

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

107604

İNSAN MİTOKONDRIYAL DNA'SINDA RFLP YÖNTEMİ İLE
POLİMORFİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Abdulgani TATAR

107604

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İrfan BATAT

ERZURUM YÜKSEKÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Doktora Tezi
ERZURUM-2001

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	II
ÖZET.....	III
SUMMARY.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
3. MATERYAL VE METOD.....	31
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA.....	48
6. KAYNAKLAR.....	51



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, gerek ders gerekse tez aşamasında desteklerini benden esirgemeyen, daima cesaretlendiren hocam Sayın Prof. Dr. İrfan BATAT'a, her türlü teknik problemin çözümünde yardımına başvurduğum ve katkılarını gördüğüm hocam Sayın Doç. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ'a ve Biyoteknoloji Araştırma ve uygulama merkezindeki çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Uz. Dr. Fevzi POLAT'a teşekkür ederim.



ÖZET

Moleküler genetik tekniklerinin ortaya çıkması ve gelişmesi ile biyoloji ve genetik bilimi ivme kazanmıştır. Geliştirilen teknikler birçok çalışmada kullanılmaya başlanmış ve moleküler genetik tıp, ziraat ve biyoloji gibi birçok bilim dalında uygulama alanı bulmuştur. Bu bilim dallarında birçok problemin çözümünde moleküler genetik yöntemlerinin kullanımı zorunlu hale gelmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction : PCR) yönteminin keşfedilmesi ve geliştirilmesi genetikte devrim olmuş ve nükleotid dizilerinin *in vitro* ortamda çoğaltılması sağlanmıştır. Mitokondriyal DNA bağlantılı ilk hastalığın (Lebers Hereditary Optic Neuropathy; LHON) moleküler patolojisinin açıklanmasından sonra, moleküler genetik teknikleri kullanılarak birçok hastalığın etiyopatogenezinde mitokondriyal DNA'nın rol oynadığı ortaya konulmuştur. Bu konudaki çalışmalar arttıkça bireyler arasındaki DNA dizi farklılıklarının her zaman hastalıkla sonuçlanmadığı anlaşılmıştır. Bu dizi farklılıkları popülasyonlarda sabitlenmekte ve popülasyonlar arası farklılıklar göstermektedir. Ayrıca DNA dizisinde zamanla orantılı bir değişimin olduğunun farkına varılması modern, insanın gelişimini ortaya koymada moleküler genetik tekniklerinin kullanımına yeni bir alan sağlamıştır.

Sağlıklı bireyler arasında DNA dizilerindeki farklılıkların ortaya konulması, klinik patolojiyle bağdaştırılan moleküler değişikliklerin her zaman bir etiyolojik etken olmayabileceği düşüncesini doğurmuştur. Bu nedenle polimorfizm çalışmaları gündeme gelmiştir. Klinik çalışmalarda yanılırlara düşmemek için çalışılan popülasyonun polimorfik yönünün iyi algılanmış olması gereklidir.

Biz bu çalışmamızda sağlıklı bireylerin oral kavite mukoza epitelinden mitokondriyal DNA izolasyonu yaparak, mitokondriyal DNA'nın, biri konstant diğeri de hipervaryabl olmak üzere iki segmentini PCR ile amplifiye ettik. Her bir bölge için iki adet farklı restriksiyon enzimi uyguladık. DNA fragmentlerini %3,5'lik agaroz gelde yürüttük.

Çalışmaya dahil edilen 38 bireyin tamamının konstant bölgelerinde farklı kesim olgusuna rastlanmazken, hipervaryabl bölgede 4 bireyde farklı kesime rastlanmıştır. Bu 4 bireyde *Hinf* I enzimi kesim bölgesi kaybolmuştu. Bu bireylerden birisinin birinci derece 2 yakını ile diğerinin bir yakını incelenmiş ve bunların da *Hinf* I kesim bölgesini kaybettikleri görülmüştür.

Bu çalışma, bölgemizdeki popülasyonda, mitokondriyal genetik hastalıkların teşhis çalışmalarına girilmeden önce yapılması gereken çalışmalardan ilkidir. Elde

edilen sonuçlar, çevremizdeki populasyonda, incelenen mitokondriyal DNA segmentlerindeki polimorfizmin boyutlarını ortaya koyması yönünden henüz yetersiz ise de, incelenen iki genetik bölgedeki varyasyon beklenen bir model ortaya koymuştur. Bu ve benzer çalışmalara daha çok marker kullanarak ve istatistiksel açıdan belli bir güvenilirlik düzeyine ulaşıncaya kadar devam edilmesi gerekmektedir.



SUMMARY

As the molecular genetic techniques have been developed and become available, the sciences of biology and genetics have gained an acceleration. This molecular techniques are being used in a large scientific field like medicine, agriculture, biology and others. The use of molecular genetic methods was now a must for the solution of problems in this scientific fields.

The development of PCR methods has been a revolution in genetics, and it has been possible to replicate *in vitro* nucleotide sequences. After the characterization of the first mitochondrial DNA linked disease (LHON) molecular genetic techniques were used to define several other diseases of which mitochondrial DNA takes part in the aethiopathogenese. It is proved that DNA sequence differences between individuals are not always a reason for a disease. These sequence differences have been fixed for populations. Moreover, being aware of the proportionally change of the DNA sequence in the course of time provides a way of evaluation for the evolution of the modern human being by using molecular genetic techniques.

Differences among DNA sequences of healthy individuals indicated that molecular changes are not always an aethiological factor for clinical pathology. For this reason polymorphism studies were considered necessary. To prevent mistakes in clinical studies, the polymorphism of the population should be known well.

In this study, we isolated mitochondrial DNA from epithelial cells of oral cavity of healthy individuals and we amplified a constant and an hypervariable segment of the mitochondrial DNA, with the PCR technique. We applied two different restriction enzymes to each region and run the DNA fragments in 3.5% agarose gel.

We have not found different restriction sites in the constant regions of the 38 individuals in our study. On the other hand, loss of the restriction site for *Hinf* I enzyme was detected in the hypervariable region in four subjects. Two first degree relatives of one subject and one first degree maternal relative of the second subject demonstrated the same feature. Maternal relatives of the other two subjects were not available at time of this study.

This study is the first of many studies which should be carried out, before studying mitochondrial genetic diseases in this population. The results maybe insufficient in defining the polymorphim of the studied mitochondrial DNA region in our population, but the observed variations in the two sites display an expected pattern.

This and similar studies should be continued with using more markers, until getting statistically satisfactory and confident results.



1. GİRİŞ:

Günümüzde, genetik biliminin gelmiş olduğu noktada, pekçok ülke moleküler genetik tekniklerini kullanarak, insanlardaki genetik polimorfizmi tespit etmeye çalışmaktadırlar. Bazı ülkeler ise bu çalışmaların ışığında, hasta bireylerde fenotipik patoloji ile DNA dizi düzensizlikleri arasındaki bağlantıları ortaya koymaya çalışmaktadırlar. Mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın standart dizileri 1981'de tamamlandıktan sonra birçok ülkede mitokondriyal DNA çok detaylı bir şekilde araştırılmıştır¹. Fakat, Türkiye'de bu alandaki çalışmalar henüz yeterli değildir.

Tüm dünyada farklı merkezlerde yapılan çalışmalarla, hergün kalıtsal hastalıklar listesine yenilerinin eklenmesi ve eskiden beri bilinen birçok hastalığın etiyolojilerinde kalıtsal etkenlerin ortaya konulması, genetik çalışmaların daha sistematik bir şekilde yürütülmesini zorunlu kılmaktadır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar daha çok genomdaki patolojileri ortaya koymaya yöneliktir.

Wallace ve arkadaşları yaptığı çalışmalarla, ilk defa mtDNA'nın da birçok hastalıkta nükleer DNA gibi önemli bir rolü olduğunu ortaya koydular ve bu konudaki çalışmalara öncülük ettiler. İnsan mtDNA'sının standart zincir analizi tamamlanıp mitokondriyal defektler ortaya çıkarıldıktan sonra, mtDNA moleküler patolojiler ve genetikçiler için ideal bir çalışma objesi olmuştur².

MtDNA'sı olmayan insan hücrelerinin izolasyonu ve bu hücrelere mitokondrinin mikroyenjeksiyonunun yapılması ile yeni mtDNA'lı hücreler, genetik manipülasyonlar için iyi bir çalışma objesi olmuştur. Bu gelişmeler, mitokondriyal genomun yeni hücrelere aktarılmasını, seleksiyonunu ve replikasyon kurallarının ortaya konulmasını sağlamıştır. Ayrıca mitokondrinin nasıl bölündüğünü, nasıl birbirleriyle birleştiğini ve stoplazmadaki pozisyonunu nasıl belirlediğini anlamamıza da yardımcı olmuştur³.

Moleküler biyoloji günümüzde, insan türünün gelişimsel tarihi hakkında objektif bilgiler ve büyük bir kantitatif kaynak sağlamıştır. Sağlıklı bireylerdeki polimorfizm çalışmaları ve hasta bireylerdeki mutasyon oranlarının tespiti, modern insanın evrimsel gelişim sürecini ve türler arası ilişkileri yorumlamayı sağlamıştır. Yine moleküler biyoloji, türler arası genetik farklılık ve insanların birbirleriyle genetik ilişkileri konusunda da yeni görüşler ortaya koymaktadır. İnsanın genetik gelişimini inceleyen çalışmalarda mtDNA kullanmanın en önemli avantajlarından birisi, mtDNA'nın olumlu veya olumsuz yüksek mutasyon hızıdır. Bu durum bazı vakalarda ancak birkaç bin yıl önce ayrılan insan popülasyonları arasındaki farklılıkları ayırtedebilmeye imkan verebilir. Ülkemizde de, moleküler genetik çalışma imkanlarının artması ile birlikte bazı

merkezlerde bu alanda çalışmalar yapılmaktadır. Fakat bu çalışmalar hasta bireylerdeki patolojileri ortaya koymaya yönelik olup, polimorfizm çalışmaları ikinci planda kalmıştır. Bu durum moleküler genetik alanında büyük bir eksikliktir. Sağlıklı bireylerin genomik yapıları tam olarak bilinmeden yapılan mutasyon analizlerinde, popülasyona özgü polimorfik yapılar mutasyon olarak algılanabilir.⁴⁻⁶

İnsan genomunun polimorfizmi genel olarak çok yüksek boyutlardadır. Klinik teşhislerin sağlıklı yapılabilmesi için bu polimorfizmin boyutları ve nitelikleri öncelikle saptanmak zorundadır; aksi takdirde ilgilenilen bir lokustaki doğal bir varyant ile klinik problemler arasında gerçekte olmayan asosiyasyonlar varsayılarak çalışmalar yanlış yönlendirilebilir. Herhangi bir klinik problemin kaynağında bir lokustaki değişik patojenik mutasyonlar olabileceği gibi, sağlıklı bireylerde de böyle bir hastalık lokusunda çeşitli boyutlarda bir polimorfizm var olabilir. Dolayısıyla olası hastalık genlerini teşhis amacıyla kullanılacak testlere karar verilmeden önce, ilgili genlerdeki polimorfizmin boyutları doğru ve detaylı olarak tesbit edilmelidir. Aksi takdirde kliniklere başvuran ve genetik hastalık teşhisi konulan hastalardan yapılacak genetik tanı testleri sağlıklı sonuçlar vermeyecektir.

Bu alışmada; Türkiye'deki mtDNA patolojileriyle ilgili çalışmalara, polimorfik yapılarla patolojik genom yapılarının ayrımı açısından katkısı olacağını düşünerek, PCR ve RFLP yöntemi ile mtDNA polimorfizmi çalışmalarına bir basamak oluşturulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER:

Friedrich Miescher ilk kez 1869'da hücrede DNA'nın varlığını göstermiştir. Watson ve Crick 1953 yılında DNA'nın moleküler yapısını ortaya koyduktan sonra, bir taraftan DNA'nın fonksiyonu ile ilgili çalışmalar yapılırken bir taraftan da DNA'nın yapısı ile ilgili araştırmalar devam ettirilmiştir. Organizmada bütün fonksiyonların DNA tarafından kontrol edildiğinin anlaşılması ve DNA'daki yapısal bozuklukların organizmada işlev bozukluğuna yol açtığına anlaşılması üzerine, işlev bozukluklarında DNA patolojileri araştırılmaya başlanmıştır.^{7, 8}

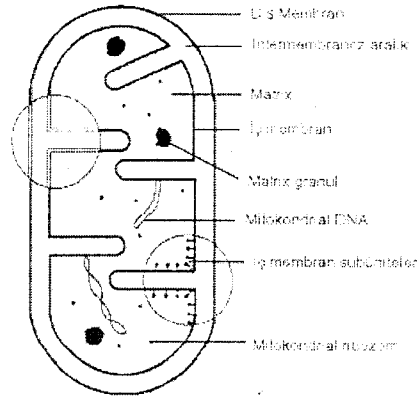
Mitokondri; 1850'de Kolliker tarafından ilk defa görülmüş, sistematik olarak 1894'te Altman tarafından tanımlanmıştır. Işık mikroskopunda mitokondri hücre içinde ipliksi ve granüler yapıda görüldüğünden dolayı, ilk kez 1897'de Benda bu organelle mitokondriyon adını vermiştir. Bensley ve Hoerr 1934'te ilk kez, karaciğerden mitokondrileri izole etmeyi başardılar. 1963'de Nass ve arkadaşları mitokondri içinde DNA varlığını gözlemlemişler ve bu tarihe kadar yaygın olan, genetik materyalin sadece nükleusta bulunduğu düşüncesini yıkmışlardır. Aslında bu tarihten daha önce mitokondrilerin pozitif fuelgen reaksiyonu verdiği gözlemlenmişse de, mtDNA'nın varlığı Nass ve arkadaşları tarafından ilk kez tesbit edilmiştir.^{7, 9}

Mitokondri, tüm ökaryotlarda bulunan bir organeldir. Bir hücredeki mitokondri sayısı, hücrenin fonksiyonuna ve ihtiyacına bağlı olarak birkaç taneden binlerceye kadar değişebilir. Hücrede cereyan eden reaksiyonlar için gerekli enerji ihtiyacını karşılar. Mitokondrinin asıl fonksiyonu oksidatif fosforilasyondur, fakat bunun dışında pirimidinlerin, amino asitlerin, fosfolipitlerin, nükleotidlerin, folat enzimlerinin, üre ve diğer birçok metabolitin biyosentezine katkıda bulunur. Hücredeki sayısı, hücrenin tipine göre değişmekle beraber, bir hücrede yüzlerce hatta binlerce mitokondri bulunabilir. Karaciğer, kas gibi yüksek enerji ihtiyacı olan doku hücrelerinde mitokondri sayısı oldukça yüksektir.^{3, 7, 9, 10}

Mitokondrinin büyüklüğünün bakteri ölçülerinde olması ve fonksiyonu, bu organelin bakterilerin evrimsel değişimi ile ortaya çıkmış olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Ökaryotlarda enerji dönüşümünü yapan organellerin, yaklaşık 1,5 milyar yıl önce, primitif ökaryotlar tarafından yutulan ve simbiyotik bir ilişki içerisine girilen prokaryotlardan geliştiği düşüncesi yaygındır. Dünya atmosferinin oksijen, azot ve karbondioksit ağırlıklı bir ortama değişimi, oksijenin toksik etkilerini engelleyecek yapıya sahip olmayan ökaryotların, bu yapıyı daha önce kazanmış olan prokaryotlarla simbiyotik bir ilişkiye girmesini zorunlu hale getirmiştir. Prokaryotlar, ökaryotları

oksijenin toksik etkilerinden korumuş, ökaryotlar ise prokaryotlara besin sağlamıştır. Bir süre sonra bu simbiyotik ilişki bozulmuş ve bir dizi olay sonunda bakteri protomitokondriyona ve sonrada mitokondriyona dönüşmüştür. Bakteri mitokondriyonu hücre DNA'sından bağımsız olarak protein sentezleyemeyecek şekilde mutasyona uğramıştır.^{9, 11}

Mitokondri oval görünümlü, yaklaşık 1 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde bir organeldir (Şekil 1). 1952'de Palade ve Sjöstrand, elektron mikroskopta mitokondrinin ultrastrüktürünü ortaya koymuşlardır. Elektron mikroskopik incelemelerde, mitokondrinin bir iç bir de dış membrana sahip olduğu ortaya konulmuştur. İç membran matrikse doğru krista denilen uzantılar verir. Kristalar iç membranın yüzeyini artırır. Doku tiplerine göre krista sayısı ve dolayısıyla alanı değişiklik gösterir. Karaciğer hücrelerinde kristaların kapladığı yüzey, hücre membran yüzeyinin üç katıdır, kalp kasında ise krista sayısı karaciğere göre üç kat daha fazladır. Mitokondri dış membranında çok sayıda porin adı verilen transport proteinleri bulunur. Porin-lipid yapısındaki bu dış membran, 5000 daltondan küçük moleküllere ve iyonlara karşı seçici geçirgenlik gösterir. İç membranı ise ikili fosfolipid yapısından oluşmuştur. İç membran iyonlar için geçirgen değildir ve küçük moleküller için selektif geçirgendir. Spesifik protein taşıyıcıları bulundurur. İç membran enerji üretiminin olduğu kısımdır. Sitrik asit siklusu ve yağ asidi oksidasyonu iç membranda matrikse bakan yüzde gerçekleşir. İç ve dış membran arasında intermembranöz aralık bulunur. Mitokondriyal matriks içerisinde mitokondriyal ribozomlar, mitokondriyal DNA'lar ve matriks granülleri bulunur.^{7, 9}



Şekil 1. Mitokondriyonun Şematik Görünümü

Mitokondriogenezis, iki farklı eylem gerektirir; ilki mitokondriyal membranların ve kompartmanların oluşumu, diğeri de oksidatif fosforilasyon için organellerin farklılaşmasıdır. Birinci işlem tamamen nüklear genler tarafından kontrol edilir, ikinci işlem ise nüklear genler kadar mitokondriyal genler tarafından da kontrol edilir. Mitokondriyal büyüme ve bölünme mtDNA replikasyonuna bağımlı değildir. Büyüyen hücrelerde, mitokondriyal membranların hücre kitlesine oranında artış görülür. HeLa hücrelerinde, hücre siklusu esnasında hücre kitlesine oranla mitokondri sayısı ve total mitokondri yüzeyi sabit kalır. Bu da göstermektedir ki, bu organellerin büyüme ve bölünmesinin mtDNA replikasyonu ile bir ilişkisi yoktur. Farklılaşmış hücre sistemlerinde mitokondriyal membranların büyümesi ve/veya mtDNA replikasyonu hücre kitlesindeki artış ile uyumlu olarak ortaya çıkabilir. Bu durum muhtemelen metabolik ihtiyaçların değişimini yansıtır. mtDNA replikasyonu mitokondri içerisinde gerçekleşir ve daha sonra mitokondri basit füzyon ile bölünür.^{3, 10}

Mitokondri, hücrede oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleştiği organelidir. Mitokondri, oksidatif fosforilasyon yoluyla Adenosine TriPhosphate (ATP) üretimini yapar. Hücre solunumu ile mitokondriiler arasında bir ilişki olabileceğini ilk kez Altman söylemiş, 1920'lerde Warburg ve Weiland bu ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Sonraki yıllarda Krebs, glukozdan karbondioksit kadar indirgenen bir seri reaksiyonlar zincirini açıklamıştır. Oksidatif fosforilasyon olayının mitokondride gerçekleştiğini 1948'de Eugene Kennedy ve Albert Lehninger göstermiştir.^{2, 7, 9, 12, 13}

2. 1. Oksidatif Fosforilasyon (Oxidative Phosphorylation : OXPHOS)

ATP sentezi, iç mitokondriyal membranın diğer tarafına bir proton gradienti ile NADH veya $FADH_2$ 'den oksijene elektronların akışı ile gerçekleştirilir. Glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asit siklusunda yapılan NADH ve $FADH_2$, yüksek enerjili moleküllerdir. Çünkü herbiri yüksek bir transfer potansiyeline sahip bir çift elektron içerir. Bu elektronlar moleküler oksijene transfer edildiğinde, büyük miktarlarda enerji açığa çıkar ve açığa çıkan bu enerji ATP oluşumunda kullanılabilir. OXPHOS; elektron taşıyıcıları ile elektronların NADH veya $FADH_2$ 'den oksijene taşınırken ATP'nin yapıldığı bir eylemdir.⁷

Mitokondride gerçekleşen ATP sentezi kemiosmotik teori ile açıklanmıştır. OXPHOS mitokondrinin iç membranında meydana gelir. mtDNA; mitokondriyal ATP oluşum mekanizmasında hayati bir öneme sahiptir. OXPHOS, 5 enzim kompleksinden oluşur (kompleks I, II, III, IV ve V). Bu enzimleri oluşturan polipeptitler, yaklaşık 80 kadar nükleer gen ve 13 mtDNA geni tarafından kodlanmıştır. Kompleks I ve kompleks II ile etkileşime giren yağ ve karbonhidratların oksidasyonundan elektronlar elde edilir. Bu elektronlar koenzim Q_{10} 'a transfer edilir. Daha sonra sırasıyla kompleks III, sitokrom c, kompleks IV ve sonuçta oksijene gider. Oksijen OXPHOS için terminal elektron akseptörüdür. Bu elektron transferi ile ortaya çıkan enerji, kompleks I, III ve IV'de protonları iç mitokondriyal membranın diğer tarafına pompalamak için kullanılır. Membranın her iki tarafı arasında elektrokimyasal gradient oluşur. Bu gradientten dolayı protonlar pasif olarak matrikse geçer ve kompleks V tarafından $ADP+P_i$ ATP'ye dönüştürmek için kullanılır. ADP ve ATP, daha sonra adenin nükleotid translokatorleri (ANT) ile iç mitokondriyal membranın diğer tarafına transfer edilir.^{7, 13}

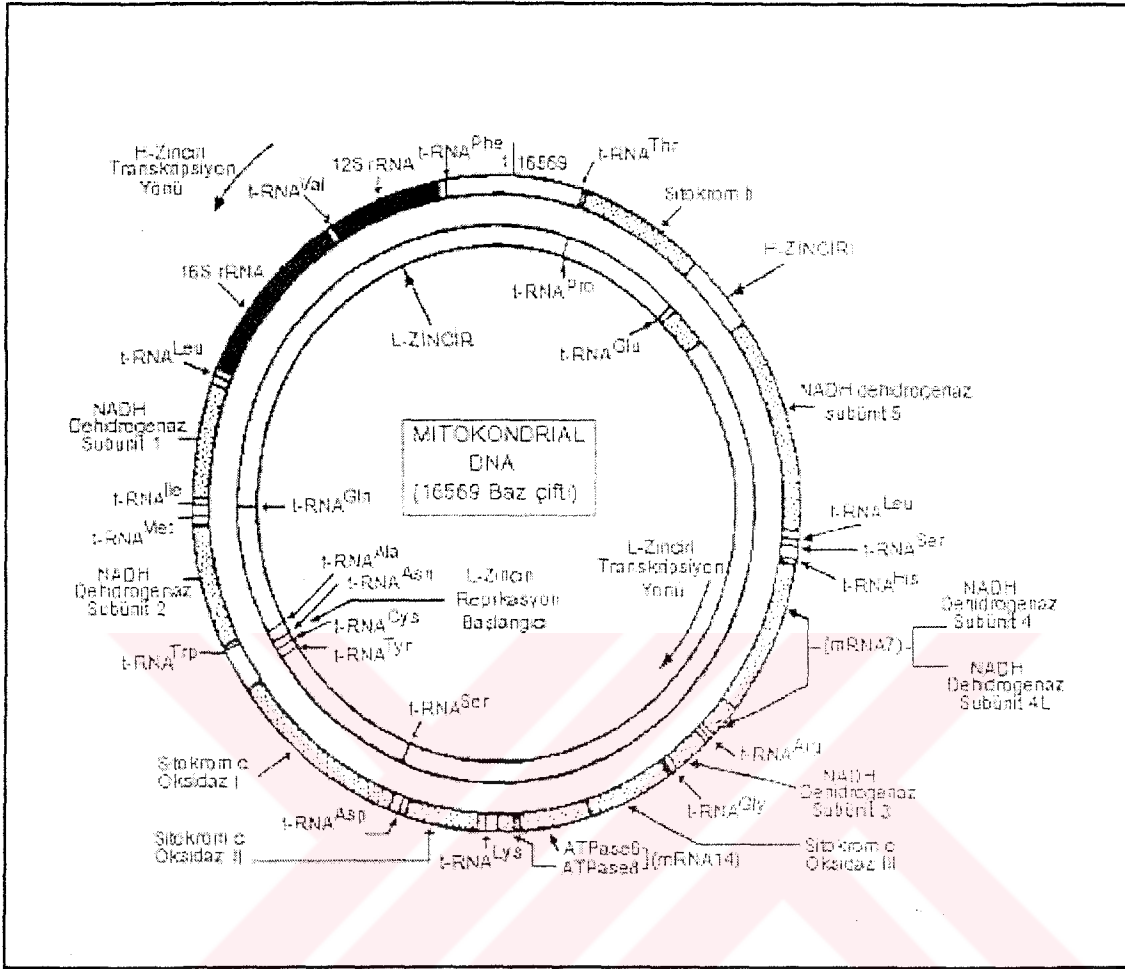
2. 2. Mitokondriyal DNA.

Mitokondri, hayvansal organizmalarda, nükleus haricinde DNA'sı olan tek hücresel organeldir ve nükleer DNA'dan bağımsız olarak replikasyon, transkripsiyon ve translasyon yapma kabiliyetindedir. mtDNA, mitokondri matriksi içerisinde 12 nm uzunluğunda granüller şeklinde bulunur. Her mitokondride 2-10 arası değişen sayıda mtDNA bulunur. Bu sayı türler arası, kişiler arası, dokular arası ve hatta hücreler arası farklılık gösterir.^{9, 12}

İnsan mtDNA'sı, kapalı sirküler bir yapıya sahip olup, 16569 baz büyüklüğündedir. Herbir memeli somatik hücresinde 1.000-10.000 mtDNA kopyesi

mevcuttur ve oocyt'lerde bu sayı çok daha yüksektir. Memeli mitokondriyal genomunun en belirgin özelliği kompakt organizasyonudur ve bu durum mtDNA zincirine ileri derecede ekonomi sağlar. D-loop bölgesi dışında bitişik genler arasında kodlanmayan bazlar çok az veya hiç yoktur. D-loop bölgesinin herhangi bir kodlayıcı fonksiyonu açıklanabilmiş değildir. İnsan mtDNA'sı, biri H-zincir (Heavy-strand) diğeri L-zincir (Light-strand) olmak üzere, çift zincirli sirküler bir yapı gösterir (Şekil 2). H-zinciri daha çok pürin bazlarını, L-zinciri ise pirimidin bazlarını içerir. Bütün bazların %44'ünü G ve C bazları oluşturur. mtDNA'nın içerdiği genler tablo 1'de gösterilmiştir. ^{1, 3, 9, 13-15}





Şekil 2: İnsan Mitokondriyal DNA molekülünün genom organizasyonu⁹.

Tablo 1: Mitokondriyal DNA'ya ait gen haritası⁹.

GEN	Yerleşim Yeri (bç)	GEN	Yerleşim Yeri (bç)
L-Zinciri Promoteri	≅392-435	Sitokrom C Oksidaz II	7586-8262
H-Zinciri Promoteri	≅545-567	t.RNA Lys	8295-8364
t.RNA Phe	577-647	ATP Sentaz 8	8366-8572
12S r.RNA	648-1601	ATP Sentaz 6	8527-9207
t.RNA Val	1602-1670	Sitokrom C Oksidaz III	9207-9990
16 S r.RNA	1671-3229	t.RNA Gly	9991-10058
t.RNA Leu	3230-3304	NADHDehidrogenaz3	10059-10404
NADH Dehidrogenaz 1	3307-4262	t.RNA Arg	10405-10469
t.RNA Ile	4263-4331	NADHDehidrogenaz4L	10470-10766
t.RNA Gln	4329-4400	NADH Dehidrogenaz 4	10760-12137
t.RNA Met	4402-4469	t.RNA His	12138-12206
NADH Dehidrogenaz 2	4470-5511	t.RNA Ser	12207-12265
t.RNA Trp	5512-5576	t.RNA Leu	12266-12336
t.RNA Ala	5587-5655	NADH Dehidrogenaz5	12337-14148
t.RNA Asn	5657-5729	NADH Dehidrogenaz 6	14149-14673
t.RNA Cys	5761-5826	t.RNA Glu	14674-14742
t.RNA Tyr	5826-5891	Sitokrom b	14747-15887
Sitokrom C Oksidaz I	5904-7444	t.RNA Thr	15888-15953
t.RNA Ser	7445-7516	t.RNA Pro	15955-16023
t.RNA Asp	7518-7585	Membran Tutunma Bölgesi (D Loop)	≅15925-499

mtDNA; farklı organizmalarda, yapısı, gen organizasyonu, gen muhtevası, ekspresyonu ve replikasyonu ile ileri derecede farklılıklar gösterir. Bu farklılık, muhtemelen nükleer ve mitokondrial genlerin günümüzdeki ayırımına sebep olan, evrimsel gelişim aşamasındaki değişikliklerden kaynaklanır. Bu farklılıklar, farklı ökaryotik hücrelerde mitokondrinin gelişimine neden olabilen, geçmişteki hücre içi olayların çokluğunun bir kanıtıdır. ^{1,3,16}

Memeli mitokondriyal genomu sirküler bir yapı gösterir. Replikasyon orijini yakınındaki kısa bir segment dışında, memeli mtDNA'sı tamamen genlerle doldurulmuştur. Bu genler intron içermezler. İnsan mtDNA'sı 13 protein kodlayan gen, 2 rRNA geni ve 22 tRNA geni içerir. Genlerin çoğunluğu ağır (H; heavy) zincirden transkribe edilirler. H zinciri 2 rRNA geni, 14 tRNA geni, 12 protein kodlayan gen içerir. Birçok organizmalarla şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, mitokondriyal proteinlerin sentez mekanizmasının RNA komponentlerinin, neredeyse tamamen mtDNA'da kodlandığı görülmüştür. Fakat protein komponentleri nükleer DNA'da kodlanır ^{1,8,11,12,15}.

tRNA'ları kodlayan mtDNA dizileri, organizmalar arasında büyük oranda farklılıklar gösterir. tRNA^{met} dışında, mitokondrideki 22 tRNA geni, mitokondriye özgün mekanizmalar kullanıldığında, tüm kodonları okumak için yeterli olur. Hiçbir memelide, mitokondriyal tRNA'ların sitoplazmadan alındığı gösterilememiştir. Hayvan ve fungal mtDNA'lar, mitokondriyal protein sentezi için gerekli bütün tRNA genlerine sahiptir. Fakat ünicellüler green alga *chlamydomonas* ve protozoa *Tet. hymena* gibi bazı organizmalar tRNA genlerinin sadece bir kısmına sahiptir. Bütün tRNA'larını kodlayan mtDNA'ya sahip organizmaların mitokondriyal tRNA takımları, nükleer DNA'da kodlanandan daha küçüktür. Mitokondriyal tRNA'ların sayısı ve türü, farklı organizmalarda mitokondriyal genomun kodon tanıma şeklini yansıtır. Mesela; universal stop kodonu olan UGA, hayvan, mantar ve protozoa mitokondrisinde tryptophanı kodlar. Aynı filogenetik grup içerisinde, farklı mitokondriyal genetik sistemler arasında da kod farklılıkları bulunmuştur. mtDNA ve nükleer DNA arasındaki kodon farklılıkları tablo 2'de verilmiştir. ^{1,3}

Tablo 2: mtDNA ve nüklear DNA arasındaki kodon farklılıkları

Kodon türü	Nüklear DNA	mtDNA
UGA	Dur	Trp
AGA	Arg	Dur
AGG	Arg	Dur
AUA	Ile	Met

Mitokondride mevcut proteinlerin çoğu nüklear DNA'da kodlanır, ancak 13 tanesi mtDNA tarafından kodlanır ve bu proteinler mitokondriyal translasyon sistemi tarafından sentezlenir. Bu sistemin rRNA'ları ve tRNA'ları mitokondri tarafından kodlanır. Protein kodlama açısından, farklı organizmalardaki mtDNA'lar oldukça farklı tipte protein kodlayan gen içerebilirler. OXPHOS için gerekli bazı proteinleri kodlayan genler, bazı mtDNA'larda mevcuttur bazılarında ise yoktur. Fakat NADH dehidrogenazın genetik kontrolünde mtDNA'nın önemli bir rolü vardır ve şimdiye kadar zincir analizi yapılmış olan bütün vertebralıların mtDNA'ları bu enzim kompleksinin subünitelerini kodlayan 7 geni içerir. Günümüze kadar yapılan araştırmalarda tüm organizmalarda ortak olan mitokondriyal genler; 2 rRNA geni, birkaç tRNA geni, sitokrom C oksidaz subünit I ve apositokrom b genidir. ^{1,3}

Mitokondriyal biyogenezisin en ilginç yönlerinden birisi replikasyonla ilgilidir. Herbir insan hücresi yüzlerce mitokondri ve binlerce mtDNA içerir. Hücre bölünmesi esnasında nüklear DNA'lar bölünür. Bunun aksine mtDNA'lar yavru hücrelere rastgele dağıtılır. Eğer bir hücre bölünmesinden sonra belirli bir oranda mutant mtDNA mevcutsa, birsonraki hücre bölünmesinden sonra bu oran değişebilir. Eğer belirli bir zamanda mutant mtDNA oranı 1 ise, yeni bir mutasyon dışında, hücre bölünmesi esnasında da 1 olacaktır. ²

mtDNA'nın replikasyonu nüklear DNA'dan farklıdır. mtDNA'nın her iki zincirinin (H ve L) replikasyon orjinleri (O_H ve O_L) farklıdır. H-zincirinin replikasyon orjini D-loop bölgesinde bulunur. L zincirinin replikasyon orijini saat 8 hizasındadır. D-loop bölgesi; 1100 bp uzunluğunda, gen içermeyen, replikasyon ve transkripsiyonun kontrolünü yapan bölgedir. Öncelikle H-zincirinin replikasyonu başlar. H-zincirinin 2/3' ü

sentezlendikten sonra L-zincirinin replikasyon orjini açılır ve ters yönde sentezlenir. mtDNA'nın replikasyonu ve ekspresyonu nüklear genler tarafından kontrol edilir. Replikasyonu gerçekleştiren mtDNA polimeraz enzimi nüklear DNA'da kodlanır ve mitokondriye gönderilir. Ayrıca nüklear genom, mitokondrinin multisubünit enzim komplekslerinin birleştirilmesinde mitokondriyal genom ile uyumludur. ^{1, 3, 9, 11, 15}

mtDNA'nın transkripsiyonu da nüklear DNA'dan farklılık gösterir. Ökaryotlarda, nüklear DNA'da transkripsiyon için her gen kendine ait spesifik bir promotere sahiptir. Oysa mtDNA polisistronik bir transkripsiyon gösterir ve H-zincirde 2, L-zincirde 1 tane promotere sahiptir. Bu promoterler transkripsiyonu birbirine zıt yönde başlatırlar. Her iki zincirin transkripsiyonu aynı anda gerçekleştirilir ve mtDNA'nın tamamı transkripsiyona uğrar. Sentezlenen dizi RNAase-P ile kesilerek mRNA, tRNA ve rRNA'lar birbirinden ayrılır. Mitokondriyal transkripsiyon mekanizması için en az iki komponent gereklidir. İlk mitokondriyal RNA polimeraz fraksiyonu, ikincisi ise ilk mitokondriyal transkripsiyon faktörü (mtTF1)'dür. Poly-A kuyruğu mRNAs'lere transkripsiyon sonrası eklenir. ^{9, 11, 15,}

17

Mitokondriyal gen işleyişini düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak ortaya konamamış ise de özellikle transkripsiyonel kontrol mekanizmaları önemli rol oynar. OXPHOS gen ekspresyonunun analizi, üç tip transkripsiyonel kontrol mekanizmasını ortaya koymaktadır. Multiple lokusun uyumlu ekspresyonu, belirli genlerin doku-spesifik ekspresyonu ve gen ekspresyonunun çevresel modülasyonu. H-zinciri promoterlere yakın bir bölgede, üstüste katlanmış iki farklı transkripsiyon ünitesi içerir. Bu ünitelerin daha aktif olanı, H-zincirinde kodlanan rRNA'ların ve 2 tRNA'nın sentezini kontrol eder, diğeri ise kalan tRNA'ların ve mRNA'ların sentezini kontrol eder. rRNA sentezi mRNA sentezinden 15-60 kat daha fazla gerçekleşir. Bunun sebebi terminasyonu belirleyen promoter ve iki promoter arasındaki tercih uyumudur. Bu iki promoterden birisinin seçimi muhtemelen, RNA polimerazın 16S rRNA geninin 3' ucundaki terminasyon sinyalini tanıma kabiliyetini ikiye katlar. Bunu nasıl başardığı bilinmemekle birlikte bu konuda ileri sürülen hipotezler şunlardır:

1- İki promoter, iki farklı RNA polimeraz transkripsiyonu gerçekleştirir ancak sadece birisi (tRNA spesifik polimeraz) terminasyon sinyalini tanıyabilir.

2- Sadece bir polimeraz vardır ve bu polimeraz, iki promoterin birisinde spesifik bir faktöre (terminatör veya antiterminatör) bağlanarak, terminasyon sinyalini tanıma kabiliyeti kazanabilir (veya kaybeder).

3- İki promoterin birisine bağlanmış spesifik bir faktör, DNA'nın dışına loop yaparak 3' uç terminasyon sinyali ile etkileşir. Transkripsiyonel kontrol dışında memeli

mitokondrisinde, gen ekspresyonu daha çok posttranskripsiyonel düzeyde kontrol edilir.^{3, 14}

Tüm genlerde mRNA başlangıcının ilk 6 bazı içerisinde bir AUG başlangıç kodonu bulunmaktadır. Fakat mitokondriyal mRNA'ların çoğunun UAA veya UAG sonlanma kodonuna sahip olmadığı tespit edilmiştir. Sonlanma muhtemelen AGA ve AGG kodonlarıyla gerçekleşmektedir. Oysa bu kodonlar universal genetik koda arginini kodlamaktadır (tablo 1'e bkz). Mitokondriyal mRNA'da arginin kodonu CGN'dir. AGA ve AGG kodonları; okuma dizilerinin sonunda bir sonraki gen ile bağlantı noktasında veya okuma dizisi sonraki gen ile devam edecekse yer almaktadır. Birçok okuma dizisinde sonlanma kodonunun olmamasını açıklamak için; mRNA'larda UAA sonlanma kodonlarının posttranskripsiyonel oluşmasına yönelik bir model düşünülmüştür. Primer transkripsiyon ürünü U veya UA ile sonlanacak şekilde kesilirse, bu ürüne poli-A kuyruğu eklenerek sonlanma sağlanır.^{1, 17}

Mitokondriyal yapıyı kontrol eden sinyallerin çoğu nükleardır. Bu sinyal genleri nükleusta bulunur ve sinyal proteinlerini kodlar. Bu proteinler stoplazmada sentezlenip mitokondriye gider. Mitokondriye gelen bu proteinler spesifik olarak yönlendirildiği 4 ana kompartmandan birisine gider. Bu kompartmanların üç tanesi iç kompartmandır (matriks, iç membran, intermembranöz aralık) ve bu kompartmanlara gidecek proteinler bir amino ön zinciri ile birlikte sentezlenirler. Ön zincirler 12-70 kadar aminoasitten oluşurlar ve mitokondri yüzeyindeki reseptör benzeri yapılara bağlanarak mitokondriye penetre olurlar.³

Görülüyor ki memeli mitokondriyal genetik sistemi, kendine özgü bir sistemdir. Memeli mitokondriyal genetik kod sistemi universal genetik koddan farklılık gösterir ve az sayıda mt tRNA ile özgün bir biçimde okunur.¹

2. 3. Mitokondriyal Kalıtım.

Klasik Mendelian kalıtım ile açıklanamayan kalıtsal hastalık pedigrileri uzun yıllar araştırılmıştır. Bu pedigrilerde dikkati çeken nokta, etkilenen birey erkek veya kadın iken bu bireyin ebeveynlerinden sadece annede hastalık görülmesiydi¹⁰.

mtDNA'nın keşfinden sonra insanın genetik gelişimi ile ilgili çalışmalar mtDNA üzerine yoğunlaştırılmıştır. mtDNA araştırmaları, insan gen havuzunun geçmişini açıklamamıza üç yolla katkıda bulunur.

1- mtDNA, insan gen havuzunda şu andaki çeşitliliği gösterir. Çünkü, mutasyonlar mtDNA'da nükleer DNA'dan daha hızlı birikir.

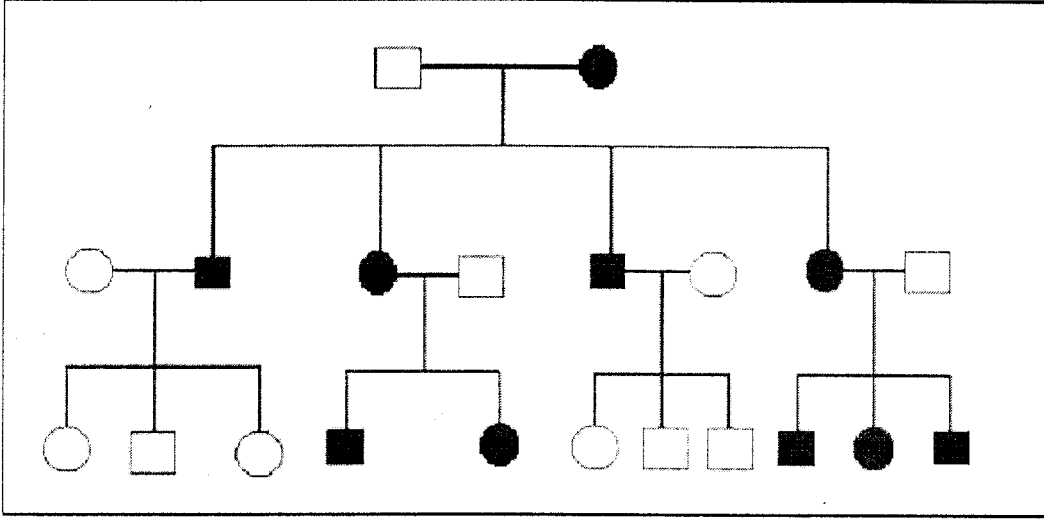
2- mtDNA, maternal olarak kalıtıldığı ve ebeveynler arası rekombinasyon göstermediği için, kişiler arası genetik ilişkileri göstermede iyi bir araçtır.

3- İnsandaki mtDNA sayısı 10^{16} dır ve genelde birbirlerine tıpatıp benzerler. Mitokondriyal kalıttaki maternal ve haploid kalıttaki, bir çift birey yavrulara tek tip mtDNA aktarabilir. Oysa, bu çift tamamı yavrulara aktarılabilen 4 haploid takım nükleer gen taşır. Bu hızlı gelişim ve mtDNA'nın özgün kalıtım modeli, insan gen havuzunun nasıl, nerede, ne zaman doğduğu ve geliştiği sorularına yeni bir bakış açısı getirmiştir.

4, 18, 19

Mitokondriyal genomun dizi analizi, insandaki hastalıklar ile ilgili mutasyon çalışmalarına büyük kolaylıklar getirmiştir. Moleküler genetikçiler ve patologlar için mitokondri, cazip bir çalışma objesi olarak görülmüştür. Fakat; mitokondrinin biyogenezis ve kalıtım özellikleri, mtDNA'nın belirlenen özellikleri için istatistiksel modeller geliştirmeyi zorlaştırmaktadır. Mitokondriyal kalıtım için bazı modeller geliştirilmiş ise de, bu modeller mitokondriyal geçiş ve ekspresyonda birçok ayrıntıyı gözden kaçırmaktadır. Mitokondriyal kalıtımı izah etmek için, gelişmiş matematik ve istatistik modellere ihtiyaç vardır. ^{2, 20}

Nükleer genlerin aksine, insan mtDNA'sının sadece anneden kalıtıldığı bilinmektedir. Annenin mtDNA'sı tüm yavrulara aktarılır, babanın mtDNA'sı ise mitokondriyal kalıtıma katkıda bulunmamaktadır (Şekil 3). Fertilizasyon esnasında spermin kuyruk kısmında bulunan mitokondriler ovuma giremediği için zigotta sadece anneye ait mitokondriler bulunur. Spermin boyun kısmında yeralan mitokondrilerin %0.1'ini zigota aktarılabılır ki bu da gözardı edilebilecek bir orandır. Maternal geçiş olayının ilginç bir özelliği otozomal dominant kalıtım modeline benzemesidir. Bu nedenle pedigride maternal geçişi belirlemek için, kondisyonun paternal yolla kalıtımının olmadığını doğrulayacak bir test gereklidir ^{2, 8, 9, 13, 14}.



Şekil 3: Mitokondriyal DNA kalıtımını açıklamak üzere hazırlanan ideal bir pedigri (Burada mitokondriyal DNA kalıtımı homoplazmik olarak düşünülmüştür) ⁹.

Spesifik doku veya hücre kitlesini oluşturan hücrelerde belirli bir mutant ve normal mtDNA'nın bir arada bulunmasına "heteroplazmi" denir. Bu durum letal mutasyonların tolare edilerek kalıcı olmasına imkan sağlar. Tüm mtDNA'lar tek tip (mutant veya yabanıl) olduğu zaman "homoplazmi" denir. Replikatif segregasyon işlevi esnasında, mtDNA kardeş hücrelere paylaştırıldığı için, mutant ve normal molekül oranı hücreden hücreye değişebilir. Patolojik bir fenotipin ortaya çıkması için gerekli mutant mtDNA oranı eşik etki olarak bilinir ve kişiler arasında, organ sistemleri arasında ve verilen doku içerisinde farklılıklar gösterir. OXPHOS'da potansiyel olarak letal bir etkiye sahip mutasyonlar (büyük yapısal defektler, kritik bölgelerdeki nokta mutasyonları, v.s.), sadece heteroplazmik oldukları zaman varlıklarını sürdürebilirler ^{2, 12-14}.

mtDNA intron içermediğinden, rastgele bir mutasyon genellikle kodlayıcı DNA zincirini etkileyecektir. Ayrıca; mtDNA'nın, histonlara ve etkili bir tamir sistemine sahip olmadığı ve OXPHOS ile oluşan serbest oksijen radikallerine maruz kaldığı genel bir düşüncedir. Özellikle mtDNA nokta mutasyonları nükleer DNA mutasyonlarından çok daha hızlı bir şekilde popülasyona fikse olmaktadır. Bu durum mtDNA tamir

mekanizmasının yetersiz olduğu düşüncesini doğurmuştur. Fakat mtDNA'nın bazı tip mutasyonları etkin olarak tamir edememesinin yanında, bazı tip mutasyonların tamirini yeterli bir biçimde gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalar olduğu bildirilmiştir.^{11, 13, 21}

Bir çok çalışmada mtDNA'daki mutasyonların nükleer DNA'daki mutasyonlardan 10-20 kat daha hızlı olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu durum nokta mutasyonları ve insersiyon/delesyon mutasyonları için doğrudur ve mtDNA'da gözlenen yüksek zincir değişim hızının bir nedeni olabilir. mtDNA'nın patolojik mutasyonları: baz değişimi mutasyonları ve delesyon-insersiyon mutasyonları olarak iki gruba ayrılır. Baz değişim mutasyonları, missens (amino asit değişimi) ve protein sentez mutasyonlarını içerir. Delesyonların ya her iki replikasyon orjinini koruduğu yada L-zincirinin replikasyon orjinini çıkardığı gösterilmiştir¹⁴. İnsersiyonlar değişik mtDNA bölgelerinin duplikasyonuna sebep olabilir. Somatik dokularda veya gelişim aşamasında ortaya çıkan mutasyonlar, spontan hastalıklara ve yaşlanmayla bağlantılı OXPHOS'da azalmaya sebep olurken, germ hücrelerinde ortaya çıkan mutasyonlar familial hastalıklara sebep olur. Bazı mtDNA mutasyonlarının OXPHOS hastalıklarına sebep olduğu bilinirken, belirli bazı nükleer DNA mutasyonlarının da benzer fenotip oluşturması beklenir. Çünkü, mitokondrideki replikasyon, transkripsiyon ve translasyona katılan tüm proteinleri ve OXPHOS enzimlerinin birçok alt ünitesini kodlayan genler nükleusta bulunur. mtDNA'nın delesyonları daha hızlı replike olabilir. Çünkü replike olacak daha küçük boyutta genoma sahiptirler. Bu nedenle mutant mtDNA'lar normal mtDNA'lara replikasyon açısından bir üstünlük sağlamış olabilirler.^{2,}

5, 9, 12, 14, 22

mtDNA'nın diğer bir özgün niteliği, dokuya spesifik etkileridir. OXPHOS olayı ve ATP oluşumu değişik organları farklı şekilde etkiler. Bu nedenle özgün bir mtDNA mutasyonu, aynı pedigrinin farklı üyelerinde farklı fenotipik formlarda ortaya çıkabilir^{2,}

14

2. 4. Mitokondriyal Hastalıklar:

Wallace ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaların önderliğinde mitokondriyal hastalıklara yönelmede büyük bir artış olmuştur. Patojenik mtDNA mutasyonları geniş spektrumlu kronik dejeneratif hastalıklar ile birlikte görülmüşlerdir. Son birkaç yılda mtDNA hastalıkları üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Beyin, kalp, iskelet kası, böbrek ve endokrin bezlere ait birçok kronik dejeneratif hastalığın mtDNA'daki mutasyonlardan kaynaklandığı artık bilinmektedir. Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, tüm organ sistemlerini etkilediği için, birçok branştaki hekimler mitokondriyal hastalıklı

kişilerle karşılaşılır. Bir patolojinin mitokondriyal DNA ile ilgili olduğunun ilk örnekleri iki araştırmayla ortaya konulmuştur: Bunlar mitokondriyal myopati hastalarda mtDNA'da büyük delesyonların bulunması ve LHON hastalarından mtDNA'da missense mutasyonun tesbit edilmesidir¹². Yine maternal kalıtım gösteren bazı hastalıklar (Progressif Eksternal Oftalmopleji, Mitokondriyal miyopati), mitokondriyal DNA ile nükleer DNA arasındaki etkileşim bozukluğundan kaynaklandığı için otozomal dominant benzeri bir kalıtım pedigrisi gösterebilir^{2, 7, 12-14, 21}

MtDNA düzensizlikleri ile ortaya çıkan hastalıklar önceleri 3 başlık altında toplanmıştı: Sporadik olarak ortaya çıkan mtDNA delesyonları, maternal olarak kalıtılan mtDNA duplikasyonları ve Mendelian-kalıtmı mtDNA'nın multiple delesyonları. mtDNA nokta mutasyonu ile birlikte olan hastalıklar hemen hemen tamamen maternal kalıtmıdır. Günümüzde daha geniş kapsamlı bir sınıflama yapılarak mtDNA hastalıkları 4 gruba ayrılmıştır:

1- MtDNA'nın delesyon ve duplikasyonları ile ortaya çıkan hastalıklar. Örnek; Progresif Eksternal Oftalmopleji, Wolfram Sendromu, Kearns-Sayre Sendromu.

2- Mitokondrideki protein kodlayan genlerde oluşan tek nükleotid mutasyonları ile görülen hastalıklar. Örnek; Leber's Herediter Optik Nöropati, Leigh Hastalığı.

3- Mitokondriyal tRNA genlerinde oluşan tek nükleotid mutasyonları ile görülen hastalıklar. Örnek; MELAS (Mitokondriyal miyopati-Ensefalopati-Laktik Asidoz-Strok benzeri ataklar), Letal infantil mitokondriyal miyopati.

4- Mitokondriyal rRNA genlerinde oluşan tek nükleotid mutasyonları ile görülen hastalıklar. Örnek; Streptomisin ototoksitesi, Kloramfenikol rezistansı.^{9,23}

Bir mutasyonun, hastanın mtDNA'sı içerisinde olup olmadığına karar vermek için kullanılan kriter; bireyin hastalığı ile veya bu özelliğin patogenetik olarak benign ve rastlantısal olarak polimorfik olup olmaması ile bağdaştırılmıştır. mtDNA insanlarda belirgin bir maternal kalıtım gösterdiği için, bir mitokondriyal mutasyonun primer patogenetik rol oynadığı hastalıklar basit pedigrî analizleri ile tesbit edilebilir. LHON; bunun için güzel bir örnektir. LHON; maternal olarak kalıtılan, genç erişkinlerde bilateral optik atrofi ile sonuçlanan ve mtDNA nokta mutasyonu içeren bir göz hastalığıdır. LHON, diğer mitokondriyal hastalıklara kıyasla belirgin bir patolojiye sahiptir. LHON hastalarının yaklaşık %80'i ve analiz edilen sağlıklı aile bireyleri, primer patogenetik mutasyon açısından homoplazmiktir. Bu homoplazmiye rağmen, LHON belirgin bir şekilde inkomplet penetrans gösterir. LHON'in kompleks bir etyolojiye sahip olduğu ve primer LHON mutasyonu asıl risk belirleyici komponent olmasına rağmen, vision kaybını belirleyen veya modifiye eden ilave genetik ve epigenetik veya çevresel

faktörler olduğu düşünülmektedir. Maternal kalıtlı geç ortaya çıkan nörodejeneratif hastalık bildirilmemiştir. Bu tip vakaların çoğusunun sporadik olduğu düşünülür. Muhtemelen etyolojileri mtDNA'daki germ-line mutasyonlardır. Diğer yandan, eğer etyoloji karmaşık ve/veya penetrans düşük ise mitokondriyal mutasyonlar için patogenetik bir rol hariç tutulamaz. Keza; nörodejenerasyon'un, ya yaşlanmanın sekonder sonucu olarak bazı dokularda mitokondriyal mutasyonların birikimi ile yada diğer bazı processler ile ilgili olması ihtimal dahilindedir. Anormal mitokondriyal metabolizmaların, aile çalışmalarında mutasyon hızını artıracak muhtemeldir. Mutasyonların birikimi ile ilgili bir diğer ihtimal, mtDNA replikasyonu ve tamiriyle ilgili nükleer gen ürünlerinin mutasyonları hızlandıran allellere sahip olmasıdır. Bu durum belirli ailelerde mutasyonların birikimine sebep olur. Mitokondriyal delesyonlara sebep olan bir nükleer lokus kromozom 10q üzerinde gösterildiği bildirilmiştir ²⁰. Mutasyonlar popülasyonda sıklıkla ortaya çıkabilir fakat seleksiyon yoluyla elimine edilebilirler. Farklı nükleotid pozisyonları mutasyon eğiliminde farklılıklar gösterir. Filogenetik çalışmalar, kontrol bölgesindeki nükleotid pozisyonları arasında genetik evrim hızı açısından 10-20 kat fark olduğunu ortaya koymuştur. Howell ve arkadaşlarının mutasyonlar tesbit ettikleri iki kontrol-bölge pozisyonunda oldukça hızlı değişimler görülmesi, bu iki pozisyonun insanlar arasında ileri derecede polimorfik olduğu ile bağdaşmaktadır ^{20, 9}.

20, 23-25

Birçok yaygın hastalığın genetik temeli karmaşıktır ve tek-gen mendelian kalıtımı gibi basit değildir. Aynı klinik tabloyu oluşturan farklı noktalarda mutasyonlar veya farklı etyolojik faktörler olabilir. Aynı klinik ve patolojik tabloya sahip hastaların tamamında mutant mtDNA bulunamayabilir. LHON'li hastalarda tesbit edilen, nt 3460, 11778, 14484'de primer LHON mutasyonlarının asıl patogenetik faktör olduğunu destekleyen en güçlü kanıtlardan birisi; aynı popülasyon içerisinde bu mutasyonların birkaç kez tekrar etmesi ve daima aynı oftalmolojik bozukluklarla birlikte ortaya çıkmasıdır ²⁶. Bir mitokondriyal mutasyonun multiple orjinlerini tam olarak ortaya koymak için phylogenetic analizler yapılmalıdır. Filogenetik analizler ya restriksiyon-bölgesi haritalaması yada nükleotid zincir analizi ile yapılır. LHON, genetik ve epigenetik faktörler arasında karmaşık etkileşimler göstermiştir. Bu etkileşimler diabetes mellitus gibi yaygın hastalıkların subgruplarında mtDNA mutasyonlarını gerektirir. Aslında diabetes mellitusta maternal kalıtım olayı belirgin değildir. Ayrıca; eksternal faktörler mtDNA'yı etkileyebilir; örneğin antiretroviral ilaç olan zidovudine, kas mtDNA'sını eksiltir ve kazanılmış mitokondriyal myopatiye sebep olur. Aşırı beslenmenin mtDNA'da oksidatif hasarı artırabileceği ve bunun sonucu olarak

mitokondri içerisinde disfonksiyonel OXPHOS ortaya çıkacağı tartışılmaktadır. İleriki safhada mitokondri serbest radikallerin kaynağı olacak ve bu radikaller mitokondriyal DNA'ya ve diğer makromoleküllere zarar verecektir. Yine tütün-alkol amblyopili hastalardaki mtDNA mutasyonlarının varlığı genetik ve epigenetik faktörler arasındaki etkileşimi gösterir. Bu mutasyonların, tütün, alkol veya her ikisinin optik sinir üzerine olumsuz etki oluşturmada genetik bir duyarlılık verdiğini gösterir. Ancak tütün-alkol amblyopili hastaların hepsinde mtDNA mutasyonu tesbit edilememiştir. İyonize radyasyona veya alkileyici ajanlara maruz kalan lösemili hastalarda sekonder myelodisplastik sendromlar geliştiği ve sendromun patogenezinde mitokondrilerin rol oynadığı bildirilmiştir^{27, 12, 14, 26, 27}.

Disfonksiyonel mitokondri ile bağdaştırılan birçok hastalık ve özellik, mtDNA ürünleri ile etkileşime giren nükleer gen ürünlerindeki defektlerden kaynaklanabilir. Bu tür etkileşimler, gerçekte homojen genetik bozukluklardaki fenotipik heterojeniteyi taklit edebilir. mtDNA hastalıklarının en farklı özelliklerinden birisi olağanüstü fenotipik heterojenitedir. İleri çalışmalar bunun mitokondriyal kalıtımın 5 özgün karakterinden kaynaklandığını göstermiştir.

1- İnsanlarda mtDNA maternal kalıtmalıdır, paternal mitokondrinin önemsiz bir katkısı mevcuttur. Bu nedenle patojenik mtDNA mutasyonlarının sebep olduğu hastalık durumları maternal çizgi boyunca yoğunlaştırılmıştır.

2- OXPHOS hastalıklarına sıklıkla heteroplazmik mtDNA mutasyonları sebep olur. Bunlarda her bir hücrede normal ve mutant mtDNA mevcuttur. Hücre bölünmesi ve mitokondriyal proliferasyon "replicative segregation" olarak isimlendirilir. Hücreler değişik oranlarda mutant ve normal DNA'lar ile doldurulmuştur.

3- Bir dokuya bir mtDNA mutasyonunun etkisi, hücrenin mitokondriyal ATP üretimine olan ihtiyacına bağlıdır. Her bir hücre veya doku normal fonksiyonunu sürdürmek için minimal seviyede ATP üretimine ihtiyaç duyar. Bu yüzden mtDNA mutasyonları ATP üretiminde bir azalmaya sebep olduğu zaman, ATP seviyesi çeşitli dokuların ekspresyon eşiği altına düştüğü için hücresel dejenerasyon ve ölüm olur. Santral sinir sistemi gibi en yüksek seviyede ATP ihtiyacı duyan organ sistemleri bu durumdan en fazla etkilenecektir.

4- mtDNA eş anlamlı ve insertion tipi mutasyonları, nükleer OXPHOS genlerinden yaklaşık 10 kat daha hızlı tamir eder. mtDNA oldukça sınırlı bir genom olduğu için patojenik mtDNA mutasyonlarının yaygın olması beklenir.

5- Somatik hücre mtDNA mutasyonlarının birikmesine paralel olarak yaşlanmayla OXPHOS fonksiyonu azalır. mtDNA'nın yüksek mutasyon oranının

sebebi; OXPHOS ile oluşan serbes radikallere yakınlığı, koruyucu histonlarının olmaması ve sınırlı mtDNA tamir mekanizmasıdır.^{2, 13, 14}

Homoplazmik mutasyonlar tüm dokularda aynıdır. Heteroplazmik nokta mutasyonlarının oranı doku tipine göre değişiklik gösterir. Büyük yapısal mutasyonlar, delesyon gibi, iskelet kası analizi gerektirir. Fakat, mtDNA mutasyonlarını göstermede spesifik ve sensitif olan tüm genomu tarama testi oldukça zordur. Mitokondriyal hastalıkların çoğusu için patogenetik mitokondriyal mutasyon heteroplazmiktir. Heteroplazminin ve doku veya organların solunum-zinciri disfonksiyonuna farklı duyarlılıklarından dolayı, mutasyonlu bir ailenin fertleri asemptomatikten çocukluk döneminde ölüme kadar değişen, farklı derecelerde klinik semptomlar gösterir. Bu yüzden çok sayıda jenerasyonu kapsayan ve çok sayıda aile bireyini içeren bir pedigree iyi analiz edilmez ise, maternal geçiş olayı gözden kaçırılabilir. Eğer heteroplazmi yaygın ise ve dokular arası yayılımı farklı ise, doku tipiyle bireyleri tanımlamada mtDNA kullanılacaksa bu durum gözden kaçırılmamalıdır. Bir veya birkaç molekülden PCR amplifikasyonu yapılarak, dokudaki nadir bir varyantın varlığı gösterilebilir. Heteroplazmik mutasyonlarda, normal/mutant mtDNA oranı bir doku içerisinde değişkendir. Örneğin; iskelet kasında bu oran liften-life değişiklik gösterebilir. Dokular arası ve doku içinde başlangıçta olan bu farklılık, embriyogenezis esnasındaki mitotik segregasyon ile tayin edilir. Bu oranlar zamanla, moleküler, organel, hücresel, doku ve organizmal seviyelerde karmaşık seleksiyon zorlamalarından dolayı değişiklik gösterir. Mesela; mtDNA'da 4977 bp delesyonu şeklindeki mutasyonun somatik dokularda yaşlanma ile spontan bir şekilde arttığı gösterilmiştir²³. Mitokondri, bir hücre içerisinde statik bir yapı değildir. Dinamik morfolojik değişikliklere maruz kalır. Missens mutasyonlar iki farklı klinik fenotip ile eşleştirilmiştir: Elektron-transport zincir polipeptitlerindeki değişiklikler LHON ile sonuçlanmıştır ve ATP Sentaz-6'yı etkileyen bir mutasyon ya nörojenik kas zayıflığı, ataksi ve retinitis pigmentosa (NARP) yada Leigh sendromuna sebep olur. LHON mutasyonları genellikle homoplazmiktir fakat NARP ve Leigh hastalıklarında ki mutasyonlar heteroplazmiktir. Mitokondriyal DNA delesyonları; delesyonun iki mtDNA replikasyon orijininden birisini ortadan kaldırıp-kaldırmamasına bağlı olarak iki gruba ayrılır. Birinci gruptaki delesyonlar (O_H+ , O_L+), replikasyon orijinlerinin her ikisinde korur fakat mtDNA'nın başka herhangi bir parçasını ortadan kaldırabilir. Bu delesyonlar sıklıkla direk tekrarlar içerisinde ortaya çıkar ve sıklıkla iki major fenotiple birliktedir: Pearson marrow-pancreas sendromu ve ocular myopatiler ve chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), daha ileri formu

Kearns-Sayre sendromu (KSS). İkinci gruptaki delesyonlar O_L 'yi ortadan kaldırırlar. Bu tip delesyonlar birkaç sporadik multisistem hastalıklı çocukta görülmüştür. Leigh hastalığındaki gibi, büyük mitokondriyal defektler öldürücü olabilir. Bu durum yaşlandıkça heteroplazminin sıklığında bir artış olması gerektiğini düşündürebilir. mtDNA mutasyon birikim hızı nükleer DNA'dan çok daha hızlıdır. ^{2, 9, 12, 14, 20, 25, 26}

Tanımlanmış ilk patojenik mtDNA mutasyonları, Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON), Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber Disease (MERRF), Kearns-Sayre Syndrome (KSS) gibi nadir sendromlarla birlikte idi. Günümüzde mtDNA ile ilgili tanımlanmış hastalık sayısı artmıştır. Bazı mtDNA hastalıkları şunlardır, Progressif External Oftalmopleji (PEO), Pearsons Marrow-Pancreas Sendromu, Wolfram sendromu, Leigh Hastalığı, Alzheimer Hastalığı, Neuropathy-Ataxi-Retinitis Pigmentosum (NARP). Bir özelliğin veya bir hastalığın mitokondriyal olup-olmadığını tesbit etme sürecinde: maternal kalıtımı araştırmak için pedigrî analizleri, alternatif aday mutasyonları belirlemek için bütün mitokondriyal genomun zincir analizi, filogenetik analizler, solunum zincirinde ve sitokrom oksidaz kompleksindeki fonksiyonel değişiklikleri saptamak için biyokimyasal analizler yapılmalıdır. Analiz edilen hastalığın etyolojisi çok karmaşık olduğunda, klinik semptomların penetransı çok düşük ve/veya çok değişken olduğunda, aday mitokondriyal mutasyonlar çok nadir olduğunda, patojenitenin tesbiti çok zor ve problemlidir. ^{9, 14, 26}

Yukarda bahsedilen hastalıklarla ilgili mitokondriyal mutasyonları araştırma çalışmaları, OXPHOS bozukluklarının spektrumunu ve sıklığını belirlemeği ve kataloglamayı sağlamıştır. Fakat, iki önemli klinik ve biyolojik duruma katkıda bulunan faktörlerin tam olarak ortaya konulması mümkün olmamıştır: Penerans ve doku spesifitesi. Bu iki konu sıklıkla genotip-fenotip uyumu ile bir bütün olarak ele alınmıştır. Fakat bu iki durumun herbirisi için farklı bir moleküler işleyiş ortaya çıkınca, birbirinden ayrılmak zorunda kalmıştır. Mitokondriyal mutasyondan kaynaklanan işitme kaybı bu durumu açıklamakta yardımcı olabilir. İşitme kaybı, kalıttan dolayı, sonradan kazanılmış, heteroplazmik ve homoplazmik mitokondriyal mutasyonlardan dolayı ortaya çıkmış olabilir. Sistemik nöromüsküler sendromlarla birlikte görülen kazanılmış mitokondriyal mutasyonlardaki işitme kayıpları en kolay açıklananlardır. Bu vakalarda, kas ve sinir dokularında yüksek seviyelerde heteroplazmik mutasyonlara rastlanmıştır. Kas ve sinir dokusunun fazla enerji ihtiyacından dolayı ve az sayıda disfonksiyonel kas ve sinir hücresi bir çok komşu normal hücrenin fonksiyonunu bozabileceğinden dolayı, bu dokulardaki mtDNA mutasyonlarının zararlı olacağı düşünülmektedir. Yaygın

nöronal disfonksiyonun keza işitme sistemindedeki etkili olması beklenir. Yapılan çalışmalarda, işitme kaybına sebep olan homoplazmik veya homoplazmiğe yakın 1555 ve 7445 mutasyonlarına sahip aile bireylerinin bir kısmında işitme kaybı görülürken bir kısmı tamamen normal bulunmuştur²⁸. Bu mutasyon çalışmaları fenotipik ekspresyonu düzenleyen üç faktörü belirlemiştir. Bu faktörlerin hepsi hücrede OXPHOS kapasitesinin seviyesini etkiler. Birinci faktör çevresel ajanlardır ki, aminoglikozidlere bağlı sağırliklar buna çok güzel örnektir. Ayrıca oksijen-radikal oluşumunu etkileyen diyet ve ilaçlar çevresel etkenlerdendir. Bleomycin veya iyonize radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel ajanların, oksijenden bağımsız bir şekilde selektif olarak mtDNA'ya hasar verdiği bilinir²⁷. İkinci faktör, mitokondriyal genom kalıntılarıdır. Üçüncü faktör, nükleer genlerdir. Penetrans, bir hücre üzerine mitokondriyal, çevresel ve nükleer faktörlerin ortak etkisiyle farklı klinik tabloların ortaya çıkmasının göstergesidir. Yine iki farklı mekanizma doku spesifikliğini izah etmemize yardımcı olur. İlki; mitokondriyal ribozomların veya OXPHOS komplekslerinin doku-spesifik subünitleri, muhtemelen yalnızca fonksiyon gördükleri dokulardaki mitokondriyal defekt ile spesifik olarak etkileşirler. İkincisi; mitokondriyal genlerin OXPHOS'daki fonksiyonlarına ilave fonksiyonlara sahip olmaları ile ilgilidir. Mitokondriyal mutasyon, mitokondriyal genin dokuya spesifik sekonder fonksiyonuna engel olur.²⁸

2. 5. Polimorfizm ve Mutasyon Tanımı.

Vücudun herbir hücresinde birçok farklı protein üretilir. Bu proteinler, vücudun gelişiminden ve metabolik işlevlerinden sorumlu enzimleri ve yapısal komponentleri içermektedir. DNA ile sentezlenen protein arasındaki temel ilişki; polipeptid zincirindeki amino asit dizisinin kodlayıcı DNA dizisindeki bazlara spesifik olmasıdır. Yani, polipeptid dizisindeki aminoasit sırasını DNA'daki baz dizisi belirler. Bu yüzden DNA baz dizisindeki bir nükleotid değişikliği, varyant proteinlerin oluşumuna yol açabilir. Varyant proteinler ise organizmanın bazı özelliklerini değiştirebilir. Bir polipeptidin primer amino asit zincirini değiştirmeyen veya polipeptidin kritik olmayan bölgesinde ortaya çıkan değişiklikler fenotipik değişikliğe neden olmayabilir. Bu nedenle tüm varyant proteinler klinik bir sonuç doğurmazlar. Hatta normal şartlarda birçok protein, nisbeten yaygın, genetik olarak farklı ve yapısal olarak ayrı formlarda organizmalarda mevcuttur. Bu durum "polymorphism" olarak bilinmektedir. Yani DNA molekülündeki nükleotid dizi farklılıkları polimorfizm olarak adlandırılır. Polimorfizm çalışmaları genelde popülasyonların incelenmesi için ve bir türün genetik gelişiminin ortaya

konulması için kullanılır. Polimorfizmler mutasyonlardan farklı olarak organizmada işlev bozukluğu yapmazlar ve bir patolojiye sebep olmazlar.^{10, 29}

Mutasyon; DNA'da kalıcı değişiklik olarak tanımlanmıştır. Bu değişiklik, genomdaki DNA'nın tertibinde veya nükleotid zincirinde görülen değişikliktir. Mutasyon oranı tahminlerinin çoğu, fenotip üzerine açık bir etkisi olan olumsuz mutasyonların tespitine dayanmaktadır. Birçok mutasyon olumsuz değildir, fakat selektif olarak nötral oldukları düşünülür. Her zigotta, ebeveynlerin her ikisinin de genomlarında bulunmayan 100 kadar yeni baz çifti kombinasyonu oluşması olasıdır. Bu varyasyonlar, sadece kodlayıcı bölgelerde (ekzon) değil, aynı zamanda ekstragenik (intron) bölgelerde ve kromozomların noncoding, heterokromatik bölgelerinde de oluşabilir. Evolüsyoner süreçte, yeni nükleotid varyasyonlarının sürekli oluşması ileri derecede bir genetik farklılığın ve bireyselliğin ortaya çıkmasına imkan verir.¹⁰

Birçok lokus birkaç yaygın allel ile karakterize edilmiştir. Bu alleler, popülasyonun üyelerini farklı fenotiplerde sınıflandırmaya imkan verir. "Genetik polimorfizm" bir lokusta çok sayıda allelin ortaya çıkması olarak tanımlanabilir. Bir lokusta en az iki allel %1'den daha fazla bir sıklıkta görülür. Polimorfik lokuslarda popülasyonun en az %2'si heterozigottur. Polimorfik lokuslar, çok sayıda farklı alleller ile karakterize edildiği için, aynı lokustaki heterozigozite oranı çok yüksektir. Sıklıkları %1'den az olan alleller nadir varyantlar olarak isimlendirilir. Pratikte, DNA varyasyonlarını göstermek için en yaygın olarak kullanılan yaklaşım, klonlanmış DNA problemleri ile belirli bir DNA bölgesinde restriksiyon enzim sahasını incelemek için Southern blot tekniğini kullanmaktır. Bu tekniğin önemli avantajı, genomdaki milyonlarca diğer fragmentler arasında genomik DNA'nın aranan veya hedeflenen tek bir fragmentinin gösterilmesine imkan vermesidir.¹⁰

Herhangi iki insanın genomları arasında, tüm nükleotid dizileri gözönüne alındığında 1/100-1/500 oranında nükleotid farklılığı beklenmektedir. Yani aynı türün iki farklı genomu arasında mutasyonların da birikimi ile 10 milyondan fazla baz değişikliği beklenir. Bu farklılık; klonlanmış DNA problemlerinin kullanıldığı birçok geniş araştırmalardan, genomda herhangi rastgele seçilmiş DNA parçaları için polimorfik baz pozisyonlarının toplam oranı (DNA heterozigozite indeksi) 270 baz çiftinde yaklaşık 1 olarak tahmin edilmiştir. Bu oran, genomun protein kodlayan bölgeleri için tahmin edilen heterozigot nükleotid oranından (yaklaşık 2500'de 1 baz çifti) yaklaşık 10 kat fazladır. Bu farklılık şaşırtıcı değildir. Çünkü, protein kodlayan bölgelerin çok daha katı selektif baskı altında olduğu ve bu yüzden gelişim boyunca bu bölgelerdeki mutasyon insidansının daha düşük olduğu tahmin edilmektedir¹⁰.

Mitokondriyal DNA'nın keşfinden sonra, genetik değişimin hızlı olduğu non-koding D-loop bölgesi üzerinde yapılan çalışmalar, insan mitokondriyal genomunun bu bölgesi için germ-line mutasyon hızı 50 jenerasyonda 1 olarak bildirilmiştir. Fakat mutasyon hızı hesaplamalarında farklı analiz yöntemleri kullanıldığından ve bazen popülasyona yerleşmemiş mutasyonlar hesaba katıldığından dolayı farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Farklı metodların kullanılması konuyu daha da karmaşık yapmaktadır. mtDNA dizi analizi sonuçları, insan mtDNA'sında kodlanmayan D-loop bölgesinin genetik gelişiminin, standart filogenetik yöntemlerle bildirilenden çok daha hızlı ve çok daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Filogenetik analizler, mtDNA gelişim hızını hesaplamak için kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu yöntemde; bireylerin mtDNA nükleotid dizileri kullanılarak farklı yöntemlerle filogenetik bir ağaç oluşturulur. Ağacın her bir dalı boyunca mutasyon sayıları ortaya çıkarılır. Sonuçta ağacın yaşı hakkında tahminler yapılır. Filogenetik metodla yapılan bir çalışmada insan mtDNA'sının iki hipervaryabl bölgesinin değişim hızı %7-%22 /milyon yıl olarak hesaplandığı bildirilmiştir. On-yedi Avrupalı ve Afrikalı popülasyonun dahil edildiği geniş mitokondriyal genom analizlerinde, hipervaryabl I ve II bölgelerinin mutasyon oranları açısından anlamlı bir farklılık göstermediği ortaya konulmuştur¹⁸. Fakat mtDNA'nın konstant bölgelerinde bu oran yaklaşık %2-%4 /milyon yıl olarak bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise bu oran 0.2-0.6 /milyon yıl olarak bildirilmiştir. Genealogical yaklaşımlar, filogenetik yaklaşımla hesaplanandan çok daha yüksek mitokondriyal genom mutasyonu olabileceğini göstermiştir. Bu verileri değerlendirmek için coalescent modeli kullanılmıştır. Coalescent modeller, bir genin (mtDNA bir gen olarak kabul edilmektedir) bütün allellerinin bir tek allelden kaynaklandığını varsayar. Coalescent modelinde insanlık tarihi hesabı, nükleotid heterozigozitesi sıklığı ve popülasyonun büyüklüğü ile bağlantılıdır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada mtDNA D-loop hipervaryabl I bölgesinin değişim hızı %110/milyon yıl olarak hesaplanmıştır⁶. Bu değer filogenetik yaklaşımlarla hesaplanandan çok daha yüksektir. mtDNA mutasyonları zamandan ve türden bağımsız olarak artış göstermez. Ayrıca bazı mitokondriyal serilerde diğerlerinden çok daha yüksek genetik gelişim hızı olabilir. Diğer bir konu, mtDNA'nın yüksek oranda ileri mutasyonlara ilaveten, yüksek oranda geriye doğru bir mutasyon hızına da sahip olmasıdır. Böylece patolojiye sebep olan bir mutasyon popülasyona yerleşmeden önce tersine bir mutasyon ile ortadan kaldırılabilir. Hatta organizmaya avantaj sağlayan faydalı etkilere sahip bir mutasyon ihtimali, düşükte olsa, vardır.^{6, 10,}

Farklı insanlarda aynı genetik materyalin farklı versiyonlarının bulunması, insan genetikçileri için çalışmalarını farklı alanlara kaydırmıştır. Polimorfizm ilk kez kan grupları çalışmalarında ortaya konmuştur. Polimorfizmler, aile çalışmalarında bir genin farklı kalıtılan formlarının ayırımında genetik marker olarak kullanıldıklarından oldukça değerli hale gelmiştir. Medikal genetikte polimorfizmlerin kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- Linkage analizleri ile bireysel kromozomların gen haritalaması,
- Genetik hastalıkların presemptomatik ve prenatal tanısı
- Heterozigot genetik hastalık taşıyıcıların belirlenmesi
- Koroner kalp hastalığı, kanser, diyabet gibi yaygın erişkin hastalıklarına yatkın yüksek ve düşük riskli bireylerin değerlendirilmesi
- Paternity testi ve hukuki problemlerin çözümüne yardım
- Doku ve organ transplantasyonları için varici-alıcı uygunluğunun araştırılması.¹⁰

Son zamanlarda birçok çalışmada sağlıklı kabul edilen bireylerde mtDNA analizleri yapılmıştır. Bu çalışmaların amacı mtDNA haplogrouplarını tesbit etmek ve mtDNA polimorfizmini ortaya koymaktır. İnsan popülasyonundaki mtDNA polimorfizm çalışmalarında, restriksiyon enzim analizleri veya D-loop kontrol bölgesi hipervaryabl segment zincir analizleri esas alınmıştır²⁵. Hayvan mtDNA'sının restriksiyon endonükleaz analizi, zincir varyasyonunun belirlenmesinde güçlü bir metod olmuştur. Örneğin türler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. İnsan mtDNA'sının restriksiyon enzim analizleri bireyler arasındaki varyasyon miktarının çok yüksek olabileceğini göstermiştir³⁰.

mtDNA'nın en değişken bölgesi (hypervariable bölge), 16204-00576 bp arasındaki 1122 bp uzunluğunda olan, kodlanmayan kontrol bölgesidir. Sağlıklı bireylerin mtDNA'ları, PCR amplifikasyonu ve endonükleazlarla yüksek rezolüsyonlu restriksiyon analizi ile incelenmektedir. Bu tip analizler; mtDNA zincirinin yaklaşık %20'sindeki varyantların taranmasına ve çok sayıda mtDNA varyantlarının varlığı veya yokluğu ile tanımlanan kompleks haplotiplerin tesbit edilmesine imkan sağlamaktadır. Harihara ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1988), 13 adet restriksiyon enzimi ile Asya kökenli 5 farklı popülasyonda mtDNA polimorfizmi ortaya konulmuştur. Yerli Amerikalılarda yapılan başka bir çalışmada, dört major mtDNA haplogrubu (A, B, C, D) tanımlanmıştır. Bu primer mitokondriyal markerlere ilaveten bu haplogruplarla birlikte görülen sekonder polimorfizmler de ortaya atılmıştır. mtDNA rekombinasyona uğramadığı için, birlikte aktarılan polimorfizmler bağlantılı bir grup olarak maternal geçiş gösterir. Fakat bu dört gruba uymayan bireylerin, paralel mutasyon veya Kafkas

gen karışımından kaynaklanmış olabileceği ileri sürülmüştür. Daha sonra D-loop zincir analizi üzerine yapılan çalışmalarda, paralel mutasyonlarla açıklanamayan haplotipler gösterilmiştir. Muhtemelen haplotip sayısı 10'dan fazladır. Haplotiplerin ortaya çıkmasını sağlayan üç mekanizma mutasyon, matrilineal geçiş ve gen karışımı olup, mitokondriyal genotip farklılıklarının sebebi bunların herhangi birisi olabilir^{5,30-34}.

Mitokondriyal DNA patolojileri açısından COX I geninin 7444. nükleotidinde ve CYTB geninin 15257. nükleotidindeki mitokondriyal mutasyonların primer LHON mutasyonları olduğu bildirilmiş, fakat aynı etnik grubun sağlıklı kontrol bireylerinde de her iki mutasyon düşük sıklıklarda gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada ise, ND4 geninin 11084 nükleotidindeki bir mutasyonun MELAS-benzeri bir hastalığa sebep olduğu bildirilmiş fakat sonradan, bu nükleotid değişikliğinin patogenetik olarak benign olduğu fakat etnik olarak Oriental'larda spesifik polimorfizm olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada, COX III geni 9438. nükleotidindeki mutasyon LHON hastalarında primer patogenetik faktör olarak sunulmuş fakat daha sonra bu mutasyonun Afrikalı ve Kübalı normal kontrollerde de bulunduğu ve primer LHON mutasyonu olmadığı gösterilmiştir. Belki de Afrikalı ve Kübalılarda 9438 mutasyonunun, ya Kafkas olmayan mitokondriyal haplotiplerin fenotipik etkilerinden yada nükleer genetik farklılıklardan dolayı veya epigenetik/çevresel faktörlerden dolayı çok düşük insidans göstermesi olarak yorumlanabilir. Bu nedenle, etyolojide etnik spesifik farklılıklar gözardı edilmemelidir^{7, 9}.

26, 31-33

Shoffner ve arkadaşları belirli mitokondriyal zincir değişikliklerini, alzheimer ve parkinson hastalarında aynı etnik kökenli kontrol grubundan çok daha fazla oranda bulmuşlardır. Ancak bu mitokondriyal mutasyonlar için patogenetik bir rolü isbat etmek zordur, çünkü nörodejeneratif hastalıklarla mitokondriyal mutasyonların artmış birlikteliğini açıklamada uyumsuzluklar vardır. Örneğin bu normal kontrol grupları henüz hastalığı geliştirmemiş olabilirler veya bu bireyler etkilenmemiş olabilirler²⁶.

mtDNA'nın bir diğer özelliği, nükleer gen dizilerine göre daha kolay parçalanmasıdır. Bu durum mtDNA'nın daha yüksek oranda polimorfizm göstermesine neden olur. Ayrıca etnik ve coğrafik köken polimorfizmi belirleyen diğer öğelerdir. Japonlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 15 adet restriksiyon enzimi kullanılarak mtDNA analizleri yapılmıştır. Bu onbeş enzimden 11'i en az bir atipik kesim paterni göstermiş ve 22 mtDNA morfolojisi ortaya çıkmıştır. Bu çalışma sonucunda Japon popülasyonunun ileri derecede mtDNA farklılığı gösterdiği kanısına varılmış ve mtDNA nükleotid değişim hızı bir yılda ortalama için 2×10^{-8} olarak hesaplanmıştır³⁵. Bir başka

çalışmada, farklı coğrafik ve etnik kökenli 21 birey analiz edilmiş ve baz değişim hızı her bir 10^6 yıl için %1 olarak hesaplanmıştır³⁶. Doğu Asya kökenli 5 farklı grup (Japanese, Ainu, Ryukyans, Koreans, Chinese) üzerinde yapılan bir çalışmada D-loop bölgesine ait 482 bazlık zincir (16129-16569) analizi yapılmış ve 207 farklı tip dizi elde edilmiştir³⁷. Bunların 189'u kendi popülasyonlarına özgün, 18'i iki veya üç grup arasında ortak dizi olarak bulunmuştur. Toplam 293 bireyin incelendiği bu araştırmada, % 1.34 oranında nükleotid farklılığı hesaplanmıştır. Bu oran, tüm mtDNA'nın restriksiyon enzim analizi ile hesaplanan orandan 3-4 kat fazladır³⁷. Afrika kökenlilerde daha yüksek bir oran (%2.08), Avrupalılar için daha düşük bir oran (%0.95), Amerikan yerlileri için ise benzer bir oran (%1.29) hesaplanmıştır. Bireysel diziler arasındaki hesaplanan bu nükleotid değişim sayıları kullanılarak filogenetik bir ağaç oluşturulmuştur. Bu 5 grubun her birisinin üyelerinin büyük çoğunluğu, 2-5 polimorfik bölge kombinasyonunu paylaşıyordu. Japonların %25.8'i Çin popülasyonuna spesifik dizileri, %24.2'si Kore popülasyonuna spesifik dizileri, %50'si Kore ve Çinlilerin her ikisine spesifik dizileri taşımakta idi. Diğer gruplar ise daha düşük oranda bir diğer grubun spesifik dizisini taşımakta idi. Yukarıdaki her bir grubun kendi içerisinde, bireyler arasında atipik morfolojili mtDNA oranı çok düşük olarak gözlenmiştir. Bu düşük ihtimal, ortak bölge kayıplarından (delesyon) ziyade, ortak olan bölge kazanımlarının olacağını düşündürmektedir. Çünkü bu çalışmada ortaya konulan ortak atipik morfolojiler bölge kazanımı şeklindedir^{8, 32, 35-38}.

Popülasyonların kaynağını belirlemek için mtDNA varyasyon çalışmaları yapılmıştır. Moğol popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada, Moğol popülasyonunun %64 oranında Amerikan yerlilerinde bulunan haplotipleri taşıdıkları tesbit edilmiş ve Moğol ve Amerikan yerlilerinin yeni dünya kurucularının en muhtemel orijinleri olduğu fikri ileri sürülmüştür³⁹.

mtDNA üzerine yapılan çalışmaların geliştirilmesindeki en büyük engel; mtDNA mutasyonlarının ortaya çıkması, ailelere ve popülasyonlara yönelmesi ve organel-hücre-birey-popülasyon seviyelerinde kararlı hale geçmesi şeklindeki karmaşık işlemin tam olarak algılanamamış olmasıdır. Ayrıca ileri yaşlarda, hem somatik mtDNA nokta mutasyonları hemde mtDNA delesyonları az da olsa artış göstermektedir. Son birkaç yılda sağlıklı bireylerde, bireyin ileri yaşıyla birlikte uzun yaşamlı postmitotik dokularda birikimden dolayı patojenik mtDNA mutasyonlarının çok düşük seviyelerde varlığı gösterilmiştir. Bu durum konuyu dahada karmaşık hale sokmaktadır.^{6, 21}

2. 6. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

RFLP, polimorfizm çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PCR ile çoğaltılan DNA molekülü, uygun bir Restriksiyon Enzimi (RE) ile kesilerek jelde yürütülür. Ethidium bromide ile boyanarak kesilen DNA molekülünün fragmentleri görünür hale getirilir. Restriksiyon enzimleri DNA molekülünde spesifik tanıma dizilerine sahiptir. DNA molekülünde kalıttan veya yeni bir mutasyondan kaynaklanan dizi değişiklikleri, spesifik kesim bölgesinin kaybolmasına veya ortaya çıkmasına sebep olacaktır. Restriksiyon enzim tanıma bölgeleri 4-8 baz uzunluğunda olabilir. RFLP tekniğinde birkaç yüz enzim kullanma şansı olduğu için, verilen DNA fragmentinin geniş analizi mümkün olur. Bu şekilde popülasyondaki, seçilmiş bu DNA molekülünün dizi farklılıkları tesbit edilebilecektir. Bu biçimde tespit edilen restriksiyon bölgelerindeki DNA-baz değişiklikleri "restriction fragment length polymorphisms" olarak isimlendirilir. mtDNA RFLP çalışmaları, farklı etnik gruplarda yapılmış ve mtDNA zincir değişiklikleri insanoğlunun filogenetiğini oluşturmak için kullanılmıştır³⁰. Bu yöntem aynı zamanda mutasyon taramaları için de kullanılır. RFLP, DNA'nın delesyon ve insersiyonlarında tek nükleotid değişikliklerinden daha fazla artabilir. Eğer iki kesim bölgesi arasındaki DNA segmenti delesyona veya insersiyona uğrarsa sonuçta kesilen parçanın büyüklüğü değişir. RFLP ile yapılan popülasyon çalışmalarında elde edilen her bir farklı kesim noktası bir baz değişikliği olarak hesaplanmıştır^{36, 7, 10, 34, 35}.

Bazı DNA polimorfizmleri nükleotid değişikliklerinden çok DNA'nın insersiyon veya delesyonuna dayandırılmıştır. Restriksiyon enzimleri ile yapılan çalışmalarda mtDNA'nın bu enzimlerle kesilme farklılıkları temel alınarak popülasyona spesifik mtDNA morfolojileri tiplendirilmiş, toplumlar arası benzerlikler veya farklılıklar, etnik bağlantılar ortaya konulmuştur. MtDNA morfolojileri yapılırken çok sayıda restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. mtDNA polimorfizm analizleri, farklı ırk ve coğrafik orjinlere mensup bireyler arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Yakın coğrafik yerleşim gösteren popülasyonlar arasında restriksiyon enzimleri ile ortaya konulan mtDNA morfolojilerinde benzerlikler vardır. Restriksiyon enzim analizlerinin bir sonraki basamağı zincir dizi analizidir. İnsan mitokondriyal genomunun zincir analizleri, mitokondriyal hastalıkların moleküler patolojisinin ortaya konmasında, gelişim ve sistematik çalışan biyologlarca coğrafik orijinin, ilk popülasyon dinamiklerinin ve modern insan tarihinin hesaplanmasında kullanılmaktadır^{6,10, 34, 36, 39-41}.

2. 7. Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR; bir gen yada DNA bölgesinin, spesifik oligonükleotid primerleri kullanılarak replikasyon ile çoğaltılması işlemidir. PCR, normal veya mutant bir DNA dizisinin *in vitro* ortamda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. PCR'dan ilk kez 1985'de Kary Mullis bahsetmiş daha sonra bu teknik Saiki tarafından geliştirilmiştir. PCR'ın bulunması moleküler genetikte devrim olmuştur. Tıp, moleküler biyoloji, arkeoloji gibi birçok bilim dalında uygulama alanı bulmuştur. Bu yöntemle 1-2 hücreden elde edilen DNA parçası çoğaltılmakta ve farklı amaçlar için kullanılabilir. ^{7, 42}

PCR'ın yapılabilmesi için ortama, çoğaltılacak çift sarmallı DNA fragmenti, bu fragmente uygun bir çift primer, DNA polimeraz enzimi, deoksiribonükleotid trifosfatlar ve uygun tamponlar konulmalıdır.

PCR üç evreden oluşur:

- 1 -- çift sarmallı DNA'nın denaturasyonu
- 2 -- primerlerin bağlanması (annealing)
- 3 -- nükleotidlerin bağlanması (extension)

Birinci evrede çift sarmallı DNA 95-100 °C ısıtılarak denatüre edilir. Uygun denatürasyon ortamı 95 °C'de 30 sn. yada 97 °C'de 15 sn.'dir. Yani sıcaklık artırılır ise süre kısaltılmalıdır. Çoğaltılacak nükleotid dizisi RNA ise; önce revers transkriptaz ile DNA kopyesi yapılır, sonra PCR uygulanır.

İkinci evrede ortama konulmuş olan primerler, denatüre DNA molekülü üzerindeki spesifik bölgelerine bağlanırlar. Primerler bir çift olarak hazırlanır. Primer uzunluğu minimum 17-19 baz kadardır. Primerin boyu uzadıkça spesifitesi artar fakat bağlanması zorlaşır. Birinci primer çoğaltılacak DNA'nın bir dalına bağlanırken, ikinci primer diğer uçtan DNA'nın ikinci dalına bağlanır. Bu şekilde çift zincirli DNA molekülünün her iki zinciride aynı anda sentezlenmiş olur. Primerlerin uygun bağlanma ısı 40 – 60 °C' dir. Genelde 55 - 72 °C' de 0.2 µM primer konsantrasyonu ile birkaç saniye yeterli olur.

Üçüncü evre nükleotidlerin, kalıp DNA'ya komplementer olacak şekilde primerlere bağlanmasıdır. Bu işlem için yüksek sıcakta faaliyet gösterebilen *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen *Taq Polimeraz* enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim optimum 70-75 °C'lik sıcaklıkta aktivite göstermekte olup, 72 °C'de ortam şartlarına bağlı olarak saniyede 35-100 bazlık uzama sağlar. ⁷

Bu üç evre bir döngü kabul edilir ve bir PCR işleminde 20-40 döngü yapılır. Bir döngü sonunda çoğaltılacak DNA molekülü öncekinin iki katına çıkar. PCR işlemi

tamamlandığında hedef nükleotid dizisinin birkaç milyon katı yapay olarak elde edilmiş olur ve bir çok alanda kullanılır. Bu işlemi birkaç saat gibi kısa sürede yapacak olan cihazlar geliştirilmiştir. Thermo-Cycler adı verilen bu cihazlar üç segmentteki farklı sıcaklık ortamlarını birkaç saniye aralıklar ile ardışık olarak sağlar. Thermocycler sayesinde kısa sürede 20-40 döngü yapılmış olur⁷.



3. MATERYAL ve METOD:

3. 1. Kullanılan Materyaller:

3. 1. a. Olgü Seçimi.

Çalışmamıza yaşları 20 ile 41 arasında değişen, 12'si kadın 29'u erkek toplam 41 sağlıklı birey dahil edilmiştir (Tablo 3 ve Tablo 4). Bu bireylerin 38 tanesi akrabalık açısından bağlantısız, 3 tanesi de restriksiyon enzimi kesim farklılığı gösteren olguların birinci dereceden yakınları idi.

Tablo 3: Çalışmaya katılan bireylerin cinsiyet ve yaşa göre dağılımı

CİNSİYET	YAŞ			Toplam
	20-30	31-40	41-↑	
Erkek	14	14	1	29
Kadın	10	2	-	12
Toplam	24	16	1	41

Tablo 4: Olguların yaş, doğum yeri ve mesleki durumları

Olgu No	Adı-Soyadı	Yaşı	Doğum Yeri	Mesleği
1	E.T.	28	Erzurum	Güvenlik Görevlisi
2	İ.Ç.	31	Erzurum	Sağlık Memuru
3	Ü.D.	32	Erzincan	Polis Memuru
4	E.D.	32	Erzurum	Sağlık Memuru
5	S.A.	23	Erzurum	Sağlık Memuru
6	A.K.	35	İğdır	Doktor
7	M.D.	32	Erzurum	Laborant
8	T.K.	32	Ağrı	Doktor
9	S.D.	29	Erzurum	Güvenlik Görevlisi
10	N.A.	25	Erzurum	Laborant
11	B.O.	28	Erzurum	Güvenlik Görevlisi
12	A.T.	28	Erzurum	Güvenlik Görevlisi
13	N.A.	27	Erzurum	Güvenlik Görevlisi
14	A.G.T.	32	Erzurum	Doktor
15	U.C.	25	Erzurum	Laborant
16	H.D.	23	Burdur	Laborant
17	K.K.	30	Erzurum	Doktor
18	M.T.	25	Erzurum	Hizmetli
19	E.D.	28	Erzurum	Sağlık Memuru
20	S.A.	24	Erzurum	Hizmetli
21	E.A.	31	Erzurum	Hizmetli
22	M.K.	32	Bayburt	Doktor
23	T.B.	33	Erzurum	İlaç mümessili
24	C.İ.	37	İğdır	Sağlık Memuru
25	R.K.	41	Rize	Serbest Meslek
26	K.Ş.	35	Tokat	Doktor
27	M.Ç.	31	Erzurum	İlaç mümessili
28	M.E.E.	31	Gaziantep	Doktor
29	R.T.	25	Erzurum	İlaç mümessili
30	E.B.	24	İzmir	Hemşire
31	S.D.	32	Erzurum	Ev Hanımı
32	Y.E.	24	Trabzon	Hemşire
33	A.E.	25	Erzurum	Hemşire
34	D.Ş.	28	Kars	Hemşire
35	M.H.	23	Erzurum	Tıbbi Sekreter
36	Ş.C.	23	Trabzon	Hemşire
37	A.T.	24	Erzurum	Doktor
38	P.Ö.	22	Erzurum	Öğretmen
39	O.B.	23	Erzurum	Öğrenci
40	B.U.	20	Erzurum	Ev Hanımı
41	M.S.D.	31	Erzurum	Doktor

Çalışmaya dahil edilecek bireyleri seçerken, numuneler alınmadan önce bu bireylere bu çalışmanın amacı hakkında kısa bir bilgi verilmiş ve bu bireylerden anamnez alınmıştır. 41 bireyin 38 tanesi bu şekilde seçilmiş, diğer üç birey *Hinf* I enzimi kesim bölgesi bulundurmeyen kişilerin birinci derece yakınlarından seçilmiştir. Ayrıca bu 38 bireyin doğum yerleri genellikle farklı bölgelerden seçilerek maternal bağlantıdan uzaklaşmaya çalışılmıştır.

3. 1. b. Kullanılan Kimyasal Maddeler.

Pankreatik proteaz (Merck)	8367
Proteinase-K (Sigma)	P-2308
PBS (Biological Industries)	02-020-1B
Trizma bazı (Sigma)	T-8524
Boric Acid (Surechem Products Ltd. Şti)	B-5102
Ethidium Bromide (Sigma)	E-7637
EDTA (Sigma)	E-5134
Glycerol (Sigma)	G-8773
Xylene Cyanole (Sigma)	X-4126
Mineral oil (Sigma)	M-84
Brome Phenol Blue (Fluka)	18030
Agaroz (Sigma)	A-9539
dNTPmix 25 mM each(Epicentre)	D59104.
Taq DNA Polymerase 5 U/mikrolitre (Epicentre)	Q82250

3. 1. c. Kullanılan Primerler:

Çalışmamızda iki ayrı çift primer kullanıldı; ilki mtDNA hipervaryable bölge için (L15996-H16401), diğeri ise konstant bölgeye (L3148 - H3612) yönelikti. Hipervaryabl bölge için kullanılan primer çifti L.15996, 5'-CTC CAC CAT TAG CAC CCA AAG C-3' , H.16401, 5'-TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG-3' şeklinde idi⁴³. Konstant bölge için kullanılan primer çifti, L.3148, 5'-CCT ACT TCA CAA AGC GCC TTC C-3', ve H.3612, 5'-GAG GCC TAG GTT GAG GTT GA-3' şeklinde tarafımızdan dizayn edilmiştir.

3. 1. d. Marker DNA'lar:

Çalışmamızda iki adet marker DNA kullanıldı; Pst I (544 mikrogram DNA/ml) (Sigma. D-1793) ve PhiX 174 (Promega. G176A) Marker DNA'ların fragment büyüklükleri aşağıdaki şekilde idi.

<u>Pst I</u>	<u>Phix 174</u>
11497	1353
5077	1078
4749	872
4507	603
2838	310
2560	271/281
2459	234
2443	194
2140	118
1986	72
1700	
1159	
1093	
805	
514	
468/448	
339	
264/247	
216/211/200	
164/150	
94/87/72	
15	

3. 1. e. Restriksiyon Enzim Seçimi ve Polimorfik Bölge Tayini

Çalışmamızda restriksiyon endonükleaz enzimi olarak 4 farklı enzim kullanıldı. Bunlar, hipervaryable bölge için *Hinf* I ve *Bam*H I enzimleri, konstant bölge için *Alu* I ve *Sau*3A I enzimleri idi. Bu enzimlerin dizi tanıma bölgeleri 4-6 baz uzunluğunda değişiyordu.

Hinf I tanıma bölgesi 5'-G*ANTC-3',

*Bam*H I tanıma bölgesi 5'-G*GATCC-3',

Alu I tanıma bölgesi 5'-AG*CT-3',

*Sau*3A I tanıma bölgesi 5'-*GATC-3' şeklindedir

(* Enzim kesim noktasını göstermektedir).

Standart insan mtDNA dizisine göre, seçtiğimiz hipervaryable bölgede sadece *Hinf* I enzimi tanıma bölgesi ve konstant bölgede de sadece *Alu* I enzimi tanıma bölgesi bulunmaktadır. Diğer iki enzimin ise kesim noktası bu bölgeler için tanımlanmamış idi.

PCR ile amplifiye ettiğimiz hipervariable bölge için kullanılan *Hinf* I enzimi mitokondriyal DNA'nın: 16000 – 16065 nükleotidlerini keserken, PCR ile amplifiye edilen konstant bölge için kullandığımız *Alu* I enziminin tek noktada (–3538–) kesim yapması beklenmekteydi.

3. 1. f. Kullanılan Alet ve Cihazlar.

50 ml'lik plastik falcon tüpü	Greiner
Tahta dil basacağı	
Soğutmalı santrifüj	Harrier 18/80
pH metre	Jenway 3010.
Elektronik terazi	Precisa 160M
Otomatik mikropipetler	Brand marka.
1,5 ml'lik ependorf tüpü	Alpha Lab. Ltd.
0,5 ml'lik ependorf tüpü	Alpha Lab. Ltd.
Su banyosu	Fisher Serological Bath
Thermal-Cycler	Sanyo DNA Amplifier
Magnetik karıştırıcı	Velp Scientifica
Electrophoretic gel	Bio-Rad Sub-cell GT model.
Electrophoretic gel güç kaynağı	Titan power supply
UVB 20 Ultraviolet Transilluminatör	Ultra Lum 305019-001 California
Polaroid kamera (Sigma)	DS 34
Polaroid siyah - beyaz film (Sigma)	Type667
UV bloke edici yüz maskesi (Sigma)	F 8142
Derin Dondurucu	Simtel

3. 1. g. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.

10X TBE; 108 gr. Trizma bazı,

55 gr. Boric asid,

40 ml. 0.5 M EDTA (pH: 8.0),

800 ml distile su

karıştırılıp dd H₂O su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

1X TBE; 10X TBE stok solüsyonundan ayrı bir kaba alınarak dd H₂O ile dilüe edildi.

Ethidium Bromide; 10 mg/ml konsantrasyondaki stok solüsyondan ddH₂O ile hazırlandı. Aliminyum folyo ile sarıldı ve oda ısısında saklandı.

Gel laoding buffer;

%0,4 Bromephenol Blue

%0,4 Xylene Cyanole

%50 Glycerol

kariştırıldı ve filtre edildi.

Pankreatik proteaz; 10 mg pankreatik proteaz 10 ml ddH₂O ile çözüldürüldü. Stok solüsyon hazırlandı.

PCR Amplifikasyon Buffer; 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH:8;3 , 2,5 mM MgCl₂, % 0,45 NP-40, % 0,45 Tween-20, 1mg/ml Gelatin and %1 Sodyum azide⁴³.

Proteinaz-K; 100 mg proteinaz-K üzerine 10 ml ddH₂O eklendi ve çözüldürüldü.

3. 2. Metodlar.

3. 2. a. Materyal alınması.

Materyal alınmadan önce ağız çeşme suyu ile iyice çalkalandı ve eğer mümkünse dişler fırçalandı. 10 ml PBS ile ağız, gargara yapmadan 3 dk. çalkalandı ve 50 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. Tahta dil basacağı ile dil üzerinden 5-6 defa kazıma yapıldı ve bu kazınan hücrelerde aynı tüpe aktarıldı.

3. 2. b. Mitokondriyal DNA'nın Ekstraksiyonu.

Alınan numuneler soğutmalı santrifüjde 3000 g'de 10 dk.santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Pellet üzerine 500 µL PBS eklendi, pipetaj yöntemiyle kariştırıldı. 3000 g'de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellet üzerine 600 µL PCR amplifikasyon buffer eklendi ve pipetajla kariştırıldı. Üzerine 60 µL pankreatik proteaz eklendi ve 37 °C'de 30 dk. bekletildi. Karişım üzerine 60 µL proteinaz-K eklendi ve 55 °C'de 90 dk. bekletildi. Sonrasında 95 °C'de 10 dk. bekletildi. +4 °C'de saklandı.

3. 2. c. PCR Ürünlerinin Elde Edilmesi.

0,5 ml'lik ependorf tüplerinin üzerlerine olguların numaraları yazıldı. Herbir tüpe, numaranın ait olduğu olgunun stok DNA solüsyonundan 10,5 µL, primer-A'dan 2 µL, primer-B'den 2 µL, dNTPmiks'ten 4 µL, 10XPCR Buffer'dan 5 µL, MgCl₂'den 10 µL, master AMP buffer'dan 15 µL konuldu. Buharlaşmayı engellemek için her bir tüpe mineral oil eklenerek, thermal-cycler'a yerleştirildi ve 94 °C'de 5 dakika genel denatürasyon için beklendi Sonra her bir örneğe 2 ünite Taq DNA polimeraz eklendi. Sırasıyla 94 °C'de 45 saniye, 56 °C'de 1dakika, 74 °C'de 1,5 dakika olarak, 32 siklus gerçekleştirildi. Her bir olgunun hem hipervaryabl hem de konstant bölgelerine ait iki

ayrı PCR ürünü elde edildi. PCR ürünlerine endonükleaz enzimleri uygulanmadan önce her bir olgunun PCR ürünü %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 4 ve 5).

3. 2. d. PCR Ürünlerine Endonükleaz Enzimlerinin uygulanması.

Bu işlem için 0,5 ml'lik eppendorf tüpleri kullanıldı. Her olgu için aşağıdaki protokoller ayrı ayrı uygulandı.

Hipervaryabl bölge PCR ürünü	20 μ L
<i>Hinf</i> I enzimi (8 U/ μ L)	1,5 μ L
Albumin (BSA) (20 mg/ml)	1 μ L
<u>Inkübasyon buffer R (10X)</u>	<u>3 μL</u>

Hazırlanan bu karışım 37° C'de yaklaşık 4-6 saat inkübe edildi. Daha sonra 95° C'de yaklaşık 5 dakika bekletilerek, enzim inaktivasyonu sağlandı.

Hipervaryabl bölge PCR ürünü	20 μ L
<i>BamH</i> I enzimi (12 U/ μ L)	2 μ L
<u>Inkübasyon buffer <i>BamH</i> I (10X)</u>	<u>8 μL</u>

Hazırlanan bu karışım 37° C'de yaklaşık 4-6 saat inkübe edildi. Daha sonra 95° C'de yaklaşık 5 dakika bekletilerek, enzim inaktivasyonu sağlandı.

Konstant bölge PCR ürünü	20 μ L
<i>Sau3A</i> I enzimi (4 U/ μ L)	2 μ L
<u>Universal buffer (10X)</u>	<u>3,5 μL</u>

Hazırlanan bu karışım 37° C'de yaklaşık 4-6 saat inkübe edildi. Daha sonra 95° C'de yaklaşık 5 dakika bekletilerek, enzim inaktivasyonu sağlandı.

Konstant bölge PCR ürünü	20 μ L
<i>Alu</i> I enzimi (8 U/ μ L)	2 μ L
Albumin (BSA) (20 mg/ml)	1 μ L
<u>Inkübasyon buffer Y (10X)</u>	<u>4,5 μL</u>

Hazırlanan bu karışım 37° C'de yaklaşık 4-6 saat inkübe edildi. Daha sonra 95°C'de yaklaşık 5 dakika bekletilerek, enzim inaktivasyonu sağlandı.

3. 2. e. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi.

Enzim muamelesi yapılmış PCR ürünleri için %3,5'lik agaroz jel hazırlandı. Enzim uygulanmış PCR ürünlerine gel loading buffer eklenerek agaroz gele yüklendi. Yaklaşık 100 Volt akımda 3 saat kadar yürütüldü. Daha sonra transillüminatörde PCR ürünleri ve enzim uygulama sonuçları kontrol edilerek polaroid kamera ile görüntüler fotoğraflandı.



4. BULGULAR:

Çalışmaya dahil edilen 38 akrabalık açısından bağlantısız bireyin mtDNA'ları izole edildi. mtDNA'nın, biri 447 baz uzunluğundaki hipervaryabl, diğeri 506 baz uzunluğunda konstant olmak üzere iki bölgesi PCR ile amplifiye edildi. Hipervaryabl bölgeye *Hinf* I ve *BamH* I endonükleazları uygulandı. *Hinf* I enziminin seçtiğimiz hipervaryabl bölge içerisinde tanımlanmış iki adet kesim bölgesi vardı. Bu kesim ile 447 bazlık bölge, büyüklükleri 356, 65 ve 26 baz olan 3 fragmente ayrılıyordu. *BamH* I enziminin standart mtDNA dizisine göre seçtiğimiz segmentte kesim bölgesi bildirilmemişti.

Konstant bölgeye *Sau3A* I ve *Alu* I enzimleri uygulandı. *Alu* I enziminin seçtiğimiz konstant bölgede bir kesim bölgesi olup, 506 baz uzunluğundaki segmenti 412, 94 baz uzunluğunda iki fragmente ayırıyordu. *Sau3A* I enziminin ise seçtiğimiz konstant segmentte standart mtDNA'da kesim bölgesi yoktu. Sonuçlar Tablo 6 ve 7'de detaylı olarak ve Tablo 5'de özetlenerek verilmiştir.

38 bireyin 4 tanesinde hipervaryabl bölgede *Hinf* I enzimi kesim bölgesinin kaybolduğu gözlemlendi. Bu bireylerin birisinin anne tarafından 2 yakınından, diğerinin 1 yakınından numune alınarak çalışmaya dahil edildiler. Elde edilen bulgularla ilgili tablo ve fotoğraflar aşağıdadır.

Tablo 5: Olguların restriksiyon enzim kesim hataları ile ilgili toplu değerlendirilmesi.

	Vaka Sayısı	<i>Hinf</i> I Kesim Hatası	<i>BamH</i> I Kesim Hatası	<i>Alu</i> I Kesim Hatası	<i>Sau3A</i> I Kesim Hatası
Erkek	29	3/29	0/29	0/29	0/29
Kadın	12	4/12	0/12	0/12	0/12
Toplam	41	7/41	0/41	0/41	0/41

Tablo 6: Hipervaryabl bölge restriksiyon enzim sonuçları.

Olgu No	<i>Hinf</i> I	<i>Bam</i> H I
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	-
7	+	-
8	+	-
9	+	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	-	-
14	+	-
15	+	-
16	+	-
17	+	-
18	+	-
19	+	-
20	+	-
21	+	-
22	+	-
23	-	-
24	+	-
25	+	-
26	+	-
27	+	-
28	-	-
29	+	-
30	+	-
31	+	-
32	+	-
33	+	-
34	+	-
35	+	-
36	+	-
37	-	-
38	-	-
38	-	-
40	-	-
41	+	-

+ : Restriksiyon enzim kesim bölgesi mevcut.

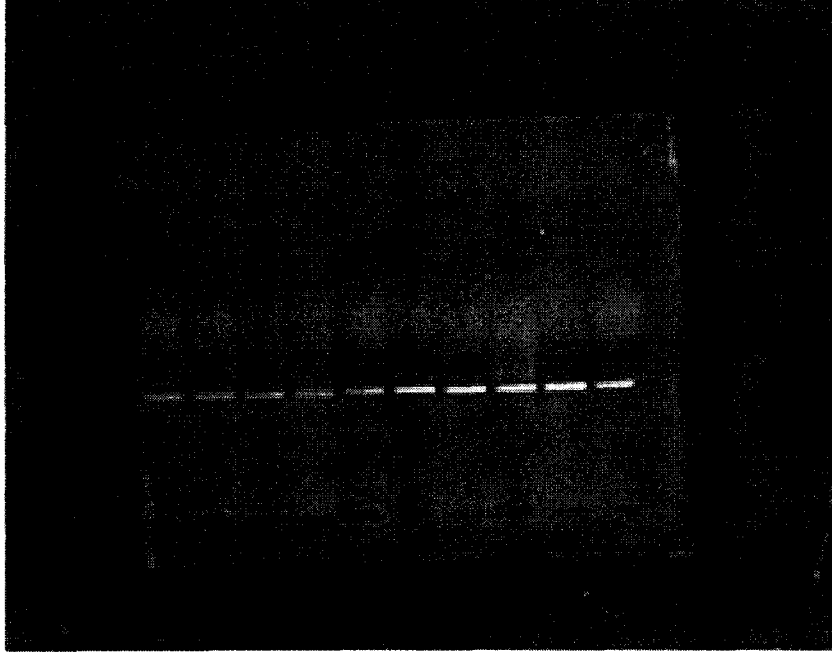
- : Restriksiyon enzim kesim bölgesi yok.

Tablo 7: Konstant bölge restriksiyon enzim sonuçları

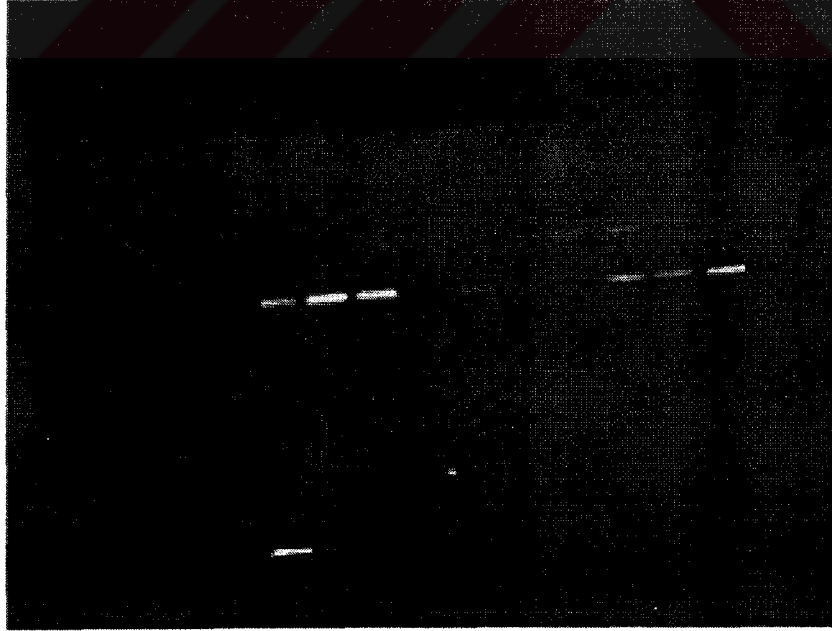
Olgu No	<i>Alu I</i>	<i>Sau3A I</i>
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	-
7	+	-
8	+	-
9	+	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	-
16	+	-
17	+	-
18	+	-
19	+	-
20	+	-
21	+	-
22	+	-
23	+	-
24	+	-
25	+	-
26	+	-
27	+	-
28	+	-
29	+	-
30	+	-
31	+	-
32	+	-
33	+	-
34	+	-
35	+	-
36	+	-
37	+	-
38	+	-
39	+	-
40	+	-
41	+	-

+ : Restriksiyon enzim kesim bölgesi mevcut.

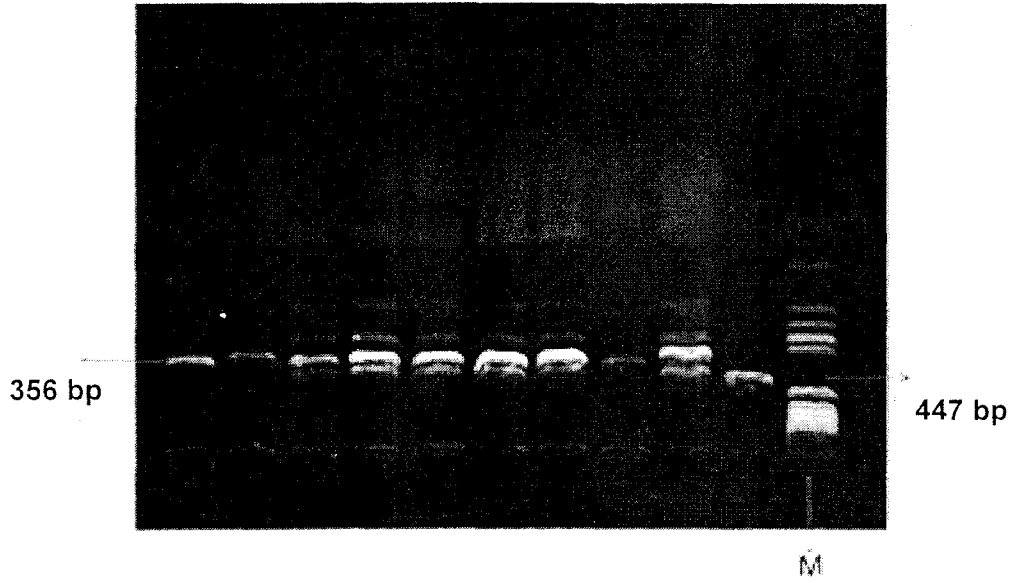
- : Restriksiyon enzim kesim bölgesi yok.



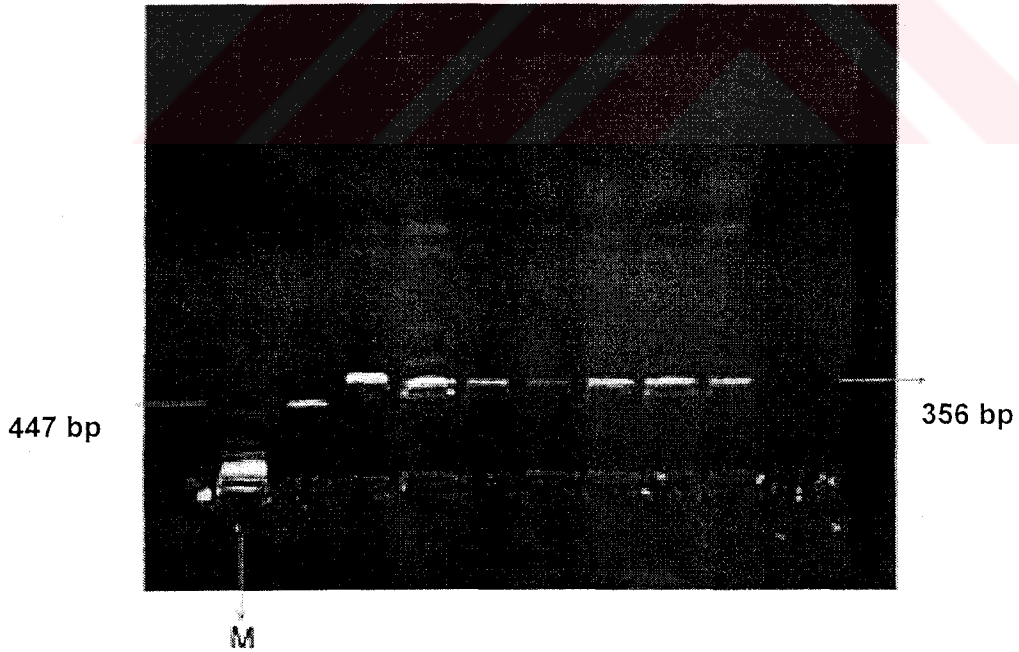
Şekil 4: Hipervaryabl bölge PCR ürünlerinin %1,5'lik jelde yürütülmüş görüntüsü. Soldan sağa, 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. ve 10. olguların 447 bp'lik PCR ürünleri kuyulara yerleştirilmiş ve yürütülmüştür.



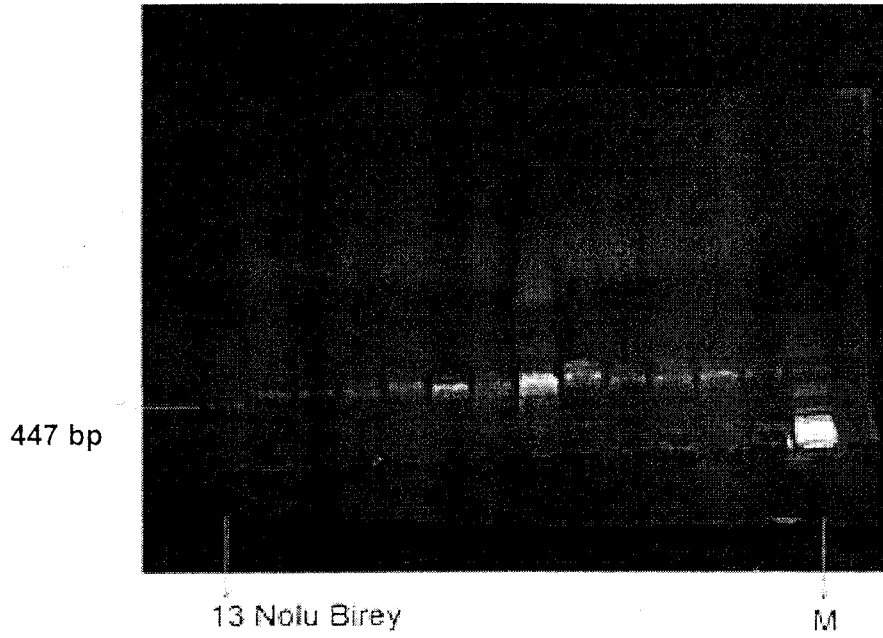
Şekil 5: Konstant bölge PCR ürünlerinin %1,5'lik jelde yürütülmüş görüntüsü. Soldan sağa doğru 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. olguların 506 bp'lik PCR ürünleri kuyulara yerleştirilmiş ve yürütülmüştür.



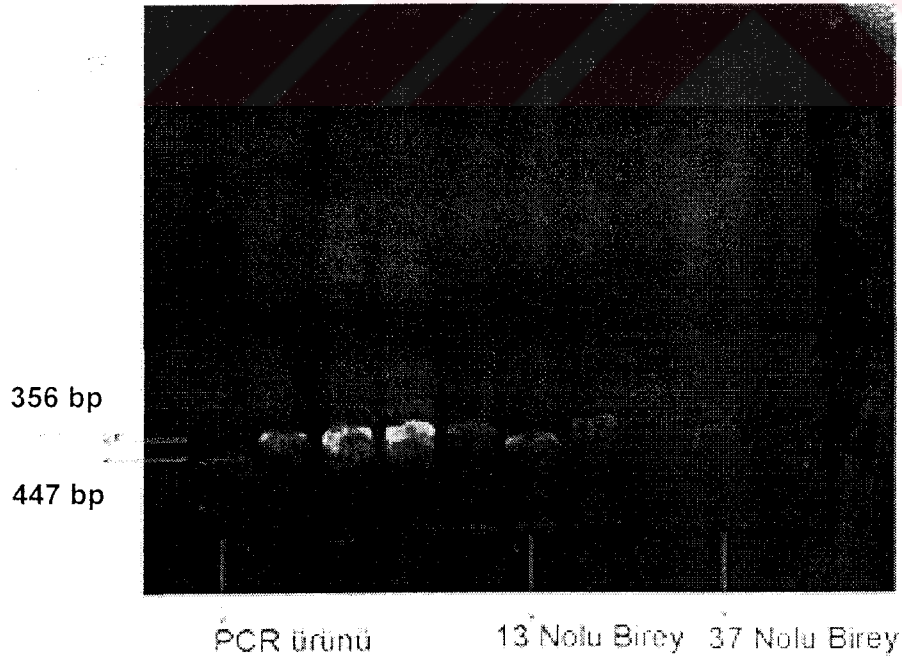
Şekil 6: Hipervaryabl bölge *Hinf* I ile kesim yapıldı. Marker DNA olarak *PhiX* 174 kullanıldı. Marker DNA'nın hemen yanında restriksiyon enzimi ile kesilmemiş PCR ürünü yürütülerek, fragment büyüklükleri teyid edildi. Sağdan sola doğru marker DNA, 14. olgunun restriksiyon enzimi ile kesilmemiş PCR ürünü, 24. 26. 29. 30. 31. 32. 25. 33. ve 34. olgunun restriksiyon enzimi ile kesilmiş hipervaryabl bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Resimdeki bütün bireylerde PCR ürünleri enzim ile kesilmiştir.



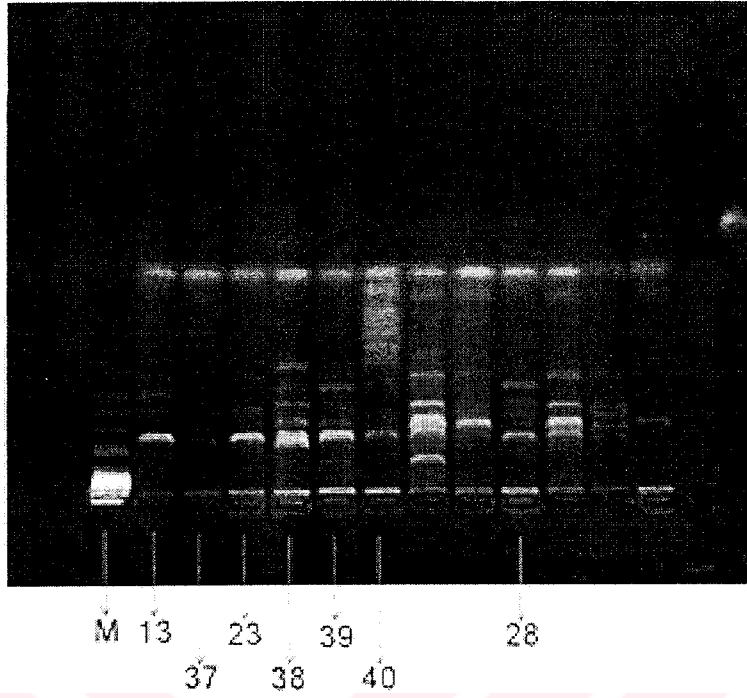
Şekil 7: Hipervaryabl bölge *Hinf* I ile kesim yapıldı. Marker DNA olarak *Pst* I kullanıldı. Marker DNA'nın hemen yanında restriksiyon enzimi ile kesilmemiş PCR ürünü yürütülerek, fragment büyüklükleri teyid edildi. Soldan sağa doğru sırası ile marker DNA, 14. olgunun restriksiyon enzimi ile kesilmemiş PCR ürünü, 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. ve 22. olgunun *Hinf* I ile kesilmiş hipervaryabl bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Enzim uygulanan resimdeki tüm bireylerde, PCR ürünleri enzim ile kesilmiştir.



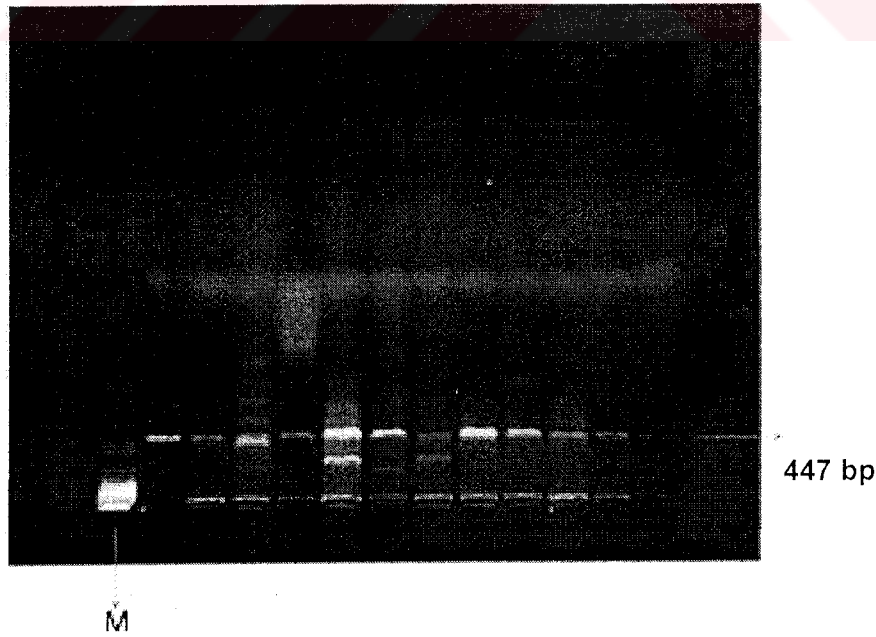
Şekil 8: Hipervaryabl bölge PCR ürünlerine *Hinf* I ile kesim uygulandı. Marker DNA olarak *Pst* I kullanıldı. Sağdan sola doğru marker DNA, 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. ve 13. olgunun enzim uygulanmış hipervaryabl bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. 13 nolu olguda enzim kesimi negatif idi.



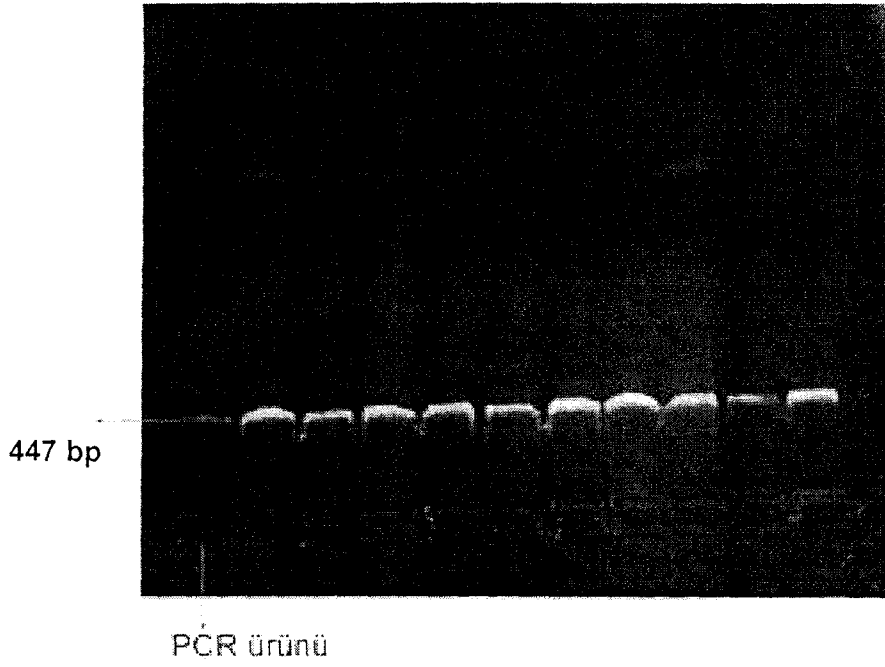
Şekil 9: Hipervaryabl bölge *Hinf* I ile kesim yapıldı. Birinci kuyuya PCR ürünü yüklenerek kesim kontrolü yapıldı. Soldan sağa doğru 14. bireyin enzim uygulanmamış PCR ürünü, 9. 10. 11. 12. 13. 27. 35. ve 37. bireyin enzim uygulanmış PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. 13 ve 37 nolu bireylerde enzim kesim bölgesi kaybolmuştur.



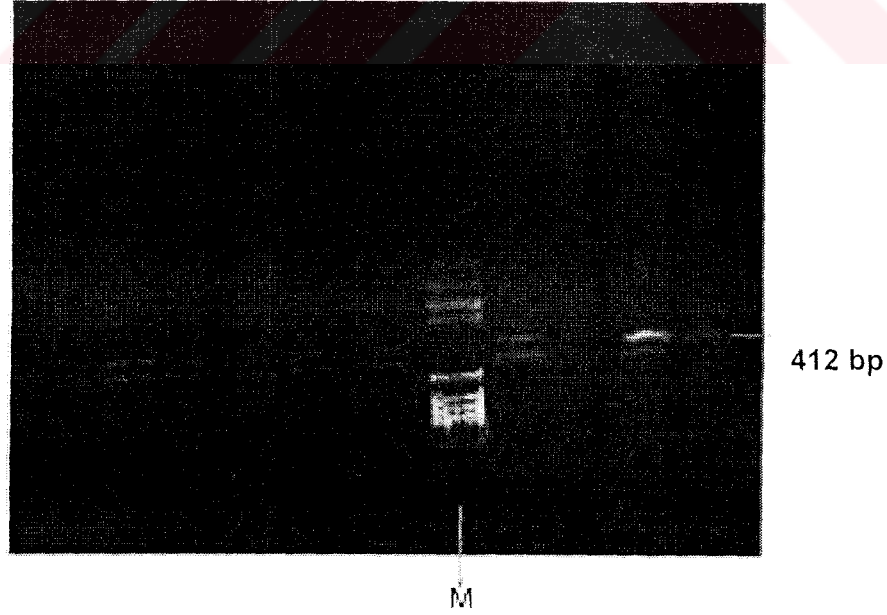
Şekil 10: Hipervaryabl bölge *Hinf* I ile kesim yapıldı. Marker DNA olarak Pst I kullanıldı. Soldan sağa doğru sırası ile marker DNA, 13. 37. 23. 38. 39. 40. 24. 27. 28. 35. 36. ve 41. olgunun enzim uygulanmış hipervaryabl bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. 13, 37, 23, 38, 39, 40 ve 28 nolu bireylerde enzim kesimi negatif idi. Burada 38 ve 40 nolu bireyler 37 nolu bireyin anne tarafından akrabası, 39 nolu birey ise 23 nolu bireyin anne tarafından akrabasıdır.



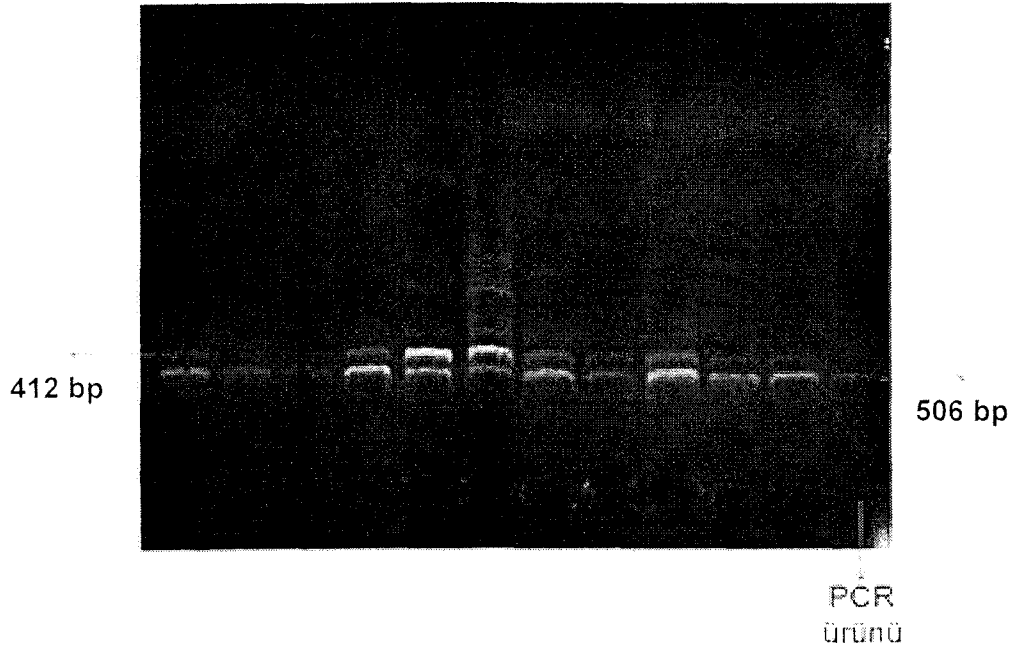
Şekil 11: Hipervaryabl bölge *BamH* I ile kesim yapıldı. Marker DNA olarak Pst I kullanıldı. Soldan sağa doğru marker DNA 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. olguların *BamH* I enzimi uygulanmış hipervaryabl bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Bireylerin hiçbirisinde enzim kesimi olmadı.



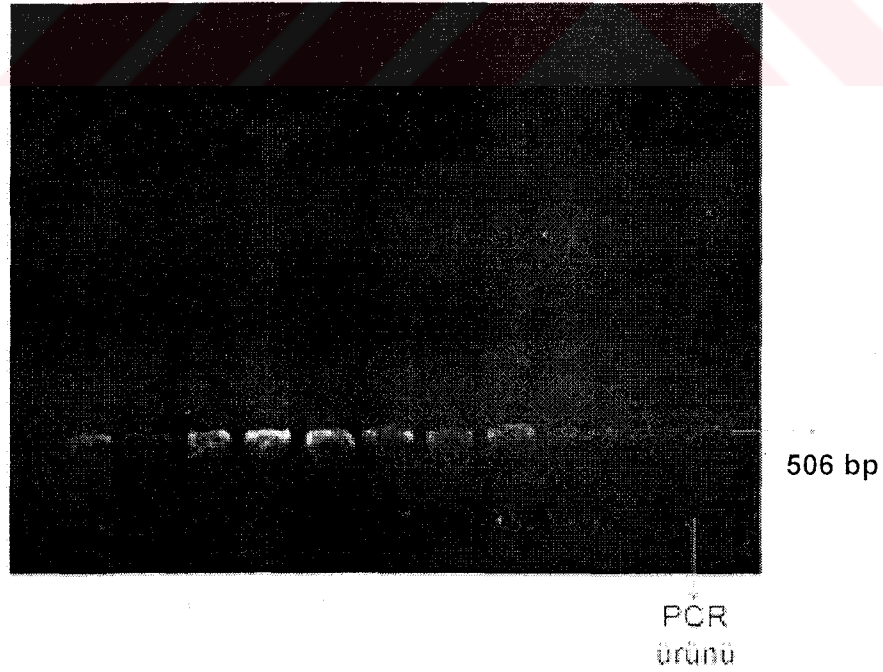
Şekil 12: Hipervaryabl bölge *BamH* I ile kesim yapıldı. Birinci kuyuya 14 nolu vakanın PCR ürünü yüklenerek kontrol sağlandı. Soldan sağa sırası ile 14 nolu vakanın PCR ürünü, 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. olguların *BamH* I uygulanmış hipervaryabl bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Hiçbir olguda kesim olmadı.



Şekil 13: Konstant bölge *Alu* I ile kesim yapıldı. Marker DNA olarak *PhiX* 174 kullanıldı. Soldan sağa doğru sırası ile 1. 2. 3. 4. 5. 6. olgunun *Alu* I uygulanmış konstant bölge PCR ürünü, marker DNA, 7. 8. 9. 10. olgunun *Alu* I uygulanmış konstant bölge PCR ürünü kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Bireylerin tamamında enzim PCR ürünlerini kesmiştir.



Şekil 14: Konstant bölge *Alu* I ile kesim yapıldı. Birinci kuyuya 14 nolu olgunun PCR ürünü yüklenerek kesim kontrolü sağlandı. Sağdan sola sırası ile, 14. olgunun konstant bölge PCR ürünü, 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. olgunun *Alu* I ile kesim yapılmış konstant bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Bireylerin tamamında enzim PCR ürünlerini kesmiştir.



Şekil 15: Konstant bölge *Sau3A* I ile kesim yapıldı. Birinci kuyuya 14. olgunun PCR ürünü yüklenerek kesim kontrolü yapıldı. Sağdan sola doğru sırası ile 14. olgunun PCR ürünü, 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. olgunun *Sau3A* I enzimi uygulanmış konstant bölge PCR ürünleri kuyulara yerleştirildi ve yürütüldü. Bireylerin hiçbirisinde enzim kesimine rastlanmadı.

5. TARTIŞMA:

Günümüzde insan genom projesinin ilk sonuçları dikkate alındığında, moleküler genetik çalışmaları polimorfizm çalışmalarına ve buna bağlı olarak da hasta bireylerdeki mutasyonların ortaya konmasına yönelmiştir. Çünkü sağlıklı bireylerin genomik yapıları tam olarak bilinmeden yapılan mutasyon analizlerinde popülasyona spesifik polimorfik yapılar mutasyon olarak algılanabilir ve bu durum yanlış değerlendirmelere neden olabilir.

Farklı popülasyonlarda genetik varyasyonun ortaya konmasında mtDNA'yı kullanmanın en önemli nedeni; mtDNA'nın yüksek mutasyon hızı ve bu mutasyonların belirli popülasyonlarda sabitlenmesidir. Bu durumun bilinmesi, insan popülasyonları arasındaki farklılıkları ortaya koyması yanısıra doğal polimorfik çeşitliliğin mutasyon olarak algılanması yanlışlığını da ortadan kaldıracaktır.^{4, 6, 14}

Son zamanlarda birçok çalışmada sağlıklı kabul edilen bireylerde mtDNA analizleri yapılmıştır. Bu çalışmaların amacı mtDNA haplogrouplarını tesbit etmek ve mtDNA polimorfizmini ortaya koymaktır. İnsan popülasyonundaki mtDNA polimorfizm çalışmalarında, restriksiyon enzim analizleri veya D-loop kontrol bölgesi hipervaryabl segment dizi analizleri esas alınmıştır. mtDNA'nın en değişken bölgesi (hipervaryabl bölge), 16204-00576 baz çifti arasındaki 1122 bp uzunluğunda olan, herhangi bir ürün kodlamayan kontrol bölgesidir. Doğal polimorfizmin niteliklerini ve boyutlarını belirlemek amacıyla sağlıklı bireylerin mtDNA'ları PCR amplifikasyonu ve endonükleaz uygulamaları ile incelenmeye başlanmıştır.

Mitokondriyal DNA'da hipervaryabl bölge üzerinde özellikle etnik grup tespitine yönelik olarak pekçok çalışma yapılmış olup, popülasyonlar arası ilişkiler ortaya konmaya çalışılmıştır^{31,32,35,37-41,43}. Mitokondriyal DNA'nın konstant bölgelerindeki polimorfizm çalışmaları aynı patolojinin farklı popülasyonlarda farklı mutasyon noktalarının tespiti ile gündeme gelmektedir. Şöyle ki aynı mitokondriyal DNA patolojisi bir popülasyonda sağlıklı insanlarda görülmez iken, başka bir popülasyonda sağlıklı bireylerde görülebilmektedir. Bu durum konstant bölgelerdeki polimorfizmlerin değişik popülasyonlarda ortaya konmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Örneğin Wallace ve arkadaşları, COX I geninin 7444. nükleotidinde ve CYTB geninin 15257. nükleotidindeki mitokondriyal mutasyonların primer LHON mutasyonları olduğunu ileri sürseler de, aynı popülasyonun sağlıklı kontrol bireylerinde, düşük oranda da olsa her iki mutasyon da tesbit edilebilmiştir¹⁴. Bir diğer çalışmada COX III geni 9438. nükleotidindeki mutasyonun, LHON hastalarında primer patogenetik faktör olabileceği

ileri sürülmüş, fakat daha sonra bu mutasyonun Afrikalı ve Kübalı sağlıklı bireylerde bulunduğu ve primer LHON mutasyonu olamayacağı ortaya konmuştur.²⁶

Bizim çalışmamızın amacı, mtDNA'daki patolojilerin tespitinde Türk toplumuna özgün varyasyonların ortaya konması ve bu sayede patolojik mutasyon ile polimorfizmin ayırt edilmesine yönelik bir temel sağlamaktır.

Biz bu çalışmamıza akrabalık açısından bağlantısız 38 bireyin mtDNA'larını dahil ettik. Olgularımız özellikle sağlık alanında çalışan, klinik ve laboratuvar olarak sağlıklı oldukları teyit edilen bireylerden oluşmuştur. Bu çalışmada mtDNA'nın iki bölgesi seçilmiştir. Burada hipervaryabl bölge olarak 447 baz (primerler dahil) uzunluğundaki L.15996-H.16401 bölgesini ve korunmuş (konstant) bölge olarak da 4 farklı mtDNA patolojisi (mt DNA'nın: 3243. bazındaki A---G substitüsyonu ile ortaya çıkan MELAS, 3260. bazındaki A---G substitüsyonu ile ortaya çıkan MMC, 3394. bazındaki T---C substitüsyonu ile ortaya çıkan LHON ile 3460. bazdaki G---A substitüsyonu ile ortaya çıkan LHON) rapor edilmiş olan, ve biri tamamen (tRNA^{Leu} geni: 3230 - 3304) ve diğer 2'si parsiyel olarak flanking bölgelerde yerleşmiş olan (16S rRNA geni: 1671 - 3229 ve NADH Dehidrogenaz I geni: 3307 - 4262) 3 tane mt DNA genini içine alan 506 baz (primerler dahil) uzunluğundaki L.3148 - H.3612 bölgesini seçtik (Şekil 2 ve Tablo 2)^{9, 11-14, 17}.

Hipervaryabl bölgeye *Hinf* I ve *BamH* I endonükleazları uygulanmıştır. Seçtiğimiz hipervaryabl bölge içerisinde, iki adet *Hinf* I enzimi kesim bölgesi mevcut olup, 447 bazlık bu bölge, büyüklükleri 356 - 65 - 26 bazlık üç parçaya ayrılıyordu. Yirmi-altı bazlık fragmentin agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi mümkün olmadığından büyük olan 2 fragment üzerinden değerlendirme yapılmıştır. *BamH* I enziminin standart mtDNA dizisine göre çalıştığımız segmentte kesim bölgesi daha önce bildirilmemişti.

Korunmuş bölge çalışmalarında ise *Alu* I ve *Sau3A* I enzimleri uygulanmıştır. *Alu* I enziminin seçilen bölgede bir kesim bölgesi olup, 506 baz uzunluğundaki segmenti 412, 94 baz uzunluğunda iki fragmente ayırıyordu. *Sau3A* I enziminin ise seçtiğimiz bölgenin standart mtDNA'sında bir kesim bölgesi tanımlanmamıştır.

Çalışmamızda amplifiye edilen hipervaryabl bölge için kullandığımız *BamH* I enziminin kesim noktası bizim olgularımızda tespit edilememiştir. Bu enzimin uygulandığı toplam 41 olgunun restriksiyon enzim kesim haritasında herhangi bir farklılık görülmemiş ve hiçbirisinde kesim olmamıştır. Yine hipervaryabl bölgeye uygulanan ve 2 kesim noktası olan *Hinf* I enzim uygulamasında 38 olgunun 4

tanesinde hipervaryabl bölgede *Hinf* I enzimi kesim bölgesinin kaybolduğu gözlenmiş olup, bu bireylerin birisinin anne tarafından 2 yakınında, diğerinin bir yakınında yapılan sonraki incelemeler ile bunların da *Hinf* I kesim bölgesini kaybettikleri görülmüştür (Tablo 5 ve 6, Şekil 8 ve 9). Mitokondriyal DNA'nın hipervaryabl bölgesindeki polimorfizmler açısından Türk toplumu ile ilgili olarak yapılmış bir çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinde yaşayan sağlıklı 29 bireyin mitokondriyal DNA hipervaryabl I ve II bölgeleri incelenmiş ve Türk ve Bulgar toplumları arasındaki polimorfik benzerlikler araştırılmıştır. Bu çalışmada her iki toplumda mitokondriyal DNA'nın hipervaryabl bölgesindeki segment I'de 18 ortak polimorfik bölge, segment II'de de 15 ortak polimorfik bölge tespit edilmiş iken, segment I'de 30 polimorfik bölge ve segment II'de de 22 polimorfik bölge sadece Türk toplumuna özgü olarak ortaya konmuştur. Bulgar toplumuna özgü polimorfizm oranları sırasıyla 22 ve 5 olarak tespit edilmiştir. Buna göre Türk toplumu Bulgar toplumuna göre yüksek oranda polimorfizm ortaya koymaktadır³².

Çalışmaya dahil edilen 38 bireyin hepsinde, mtDNA'nın korunmuş bölgesi üzerinde yapılan restriksiyon enzim çalışmalarında, *Alu* I enziminin uygun olarak kestiği ve *Sau*3A I enziminin ise kesmediği tespit edilmiştir (Tablo 5 ve 7, Şekil 13, 14 ve 15). Sonuçta korunmuş bölge açısından sağlıklı olan çalışma grubumuzda, kullanılan restriksiyon enzimler açısından kesim noktasının kaybolması veya yeni bir kesim bölgesinin oluşması durumlarına rastlanılmamıştır. Bu sonuç iki enzim kullanılmış dahi olsa seçtiğimiz bölgenin ileri derecede korunmuş bölge olduğu kanaatini güçlendirmektedir. Mitokondriyal DNA'nın konstant bölgesindeki polimorfizmler açısından Türk toplumunda yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Bu çalışma, bölgemizdeki popülasyonda, genetik hastalıkların teşhis çalışmalarına girişilmeden önce yapılması gereken çok sayıdaki çalışmalardan ilkidir. Elde edilen sonuçlar, çevremizdeki popülasyonda, incelenen mtDNA segmentindeki polimorfizmin boyutlarını ortaya koyması yönünden henüz yetersiz ise de, incelenen iki genetik bölgedeki varyasyon beklenen bir model ortaya koymuştur. Bu ve benzeri çalışmalara, çalışılan mtDNA segmenti genişletilerek, daha çok marker kullanılarak ve DNA dizi analizleri yapılarak istatistiksel açıdan belli bir güvenilirlik düzeyine ulaşıncaya kadar devam edilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR:

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genom. *Nature* 1981; 290: 457-464.
2. Schork NJ. and Guo SW. Pedigree Models for Complex Human Traits Involving the Mitochondrial Genom. *Am J Hum Genet.* 1993; 53: 1320-1337.
3. Attardi G, Schwartz G. Biogenesis of Mitochondria. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4: 289-333.
4. Cann RL, Storeking M & Wilson AC. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature* 1987; 325: 31-36.
5. Torroni A, Wallace DC. mtDNA Haplogroups in Native Americans. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1234-1236.
6. Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How Rapidly Does the Human Mitochondrial Genome Evolve. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 501-509.
7. Solak M, Bağcı H, Şengil A.Z, Öztaş S. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2000: 30-46 .
8. Başaran N. Tıbbi Genetik. Eskişehir: Bilim Teknik Yayınevi, 1996: 270-274 .
9. Öztaş S, Yakan B. Mitokondriyon & mitokondriyal DNA Patolojileri. Erzurum: A. Ü. K. K. E. F. Ofset tesisleri, 2000.
10. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Genetics in Medicine*. 5th Ed. Philadelphia: WB Saunders Comp, 1991: 89-91.
11. Dimaura S, Wallace DC. *Mitochondrial DNA in Human Pathology*. New York:: Raven Press Ltd, 1993: 1-37.
12. Johns DR. Mitochondrial DNA and Disease. *The New England Journal Of Medicine* 1995; 333/10: 638-644.
13. Shoffner JM. and Wallace DC. *Mitochondrial Genetics: Principles and Practice*. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1179-1186.
14. Wallace DC. Mitochondrial Disease: Genotype Versus Phenotype. *TIG* 1993; 9/4: 128-133.
15. Clayton DA. Nuclear Gadgets in Mitochondrial DNA Replication and Transcription. *TIBS* 1991; 16: 107-111 .
16. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Edition New York: Garland Publishing Inc, 1994: 653-720.

17. Wallace DC. Diseases of the Mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 1175-1212.
18. Salas A, Lareu V, Calafell F, Bertranpetit J and Carracedo A. MtDNA Hypervariable Region II (HVII) Sequences in Human Evolution Studies. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 964-974.
19. Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM and Howell N. Analysis of European mtDNA for Recombination. *Am J Hum Genet* 2001; 68:145-153 .
20. Paabo S. Mutational Hot Spots in the Mitochondrial Microsom. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 493-496 .
21. Pallotti F, Chen X, Bonilla E, Schon EA. Evidence That Specific mtDNA Point Mutations May Not Accumulate in Skeletal Muscle During Normal Human Aging. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 591-602.
22. Howell N. Mutational Analysis of the Human Mitochondrial Genome Branches into the Realm of Bacterial Genetics. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 749-755.
23. Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G. & Arnheim N. Mosaicism for a Specific Somatic Mitochondrial DNA Mutation in Adult Human Brain. *Nature Genet* 1992; 2: 318-323.
24. Lamminen T, Majander A, Juvonen V. et al. A Mitochondrial Mutation at nt 9101 in the ATP Synthase 6 Gene Associated with Deficient Oxidative Phosphorylation in a Family with Leber Hereditary Optic Neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1238-1240.
25. Richards M, Corte-Real H, Forster P. et al. Paleolithic and Neolithic Lineages in the European Mitochondrial Gene Pool. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 185-203.
26. Howell N. Mitochondrial Gene Mutations and Human Diseases: A Prolegomenon. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 219-224.
27. Hatfill SJ, La Cock CJR, Laubscher R, Downing TG. and Kirby R. A Role for Mitochondrial DNA in the Pathogenesis of Radiation - Induced Myelodysplasia and Secondary Leukemia. *Leukemia Res* 1993; 17 (11): 907-913.
28. Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial Mutations and Hearing Loss: Paradigm for Mitochondrial Genetics. *Am J Hum* 1998; 62:15-19.
29. Özçelik T. DNA Polimorfizmi ve tıbbi önemi. *Hacettepe Tıp Derg* 1996; 27: 72-76

30. Scozzari R, Torroni A, Semino O, Sirugo G, Brega A, Santachiara-Benerecetti AS. Genetic Studies on the Senegal Population. I. Mitochondrial DNA Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 534-544.
31. Denaro M, Blanc H, Johnson MJ, Chen KH. et al. Ethnic Variation in *Hpa* I Endonuclease Cleavage Patterns of Human Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78/9: 5768-5772.
32. Calafell F, Undehill P, Tolun A, Angelicheva D, Kalaydjieva L. From Asia to Europa: mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks. *Ann Hum Genet* 1996; 60: 35-49.
33. Bianchi NO, Rothhammer F. Reply to Torroni and Wallace. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1236-1238.
34. Harihara S, Saitou N, Hirai M. et al. Mitochondrial DNA Polymorphism Among Five Asian Populations. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 134-143.
35. Horai S, Gojobori T, Matsunaga E. Mitochondrial DNA Polymorphism in Japanese. *Hum Genet* 1984; 68: 324-332.
36. Brown WM. Polymorphism in Mitochondrial DNA of Human as Revealed by Restriction Endonuclease Analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77/6: 3605-3609.
37. Horai S, Murayama K, Hayasaka K. et al. mtDNA Polymorphism in East Asian Populations, with Special Reference to the Peopling of Japan. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 579-590.
38. Brega A, Gardella R, Semino O. et al.: Genetic Studies on the Tharu Population of Nepal: Restriction Endonuclease Polymorphisms of Mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 502-512.
39. Merriwether DA, Hall WW, Vahlne A. and Ferrel RE. mtDNA Variation Indicates Mongolia May Have Been the Source for the Founding Population for the New World. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 204-212.
40. Passarino G, Semino O, Bernini LF, Santachiara-Benerecetti AS. Pre-Caucasoid and Caucasoid Genetic Features of the Indian Population, Revealed by mtDNA Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 927-934.
41. Viikki J, Savontaus ML, Nikoskelainen EK. Human Mitochondrial DNA Types in Finland *Hum Genet* 1988; 80: 317-321.
42. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.

43. Bertranpetit J, Sala J, Calafell F, Underhill PA, Moral P and Comas D. Human mitochondrial DNA variation and origin of Basques. *Ann Hum Genet* 1995; 59: 63-81.



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

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**İNSAN MİTOKONDRIYAL DNA'SINDA RFLP YÖNTEMİ İLE
POLİMORFİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Abdulgani TATAR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29.03.2001
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 21.05.2001
Tez Danışmanı : Prof.Dr. İrfan BATAT
Jüri Üyesi : Prof.Dr. Birkan YAKAN
Jüri Üyesi : Doç.Dr. Sıtkı ÖZTAŞ
Jüri Üyesi : Doç.Dr. Akçahan GEPEİREMEN
Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. İbrahim PİRİM

Enstitü Müdürü : Doç.Dr. Erol SELİMOĞLU

Mayıs 2001
ERZURUM

**T.C. FÜSİLLAH-İ.Ş.Ş. : ERZURUM
DOKÜMENTASYON MERKEZİ**