer çiftleri 77
Tablo 3.2. PCR Protokolü 80
Tablo 3.3. Kullanılan Restriksiyon Enzimleri ve Tanıma Bölgeleri 81
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri (1) 84
Tablo 4.2. Çalışılan polimorfizmlerin restriksiyon enzimleri ve bant boyutları 85
Tablo 4.3. ND5- 13704 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmlerin hasta grupları arasındaki dağılımı 86
Tablo 4.4. ND5- 13704 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmin cinsiyetler arasında dağılımı 86
Tablo 4.5. Sitokrom C Oksidaz II- 8252 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmlerin hasta grupları arasındaki dağılımı 87
Tablo 4.6. Sitokrom C Oksidaz II- 8252 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmlerin cinsiyetler arasında dağılımı 87
Tablo 4.7. Hematolojik maligniteli hastaların yaş, cinsiyet, tanı ve polimorfizm değerlendirme sonucu 88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. p53 ve Mdm2 ilişkisi 19
Şekil 2.2. Tavuk embriyosuna ait bir mitokondrinin elektron mikroskobik görüntüsü 22
Şekil 2.3. Elektron Transport Zinciri 24
Şekil 2.4. İnsan mtDNA'sı 25
Şekil 2.5. Mitokondriyal (maternal) kalıtımı gösteren örnek pedigri 27
Şekil 2.6. mtDNA'nın transkripsiyonu 31
Şekil **2.7.** Mitokondriyal ROS'un üretimi 34
Şekil 2.8. Hematolojik Maligniteler Orjin ve sınıflama 53
Şekil 2.9. Polimeraz zincir reaksiyonu 69
Şekil 2.10. Restriksiyon enzimi kesim ürünleri 72
Şekil 4.1. Hastalık tipi ile yaş dağılımı arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi. 83
Şekil 4.2. 15315 CT polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 92
Şekil 4.3. C13704T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 93
Şekil 4.4. G740A polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 94
Şekil 4.5. T680C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 95
Şekil 4.6. T7319C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 96
Şekil 4.7. G7444A polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 97
Şekil 4.8. T7660C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 98
Şekil 4.9. A7975G Polimorfizm çalışması PCR görüntüsü 99
Şekil 4.10. T8310C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 100
Şekil 4.11. C8252G, C8252T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 101
Şekil 4.12. A8014G, A8014T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 102
Şekil 4.13 C8113A ve G8152A polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü 103

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
ALL	Akut lenfoid lösemi
AML	Akut myeloid lösemi
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
°C	Santigrat derece
dH_2O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
g	Gram
G	Guanin
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
KLL	Kronik lenfositik lösemi
KML	Kronik myeloid lösemi
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ND	NADH dehidrojenaz
OXPHOS	Oksidatif Fosforilasyon
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Ph	Philedelphia kromozomu
RE	Restriksiyon endonükleaz

RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikada dönüş sayısı
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
U	Urasil
UV	Ultraviyole
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık Örğütü

1. GİRİŞ

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin her ikisinin birden etkilediği ve regülasyonu bozulmuş hücre siklusu ile sonuçlanan multifaktöryel bir hastalıktır. İnsan kanserleri; hücrenin DNA tamir mekanizmasının bozulması, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi genetik olaylar sonucunda, çok basamaklı aşamalarla oluşmaktadır.

Dünyada her yıl 10 milyon yeni kanserli hasta tanımlanmakta ve 6 milyon insan kanser sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Dünyadaki tüm ölümlerin %12'si kanser sonucu olmakta ve gelişmiş ülkelerde kanser, 2. en sık ölüm nedeni olarak görülmektedir.

Kanser araştırmalarında erken tanı ve tedavi kadar, kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerin, kanser gelişmeden önce tespit edilebilmesi de büyük önem taşımaktadır. Çevresel risk faktörlerinin önemi dikkate alınmasına rağmen, epidemiyolojik çalışmalar; benzer türde ve miktarda çevresel riske maruz kalan bireyler arasında populasyonun belli bir bölümünün kanser gelişimine daha yatkın olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, genetik faktörlerin aracılık ettiği kanser yatkınlığını araştırmaya odaklanan moleküler epidemiyoloji çalışmalarının yapılmasına yol açmıştır (1). Araştırmacılar; belli populasyonları nadir genetik defektlerden dolayı suçlasa da, giderek artan kanser vakalarında, DNA sekansındaki polimorfik varyasyonların yarattığı bireysel yatkınlığın varlığı konusunda uzlaşmışlardır (2).

Son yıllarda, mitokondriyal genomdaki polimorfizmler ve kanser ilişkisi sıkça araştırılır hale gelmiştir. İnsan populasyonunda, çeşitli mtDNA polimorfizmleri ile ilişkili olarak bazı kanserlerde artan riskin tariflenmesi dikkatleri mitokondri organeline yöneltmiştir (3). Kendine ait bir genomu bulunan mitokondri; hücrede enerji üretimi yanında çoğu hücresel fonksiyonu da gerçekleştirmektedir. Bu fonksiyonlar arasında; hücre ölümünün kontrolü, büyüme, gelişme, nükleus ile arasındaki sinyallerin ve çeşitli metabolik yolların düzenlenmesi sayılabilir. Spesifik mtDNA polimorfizmlerinin kanserde risk artışına sebep olmasıyla ilgili altta yatan mekanizma halen esrarını korusa da, kabul edilen hipotez; elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonu da kapsayan mitokondriyal genomdaki bu polimorfizmlerin, mtDNA kadar nükleer

DNA'da da hipermutajen olan oksidatif streste artışa sebep olmasıdır. Kanserli hastalarda yapılan incelemelerde, mtDNA'nın bir çok bölgesine ait çoğu noktada polimorfizmler tespit edilmiş ve bu polimorfizmler kansere yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir (3, 4).

Türk Hematoloji Derneği'nin resmi sitesinden alınan verilere göre; hematolojik kanserler tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Hodgkin lenfoma çoğunlukla genç erişkinlerin hastalığı olup 15-34 yaş grubu erkeklerde ikinci en sık görülen kanser, kadınlarda ise 4. en sık görülen kanserdir. Kadınlarda 3. dekadda görülen artış daha sonra düşerken erkeklerde görülme sıklığı tedricen artar. Hodgkin lenfoma insidansı 100.000 de 2-3'tür. Non- Hodgkin lenfomaların görülme sıklığı 1950'li yıllardan sonra dramatik bir artış göstermiştir. Batı toplumlarında 1950'li yıllarda insidansı 100.000'de 6-7 iken, 1990'lı yıllarda 100.000'de 18–20 olmuştur. Non-Hodgkin lenfomalar erkeklerde kadınlardan, beyazlarda ise siyahlardan biraz fazla görülmektedir. Görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Foliküler lenfoma tipleri Kuzey Avrupa ve Amerika'da oldukça sık görülmesine karşın doğu ve uzak doğuda yok denecek kadar azdır. Bu farklılığın nedeni hala anlaşılamamakla birlikte ırksal olduğu düşünülen çeşitli faktörler suçlanmaktadır. Myeloma, tüm kanserlerin %1'ini oluşturmaktadır. Lenfomalardan sonra ikinci en sık görülen hematolojik kanser olup tüm hematolojik kanserlerin %10'unu oluşturur. İngiltere'de 2000 yılında 3730 yeni vaka saptanmıstır. Tanı sırasındaki ortalama yaş 60-65 olup vakaların sadece %2'si 40 yaşın altındadır. Son toplum çalısmalarında 55 yaş altında myeloma sıklığının arttığı rapor edilmektedir. Çeşitli etnik gruplarda ve coğrafik bölgelerde farklı olmakla birlikte myeloma insidansı 100.000'de 8-10 arasında değişmektedir. Akut lösemilerin insidansı çocuk yaş grubunda 100.000'de 2-3 iken ileri yaş grubunda 100.000'de 15'in üzerine çıkmaktadır. Tüm yaşlarda görülmekle birlikte 7. ve 8. dekadlarda görülme sıklığı en üst seviyeye ulaşmaktadır. Kronik myeloid lösemi (KML) insidansı tüm dünyada hemen hemen sabit görülmektedir. İstatistik raporlarının tamamına yakınında KML insidansı 100.000'de 1-1,5 olarak rapor edilmektedir. Yirmi yaşın altında oldukça nadir olup ilerleyen dekadlarda görülen artış 50-60 yaşlarda pik yapmaktadır. Erkeklerde kadınlardan biraz daha fazla sıklıkta görülmektedir. 1945'te atom bombası atılmasından sonra ortaya çıkan radyasyon Japonya'da KML sıklığını oldukça artırmıştır. Radyasyonun en belirgin olarak etkili olduğu lösemi tipi KML'dir. Myelodisplastik sendromlar (MDS)

insidansı 100.000'de 3-4 olarak bildirilmektedir. Bu oran yaşla birlikte artarak 7-8 dekadda 100.000'de 50-60 olarak görülmektedir.

Literatürde; hematolojik maligniteler ve myelodisplastik sendrom gibi kemik iliğinin çoğu hastalıklarında, mtDNA'da bir çok mutasyon ve polimorfizm rapor edilmiştir (5-9).

Biz bu çalışmamızda, hematolojik malignite tanısı almış olan hastalardan elde edilen mtDNA örneklerinde, 6 kodlayan bölgeye ait 13 polimorfik noktayı PCR-RFLP yöntemi kullanarak incelemeyi ve olası mtDNA polimorfizmlerinin bu malignitelere olan yatkınlıktaki önemini ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gen ve Genom

Gen; bir polipeptidin sentezi için gerekli olan DNA dizisinin tamamıdır. Bir bireyin tüm karakterlerine ait bilgi kalıtsal molekülündeki birimlerde (genlerde) şifreli biçimde yazılıdır. Bir organizmanın hücrelerinde bulunan genetik bilginin tamamına *genom* denir. Ökaryotik organizmaların çoğunun genomu prokaryotlarınkinden daha büyük ve karmaşıktır. Bununla birlikte birçok ökaryotun genom boyutu, onların genetik karmaşıklığı ile her zaman tam anlamıyla ilişkili değildir.

Genom 2 kısımdan oluşur:

I) Protein Kodlayıcı Bölgeler (Ekzon)

- Proteinleri oluşturan genler
- Düzenleyici diziler

II) Protein Kodlayıcı Olmayan Bölgeler (İntron)

- Tekrarlanan DNA dizileri
  a) Ard arda dizilmiş basit dizi tekrarları (Satellit DNA)
  b) Aralara dizilmiş dizi tekrarları
  - SINE
  - LINE
- Transposable elementler (Yerdeğiştiren DNA parçacıkları)
- Gen aileleri
- Psödogenler

İnsan genomunda genler, kromozomlar üzerinde ve çeşitli oranlarda dağılmışlardır. Bir gen, sahip olduğu nükleotid dizisinde, bir proteinin aminoasit dizisi için gerekli olan bilgiyi taşır. Gendeki DNA'nın geri kalan bölümü, proteinleri kodlayan kısa DNA parçalarının aralarını dolduran, uzun, kodlamayan DNA dizileridir. Genlerin kodlayan sekansları *ekzonlar*, kodlamayan sekansları *intronlar* olarak adlandırılır. İnsan genlerinin çoğu birbirini izleyen intron ve ekzon dizilerinden meydana gelir ve genin

büyük bölümünü intronlar oluşturur. Ekzon ve intronların sayısı ve boyutları genler arasında geniş oranda değişkenlik gösterir. İntronlara ve ekzonlara ek olarak, *düzenleyici DNA dizileri* her genin uygun zaman ve düzeyde, uygun hücre tipinde ifade edilmesini sağlamaktan sorumludur. İnsanlarda, tipik bir gen için düzenleyici diziler onbinlerce nükleotid çiftine yayılmıştır. Bu kodlamayan bölgeler, traskripsiyonun düzenlenmesini kotrol eden özel protein moleküllerine bağlanır.

Tekrarlayıcı DNA dizileri, ökaryotik genomun önemli bir bölümünü oluşturan ve kodlamayan yapılardır. Tekrarlanan diziler genom boyunca yerleşme şekillerine göre 2 gruba ayrılır:

1- Ard arda dizilmiş basit dizi tekrarları (Satellit DNA)

5-200 nükleotidlik kısa DNA dizilerinin ard arda kümelenmiş binlerce kopyasından oluşurlar (….GTTACGTTTACGTTACGTTACGTTACGT….). Bu şekilde tekrarlanan DNA dizilerinin hepsine birden *satellit (uydu) DNA* adı verilir. Bu diziler her genomda milyonlarca kez tekrarlanabilir ve tüm DNA'nın % 10-15'ini oluştururlar. Bu basit DNA dizilerinin transkripsiyonu yapılmaz ve fonksiyonel genetik bilgi taşımazlar.

2- Aralara serpiştirilmiş tekrar dizileri

Bu tekrarlanan DNA dizileri, genom boyunca aralıklı olarak serpiştirilmiş durumdadırlar.

Bu serpiştirilmiş diziler 2 gruba ayrılır:

a- Aralara serpiştirilmiş kısa dizi tekrarları (SINE'ler)

b- Aralara serpiştirilmiş uzun dizi tekrarları (LINE'ler)

a- *SINE:* 100-300 baz çifti uzunluğundadır ve toplam insan DNA'sının % 13'ünü oluşturur. RNA'ya transkribe olsa da protein kodlamazlar. İşlevleri bilinmemektedir.

b- *LINE:* 6-8 kb uzunluğundadır ve toplam insan DNA'sının % 21'ini oluşturur. Transkribe olurlar ve bazıları protein kodlarlar. İşlevleri bilinmemektedir.

Transposable elementler (Yerdeğiştiren DNA parçacıkları): Bir hücrenin genomunda bir bölgeden diğerine hareket edebilen DNA parçalarına *transpozonlar* denir. Bunlar genellikle 2000 bç büyüklüğündedir.

Gen aileleri: Ökaryotik genomda birçok gen, bir kısmı genellikle işlevsel olmayan, çok sayıda kopyalar şeklinde bulunur. Genlerin bu halde bulunması bazen çok miktarda ihtiyaç duyulan RNA'ların ve proteinlerin (rRNA ve histon genleri gibi) üretilmesi için gerekli olmaktadır. Bazı durumlarda ise bir gen ailesinin farklı üyeleri farklı dokularda veya gelişmenin farklı evrelerinde transkribe olabilir. Gen ailelerinin orijinal bir ata genin dublikasyonu ile oluştuğu, ailenin farklı elemanlarının ise evrim sırasında geçirilen mutasyonlar sonucunda birbirinden farklılaştığı düşünülmektedir. Böyle bir farklılaşma gen ailesi elemanlarının ürünleri olan proteinlerin farklı doku ve farklı gelişim evrelerinde fonksiyon görmek üzere evrimine neden olur.

Pseudogen: DNA dizileri içerisinde, yapısal olarak bir gene benzeyen fakat fonksiyonel olarak eksprese olmayan dizilerdir. Bunların, geçirdiği mutasyonlar sebebiyle fonksiyonel gen ürünleri oluşturma yeteneğini kaybeden genlerin evrimsel kalıntıları olduğu sanılmaktadır.

Yaklaşık 25.000 gene sahip olan insan genomunun, % 2'den daha azının protein kodladığı ortaya konulmuştur. Genomun kodlayan bölgeleri dışında kalan bölümünün genomun evrim boyunca korunmasında, DNA'nın paketlenmesinde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları tahmin edilmektedir. Düzenleyici ve kodlamayan DNA'nın miktarı ve yerleşimi türler arasında türler arasında geniş ölçüde değişiklikler gösterir, ancak temel strateji evrenseldir. Tüm hücrelerde bireysel genlerin ifadesinin düzenlenmesi, hücrenin gereksinimine göre ayarlanır. DNA dizisi içinde toplanmış genetik bilginin tümü olan hücrenin genomu, sadece hücredeki proteinlerin niteliğini değil, bunların ne zaman ve nerede yapılacaklarını da tayin eder ve hücrenin devamını sağlar.

Penetrans (Etkinlik): Bir genin (veya gen kombinasyonunun) fenotipte kendini gösterme sıklığına penetrans denir. Penetrans sahip olduğu genotipi fenotipte gösteren bireylerin populasyondaki oranıyla tanımlanır. Bir genin penetransı bu genin sorumlu olduğu karaktere sahip bireylerin sayısının populasyondaki o geni taşıyan birey sayısına oranlanmasıyla hesaplanır. Örneğin, bir populasyonda genotiplerinde bir tane A alleli

taşıyanların (Aa heterozigotlarının) sayısı 100 ise ve bunların 70'i bu allele ait karakteri fenotiplerinde gösteriyorlar ise A allelinin etkinliği %70'dir. İnsanlardaki çok parmaklılık (polidaktili) özelliği bir genin dominant etkili bile olsa, her zaman fenotipte ortaya çıkmadığına ait iyi bir örnektir.

Ekspresivite (Etkinlik Derecesi): Bu kavram bir bireyde belli bir genotipin fenotipik olarak belirme derecesini veya boyutunu tanımlamakta kullanılır. Bir genin ekspresivitesi, etkin bir genin fenotipte meydana getirdiği etkinin derecesidir. Etkinlik derecesini açıklamak için de örnek olarak çok parmaklılık özelliği verilebilir. P geni etkin olsa bile, parmak sayısı beşten fazla olan bireylerde bu anormalliğin boyutu çok değişkenlik gösterebilir. Çok parmaklılık el ve ayakların her ikisinde veya sadece birinde ortaya çıkabilmekte, parmak sayısındaki artış ve fazla parmakların gelişim derecesi farklı olabilmekte, hatta bazen gözle görülemeyen bu fazlalık ancak röntgen çekimiyle anlaşılabilmektedir (10).

2.1.1. Gen Polimorfizmi

Dünyadaki bir çok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Populasyonda 2 farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 baz çifti uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece 1 baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine *allel* adı verilir. Alleller, yaygın olduğu zaman genel populasyonda kromozomlarda %1'den daha fazla bulunur; bunlar da genetik polimorfizm olarak bilinirler. Aksine, zıt olarak alleller %1'den daha az sıklıkta ise, nadir değişimler (rare varyant) olarak isimlendirilir. İntronlarda ve genler arasında lokalize olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı gen varyantları vardır. Bunlar, herhangi bir genin fonksiyonu için önemsizdir ve sadece direkt DNA analizleri ile belirlenir. Genlerin kodlanan dizi değişimleri farklı protein çeşitliliğine, bu durum da farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olur. Birçok proteinin, farklı populasyonlarda nispeten yaygın ve ayrılabilen varyantlarının olduğu tespit edilmiştir (11-13). DNA dizilerinin değişimlerinden daha çok polimorfik allellerin ürünü olan proteinler, farklı fenotiplerden sorumludur. Regülatör bölgede polimorfik alleller, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotiplerin belirlenmesinde önemli rol oynayabilir (14).

İnsanlarda yapısal gen lokuslarının en az %30'unun polimorfik olduğu ve tüm lokusların yaklaşık %20'sinde allellerin yapısal olarak farklı polipeptitler için heterozigot olabildiği gösterilmiştir. Farklı etnik gruplardan bireyler mukayese edildiği zaman, proteinlerin büyük bir kısmının tesbit edilebilen polimorfizmi gösterdiği saptanmıştır. Bilinen polimorfik protein sistemleri ABO kan grupları ve polimorfik elektroforetik farklılıklar gösteren çoğu plazma proteinlerini (α1-antitripsin, haptoglobulin, transferrin, serüloplazmin, apolipoproteinler, immünglobulinler) kapsar. Kendi enzimlerini yapan ve özgün gen ürünlerine sahip insan populasyonları arasında önemli derecede biyokimyasal bireysellik vardır. Birçok biyokimyasal yoldaki ürün etkileşim halindedir. Yani, sağlık durumu her ne olursa olsun, herbir birey genetik olarak kendine özgü kimyasal oluşuma sahiptir ve bu nedenle çevreye, beslenmeye ve farmakolojik etkilere kendine özgü cevap verecektir.

DNA polimorfizmleri, pozisyonel klonlamada, gen haritalamasında ve bir çok hastalıkla ilişkili genin tanımlanmasında kritik bir role sahip olan SNP'leri (Single Nükleotid Polimorfizm) kapsar. SNP'ler aynı zamanda, presemptomatik hastalar için kullanılan testlerin içeriğinde, prenatal tanıda ve direkt mutasyon analizlerinin mümkün olmadığı birçok tek-gen hastalığının taşıyıcılık tespitinde kullanılır. Belirli bir polimorfik sistemin önemi, onun polimorfik bilgi içeriğinin (PIC) tespit edilmesi açısından incelenmesini gerekli kılar ve yüksek PIC değeri, bağlantı analizi ve gen izleme çalışmalarında bir polimorfik marker olarak değer kazanabileceğini gösterir .

Multifaktöryel hastalıkların genetik temelinin büyük oranda kalıtımsal bir eğilim ve genetik yatkınlığın sonucu olabileceği düşünülmüştür. Bu hastalıklar, çok sayıda farklı genin birbirleriyle olan etkileşimi (polijenik kalıtım) ile çevresel faktörler ve etkilerin (multifaktöryel kalıtım) bileşkesi sonucu oluşurlar. Protein, enzim ve DNA'nın bazı kalıtılabilir varyantları, bir çok hastalıkta, etkilenmiş bireylerde tüm populasyona nazaran daha sıklıkla tespit edilebilir ve bu durum *assosiyasyon* olarak tanımlanır. Genomun bir çok bölgesine dağılmış olarak bulunan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), genomda çeşitli fonksiyonel değişimlere de sebep olabilirler (Tablo 2.1.)

İnsan genomu yaklaşık olarak 10 milyon SNP içerir. SNP genotipleme çalışmalarında yüksek verimli mikroarrayların geliştirilmesi, SNP haplotipleri ile ilgili bilgilerin (HapMap projesinden elde edilen) varlığı ve yaygın hastalığı olan hastalardan

elde edilen DNA örneklerinin geniş bir koleksiyonunun kullanılabilir olması lokuslarda mevcut olan bir çok varyasyonun güvenilir bir şekilde tanımlanmasını mümkün kılmıştır .

Tablo 2.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri

Varyantın tipi	**Lokalizasyon**	**Fonksiyonel etki**	**Genomda görülme sıklığı**	**Fenotipe yansımada öngörülen risk**
Nonsense	Kodlayan sekans	Prematür sonlanma	Çok düşük	Çok yüksek risk
Missense/non-sinonim (non-konservatif)	Kodlayan sekans	Proteinin aminoasitinde değişim	Düşük	Lokalizasyona bağlı olarak orta-yüksek risk
Missense/non-sinonim (konservatif)	Kodlayan sekans	Proteinin aminoasitinde değişim	Düşük	Düşük risk
İnsertion/delesyon (çerçeve kayması yani üç ve katları kadar)	Kodlayan sekans	Genellikle proteinde negatif etkiyle sonuçlanan, protein-kodlayan bölgenin çerçeve değişimi	Düşük	Yerleşim yerine bağlı olarak çok yüksek risk
İnsertion/delesyon (çerçeve kayması olmayan)	Kodlayan ya da kodlamayan sekans	Aminoasit sekansında değişim	Düşük	Düşük-çok yüksek
Sense/sinonim	Kodlayan sekans	Aminoasitte değişiklik olmaz, fakat splicing değişebilir	Orta	Düşük-yüksek risk
Promotör/regülatör bölge	Promotör, 5’ UTR, 3’UTR	Aminoasitte değişiklik olmaz, fakat gen ekspresyon düzeyi ve hızı etkilenir	Düşük-orta	Düşük-yüksek risk
İntron-ekzon sınırı	Ekzonda 10 bç’lik bir alan (intronun hemen yanı)	İntron etkinliğini ya da splicing paterni değiştirdiği sanılmakta	Düşük	Düşük-yüksek risk
İntronik	İntron bölgesi içinde	Etkisi bilinmiyor fakat mRNA stabilitesini ve ekspresyonu etkilediği tahmin ediliyor	Normal	Çok düşük risk
İntergenik	Genler arası kodlamayan bölge	Etkisi bilinmiyor fakat ekspresyonu etkilediği tahmin ediliyor	Yüksek	Çok düşük risk

2.1.2. Mutasyon

DNA'nın nükleotid dizilerindeki veya düzenlenmesinde kalıtılabilir değişikliklerdir. Mutasyonlar evrime katkıda bulunurlar fakat aynı zamanda patojenik de olabilirler. Mutajenik bir ajana maruz kalındığında da gelişse dahi, mutasyonların büyük çoğunluğu DNA replikasyon ve tamir hataları yoluyla, spontan oluşur. Somatik mutasyonlar, kanser gibi erişkin dönemde başlayan bir hastalık sebebi veya sonucu olabilirler, fakat bu tip mutasyon yavrulara kalıtılamaz. Gonadal doku veya bir gamette oluşabilecek bir mutasyon, yaşam süresini ve fertiliteyi etkilemediği sürece gelecek jenerasyonlara aktarılır. Toplumdaki her bireyin homozigot hale geçtiğinde çok ciddi sonuçlara yol açabilecek olan 6 adet lethal yada semilethal resesif mutant allel için taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir. Bu ılımlı bir tahmin oranıdır ve asıl değer çok daha büyük olabilir. Türlerdeki bu alleller populasyonun genetik yükünü meydana getirir. Doğal olarak oluşan mutasyonlar *spontan mutasyonlar* olarak bilinirler ve kromozomal ayrılma ya da DNA replikasyonu sırasında tesadüfen meydana gelirler. Mutajenler olarak bilinen ionize radyasyon, kimyasal veya fiziksel *mutajenler* gibi bazı çevresel ajanlar mutasyonların oluşumuna sebep olabilirler (15).

2.1.2.1. Mutasyon Tipleri

Mutasyonlar, tek bir bazın değişimi yada kromozomların tümünün kazanımı veya kaybı temelinde dağılım gösterir. Baz değişim mutasyonları en yaygın olanıdır ve missense mutasyonlar tüm mutasyonların yaklaşık yarısından sorumludur.

Substitüsyon (yer değiştirme) mutasyonları, tek bir nükleotidin bir diğerinin yerine geçmesiyle oluşurlar ve mutasyonların en yaygın türleridirler. Eğer bir substitüsyon benzer tip nükleotid yer değişimini kapsıyorsa (bir pirimidin bazının yerini bir pirimidin bazı aldıysa veya bir pürin bazı diğer bir pürin bazı ile yer değiştirdiyse), bu durum *transisyon* olarak; yer değiştirme bir pürin ve pirimidin bazı arasında gerçekleşirse *transversiyon* olarak adlandırılır. Transisyonlar transversiyonlara göre daha sık oluşur. Bu durum muhtemelen sitozin ve guanin nükleotidlerinin genomik DNA'da sıklıkla metillenmiş bir şekilde "CpG dinükleotid" (p fosfat grubunu tanımlar) olarak bir arada bulunması sonucunda C'nin T'ye transisyonunun rölatif yüksek sıklığı sebebiyle olabilir. CpG dinükleotidler mutasyonlar için hotspot noktalarıdırlar (15).

Delesyonlar, bir ya da daha fazla nükleotidin kaybını kapsar. Eğer bu kayıp kodlayan sekansta ve 3'ün katları miktarınca olmayan artışlar şeklinde olursa okuma çerçevesi bozulacaktır. Geniş delesyonlar, yenilenen sekanslar arasında eşit olmayan karşılıklı parça değişimi (krossing-over) yoluyla oluşabilir ve genin tamamının veya bir kısmının kaybıyla sonuçlanabilir.

İnsersion, bir gen içerisine bir ya da daha fazla sayıda nükleotidin eklenmesidir. Delesyondakine benzer şekilde, eğer bu eklenme kodlayan sekansta ve 3'ün katları olmayan artışlar şeklinde olursa okuma çerçevesi bozulacaktır. Geniş insersiyonlar, aynı zamanda eşit olmayan krossing over ya da yer değiştirebilen (transposable) elementlerin insersiyonu sonucunda oluşabilir.

Üçlü tekrar ekspansiyonu, ekspansiyon (genişleme) bölgesinin boyutuyla alakalı unstabil nitelikteki tekrarlayan sekansların gözlendiği bu durum dinamik mutasyonlar olarak tanımlanır. Her bir üçlü nükleotid dizisinin tekrar sayısı bir sonraki kuşağa stabil olmayan bir şekilde aktarılır. Üçlü tekrar sekansının ekspansiyon ve amplifikasyonunun gerçek mekanizması günümüzde halen açıklanamamıştır. Stabil olmayan trinükleotid tekrarları, genin hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelerinde olabilir ve bu nedenle patojenik mekanizmaları çok çeşitli olabilir.

2.1.2.2. Mutasyonların Proteinler Üzerindeki Yapısal Etkileri

2.1.2.2.1. Sinonim ve Sessiz Mutasyonlar

Eğer bir mutasyon, genin polipeptit dizisinde değişime neden olmazsa bu durum sinonim ya da sessiz mutasyon olarak adlandırılır.

2.1.2.2.2. Non-Sinonim Mutasyonlar

Eğer bir mutasyon, genin polipeptit ürününde değişime neden oluyorsa bu durum non-sinonim mutasyon olarak adlandırılır. Bu mutasyonlar sinonim mutasyonlara nazaran daha az sıklıkla gözlemlenir. Non-sinonim mutasyonlar üç şekilde gerçekleşebilir:

a- Missense Mutasyon: Tek baz çifti değişimi mutasyonu, farklı bir aminoasidin kodlanması ve farklı bir proteinin sentezi ile sonuçlanır. Eğer bir mutasyon

kimyasal ve fonksiyonel olarak farklı bir aminoasit kodlarsa, sentezlenecek proteinin yapısı değişecektir. Bu durum *non-konservatif değişim* olarak adlandırılır ve biyolojik aktivitenin büyük oranda azalması hatta tamamen kaybına yol açar. Bazı tek baz çifti değişimi mutasyonları, kimyasal olarak benzer fakat herhangi bir fonksiyonel etkiye sahip olmayan bir aminoasitin oluşumu ile sonuçlanır. Bu durum *konservatif değişim* olarak adlandırılır.

b- Anlamsız Mutasyon (Nonsense): Bir baz çiftinin değişimi "dur" kodonlarından herhangi birinin oluşumuna ve bir peptit zincirinin translasyonunda erken sonlanmaya neden oluyorsa bu durum anlamsız mutasyon olarak adlandırılır. Sentezlenecek proteinin önemli bir fonksiyonel kısmının kaybına sebep olabilecek böyle bir durumda, normal biyolojik aktivitenin devamı da mümkün değildir. Prematür terminasyon kodonunu içeren mRNA transkriptleri *nonsense-bağımlı yıkım* olarak bilinen bir süreç yoluyla parçalanırlar.

c- Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyon: Eğer bir mutasyon nükleotitlerin üçün katları şeklinde olmayan nükleotid delesyon ya da insersiyonunu kapsıyorsa, bu durum okuma çerçevesi ve yapısının bozulmasına neden olacaktır. Bu mutasyonların çoğu, erken sonlanma kodonu ile sonuçlanır. Tamamlanmamış protein mRNA transkriptleri nonsense-bağımlı yıkım yoluyla parçalanır.

2.1.2.3. DNA'nın Kodlamayan Bölgelerinin Mutasyonları

DNA'nın promoter sekansı ve diğer düzenleyici bölgelerinde oluşanlar hariç kodlamayan bölgelerine (intronlarına) ait mutasyonlar, daha az önemli olan bir fenotipik etkiye sahiptir (15).

Bağlantı (Splicing) Mutasyonları: Yüksek düzeyde korunmuş olan splice bölgelerinin mutasyonları genellikle anormal splicing mekanizması ile sonuçlanmaktadır. Bu durum kodlayan sekansın kaybı (ekzon atlama) ve intron sekansının korunumu ile sonuçlanmakta ve çerçeve kayması mutasyonlarına yol açmaktadır. Kriptik splice alanları, asıl splice alanlarının sekansına benzerdir ve korunmuş olan splice alanlarının mutasyona uğradığı durumlarda aktivasyon kazanmaktadır.

2.1.2.4. Mutasyonların Proteinler Üzerindeki Fonksiyonel Etkileri

a- Fonksiyon Kaybettiren Mutasyonlar: Fonksiyon kaybettiren mutasyonlar, gen ürününün tamamen kaybı veya azalmış aktivitesi ile sonuçlanabilir. Gen ürününün azalmış aktivitesi ya da stabilitesi *hipomorf* olarak bilinir. Gen ürününün tamamen kaybı ise null allel ya da *amorf* olarak bilinir. Fonksiyon kaybettiren mutasyonlar enzimleri kapsar ve genellikle otozomal resesif yada X'e bağlı resesif olarak kalıtılır.

b- Fonksiyon Kazandıran Mutasyonlar: Fonksiyon kazandıran mutasyonlar, gen ekspresyonunun düzeylerinde artış veya gen ürününün yeni bir fonksiyon kazanımı ile sonuçlanabilir. Bu mutasyonlar dominant olarak kalıtılır ve homozigot durumda olan fonksiyon kazandıran mutasyonların nadir örnekleri sıklıkla prenatal dönemde kaybedilen çok şiddetli fenotiple ilişkilidir (homozigot akondroplazi).

c- Dominant Negatif Mutasyonlar: Dominant negatif mutasyon, heterozigot durumda mutant olan bir genin, normal bir protein aktivitesi veya fonksiyonunun kaybına yol açmasıdır. Mutant gen ürününün müdahalesi, uygun allellin ürettiği normal genin fonksiyonunu da bozacaktır. Bu mutasyonlar özellikle kollajen gibi yapısal multimer proteinler ve dimer proteinlerde oldukça yaygın gözlemlenir (osteogenezis imperfekta) .

2.1.2.5. Genotip-Fenotip Korelasyonu

Genetik hastalıkların bir çoğu değişken şiddette seyreder veya bireysel özellikler gösterir. Moleküler genetik alanındaki gelişmeler; fenotip olarak bilinen ya da belirli bir kalıtsal hastalığa sahip olan bir bireydeki spesifik özelliklerin mutasyonel zemininin tanımlanmasına imkan sağlamışlardır. Bu durum genotip olarak bilinen belli bir mutasyonun varlığıyla, kalıtsal hastalıkların gözlemlendiği bir bireyin spesifik özelliklerinin ilişkilendirilmesi girişimleri ile sonuçlanmıştır ve bu durum *genotip-fenotip korelasyonu* olarak tanımlanmıştır .

2.2. Apoptozis

Hücre büyümesi birçok kısıtlayıcı mekanizmanın kontrolü altında gerçekleşir ve kontrol basamaklarını ihlal eden hücreler için; 2 sonucun birine maruz kalmak kaçınılmazdır:

1. Programlı hücre ölümü (apoptozis)
2. Hücre transformasyonu ve tümörogenezis (neoplazi)

Hasarlanan hücre ve dokular nekroza uğrayabilirler. Nekroz, inflamatuar cevap artışıyla oluşan ve hücrenin genişleyip, sitoplazmik membranının bütünlüğünün bozulup, hücre içeriğinin ekstrasellüler alana dökülmesi şeklindeki bir hücre ölümüdür. Genetik olarak hasarlı hücreler, bunun yanı sıra büyümenin geçici olarak durması (onarım/sağkalım yolu) ya da büzüşme ve fragmantasyon ile gerçekleşen bir noninflamatuar ölüm süreci olan apoptozis yoluna girerler (16). Nekrozdan farklı olarak apoptozis, yaklaşık 30 dakika süren, hücre intiharı olarak da bilinen enerji bağımlı bir süreçtir (17).

Apoptozisin Rol Oynadığı Olaylar:

1. Embriyonun vücut şeklinin oluşumunda (örneğin parmakların formasyonu),
2. İmmun toleransın kazanılması sürecinde otoreaktif timositlerin silinmesi,
3. Gelişim sürecinde, santral sinir sisteminin sinaps formasyonunun oluşumunda,
4. Hormonal akışa cevap olarak gerçekleşen organ involusyonunda (menstruel ya da post-partum uterus epitelinin yenilenmesi ve memenin involusyonu),
5. Kolorektal epitelyal hücrelerin turn overinde,
6. Saç foliküllerinin regresyonunda

apoptozis önemli bir mekanizmadır.

Apoptozisten sorumlu olan intrasellüler mekanizma, tüm hayvan hücrelerinde benzerdir. Hücrelerde inaktif prekürsörler olarak sentezlenen prokaspazların proteolitik ayrılması ile kaspazlar oluşur (18).

2.2.1. Hücre-Yüzey Ölüm Reseptörleri Aktivasyonu İle Oluşan Apoptozisin Ekstrensek Yolu

Bu yolda hücre-yüzey ölüm reseptörlerine bağlanan ekstrasellüler sinyal proteinleri apoptozisin ekstrensek yolunu tetikler. Transmembran proteinlerin ölüm reseptörleri bir ekstrasellüler ligand-bağımlı alan ile bir intrasellüler ölüm alanını ihtiva ederler ve bunlar apoptotik programın aktivasyonunda gereklidirler (16, 19). Bu reseptörler, TNF'nin kendi bağlanması için bir reseptörü olan Tümör nekroz faktör reseptör ailesinin üyeleri ve aynı zamanda Fas ölüm reseptörleri olan homotrimerlerdir (16, 20). Apoptozisin ekstrensek yolunu tetikleyen ölüm reseptörleri olan bir sitotoksik lenfositin yüzeyindeki Fas ligand yoluyla hedef hücrelerin yüzeyindeki Fas'ın aktive olmasıdır (19). Fas ligand, Fas ölüm reseptörüne bağlandığında, bu reseptörün sitozolik kuyruğu, hücre içi adaptör proteinlerin bir ölüm-indükleyici sinyal kompleksine [death-inducing signaling complex (DISC)] şekillenmesini sağlar. DISC'in bir kez aktive olması, prokaspaz-8, prokaspaz-10 veya her ikisinin de tetiklenerek, aktif kaspaz-8 veya 10'un oluşumuna ve apoptozis sürecinin başlamasına neden olur (18, 20, 21).

2.2.2. Mitokondri Bağımlı Apoptozisin İntrensek Yolu

Hücredeki herhangi bir tahribat veya DNA hasarı, besin ve oksijen kaybı ya da ekstrasellüler hayati sinyallerin oluşumuna, hücrenin kendi cevabı olarak apoptozis aktivasyonu olabilir. Mitokondrilerin, membranlar arası alanda bulunması gereken proteinlerinin sitozole salınımına bağlı olarak apoptotik ölüm programının intrasellüler aktivasyonu gerçekleşir (19). Salınan proteinlerin bir kısmı, sitoplazmada bir kaspaz proteolitik kaskadı aktive ederek apoptozise neden olur. İntrensek yolda mitokondriyal elektron transport zincirinin, suda çözünen bir komponenti olan sitokrom c, mitokondriden salınır (18, 21). Bu protein sitozole salındığında *apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)* olarak adlandırılan, bir prokaspaz aktive edici adaptör proteine bağlanır. Bu bağlanım Apaf-1'in apoptozom olarak adlandırılan tekerlek benzeri bir heptamere oligomerizasyonuna sebep olur. Apoptozomdaki Apaf-1 proteinleri, DISC içinde bulunan prokaspaz-8 ve -10 proteinlerinin aktive olmasına benzer şekilde, tetikleyici prokaspaz proteinlerinin (prokaspaz-9) aktivasyonuna sebep olur. Aktive olan kaspaz-9 molekülleri, öldürücü prokaspazların down-stream aktivasyonunu sağlayarak, apoptozisi indüklerler (19, 21).

2.2.3. Bcl2 Proteinleri- Apoptozisin İntrensek Yolunun Regülatörleri

Organizma tarafından ölümüne karar verilen hücreler, apoptozisin intrensek yolu tarafından sıkı bir şekilde regüle edilirler (20). Apoptozisi intrasellüler olarak düzenleyen Bcl2 protein ailesi, kaspaz ailesine benzer ve tüm türlerde evrim boyunca korunmuştur. Memelilerde Bcl2 proteinleri, başlıca sitokrom c'nin ve diğer intermembran mitokondriyal proteinlerin sitozole salınımını kontrol etmek yoluyla apoptozisin intrensek yolunun regülasyonunu sağlarlar (19). Bazı Bcl2 proteinleri, pro-apoptotikken (apoptozise teşvik ederler), bazıları anti-apoptotiktirler (apoptozisi inhibe ederler) (18, 21, 22).

Antiapoptotik Bcl2 Proteinleri:

. Bcl2 ailesinin keşfedilen ilk üyesi olan Bcl2'nin kendisi ve Bcl-X_L

Pro-Apoptotik Bcl2 Proteinleri:

. BH123 ailesinin üyeleri olan Bax ve Bak proteinleri

. BH3-only proteinleri

Bir apoptotik stimulus intrensek yolu tetiklediğinde, pro-apoptotik BH123 proteinleri aktive olur ve mitokondriyal dış membranında bir araya gelerek bilinmeyen bir mekanizmayla sitokrom c ve diğer intermembran proteinlerinin salınımını indüklerler (19). Memeli hücrelerinde Bax ve Bak, ana BH123 proteinleridirler ve apoptozisin intrensek yolunun etkinliğinde en az birine ihtiyaç duyulmaktadır (20, 21). Bax ve Bak'ın aktivasyonu, genellikle pro-apoptotik BH3-only proteinlerinin aktivasyonuna bağlıdır. Bax ve Bak, endoplazmik retikulum (ER) yüzeyinde ve nükleer membranda da etkindirler. Bunların ER stresine cevaben sitozole Ca^{+2} salınımında ve apoptozisin mitokondri bağımlı intrensek yolunun aktivasyonunda rol aldıkları düşünülmektedir (20). Anti-apoptotik Bcl2 proteinleri olan Bcl2'nin kendisi ve Bcl-X_L; pro-apoptotik Bcl2 proteinlerini inhibe etmek yoluyla apoptozisi inhibe ederler. BH3-only proteinleri, Bcl2 protein ailesinin en geniş alt sınıfıdır. Bu proteinlerin hücrede bir apoptotik stimulusa cevaben üretilip aktive edildiği ve anti-apoptotik Bcl2 proteinlerini inhibe ederek apoptozisi destekledikleri düşünülmektedir (20). BH3'ün antiapoptotik Bcl2 proteinlerinin uzun hidrofobik oluğuna bağlanan bir parçası, bu proteinlerin aktivitelerini nötralize ederler. Çok iyi anlaşılamamış bir mekanizma yoluyla, bu

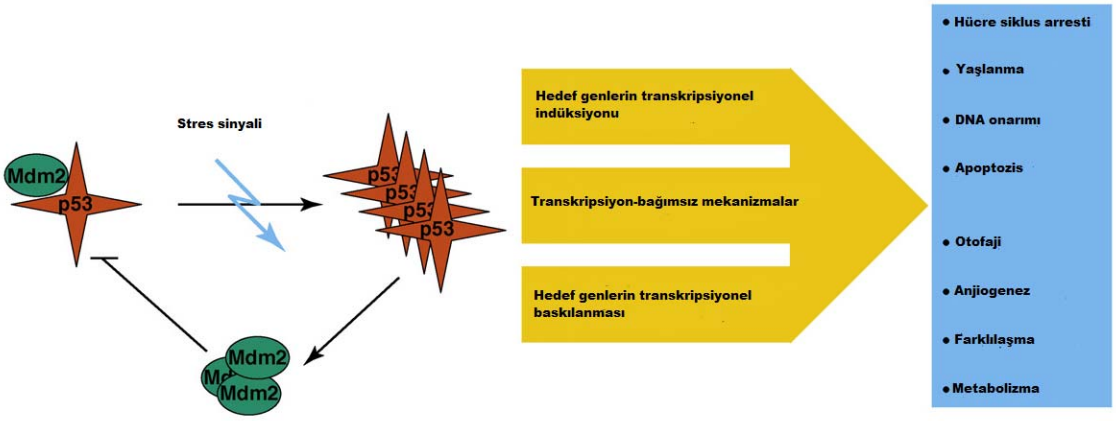
bağlanma ve inhibisyon, mitokondri yüzeyindeki Bax ve Bak'ın agregasyonuna imkan vererek apoptozisi indükler. BH3-only proteinlerinin bazıları, Bax ve Bak'a direkt olarak bağlanır ve mitokondride BH123 pro-apoptotik proteinlerinin agregasyonu ve aktivasyonunun tetiklenmesini sağlarlar. BH3-only proteinleri, apoptozisin intrensek yolu ve apoptotik stimulus arasındaki kritik bağlantıyı sağlar. Bazı hücrelerde ekstrensek apoptotik yol, kaspaz kaskadının amplifikasyonuyla intrensek yolun gelişimine katkı sağlar. Bu iki yol arasındaki bağlantıyı sağlayan, bir BH3-only proteini olan Bid'dir (21). Bu hücrelerde ölüm reseptörleri ekstrensek yolu aktive ettiğinde bir tetikleyici kaspaz olan kaspaz-8 tarafından Bid bölünür ve tBid olarak bilinen Bid'in kesik bir formu oluşur. Mitokondriye transloke olan tBid, anti-apoptotik Bcl2 proteinlerini inhibe eder ve sitokrom c ve diğer intermembraner proteinlerin salınımı yoluyla pro-apoptotik BH123'ün agregasyonunu tetikleyerek ölüm sinyallerinin amplifikasyonunu sağlar. BH3-only proteinleri olan, Bid, Bim ve Puma anti-apoptotik Bcl2 proteinlerinin tümünü inhibe edebilirken, diğer BH3-only proteinleri, anti-apoptotik proteinlerin yalnızca küçük bir alt grubunu inhibe edebilirler. Böylece, Bid, Bim ve Puma proteinleri, BH3-only subgrubunun apoptozisteki en potent aktivatörleridir (21).

2.2.4. IAP_s ve anti-IAP Proteinleri

İlk kez bazı böcek virüslerinden elde edilen ve IAP (inhibitor of apoptozis) proteinlerini kodlayan, virusle enfekte konakçı hücrenin apoptozis yoluyla intiharını önleyen gen ailesidir. Bir apoptotik stimulus yokluğunda IAP_s'lar prokaspazların spontan aktivasyonu yoluyla yanlışlıkla oluşabilecek bir apoptoz sürecini önlerler. IAP_s'lar sitozolde lokalizedirler ve intrensek yolda bir apoptotik stimulus aktive olduğunda mitokondriyal intermembraner alandan salınan proteinler arasında bulunan anti-IAP proteinleri, IAP_s'lara bağlanırlar ve onların inhibitör aktivitelerini bloke ederler. Eş zamanlı olarak salınan sitokrom c, kaspaz kaskadının aktivasyonu ile olan apoptozomların birleşmesini tetikler ve apoptozis süreci başlar. Memelilerde bilinen 2 anti-IAP_s'ların kombine aktiviteleri, apoptozis-indükleyici stimulusa hücrenin duyarlılığını belirler (21).

2.2.5. Apoptozis ve p53

Tümör supressor bir protein olan p53, hücrenin strese olan yanıtında en önemli düzenleyicidir ve insan kanserlerinde kritik bir yeri vardır. p53; potansiyel olarak mutajenik hasarı mevcut hücrelerin yaşamasını ve çoğalmasını önleyen, apoptozis, hücre siklusunun devamının engellenmesi, yaşlanma ve DNA onarımı şeklindeki bir çok mekanizmanın düzenlenmesinde temel rol oynayan, hücreyi maligniteden koruyan bir moleküldür (23, 24). Stres uyaranlarının farklı tipleri yoluyla uyarılmaya bağlı olarak, p53, temelde farklı 2 sinerjik mekanizma olan transkripsiyon-bağımlı ve transkripsiyon-bağımsız yollarla apoptozisi indükler. p53, nükleusta, Puma, Noxa ve Bax gibi apoptotik ve aynı zamanda henüz çok iyi tanımlanamamış fonksiyonları olan non-apoptotik genleri de kapsayan kompleks bir transkripsiyonel programı yönetir. Ayrıca, stresin indüklediği p53, mitokondriye transloke olarak Bcl-2 ailesinin multi-domain üyeleri ile direkt etkileşime girebilir (24, 25). Genomik bütünlüğün sürdürülmesinde temel fonksiyonu olan p53, sadece DNA hasarında değil, aynı zamanda besin yetersizlikleri, hipoksi ve onkogenlerin aktivasyonu gibi diğer bir çok stres uyaranı varlığında da aktive olur. Bu aktivasyon normalde çok düşük düzeylerde olan p53'ün, hücre içinde birikimi ve stabilize olmasını kapsar. Hücredeki toplam p53 düzeylerinin regülasyonu Mdm2'li bir otoregülatuar ilmek (loop) ile kontrol edilir. Mdm2, bir E3 ubiquitin ligazdır ve p53'e bağlanır ve proteozomal yıkılım için p53 hedef olarak seçilir. Stres altında p53 ve Mdm2 arasındaki fiziksel ilişki bozulur ve bu durum hücresel p53 düzeylerinin artışı ve nükleusta yığılımı ile sonuçlanır. P53'ün artışı sırasıyla Mdm2'yi kodlayan genin aktivasyonuna, Mdm2 düzeylerinin artışı ise p53'ün degradasyonuna sebep olur (Şekil 2.1.)(26, 27). İnsan kanserlerinin yaklaşık olarak yarısı, p53'ün inaktif mutasyonuna (insanda TP53 olarak bilinir) sahiptir ve geri kalan kanserlerde ise; inhibitörlerinin artışı, aktivatörlerinin azalması ya da hedeflerinin inaktive edilmesi ile p53 yolu bertaraf edilmiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı P53, son zamanlarda, kanserde ilgi çeken bir terapötik hedef olarak kabul edilmiş olup deneysel çalışmalarda, mutant p53 genine sahip kanser hücrelerinde, küçük p53 molekülü ve peptit düzenleyicilerinin kullanılması ile, tümör hücrelerinde indüklenmiş ölümde artış olduğu da gözlemlenmiştir (28).



Şekil 2.1. p53 ve Mdm2 ilişkisi

p53 stres harici stabil durumlarda hücrede oldukça düşük seviyelerde bulunur. Genotoksik stres sinyallerinin alınmasıyla, p53 protein konsantrasyonu artar ve bu durum hücresel ortamda çok sayıda etkinin oluşumuna yol açar (29). P53 hücre siklus arrestini ve pro- ve antioksidan proteinlerin ekspresyonunu indükler. Hücre ölümünü, mitokondri bağımlı apoptozisle direkt şekilde ya da nükleer DNA'nın kodladığı proapoptotik proteinlerin transkripsiyonel indüksiyonu yoluyla yönetir. p53, aynı zamanda, mitokondrinin optimal fonksiyonun devamını sağlayan çeşitli genlerin ekspresyonunu stimüle eder.(29, 30). P53, öncelikli olarak transkripsiyonel aktivitesi yoluyla, mitokondriyal bağımlı hücresel metabolizmanın regülasyonunu düzenler. Son çalışmalar göstermiştir ki; mitokondriyal proteinleri kodlayan çeşitli nükleer genler, promoter bölgelerinde p53 cevap öğelerine sahiptirler ve bundan dolayı, kısmen p53 yoluyla regüle edilirler. Örneğin, p53; nükleer olarak kodlanan sitokrom c oksidaz II ve apoptozis indükleyen faktör (AIF) ile mtDNA-transkript gen 16s rRNA'nın ekspresyonunu düzenler (31-33). Sitokrom c oksidaz II, elektron transport zincirinde sitokrom c oksidazın fonksiyonunun uygun şekilde yürümesi için kritik bir rol oynar. COX kompleksi sitokrom c'den moleküler oksijene transferini kataliz etme yoluyla aerobik solunumda kritik bir rol oynar. p53 proteininin fonksiyonunda bozulma, COX aktivitesinin belirgin olarak bozulmasını sağlar (31, 34). COX aktivitesindeki bu azalmanın sebebi; COX I ve II subunitlerinin regülasyonu ile p53 arasında gözlenen ilişkiye bağlanabilir (34, 35). 16S rRNA, mtDNA'nın kodladığı genlerin translasyonu açısından çok önemli bir yapıdır (36). Ayrıca p53'e ait küçük bir birimin stresin

olmadığı bazal durumlarda mitokondriyal matrikste bulunduğu rapor edilmiştir. P53; mtDNA polimeraz γ'nın fonksiyonunu onunla direkt olarak etkileşerek artırırır (37). P53'ün, mtDNA kopya sayısını ve transkripsiyonel aktiviteyi regüle ettiği bilinen bir yapı olan mitokodriyal transkripsiyon faktör A (Tfam) ile direkt olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir (38). Tüm bu nedenlerden dolayı p53, hücrede mitokondriyal biogenezin ve hücresel metabolizmanın regülasyonunda açık bir şekilde rol alır.

2.2.6. Apoptozis ve Kanser

Kanser hücrelerinin sahip olduğu apoptotik regülasyon anormallikleri çoğu tümörün gelişimine önemli bir katkı sağlamaktadır (20). Örneğin apoptozisi inhibe etme yoluyla kanser gelişimini uyaran translokasyon taşıyıcısı olan lenfositlerde Bcl2 proteinin yüksek düzeyi, hücre sayısı ve yaşam sürecinin artışına ve aynı zamanda hücrelerin antikanser ilaçlara olan duyarlılığının azalmasına neden olur. Benzer şekilde, insan kanserlerinin %50'sinde bir tümör süpressör gen olan p53'ü kodlayan gen, mutasyona uğramıştır ve hücre DNA hasarına cevap olarak kendi siklusunu durduramayacak ve apoptozise giremeyecektir. Bu durum hücrelerde daha fazla mutasyon birikimine ve kanserli dokunun daha agresif hale dönüşümüne sebep olacaktır. p53 fonksiyonunun kaybı sonucunda, p53 bağımlı mekanizma yolunu kullanarak apoptozisi indükleyen birçok antikanser ilaca olan duyarlılık azalmış olacaktır (21).

2.3. Mitokondri

Mitokondri, insan hücrelerinin tamamına yakınında bulunan, 0,002-0,008 mm uzunluğunda ve oval şekilli, intrasellüler, sitoplazmik organeldir. Hücrelerin oksidatif fosforilasyon ve aerobik metabolizmasından sorumlu olan major enerji kaynağıdır. Sadece anaerobik metabolizma yoluyla enerji üreten matür eritrositler hariç, herbir insan hücresi, çok sayıda mitokondri içermektedir. Mitokondri, bir çok hücrede toplam sitoplazmik volümün %15-50 kadarını oluşturur (39). Hücrenin ihtiyaç duyduğu enerjinin miktarı ile sahip olduğu mitokondri sayısı arasında bir ilişki vardır (22).

Mitokondri dört ana kısma sahiptir:

1- Bazı iyonlara ve küçük moleküllere geçirgen olan ve sitozolden mitokondriyi ayıran dış membran

2- Sitozole benzer yapıdaki intermembraner alan.

3- Respiratuar zincir proteinlerini ihtiva eden ve yüzey alanını artırmak amacıyla krista denilen çok sayıda katlantıyı oluşturan iç membran

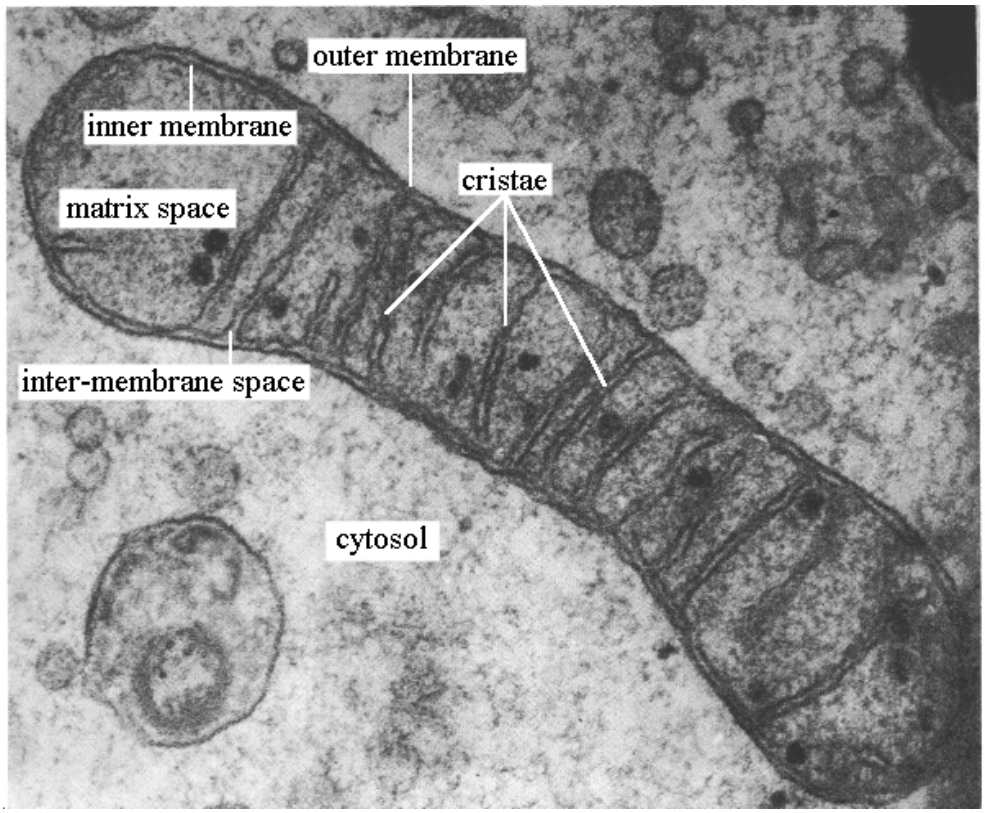
4- Metabolik reaksiyonların çoğunun meydana geldiği ve mitokondrinin kendi genomunun bulunduğu iç bölüm ya da matrikstir. Proteinlerin çoğunun kümelendiği matrikste, pirüvat oksidasyonu, Krebs siklusu, yağ asidi oksidasyonu ve amino asid metabolizmasını da kapsayan birçok diğer metabolik fonksiyon da gerçekleşmektedir. Ayrıca mitokondriyal matrikste, mtDNA, ribozomlar, tRNA'lar, mitokondriyal genlerin ekspresyonunda görevli olan enzimler ve matriks granülleri de bulunur (Şekil 2.2.)(22, 40).

Mitokondri hücrenin primer enerji kaynağı olmasının yanısıra programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde (apoptozisin intrensek yolu), reaktif oksijen türlerinin üretilmesinde (ROS), kalsiyum hemostazının devamında ve Fe/S biogenezisinde rol oynar.

İnsan hücreleri; birbirine bağımlı olan ve yapıları farklı 2 ayrı genetik yapıya sahiptir. Hücre nükleusundaki genetik materyal olan nükleer genom yaklaşık 6 milyar baz çifti içerirken, sitoplazmada yaklaşık 1000-10000 kopyası bulunan mitokondri genomu 16.569 baz çiftini içermektedir (41). Mitokondriyal DNA hücredeki total DNA'nın yaklaşık olarak sadece %0,5-1'ini oluşturur (42). Mitokondrinin intronları ve histonları bulunmayan polisistronik, sirküler bir DNA'ya sahip olmasından dolayı, bir anaerobik proto-ökaryotik hücre arasındaki simbiyotik ilişkiden köken aldığı düşünülmektedir (22). Yaklaşık 800 milyon yıl önce, ökaryotik bir hücrenin nükleus-sitozolünde bulunduğu düşünülen fagositik bir organizmayla birlikte optimal bir bölünmeye maruz kaldığı ve şimerik bir yapının oluştuğu ve evrimin bu eşsiz, enerjik olarak etkin multisellüler yaşam formunun devamına izin verdiği kabul edilir.

Mitokondriyal genom nükleer genomla kıyaslandığında oksidatif hasara daha yatkındır ve 10-20 kat daha yüksek sıklıkta mutasyon oluşum hızına sahiptir. Bu durum,

mitokondrinin koruyucu histon proteinlerinden yoksunluğu, sınırlı DNA onarım mekanizmasına sahip olması ve mitokondri içerisinde yüksek oranda üretilen ROS'a maruziyeti ile açıklanabilir (43).



Şekil 2.2. Tavuk embriyosuna ait bir mitokondrinin elektron mikroskobik görüntüsü

2.3.1. Elektron Transport Zinciri

Tüm ökaryotik hücreler için elde edilen çevresel kalorilerin enerjiye dönüşümünde primer olarak aracılık yapan mitokondri, elektron transport zinciri yoluyla yağ asitleri ve karbonhidratlardan elde edilen hidrojenin verdiği elektronların oksidasyonu yoluyla enerji üretir. Mitokondride enerji salınımı gerçekleşirken bir elektrokimyasal gradient farkı (yaklaşık -180 milivoltluk membran potansiyeli) oluşur. Bu elektriksel kapasite her bir hücredeki tüm mitokondrilerde üretilir. Mitokondriyal potansiyel enerjinin kullanım alanlarından biri, mitokondriyal ATP sentaz yoluyla adenozin difosfat (ADP) ve inorganik fosfattan (P_i), adenozin trifosfat (ATP) üretimidir. Elektromanyetik alan aynı zamanda sitozolik kalsiyum ve hücresel pH'nın

regülasyonunda, substratların bölümlenerek ayrıştırılmasında ve proteinlerin mitokondri içine aktarımında kullanılır. Elektron respiratuar zinciri, iç mitokondriyal membran boyunca yerleşmiştir ve oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimini gerçekleştirir (Şekil 2.3.)(44, 45). Oksidatif fosforilasyon sistemi, yaklaşık 13 adet mitokondriyal gen ve 74 adet nükleer gen ürünü olan, multi-subunit 5 enzim kompleksinden oluşmuştur (Tablo 2.2.)(22).

Kompleks I (NADH dehidrojenaz- ubiquinin oksidoredüktaz); ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 ve ND6 olarak bilinen, elektronları NADH'dan alıp Kompleks I'e teslim eden ve mitokondriyal genom tarafından kodlanan 7 subunitten oluşmuş yapıdır. Kompleks I subunitlerinin en küçüğü, 11kDa ağırlığıyla ND4L iken, 68kDa ağırlığıyla en büyüğü ND5'dir.

Kompleks II (süksinat dehidrojenaz- ubiquinin oksidoredüktaz) tamamı nükleer DNA tarafından kodlanan ve elektronları süksinattan alan komplekstir. Süksinat ve NADH'ın her ikisi de Krebs siklusunun ürünleridir ve sahip oldukları elektronları; Kompleks I ve II'den, iç membranda bulunan lipid yapıdaki bir mobil taşıyıcıya, horizontal olarak aktarırlar.

Kompleks III (ubiquinin- sitokrom c oksidoredüktaz), sadece 1'i (sitokrom b) mtDNA tarafından kodlanan 11 subunitten oluşmuş yapıdır. Elektronlar; intermembraner alanda bulunan protein yapıdaki bir mobil taşıyıcı olan, sitokrom c aracılığıyla, Kompleks III'den Kompleks IV'e aktarılır.

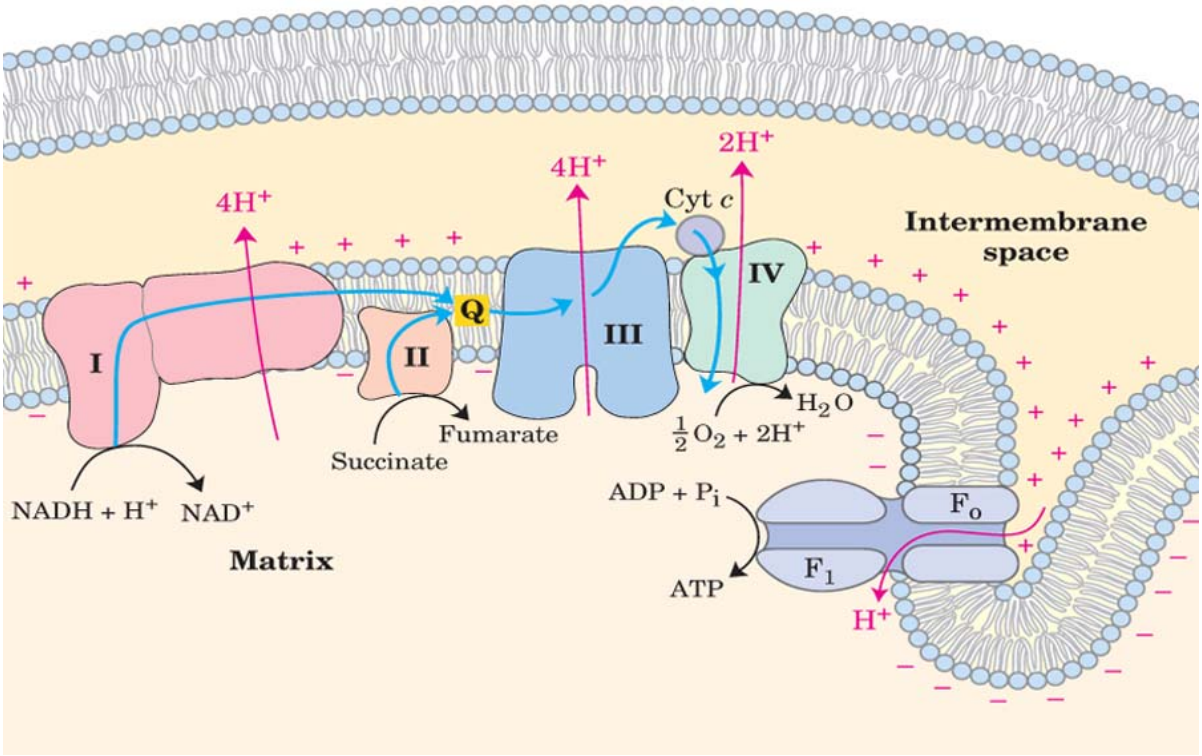
Kompleks IV (sitokrom c oksidaz), 3'ü mtDNA tarafından kodlanan (COXI, COXII ve COXIII), toplam 13 subunitten oluşmuş yapıdır. Kompleks IV son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır.

Kompleks V (ATP sentaz), ikisi mtDNA tarafından kodlanan (ATP6 ve ATP8), toplam 16 subunitten oluşmuş yapıdır. Dönen, küçük bir motora benzeyen bir mekanizmaya sahip olan bu kompleks yoluyla, hidrojen protonları mitokondriyal matrikse geri akarken, ATP üretimi de gerçekleşmiş olur.

Kompleks I, III ve IV; elektronların transferi yoluyla ortama salınan enerjiyi kullanarak, hidrojen moleküllerini (H+) matriksten intermembraner alana pompalar ve iç membran boyunca bir elektrokimyasal proton gradiyenti oluşur (22).

Tablo 2.2. Hücresel ATP üretiminde mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan gen sayısı

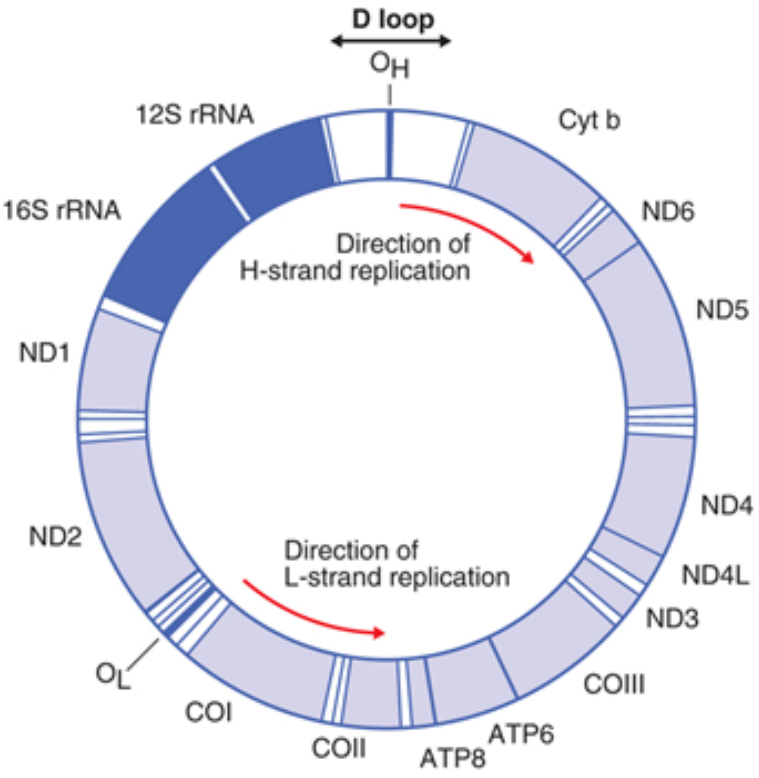
Protein Kompleks	mtDNA gen ürünü	mtDNA gen ürünleri (N)	nDNA gen ürünleri (N)	Toplam gen ürünleri (N)
I	ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6	7	36	43
II	-	0	4	4
III	Sitokrom b	1	10	11
IV	Sitokrom c oksidaz I, Sitokrom c oksidaz II, Sitokrom c oksidaz III	3	10	13
V	ATPaz 6, ATPaz 8	2	14	16
	Total	13	74	87



Şekil 2.3. Elektron Transport Zinciri

2.3.2. Mitokondriyal DNA (mtDNA)

İnsan mitokondriyal genomu; 16,569 baz çifti uzunluğunda, halkasal, çift zincirli yapıda (46) ve tüm dizisinin Anderson ve ark. tarafından ilk kez 1981 yılında tanımlandığı genetik yapıdır (47). İnsan mtDNA'sı mitokondriyal elektron solunum zincirini oluşturan 13 polipeptit ile bu polipeptitlerin sentezinde gerekli olan 22 tRNA ve 2 rRNA'yı kodlayan 37 gen içermektedir (46). Oksidatif fosforilasyon sistemini oluşturan diğer polipeptidler ise nükleer genom (nDNA) tarafından kodlanmaktadır. MtDNA, pürinlerin (özellikle guanin) fazlaca bulunduğu, 28 gen kodlayan ağır zincir (H-zincir) ve pirimidinlerin (özellikle sitozin) fazlaca bulunduğu, 9 gen kodlayan hafif zincirin (L-zincir) her birisinden, farklı orjin noktası kullanarak replikasyona uğrar (47). mtDNA'nın kodlamayan kontrol bölgesi, 16,024-576. nükleotidler arasında yer alan, 3 hipervariabl bölge ile 1 D-loop bölgesi içermektedir (48). 1120 baz çifti uzunluğundaki D-loop bölgesi mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu kontrol eder ve bu bölgenin instabilitesi karsinogenezis sürecine katkıda bulunur (Şekil 2.4.)(43).



Şekil 2.4. İnsan mtDNA'sı

2.3.2.1. Mitokondriyal DNA'nın Kalıtımı

Yüksek mutasyon hızına sahip mtDNA, populasyonda, yüksek oranda polimorfik olmasına rağmen, genellikle bireyler tek bir mtDNA varyantı için homoplazmiktirler. Bir bireyin sahip olduğu tüm mtDNA'larının aynı dizi özelliklerini gösterdiği durum homoplazmi olarak bilinirken, mtDNA'nın farklı varyantları ya da mutant tipleri ile yabanıl tiplerinin bir kişi, bir doku ve bir hücrede birlikte bulunması durumu ise heteroplazmi olarak bilinmektedir. İlk olarak 1980 yılında Giles ve ark., tarafından tanımlanmış olan mtDNA kalıtım paterninde, annenin mtDNA'sı tüm yavrulara aktarılırken, babanın mtDNA'sının bu kalıtıma katkısı olmamaktadır. Bu kalıtım şekline maternal kalıtım adı verilmiştir (Şekil 2.5.).

Fertilizasyon sırasında spermin kuyruk bölümünde bulunan mitokondriler ovum içine giremediği için döllenmiş yumurtada sadece anneye ait mitokondri bulunmaktadır. Memeli sperm hücresinde mtDNA kopya sayısı düşük (50-75) iken memeli oositteki kopya sayısı ($\geq 10^5$) oldukça yüksektir ve fertilizasyon sırasında oosite girebilen sperm hücresine ait bir kaç mitokondrinin aktivitesi de, bir ubiquitin bağımlı mekanizma tarafından yok edilir. Gyllensten ve ark., ilk olarak 1991 yılında, Mus musculus ve Mus spretus ile yapmış oldukları tür çaprazlamalarında az miktarda paternal mtDNA'nın yavrulara geçebileceğini göstermişler (49), Schwartz ve ark. insanlarda da paternal kalıtım olabileceğini savunmuşlardır (50). Mitokondriyal DNA'da kalıtım paterninin açıklanmaya çalışılmasında, ilk bulgular Hauswirth ve Laipis'in 1982 yılında yayınlanan ve heteroplazmik mtDNA polimorfizmini taşıyan Holstein ineklerinde yaptıkları çalışmalara dayanmaktadır (51). Heteroplazmik mitokondriyal genotipin, 2 nesil sonra homoplazmiye kayması heteroplazmik durumun geçici olduğunu düşündürmüştür. Mitokondriyal DNA'nın bu hızlı segregasyonu için dişi "germ line"da veya erken embriyoda *"şişe boynu" (bottleneck)* hipotezi geliştirilmiştir (52-55).

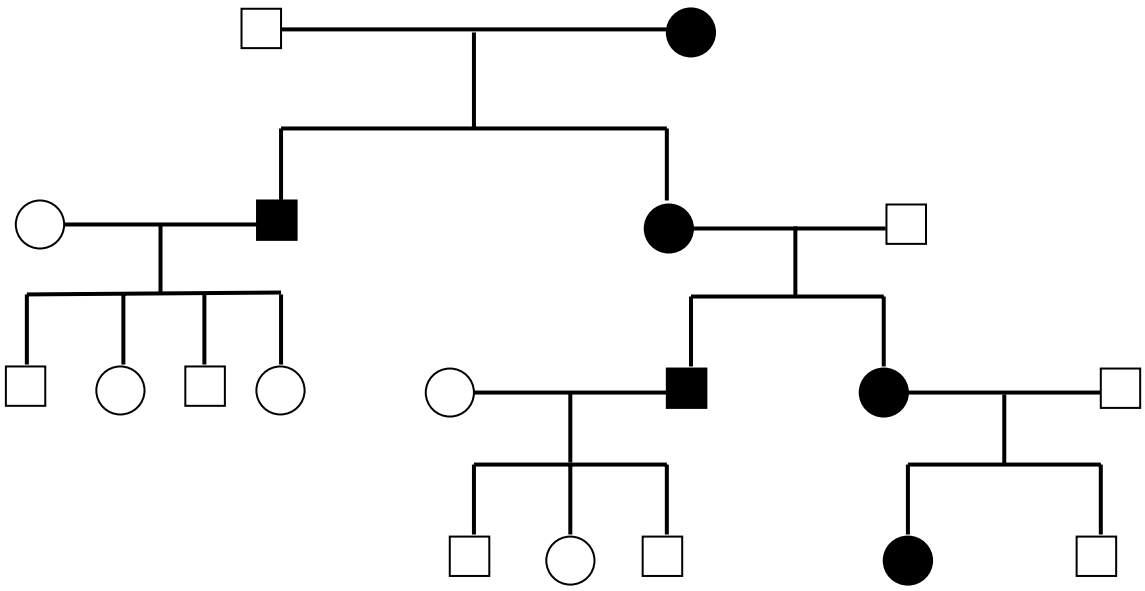
Bu etki teorik olarak 3 farklı biçimde meydana gelebilir:

i. cinsiyet hücrelerinin gelişiminde mtDNA sayısında azalma,

ii. primer oositin olgunlaşmasında belli mtDNA moleküllerinin klonal amplifikasyonu,

iii. embriyonik dokuları verecek olan trofoblast ve diğer hücrelerde mtDNA moleküllerinin dengesiz dağılımı ile.

Özellikle dişi "germ line" gelişimi maternal kalıtım için önemlidir. Oogenez sırasında her bir mitokondrideki mtDNA kopya sayısının azalması ve bunların yavru hücrelere rasgele dağılımı heteroplazminin derecesini etkilemektedir (55). Ayrıca, erken embriyogenezde oositin sitoplazmik dağılımı da dokulardaki heteroplazminin seviyesini etkilemektedir. Diğer taraftan farklı mtDNA mutasyonlarının farklı kalıtım özellikleri taşıması ve nDNA'da olduğu gibi tipik bir kalıtım şemasının ortaya konamamış olması özellikle mtDNA segregasyonunda rol alan faktörlerin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (52, 55, 56).



Şekil 2.5. Mitokondriyal (maternal) kalıtımı gösteren örnek pedigri (soyağacı)

Mutasyonun genomdaki lokalizasyonu ve düzeyine bağlı olarak, hastalar arasında hastalık fenotipi ve şiddetinde çok sayıdaki varyasyon gözlenmektedir. Mitokondriyal DNA'nın belli mutasyonlarının klinik fenotipleri, çoğunlukla farklı dokulardaki mutant genomun ve yabanıl tipin hangi oranda bulunduğunun saptanması ile belirlenebilir. Bir patolojik fenotipin kendini göstermesi, mutant genomunun seviyesine bağlıdır, buna *eşik etkisi (threshold effect)* denir (57). Bazı homoplazmik mutasyonların, hastalıkla ilişkili olabileceğinin kanıtlanmasına rağmen, patojenik geçişlerin büyük çoğunluğu heteroplazmiktir. Dokulardaki fonksiyon bozukluğu ve buna bağlı olarak klinik semptomların görülmesinden önce, kritik sayıdaki mutant mtDNA molekülleri tespit edilebilir. Bu minimum eşik etki, dokudan dokuya farklılık gösterir ve dokuları farklı kombinasyonlarda ve farklı derecede etkileyebilir. Mutasyonların klinik görüntüsü heteroplazminin derecesine, doku hasarına ve farklı dokuların spesifik mutasyona yatkınlığına bağlı olabilir (57). Son zamanlarda yayımlanan dominant bir mutasyonda %8 olarak bildirilse de, bu eşik düzeyi, sıklıkla %70-90 arasında değişmektedir (58).

2.3.2.2. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyon, Transkripsiyon Ve Translasyonu

2.3.2.2.1. Replikasyon

Mitokondriyal DNA replikasyonu, mitokondriyal matriks içerisinde, hücre döngüsü ve nDNA replikasyonundan bağımsız bir şekilde gerçekleşmektedir. Mitokondriyal DNA replikasyonu ağır ve hafif zincirlere özgü iki replikasyon orijininden başlamaktadır. Ağır zincir orijini (OH) D-loop bölgesinde hafif zincir promotorunun (LSP) aşağısında yer alırken, hafif zincir orijini (OL) OH'den mtDNA'nın 2/3'si kadar bir uzaklıkta (saat 8 hizasında) yer almaktadır (40, 55). Replikasyon OH üzerinden başlayarak halkasal biçimde ilerler ve yeni sentezlenen ağır zincir OL'yi geçtikten hemen sonra, zıt yönde OL üzerinde hafif zincir sentezi başlatılmaktadır (59). Mitokondriyal replikasyonun başlaması mitokondriyal transkripsiyon sistemi ile bağlantılıdır (55, 60). Ağır zincir sentezinin başlaması için hafif zincir transkripsiyon başlangıç (ITL) bölgesinden köken alan, kısa bir RNA transkripti, primer görevi yapmaktadır. Mitokondriyal RNA polimerazın, RNA primer sentezi sonrasında mitokondriyal DNA polimeraz (DNA polimeraz γ) yeni zincir

sentezleme sürecini başlatacaktır (61, 62). Çoğu durumda DNA sentezi *"sonlanma ile ilişkili diziler" (TAS)* üzerinde durur ve 3 zincirli D-loop yapısı ortaya çıkmaktadır. Diğer durumlarda ise sentez tüm genom boyunca devam etmekte ve yeni bir mtDNA kopyası oluşturulmaktadır. Sentezin durması veya devam etmesi ile ilgili mekanizma henüz açıklanabilmiş değildir (55, 59, 63). Hafif zincir sentezi, ağır zincir sentezine bağlı olarak OL bölgesindeki çift zincirin açılması sonrasında gerçekleşmekte olup açılmayı müteakip bir primaz yardımı ile primer dizisi oluşturulur ve ters yönde replikasyon gerçekleştirilir (55, 60).

Mitokondriyal DNA replikasyonu DNA polimeraz γ (Pol γ) tarafından gerçekleştirilir. Pol γ 125-140 kD ağırlığında büyük katalitik α-alt birimi ve 30-54 kD ağırlığında primer tanınmasında rol alan β-alt birimlerinden oluşur (55, 64, 65). Pol γ'nın büyük alt birim aynı zamanda 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve bu sayede replikasyonun doğruluğu sağlanır. Nükleer DNA polimerazlara benzer şekilde Pol γ'da diğer yardımcı proteinlere gereksinim duyar ancak bu proteinlerin sadece bir kısmı karakterize edilebilmiştir. Bu proteinlerden bazıları: replikasyon sırasında çift sarmalın açılmasını sağlayan mitokondriyal helikaz, mtDNA süper dönümlerinin açılmasında rol alan DNA topoizomeraz I ve II, mitokondriyal tek zincir bağlayıcı protein (mtSSB), mitokondriyal DNA primaz ve ligazdır (55, 60).

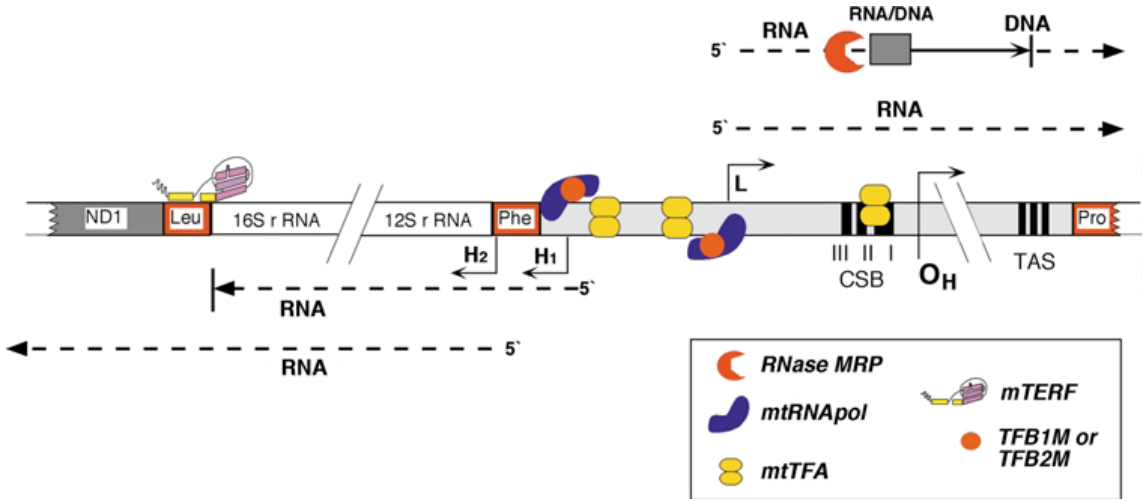
2.3.2.2.2. Transkripsiyon

Mitokondriyal DNA kontrol bölgesi üzerinde yerleşim gösteren ve birbirlerinde 150 bç uzaklıkta yer alan, ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi ITH1 ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi ITL olarak adlandırılan iki ana transkripsiyon başlangıç bölgesi tanımlanmıştır (55, 60, 66). Ağır zincir ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgeleri 5'-CANACC(G)CC(A)AAAGAYA–3' şeklinde 15 bç uzunluğundaki bir diziden oluşan ağır ve hafif zincir promotor bölgeleri (sırasıyla HSP ve LSP) içerisinde yer almaktadır. Her iki promotor dizinin yukarısında mitokondriyal transkripsiyon faktörü mtTFA'nın bağlanması için gerekli olan "enhancer dizileri" bulunmakta olup, mitokondriyal ağır zincir transkripsiyonunda rol alan ikinci transkripsiyon başlangıç bölgesi ITH2 ise 638 nükleotid pozisyonunda tRNAphe geninin içerisinde ve 12S rRNA geninin hemen yanında yer almaktadır. ITH2'de başlayan transkripsiyon tüm mtDNA molekülü boyunca devam ederek polisistronik bir

mRNA oluştururken, ITH1'den başlayan transkripsiyon 16S rRNA'nın 3'-ucunda sona ermektedir. İki farklı transkripsiyon başlama bölgesinin varlığı, mRNA ve rRNA transkriptlerinin de bağımsız regülasyonuna olanak sağlamaktadır. Hafif zincirde ITL üzerinden başlayan transkripsiyon ise ITH2 gibi polisistronik bir mRNA oluşumuyla sonuçlanmaktadır (55, 60, 66).

Mitokondriyal transkripsiyon, mitokondriyal RNA polimeraz (mtRNApol) tarafından gerçekleştirilir. Mitokondriyal RNApol 120 kD ağırlığında bir protein olup bakteriofajlardaki monomerik RNA polimeraz ve maya mtRNApol ile yüksek benzerlik göstermekte (67), ancak faj T7 RNA polimerazından farklı olarak tek başına promotora bağlanıp transkripsiyonu başlatamayıp, mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (mtTFA), TFB1M ve TFB2M'ye gereksinim duymaktadır. Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A, yüksek hareketlilik yeteneğine sahip proteinler grubunun (high mobility group proteins, HGM) üyelerinden, 25 kD ağırlığında, birbirine 27 aminoasitlik bir ara bağlayıcı polipeptid zinciri ile bağlı iki yüksek mobilite grubuna sahip bir proteindir. Memeli HMG proteinleri, gen düzenleyici proteinlerin yapısal transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleridir ve bağlanma sonrası DNA'da yapısal değişiklikler meydana getirmektedirler (55, 64, 65, 67-69).

Mitokondriyal TFA ile birlikte tanımlanan ve TFB1M ile TFB2M olarak adlandırılan diğer iki transkripsiyon faktörü RNA metil transferazlarla yüksek homoloji gösterirler (69). Her iki faktör de mtRNApol ile heterodimer oluşturarak transkripsiyonun başlamasında rol oynarlar ancak uzama için gerekli değillerdir. Hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi ve ITH2 üzerinden başlayan transkripsiyonun sonlanma mekanizması ise günümüzde açıklık kazanmış değildir. ITH1 üzerinden başlayan transkripsiyonun sonlanımı ise tRNA'da bulunan mitokondriyal sonlanma faktörü (mTERF) ile sağlanmaktadır (Şekil 2.6.) (55, 64, 69).



Şekil 2.6. mtDNA'nın transkripsiyonu

2.3.2.2.3. Translasyon

Mitokondriyal translasyon; nükleustan bağımsız bir şekilde mitokondriyal matrikste ve mitoribozom adı verilen mitokondriyal ribozomlarda gerçekleşmektedir. Ribozomlardan daha küçük ve daha az RNA içeriğine sahip olan mitoribozomların proteini içeriği halen aydınlatılamamıştır (65, 70). Mitokondriyal DNA'nın translasyonunda, polisistronik transkripsiyon ürününden mRNA, tRNA ve rRNA oluşturulur. Mitokondrinin kodladığı 22 tRNA aracılığıyla bu organele özgü protein sentezi yapılmakta ve translasyon safhasında sitoplazmadan mitokondriye herhangi bir tRNA gelmemektedir (40, 70-72). Protein sentezinde, mtDNA'nın genetik kodu ile nükleer DNA'nın genetik kodu (üniversal kod) hemen hemen aynı olup, iki şifre sistemi arasında yalnızca dört kodon bakımından farklılık vardır. Mitokondride AUA, AUU ve AUG başlama kodonu iken üniversal kodonda AUG ve GUG başlama kodonudur (71-73). Fakat mitokondriyal mRNA'ların çoğunun UAA veya UAG sonlanma kodonuna sahip olmadığı tespit edilmiştir (73). Mitokondriyal genom bir çok özelliğiyle nükleer genomdan ayrılmaktadır (Tablo 2.3.) ve sonlanma kodonu da muhtemelen AGA ve AGG kodlarıyla gerçekleşmektedir. Oysa bu kodonlar nükleer DNA kodonunda arjinini kodlamaktadır. Mitokondriyal mRNA'da Arjinin kodonu CGN'dir (40).

Tablo 2.3. Nükleer genom ve mitokondriyal genom karşılaştırılması

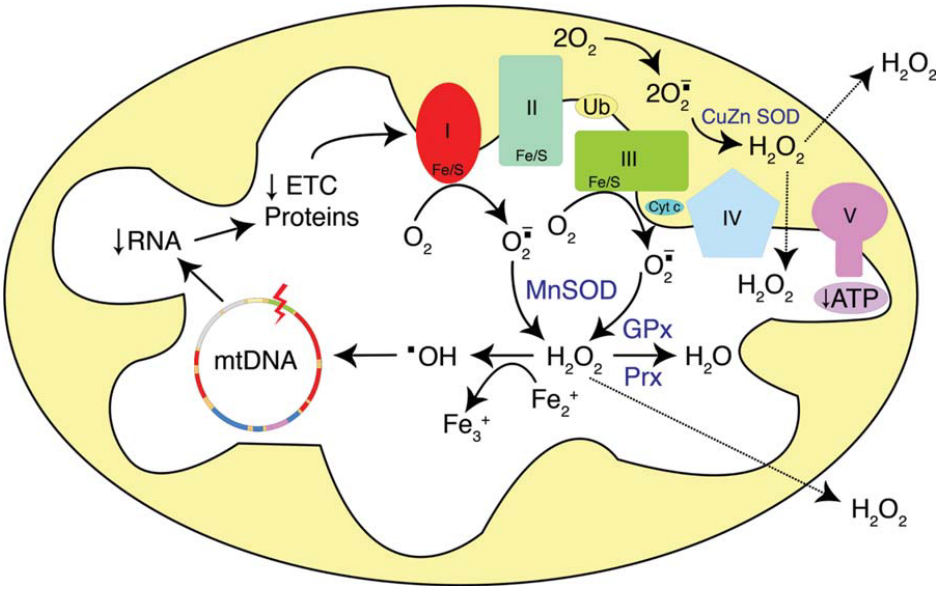
ÖZELLİK	NÜKLEER GENOM	MİTOKONDRİYAL GENOM
Boyut	~3.3 x 10^9 bç	16,569 bç
Hücre başına DNA moleküllerinin sayısı	Haploid hücrelerde 23, diploid hücrelerde 46	Hücre başına yüzbinlerce kopya (poliploidi)
Kodlayan gen sayısı	~20,000-30,000 gen	37 gen (13 polipeptit, 22 tRNA ve 2 rRNA)
Gen yoğunluğu	~40,000 baz çiftinde 1 gen	450 baz çiftinde 1 gen
İntronlar	Genlerin çoğunda sıklıkla bulunur	Yok
Kodlayan DNA'nın oranı	~%3	~%93
Kodon kullanımı	Genetik kod evrenseldir	AUA metiyonin, TGA triptofan kodlarken AGA ve AGG spesifik dur kodonlarıdır
İlişkili proteinler	Nükleozom-ilişkili histon proteinleri ve non-histon proteinleri	Histon bulunmaz fakat TFAM gibi bir çok proteinlerle ilişkilidir
Kalıtım modeli	Otozomlar ve X kromozomu için Mendelyen kalıtım, Y kromozomu için paternal kalıtım	Sadece maternal
Replikasyon	DNA polimeraz α ve δ'nın kullanıldığı zincir-bağlı mekanizma	Sadece DNA polimeraz γ kullanılan, zincir-bağlı ve zincir-yerdeğiştirme modelleri
Transkripsiyon	Genlerin çoğu bireysel olarak transkripsiyona uğrar	Genlerin tamamı geniş polisistronik olarak, her iki zincir üzerinde de transkribe olurlar
Rekombinasyon	Mayozun profazında, her bir çift homolog rekombinasyona uğrar	Rekombinasyonun hücresel düzeyde olabileceği fakat populasyon düzeyinde olmadığı sanılmaktadır

2.3.3. Oksidatif Stres, Mitokondriyal Disfonksiyon ve Yaşlanma

Yaşlanma sürecinin ana belirtisi, doku hemostazının fonksiyonel devamında ilerleyici bir gerileme ve dejeneratif hastalıklara eğilimde artış ve ölümdür. Yaşlanma genetik olarak tespit edilen ve çevreden epigenetik olarak etkilenen multifaktöryel bir süreçtir. Reaktif oksijen türleri (ROS); süperoksit anyon, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksiti kapsayan, farklı kimyasal türlerin bir grubundan oluşan, yüksek oranda reaktif moleküllerdir. ROS'un, başlıca mitokondriyal solunumun yan ürünleri olarak üretilmesi mitokondrinin oksidatif hasarın ana hedefi olduğunu ve yaşlanmada önemli rol oynadığını düşündürtmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarla kanser gibi yaş ilişkili hastalıkların geniş bir bölümü mitokondriyal disfonksiyon ile bağlantılıdır (74). ROS; bir hücre içinde aerobik solunum ve diğer çeşitli katabolik ve anabolik reaksiyonların yan ürünleri olarak üretilmektedir. Mitokondri, hücredeki ROS'un major üreticisidir ve mitokondriyal ROS'un büyük kısmı elektron transport zincirinde üretilir. Elektronlar, elektron transport zincirinden O_2'e akarken, süperoksit anyon gibi kısa ömürlü serbest radikaller üretilir. Süperoksit anyon, süperoksit dismutaz yoluyla katalize edilerek veya spontan olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi radikal olmayan türevlere dönüştürülür. H_2O_2 relatif olarak stabil ve membranı geçebilen bir moleküldür. H_2O_2 difüzyona uğrayabilir ve katalaz, glutatyon peroksidaz ve tioredoksin peroksidaz gibi sitozolik antioksidan sistemlerce yok edilir. Mitokondride hücresel metabolizma esnasında üretilen ROS, aynı zamanda büyüme faktörleri, inflamatuar sitokinler, iyonize radyasyon, UV, kimyasal oksidanlar, kemoterapotikler, hiperoksi, toksinler ve bazı metaller gibi farklı çevresel stimuluslara cevaben üretilir (Şekil 2.7.).

Mitokondriyal respirasyondan başka sitozolik enzimlerin bir kısmı da ROS üretebilirler. ROS, DNA'ya kolaylıkla zarar verir ve DNA bazlarının oksidasyonu nihayetinde genomik instabiliteye neden olur ve zincir kırıkları gibi bir takım DNA hasarları oluşur. 7,8-dihidro-8-oksodeoksiguanozin (8-oxo-dG), ROS'un neden olduğu DNA hasarlarından en yaygın ve en iyi tanımlanmış olanıdır (75). ROS, düşük konsantrasyonlarda hücre içinde fizyolojik olarak bulunmakta ve redoks hemostazı ile hücresel sinyal iletimi gibi bir çok fizyolojik olayda sinyal molekülleri olarak aktif şekilde görev almaktadırlar. Tirozin kinazlar, mitojen aktive edici protein kinazlar ve Ras proteini gibi etkinleşmiş bir çok protein işlev görmesi için, ROS, sinyal iletim yolunun önemli bir medyatörüdür. ROS, ayrıca, hücrenin tipine bağlı olarak, hücre

proliferasyonunda, hücre yaşlanması ve ölümünde sinyal molekülleri olarak rol oynar. ROS sadece hücresel süreçte zararlı yan ürünler olarak mevcut olmayıp, aynı zamanda çeşitli sinyal yollarında, düz kasların gevşemesinde, enfeksiyöz ajanlara karşı savunmada, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde, protein fosforilasyonunun düzenlenmesi ve NF-κB, AP-1 gibi belli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda fizyolojik rolü olan moleküllerdir (74).



Şekil **2.7.** Mitokondriyal ROS'un üretimi

Mitokondriyal respirasyon esnasında, hücreler tarafından tüketilen O_2'nin bir kısmı, Kompleks I ve III yoluyla, OXPHOS'un toksik yan ürünleri olarak süperoksit anyona $(O_2)^-$ dönüştürülür. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri (MnSOD ve CuZn SOD), oksijeni (O_2) hidrojen perokside (H_2O_2) dünüştürür. H_2O_2, glutatyon peroksidaz ya da peroksiredoksin enzimleri ile H_2O'ya dönüşür. Ayrıca H_2O_2, Fe_{21} ile bir hidroksil radikali üretmek üzere reaksiyona girebilir. Bu radikal, mtDNA'nın tüm moleküllerine saldırabilir ve sonuçta, mitokondriyal mRNA düzeylerinde azalma ve elektron transport zinciri ve ATP sentezinin temel proteinlerinde değişen bir ekspresyona neden olur (76).

Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi: Bu teoriye göre mitokondri tarafından, artan ROS üretimi ve mtDNA'daki artan 8-oxo-dG içeriği sıklıkla yaşlı dokularda tespit edilir. Bu durum, oksidatif DNA hasarının ilerleyici birikiminin, yaşlanma sürecine katkıda bulunan bir faktör olduğunu düşündürtmektedir. İlgili bir çok çalışma, hücrelerde artan oksidatif hasarın yaşlanmayla ilişkisi olduğunu doğrulamıştır (74, 77, 78). Bir çok çalışmada; ROS ve koruyucu antioksidan cevap arasındaki etkileşimin yaşlanma ve yaşam süresini belirlemede önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (74, 79).

ROS ve Yaşlanma: Yaşlanma; normal somatik hücrelerin hücre bölünmesinin belli bir safhasından sonra büyümesinin geri dönüşümsüz olarak bloke olmasıdır. Hücrelerin yaşlanması, hücre içi ROS'un yüksek düzeyleri ile DNA ve proteinlerde biriken oksidatif hasar ile ilişkilidir. Aksine, ölümsüz hücreler, primer hücrelere nazaran H_2O_2'nin zararlı etkilerine karşı daha dirençlidirler ve daha az oksidatif hasara uğrarlar. Ortamın değişen O_2 konsantrasyonu veya antioksidanların (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik antioksidanlar ile C ve E vitaminleri, betakaroten, selenyum, glutatyon gibi non-enzimatik antioksidanlar) düzeylerinin azalması yoluyla hücre içi oksidanların artması, yaşlanmanın başlamasını hızlandırırken, ortamdaki düşük O_2 düzeyleri veya ROS'un ortamdan temizlenmesindeki artış yaşlanmayı geciktirir. Yaşlanmanın major nedenlerinden biri olarak telomer kısalması hızının ise hücresel oksidatif stres ile direkt ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Yani, ROS, telomer devamı ya da bütünlüğünün düzenlenmesini sağlamak yoluyla, yaşlanmada kritik bir rol oynar (80).

ROS ve Kök Hücrelerinin Yaşlanması: Kendi kendine yenilenebilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahip olan doku spesifik ya da yetişkin stem hücreleri, bir organizmanın tüm yaşamı boyunca dokuların rejeneratif onarımı ve normal hemostazının devamında esas öneme sahiptir. ROS'un bozulmuş olan regülasyonu, stem ve progenitör hücreleri erken yaşlanmaya zorlar ve bu sayede normal doku hemostazı engellenir. Stem hücrelerinin kendi kendine yenilenebilme kabiliyetinin ilerleyen yaşla azalması ve bu azalmanın yaşlanmada temel rol oynadığı kabul edilmektedir (81).

Mitokondri ve Yaşlanma: Memeli hücrelerinde ROS'un major üretim kaynağının mitokondri olması ve mtDNA'nın ROS'a yakın maruziyetinden dolayı oksidatif hasara daha fazla maruz kalmaktadır. ROS'un yaşlanmayla birlikte hücrede ileri düzeyde birikimi, hücrede enerjinin azalmasına yol açan kusurlu bir siklusu ve nihayetinde hücre ölümünü tetikler. Yapılan bir çok çalışmada en yaygın oksidatif lezyonlardan biri olan 8-oxo-dG'nin mtDNA'da nükleer DNA'ya kıyasla çok daha yüksek düzeylerde bulunduğu gösterilmiş ve mtDNA'nın oksidatif hasara daha yatkın olduğu ileri sürülmüştür. mtDNA, proteinler veya lipidler gibi mitokondriyal makromoleküllerin oksidatif fosforilasyonu esnasında üretilen oksidatif hasarın yaşlanmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir (74, 82). Mitokondri aynı zamanda

yaşlanma süreci ile ilişkili olan apoptozisin regülasyonunda kritik bir rol oynar ve apoptozis regülasyonunun modifikasyonu yoluyla yaşlanma sürecini etkiler (83). Mitokondriyal genom, oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezi için gerekli olan ve mitokondriyal protein translasyonu için gerek duyulan RNA'ları kodlar. mtDNA, D-Loop olarak bilinen kodlamayan bir bölge ve genlerle yoğun bir şekilde paketlenmiş haldedir. D-Loop, mtDNA replikasyon ve transkripsiyonu için önemlidir ve yaş ilişkili mutasyonların varlığı geniş çaplı araştırılmıştır (84). D-Loop'ta yaş bağımlı nokta mutasyonların birikimi, cilt ve kas dokusunu da kapsayan çoğu dokuda ve bir çok hücrede rapor edilmiştir. Ayrıca mtDNA'nın delesyonları ve nokta mutasyonlarına yaşlanmış insan ve hayvan dokularında yüksek sıklıkta rastlanmaktadır (85). Kompleks bir klinik fenotiple giden hastalıkların heterojen bir bölümü, mitokondriyal defekt ve oksidatif stres ile bağlantılıdır. Özellikle, mitokondrinin Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi yaş-ilişkili nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (86). Kanser; yaşla birlikte insidansı artan ve yaş-ilişkili bir hastalıktır. Kanser hücreleri temel olarak glikozu metabolize ederler ve ortamda yüksek düzeyde oksijen varlığında dahi yüksek miktarda laktik asit üretirler. *Aerobik glikolizis* olarak bilinen bu metabolik yolak ilk olarak Warburg tarafından ileri sürülmüştür (87). Tam tersine, normal hücreler, enerjiyi başlıca mitokondride oksidize edilen ve glikolizin bir son ürünü olan pirüvatın oksidasyonuyla üretirler. Normal hücrelerde glukozun laktata dönüşümü yalnızca O_2 yokluğunda olur ve bu durum *Pasteur Efekti* olarak tanımlanır (74). İnsan kanserlerinin birçok tipinde mtDNA'da somatik ve germ hücrelerinde mutasyonların her ikisinin varlığı da, tümör hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon olduğunu ispatlamıştır (88). Yaşlanma, bir çok faktörün rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Bir çok çalışma oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun, yaşlanma sürecine katkıda bulunan 2 önemli faktör olduğunu ispatlamış olup, yaşlanmada, mitokondriyal dinamiğin önemi yaş ilişkili patogenezle ilişkili olarak gösterilmiştir (74).

2.3.4. MtDNA Polimorfizmi

Yaygın metabolik ve dejeneratif hastalıkların gelişiminde rol oynayan risk faktörlerinin açıklığa kavuşmasındaki güçlükler, bu hastalıkların mendelyan genlerin bir kısmı ile çevresel bir çok faktörün kompleks bir ilişkisi sonucu oluştuğunun

önerilmesine yol açmıştır. Genetik risk faktörlerinin bir kısmını aydınlatmak amacıyla, yaygın nükleer DNA (nDNA) varyantları ile ilgili fenotipi olan ve olmayan çok sayıda bireyin, genom boyunca dağılmış tek nükleotid polimorfizmlerin (SNPs) yüzbinlercesinin kullanıldığı araştırmalar yapılmıştır. Bu genom-wide ilişkili çalışmalarda, belirli hastalıkların gelişim riskine katkıda bulunan genlerle ilişkili nDNA varyantlarının bir kısmı başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Ancak vakaların çoğunda her bir varyantın hastalık riskine yalnızca zayıf bir katkısı olduğu tespit edildi. Bu hayal kırıklığı yaratan sonuç, yaygın hastalıklara olan yatkınlıkta baskın olan faktör olarak kabul edilen çevresel varyasyonların etkilerinin önemini gösterdi fakat yaygın hastalıkların, nDNA ilişkili varyasyonlar ya da bölgesel çevresel faktörler aracılığıyla açıklanabilen, büyük oranda ailesel ve etnik kümelenme göstermesini tam anlamıyla açıklayamadı. Bu durum yaygın metabolik ve dejeneratif hastalıkların etyolojisinde önemli olabilecek mtDNA gibi diğer bazı faktörlerin varlığına dikkat çekmiştir (89).

İnsanlarda yaygın metabolik ve dejeneratif hastalıkların etyolojisini tanımlamada, hücresel düzeyde enerji üretimi ve dağıtımının genetik ve biyolojik yönlerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Yaşam için gerekli olan güç, alınan kalorilerin mitokondriyal oksidasyon ile enerjiye dönüşümü yoluyla sağlanır (89, 90). Adaptif mtDNA mutasyonları, yaşam ve üreme için gerekli olan kalori kaynaklarının kullanım ve metabolizmasını düzenleyen bir dizi mitokondriyal fonksiyonun bir kısmını modifiye edebilirler. Örneğin, bu mutasyonlar, elektron transport zinciri ve ısı üretimine karşı ATP üretimi için kalorilerin yeniden dağılımını düzenleyen ATP sentaz arasındaki bağlantı etkinliğini değiştirebilirler. Mitokondriyal DNA varyantları, memeli türlerinin subpopulasyonlarının farklı iklimsel bölgelere adaptasyonunu mümkün kılmaktadır. mtDNA'nın kodlayan bölgesinin fonksiyonel değişiklikleri aynı zamanda farklı kalori kaynaklarının kullanımında kolaylıklar sağlayabilir ve infeksiyonlara duyarlılığı etkileyebilir. İnsan mtDNA polimorfizminin bulguları; benzer mtDNA varyantlarının, evrimsel zeminde birbirleriyle çakışacak şekilde, farklı mtDNA haplogruplarında tekrar tekrar görünmesidir. Ayrıca birçok mtDNA varyantı enerji metabolizmasındaki fonksiyonel değişimlerle ilişkilendirilmiştir (91, 92).

Fonksiyonel bölge-spesifik mtDNA sekans varyantları; aynı zamanda yaygın kompleks hastalıklara yatkınlıkta bireysel enerjetik çevrenin değişikliklere cevabında, yaygın varyantlar olarak dikkat çekerler. Tüm dünyada spesifik populasyonlarla ilişkili

olan spesifik mtDNA soyları mevcuttur. Bu soy; Afrika'da yaşayan Afrikalı ırkın yaklaşık olarak ¾'ünde haplogrup L0, L1, L2 ve L3'ü de kapsayan makro-haplogrup L iken, Avrasya'ya göç eden Afrikalılarda makro-haplogrup M ve N'dir. Makro-haplogrup N Avrupa toplumunda yaygındır ve H, I, J, Uk, T, U, V, W ve X haplogruplarını oluşturur. M ve N'nin her ikisi de Asya'ya yayılırken, M makro-haplogrup C, D, G'yi ve N makro-haplogrup ise haplogrup A, B, F'yi oluşturur. A, C ve D haplogrupları, kuzeydoğudan gelen Sibirya'lıların haplogruplarıyla zenginleşmiş, daha sonra Amerika'lıların haplogrubu olan B ve X'e katılmıştır (93).

Ilımlı Leber Herediter Optik Nöropati (LHON) mutasyonları olan m.3460G→A, m.10663T→C, m.11778G→A ve m.14484T→C sıklıkla Avrupa ırkının mtDNA J haplogruplarında görülmektedir (94). Haplogrup T, bipolar affektif hastalıkta için artmış riskle ilişkili iken (95), J Avrupa ırkında (96) ve D Asya ırkında yaşam süresinin uzunluğu ile ilişkilidir (97). Haplogrup H, Parkinson hastalığının gelişimi için artmış riske sahipken, J ve Uk haplogruplarında bu risk azalmıştır (98). Haplogrup H'nin m.4336T→C'yi içeren sub-grupları Alzheimer hastalığının artmış riski ile ilişkili iken, haplogrup U ve T azalmış riskle beraberdir (99). Haplogrup H, yaş-ilişkili makuler dejenerasyonda azalan bir riskle beraberken, J ve U haplogrupları retina pigment anomalileri ve dekolman riskinde artış ile ilişkilidir (100),(101). Haplogrup J, Avrupa populasyonunda diabet riskinin artışıyla ilişkili iken Asyalılarda N9a diabet, metabolik sendrom ve miyokard infarktüsüne karşı koruyucu bir haplogrubtur (102, 103). Haplogrup H sepsise karşı koruyucudur (104) ve U haplogrubu serum IgE düzeylerinde artışla ilişkilidir (105). Çeşitli haplogruplar, bir çok kanser türünde artan ve azalan risklerle ilişkilendirilmiştir (106-111).

Bu çalışmalar mtDNA'daki polimorfizlerin, yaygın, yaş-ilişkili ve kompleks hastalıklara yatkınlık ya da sebep olabileceğini göstermektedir. Bu durum, yaygın metabolik ve nörodejeneratif hastalıkların çoğunun altında yatan patofizyolojik nedenin aslında, biyoenerjetik disfonksiyon olduğunu belirtmektedir (112).

Literatürde mitokondriyal polimorfizmlerin çeşitli hastalıklardaki önemi araştırılmıştır. Bu hastalıklardan sıklıkla araştırılanı sağırlıktır. Örneğin, önemli mitokondriyal haplogruplarında tanımlanan mitokondriyal genomun 827 A>G ve 1095 T>C polimorfizmlerine aynı zamanda bir çok farklı non-sendromik aminoglikozid-

ilişkili işitme kaybı vakasında rastlanılmaktadır (91, 113, 114). Jianxin ve arkadaşları; mitokondriyal haplogrup spesifik varyantlarının, bazı ailelerde, işitme kaybı penetransını artırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, 1555A>G mutasyonuna sahip hastalarda işitme kaybının B haplogrubunda artmış penetrans gösterdiğine dikkat çekmişler ve sağırlığın görüldüğü ailelerde, mitokondriyal haplotiplerin hastalığın değişken penetransı ve ekpresivitesini modüle ettiğini iddia etmişlerdir (115). Jianxin ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada (116); non-sendromik işitme kaybı mevcut, pediatrik yaş grubunda olan 1642 hastada mitokondriyal varyantların spektrumunu ve sıklığını araştırmışlar ve çeşitli mutasyon ve polimorfizmler tespit etmişlerdir. Aminoglikozid tedavisi almadığı halde bu bölgenin mutasyonlarını taşıyan bazı bireylerde gözlenen işitme kaybı; diğer genetik ve çevresel bazı faktörlerin bu bireylerdeki sağırlık fenotipine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Araştırmacılar, bu polimorfizmlerin klinik fenotipin meydana gelmesinde tek başına yeterli olamayacağını ve patojenik tablo oluşumu için modifiye edici ek faktörlere de ihtiyaç duyulduğunu iddia etmişlerdir. Malgorzata ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada (115), işitme kaybı mevcut 250 Polonyalı hastada; en yaygın polimorfizm olarak $tRNA^{Ser}$ geninde bulunan 7476C>T'yi tespit etmişlerdir. Aynı gende bulunan 7444G>A polimorfizmine ise sıkça rastlamışlar ancak bu varyantları taşıyan hastalarda, hastalığın başlama yaşı ile işitme kaybı penetransının değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Jianxin ve arkadaşları ise araştırmalarında gözlemledikleri polimorfik noktaların sıklıkla tRNA'ların korunmuş nükleotidlerinde tespit etmişler ve bu varyantların muhtemel potansiyel yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olabileceğini öne sürmüşlerdir. Polimorfizmler iyi tanımlanmış mitokondriyal hastalıklardan biri olan MERFF (Myoclonic epilepsy and ragged red fibers) hastalarında da bulunmaktadır (117). Kobayashi ve arkadaşları ise (118), MERRF sendromu mevcut bir hasta ile ilgili yayımladıkları raporda; yaşam tarzı ve ırklar arasındaki genetik polimorfizmin, mitokondriyal anormalliğe bağlı multipl simetrik lipomatozisin prevalansıyla ilişkili olduğunu iddia etmişlerdir. Pulkes ve arkadaşları (119), progresif nörodejeneratif hastalıklardan biri olan MELAS sendromunda, mitokondriyal tRNA geninde görülen bir polimorfizmin, hastalarda strok gelişim riskini etkilediğini savunmuşlardır. Kato ve arkadaşları (120), nörolojik rahatsızlığı bulunan hastaların mtDNA'larını sekanslamışlar ve şizofreni semptomları bulunan bir hastanın tRNA lizin

geninde 8291A>G polimorfizmini tespit etmişlerdir. Hirata ve arkadaşları (121), bu polimorfik noktanın yetişkin başlangıçlı mitokondriyal miyopatinin bir tipi ile ilişkili olduğunu iddia etmişlerdir. Bu hastada sadece tRNA lizin geninde değil, aynı zamanda NADH dehidrojenaz II geninde ve kodlamayan nükleotid bölgelerinde de polimorfizmler tespit edilmiştir. Wei ve arkadaşları (122), yaptıkları fare deneylerinde tip 2 diabet ile genetik varyantlar arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve proinsülinin glukoz tarafından stimule edilmiş translasyonunun gerçekleşebilmesi için tamamen modifiye olmuş tRNA lizin'e ihtiyaç duyulduğunu ve yanlış okunabilecek bir lizin kodonunun, proinsülin sentezinde azalmayla sonuçlanabileceğini iddia etmişlerdir**.** Wesley ve arkadaşları (123), insan mitokondriyal haplogrup H'yi, haplogrup U'dan ayıran sitokrom b bölgesinin 14766T>C polimorfizmi ile yaşam süresinin artışı ve kalori tüketimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır ve sitokrom b'nin bu bölgesindeki polimorfizmin; ROS üretim hızında bir azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Okura ve arkadaşları (124), sitokrom b bölgesinde 15497G>A polimorfizmini Japon obez hasta populasyonunda araştırmışlar ve bu varyantın obezite ile trigliserid düzeyinde artma ile ilişkisi olduğunu iddia etmişlerdir. Liguori ve arkadaşları (125), aynı polimorfik noktayı İtalyan populasyonunda araştırmışlar ve bu polimorfizmin obezitedense, lipid düzeylerinde artış ile daha çok ilişkili olabileceğini savunmuşlardır. Tanaka ve arkadaşları ise (126) bu polimorfik noktanın kalp yetmezliği ile ilişkili olduğunu savunmuşlardır. Vanniarajan ve arkadaşları (127), ND5 gen bölgesinin mitokondriyal mutasyonlarda hot spot olduğunu iddia etmişlerdir. Bamne ve arkadaşları (128), şizofreni tanısı alan hastalar ve sağlıklı kontrollerin inceledikleri mitokondriyal genomlarında yaygın polimorfizmler tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar, genomun ND5 bölgesine ait 13368G>A ve 13708A>G polimorfizmlerine hem hasta hem kontrol grubunda sıklıkla rastlamışlardır. Parker ve Parks (129), Parkinson hastalarında ND5 gen varyantlarının farklı ekspresyonları olduğunu iddia etmişler ve bu varyantlar aynı zamanda önceki çalışmalarda Leigh hastalığı ve MELAS benzeri hastalıklardaki şiddetli nörolojik hasarlarla ilişkili bulunmuştur (130, 131). Martorell ve (132), arkadaşları bir şizofreni hastasının incelenen genomunda ND5 genine ait polimorfizmleri tespit etmişler ve aynı polimorfizmler bir çok bipolar hastada da saptanmıştır (133). Vitali ve arkadaşları (134), sitokrom oksidaz c'nin bazı polimorfik noktalarının Alzheimer hastalığı gelişiminde bir risk faktörü olduğunu iddia etmişlerdir. Son yıllarda erkek

infertilitesi ile ilgili yapılan araştırmalarda, araştırmacılar sperm motilitesi ile mtDNA varyantları arasındaki ilişkiye dikkat çekmişler (135), Kumar ve arkadaşları ise (136, 137), infertil erkeklerin incelenen mtDNA'larında sitokrom oksidaz genlerine ait yüksek oranda polimorfizm tespit etmişlerdir. Polimorfizm bu hasta grubunda sadece COII'de aynı zamanda ATPaz 6, ATPaz 8, ND2, ND3, ND4 ve ND5 genlerinde de saptanmış ve araştırmacılar, mtDNA'nın infertilitede potansiyel bir diagnostik marker olabileceğini savunmuşlardır.

Mitokondriyal genomda 16,620 baz çifti (51 baz çifti üst üste çakışan bölgeleri kapsar) için 1294 mtDNA SNP'nin frekansı, genomdaki her 13 baz çifti için 1 mtSNP'e karşılık gelir. Nükleer genomda ise yaklaşık olarak her 1000 baz çifti için 1 SNP tahmin edilmektedir. Dolayısıyla, mtSNP'lerin frekansı nükleer SNP'lerden en az 70 kat daha fazladır (Tablo 2.4.) (138).

Tablo 2.4. Mitokondriyal genomda polimorfizmlerin dağılımı:

Bölge	mtSNP	Baz çifti büyüklüğü	Oran
Non-koding bölge	264	1228	%21.5
Ribozomal RNA genleri	90	2513	%3.6
Transfer RNA genleri	70	1512	%4.6
Protein kodlayan genler	870	11367	%7.7
Toplam	1294	16620	%31.4

Yüksek mutasyon hızına sahip mtDNA'daki yaygın genomik değişimlerin; basit, zararsız bir polimorfizm mi yoksa patojenik bir mutasyon mu olduğuna karar verebilmek önemlidir. Eğer mitokondriyal bir mutasyondan şüpheleniliyorsa, diagnostik değerlendirme açısından hastanın çeşitli dokularının incelenmesi gerekmektedir. Biyokimyasal veya histokimyasal bir defekt saptandığında, mitokondriyal genomun sekanslanmasıyla genetik değişimler ortaya çıkarılabilir. Günümüz şartlarında, değişimlerin patojenik bir mutasyon mu yoksa bir polimorfizm mi olduğu, halen açık bir şekilde gösterilememesine rağmen, patojenik mutasyonu tanımlayan genel olarak kabul edilmiş kriterler mevcuttur. Bu kriterler:

1- Patojenik mutasyonlar mtDNA'nın evrimsel olarak korunmuş olan bölgelerinde bulunmaktadır.

2- Patojenik mutasyonlar heteroplazmik olarak saptanırlar.

3- Patojenik mutasyonlar sağlıklı kontrollerde bulunmamalıdırlar.

4- Mutant mtDNA, bireylerin klinik olarak etkilenen dokularında, etkilenmeyen dokularına nazaran daha yüksek oranda saptanmalıdır.

5- Mutant mtDNA, etkilenen bireylerin dokularında, nispeten daha az etkilenenlere göre yüksek oranda olmalıdır.

6- Mutant mtDNA, bir biyokimyasal defektle ayrılabilmelidir (58, 139).

mtDNA'nın benzer etnik gruplar ve birçok farklı gruplar içerisindeki kişiler arasında bir kaç farklı dizi sıralaması vardır. Mitokondriyal DNA haplotipleri, polimorfizmin özel kalıplarının temelini oluştururlar ve bu durum mitokondrinin bazı hastalıklara duyarlılığını, yaşlanma sürecindeki etkilerini ve bazı mitokondriyal DNA mutasyonlarının ekspresyonunu gösterir. Mitokondriyal DNA haplotipleri dünya üzerindeki popülasyon hareketlerinde ve etnik grupların değerlendirilmesinde bir yol olarak kullanılmaktadır (140).

mtDNA varyantları ve epigenetik değişiklikler, yaygın metabolik ve dejeneratif hastalıklardaki kompleks problemlere direkt neden olmasalar da, bireysel yatkınlık oluştururlar. Parsiyel defektlerse, somatik dokularda mutasyonların birikimine yol açan, yaş-ilişkili mitokondriyal fonksiyonlarda azalma yoluyla artmaktadırlar. Kalıtılan defektler, epigenetik defektler ve somatik mtDNA mutasyonlarının toplamı, mitokondriyal enerji üretimini engelleyerek, yüksek-enerji ihtiyacı olan dokuların (beyin, kalp, kas, böbrek, endokrin vs…) normal fonksiyonlarını sürdürmeleri için gerekli olan minimum eşik enerji ihtiyacının dahi sağlanamamasına ve nihayetinde organ disfonksiyonu ve ölüme neden olabilirler (89).

2.3.5. mtDNA Mutasyonları

İnsan mtDNA'sının tamamının sekanslanmasından 7 yıl sonra, ilk patojenik mtDNA'sı 1988 yılında tanımlandı (141). Son 20 yıldır, mtDNA'da 100'den fazla nokta mutasyonu ve sayısız yeniden düzenlenme insan mitokondriyal hastalıkları ile ilişkili bulunmuştur. Günümüzde spesifik baz değişimlerinin patojenitesini tanımlamada halen

güçlükler yaşansa da, mitokondriyal genomun sekanslanmasındaki kolaylıklar mtDNA ilişkili hastalıkların tanınabilirliğinde artış sağlamıştır (141). mtDNA'daki mutasyonlar; demans, ataksi, optik atrofi ve epilepsiyi de kapsayan nörodejeneratif hastalıkların geniş bir bölümünde (140), şizofreni ve diğer psikiyatrik hastalıklarda (121), kardiyomyopati, diabet, sağırlık gibi bir çok hastalıkta ve çoğu kanserde tanımlanmış olup (142), mtDNA hastalıklarının tahmini olarak, 1.65/10,000 civarında bir insidansa sahip olduğu rapor edilmiştir (143). mtDNA mutasyonları 3 kategorik gruba ayrılır:

1- mtDNA'nın protein kodlayan genlerindeki missense mutasyonlar: Bu tip mutasyonlar sıklıkla OXPHOS proteinin aktivitesini değiştirirler. Mitokondriyal DNA missense mutasyonları nörolojik hastalıklarda, retinis pigmentoza ve optik atrofi gibi yaygın oftalmolojik bulgularla ilişkili olabilir. LHON'da görülen 11778 G>A ve 3460 G>A mutasyonları, missense mutasyonlar olarak tanımlanmışlardır (144).

2- tRNA veya rRNA'daki tek baz mutasyonları: Bu tip mutasyonlar sentezlenen mitokondriyal proteinlerin yapısını değiştirirler ve tek nükleotid mutasyonlarıdırlar. İnsanlarda mtDNA'da sıklıkla gözlenen nokta mutasyonlar; $tRNA^{lösin}$ geninde A3243G, $tRNA^{lizin}$ geninde 8344 A>G ve ATPaz6 geninde 8993 T>G'dir (145). tRNA genleri mtDNA'nın %10'unda mevcutken, bu gene ait mutasyonlar mtDNA-ilişkili hastalıkların yaklaşık olarak %75'inden sorumludur. MELAS, LHON, aminoglikozid ve kloramfenikol toksisitesi, myoklonik epilepsi gibi hastalıklarda bu tip mutasyonlar tanımlanmıştır (146).

3- mtDNA'nın delesyon ve duplikasyonlarıyla olan mutasyonlar: mtDNA'nın mutasyonlarının çoğu, muhtemelen oksidatif stres tarafından indüklenmiş, T>C ya da G>A transisyonunu içeren nokta mutasyonlardır. Ancak mtDNA delesyonları ve mitokondriyal mikrosatellite instabilitesi, yanlış replikasyon sırasında meydana gelebilir veya kendiliğinden oluşabilir. Kearns-Sayre Sendromu, Progressif Eksternal Oftalmopleji, Pearsons Marrow Pankreas Sendromu ve Maternal kalıtımlı Diabet ve İşitme Kaybı gibi bazı hastalıklarda bu tip mutasyonlar tanımlanmıştır (147).

Son 10 yıldır yapılan geniş çaplı çalışmalarla bu mutasyonların patojenik mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmıştır. mtDNA mutasyonları multisistem sendromlarla ilişkili olduğu gibi aynı zamanda doku-spesifik hastalıklarda da gözlemlenmiştir. Bazen, aynı mutasyon, bireyler arasında çok geniş spektrumda

gözlenebilen bir klinik fenotipik etkiye neden olabilirken; farklı mutasyonlar benzer bir klinik fenotipik etki oluşturabilirler (148). Organizmadaki her hücre mtDNA'nın multipl kopyalarını içerir. mtDNA'nın mutant ve doğal tiplerinin bir hücrede birlikte bulunması heteroplazmi durumudur. Bir hücredeki mtDNA'daki heteroplazminin oranı zamanla mutant tip ya da doğal tipten birine doğru kayabilir ve hücre homoplazmi durumuna yer değiştirebilir. Böylece mutasyonun biyolojik etkileri bireyin sahip olduğu mutant DNA'nın oranına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu durum benzer patojenik mtDNA mutasyonlarını taşıyan aile bireylerinde, farklı fenotiplerin gözlenmesine katkıda bulunur (149).

Sperm mtDNA'sının fertilizasyon sonrası degradasyona uğraması sebebiyle, mtDNA mutasyonları yalnızca maternal olarak kalıtılır. Ancak, delesyonlu mtDNA molekülleri, çok nadir olarak (belki de hiçbir zaman) etkilenmiş anneden yavrularına aktarılır. Etkilenen vakalarda ise, sebep olan mutasyonun germ hücre kaynaklı olduğu sanılmaktadır (145). mtDNA'nın bir çok hastalıkta gözlemlenen germ hücre mutasyonlarının yanında, somatik mtDNA-ilişkili defektleri kanseri de kapsayan birçok hastalıkta tespit edilmiştir. Tüm bu anormallikler elektron transport zincirinin subunitlerinin aktivite ve ekpresyon değişimleri, NADH-bağımlı substratların oksidasyonlarında azalma ve mtDNA mutasyonlarını kapsar (7). mtDNA-ilişkili hastalıklar, sıklıkla gecikmiş başlangıç yaşı ve ilerleyici sürece sahiptirler. mtDNA mutasyonları genellikle beyin, kalp, iskelet kası ve endokrin sistemi etkiler ve spesifik semptomlar; körlük, sağırlık, hareket kısıtlılığı, demans, kardiyovasküler bulgular, kas güçsüzlüğü, renal disfonksiyon ve diabeti içeren endokrin hastalıkların çeşitli formlarını kapsar (Tablo 2.5.)(150).

mtDNA mutasyonları yaşlanmada ve yaş-ilişkili dejeneratif hastalıkların çoğunda temel rol oynar. Kazanılmış mtDNA mutasyonları ve mitokondriyal disfonksiyonun yaşlanmayla ve diabet gibi yaş ilişkili çoğu hastalıkla olan ilişkisi, hayvan modellerinde (151) ve bir çok klinik araştırmada gösterilmiştir. Klinisyenler için temel zorluk ise; mtDNA ilişkili hastalıklı bireylerin, nadiren klasik bir fenotipe sahip olmaları ve mtDNA hastalıklarının çoğunun, yaygın klinik sendromların farklı tanılarıyla karışabilmeleridir (152).

Tablo 2.5. mtDNA mutasyonlarından kaynaklanan bazı hastalıklar

MtDNA hastalığı	Klinik fenotip	mtDNA genotipi	Gen	Durum	Kalıtım	Referans
Kearns–Sayre sendromu	Progresif myopati, oftalmopleji, kardiyomyopati	Tek, geniş ölçekli delesyon	Bazı delesyona uğramış genler	Heteroplazmik	Genellikle sporadik	(153, 154)
CPEO	Oftalmopleji	Tek, geniş ölçekli delesyon	Bazı delesyona uğramış genler	Heteroplazmik	Genellikle sporadik	(153, 155)
Pearson syndrome	Pansitopeni, laktik asidoz	Tek, geniş ölçekli delesyon	Bazı delesyona uğramış genler	Heteroplazmik	Genellikle sporadik	(156)
MELAS	Miyopati, ensefalopati, laktik asidoz, strok-benzeri epizodlar	3243A>G; 3271T>C Özgün mutasyonlar	TRNL1 ND1 and ND5	Heteroplazmik Heteroplazmik	Maternal Maternal	(157)
MERRF	Myoclonic epilepsy, myopathy	8344A>G; 8356T>C	TRNK	Heteroplazmik	Maternal	(158)
NARP	Nöropati, ataksi, retinitis pigmentosa	8993T>G	ATP6	Heteroplazmik	Maternal	(159)
MILS	İlerleyici beyin hastalığı	8993T>C	ATP6	Heteroplazmik	Maternal	(160)
MIDD	Diabet, sağırlık	3243A>G	TRNL1	Heteroplazmik	Maternal	(161)
LHON	Optik nöropati	3460G>A 11778G>A 14484T>C	ND1 ND4 ND6	Hetero- ya da homoplazmik Hetero-ya da homoplazmik Hetero-ya da homoplazmik	Maternal Maternal Maternal	(162, 163)
Myopati ve diabet	Myopati, güçsüzlük, diabet	14709T>C	TRNE	Hetero- ya da homoplazmik	Maternal	(164)
Sensorinöral işitme kaybı	Güçsüzlük	1555A>G Özgün mutasyonlar	RNR1 TRNS1	Homoplazmik Hetero-ya da homoplazmik	Maternal Maternal	(165, 166)
Ekzersiz intoleransı	Yorgunluk, kas güçsüzlüğü	Özgün mutasyonlar	CYB	Heteroplazmik	Sporadik	(167)
Fatal, infantil ensefalopati; Leigh/Leigh-like sendrom	Ensefalopati, laktik asidoz	10158T>C; 10191T>C	ND3	Heteroplazmik	Sporadik	(168)

2.3.6. Mitokondri ve Kanser

Kanser, büyüme sinyallerinin varlığına ihtiyaç duymayan, apoptozisten kurtulabilme kabiliyetine sahip, anti-büyüme sinyallerine dirençli, anjiogenezisi devamlı olan, kontrolsüz proliferasyon, invazyon ve metastaz yapabilen hücrelerle karakterize hastalıktır. Kanserde, hücresel biyoenerjetikdeki değişimler, hastalığa özgü bir şekilde görünür hale gelir (169). Mitokondri, kansere eşlik eden hücresel biyoenerjik ve biyosentetik değişimleri kapsayan major organeldir. Bu bioenerjik modifikasyonlar, tümörlerin invaziv, metastatik ve adaptif özelliklerine katkıda bulunurlar. Histonlardan yoksun olan mtDNA'nın, onarım mekanizmalarının sınırlı olması ve mitokondri organeli içerisinde üretilen ROS'e yüksek düzeyde maruziyetinden dolayı hasara ve mutasyona uğramaktadır. Hasar ve mutasyonlar, neden dolayı kaynaklanırsa kaynaklansın, mitokondriyal fonksiyonlarda bozukluklarla sonuçlanan gen ekspresyonunda değişimlerle sonuçlanabilir. OXPHOS komponentlerini kapsayan mutasyonlar, ROS üretimi siklusunu başlatır ve ardından hasarlanmış mtDNA enerji metabolizmasının regülasyonunun bozulmasına yol açar (170). mtDNA'nın D-Loop olarak da bilinen promotor bölgesindeki ya da tRNA kodlayan bölgelerindeki mutasyonlar OXPHOS komponentlerinin gen transkripsiyonunda zararlı bir etkiye neden olabilirler (171). Ayrıca, nDNA'da ve mtDNA'nın OXPHOS genlerinde meydana gelen mutasyonlar, sadece elektronların electron transport zinciri yoluyla akışını engelleyip, mitokondriyal ROS üretiminde artışa neden olmakla kalmaz aynı zamanda artan H_2O_2'nin mitokondriden sitozole ve nükleusa doğru difüzyonu gerçekleşir. H_2O_2 nükleusta, transisyon metalleriyle etkileşime girer ve nDNA için mutagenez olarak Kabul edilen OH^-'ye dönüşür ve bu durum hasarlanan nDNA'nın poli ADP-riboz polimeraz (PARP)'I kapsayan nDNA onarım sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanır. Active PARP; histon ve diğer nükleer proteinlere poli ADP-riboz zincirinin eklendiği süreçte rol oynayan nükleer NAD+'yı degrade eder (172).

Nükleer NAD+'nın degradasyonu, NADH/NAD+ oranının yüksek düzeyleri ile birlikte nükleer SIRT1'in inaktivasyonuna yol açar. SIRT1; bir histon deasetilazdır (Nükleer transkripsiyon, histon asetilasyonu yoluyla aktive, histon deasetilasyonu ile inaktive olur) ve histon deasetilasyonu, post-mitotik dokulardaki proto-onkogen gibi genlerin sessizleştirilmesinde rol oynar. Böylece, SIRT1'in inhibisyonu, normalde inaktif durumda bulunan genlerin transkripsiyonuna izin verir. H_2O_2'nin nükleusa

difüzyonu ve OH^-'ye dönüşümü, proto-onkogenlerin mutasyona uğrayarak fonksiyonel onkogenez sürecinin başlamasına neden olur. Dahası, sitozolik ve nükleer H_2O_2'nin düzeylerindeki artış, NFκB, APE-1, Fos, Jun ve tirozin kinazları da kapsayan bir grup hücresel sinyal transdüksiyon faktörünün aktivasyonuna yol açar. Bu hareketlenme hücreyi replikasyona sürükler. Sonuç olarak, mitokondriyal genomun mutasyonları, elektron tranport zinciri yoluyla elektron akışını engellemekte ve mitokondriyal ROS üretiminde kronik bir artışa neden olmaktadır ve bu durum hem tümör öncülü proto-onkogenlerin mutasyonuna hem de tümör oluşumunda transkripsiyon ve replikasyonun aktivasyonunu destekleyen tümör promoterlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (173).

Kanserlerin tümünde yaygın olarak gözlemlenen mitokondriyal genom değişiklikleri günümüze kadar araştırılmış olup mutasyon sıklığı ve heteroplazmik düzeylerin çeşitli faktörler sebebiyle bir hayli farklı seyrettiği rapor edilmiştir. Mitokondriyal genom; cilt, baş ve boyun, tükrük bezleri, tiroid, meme, akciğer, özofagus, gastrik, kolorektal, pankreas, karaciğer, safra kesesi ve hematolojik kanserlerinde araştırılmış olup, çeşitli polimorfizmler, mitokondriyal mikrosatellit instabilitesi, somatik nokta mutasyonları ve mitokondriyal genomun ekspresyonundaki değişimler tespit edilmiştir (174-177). Birçok kanser araştırmasında sıklıkla rastlanılan mitokondriyal mutasyonlar ise, çeşitli somatik nokta mutasyonları, küçük insersiyon ve delesyonlar ve geniş ölçekli yeniden düzenlenmeler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, germline tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) ve populasyon polimorfik varyantları bazı kanserlerin gelişim riskini modüle ettiği kabul edilmiş olup belli kanserlerin prognostik tahmininde önerilebilirler. Kanser türlerinin incelenmesinde mtDNA mutasyon sıklığının da bir hayli değişken olduğu rapor edilmiştir (174).

Meme, akciğer, tiroid, prostat, renal hücreli kanser, hepatosellüler kanser ve diğer bir çok kanser türünde gözlemlenen bu mutasyonların, mtDNA'nın hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelerinde olduğu rapor edilmiştir (178-180). İnsan kanserlerinin çeşitli tiplerinde delesyon, insersiyon, tandem duplikasyonlar ve kopya sayısı değişimleri tanımlanmıştır. Mutasyonların türü ve miktarı; invazyonun ve metastaz potansiyelinin artışı, ilaç direnci ve kötü prognozla korelasyon göstermiştir (88, 181). Ayrıca kanser hastalarının idrarları ve diğer vücut sıvılarındaki normal hücrelerde de gözlemlenmiş olan mtDNA mutasyonları, kanserin erken teşhisi için yapılan

araştırmalarda önem kazanmıştır. Ancak, hastaların büyük bir kısmında vücut sıvılarında mtDNA mutasyon tespiti çalışmaları, diagnostik test parametreleri için tatmin edici sonuçlanmamıştır (182).

Kanser süreci esnasında mtDNA mutasyonlarının belli tür ve sayılarında bazı değişimler gözlemlenmiştir. Memeli hücreleri türler arasında değişmekle beraber genellikle; her hücre bölünmesinde rasgele bir şekilde yavrulara geçen mtDNA'nın 10^3-10^4 kopyasını içermektedir. Mutasyona uğramış olan DNA, birçok hücre bölünmesi ile hücrede zenginleşir ve karsinogenezisin başlamasına yardımcı metabolik disfonksiyon fenotipi ile sonuçlanabilir ve kanser gelişim sürecinde mutasyonları barındıran mitokondriyanın tümü homoplazmi yönüne giden bir hücre sürecine yönelirler. Çoğu homoplazmik mutant mtDNA'nın, genomik DNA'nın bütünlüğüne bakılmaksızın, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini yansıttığını göstermiştir (183).

Literatürde; somatik mtDNA mutasyonları çoğu kanser türünde rapor edilmiş olmasına rağmen, kanser hastalarında mtDNA polimorfizm ilişkili olarak yapılmış çok az çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların ilki ve en geniş çaplı olanı, meme kanserli hastalarda, kanser gelişiminde bir risk faktörü olarak tanımlanan 10398 A>G polimorfizminin araştırılmasıdır (184, 185). Canter ve ark. (186), mtDNA ND3 bölgesine ait 10398 G>A polimorfizminin, Kompleks I'in yapısını değiştirdiğini, bu sayede ROS üretiminde artışa neden olduğu ve Afrika kökenli Amerikalı kadınlarda meme kanserine yatkınlık oluşturduğunu ayrıca bu polimorfizmin meme karsinogenezisinde önemli bir nokta olduğunu iddia etmişlerdir. Czarnecka ve ark. (187), aynı SNP'nin Polonya populasyonunda da meme kanseri gelişim riskini artıran bir faktör olduğunu iddia etmişlerdir. Navaglia ve arkadaşları (188), pankreas kanserli hastaların inceledikleri mtDNA D-Loop bölgelerinde 16519 C>T polimorfizminin; sadece hücre metabolizmasında bir bozukluğa yatkınlık oluşturmakla kalmadığını, aynı zamanda oksidatif strese karşı hücre cevabını değiştirdiğini ve böylelikle tümör hücrelerini apoptozise daha dirençli hale soktuğunu iddia etmişlerdir. Yaptıkları araştırma sonucunda, bu polimorfizme sahip pankreas kanserli hastaların, kanser-ilişkili diabet gelişimi açısından yüksek riske ve azalmış yaşam beklentisine sahip olduğunu iddia etmişlerdir. Wei ve arkadaşları (189), mide kanserli hastalarda mtDNA D-Loop bölgesinin yaygın görülen polimorfizmlerini araştırmışlar ve 16521 G>C SNP'nin mide kanserinde yatkınlık oluşturan bir faktör olduğunu iddia etmişlerdir. Petros ve ark.

(170), kompleks I'in ND bölgelerindeki muhtelif polimorfizmlerin erkeklerde prostat kanserine yatkınlıkta katkı sağladığını savunmuşlardır. Yacoubi ve ark. (190), meme kanserli kadın hastaların, inceledikleri mtDNA HVR-II (hipervariabl) bölgelerinde çeşitli polimorfizmler tespit etmiş olup, bu polimorfizmlerden bazıları ile meme kanseri arasında zıt bir ilişki olduğunu iddia etmişlerdir. Zhang ve ark. (191), özofagus kanserli hastaların, mtDNA D-Loop bölgesine ait SNP incelemelerinde, bu hastalarda mevcut bazı SNP noktalarının kanser riski ve hastalığın prognozu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. mtDNA'nın çoğu bölgesindeki SNP'ler, mtDNA'nın yüksek düzeyde ROS salınımından sorumlu olan elektron transport zincirinde değişimine yol açar ve bu değişim kanser başlaması ve gelişiminde önemli bir adımdır.

2.4. Hematolojik Maligniteler

2.4.1. Miyelopoez ve Myeloid Kök Hücreler

Miyelopoez süreci; normal bir konak savunması için gerekli olan ve yeni myeloid hücrelerin (nötrofil, eozinofil ve bazofil granülositler, monosit ve makrofajlar) düzenli bir şekilde üretilmesini kapsar ve süreç çeşitli büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Tüm myeloid hücreler, koloni oluşturan birim granülosit, monosit (CFU-GM) olarak bilinen ortak bir hücreden türeyip, çeşitli myeloid büyüme faktörlerinin etkisiyle farklılaşırlar. Bu büyüme faktörleri; sitokin (IL-3, IL-5 ve granülosit-makrofaj koloni stimüle eden faktör [GM-CSF]) reseptör süper ailesinin membran reseptörleriyle etkileşirler. Bu etkileşim, farklılaşması ile ilgili genlerin ekspresyonunu kontrol eden, hücre öncül hücre transkripsiyon faktörü proteinleri olan Jak-STAT, RAS, NF-κB ve PI3-kinaz'ı tetikleyebilirler. Hücre farklılaşması ve büyüme faktörüne cevapta, kemik iliği mikroçevresi de (stroma hücreleri) önemli rol oynar (Tablo 2.6.) (192, 193).

Tablo 2.6. Miyelopoezde Rol Oynayan Faktörler:

Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF)	GM-CSF, nötrofil, eozinofil ve monosit kolonilerinin üretimini uyaran bir moleküldür. Aynı zamanda bu konilerin fonksiyonunu anlamlı düzeyde artırdığı için, enflamasyonunun sistemik etkilerinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu molekülün, öncül hücrelerin perifere göçünde etkin olduğu gösterilmiştir. GM-CSF; lenfositler, myeloid hücrelerin kendileri, endotel hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli hücreler tarafından üretilir ve bu durum IL-1, tümör nekroz faktör gibi enflamatuar sitokinler ve bakteri endotoksinleri tarafından uyarılır.
Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G-CSF)	G-CSF, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından salgılanan, granülosit üretimini uyaran, GM-CSF'den daha az sistemik etkili bir moleküldür. G-CSF, olgun granülositleri güçlü bir şekilde etkinleştirirken, hücre göçünü engelleme eğilimi taşır.
Monosit Koloni Uyarıcı Faktör (M-CSF)	M-CSF (CSF-1), başlıca etkisini makrofaj kolonileri üzerinde gösteren, yoğun olarak glikozillenmiş ve koloni uyarıcı diğer faktörlerden (CSF'ler) farklı olarak dolaşan kanda ve idrarda bulunabilen bir moleküldür. Hayvan çalışmaları, bu molekülün, monositozu ve monosit ve makrofajların etkinleşmesini uyarıp orta-ağır dereceli bir trombositopeniye yol açtığını göstermiştir.
İnterlökin-3 (IL-3)	Sadece T lenfositleri tarafından üretilen ve orijinal adı multi-CSF olan IL-3; nötrofil, monosit, eozinofil, bazofil ve trombosit üretimini uyarıp, olgun eozinofil ve monosit fonksiyonlarını güçlendirir.
Kök Hücre Faktörü (c-kit Ligand, Steel faktör)	Hücre kültürlerinde, IL-3'e benzer şekilde, çok sayıda hücre dizisinin çoğalmasını indükler.
İnterlökin-5 (IL-5)	IL-5, eozinofillerin farklılaşarak kemik iliğinden salınımı ve sağkalımı ile ilişkili en özgül sitokindir. Mast hücreleri ve eozinofillerden, alerjik cevabın bir parçası olarak da salınabilen IL-5'in yüksek düzeyleri, yardımcı T-hücre ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin fonksiyonu ile de ilişkilidir.
İnterlökin-6 (IL-6)	IL-6, çok sayıda hücre serisinde ve erken hücre öncülleri üzerinde etki gösteren bir faktördür.
İnterlökin-11 (IL-11)	IL-11, in vitro ortamda çok sayıda hücre serisi üzerinde etkilidir. Hastalarda trombosit üretim hızını ve böbreklerde sıvı retansiyonunu artırıcı etkisi bulunmaktadır.
Flt3 ligand	Flt3 ligand, etkisini Flt3 membran reseptörü (fms-benzeri tirozin kinaz) üzerinde gösterir ve M-CSF ve c-kit ile yakın ilişkilidir. Diğer hematopoetik büyüme faktörleri ve interlökinlerle sinerjik etki göstererek, kök hücrelerin, miyeloid öncüllerin, dendritik hücrelerin ve doğal öldürücü hücrelerin çoğalmasını uyarır.
Kemokinler ve Reseptörleri	Orijinal adları kemotaktik sitokinler olan ve çoğu 4. kromozomda kodlanan, yoğun yapılı, 50'den fazla ufak molekülden oluşan, geniş bir sitokin ailesidir. Genel işlevleri hücre göçünün yönetimidir. Bu moleküller bağışıklık gözetiminde, doku gelişiminde ve anjiogenezde önemli rol oynarlar. Bu kemokinler ve reseptörlerinin çoğu, hematopoezin düzenlenmesi ve kemik iliğinden lökosit göçünün kontrolünü sağlarlar. Bazıları kök hücre sağkalımını artırmakta ve apopitozu baskılamakta, bazıları da miyeloid hücrelerin yerleşimi ve göçünün kontrolünü yapmaktadır

2.4.2. Lenfopoez ve Lenfoid Kök Hücreler

Normal lenfopoez konak savunmasının zorunlu bir bileşenidir. Bu süreç, antikor üreten B hücrelerinin, hücre-aracılıklı bağışıklık işlevlerini yerine getiren ve büyük ölçüde bağışıklık sisteminin düzenlenmesinden sorumlu olan T hücrelerinin ve konak savunmasında enfeksiyonlara ve malignitelere karşı daha çok makrofaj benzeri bir rol üstlenen doğal öldürücü (natural killer) (NK) hücrelerinin çoğalmasını ve işlevini kapsar. Normal lenfopoezin anlaşılabilmesi için katılımcı hücre işlevlerinin ve hastalık durumlarında bu hücrelerin vermesi beklenen yanıtların bilinmesi gerekir (194).

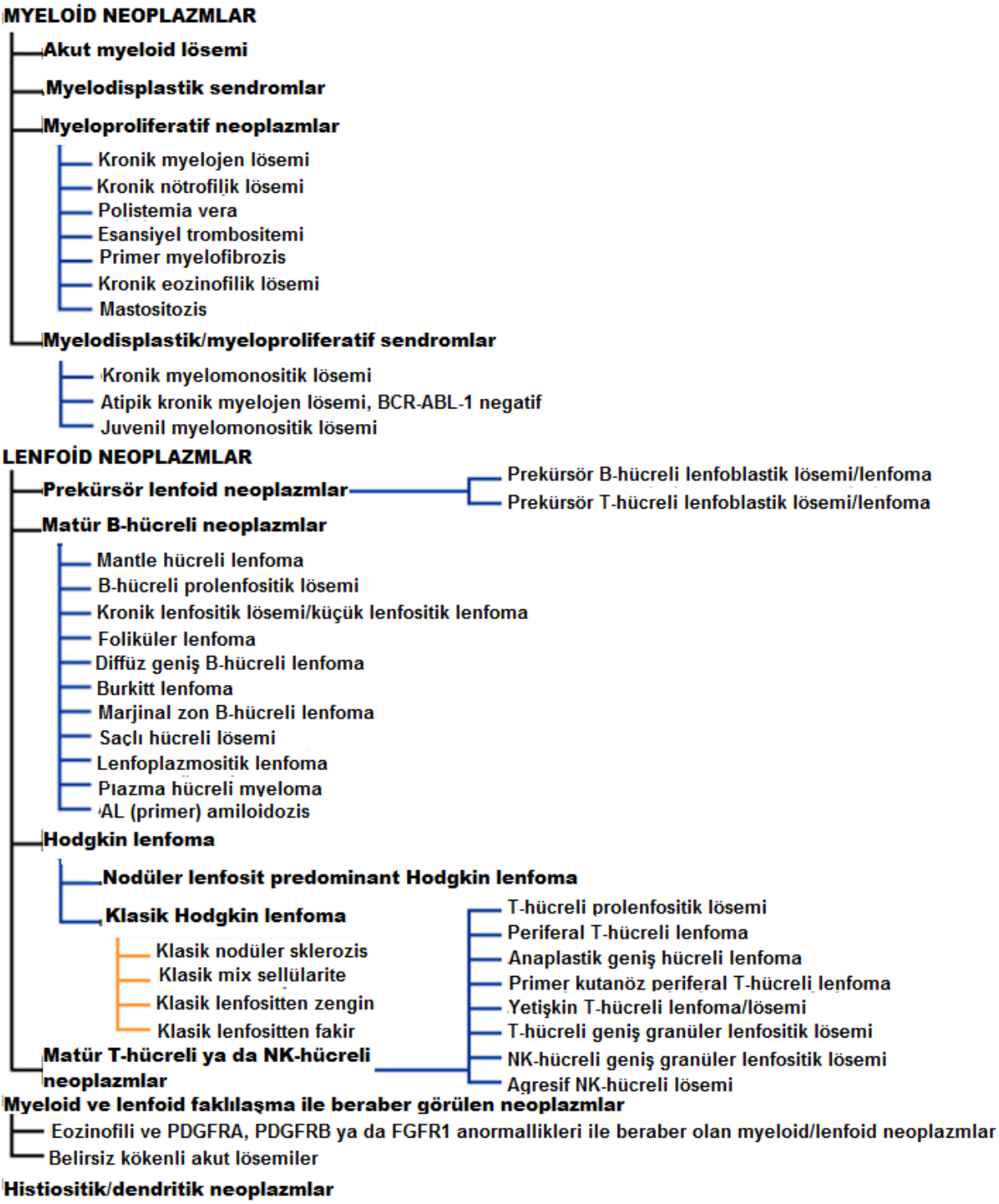
En önce gelen lenfoid kök hücre kemik iliğindeki totipotent kök hücre havuzundan türer. Fakat B hücreleri ve T hücreleri daha sonra diğer dokularda olgunlaşırlar. Öncül hücreler kemik iliğinden ayrılarak immunkompetan hücrelere dönüşecekleri timusa göç ederler. B hücre gelişimi kemik iliğinde ve periferik lenfoid dokularda, lenf düğümlerinde ve dalakta gerçekleşir. B hücreleri devamlılık gösteren bir değişimle son evre olan plazma hücresine dönüşürler. Antikor üretimi dışında B hücreleri antijen sunucu hücre olarak da görev yaparlar. Lenfosit gelişimini ve işlevini düzenleyen çeşitli büyüme faktörleri (interlökinler) tanımlanmıştır (Tablo 2.7.). İnterlökinler lenfosit gelişimini kontrol etmek üzere karmaşık ve birbirleriyle örtüşen yollar izlerler (192, 194).

Tablo 2.7. Lenfopoezde Rol Oynayan Faktörler

İnterlökin-1 (IL-1)	IL-1; farklı hücre tipleri tarafından üretilir ve akut ve kronik enflamasyonun bir parçası olarak geniş bir etki çeşitliliğine sahiptir. IL-1 T hücrelerinde IL-2 üretimini artırır ve kemik iliğindeki kök hücreleri uyarmak üzere myeloid büyüme faktörleri ile sinerjistik etki gösterir.
İnterlökin-2 (IL-2)	IL-2; lenfoid işlevlerle ilişkisi en açık olan interlökin grubudur. Etkinleşmiş T hücrelerinde üretilir ve hem T hem B hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını uyarır. Bağışıklık yanıtının güçlendirilmesine hizmet eden IL-2'ye T hücre yanıtında ve NK hücrelerinin uyarılmasında gereksinim duyulur.
İnterlökin-3 (IL-3)	IL-3; bir B hücre büyüme faktörüdür. IL-3 antijen tarafından etkinleştirilen B hücrelerinin çoğalmasına neden olur, antikor sentezini artırır ve IL-2 ile sinerjistik etki gösterir. Ayrıca T hücre çoğalmasını da uyarır ve erken myeloid ve eritroid öncül hücre çoğalması ile farklılaşmasında sinerjistik rol oynar.
Diğer İnterlökinler	IL-5; B hücre olgunlaşmasını ve eozinofil farklılaşmasını sağlar. IL-6; B hücre çoğalması ve farklılaşmasında etkilidir, aynı zamanda hepatosit ve nöron çoğalmasını da uyarır. IL-7; erken B hücreleri üzerinde uyarıcı etki gösterir ve B ve T hücre yollarındaki lenfoid öncül hücreleri etkileyebilir. IL-11; genel bir hematopoetik büyüme faktörü olarak işlev görür ve trombopoezde rol oynayabilir. IL-12; lenfoid hücreler (özellikle sitotoksik T hücreleri) üzerinde güçlü uyarıcıdır.

Lenfositler ve myeloid hücreler konak savunmasının bir parçası olarak interferon da üretebilirler. İnterferonlar T ve NK hücre işlevlerini uyarırlar. Bununla beraber, eritrosit ve lökosit çoğalmasını engellemek suretiyle hematopoezi baskılayabilir, sitotoksisite ve fagositoz gibi hücre işlevlerini de uyarabilirler. Lenfosit adezyon molekülleri olarak bilinen; immunglobulin (Ig) süper ailesi, integrinler, selektinler ve kaderinler, lenfosit ve diğer kan hücrelerinin göçünü, yerleşimini ve işlevlerini düzenleyebilirler (192, 194).

Hematolojik maligniteler, bahsedilen bu iki major kan hücre serisi olan myeloid ve lenfoid hücre serisinden köken alırlar (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Hematolojik Maligniteler Orjin ve sınıflama

2.4.3. Akut Lösemiler

2.4.3.1. Tanım

Akut Lösemi, erken hematopoetik prekürsörler hücrelerin malign dönüşümü sonucu meydana gelir. Proliferasyon ve diferansiyasyonunu normal olarak gerçekleştirmek yerine, etkilenen hücreler, farklılaşmaya uğramaz ve kontrolsüz şekilde çoğalmaya devam eder. Sonuçta, akut miyeloid lösemide (AML) immatür miyeloid hücreler (blast) ve akut lenfoblastik lösemide (ALL) immatür lenfoid hücreler (blast) hızlı bir şekilde birikir ve kemik iliğinde normal eritrosit, lökosit ve trombositlerle yer değiştirir. Kemik iliğinin normal fonksiyonunu kaybetmesi, lösemide sık görülen klinik komplikasyonlar olan kanama, enfeksiyon ve anemiye neden olur. Bu aşamadan sonra lösemik blastlar kan dolaşımına çıkar ve oradan da lenf nodları, dalak ve diğer vital organlarda birikir. Eğer tedavi edilmezse, akut lösemi hızla öldürür. Hastaların çoğu tanıdan sonra birkaç ay içerisinde ölür. Ancak uygun tedavi ile akut löseminin doğal seyri belirgin olarak değişir ve hastaların çoğunda kür sağlanabilir (193, 194).

2.4.3.2. Epidemiyoloji

Amerika'da her yıl yaklaşık 35,000 yeni vaka tanı almaktadır. Oran her 100,000 kişide yaklaşık 8,5'dir. Bu oran son 30 yıl için aynı şekilde devam etmiştir. Bu vakaların yaklaşık %34'ü AML, %28'i kronik lenfositik lösemi (KLL), %13'ü kronik myeloid lösemi (KML), %11'i (ALL) ve geriye kalanlar ise diğer tipleri oluşturur. Lösemiler Amerika'da tüm kanserlerin yaklaşık %3'den sorumludur (194) Ülkemizde AML insidansı 3-5/100.000 düzeylerinde seyretmekte iken ALL insidansı 1-2/100.000 arasında değişmektedir (195). Löseminin etkisi hastaların bir kısmının genç yaşta olmasından dolayı artar. Örneğin maksimum insidansı 2-10 yaşında olan ALL, en sık görülen kanserdir ve 15 yaşından küçük çocuklarda 2. en sık ölüm sebebidir. Tersine AML insidansı yaşla birlikte artar ve AML tanısı konduğunda ortalama yaş yaklaşık 60'dır (193, 194).

2.4.3.3. Sorumlu Faktörler

Vakaların çoğunda akut lösemi bilinen bir sebep yokken gelişir fakat bazen olası neden saptanabilir.

Radyasyon: İyonize radyasyon lökomojeniktir. ALL, AML ve KML insidansı, ankilozan spondilit için radyoterapi alan hastalar arasında ve Hiroşima ve Nagasaki'de atom bombasına maruz kalan kişiler arasında artmıştır. Riskin büyüklüğü, radyasyon dozuna, zaman içerisinde yayılımına ve kişilerin yaşına bağlıdır. Daha yüksek radyasyon dozlarında daha yüksek risk görülür ve daha genç hastalarda daha kısa sürede ortaya çıkar. Radyasyon öyküsü olan hastalarda (sıklıkla radon), kromozomal anormalliklerin, daha sık olduğu bildirilmiştir. Fakat akut lösemide artış saptanamamıştır. Elektrik merkezlerinden yayılan oldukça düşük frekanstaki noniyonize elektromagnetik alanların olası lökomojenik etkisi giderek artan sıklıkta önem kazanmaktadır. Tüm bunların etkisi olsa bile minimaldir (194).

Onkojenik Virüsler: Löseminin viral nedenleri için yapılan araştırmalar, yoğun şekilde devam etmektedir. İnsan T hücreli lenfotropik virüs tip I (HTLV-I), kılıfı olan tek zincirli RNA virüsüdür. Erişkin T hücreli lösemiye (ATL), neden olan bir faktör olarak kabul edilmektedir. Ayrıca infeksiyöz mononükleoza neden olan bir DNA virüsü olan EBV, Burkitt lenfoma ve onun lösemik eşdeğerleri, matür B-hücreli ALL ile ilişkilidir (194).

Kimyasallar ve İlaçlar: Benzen, benzen içeren kerosen ve karbon tetra klorid gibi maddelere mesleksel maruziyet, aplastik anemi, myelodisplazi veya AML gibi kemik iliği hasarı ile ortaya çıkan hastalıklara yol açabilir. Lösemi ve sigara kullanımı arasındaki ilişki yakın zamanda bildirilmiştir. Diğer maligniteleri tedavi etmek için kemoterapi kullanımının artmasıyla, daha önce uygulanan kemoterapiye sekonder gelişen AML insidansı artmıştır ve tüm vakaların %6-10'da görülebilir. Melfalan gibi alkilleyici ajanlar ve nitrozürelere daha önce maruziyet, sıklıkla ilk prezentasyonu MDS gibi olan sekonder AML gelişim riskini artırmıştır. Bu tabloda genellikle kromozom 5, 7 ve 8'de anormallik vardır, fakat farklı morfolojik özellikler yoktur. Bu sekonder AML'ler tipik olarak, alkilleyici ajana maruziyetten sonra 4-6 yıl sonra gelişir. İlaca maruziyet süresi ve yoğunluğu arttıkça görülme sıklığı da artabilir. Epifilotoksinlere uzun süre maruziyet (teniposid veya etoposid), AML gelişimi için risk faktörü olarak belirlenmiştir. Epipodofilotoksin maruziyeti ile ilişkili sekonder lösemiler, kısa latent periyod (1-2 yıl), miyelodisplastik fazın olmaması, monositik morfoloji ve kromozom 11 (band q23) ile kromozom 21 (band q22)'in uzun kolundaki anormallikleri içerirler.

Son zamanlarda, akut promiyelositik lösemi (APL) ve daha önce psöriasis için bimolan, dioksopiperazin kullanımı arasında bir ilişki bildirilmektedir (193, 194).

2.4.3.4. Patobiyoloji

Genetik: Tek yumurta ikizi olan bir hastada 10 yaşından önce lösemi gelişirse, etkilenmeyen ikizde lösemi gelişme riski %20'dir. Somatik hücre anöploidisi olan bazı sendromlarda, trizomi 21 (down), trizomi 13 (patau), XXY (klinefelter) gibi, AML gelişme riski artmıştır. Diğer genetik mutasyonların, örneğin, 21q22'deki bir mutasyon, AML gelişimi için yüksek risk oluşturduğu bildirilmiştir. Bloom sendromu, Fankoni anemisi ve Ataksi telenjektazi gibi bazı otozomal resesif hastalıklar akut lösemi ile sonuçlanma eğilimi oluşturan kromozomal instabilite ile ilişkilidir (194).

Klonalite ve Hücre Orijini: Akut lösemiler klonal hastalıklardır ve bir hastadaki tüm lösemik hücreler tek bir progenitörden oluşur. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, AML'deki lösemik kök hücrelerin 0,2-10×10^6 miktarında olduğunu ve lösemik kitlelerde nadir olarak bulunduğunu ileri sürmektedir. Bu kök hücreler $CD34^{++}CD38^{-}$ fraksiyon içerisindedirler. ALL kök hücre hakkındaki bilgiler ise oldukça azdır (194).

2.4.3.5. Sınıflama

Akut lösemiler birkaç yolla sınıflandırılabilir. Bunlar, morfolojik, sitokimyasal, hücre yüzey markırları, sitoplazmik markırlar, sitogenetik ve onkogen ekspresyonu şeklindedir. Üç dekaddan daha uzun bir süredir morfolojiye dayanan Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sistemi temel olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda morfolojik özelliklerin yanı sıra moleküler ve klinik özelliklerini de içeren Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflaması geliştirilmiştir (Tablo 2.8.)(194).

Tablo 2.8. Akut Lösemiler WHO sınıflaması

AKUT MYELOİD LÖSEMİ (AML) Tekrarlayan sitogenetik translokasyonlarla birlikte olan AML'ler t(8;21)(q22;22), AML1 (CBF-α)/ETO ile beraber olan AML Akut Promiyelositik lösemi t(15;17)(q22;q11-12) varyantları, PML/RARα ile birlikte olan AML Anormal kemik iliği eozinofilleri ile birlikte olan AML (inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q11), CBF-β/MYH11X) 11q23 (MLL) anormalliği ile birlikte olan AML
Multilinear displazi ile birlikte olan AML Öncesinde MDS olan Öncesinde MDS olmayan
AML ve MDS, tedaviyle ilişkili Alkilleyici ajanlarla ilişkili Epipodofilotoksinlerle ilişkili (bazıları lenfoid seri ile ilişkili) Diğer tipler
Sınıflandırılamayan AML AML, minimal olarak diferansiye (FAB M0) AML, maturasyon olmadan (FAB M1) AML, maturasyon olan (FAB M2) Akut promyelositik lösemi (FAB M3) Akut miyelomonositik lösemi (FAB M4) Akut monositik lösemi (FAB M5) Akut eritroid lösemi (FAB M6) Akut megakaryositik lösemi (FAB M7) Akut bazofilik lösemi
MYELOFİBROZ İLE BERABER OLAN AKUT PANMYELOZİS **AKUT BİFENOTİPİK LÖSEMİLER** **AKUT LENFOİD LÖSEMİLER (ALL)** Prekürsör B hücreli ALL (sitogenetik altgruplar) t(9;22)(q34;q11); BCR/ABL t(9;11)(p22;q23); MLL yeniden düzenlenme t(1;19)(q23;p13); E2A/PBX1 t(12;21)(p12;q22); ETV/Cbf-α
PREKÜRSÖR T HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ **BURKİTT BENZERİ LÖSEMİ**

2.4.3.6. Morfoloji

AML'deki lösemik hücreler tipik olarak, 12-20 nm çapında, farklı nükleer kromatini olan, multipl nükleolus içeren ve sitoplazmasında azürofilik granüllere sahip hücrelerdir. Silindirik, fusiform yapıda, Wright-Giemsa boyaması ile kırmızı boyanan sitoplazmik inklüzyonlar olan Auer cisimcikleri, AMl tanısı için patognomoniktir. FAB sisteminde, morfolojik özelliklerine dayanarak AML 8 alt tipe ayrılır. M0, M1, M2 ve M3, miyeloid lösemik hücrelerin artan derecede diferansiyasyonunu yansıtır. M4 ve M5 lösemiler, monositik serinin özelliklerini taşır. M6, eritroid hücre serisinin özelliklerine sahiptir ve M7 ise akut megakaryositik lösemidir.

ALL'deki lösemik hücreler, AML'deki blastlardan daha küçük ve granüllerden de kısmen yoksun olma eğilimindedir. FAB sisteminde ALL, L1, L2 ve L3 olarak alt gruplara ayrılır. L1 blastlar, uniform yapıda, homojen nükleer kromatin ve belirsiz nükleolusu bulunan, dar sitoplazmalı ve eğer varsa az granüllü hücrelerdir. L2 blastlar, daha büyük, değişken boyutlu ve nükleolusu olan hücrelerdir. L3 blastlar ise, aşikar nükleoluslu ve vakuollü, belirgin bir sitoplazmaya sahiptir (194).

2.4.3.7. Hücre Yüzey Markırları

Hücre yüzey antijenleri ile reaksiyona giren monoklonal antikorlar, akut lösemileri sınıflandırmada kullanılmaktadır. Antijenlerle reaksiyon veren antikorlar normal immatür miyeloid hücrelerde bulunur. Bunlar CD13, CD14, CD33 ve CD34'dür. Aynı zamanda AML'li hastaların çoğunda bulunan blastlarla da reaksiyon verir. M6 ve M7 varyantları bunun dışındadır. Çünkü buradaki hücreler sırasıyla eritroid ve trombositer seriye ait antijenlere sahiptir. Myeloid lösemik blastlar, insan lökosit antijenlerini de (HLA-DR) ekprese ederler. Ancak T-hücre, B-hücre ve diğer lenfoid antijenler genellikle bulunmaz. Hastaların %10-20'de AML blastlarında B ve T hücre serisine ait antijenler eksprese edilebilir. AML hücreleri tarafından eksprese edilen lenfoid antijenler, hastalığın doğal seyrini veya lösemilerin terapötik yanıtını değiştirmez (194).

ALL'li vakaların yaklaşık %75'i, B-seri antijenlerini eksprese eder ve 4 gruba ayrılır. En immatür grup olan pro-B ALL, diğer B-seri antijenlerini değil sadece CD19 eksprese eder ve ALL'li vakaların yaklaşık %10'unu oluşturur. Vakaların yaklaşık

%50-60'ı common ALL antijeni (CALLA veya CD10) ekspresse eder. Bu antijen, normal erken lenfositler ve diğer non hematopoetik dokularda da bulunabilen bir glikoproteindir. CALLA-pozitif ALL'nin, erken pre-B hücre diferansiyasyon durumunu gösterdiği düşünülür. ALL'li vakaların yaklaşık %10'u intrasitoplazmik immunglobuline sahiptir ve pre B-hücre ALL olarak adlandırılır. B-hücre ALL, hücre yüzeyinde immünglobulinlerin varlığı ile gösterilir ve vakaların %5'inden azında görülür. Genelde B-hücre ALL tipleri arasında en iyi teröpatik sonuç, erken pre-B hücre (CALLA pozitif) ALL'de görülür. T-hücre antijeni ekspresse eden ALL'li vakaların %25 içerisinde yarıdan azı CD4 ve CD8 ile beraber veya tek başına CD3 ekspresse eden pre T-hücre ALL olarak adlandırılır. Vakaların çoğunda T-hücre ALL, CD3 ve CD4 veya CD8 ekspresse eder. T-hücre ALL'nin prognozu pre T-hücre ALL'den daha iyidir. ALL'li hastaların yaklaşık %25'inde lösemik hücreler, miyeloid antijenleri eksprese eder (194).

2.4.3.8. Sitogenetik ve Moleküler Biyoloji

Akut lösemili vakaların çoğunda kromozom sayı ve yapısında anormallik bulunur. Bu anormallikler, etkilenen hastalarda tüm malign hücreleri içerecek şekilde klonaldir. Bu anormallikler sonradan kazanılmıştır ve hastaların normal hücrelerinde bulunmaz. Bunlar non-random olarak adlandırılır. Çünkü AML'li birçok vakada spesifik anormallikler bulunur ve hastalığın farklı morfolojik ve klinik alt tipleri ile ilişkilidir (Tablo 2.9.). Bu anormallikler, tüm kromozomun kaybı veya fazlalaşması şeklinde olabilir fakat daha sıklıkla kromozomal translokasyonlar, delesyonlar veya inversiyonlar şeklindedir. Akut lösemili ve kromozomal anormalliği olan hastalar tedavi ile komplet remisyona girdikleri zaman, kromozomal anormallikler ortadan kaybolur. Relaps olduğunda ise tekrar ortaya çıkar (Tablo 2.10.). Vakaların çoğunda bu anormallikler, akut lösemi patobiyolojisinde ipuçları sağlamıştır (194).

Tablo 2.9. AML'de görülen bazı sitogenetik anomaliler

Anomali	Yaklaşık Sıklığı	Katılan Genler	Prognostik Anlamı
t(8;21)(q22;22)	M2 AML'de %40	AMLI/ETO	Olumlu
t(15;17)(q22;q11-22) (Promyelositik)	AML'de %10	PML/RARα	Olumlu
inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q11)	Kemik iliğinde anormal eozinofil bulunan çoğu M4	AMLI/MYHI IX	Olumlu
11q23 anomalileri	Birincil AML'lerde %6-6, ikincil AML'lerde %85	MLL (karma dizili lösemi)	Orta veya olumsuz
del(5q) veya monozomi 5	Yaşlı hastalarda ve ikincil AML'de daha sık	Büyüme faktörü kümesi	Olumsuz
Kromozom 8 trizomisi	AML'lelerin %10'unda	AMLI?	Olumsuz

Tablo 2.10. Sitogenetik olarak normal AML ile ilgili gen mutasyonları

Gen	İşlev	Prognoza Etkisi	Beklenen Tedavi Etkisi
FTL3	Tirozin kinaz	ITD: daha kötü; TKA: daha iyi	İnhibitörlerle yapılan çalışmalar devam etmektedir
NPMI (nükleofosmin)	Pleiotropik	FLT3'de olumlu	RA ile etkileşim
CEPBA	Transkripsiyon faktörü	Olumlu	Tanımlanması güç
MLL	Histon metiltransferaz	Olumsuz	Histondeasetilaz ve metiltransferaz inhibitörleri
N-RAS	Hücre içi sinyal	Etki yok	Yüksek doz ARA-C etkisi
WT-I (Wilms tümör gen I)	Farklılaşma faktörü	Olumsuz	Tanımlanması güç

ALL'li erişkinlerde en sık görülen sitogenetik anomali olan Philadelphia (Ph) kromozomu 22. kromozom üzerindeki BCR geni ile 9. kromozom üzerindeki ABL geninin füzyonu ile oluşur. Bu derivatif kromozomun oluşumuna sebep olan translokasyonun aktivasyon mekanizması halen bilinmemektedir. BCR/ABL füzyonu hem ALL hem de KML ile ilişkilidir. t(9;22)'nin sıklığı yaşla birlikte artar. Çocukluk çağında yaklaşık %5, erişkinlerde %25 ve 50 yaş ve üzerinde ise %50 oranında bulunur. t(9;22) translokasyonu ile beraber olan ALL'li vakalar, konvansiyonel kemoterapiyle tedavi edildikleri zaman kötü prognoza sahiptirler. Çocukluk çağındaki ALL'de en sık görülen translokasyon t(12;21)'dir. Bazen, t(8;14) ve t(8;22) gibi diğer anomaliler de B-hücre ALL'de görülür. Ayrıca 11q23'ü içeren kromozomal patolojiler de görülür (Tablo 2.11.). ALL'li hastaların yaklaşık %20'sinde lösemi hücreleri kromozomlarında artışa meyil vardır, bazen her hücre için ortalama 50-60 kromozom sayısına kadar ulaşılır. Bu hiperdiploid durumda, lösemi hastaları kemoterapiye daha iyi yanıt verme eğilimindedir (194).

Tablo 2.11. ALL'de görülen bazı moleküler ve sitogenetik anomaliler

Genetik Anomali	**Hücre Tipi**	**Çocuklarda Sıklık**	**Erişkinlerde Sıklık**	**Tedavi Açısından Anlamı**
Hiperdiplodi(>50) kromozom	B	%25	%7	Metotreksata duyarlılık
TEL/AMLI t(12;21)	B	%22	%2	Asparaginaza duyarlılık
MLL t(4;11) t(11;19) t(9;11)	B	%8	%10	Yüksek doz sitarabine duyarlılık
BCR-ABL t(9;22)	B	%3	%25	TK inhibitörü dahil edilir
E2A-PBXI t(1;19)	B	%5	%3	Yüksek dozlu tedavi gerektirir
TALI del(1p32)	T	%7	%12	Metotreksata direnç
HOXII t(10;14)(q24;q11)	T	%0.7	%8	Çocuklarda daha olumlu bir prognoz sağlar

AML'de farklılaşmayı etkilemeyen ancak proliferasyonu ve/veya hücre sağkalımını artıran Sınıf I mutasyonlar (BCR/ABL, c-KIT, FLT3, ALM, onkojenik Ras, PTPN11, TEL/PDGFβR) ve farklılaşmayı ve apoptozu bozan Sınıf II genetik mutasyon ve füzyonlar (AML/ETO ve PML/RARα füzyonları, CEBPA, CBF, CBP/P300, TIF1 ve HOX mutasyonları, MLL yeniden düzenlenmeleri) saptanabilir (195).

ALL hastalarında ise ilerleyen yaş ile birlikte hastalığın biyolojisinin değiştiği, kötü sitogenetik özelliklerin (Ph+, t(4;11)/ALL1-AF4, t(1;19)/E2A-PBX ve 11q23+) sıklığı artarken, iyi prognoz ile ilişkili genetik değişikliklerin (TEL-AML1, hiperdiploidi) sıklığının azaldığı dikkati çekmektedir (194, 195).

2.4.4. Kronik Lösemiler

Kronik miyeloid lösemi (KML) ve myeloproliferatif hastalıklar, hematopoetik kök hücrenin klonal maligniteleridirler. Akut lösemilerin aksine daha yavaş klinik seyir gösterirler çünkü malign hücreler hastalığın kronik döneminde olgunlaşma yeteneğini halen korumaktadırlar. Birincil olarak tek bir hücre serisinin çoğalması olarak ortaya çıksalar bile, granülositik, eritrositik ve megakaryositik dizilerin kökenlerini aynı anormal klondan aldıkları gösterilebilir. Bu bozukluklar başlangıçta veya hastalığın seyri sırasında sıklıkla birbirleriyle örtüşebilirler ve bu da hastalığın sınıflandırılması ve tedavisi konusunda güçlük yaşanmasına sebep olabilir (Tablo 2.12.) (193, 194).

Tablo 2.12. Myeloproliferatif hastalıkların sınıflandırılması

Kronik miyeloid lösemi (BCR/ABL pozitif)
Kronik miyeloid lösemi (BCR/ABL negatif)
Kronik nötrofilik lösemi
Primer miyelofibroz
Primer (esansiyel) trombositopeni
Polisitemia vera
Kronik eozinofilik lösemi
Kronik miyelomonositik lösemi (KMML)
Juvenil kronik miyelomonositik lösemi

2.4.4.1. Kronik Miyeloid Lösemi

2.4.4.1.1. Tanım

Kronik miyeloid lösemi (KML) kronik myelositik lösemi veya kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılır ve myeloid seri hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla karakterize olan, primitif hematopoetik kök hücrenin klonal myeloproliferatif bir hastalığıdır. Bu çoğalma belirgin splenomegali ve lökositozile sonuçlanır. Bazofili ve trombositoz sıktır. Karakteristik bir sitogenetik anormallik olan Ph kromozomu, vakaların %90'dan daha fazlasında kemik iliği hücrelerinde bulunur. Hastaların çoğu (%85-90) kronik fazdadır, ancak kontrol sağlanamazsa KML hızlanır ve blastik fazlara geçer (193).

2.4.4.1.2. Epidemiyoloji

KML, Amerika'da tüm lösemili vakaların 1/5'ini oluşturur. Her yıl 100.000'de 1 veya 2 kişiye tanı konur ve erkek dominansı vardır. KML insidansı yaşla artar ve ortalama yaş 45-55'dir. Ph(+) KML, çocuklarda ve adelösanlarda nadirdir. KML'de bildirilmiş ailesel ilişki yoktur (194).

KML'de suçlanabilen bir etyolojik ajan yoktur. İyonize radyasyona maruziyet (1945'te Japonya'da atom bombası sonrası yaşayanlar ve servikal ankilozan spondilitin radyoterapi ile tedavisi) KML riskini artırır. Pik insidans maruziyettten 5-12 yıl sonra meydana gelir ve dozla ilişkilidir. Benzen maruziyeti, AML riskini artırırken KML'de bu şekilde bir ilişki yoktur. KML, diğer kanserlerin tedavisi için kullanılan radyasyon ve/veya alkilleyici ajanlar sonrasında sekonder lösemi olarak sık görülmez (193, 194).

2.4.4.1.3. Moleküler Patogenez

Ph kromozom anormalliği, tipik KML'li hastaların %90'ından fazlasında bulunur. Kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasındaki genetik materyalin dengelenmiş translokasyonu sonucu oluşur. Kromozom 9'un q34 bandında kırılma, sellüler onkogenin ABL1 (c-ABL)'in, kromozom 22 üzerindeki ana kırılma bölgesine (BCR) translokasyonu ile sonuçlanır. Bu translokasyon, BCR'nin 5' bölümü ile ABL'nin 3' bölümünün uç uca gelmesine izin verir ve yeni bir hibrid onkogenin (BCR-ABL) üretimine neden olur. Bu da KML hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla beraber apoptozisinde

azalmayı tetikler. Böylece KML hücrelerinin normal hematopoezi baskılanır ve diğer normal hücrelere göre büyüme avantajı kazanır. Ph (+) ALL'de, BCR'deki kırılma, minor BCR bölgesinde, yani proksimaldedir ve daha küçük füzyon gen, mRNA, BCR-ABL ($p190^{BCR-ABL}$) onkoproteini oluşmasına yol açar. Bir diğer BCR-ABL onkoproteini ise sessiz KML dönemiyle ilişkili olup, BCR bölgesinin distalinde oluşan kırık nedeniyledir ve $p230^{BCR-ABL}$ hibrid onkoproteininin üretilmesiyle sonuçlanır (193).

2.4.4.1.4. Sitogenetik

t(9;22)(q34;q11.2) anormalliklerinin varlığı KML tanısını destekler. KML şüphesi olan hastalarda Ph kromozomu saptanamazsa, hibrid BCR-ABL geninin araştırmak için moleküler çalışmalar yapılmalıdır. Ph(-) olan, KML'nin tipik morfolojik tablosunun olduğu hastaların yaklaşık %25-30'unda BCR-ABL hibrid proteini bulunur. Hastaların %10-15'i ek kromozomal değişikliklere sahiptir (Y kromozom kaybı, trizomi 8,22q'daki materyalin ek kaybı, çift Ph) (193).

2.4.4.2. Kronik Miyelomonositik Lösemi

Klinik ve morfolojik prezentasyonuyla yüzeyel olarak KML'ye benzemesine rağmen, KMML, klinik, terapötik, prognostik görünümü nedeniyle ayrı bir tablo olarak düşünülmelidir. KMML, eritroid-megakaryositik serilerde displazi ve myelomonositik serinin proliferasyonu ile ortaya çıkan hibrid tablodur. KMML'li hastalar, KML'li hastaların çoğundan daha yaşlıdır (ortalama yaş 65-70). KMML'li hastalardaki sitogenetik bulgular, normal veya Ph kromozomu dışındaki bulgular ve ek kromozom 8 anormalliklerini içerir. KMML'li hastalar %40-60 oranında RAS mutasyonuna sahiptirler (193, 194).

2.4.4.3. Saçlı Hücreli (Hairy Cell) Lösemi

Saçlı hücreli lösemi (HCL), sık görülmeyen, sessiz bir B hücreli lösemi türüdür (tüm lösemilerin %1-2'si). Tanıda ortalama yaş 50'dir ve 4:1 oranında erkek hakimiyeti görülür. HCL'de hücrenin kaynağı immünglobulin gen yeniden düzenlenmesinde ağır ve hafif zincirlerin gösterilmesiyle dökümente edilen, B lenfositlerdir. Bu hücreler CD10, CD20, CD11C, CD103, FMC7 ve CD22 eksprese eder ama CD21, CD5, CD10

veya CD23 eksprese etmez. HCL'de diğer hematolojik malignitelerde de saptanabilen farklı sayıda sitogenetik anormallikler bildirilmiştir. İmmün disfonksiyon, HCL'de geniş oranda bulunur. Monositopeni hemen her zaman bulunur. B ve T lenfosit sayısı da azalmıştır (193, 194).

2.4.4.4. Kronik Lenfositik Lösemi

2.4.4.4.1. Tanım

Kronik lenfositik lösemi (KLL), B hücre kaynaklı monoklonal lenfositlerin birikimiyle karakterize olan bir neoplazmdır. Bu hücreler, kemik iliğinde, lenf nodlarında, karaciğer, dalak ve nadiren diğer organlarda birikir (193, 194).

2.4.4.4.2. Epidemiyoloji

KLL, batı dünyasında en sık görülen lösemidir (tüm vakaların üçte biri) ve KML'den daha sıktır. Hastalık nadiren, 30 yaşın altında meydana gelir. KLL'li hastaların çoğu 60 yaş ve üzerindedir. KLL'nin insidansı zaman içerisinde artar. 80 yaşında insidans oranı, yıllık 100.000'de 20'dir. Erkek/kadın oranı yaklaşık 2:1'dir. KLL'nin nedeni bilinmemektedir. İyonize radyasyon ve virüsler, KLL ile ilişkili değildir. KLL'de ailesel ilişki diğer lösemilerden daha sıktır. Hastaların 1. derece akrabalarında 2-4 kat artmış risk vardır ve KLL daha genç yaşta görülür. Benzen gibi kimyasalların kesin lökomojenik rolü KLL için tanımlanmamıştır (193, 194).

2.4.4.4.3. Patobiyoloji

KLL'de lösemi hücreleri, homojendir ve normal olgun lenfosit görünüşüne sahiptir. Bununla birlikte klonalite, immünglobulin gen yeniden düzenlenmesinin varlığı ile dökümente edilebilir. Hücreler, düşük yoğunlukta monoklonal yüzey immünglobulinlerini (SmIg; genellikle IgM±IgD) eksprese ederler. Aynı zamanda vakaların tamamı, tüm B hücre antijenleri, CD19, CD20, CD23 ve CD24'ü ve vakaların %75'iden fazlası ise CD21'i (EBV reseptörü ve komplemanın C3D komponentini içerir) eksprese ederler. B hücre antijenlerine ek olarak, KLL hücreleri CD5'i de eksprese ederler. CD25 antijeni, vakaların %25'inde pozitiftir. T hücre fonksiyonu KLL'de her zaman anormaldir. Tanıda T hücreleri artmıştır ve CD8'de nispeten daha

fazla olan artışla beraber, CD4/CD8 oranı da sıklıkla tersine dönmüştür. CD4/CD8 oranı hastalık progrese olduğunda ve tedavi sonrasında azalır. Antijenlere gecikmiş hipersensitivite reaksiyonu görülür. KLL hücreleri tarafından üretilen faktörler, T hücre fonksiyonlarında anormalliklere sebep olurlar (194).

2.4.4.4.4. Genetik

Standart sitogenetik analiz,vakaların %40-50'sinde, anormallikleri belirler ama KLL hücreleri düşük mitotik aktiviteye sahiptirler. FISH ile, anormallikleri saptama olasılığı, %80'lere çıkar. 13q delesyonu, en sık görülen anormalliktir. Diğer anormallikler, 11q delesyonu (%15-20), trizomi 12 (%15-20) ve 17p delesyonudur (%5-10). 17p delesyonu, hastalık progresyonu ve tedavi sonrası nüks durumunda sıklıkla artar ve kötü prognozla ilişkilidir ama 13q delesyonu eğer tek anormallik olarak bulunuyorsa iyi prognozla ilişkilidir (194).

2.4.4.5. Diğer Kronik Lenfositik Lösemiler

Ayırıcı tanılarında klinik özelliklerin yanında, büyük oranda histopatolojik ve daha spesifik olarak immün fenotipik kriterler değerlendirilir.

2.4.4.5.1. Prolenfositik Lösemi (PLL)

Nadir görülen bir hastalık olan PLL (KLL insidansının %5'den azı), lökosit sayısının %10-90'ında belirgin nükleuslu prolenfositlerin bulunması ile B hücre KLL'den ayrılır. Bu hücreler, FMC-7 ekspresse ederler. Erkek/kadın oranı 4:1'dir ve tanıda ortanca yaş 70'dir. Sağkalım KLL'ye nazaran az olup, tedavi cevabı da nispeten kötüdür. Monoklonal pik tipik olup, IgG veya IgA yapısındadır ve vakaların üçte birinde bulunur. PLL'de t(11;14)(q13;q32) gibi bazı karyotipik anormallikler bildirilmiştir. 11q ve 17p delesyonları, B hücreli PLL'de KLL'ye nazaran daha sıktır. TP53 onkogenindeki anormallikler, B hücreli PLL vakaların %75'inde bulunur. PLL vakalarının beşte biri, bir T hücre fenotipi ekspresse ederler (193, 194).

2.4.4.5.2. Küçük Lenfositik Lenfoma (SLL)

KLL ile histopatolojik ve immünfenotipik özellikleri paylaşır, sadece periferik kanda lenfositozun yokluğu ile ayrılır. SLL'de kemik iliğinde %30'dan fazla olabilir ya da olmayabilir. LFA-1 adezyon molekülü, KLL hücrelerine kıyasla SLL hücrelerinde daha fazla ekspresse edilirler. Hücreler plazmositoid görünüme sahiptir, CD38 ve PCA-1 pozitiftir ve sitoplazmik Ig, SmIg daha fazla görülür. Monoklonal IgM piki, vakaların hemen hemen tamamında bulunur ama KLL'de bu durum nadirdir (194).

2.4.4.5.3. T Hücreli Lösemiler

Sezary sendromunun belirgin klinik özelliği (mikozis fungoides ile ilişkili bir $CD4^+$, T hücreli malign hastalık), düşük sayıda dolaşan monoklonal T hücreleri ile birlikte kronik eksfolyatif eritrodermidir. KLL'den klinik ve laboratuar olarak ayırıcı tanısı zor değildir. Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma, bir retrovirüsle (HTLV-1) ilişkilidir ve Japonya ve Karayiplerde sık olarak görülür. Sıklıkla hiperkalsemi ve litik kemik lezyonları ile prezente olurlar. T büyük granüler lenfoproliferatif hastalıkta, genellikle $CD2^+$, $CD3^+$, $CD8^+$ ve $CD16^+$ (t-süpresör) fenotipi vardır (T-gamma hücreleri) (193, 194).

2.4.5. Hematolojik Maligniteler ve Mitokondri Ilişkisi

Son yıllarda, mtDNA mutasyonlarının yaş-ilişkili birikimi stem hücrelerini de kapsayan somatik hücrelerin büyük kısmında gözlemlenmiştir. Bazı mtDNA mutasyonları klonal kemik iliği hastalıklarında tespit edilmiştir ve bunların mitokondriyal disfonksiyona neden olabileceği ve böylece hastalık fenotipine katkı sağlabileceği düşünülmüştür (5). Pearson sendromlu hastaların tamamında bulunan mtDNA delesyonlarının varlığı; mtDNA defektlerinin, sideroblastik fenotip ve diğer myelodisplastik özelliklerin patogenezinde rol oynayabileceği ile ilgili güçlü bir ipucu olarak kabul edilmiştir. Ancak henüz, mtDNA mutasyonlarının hematolojik kanserlerdeki fonksiyonel önemi kesin olarak açıklanamamış ve bu durumla ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır (5). Boultwood ve arkadaşları (196) yapmış oldukları bir çalışmada; 25 AML hastası ve 20 kronik granulositik lösemi hastasında mtDNA'nın hacminin 2-80 kat kadar artmış olduğunu ve bu artışın hastaların remisyon dönemlerinde normal düzeylerine indiğini göstermişlerdir. Bu artış muhtemelen her hücredeki artan mtDNA kopya sayısı nedeniyle olmaktadır. Linnartz ve arkadaşları

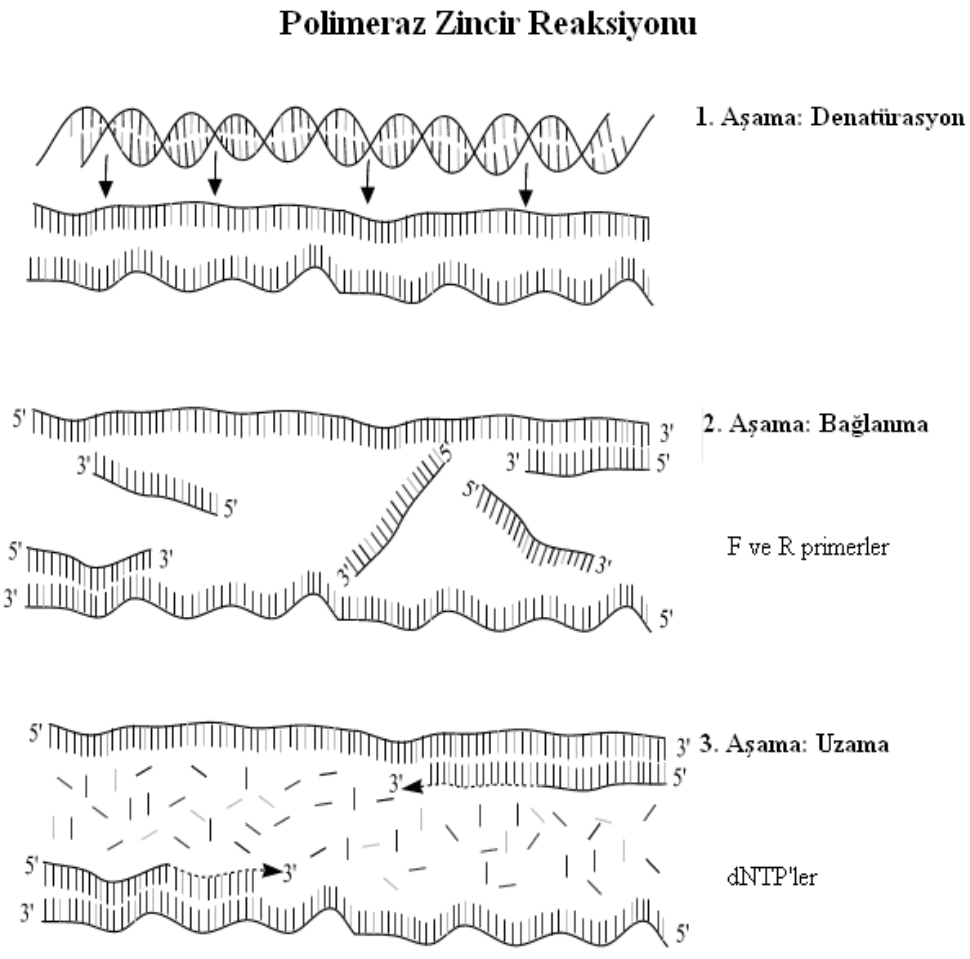
(180), mtDNA'nın D-loop bölgesi varyasyonlarının lösemik blast fenotipindeki, normal ya da displastik hücrelerin transformasyonundan sorumlu olabileceğini gözlemlemişlerdir. 1998'de, Ivanova ve arkadaşları 30 ALL hastasında RFLP-PCR yöntemiyle mtDNA mutasyonlarını taramışlar ve çeşitli varyasyonlar tespit etmişlerdir (197). Grist ve arkadaşları (198) ise, 22 yetişkin AML hastasının 8'inde ve 26 AML hastasının 15'inde mtDNA'nın D-loop bölgesinde çeşitli varyasyonlar tespit etmişlerdir. Sharawat ve arkadaşları (43), pediatrik yaş grubu 44 AML hastasının 35'inde mtDNA D-loop bölgesinde çeşitli varyasyonlar bulmuşlardır. Carew ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada (199), KLL hücrelerinin normal lenfositlere kıyasla daha yüksek oranda mitokondri içerdiğini ayrıca hücrelerin mitokondri sayısındaki artış ile in vitro ilaç duyarlılığındaki azalmanın anlamlı düzeyde korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Wulfert ve ark., yapmış oldukları çalışmada (5), 104 miyelodisplastik sendromlu hastanın %56'sında ve miyeloproliferatif hastalığı bulunan 36 hastanın %44'ünde, çoğunlukla transisyon mutasyonu olan heteroplazmik mtDNA mutasyonları ve polimorfizmler tespit etmişlerdir. Bu mutasyonlar ve polimorfizmler; kontrol bölgesi, tRNA ve rRNA'da yoğunlaşmışken, protein kodlayan genlerde düşük düzeyde saptanmıştır. He ve arkadaşları (200), inceledikleri akut ve kronik lösemili hastaların %40'ında lösemik hücre klonlarında geniş somatik mtDNA nokta mutasyonları tespit etmişlerdir. Shin ve arkadaşları (201, 202), sağlıklı yetişkin yaş grubunun granülositleri ile kemik iliği ve kan hücrelerinde mtDNA mutasyonlarınının yaş-bağımlı birikimini tespit etmişler ve bu çalışmalar sonucunda, somatik mtDNA mutasyonlarının yaş-bağımlı birikiminin kemik iliği progenitör hücrelerinde rölatif olarak yaygın olduğu sonucuna varmışlardır.

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genetik materyal ile çalışmada DNA'nın saflaştırılmasının yanı sıra analiz edilebilir konsantrasyona gelinceye kadar çoğaltılması (amplifikasyonu) gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri polimeraz zincir reaksiyonudur (Polymerase Chain Reaction, PCR). PCR, hücrede doğal olarak meydana gelen replikasyona benzer şekilde, istenilen bir DNA parçasının kopyalarının enzimatik olarak sentezlenmesini sağlayan, hızlı bir *in vitro* yöntemdir. Kopyalama, kalıp DNA üzerindeki hedef dizilerde kendilerine komplementer bölgelere bağlanan ve primer olarak adlandırılan oligonükleotit zincirleri tarafından yönlendirilir. PCR' de yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görür.

Yirmibeş-kırk döngü ile birkaç saat gibi kısa bir sürede istenilen DNA segmentinin milyarlarca kopyası elde edilebilir. DNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi, hedef DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bazı bilgilerin bilinmesini gerektirmektedir.

Bir PCR döngüsü denatürasyon, annealing (bağlanma), ekstensiyon (uzama) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Bir döngü 25-40 kez tekrar edilerek DNA amplifiye edilir. Denatürasyon, yüksek sıcaklık uygulanarak çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale getirildiği aşamadır (90-95°C'de). Bağlanma aşamasında sıcaklık 50-70 °C arasında bir değere düşürülür ve böylece primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır (Şekil 2.9.). Uzama aşaması, yüksek sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz (genelde taq polimeraz enzimi kullanılır) tarafından hedef bölgenin sentezlenmesini kapsar. Bu yöntemin reaksiyon karışımı içerisinde temel olarak DNA örneği, dört deoksiribonükleozit trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), DNA polimeraz, hedef DNA'ya uygun iki primer, $MgCl_2$ ve tampon bulunmaktadır.



Şekil 2.9. Polimeraz zincir reaksiyonu

2.6. Restriksiyon Enzimleri

Restriksiyon enzimleri (RE), DNA üzerinde özel bir diziyi özgül olarak tanıyan ve DNA'yı bu diziler içindeki veya bu dizilere yakın, özgül bir bölgeden kesen endodeoksiribonükleazlardır. Restriksiyon enzimleri, tip I, tip II, tip III ve tip IV olmak üzere dört sınıfa ayrılır (Tablo 2.13.)(203). DNA üzerinde belli dizileri tanıyarak DNA'yı bu diziler içindeki özgül bölge üzerinden kesenler; tip II restriksiyon enzim sınıfıdır. RE sınıflarının diğer üyeleri, dizi üzerine ya daha az tanıma özgüllüğü gösterirler ya da tanıma dizisinin dışında rastgele kesim işlemini gerçekleştirirler (203-205). Bundan dolayı RFLP tekniğinde tip II sınıfı RE dışındakiler kullanışlı olmayıp pratikte tip II sınıfı RE kullanılması uygundur.

Tablo 2.13. Restriksiyon enzimleri sınıflandırma

Tip I Restriksiyon Enzimleri	Hem metilasyon hem de modifikasyon yapabilen iki fonksiyonlu hetero-oligomerik enzimlerdir. Kesim işleminde belirleyici faktör enzimin metilasyon aktivitesidir.
Tip II Restriksiyon Enzimleri	4-8 nükleotid uzunluğundaki palindrom bir diziyi tanıyıp kesim yaparlar. Restriksiyon ve modifikasyon aktiviteleri birbirinden bağımsızdır ve kesimin gerçekleşmesi için Mg^{+2} 'ye; modifikasyonu için S-adenozil-metiyonine gereksinimleri vardır.
Tip III Restriksiyon Enzimleri	Tip I RE'ye benzer. Tek bir DNA zincirinin modifikasyonu (hemimetilasyon) gerçekleşir. Hemimetilasyondan dolayı kesime karşı eksik koruma gösterirler. Restriksiyon ve modifikasyon aktiviteleri ayrı enzimler tarafından gerçekleştirilir.
Tip IV Restriksiyon Enzimleri (Homing Endonukleazlar)	Bu enzimler en son tanımlanan restriksiyon enzim gruplarıdırlar ve DNA'nın yeniden yapılandırılmasında fonksiyonel oldukları bilinmektedir. Diğer RE'lerden farklı olarak, bunlar daha az tanıma özgüllüğü göstermekte ve tanıma bölgelerindeki tek baz değişimini tolere edebilmektedirler.

2.6.1. Restriksiyon Enzimlerinin Doğal Fonksiyonu

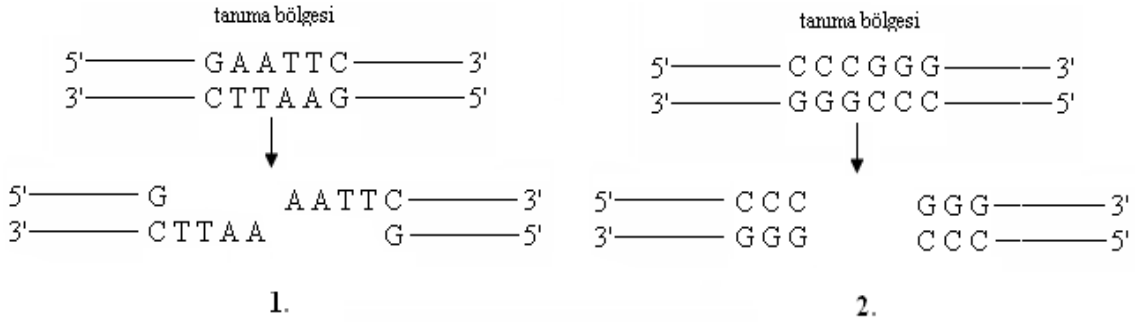
Restriksiyon enzimleri, bakterinin savunma mekanizmasının bir parçası olarak rol oynar ve bakteri hücresi içine giren faj DNA'sı gibi yabancı DNA'ları parçalar ve onların aktivitelerini kısıtlar. Buna *"restriksiyon aktivitesi"* denir. Bakteri kendi

DNA'sını bu enzimlerin etkisinden restriksiyon endonükleazın tanıdığı nükleotit dizilerindeki bazı bazların metillenmesi yoluyla korur ve buna *"modifikasyon aktivitesi"* denir (206).

Restriksiyon enzimlerinin bağlandığı DNA üzerindeki özgül dizilere *"restriksiyon (tanıma) bölgesi"* denir ve DNA çift zincirindeki, çoğunlukla 4-6 baz çiftinden oluşan, özel baz dizilerini tanınması ise restriksiyon enzimlerinin özgüllüğünü belirler. DNA zincirinin birinde 5' yönünden 3' yönüne olan okunuş ile diğer zincirin 5' yönünden 3' yönüne olan okunuşunun aynı olduğu dizilere "*palindrom diziler*" denilmektedir. DNA üzerinde aynı dizileri tanıdığı halde, aynı yada farklı yerlerden kesim yapan RE'lerine "*izoşizomerler"* denir.

Star Aktivitesi: Restriksiyon endonükleazların özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden ayırt edebilme başarılarının optimal olmayan şartlarda oldukça değiştiği gözlemlenmiştir. Benzer bölgeleri kesme işlemine bir enzimin star aktivitesi denir. Bu durum moleküler çalışmalarda oldukça önemli ve çalışmanın başarısında belirleyici olduğundan enzimin star aktiviteye sahip olup olmadığı bilinmelidir. Enzimlerin star aktivitesini artıran parametrelerin en önemlileri pH, Mg^{+2}, metal iyonlarının varlığı (özellikle Mn^{+2}), gliserol ve etanol gibi maddelerin ortamda bulunması ve kesilen DNA ile enzim oranı arasındaki ilişkidir (207).

Kesim Ürünü: RE ile kesim sonucunda küt veya yapışkan uçlu ürünler oluşur (208). Bazı RE, DNA molekülünün iki zincirini farklı noktalardan keserek birbirinin tamamlayıcısı tek zincirli kuyruklar meydana getirir. Bu tek zincirli uçlar kendilerine komplementer bir uçla hemen birleşme eğilimi gösterdiği için *"yapışkan uçlar"* olarak tanımlanırlar (şekil 2.10.'da 1 nolu ürün) ve bu rekombinant DNA teknolojisinde RE'leri kullanışlı kılan bir özelliktir. Bazı RE ise DNA molekülünün her iki zincirini aynı noktadan karşılıklı (düz) keserek kör uçlu DNA parçaları meydana getirir (şekil 2.10.'da 2 nolu ürün).



Şekil 2.10. Restriksiyon enzimi kesim ürünleri (1.şekil yapışkan uç oluşumunu, 2. Şekil kör uç oluşumu gösteriyor)

2.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Bir popülasyonda mevcut olan genetik çeşitlilik olan polimorfizmler, bir restriksiyon enziminin kesim bölgesinin yok olmasına ya da restriksiyon enzimi yeni bir kesim bölgesinin oluşmasına neden olduğunda kolaylıkla saptanabilirler. PCR ürünlerinin analizinde değişik moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu tekniklerden biri, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimine dayalı restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) analiz yöntemidir.

PCR ürünlerinin uygun reaksiyon şartlarında restriksiyon enzimi ile muamele edilmesi sonucunda farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşur. Bu DNA parçaları jel elektroforezi yöntemiyle birbirlerinden ayrılabilirler. Restriksiyon parçalarının jeldeki sayısı ve göç paternlerine göre polimorfizm tespit edilir.

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA dizisinin kesim noktalarındaki baz değişimlerinin saptanmasını sağlayan RFLP yönteminden sadece polimorfizmlerin analizinde değil, aynı zamanda kalıtsal hastalıkların tanısı, genom haritalama, kriminal amaçlı kullanım ile ebeveyn ve akrabaların tespiti alanlarında da faydalanılmaktadır.

2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Moleküler biyolojinin en temel bileşenleri arasında yer alan jel elektroforezi tekniği, bir elektriksel alandaki moleküllerin sahip oldukları net elektrik yüklerine göre farklı hareket etmeleri prensibine dayalıdır. Nükleik asit parçalarının tanımlaması, saflaştırılması ve ayrıştırılmasında kullanılan en yaygın yöntemdir. DNA moleküllerinin elektroforezinde genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel kullanılır. Agaroz, kırmızı bir alg türüden izole edilen lineer bir polisakkarittir. Agaroz geri dönüşümlü olarak sıcak suda çözünür ve soğutuldugu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı olusur. Elektroforez aşamasında hazırlanan jelin konsantrasyonu DNA parçacıklarının ayırma gücünü de etkilemektedir. Jelin içerisinde, DNA moleküllerinin girip hareket ettiği mikroskobik porlar mevcuttur. Jelin konsantrasyonu arttıkça porların çapı küçülürken, konsantrasyon azaldıkça porların çapı artmaktadır. Jelde uzunlukları 200 baz çifti (bç) ile 50 kilo baz (kb) gibi oldukça geniş aralıkta değişebilen DNA parçaları tanımlanabilmektedir. Agaroz konsantrasyonu (%0,5-3,0 gibi) değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun sekilde yürümesi sağlanabilir. DNA molekülleri, proteinler ve diğer pek çok biyomoleküller belirli bir elektriksel yük taşırlar. DNA molekülü yapısında bulunan fosfat grubu nedeniyle negatif yüklüdür ve bu nedenle bir elektrik alanında, negatif kutuptan pozitif kutba doğru hareket eder. Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketleri, agaroz konsantrasyonu ile nükleik asit moleküllerinin boyutları ve şeklinden etkilenir. DNA örnekleri, jel içine yerleştirilen tarak vasıtasıyla oluşturulan kuyucuklar içerisine uygulanır. Jel daha sonra içine elektrodlar yerleştirilmiş ayırıcı tampon tankına bırakılır ve sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülür (209).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Hematoloji Anabilim Dalı arasında, etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, hematolojik malignite tanısı almış hastaların rutin işlemler için merkezimize gönderilmiş olan kan örneklerinin, rutin işlemler sonrası artan kısımları, hasta onam formları imzalatılarak toplanılmıştır. Hasta grubu 18-82 yaş aralığındaki 80 bireyden (KML tanısı almış 30 birey, AML tanısı almış 20 birey, KLL tanısı almış 18 birey ve ALL tanısı almış 12 birey) oluşmuştur. Kontrol grubu, herhangi bir hastalığı mevcut olmayan 18-80 yaş aralığındaki 80 bireyden oluşmuştur. Örneklerden mtDNA polimorfizm çalısmaları için DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA izolasyonu

- Kandan DNA izolasyon kiti (Qiagen)
- Etanol (MERCK)

PCR

- Taq PCR Master Mix Kit 250 Units (Qiagen)
- 5 adet primer takımı (Metabion)

Restriksiyon Enzimleri

- MboI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
- DdeI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
- RsaI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
- XbaI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
- BstNI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
- HaeIII Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
- MspI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)

Agaroz Jel Hazırlanması

- 6X gel loading dye (Fermentas)
- Agaroz (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Trizma bazı (Sigma)
- Ethidium bromide (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Marker DNA (Fermentas-O'rangeRuler 50 bp DNA ladder): Marker DNA fragment büyüklükleri; 1000- 500 - 450 - 400 – 350 – 300 – 250 – 200 – 150 – 100 – 50 bp (base pairs)

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Elektronik terazi (Precisa 160 M)
- Santrifüj (Nüve CN180, NF048)
- Otoklav (Tinget)
- Etüv (Heraeus)
- Mikrodalga fırın (Altus ALMD 17S)
- Çekerocak (Cromex)
- Spektrofotometre (WPA UU 1101)
- Hassas terazi (Shimatzu)
- pH metre (Jenway 3010)
- Soğutmalı santrifüj (Harrier 18/80)
- Otomatik pipetler 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Orange Scientific)
- Mikropipet uçları 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Labtips)
- 0,5 ml'lik ependorf tüpü (Axygen)
- 1,5 ml'lik ependorf tüpü (Axygen)
- 2 ml'lik ependorf tüpü (Axygen)
- Plastik pastör pipeti
- Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)
- Electrophoretic gel system (Bio-Rad Sub-cell GT)
- Thermal cycler (Bioer XP Cycler)
- Buzdolabı (Arçelik 26775)

- Yatay elektroforez sistemi (Biolab-wealtec elite 300 plus)
- Jel görüntüleme ve analiz sistemi (Syngene)
- Cam mezür
- Cam erlen mayer

3.1.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

10X TBE:

- 108 gr Trizma bazı
- 55 gr Borik asit
- 40 ml 0,5 M EDTA (pH:8,0)
- 800 ml distile suda ısıtılarak çözündürülüp ve total volüm distile su ile 1000ml'ye tamamlandı.

1X TBE;

- 10X TBE stok solüsyonundan ayrı bir kaba alınarak distile su ile 1/10 oranında seyretildi.

0,5 M EDTA:

- 186 gr EDTA 800 ml distile suda ısıtılarak çözündürülüp NaOH ile pH 8,0'e ayarlandı. Total volüm 1 L'ye tamamlandı.

Ethidyum Bromide:

- 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanıp alüminyum folyoya sarılarak +4 ^{0}C'de saklandı.

3.1.5. Primer Çiftlerinin ve Restriksiyon Enzimlerinin Seçilmesinde Yararlanılan İnternet Siteleri

1. http://www.mitomap.org/MITOMAP
2. http://insertion.stanford.edu/primers.html2.
3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251831106?report=genbank
4. http://tools.neb.com/NEBcutter2/cutshow.php?name=db897aaf-
5. http://www.mtdb.igp.uu.se

3.1.6. Mitokondriyal DNA Polimorfizmleri Çalışmasında Kullanılan Primer (Oligonükleotid) Çiftleri (F; forward, R; reverse):

Çalışmada kullanılacak olan Primer çiftleri (oligonükleotid), ticari olarak Metabion firmasına yaptırılmıştır. PCR çalışmalarında kullanılacak olan oligonükleotidler, insan mtDNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerlerin nükleotid sekansı tablo 3.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Mitokondriyal DNA polimorfizmi için kullanılan primer çiftleri. (F; forward, R; reverse)

1. Primer Çifti: Sitokrom b (korunmuş) Bölgesi Primerleri; Primer F1: 5′-ACA TCG GCA TTA TCC TCC TG-3′ 15087-15107 Primer R1: 5′-GAG GGC GTC TTT GAT TGT GT-3′ 15416-15436 Bu primerler, sitokrom b bölgesi içerisinde, 15087-15436. baz dizileri arasında 350 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedir.
2. Primer Çifti: ND5 (korunmuş) Bölgesi Primerleri; Primer F2: 5′-CTA ACA GGT CAA CCT CGC TTC C-3′ 13627-13648 Primer R2: 5′-AGA TAG GGG ATT GTG CGG TG-3′ 13936-13955 Bu primerler, ND5 bölgesi içerisinde, 13627-13955. baz dizileri arasında 328 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedir.
3. Primer Çifti: ND5 (korunmuş) Bölgesi Primerleri; Primer F3: 5′-GGT ATG CAC TTT TAA CAG TCA CC-3′ 412-435 Primer R3: 5′-ACT TGG GTT AAT CGT GTG ACC-3′ 901-921 Bu primerler, 12S rRNA bölgesi içerisinde, 412-921. baz dizileri arasında 510 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedir.
4. Primer Çifti: Sitokrom C Oksidaz I (korunmuş) Bölgesi Primerleri; Primer F4: 5′-ACC CCG ATG CAT ACA CCA-3′ 7231-7248 Primer R4: 5′-GGA CTA GGA AGC AGA TAA GGA AA-3′ 7678-7700 Bu primerler, sitokrom c oksidaz I bölgesi içerisinde, 7231-7700. baz dizileri arası 470 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedir.
5. Primer Çifti: Sitokrom C Oksidaz II (korunmuş) Bölgesi Primerleri; Primer F5: 5′-CTA ATC TTC AAC TCC TAC ATA CTT CC-3′ 7931-7956 Primer R5: 5′-GCC ATA CGG TAG TAT TTA GTT GG-3′ 8371-8393 Bu primerler, sitokrom c oksidaz II bölgesi içerisinde, 7931-8393. baz dizileri arası 463 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedir.

3.2. Metod

3.2.1. Kandan DNA Izolasyonu

Genomik DNA'nın tüm kandan elde edilmesinde Qiagen DNA-MİNİ KİT ile izolasyon prosedürü uygulanmıştır. DNA Mini kutusu ilk açıldığında, içindeki Buffer-1 (AW-1)'e 25 ml ethanol, Buffer-2 (AW-2)'ye 30 ml ethanol eklenip oda sıcaklığında saklandı. Bu arada, bir pipet yardımıyla 5.5 ml proteaz solvent içeriği, cam şişe içerisindeki liyofize proteaz içerisine eklendi.

Örneklerden DNA izolasyon çalışmasına başlarken, ısı bloğu 56°C'ye ayarlanıp, örnek sayısı kadar ependorf tüpleri ikişerli gruplar halinde numaralandırıldı. O günkü çalışmada kullanılacak örnek kadar spin kolon çıkarıldı. Örnekler vortexlenip, pipet uçları hazırlandı.

İzolasyonu yapılacak örneklerin her birisinden 200 µl alınarak, ilk ependorflara aktarıldı. Örneklerin üzerlerine 200'er µl Buffer AL (Lysis Buffer) ve 20'şer µl proteinaz K eklendi. Ependorfların kapakları kapatılıp, 15'er sn. vortexlenip, spin santrifüjlendi. Santrifüjlenen örnekler, ısı bloğunda (56°C'de), 15 dk inaktivasyona bırakıldı. 15 dk sonra, ısı bloğundan alınan örneklerin üzerlerine %100 ethanol'den 200 µl ilave edildi. Vortex ve spin santrifüj yapıldı. Daha sonra, ependorflardaki karışımların tamamı spin kolonlara dikkatli bir şekilde aktarıldı. Tüm spin kolonlar, 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Bu sırada yeni boş toplama tüpleri dizildi. Spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş toplama tüplerine yerleştirildi.

AW-1'den 500 µl filtre kısımlarına eklenip, 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüjden çıkan tüplerin alt kısımları atılıp, üstteki filtreler yeni boş toplama tüplerine yerleştirildi. Filtre kısımlarının üzerlerine 500'er µl AW-2 eklendi. Tüm spin kolonlar, 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Bu sırada yeni boş toplama tüpleri dizildi. Spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş spin kolonlara alındı. Tüm spin kolonlar, 13.000 rpm'de 1 dk daha santrifüj edildi. Bu sırada yeni boş ependorf'lar hazırlanıp, santrifüjden çıkarılan tüplerin altındaki toplama tüpleri atıldıktan sonra, yeni ependorflara filtre kısımları yerleştirildi. Tüplerin filtre kısımlarına 100 µl Elusyon Buffer (Buffer AE) ilave edildi. 20 dakikalık bir bekleme süresinin ardından tüm ependorflar santrifüje yerleştirilip, 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Ependorflar içerisinde toplanan sıvı DNA içermekteydi ve elde edilen DNA miktarının %15 kadar

artması için bu işlem bir sefer daha tekrar edildi. Yani; tüplerin filtre kısımlarına 100 µl Elution Buffer (Buffer AE) ilave edilip 20 dakikalık bir bekleme süresinin ardından tüm ependorflar, santrifüje dizilerek, 8000 rpm'de 1 dk çevirildi. Yapılan bu son santrifüj işleminden sonra bu kez üst (filtre) kısımları atılıp, alttaki sıvı içeren ependorfların kapakları kapatıldı. Örnekler spektrofotometrik ölçüm anına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonunun Kantitatif Ölçümü

İzole edilen DNA'lar 1/600 oranında dilüe edildi ve UV spektrofotometre cihazında DNA için spektrum aralığı 260 nm ve protein için 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçüldü. 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı.

260 nm OD (optical density) ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı, DNA'mızın protein ya da RNA ile kontamine olup olmadığı hakkında bilgi verir. A_{260}/A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenir. OD değerinin 2,0'nin üzerinde olması RNA kontaminasyonuna, 1,8'in altında olması da protein kontaminasyonuna işaret eder. PCR sonuçlarının sağlıklı çıkması için DNA'ların saf olması gerekmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere DNA'lar, DNA hidrasyon solüsyonu ile 50 ng/ µl olacak şekilde sulandırıldı. Her bir örnek için kontrol amaçlı 2 defa okuma yapılmış olup, bu yöntemle DNA örneklerinin saflığı kontrol edildi ve miktarı saptandı. DNA konsantrasyonu düşük bulunan örneklerde, istenilen değere ulaşılıncaya kadar, kan örneklerinden DNA elde etme işlemleri tekrarlandı.

3.2.3. PCR Ürünlerinin Elde Edilmesi

Her bir birey için 1 tane 0,5 ml'lik PCR tüpü etiketlenerek hazırlandı. Polimeraz zincir reaksiyonu için 50 µl'lik miks hazırlandı, bunun içinde her tüpe sırası ile 10 µl steril bidistile su, 14 µl PCR master miks, 5 µl DNA çözeltisi ve 1,5 µl ilgili bölgeye ait primer miks eklendi (eklenen primer miks, ilgili bölgeye ait forward ve revers primerlerinin her birinden 5 µl alınıp, 90 µl distile su ile dilüsyonu şeklinde hazırlanmıştır). Tüpler PCR cihazına dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyon cihazında tüpler Tablo 3.2.'teki programlara göre çalıştırıldı.

Tablo 3.2. PCR Protokolü

1. Primer çifti için PCR Protokolü	Program 1: 95 ^{O}C'de 5 dakika olmak üzere 1 siklüs Program 2: 95 ^{O}C'de 1 dakika 58 ^{O}C'de 1 dakika 72 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 35 siklüs Program 3: 72 ^{O}C'de 7 dakika olmak üzere 1siklüs
2. Primer çifti için PCR Protokolü	Program 1: 95 ^{O}C'de 5 dakika olmak üzere 1 siklüs Program 2: 95 ^{O}C'de 1 dakika 60 ^{O}C'de 1 dakika 72 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 35 siklüs Program 3: 72 ^{O}C'de 7 dakika olmak üzere 1siklüs
3. Primer çifti için PCR Protokolü	Program 1: 95 ^{O}C'de 5 dakika olmak üzere 1 siklüs Program 2: 95 ^{O}C'de 1 dakika 59 ^{O}C'de 1 dakika 72 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 35 siklüs Program 3: 72 ^{O}C'de 7 dakika olmak üzere 1siklüs
4. Primer çifti için PCR Protokolü	Program 1: 95 ^{O}C'de 5 dakika olmak üzere 1 siklüs Program 2: 95 ^{O}C'de 1 dakika 56 ^{O}C'de 1 dakika 72 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 35 siklüs Program 3: 72 ^{O}C'de 7 dakika olmak üzere 1siklüs
5. Primer çifti için PCR Protokolü	Program 1: 95 ^{O}C'de 5 dakika olmak üzere 1 siklüs Program 2: 95 ^{O}C'de 1 dakika 61 ^{O}C'de 1 dakika 72 ^{O}C'de 1 dakika olmak üzere 35 siklüs Program 3: 72 ^{O}C'de 7 dakika olmak üzere 1siklüs

3.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PCR'la elde edilen ürünlerin yürütülmesi için önce %1,8'lik agaroz jel hazırlandı. Hassas terazide 1,8 gr agaroz tartılarak cam erlen mayere aktarıldı ve agarozu çözdürmek için tampon solusyon olarak üzerine 100 ml 1XTBE eklendi. Bu karışım mikrodalga fırında, 500 Watt ısıda 4 dakika kaynatılarak hazır hale getirildi. DNA'nın jelde görüntülenmesi için de şeffaflaşan çözeltiye 5 µl ethidium bromide eklendi ve çözelti karıştırıcıdan alınarak yaklaşık 50^{O}C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra jel tablasına hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dikkatlice dökülüp üzerine tarak yerleştirildi ve polimerizasyon için oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. Tarağı alınan jel 1XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Kuyucuklara, her bir PCR ürününden 4 µl alınarak 0,4 µl DNA boyası (6 X gel loading dye) ile karıştırıldı, son kuyucuğa ise marker DNA 4 µl miktarda yüklendi ve agaroz jelde 120 V akımda katottan anoda doğru 20 dakika yürütüldü. Süre sonunda elektroforez tankından

çıkarılan jel, transillüminatör üzerine yerleştirilerek UV ışık altında görüntülendi, elde edilen görüntü cihazın kamerası vasıtası ile bilgisayara aktarıldı. İstenilen bant boyları elde edilmiş olan örneklerde PCR işleminin başarıyla sonuçlandığına karar verildi.

3.2.5. Restriksiyon Enzim Muamelesi

Çalışılacak polimorfik bölgeye ait, elde edilen PCR ürününe, uygun enzimiyle kesim yapıldı (Tablo 3.3.). Sekiz µl PCR ürünü, 9 µl distile su, 3 µl enzim bufferi ve 0,25-0,5 µl restriksiyon enzim karışımı 37°C'de 1 gece inkübe edildikten sonra, %3'lük agaroz jelde, 85 V akımda 3 saat yürütüldü. Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan jel, transillüminatör üzerine yerleştirilerek UV ışık altında görüntülendi, elde edilen görüntü cihazın kamerası vasıtası ile bilgisayara aktarıldı. Marker DNA baz alınarak bant büyüklükleri değerlendirildi.

Tablo 3.3. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve tanıma bölgeleri ve kesim noktaları

Restriksiyon enzimleri	Enzim tanıma ve kesim bölgeleri
MboI restriksiyon tanıma bölgesi	5′...▼GATC...3′ 3′...CTAG▲...5′
BstNI restriksiyon tanıma bölgesi	5′...CC▼WGG...3′ 3′...GGW▲CC...5′
DddeI restriksiyon tanıma bölgesi	5′...C▼TNAG...3′ 3′...GANT▲C...5′
XbaI restriksiyon tanıma bölgesi	5′...T▼CTAGA...3′ 3′...AGATC▲T...5′
RsaI restriksiyon tanıma bölgesi	5′...GT▼AC...3′ 3′...CA▲TG...5′
HaeIII restriksiyon tanıma bölgesi	5′...GG▼CC...3′ 3′...CC▲GG...5′
MspI restriksiyon tanıma bölgesi	5′...C▼CGG...3′ 3′...GGC▲C...5′

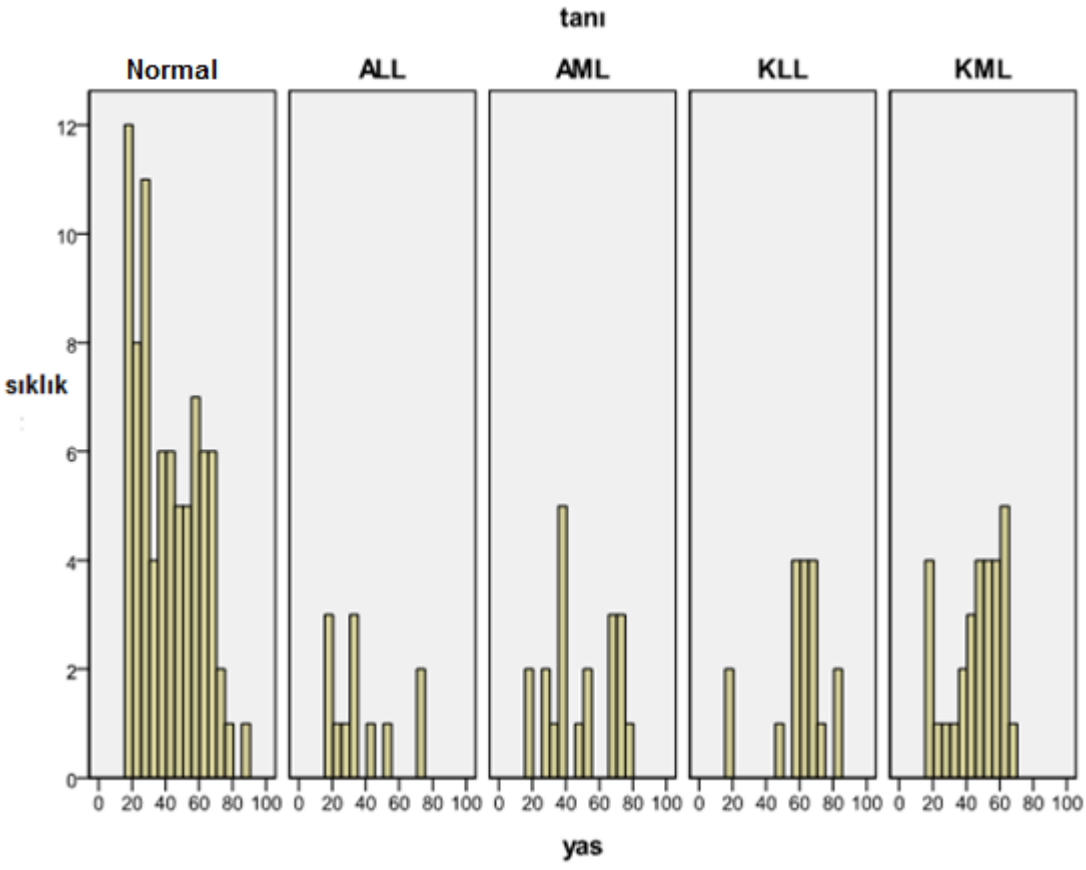
3.2.6. Kullanılan İstatistik Yöntemler Ve Bilgisayar Programları

• Tez çalışmasında hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki farklılık Ki-kare testi ile değerlendirildi. "*p*" değerinin 0,05'den küçük olması aradaki farkın anlamlı olması olarak tanımlandı. İstatistik hesaplamaları için SPSS 13.0 programı kullanıldı.

• Tez yazımı ve tabloların hazırlanmasında Microsoft Excel ve Microsoft Word programlarından yararlanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen ve hematolojik malignitesi mevcut 80 hastanın; 30 tanesi KML, 18 tanesi KLL, 20 tanesi AML, 12 tanesi ALL tanısı almıştı ve sağlıklı kontrol grubu 80 kişiden oluşmuştu. Toplam 80 hastanın yaşları 18-82 arasında değişirken, yaş ortalamaları 48,60±18,7 olarak hesaplandı. Hasta gruplarına göre yaş dağılımı ise; KML grubundaki 30 hastanın yaşları 19-65 arasında değişirken, bu grubun yaş ortalamaları 46,33±15,7, KLL grubundaki 18 hastanın yaşları 20-82 arasında değişirken, yaş ortalamaları 60,11±16,9, AML grubundaki 20 hastanın yaşları 18-75 arasında değişirken, bu grubun yaş ortalamaları 48,60±19,6, ALL grubundaki 12 hastanın yaşları 18-72 arasında değişirken, bu grubun yaş ortalamaları 37±19,6 olarak hesaplandı. Kontrol grubu 80 hastanın yaşları 18-87 arasında değişirken, yaş ortalamaları 41,79±18,5 olarak hesaplandı (Hastalık tipi ile yaş dağılımı arasındaki ilişki şekil 4.1'de gösterilmiştir).



Şekil 4.1. Hastalık tipi ile yaş dağılımı arasındaki ilişki

Toplam 80 hastanın 38'i kadın cinsiyette, 42'si erkek cinsiyette idi. Hasta gruplarına göre cinsiyet dağılımı ise; KML grubundaki 30 hastanın 15'i kadın cinsiyette, 15'i erkek cinsiyette, KLL grubundaki 18 hastanın 10'u kadın cinsiyette, 8'i erkek cinsiyette, AML grubundaki 20 hastanın 9'u kadın cinsiyette, 11'i erkek cinsiyette, ALL grubundaki 12 hastanın 4'ü kadın cinsiyette, 8'i erkek cinsiyette idi. Kontrol grubunda bulunan 80 kişinin 39'u kadın cinsiyette, 41'i erkek cinsiyette idi (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	KML	**KLL**	**AML**	**ALL**	**Tüm Hasta Grup**	**Kontrol Grup**	**Toplam**
Kadın	15	10	9	4	38	39	77
Erkek	15	8	11	8	42	41	83
Toplam	30	18	20	12	80	80	160
Yaş ort.	46,33±15,7 (19-65)	60,11±16,9 (20-82)	48,60±19,6 (18-75)	37±19,6 (18-72)	48,60±18,7 (18-82)	41,79±18,5 (18-82)	45,19±18,8 (18-87)

Not: Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1. Laboratuvar Bulguları

Hasta ve kontrol grubundan alınan örneklerin değerlendirilmesinde mtDNA'lardan 13 bölge çalışıldı. Elde edilen PCR ürünleri %2,5'luk agaroz jel kullanılarak, DNA marker rehberliğinde gösterildi. Aşağıdaki tabloda çalışılan bölge polimorfizmleri, kullanılan restriksiyon enzimleri ve restriksiyon enzim kesim alternatifleri genel olarak özetlenmiştir. (Tablo 4.3.).

Tablo 4.2. Çalışılan polimorfizmlerin restriksiyon enzimleri ve bant boyutları

Çalışılan Gen Polimorfizmi	**Kulanılan Primer çifti**	**Kullanılan Restriksiyon Enzimi**	**PCR Ürünü**	**Normal genotip**	**Heteroplazmik Genotip Ürünleri**	**Homoplazmik Polimorfik Genotip**
Sitokrom b-15315 (C>T)	1	*Mbo*I	350 bç	270 bç 76 bç	350 bç 270 bç 76 bç	350 bç
NADH dehydrogenase subunit 5- 13704 (C>T)	2	*Mva*I (*BstN*I)	328 bç	249 bç 79 bç	328 bç 249 bç 79 bç	328 bç
12S rRNA -740 (G>A)	3	*Mbo*I	510 bç	314 bç 182 bç	510 bç 314 bç 182 bç	510 bç
12S rRNA -680 (T>C)	3	*Dde*I	510 bç	268 bç 242 bç veya 268 bç 134 bç 108 bç veya 268 bç 144 bç 68 bç veya 268 bç 108 bç 68 bç 36 bç	510 bç ve 268 bç 242 bç veya 510 bç 268 bç 134 bç 108 bç veya 510 bç 268 bç 144 bç 68 bç veya 510 bç 268 bç 108 bç 68 bç 36 bç	510 bç
Sitokrom C Oksidaz I- 7319 (T>C)	4	*Dde*I	470 bç	470 bç	470 bç 381 bç 85 bç	381 bç 85 bç
Sitokrom C Oksidaz I- 7444 (G>A)	4	*Xba*I	470 bç	260 bç 210 bç	470 bç 260 bç 210 bç	470 bç
Sitokrom C Oksidaz II- 7660 (G>A)	4	*Mbo*I	470 bç	427 bç 43 bç	470 bç 427 bç 43 bç	470 bç
Sitokrom C Oksidaz II- 7975 (A>G)	5	*Mva*I (*BstN*I)	463 bç	419 bç 44 bç	463 bç 419 bç 44 bç	463 bç
tRNA lysine- 8310 (T>C)	5	*Dde*I	463 bç	379 bç 81 bç	463 bç 379 bç 81 bç	463 bç
Sitokrom C Oksidaz II- 8014 (A>G, A>T)	5	*Rsa*I	463 bç	380 bç 83 bç	463 bç 380 bç 83 bç	463 bç
Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C>G, C>T)	5	*Hae*III	463 bç	321 bç 142 bç	463 bç 321 bç 142 bç	463 bç
Sitokrom C Oksidaz II- 8113 (C>A), 8152 (G>A)	5	*Msp*I	463 bç	281 bç 182 bç veya 243 bç 182 bç 38 bç	463 bç ve 281 bç 182 bç veya 463 bç 243 bç 182 bç 38 bç	463 bç

ND5- 13704 (C/T) Polimorfizmi Sonuçları: Hematolojik malignitesi mevcut 80 hastanın 68'inde polimorfizm tespit edilememiş olup, 12 tanesi (%15) polimorfizmik bölgeye sahipti. Sağlıklı kontrollerde ise sadece 1 kişide (%1.3) polimorfizm tespit edilmişti. Polimorfizmler hasta grupta; 38 kadının 3'ünde ve 42 erkeğin 9'unda tespit edilmişken, kontrollerde polimorfizm gözlemlenen tek vaka erkek cinsiyette idi. Gözlemlenen polimorfizmler, hasta grupları arasında, 3 KML (%25), 1 KLL (%8.3), 6 AML (%50), 2 ALL (%16.7) şeklinde dağılım gösterdi.

Bu bölgenin polimorfizmleri hasta grubunda, sağlıklı kontrollere göre anlamlı bulunmuştur (Ki Kare: 10.1 p= 0.001). Hastalık gruplarının kendi arasında ve cinsiyete göre dağılımı ise homojen yani anlamsızdır.

Gözlemlenen polimorfizmlerin, hasta grupları arasındaki dağılımı tablo 4.4'de ve cinsiyetler arasındaki dağılımı Tablo 4.5.'te özetlenmiştir

Tablo 4.3. ND5- 13704 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmlerin hasta grupları arasındaki dağılımı.

TANI	ND5- 13704 Polimorfizmi		Toplam
	Normal	Polimorfik	
KML	27	3	30
KLL	17	1	18
AML	14	6	20
ALL	10	2	12
Toplam	68	12	80

Tablo 4.4. ND5- 13704 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmin cinsiyetler arasında dağılımı

Cinsiyet	ND5- 13704 Polimorfizmi		Toplam
	Normal	Polimorfik	
Kadın	74	3	77
Erkek	73	10	83
Toplam	147	13	160

Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) Polimorfizm Sonuçları: Hematolojik malignitesi mevcut 80 hastadan 65'i (%81.3) normal, 4'ü (%5) homozigot polimorfik, 11'i (%13.8) ise heteroplazmik polimorfik genotipe sahipti. Sağlıklı kontrollerde; 67 kişide (%83.8) normal genotip, 3 kişide (%3.8) homozigot polimorfik, 10 kişide (%12.5) ise heteroplazmik polimorfik genotip tespit edilmiştir. Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) polimorfizm çalışmasında, hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde dağılım homojendir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0.895). Ayrıca bu bölgede tespit edilen polimorfizmlerin cinsiyetlere göre dağılımı da homojendir.

Gözlemlenen polimorfizmlerin, hasta grupları ve cinsiyetler arasındaki dağılımı Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.5. Sitokrom C Oksidaz II- 8252 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmlerin hasta grupları arasındaki dağılımı

	Sitokrom C Oksidaz II- 8252 Polimorfizmi			**Toplam**
	Normal	**Homoplazmik**	**Heteroplazmik**	
KML	26	2	2	30
KLL	16	1	1	18
AML	15	1	4	20
ALL	8	0	4	12
Toplam	65	4	11	80

Tablo 4.6. Sitokrom C Oksidaz II- 8252 bölgesi polimorfizm çalışmasında polimorfizmlerin cinsiyetler arasında dağılımı

Grup		**Sitokrom C Oksidaz II- 8252 Polimorfizmi**			**Toplam**
		Normal	**Homoplazmik**	**Heteroplazmik**	
Hasta	**Kadın**	34	1	3	38
	Erkek	31	3	8	42
Hasta Toplam		65	4	11	80
Kontrol	**Kadın**	34	1	4	39
	Erkek	33	2	6	41
Kontrol Toplam		67	3	10	80

Çalışmamızda değerlendirilen diğer SNP noktaları olan; Sitokrom b-15315 (C/T), 12S rRNA -740 (G/A), 12S rRNA -680 (T/C), Sitokrom C Oksidaz I- 7319 (T/C), Sitokrom C Oksidaz I- 7444 (G/A), Sitokrom C Oksidaz II- 7660 (G/A), Sitokrom C Oksidaz II- 7975 (A/G), tRNA lysine- 8310 (T/C), Sitokrom C Oksidaz II- 8014 (A/G, A/T), Sitokrom C Oksidaz II- 8113 (C/A) ve Sitokrom C Oksidaz II- 8152 (G/A)'de hasta ve kontrol grubunun tamamında normal olarak gözlemlendi.

Hematolojik malignite tanısı almış olan tüm hastalar ve yaş, cinsiyet, tanı ve çalışmamızda tespit ettiğimiz Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) ile ND5- 13704 (C/T) polimorfizm bulguları Tablo 4.8'de özetlenmiştir.

Tablo 4.7. Hematolojik maligniteli hastaların yaş, cinsiyet, tanı ve polimorfizm değerlendirme sonucu

Hasta kod	**Hasta ad, soyad**	**Yaş**	**Cinsiyet**	**Tanı**	**Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) polimorfizmi**	**ND5- 13704 (C/T) polimorfizmi**
H1	A.Ç.	38	E	AML	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik
H2	A.S.	72	E	ALL	Normal	Normal
H3	A.K.	50	K	KML	Normal	Normal
H4	A.H.	61	K	KLL	Normal	Normal
H5	A.K.	57	K	KLL	Normal	Normal
H6	B.D.	18	E	ALL	Normal	Normal
H7	C.E.	61	E	KLL	Normal	Normal
H8	C.A.	58	E	KLL	Normal	Normal
H9	C.E.	33	E	ALL	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik
H10	D.D.	65	K	KML	Normal	Normal
H11	D.K.	26	K	KML	Normal	Normal
H12	E.İ.	52	E	KML	Normal	Normal
H13	E.Ö.	31	E	ALL	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik
H14	E.A.	21	E	ALL	Normal	Normal
H15	E.S.	55	K	AML	Normal	Normal
H16	E.Y.	28	E	AML	Normal	Normal
H17	F.A.	22	E	KML	Normal	Homoplazmik

Tablo 4.7. (devam)

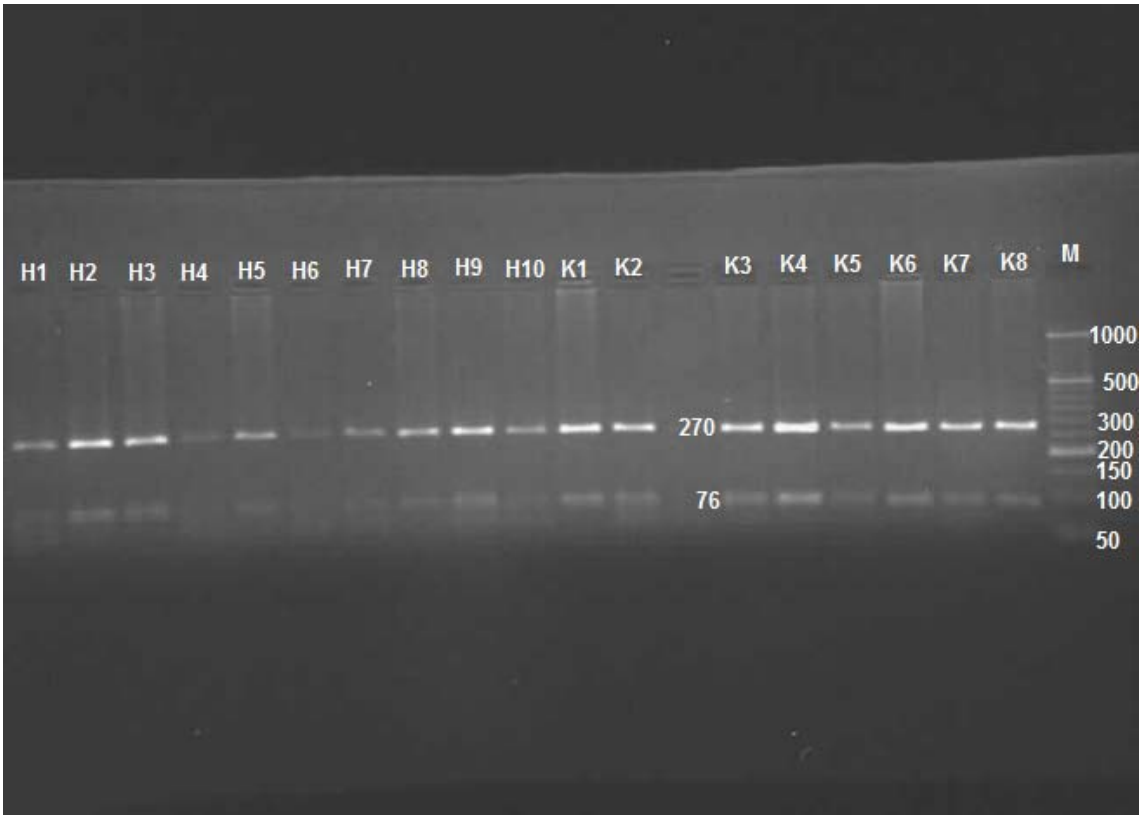
Hasta kod	Hasta ad, soyad	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) polimorfizmi	ND5- 13704 (C/T) polimorfizmi
						Polimorfik
H18	F.K.	20	K	KLL	Normal	Normal
H19	F.Y.	18	K	ALL	Normal	Normal
H20	F.H.	20	E	ALL	Normal	Normal
H21	F.S.	35	E	AML	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik
H22	G.B.	55	K	KML	Normal	Normal
H23	G.Ç.	64	K	KLL	Normal	Normal
H24	G.T.	40	K	AML	Normal	Normal
H25	G.D.	39	K	AML	Heteroplazmik Polimorfik	Normal
H26	G.K.	56	E	KML	Normal	Normal
H27	H.S.	37	K	KML	Normal	Normal
H28	H.E.	18	E	AML	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik
H29	H.F.	20	E	KML	Normal	Normal
H30	H.B.	18	E	AML	Normal	Homoplazmik Polimorfik
H31	H.B.	70	K	KLL	Normal	Normal
H32	H.A.	58	E	KLL	Homoplazmik Polimorfik	Normal
H33	H.K.	57	E	KML	Normal	Normal
H34	H.E.	65	E	KML	Homoplazmik Polimorfik	Normal
H35	H.Ç.	72	E	AML	Homoplazmik Polimorfik	Normal
H36	H.A.	59	K	KLL	Heteroplazmik Polimorfik	Normal
H37	H.Ç.	67	E	AML	Normal	Normal
H38	H.A.	48	K	AML	Normal	Normal
H39	İ.G.	81	E	KLL	Normal	Normal
H40	İ.B.	42	E	ALL	Heteroplazmik Polimorfik	Normal
H41	K.K.	64	K	KML	Normal	Normal
H42	K.A.	74	E	KLL	Normal	Normal
H43	K.U.	38	E	AML	Normal	Normal
H44	M.Y.	19	E	KML	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik

Tablo 4.7. (devam)

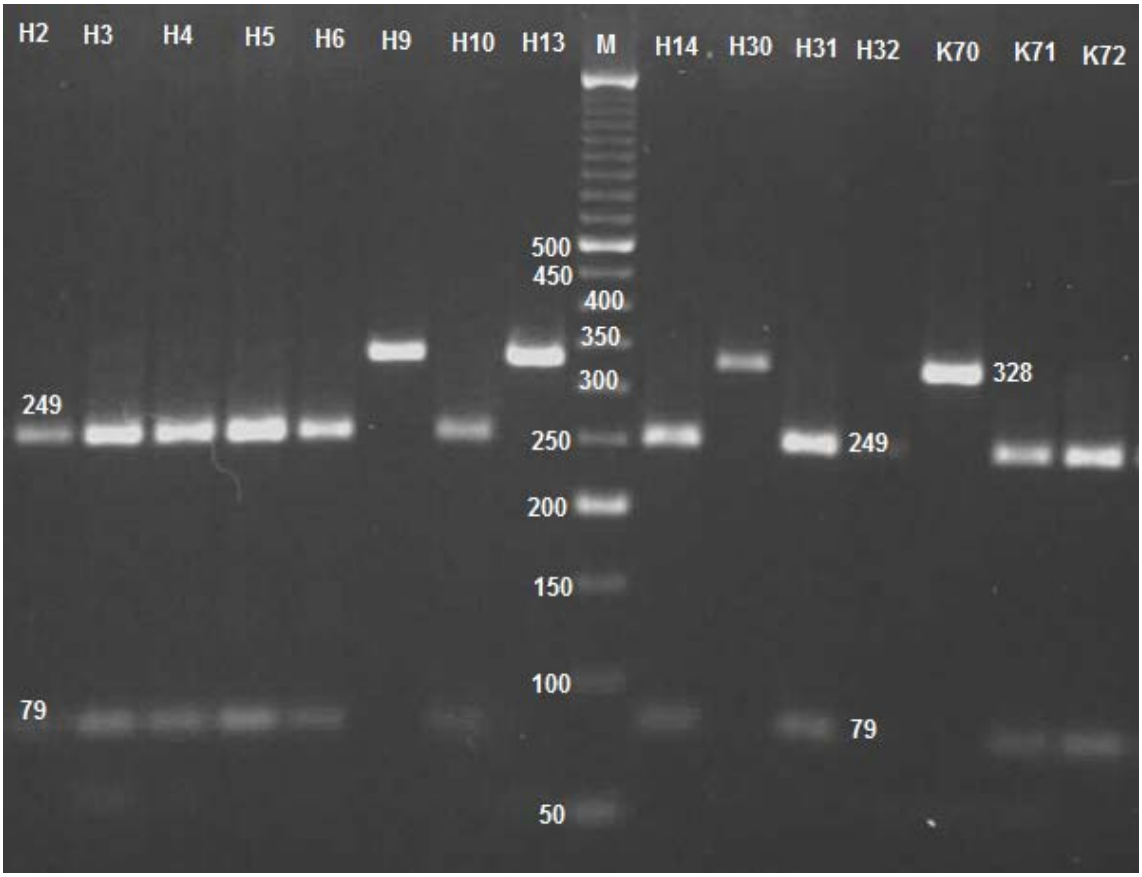
Hasta kod	Hasta ad, soyad	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) polimorfizmi	ND5- 13704 (C/T) polimorfizmi
H45	M.A.	67	E	KLL	Normal	Normal
H46	M.K.	37	K	AML	Normal	Homoplazmik Polimorfik
H47	M.Y.	70	K	KLL	Normal	Homoplazmik Polimorfik
H48	M.Ö.	42	K	KML	Homoplazmik Polimorfik	Normal
H49	M.K.	20	E	KLL	Normal	Normal
H50	M.T.	33	E	ALL	Heteroplazmik Polimorfik	Normal
H51	M.Ü.	67	E	KML	Normal	Normal
H52	M.B.	57	K	KML	Normal	Normal
H53	N.D.	82	K	KLL	Normal	Normal
H54	N.Ö.	72	K	ALL	Normal	Normal
H55	N.G.	65	E	KML	Normal	Normal
H56	N.E.	67	K	AML	Normal	Normal
H57	N.U.	40	K	KML	Normal	Normal
H58	Ö.E.	47	E	KML	Normal	Normal
H59	R.G.	52	K	AML	Normal	Normal
H60	R.D.	35	K	KML	Normal	Normal
H61	R.G.	18	E	KML	Normal	Normal
H62	R.A.	68	E	KLL	Normal	Normal
H63	R.Y.	29	K	ALL	Normal	Normal
H64	S.T.	64	K	KLL	Normal	Normal
H65	S.M.	71	E	AML	Normal	Normal
H66	S.Ü.	61	K	KML	Normal	Normal
H67	S.Ç.	48	K	KLL	Normal	Normal
H68	S.E.	55	K	KML	Normal	Normal
H69	S.A.	55	K	ALL	Normal	Normal
H70	S.U.	45	K	KML	Normal	Normal
H71	S.B.	27	E	AML	Normal	Homoplazmik Polimorfik
H72	S.Ö.	60	K	KML	Heteroplazmik Polimorfik	Homoplazmik Polimorfik
H73	S.H.	79	E	AML	Normal	Normal
H74	S.G.	55	E	KML	Normal	Normal

Tablo 4.7. (devam)

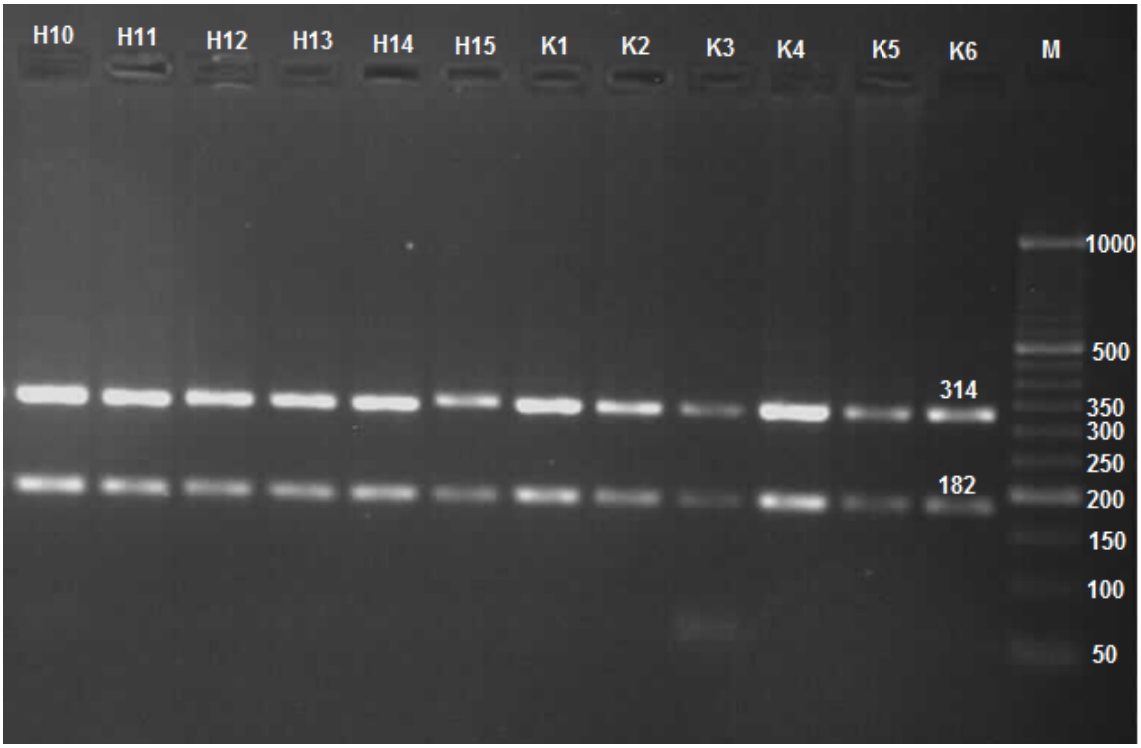
Hasta kod	Hasta ad, soyad	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C/G, C/T) polimorfizmi	ND5- 13704 (C/T) polimorfizmi
H75	S.Ç.	68	K	AML	Normal	Normal
H76	S.G.	47	E	KML	Normal	Normal
H77	S.A.	47	E	KML	Normal	Normal
H78	T.İ.	18	K	KML	Normal	Normal
H79	T.K.	43	E	KML	Normal	Normal
H80	T.K.	75	K	AML	Normal	Normal



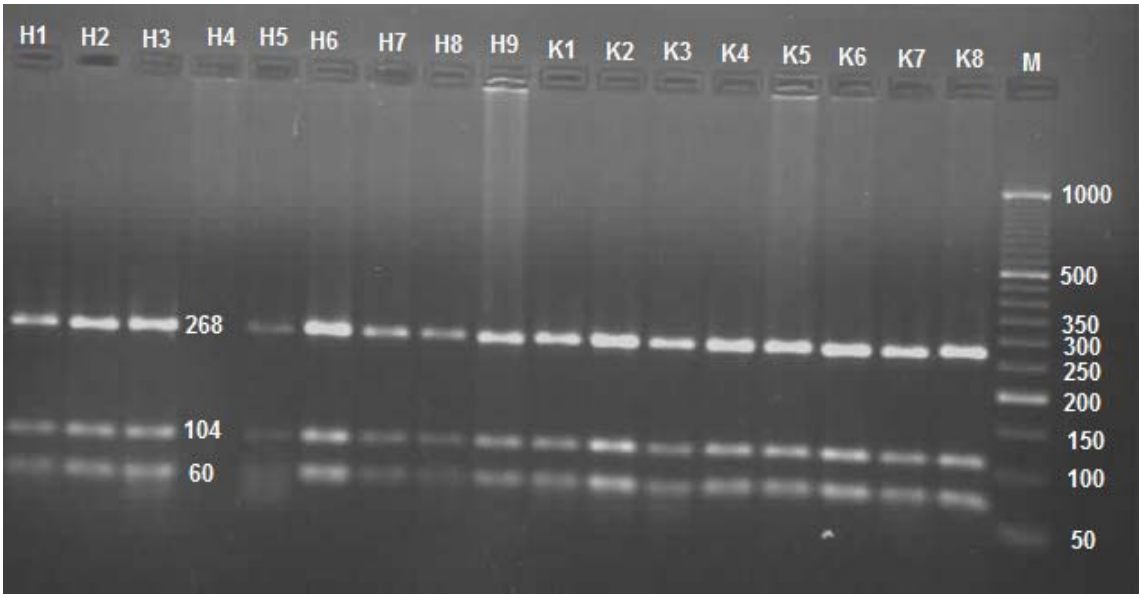
Şekil 4.2. 15315 C>T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom b (korunmuş) bölgesi 15315 C>T polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *MboI* ile muamele edildi. Kullanılan *MboI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü 270/274. baz dizileri arasından kesip, agaroz jelde 270 ve 76 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



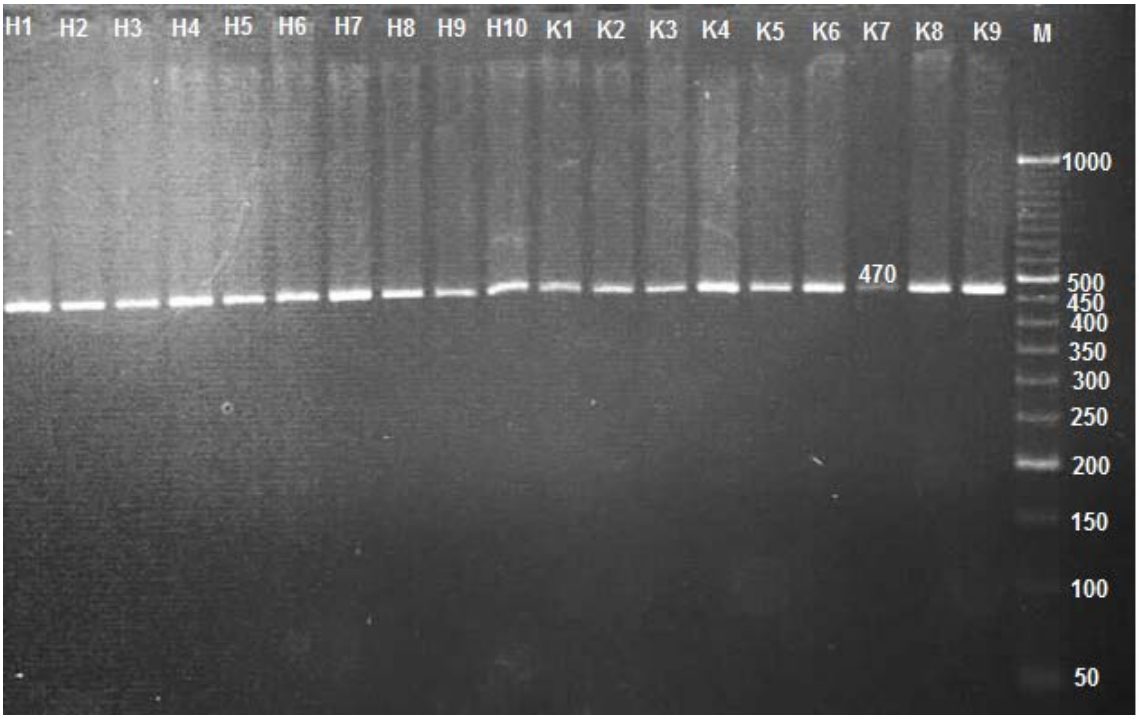
Şekil 4.3. 13704 C>T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H2, H3, H4, H5, H6, H9, H10, H13, H14, H30, H31, H32 numaralı hastalar ile K70, K71, K72 numaralı kontroller ve ortada marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). NADH dehidrogenaz subunit 5 (korunmuş) bölgesi 13704 C>T polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *MvaI (BstNI)* ile muamele edildi. Kullanılan *MvaI (BstNI)* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 79/80. baz dizileri arasından kesip, agaroz jelde 249 ve 79 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. H2, H3, H4, H5, H6, H10, H14, H31, H32, K71 ve K72 bu bölge açısından normal genotipe sahipken, H9, H13, H30 ve K70 polimorfik genotipe sahipti (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



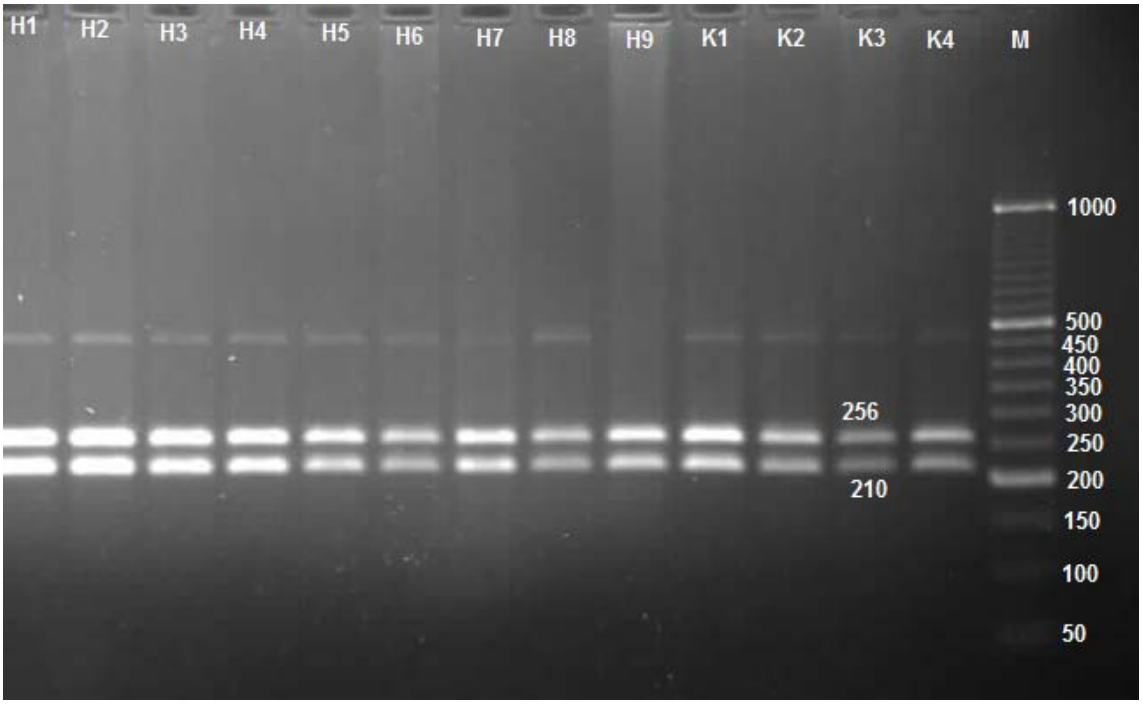
Şekil 4.4. 740 G>A polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H10, H11, H12, H13, H14, H15 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K5, K6 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). 12S rRNA (korunmuş) bölgesi 740 G>A polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *MboI* ile muamele edildi. Kullanılan *MboI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü 328/332. baz dizileri arasından kesip, agaroz jelde 182 ve 314 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



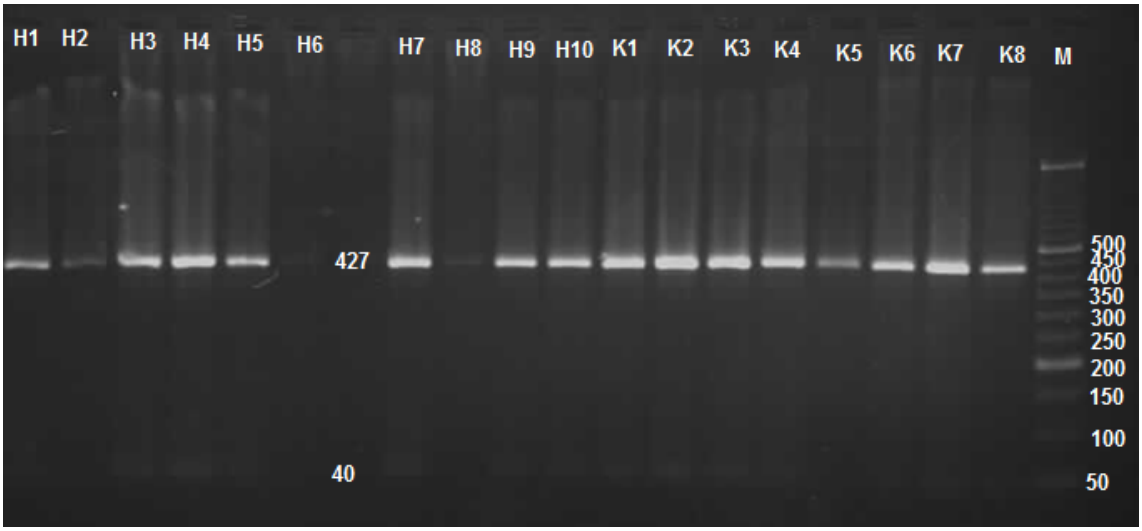
Şekil 4.5. 680 T>C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). 12S rRNA (korunmuş) bölgesi 740 G>A polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *DdeI* ile muamele edildi. Kullanılan *DdeI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 680/683. baz dizileri arasından kesti (*DdeI* enzimi; aynı zamanda 788/791. baz dizileri ve 854/857. baz dizileri arasından kesim yapar. Fakat bu alanların kesimleri değerlendirmeye alınmamıştır) ve agaroz jelde 268, 104 ve 60 bç'lik üç bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



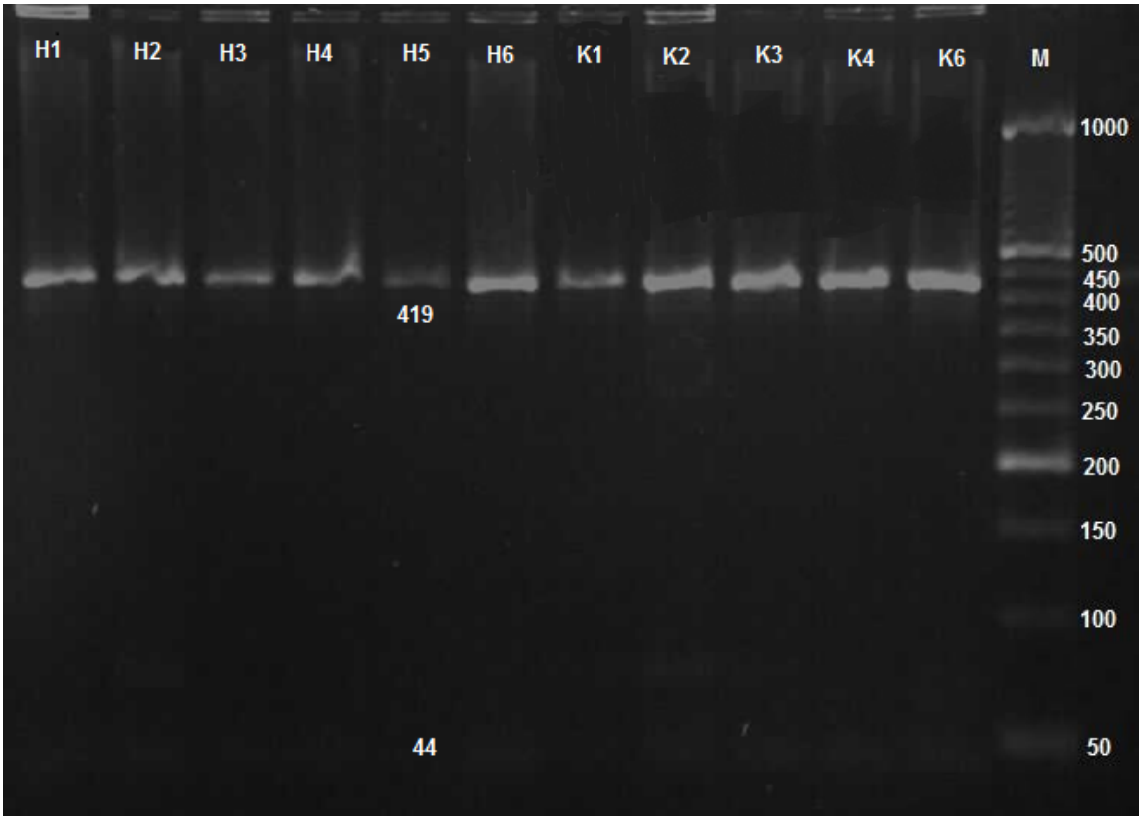
Şekil 4.6. 7319 T>C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz I (korunmuş) bölgesi 7319 A>G polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *DdeI* ile muamele edildi. Kullanılan *DdeI* enziminin; sadece polimorfik tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü 7316/7319. baz dizileri arasından kesmesi ve agaroz jelde 85 ve 381 bç'lik iki bant gözlenmesi beklendi. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



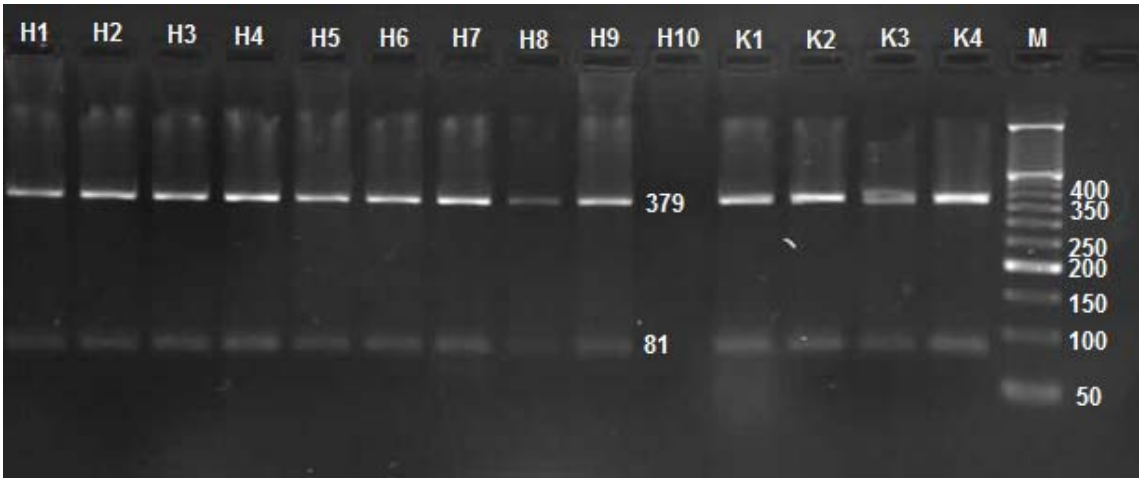
Şekil 4.7. 7444 G>A polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz I (korunmuş) bölgesi 7444 G>A polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *XbaI* ile muamele edildi. Kullanılan *XbaI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 7441/7444. baz dizileri arasından kesti ve agaroz jelde 256 ve 210 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



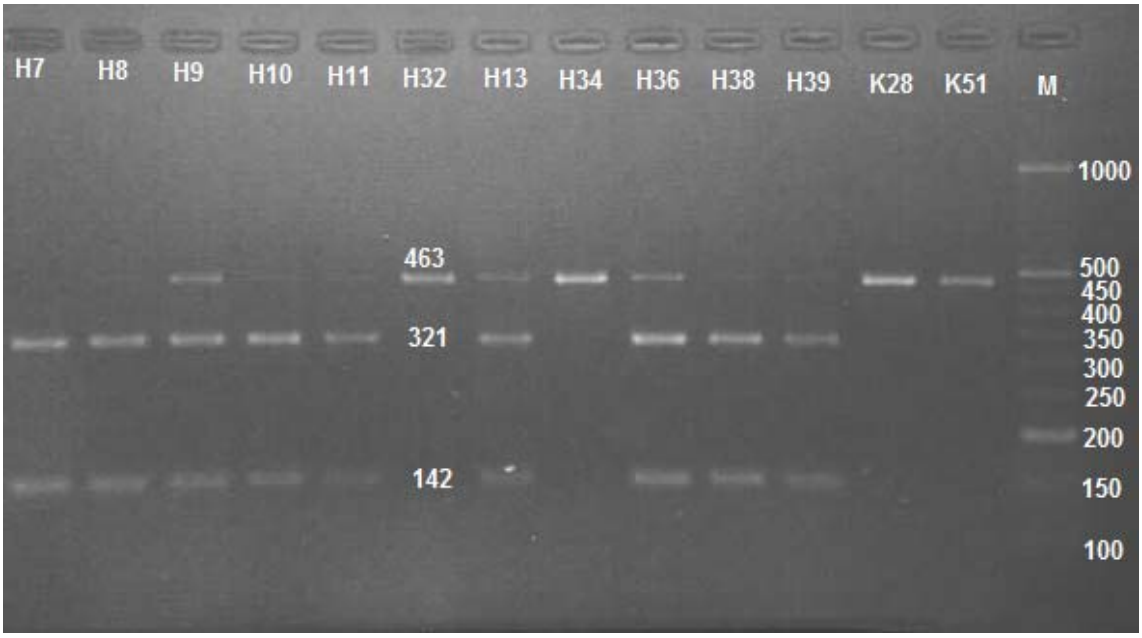
ŞEKİL 4.8. 7660 T>C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz I (korunmuş) bölgesi 7660 T>C polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *MboI* ile muamele edildi. Kullanılan *MboI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 7658/7662. baz dizileri arasından arasından kesti ve agaroz jelde 427 ve 40 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



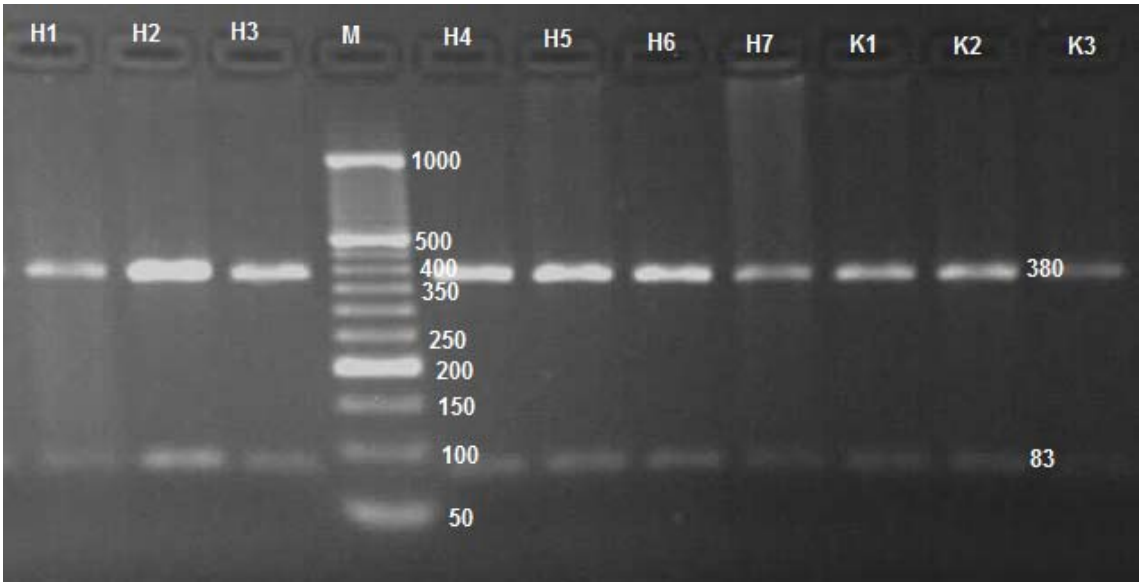
Şekil 4.9. 7975 A>G polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K6 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz II (korunmuş) bölgesi 7975 A>G polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *MvaI (BstNI)* ile muamele edildi. Kullanılan *MvaI (BstNI)* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 7975/7976. baz dizileri arasından kesti ve agaroz jelde 419 ve 44 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



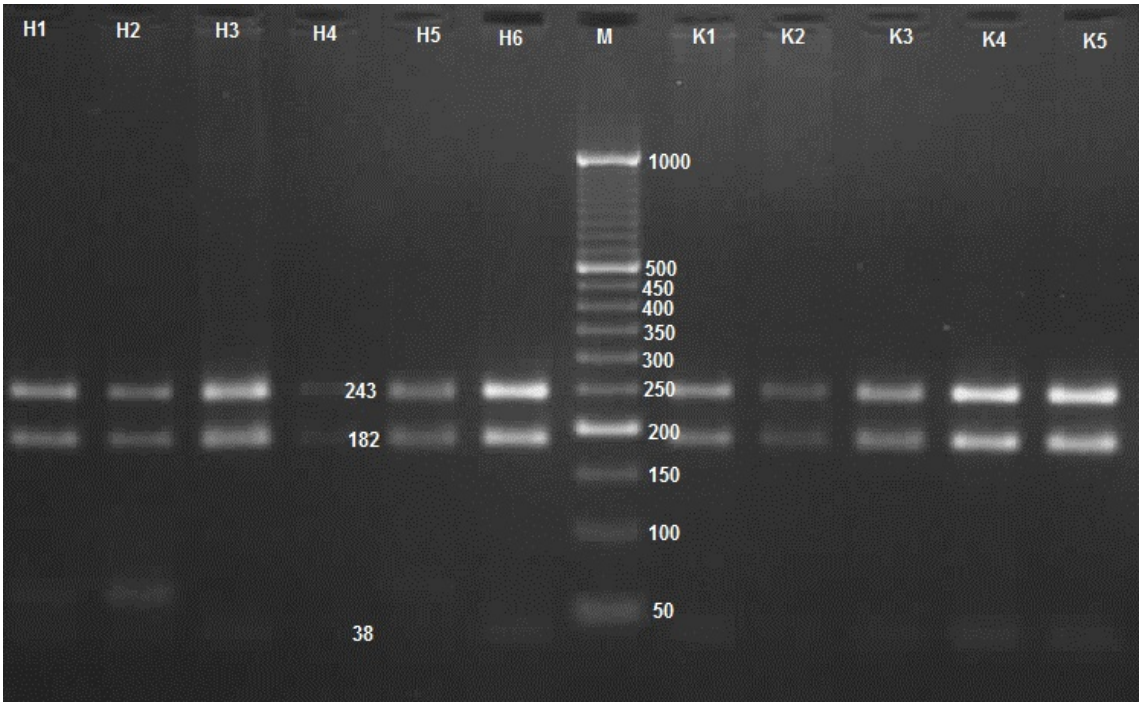
Şekil 4.10. 8310 T>C polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). $tRNA^{lizin}$ (korunmuş) bölgesi 8310 T>C polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *DdeI* ile muamele edildi. Kullanılan *DdeI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü 8310/8313. baz dizileri arasından kesti ve agaroz jelde 379 ve 81 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



Şekil 4.11. 8252 C>G, 8252 C>T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H7, H8, H9, H10, H11, H32, H13, H34, H36, H38, H39 numaralı hastalar ile K28, K51 numaralı kontroller ve en sağda marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz II (korunmuş) bölgesi 8252 C>G, 8252 C>T polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *HaeIII* ile muamele edildi. Kullanılan *HaeIII* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 8252/8253. baz dizileri arasından kesti ve agaroz jelde 321 ve 142 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. H7, H8, H10, H11, H38, H39 normal genotipe sahipken, H32, H34, K28, K51 polimorfik genotipte ve H9, H13, H36 heteroplazmik polimorfik genotipte gözlemlenmiştir (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



Şekil 4.12. 8014 A>G, 8014 A>T polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 numaralı hastalar ile K1, K2, K3 numaralı kontroller ve ortada marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz II (korunmuş) bölgesi 8014 A>G, 8014 A>T polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *RsaI* ile muamele edildi. Kullanılan *RsaI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 8014/8015. baz dizileri arasından kesti ve agaroz jelde 380 ve 83 bç'lik iki bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).



Şekil 4.13 8113 C>A ve 8152 G>A polimorfizm çalışması agaroz jel görüntüsü (H1, H2, H3, H4, H5, H6 numaralı hastalar ile K1, K2, K3, K4, K5 numaralı kontroller ve ortada marker DNA fragment büyüklüklerinin agaroz jel görüntüleri). Sitokrom c oksidaz II (korunmuş) bölgesi 8113 C>A ve 8152 G>A polimorfizmini araştırmak için; hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örnekleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve bölgeye spesifik restriksiyon enzimi olan *MspI* ile muamele edildi. Kullanılan *MspI* enzimi; wild tip baz dizisine sahip olan PCR ürününü, 8113/8115. baz dizileri ve 8151/8154. baz dizileri arasından kesti ve agaroz jelde 243, 182 ve 38 bç'lik üç bant gözlenmesine neden oldu. Hasta ve kontrol gruplarının hiçbirinde bu bölgeye ait polimorfizme rastlanmamıştır (H: hasta, K: kontrol grubu, M: markır DNA'yı tanımlar).

5. TARTIŞMA

Tıp dünyasında; diabet, metabolik sendrom, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi yaş-ilişkili hastalıklarla savaşmada büyük bütçeler harcanmaktadır. Bu hastalıkların insidansı ve morbiditesi, süregen ve artan bir şekilde devam ederken, bunlara neden olan unsurlar halen esrarını korumaktadır. Yakın geçmişte, büyük bir bütçe ayrılarak insan kromozomal DNA'sının sekanslanması yoluyla yapılan biyomedikal araştırma, çarpıcı bir şekilde sonuçlanmış, insan kromozomunda yüzbinlerce SNP ve bu kromozomal SNP'lere ait bölgesel kümelenmeler tanımlanmıştır. Nükleer genomda ortalama olarak her 1000 baz çiftinde 1 yoğunlukta görülen, genomun en yaygın varyasyonları olan SNP'lerin, hastalık genlerini tanımlamada ve farmakogenetik çalışmalarda önemli markırlar olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (210). Ancak, bu çalışma, yaygın yaş-ilişkili hastalıkların genetik nedeninin aydınlatılmasında tam anlamıyla yeterli olamamıştır (211).

İnsan hücresinin, 23 çift kromozomdan oluşan diploid (2n) yapıdaki nükleer genom ve sitoplazmik genom olarak da bilinen mitokondriyal genomdan oluşan iki ayrı genetik sisteme sahip olması, son yıllarda, bilim dünyasının dikkatini mitokondri organeline çekmiş ve mitokondriyel biyoloji ve genetiğin; yaş-ilişkili hastalıklar, yaşlanma ve kanserdeki kompleks durumun açıklamada iyi bir aday olarak kabul edilmesini sağlamıştır (212).

İnsan mitokondriyal genomu sadece maternal yolla kalıtılan ve 16.569 baz çiftinden oluşan kapalı, sirküler bir DNA molekülüdür. Nükleer genomun yaklaşık 3 milyar baz çiftlik muazzam büyüklüğünün önemli kısmı kodlamayan bölgelerden oluşurken, yalnızca %1.5 kadar bir kısmı proteinleri kodlamakta ve böylece 90 milyon baz çiftini içeren kodlayan kısım, fonksiyonel olarak önemli olmakta buna karşı, insan mitokondriyal genomunun kodlamayan bölgesi, yalnızca 1228 baz çifti uzunluğunda ve genomun geri kalan 15.392 baz çifti uzunluğundaki bölgesi, intraorganel protein sentezi için gerekli olan 22 tRNA ve 2 rRNA genlerinin yanı sıra 13 protein kodlayan geni içermektedir. Mitokondriyal genomun her hücrede yaklaşık 2000 kopyasının olduğu sanılmaktadır yani bir hücrede mitokondriyal genoma ait toplam 30 milyar baz çifti (15.000 baz çiftix2000 kopya) fonksiyonel olarak eksprese edilmektedir. Üstelik,

mitokondriyal genomun evrimsel hızının nükleer genomdan 5-10 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Bundan dolayı, mitokondriyal genomun polimorfizmleri bireyler arasındaki fonksiyonel farklılıklara nükleer genoma kıyasla daha geniş ölçüde katkı sağlayacaktır. Mitokondriyal genom polimorfizminin maternal geçişle ilişkili olarak, haploid ve homoplazmik olması önemli bir yönüdür. Nükleer genomun biallelik doğasında, tek alleldeki polimorfizmin zararlı etkisinin diğer allelin normal fonksiyonu yoluyla gizlenmesi sağlanmaktadır. Tersine, mitokondriyal genom sadece anneden kalıtılır ve bu yüzden monoallelik olarak nitelendirilir. Mitokondriyal genom büyük ölçüde oogenezis esnasında amplifiye edilir; örneğin, bir embriyonik germinal hücredeki mitokondriyal genom, hücre başına yalnızca 100 kopya iken matür bir oosit mitokondriyal genomun 200,000 kopyasını barındırır. Bottleneck etkisi sebebiyle, germ-line'da oluşabilen yeni bir mutasyon dahi, 2. jenerasyonun major populasyonu şeklinde yayılabilir ve nihayetinde 3. ve 4. jenerasyonda homoplazmi ile sonuçlanır. Mitokondriyal disfonksiyona neden olan zararlı mutasyonlar insan populasyonunda elenmesine rağmen, kısmen zararlı sayılabilecek polimorfizmler populasyonda birikme eğilimindedir. Böylece, mitokondriyal polimorfizmleri taşıyan bireyler; genomlarında hem haplogrup-spesifik mtSNP'leri (maternal ata kökenli tarihsel özellik) hem de bireysel-veya ailesel- spesifik mutasyonların (son maternal atadan kazanılmış olan özellik) her ikisini birden biriktirirler. Fonksiyonel değişikliklerle sonuçlanan amino asit değişimlerinin %26-32'sinin doğal bir şekilde ve protein kodlayan genlerdeki SNP'lerin yaklaşık olarak %30'unun non-sinonim mutasyonlarla oluştuğu rapor edilmiştir. Mitokondriyal genom polimorfizmleri; biyoenerjetik etkinlik, metabolik hız, oksijen tüketimi ve ROS üretimi terimlerinde bireyler arasındaki farklılığa önemli bir katkı sağlar (138).

İnsan genomundaki genetik varyasyonlar, aslında, karakteristik olarak genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminin bir sonucu olan kompleks hastalıkların araştırılmasında güçlü kaynaklardır. Çoğu mitokondriyal genetik varyantın atasal bir mutasyon sebebiyle oluştuğu ve zamanla populasyonda yaygınlaştığı düşünülmektedir. Bu polimorfizmler, mitokondriyal haplogruplar (türlerin evrimsel gelişimi yani filogenetik olarak ilişkili bulunan mitokondriyal genotiplerin kümelenmesi) olarak tanımlanır ve insan populasyonunda relatif olarak sık bulunurlar (213).

Populasyonda coğrafik olarak dağılmış olan mtDNA sekans varyantlarının bir kısmı, ilginç bir şekilde patolojik bir durumla ilişkili bulunabilir. mtDNA'daki polimorfizmler, kodlanan proteinlerde kolayca fark edilemeyen farklılıklara ve böylece, oksidatif fosforilasyon aktivitesinde ve serbest radikallerin üretimde değişimlere neden olabilir. Bir bireyin sahip olduğu ya da ırkların paylaştığı benzer mtDNA genotipleri, somatik mtDNA varyasyonlarının birikimi ve OXPHOS kapasitesinde azalmayla giden dejeneratif hücresel bir sürecin erkenden başlamasına yatkınlık oluşturabilir (214). Mitokondriyal haplogrupların; sağırlık (115, 215-217), körlük (218, 219), yaşlanma (220), Parkinson hastalığı (221), erkek infertilitesi (222), diabet (223) ve kanser gibi bazı klinik anormalliklerde, mtDNA mutasyonlarının fenotipik ekspresyonlarını düzenlediği gösterilmiş (115) ve bu varyasyonların sadece kanser gelişim riskini değiştirmekle kalmadığı aynı zamanda kanser ilişkili semptomların oluşumunu, kanserin tedavi ve hastalığın sonuçlarını değiştirebildiği de gösterilmiştir.

Yüksek oranda polimorfik olan mtDNA'da, belli polimorfizmler diabet, Alzheimer hastalığı,Parkinson hastalığı, bipolar hastalık ve kanserler gibi kompleks hastalıklarda risk faktörü olduğu düşünülür. mtDNA polimorfizmlerinin aynı zamanda insan kognisyonu (bilişsellik), karakter yapısı, atletik performansı ve yaşam süresinin uzunluğu gibi bireysel fonksiyonal çeşitlilikle ilişkili olduğu rapor edilmiştir ve bu ilişki populasyon genetiğine bağlı değerlendirilmiştir. Bireyler arasındaki mtDNA'nın yüksek orandaki değişkenliği, ayrıca mitokondriyal ve nükleer genlerdeki ek polimorfizmlerin etkisi genetik analizlerin karmaşıklaşmasına neden olabilir. Tüm bu polimorfizmlerin fonksiyonel analizlerinin yapılmasına ihtiyaç duyulmasına rağmen, günümüze kadar mtDNA polimorfizmlerinin fonksiyonel etkilerini tanımlayan çok az sayıda rapor bulunmaktadır. Bu durum başlıca metodolojik zorluklar sebebiyle ve konvansiyonel moleküler biyolojik tekniklerin mtDNA'da kolaylıkla uygulanabilir olmamasından kaynaklanmaktadır (224).

Hücre içerisinde DNA, sürekli olarak ekzojenik ve endojenik mutajenler ve karsinojenlerle hasara uğramakta olup DNA'daki bu hasarlar birtakım tamir mekanizmaları ile onarılmaktadır. DNA hasarındaki artış ve tamir mekanizmasındaki bir eksiklik, hücreyi ya hücre intiharı olan apoptozise veya hücrenin malignleşmesi yoluna itebilir. Son yıllarda mtDNA'daki mevcut bir çok yaygın polimorfizmin, DNA hasarı ve bireyin karsinojenlere karşı hassasiyetini belirlemede önemli olduğu öne

sürülmüştür (225) ve çoğu kanser türünde, doku örneklerinde tespit edilen mtDNA'daki bu polimorfizmlerin, yeni bir moleküler markır olarak kabul edilebileceğini iddia etmişlerdir (226, 227).

Çeşitli kanserlerde incelenen mtDNA'daki değişiklikler, hematolojik malignitelerde de araştırılmış ve ilk olarak Clayton ve ark. tarafından (228), 1967'de, lösemi hastalarının lökositlerinde, mtDNA'nın yapısal anomalileri tespit edilmiştir. Araştırmacılar, elektron mikroskopisi yöntemi kullanarak, lösemi hastalarının mtDNA'larındaki yapısal değişiklikleri incelediler ve mtDNA'nın yapısında sirküler dimerler, zincirleşen dimer ve trimer yapılar tespit ettiler ve bu yapıların akut ve kronik lösemilerin etyolojisinde önemli role sahip olduğunu savundular. Bu çalışmayı takip eden araştırmalarda, akut ve kronik granülositik lösemili hastaların mtDNA'larının elektron mikroskopik analizlerinde, tüm lösemi hastalarında sirküler dimerler tespit etmiş olmalarına karşın, sağlıklı kontrollerde herhangibir değişiklik gözlemlemediler Sitotoksik kemoterapotik ajanlarla tedaviyi takiben, bazı lösemi hastalarında sirkuler dimerlerin oranında azalma izlendi (229). Gatterman ve ark. (6, 230), miyelodisplastik sendromlu 17 hastada mtDNA'nın sitokrom b, sitokrom c oksidaz I ve II ve ATPaz 8'de nokta mutasyonları tespit etmişler ve bu mutasyonların MDS fenotipinin oluşmasına ve MDS klonal ekspresyonunu artırmak suretiyle, lösemi gelişimine katkıda bulunduğu yorumunu yapmışlardır. Wulfert ve ark. (5), yapmış oldukları çalışmada; 104 miyelodisplastik sendromlu hastanın %56'sında ve miyeloproliferatif hastalığı bulunan 36 hastanın %44'ünde, çoğunlukla transisyon mutasyonu olan heteroplazmik mtDNA mutasyonları ve polimorfizmler tespit etmişlerdir. Bu mutasyonlar ve polimorfizmler; kontrol bölgesi, tRNA ve rRNA'da yoğunlaşmışken, protein kodlayan genlerde düşük düzeyde saptanmıştır. Cerezo ve ark. (231), KLL hastalarından elde ettikleri mtDNA kontrol bölgesini sekanslamışlar ve çeşitli mutasyon ve polimorfizmler tespit etmişlerdir. Onlar, bu hastalarda gözlemlenen mtDNA instabilitesinin, KLL'ye primer neden olarak gösterilebilecek bir faktör olmadığını, fakat tam olarak anlaşılamamış bir mekanizmayla tümöral sürece katkıda bulunduğunu savunmuşlardır Carew ve ark. (232), KLL hastalarının kemoterapi öncesi ve sonrası elde edilen mtDNA'larını sekans analizi yöntemiyle incelemişler ve bir çok bölgede polimorfizm ve mutasyon noktaları tespit etmişlerdir. Kemoterapi sonrası, mtDNA'da rastlanılan mutasyonların yoğunluğunda artış tespit edilmiş olup, bu çalışma tedavi sonrası süperoksit anyon

üretimindeki artış ile mtDNA mutasyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğunu doğrulamıştır. Grist ve ark. (198), AML ve ALL hastalarının mtDNA'larını sekans analizi yöntemiyle incelemişler ve çeşitli mutasyon ve polimorfizmler tespit etmişlerdir. Aynı çalışma, Monnat ve ark. (233), tarafından lösemi ve lenfoma hücre serilerinde yapılmış ve bir çok polimorfizm noktası tespit edilmiştir. Linnartz ve ark. (180), MDS'ye sekonder gelişen AML hastalarının mtDNA'larında rRNA, tRNA ve polipeptit kodlayan genlerde yeni nokta mutasyonlar tespit etmişler ve bu hastalarda malignite gelişiminde mtDNA mutasyonlarının önemli rolü olduğunu iddia etmişlerdir. Yao ve ark. (234), lösemi hastaları ve sağlıklı kontrollerde yaptıkları incelemelerde, hastalarda mtDNA kontrol bölgesinde yüksek düzeyde polimorfizm ve mutasyon gözlemlemişlerdir. He va ark. (200), bir çok lösemi hastasının mtDNA'larını sekans analizi yaparak incelemiş ve bu hasta grubunda somatik mtDNA mutasyonlarının insidansını araştırmışlardır. Onlar, bir çok bölgesinde mutasyon tespit ettikleri mtDNA'nın sitokrom b bölgesinde bulunan bir mutasyonunun, lösemide klonal markır olarak kulanılabilir olduğunu iddia etmişlerdir. Shin ve ark. (9), miyelodisplazi hastaları ve sağlıklı kontrollerden elde edilen mtDNA'sını sekans analizi yöntemiyle incelemişler ve hem hasta grubunda, hem sağlıklı kontrollerde mtDNA'nın bir çok bölgesini kapsayan mutasyon ve polimorfizmlere rastlamışlardır. Hastalardaki bu değişimler sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde farklılık göstermemiştir.

Bizim çalışmamızda incelenen 13 polimorfik noktanın bulunduğu 6 kodlayan-gen bölgesi, ROS üretimindeki öneminden dolayı, kanser de dahil bir çok hastalıkta, sekans analiz yöntemiyle incelenmiştir (9, 200). Çalışmamızda değerlendirilen SNP'lerin seçiminde, seçilen noktanın bulunduğu fonksiyonel olarak önemli kodlayan-gen bölgesi dikkate alınmıştır. Dizayn edilen tüm primerler, elimizde bulunan restriksiyon enzimleri ile bilgisayar ortamında tek tek çaprazlanmış ve araştırılacak SNP'lerin sayısı mümkün olduğunca arttırılmıştır. Literatürde, mtDNA polimorfizmi ile ilgili yapılan bir çok çalışmada pahalı ve hızlı bir yöntem olan "DNA sekanslama yöntemi" ile genotipleme kullanılmıştır. Çalışmamızda ise mtDNA SNP'lerinin tanımlanmasında, moleküler markırlar kullanılarak gerçekleştirilen "PCR/RFLP yöntemi" ile genotipleme; güvenilir, duyarlı ve pahalı olmayan bir metod olmasından dolayı tercih edilmiştir.

ND5- 13704 (C>T) polimorfizmi çalışmamızda; hematolojik malignitesi mevcut 80 hastanın 68'inde polimorfizm tespit edilememiş olup, 12 tanesi polimorfizmik bölgeye sahipti. Sağlıklı kontrollerde ise sadece 1 kişide polimorfizm tespit edilmişti. Polimorfizmler hasta grupta; 38 kadının 3'ünde ve 42 erkeğin 9'unda tespit edilmişken, kontrollerde polimorfizm gözlemlenen tek vaka erkek cinsiyette idi. Gözlemlenen polimorfizmler, hasta grupları arasında, 3 KML (%25), 1 KLL (%8.3), 6 AML (%50), 2 ALL (%16.7) şeklinde dağılım gösterdi. Bu bölgenin polimorfizmleri hasta grubunda, sağlıklı kontrollere göre anlamlı bulunmuştur (Ki Kare: 10.1 ve p= 0.001). Hastalık gruplarının kendi arasında ve cinsiyete göre dağılımı ise homojen yani anlamsızdır.

Literatürde ND5'in yerleştiği Kompleks I'deki bazı polimorfizmlerin, çeşitli kanserlerde sıkça rastlanmasının rapor edilmesi ve bu polimorfizmlerin hastalığa yatkınlık oluşturduğuna dair iddialar; bu bölgedeki SNP'lerin ROS üretiminde artışa ve sonuçta Kompleks I'in fonksiyonlarında değişime yol açtığı hipotezine dayanmaktadır (187, 235). Serbest radikal üretimindeki artış, lokal oksidatif hasarın oluşumunu kolaylaştırarak neoplastik transformasyon ve metastaz gelişimini kolaylaştırıcı bir faktör olarak karşımıza çıkar (186, 236).

La biche ve ark. (237), murin lenfoma hücrelerinde, mitokondriyal genomik değişiklikler tespit etmişler ve Northern blot analizleri ile metastatik lenfoma hücrelerinde, metastatik olmayanlarla karşılaştırıldığında, ND5 Kompleks I subunitinin artmış ekspresyonunu saptamışlardır. Araştırmacıların bu ve diğer çalışmalarıyla, ND5 ekspresyonundaki artışın tümör metastazını kolaylaştırdığı fikri ortaya atılmış ve ND5'in artan ekspresyonlarının lenfomaların metastazında rol oynayabileceği iddia edilmiştir (238).

ND5'in üyesi olduğu Kompleks I'e ait mtDNA polimorfizmi ilk olarak Canter ve ark. tarafından tanımlanmış (186) ve 10398 G>A polimorfizmini taşıyan kadınlarda taşımayanlara nazaran anlamlı düzeyde artmış invaziv meme kanseri riski gözlemlenmiştir. Bu polimorfizm aynı zamanda prostat kanseri için risk artışı ile beraberdir (239). Bu polimorfizmin aynı zamanda meme ve özofagus kanseriyle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (111). Allegra ve ark. (240), bu kompleksin, karsinojen ürünlerin metabolik işlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu ve bunun sonucu olarak, bu kompleksin fonksiyonlarındaki değişimlerin mutajenlerin birikiminde

muhtemel bir artışa katkı sağlayabileceğini, Vanniarajan ve arkadaşları ise (127), ND5 gen bölgesinin mitokondriyal mutasyonlarda hot spot oduğunu iddia etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, Kompleks I'i kapsayan respiratuar defektlerde, hücrelerde anti-apoptotik bir protein olan bcl-2'nin artmış düzeyleri ve pro-apoptotik bir protein olan Bax'ın azalmış düzeyleri tespit edilmiştir (241, 242).

Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C>G, C>T) polimorfizmi çalışmamızda, hematolojik malignitesi mevcut 80 hastadan 65'i (%81.3) normal, 4'ü (%5) polimorfik, 11'i (13.8) ise heteroplazmik polimorfik genotipe sahipti. Sağlıklı kontrollerde; 67 kişide (%83.8) normal genotip, 3 kişide (%3.8) polimorfik, 10 kişide (%12.5) ise heteroplazmik polimorfizm tespit edilmiştir. Sitokrom C Oksidaz II- 8252 (C>G, C>T) polimorfizmi, hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de homojen dağılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,895). Bu bölgede tespit ettiğimiz polimorfizmlerin cinsiyet ve yaşa göre dağılımı da homojendir ve anlamlı bulunmamıştır.

Araştırılan diğer polimorfizm bölgeleri olan **Sitokrom C Oksidaz I- 7319 (T>C), Sitokrom C Oksidaz I- 7444 (G>A), Sitokrom C Oksidaz II- 7660 (G>A), Sitokrom C Oksidaz II- 7975 (A>G), Sitokrom C Oksidaz II- 8014 (A>G, A>T), Sitokrom C Oksidaz II- 8113 (C>A) ve Sitokrom C Oksidaz II- 8152 (G>A)** ise, hasta ve kontrol grubunun tamamında normal olarak gözlemlenmiştir.

OXPHOS sisteminin yaygın defektlerini barındıran bölgelerinden olan sitokrom c oksidaz (Kompleks IV), kompleks III ve IV arasında elektron transferini sağlamaktadır. Sitokrom c oksidaz, elektron transport zincirinin son komponenti olup, elektronların sitokrom c'den oksijene transferini sağlamaktadır. 200 kDa büyüklüğündeki bu enzim kompleksi, hem mitokondriyal genom (COX1, COX2 and COX3 subünitleri) hem de nükleer genom (COX4, COX5a, COX5b, COX6a, COX6b, COX6c, COX7a, COX7b, COX7c ve COX8 subünitleri) tarafından kodlanmaktadır. mtDNA tarafından kodlanan geniş katalitik subünit bölgesi, enzimin tam merkezinde yer almaktadır. Nükleer DNA tarafından kodlanan yapı ise daha küçük boyutta olup, periferde yer almaktadır. Redoks kimyası ile ilişkili olan katalitik fonksiyon COI ve COII subunitleri sayesinde gerçekleştirilmektedir. COX biyogenez mekanizmasının

anlaşılmasında son yıllarda büyük ilerlemeler olsa da, bu süreç halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Literatürde, hematolojik malignite hastalarının incelenen mitokondriyal genomlarında bu bölgeye ait çeşitli mutasyonlar ve polimorfizmler tespit edilmiş olsa da, bizim seçmiş olduğumuz SNP'lerle ilgili herhangi bir bilgi mevcut değildir. Elektron transfer zincirini kodlayan genlerdeki SNP'ler, elektron akış kalitesini değiştirebilir ve ROS üretimi ve buna bağlı gelişen hücresel süreci etkileyebilir (123). Sitokrom c oksidaz bölgesinin oksidatif fosforilasyondaki tartışılmaz önemi nedeniyle, bu bölgedeki SNP'lerin kanserdeki muhtemel rolünün açıklanması amacıyla, daha geniş kitlelerde araştırılması gerekmektedir.

Sitokrom b-15315 (C>T) polimorfizmi çalışmamızda, hasta ve kontrol grubunun tamamında bu bölgede polimorfizm tespit edilememiştir. Çalışmamızda araştırılan bu bölge, iç mitokondriyal membranda lokalize olan ve mitokondriyal "sitokrom bc1 kompleksi" olarak bilinen respiratuar zincirin başlıca elektron-transfer kompleksinin bir üyesidir. Mitokondriyal sitokrom bc1 kompleksi, "respiratuar kompleks III" olarak da adlandırılan 11 subunitten oluşmuş bir komplekstir. Bu subünitlerin 10'u nükleer genom tarafından, 1'i mitokondriyal genom tarafından kodlanmaktadır. Mitokondriyal genomun kodladığı ve elektron transferinde katalitik bir subünit olarak rol oynayan sitokrom b, türlerin tanımlanmasında, evrim analizlerinde ve filogenetik çalışmalarda geniş ölçüde araştırılmış olup, çeşitli mutasyon ve polimorfizmleri tespit edilmiştir (243-245).

12S rRNA-740 (G>A) ve 12S rRNA-680 (T>C) polimorfizmleri çalışmamızda, hasta ve kontrol grubunun tamamında bu bölgede polimorfizm tespit edilememiştir. Bu gen bölgesinin ait olduğu mitokondriyal rRNA gen ailesi, evrimsel biyolojide geniş bir şekilde çalışılmıştır (246-248) ve son çalışmaların bir kısmında, mitokondriyal rRNA genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri, türlerin tanımlanmasında fayda sağlamıştır (249). Populasyondaki yüksek sıklıkta bulunan bazı mt-rRNA varyantları, insanlarda hastalıklara yatkınlık faktörleri olarak davranabilirler.

Örneğin, önemli mitokondriyal haplogruplarında tanımlanan mitokondriyal genomun bazı polimorfizmlerine aynı zamanda bir çok farklı non-sendromik aminoglikozid-ilişkili işitme kaybı vakasında rastlanılmakta fakat bu bölgedeki

değişimlerin tek başına sağırlık nedeni olamayacağını ve nükleer ve mitokondriyal bazı öğelerin ya da aminoglikozid kullanımı gibi bazı çevresel faktörlerin mtDNA mutasyonlarının değişken fenotipine katkı sağladığını savunmuşlardır (91, 113, 114). Bu bölgenin bazı polimorfizmlerinin belli haplogruplarda ve belli hastalıklar için artmış penetrans gösterdiğine dikkat çekilmiş ve hastalıkların görüldüğü ailelerde, mitokondriyal haplotiplerin hastalığın değişken penetransı ve ekpresivitesini düzenlediği iddia edilmiştir (115). Araştırmacılar; bu polimorfizlerin hastalıkların klinik fenotipinin meydana gelmesinde tek başına yeterli olamayacağını ve patojenik tablo oluşumu için modifiye edici ek faktörlere de ihtiyaç duyulduğunu iddia etmişlerdir (116).

$tRNA^{lizin}$ - 8310 (T>C) polimorfizmi çalışmamızda, hasta ve kontrol grubunun tamamında bu bölgede polimorfizm tespit edilememiştir. Hastalıklardaki genotip-fenotip ilişkisi, mitokondriyal tRNA genlerindeki değişimlerin yüksek oranda kompleks olmasına ve tanımlanamamasına neden olur. Mitokondriyal tRNA genlerindeki patojenik değişimler, mitokondriyal hastalıkların büyük bir kısmından sorumludur. mtDNA'nın kodladığı 37 genin 13 tanesi elektron transport zincirinin komponentlerini, 2 tanesi rRNA genlerini ve geriye kalan 22 tanesi tRNA genlerini kodlamaktadır (58). Transkripsiyon esnasında, her bir zincir; mt-tRNA genlerinin işaretlemesi ile başlayıp, protein kodlayan genler aracılığıyla sonlandırılan uzun bir transkript olarak işleme tabi tutulur. mt-tRNA genlerinin sekonder yapısı; her bir gene ait transkriptlerin salınımı olan endonükleolitik aktivite için uygun bir ortam yaratır ve transkripsiyon bir kez başladığında, 14 sitozine sahip hafif zinciri ve 8 guanine sahip ağır zinciri olan mt-tRNA genleri matrikse salınırlar. mt-tRNA'lar, yonca yaprağı şeklinde ve 3 looptan oluşan yapılardır. mt-tRNA'nın antikodon lupu, mRNA kodonuna uygun olan spesifik bir 3 bazlık yapıdan oluşur ve translasyon esnasında doğru aminoasit eklenmesini sağlar (58).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda; hücrelerin, stres yaratan çeşitli durumlara cevabında, mt-tRNA'ların yapısal ve fonksiyonel düzeyde oluşturdukları modifikasyonlar saptanmıştır (250). Hastalıklarda, ilginç bir şekilde, $tRNA^{lösin}$, $tRNA^{lizin}$ ve $tRNA^{izolösin}$ gibi bazı tRNA'lar, daha sık olarak etkilenmektedirler (251, 252). Araştırmacılar; gözlemlenen polimorfik noktaların sıklıkla tRNA'ların korunmuş

nükleotidlerinde tespit etmişler ve bu varyantların muhtemel potansiyel yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olabileceğini öne sürmüşlerdir (115).

Bizim çalışmamızda, Kompleks I bölgesine ait ND-5 13704 (C>T) polimorfizmi, hematolojik malignite tanısı almış hastalarda, sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde pozitif bulunmuştur (p= 0,001). Mitokondriyal SNP'lerin (bizim çalışmamızda 13704 (C>T)), nükleer olarak kodlanan diğer faktörlerle olan kombinasyonu, karsinogenez sürecinde rol oynayabilir. Mitokondriyal haplogrup ve SNP'lerin, kanser gelişimine yatkınlık oluşturmasında altta yatan mekanizmanın bu varyantların artmış ROS üretimine sebebiyet vermesi olduğu düşünülmektedir. ROS düzeylerindeki bu artış, kanser gelişiminde bir risk faktörü olan onkojenik bir yolun aktivasyonuna sebep olabileceği gibi, kanser gelişiminin geç evrelerinde koruyucu bir etki gösteren bir apoptotik reaksiyonun etkinliğinde değişimlere de yol açabilir.

Bizim çalışmamızda apoptozis ve polimorfizm ilişkisine dair herhangi bir verimiz olmamasına rağmen, düşüncemiz; ND5- 13704 (C>T) polimorfizminin ROS üretiminde muhtemel bir artışa sebep olduğu ve Kompleks I'in fonksiyonlarını etkileyen bu değişimin apoptotik mekanizmayı da etkilediği şeklindedir. Bu polimorfizmin hematolojik malignitelere yatkınlık oluşturan bir faktör olabileceği yönündeki hipotezimizin, daha fazla vaka üzerinde araştırılıp desteklenmesi ve bu polimorfizmin kanserdeki muhtemel patolojik etkisinin aydınlatılması gerekmektedir. Hastaların farklı genetik yapılarındaki gizemi ve mtDNA varyantlarının karsinogenezisteki önemini anlayabilmek ve kanser hücrelerinde mitokondri ile nükleer genom arasındaki ilişkinin aydınlatılabilmesi için, bu polimorfizmin bir çok kanser türünde ve farklı populasyonlarda geniş çaplı araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Franekova M, Halasova E, Bukovska E, Luptak J, Dobrota D. Gene polymorphisms in bladder cancer. Urologic oncology. 2008;26:1-8.
2. Tunalı N. Polymorphisms in the xenobiotic genes and susceptibility to bladder cancer. J. Cell Mol. Biol. 2011;9:5-13.
3. Singh KK, Kulawiec M. Mitochondrial DNA polymorphism and risk of cancer. Methods Mol Biol. 2009;471:291-303.
4. Ye C, Gao YT, Wen W, Breyer JP, Shu XO, Smith JR, et al. Association of mitochondrial DNA displacement loop (CA)n dinucleotide repeat polymorphism with breast cancer risk and survival among Chinese women. Cancer epidemiol biomarkers prev. 2008;17:2117-22.
5. Wulfert M, Kupper AC, Tapprich C, Bottomley SS, Bowen D, Germing U, et al. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. Exp Hematol. 2008;36:577-86.
6. Gattermann N. From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. Leuk Res. 2000;24:141-51.
7. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. Mol Cancer. 2002;1:9.
8. Verma M, Kumar D. Application of mitochondrial genome information in cancer epidemiology. Clin Chim Acta. 2007;383:41-50.
9. Shin MG, Kajigaya S, Levin BC, Young NS. Mitochondrial DNA mutations in patients with myelodysplastic syndromes. Blood. 2003;101:3118-25.
10. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Molecular biology of the cell. Garland Science; 2008.
11. Robert Nussbaum RRM, Huntington F. Willard Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Saunders; 2007.
12. Peter Turnpenny SE. Emery's Elements of Medical Genetics 2012.
13. Jocelyn E. Krebs ESG, Stephen T. Kilpatrick. Lewin's Genes X 2011.
14. Robert Nussbaum RRM, Huntington F. Willard Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Saunders 2007.
15. Norman Arnheim PC. Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations. Nat Rev Genet. 2009;10:478-88.

16. Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. Nat Struct Biol. 2001;8:394-401.
17. Epstein RJ. Human Molecular Biology. 1, edit: Cambridge University Press; 2003. 356-86 p.
18. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. BMB reports. 2008;41:11-22.
19. Ballot C, Kluza J, Martoriati A, Nyman U, Formstecher P, Joseph B, et al. Essential role of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by the marine alkaloid Lamellarin D. Mol Cancer Ther. 2009;8:3307-17.
20. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35:495-516.
21. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. Garland Science; 2008. 1115-29
22. Hayley B. Clay SS, Christine Konradi. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. Int J Dev Neurosci. 2010;29:311-24.
23. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature. 2000;408:307-10.
24. Saleem A, Adhihetty PJ, Hood DA. Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. Physiol Genomics. 2009;37:58-66.
25. Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, et al. Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. J Biol Chem. 2005;280:19166-76.
26. Marine J. Cea. Keeping p53 incheck: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. Cell Death Differ. 2006;13:927-34.
27. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. Cell Press. 2009;10:14-23.
28. Friedler A, Veprintsev DB, Hansson LO, Fersht AR. Kinetic instability of p53 core domain mutants: implications for rescue by small molecules. J Biol Chem. 2003;278:24108-12.
29. Levine AJ HW, Feng Z. The p53 pathway: what questions remain to be explored? Cell Death Differ. 2006;13:1027-36.

30. Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, et al. Regulation of AIF expression by p53. Cell Death Differ. 2006;13:2140-9.
31. Matoba S KJ, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. Science. 2006;312:1650-3.
32. Stambolsky P WL, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V. . Regulation of AIF expression by p53. Cell Death Differ. 2006;13:2140-9.
33. Donahue RJ RM, Hoek JB, Knudsen TB. Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. FASEB J. 2001;15:635-44.
34. Ma W, Sung HJ, Park JY, Matoba S, Hwang PM. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. J Bioenerg Biomembr. 2007;39:243-6.
35. Fields J HJ, Choi JW, Hwang PM. How does p53 regulate mitochondrial respiration. IUBMB life. 2007;59:682-4.
36. Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. Exp Physiol. 2003;88:99-107.
37. Achanta G SR, Feng L, Carew JS, Lu W, Pelicano H, Keating MJ, Huang P. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. EMBO Journal. 2005;24: 3482-92.
38. Hood DA, Saleem A. Exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007;17:332-7.
39. N. Hail JaRL. Apoptosis induction by the natural product cancer chemopreventive agent deguelin is mediated through the inhibition of mitochondrial bioenergetics. Apoptosis. 2004;9(3):437-47.
40. Mustafa Solak HB, A. Zeki Şengil, Sıtkı Öztaş Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel İlkeler). Afyon Kocatepe Üniversitesi: 2000. 30-44
41. P.F.Chinnery DMT. Mitochondrial DNA and disease. Lancet Neurol. 1999;354:17-21.
42. Fernandez-Silva P, Enriquez. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. Exp Physiol. 2003;88:41-56.

43. Sharawat SK, Bakhshi R, Vishnubhatla S, Bakhshi S. Mitochondrial D-loop variations in paediatric acute myeloid leukaemia: a potential prognostic marker. Br J Haematol. 2010;149:391-8.
44. Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. Cardiovasc Res. 2008;80:30-9.
45. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondria in heart failure. Cardiovasc Res. 2010;88:40-50.
46. Boesch P, Ibrahim N, Dietrich A, Lightowlers RN. Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria. Nucleic Acids Res. 2010;38:1478-88.
47. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981;290:457-65.
48. Yasukawa T. Overview of mammalian mitochondrial DNA replication and transcription. Tanpakushitsu kakusan koso. 2005;(14 Suppl) 50:1727-31.
49. Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature. 1991;352:255-7.
50. Schwartz M, Vissing J. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. Biochem Biophys Res Commun. 2003;310:247-51.
51. Hauswirth WW, Laipis PJ. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:4686-90.
52. Malka F, Lombes A, Rojo M. Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids. Biochim Biophys Acta. 2006;1763:463-72.
53. Khrapko K. Two ways to make an mtDNA bottleneck. Nat Genet. 2008;40:134 - 5.
54. Liqin Cao HS, Takuro Horii, Yasumitsu Nagao, Hiroshi Imai, Kuniya Abe, et al. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. Nat Genet. 2007;39:386-90.
55. Aral C. Mitokondriyal DNA Değişimlerinin Kanser İle İlişkisinin Araştırılması: Marmara Üniversitesi; 2007.

56. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. Nat Genet. 2005;6:815-25.
57. Salvatore Dimaura GD. Mitochondrial DNA and disease. Ann. Med. 2005;37:222-32.
58. Yarham JW, Elson JL, Blakely EL, McFarland R, Taylor RW. Mitochondrial tRNA mutations and disease. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2010;1:304-24.
59. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell. 1982;28:693-705.
60. David D. Chang DAC. Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. Cell. 1984;36:635-43.
61. Lee DYC, D. A. Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. J Biol Chem. 1996;271:9.
62. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. Annu Rev Biochem. 1997;66:409-35.
63. Brown TA, Clayton DA. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. Nucleic Acids Res. 2002;30:2004-10.
64. Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. Exp Physiol. 2003;88:41-56.
65. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim Biophys Acta. 1999;1410:23.
66. Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annu Rev Cell Biol. 1991;7:453-78.
67. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. Hum Mol Genet. 2004;13:935-44.
68. Gaspari M, Larsson NG, Gustafsson CM. The transcription machinery in mammalian mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2004;1659:148-52.
69. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. Mol Cell Biol. 2005;25:1354-66.

70. Rajendra K. Agrawal, Manjuli R. Sharma, Aymen Yassin, Indrajit Lahiri, et al. Structure and function of organellar ribosomes as revealed by cryo-EM. Ribosomes 2011;1:83-96.
71. Nagaike T, Suzuki T, Katoh T, Ueda T. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. J Biol Chem. 2005;280:19721-7.
72. Christian BE, Spremulli LL. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2011.
73. Chang JH, Tong L. Mitochondrial poly(A) polymerase and polyadenylation. Biochim Biophys Acta. 2011.
74. Hang Cui YK, Hong Zhang. Oxidative Stress,Mitochondrial Dysfunction, and Aging. J Signal Transduct. 2012;2012:1-13.
75. M. Dizdaroglu PJ, M. Birincioglu, H. Rodriguez. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic Biol Med. 2002;32:1102-15.
76. de Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. Environ Mol Mutagen. 2010;51:391-405.
77. M. L. Hamilton HVR, J. A. Drake. Does oxidative damage to DNA increase with age? Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:10469-74.
78. C. G. Fraga MKS, J. W. Park, P. Degan, B. N.Ames. Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:4533-7.
79. J. Lapointe SH. When a theory of aging ages badly? Cell Mol Life Sci. 2010;67:1-8.
80. T. Richter TVZ. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. Exp Gerontol. 2007;42:1039-42.
81. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. Cell. 2008;132:681-96.
82. J. H. Santos BSM, B. VanHouten. Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR. Methods Mol Biol. 2002;197:159-79.

83. Yamaguchi R, Perkins G. Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. Biochim Biophys Acta. 2009;1787:963-72.

84. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. Annu Rev Biochem. 2007;76:679-99.

85. Lee CM, Lopez ME, Weindruch R, Aiken JM. Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy. Free radic Biol Med. 1998;25:964-72.

86. DiMauro S, Andreu AL. Mutations in mtDNA: are we scraping the bottom of the barrel? Brain Pathol. 2000;10:431-41.

87. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123:309-14.

88. Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. Oncogene. 2006;25:4663-74.

89. Wallace DC. Bioenergetics and the epigenome: interface between the environment and genes in common diseases. Dev Disabil Res Rev. 2010;16:114-9.

90. Wallace DC. Colloquium paper: bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107 2:8947-53.

91. Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. Hum Mutat. 2006;27:1072-81.

92. Montiel-Sosa F, Ruiz-Pesini E, Enriquez JA, Marcuello A, Diez-Sanchez C, Montoya J, et al. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. Gene. 2006;368:21-7.

93. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. Gene. 1999;238:211-30.

94. Brown MD, Starikovskaya E, Derbeneva O, Hosseini S, Allen JC, Mikhailovskaya IE, et al. The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. Hum Genet. 2002;110:130-8.

95. McMahon FJ, Chen YS, Patel S, Kokoszka J, Brown MD, Torroni A, et al. Mitochondrial DNA sequence diversity in bipolar affective disorder. Am J psychiatry. 2000;157:1058-64.

96. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. FASEB J. 1999;13:1532-6.

97. Tanaka M, Gong J, Zhang J, Yamada Y, Borgeld HJ, Yagi K. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. Mech Ageing Dev. 2000;116:65-76.

98. Khusnutdinova E, Gilyazova I, Ruiz-Pesini E, Derbeneva O, Khusainova R, Khidiyatova I, et al. A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci. 2008;1147:1-20.

99. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. Neurosci Lett. 2004;365:28-32.

100. Christiane Wolf EG, Bertram Müller-Myhsok, Francesca Pasutto, Bernd Wissinger, Nicole Weisschuh. Mitochondrial haplogroup U is associated with a reduced risk to develop exfoliation glaucoma in the German population. BMC Genet. 2010;11:1-6.

101. Jones MM, Manwaring N, Wang JJ, Rochtchina E, Mitchell P, Sue CM. Mitochondrial DNA haplogroups and age-related maculopathy. Arch Ophthalmol. 2007;125:1235-40.

102. Nishigaki Y YY, Fuku N, et al. Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. Hum Genet. 2007;120:827-36.

103. Saxena R, de Bakker PI, Singer K, Mootha V, Burtt N, Hirschhorn JN, et al. Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. Am J Hum Genet. 2006;79:54-61.

104. Baudouin SV, Saunders D, Tiangyou W, Elson JL, Poynter J, Pyle A, et al. Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. Lancet. 2005;366:2118-21.

105. Raby BA KB, Murphy A, et al. A common mitochondrial haplogroup is associated with elevated total serum IgE levels. J Allergy Clin Immunol 2007;120:351-8.

106. Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg address. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005;70:363-74.

107. Gottlieb E TI. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. Nat Rev Cancer 2005;5:857-66.

108. Booker LM, Habermacher GM, Jessie BC, Sun QC, Baumann AK, Amin M, et al. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. J Urol. 2006;175:468-72

109. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. Oncogene. 2006;25:4647-62.

110. Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong LJ. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. Cancer Res. 2007;67:4687-94.

111. Darvishi K, Sharma S, Bhat AK, Rai E, Bamezai RN. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. Cancer Lett. 2007;249:249-55.

112. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. Annu Rev Pathol. 2010;5:297-348.

113. Chaig MR, Zernotti ME, Soria NW, Romero OF, Romero MF, Gerez NM. A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean family with hearing loss after aminoglycoside treatment. Biochem Biophys Res Commun. 2008;368:631-6.

114. Dai P, Yuan Y, Huang D, Qian Y, Liu X, Han D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation in three Chinese families. Biochem Biophys Res Commun. 2006;348:200-5.

115. Jianxin Lu YQ, Zhiyuan Li, Aifen Yang, Yi Zhu, Ronghua Li, Li Yang, et al. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. Mitochondrion. 2010;10:69-81.

116. Małgorzata Rydzanicz KC, Maciej Wróbel, Agnieszka Pollak, Wojciech Gawęcki, Irena Wojsyk-Banaszak, Urszula Lechowicz, et al. The contribution of the mitochondrial COI/tRNASer gene mutations to non-syndromic and aminoglycoside-induced hearing loss in Polish patients. Mol Genet Metab. 2011;104:153-9.

117. Erol I, Alehan F, Horvath R, Schneiderat P, Talim B. Demyelinating disease of central and peripheral nervous systems associated with a A8344G mutation in tRNALys. Neuromuscul Disord. 2009;19:275-8.

118. Kobayashi J, Nagao M, Miyamoto K, Matsubara S. MERRF syndrome presenting with multiple symmetric lipomatosis in a Japanese patient. Intern Med. 2010;49:479-82.

119. Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. Lancet. 2000;356:2068-9.

120. Hirata K, Nakagawa M, Higuchi I, Hashimoto K, Hanada K, Takahashi K, et al. Adult onset limb-girdle type mitochondrial myopathy with a mitochondrial DNA np8291 A-to-G substitution. J Hum Genet. 1999;44:210-4.

121. Kato M, Nakamura M, Ichiba M, Tomiyasu A, Shimo H, Higuchi I, et al. Mitochondrial DNA deletion mutations in patients with neuropsychiatric symptoms. Neurosci Res. 2011;69:331-6.

122. Wei FY, Suzuki T, Watanabe S, Kimura S, Kaitsuka T, Fujimura A, et al. Deficit of tRNA(Lys) modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. J Clin Invest. 2011;121:3598-608.

123. Wesley A. Beckstead MTWE, Mark J. Rowe, David A. McClellan. Evolutionary Pressure on Mitochondrial Cytochrome b Is Consistent with a Role of CytbI7T Affecting Longevity during Caloric Restriction. Plos One. 2009;4:1-10.

124. Okura T KM, Ando F, Niino N, Tanaka M, Shimokata H. Association of the mitochondrial DNA 15497 G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. . Hum Genet. 2003;113:432-6.

125. Liguori R, Mazzaccara C, Pasanisi F, Buono P, Oriani G, Finelli C, et al. The mtDNA 15497 G/A polymorphism in cytochrome b in severe obese subjects from Southern Italy. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2006;16:466-70.

126. Tanaka M FN, Takeyasu T. Golden means to longevity: rareness of mitochondrial cytochrome b variants in centenarians but not in patients with Parkinson's disease. J Neurosci Res. 2002;70:347-55.

127. Vanniarajan A, Nayak D, Reddy AG, Singh L, Thangaraj K. Clinical and genetic uniqueness in an individual with MELAS. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006;141B:440-4.

128. Bamne MN, Talkowski ME, Moraes CT, Manuck SB, Ferrell RE, Chowdari KV, et al. Systematic association studies of mitochondrial DNA variations in schizophrenia: focus on the ND5 gene. Schizophr Bull. 2008;34:458-65.

129. Parker WD, Jr., Parks JK. Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun. 2005;326:667-9.

130. Liolitsa D, Rahman S, Benton S, Carr LJ, Hanna MG. Is the mitochondrial complex I ND5 gene a hot-spot for MELAS causing mutations? Ann Neurol. 2003;53:128-32.

131. Taylor RW, Morris AA, Hutchinson M, Turnbull DM. Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. Eur J Hum Genet. 2002;10:141-4.

132. Martorell L, Segues T, Folch G, Valero J, Joven J, Labad A, et al. New variants in the mitochondrial genomes of schizophrenic patients. Eur J Hum Genet. 2006;14:520-8.

133. Kirk R, Furlong RA, Amos W, Cooper G, Rubinsztein JS, Walsh C, et al. Mitochondrial genetic analyses suggest selection against maternal lineages in bipolar affective disorder. Am J Hum Genet. 1999;65:508-18.

134. Vitali M, Venturelli E, Galimberti D, Benerini Gatta L, Scarpini E, Finazzi D. Analysis of the genes coding for subunit 10 and 15 of cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2009;116:1635-41.

135. Palanichamy MG, Zhang YP. Identifying potential pitfalls in interpreting mitochondrial DNA mutations of male infertility cases. Indian J Med Res. 2011;134:447-51.

136. Kumar R, Bhat A, Bamezai RN, Shamsi MB, Gupta NP, Ammini AC, et al. Necessity of nuclear and mitochondrial genome analysis prior to assisted reproductive techniques/intracytoplasmic sperm injection. Indian J Biochem Biophys. 2007;44:437-42.

137. Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Gupta NP, et al. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. Indian J Biochem Biophys.2009;46:172-7.

138. Masashi Tanaka TT, Noriyuki Fuku, Guo li-jun, Miyuki Kurata. Mitochondrial Genome Single Nucleotide Polymorphisms and Their Phenotypes in the Japanese. Ann N Y Acad Sci. 2004;1011:7-20.

139. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Am J Med Genet. 2001;106:18-26.

140. Schapira AH. Mitochondrial disease. Lancet. 2006;368:70-82.

141. Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. Lancet. 1999;3541:SI17-21.

142. Zhu X, Peng X, Guan MX, Yan Q. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. Acta Biochim Biophys Sin. 2009;41:179-87.

143. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. Ann Neurol. 2008;63:35-9.

144. Wong LJ. Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. Mitochondrion. 2007;7:45-52.

145. Chinnery PF, Howell, N., Lightowlers, R. N.,Turnbull, D. M. . Genetic counseling and prenatal diagnosis for mtDNA disease. Am J Hum Genet. 1998;63:1908-11.

146. Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. J Bioenerg Biomembr. 1997;29:131-49.

147. Zhang XN, Qi M. Mitochondrion and its related disorders: making a comeback. J Zhejiang Univ Sci B. 2008;9:90-2.

148. Jacobs HT, Holt IJ. The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don’t. Hum Mol Genet. 2000;9:463-5.

149. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. Annu Rev Biochem. 1992;61:1175-212.

150. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Engl J Med. 2003;348:2656-68.

151. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. Nature. 2004;429:417-23.

152. Yokono K. Possible role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance in the elderly. Nihon rinsho. 2006;64:39-44.

153. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature. 1988;331:717-9.

154. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology. 1988;38:1339-46.

155. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med. 1989;320:1293-9.

156. Rotig A, Cormier V, Blanche S, Bonnefont JP, Ledeist F, Romero N, et al. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. J Clin Invest. 1990;86:1601-8.

157. Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP, et al. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. Biochem Biophys Res Commun. 1997;238:326-8.

158. Shoffner JM. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNALys mutation. Cell. 1990;61:931-7.

159. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. Am J Hum Genet. 1990;46:428-33.

160. de Vries DD, van Engelen BG, Gabreels FJ, Ruitenbeek W, van Oost BA. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. Ann Neurol. 1993;34:410-2.

161. Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, et al. Mutation in mitochondrial tRNALeu(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. Nat Genet. 1992;1:368-71.

162. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, et al. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. Am J Hum Genet. 1991;49:939-50.

163. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. Biochem Biophys Res Commun. 1992;187:1551-7.

164. McFarland Rea. Familial myopathy: New insights into the T14709C mitochondrial tRNA mutation. Ann Neurol. 2004;55:478-84.

165. Sue CMea. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNASer(UCN) gene. Neurology. 1999;52:1905-8.

166. Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. Hum Mutat. 1994;3:243-7.

167. Andreu ALea. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. N Engl J Med 1999;341:1037-44

168. McFarland Rea. De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. Ann Neurol. 2004;55:58-64.

169. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646-74.

170. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:719-24.

171. J. Kwong MH. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. J Cell Biol. 2007;179:1163-77.

172. Wilson FH HA, Farhi A, Zhao H, Petersen KF, et al. A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. Science. 2004;306:1190-94.

173. Wallace DC LM, Brown MD, Kerstann K. Mitochondria and neuro-ophthalmological diseases. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill; 2001. 2425–512

174. Dakubo GD. Mitochondrial Genetics and Cancer: Springer; 2010. 135-6

175. Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers. J Gastroenterol Hepatol. 2005;20:1679-84.

176. Miyazono F, Schneider PM, Metzger R, Warnecke-Eberz U, Baldus SE, Dienes HP, et al. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. Oncogene. 2002;21:3780-3.

177. Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2005;44:19-28.

178. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. Int J Mol Sci. 2009;10:674-701.

179. Czarnecka AM, Bartnik E. The role of the mitochondrial genome in ageing and carcinogenesis. J Aging Res. 2011;2011:136435.

180. Linnartz B, Anglmayer R, Zanssen S. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA alterations in acute leukemia developing from myelodysplastic syndromes. Cancer Res. 2004;64:1966-71.

181. Plak K, Kukwa W, Bartnik E, Golik P, Scinska A, Krawczyk T, et al. The impact of mtDNA mutations on proteins structure in selected types of cancer. Postepy Biochem. 2008;54:151-60.

182. Jakupciak JP, Maragh S, Markowitz ME, Greenberg AK, Hoque MO, Maitra A, et al. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. BMC Cancer. 2008;8:285.

183. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. Science. 2008;320:661-4.

184. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nature Genet. 1999;23:147.

185. Ingman M, Gyllensten U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. Nucleic Acids Res. 2006;34:749-51.

186. Canter JA, Kallianpur AR, Parl FF, Millikan RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. Cancer Res. 2005;65:8028-33.

187. Czarnecka AM, Krawczyk T, Zdrozny M, Lubinski J, Arnold RS, Kukwa W, et al. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. Breast Cancer Res Treat. 2010;121:511-8.

188. Navaglia F, Basso D, Fogar P, Sperti C, Greco E, Zambon CF, et al. Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome. Am J Clin Pathol. 2006;126:593-601.

189. Wei L, Zhao Y, Guo TK, Li PQ, Wu H, Xie HB, et al. Association of mtDNA D-loop polymorphisms with risk of gastric cancer in Chinese population. Pathol Oncol Res. 2011;17:735-42.

190. Yacoubi Loueslati B, Troudi W, Cherni L, Rhomdhane KB, Mota-Vieira L. Germline HVR-II mitochondrial polymorphisms associated with breast cancer in Tunisian women. Genet Mol Res. 2010;9:1690-700.

191. Zhang SP, Song SJ, Li YX. Association between mitochondrial DNA mutations and cancer in human. Yi chuan. 2008;30:263-8.

192. Robert S. Hillman KAA, Michel Leporrier, Henry M.Rinder. Klinik Uygulamada Hematoloji. Ozcan M, editor. Gunes Tıp Kitabevi2012. 195-339.

193. John P. Greer JF, George M. Rodgers, Frixos Paraskevas, Bertil Glader, Daniel A. Arber, Robert T. Means. Wintrobe's Clinical Hematology. 12, editor. philadelphia: Lippincott Williams; 2009. 1663-2311.

194. Lee Goldman DAA, William Arend, James O. Armitage, David Clemmons, Jeffrey Drazen, Robert Griggs. Cecil Textbook of Medicine. 2010. 1390-407.

195. Ündar L. Akut lösemiler tanı ve tedavi kılavuzu-2011. Hematoloji Derneği.

196. Boultwood J, Fidler C, Mills KI, Frodsham PM, Kusec R, Gaiger A, et al. Amplification of mitochondrial DNA in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 1996;95:426-31.

197. Ivanova R, Lepage V, Loste MN, Schachter F, Wijnen E, Busson M, et al. Mitochondrial DNA sequence variation in human leukemic cells. Int J Cancer. 1998;76:495-8.

198. Grist SA, Lu XJ, Morley AA. Mitochondrial mutations in acute leukaemia. Leukemia. 2004;18:1313-6.

199. Carew JS, Nawrocki ST, Xu RH, Dunner K, McConkey DJ, Wierda WG, et al. Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine. Leukemia. 2004;18:1934-40.

200. He L, Luo L, Proctor SJ, Middleton PG, Blakely EL, Taylor RW, et al. Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukaemia. Leukemia. 2003;17:2487-91.

201. Shin MG, Kajigaya S, McCoy JP, Jr., Levin BC, Young NS. Marked mitochondrial DNA sequence heterogeneity in single CD34+ cell clones from normal adult bone marrow. Blood. 2004;103:553-61.

202. Shin MG, Kajigaya S, Tarnowka M, McCoy JP, Jr., Levin BC, Young NS. Mitochondrial DNA sequence heterogeneity in circulating normal human CD34 cells and granulocytes. Blood. 2004;103:4466-77.

203. Nekrasov SV, Agafonova OV, Belogurova NG, Delver EP, Belogurov AA. Plasmid-encoded antirestriction protein ArdA can discriminate between type I methyltransferase and complete restriction-modification system. J Mol Biol. 2007;365:284-97.

204. RJ. R. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:5905-8.

205. Karakoç A. Paraoksonaz polimorfizmleri ile tip 2 diabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması Atatürk Üniversitesi 2008.

206. Bourniquel AA, Bickle TA. Complex restriction enzymes: NTP-driven molecular motors. Biochimie. 2002;84:1047-59.

207. Aggarwal AK WD. Novel site-spesific DNA endonuclease. Curr Opin Struct Biol. 1998;8:19-25.

208. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi; 2008.

209. Temizkan G. AN. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi; 2008.

210. Sobin Kim HDR, T. Conrad Gilliam, Jingyue Ju. Digital genotyping using molecular affinity and mass spectrometry. Nat Rev Genet. 2003;4:1001-10.

211. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature. 2007;449:851-61.

212. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science. 1992;256:628-32.

213. Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Perez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. Drug discovery today. 2010;15:33-9.

214. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:8739-46.

215. Guan MX, Enriquez JA, Fischel-Ghodsian N, Puranam RS, Lin CP, Maw MA, et al. The deafness-associated mtDNA 7445 mutation, which affects tRNASer(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase ND6 subunit gene expression. Mol Cell Biol. 1998;18:5868-79

216. Li R, Xing G, Yan M, et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with A1555G mutation of mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. Am J Med Genet. 2004;124A:113-7.

217. Li R, Greinwald JH Jr, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of mitochondrial 12S rRNA and tRNASer(UCN) genes in paediatric subjects with nonsyndromic hearing loss. J Med Genet. 2004;41:615-20.

218. Hudson G, Carelli, V, Spruijt L, et al.Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. Am J Hum Genet. 2007;81:228-33.

219. Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, et. al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic

neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. Am J Hum Genet. 1997;60:1107-21.

220. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:2174-6.

221. Van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. Am J Hum Genet. 2003;72:804-11.

222. Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. Am J Hum Genet. 2000;67:682-96.

223. Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, et al. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. Am J Hum Genet. 2007;80:407-15.

224. Bostjan Seruga HZ, Lori J. Bernstein, Ian F. Tannock. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. Nat Rev Genet. 2008;1:887-99.

225. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers. 2002;11:1513-30.

226. Parr RL, Dakubo GD, Thayer RE, McKenney K, Birch-Machin MA. Mitochondrial DNA as a potential tool for early cancer detection. Hum Genomics. 2006;2:252-7.

227. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science. 2000;287:2017-9.

228. Clayton DA, Vinograd J. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. Nature. 1967;216:652-7.

229. Clayton DA, Vinograd J. Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969;62:1077-84.

230. Gattermann N, Retzlaff S, Wang YL, Hofhaus G, Heinisch J, Aul C, et al. Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of

cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. Blood. 1997;90:4961-72.

231. Cerezo M, Bandelt HJ, Martin-Guerrero I, Ardanaz M, Vega A, Carracedo A, et al. High mitochondrial DNA stability in B-cell chronic lymphocytic leukemia. PloS One. 2009;4:e7902.

232. Carew JS, Zhou Y, Albitar M, Carew JD, Keating MJ, Huang P. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. Leukemia. 2003;17:1437-47.

233. Monnat RJ, Jr., Maxwell CL, Loeb LA. Nucleotide sequence preservation of human leukemic mitochondrial DNA. Cancer Res. 1985;45:1809-14.

234. Yao YG, Ogasawara Y, Kajigaya S, Molldrem JJ, Falcao RP, Pintao MC, et al. Mitochondrial DNA sequence variation in single cells from leukemia patients. Blood. 2007;109:756-62.

235. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. Nucleic Acids Res. 2007;35:823-8.

236. Vives-Bauza C, Gonzalo R, Manfredi G, Garcia-Arumi E, Andreu AL. Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. Neurosci Lett. 2006;391:136-41.

237. LaBiche RA, Yoshida M, Gallick GE, Irimura T, Robberson DL, Klostergaard J, et al. Gene expression and tumor cell escape from host effector mechanisms in murine large cell lymphoma. J Cell Biochem. 1988;36:393-403.

238. LaBiche RA, Demars M, Nicolson GL. Transcripts of the mitochondrial gene ND5 are overexpressed in highly metastatic murine large cell lymphoma cells. In Vivo. 1992;317-24.

239. Mims MP, Hayes TG, Zheng S, Leal SM, Frolov A, Ittmann MM, et al. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. Cancer Res. 2006;66:1880-1.

240. Allegra E, Garozzo A, Lombardo N, De Clemente M, Carey TE. Mutations and polymorphisms in mitochondrial DNA in head and neck cancer cell lines. Acta otorhinolaryngol Ital. 2006;26:185-90.

241. Binder C, Marx D, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. Expression of Bax in relation to Bcl-2 and other predictive parameters in breast cancer. Ann Oncology. 1996;7:129-33.

242. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, et al. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. Int J Cancer. 1995;60:854-9.

243. Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM, Shanske S, DiMauro S. Polymorphic variants in the human mitochondrial cytochrome b gene. Mol Genet Metab. 1999;67:49-52.

244. Lee JC, Hsieh HM, Huang LH, Kuo YC, Wu JH, Chin SC, et al. Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. Int J Legal Med. 2009;123:117-21.

245. Lee JC, Tsai LC, Huang MT, Jhuang JA, Yao CT, Chin SC, et al. A novel strategy for avian species identification by cytochrome b gene. Electrophoresis. 2008;29:2413-8.

246. LR. AWaH. Nucleotide sequence variation in the mitochondrial 12s rRNA gene and the phylogeny of African molerats (Rodentia: Bathyergidae). Mol Biol Evol. 1992;9:27-40.

247. Whitfield JB CA. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. Mol Biol Evol. 1998;15:1728-43.

248. Arctander P JC, Vreto M. Phylogeography of three closely related African Bovids. Mol Biol Evol. 1999;16:1724-39.

249. Chapela MJ, Sotelo CG, Mata P, Perez-martin RI, Rehbein H, Hold GL, et al. Identification of Cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS). J Food Sci 2002. ; 67:1672-6.

250. Nawrot B, Sochacka E, Duchler M. tRNA structural and functional changes induced by oxidative stress. Cell Mol Life Sci. 2011;68:4023-32.

251. Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z et al. Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. RNA Biol. 2007;4:38-66.

252. Cardaioli E, Malfatti E, Da Pozzo P, Gallus GN, Carluccio MA, Rufa A, et al. Progressive mitochondrial myopathy, deafness, and sporadic seizures associated with a novel mutation in the mitochondrial $tRNA^{Ser}$ (AGY) gene. J Neurol Sci. 2011;303:142-5.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİK MALİNGNİTELERDE MİTOKONDRİYAL POLİMORFİZMLERİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Neslihan DÜZKALE

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi :26.12.2007
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi :27.09.2012
Uzmanlık Sınavı Tarihi :27.09.2012
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Abdulgani TATAR
Jüri üyesi : Prof. Dr. Mehmet GÜNDOĞDU
Jüri üyesi : Prof. Dr. Naci CEVİZ
Jüri üyesi : Doç. Abdulgani TATAR
Jüri üyesi : Doç. Dr. Ragıp Atakan AL
Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. İbrahim CANER

Doç. Dr. Abdulgani TATAR
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı

EYLÜL-2012
ERZURUM