

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

**İNFLAMASYON İLE İLİŞKİLİ
NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA
DOLAŞIMDAKİ MİTOKONDRİYAL DNA'NIN
ARAŞTIRILMASI**

Ayşe Tülay AYDINOĞLU

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2019**

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

**İNFLAMASYON İLE İLİŞKİLİ
NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA
DOLAŞIMDAKİ MİTOKONDRIYAL DNA'NIN
ARAŞTIRILMASI**

Ayşe Tülay AYDINOĞLU

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Burcu HAYTA**

**ANKARA
2019**

ONAY SAYFASI

İNFLAMASYON İLE İLİŞKİLİ NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA DOLAŞIMDAKI MİTOKONDRİYAL DNA'NIN ARAŞTIRILMASI

Öğrenci: Ayşe Tülay AYDINOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Burcu HAYTA

Bu tez çalışması **30/07/2019** tarihinde jürimiz tarafından “**Tıbbi Biyoloji Programı**”
nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Şükriye AYTER

(TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi)



Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Burcu HAYTA

(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Serap DÖKMECİ

(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE

(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe İlksen ÇOLPAK IŞIKAY

(Hacettepe Üniversitesi)



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

06 Ağustos 2019



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI


Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

29 /07/2019


Ayşe Tülay AYDINOĞLU

i


ⁱ"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Burcu HAYTA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.


Ayşe Tülay AYDINOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek tez çalışmalarında gerekse kişisel hayatımda karşılaştığım tüm zorluklarda bana her zaman destek olan, yol gösteren, değerli görüş ve önerilerini esirgemediğim tez çalışmamda ve bana büyük katkı sağlayan değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Burcu HAYTA'ya,

Tez çalışmamı inceleyerek değerli yorumlarıyla çalışmamda katkıda bulunan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Şükriye AYTER, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE ve Dr. Öğr. Üyesi Ayşe İlksen ÇOLPAK IŞIKAY'a,

Eğitimime yapmış oldukları değerli katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm kıymetli hocalarıma ve çalışanlara,

Eğitimim boyunca, bana her zaman destek olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan, eğitim alan çok değerli büyüklerime ve çok sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman ve her koşulda olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da sevgi ve anlayışlarıyla bana güç veren ve uzakta olsalar dahi her zaman arkamda olduklarını hissettiğim canım anneme, abim İbrahim ve eşi Pınar ablama, ablam Tuba ve eşi Muhammet abime, dayım İbrahim Kuşçu'ya, yeğenlerim İpek ve Arda'ya,

Sevgi ve anlayışıyla bu süreçte bana her zaman destek olan sevgili Cantürk AYDIN'a, sevgi gösterileri ve dostluğuyla bana neşe veren kedim Yumak'a

En içten ve samimi duygularla sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın, iyi bir bilim insanı olmanın öncesinde iyi bir insan olmanın önemine ve bilgiyi paylaşmanın gücüne inanan herkese katkı sağlamasını dilerim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje no: TYL-2018-17372).

ÖZET

Aydınoğlu, A.T., İnflamasyon İle İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda Dolaşımdaki Mitokondriyal DNA'nın Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.

Nöromusküler hastalıklar, çoğu nadir genetik hastalıklar içerisinde yer almakla beraber, direkt ya da dolaylı olarak iskelet kas yapısı ve işlevinin etkilendiği çok geniş sendrom ve hastalıklar grubunu içermektedir. Güncel araştırmalar nadir hastalıkların patogenezinde rol oynayan ortak mekanizmaları tanımlayarak tedavi hedefleri bulma üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Farklı etmenlere bağlı olarak ortaya çıkan nöromusküler hastalıkların büyük çoğunluğunda inflamasyon öne çıkan özelliklerdendir. Farklı hastalıklara yönelik yapılan araştırmalar, dolaşımdaki serbest mtDNA'nın (ccf-mtDNA) pro-inflamatuvar bir faktör olarak doğal immün yanıt oluşumunda görev aldığını göstermiştir. Günümüze kadar, inflamasyonla ilişkili nöromusküler hastalıklarda ccf-mtDNA'nın varlığını, miktarını veya inflamasyon sürecindeki olası işlevini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Tez çalışması kapsamında; (1) otoimmün nöromusküler hastalıklarda, (2) sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklarda ve (3) kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalığa sahip bireylere ait plazmadaki ccf-mtDNA miktarının RT-qPZR ile absolut kantitasyonu yapılmış ve sonuçlar sağlıklı kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Otoimmün hastalıklar grubunda yer alan MG'de; ek tedavi uygulaması yapılmayan hastalarda ccf-mtDNA kopya sayılarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 5,6 kat arttığı saptanırken ($p=0.0119$), tedavi alan hastalarda 1,8 kat azaldığı belirlenmiştir ($p=0.0476$). İkinci grupta yer alan FSHD ve LGMD2B hastalarındaki ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla değişmediği saptanırken, üçüncü grupta yer alan SMA hastalığında ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde 2 kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır ($p=0.0017$). Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje no: TYL-2018-17372).

Anahtar Kelimeler: absolut kantitasyon, ccf-mtDNA, inflamasyon, nöromusküler hastalıklar

ABSTRACT

Aydinoglu, A.T., Investigation of the Circulating Mitochondrial DNA in Inflammation Related Neuromuscular Diseases, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master Thesis of Medical Biology Programme, Ankara, 2019. Neuromuscular diseases, mostly being among the rare genetic diseases, include a wide range of syndromes and diseases in which directly or indirectly skeletal muscle structure and function are affected. Recent scientific research has focused on defining common mechanisms involved in the pathogenesis of rare diseases and identifying novel therapeutic targets. Inflammation is one of the prominent features of the majority of neuromuscular diseases. The research carried out on different diseases showed that circulating cell free mtDNA (ccf-mtDNA) takes part in the development of innate immune response as a pro-inflammatory factor. No studies to date have investigated the presence, amount and the potential function of ccf-mtDNA during inflammation process in the inflammatory neuromuscular diseases. In this thesis; absolute quantitation of the amount of ccf-mtDNA found in plasma of patients with (1) autoimmune neuromuscular diseases, (2) the hereditary neuromuscular diseases associated with muscle inflammation and (3) the hereditary neuromuscular diseases without muscle inflammation, was done by RT-qPCR and the results were analyzed in comparison with the healthy control samples. In MG, which is an autoimmune neuromuscular disease, a statistically significant increase in the copy number of ccf-mtDNA by 5,6 fold ($p=0,0119$) were detected in the patients without any additional treatment compared to control, while there was a statistically significant 1,8 fold ($p=0,0476$) decrease in the copy number of ccf-mtDNA of the patients who received treatment compared to control. In the second group, there was no statistically significant difference in the ccf-mtDNA copy number in FSHD and LGMD2B patients, while in the third group, there was a statistically significant 2-fold increase ($p=0,0017$) in SMA patients. This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: TYL-2018-17372)

Key words: absolute quantitation, ccf-mtDNA, inflammation, neuromuscular diseases.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mitokondri ve Mitokondiyal DNA (mtDNA)	4
2.2. Dolaşımdaki Serbest mtDNA (<i>circulating cell-free mtDNA/ccf-mtDNA</i>)	5
2.2.1. ccf-mtDNA ve Sistemik Dolaşıma Katılma Mekanizmaları	6
2.2.2. ccf-mtDNA ve Sistemik Dolaşımda Bulunma Şekilleri	8
2.3. ccf-mtDNA ve İnflamasyon İlişkisi	9
2.4. ccf-mtDNA ve Hastalıklarla İlişkisi	12
2.5. İnflamasyonla İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda ccf-mtDNA'nın Olası İşlevi	15
3. BİREYLER VE YÖNTEM	19
3.1. Bireyler	19
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar	21
3.2.1. Periferik Kandan Plazma/Serum İzolasyonu	21
3.2.2. Plazma/Serum Örneklerinden ccf-DNA İzolasyonu	21
3.2.3. ccf-DNA Konsantrasyon Ölçümü	21
3.2.4. İnsan mtDNA'sı ile Dış Standart Örneklerin Hazırlanması	21
3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile ccf-mtDNA'nın Absolut (Mutlak) Kantitasyonu	22
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	23

3.3. Yöntemler	23
3.3.1. Periferik Kandan Plazma/Serum İzolasyonu	23
3.3.2. Plazma/serum örneklerinden ccf-DNA İzolasyonu	24
3.3.3. ccf-DNA Konsantrasyonunun Florometrik Ölçümü	26
3.3.4. Kalibrasyon Eğrisi Çizimi için İnsan mtDNA'sı ile Dış Standart Örneklerin Hazırlanması	27
3.3.5. RT-qPZR ile Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA Miktarının Absolüt Kantitasyonu	29
3.3.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. ccf-DNA İzolasyon Protokolünün Optimize Edilmesi	31
4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Plazma Örneklerinden ccf-DNA İzolasyonu	33
4.3. Dış Standart Örnekler ile Kalibrasyon Eğrisi Çizimi	35
4.4. RT-qPZR ile Çalışma Gruplarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA Miktarının Absolüt Kantitasyonu	37
4.4.1. Otoimmün Nöromusküler Hastalıklarda Plazmadaki ccf-mtDNA Miktarının Analizi	37
4.4.2. Sekonder Olarak Kas Dokusunda İnflamasyon Bulgularının Saptandığı Kalıtsal Nöromusküler Hastalıklarda Plazmadaki ccf-mtDNA Miktarının Analizi	39
4.4.3. Kas Dokusunda İnflamasyon Gözlenmeyen Kalıtsal Nöromusküler Hastalıklarda Plazmadaki ccf-mtDNA Miktarının Analizi	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
6.1. Sonuçlar	49
6.2. Öneriler	50
7. KAYNAKLAR	52
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni	
EK-2. Myasteni Gravis (MG) Hastalarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA miktarının Absolüt Kantitasyonu	

EK-3. Fasiyoskapulohumeral Kas Distrofisi (FSHD) ve Disferlinopati (LGMD2B)
Hastalarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA miktarının Absolüt
Kantitasyonu

EK-4. Spinal Müsküler Atrofi (SMA) Hastalarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan
ccf-mtDNA miktarının Absolüt Kantitasyonu

EK-5. Tez Orjinallik Ekran Görüntüsü

EK-6: Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrat
µl	Mikrolitre
AchR	Asetilkolin Reseptörü
AKİ	Akut Miyokard İnfarktüsü
ASC	<i>Apoptosis-associated speck like protein with a CARD</i>
ATP	Adenozin Trifosfat
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2 like protein</i>
bç	Baz çifti
Ca ²⁺	Kalsiyum
cfc-DNA	<i>Circulating cell free DNA</i>
cfc-mtDNA	<i>Circulating cell-free mitochondrial DNA</i>
cGAMP	Siklik GMP-AMP
cGAS	Siklik GMP-AMP sentaz
CK	Kreatin kinaz
cRNA	<i>Carrier RNA</i>
Ct	<i>Cycle of treshold</i>
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
dk	Dakika
DNA	Deaksiribonükleik asit
DUX4	<i>Double homeobox 4</i>
DYSF	Disferlin
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ESS	<i>Ekzonik Splicing Silencer</i>
EtOH	Etanol
ETZ	Elektron Transport Zinciri
Fe	Demir
FSHD	Fasioskapulohumeral Kas Distrofisi
g	Gram
HFMS	Hammersmith fonksiyonel motor skalası
IL	İnterlökin

IL-1β	İnterlökin-1 beta
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
IVIg	İntravenöz immunglobülin
LC3B	<i>Microtubule associated protein-1 light chain 3B</i>
LGMD 2B	Limb-Girdle Kas Distrofisi tip 2B
Lrp4	Lipoprotein Receptör İlişkili Protein 4
M	Molar
mg	Miligram
MGFA	<i>Myasthenia Gravis Foundation of America</i>
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MPT	<i>Mitochondrial permeability transition</i>
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MusK	Kasa Spesifik Tirozin Kinaz
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NASH	Non-alkolik steatohepatit
nDNA	Nükleer DNA
NET	Nötrofil Ekstraselüler Tuzaklar
NF-κB	<i>Nuclear factor- kappa b</i>
ng	Nanogram
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-Like receptor</i>
NLRP3	<i>Nod-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
PMN	Polimorfonükleer
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reactive Oxygen Türleri
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-qPZR	Gerçek Zamanlı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	Sülfür
SMA	Spinal Müsküler Atrofi

SMCHD1	<i>Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1</i>
SMN	<i>Survival motor neuron</i>
sn	Saniye
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TFAM	Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>
UPR^{mt}	Mitokondriyal Katlanmamış Protein Cevabı
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	ccf-mtDNA'nın sistemik dolaşıma katılma mekanizmaları.	7
2.2.	Dolaşıma katılan ccf-mtDNA ve pro-inflamatuar yanıt oluşumundaki rolü.	11
2.3.	Hasarlı mtDNA ile cGAS-STING yolağının aktivasyonu ve immün cevabın oluşumu.	12
4.1.	Dış standart örnekler (STD 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) ile kalibrasyon eğrisi çizimi.	36
4.2.	MG hastalarının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPZR ile absolut kantitasyonu.	38
4.3.	FSHD ve LGMD2B hastalarının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPZR ile absolut kantitasyonu.	40
4.4.	SMA hastalarının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPZR ile absolut kantitasyonu.	41

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Farklı hastalık gruplarına ait vücut sıvılarından elde edilen örneklerde ccf-mtDNA miktarındaki değişimler.	14
3.1.	Tez çalışması kapsamında oluşturulan çalışma grupları ve hastalara ait klinik/laboratuvar bulguları.	20
3.2.	RT-qPZR deneylerinde kullanılan dış standartların miktarları ve içerdikleri mtDNA kopya sayısı.	28
3.3.	RT-qPZR bileşenleri.	30
3.4.	RT-qPZR reaksiyon koşulları.	30
4.1.	ccf-DNA izolasyon protokolünün optimize edilmesi için denenmiş olan farklı parametreler.	32
4.2.	Tez kapsamındaki çalışma gruplarına ait plazmadan izole edilen ccf-DNA miktarları.	34

1. GİRİŞ

Ökaryotik organeller arasında özelleşmiş bir yapısı ve kendine özgü genomu olan mitokondri, hücre metabolizmasında anahtar işlevi olan, hücre ve dokuya spesifik morfoloji ve dinamik yapı sergileyen yarı özerk bir organeldir. Hücre canlılığının devamı için gerekli olan bu organel, ATP üretiminden sorumlu olmasının yanı sıra, hücre içi Ca^{+2} homeostazının sağlanmasında, sayısız anabolik ve katabolik yolda, apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde ve reaktif oksijen türleri (ROS) sinyal mekanizmalarında da işlevseldir. Özellikle iskelet kası, kalp kası ve nöron gibi yüksek enerji kullanımına gereksinim duyan hücre ve dokularda fazla sayıda bulunmaktadır.

Ağır ve hafif zincir olmak üzere çift zincirden oluşan ve halkasal yapıda bulunan mitokondriyal DNA (mtDNA), 16.569 baz çifti (bç) uzunluğunda olup, 37 gen içermekte ve elektron transport zinciri (ETZ)'nde görevli bazı temel proteinlerin yanı sıra, ATP sentaz enziminin belirli alt ünitelerini kodlamak suretiyle toplam 13 polipeptit ve mitokondriye özgü 22 tRNA ve 2 rRNA sentezinden sorumludur. %99'u nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanan ve sitozole geçerek mitokondriye taşınan mitokondrial proteom ise 1200 kadar proteinin biraraya gelmesiyle oluşur. Hücre yaşamı ve ölümü için kritik öneme sahip bu organelin işlevinin devam edebilmesi, hücre içerisinde her iki genomun koordineli olarak çalışmasını sağlayan birçok faktör tarafından kontrol edilir. Histon proteinlerinin ve DNA tamir mekanizmalarının eksikliği, bunun yanı sıra mtDNA'nın ETZ'ye yakın yerleşimde bulunması organel genomundaki mutasyon hızını arttırmakta ve birçok hastalığın patogenezinde etkin rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, farklı genetik ve çevresel kökenleri olan kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar vb. çeşitli hastalık gruplarında da sekonder bir bulgu olarak organelde işlev kaybı gözlenmektedir. Bu nedenle, mitokondrinin farklı işlevlerini ve hastalıkların patomekanizmasının altında yatan aday mitopatojenik mekanizmaları tanımlamaya yönelik birçok bilimsel araştırma yapılmaktadır. Özellikle son yıllarda, mitokondrinin sistemik dolaşıma katılan DNA'sı aracılığıyla birçok farklı hastalık grubunda doğal bağışıklık sisteminin agonisti olarak inflamatuvar patolojiyi etkilediği saptanmıştır.

Kan, idrar, tükürük, eklem sıvısı, beyin omurilik sıvısı vb. çeşitli vücut sıvılarına katılan mtDNA, **dolaşımdaki serbest mtDNA (circulating cell-free mtDNA/ccf-mtDNA)** olarak adlandırılmaktadır. Normal fizyolojik koşullarda

mitokondri matriksinde bulunurken; organel morfolojisi ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarındaki hasar, hücrel stres, enfeksiyon, aşırı ROS üretimi vb. farklı patolojik etmenlerin de etkisiyle aktive olan apoptoz, nekroz ve NETozis mekanizmaları, mtDNA'nın dolaşıma katılmasına neden olur.

Mitokondrinin bakteriden köken alması nedeniyle genomunda yaygın olarak bulunan hipometile CpG motifleri, ccf-mtDNA'nın sistemik dolaşımda yabancı bir DNA molekülü olarak tanınmasına yol açarak, bağışıklık sistemin uyarıcı bir 'otopatojen' olarak işlev görmesine neden olur. Doku hasarı sonrasında hücrelerden sızarak dolaşıma katılan ve doğal bağışıklık sistemini uyarıcı moleküller **Hasarla İlişkili Moleküler Yapılar** [*Damage Associated Molecular Patterns (DAMP)*] olarak adlandırılmaktadır. Dolaşımda bulunan çift zincirli ve fragmente haldeki mtDNA, DAMP olarak işlev görmekte ve CpG motifleri ile membrana bağlı ya da sitoplazmik DNA sensörleri olan ve patojen ilişkili cevapta görev alan **Kalıp Tanıma Reseptörleri** [*Pattern Recognition Receptors (PRR)*]'ne bağlanmaktadır. ccf-mtDNA, bu reseptörlerden özellikle lökositlerdeki *Toll-like* reseptörü 9 (TLR9) aracılığıyla, doğal bağışıklık sistemini harekete geçirecek sinyal yollarını aktive eder.

Özellikle son yıllarda farklı genetik ve çevresel temelleri bulunan nadir hastalık gruplarında ortak tedaviye yön verebilecek mekanizmaları ortaya çıkarabilme potansiyeli olan çalışmalar (*commonality approach*) artış göstermiştir. Birçok farklı durum/hastalıkta ve hayvan modellerinde dolaşıma çıkan ccf-mtDNA, inflamatuvar patoloji ile ilişkilendirilmiştir. Yapılmış olan araştırmalar, translasyonel bir yaklaşımla, ccf-mtDNA aracılı inflamasyonun alternatif ve birçok farklı hastalık için ortak bir tedavi hedefi olma potansiyelini ortaya çıkarmıştır.

Nöromusküler hastalıklar kas, sinir veya sinir-kas bileşkesinin etkilendiği, geniş çapta etki mekanizmaları olan ve çoğu nadir hastalıklar grubunda yer alan hastalık grubudur. Genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin bu hastaların gelişiminde çok önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Bazıları direkt otoimmün hastalık grubuna dahil olmakla birlikte, birçoğunun patogenezinde ise immün sistem farklı yollar aracılığı ile devreye girmektedir. Ancak günümüze kadar hücrel hasar ve farklı inflamasyon bulgularının görüldüğü nadir nöromusküler hastalıklarda

dolaşımdaki (serum/plazma) mtDNA'nın varlığını, miktarını ve olası işlevini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Bu amaçla tez çalışmasında; (1) otoimmün nöromusküler hastalıklarda, (2) sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklarda, (3) kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklarda, plazmadaki ccf-mtDNA kopya sayıları sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu doğrultuda; hasta ve kontrol örneklere ait periferik kan örneklerinden plazma izolasyonu yapılmış ve devamında optimize edilen protokolle dolaşımdaki total ccf-DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Dolaşımda bulunan total ccf-DNA içerisindeki yalnızca mtDNA'yı amplifiye edecek özgül primerler yardımıyla gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) gerçekleştirilmiş ve hasta gruplarına ait örneklerdeki bilinmeyen ccf-mtDNA kopya sayıları, miktarı bilinen dış standartlar yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondri ve Mitokondiyal DNA (mtDNA)

Evrimsel geçmişi yaklaşık iki milyar yıl önce var olmuş bir alfa-proteobakteriye dayanan ve ökaryotik hücrelerin tamamında bulunan mitokondri, özelleşmiş bir yapısı olan ve kendine özgü genetik sistem içeren yarı-özerk bir organeldir (1, 2). Temelde hücre metabolik faaliyetlerin devamlılığı için gerekli ATP üretiminden sorumlu olmakla birlikte, hücre içi Ca^{+2} dengesinin korunması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, demir (Fe)-sülfür (S) biyogenezi, apoptoz, nükleotit, aminoasit ve lipit metabolizması gibi birçok hücre metabolik aktivitede rol almaktadır (3, 4).

Diğer organellerin aksine mitokondri, maternal olarak kalıtılan özelleşmiş bir genetik sisteme sahiptir. Çift zincirli ve halkasal yapıda olan mitokondriyal DNA (mtDNA), 16.569 baz çifti (bç) uzunluğunda olup, 37 gen içerir ve 13 polipeptit sentezler. Elektron transport zinciri (ETZ)'nde görevli temel proteinlerin yanı sıra, ATP sentaz enziminin bazı alt ünitelerinin ve mitokondriye özgül 22 tRNA ve 2 rRNA sentezinden sorumludur. Yaklaşık 1200 kadar proteinden oluşan mitokondriyal proteomun yalnızca %1'i mtDNA tarafından kodlanmakta, geriye kalan proteinlerin %99'u nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanarak translasyon sonrasında traslokaz proteinleri yardımıyla sitozolden mitokondriye taşınmaktadır (5) Bu nedenle organel işlevinin sağlıklı bir şekilde yerine getirebilmesi, mitokondri ve nükleer genomun kendi aralarında koordineli bir şekilde çalışmasına bağlıdır (6).

Kas ve sinir gibi enerji ihtiyacı yüksek olan hücrelerde daha fazla olacak şekilde, memeli somatik hücrelerinde bulunan organel sayısı ~80-2000 arasında, organel başına düşen mtDNA sayısı da ~2-10 arasında değişiklik göstermektedir (7, 8). Önemli bir özellik olarak histon proteinlerinin bulunmaması ve mtDNA'nın ETZ'ye daha yakın olması, organel genomunda meydana gelen mutasyon hızını nükleer genoma kıyasla ~10 kat arttırmaktadır (9-12). mtDNA'da meydana gelen mutasyonların oksidatif fosforilasyon ile enerji üretimini sekteye uğratarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, oksidatif stres, hücre ölümü gibi durumlarla sonuçlanmakta ve birçok hastalığın patogeneziinde etkin rol oynamaktadır (13). Yüksek miktarda organel stresine ve genom hasarına maruz kalan bu organelin işlevsel

ve yapısal bütünlüğü; katlanmamış protein cevabı (UPRmt), biyogenez, mitokondriyal füzyon/ fisyon, mitofaji gibi birçok farklı mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasının koordineli bir şekilde çalışması ile kontrol edilmektedir (14).

Gelişmekte olan genombilim teknolojileri, birçok hastalığın başlangıcı ve ilerlemesinin altında yatan temel nedenlerden birinin de hücresel stres artışına bağlı olarak mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının işlevini doğru olarak yerine getirememesi ve organelin işlevini yitirmesi olduğunu ortaya koymaktadır (15). Organelde meydana gelen işlev kaybının kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok farklı patolojik durum ile ilişkisi olduğu bilinmektedir (16). Hücre canlılığı ve ölümü için temel işlevlere sahip olan bu organelin, bilinen işlevlerini korumaya ve hücre içerisinde farklı mekanizmalardaki rollerini aydınlatmaya yönelik birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar sayesinde, her geçen gün organelin hücre içerisindeki bilinmeyen işlevlerine ilişkin edinilen bilgiler artmakta ve yeni araştırma alanları doğmaktadır. Özellikle 2010 yılından bu yana ağırlık kazanmış olarak, mitokondrinin, mtDNA aracılığıyla çeşitli sinyal yollarına eşlik ederek inflamasyon oluşumunda ve doğal bağışıklık sistemini harekete geçirmede anahtar rol oynadığı ortaya çıkmıştır (4, 17, 18).

2.2. Dolaşımdaki Serbest mtDNA (*circulating cell-free mtDNA/ccf-mtDNA*)

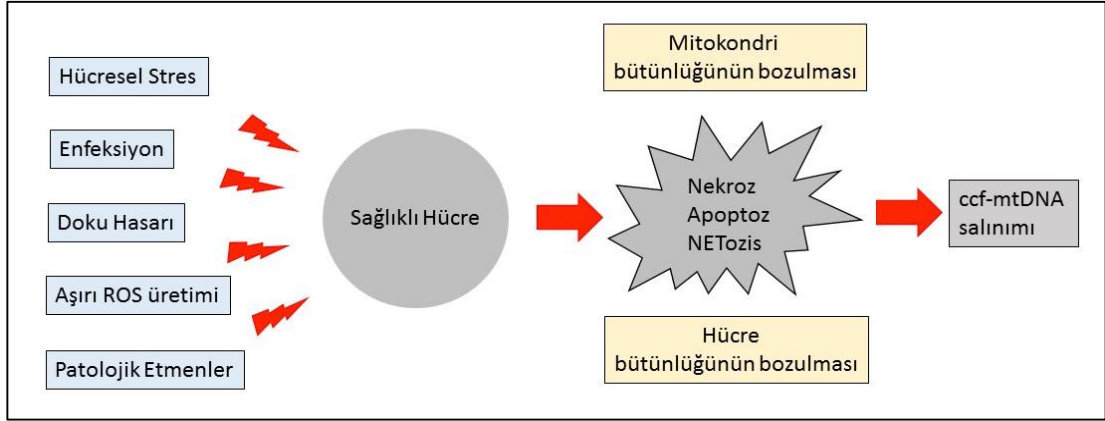
1990'lı yıllarda farklı kanser türlerinde yapılan birçok farklı araştırma, dolaşımda serbest halde bulunan ve tümör dokusundan köken alan nDNA'nın hastalardaki miktarsal farklılıklarını ve mutasyon analizine imkan sağlama potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar araştırmacıları dolaşımda bulunan serbest DNA'nın (*circulating cell-free DNA/ccf-DNA*) hastalıkların tanı ve seyrini belirleme amacıyla 'likit biyopsi' olarak kullanılabilme fikrini gündeme getirmiştir (19-21). Bunun üzerine, mtDNA'nın da dolaşımda serbest olarak bulunabilme potansiyeli üzerine araştırmalar yapılmıştır. Zhong ve ark. 2000 yılında yapmış oldukları bir araştırmada, tip 2 diyabet hastalarına ait plazma ve serum örneklerinde mtDNA varlığını ilk olarak saptanmış ve bu hastalarda yaygın olarak bulunan mt3243 A>G mutasyon taramasını ccf-mtDNA ile gerçekleştirebilmişlerdir (22). Bu çalışmadan

sonra, birçok farklı hastalık grubunda ccf-mtDNA'nın varlığını ve işlevini belirlemeye yönelik çalışmalar ivme kazanmıştır.

Normal fizyolojik koşullarda mitokondri matriksinde bulunurken, bazı durumlarda organelden sitoplazmaya ve buradan da hücre dışı matrikse sızarak kan, idrar, tükürük, eklem sıvısı, beyin omurilik sıvısı vb. çeşitli vücut sıvılarına katılan mtDNA, **dolaşımdaki serbest mtDNA (*circulating cell-free mtDNA/ccf-mtDNA*)** olarak adlandırılmaktadır. Mitokondrinin bakteriden köken alması sebebiyle, mtDNA'da bakteri genomuna benzer nitelikte hipometile CpG motifleri bulunduğu; buna karşın memeli nDNA'sının ise yaygın olarak metile CpG motifleri içerdiği bilinmektedir. İki genom arasında bulunan bu farkın, ccf-mtDNA'nın sistemik dolaşımda yabancı bir DNA molekülü olarak tanınmasına yol açarak, bağışıklık sisteminin uyarıcı bir 'otopatojen' olarak işlev görmesine neden olduğu gösterilmiştir (23-25). Son yıllarda yapılan çalışmalar, farklı mekanizmalara bağlı olarak dolaşıma katılan ccf-mtDNA'nın inflamatuvar yolların aktivasyonu ve immün yanıt oluşum mekanizmaları arasındaki bağlantıdaki işlevleri üzerine yoğunlaşmıştır.

2.2.1. ccf-mtDNA ve Sistemik Dolaşıma Katılma Mekanizmaları

mtDNA'nın sistemik dolaşıma çıkma mekanizmasına ilişkin detaylı yollar henüz net olarak bilinmese de, günümüze kadar yapılmış olan araştırmalar temelde apoptoz, nekroz ve NETozis mekanizmalarının ccf-mtDNA'nın dolaşıma katılmasında işlevi olduğunu ortaya koymaktadır (26). Öte yandan; organel morfolojisi ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarındaki hasarların, hücresel stres, enfeksiyon, aşırı ROS üretimi vb. farklı patolojik etmenlerin de bu mekanizmaları tetikleyerek mtDNA salınımına zemin oluşturabileceği ileri sürülmektedir (18) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. ccf-mtDNA'nın sistemik dolaşıma katılma mekanizmaları

Dolaşımdaki mtDNA'nın kaynağı doku hasarından etkilenen hücreler veya inflamatuvar mekanizmalarda görevli olan çeşitli hücreler olabilir. ccf-mtDNA'nın dolaşıma salınmasındaki temel faktörlerden biri nekroz temelli hücre ölümüdür. Dokuda meydana gelen patoloji ve/veya hücresel hasar, nekroz mekanizmasını tetikleyerek mtDNA'nın hücre dışına salınmasına neden olmaktadır (18). Kronik inflamasyon, mitokondride meydana gelen işlev kayıpları ve aşırı ROS üretiminin de, hücreyi nekroza sürüklediği bilinmektedir. (27). Nekroz sırasında organel bütünlüğünün bozulduğu ve mitokondriden N-formilpeptit, mitokondriyal lipitler, TFAM ve ATP moleküllerinin yanı sıra mtDNA'nın da dolaşıma salınımının gerçekleştiği belirlenmiştir (4). Akut Miyokard İnfarktüsü (AKİ), kardiyomiyositlerde yoğun nekrozun saptandığı inflamatuvar bir hastalık olup, AKİ hastalarına ait plazma örneklerinde yüksek oranda ccf-mtDNA varlığı saptanmıştır (28, 29). Ayrıca, travma sonucu dokuda meydana gelen hasara bağlı olarak, hücre yapısının ve mitokondrilerin zarar görmesi sebebiyle mtDNA'nın dolaşıma salındığı belirlenmiştir(30, 31). Bakteriyal enfeksiyon durumunda ölen lökositlerden de mtDNA salınımı gerçekleşmektedir (32, 33). İlginç bir bulgu olarak, kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılan katyonik nano taşıyıcıların, toksik etki sonucu hücrelerde akut nekroz sonucu mtDNA salınımı sebep olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (34, 35). Bu çalışma, bazı ilaçların mtDNA'nın dolaşıma salınma mekanizmalarına etki edebileceğini göstermektedir.

ccf-mtDNA'nın dolaşıma katılma mekanizmalarından biri de apoptoz mekanizmasıdır. Apoptoz sırasında mtDNA'nın fagosite olamayan apoptotik

cisimciklerin membranından sızarak dolaşıma salınabileceği belirtilmektedir (36). Farklı bir çalışmada, apoptoz sırasında *BCL-2 like protein 4* (BAX) ve *BCL-2 homologous antagonist/killer* (BAK) aracılı mitokondri dış zar geçirgenliğinin artması nedeniyle, sitoplazmaya dış zardan sıyrılarak çıkan iç zardan mtDNA'nın salındığı tespit edilmiştir (37, 38). Matrikste yer alan mtDNA'nın, geçirgenliği artan iç zardan sitoplazmaya, buradan da ekstraselüler bölgeye taşındığı belirlenmiştir (39, 40).

Bağışıklık sisteminde görevli nötrofiller, apoptoz ve nekrozdan farklı olarak NETozis olarak adlandırılan bir hücre ölüm mekanizmasına sahiptirler. Vücuda giren bakterileri yok etmek amacıyla, nDNA, histonlar ve antimikrobiyal proteinleri içeren ve hücre dışına doğru oluşan Nötrofil Ekstraselüler Tuzak (NET) adı verilen ağsı yapılar oluştururlar. Oluşan NET yapıları sayesinde bakterinin etrafını sararak etkisiz hale getirir ve ölüm sırasında içerdikleri DNA ve protein komplekslerini hücre dışına salarlar (41). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ilginç olarak NET yapılarının mtDNA da içerdiği saptanmıştır (42, 43). Nötrofillerdeki ROS üretimi artışının, NET yapılarını oluşumunu tetiklediği ve bu yapılar aracılığıyla mtDNA salınımını da gerçekleştirdiği gösterilmiştir (44). Bu durum, nötrofillerin ccf-mtDNA'nın salınmasında önemli bir yeni kaynak oluşturabileceği fikrini doğurmuştur.

Yapılan bir başka araştırmada ise, dokuda hasarın olduğu bölgeye göç eden polimorfonükleer lökositler (PMN), trombositler ve kök hücreler tarafından da nekroz durumundan bağımsız şekilde sekonder olarak mtDNA aktif salınımının gerçekleşme olasılığından bahsedilmiştir (31). Sağlıklı bireylerden elde edilen örneklerde de ccf-mtDNA'nın varlığının gösterilmesi, mtDNA'nın normal fizyolojik durumda da düzenli olarak sitoplazmaya geçerek hücre dışı matrise ve buradan da sistemik dolaşıma katılmasına yol açan bir mekanizmanın var olabileceğini düşündürmektedir (18)

2.2.2. ccf-mtDNA ve Sistemik Dolaşımda Bulunma Şekilleri

ccf-mtDNA'nın, çift zincirli uzun/kısa fragmanlar halinde ve yapı olarak serbest ve/veya mikroveziküller içerisinde dolaşıma katıldığı belirtilmiştir (18). mtDNA'nın fragmantasyon mekanizması tam olarak bilinmese de, hücrelerden mtDNA salınımına neden olan mekanizmaların kökeninde yatan birçok etmen (enfeksiyon, hücrel ve mitokondriyal stres vb.) organel genomunun stabilitesini de

etkileyerek fragmanlara ayrılmasına neden olmaktadır. Örneğin, sıçan böbrek ve karaciğer dokularında yapılan çalışmalarda, ROS artışının mtDNA stabilitesini bozduğu ve oksidatif strese maruz kalan mtDNA'nın hidrolize olarak ~700-1000 bç. olacak şekilde fragmanlara ayrıldığı belirlenmiştir (45, 46). Öte yandan viral enfeksiyonlarda, mtDNA stabilitesinde rolü olan TFAM'ın ifadesinin azalması sonucunda nükleoid yapılarının zarar gördüğü ve mtDNA'nın stabilitesinin bozulduğu bildirilmiştir (47).

ccf-mtDNA'nın dolaşımında çoğunlukla serbest halde bulunduğu belirtilse de, dolaşımında bulunduğu bir diğer formu mikropartiküller içerisinde olduğu şeklindedir (18). Mikrovezikül ya da mikropartiküller, çapları 50-1000 nm arasında değişen, hücre zarından köken alarak hücreler arası boşluğa salınan veziküllerdir (48). Mikropartiküllerin işlevi tam olarak anlaşılmamış olsa da, tıpkı diğer ekstraselüler veziküller gibi hücreler arası iletişimde görev aldıkları bilinmektedir. Dolayısıyla, mikropartiküller içerisinde bulunan mtDNA'nın da, bağışıklık sisteminin bir uyarını olarak komşu hücrelerde inflamatuvar yolları aktive ettiği düşünülmektedir (18). Non-alkolik steatohepatit (NASH) hastalarına ait hepatosit hücreleriyle yapılmış olan çalışma sonucunda okside haldeki mtDNA'nın, mikropartiküller aracılığıyla hücre dışına salındığı ve dolaşımında bulunan endositik yolak ile PMN hücrelerine internalize olduğu belirtilmiştir (49). Oksidatif hasar sonrası sitozole salınan mtDNA'nı mikropartiküllü içerisine alınarak hücreden uzaklaştırılma nedeninin, hücre homeostazını koruma amaçlı bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. (31, 50). Öte yandan, temelde serbest halde bulunan ccf-DNA'nın inflamasyonla ilişkili temel yolları aktive eden pro-inflamatuvar bir faktör olduğu bilinmektedir.

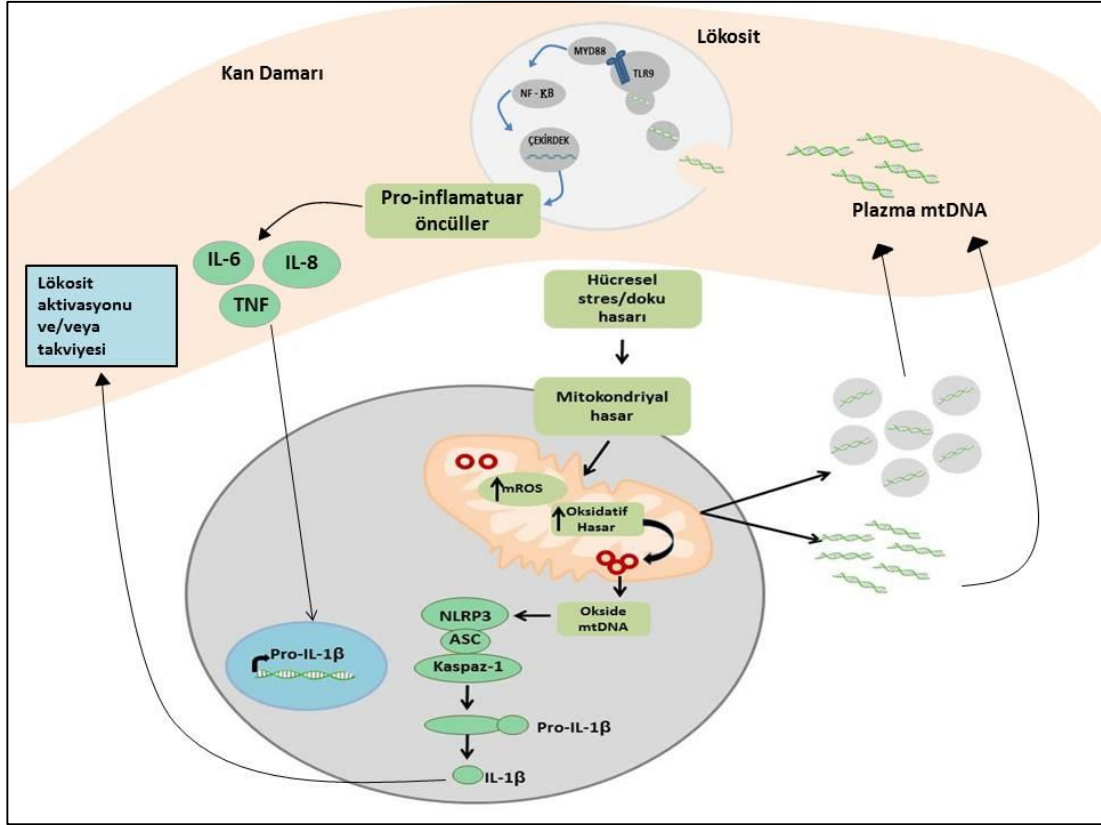
2.3. ccf-mtDNA ve İnflamasyon İlişkisi

Gerek serbest halde, gerekse mikropartiküller içinde olsun, ccf-mtDNA doğal bağışıklık sistemi tarafından tanınan kuvvetli bir tehlike sinyali olup inflamatuvar cevabı ayarlamada önemli bir işleve sahiptir. ccf-mtDNA'nın sistemik inflamasyon ve mitokondriyal hasar arasındaki bağlantıda merkezi rol üstlenebileceği gösterilmiştir (51).

Bilindiği üzere, doku hasarı sonrasında hücrelerden sızarak dolaşıma katılan ve doğal bağışıklık sistemini uyaran moleküller **Hasarla İlişkili Moleküler Yapılar**

[*Damage Associated Molecular Patterns (DAMP)*] olarak adlandırılmakta ve bağışıklık sisteminde görevli **Kalıp Tanıma Reseptörleri** [*Pattern Recognition Receptors (PRR)*]’ne bağlanarak doğal bağışıklık sistemini aktive edip immün yanıt oluşturulmasında rol almaktadırlar (52). Mitokondriden organel dışına çıkan ATP, TFAM, N-Formilpeptit, mtDNA gibi mitokondriyal DAMP’lar dolaşım sisteminde yer alan çeşitli PRR’ları uyarmaktadır (4). mtDNA, önemli bir DAMP molekülü olup, hücre içerisinde ve dışında farklı yollar üzerinden immün yanıtın oluşumunda rol almaktadır. Bu yolda görevli başlıca PRR molekülleri; *Nucleotide-binding oligomerization domain-Like* reseptör (NLR), sitozolik *cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes* (cGAS-STING) ve *Toll-like* reseptörü (TLR) olmakla birlikte, ccf-mtDNA ile ilişkili üzerinde en çok çalışılmış olan yolak TLR9 aracılı olmaktadır (53).

TLR ailesinin bir üyesi olan TLR9; bağışıklık sisteminde görevli dentritik hücreler, doğal öldürücü [*natural killer (NK)*] hücreler, B lenfositleri ve makrofajlar başta olmak üzere, karaciğer ve akciğer gibi farklı dokulara ait hücrelerde de ifade olduğu bilinen bir reseptör grubudur (54). TLR9, dinlenme halindeki hücrede endoplazmik retikulumda bulunmakta, viral veya bakteriyel DNA’ya özgül hipometile CpG motiflerinin endositoz aracılığıyla hücreye alınmasıyla aktif hale geldiğinde ise, lizozomal kompartmana taşınıp ligandına bağlanarak, hücrede immün sistemin aktivasyonunu başlatmaktadır (55). ccf-mtDNA, bakteri genomuna benzer olarak içerdiği hipometile CpG motifleri ile, TLR9 ile direk interaksiyona girerek immün yanıt oluşumunda rol almaktadır (18, 32, 56, 57). ccf-mtDNA, dolaşımdaki lökositler içerisinde endositoz ile internalize olduktan sonra endolizozomal kompartmanda TLR9’a bağlanarak, TLR9- *myeloid differentiation primary response protein 88* (MYD88)- *nuclear factor-κB* (NF-κB) sinyal yolağını uyarır. Bu yolak, *tumour necrosis factor* (TNF), *interleukin (IL)-6*, *interleukin (IL)-8* ve adhezyon molekülleri gibi pro-inflamatuar araçların üretimini artırarak lökosit farklılaşmasına ve dokuya ekstrasvasyonuna sebep olur ve patolojinin gelişmiş olduğu doku hücrelerinde *Pro-interleukin (IL)-1β* aracılı inflamazom oluşumunu tetikler. İnflamazom yapısının oluştuğu hücreden salınan IL-1β ise bağışıklık sistemini uyararak, daha fazla sayıda lökosit aktivasyonuna sebep olur (Şekil 2.2).

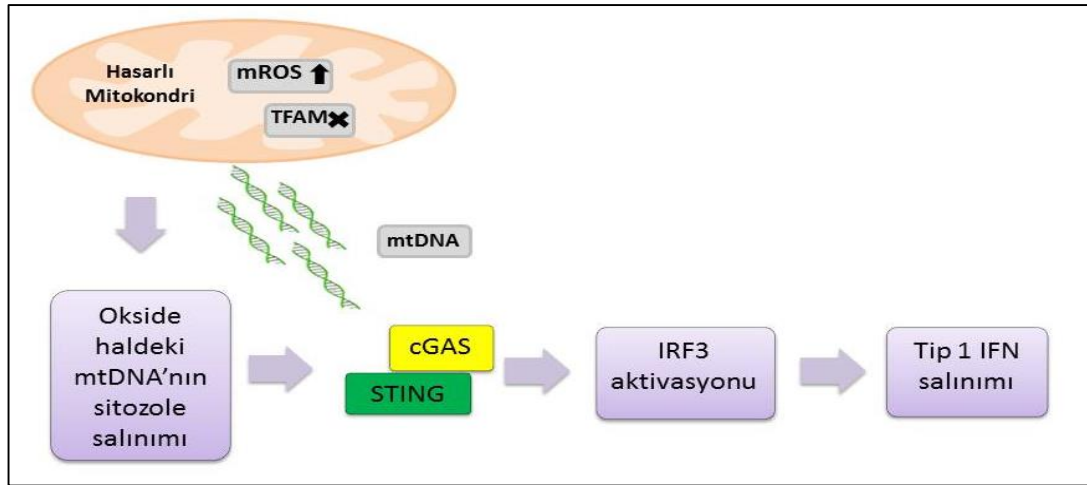


Şekil 2.2. Dolaşıma katılan ccf-mtDNA ve pro-inflamatuvar yanıt oluşumundaki rolü (18, 58).

Bunun yanı sıra, hücreden salınan mikropartiküller içindeki ccf-mtDNA'nın da dokuda dinlenme halinde bulunan makrofajlardaki TLR9 tarafından tanınarak NFκB sinyal yolağı aktivasyonu ile pro-inflamatuvar yanıtı başlattığı gösterilmiştir (18). ccf-mtDNA'nın TLR9 aracılı pro-inflamatuvar cevap aktivasyonu hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (34).

ccf-mtDNA dışında, oksidatif hasar içeren mtDNA'nın sitoplazmaya çıkmasının da *Nod-like receptor family pyrin domain-containing 3* (NLRP3) inflamazomunun oluşumunda anahtar rol üstlendiği belirtilmiştir (59, 60). Oligomerize olan NLRP3 inflamazomu, adaptör bir protein olan *Apoptosis-associated speck like protein with a CARD* (ASC) aracılığı ile kaspaz-1 ile etkileşime girerek IL-1β ve IL-18'in kesimini ve salınımını tetikler ve farklı bir yolla daha inflamatuvar cevabı aktive eder (Şekil 2.2)(18). Devamında, aktifleşen NLRP3 inflamazomunun pozitif geri besleme döngüsü ile daha çok ccf-mtDNA'nın dolaşıma çıkmasına sebep olduğu öne sürülmektedir (61).

TLR9 ve NLRP3 yollarına ek olarak mtDNA'nın aktive ettiği diğer bir yolak ise **cGAS-STING** yolağıdır. Sitozolik DNA sensörü olan cGAS, mitokondriden sitoplazmaya çıkmış olan mtDNA fragmanlarının bağlanmasıyla aktive olur ve ikincil mesajcı olarak görev yapan *cyclic GMP-AMP dinucleotide* (cGAMP) sentezini katalizleyerek, endoplazmik retikulumda yerleşim gösteren STING'i aktive eder (62). Aktif STING, protein kinazlar aracılığı ile transkripsiyon faktörleri olan NF- κ B ve *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3)'ü aktive eder. Bu sayede, Tip 1 interferon (IFN1) ve *Interferon-stimulated genes* (ISG)'lerin ifadesi artar ve antiviral doğal bağışıklık sistemi harekete geçmiştir olur (**Şekil 2.3**)(47).



Şekil 2.3. Hasarlı mtDNA ile cGAS-STING yolağının aktivasyonu ve immün cevabın oluşumu (58).

2.4. ccf-mtDNA ve Hastalıklarla İlişkisi

Mitokondri, hücre içerisinde üstlendiği pek çok anahtar rolün yanı sıra, kendine özgül DNA'sı aracılığıyla çeşitli sinyal yollarını uyararak hastalıkların patogeneze etki etmektedir. ccf-mtDNA gibi dolaşımda serbest halde bulunan DNA'lar, hastalıkların erken tanısında doku biyopsilerine nazaran elde edilmesi daha kolay olan likit biyopsiler olarak işlev görebilmektedir. Birçok farklı kanser türünde, ccf-mtDNA'nın minimal invaziv diyagnostik ve prognostik biyobelirteç olma potansiyeli ortaya çıkmıştır (61, 63). Buna ek olarak, ccf-mtDNA miktarının kanser dışındaki farklı hastalıklarda da kontrol bireylere oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Tablo 2.1).

Son yıllarda, ccf-mtDNA'nın inflamasyonla ilişkili birçok farklı hastalık grubunda doğal bağışıklık sisteminin agonisti olarak inflamatuvar patolojiyi etkilediği saptanmıştır. Bu nedenle, organel DNA'sının bir otopatojen olarak işlev gördüğü ve bağışıklık sisteminin uyarıcı olduğu ileri sürülmektedir (61). Birçok farklı hastalığın yanı sıra, enfeksiyonlardan bağımsız olarak yaşlanma sürecinde görülen kronik inflamasyon tablosunda da (*inflammaging*) ccf-mtDNA'nın DAMP olarak işlev gördüğü, dolayısıyla yaşlanma sürecinin otoimmün hastalık benzeri bir yolak olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştür (51). Gerek otoimmün, gerekse sekonder inflamasyon bulgularının saptanmış olduğu birçok farklı hastalık grubunda, ccf-mtDNA'nın patogeneze etki eden potansiyel bir faktör olup olmadığı halen bilinmemektedir.

Tablo 2.1. Farklı hastalık gruplarına ait vücut sıvılarından elde edilen örneklerde ccf-mtDNA miktarındaki değişimler (58).

Hastalık Kategorisi	Hastalık	Analiz Edilen Vücut Sıvısı	ccf-mtDNA (artış/azalış)
Otoimmün Hastalıklar	Romatoid ve İnflamatuvar Artrit	Plazma, Eklem Sıvısı	Artış
	Granülomatozis Polianjiit	Serum	Artış
Kardiyovasküler Hastalıklar	Hipertansiyon	Plazma	Artış
	Ateroskleroz	Plazma	Artış
	Miyokard İnfarktüsü	Plazma	Artış
	Koroner Kalp Hastalığı	Plazma	Artış
	İskemik Kalp Hastalığı	Serum	Artış
Karaciğer Hastalıkları	Akut Karaciğer Yetmezliği	Serum	Artış
	Nonalkolik Steatohepatit (NASH)	Plazma	Artış
	Asetaminofen Dozajına Bağlı Olarak Gelişen Karaciğer Yetmezliği	Serum	Artış
Travma	Travma	Plazma	Artış
	Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS)	Plazma	Artış
	Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu (MODS)	Plazma	Artış
Enfeksiyon	Sepsis	Plazma	Artış
Kanser	Meme Kanseri	Plazma	Azalış
	Yumurtalık Kanseri	Plazma	Artış
	Akciğer Kanseri	Plazma	Artış
	Testis Kanseri	Serum	Artış
	Ewing Sarkomu	Serum	Azalış
	Prostat Kanseri	Plazma	Artış
	Ürolojik Malignite	Serum	Artış
	Adenokarsinom	Plazma	Artış
	Renal Hücreli Karsinom	Plazma	Artış
	Hepatoselüler Karsinom	Serum	Azalış
Nörodejeneratif Hastalıklar	Alzheimer	BOS	Azalış
	Parkinson	BOS	Azalış
Yaşlanma ile İlişkili Hastalıklar	Kronik İnflamasyon	Plazma	Artış
Diğer	Otizm	Serum	Artış
	Bipolar	Serum	Artış
	Hemodiyalize Bağlı Kronik İnflamasyon	Plazma	Artış
	Yaralanma	Plazma	Artış
	Friedreich Ataksisi	Plazma	Azalış
	Majör Depresif Bozukluk	Plazma	Artış
	Egzersiz	Plazma	Azalış

2.5. İnflamasyonla İlişkili Nöromüsküler Hastalıklarda ccf-mtDNA'nın Olası İşlevi

Nöromüsküler hastalıklar, doğrudan veya dolaylı olarak kol, bacak ve gövdeyi hareket ettiren iskelet kaslarının işlev ve aktivitesini etkileyen; ilerleyici kas zayıflığı ve bazıları erken dönemde ölüm ile karakterize çok geniş sendrom ve hastalıklar grubunu içermektedir. Bu gruptaki hastalıkların çoğu nadir genetik hastalıklar olmakla beraber; motor nöronu, periferik sinirleri ve sinir-kas kavşağını tutan hastalıklar olacak şekilde üç ana sınıfta incelenirler (64). Günümüze kadar tanımlanmış 780 farklı nöromüsküler hastalık tipi ve 417 hastalıktan sorumlu gen bilgisi mevcut olmakla beraber, tüm nöromüsküler hastalıkların toplu olarak insidansı 1/3000 olarak saptanmıştır (65). Söz konusu hastalıkların birçoğu erken yaşta ortaya çıkmakta ve yaşa bağlı olarak ilerleme göstermektedir (66). Genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin bu hastaların gelişiminde çok önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Bazıları direkt otoimmün hastalık grubuna dahil olmakla birlikte, bir çoğunun patogenezinde ise immün sistem farklı yollar aracılığı ile devreye girmektedir (67). İnflamatuvar miyopatiler, distrofiler, metabolik ve ilaca bağlı miyopatiler gibi bu gruba dahil farklı hastalık gruplarında da; apoptoz, nekroz ve otofaji mekanizmalarının hasarlı/rejenere olan kas liflerinde bir arada gözleendiği saptanmıştır (68). Bunun yanı sıra, mitokondriyal sitopatiler dışındaki genetik ve patolojik olarak farklı birçok nöromüsküler hastalıkta da ortak bir bulgu olarak mitokondri hasarı gözlenmektedir (69). Ancak, nöromüsküler hastalıklara yönelik ortak ve etkin bir tedavi yaklaşımı olmamakla birlikte, tedavi seçenekleri çoğunlukla tek gen-tek hedef yaklaşımını benimsemekte ve kişiye özgül yenilikçi tedavi seçeneklerinin önünü açacak klinik öncesi çalışmalar sadece bazı hastalıklar için bulunmaktadır. Bu amaçla son yıllarda özellikle farklı genetik ve çevresel temelleri bulunan bu tür hastalık gruplarında ortak tedaviye yön verebilecek mekanizmaları ortaya çıkarabilme potansiyeli olan çalışmalar (*commonality approach*) artış göstermiştir.

Son yıllarda ccf-mtDNA'nın, çeşitli hastalık gruplarında doğal bağışıklık sisteminin agonisti olarak inflamatuvar patolojiyi etkilediği saptanmıştır. Yapılmış olan araştırmalar, translasyonel bir yaklaşımla, ccf-mtDNA aracılı inflamasyonun alternatif ve birçok farklı hastalık için ortak bir tedavi hedefi olabileceğini ortaya çıkarmıştır (61). Ancak günümüze kadar inflamasyonla ilişkili farklı nöromüsküler hastalık

gruplarında dolaşımdaki (serum/plazma) mtDNA'nın varlığını, miktarını ve inflamasyon mekanizmasındaki olası işlevini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Bu amaçla tez çalışmasında; (1) otoimmün nöromusküler hastalıklarda, (2) sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklarda, (3) kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklarda, serum ya da plazmadaki ccf-mtDNA miktarlarının gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile absolut (mutlak) kantitasyonun yapılması ve sonuçların sağlıklı kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca yönelik olarak tez çalışması kapsamında analiz edilen nöromusküler hastalık grupları şu şekildedir;

Myastenia Gravis (MG) (OMIM: 254200): Otoimmün nöromusküler hastalıklar periferik sinirlerin, sinir-kas bileşkesinin veya doğrudan kasın etkilendiği hastalıklardır. Bu hastalıkların gelişiminde temel olarak bağışıklık sisteminde görevli T ve B lenfositlerin vücudun kendi yapılarını tanımadaki toleransını kaybetmesi ve bu yapılara karşı immün yanıt oluşturmamasından kaynaklanmaktadır. Kronik otoimmün nöromusküler hastalıklar grupları arasında patomekanizması en iyi bilinenlerden olan ve nadir hastalık grubunda yer alan MG'nin insidansı 30/1.000.000 olmakla birlikte, bu oran çocukluk ve adolesan dönemde 1-5/1.000.000 civarında gözlemlenmektedir (70). Kas güçsüzlüğü genellikle göz ve bulber kaslarda ve kol bacak kaslarımızın vücuda yakın proksimal kaslarındadır. Myasthenia Gravis hastalığının en ciddi semptomu solunum güçlüğüdür. MG hastalarının %87'inde postsinaptik bölgede bulunan Asetilkolin Reseptörü (AchR)'ne karşı otoantikor üretilmektedir (71). Bu antikora ek olarak MG hastalarında Kasa Spesifik Tirozin Kinaz (MusK)'a ve Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein 4 (Lrp4)'e karşı otoantikorlar üretildiği de belirtilmektedir (72, 73). Erken veya geç yaşta ortaya çıkan MG'de yaygın olarak timik abnormaliteler, foliküler hiperplazi ve timoma görülür (74).

Fasioskapulohumeral Kas Distrofisi (FSHD) (OMIM: 158900, 158901): FSHD, otozomal dominant kalıtım gösteren ve prevalansı 1-9/100.000 olan nadir bir kas distrofidir (75).Yüz, skapular, omuz, bacak, kalça kuşağı kaslarının yavaş ilerleyen güçsüzlüğüyle karakterize olmakla birlikte, FSHD'nin klinik olarak

birbirinden ayırt edilemeyen iki türü bulunmaktadır. Hastalığın en sık görülen tipi olan FSHD1, 4q35 bölgesinde bulunan D4Z4 tekrarlarındaki delesyonlar sonucunda oluşmakta, FSHD2 ise 18p11.32 kromozom bölgesinde yerleşim gösteren *Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 (SMCHD1)* genindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. FSHD1’de, D4Z4 tekrar bölgesindeki kısalmalar normalde hipermetile olan bölgenin hipometile olmasına ve buna bağlı olarak *Double homeobox protein 4 (DUX4)* geninin ifade artışına neden olmaktadır. *SMCHD1* geninin ise, FSHD1’i modifiye edici bir faktör olduğu düşünülmektedir. FSHD2’de gözlenen *SMCHD1* mutasyonları dolaylı olarak kromozom 4 ve 10 hipometilasyonu ile, FSHD1’deki gibi toksik *DUX4* ifade artışına neden olur. *DUX4* ifade artışı, her iki durumda da pro-apoptotik proteinlerin üretilmesine sebep olur ve kas hücrelerini ölüme sürükler (76-78). Kas dokusunda meydana gelen inflamasyon ortak bir histopatolojik özellik olarak FSHD hastalığında yer almaktadır.

FSHD hastalarına ait kas biyopsiyelerinde yapılan histopatolojik analizler sonucunda, inflamatuvar mononükleer hücrelerin (T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri ve makrofajlar) fazla sayıda olduğu ve bu artışa paralel olarak nekrotik kas fibrillerinin arttığı belirlenmiştir (79).

Disferlinopati (Limb-Girdle Kas Distrofisi tip 2B/ LGMD2B) (OMIM: 253601): Kas distrofilerinin heterojen bir grubu olan otozomal resesif kalıtmımlı Limb-girdle (LGMD2) kas distrofileri genetik ve patofizyolojik olarak heterojen bir hastalık grubu olup, pelvik ve omuz kuşağındaki proksimal kaslarda simetrik olarak ilerleyen kas güçsüzlüğü ve yüksek düzeyde serum-kreatin kinaz (CK) düzeyi ile karakterize, çocukluk ve erişkin yaş grubunda görülen hastalıklardır. LGMD2B, LGMD2’ler arasında en yaygın görülen tiplerden biri olmakla birlikte, prevalansı 1-9/1.000.000’dir (75). Disferlin proteinini kodlayan *DYSF* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşur. Yüksek miktarda kas dokusunda ifade olduğu bilinen, aynı zamanda makrofaj ve endotel gibi farklı hücre tiplerinde bulunan disferlin; veziküler trafikte, sarlolemmal hasarın tamirinde ve Ca^{+2} homeostazında görev olarak, kas bütünlüğü ve fonksiyonunun korunmasına önemli işlevlere sahip bir proteindir (80, 81).

Hastalara ait kas biyopsilerinde yapılan histopatolojik analizler sonucunda, sıklıkla nekrotik lifler ve T lenfosit ağırlıklı inflamasyon bulguları saptanmıştır (82-84). Ayrıca, LGMD2B'nin patomekanizmasında membran tamir mekanizması hasarı olduğundan, hücre dışına çıkan DAMP moleküllerinin bölgede inflamasyonu tetikleyerek bağışıklık sistemini uyarma potansiyeli olduğu düşünülmüştür (85, 86).

Spinal Müsküler Atrofi (SMA) (OMIM: 253300, 253550, 253400, 271150):

Spinal Müsküler Atrofi (SMA), omurilikte bulunan alfa motor nöronların dejenerasyonu ve ilerleyici kas atrofisinin gözlenildiği otozomal resesif kalıtılan nadir bir nöromüsküler hastalıktır. Prevelansı 1-9/100.000 olan bu hastalığın şiddetinin azalması ile sayının arttığı farklı alt tipleri bulunmaktadır (SMA TipI, TipII, TipIII, TipIV). SMA hastalığının patogenezinde *Survival motor neuron 1 (SMN1)* geninde meydana gelen mutasyonlar rol oynamaktadır. Hastaların %96'sında SMN1 geninde ekzon 7 ve 8'de homozigot delesyon bulunurken %4'ünde birleşik heterozigot mutasyonları bulunmakta ve sadece ekzon 7 delesyonu taşıyan hastalar da bulunmaktadır (87). *SMN1*'e ek olarak insan genomunda SMN proteini kodlayan diğer bir gen ise *SMN2*'dir. Bu iki gen %99 oranında homoloji göstermekle birlikte, iki geni birinden ayıran en önemli farklılık, 7. ekzonunun 6. pozisyonundaki sitozinin nükleotidinin timine (C>T) dönüşümüdür. Bu transisyon sonucunda SMN2 geninde *Ekzonik Splicing Silencer (ESS)* dizisi oluşmakta ve ekzon 7 içermeyen ve stabil olmayan SMN proteini üretilmektedir (88). Üretilen proteinlerin %10'u işlevsel olmakla birlikte bu durum hastalığı önlemek için yeterli değildir. SMN2 kopyası sayısına bağlı olarak üretilen işlevsel SMN protein miktarının artması hastalığın seyrini hafifleterek fenotipe etki etmektedir (89, 90).

Farklı kalıtsal nöromüsküler hastalıkların aksine, SMA hastalarına it iskelet kasında inflamasyon bulguları gözlenmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar hastalığın patogenezinde rol alan motor nöron hücre kayıplarına ek olarak; karaciğer, dalak, timus gibi periferik dokularda meydana gelen işlev kayıplarının hastalığın patogenezinde olan etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. SMA fare modellerinde yapılan çeşitli çalışmalar SMA hastalığında sistemik inflamasyon varlığını kanıtlamıştır. Bu inflamatuvar tablonun merkezi sinir sisteminde yer alan hücreleri etkileyerek nöroinflamasyonda da rol oynayabileceği belirtilmektedir (91, 92).

3. BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Bireyler

Tez çalışması kapsamında belirlenen çalışma grupları, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran, klinik ve laboratuvar bulguları doğrultusunda nöromusküler hastalık tanısı konmuş 19 hasta ve 6 sağlıklı kontrol bireyden oluşmaktadır. Tez kapsamında yapılacak çalışmalar için, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 21.6.18 Karar No: GO 18/598-22) alınmış olup (Bkz. EK-1), çalışmamıza katılan bireylere 'Biyobanka Onam Formu' imzalatılmıştır. Çalışma gruplarını oluşturan hastalık tipleri ve çalışmamız kapsamında toplanan örnekler aşağıda belirtilmiş olup, hasta ve sağlıklı kontrollere ait klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Grup 1- Otoimmün nöromusküler hastalıklar: Bu gruba Myastenia Gravis tanısı almış olan 6 hasta dahil edilmiştir.

Grup 2- Sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklar: Fasyoskapulohumeral Kas Distrofisi (FSHD) tanısı almış 3 ve Disferlinopati (LGMD-2B) tanısı almış 3 hasta olacak şekilde toplam 6 hasta bu grup kapsamında analiz edilmiştir.

Grup 3- Kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklar: Spinal Müsküler Atrofi (SMA) tip III tanısı almış olan 7 hasta tez çalışmamıza dahil edilmiştir.

Grup 4- Sağlıklı kontrol bireyler: Herhangi bir inflamasyon bulgusunun olmadığı, son iki aydır enfeksiyon geçirmediği bilinen benzer yaş gruplarındaki 6 birey tez çalışmasına dahil edilmiştir.

Tablo 3.1. Tez çalışması kapsamında oluşturulan çalışma grupları ve hastalara ait klinik/laboratuvar bulguları

ÇALIŞMA GRUBU 1	Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Tanı Yaşı	MGFA Skoru*	Antikor tipi	Ivig**+ Ek Tedavi
Myastenia Gravis (MG)	MG1	K	42	41	IIIB	Musk	Plazmaferez
	MG2	E	33	32	IIA	AchR	-
	MG3	K	38	32	V	AchR	Plazmaferez
	MG4	K	36	11	IIIA	AchR	-
	MG5	E	35	23	IIIA	AchR	-
	MG6	E	71	55	IIIB	AchR	Metformin

* Myasthenia Gravis Foundation of America skoru

**İntravenöz immunoglobulin

ÇALIŞMA GRUBU 2	Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Tanı Yaşı	Ambulasyon durumu	Tedavi
Fasiyoskapulohumeral Kas Distrofisi (FSHD)	FSHD1	E	31	25	Ambule	-
	FSHD2	E	16	16	Ambule	-
	FSHD3	E	58	47	Ambule	-
Disferlinopati (LGMD2B)	LGMD2B-1	K	23	11	Non-Ambule	-
	LGMD2B-2	K	38	20	Ambule	-
	LGMD2B-3	K	35	8	Non-ambule	-

ÇALIŞMA GRUBU 3	Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Tanı Yaşı	HFMS skoru*	SMA Tip	SMN1 Genotipi (e7/e8)**	SMN2 Kopya Sayısı	Tedavi
Spinal Müsküler Atrofi (SMA)	SMA1	K	27	2	20	III	-/-	3 SMN2	-
	SMA2	K	28	8	4	III	-/+	3 SMN2	-
	SMA3	E	34	11	46	III	-/+	4 SMN2	-
	SMA4	E	39	3	51	III	-/-	4 SMN2	-
	SMA5	E	20	3	16	III	-/-	3 SMN2	-
	SMA6	K	59	11	44	III	-/+	3 SMN2	-
	SMA7	E	38	5	57	III	-/-	3 SMN2	-

* Hammersmith Fonksiyonel Motor Skalası Skoru

** (-) ve (+) SMN1 genotipinde ekson 7 ve 8'de delesyon olma ve olmama durumlarını ifade eder.

ÇALIŞMA GRUBU 4	Kontrol No	Cinsiyet	Yaş	Tedavi
Sağlıklı Kontroller	K1	E	26	-
	K2	K	29	-
	K3	K	31	-
	K4	E	24	-
	K5	K	40	-
	K6	K	35	-

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

3.2.1. Periferik Kandan Plazma/Serum İzolasyonu

- EDTA 'lı Tüp (10 ml/BD Vacutainer)
- Kırmızı kapaklı serum izolasyon tüpü (10 ml/BD Vacutainer)
- Soğutmalı Santrifüj (BOECO U320/R)

3.2.2. Plazma/Serum Örneklerinden ccf-DNA İzolasyonu

- *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit/Human Plasma and Serum* (QIAGEN): Kit içerisinde; guanidin tiyosiyanat içeren *ACL* lizis tamponu, *ACB* nükleik asit bağlama tamponu, guanidin hidroklorür içeren *ACW1* ve *ACW2* yıkama tamponları, *AVE* elüsyon tamponu ve Proteinaz K ile nükleik asitlerin membrana bağlanmasını güçlendiren *Carrier RNA* bulunmaktadır.
- *QIAamp DNA Blood Mini* (QIAGEN): Kit içerisinde; guanidin hidroklorür içeren *AL* lizis tamponu, guanidin hidroklorür içeren *AW1* yıkama tamponu, *AW2* yıkama tamponu, *AE* elüsyon tamponu ve Proteaz yer almaktadır.
- Soğutmalı Santrifüj (BOECO U320/R)
- *QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold with the QIAvac Connecting System* (QIAGEN)
- Hibridizasyon Fırını (Amersham Life Sciences)

3.2.3. ccf-DNA Konsantrasyon Ölçümü

- *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Scientific): Bu kit içerisinde; *Qubit dsDNA HS* reaksiyon solüsyonu ve *Qubit dsDNA HS* dilüsyon tamponu, *Qubit dsDNA HS* Standart 1 (0 ng/μL) ve Standart 2 (10 ng/μL) bulunmaktadır.
- *Qubit Assay tüpleri* (Thermo Fisher)
- *Qubit 2.0* Florometre (Invitrogen)

3.2.4. İnsan mtDNA'sı ile Dış Standart Örneklerin Hazırlanması

- *Human Mitochondrial Standard Reference Material® 2392-I* (NIST/USA)

- Konvansiyonel Polimeraz Zincir Raksiyonu (PZR) ile mtDNA'nın amplifikasyonu:

10X Buffer (NH₄)₂SO₄ (Thermo Fisher)

25mM MgCl₂ (Thermo Fisher)

Deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) (Jena Biosystem): 2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP

mtDNA amplifikasyonu için primer dizileri (Oligomer): Mitokondriyal genomda 317-381. bazlar arasındaki 64 bç'lik *D-loop* bölgesini amplifiye etmektedir.

Mito-F: 5'-CTTCTGGCCACAGCACTTAAAC-3'

Mito-R: 5'-GCTGGTGTTAGGGTTCTTTGTTTT-3'

Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher)

Distile Su

- PCR pürifikasyon kiti (*Nucleospin Extract II*, Macherey-Nagel): Kit içerisinde; guanidin tiyosiyanat içeren *NTI* bağlama tamponu, *NT3* yıkama tamponu ve *NE* elüsyon tamponu yer almaktadır.
- SimpliAmp™ *Thermal Cycler* (Applied Biosystems)
- Vorteks (*V1 Plus*, Biosan)
- Mini santrifüj (*Multi Spin*, Biosan)
- Soğutmalı Santrifüj (BOECO U320/R)
- *Nanodrop* 1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)

3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile ccf-mtDNA'nın Absolut (Mutlak) Kantitasyonu

- *SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix* (Sigma)
- 25mM MgCl₂ (Sigma)
- *Strip Tubes and Caps 250* (0.1 ml/QIAGEN)
- *Rotor-Gene 6000™* (Corbett Research)
- Vorteks (*V1 Plus*, Biosan)
- Mini santrifüj (*Multi Spin*, Biosan)

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma)	: Moleküler biyoloji kullanımı saflığında	
Tris-asetat tamponu (TAE) (pH 8.0)	: Tris baz (Merck)	2 M
	Glasiyal asetik asit (Merck)	1,14 ml
	Na ₂ EDTA (Merck)	0,5 M
Yükleme tamponu	: Gliserol (Merck)	5,5 ml
	1X TAE tamponu (Merck)	4,5 ml
	<i>Orange G</i> boya (Merck)	0,01 g
Etidyum bromür (Sigma)	: 10 mg/ml (w/v) distile su	
Moleküler ağırlık belirleyicisi	: <i>Gene Ruler 50 bp DNA Ladder</i> (Fermentas)	

3.3. Yöntemler

Tez çalışması kapsamında dolaşımdaki ccf-DNA'yı en yüksek miktarda ve en etkin şekilde izole edebilmek amacıyla, hasta örneklerinin toplanması öncesinde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda, iki kontrol bireyde hem serum hem de plazma izolasyonu yapılmış ve örneklerden farklı kit ve tekniklerle ccf-DNA izolasyonu denenerek, elde edilen ccf-DNA miktarları karşılaştırılmıştır. En uygun protokol belirlendikten sonra, tüm çalışma gruplarında aynı yöntemle ccf-DNA izolasyon tekniği uygulanmış ve örneklerdeki ccf-mtDNA miktarları RT-PZR ile absolut kantitasyonun yardımıyla kontrol örnekler ile karşılaştırılmıştır.

3.3.1. Periferik Kandan Plazma/Serum İzolasyonu

Plazma izolasyonu

- EDTA'lı tüpe alınan 10 ml kan 1900xg'de, 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiş ve üst fazda yer alan plazma 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır.
- Pipet yardımıyla toplanan plazma (4-5 ml) 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 1'er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Hazırlanan plazma örnekleri eritrositlerden tamamen kurtulmak amacıyla 16.000xg'de, 10 dk 4 °C'de tekrar santrifüj edilmiştir.
- ccf-DNA izolasyon kitlerinin uygun gördüğü miktardaki plazma (*QIAamp Circulating Nucleic Acid* kit için 2ml, *QIAamp DNA Blood Mini* kit için 400

μ l) bekletilmeden ccf-DNA izolasyonu yapmak amacıyla ayrılmış, geriye kalan örnek 500 μ l'lik hacimlerde kriotüplere alikotlanarak -80°C'deki derin dondurucularda saklanmıştır.

Serum izolasyonu

- 10 ml kan kırmızı kapaklı serum izolasyon tüpüne alındı ve oda sıcaklığında 45 dk bekletildi.
- 2.000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası üst fazda eritrosit gözlendiği durumda, üst faz ayrı bir 15'lik falkona alınarak tekrar aynı şartlarda santrifüj uygulandı.
- ccf-DNA izolasyon kitlerinin uygun gördüğü miktardaki serum (*QIAamp Circulating Nucleic Acid* kit için 2ml, *QIAamp DNA Blood Mini* kit için 400 μ l) bekletilmeden ccf-DNA izolasyonu yapmak amacıyla ayrılmış, geriye kalan örnek 500 μ l'lik hacimlerde kriotüplere alikotlanarak -80°C'deki derin dondurucularda saklanmıştır.

3.3.2. Plazma/serum örneklerinden ccf-DNA İzolasyonu

Plazma ve serum örneklerinden ccf-DNA izolasyonu için iki farklı kitten yararlanılmıştır.

***QIAamp Circulating Nucleic Acid* kit:** İzolasyon için 2 ml plazma/serum kullanıldı.

- İzolasyonda kullanılacak olan Proteinaz K, silika membran bazlı spin kolon ve *carrier* RNA (cRNA) oda sıcaklığına getirildi. İzolasyon sırasında *RNAse Free* malzemeler ve *DEPC*'li pipet uçları kullanıldı.
- 2 ml'lik plazma/serum örneği için 15 ml'lik falkon tüpü içerisine 1,8 ml *ACL* lizis tamponu ve 5,6 μ l cRNA eklendi ve kısa süre vortekslendi. Karışım daha sonra kullanılmak amacıyla bekletildi.
- Ayrı bir 50 ml'lik falkon tüpü içerisine sırasıyla 200 μ l Proteinaz K, 2 ml plazma/serum örneği ve hazırlanan *ACL* tamponu-cRNA karışımından 1,6 ml eklenerek 30 sn süreyle vortekslendi.
- Hazırlanan karışım 60°C'de 30 dk inkübe edildi.

- ccf-DNA'nın silika bazlı membrana bağlanmasını sağlamak için inkübasyonu tamamlanan karışımın üzerine 3,6 ml *ACB* tamponu eklenerek 15-30 sn süreyle vortekslendi.
- Karışım buz üzerinde 5 dk bekletildi.
- İnkübasyon sırasında vakum sistemi (*QIAvac 24 Plus with the QIAvac Connecting System*) hazırlandı. Vakum sistemi üzerine *Vacconnector* takıldı. *Vacconnector* üzerine kit içerisindeki kolon yerleştirildi, kolonun ağzı açılarak 20ml'lik *tube extender* kolona sıkıca takıldı.
- İnkübasyonu tamamlanan karışım, *tube extender*'a aktarıldı. Vakum sistemi çalıştırıldı ve tüm karışım kolondan geçince *tube extender* dikkatlice çıkarıldı.
- Kolon üzerine 600 µl *ACW1* yıkama tamponu eklendi. Kolonun kapağı açık halde vakum sistemi çalıştırıldı ve tüm tamponun kolondan geçmesi sağlandı.
- Kolon üzerine 750 µl *ACW2* yıkama tamponu eklendi ve vakum sistemi yardımıyla aynı şekilde kolondan geçirildi.
- Kolon üzerine 750 µl EtOH (%96-100) eklendi ve vakum sistemi yardımıyla kolondan geçirildi.
- Kolonun kapağı kapatılarak 2 ml'lik ependorf tüpü içerisine alındı. 20.000xg (14.000 rpm)' de oda sıcaklığında 3,5 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve membranın kurutulması için ağzı açık olacak şekilde 56°C'de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası kolon 1,5 ml'lik elüsyon tüpüne aktarıldı. Kolonun içindeki membranın üzerine 30 µl *AVE* tamponu eklendi ve ağzı kapalı şekilde 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Ağzı kapatılan kolon 20.000xg (14.000 rpm)'de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj edilerek membrana bağlanmış olan ccf-DNA elüsyon tüpü içerisinde toplandı.

QIAamp DNA Blood Mini kit: İzolasyon için 400 µl plazma/serum kullanıldı.

- İzolasyonda kullanılacak Proteaz K, silika membran bazlı spin kolon oda sıcaklığına getirildi. Kit içerisinde yer alan tamponlar vortekslendi.
- 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisine 40 µl Proteaz K aktarıldı. Üzerine 400 µl plazma/serum örneği eklendi ve 3-5 sn vortekslendi.
- Karışım üzerine 400 µl *AL* lizis tamponu eklendi ve 15 sn vortekslendi.

- Karışım daha sonra hibridizasyon fırında 56°C’de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyonu tamamlanan karışım üzerine 400 µl EtOH eklendi ve 15sn vortekslendi.
- Kolon ependorf tüpü içerisine yerleştirildi. EtOH’lı karışım kolona aktarıldı. Kolonun kapağı kapatılarak 6000xg (8000 rpm)’de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni ependorf tüpüne aktarıldı. Kolon üzerine 500 µl AW1 yıkama tamponu eklendi ve 6000xg (8000 rpm)’de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj edildi.
- Kolon tekrar yeni ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 500 µl AW2 yıkama tamponu eklendi ve 20.000xg (14.000 rpm)’de oda sıcaklığında 3,5 dk santrifüj edildi.
- Membranın kurutulması amacıyla, kolon boş bir şekilde aynı şartlarda 1,5 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine daha önce 65°C’de 10 dk ısıtılmış olan 200 µl AE tamponundan 50 µl eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- 6000xg (8000 rpm)’de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj edilerek kolonda bulunan ccf-DNA ependorf tüp içerisine toplandı.

3.3.3. ccf-DNA Konsantrasyonunun Florometrik Ölçümü

Örneklerdeki ccf-DNA konsantrasyonu *Qubit dsDNA Assay Kit* yardımıyla *Qubit 2.0* Florometre cihazında ölçülmüştür. Bu cihaz, konsantrasyon ölçümü için çift zincirli DNA’ya bağlanma özelliğine sahip floresan boya kullanır. Boya çift zincirli DNA’ya bağladığında floresan ışımaya yayar. Elde edilen ışımaya miktarının örnekte bulunan DNA konsantrasyonu ile doğru orantılı olması temeline dayanılarak DNA örneklerinin konsantrasyonu hesaplanır.

- Kit içerisinde bulunan *Qubit dsDNA HS* reaksiyon solüsyonu 1:200 oranında *Qubit dsDNA HS* dilüsyon tamponu ile seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlandı.
- Kalibrasyon eğrisi çizimi için, kit içerisinde yer alan Standart 1 (0 ng/µL) ve Standart 2 (10 ng/µL) örneklerinden yararlanıldı. Her bir standart ayrı bir *Qubit*

Assay tüpte; 10 µl standart örneği ve 190 µl çalışma çözeltisi olacak şekilde hazırlanıp 2-3 sn süre ile vortekslendi.

- Örnekler için *Qubit Assay* tüpte toplam hacim 200 µl olacak şekilde; 2 µl ccf-DNA, 198 µl çalışma çözeltisi ile karıştırılarak 2-3 sn vortekslendi.
- Örnekler ve standartlar oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
- *Qubit 2.0* florometre cihazında *dsDNA High Sensitivity Assay* ile ölçüm yapıldı. Standartların ölçümü ile çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla, hasta ve kontrol bireylere ait izole edilmiş ccf-DNA'ların miktarı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı.

3.3.4. Kalibrasyon Eğrisi Çizimi için İnsan mtDNA'sı ile Dış Standart Örneklerin Hazırlanması

RT-qPZR deneyleri için gerekli olan kalibrasyon eğrisi çizimi için, miktarı bilinen sertifikalı insan mitokondri DNA'sı (*Human Mitochondrial Standard Reference Material® 2392-I*) kullanıldı. Hedeflenen mtDNA bölgesi PZR yardımıyla amplifiye edildi ve pürifiye edilen mtDNA fragmanı standart örneklerin hazırlanması amacıyla kullanıldı.

Konvansiyonel PZR ile hedef bölgenin amplifikasyonu

PZR deneyi; 1x(NH₄)₂ SO₄ tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,4 µM primer çiftleri, 0,03 U Taq DNA Polimeraz ve 1,4 ng mtDNA olacak şekilde total hacim 50 µl'de yapıldı. PZR reaksiyonu ise; 94°C'de 30 sn, 55°C'de 45 sn ve 72 °C'de 45 sn süre ile 35 döngü şeklinde *SimpliAmp™ Thermal Cycler* cihazında gerçekleştirildi.

PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Dış standartların hazırlanması amacıyla insan mtDNA'sından amplifiye edilen PZR ürünü *Nucleospin Extract II* kiti ile pürifiye edildi

- DNA'nın silika bazlı membrana bağlanmasını sağlamak için kit içerisinde yer alan *NT* tamponu, 1:2 oranında PZR ürünü üzerine eklendi ve vortekslendi.

- Örnek karışımı ependorf tüpü içerisine yerleştirilen kolona aktarılarak 11.000xg'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüj edildi ve mtDNA'nın kolon membranına bağlanması sağlandı.
- Yeni ependorf tüpü içerisine aktarılan kolon, iki aşamalı olacak şekilde *NT3* yıkama tamponu ile 11.000xg'de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj edilerek yıkandı ve tekrar ependorf tüpü içerisine alındı.
- Membranın kurutulması amacıyla kolon boş bir şekilde 11.000xg'de oda sıcaklığında 2,5 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 70°C' de ısıtılmış olan 30 µl *NE* elüsyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- 11.000xg 'de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj edilerek membrana bağlanmış olan mtDNA elüsyon tüpü içerisinde toplandı.
- Elde edilen mtDNA'nın konsantrasyonu *Nanodrop* 1000 Spektrofotometre ile ölçüldü.

Dış Standart Örneklerin Hazırlanması

PZR amplifikasyonu sonrası pürifiye edilen insan mtDNA'sı (25 ng/µl) yardımıyla aralarında dilüsyon farkı bulunan 10 dış standart örneği hazırlandı (Tablo 3.2). Her bir standart örneğin içerisinde yer alan mtDNA kopya sayısı ise aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı (93).

$$\text{Kopya Sayısı} = \frac{\text{ng} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{uzunluk} \times 10^9 \times 650}$$

Tablo 3.2. RT-qPZR deneylerinde kullanılan dış standartların miktarları ve içerdikleri mtDNA kopya sayısı

Standartlar	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	STD10
Dilüsyonlar	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	1/5x10 ⁻⁸	1/25x10 ⁻⁸
Miktar (ng/µl)	2,5	0,25	0,025	0,0025	25x10 ⁻⁵	25x10 ⁻⁶	25x10 ⁻⁷	25x10 ⁻⁸	5x10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
Kopya Sayısı /µl	3.619x10 ⁵	3.619x10 ⁴	3.619x10 ³	361.900	36.190	3.619	362	36,2	7,24	1,45

3.3.5. RT-qPZR ile Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA Miktarının Absolüt Kantitasyonu

Absolüt kantitasyon yöntemi bir örneğin miktarını (kopyası sayısı, konstanrasyon) kesin olarak belirlemek için kullanılır. Bunun için, miktarı bilinen bir örnekten seri dilüsyonlar oluşturularak standart örnekler hazırlanır. Miktarı belirlenecek örnek ile standartlar aynı reaksiyon içerisine dahil edilerek, hedeflenen bölge RT-qPZR ile çoğaltılır. Reaksiyon sonunda standartlar yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak örneğin miktarı kesin olarak saptanır. Tez çalışmasında, plazma örneklerinde bulunan total ccf-DNA içerisindeki yalnızca mtDNA'yı amplifiye edecek özgül primerler kullanılarak RT-qPZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve hasta gruplarına ait örneklerdeki bilinmeyen ccf-mtDNA miktarları, çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

RT-qPZR reaksiyonu

- Çalışmamızda RT-qPZR deneyleri, 0,1 ml'lik PZR tüplerinde (*Strip Tubes and Caps 250*) Tablo 3.3'de belirtilen reaksiyon içeriği ve Tablo 3.4'de verilmiş olan koşullarda *Rotor-Gene 6000™* PZR cihazında gerçekleştirildi.
- Tüm örnekler üçlü tekrarlar şeklinde amplifiye edildi.
- Tez çalışması kapsamında hazırlanan ve mtDNA kopya sayıları bilinen dış standart örneklerin ortalama Ct değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Çalışma gruplarında yer alan hasta ve kontrol bireylere ait ccf-mtDNA kopya sayıları çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla *RotorGene 6000 Series Software 1.7 Build 87* yazılımı ile hesaplandı.

Tablo 3.3. RT-qPZR bileşenleri (Bir reaksiyon için)

RT-PCR bileşenleri	Hacim
<i>SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix</i> (100 rxn)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
Primer F (Mito F/ 10 µM)	0,3 µl
Primer R (Mito R/ 10 µM)	0,3 µl
ccf-DNA	2 µl
dH ₂ O	1,5 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.4. RT-qPZR reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94°C	2 dk	1
94°C	15 sn	30
60 °C	15 sn	

3.3.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar *Graphpad Prism 5.0* yazılımı kullanılarak istatistiksel açıdan analiz edildi. Gruplar arasında ccf-mtDNA kopya sayısındaki kat değişimi analizi, *Mann Whitney U* testi kullanılarak yapıldı ve p değeri 0,05 altında kalan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında; (1) otoimmün nöromusküler hastalıklarda, (2) sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklarda, (3) kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklarda, serum ya da plazmadaki ccf-mtDNA miktarlarının RT-qPCR ile absolut kantitasyonun yapılması ve sonuçların sağlıklı kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır.

4.1. ccf-DNA İzolasyon Protokolünün Optimize Edilmesi

Dolaşımda bulunan ccf-DNA miktarı çok azdır (1-100 ng/ml) (94). ccf-mtDNA analizine yönelik olarak literatürde hem plazma hem de serum örnekleri kullanılarak yapılmış farklı araştırmalar mevcut olmakla birlikte, ccf-DNA izolasyonu için standart olarak uygulanan bir protokol bulunmamaktadır. Bu nedenle hasta örneklerini toplamaya geçmeden önce; (1) ccf-DNA izole edilecek başlangıç materyali (plazma/ serum) seçimine karar verilmiş ve (2) ccf-DNA izolasyonu için en uygun protokol optimize edilmiştir. Bu amaçla kontrol örneklerde eş zamanlı olarak denenmiş olan farklı parametreler Tablo 4.1’de verilmiştir. Her bir parametreye ait sonuçlar kendi içerisinde aynı örnek ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.1. ccf-DNA izolasyon protokolünün optimize edilmesi için denenmiş olan farklı parametreler

Deney Optimizasyonu	Denenen Farklı Parametreler	Sonuç
1. ccf-DNA izolasyonu için kullanılacak başlangıç materyali	Plazma	48 ng/ml
	Serum	145,6 ng/ml
2. Plazma izolasyon tekniği	Tek aşamalı santrifüj (1900xg'de 10 dk 4°C)	Eritrosit kontaminasyonu Lökositlerin ayrışmaması
	İki aşamalı santrifüj (ilaveten 16.000xg'de 10 dk 4°C)	Eritrositlerden arundırılmış saf plazma
3. Taze /önceden izole edilip dondurulmuş olarak -80°C' de saklanan plazma örneği	Taze örnek	65 ng/ml
	Dondurulmuş örnek	36 ng/ml
4. ccf-DNA izolasyonu için kullanılacak kit	<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i> (başlangıç hacmi: 200 µl plazma)	121 ng/ml
	<i>QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit</i> (başlangıç hacmi: 2 ml plazma)	866 ng/ml
5. ccf-DNA miktarının ölçümü	Nanodrop 1000 Spektrofotometre (ölçüm sınırı: 2 ng/ml)	Hatalı ölçüm değerleri
	<i>Qubit 2.0</i> Florometre (ölçüm sınırı: 0,2 ng/µl)	Hassas ölçüm değerleri

Deneysel optimizasyon çalışmalarımızın sonucunda, serum örneğinden elde edilen ccf-DNA miktarı (145,6 ng/ml) plazmadan elden ccf-DNA miktarına (48 ng/ml) göre daha yüksek çıkmıştır. Ancak son yıllarda yapılmış olan araştırmalar, plazmadaki ccf-DNA miktarının kan damarında bulunan ccf-DNA miktarını daha doğru yansıtacağı ve serumda farklı hücre kaynaklı ccf-DNA kontaminasyonunun olabileceği yönündedir (95) Bunun yanı sıra, inflamasyon durumunda pleteletlerin aktivasyonu ile ccf-mtDNA salınımının arttığı bilinmektedir (96) Bu nedenle, tez çalışmasına plazma örnekleri kullanılarak devam edilmesine karar verildi. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda (Tablo 4.1), tüm bireylerden EDTA'lı tüpe alınan 10 ml kandan, iki aşamalı santrifüj tekniği kullanılarak plazma izolasyonu yapılmasına ve elde edilen taze plazma örneğinin (-4-5 ml) 2 ml'sinden, *QIAamp Circulating Nucleic Acid* kit yardımıyla ccf-DNA izolasyonu yapılması sonucuna varıldı. Söz konusu kit, daha yüksek hacimde (2 ml) plazma kullanarak daha kısa sürede ve daha

fazla miktarda ccf-DNA izolasyonu yapma imkanı sağlamış olup, kit içerisinde bulunan *carrier* RNA, DNA'ların kolona bağlanmasını kolaylaştırarak izolasyon başarısını yükseltmiştir. Çalışma gruplarına ait ccf-DNA miktarlarının ise, daha hassas ölçüm yapabilme kapasitesine sahip olan *Qubit* 2.0 Florometre cihazı yardımıyla analiz edilmesine karar verildi.

4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Plazma Örneklerinden ccf-DNA İzolasyonu

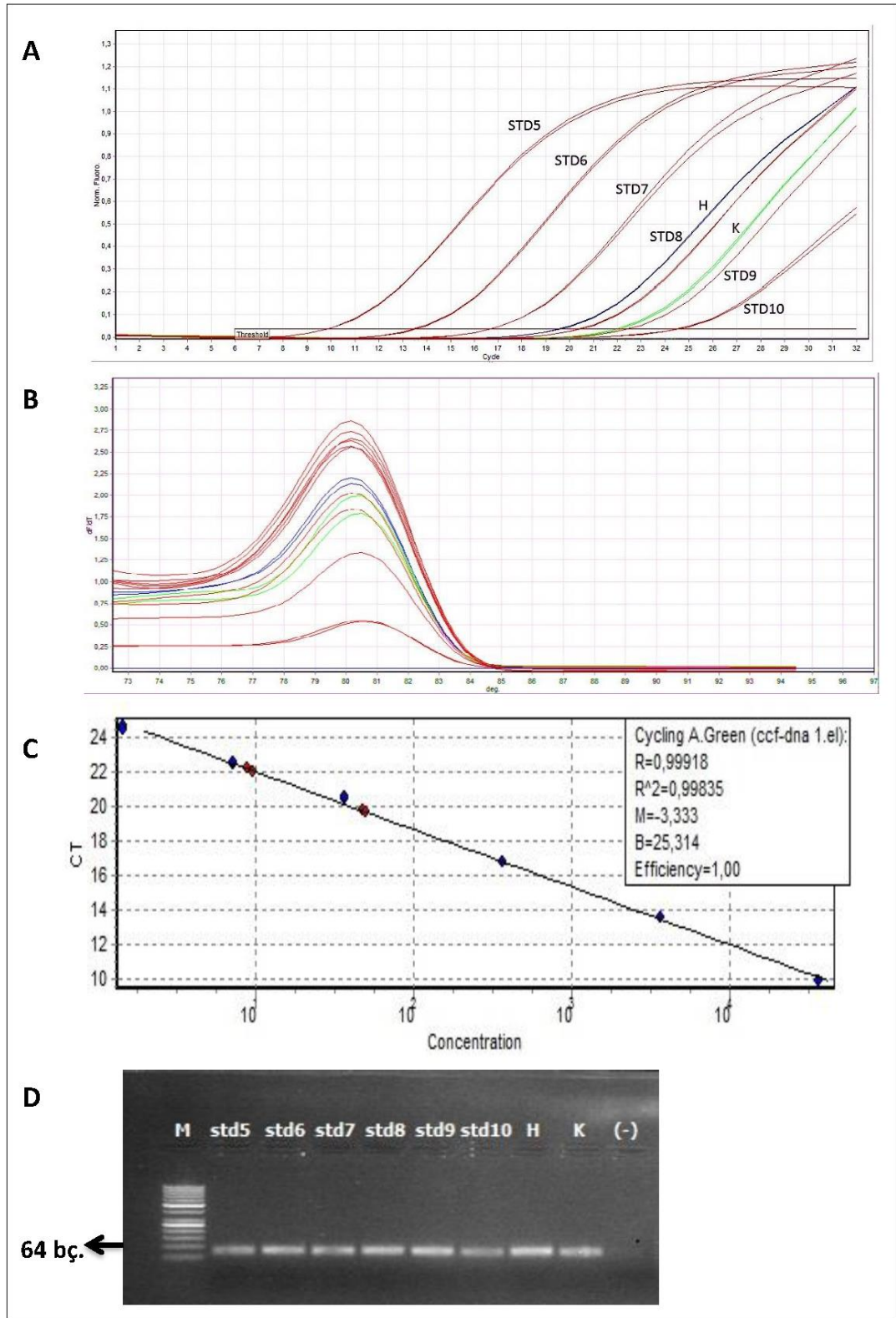
Tüm çalışma gruplarına ait bireylerden izole edilen plazma örneklerinden *QIAamp Circulating Nucleic Acid* kit yardımıyla ccf-DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA miktarları *Qubit* 2.0 Florometre cihazı ile ölçülmüştür (Tablo 4.2). Dolaşımda bulunan ccf-DNA miktarının, gerek aynı gruplar içerisinde gerekse hasta ve sağlıklı kontrol bireyler arasında heterojen bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Toplam 25 birey arasında, 2ml plazma örneğinden en düşük 136 ng/ml en yüksek 1370 mg/ml olacak şekilde ccf-DNA izolasyonu yapılmıştır.

Tablo 4.2. Tez kapsamındaki çalışma gruplarına ait plazmadan izole edilen ccf-DNA miktarları

Çalışma Grubu	Hastalık	Hasta no	ccf-DNA miktarı (ng/ml)
GRUP 1: Otoimmün nöromusküler hastalıklar	Myastenia Gravis (MG)	MG1	547 ng/ml
		MG2	1370 ng/ml
		MG3	226 ng/ml
		MG4	416 ng/ml
		MG5	1150 ng/ml
		MG6	540 ng/ml
GRUP 2: Sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklar	Fasiyoskapulohumeral Kas Distrofisi (FSHD)	FSHD1	331 ng/ml
		FSHD2	769 ng/ml
		FSHD3	576 ng/ml
	Disferlinopati (LGMD2B)	LGMD2B-1	370 ng/ml
		LGMD2B-2	232 ng/ml
		LGMD2B-3	763 ng/ml
GRUP 3: Kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklar	Spinal Müsküler Atrofi (SMA)	SMA1	244 ng/ml
		SMA2	290 ng/ml
		SMA3	227 ng/ml
		SMA4	246 ng/ml
		SMA5	467 ng/ml
		SMA6	416 ng/ml
		SMA7	851 ng/ml
Grup 4: Sağlıklı kontroller	-----	K1	136 ng/ml
		K2	289 ng/ml
		K3	390 ng/ml
		K4	215 ng/ml
		K5	322 ng/ml
		K6	240 ng/ml

4.3. Dış Standart Örnekler ile Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

RT-qPZR ile plazma örneklerinde bulunan ccf-mtDNA miktarının absöüt kantitasyon ile belirlenmesi için kalibrasyon eğrisi çizilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, miktarı bilinen sertifikalı insan mitokondri DNA'sı (*Human Mitochondrial Standard Reference Material*® 2392-I) kullanıldı. Ancak, ticari olarak temin edilen DNA'nın miktarı (65 µl) ve konsantrasyonu (1,4 ng/µl) çok az olduğu ve deneylerin tamamına yetmeyeceği için, hedeflenen mtDNA bölgesi PZR yardımıyla amplifiye edildi ve pürifiye edilen mtDNA fragmanı seri dilüsyonlar oluşturularak 10 standart örneğin (Tablo 3.2) hazırlanması amacıyla kullanıldı. Bir hasta ve bir kontrol örnek ile yapılan RT-qPZR denemeleri sonucunda, hasta ve kontrol örneklere ait amplifikasyon eğrilerinin standart 7 ve 9 arasında olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). Tez kapsamında çalışılacak diğer örneklerin farklı miktarlarda ccf-mtDNA kopya sayısı içerebilecekleri de göz önünde bulundurularak, RT-qPZR deneylerinde STD 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 (Tablo 3.2) olacak şekilde toplam 6 dış standartın kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.1. Dış standart örnekler (STD 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) ile kalibrasyon eğrisi çizimi. (A) RT-qRZR amplifikasyon eğrisi; (B) Erime eğrisi; (C) Kalibrasyon eğrisi; (D) PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü (H: FSHD3, K: K5).

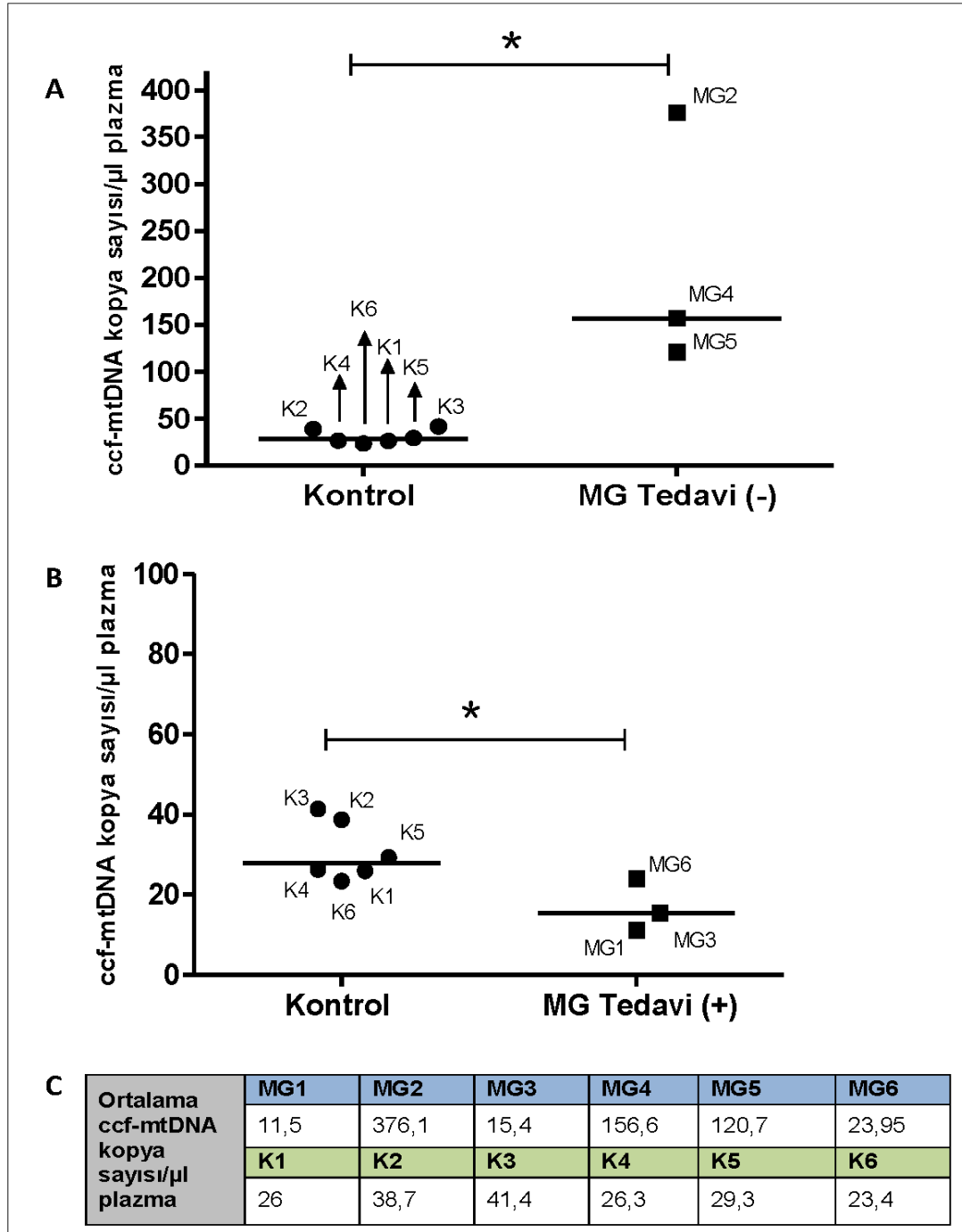
4.4. RT-qPZR ile Çalışma Gruplarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA Miktarının Absolüt Kantitasyonu

4.4.1. Otoimmün Nöromusküler Hastalıklarda Plazmadaki ccf-mtDNA Miktarının Analizi

Otoimmün nöromusküler hastalık grubunda yer alan 6 MG tanısı almış hastaların plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının absolut kantitasyon ile belirlenmesi amacıyla; mtDNA'yı amplifiye edecek özgül primerler ile MG hastaları ve sağlıklı kontrol bireyler için RT-qPZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı reaksiyona dahil eden standartlar yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak hasta ve kontrol bireylerin plazma örneklerindeki ccf-DNA kopya sayıları saptanmış ve karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Analizlerimiz sonucunda, MG hastalarına ait plazmadaki ccf-mtDNA miktarları, hastaların IVIg tedavisine ek bir tedavi uygulanma ve uygulanmama durumlarına göre iki gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Buna göre, tedavi uygulaması yapılmamış olan üç MG hastasına (MG2, MG4, MG5) ait plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 5,6 kat arttığı saptanmıştır ($p=0,0119$) (Şekil 4.2).

Buna ek olarak, kan örneklerinin alındığı dönemde MG hasta grubuna dahil edilen iki hastanın (MG1 ve MG3) plazma değişim tedavisi olarak bilinen plazmaferez (97), bir hastanın ise (MG6) anti-inflamatuar eltisi olduğu bilinen (98) ve tip II diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan (99) Metformin tedavisi gördüğü bilinmektedir. MG çalışma grubu içerisinde yer alan ve tedavi uygulanan bu üç hastanın (MG1, MG3, MG6) plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının, tedavi uygulaması yapılmayan hastaların aksine, kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 1,8 kat azaldığı belirlenmiştir ($p=0,0476$) (Şekil 4.2). RT-qRZR deneylerine ait amplifikasyon, erime ve kalibrasyon eğrileri ile PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü EK 2'de verilmiştir.

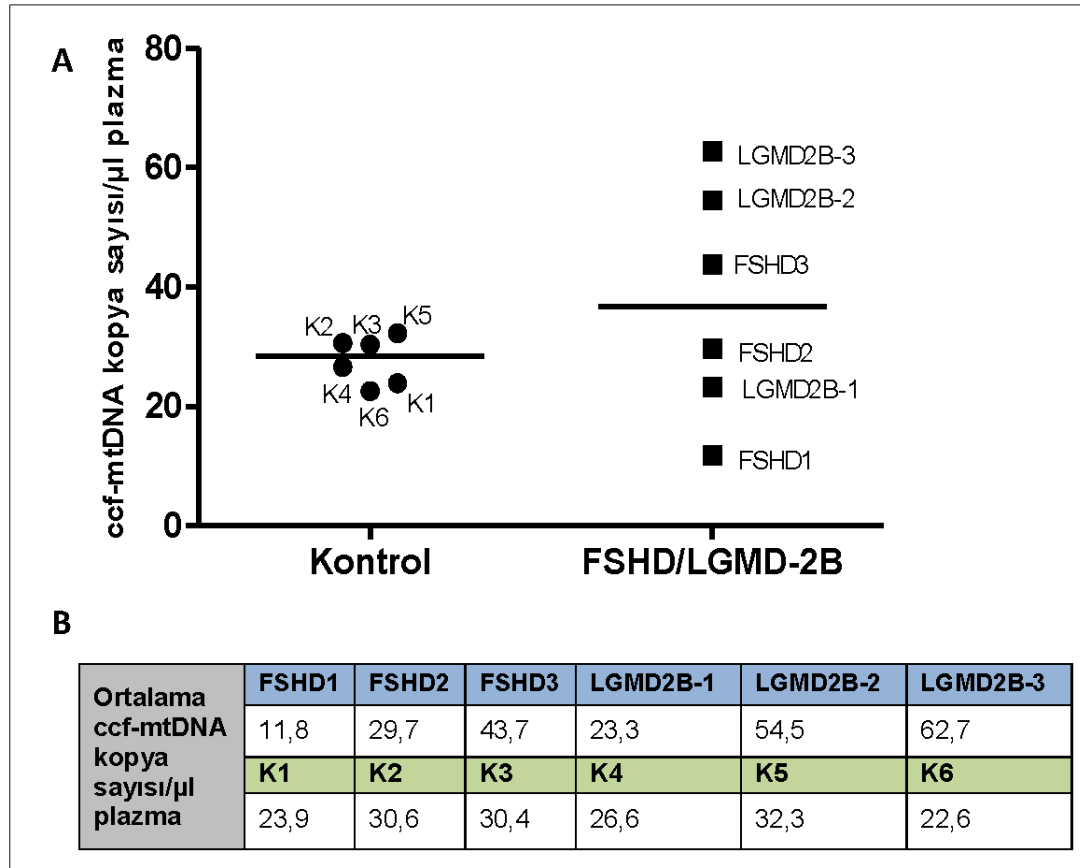


Şekil 4.2. MG hastalarının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPZR ile absölet kantitasyonu. (A) tedavi uygulanmayan (B) tedavi uygulanan MG hastalarının ccf-mtDNA kopya sayılarının sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırılma grafiği (*Mann Whitney U* testi; *:p<0,05); (C) hasta ve kontrol bireylere ait ortalama ccf-mtDNA kopya sayıları.

4.4.2. Sekonder Olarak Kas Dokusunda İnflamasyon Bulgularının Saptandığı Kalıtsal Nöromusküler Hastalıklarda Plazmadaki ccf-mtDNA Miktarının Analizi

Bu çalışma grubuna, farklı genlerin hastalığın patogenezinde sorumlu olduğu ve sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının gözlemlendiği 6 hasta dahil edilmiştir. Hastalardan üçü klinik ve histopatolojik kriterler doğrultusunda FSHD tanısı almakla birlikte, geriye kalan üçü LGMD2B tanısı almıştır. ccf-mtDNA kopya sayılarının absolut kantitasyon ile belirlenmesi amacıyla; hastalar ve sağlıklı kontrol bireyler için mtDNA'yı amplifiye edecek özgül primerler ile RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı reaksiyona dahil eden standartlar yardımıyla çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak hasta ve kontrol bireylerin plazma örneklerindeki ccf-DNA kopya sayıları saptanmış ve karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Yapılan analizlerimiz sonucunda, aynı çalışma grubu içerisinde yer alan tüm hastalara ait plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmediği saptanmıştır (Şekil 4.3). Bunun yanısıra, gerek FSHD gerekse LGMD2B hastalarına ait ccf-mtDNA kopya sayılarının da kendi alt grubu içerisinde heterojenlik gösterdiği gözlemlenmiştir. RT-qPCR deneylerine ait amplifikasyon, erime ve kalibrasyon eğrileri ile PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü EK 3'de verilmiştir.



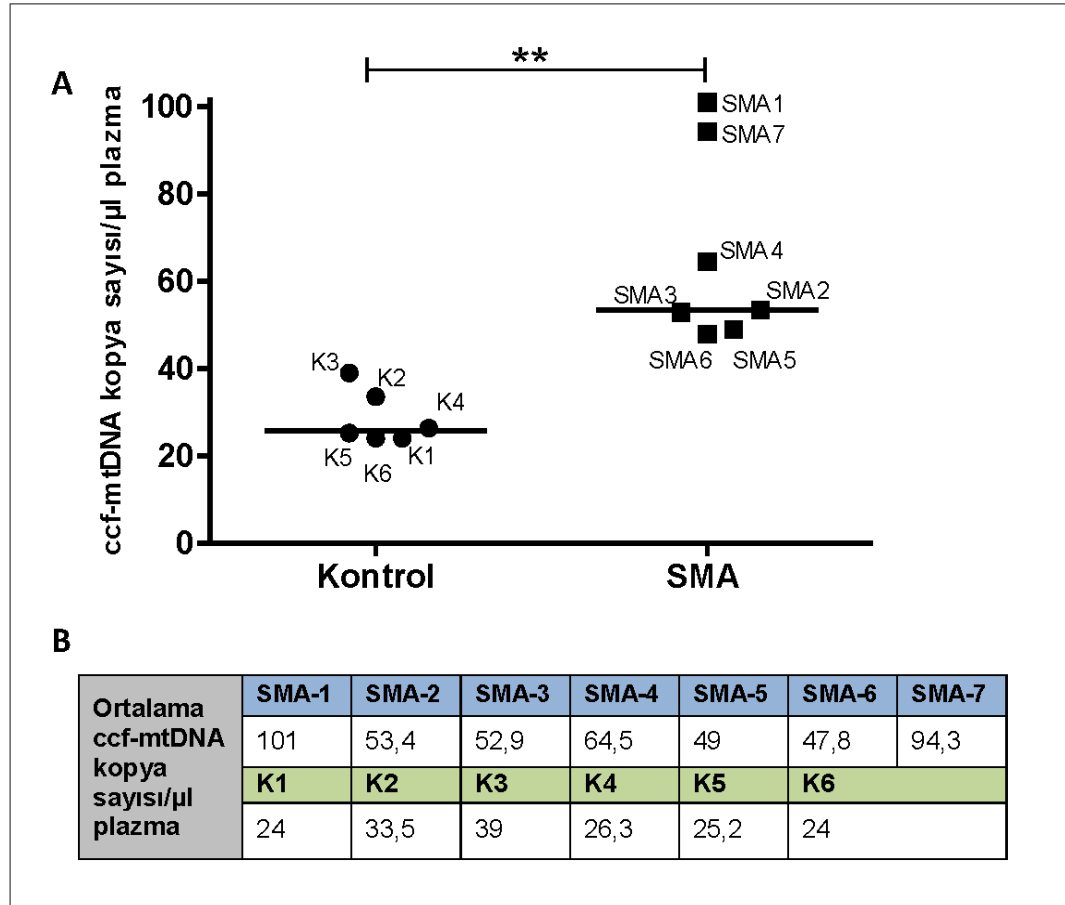
Şekil 4.3. FSHD ve LGMD2B hastalarının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPZR ile absolut kantitasyonu. (A) hastalara ait ccf-mtDNA kopya sayılarının sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırılma grafiği; (B) hasta ve kontrol bireylere ait ortalama ccf-mtDNA kopya sayıları.

4.4.3. Kas Dokusunda İnflamasyon Gözlenmeyen Kalıtsal Nöromusküler Hastalıklarda Plazmadaki ccf-mtDNA Miktarının Analizi

Bu gruba; kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptanmadığı, klinik, genetik ve histopatolojik bulgular doğrultusunda SMA tip III tanısı almış olan 7 hasta dahil edilmiştir. Bu gruptaki hastalar içerisinde dört tanesi (SMA-1, SMA-4, SMA-5, SMA-7) SMN1 geni ekson 7 ve 8 homozigot delesyonu içermekle beraber, üçü (SMA-2, SMA-3, SMA-6) yalnızca homozigot olarak ekson 7 delesyonu içermektedir. SMN2 kopya sayısı 3 veya 4 olan bu hastaların plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayıları, absolut kantitasyon ile belirlenmiş ve kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Analizlerimiz sonucunda, SMA hastalarına ait plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde

2 kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır. ($p=0,0017$) (Şekil 4.4). RT-qRZR deneylerine ait amplifikasyon, erime ve kalibrasyon eğrileri ile PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü EK 4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. SMA hastalarının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPZR ile absolut kantitasyonu. (A) hastalara ait ccf-mtDNA kopya sayılarının sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırılma grafiği (*Mann Whitney U* testi; **: $p<0,01$); (B) hasta ve kontrol bireylere ait ortalama ccf-mtDNA kopya sayıları.

5. TARTIŞMA

ccf-mtDNA, otoimmün hastalıklar, kardiyovasüler hastalıklar, yaşlanma, enfeksiyon, dejeneratif hastalıklar vb. farklı genetik ve çevresel kökenleri olan birçok hastalık/durumda inflamatuvar patoloji ile ilişkilendirilmiştir (18). Yapılmış olan araştırmalar, translasyonel bir yaklaşımla, ccf-mtDNA aracılı inflamasyonun alternatif ve birçok farklı hastalık için ortak bir tedavi hedefi olabileceğini ortaya çıkarmıştır (61). Özellikle son yıllarda, nadir hastalıklara yönelik yapılan birçok bilimsel çalışma, hastalıkların patogenezinde rol oynayan ortak mekanizmaları tanımlama (*commonality*) ve bu mekanizmalar üzerinden ortak tedavi hedefleri bulma üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Ancak, günümüze kadar nadir hastalıklar grubunda yer alan ve farklı inflamasyon yolları ile ilişkilendirilen nöromusküler hastalıklarda dolaşımdaki ccf-mtDNA'nın varlığını, miktarını ve inflamasyon sürecindeki olası işlevini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında; inflamasyonla ilişkili farklı nadir nöromusküler hastalık gruplarında, dolaşımda bulunan ccf-mtDNA kopya sayılarının RT-qPCR ile absolut kantitasyonun yapılması ve sonuçların sağlıklı kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla seçmiş olduğumuz hastalık grupları; (1) otoimmün nöromusküler hastalıklar, (2) sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklar, (3) kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklar ve (4) sağlıklı kontroller şeklinde dört ana grup altında toplanmaktadır.

Dolaşımında bulunan ccf-DNA miktarı hastalık patolojisi durumunda değişim gösterse de, miktarsal anlamda çok azdır (1-100 ng/ml) (94). Günümüze kadar yapılmış araştırmalara bakıldığında, izolasyon için kullanılan standart ve yaygın bir protokol bulunmamaktadır. Literatürde ccf-mtDNA analizine yönelik olarak hem plazma hem de serum örnekleri kullanılarak yapılmış farklı araştırmalar mevcuttur. Bu nedenle, tez çalışmasının ilk aşamasında ccf-DNA izole edilecek başlangıç materyali (plazma/ serum) seçimine karar verilmiş ve ccf-DNA izolasyonu için en uygun protokol optimize edilmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda plazmadaki ccf-DNA miktarının dolaşımda bulunan ccf-DNA miktarını daha doğru yansıtacağı ve serumda farklı hücre kaynaklı ccf-DNA kontaminasyonunun olabileceği yönündeki veriler bulunmaktadır (95) Bunun yanı sıra, inflamasyon durumunda plateletlerin

aktivasyonuna bağılı olarak ccf-mtDNA salınımının arttığı bilinmektedir (96). Bu nedenle, inflamasyon ile ilgili araştırmalarda plazma içerisinde bulunan platelet kaynaklı ccf-mtDNA'nın da izole edilmesi gerekmektedir. Optimizasyon çalışmamız sonucunda, her ne kadar serum örneğinden elde edilen ccf-DNA miktarı (145,6 ng/ml) plazmadan elden ccf-DNA miktarına (48 ng/ml) oranla daha yüksek çıksa da (Tablo 4.1), çalışmamız kapsamında plazma örneklerinden ccf-DNA izole edilmesine karar verilmiştir. Buna ek olarak, plazma izolasyonu sırasında kullanmış olduğumuz iki aşamalı santrifüj tekniği eritrositlerden arındırılmış saf plazma elde etmemizi sağlamıştır (Tablo 4.1). ccf-DNA izolasyonunun optimize edilmesi için için ise, hem taze hem de önceden izole edilip dondurulmuş olarak -80°C' de saklanan plazma rneği kullanılmış ve dondurmanın izolasyon verimini yarıya düşürdüğü (taze örnek: 65 ng/ml, dondurulmuş örnek: 36 ng/ml) sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.1). Yapılan farklı çalışmalarda da, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde 80°C' de dondurulmuş olarak bekletilen plazma örneklerinden daha düşük miktarda DNA izole edildiği bildirilmiştir (100). Bunun yanı sıra, ccf-DNA izolasyonu için, literatürde sıklıkla kullanılan *QIAamp DNA Blood Mini* kit ve *QIAamp Circulating Nucleic Acid* kit adı verilen iki farklı kit denenmiştir (101, 102). Çalışmalarımız sonucunda, sadece dolaşımdaki DNA'ları izole edebilmek amacıyla geliştirilmiş ikinci kitin daha yüksek hacimde (2 ml) taze plazma kullanarak daha kısa sürede ve daha fazla miktarda (866 ng/ml) (Tablo 4.1) ccf-DNA izolasyonu yapma imkanı sağladığı saptanmıştır. İzole edilen ccf-DNA'ların da Nanodrop 1000 spektrofotometre'ye (lm sınırı: 2 ng/ml) göre daha hassas ölçüm sınırı olan *Qubit 2.0* cihazı (lm sınırı: 0,2 ng/l) ile florometrik olarak llmesine karar verilmiştir (Tablo 4.1).

Optimize etmiş olduğumuz protokolle hasta ve kontrol gruplarına ait plazma örneklerinden ccf-DNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen örneklerden yalnızca ccf-mtDNA'yı amplifiye edecek özgül primerler yardımıyla RT-qPZR gerçekleştirilmiştir. RT-qPZR deneylerinde kullanılan primerlerin, mtDNA ve nDNA arasında homoloji gösteren dizileri hedef alması sorun teşkil etmektedir. Evrimsel süreçte mtDNA'nın bir kısmının duplike olarak nDNA'ya entegre olması nedeniyle, nDNA'da mtDNA ile benzer diziler içeren psdogenler bulunmaktadır. Malik ve ark. 2011 yılında yapmış oldukları bir çalışmada mitokondriyal genomun %95'inden fazlasının duplike olarak nDNA'ya entegre olduğunu belirlemiş ve yalnızca

mtDNA'ya özgü dizilerini hedef alan primer dizilerini tanımlamışlardır (103). Tez çalışması kapsamında yapılan RT-qPZR analizlerinde bu primeler çiftlerinden faydalanılmış ve dolaşımdaki total ccf-DNA'lar içerisindeki yalnızca ccf-mtDNA'lar amplifiye edilmiştir. RT-qPZR sonucunda, miktarı bilinen dış standartlar ile çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla hasta gruplarına ait örneklerdeki bilinmeyen ccf-mtDNA kopya sayılarının absolut kantitasyonu yapılmış ve sonuçlar kontrol örnekler ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında ilk hastalık grubu olan otoimmün nöromusküler hastalıklara dahil edilen 6 MG hastasına ait plazmadaki ccf-mtDNA miktarları kontrol örneklerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Çalışma grubumuzdaki hastaların hepsine, dolaşımdaki otoantikörlerin bloke edilmesi amacıyla IVIg tedavisi uygulanmıştır. Hastalardaki ccf-mtDNA kopya sayıları, hastalara standart olarak uygulanan IVIg tedavisine ek bir tedavi uygulanma ve uygulanmama durumlarına göre iki gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Buna göre, ek tedavi uygulanması yapılmamış olan üç MG hastasına (MG2, MG4 ve MG5) ait plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 5,6 kat arttığı saptanırken ($p=0,0119$) (Şekil 4.1), plazmaferez veya Metformin tedavisi uygulanan üç hastanın (MG1, MG3 ve MG6) plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının, tedavi uygulanması yapılmayan hastaların aksine, kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 1,8 kat azaldığı belirlenmiştir ($p=0,0476$) (Şekil 4.2).

Myasteni Gravis hastalığı, bağışıklık sisteminde görevli T ve B lenfositlerin vücudun kendi yapılarını tanımadaki toleransını kaybetmesi sonucunda oluşan ve nöromusküler bileşkede bulunan AchR, MusK, Lrp4 reseptörlerine karşı üretilen otoantikörün nöroiletim bozukluğu oluşturması sebebiyle kas kasılmasının etkilendiği nadir görülen bir otoimmün hastalıktır. MG hastalarının büyük çoğunluğunda foliküler hiperplazi ve timoma gibi timik bozukluklar görülmektedir (74). Ayrıca, timik epitel hücreleri tarafından salgılanan çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin hastalığın patogenezinde görülen kronik inflamasyon tablosuna etki ettiğini belirtilmektedir (104, 105). MG hastalarında artmış olan ccf-mtDNA miktarının, hastalıkta görülen sistemik inflamasyon tablosuna etki eden faktörlerden biri olduğu düşünülebilir.

MG hastalığında elde ettiğimiz verilere benzer şekilde, Sistemik lupus eritematozus (SLE), Romatoid artrit ve Granülomatozis polianjiit (GPA) gibi farklı otoimmün hastalıklara yönelik olarak yapılmış olan çalışmalarda da, dolaşımdaki ccf-mtDNA miktarının arttığı belirlenmiştir (43, 105, 106). Bu artışın sebebinin, SLE ve GPA patolojisinde ortak bir bulgu olarak gözlemlenen ve oksidatif strese bağlı olarak aktif hale gelen NETozis yapılarının olduğu saptanmıştır (43, 107). NETozis yapıları mtDNA'nın sistemik dolaşıma salınımına kaynak oluşturan mekanizmalardan biridir (108). MG hastalarında serum proteinleri ve antioksidan moleküllerin seviyesine bakılarak yapılan araştırmalar, hastalarda oksidatif stres bulgularının varlığını göstermektedir (109, 110) Bu bulgular, MG hastalığında var olan oksidatif stresin, diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, NET yapılarının aktivasyonuna neden olarak dolaşıma salınan ccf-mtDNA miktarını arttırdığı düşündürülebilir. Bunun dışında, var olan oksidatif stres mitokondri ve devamında hücre hasarına neden olarak ccf-mtDNA miktarını arttıyor olabilir.

MG hastalarının üçünde sağlıklı kontrol örneklere kıyasla görülen ccf-mtDNA kopya sayısı azalışının nedeninin ise, hastalara uygulanan ek tedavi yöntemleri olabileceği düşünülmüştür. MG hastalarının ikisine (MG1 ve MG3) plazmaferez tedavisi uygulanmıştır. Plazmaferez, kanın plazma kısmının ayrıştırılarak filtreden geçirildiği bir tedavi yöntemi olup, MG hastalığında üretilen otoantikörlerin vücuttan uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır (97). Plazmaferez sırasında uygulanan filtre işlemi, hastalarda var olan plazma içeriğini yüksek oranda değiştirdiğinden plazmada bulunan ccf-mtDNA miktarını etkileyerek normalde yüksek olan miktarın azalmasına sebep olmuş olabilir. Öte yandan, ccf-mtDNA miktarının azaldığı gözlemlenen diğer MG hastasının (MG6), tip 2 diyabet tanısının bulunduğu ve Metformin kullandığı tespit edilmiştir. Metformin, karaciğerde üretilen glukoz miktarını azaltarak diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (99). Son yıllarda otoimmün hastalıkların modellendiği *in vitro* çalışmalar, metforminin otoimmün hastalıklarda bozulmuş olan immün homeostazını düzenlediği ve immün sistemde görevli birçok hücre tipinin işlevini düzenleyerek hastalıkların şiddetini azalttığı belirtilmiştir (98, 111). Bu çalışmalara bağlı olarak, MG hastasında kontrole göre azalan ccf-mtDNA kopya sayısının Metformin'in anti-inflamuar etkisine bağlı olduğu düşünülebilir.

Tez çalışması kapsamında analiz ettiğimiz ikinci hastalık grubu, sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklar grubudur. Bu gruba sistemik inflamasyon bulgularının görülmediği, ancak histopatolojik olarak kas dokusunda nekroza ve inflamasyon bulgularının saptandığı 3 FSHD ve 3 LGMD2B hastası dahil edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, hastaların plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının, kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.3). Hastalar FSHD ve LGMD2B şeklinde iki gruba ayrılarak analiz edildiğinde bile hasta ve kontrol bireyler arasındaki ccf-mtDNA kopya sayılarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, ccf-mtDNA miktarı artışının lokal olarak saptanmış olan kas dokusu inflamasyonu bulguları yerine, sistemik inflamasyon bulguları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız kapsamında analiz ettiğimiz son hastalık grubu, kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklardan SMA hastalığıdır. Toplam 7 tip III SMA hastasına ait plazma örneğindeki ccf-mtDNA miktarları absolut kantitasyon ile sağlıklı kontrollerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Yaptığımız analizler sonucunda, SMA hastalarında plazmada bulunan ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde 2 kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır. ($p=0,0017$) (Şekil 4.4).

SMA hastalığı ile ilişkili olarak son yıllarda yapılan çalışmalar; SMA hastalığının patogenezinde rol alan yolakların sadece motor nöron dejenerasyonu ile kısıtlı olmadığını, başta immün sistemle ilişkili organlardan timüs ve dalak olacak şekilde, birçok farklı hücre ve doku tipinin de etkilendiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca hastalığının patogenezinde sistemik inflamasyonla ilişkili tanımlanan bulguların önemli rol oynadığını belirtilmektedir (92). Bunun yanı sıra, mekanizması henüz net bir şekilde ortaya konulamamış olsa da SMA hastalığında nöroinflamasyon bulgularının olduğu bildirilmektedir (112).

Ağır fenotip gösteren SMA fare modellerinde yapılmış olan çalışmalar, pro-inflamatuvar sitokinlerin ifadesinin tüm dokularda erken semptomatik dönemde arttığını ve karacağerde akut faz cevabının aktive olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak; nörodejenerasyon, kas atrofisi, kardiyovasküler patoloji ve diyabet gibi SMA fare modelinde de saptanmış olan birçok farklı patolojide, nedeni bilinmeyen sistemik/

kronik inflamasyon bulguları mevcuttur. Bu hastalıkta, bağırsak epitel hücrelerinin geçirgenliğinin bozulmasına bağlı olarak mikroorganizmaların dolaşıma katılmasının inflamasyon için indükleyici bir faktör olduğu düşünülse de, ccf-mtDNA artışının da sistemik inflamasyon yolağında etkisi olduğu düşünülebilir. Ayrıca, akut inflamasyon durumunda hedef bölgeye göç eden bağışıklık sisteminde görevli hücreler, ROS, sodyum hipoklorit ve proteaz salınımına bağlı olarak sağlıklı hücrelerde hasar oluşturabilmektedir (91). İnflamasyon sonucu oluşan bu hasar, dolaşıma salınan ccf-mtDNA miktarının daha fazla artışını tetikleyebilir. Bunun yanı sıra, SMA patogeneğinde farklı hücre tiplerinde saptanmış olan apoptoz ve/veya nekroz mekanizmalarının da ccf-mtDNA salınımına etki ederek sistemik inflamasyona katkı sağladığı düşünülebilir (113).

Tez çalışmasının sonuçları, nöromusküler hastalıklarda saptanmış olan ccf-mtDNA artışının kas dokusundaki lokal inflamasyondan bağımsız olarak, sistemik inflamasyon bulguları ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Sadece sistemik inflamasyon bulguları görülen hastalıklarda (MG ve SMA) dolaşımdaki miktarının arttığı, ancak kas inflamasyonu ile karakterize FSHD ve LGMD2B hastalıklarında miktarının değişmediği saptanmıştır. Buna ek olarak, kas dokusunda inflamasyon bulguları olmayan, ancak sistemik inflamasyon ile ilişkilendirilen SMA hastalığındaki miktarsal artış sonucumuzu destekler niteliktedir. Bu veriler bize sistemik inflamasyon ile ilişkilendirilen gerek nöromusküler, gerekse farklı hastalık gruplarında da ortak bir bulgu olarak ccf-mtDNA miktarının artmış olabileceğini düşündürmektedir.

Hastalıklarla ilişkili yapılan araştırmalar, ccf-mtDNA aracılı inflamasyonun, farklı genetik ve çevresel kökenleri olan hastalık gruplarında ortak bir tedavi hedefi olma potansiyelini ortaya çıkarmış ve translasyonel bir yaklaşımla yeni tedavi stratejilerinin (ccf-mtDNA salınımının önlenmesi, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının aktive edilmesi, mtDNA'nın inflamatuvar potansiyelinin azaltılması, ccf-mtDNA aracılı inflamatuvar yolağın aktivasyonunun engellenmesi vb.) önerilmesini sağlamıştır (46). Yapmış olduğumuz tez çalışması, sistemik inflamasyon bulgularının görüldüğü farklı kökenleri olan nöromusküler hastalıklarda, ccf-mtDNA'nın inflamasyon yolağına etki edebilecek ortak bir molekül olduğunu düşündürmektedir. Günümüzde, nöromusküler hastalıklar için ortak ve etkin bir tedavi yaklaşımı olmamakla birlikte, tedavi seçenekleri

çoğunlukla tek gen-tek hedef yaklaşımını benimsemekte ve kişiye özgül yenilikçi tedavi seçeneklerinin önünü açacak araştırmalar sadece bazı hastalıklar için bulunmaktadır. Farklı genetik/çevresel kökenleri olan bu hastalıkların belli bir grubunda saptanacak ortak yolaklar, ileri dönemde hastalıkların tedavisine yön verecek işlevsel analizlere yol açma potansiyeli taşımaktadır. Evrimsel geçmişi olan organel DNA'sının doğal bağışıklık sistemine detaylı etkilerini ve anlayabilmek için ileri düzeyde çalışmaların daha geniş hastalık gruplarında yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- Dolaşımdaki ccf-mtDNA'nın analizine yönelik çalışmalarda plazmanın daha uygun bir biyolojik materyal olduğu sonucuna ulaşıldı. Serumla kıyaslandığında (145,6 ng/ml) plazmadan izole edilen ccf-DNA miktarının daha az (48 ng/ml) olduğu saptansa da, farklı hücre kaynaklı DNA kontaminasyonunun olmaması ve platelet içermesi nedeniyle, kan dolaşımındaki ccf-DNA miktarını daha iyi yansıtacağı sonucuna varıldı.
- Çalışma gruplarına ait tüm hasta ve sağlıklı kontrol bireylerden EDTA'lı tüpe alınan 10 ml kandan, iki aşamalı santrifüj tekniği kullanılarak eritrositlerden arınmış saf plazma izolasyonu yapılmasına karar verildi.
- Taze plazma örneğiyle çalışmanın ccf-DNA izolasyon verimini arttırdığı sonucuna ulaşıldı (taze örnek: 65 ng/ml, dondurulmuş örnek: 36 ng/ml).
- ccf-DNA izolasyonu için geliştirilmiş olan *QIAamp Circulating Nucleic Acid* kitin, literatürde aynı amaçla sıklıkla kullanılan *QIAamp DNA Blood Mini* kitine kıyasla; daha yüksek hacimde (2ml) plazmadan daha kısa sürede ve daha fazla miktarda (866 ng/ml) ccf-DNA izolasyonu yapma imkanı sağladığı sonucuna varıldı.
- İzole edilen ccf-DNA'ların miktar tayini için; Nanodrop 1000 spektrofotometre (ölçüm sınırı: 2 ng/ml) yerine, daha hassas ölçüm yapabilme kapasitesine sahip olan *Qubit 2.0* florometrenin (ölçüm sınırı: 0,2 ng/µl) kullanılmasına karar verildi.
- Tez çalışması kapsamındaki tüm hasta ve sağlıklı kontrol bireylerden elde edilen ccf-DNA miktarlarının, gerek aynı grup içerisinde gerekse hasta ve sağlıklı kontrol bireyler arasında heterojen bir dağılım gösterdiği gözlemlendi. Toplam 25 birey arasında, 2ml plazma örneğinden en düşük 136 ng/ml en yüksek 1370 mg/ml olacak şekilde ccf-DNA izolasyonu gerçekleştirildi.
- Otoimmün nöromüsküler hastalık grubunda yer alan 6 MG hastasının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayıları absolut kantitasyon yöntemiyle belirlendi ve sonuçlar sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırmalı olarak analiz

edildi. Buna göre; IVIg tedavisine ek bir tedavi uygulaması yapılmamış olan üç MG hastasında, ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 5,6 kat arttığı saptandı ($p=0,0119$). Plazmaferez veya Metformin tedavisi uygulanan üç hastanın plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının ise, kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 1,8 kat azaldığı belirlendi ($p=0,0476$).

- Sekonder olarak kas dokusunda inflamasyon bulgularının saptandığı kalıtsal nöromusküler hastalıklar grubunda yer alan 3 FSHD ve 3 LGMD2B olacak şekilde toplam 6 hastanın plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayıları absolut kantitasyon ile belirlendi ve sonuçlar sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Buna göre; hastaların plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının, kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği saptandı.
- Kas dokusunda inflamasyon gözlenmeyen kalıtsal nöromusküler hastalıklar grubunda yer alan 6 SMA tip III hastasının plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayıları absolut kantitasyon ile belirlendi ve sonuçlar sağlıklı kontrol örneklerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Buna göre; SMA hastalarına ait plazma örneklerindeki ccf-mtDNA kopya sayılarının kontrol örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde 2 kat arttığı sonucuna ulaşıldı ($p=0,0017$).
- Tez çalışması kapsamındaki nöromusküler hastalıklarda saptanmış olan ccf-mtDNA artışının, kas dokusundaki lokal inflamasyondan bağımsız olarak, sistemik inflamasyon bulguları ile ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

6.2. Öneriler

Tez çalışması sonucunda elde edilen bulguların doğrulanması ve desteklenmesi için yapılabilecek çalışmalar aşağıda belirtilmiştir.

- Çalışma gruplarına ait plazmadaki ccf-mtDNA miktarına ilişkin elde edilen verilerin doğrulanabilmesi için çalışma gruplarını oluşturan birey sayıları artırılarak analizler tekrarlanabilir.
- Sistemik inflamasyon bulgularının görüldüğü diğer nöromusküler hastalık gruplarında da benzer bir çalışma yapılarak, ccfmtDNA ve sistemik inflamasyon ilişkisi hakkında daha detaylı bilgi edinilebilir.

- Dolaşımda ccf-mtDNA'nın dışında, ccf-nDNA'nın da bulunduğu bilinmektedir. Özellikle ccf-DNA miktarının yüksek olduğu gözlenen bazı bireylerde saptanmış olan düşük ccf-mtDNA miktarları, bu bireylerde dolaşıma salınan ccf-nDNA miktarının daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Bu sebeple, hasta ve kontrol grubuna ait örneklerdeki ccf-nDNA miktarının da analiz edilmesi elde edilecek sonuçların anlamlılığını kuvvetlendirebilir.
- MG hastalığında saptanmış olan oksidatif stresin, diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, NET yapılarının aktivasyonuna ve ccf-mtDNA salınımına etkisi araştırılabilir. Bu amaçla ilk adım olarak, MG hastalarında gerek oksidatif stres gerekse NETozis belirteçleri analiz edilebilir.
- Sistemik inflamasyon bulgularının görüldüğü SMA hastalığı patogenezinde; farklı klinik tipteki SMA hastaları arasında ccf-mtDNA kopya sayıları analiz edilebilir.
- ccf-mtDNA kopya sayıları artmış olan nöromusküler hastalığa sahip bireylerde, tedavi öncesi ve sonrası kopya sayıları analiz edilerek uygulanan tedavinin ccf-mtDNA salınımına etkisi araştırılabilir.
- Nöromusküler hastalıklara yönelik olarak yapılacak işlevsel analizler ile apoptoz, nekroz, NETozis aracılı hücre ölümlerinin ccf-mtDNA salınımına olan etkisi araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a011403.
2. McCarron JG, Wilson C, Sandison ME, Olson ML, Girkin JM, Saunter C, et al. From structure to function: mitochondrial morphology, motion and shaping in vascular smooth muscle. *J Vasc Res.* 2013;50(5):357-71.
3. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 1981;91(3 Pt 2):227s-55s.
4. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):389-402.
5. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
6. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:701-22.
7. Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;183(2):553-9.
8. Cole LW. The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:85.
9. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(17):6465-7.
10. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8739-46.
11. Wolstenholme DR. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol.* 1992;141:173-216.
12. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):514-9.
13. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
14. Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, Sanderson TH. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol.* 2018;55(3):2547-64.
15. Aksu E. Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi Hastalığında Mitokondri Dinamiğinin İncelenmesi. Yayınlanmamış Tez: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
16. Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol.* 2007;83(1):84-92.

17. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*. 2015;42(3):406-17.
18. West AP, Shadel GS. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(6):363-75.
19. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1994;86(4):774-9.
20. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347-76.
21. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-37.
22. Zhong S, Ng MC, Lo YM, Chan JC, Johnson PJ. Presence of mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pathol*. 2000;53(6):466-9.
23. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-5.
24. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:185-214.
25. Zhang B, Asadi S, Weng Z, Sismanopoulos N, Theoharides TC. Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PLoS One*. 2012;7(12):e49767.
26. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018;93(3):1649-83.
27. Picca A, Lezza AMS, Leeuwenburgh C, Pesce V, Calvani R, Bossola M, et al. Circulating Mitochondrial DNA at the Crossroads of Mitochondrial Dysfunction and Inflammation During Aging and Muscle Wasting Disorders. *Rejuvenation Res*. 2018;21(4):350-9.
28. Bliksoen M, Mariero LH, Ohm IK, Haugen F, Yndestad A, Solheim S, et al. Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2012;158(1):132-4.
29. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:206039.
30. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464(7285):104-7.

31. Thurairajah K, Briggs GD, Balogh ZJ. The source of cell-free mitochondrial DNA in trauma and potential therapeutic strategies. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(3):325-34.
32. Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, Kato A, Fujigaki Y, Yasuda H. Role of Mitochondrial DNA in Septic AKI via Toll-Like Receptor 9. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):2009-20.
33. Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Manzini S, Roat E, et al. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion.* 2011;11(5):750-5.
34. Wei X, Shao B, He Z, Ye T, Luo M, Sang Y, et al. Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na(+)/K(+)-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Res.* 2015;25(2):237-53.
35. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):771-82.
36. Nevalainen T. Evaluation of the Cell-free Mitochondrial DNA Quantity in Plasma as an Aging Biomarker Candidate [Master Thesis]2012.
37. Nakayama H, Otsu K. Mitochondrial DNA as an inflammatory mediator in cardiovascular diseases. *Biochem J.* 2018;475(5):839-52.
38. Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell.* 2014;159(7):1563-77.
39. Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J.* 2018;37(17).
40. McArthur K, Whitehead LW, Heddleston JM, Li L, Padman BS, Oorschot V, et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science.* 2018;359(6378).
41. Mesa MA, Vasquez G. NETosis. *Autoimmune Dis.* 2013;2013:651497.
42. Itagaki K, Kaczmarek E, Lee YT, Tang IT, Isal B, Adibnia Y, et al. Mitochondrial DNA released by trauma induces neutrophil extracellular traps. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120549.
43. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med.* 2016;22(2):146-53.
44. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.
45. Garcia N, Chavez E. Mitochondrial DNA fragments released through the permeability transition pore correspond to specific gene size. *Life Sci.* 2007;81(14):1160-6.

46. Garcia N, Garcia JJ, Correa F, Chavez E. The permeability transition pore as a pathway for the release of mitochondrial DNA. *Life Sci.* 2005;76(24):2873-80.
47. West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature.* 2015;520(7548):553-7.
48. Cai Y, Xu MJ, Koritzinsky EH, Zhou Z, Wang W, Cao H, et al. Mitochondrial DNA-enriched microparticles promote acute-on-chronic alcoholic neutrophilia and hepatotoxicity. *JCI Insight.* 2017;2(14).
49. Garcia-Martinez I, Santoro N, Chen Y, Hoque R, Ouyang X, Caprio S, et al. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest.* 2016;126(3):859-64.
50. Caielli S, Athale S, Domic B, Murat E, Chandra M, Banchereau R, et al. Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J Exp Med.* 2016;213(5):697-713.
51. Picca A, Lezza AMS, Leeuwenburgh C, Pesce V, Calvani R, Landi F, et al. Fueling Inflamm-Aging through Mitochondrial Dysfunction: Mechanisms and Molecular Targets. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
52. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2018;18(4):e27.
53. Fang C, Wei X, Wei Y. Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses. *Protein Cell.* 2016;7(1):11-6.
54. Ashkar AA, Rosenthal KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med.* 2002;2(6):545-56.
55. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004;5(2):190-8.
56. Liu B, Du Q, Chen L, Fu G, Li S, Fu L, et al. CpG methylation patterns of human mitochondrial DNA. *Sci Rep.* 2016;6:23421.
57. Zhang JZ, Liu Z, Liu J, Ren JX, Sun TS. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF-kappaB expression in lung tissue. *Int J Mol Med.* 2014;33(4):817-24.
58. Aydınoğlu AT, Aksu-Mengeş E, Balcı-Hayta B. Serbest Mitokondriyal DNA'nın Sistemik Dolaşımdaki Rolü ve Hastalıkların Patogenezine Etkisi. *ACU Sağlık Bil Derg*2019.
59. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011;12(3):222-30.
60. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 2012;36(3):401-14.

61. Boyapati RK, Tamborska A, Dorward DA, Ho GT. Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases. *F1000Res*. 2017;6:169.
62. Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*. 2013;341(6148):903-6.
63. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-86.
64. Mary P, Servais L, Vialle R. Neuromuscular diseases: Diagnosis and management. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2018;104(1S):S89-S95.
65. Kaplan JC, Hamroun D. The 2016 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord*. 2015;25(12):991-1020.
66. Zatz M, Passos-Bueno MR, Vainzof M. Neuromuscular disorders: genes, genetic counseling and therapeutic trials. *Genet Mol Biol*. 2016;39(3):339-48.
67. Chitnis T, Khoury SJ. 20. Immunologic neuromuscular disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S659-68.
68. Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):927-37.
69. Nardin RA, Johns DR. Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve*. 2001;24(2):170-91.
70. McGrogan A, Sneddon S, de Vries CS. The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2010;34(3):171-83.
71. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*. 1976;26(11):1054-9.
72. Juel VC, Massey JM. Myasthenia gravis. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:44.
73. Sieb JP. Myasthenia gravis: an update for the clinician. *Clin Exp Immunol*. 2014;175(3):408-18.
74. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*. 2014;52:90-100.
75. FSHD ve LGMD2B hastalıklarının prevalansı[Internet].2014 [Erişim Tarihi:17 Temmuz 2019]. Erişim Adres:<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>.
76. Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, et al. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat Genet*. 2012;44(12):1370-4.
77. Statland JM, Tawil R. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2016;22(6, Muscle and Neuromuscular Junction Disorders):1916-31.

78. Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(8):611-23.
79. Arahata K, Ishihara T, Fukunaga H, Orimo S, Lee JH, Goto K, et al. Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve Suppl.* 1995;2:S56-66.
80. Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic.* 2012;13(2):185-94.
81. Grounds MD, Terrill JR, Radley-Crabb HG, Robertson T, Papadimitriou J, Spuler S, et al. Lipid accumulation in dysferlin-deficient muscles. *Am J Pathol.* 2014;184(6):1668-76.
82. Khaiboullina SF, Martynova EV, Bardakov SN, Mavlikeev MO, Yakovlev IA, Isaev AA, et al. Serum Cytokine Profile in a Patient Diagnosed with Dysferlinopathy. *Case Rep Med.* 2017;2017:3615354.
83. Kutlu O, Kurt CEB, Unsal I, Aribas Z, Renkliyildiz B, Eruzun H, et al. Dysferlinopathy: A Case Report and Literature Update. *Istanb Med J.* 2016;17(4):136-40.
84. McNally EM, Ly CT, Rosenmann H, Mitrani Rosenbaum S, Jiang W, Anderson LV, et al. Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. *Am J Med Genet.* 2000;91(4):305-12.
85. Cardenas AM, Gonzalez-Jamett AM, Cea LA, Bevilacqua JA, Caviedes P. Dysferlin function in skeletal muscle: Possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. *Exp Neurol.* 2016;283(Pt A):246-54.
86. Mariano A, Henning A, Han R. Dysferlin-deficient muscular dystrophy and innate immune activation. *FEBS J.* 2013;280(17):4165-76.
87. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000;15(3):228-37.
88. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34(4):460-3.
89. Bowerman M, Becker CG, Yanez-Munoz RJ, Ning K, Wood MJA, Gillingwater TH, et al. Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. *Dis Model Mech.* 2017;10(8):943-54.
90. Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med.* 2002;4(1):20-6.
91. Wan B, Feng P, Guan Z, Sheng L, Liu Z, Hua Y. A severe mouse model of spinal muscular atrophy develops early systemic inflammation. *Hum Mol Genet.* 2018;27(23):4061-76.

92. Deguise MO, Kothary R. New insights into SMA pathogenesis: immune dysfunction and neuroinflammation. *Ann Clin Transl Neurol.* 2017;4(7):522-30.
93. Staroscik A. Calculator for determining the number of copies of a template [Internet]. 2004 [Erişim Tarihi 11 Mayıs 2019]. Erişim Adresi: <https://celsuriedu/gsc/cndnahtml>
94. Qiagen, Hazırlayan. QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit Handbook. Internet Yayını: 2013. s.8.
95. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion.* 2001;41(2):276-82.
96. Boudreau LH, Duchez AC, Cloutier N, Soulet D, Martin N, Bollinger J, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood.* 2014;124(14):2173-83.
97. Melzer N, Ruck T, Fuhr P, Gold R, Hohlfeld R, Marx A, et al. Clinical features, pathogenesis, and treatment of myasthenia gravis: a supplement to the Guidelines of the German Neurological Society. *J Neurol.* 2016;263(8):1473-94.
98. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, Mohan M, Forteath C, Beall C, et al. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ Res.* 2016;119(5):652-65.
99. Rojas LB, Gomes MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2013;5(1):6.
100. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(24):1848-50.
101. Li L, Hann HW, Wan S, Hann RS, Wang C, Lai Y, et al. Cell-free circulating mitochondrial DNA content and risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection. *Sci Rep.* 2016;6:23992.
102. Sonnenberg A, Marciniak JY, Rassenti L, Ghia EM, Skowronski EA, Manouchehri S, et al. Rapid electrokinetic isolation of cancer-related circulating cell-free DNA directly from blood. *Clin Chem.* 2014;60(3):500-9.
103. Malik AN, Shahni R, Rodriguez-de-Ledesma A, Laftah A, Cunningham P. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):1-7.
104. Villegas JA, Bayer AC, Ider K, Bismuth J, Truffault F, Roussin R, et al. IL-23/Th17 cell pathway: A promising target to alleviate thymic inflammation maintenance in myasthenia gravis. *J Autoimmun.* 2019;98:59-73.
105. Uzawa A, Kanai T, Kawaguchi N, Oda F, Himuro K, Kuwabara S. Changes in inflammatory cytokine networks in myasthenia gravis. *Sci Rep.* 2016;6:25886.

106. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):R234-40.
107. Surmiak MP, Hubalewska-Mazgaj M, Wawrzycka-Adamczyk K, Szczeklik W, Musial J, Sanak M. Circulating mitochondrial DNA in serum of patients with granulomatosis with polyangiitis. *Clin Exp Immunol.* 2015;181(1):150-5.
108. Yousefi S, Stojkov D, Germic N, Simon D, Wang X, Benarafa C, et al. Untangling "NETosis" from NETs. *Eur J Immunol.* 2019;49(2):221-7.
109. Fuhua P, Xuhui D, Zhiyang Z, Ying J, Yu Y, Feng T, et al. Antioxidant status of bilirubin and uric acid in patients with myasthenia gravis. *Neuroimmunomodulation.* 2012;19(1):43-9.
110. Adamczyk-Sowa M, Bieszczad-Bedrejcuk E, Galiniak S, Rozmilowska I, Czyzewski D, Bartosz G, et al. Oxidative modifications of blood serum proteins in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2017;305:145-53.
111. Ursini F, Russo E, Pellino G, D'Angelo S, Chiaravalloti A, De Sarro G, et al. Metformin and Autoimmunity: A "New Deal" of an Old Drug. *Front Immunol.* 2018;9:1236.
112. Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis.* 2010;37(3):493-502.
113. Sareen D, Ebert AD, Heins BM, McGivern JV, Ornelas L, Svendsen CN. Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS One.* 2012;7(6):e39113.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1083

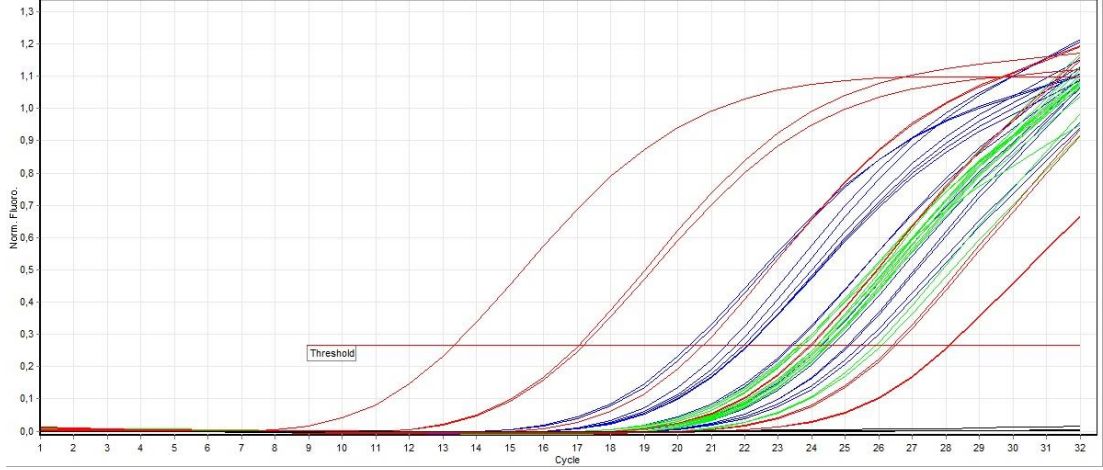
Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 21 HAZİRAN 2018 PERŞEMBE
Toplantı No : 2018/16
Proje No : GO 18/598 (Değerlendirme Tarihi: 21.06.2018)
Karar No : GO 18/598-22

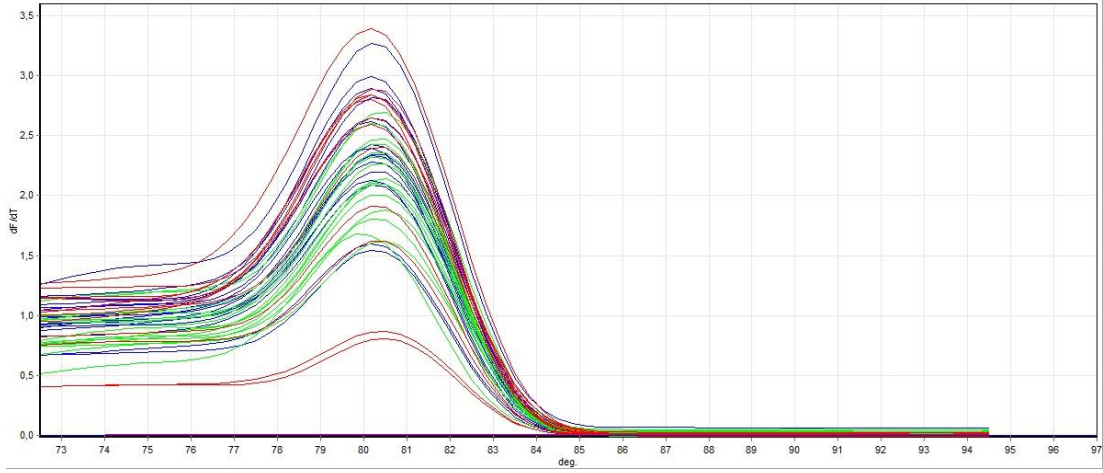
Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Bureu HAYTA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Can Ebru KURT, Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU, Arş. Gör. Evrim AKSU ile birlikte çalışacakları ve Ayşe Tülay AYDINOĞLU'nun yüksek lisans tezi olan, GO 18/598 kayıt numaralı ve "İnflamasyon ile İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda Dolaşımdaki Mitokondriyal DNA'nın Araştırılması" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Ağustos 2018 – 01 Ağustos 2020 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
İZİNLİ	İZİNLİ
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ (Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR (Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye)
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)	17. Av. Meltem ONURLU (Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)	

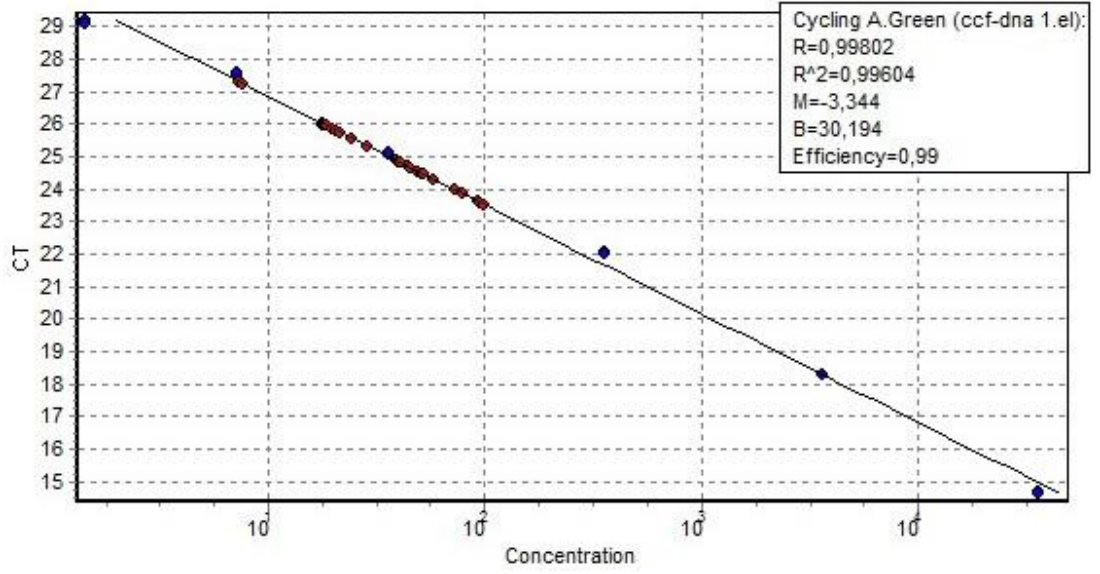
EK-2. Myasteni Gravis (MG) Hastalarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA miktarının Absolüt Kantitasyonu



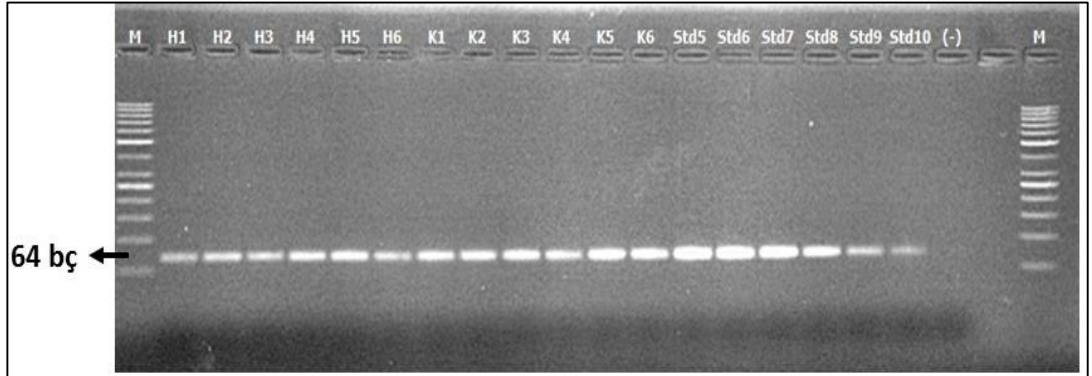
Şekil EK-2.1. RTq-PZR amplifikasyon eğrisi (Mavi: MG hastaları; Yeşil: sağlıklı kontroller; Kırmızı: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).



Şekil EK-2.2. RTq-PZR erime eğrisi (Mavi: MG hastaları; Yeşil: sağlıklı kontroller; Kırmızı: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

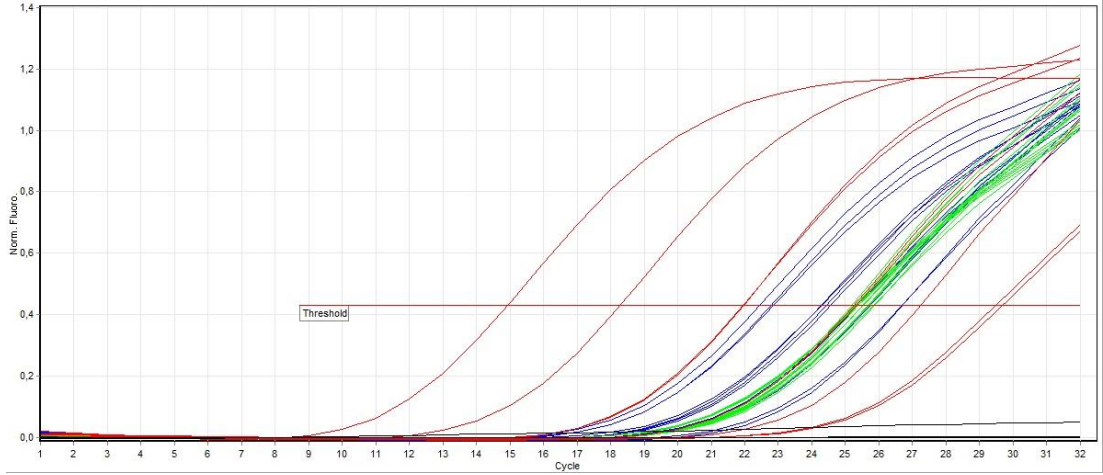


Şekil EK-2.3. RTq-PZR kalibrasyon eğrisi (Kırmızı: MG hastaları ve sağlıklı kontroller; Mavi: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

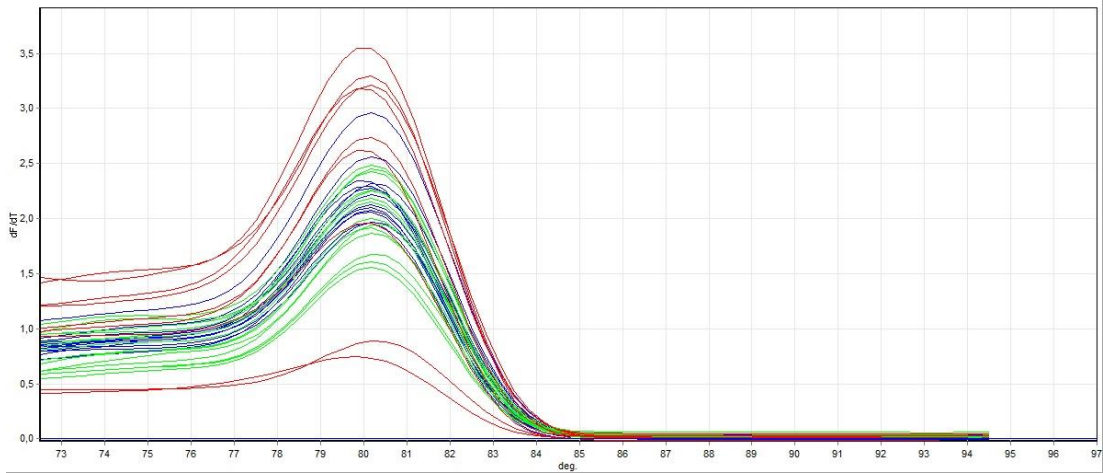


Şekil EK-2.4. PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü (H: MG hastaları; K: sağlıklı kontroller; STD: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

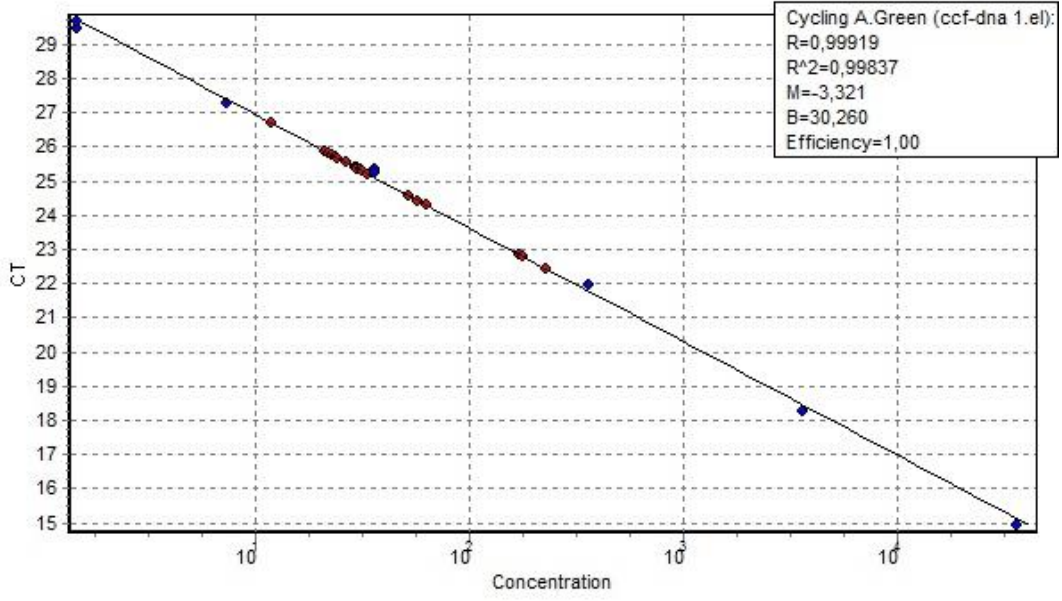
EK-3. Fasiyoskopulohumeral Kas Distrofisi (FSHD) ve Disferlinopati (LGMD2B) Hastalarına Ait Plazma Örneklerinde Bulunan ccf-mtDNA miktarının Absolüt Kantitasyonu



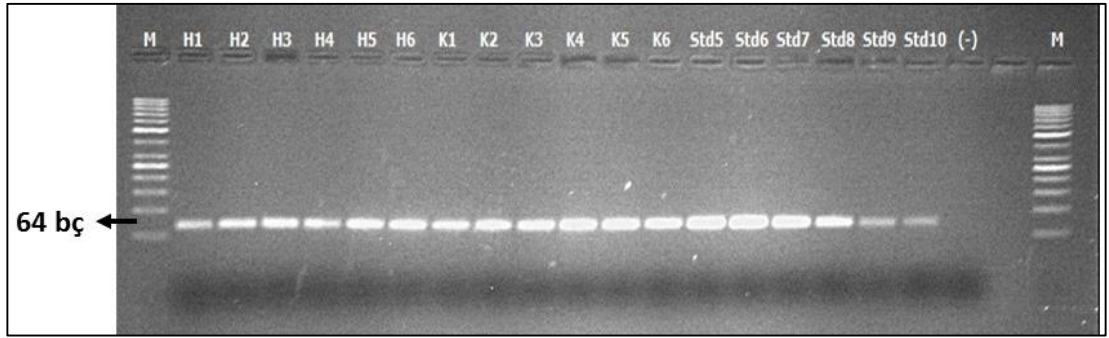
Şekil EK-3.1. RTq-PZR amplifikasyon eğrisi (Mavi: FSHD ve LGMD2B hastaları; Yeşil:sağlıklı kontroller; Kırmızı: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).



Şekil EK-3.2. RTq-PZR erime eğrisi (Mavi: FSHD ve LGMD2B hastaları; Yeşil: sağlıklı kontroller; Kırmızı: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

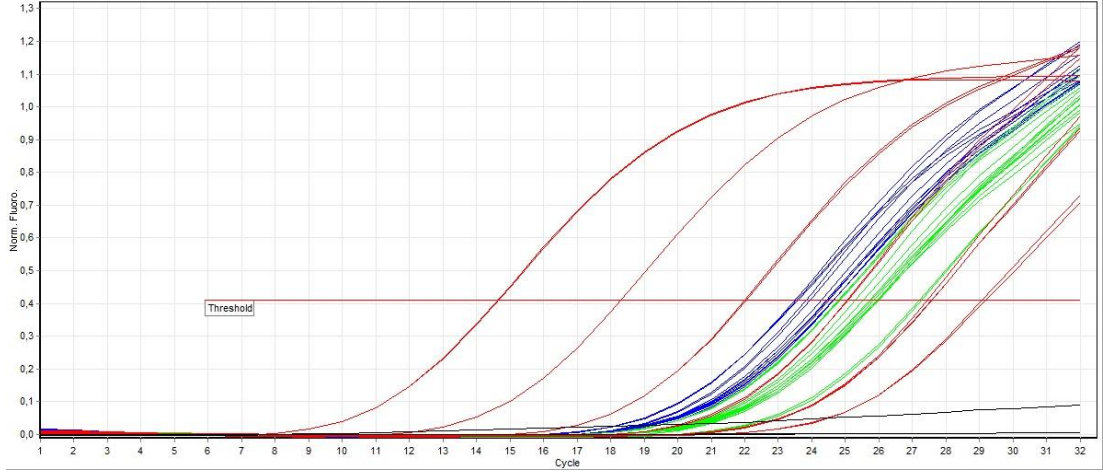


Şekil EK-3.3. RTq-PZR kalibrasyon eğrisi (Kırmızı: FSHD ve LGMD2B hastaları ve sağlıklı kontrollere; Mavi: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

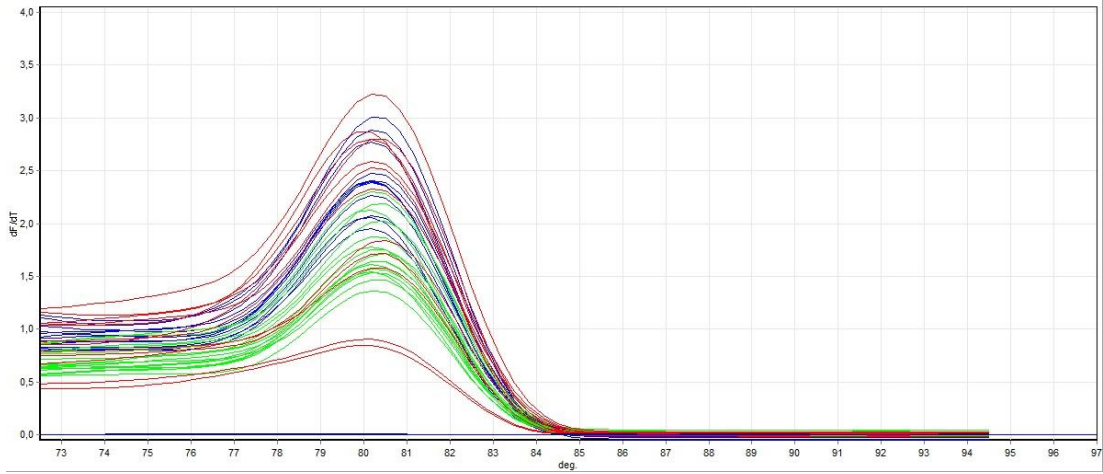


Şekil EK-3.4. PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü (H: FSHD ve LGMD2B hastaları; K: sağlıklı kontrollere; STD: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

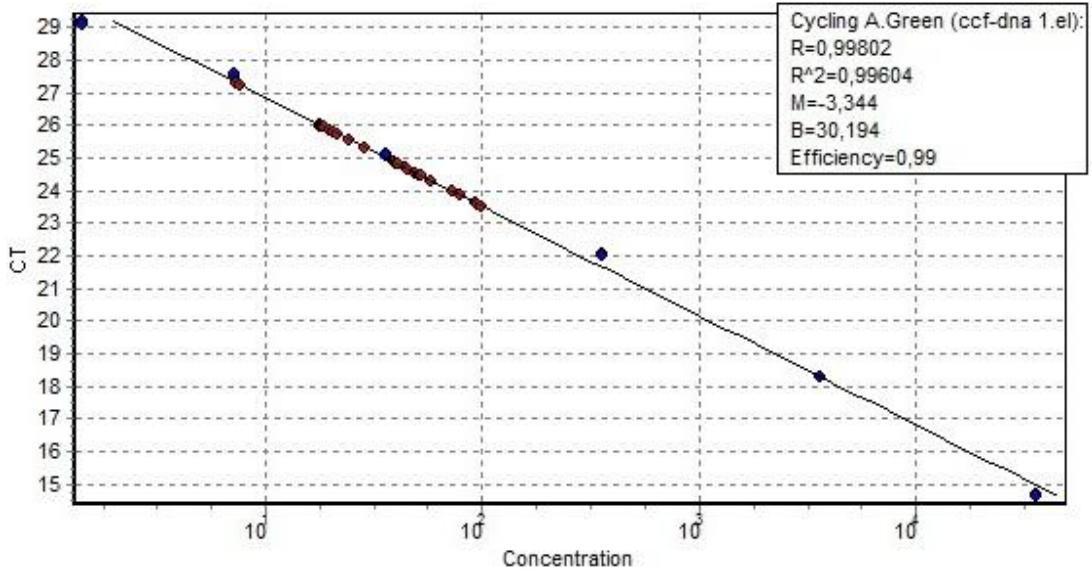
EK-4. Spinal Müsküler Atrofi (SMA) Hastalarına Ait Plazma rneklerinde
Bulunan ccf-mtDNA miktarının Absolüt Kantitasyonu



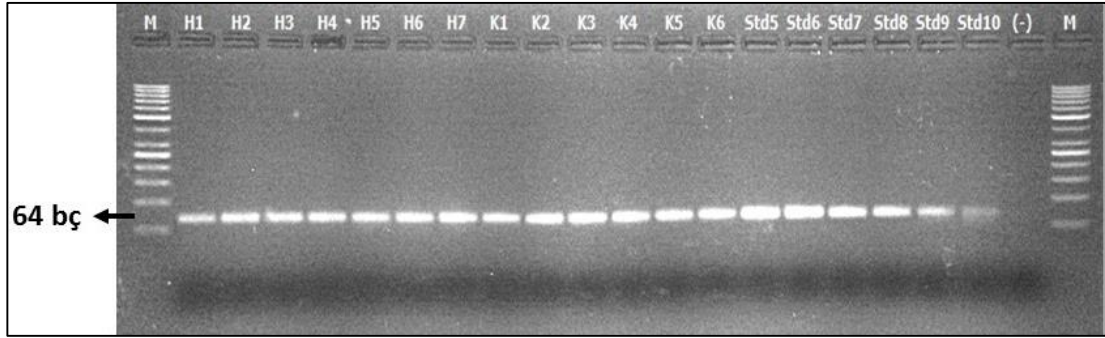
Şekil EK-4.1. RTq-PZR amplifikasyon eğrisi (Mavi: SMA hastaları; Yeşil: sağlıklı kontroller; Kırmızı: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).



Şekil EK-4.2. RTq-PZR erime eğrisi (Mavi: SMA hastaları; Yeşil: sağlıklı kontroller; Kırmızı: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart rnekler).



Şekil EK-4.3. RTq-PZR kalibrasyon eğrisi (Kırmızı: SMA hastaları ve sağlıklı kontroller; Mavi: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).



Şekil EK-4.4. PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü (H: SMA hastaları; K: sağlıklı kontroller; STD: ccf-mtDNA kopya sayısı bilinen dış standart örnekler).

EK-5. Tez Orjinallik Ekran Görüntüsü

TEZİN TAM BAŞLIĞI: İNFLAMASYON İLE İLİŞKİLİ NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA DOLAŞIMDAKİ MİTOKONDRİYAL DNA'NIN ARAŞTIRILMASI

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: AYŞE TULAY AYDINOĞLU

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 59

İnflamasyon ile İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda Dolaşımdaki Mitokondriyal DNA'nın Araştırılması

ORJİNALLIK RAPORU

% 7	% 4	% 1	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
2	acibadem.dergisi.org İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	tr.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1

EK-6: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ayşe Tülay Aydinoğlu
Ödev başlığı: İnflamasyon ile İlişkili Nöromusküler...
Gönderi Başlığı: İnflamasyon ile İlişkili Nöromusküler...
Dosya adı: Ayse_Tulay_Aydinoglu_tez_5.docx
Dosya boyutu: 1.24M
Sayfa sayısı: 59
Kelime sayısı: 9,315
Karakter sayısı: 65,023
Gönderim Tarihi: 07-Ağu-2019 02:50PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1158332554



9. ÖZGEÇMİŞ

AYŞE TÜLAY AYDINOĞLU

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi ve Yeri: 17.07.1993 / Viyana

Yazışma Adresi: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, 06100, Sıhhiye, Ankara.

Telefon: 0545 221 1960

E-mail: ataydinoglu@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	2017-2019	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Lisans	2011-2016	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (İngilizce)
Lise	2007-2011	Mustafa Kemal Anadolu Lisesi

DENEYİMLER

Araştırmacı	2016-2017 (1 Yıl)	Mobile Government Consortium International (Londra)
Halkla İlişkiler	2015-2016 (1 Yıl)	Erasmus Student Network of Izzet Baysal University (ESN-IBU)
Erasmus Öğrencisi	2014 (4.5 Ay)	Halmstad University, Department of Biology and Environmental Science (İsveç)

YAYINLAR

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- **Aydinoglu AT.**, Aksu-Mengeş E., Balcı-Hayta B. Serbest Mitokondriyal DNA'nın Sistemik Dolaşımdaki Rolü ve Hastalıkların Patogenezine Etkisi-**Derleme, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2019;** <https://doi.org/10.31067/0.2019.120>.

Ulusal Popüler Bilim Dergilerinde Yayımlanan Makaleler

- Zencirci N., **Aydinoglu AT.** On bin yıllık Miras Siyez. Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi. 2018. 604; 34-38.
- Gemici DG., **Aydinoglu AT.**, Şimşek E. Mobil Devlet: Geliştirilmiş Kamu Hizmetleri ile Yeni Türkiye. Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi. 2016. 569; 83-87.

Kitaplar

- **Aydinoglu AT.**, Yılmaz MN., Simsek E., Kushchu İ. Faralya Visitor's Guide: Kidrak, Butterfly Valley and Kabak: A Visitor's Guide. 2017. Fetiye. mLIFE. ISBN-10: 1912037653, ISBN-13: 978-1912037650

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULMUŞ VE ÖZETİ YAYINLANMIŞ SÖZLÜ BİLDİRİLER

- Ucar Z., **Aydinoglu AT.**, Akbaba TA., Önder SÇ., Balci-Peynircioglu B., Balci-Hayta B., Demircin M. Children with Congenital Heart Diseases: Any Correlation Between Mitochondrial Functions of Myocardium, Cardiac Markers, and Histopathological Changes? (oral presentation). ACS Clinical Congress 2019, San Francisco, CA.

- Bekircan-Kurt CE., Aksu-Mengeş E., Balcı-Hayta B., **Aydinoglu AT.**, Erdem-Ozdamar S., Tan E. Differentially Expressed microRNA Profile in Skeletal Muscle Tissue of Sporadic ALS Patients (Poster). Neurology Apr 2019, 92 (15 Supplement) S54.008.

GÖREV ALDIĞI PROJELER

- İnflamasyon İle İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda Dolaşımdaki Mitokondriyal DNA'nın Araştırılması HÜBAB Yüksek Lisans Tez Projesi, Proje no: TYL-2018-17372(2017-2019), *Yardımcı araştırmacı*.
- Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Siyanotik ve Asiyantotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Kardiyopulmoner Baypas Sonrasında Miyokardda Görülen Histopatolojik ve Enzimatik Değişiklikler ve Bu Değişikliklerin Mitokondriyal Fonksiyonlar ile İlişkisi HÜBAB (Destek projesi), Proje no: THD-2018-16687 (2018-2019), *Araştırmacı*
- Sporadik ALS Patogenezinde İskelet Kasında Gözlenen Hasarın miRNA'lar ile İlişkinin Araştırılması Tıbbi Biyoloji AD.-Nöroloji AD. Ortak Projesi, *Araştırmacı*

SERTİFİKA

- Deneysel Biyoinformatiğe Giriş Kursu Katılım Sertifikası. Hacettepe Üniversitesi Yaşam Boyu Öğrenme Merkezi. 2019.