

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

**MİTOKONDRIYAL SİTOPATİ ÖNTANILI  
HASTALARDA  
*MT-TL1* GEN MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

**Bengisu Kevser BULDUK**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2018**



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

**MİTOKONDRIYAL SİTOPATİ ÖNTANILI HASTALARDA  
*MT-TL1* GEN MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

**Bengisu Kevser BULDUK**

**Tıbbi Biyoloji Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof.Dr. Y. Çetin KOCAEFE**

**ANKARA**

**2018**

## ONAY SAYFASI

## MİTOKONDRİYAL SİTOPATİ ÖNTANILI HASTALARDA MT-TL1 GEN

## MUTASYONLARININ İNCELENMESİ

Öğrenci: Bengisu Kevser BULDUK

Danışman: Prof.Dr. Y. Çetin KOCAEFE

Bu tez çalışması 12.06.18 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

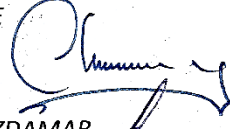
Jüri Başkanı:

Prof.Dr. Meral ÖZGÜÇ  
(Hacettepe Üniversitesi)



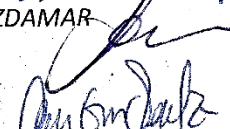
Tez Danışmanı:

Prof.Dr. Y. Çetin KOCAEFE  
(Hacettepe Üniversitesi)



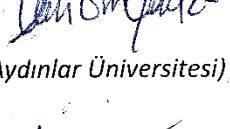
Üye:

Prof.Dr. Sevim ERDEM ÖZDAMAR  
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Engin YILMAZ  
(Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi)




Üye:

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ  
(Ankara Üniversitesi)



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

25 Haziran 2018

  
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.

o **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.** (Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

• **Tezimin/Raporumun 21.06.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.** (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**



21 /06/2018

**Bengisu Kevser BULDUK**

## 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, Prof. Dr. Y. Çetin KOCAEFE danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Bengisu Kevser BULDUK

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmalarım boyuncaengin bilgileriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Y. Çetin Kocafe başta olmak üzere, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma,

Tezimde kullandığım hasta materyallerinin eldesinde yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvar tecrübelerini benimle paylaşan, huzurlu ve güven dolu bir çalışma ortamı yaratan değerli çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Bulduk, B.K., Mitokondriyal Sitopati Öntanlı Hastalarda *MT-TL1* Gen Mutasyonlarının İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018.** Mitokondriyal DNA'nın tRNA ve rRNA genlerini içeren kısımlarında görülen nokta mutasyonları, mitokondriyal protein sentezi mekanizmasını olumsuz etkileyerek oksidatif fosforilasyon işlev bozukluklarına neden olur. Klinikte "Mitokondriyal Sitopatiler" olarak tanımlanan bu klinik tablonun önemli bir kısmını, mitokondriyal tRNA<sup>Leu (UUR)</sup> (*MT-TL1*) geninde meydana gelen nokta mutasyonları oluşturmaktadır. *MT-TL1* geninde görülen m.3243A>G mutasyonu MELAS hastalarının %80'inde tanımlanmıştır. Ancak, aynı gende tanımlanmış olan m.3256C>T, m.3260 A>G, m.3271 T>C, m. 3291T>C ve m.3303 C>T nokta mutasyonları da mitokondriyal sitopatilerle ilişkilendirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, *MT-TL1* geninde belirlenmiş 6 nokta mutasyonunu taranmasına yönelik yenilikçi bir ARMS-PZT yaklaşımı standardize edilmiştir. "Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi" (HRM) teknolojisinin kullanımı ile bu yaklaşımın tanımlayıcı hassasiyeti geliştirilmiştir. *in vitro* koşullarda PZT tabanlı mutagenез çalışmasıyla farklı oranlarda heteroplazmik mutasyon taşıyan rekombinant mtDNA standartları oluşturularak yöntemin sınırları ve hassasiyeti gösterilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Çocuk Hastanesi Nöroloji ünitesinde takip edilmiş ve mitokondriyal sitopati öntansı almış 219 hastanın kan ve/veya doku örnekleri, geliştirilen yöntem ile taranmıştır. Tarama sonucunda iki hastanın m.3243 A>G mutasyonu, bir hastanın m.3290 T>C varyasyonu ve bir hastanın m.3303 C>T mutasyonu taşıdığı belirlenmiş, mutasyonlar DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bu yenilikçi yöntem, *MT-TL1* nokta mutasyonlarının taranmasında ucuz, güvenilir ve hızlı bir alternatif sunmaktadır. Bu çalışma ve sonuçları, hastalarda nadir gözlenen diğer mtDNA varyasyonlarının da taranabilmesi için ileriye yönelik yeni ve teknolojik bir "kavram kanıtı" ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Mitokondriyal Sitopati, mitokondriyal genom, mitokondriyal tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> geni, ARMS-PZT, HRM, mutasyon analizi.



## ABSTRACT

**Bulduk, B.K., Investigating *MT-TL1* Gene Mutations in Patients with Suspected Mitochondrial Cytopathy, Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2018.** Point mutations in mitochondrial tRNA and rRNA genes cause oxidative phosphorylation defects by negatively affecting protein synthesis function. The majority of “mitochondrial cytopathies” are caused by point mutations in the tRNA<sup>Leu (UUR)</sup> (*MT-TL1*) gene. m.3243A>G mutation in the *MT-TL1* gene is described in 80% of MELAS patients. However, other rare mutations such as m.3256 C>T, m.3260 A>G, m.3271 T>C, m. 3291 T>C and m.3303 C>T are also identified in the same gene and associated with mitochondrial cytopathies. Within the scope of this study, a novel ARMS-PCR assay has been standardized to screen for the six described point mutations in the *MT-TL1* gene. The descriptive sensitivity of this approach was aimed to be improved by combining it with HRM technology. Detection limits and the precision of this novel method is verified by using recombinant mtDNA standards carrying heteroplasmic mutations at different rates which is created by PCR-based mutagenesis. Peripheral blood or skeletal muscle tissue samples of 219 patients, prediagnosed as mitochondrial cytopathies at the Departments of Neurology and Child Neurology Units of Hacettepe University Hospitals were screened using the developed method. The results of the screening procedure revealed two patients to have m.3243 A> G mutation, one patient with m.3290 T> C variation, and one patient carrying m.3303 C>T mutation. These mutations were further confirmed by DNA sequence analysis. This novel ARMS-PCR assay study and its results provide a new and technological "proof of concept" for future screening of other rarely observed mtDNA variations in patients.

**Key words:** Mitochondrial cytopathy, mitochondrial genome, mitochondrial tRNA for leucine (UUR), ARMS-PCR, HRM, mutation analysis.

## 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	xviii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1 Mitokondri Oluşumu, Yapısı ve İşlevi	3
2.1.1 Mitokondriyal Genom	6
2.1.2 Mitokondri Genetiği ve Kalıtımı	9
2.3 Mitokondriyal Sitopatiler	10
2.3.1 Leigh Sendromu	13
2.3.2 Kearns-Sayre Sendromu	13
2.3.3 MERRF ( <i>Myoclonic epilepsy with ragged red fibers</i> )	14
2.3.4 MELAS	14
2.4 <i>MT-TL1</i> Geni	16
2.5 Mutasyon Analiz Teknikleri	19
2.5.1 Restriksiyon Endonükleazlar	19
2.5.2 ARMS-PZT ( <i>Amplification Refractory Mutation System</i> )	19
2.5.3 HRM ( <i>High Resolution Melting Analysis</i> -Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi)	21
2.5.4 Dizi Analizi	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	24
3.1 Gereçler	24
3.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve PZR-Temelli Mutagenез	24
3.1.2 Real-Time ARMS-PZT ve HRM Analizi	24
3.1.3 Klonlama ve Bakteri Kültürü	24

3.1.4 Plazmid İzolasyonu	25
3.1.5 DNA Dizi Analizi	25
3.1.6 DNA İzolasyonu	25
3.1.7 DNA Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.1.8 Agaroz Jelden DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	26
3.2 Yöntemler	26
3.2.1 ARMS Primer Tasarımı	26
3.2.2 PZT Temelli Mutagenez	27
3.2.3 Farklı Heteroplazmi Oranlar İçeren Pozitif Kontrollerin Hazırlanması	33
3.4 Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi Koşulları	35
3.5 <i>MT-TLI</i> Geni Mutasyon Taramaları için ARMS-PCR Koşulları	36
3.5.1 m.3243 A>G Mutasyonu Optimizasyonu	36
3.5.2 m.3256 C>T Mutasyonu Optimizasyonu	37
3.5.3 m.3260 A>G Mutasyon Optimizasyonu	38
3.5.4 m.3271 T>C Mutasyon Optimizasyonu	41
3.5.5 m.3291 T>C Mutasyon Optimizasyonu	43
3.5.6 m.3303 C>T Mutasyon Optimizasyonu	44
<b>4. BULGULAR</b>	46
4.1 m.3243A>G Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama	46
4.2 m.3256 C>T Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama	52
4.3 m.3260 A>G Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama	56
4.4 m.3271 T>C Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama	59
4.5 m.3291T>C Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama	62
4.6 m.3303C>T Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama	67
<b>5. TARTIŞMA</b>	73
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	79
6.1 Sonuçlar	79
6.2 Öneriler	79
<b>7. KAYNAKLAR</b>	80
<b>8. EKLER</b>	
<b>EK-1:</b> <i>MT-TLI</i> Geni.	
<b>EK-2:</b> ARMS-PZT primerlerinin hedeflediği <i>MT-TLI</i> gen bölgesi.	
<b>EK-3:</b> m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT optimizasyonu, iç primer konsantrasyon denemeleri.	

**EK-4: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni**

**9. ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrat
ADP	Adenozin difosfat
APAF1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ARMS	<i>Amplification-refractory Mutation System</i>
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bç/bp	Baz çifti
Ca <sup>+</sup>	Kalsiyum
CoA	Koenzim A
COX	Sitokrom c oksidaz
ddNTP	Dideoksinükleotit trifosfat
dk	Dakika
D-loop	<i>Displacement loop</i>
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
ER	Endoplazmik retikulum
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FADH <sub>2</sub>	Flavin Adenin Dinükleotit
g	<i>gravity</i>
GPS2	G-Protein Pathway Suppressor 2
H <sub>2</sub> O	Su
HRM	<i>High Resolution Melting</i> – Yüksek çözünürlüklü erime
IP3R	İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörü
IPTG	İzopropil-β-D-1-tiyogalaktopiranozoid
kb	Kilo baz
LB	Luria-Bertani besiyeri
Leu	Lösin
LHON	Leber'in herediter optik nöropati
MELAS	<i>Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic epilepsy with ragged red fibers</i>

<b>mg</b>	Miligram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum Klorür
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal Deoksiribonükleik Asit
<b>MT-ND</b>	<i>Mitochondrially encoded NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit</i>
<b>MT-TL1</b>	<i>Mitochondrially encoded tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-1</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodyum
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NADH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>NaOAc</b>	Sodyum Asetat
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>nDNA</b>	Nükleer Deoksiribonükleik Asit
<b>NDUFA1</b>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A1
<b>ng</b>	Nanogram
<b>NRF-1</b>	<i>Nuclear respiratory factor-1</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>OXPHOS</b>	Oksidatif fosforilasyon
<b>PAH</b>	Fenilalanin hidroksilaz
<b>PDH</b>	Piruvat dehidrogenaz
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1</i>
<b>POLG</b>	Mitokondriyal DNA polimeraz $\gamma$
<b>PZT</b>	Polimeraz Zincir Tepkimesi
<b>RE</b>	Restriksiyon Endonükleaz
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>rRNA</b>	Ribozomal Ribonükleik Asit
<b>Rtg</b>	<i>Retrograde regulation</i>
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sulfat
<b>SLIK</b>	<i>Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA)-like</i>
<b>sn</b>	Saniye

<b>STE</b>	Sodium Chloride-Tris-EDTA
<b>TFAM</b>	<i>Human mitochondrial transcription factor A</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Erime sıcaklığı
<b>tRNA</b>	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
<b>u</b>	Birim
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-kloro-3-endoil $\beta$ -D-galaktozoid
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromolar

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Glikoz ve yağ asitleri metabolizmasının mitokondri bağlantılı temel basamakları	4
2.2	Elektron taşıma sistemi elemanları	5
2.3	Mitokondriyal DNA haritası	8
2.4	mtDNA heteroplazmisi ve eşik etkisi	12
2.5	<i>MT-TL1</i> gen ürünü: Trna <sup>Leu(UUR)</sup>	16
2.6	ARMS-PZT'nin şematik gösterimi ve tepkime sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü	20
2.7	Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi. A. HRM öncesi PZT basamakları. B. Erime eğrisi oluşturulması	22
3.1	Megaprimerele methoduyla mutageniz yaklaşımı	28
3.2	Pgem-T Easy vektörünün haritası	32
3.3	İspanak mtDNA'sı ve insan mtDNA'sıyla yapılan m.3243 A>G mutasyonu analizi	34
3.4	Farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik pozitif kontrol karışım kalıplarının hazırlanması	35
3.5	ARMS-PZT m.3243 A>G mutasyonu optimizasyon öncesi agaroz jel görüntüsü	36
3.6	ARMS-PZT m.3243 A>G mutasyonu agaroz jel görüntüsü	37
3.7	ARMS-PZT m.3256 C>T mutasyonu agaroz jel görüntüsü	37
3.8	ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonunun farklı dış primerlerin kombinasyonlarıyla yapılan optimizasyon çalışmaları	39
3.9	ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonunun üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen optimizasyon tepkimesi	39
3.10	ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu agaroz jel görüntüsü	41
3.11	m.3271 T>C mutasyonu için tasarlanan primerler arası rekabetin kontrolü	41
3.12	ARMS-PZT m.3271 T>C mutasyonu agaroz jel görüntüsü	43
3.13	m.3291 T>C mutasyonu farklı bağlanma sıcaklıklarında optimizasyon denemeleri	43
3.14	ARMS-PZT m.3291 T>C mutasyonu agaroz jel görüntüsü	44
3.15	ARMS-PZT m.3303 C>T mutasyonu agaroz jel görüntüsü	45
4.1	m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri	46



<b>4.2</b>	m.3243 A>G mutasyonuna sahip sentetik kontrollerin ayrıntılı erime eğrisi analizi.	47
<b>4.3</b>	m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları-1	48
<b>4.4</b>	m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları-2	49
<b>4.5</b>	m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları-3.	50
<b>4.6</b>	m.3243 A>G mutasyon taramalarında pozitif çıkan 111 numaralı hasta örneğinin agaroz jel elektroforezi, erime eğrisi ve dizileme sonuçları	51
<b>4.7</b>	m.3243 A>G mutasyon taramalarında pozitif çıkan 135 numaralı hasta örneğinin agaroz jel elektroforezi, erime eğrisi ve dizileme sonuçları	51
<b>4.8</b>	m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri.	52
<b>4.9</b>	m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları-1	53
<b>4.10</b>	m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları-2	54
<b>4.11</b>	m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları-3	55
<b>4.12</b>	m.3260 A>G mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri	56
<b>4.13</b>	m.3260 A>G mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -1.	57
<b>4.14</b>	m.3260 A>G mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -2	58
<b>4.15</b>	ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu taramalarında belirlenen yalancı pozitif sonuçların agaroz jel ve dizileme analizleri -1	58
<b>4.16</b>	ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu taramalarında belirlenen yalancı pozitif sonuçların agaroz jel ve dizileme analizleri -2	59
<b>4.17</b>	m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri	60
<b>4.18</b>	m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -1	61
<b>4.19</b>	m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -2	62
<b>4.20</b>	m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri	63
<b>4.21</b>	m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -1	64
<b>4.22</b>	m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -2	65
<b>4.23</b>	m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -3	66
<b>4.24</b>	m.3291 T>C mutasyonu taramalarında m.3290 T>C varyasyonu pozitif çıkan 814 numaralı hastaörneğinin agaroz jel elektroforezi, erime eğrisi ve dizileme sonucu	67
<b>4.25</b>	m.3303 C>T mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri	68
<b>4.26</b>	m.3303 T>C mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları -1	69
<b>4.27</b>	m.3303 T>C mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları -2	70
<b>4.28</b>	m.3303 T>C mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları -3	71

- 4.29** m.3303 T>C mutasyonu taramalarında pozitif çıkan 641 numaralı hasta örneğinin agaroz jel elektroforezi, erime eğrisi ve dizileme sonuçları 72
- 5.1** m.3256 C>T mutasyonu için tasarlanan primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanması sonucunda elde edilen erime eğrisi grafiği 76

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1</b>	Mitokondriyal solunum zinciri elemanları, altbirimleri ve sentezlendikleri genler	7
<b>2.2</b>	<i>MT-TL1</i> geninde meydana gelen mutasyonlar ve ilişkili oldukları sendromlar.	17
<b>3.1</b>	ARMS-PCR Primerleri	27
<b>3.2</b>	Mutasyona özgü mutajenik primerler.	28
<b>3.3</b>	Kalıp DNA için kullanılan primer çiftleri	29
<b>3.4</b>	ARMS-PZT m.3243 A>G mutasyonu şartları	36
<b>3.5</b>	ARMS-PZT m.3256 C>T mutasyonu şartları	38
<b>3.6</b>	ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu şartları	40
<b>3.7</b>	ARMS-PZT m.3271 T>C mutasyonu şartları	42
<b>3.8</b>	ARMS-PZT m.3291 T>C mutasyonu şartları	44
<b>3.9</b>	ARMS-PZT m.3303 C>T mutasyonu şartları	45
<b>5.1</b>	ARMS-PZT taramaları sonucunda <i>MT-TL1</i> geninde mutasyon tespit edilen hastalar	75

## 1.GİRİŞ

Mitokondri ökaryotik hücrelerde bulunan, oksidatif fosforilasyon tepkimeleriyle hücrenin temel enerji ihtiyacını karşılamak gibi önemli bir işlevi bulunan özelleşmiş bir organeldir. Endosimbiyotik teoriye göre prokaryot hücrenin ökaryotik hücrenin içine girmesiyle oluştuğu düşünülen bu çift zarlı organel (1), yapısında 16,569 baz çifti uzunluğunda kendine ait halkasal DNA bulundurur. Mitokondriyal DNA (mtDNA) 37 gen içermektedir; bu genlerden 13'ü protein kodlarken, 22'si transfer RNA (tRNA), ikisi de ribozomal RNA (rRNA) kodlar (2). mtDNA'nın tRNA ve rRNA genlerini içeren kısımlarında meydana gelen mutasyonlar, mitokondriyal protein sentezi mekanizmasını olumsuz etkileyerek oksidatif fosforilasyon işlev bozukluklarına neden olur. Klinikte "mitokondriyal sitopatiler" olarak karşımıza çıkan bu tabloda, lösin tRNA (*MT-TLI*) geninde meydana gelen nokta mutasyonları önemli bir yere sahiptir. *MT-TLI* geninde görülen m.3243A>G mutasyonu MELAS hastalarının %80'inde, m.3271 T>C mutasyonu ise MELAS hastalarının %7-10'unda tanımlanmıştır (3,4). Aynı gende tanımlanmış olan m.3256 C>T, m.3260 A>G, m.3291 T>C ve m.3303 C>T nokta mutasyonlarının da patojenik olduğu ve mitokondriyal sitopati tablosuyla örtüştüğü belirlenmiştir. Meta analizler sonucunda mtDNA'da meydana gelen mutasyonların prevalansının en az 1/5000 olduğu tahmin edilmekte (5), Avrupa'da mitokondriyal hastalıklarla yaşayan insan sayısının 400,000 civarında olduğu ve mitokondriyal hastalıkların görülme sıklığının 1/2000 olduğu düşünülmektedir (6).

Bilinen mutasyonlarının doğrudan analizinde genellikle düşük maliyetli restriksiyon endonükleazlar (RE) tercih edilmektedir. İlgilenilen dizide meydana gelen mutasyonlar enzim kesim bölgeleri yaratabilir ya da var olan enzim kesim bölgelerini ortadan kaldırabilir; her iki durumda da RE'lar bu mutasyonların tayini için iyi bir seçenektir. Ancak herhangi bir RE dizisiyle uyuşmayan nokta mutasyonlarının varlığında çok daha yüksek maliyetli DNA dizi analizini kullanmak kaçınılmazdır. Söz konusu nokta mutasyonlarının belirlenmesinde amplikasyon refraktör mutasyon analiz sistemi (ARMS), RE'ye önemli bir alternatif sunmaktadır. ARMS yöntemi nokta mutasyonuna ve normal allele özgül olmak üzere iki farklı amplikon çoğaltmayı hedefleyen bir polimeraz zincir tepkimesi (PZT) tasarımına dayanmaktadır (7).

Tasarlanan reaksiyon sonucunda allele özgül olarak iki farklı uzunlukta PZT ürünü oluşur ve bu ürünler agaroz jel elektroforez yardımıyla görüntülenerek hızlı, düşük maliyetli mutasyon analizine olanak sağlar.

Bu çalışmada mitokondriyal sitopati öntanısı almış hastalarda *MT-TL1* geninde belirlenmiş altı nokta mutasyonun taranmasına yönelik yenilikçi bir ARMS-PZT yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen bu yöntemin yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) teknolojisiyle hassasiyetinin artırılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Ökaryotik organizmaların büyük bir kısmında bulunan mitokondri, hücrenin yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan enerjinin çok büyük bir kısmını karşılayan, kendine ait genomu olan özel organeldir.

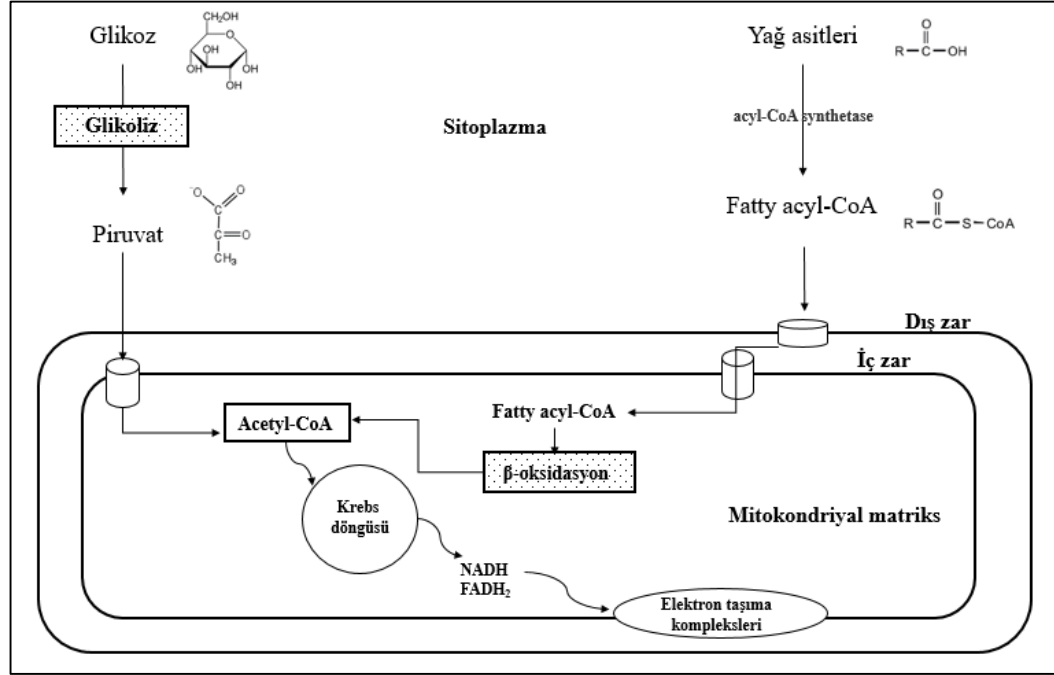
### 2.1 Mitokondri Oluşumu, Yapısı ve İşlevi

Mitokondri kendine özgü genomuyla ve çift zarlı yapısıyla araştırmacıların her zaman ilgisini çeken, oluşumu ve gelişimi üzerine çeşitli hipotezler kurulan bir organeldir. 1980'lerin sonlarında yapılan ribozomal RNA'nın filogenetik analiz çalışmalarıyla mitokondrinin endosimbiyoz ile  $\alpha$ -proteobacteria olan *Rickettsiales* ailesinin, ökaryotik atasal hücrenin içine girmesiyle oluştuğu gösterilmiştir (1). Mitokondriyal genom, maya çekirdeği ve bakteriler arasındaki homolog genlerin kullanıldığı filogenetik rekonstrüksiyonlarla da kanıtlanan mitokondri ve *Rickettsia* yakınlığı; Krebs döngüsü, solunum döngüsü ve translasyon sistemleri için kodlanan genlerin benzerlikleriyle de desteklenmiştir (1,8).

Mitokondri, özelleşmiş bir yapıya sahiptir. Yapısında bulunan dış ve iç membranlar, membranların arasında kalan boşluk ve organelin merkezinde bulunan jelimsi yapıdaki matriks ile üç temel bölüme ayrılır. Dış membran ve iç membran birbirinden oldukça farklı geçirgenlikte olup; dış membran 10,000 daltonun altındaki tüm moleküllerin organel içine geçişine izin verirken (9), iç membran küçük moleküllerin ve iyonların geçişini kısıtlayıcı bir bariyer görevi görmektedir. Yapı olarak hücre zarına da benzeyen iç membran ayrıca elektron transport sisteminde ve ATP sentezinde görev alan proteinler bakımından da oldukça zengindir. Bu yapıda iç membranın matrikse doğru yaptığı krista adı verilen, membranın yüzey alanını biyokimyasal tepkimelerin gerçekleşmesi için genişleten kıvrımlar bulunmaktadır. İç membranın çevrelediği mitokondriyal matriks ise Krebs döngüsünün gerçekleştiği; içeriğinde enzim, protein, mitokondriyal DNA ve RNA bulunan kısımdır.

Krebs Döngüsü ya da diğer adıyla Sitrik Asit Döngüsü, 1937'de ilk kez Hans Adolf Krebs tarafından keşfedilen (10); hücresel enerjinin 2/3'ünün üretildiği, oksijenli solunum yapan tüm canlıların temel metabolik yolağıdır (11). Hücresel enerji

üretiminin temel basamağı olan glikoliz sonucunda üretilen piruvat molekülleri, sitoplazmadan mitokondriyal matrikse taşınır ve oksidasyonla acetyl CoA'ya dönüştürülerek Krebs döngüsüne girer. Benzer şekilde yağ asitleri, sitoplazmada acyl-CoA sentataz ile fatty acyl-CoA'lara dönüştürülüp, difüzyon ile mitokondriye geçer ve matrikste gerçekleşen  $\beta$ -oksidasyon tepkimesiyle acetyl-CoA'a indirgenerek Krebs döngüsüne girer (12) (Şekil 2.1).

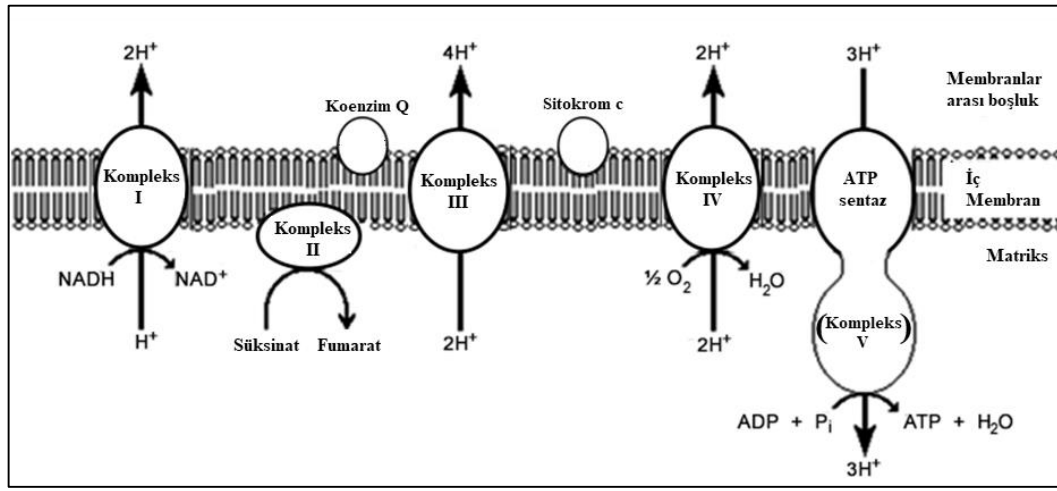


**Şekil 2.1** Glikoz ve yağ asitleri metabolizmasının mitokondri bağlantılı temel basamakları.

Krebs döngüsü sırasında meydana gelen zincirleme tepkimeler sonucunda ortaya çıkan son ürünler CO<sub>2</sub>, NADH ve FADH<sub>2</sub>'dir. NADH ve FADH<sub>2</sub> mitokondrinin iç zarında bulunan elektron taşıma sistemi elemanlarının temel elektron ihtiyacını karşılayan koenzimlerdir (11). Elektronlar, sitokrom c ve koenzim Q gibi taşıyıcılar aracılığıyla elektron vericisi ve alıcısı olarak organize olmuş dört kompleksten (I-IV) geçerek, kompleks IV'ün (sitokrom c oksidaz) katalizlediği son basamakta O<sub>2</sub> ile birleşip H<sub>2</sub>O molekülü oluşturur (Şekil 2.2) (9).

Elektron taşıma zinciri elemanları boyunca NADH ve FADH<sub>2</sub>'den aktarılan protonlar matriksten membranlar arası boşluğa geçerken bir proton gradyanı oluşturur; protonların membranlar arasındaki boşlukta depolanmasıyla proton hareket gücü

oluşur. Membranlar arası boşlukta biriken protonlar, ATP sentaz (kompleks V) ile matrikse taşınır, ortaya çıkan enerji ile ADP ve inorganik fosfatın birleşmesiyle ATP üretilir (Şekil 2.2). Bu süreç oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) olarak tanımlanır. OXPHOS sonucunda mitokondri, hücrel hasara ve yaşlanmaya neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Dolayısıyla mitokondri, bir taraftan hücrenin enerji ihtiyacını karşılama görevi görürken diğer taraftan hücrel yaşlanmaya ve patolojik bir çok duruma da neden olur (2,13).



Şekil 2.2 Elektron taşıma sistemi elemanları.

Sitrik asit döngüsü, elektron taşıma sistemi için NADH ve FADH<sub>2</sub> üreterek ATP sentezine olanak sağlamasının yanı sıra, ara ürünleriyle biyosentez yollarında görev alarak steroid, heme, amino asit ve nükleotid sentezine de yardımcı olur (2,12).

Mitokondri, çevresindeki organellerle ve çekirdekle iletişim halinde kalarak biyoenerjetik-biyosentetik rolünü enerji ihtiyacına göre şekillendirir. Mitokondri anterograd (sitozolden mitokondriye doğru taşıma) ve retrograd (mitokondriden sitozole doğru taşıma) olmak üzere iki farklı yolla hücre içi sinyal iletimini sağlar. Anterograd sinyal iletimine çekirdekten gelen ve mitokondri işlevini düzenleyen sinyaller örnek verilebilir. Çekirdek genomundan kodlanan NRF-1 (*nuclear respiratory factor-1*) ve PGC-1 $\alpha$ 'nın (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1*) birlikte solunum genlerinin transaktivasyonunda görev alması ve çekirdek genomundan kodlanıp mitokondriye taşınan mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM'ın mtDNA transkripsiyonunun doğrudan düzenlemesi anterograd sinyal iletiminin bir sonucudur (14,15). Retrograd sinyal iletimi ise solunum zinciri



elemanlarında meydana gelen bozukluklar, mtDNA mutasyon birikimleri, mtDNA kopya sayısı değişimleri ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasıyla başlatılır. İlk kez maya hücrelerinde tanımlanan retrograd sinyal iletiminde Rtg1/Rtg3 transkripsiyon faktörleri ve sitoplazmik Rtg2 proteininin temel düzenleyiciler olduğu ve transkripsiyon faktörlerinin çekirdekte çıkmasını sağlayıp, SLIK (*Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA)-like*) kromatin *remodelling* kompleksinde görev alarak çekirdekte retrograd gen transkripsiyonunu düzenlediği bilinmektedir (16). Cardamone ve arkadaşları fareler üzerinde yaptığı araştırmalarda mayadaki Rtg2'nin işlevsel homologunun memelilerdeki GPS2 (*G-Protein Pathway Suppressor 2*) olduğunu ve mitokondriyal depolarizasyonla çekirdeğe ulaşan GPS2'nin buradaki mitokondriyal genlerin promotörlerine bağlanarak transkripsiyonunu düzenlediğini bildirmişlerdir (17).

Anterograd ve retrograd sinyal iletimlerinin yanı sıra mitokondri hücre içi homeostaziyi sağlamak adına diğer organellerle de etkileşimdedir. Mitokondri, dış zarında bulunan uniport ve  $\text{Na}^{+2}/\text{Ca}^{+2}$  pompları ile sitozolde biriken  $\text{Ca}^{+2}$ 'u içine alarak hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  dengesini sağlarken; inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü (IP3R) ve anyon kanalları aracılığıyla da endoplazmik retikulum (ER) ile iyon alışverişinde bulunur (13,18). Mitokondri hücre için oldukça önemli olan apoptoz yollarında da görev alır. Bcl-2 proteinleri mitokondri dış zarına yerleşip zarın geçirgenliğini artırarak sitokrom c nin organel dışına çıkmasına neden olur; sitokrom c, APAF1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ve prokaspaz 9 ile birleşip apoptozom kompleksini oluşturarak apoptoz olayını başlatır (13,18).

### 2.1.1 Mitokondriyal Genom

Mitokondriyal matriks içerisinde, Krebs döngüsünde görev alan enzimlerin yanı sıra mitokondriyal DNA (mtDNA) da bulunur. İnsan mtDNA molekülü 16,569 baz çifti uzunluğunda, halkasal yapıda, çift zincirden oluşan ve içeriğinde 37 gen barındıran özel bir nükleik asittir (Şekil 2.3). 37 genin 13'ü solunum zinciri elemanlarından olan kompleks I, III, IV ve V'ün ant ünitelerini kodlar (19,20) (Tablo 2.1), 22 tanesi mt-tRNA kodlanmasında, iki tanesi de mt-rRNA sentezinde görev alır (2). Evrimsel süreçte, mitokondriyal genomda bulunan bazı genlerin kaybolduğu,

ATP/ADP translokaz genleri gibi mitokondri işlevi için önemli genlerin endosimbiyotik ilişkisinin bir sonucu olarak çekirdek genomuna aktarıldığı düşünülmektedir (8). Bugün 1500'e yakın mitokondri ilişkili genin kromozomal DNA üzerinde dağınık bir şekilde bulunduğu ve mitokondriyal proteinlerin %99'unun çekirdek DNA'sından kodlandığı bilinmektedir (2,19).

**Tablo 2.1** Mitokondriyal solunum zinciri elemanları, altbirimleri ve sentezlendikleri genler (19).

Altbirim	Kompleks I	Kompleks II	Kompleks III	Kompleks IV	Kompleks V
mtDNA'dan kodlanan	7	0	1	3	2
nDNA'dan kodlanan	39	4	10	10	14
Mitokondri altbirimleri	ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, ND4L	–	Sitokrom b	COX I, COX II, COX II	ATPase 6, ATPase 8
Enzimler	NADH - CoQ Redüktaz	Süksinat dehidrogenaz	Sitokrom c redüktaz	Sitokrom c oksidaz	ATP sentaz

Çekirdek DNA'sından sentezlenen proteinlerin içerisinde Kompleks II'nin dört altbirimi de dahil olmak üzere (Tablo 2.1), mitokondriyal DNA polimerase  $\gamma$  (POLG), mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TFAM), mitokondriyal ribozomal proteinler, elongasyon faktörleri ve mitokondriyal metabolik enzimler de bulunur (20).

Mitokondriyal DNA'nın iki zinciri baz içeriklerine göre ağır ve hafif zincir olarak adlandırılır: ağır (H) zincir guanin (G) bakımından zenginken, hafif (L) zincirin yapısında karşılık gelen sitozinler (C) bulunur. H-zinciri, 12S (küçük) rRNA ile 16S (büyük) rRNA, 12 polipeptid ve 14 tRNA dizisini içerirken, L-zinciri ND6 polipeptidi ve 8 tRNA için bir kalıp görevi görmektedir (21). Mitokondriyal DNA'da H-zinciri ve L-zinciri için iki farklı replikasyon başlangıç dizisi bulunur; H-zincirinin replikasyon başlangıç dizisi, *major noncoding region* (NCR)'da bulunan D-loop (*displacement loop*) bölgesinde yer alır. D-loop içerisinde H-zincirine ait (HSP1) ve L-zincirine ait (LSP) olmak üzere iki farklı mtDNA promotörü içerir. D-loop içinde üç farklı



Her bir mitokondrionunun 1-15 arasında mtDNA kopyası taşıdığı öngörülmektedir (25). Çekirdekdeki histonlarla DNA ipliklerinin oluşturduğu nükleozom yapılarına benzer yapılar mitokondride de bulunur, nükleoid adı verilen bu yapılar içeriğinde histon proteinleri bulundurmazlar. Her nükleoidin yapısında bir ya da iki mtDNA molekülü vardır (23). Bu yapılar iç membranın matrikse bakan iç yüzünde yer alır. mtDNA'nın mutasyonlara oldukça açık olmasının nedenleri arasında, iç membranda ETS elemanlarına yakın olması ve OXPHOS sonucunda açığa çıkan oksijen serbest radikallerine maruz kalması gösterilmektedir. Çeşitli modellerle yapılan çalışmalarda mtDNA'nın nDNA'ya göre mutasyonlara 10 kat kadar daha açık olduğu belirlenmiştir. (26,27). Bazı çalışmalarda mitokondride meydana gelen oksidatif DNA hasarlarında *base-excision repair* mekanizmasına benzer bir işlev gösterilmiş olsa da (28,29) mtDNA'da etkin bir hasar tamir mekanizmasının varlığı hala tartışmalıdır. Mitokondriye ait etkin bir tamir mekanizması olmaması, mtDNA'nın mutasyonlara açık olmasının nedenleri arasında gösterilmektedir.

### 2.1.2 Mitokondri Genetiği ve Kalıtımı

Mitokondri genetiği birçok yönden çekirdek DNA'sının (nDNA) Mendelyan kalıtım kalıplarından farklılık gösterir. Mitokondri genetiğinin en önemli özelliği maternal kalıtım göstermesidir. Literatürde, Schwartz and Vissing'in 2002 yılında yayınladıkları ND2 geninde iki bazlık bir delesyon taşıyan vaka raporunda (30) olduğu gibi bazı meyve sineği, fare ve koyun modellerinde de paternal kalıtımın görüldüğü istisnai durumlar da bulunmaktadır (31). Oositlerde sayısı 10000'i bulan mtDNA kopyası, sperm hücrelerinde 100 kopyanın altındadır (23). Sperm ile oositin birleşmesi sonucunda paternal mitokondrinin popülasyonda kaybolmasının nedeni sadece sayıca az olmasıyla açıklanamaz. 1999 yılında Sutovsky ve arkadaşlarının inek ve maymun embriyolarında yaptığı araştırmalar paternal mitokondrinin ubiquitin taşıdığını, bu nedenle embriyo içerisinde otofaji yoluyla elimine edildiğini göstermiştir (32). *C. elegans* (33) ve fare (34) ile yapılan deneylerde de benzer şekilde sperm içerisinde taşınan paternal mitokondrinin, taşıdığı belirteçler yoluyla otofaji mekanizmasını aktive ederek yıkıldığı gösterilmiştir.

nDNA kalıtımında independent assortment (bağımsız dağılım) ve rekombinasyon ile farklı genetik içeriklerin gelecek kuşaklara aktarılması söz konusuysen, mtDNA’da rekombinasyon olmaksızın mutasyonlar birikerek bir sonraki kuşağa aktarılır (35). mtDNA varyantları popülasyon genetiğinde “şişe boynu” olarak adlandırılan seçilim modeliyle bir sonraki kuşağın mtDNA içeriğini belirler. Fluoros ve arkadaşları, mtDNA segregasyonu ve seçiliminin insan embriyosunun gelişim döneminde-Carnegie evrelerinde- meydana geldiğini göstererek ilk kez şişe boynu modelini insan embriyosunda göstermişlerdir (36).

Mitokondriyal genomun poliploidik bir yapısı vardır; hücrenin çeşidine göre içerdiği mtDNA sayısı 10,000’i geçebilir (25,37,38). Bu durum mitokondri genetiğinde homoplazmi ve heteroplazmi olarak adlandırılan iki önemli kavramın temelini oluşturur. Homoplazmi belirli bir lokus için tüm mtDNA kopyalarının özdeş olduğu durumu ifade ederken; heteroplazmi durumunda ise iki ya da daha fazla mitokondriyal genotipin varlığı söz konusudur. Heteroplazmik mtDNA bulduran hücreler bölündüklerinde içerdikleri farklı mtDNA molekülleri yeni oluşan hücrelere rastgele dağılım göstererek aktarılır. Bu kavrama replikatif segregasyon adı verilir ve yeni oluşan hücrelerin birbirlerinden farklı oranlarda heteroplazmik mtDNA içerdiğini açıklar.

mtDNA’da ortaya çıkabilecek değişikliklerin “patolojik mutasyon” olarak gözlemlenmesi için gerekli bir eşik (*threshold*) seviyesi vardır (bkz. 2.3) ve bu seviyenin aşılması durumunda mitokondri hayati biyokimyasal işlevlerini yerine getiremeyerek ortaya klinik bir tablo çıkartır (39). Yapılan tek hücre (*single cell*) ve transmitokondriyal hücre hattı çalışmaları, mitokondriyal genomda meydana gelen mutasyonların işlevsel olarak “çekinik nitelikte” olduğunu ve ancak eşik seviyesinin üstünde bir oranın (ortalama %65 üstü) varlığında biyokimyasal fenotiplerin ortaya çıktığını göstermektedir (39,40).

### 2.3 Mitokondriyal Sitopatiler

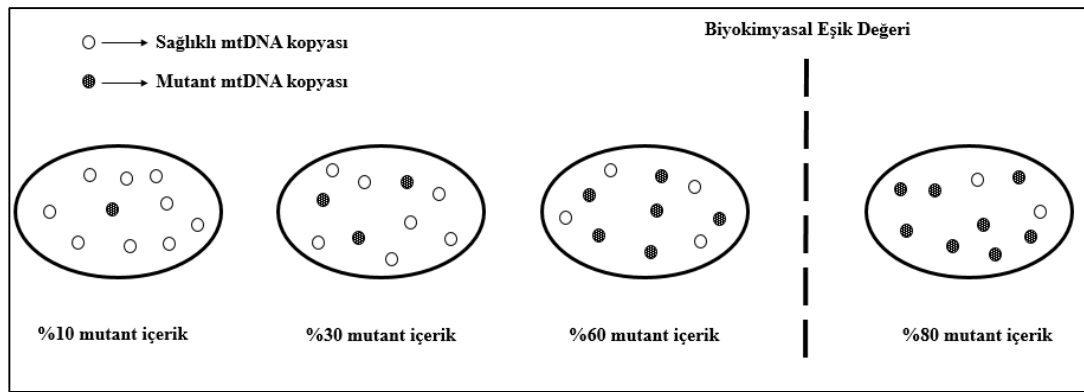
Mitokondriyal sitopatiler, kalıtım yoluyla aktarılan ya da sonradan edinilen, mitokondri hasarının sonucunda ortaya çıkan ve bu hasar nedeniyle hücresel enerji üretim mekanizmasını olumsuz etkileyen, genetik heterojenitenin görüldüğü multi-

sistemik hastalık grubudur. Mitokondri protein içeriğinin iki farklı kaynağı olan nDNA ve mtDNA, mitokondriyal sitopatilerin genetik ve biyokimyasal temellerini belirlemektedir. Mitokondri işlevinde görev alan çekirdek genomunda kodlanan genlere ilişkin mutasyonlar otozomal (Mendelian) kalıtım kuralları ile aktarılmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları mtDNA replikasyonundan sorumlu olan mitokondriyal DNA polimeraz  $\gamma$  (POLG), helikaz (41), primaz ve ligaz genlerinde (42,43) meydana gelen mutasyonlar olabileceği gibi çekirdek genomunda bulunan mtDNA idamesinden sorumlu timidin kinaz ve fosforilaz genlerinde de meydana gelebilir(44). Bu grupta yer alan mutasyonlar mtDNA’da çoklu delesyon, duplikasyon ve depleksiyonlar oluşturarak (45) mtDNA’da kalitatif ve kantitatif bozukluklara neden olur. OXPHOS’da görev alarak kompleks I ve kompleks II alt ünitelerini biraraya getiren “*assembly*” faktörlerinin sentezlendiği çekirdek genlerinde meydana gelen mutasyonlar da otozomal kalıtılan mutasyonlara örnek verilir (46).

mtDNA mutasyonlarıyla ilişkili olan mitokondriyal sitopatiler, mitokondrinin dağılım hacmi nedeniyle hemen hemen her doku ve organı etkileyebildikleri gibi, ilerleyen yaşlarda post-mitotik hücrelere –nöron ve kas hücreleri gibi- bağlı olarak da kendini gösterebilir (44,47). Bir dokuda mitokondriyal sitopatinin gözlemlenebilmesi için mutant mtDNA’nın belli bir oranın üstünde olması ve bir somatik yük oluşturması gerekir. Somatik yükün hastalık yapıcı etkisi ise eşik etkisi olarak adlandırılır ve bu eşik her dokunun enerji ihtiyacına göre organdan organa farklılık gösterebilir.

Mitokondriyal hastalıklarda genotip-fenotip ilişkisi *cybrid* adı verilen trans-mitokondriyal hücre hatlarının geliştirilmesi ve kullanılmasıyla beraber netlik kazanmıştır. 1986’da ilk kez Wallace yaptığı çalışmada mitokondriyal 16S RNA geninde meydana gelen mutasyonların %15’lik bir yüke ulaştıkça fenotipe yansıdığını göstermiştir (48). MERRF ve MELAS hastalarının hücre hatlarından elde edilen *cybrid*lerde patojenik mutasyonların söz konusu olduğu durumlarda fenotipik bir eşik değeri olduğu ispatlanmış, MERRF ve MELAS hastalarının kas hücrelerinde mutant yükün sırasıyla %90’ı ve %65’i geçmesi durumunda klinik bulgular gözlemlendiği belirlenmiştir (39). Shoffner ve arkadaşlarının araştırmalarına göre mtDNA delesyonlarında %60’lık bir yükün fenotipi etkilemek için yeterli olduğu, diğer mutasyon tiplerinin fenotipe yansıma değerinin %90’ları da bulabileceği söylenebilir (49,50). Mutant ve sağlıklı mtDNA kopyalarının bir arada bulunduğu

popülasyonlarda sağlıklı mtDNA'nın genellikle patojenik mutasyon taşıyan kopyayı tolere ettiği düşünülmektedir. Bu durumun kimyasal temeli, mtDNA üzerinde oluşan patojenik mutasyonların eksik baskınlıkta ya da resesif (çekinik) nitelikte olmasıdır (23). Sağlıklı ve mutant mtDNA kopyalarının birarada olduğu bir hücrede, OXPHOS ve mitokondriyal protein sentez mekanizmalarının devamlılığı sağlıklı kopyaların varlığında biyokimyasal eşik etkisi aşılanı kadar devam eder. Mutant içeriğin hücrede birikerek artması ve mutant yükün %80 civarına ulaşması durumunda mitokondri işlevini yerine getiremeyerek işlev yetersizliğinin ortaya çıkmasına neden olur (23) (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4** mtDNA heteroplazmisi ve eşik etkisi.

mtDNA'da meydana gelen mutasyonlar "2.2.1 Mitokondri Genetiği" bölümünde bahsedildiği gibi genellikle maternal kalıtım ile bir sonraki kuşağa akatılırlar. Ancak annede mutant mtDNA varlığı bilinse dahi şişe boynu seçilimiyle hangi oranda mutant, hangi oranda sağlıklı mtDNA kopyanın çocuğa aktarılacağı öngörülemez. Avrupa toplumunda 400,000 insanın mitokondriyal sitopati hastası olduğu bilinmekte ve bu hastalıkların görülme sıklığı yaklaşık 1:2,000 olarak tahmin edilmektedir (5,6).

Günümüzde mitokondriyal sitopatilerin radikal tedavisi olmamakla birlikte, hastanın gösterdiği semptomlara yönelik vitamin, kofaktör ve antioksidan takviyesi gibi palyatif yöntemler uygulanmaktadır (47,51).

### 2.3.1 Leigh Sendromu

Leigh Sendromu, her 40,000 doğumda bir görülen nörodejeneratif bir hastalıktır (52). Sayısı 50'yi aşan, çekirdeksel ve mitokondriyal DNA kaynaklı, ETS elemanlarının altünite birimlerinin ve solunum komplekslerinin oluşmasında görev alan *assembly* faktörlerinin sentezlendiği genlerde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle görülür (53). Dolayısıyla mutasyonun gerçekleştiği gene bağlı olarak X'e bağlı resesif, otozomal resesif ya da maternal olarak bir sonraki kuşağa aktarılır. X'e bağlı resesif aktarılan Leigh hastalıklarına piruvat dehidrogenaz (PDH) eksikliğine neden olan *PDHA1* geninde meydana gelen mutasyonları ya da *NDUFA1* geninde oluşup kompleks I eksikliğine neden olan mutasyonları gösterebiliriz (54). Otozomal resesif geçişle bir sonraki kuşağa aktarılan patojenik mutasyonlar ise OXPHOS enzimlerinin ya da *assembly* faktörlerinin kodlandığı genlerde meydana gelen mutasyonlardır. Bu mutasyonlara kompleks I hasarı başta olmak üzere, kompleks II, kompleks III ve kompleks IV hasarına neden olan mutasyonları örnek verebiliriz. Maternal geçişli Leigh Sendromuna ise mtDNA'da kompleks I eksikliğine neden olan MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND5 ve MT-ND6 gen mutasyonlarını ve kompleks V hasarına neden olan MT-ATP6 gen mutasyonunu örnek gösterebiliriz (54).

Kompleks I eksikliği Leigh Sendromu olan hastalarda en sık rastlanılan tablodur ve vakaların 1/3'ünde görülür (52).

### 2.3.2 Kearns-Sayre Sendromu

Kearns-Sayre Sendromu enerji ihtiyacının oldukça yoğun olduğu dolayısıyla, mitokondrinin yoğun olarak bulunduğu santral sinir sistemi, retina, kalp ve iskelet kasında tutulumlar sergileyerek progresif eksternal oftalmopleji, pigmenter retina dejenerasyonu ve kardiyak iletim defektleriyle karakterize edilen bir mitokondriyal hastalıktır (55).

mtDNA'da 1,000 ile 10,000 baz aralığında değişen delesyonların (56) neden olduğu bu Kearns-Sayre Sendromu'nda mutasyonların %90'ı somatiktir ve maternal kalıtım kalıbı göstermez (55). Vakaların 1/3'ünde, mtDNA üzerinde bulunan COXII geninden ND5 genine doğru uzanan 4,977 kb'lık bir delesyonun görülür (ortak



delesyon) ve bu delesyon sonucunda 12 gen etkilenecek oksidatif fosforilasyon mekanizmasının bozulmasına dolayısıyla hücrel enerji üretiminin yetersiz kalmasına neden olur (55,57).

Hastalığın tam olarak prevalansı bilinmemekle birlikte Fin popülasyonunda yapılan bir çalışmada prevalansın 100,000 olguda 1.6 olduğu belirlenmiştir (55).

### 2.3.3 MERRF (*Myoclonic epilepsy with ragged red fibers*)

MERRF miyoklonik epilepsi, konuşma bozukluğu (dizartri), nistagmus, optik atrofi ve progresif ataksi ile karakterize hastaların kas biyopsilerinde trichrome boyası ile düzensiz kırmızı fiberlerin gözlemlendiği (*ragged red fibers*) (58,59) bir sitopati çeşididir.

Shoffner ve arkadaşları mtDNA'nın tRNA<sup>Lys</sup> geninde keşfettikleri m.8344.A>G mutasyonunun MERRF sendromu ile ilişkili olduğunu ve bu mutasyonun OXPHOS'da görev alan protein birimlerinin, özellikle kompleks I (NADH-CoQ redüktaz) oluşumunu olumsuz etkilediğini belirtmiştir (49). MERRF tanısı alan hastaların %80-90'ında görüldüğü belirtilen m.8344.A>G mutasyonu maternal kalıtım göstermektedir (60). Maternal kalıtım kalıbının tipik özellikleri arasında olan sağlıklı ve hasarlı mtDNA kopyalarının birarada olması, dağılım hacminin dokudan dokuya farklılık göstermesi ve bir eşik etkisinin varlığı; MERRF semptomlarının oldukça değişken bir klinik tablo göstermesine neden olur. Avrupa toplumunda prevalansının 100,000'de 0.9 olduğu düşünülmektedir (61).

### 2.3.4 MELAS

MELAS sendromu, ilk kez Pavlakis ve arkadaşları tarafından 1984'te tanımlanan; inme benzeri episodlar, laktik asidoz ve mitokondriyal miyopati ile karakterize progresif bir nörodejeneratif hastalıktır (62). Bir hastaya MELAS tanısı koyabilmek için klinikte üç önemli kriter bulunmaktadır; (1) hastada 40 yaş öncesi inme benzeri ataklar görülmesi, (2) nöbet atakları ya da bunamayla gelen ensefalopatik bulgulara rastlanması, (3) kas biyopsisinde *Gomori trichrome* boyaması ile düzensiz

kırmızı fiberlerin görülmesi ve laktik asidozun eşlik ettiği mitokondriyal miyopatiler (3).

mtDNA'dan kodlanan tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> geni *MT-TL1*'de meydana gelen nokta mutasyonlarının MELAS ile ilişkili olduğu ve MELAS hastalarının %80'inin m.3243A>G mutasyonu taşıdığı tespit edilmiştir (3,63). m.3243 A>G mutasyonu mitokondriyal translasyon mekanizmasını bozarak mitokondriyal protein sentezinin dolayısıyla da ETS komplekslerinin sentez mekanizmasında bozulmalara; ETS kompleksleri sentezindeki azalma da mitokondriyal işlev bozuklukluğuna neden olur. Ayrıca nadir de olsa *MT-TL1* geninde yer alan m.3256 C>T(64,65), m.3271 T>C (63,66,67) ve m.3291 T>C (68,69) mutasyonları da MELAS sendromuyla ilişkilendirilmiştir.

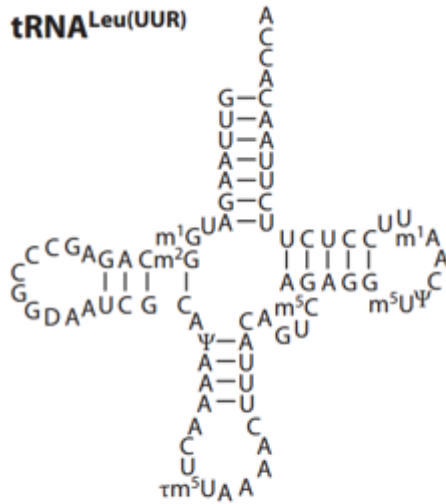
mtDNA kaynaklı mutasyonların neden olduğu diğer hastalıklar gibi MELAS da maternal kalıtım gösteren bir sendromdur. Hastada farklı organ ve dokularda farklı oranda mtDNA bulunması ve eşik değer üzerinde mutant mtDNA bulunduran bu organ ve dokuların birbirinden farklı biyokimyasal eşik etkilerinin olması klinik tabloların birbirinden farklılık göstermesine neden olmaktadır. Örneğin m.3243 A>G mutasyonu taşıyan hastaların iskelet kas dokularında yapılan bir çalışmada, patolojik tablo için kasta biriken mutant mtDNA seviyesinin %50 olmasının gerekli olduğu gösterilmiştir (3).

Bugün MELAS sendromunun prevalansının Japonya için 0.2:100,000 olduğu (70), başta MELAS olmak üzere diğer mitokondriyal hastalıklarla ilişkili m.3243 A>G mutasyonunun prevalansının Finlandiya için ise 16–18:100,000 olduğu bilinmektedir (71,72).

## 2.4 MT-TL1 Geni

*MT-TL1* (mitochondrially encoded *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-1*) mtDNA'nın 3230-3304 nükleotidleri arasında bulunan, 75 baz çiftlik *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* genidir (bkz. Ek-1). *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* 10 bazlık DHU loop ve 7 bazlık oluşan *TψC loop*'a sahiptir (Şekil 2.5). Mitokondriyal genomda transkripsiyon terminasyonu için MTERF'ün (*mitochondrial transcription termination factor*) 13 bazlık terminasyon zincirine bağlanması gerekmektedir ve bu zincir *MT-TL1* geni içerisinde 3237 ve 3249 nükleotidleri arasındadır (73). Yakubovskaya ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada MTERF1'in mtDNA'nın 3232 ve 3253. nükleotidleri arasında kalan dizisine yani *tRNA<sup>Leu</sup>* terminasyon zincirinin de olduğu bölgeye bağlandığını keşfetmişlerdir (74). Bu bağlanmayla mtDNA'nın çözülüp 3 bazın içten dışa (*flipping*) dönerek bağlanmayı stabil hale getirmesi ve transkripsiyon terminasyonunun düzenlenmesi söz konusudur (74).

mtDNA'nın etkili bir tamir mekanizması olmadığı için (Bkz. 2.1.1), *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* in de patojenik nokta mutasyonlarına açık olması kaçınılmazdır. *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* 'de meydana gelen patojenik mutasyonlardan en sık görüleni m.3243



A>G mutasyonudur (3) ve bu mutasyon MELAS başta olmak üzere bir çok mitokondriyal hastalıkla da ilişkilidir. *MT-TL1* geninde meydana gelen diğer mutasyonlara ise m.3256 C>T, m.3260 C>T, m.3271 T>C, m.3291 T>C ve m.3303 C>T mutasyonlarını örnek verebiliriz (Tablo 2.2).

Şekil 2.5 MT-TL1 gen ürünü: *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*.

**Tablo 2.2** *MT-TL1* geninde meydana gelen mutasyonlar ve ilişkili oldukları sendromlar.

Sendrom	Mut.	Referans
MELAS / Leigh Sendromu	A3243G	Goto ve ark.(63)
MELAS/MERRF	C3256T	Moraes ve Sato (64,65)
MELAS	T3271C	Goto, Hayashi, Sakuta(63,66,67)
MELAS / Miyopati / Sağırılık + Kognitif Bozukluk	T3291C	Goto ve ark. (68)
Mitokondriyal Miyopati ve Kardiyomiyopati	A3260G	Zeviani ve Sweeney(75,76)
Mitokondriyal Miyopati ve Kardiyomiyopati	C3303T	Silvestri ve ark.(77)

MELAS hastalarının %80'inde görülen m.3243 A>G mutasyonu ilk kez Goto ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (63,69). m.3243 A>G mutasyonunun ayrıca Leigh sendromu (78), MERRF ve MELAS'ın çakıştığı klinik tablolar ve annesel geçişli sağırılıkla seyreden diyabet tablolarında da bildirilmiştir (79). Hastaların periferik kan örneklerinde heterojenik olarak bildirilen m.3243 A>G mutasyonunun ilerleyen yaşla beraber periferik kandaki lökositlerde taşınma oranının da azaldığı gösterilmiştir (79). *MT-TL1*'in antikodonunda wobble pozisyonunda yer alan uridin, 5-taurinometiluridine dönüştürülerek tRNA işlev kazanır. Yasukawa ve arkadaşları m.3243 A>G ve m.3271 T>C mutasyonlarının varlığında bu değişimin gerçekleşmediğini göstermiş; bu değişimin eksikliğinin lösin translasyonunda hatalara neden olduğunu belirtmişlerdir (80).

m.3256 T>C mutasyonu ise ilk kez Moraes ve arkadaşları tarafından MERRF sendromuyla beraber gelen optik nöropati ve diyabet bulgularını gösteren bir hastanın kas dokusunda heteroplazmik olarak saptanmıştır (64). Hirai ve arkadaşları, sekiz kişilik bir ailede altı kişinin heteroplazmik olarak bu mutasyonu taşıdığını göstermiş, aile bireylerinden bazılarında kas atrofisinin yanında insüline bağımlı olmayan diyabet ve glukoz intoleransı görüldüğünü dolayısıyla bu mutasyonun glukoz metabolizmasını etkilediğini belirtmişlerdir (81).

Bir diğerk *MT-TL1* gen mutasyonu olan m.3260 A>G, iskelet kası miyopatisiyle ya da kas miyopatisi görülmeksizin seyreden kardiyomiyopatiyle ilişkilendirilmiştir (75). Erişkin dönem başlangıçlı olduğu tespit edilen m.3260 A>G mutasyonunun literatüre geçen örneğinde, konjestif kalp yetmezliği belirtileri gösteren 23 yaşındaki hastanın kas dokusunda %90'a ulaşan bir mutant yük olduğu tespit edilmiştir (82).

Her 40 MELAS hastasının 3'ünde görülen patolojik *MT-TL1* mutasyonu m.3271 T>C, Stenqvist ve arkadaşlarına göre ND6 altünitesinin sentezini engelleyerek ETS elemanı olan kompleks I'in aktivitesini düşürmektedir (4). Ayrıca m.3243 A>G mutasyonu gibi m.3271 T>C mutasyonunun da lösinin hatalı translasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (80).

m.3291 T>C mutasyonu tRNA<sup>Leu</sup>'nin *TψC loop*'unda yer alan ve MELAS sendromuyla ilişkilendirilen üçüncü mutasyondur (68). Literatürde MERRF ve MELAS sendromlarının klinik belirtilerini gösteren, kan ve fibroblast örneğinde heteroplazmik, kas biyopsi örneğinde homoplazmik olarak m.3291 T>C mutasyonu taşıyan bir vaka da bildirilmiştir (83).

*MT-TL1* geninde meydana gelen patojenik m.3303 C>T mutasyonu ise kardiyomiyopatiyle ilişkilendirilmektedir (77). Silvestri ve arkadaşları mutasyonu tanımladıkları ilk vakada, aynı aileden letal infantil kardiyomiyopatinin görüldüğü üç bireyin tüm dokularında homoplazmik olarak bu mutasyonu taşıdığını göstermiştir (77). Aynı vakada anne tarafında akrabalık ilişkisi bulunan asemptomatik beş bireyin kan örneklerinde de heteroplazmik olarak bu mutasyonun varlığı gösterilmiş, üç akrabanın ise ilerleyen yaşlarında ani kalp yetmezliği nedeniyle hayatlarını kaybettiği belirtilmiştir. Bruno ve arkadaşları ise dört farklı aileden gelen sekiz hastada bu mutasyonu tanımlamış; kardiyomiyopatiye iskelet kası miyopatisinin de eşlik ettiği vakaların olduğunu belirterek mutasyonun patolojik olduğunu desteklemiştir (84).

## 2.5 Mutasyon Analiz Teknikleri

### 2.5.1 Restriksiyon Endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazlar ilk kez bakteriyel savunma mekanizmalarında keşfedilmiş; bakterilerin kendi DNA'larını korumak adına hücre içine giren yabancı bakteriyofaj DNA'sını parçalara ayıran enzimler bulundurduğu gözlemlenmiştir (85). Aynı çalışmada bakteri içine giren yabancı DNA'yı parçalamak için kullanılan bu enzimlerin konak bakteri DNA'sına zarar vermediği, bakterinin DNA'sını metilleyerek bu enzimlerden koruduğu da bildirilmiştir (85). Restriksiyon endonükleazlar (RE), DNA dizisi üzerinde palindromik yapıdaki özgül kısa dizileri tanıyan ve bu dizilerin içinden veya dizilere yakın bölgelerden DNA'yı kesen enzimlerdir. 1968'de Meselson ve Yuan'ın ilk kez *E.coli* bakterisinden özgül bağlanma bölgelerine ihtiyaç duymayan bir RE'nin izolasyonu yapmış, 1970'de ise Smith ve Wilcox *H.influenza*'dan özgül DNA dizisi tanımlayarak kesim yapan Hind II endonükleazını izole etmişlerdir (86,87). RE'ler; DNA metil transferaz aktivitelerine, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre farklı şekillerde sınıflandırılırlar.

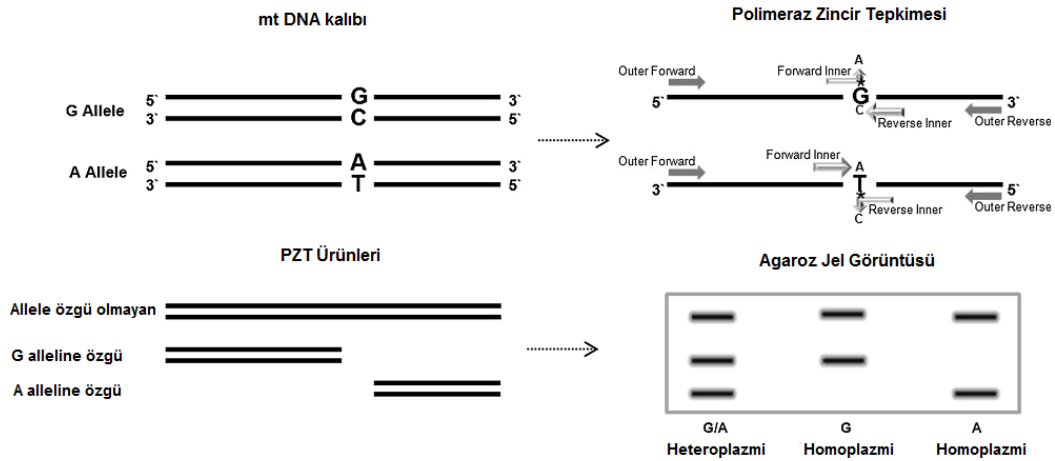
Bilinen nokta mutasyonlarının doğrudan tespiti için kullanılan restriksiyon endonükleaz fragman analizleri, RE'lerin çift zincirli DNA'yı özgül tanıma bölgelerinden ya da bu bölgelere yakın noktalardan kesmesine dayanmaktadır. DNA'da meydana gelen mutasyonlar yeni enzim kesim bölgesi oluşturabildikleri gibi varolan enzim tanıma dizilerini de ortadan kaldırabilir. İncelenen mutasyonları içeren kesim bölgelerine sahip RE'ler ile kesilen Polimeraz Zincir Tepkimesi ürünleri jel elektroforezinde farklı fragmentlere ayrılarak mutasyon analizi gerçekleştirilir.

### 2.5.2 ARMS-PZT (*Amplification Refractory Mutation System*)

ARMS-PZT ya da diğer adıyla allele özgü polimeraz zincir tepkimesi, Newton ve arkadaşları tarafından 1989 yılında geliştirilen, bir DNA dizisinde yer alan ve önceden bilinen mutasyonların bu allellere özgü primerler yardımıyla hedef DNA'nın çoğaltılması temeline dayanmaktadır (7). ARMS tekniği, restriksiyon endonükleaz fragman analizlerinin gerektirdiği enzim kesim bölgeleri varlığına ihtiyaç

duymaksızın DNA zincirinde bulunan nokta mutasyonlarının veya varyasyonlarının doğrudan analizi için kullanılan bir polimeraz zincir tepkimesidir.

Alele özgü iki farklı primer tasarımına dayanan bu yöntem, mutasyon taşıyan nükleotidin iki zincirinde farklı allelere komplementer primerler varlığı ile hedef dizinin 5' ve 3' kollarında allele özgü iki farklı uzunlukta amplicon eldesine dayanmaktadır (88). Şekil 2.6'da biri nokta mutasyonu taşıyan allele özgü, diğeri yabancı tipteki allele özgü iki farklı iç primer ve allele özgü olmayan iki farklı dış primerle gerçekleştirilen tek bir PZT gösterilmektedir. Bu tepkime sonucunda allele özgü olmayan uzun bir amplicon ile mutant ve yabancı tipteki allele özgü primerlerin çoğalttığı daha kısa ampliconlar elde edilir.



**Şekil 2.6** ARMS-PZT'nin şematik gösterimi ve tepkime sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (88).

Tepkimenin iyi optimize edilmesi durumunda analiz edilen örneğin mutasyon taşıyıp taşımadığı farklı uzunluktaki ampliconların agaroz jel elektroforez görüntüsünden anlaşılabilir. Eger mtDNA üzerindeki bir gen hedeflendiyse mutasyon taşıyan örneğin heteroplazmik olması durumunda iki iç primerden de amplifikasyon alınır ve agaroz jelde üç farklı boyutta bant görünümü alınır (Şekil 2.6).

Literatürde Leber'in herediter optik nöropati (LHON) hastalarında üç temel mitokondriyal mutasyonun belirlendiği (89) ve fenilketonüri hastalarında *PAH*

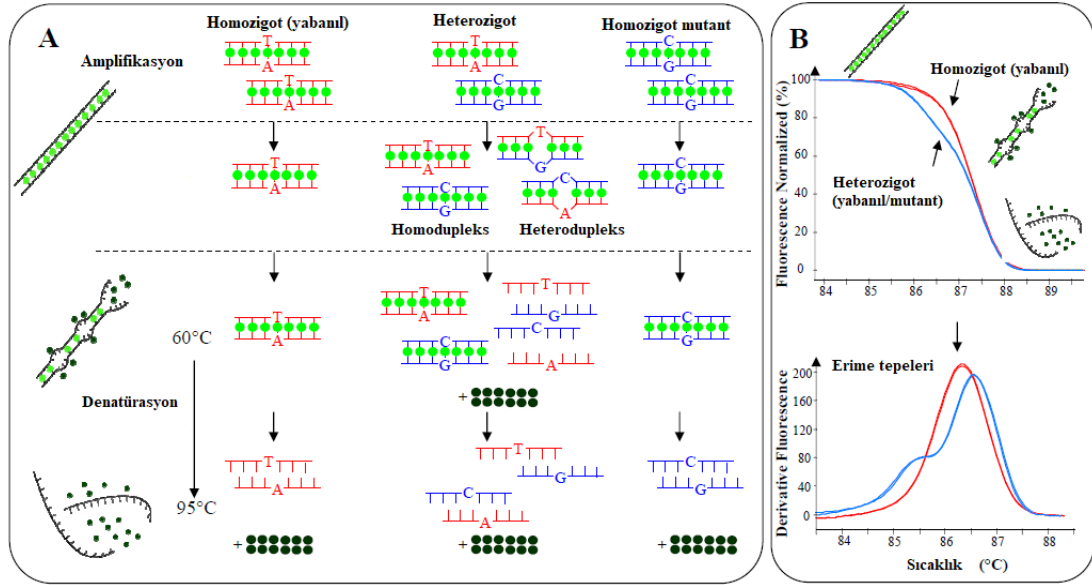
genlerinde meydana gelen altı farklı mutasyonun tanımlanabildiği (90) başarılı ARMS-PZT teknikleri bulunmaktadır.

### **2.5.3 HRM (*High Resolution Melting Analysis*-Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi)**

Çift zincirli yapıda bulunan DNA molekülü, yüksek sıcaklıkta zincirleri arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasıyla tek zincirli bir yapı halini alır. DNA moleküllerinin yarısının tek zincirli yapı halinde bulunduğu sıcaklık  $T_m$  olarak adlandırılan erime sıcaklığıdır.  $T_m$  sıcaklığı dizinin guanin (G) ve sitozin (C) içeriğine ve uzunluğuna bağlı olarak değişir. G ve C üç hidrojen bağıyla birbirine bağlandıkları için daha kararlı bir yapı oluşturur dolayısıyla bu yapıların sık tekrarlandığı dizilerin  $T_m$  sıcaklıkları, çoğunlukla adenin (A) ve timin (T) bazlarını içeren dizilerden yüksektir.

Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) analizi, çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıkla denatüre olup tek zincirli yapıya dönüşmesinin (*melting*) floresan boyalar aracılığıyla gerçek zamanlı (*real-time*) görüntülenmesine dayanan bir yöntemdir. HRM'da süreç PZT ile başlar, tasarlanan özgül primerler hedef bölgeyi çoğaltırken floresan boyalar zincirler arasına yapışır ve ışımaya verir (Şekil 2.7 A). Bu boyaların toksik olmaması ve PZT için bir engelleyici görevi görmemesi önemlidir. Bu amaçla genellikle piyasada bulunan SYTO, LC Green, EvaGreen, Chromofy gibi boyalar kullanılır (91). Son PZT döngüsünden sonra kademeli olarak sıcaklık artışı gerçekleşir ve çift zincirli ampikonlar tek zincirli yapıya dönüşürken floresanlı boyalar bu yapılardan çıkarak ortama yayılır ve ışımalarını kaybeder (Şekil 2.7 A). Bu süreçte gerçek zamanlı floreskopik ışımaya ölçümü yapılır. Çift zincirli ürünün yarısının tek zincirli forma dönüştüğü noktada bir  $T_m$  değeri alınır ve tek bazlık değişimler, küçük insersiyon ve delesyonlar farklı erime profilleri gösterdikleri için farklı  $T_m$  değerlerini gösteren erime eğrisi grafikleri verir (Şekil 2.7 B) (92).





**Şekil 2.7** Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi. A. HRM öncesi PZT basamakları. B. Erime eğrisi oluşturulması (93).

#### 2.5.4 Dizi Analizi

Hedeflenen gen bölgesinde meydana gelen mutasyonların belirlenmesi amacıyla kullanılan dizileme yöntemleri 1970'lerin sonunda iki farklı grup tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden ilki "Sanger Dizileme" yöntemidir. Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem, dizisi belirlenecek olan DNA parçasının yeni sentezlenecek DNA ipliğine kalıp olması ve belirli bir bazdan sonra bu sentezin durdurulması esasına dayanır (94). Dizileme tepkimesinde, polimeraz, DNA kalıbına hedefli bir primer, deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) karışımı ve 3' ucunda hidroksil grubu (-OH) eksik olan dideoksiribonükleozit trifosfat (ddNTP) karışımı bulunur. Tepkime yüksek sıcaklıklarda kalıp DNA'nın çift zincirli yapısını kaybedip tek zincirli bir yapı halini almasıyla başlar. Daha sonra sıcaklık düşürülür DNA parçasına özgül primerler tek zincirli kalıp DNA'ya bağlanır ve yeni gelen dNTP'nin 5' karbonu zincirin sonundaki 3' karbonu ile birleşerek yeni DNA zincirinin sentezlenmesini sağlar. Ancak sentezlenen DNA'ya 3' uçlarında hidroksil grubu eksik olan ddNTP'lerin katılması halinde sentez durur ve son bazı ddNTP'lerden birini içeren aynı kalıba ait farklı uzunlukta parçalar elde edilir.

Sanger dizilemenin ilk yıllarında dört farklı ddNTP için dört farklı karışım hazırlanmaktaydı (94). Ayrı ayrı tüplerde gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda elde edilen ürünler akrilamid jelde yan yana yürütülüp, en kısa parçadan en uzuna doğru okuma yapılarak dizinin baz içeriği belirlenmekteydi. Ancak otomatik dizileme cihazlarının gelişmesiyle aynı tepkime karışımı içerisine eklenen ve farklı dalga boyunda floresan ışımalar veren ddNTP karışımları kullanılmaya başlanmıştır. Bu cihazlarda floresan ddNTP ile işaretli farklı uzunluktaki parçalar elektroforez ile ayrıştır, her bir parçanın sonundaki dideksinükleotidin yaptığı farklı dalga boylarındaki ışımalar saptanır ve simüle jel görüntüsü oluşturularak en kısa parçalardan en uzunlara doğru okumalar yapılır. Otomatik dizileme cihazları DNA dizisinin içeriğini her bir bazı farklı renklerin temsil ettiği elektroferogram grafikleri oluşturarak verir.

İkinci dizileme yöntemi ise Maxam ve Gilbert'in geliştirdikleri DNA'nın kimyasal olarak belirli bazlardan sonra kırılmasını esas alan yöntemdir (95). Sanger dizilemede olduğu gibi bu yöntemde de çift zincirli yapıdaki DNA tek zincirli hale getirilir, zincir 5' ucundan radyoaktif fosfat ile işaretlenir, dört ayrı tüpte dört farklı kimyasal işleme uğratarak belirli nükleotidlerin kırılması sağlanır (96). Kırılmış bu nükleotidlerin farklı pozisyonda yer almasından dolayı farklı uzunluklarda moleküller elde edilir ve elektroforezde yürütülür. Elektroforez sonucunda otoradyografi uygulanarak jelde en önde yürüyen kısa parçadan en arkada kalan uzun parçaya doğru okumalar yapılır ve baz dizisi belirlenir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Gereçler

Bu tez çalışması kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı'ndan, Hacettepe Çocuk Hastanesi bölümlerinden ve dış merkezlerden, 1995'ten bu yana bölümümüzün tanı laboratuvarına yönlendirilen, "Mitokondriyal Sitopati" öntanısı almış 219 hastanın kan ve kas doku örnekleri taranmıştır. Tez kapsamında yapılacak tüm çalışmalar için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır (Tarih: 13.06.2017, Karar no: GO 17/519 - 08). (Bkz. Ek-4)

##### 3.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve PZR-Temelli Mutagenез

- GoTaq® DNA Polymeraz ve 5X GoTaq DNA Tamponu (Promega, # 9PIM300)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> solüsyonu (Promega, A3511)
- dNTP seti (Promega, U1330)
- IDT firmasında sentezletilen primerler
- PZT cihazı (GeneAmp PCR Systems 9700)

##### 3.1.2 Real-Time ARMS-PZT ve HRM Analizi

- SYTO™ 9 Yeşil Floresanlı Nükleik Asit Boyası (Invitrogen™, Thermo Fisher S34854)
- Real-Time PZT Cihazı (Corbett-RotorGene 6000)

##### 3.1.3 Klonlama ve Bakteri Kültürü

- pGEM-T Easy Vektörü (Promega, A1360)
- T4 DNA Ligase (Promega, M1801)
- T4 Ligasyon Tamponu (Promega, C126A)
- EcoRI (Promega, R601A)
- 10X H Tampon (Promega, R008A)
- Kompetan JM109 bakteri suşu (Promega, P9751)
- Agar, bakteriyoloji kullanımı saflığında (AppliChem, A0949)
- Sıvı Luria-Bertani (LB) Besiyeri (pH: 7,0)

- Maya özütü (AppliChem, A1552) (5 gr),
- NaCl (5 gr)
- Tripton (SRL, 32007) (10 gr)

Karışım, pH'ı NaOH ile 7'ye ayarlanıp distile suyla 1 lt'ye tamamlanarak otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır

- Katı LB besiyeri (%1,5 agar içeren sıvı LB besiyeri)
- X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indoil  $\beta$ -D-galaktozoid) stok çözeltisi (dimetilsülfoksit içinde %5'lik çözelti)
- IPTG (İzopropil- $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozoid) stok çözeltisi (su içinde 0,1 M)

### 3.1.4 Plazmid İzolasyonu

- The QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, 27104)

### 3.1.5 DNA Dizi Analizi

- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 4336917)
- %70 ve %95 oranlarında hazırlanmış soğuk etanol
- 3 M Sodyum asetat çözeltisi
- Formamid
- DNA dizi analizi cihazı (ABI 3130)

### 3.1.6 DNA İzolasyonu

- Taze ıspanak
- Proteinaz K (Sigma, P2308)
- STE Tamponu
  - 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA içermektedir.
- SDS (Sigma, L3771)
- $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma, 516732)
- Phenol
- Kloroform (Carlo Erba)
- Isoamyl alkol (Carlo Erba)
- Isopropanol (MERCK)
- Etanol (Sigma)

### 3.1.7 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz Biomax (Prona, HS-8000)
- Yürütme tamponu - TAE Tamponu (Tris-Asetat-EDTA) pH: 8.0
  - Glasiyal asetik asit (Merck) (1,14 mL)
  - Na<sub>2</sub>EDTA (Merck) (0,5 M)
  - Trisbaz (Merck) (2 M)

Hazırlanan karışım 50X yoğunluğunda olup 50 kat seyreltilerek kullanılır.

- Yükleme tamponu – Orange G
  - Gliserol (Merck) 5,5 mL
  - 1X TAE Tamponu 4,5 mL
  - Orange G boyası (Merck) 0,01 gr
- Etidyum Bromür (Sigma) (10 mg/ml)
- Moleküler ağırlık belirleyicisi 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience, M-214S)
- Agaroz jel görüntüleme sistemi (Biometra)

### 3.1.8 Agaroz Jelden DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

- *Wizard SV Gel and Clean-Up System* Kiti (Promega, A9282)
- UV illuminator
- Spektrofotometre (The NanoDrop 1000)

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 ARMS Primer Tasarımı

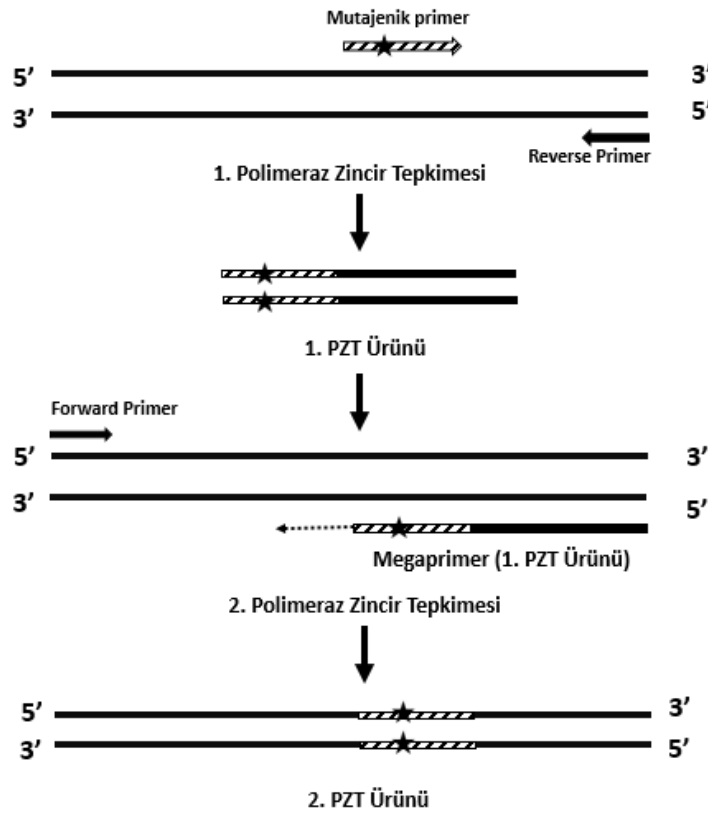
- ARMS-PCR primerleri, insan mitokondriyal genomu (NC\_012920.1) referans alınarak tasarlanmıştır. Bu dizinin 75 bazlık *MT-TL1* gen bölgesi ortada kalacak şekilde, öncesinde bulunan 229 bazlık bir alan ve gen dizisinin hemen ardından gelen 296 bazlık alanı da kapsayan toplam 600 bazlık bir bölge hedeflenilmiştir (Ek-2).
- Primerler web temelli “PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR” (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) aracı kullanılarak tasarlanmıştır (**Tablo 3.1**) (97).

**Tablo 3.1.** ARMS-PCR Primerleri.

Primer Adı	Primer Dizisi	T <sub>m</sub> °C
Ortak Dış Forward 1	5'-CTCAACTTAGTATTATACCCACACCCAC-3'	61,4
Ortak Dış Forward 2	5'-CGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTC-3'	61,4
Ortak Dış Reverse 1	5'-TTTAGGGGCTCTTTGGTGAAGAGTTTTTA-3'	60,6
Ortak Dış Reverse 2	5'-GTAAGCATTAGGAATGCCATTGCGATTA-3'	61,9
m.3243 A>G Forward	5'-AGAACAGGGTTTGTAAAGATGGCCGA-3'	63,9
m.3243 A>G Reverse	5'-AAGTTTTAAGTTTTATGCGATTACCGGTCC-3'	60,5
m.3256 C>T Forward	5'-TTAAGATGGCAGAGCCCGTAATAGT-3'	63,9
m.3256 C>T Reverse	5'-ACCTCTGACTGTAAAGTTTTAAGTTTTCTG-3'	58,2
m.3271 T>C Forward	5'-CCCGGTAATCGCATAAACTTAAACCT-3'	60,4
m.3271 T>C Reverse	5'-GAAGAGGAATTGAACCTCTGACTGTCAG-3'	63
m.3291 T>C Forward	5'-ACTTAAAACTTTACAGTCAGAGGTTCACTC-3'	60,2
m.3291 T>C Reverse	5'-CCATGGGTATGTTGTTAAGAAGATGA-3'	59
m.3260 A>G Forward	5'-TAAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCAGAA-3'	69,6
m.3260 A>G Reverse	5'-TTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTTAAGGTC-3'	59,9
m.3303 C>T Forward	5'-CAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTCAC-3'	62,9
m.3303 C>T Reverse	5'-AGTAGGAGGTTGGCCATGGGTATGGTA-3'	67,9
m.3260 A>G Forward B	5'-GCAGAGCCCGGTAATCGCAGAA-3'	61,8
m.3260 A>G Reverse B	5'-TAAGTTTTATGCGATTACCGGTCC-3'	55,1
m.3271 T>C Forward B	5'-AGCCCGGTAATCGCATAAACTTAAACCT-3'	60,2
m.3271 T>C Reverse B	5'-GAAGAGGAATTGAACCTCTGACTGTCAG-3'	58,6

### 3.2.2 PZT Temelli Mutageniz

ARMS-PZT taramalarında kullanılacak pozitif kontroller için megaprimer mutageniz yaklaşımı benimsenmiştir. İlk defa 1989 yılında Kammann ve arkadaşlarının geliştirdiği bu hedefli mutageniz yaklaşımı iki PCR aşamasından oluşur. İlk aşamada hedeflenen bölge, mutasyona özgü tasarlanan bir mutajenik primer ve komşu bir reverse primer ile amplifiye edilerek mutasyon taşıyan kısa bir ampikon elde edilir. İkinci aşamada ise mutasyon taşıyan bu ampikon, primer (megaprimer) olarak uzak bir forward primeriyle kullanılır, sonuç olarak istenilen mutasyonu taşıyan ampikon elde edilir (Şekil 3.1) (98-100).



Şekil 3.1. Megaprimer methoduyla mutagenез yaklaşımı.

Bu çalışmada da 6 farklı *MT-TLI* nokta mutasyonu için 6 farklı mutajenik primer tasarlanarak megaprimer methoduyla mutagenез gerçekleştirilmiştir.

### a) Mutajenik Primerlerin Tasarımı

*MT-TLI* geninde hedeflenen 6 nokta mutasyonu için 6 farklı mutajenik primer Tm dereceleri outer primerlere yakın olacak şekilde Tablo 3.2'deki gibi tasarlanmıştır.

Tablo 3.2 Mutasyona özgü mutajenik primerler.

Mutasyon	Primer Dizisi
m. 3243A>G	5'-ggcag <b>G</b> gccccgtaatcgcata-3'
m. 3256C>T	5'-cg <b>T</b> ataaaaacttaaaactttac-3'
m. 3260A>G	5'-a <b>G</b> aacttaaaactttacagtca-3'
m. 3271T>C	5'-aaaac <b>C</b> ttacagtcagaggttc-3'
m. 3291T>C	5'-caat <b>C</b> cctcttcttaacaacat-3'
m. 3303C>T	5'-aa <b>T</b> aacatacccatggccaacc-3'

### b) Mega-primer üretimi

- Şekil 3.1’de 1.PZT basamağı olarak belirtilen mega-primer üretimi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

PZT Malzemeleri	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">           94 °C - 2 dk            94 °C - 15 sn            50 °C - 15 sn            72 °C - 20 sn            72 °C - 2 dk         </div>
dNTP	0,5 mM	
Mutajenik primer	0,4 µM	
Reverse 1 primeri	0,4 µM	
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz	0,5 u	
Toplam Hacim	20 µl	

- Yukarıdaki şartlarda gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda PZT ürünlerinin, yani mega-primerlerin agaroz jel elektroforez yöntemiyle kontrolü yapılmıştır.
- Ürünlerin tamamı %0.8’lik agaroz jele yüklenerek *Wizard SV Gel and Clean-Up System* kitiyle agaroz jelden pürifiye edilmiş, NanoDrop 1000 kullanılarak, saflık ve miktar tayini yapılmıştır.

### c) Mega-primerlerle PCR

- Mega-primerler için yaklaşık 3000 baz çifti uzunluğunda bir kalıp DNA kullanılmıştır. Bu kalıp mtSeq02F ve mtSeq03R primerleriyle sağlıklı bir bireye (mitokondriyal herhangi bir rahatsızlığı olmayan) ait olan genomik DNA’nın çoğaltılması sonucunda elde edilmiştir.

**Tablo 3.3.** Kalıp DNA için kullanılan primer çiftleri.

<b>mtSeq02F</b>	ACCTTAGCCAAACCATTTACCC	1713-1734 bç
<b>mtSeq03R</b>	TGATGAGTGTGCCTGCAAAGAT	4527-4506 bç



- 3.2.2.2’de saflaştırılarak elde edilen mega-primerler’in konsantrasyonları temel alınarak molarite hesaplamaları yapılmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda aşağıdaki şartlarda ikinci PZT kurulmuştur:

PZT Malzemeleri	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">           94 °C - 2 dk            94 °C - 10 sn            60 °C - 10 sn            72 °C - 15 sn            72 °C - 2 dk         </div>
dNTP	0,5 mM	
Mutajenik primer	0,2 µM	
Forward 2 primeri	0,2 µM	
DNA	200 pg	
GoTaq Polimeraz	0,5 u	
Toplam Hacim	50 µl	

- *Wizard SV Gel and Clean-Up System* kiti kullanılarak ikinci PZT ürünleri yani mutasyon taşıyan ampikon ürünleri saflaştırılmış ve miktar-saflık tayini için *The NanoDrop* spektrofotometrik ölçüm cihazı kullanılmıştır.
- Mutagenizin başarısından emin olmak ve mutasyonların doğrulamasını yapmak için Sanger dizilemeye gidilmiştir. Sanger dizileme için PZT şartları aşağıdaki gibidir:

#### Dizileme Tepkimesi Malzemeleri

Big Dye Sequencing Mix	2,5X	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">           94 °C - 5 dk            94 °C - 15 sn            50 °C - 15 sn            60 °C - 4 dk            60 °C - 1 dk         </div>
BigDye Buffer	5X	
Forward 2 Primeri	0,16 µM	
Mutant ampikon	30 ng	
Toplam Hacim	20 µl	

- Dizileme tepkimesi sonrası sekans pürifikasyonu aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir:

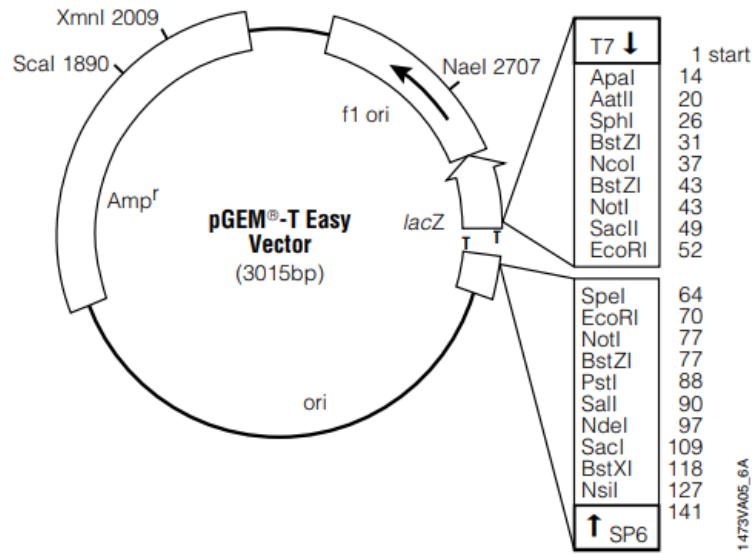
1. PZT ürünlerinin üzerine 1/10 oranında NaOAc (2 µl) eklenmiş, hafif vortexlenen ürünler yeni eppendorfa alınıp üzerine 2,5 volume denk gelecek şekilde soğuk %95'lik etanol eklenmiştir (60 µl).
2. Örneklerin -80 °C'de 45 dakika bekletilerek presipitasyonu sağlanmıştır.
3. 18,000 x g'de 30 dakika santrifüj edilen örneklerin çökmesi sağlanarak üzerlerindeki etanol uzaklaştırılmıştır.
4. %70'lik etanolla bir yıkama adımı daha gerçekleştirilmiş ve örnekler 18,000 x g'de 30 dakika daha santrifüje edilmiştir.
5. Son santrifüjden sonra örneklerin üzerindeki tüm etanolün uçması için örnekler 37 °C'lik fırında 10-15 dakika bekletilmiştir.
6. Etanolün tamamen uzaklaştığından emin olduktan sonra örneklerin üzerine 20 µl formamid eklenmiş, çözüldüklerinden emin olduktan sonra da sekans platelerine yüklenmişlerdir.

#### **d) pGEM-T Easy Vektöre PCR ürünlerinin Takılması**

- Sanger dizilemeyle mutasyonları doğrulanan mutant amplikonlar, aşağıdaki ligasyon reaksiyonuyla pGEM-T Easy vektöre (Şekil 3.2) takılarak sonraki çalışmalar için stoklanmıştır.

T4 Ligasyon Tamponu	2X
pGEM-T Easy Vektör	50 ng
PZT Ürünleri (mutant amplikonlar)	15 ng
T4 Ligaz	3u
Toplam Hacim	10 µl

Oda sıcaklığında 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2 pGEM-T Easy vektörünün haritası.

#### e) Transformasyon

1. 1,5 µl ligasyon ürünü, 50 µl'lik JM109 kompetan hücrelerinin üzerine yavaşça bırakılarak 30 dakika buz üstünde bekletilmiştir.
2. Ligasyon ürünleriyle aynı tüplerin içerisinde bulunan bakteriler 42 °C'lik sıcak su banyosunda 2 dakika kadar bekletilip tekrar buz üstüne alınarak *heat-shock*'a uğratılmıştır.
3. Bakteriler 8 dakika kadar buz üstünde bekletildikten sonra 900 µl LB medium içerisine alınarak 37 °C'de 1 saat, 250 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır.
4. 1 saatin sonunda bakteriler 6,500 x g'de santifüjenip çöktürülmüştür.
5. 100 mM IPTG ve 50 mg X-Gal içeren planelere boncuklar yardımıyla yayılan bakteriler ertesi sabah Mavi-Beyaz koloni seleksiyonu yapılmak üzere 37 °C'lik inkübatörde tüm gece bekletilmiştir.

Mavi-beyaz koloni seçiminde PZT ürünlerini içine alan bakterilerin beyaz koloniler şeklinde gözükürken, boş vektörlere sahip bakterilerin mavi koloniler şeklinde görüneceği bilgisinden yola çıkarak beyaz kolonilerin mutant ürünler taşıdığı söylenebilir.

6. Ertesi sabah platelerden beyaz kolonilerin seçilmiş, bu koloniler 2 µl carbenisilin içeren 900 µl LB besiyerlere ekilip 37 C’de 250 rpm’de 6-7 saatlik bir inkübasyona bırakılmıştır.

#### f) Transformasyon Ürünlerinin Saflaştırılması ve Kalite kontrolü

İnkübasyon sonunda QIAprep Spin Miniprep Kiti kullanılarak plazmidler izole edilmiştir. İzole edilen plazmidlerin EcoRI enzim kesimi ile kontrolü yapılmıştır. EcoRI Şekil 3.2’de görüldüğü gibi, iki farklı kesim bölgesi olan ve vektörle içerisine aldığı PZT ürününü rahatlıkla ayıran birbirinden ayıran bir enzimdir. Enzim kesim tepkimesi aşağıdaki gibi hazırlanmış ve kesim sonrasında ürünler %2’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

#### EcoRI Enzim Kesim Tepkimesi

10X Enzim Kesim Tamponu	2 µl
EcoRI Enzimi	0,5 µl
Vektör	150 ng
dH <sub>2</sub> O	20 µl’ye tamamlanmıştır.

Tüm gece 37 °C’de bekletilmiştir.

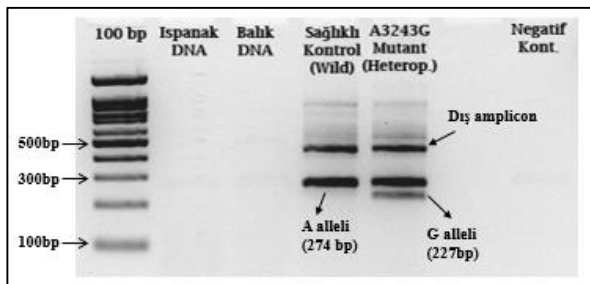
### 3.2.3 Farklı Heteroplazmi Oranlar İçeren Pozitif Kontrollerin Hazırlanması

Mitokondri genetiğinin kendine özgü doğasını laboratuvar şartlarında taklit edebilmek için PZT temelli mutagenезle oluşturulan sentetik mutantlardan %0-%100’ kadar farklı heteroplazmi seviyeleri içeren 5 farklı içerik hazırlanmıştır. Bunun için insan *MT-TL1* genine özgü tasarlanan primerler tarafından çoğaltılmayan bir “arkaplan” DNA’sına ihtiyaç duyulmuştur. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, ıspanak mitokondriyal genomunun tRNA-leu geninin (GenBank: KY768855.1) (101) insanınken farklılık gösterdiği NCBI Nucleotid BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

### a) Ispanaktan DNA izolasyonu

1. Taze ıspanak yaprakları kıvamlı bir sıvı hale gelene kadar STE tamponu ve %10'luk SDS ile havanda ezilip eppendorf tüplere aktarılmıştır.
2. Ezilmiş ıspanaklar 20 µl Proteinaz K, 200 µL β-merkaptoetanol eklenerek tüm gece 56 °C'de kalacak şekilde karıştırıcıya yerleştirilmiştir.
3. Ispanaklara ertesi sabah, 400 µl olacak şekilde 25:24:1 oranında Fenol- kloroform-izoamyl alkol karışımı eklenmiş ve örnekler 13,000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.
4. Santrifüj sonunda debristen kurtulmak için üst faz yeni bir eppendorfa alınarak aynı işlem tekrarlanmıştır.
5. Üst faz tekrar yeni bir eppendorfa alınarak üzerine 300 µl kloroform:isoamyl alkol (24:1) eklenerek 5 dakika 13,000 rpm'de santrifüjlendi. Bu işlem bir kere daha tekrarlanmıştır.
6. Son santrifüjden sonra üst faz yine temiz bir eppendorfa aktarılarak toplam hacmin 1/10'u kadar NaOAc eklendi ve yine total hacim kadar izopropanol eklenerek örnekler -20 C'ye bırakılmıştır.
7. Örnekler 13,000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi ve izopropanol uzaklaştırılmıştır.
8. Tüpün dibinde çökmüş olarak bulunan pellet etanolle yıkama aşamalarından sonra 30 µl suda çözülerek saflık ve miktar tayini yapılmıştır.

Ispanak DNA'sı elde edildikten sonra *in silico* analizleri doğrulamak adına m.3243 A>G mutasyonuna özgü iç primerler ve ortak dış primerlerle bir PZT daha hazırlanmıştır. Tepkime sonunda tasarlanan primerlerin ıspanağa özgül olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.3).

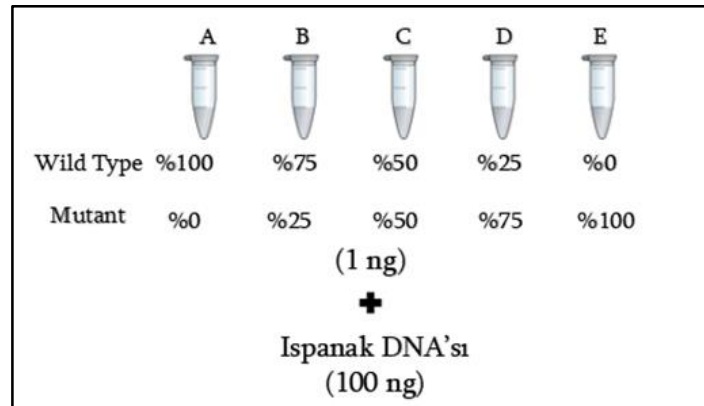


**Şekil 3.3** Ispanak mtDNA'sı ve insan mtDNA'sıyla yapılan m.3243 A>G mutasyonu analizi.

### b) Hesaplamalar

Diploid bir insan hücresinin 6,5 pg DNA içeriğine sahip olduğu bilinmektedir (102). Miller ve arkadaşlarının çeşitli yaş grupları kullanarak yaptığı iskelet ve kalp kasında mtDNA kopya sayısını belirleme çalışmaları temel alınarak, bir iskelet kası hücresinde ortalama 3000 mtDNA kopyası olduğu varsayılmıştır (37). 6,5 pg toplam DNA içeriğinde 3000 kopya mtDNA vardır, dolayısıyla bir PZT'ine koyulan ortalama 200 ng'lık hasta örneğinde mtDNA kopya sayısının  $10^8$  civarında olması beklenmektedir. 1 ng T-Easy vektör  $5,64 \times 10^8$  kopya içermektedir. Dolayısıyla mutant mtDNA fragmanı içeren T-Easy vektörün 1 ng'ı  $5,64 \times 10^8$  mutant mtDNA kopyası içermektedir. PZT'sine her bir sentetik kontrolden 1 ng konulması halinde reaksiyon içinde insan örneklerinin 200 ng DNA'sına karşılık gelecek mtDNA kopya sayısı sağlanmış olur.

Sonuç olarak pozitif kontrollerimizin her biri 1 ng vektör ve arka planda 100 ng ıspanak DNA'sı içerecek şekilde hazırlanmıştır (**Şekil 3.4**).



**Şekil 3.4** Farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik pozitif kontrol karışım kalıplarının hazırlanması.

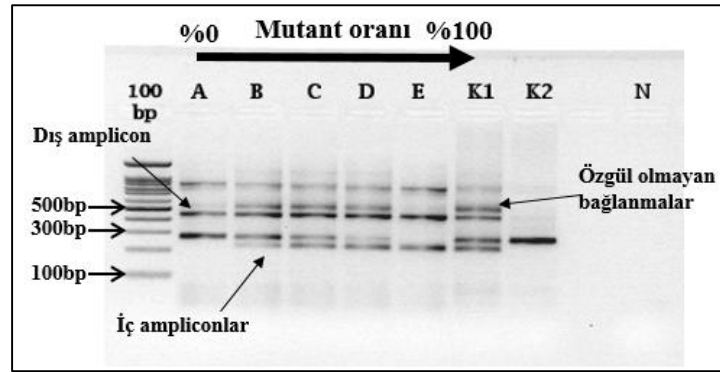
### 3.4 Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi Koşulları

ARMS-PZT ürünlerinin analizi için kullanılan yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi, Corbett-RotorGene 6000 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ARMS-PZT'sinin son döngüsünden sonra ürünlerin bulunduğu sıcaklık  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 'den  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye her 2 saniyede  $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  artacak şekilde çıkartılmış ve analiz gerçekleştirilmiştir.

### 3.5 MT-TL1 Geni Mutasyon Taramaları için ARMS-PCR Koşulları

#### 3.5.1 m.3243A>G Mutasyonu Optimizasyonu

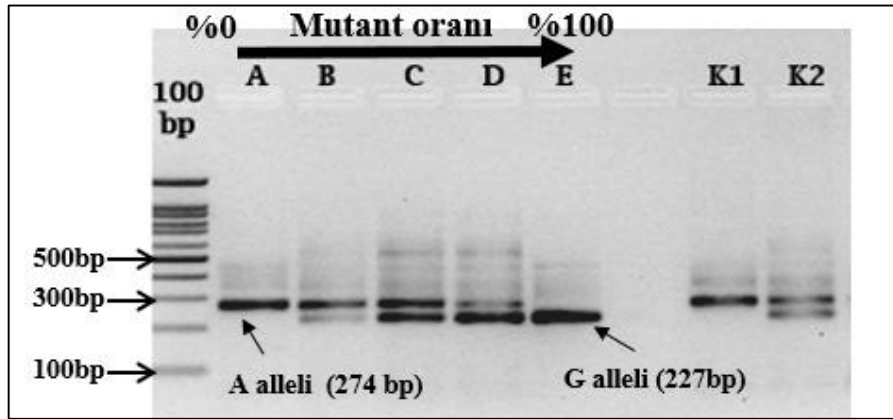
m.3243 A>G mutasyonu primerleriyle yapılan optimizasyon çalışmalarında farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik kontroller, heteroplazmik m.3243 A>G mutasyonu taşıyan MELAS hastası ve bu mutasyona sahip olmayan bir kontrol örneği kullanılmıştır. Klasik PZT cihazlarında gerçekleştirilen döngülerde 72 °C'deki uzama süresinin özgül olmayan primer bağlanmalarına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 3.5). Bu nedenle Corbett-RotorGene 6000 ile yapılan gerçek zamanlı PZT'si iki basamaklı planlanmış, uzama süresi 5 sn ile sınırlandırılmıştır (Tablo 3.4). Tepkime sonuçlarının agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.5** ARMS-PZT m.3243 A>G mutasyonu optimizasyonu öncesi agaroz jel görüntüsü (%2'lik jel).

**Tablo 3.4** ARMS-PZT m.3243 A>G mutasyonu şartları.

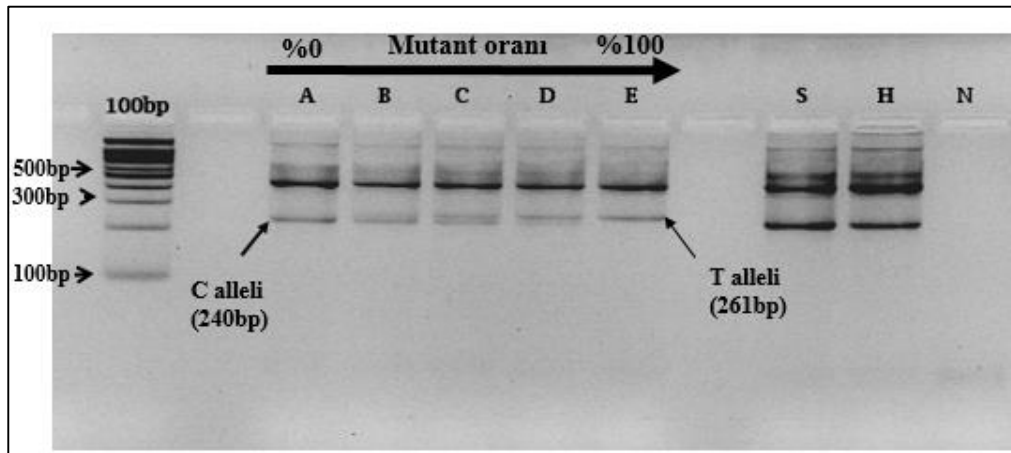
Malzemeler	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	<b>Klasik PZT x30 döngü</b>
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	
dNTP mix	0,5 mM	
Dış Forward 2 Primeri	0,4 µM	
Dış Reverse 1 Primeri	0,4 µM	
İç Forward Primeri	0,4 µM	
İç Reverse Primeri	0,4 µM	
SYTO9	1,5µM	<b>Real-time x40 döngü</b>
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz (5u/µL)	0,5u	
Toplam Hacim	20 µL	



Şekil 3.6 ARMS-PZT m.3243 A>G mutasyonu agaroz jel görüntüsü (%2'lik jel).

### 3.5.2 m.3256C>T Mutasyonu Optimizasyonu

m.3256 C>T mutasyonu taramaları için yapılan optimizasyon çalışmalarında tıpkı m.3243 A>G mutasyonunda olduğu gibi döngünün uzama süresinin kısaltılması prensibi izlenmiştir. Ancak primerler hedef diziyeye özgül olmayan bağlanmalar yaparak özgül olmayan ampliconlar vermeye devam etmiştir. Optimize edilmiş tepkime sonucunda oluşan ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.7'de, optimize edilmiş tepkime koşulları Tablo 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.7 ARMS-PZT m.3256 C>T mutasyonu agaroz jel görüntüsü (%2,8'lik jel).



**Tablo 3.5** ARMS-PZT m.3256 C>T mutasyonu şartları.

Malzemeler	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	<b>Klasik PZT x30 döngü</b> 94 °C – 2 dk 94 °C – 15 sn 60 °C – 15 sn 72 °C – 20 sn 72 °C – 2 dk
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	
dNTP mix	0,5 mM	
Dış Forward 2 Primeri	0,4 µM	
Dış Reverse 1 Primeri	0,4 µM	
İç Forward Primeri	0,4 µM	
İç Reverse Primeri	0,4 µM	
SYTO9	1,5µM	
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz (5u/µL)	0,5u	
Toplam Hacim	20 µL	<b>Real-time x40 döngü</b> 94 °C – 1 sn 60 °C – 5 sn

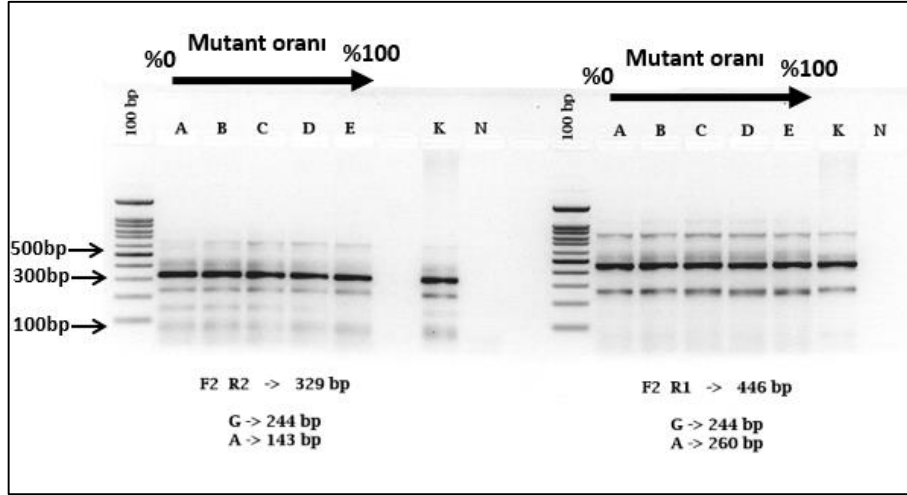
### 3.5.3 m.3260A>G Mutasyon Optimizasyonu

m.3260 A>G mutasyonu taramaları için tasarlanan ilk forward primer (A alleli için) ve reverse primer (G alleli için) çiftinin  $T_m$ 'leri sırasıyla 59,9 °C ve 69,5 °C'dir. Bu primer çifti ile yapılan optimizasyon çalışmalarında aşağıdaki tepkime koşullar denenmiştir:

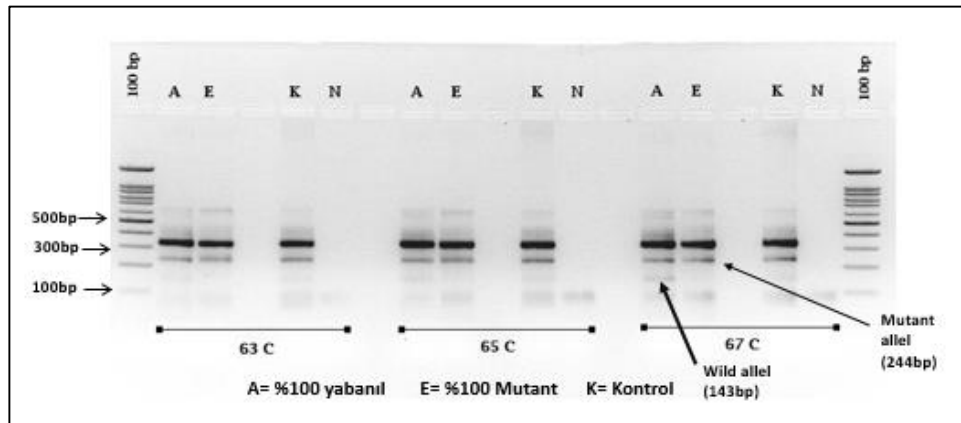
a) Bağlanma sıcaklığının 60 °C olduğu 30 döngülük; iç ve dış primerlerin eşit konsantrasyonda (0,4 µM) olduğu tepkimeler gerçekleştirilmiştir.

b) Bağlanma sıcaklığının 60 °C olduğu 30 döngülük; dış primer çiftlerinin farklı kombinasyonlarıyla gerçekleştirilen tepkimeler (Ortak dış forward 2 ve ortak dış reverse 1 çifti; ortak dış forward 2 ve ortak dış reverse 2 çiftiyle) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8).

c) Bağlanma sıcaklığının 63-65-67 °C olduğu 35 döngülük, iç primer konsantrasyonunun (0,8 µM) dış primer konsantrasyonunun (0,4 µM) iki kat daha fazla olduğu tepkimeler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9)



**Şekil 3.8** ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonunun farklı dış primerlerin kombinasyonlarıyla yapılan optimizasyon çalışmaları (%2,5'lik jel).



**Şekil 3.9** ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonunun üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen optimizasyon tepkimesi (%2,5'lik jel).

Tasarlanan ilk primerlerin  $T_m$  sıcaklıklarının birbirinden oldukça farklı olması nedeniyle yukarıdaki koşullarda optimizasyonu sağlanamayan tepkime için yeni bir primer çifti tasarlanmıştır. Tasarımda  $T_m$  sıcaklıklarının dengelenmesi esas alınmıştır. A alleli için  $T_m$ 'i 61,8 °C olan FinAb (5'-GCAGAGCCCGGTAATCGCAGAA-3') ve G alleli için  $T_m$ 'i 55,1 °C olan RinGb (5'-TAAGTTTTATGCGATTACCGGTCC-3) primerleri tasarlanmıştır. Tasarlanan yeni primerlerle tepkime optimizasyon çalışmalarına aşağıdaki koşullarla devam edilmiştir:

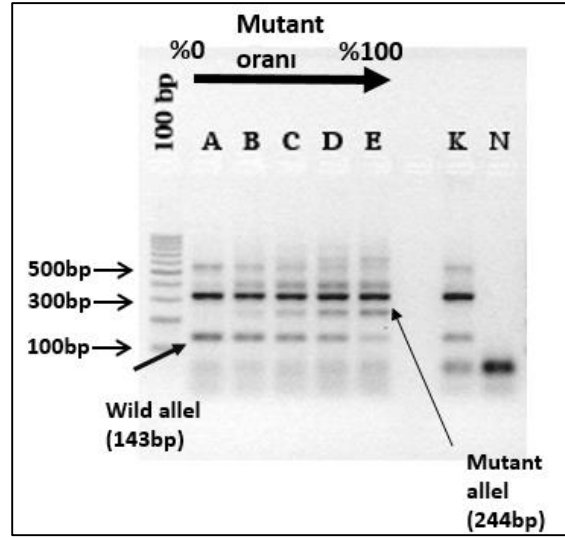
1) Bağlanma sıcaklığı 56 °C olduğu 30 döngülük; yeni tasarlanan iç primerler konsantrasyonunun (0,8 µM) dış primer konsantrasyonunun (0,4 µM) iki kat daha fazla olduğu tepkimeler gerçekleştirilmiştir.

2) Bağlanma sıcaklığının 57 °C olduğu 35 döngülük; yeni tasarlanan iç primerlerle eski iç primerlerin farklı kombinasyonlarıyla tepkimeler hazırlanmıştır.

Sonuç olarak yeni tasarlanan FinAb ( $T_m$ : 61,8 °C) ve eski iç reverse primer ( $T_m$ : 59,9°C) çifti ile ortak dış forward 2 ve ortak dış reverse 2 primer çifti kullanılarak, 57 °C’de 5 saniyelik bağlanma basamağının olduğu iki adımlık real-time PZT ile optimizasyon sağlanmıştır (Tablo 3.6). Şekil 3.10’da bu tepkime sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezde ayrışma düzeni bulunmaktadır.

**Tablo 3.6** ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu şartları.

Malzemeler	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	<b>Klasik PZT x30 döngü</b> 94 °C – 2 dk 94 °C – 10 sn 57 °C – 10 sn 72 °C – 15 sn 72 °C – 2 dk
MgCl2	3,5 mM	
dNTP mix	0,5 mM	
Dış Forward 2 Primeri	0,4 µM	
Dış Reverse 2 Primeri	0,4 µM	
İç Forward Primeri	0,8 µM	
İç Reverse Primeri	0,8 µM	<b>Real-time x35 döngü</b> 94 °C – 1 sn 57 °C – 5 sn
SYTO9	1,5 µM	
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz (5u/µL)	0,5u	
Toplam Hacim	20 µL	



Şekil 3.10 ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu agaroz jel görüntüsü (%2,5'lik jel).

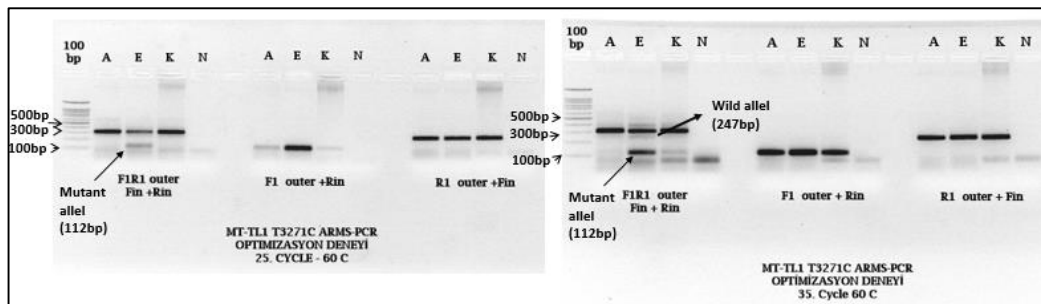
### 3.5.4 m.3271T>C Mutasyon Optimizasyonu

m.3271 T>C mutasyonu tarama tepkimeleri için yapılan optimizasyon çalışmalarında aşağıdaki koşullar denenmiştir:

a) Bağlanma sıcaklığı 55-69 °C arasında değişen 40 döngülük; dört ortak dış primerin, iki iç primerle farklı kombinasyonlarıyla tepkimeler hazırlanmıştır.

b) Bağlanma sıcaklığı 60 °C olan 40 döngülük; ortak forward 1 ve ortak reverse 1 primerlerinin kullanıldığı, iç primerlerin dış primerlerden iki kat ve beş kat daha fazla konsantrasyonda olduğu tepkimelerle hazırlanmıştır.

c) İç primerlerin arasında bir rekabet olup olmadığını belirleyebilmek için bağlanma sıcaklığının 60 °C olduğu bir tepkime tasarlanmış ve aynı tepkimenin 25. döngüsü ile 35. döngüsünden alınan örnekler agaroz jel elektroforez ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.11)



Şekil 3.11 m.3271 T>C mutasyonu için tasarlanan primerler arası rekabetin kontrolü.

Optimizasyonu oturmayan bu protokol için yeni iç primer tasarımına gidilmiştir. T alleli için  $T_m$ 'i 60,2 °C olan FinTb (5'-AGCCCGGTAATCGCATAAACTTAAACCT-3') ve C alleli için  $T_m$ 'i 58.6 °C olan RinCb (5'-GAAGAGGAATTGAACCTCTGACTGTCAG-3') primerleri tasarlanmıştır. Bu yeni primer için de aşağıdaki koşullar denenmiştir:

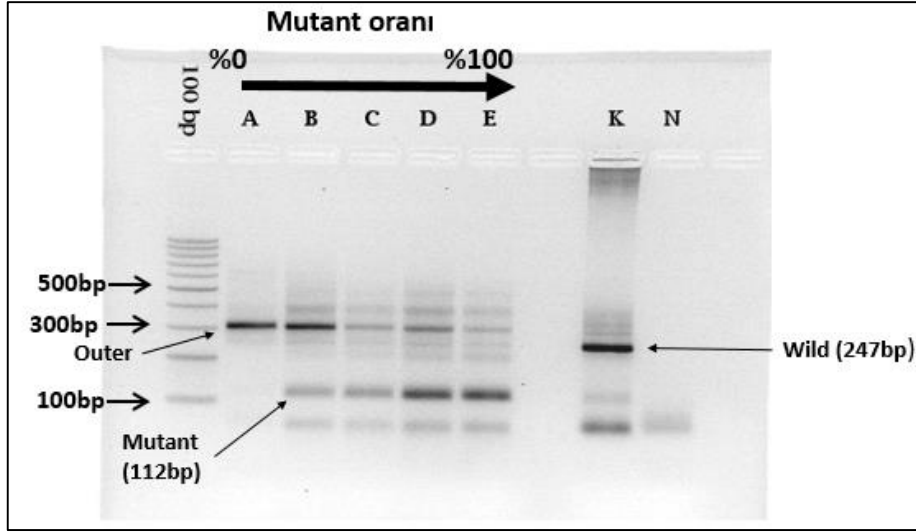
1)Bağlanma sıcaklığı 60 °C olan 35 döngülük; ortak dış primerlerle aynı konstarasyonda (0,4 µM) yeni iç primerlerin olduğu tepkimeler hazırlanmıştır.

2)Bağlanma sıcaklığı 60 °C olan 35 döngülük; ortak dış primerlerin konsantrasyonunun (0,4 µM), yeni iç primerlerin konsantrasyonundan (0,8 µM) daha düşük olduğu tepkimeler hazırlanmıştır.

Sonuç olarak tepkime optimizasyonu Tablo 3.7'de belirtilen şartlarla optimize edilerek agaroz jel elektroforezde kontrol edilmiştir (Şekil 3.12).

**Tablo 3.7** ARMS-PZT m.3271 T>C mutasyonu şartları.

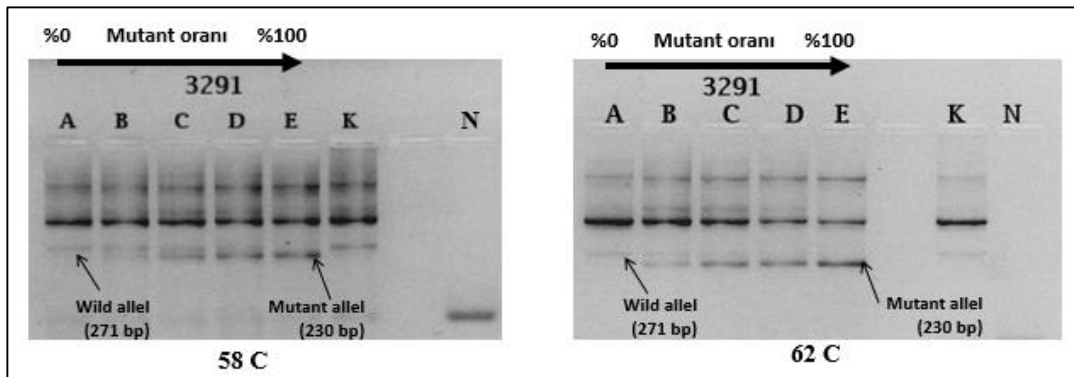
Malzemeler	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	<b>Klasik PZT x30 döngü</b> 94 °C – 2 dk 94 °C – 10 sn 60 °C – 10 sn 72 °C – 15 sn 72 °C – 2 dk
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	
dNTP mix	0,5 mM	
Dış Forward 1 Primeri	0,4 µM	
Dış Reverse 1 Primeri	0,4 µM	
İç Forward Primeri	0,8 µM	
İç Reverse Primeri	0,8 µM	
SYTO9	1,5 µM	
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz	0,5u	
dH <sub>2</sub> O	20 µL	<b>Real-time x35 döngü</b> 94 °C – 1 sn 60 °C – 5 sn



Şekil 3.12 ARMS-PZT m.3271 T>C mutasyonu agaroz jel görüntüsü (%2,5'lik jel).

### 3.5.5 m.3291 T>C Mutasyon Optimizasyonu

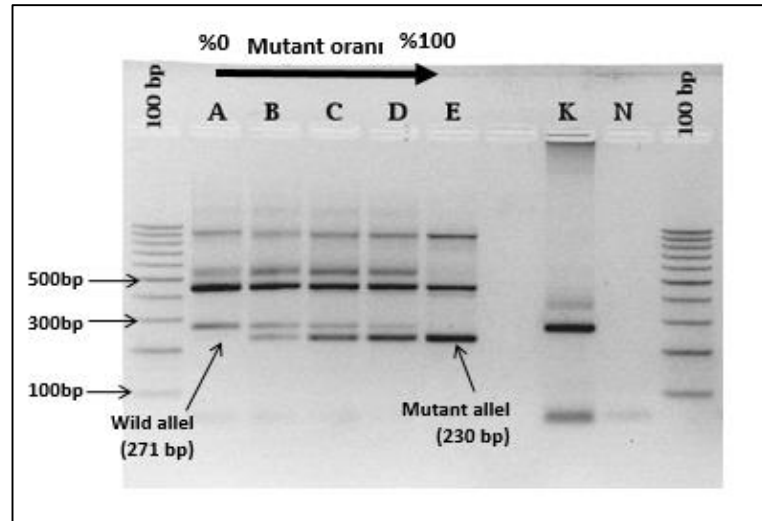
m.3291 T>C mutasyonu tarama tepkimeleri için optimizasyon sürecinde  $MgCl_2$  titrasyonu yapılmıştır (2,5 - 3,5  $\mu M$  arası konsantrasyonlarda). Üç farklı bağlanma sıcaklığının (58-60-62 °C) denendiği tepkimelerde (Şekil 3.13), iç primer konsantrasyonları da değiştirilmiştir. Tepkime şartları Tablo 3.8'de belirtildiği gibi optimize edilmiş ve agaroz jel elektroforez sonucunda sentetik kontroller arasında Şekil 3.14'te görülen ayrışma sağlanmıştır.



Şekil 3.13 m.3291 T>C mutasyonu farklı bağlanma sıcaklıklarında optimizasyon denemeleri (%2,5'lik jel).

**Tablo 3.8** ARMS-PZT m.3291 T>C mutasyonu şartları.

Malzemeler	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	<b>Klasik PZT x30 döngü</b> 94 °C – 2 dk 94 °C – 10 sn 57 °C – 10 sn 72 °C – 15 sn 72 °C – 2 dk
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	
dNTP mix	0,5 mM	
Dış Forward 2 Primeri	0,4 µM	
Dış Reverse 1 Primeri	0,4 µM	
İç Forward Primeri	0,4 µM	
İç Reverse Primeri	0,8 µM	
SYTO9	1,5µM	<b>Real-time x35 döngü</b> 94 °C – 1 sn 60 °C – 5 sn
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz	0,5u	
dH <sub>2</sub> O	20 µL	

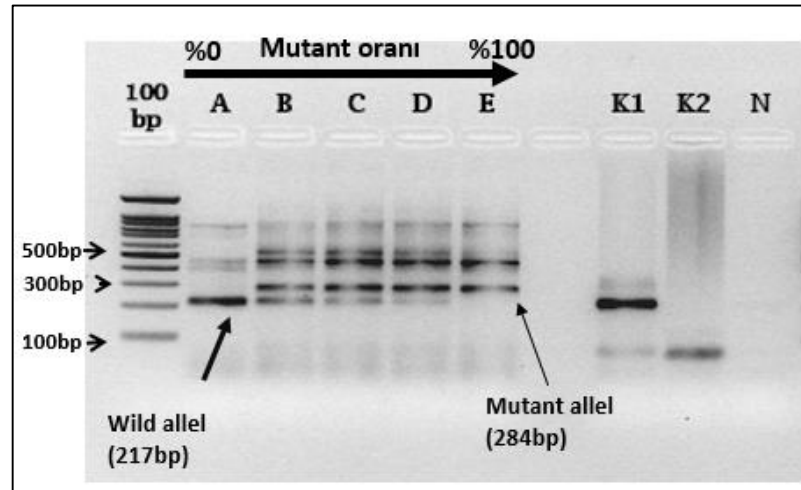
**Şekil 3.14** ARMS-PZT m.3291 T>C mutasyonu agaroz jel görüntüsü (%2,5'lik jel).

### 3.5.6 m.3303 C>T Mutasyon Optimizasyonu

m.3303 C>T mutasyonu için optimal koşullar Tablo 3.9'da gösterilmiş olup, PZT ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.15'te verilmiştir.

**Tablo 3.9** ARMS-PZT m.3303 C>T mutasyonu şartları.

Malzemeler	Konsantrasyon	
GoTaq Polimeraz Tamponu	1X	<b>Klasik PZT x30 döngü</b> 94 °C – 2 dk 94 °C – 10 sn 60 °C – 10 sn 72 °C – 15 sn 72 °C – 2 dk
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	
dNTP	0,5 mM	
Dış Forward 2 Primeri	0,4 µM	
Dış Reverse 1 Primeri	0,4 µM	
İç Forward Primeri	0,4 µM	
İç Reverse Primeri	0,4 µM	
SYTO9	1,5 µM	
DNA	200 ng	
GoTaq Polimeraz	0,5 u	
dH <sub>2</sub> O	20 µL	<b>Real-time x35 döngü</b> 94 °C – 1 sn 60 °C – 5 sn

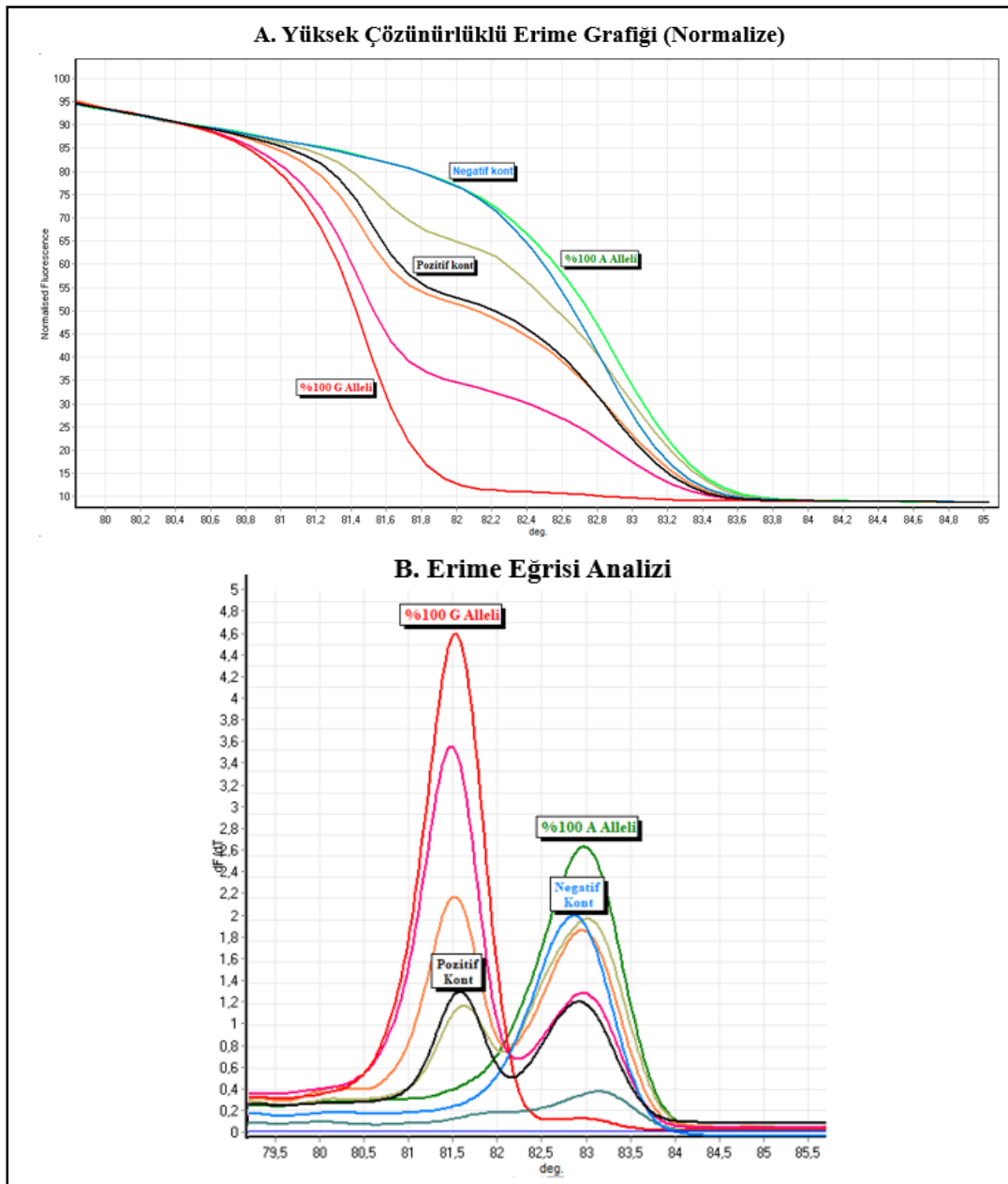
**Şekil 3.15** ARMS-PZT m.3303 C>T mutasyonu agaroz jel görüntüsü (%2,5'lik jel).



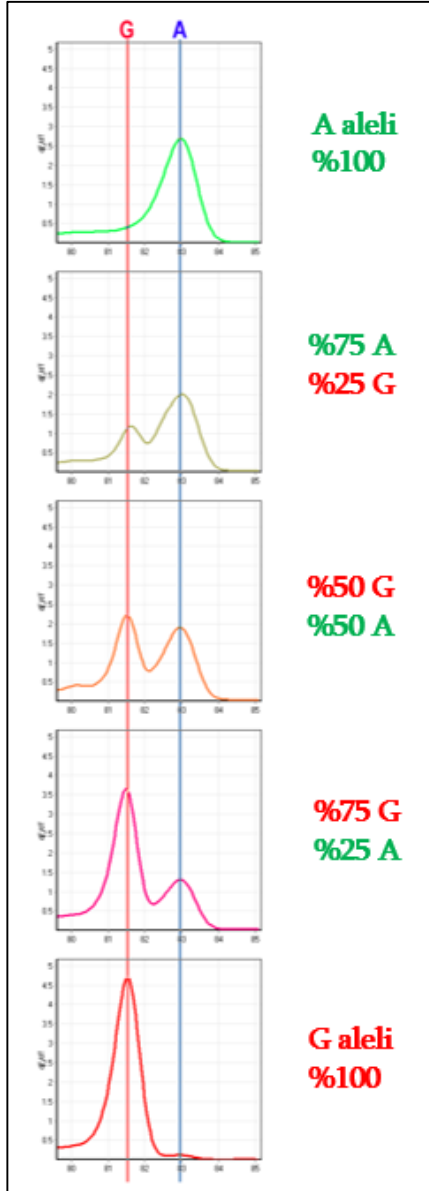
## 4. BULGULAR

### 4.1 m.3243A>G Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama

ARMS-PZT, farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik kontroller, heteroplazmik m.3243 A>G mutasyonu taşıyan MELAS hastası ve bu mutasyona sahip olmayan başka bir kontrol ile kurulmuştur. Tablo 3.4'teki şartlarda Corbett RotorGene 6000 cihazında gerçekleştirilen gerçek zamanlı reaksiyon sonucunda yapılan yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



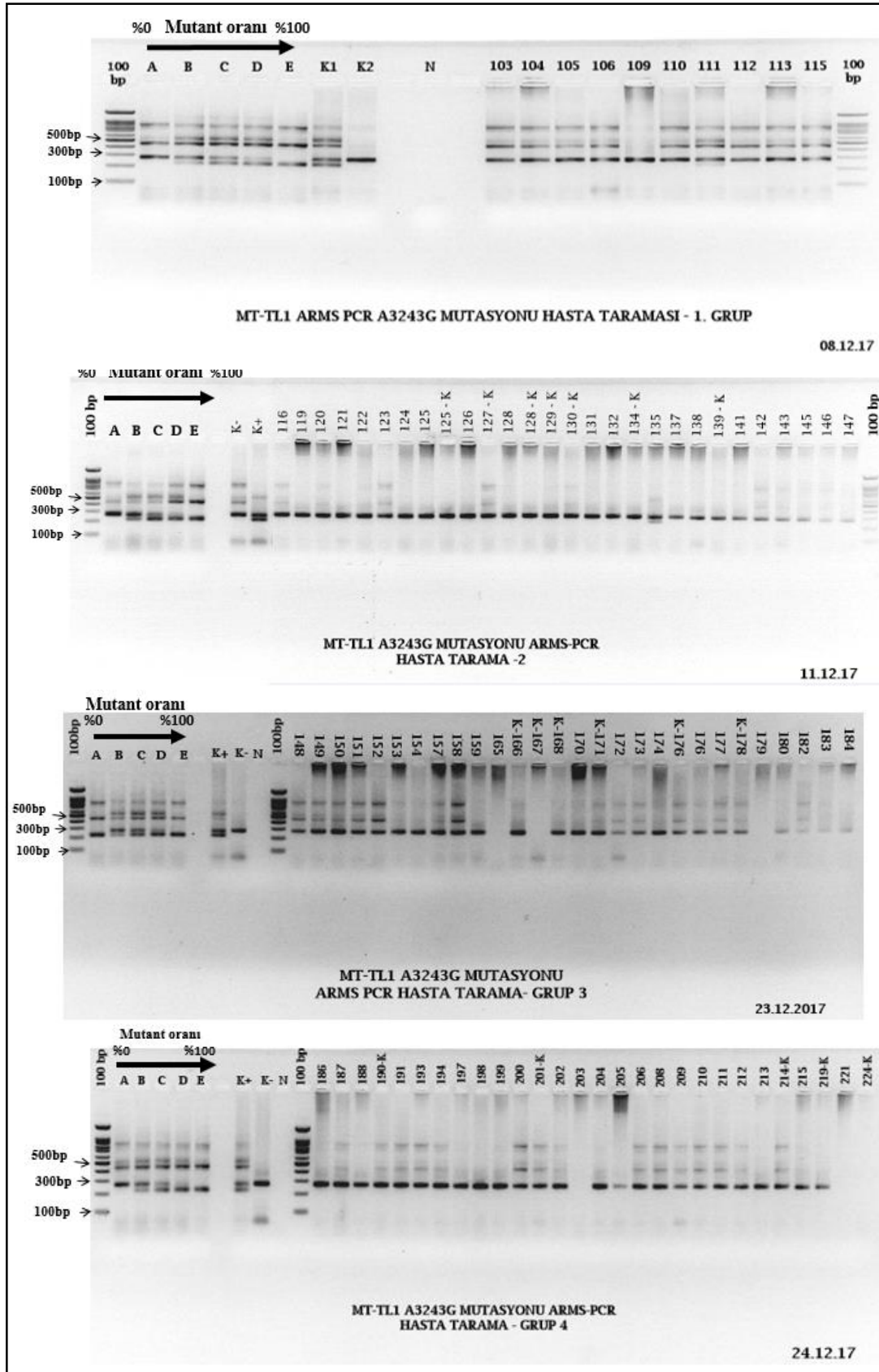
Şekil 4.1 m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri.



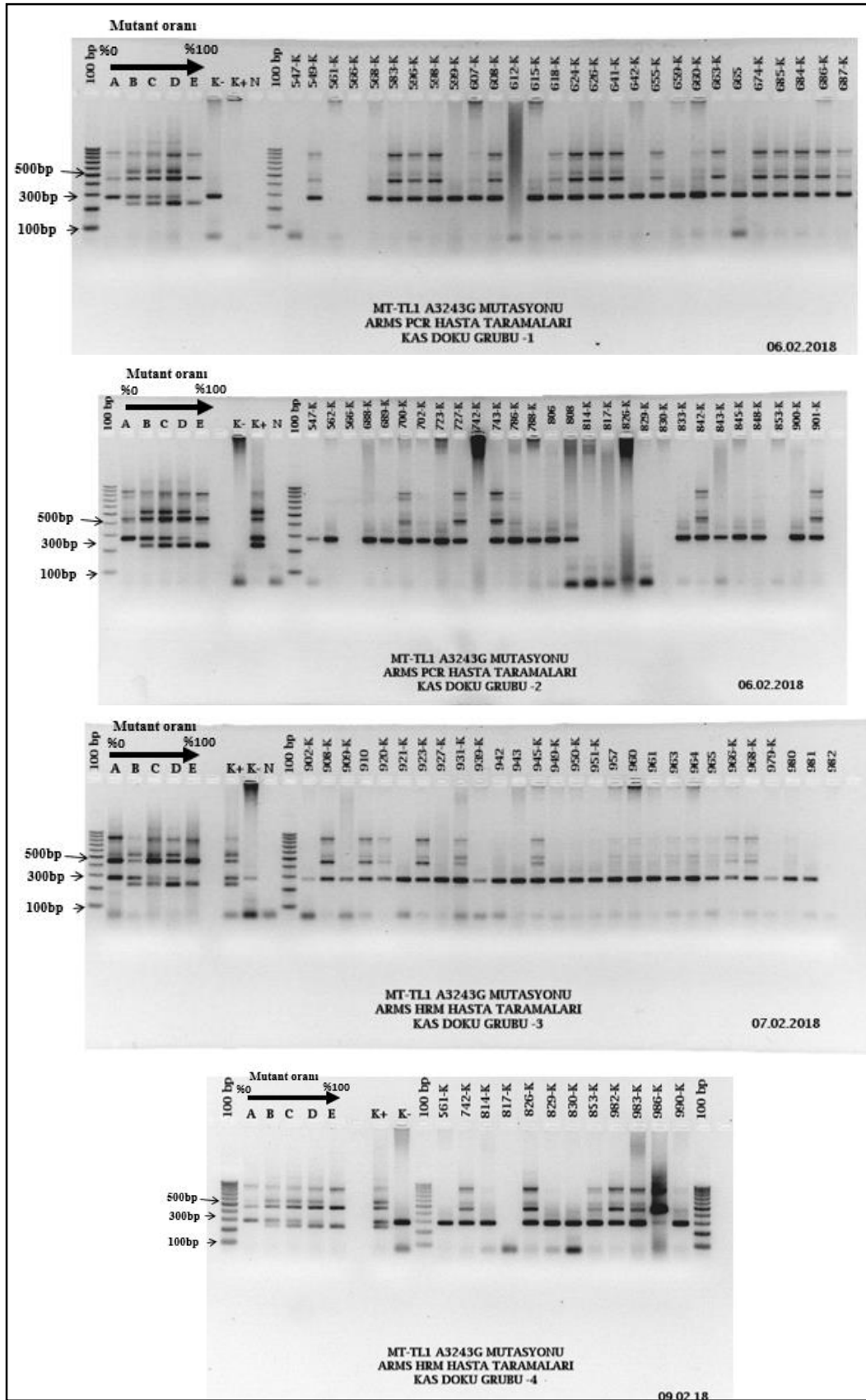
**Şekil 4.2** m.3243 A>G mutasyonuna sahip sentetik kontrollerin ayrıntılı erime eğrisi analizi.

Şekil 4.2’de sentetik kontrollerin ayrıntılı erime eğrisi analizleri verilmiştir. Yukarıdan aşağıya doğru örnekler içerisinde mutant allel kopya sayısı artmaktadır. Değişen heteroplazmi içeriğiyle beraber erime eğrisinin de farklılık gösterdiği, yabancı tipteki allelin (A allelinin) 83 °C’de erime tepesi oluştururken, mutant allelin (G allelinin) 81,5 °C’de erime tepesi oluşturduğu görülmektedir.

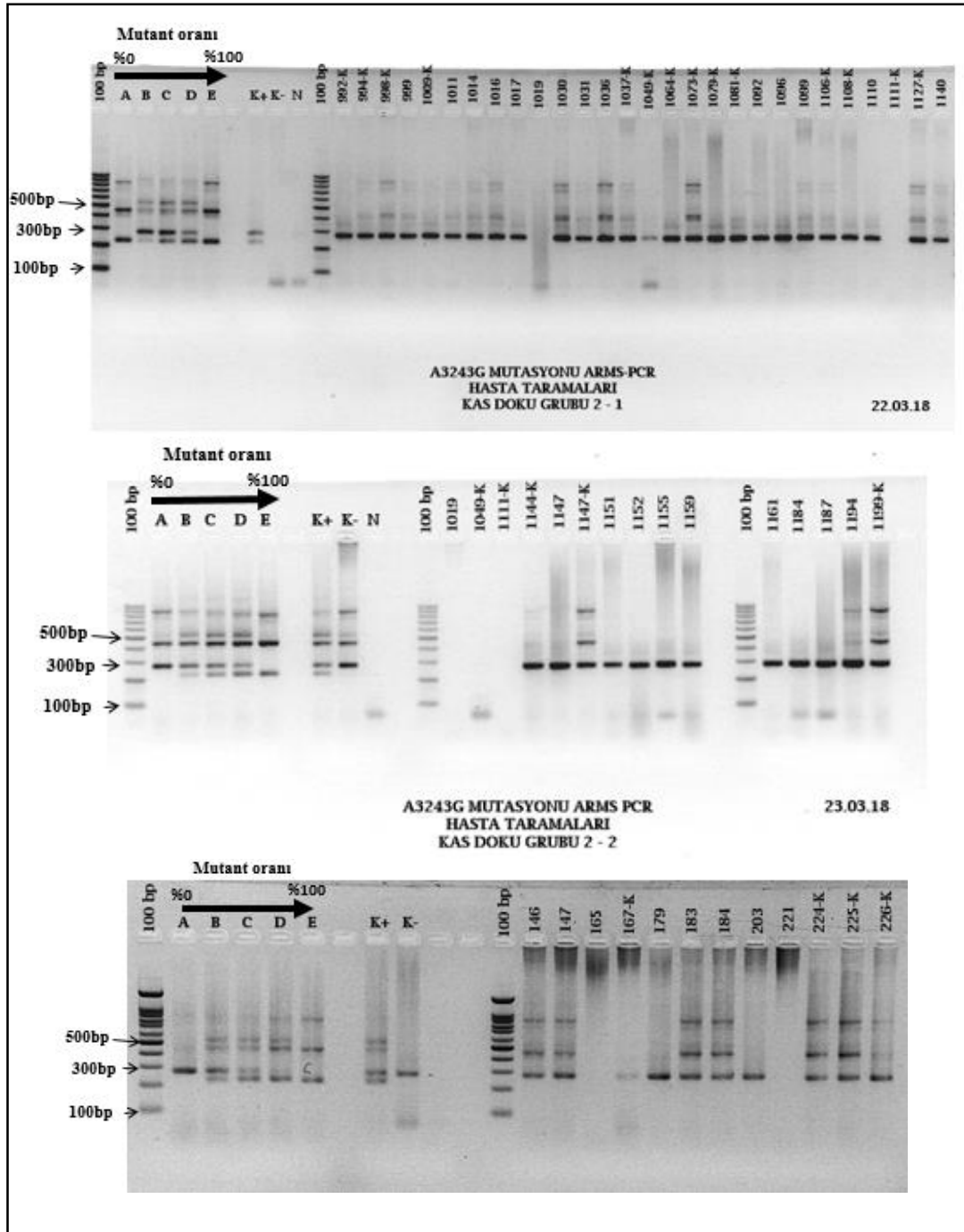
Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’te 219 hastanın ARMS-PZT yöntemi ile m.3243 A>G mutasyonu taramalarına ait agaroz jel görüntüleri verilmiştir. Bu taramalar sonucunda heteroplazmik olarak m.3243 A>G mutasyonu taşıyan hastalara ait jel görüntüleri ve erime eğrisi analizleri de Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de bulunmaktadır. Hastalar taşıdıkları m.3243 A>G mutasyonu nedeniyle farklı erime profillerine sahiptir; mutant ve yabancı tipteki alleller için iki farklı erime tepesi vermektedir.



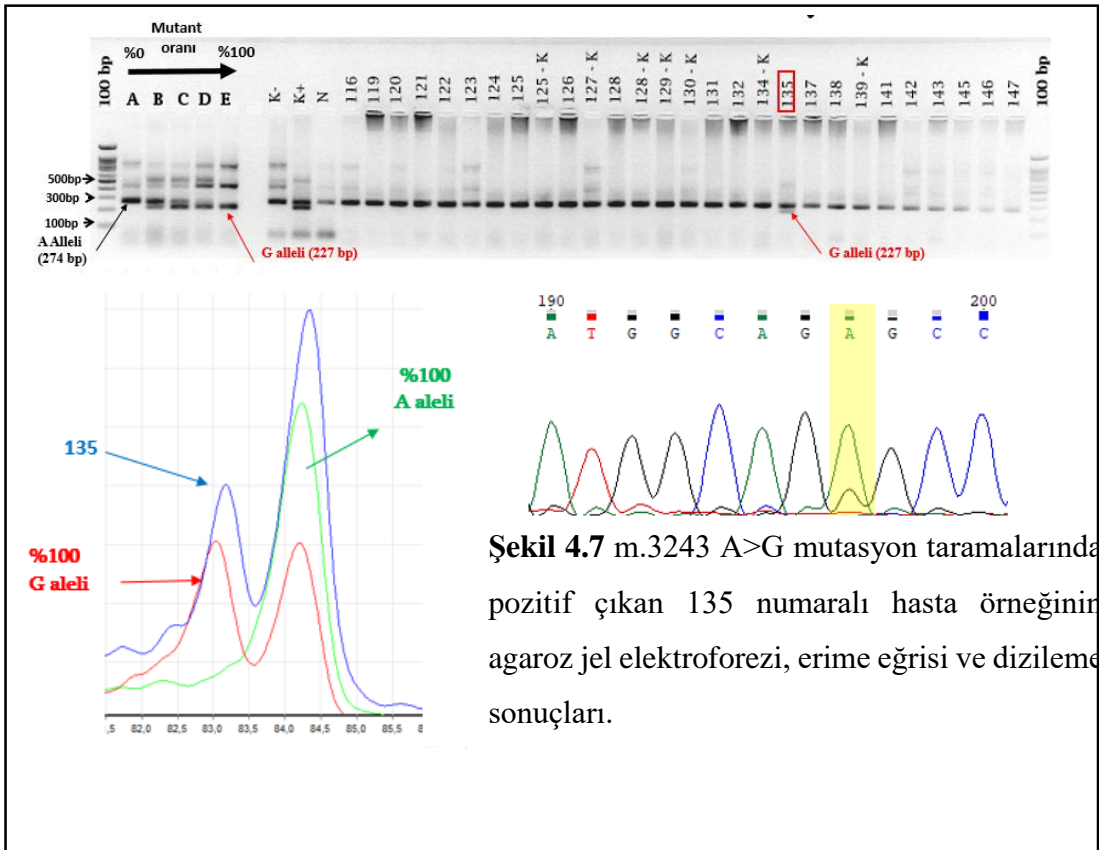
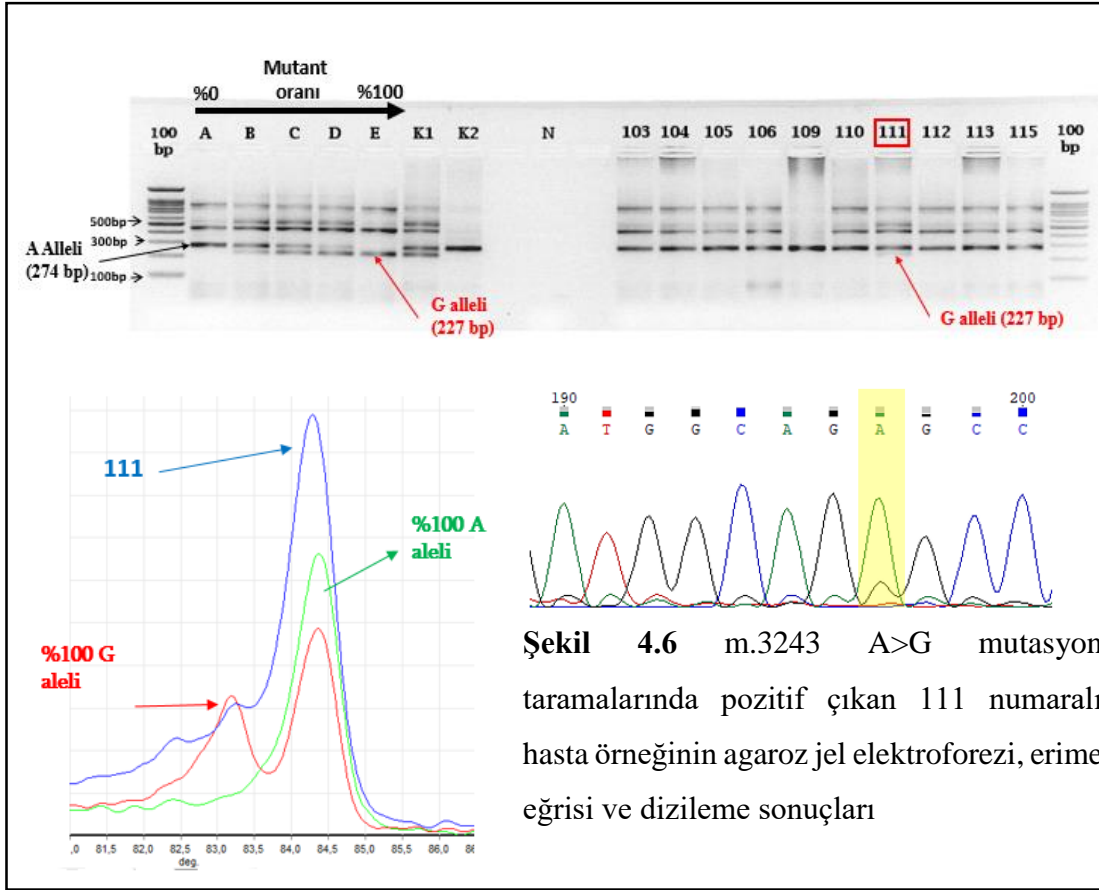
Şekil 4.3 m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları-1.



Şekil 4.4. m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları-2.

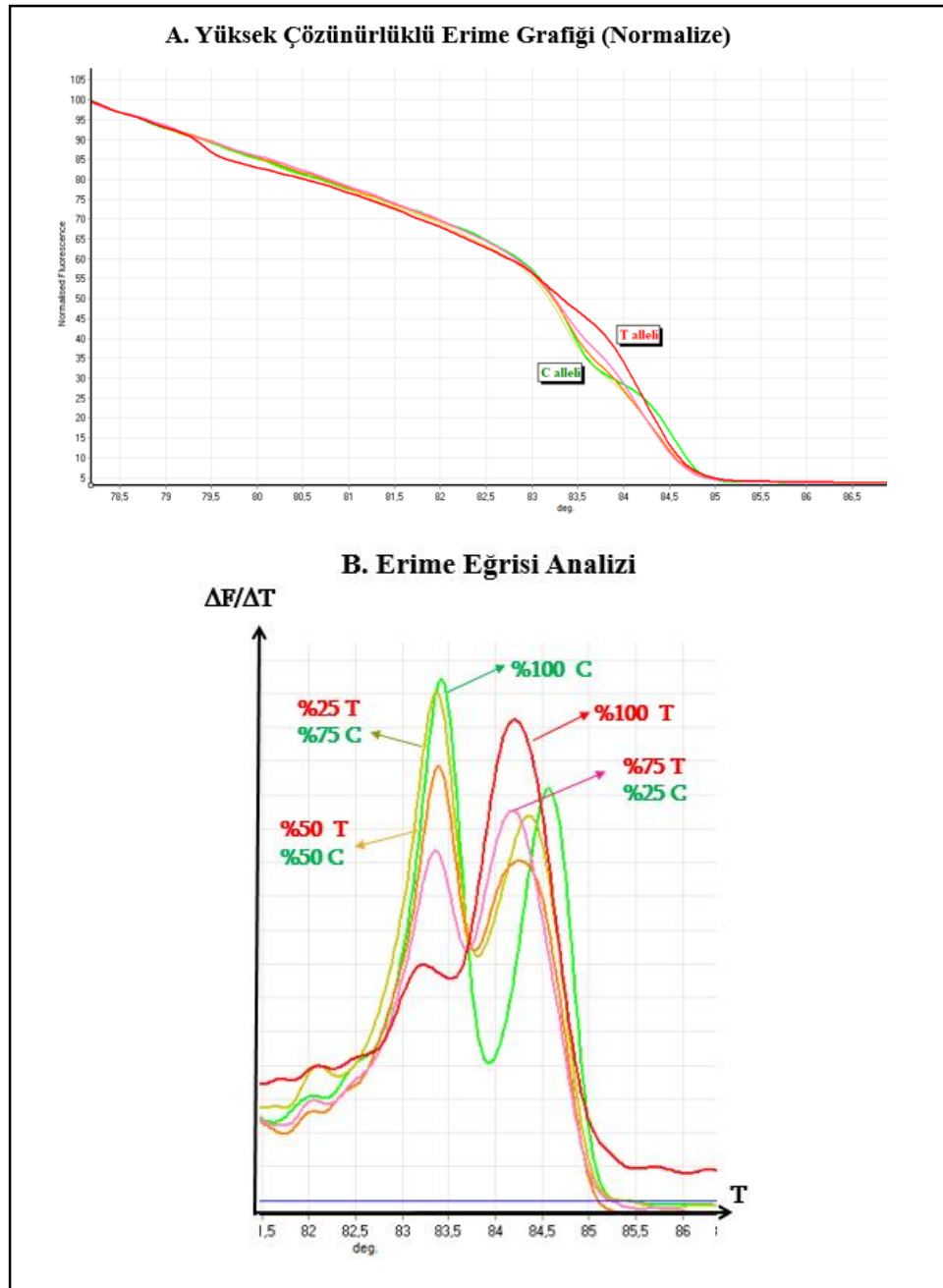


Şekil 4.5. m.3243 A>G mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları-3.

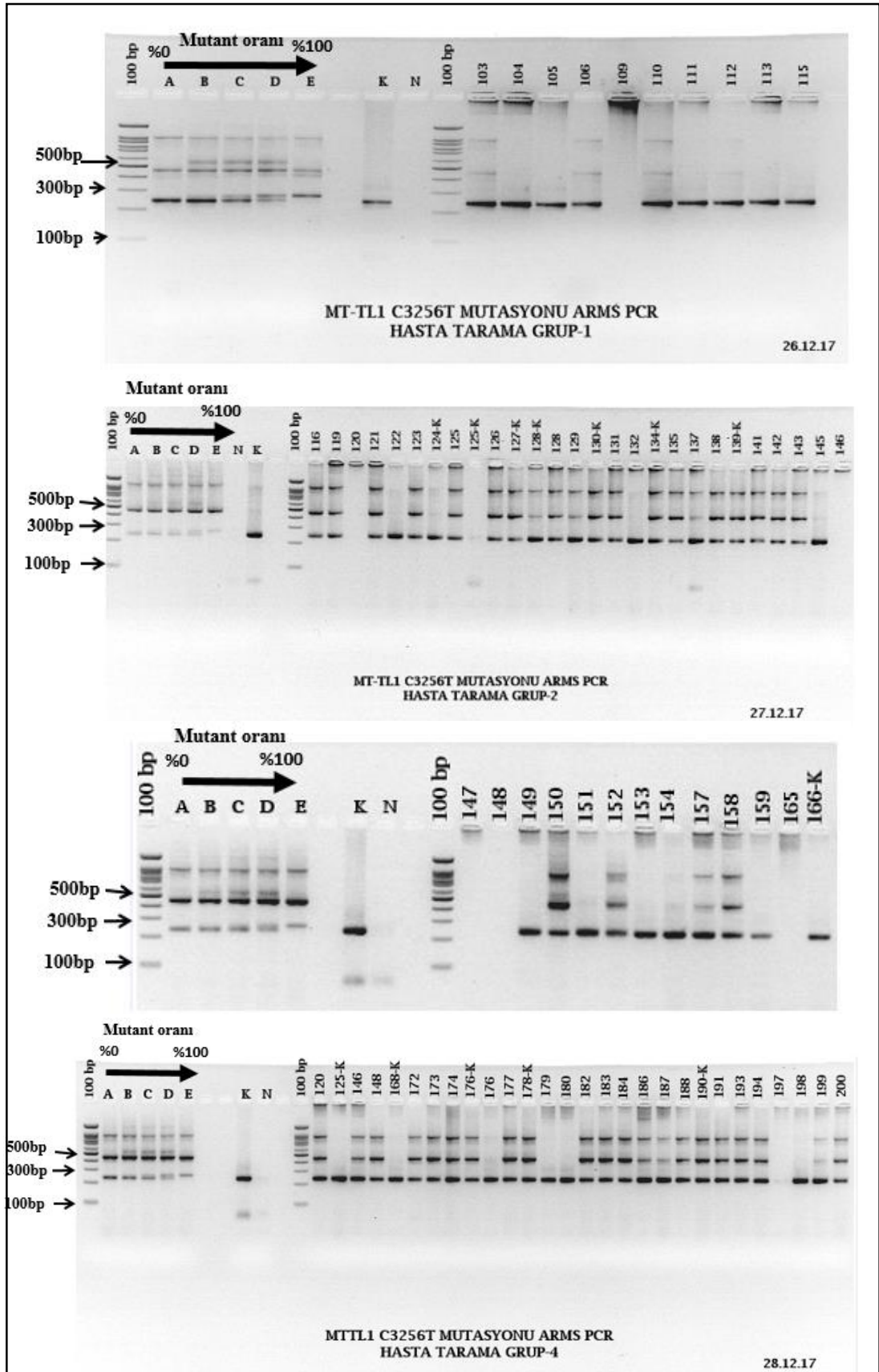


#### 4.2 m.3256 C>T Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama

Tablo 3.5'teki şartlara uygun olarak hazırlanan ARMS-PZT'nin farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik kontrollerine ait yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi Şekil 4.8'de verilmiştir. Erime eğrisi analizinde yabancı tipteki allel ile mutant allelin erime tepeleri arasındaki fark görülmektedir. Yapılan taramalar sonucunda m.3256 C>T mutasyonuna sahip bir hasta belirlenmemiştir. ARMS-PZT taramalarının agaroz jel görüntüleri Şekil 4.9-4.11'de bulunmaktadır.

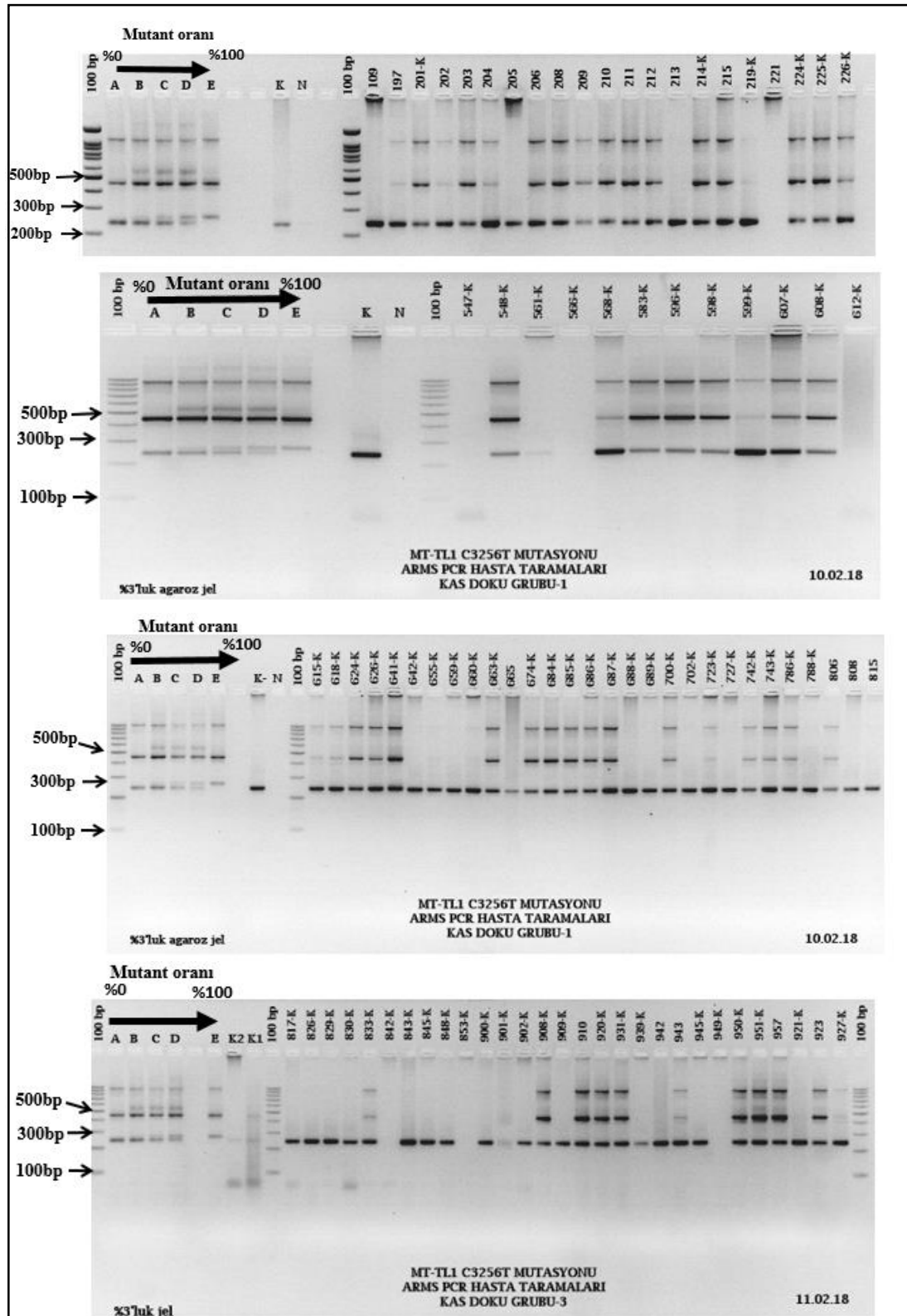


Şekil 4.8 m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri.

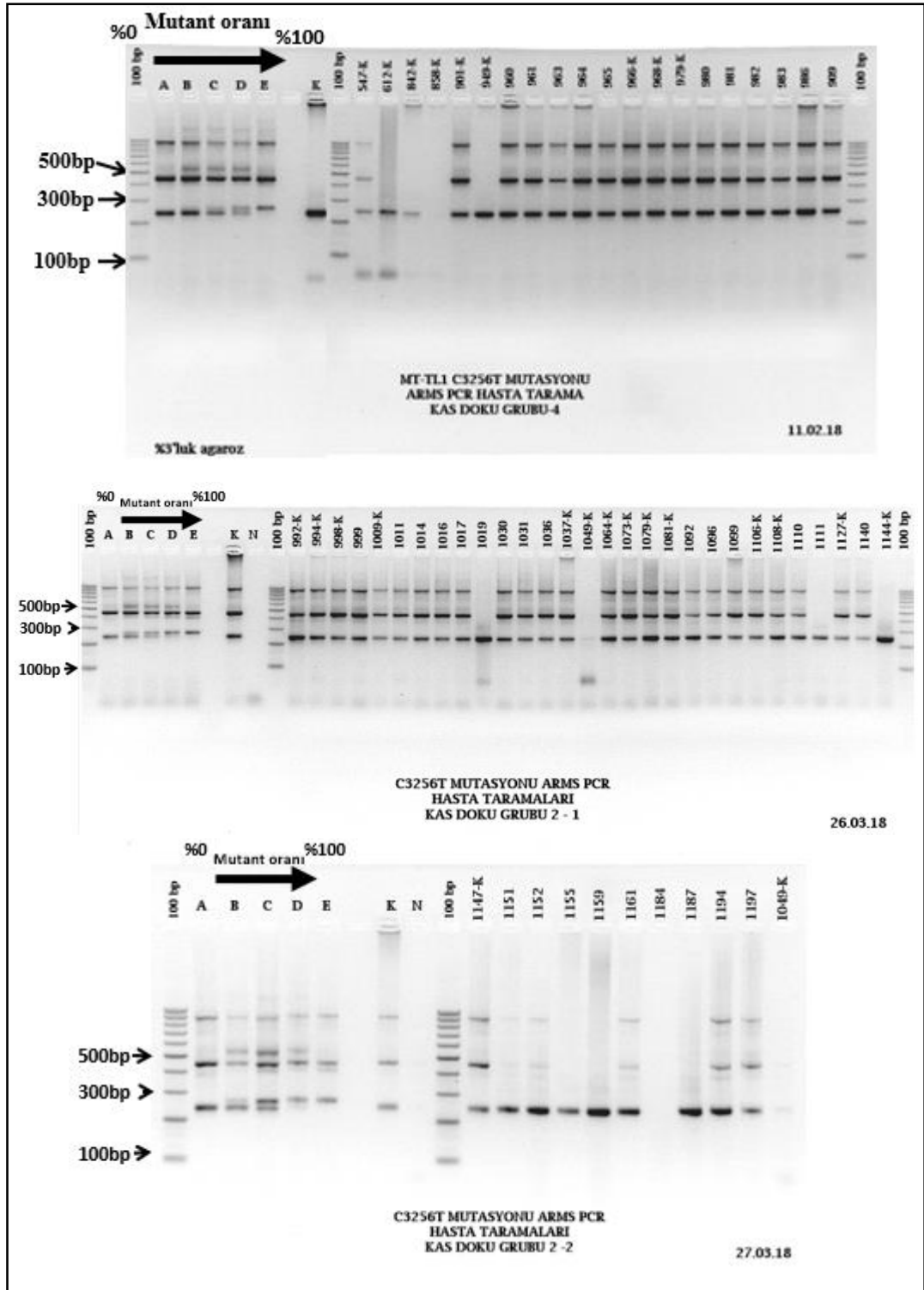


Şekil 4.9 m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları-1.





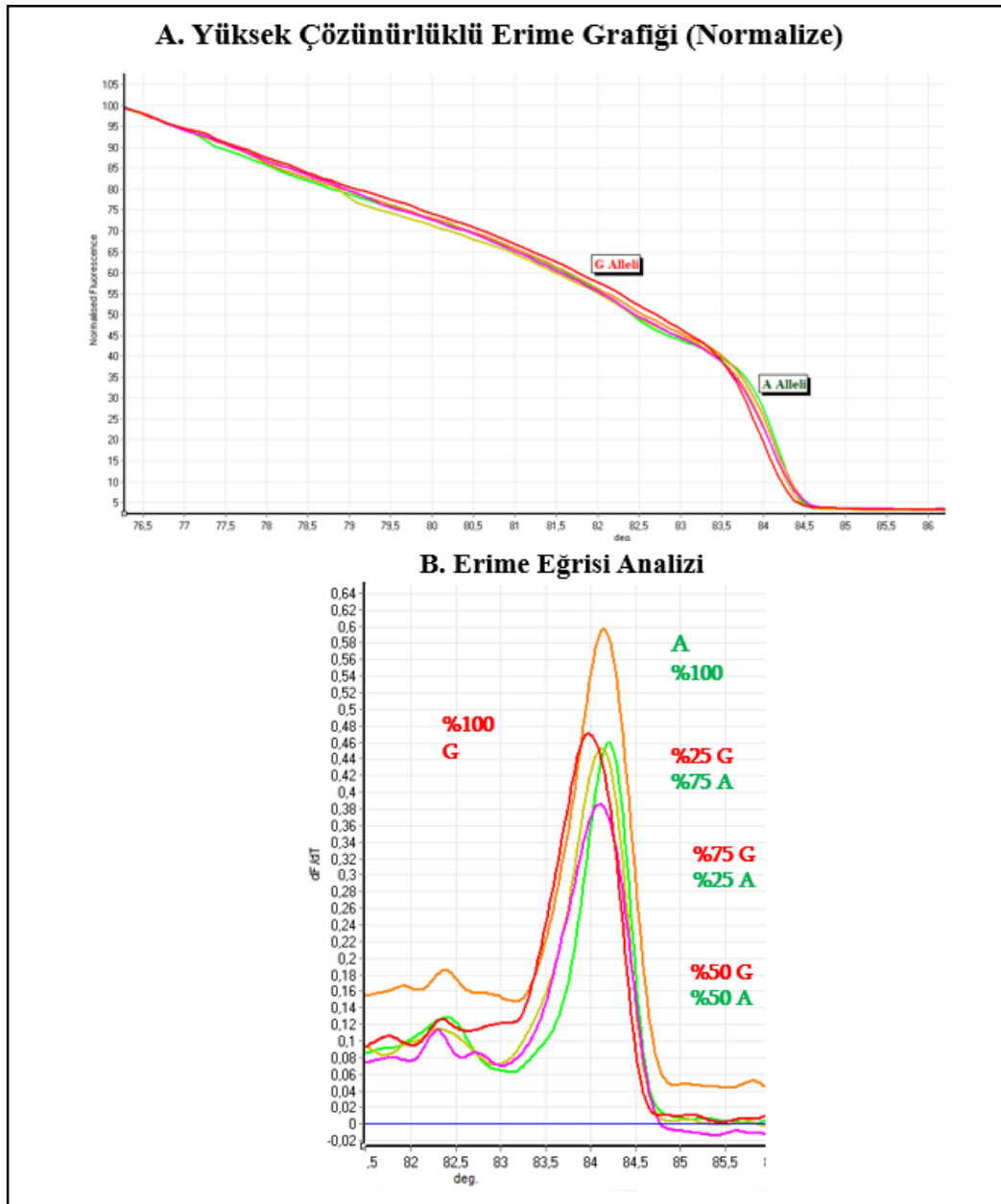
Şekil 4.10 m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları-2.



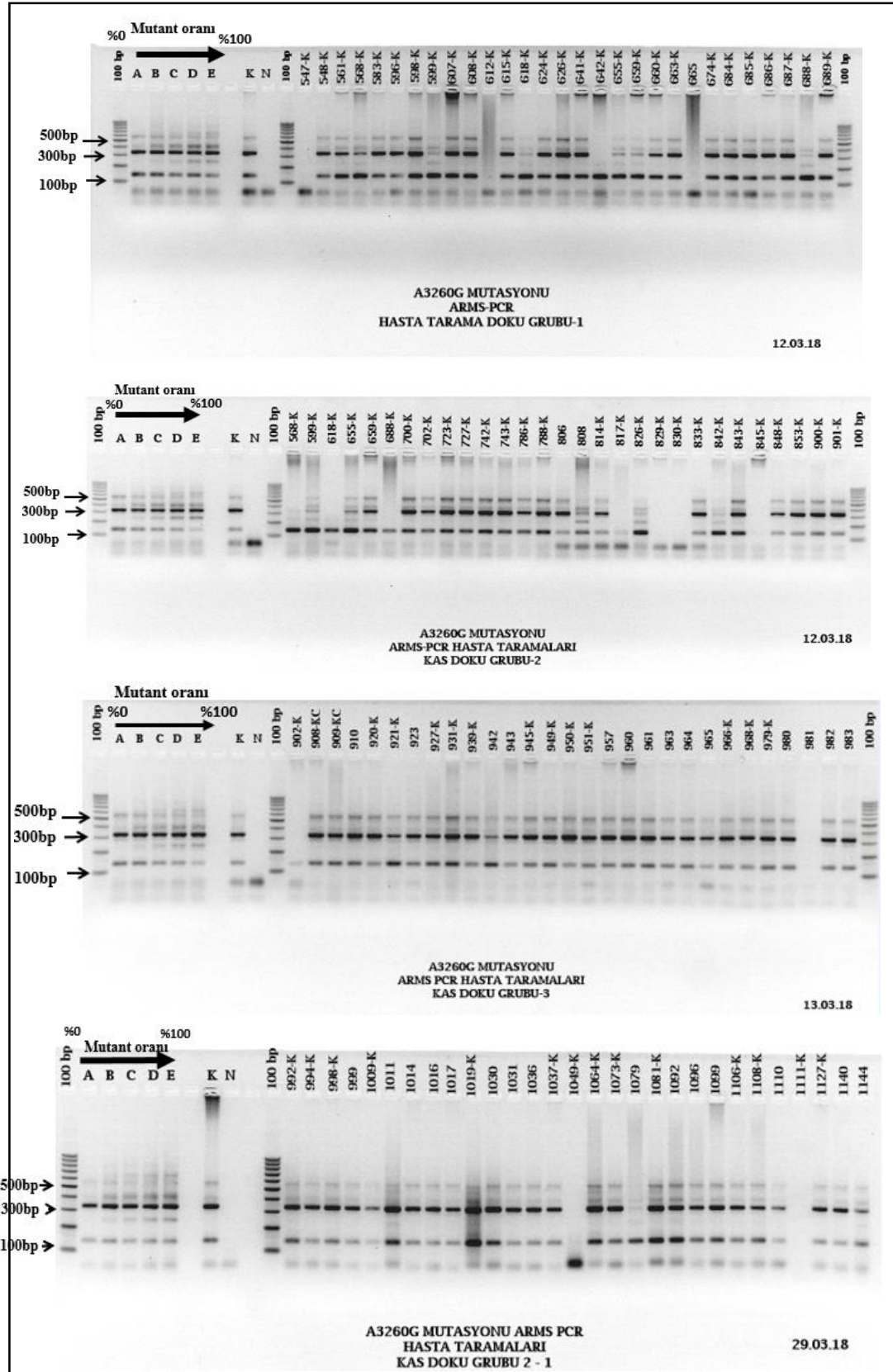
Şekil 4.11 m.3256 C>T mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları-3.

### 4.3 m.3260 A>G Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama

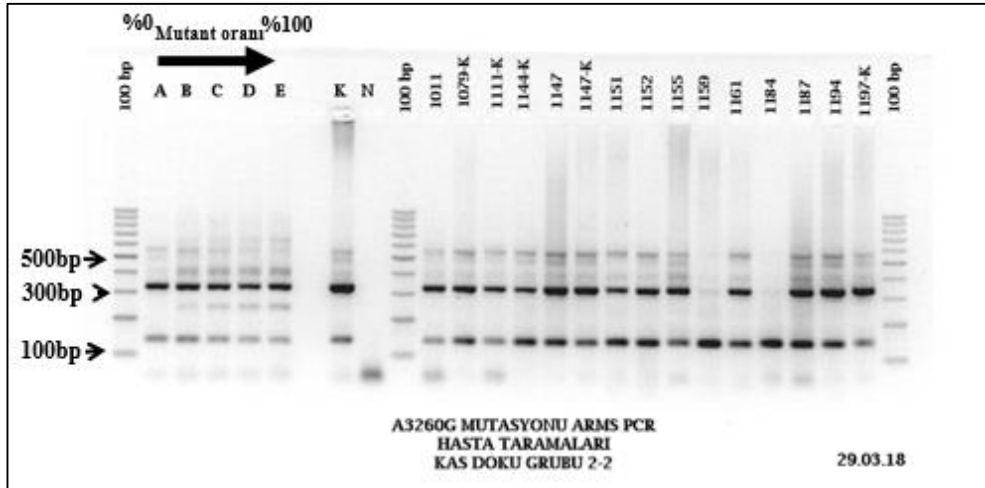
Tablo 3.6'daki şartlara uygun olarak hazırlanan ARMS-PZT'nin farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik kontrollerine ait yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi Şekil 4.12'de verilmiştir. HRM analizleri sonucunda sentetik kontrollerin erime grafikleri arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Yapılan taramalar sonucunda m.3260 A>G mutasyonuna sahip bir hasta belirlenmemiştir. ARMS-PZT taramalarına ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.13 ve 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.12 m.3260 A>G mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri.

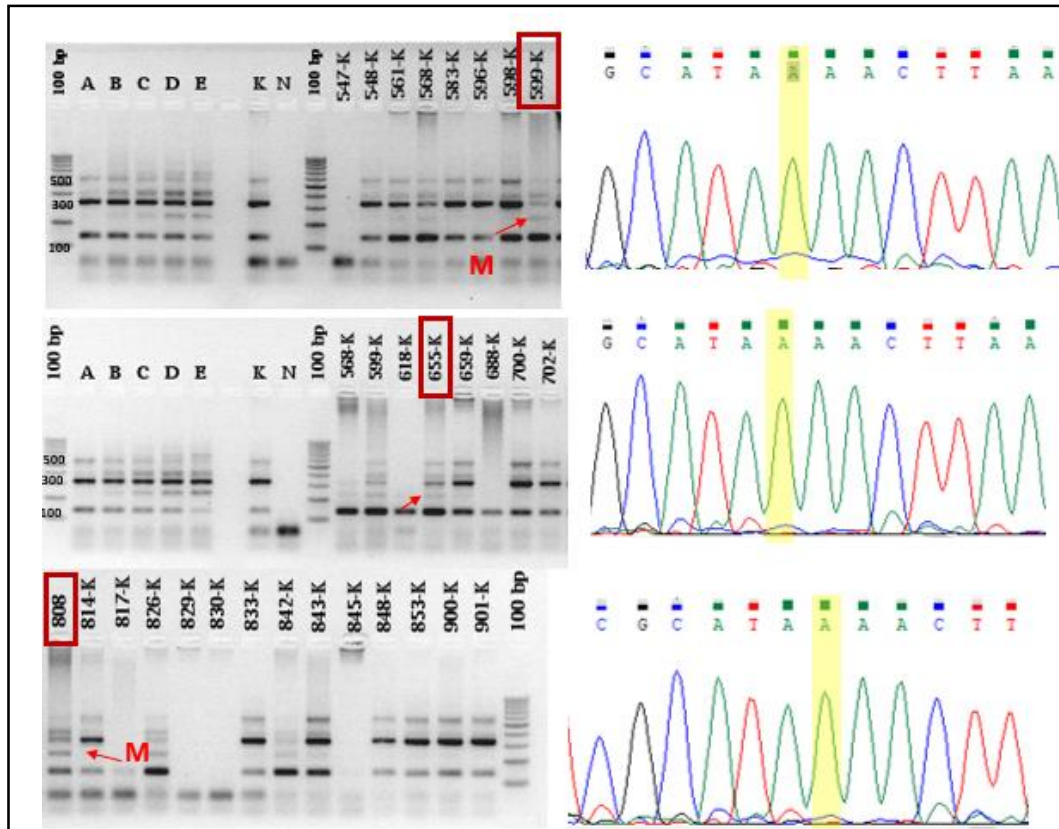


Şekil 4.13 m.3260 A>G mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -1.

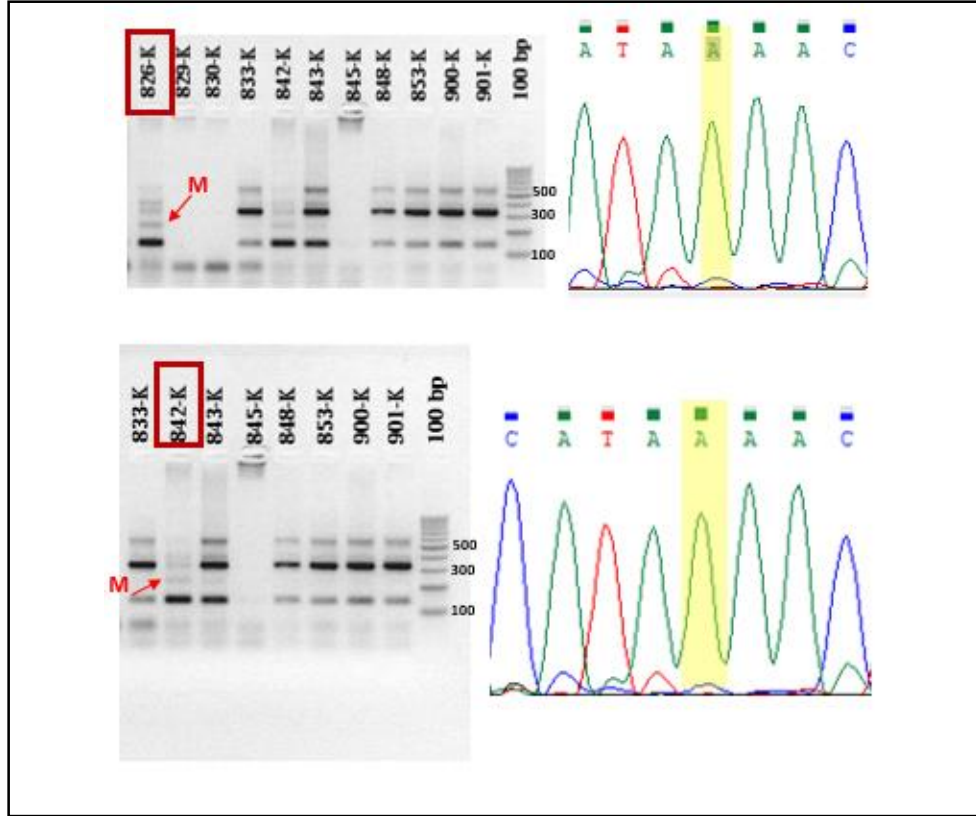


Şekil 4.14 m.3260 A>G mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -2.

ARMS-PZT hasta taramalarında m.3260 A>G mutasyonun pozitif olduğu belirlenen beş hasta için dizileme analizine gidilmiş, dizileme sonucunda hastalarda mutasyon tespit edilmemiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15 ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu taramalarında belirlenen yanlış pozitif sonuçların agaroz jel ve dizileme analizleri -1.

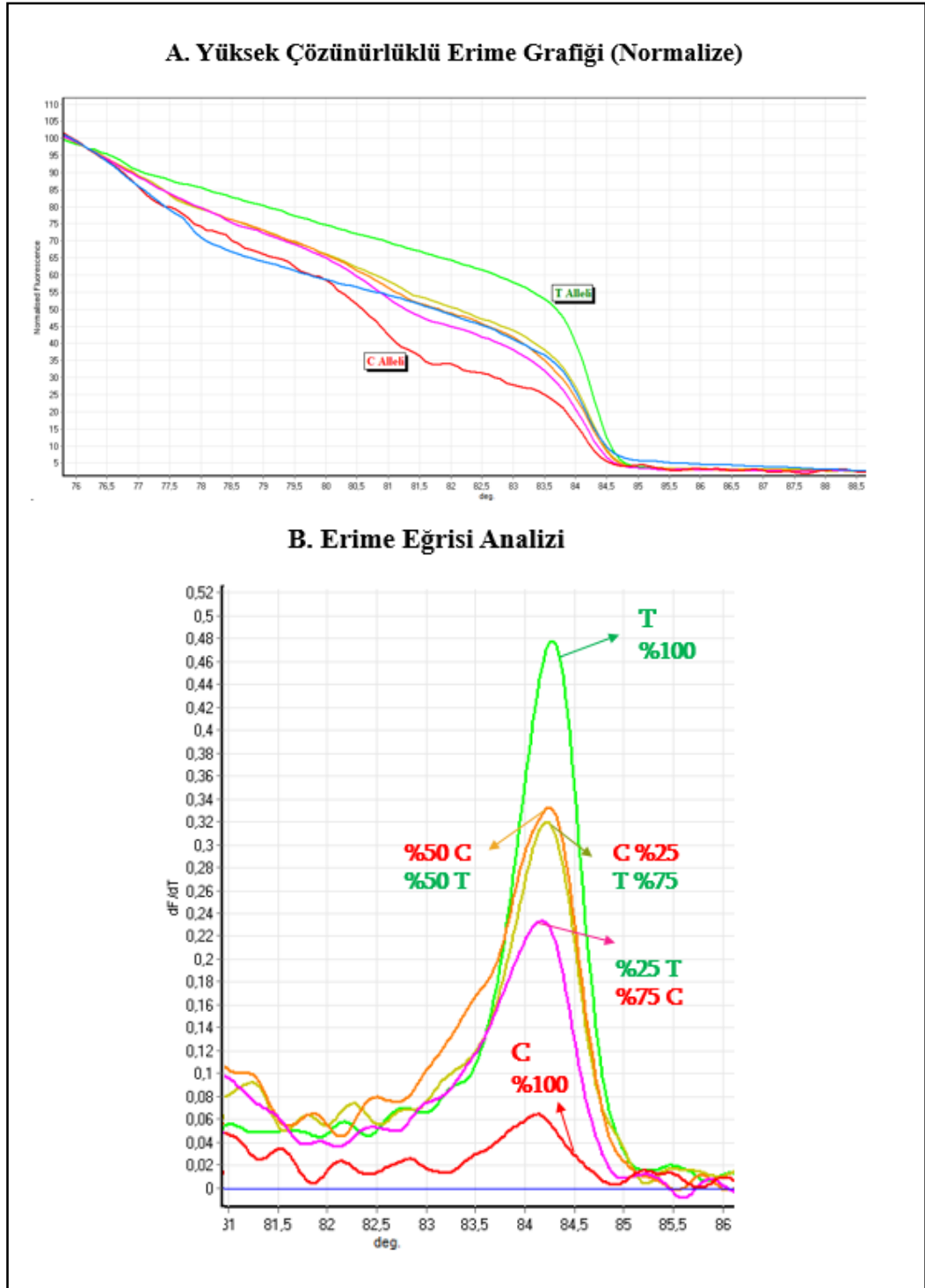


**Şekil 4.16** ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu taramalarında belirlenen yalnızca pozitif sonuçların agaroz jel ve dizileme analizleri -2.

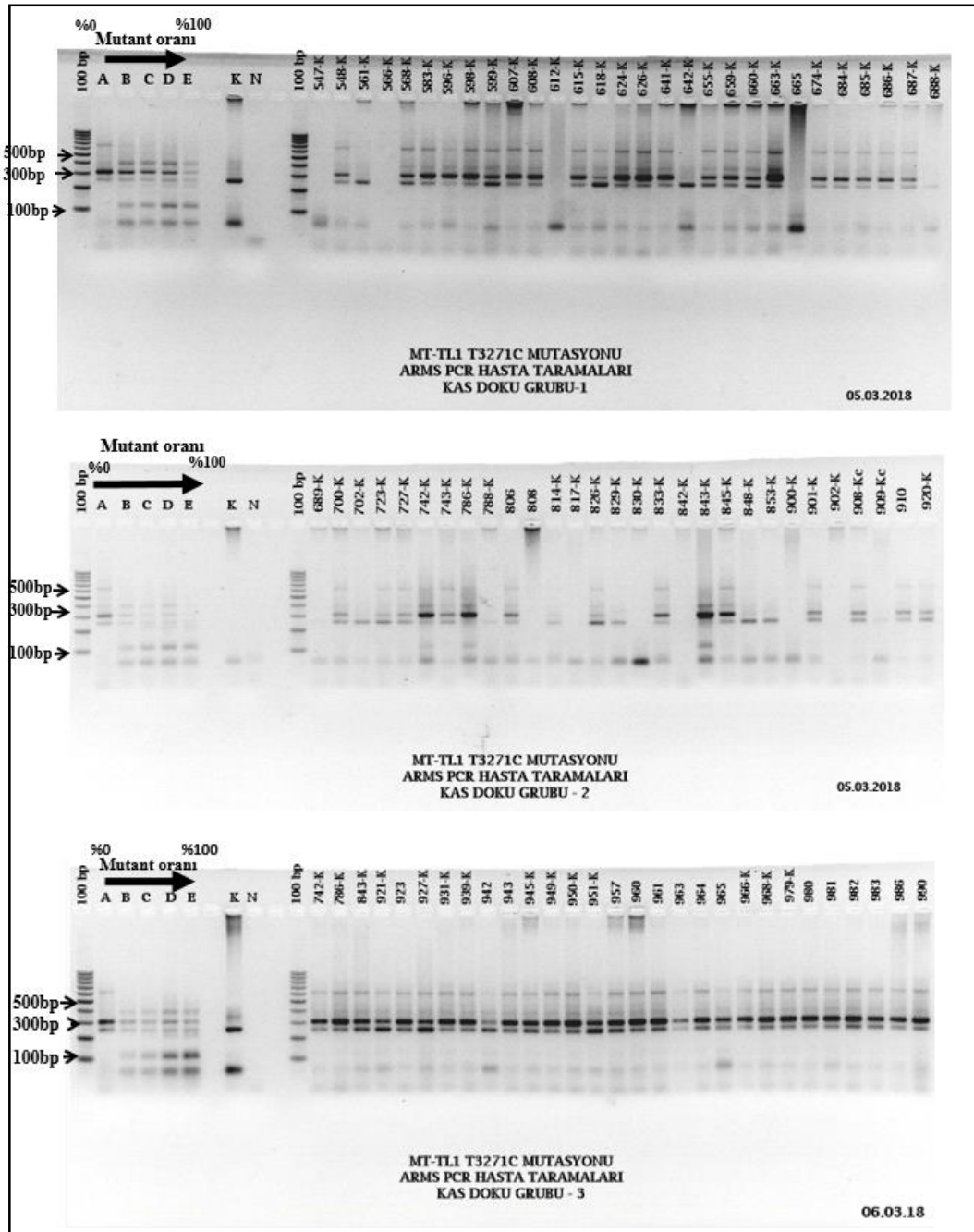
#### 4.4 m.3271 T>C Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama

Tablo 3.7'deki şartlara uygun olarak hazırlanan ARMS-PZT'nin farklı oranlarda heteroplazmi içeren sentetik kontrollerine ait yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi Şekil 4.17'de verilmiştir. Mutant allel ve yabancı tipteki allellerin erime eğrisi analizlerinde ayrıştırıcı bir fark tespit edilmemiş, farklı mutant allel oranına sahip örneklerin 84 °C'de erime tepeleri verdiği belirlenmiştir.

Yapılan taramalar sonucunda m.3271 T>C mutasyonuna sahip bir hasta belirlenmemiştir. ARMS-PZT taramalarının agaroz jel görüntüleri Şekil 4.18 ve 4.19'da gösterilmiştir.

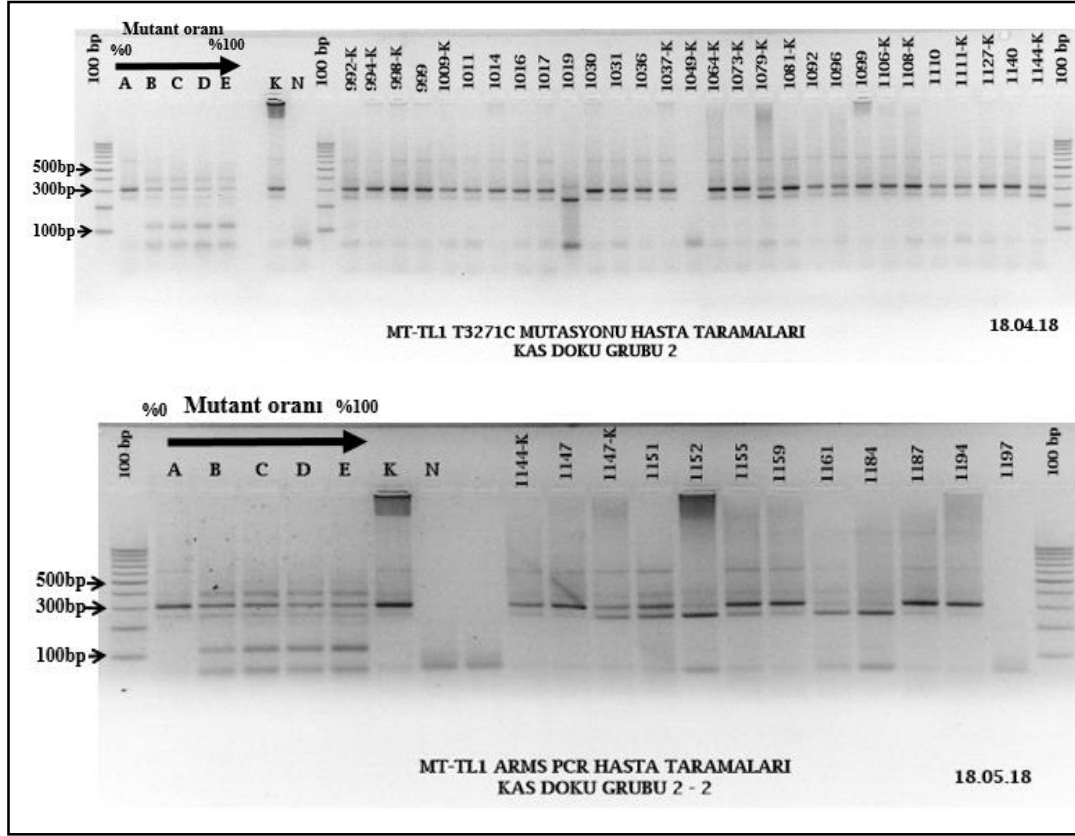


Şekil 4.17 m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri.



Şekil 4.18 m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -1.



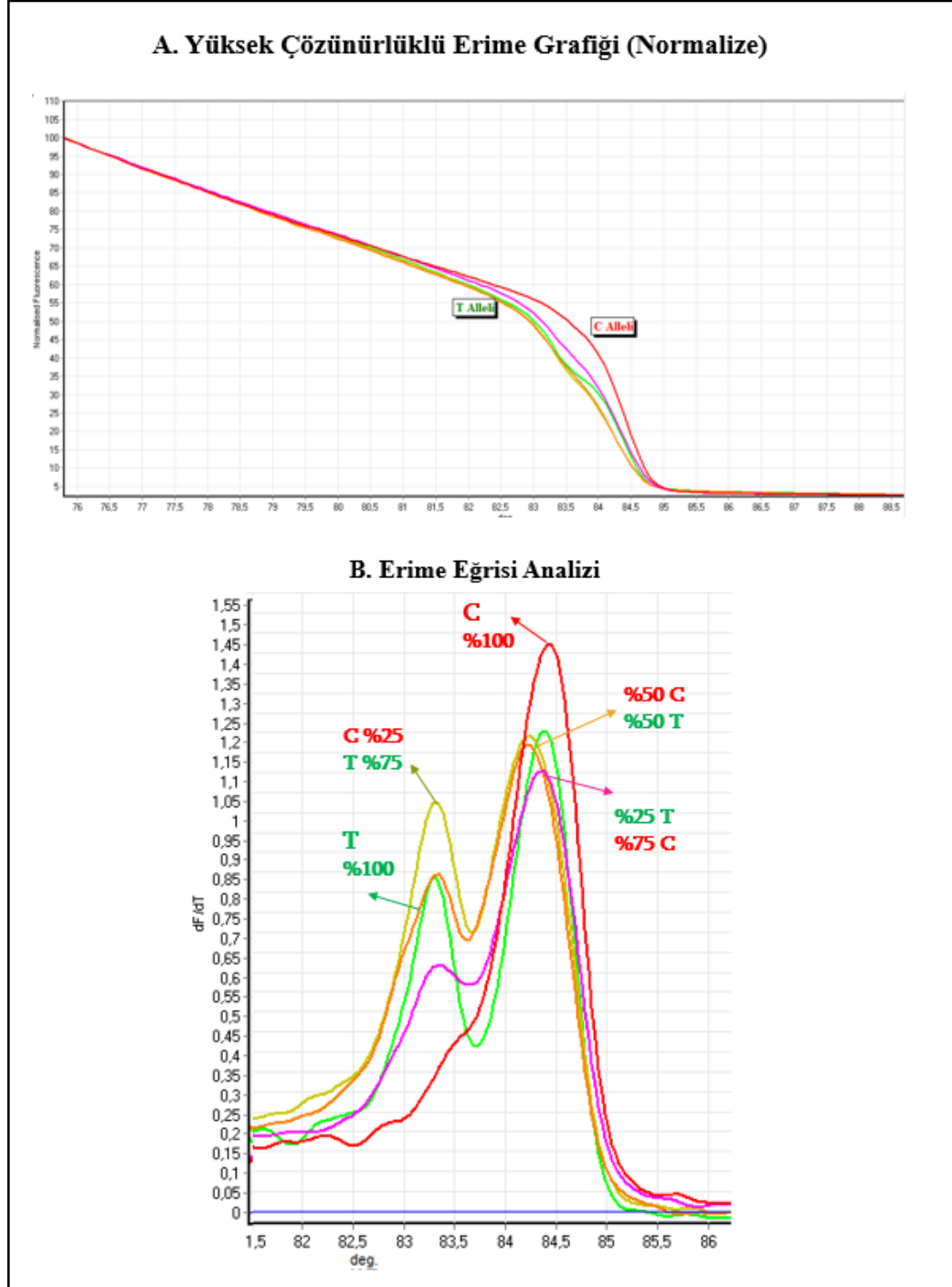


Şekil 4.19 m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -2.

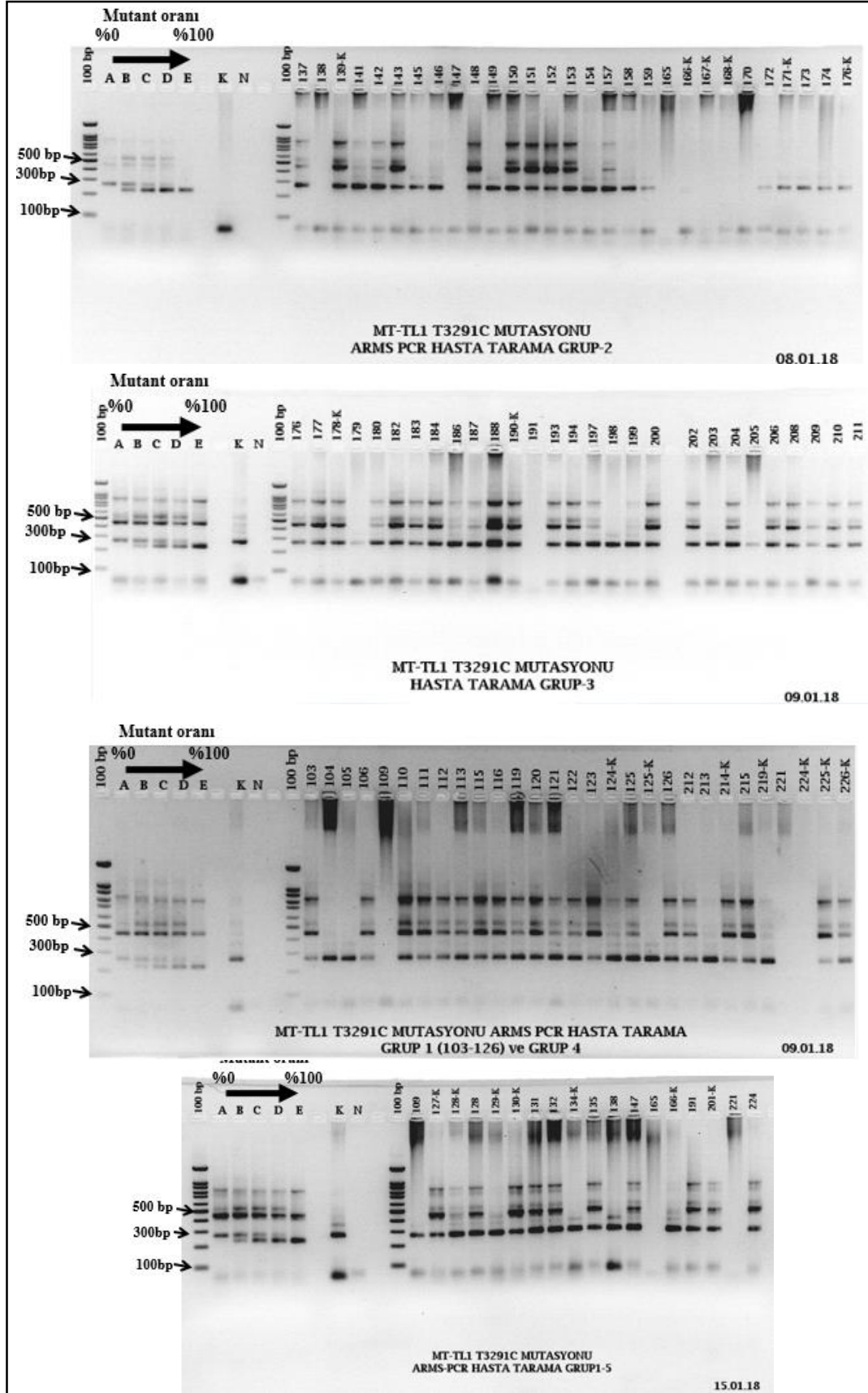
#### 4.5 m.3291 T>C Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama

Tablo 3.8'deki şartlara uygun olarak hazırlanan ARMS-PZT'nin sentetik kontrollerine ait yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi Şekil 4.20'de verilmiştir. Erime eğrisi analizinde farklı oranlarda mutant allel içeren sentetik kontrollerin farklı noktalarda erime eğrisi oluşturduğu belirlenmiş olsa da %100 yabancı tipteki allel içeriğine sahip olan kontrolün mutant kontrolle aynı noktada kesişerek bir erime tepesi oluşturduğu gözlemlenmiştir. Hastalara ait ARMS-PZT taramalarının agaroz jel görüntüleri Şekil 4.21-4.23'de bulunmaktadır.

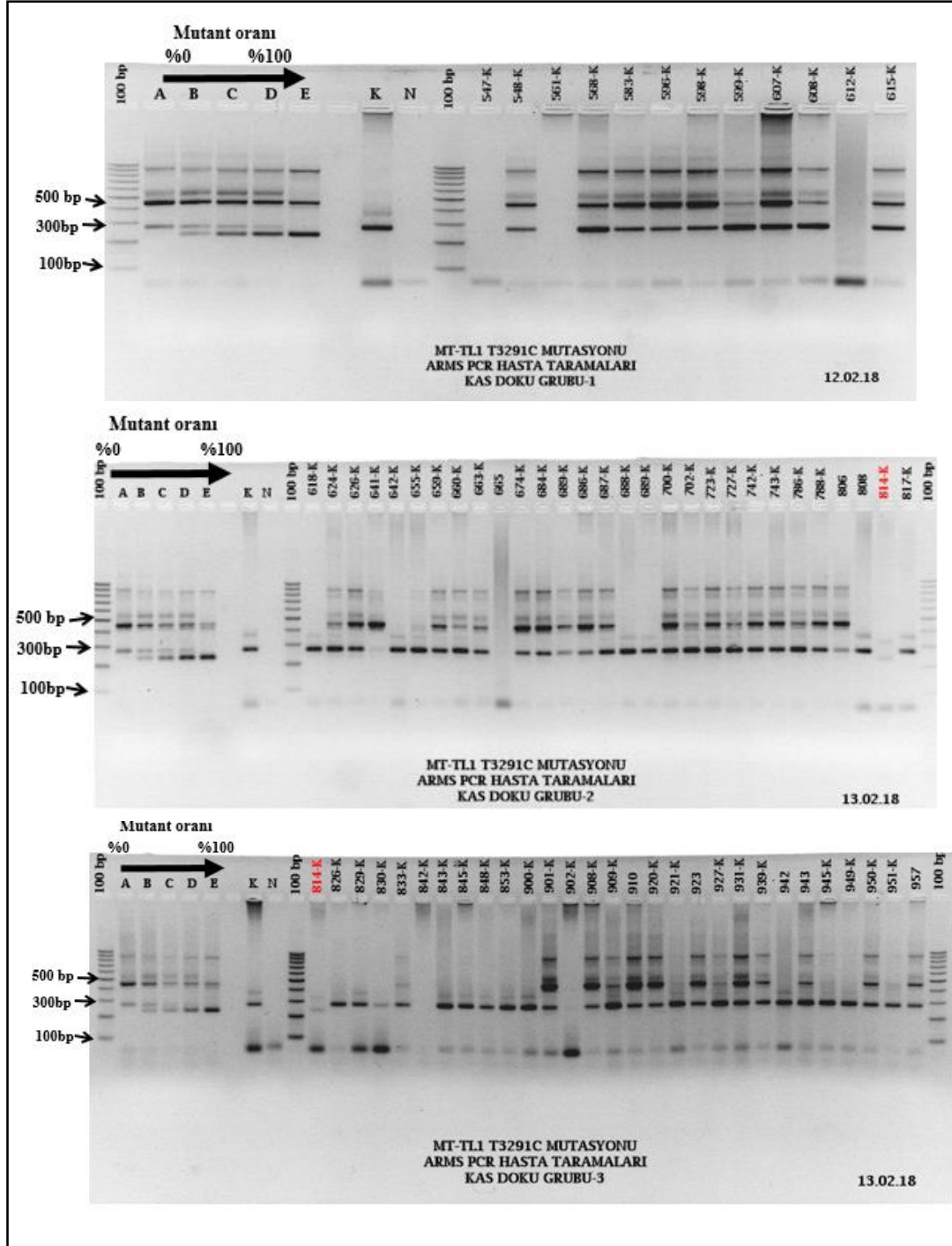
Yapılan taramalar sonucunda m.3291 T>C mutasyonuna sahip bir hasta bulunmazken, m.3290 T>C varyasyonu taşıyan bir hasta tespit edilmiştir. Hastanın homoplazmik olarak bu varyasyonu taşıdığı dizi analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.24).



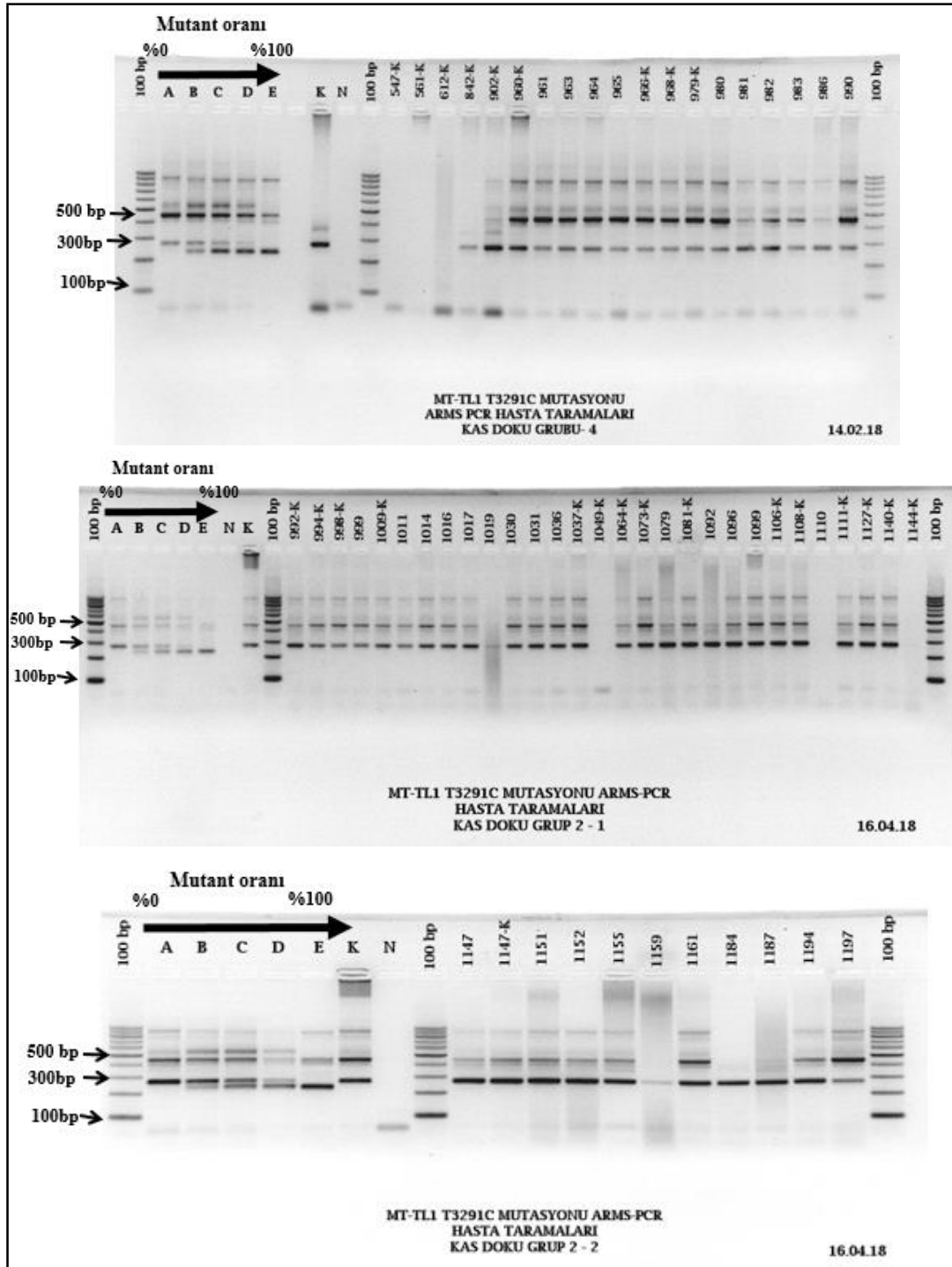
**Şekil 4.20** m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT erime eğrisi analizleri.



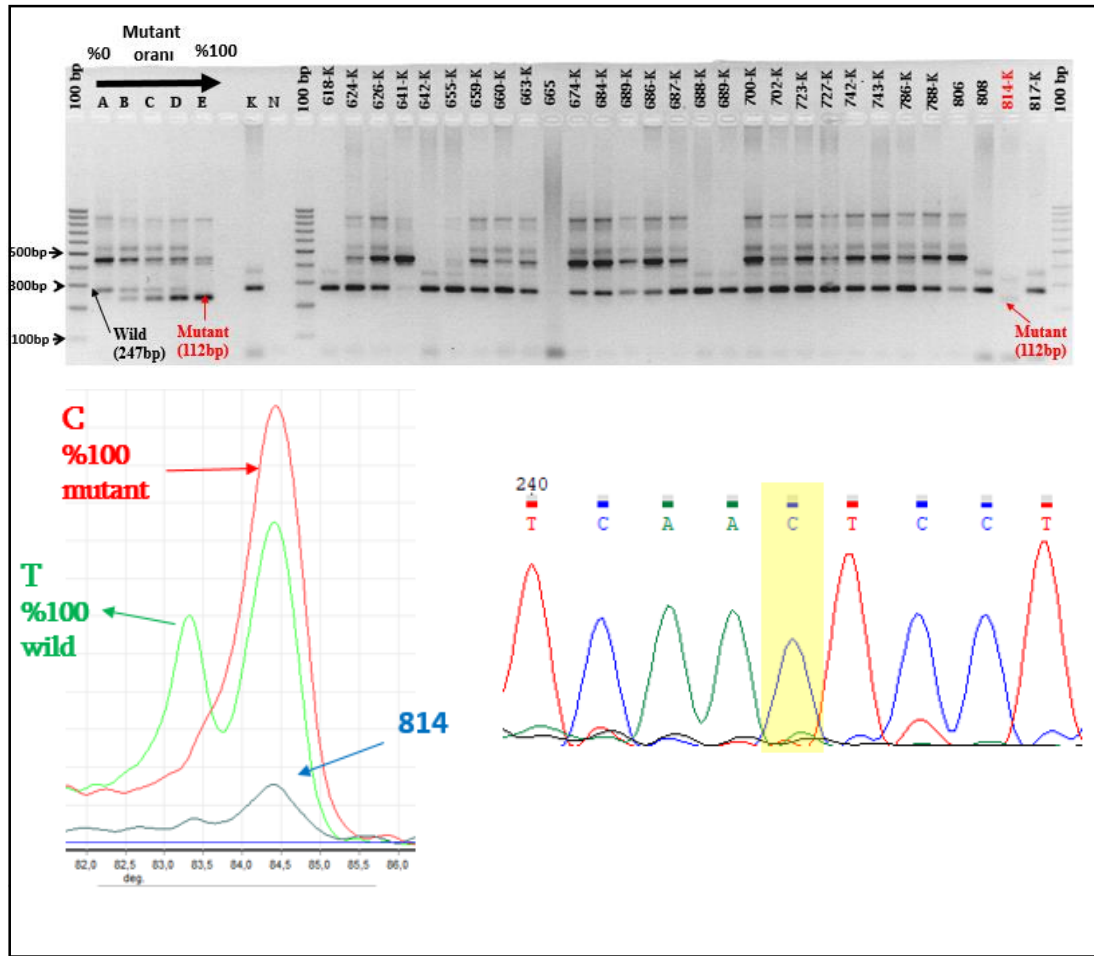
Şekil 4.21 m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -1.



Şekil 4.22 m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -2.



Şekil 4.23 m.3291 T>C mutasyonu ARMS-PZT hasta taramaları -3.

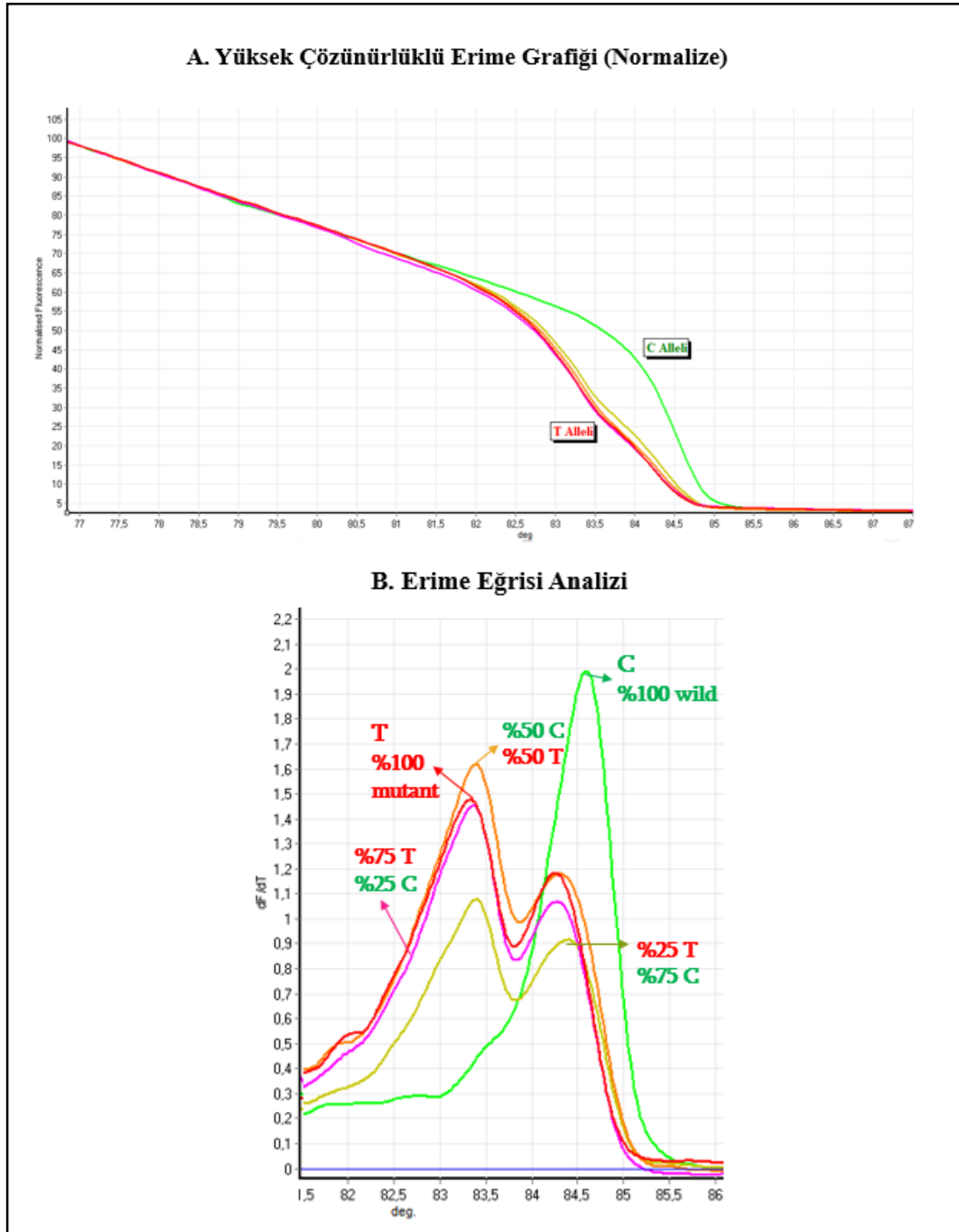


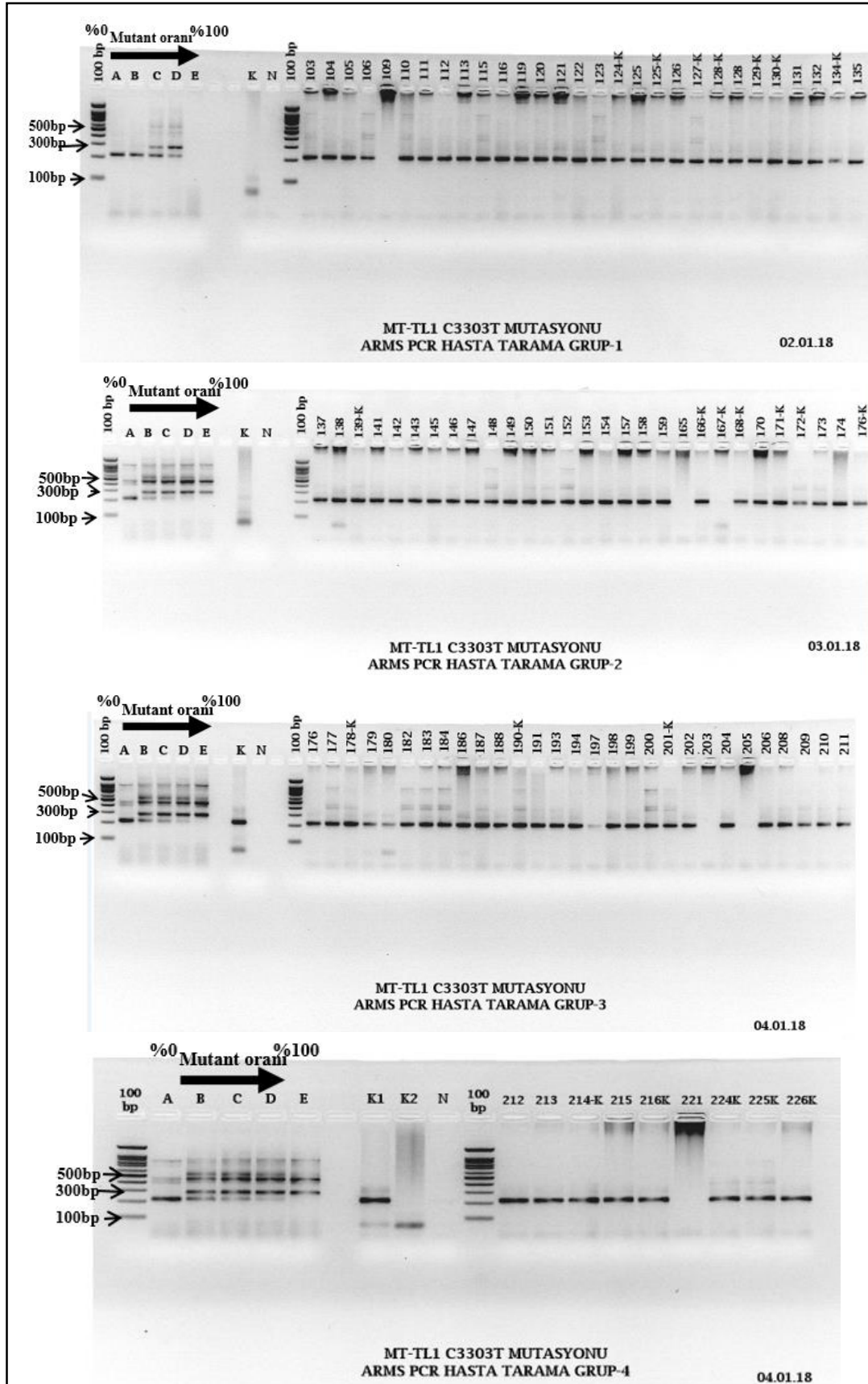
**Şekil 4.24** m.3291 T>C mutasyonu taramalarında m.3290 T>C varyasyonu pozitif çıkan 814 numaralı hasta örneğinin agaroz jel elektroforezi, erime eğrisi ve dizileme sonucu.

#### 4.6 m.3303 C>T Mutasyon Taraması ve dizi analizi ile doğrulama

Tablo 3.9’da verilen şartlara uygun olarak hazırlanan ARMS-PZT’nin sentetik kontrollerine ait yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi Şekil 4.25’de verilmiştir. Erime eğrisi analizinde farklı oranlarda mutant allel içeren sentetik kontrollerin mutant ve yabancıl tipteki alleller için verdiği erime tepelerinin farklı noktalarda bulunduğu tespit edilmiştir. Belirgin olarak yabancıl tipteki allel için 84,5 °C’de, mutant allel için 83,5 °C’de erime tepesi oluştuğu gözlemlenmiştir. (Şekil 4.25). 219 hasta örneğiyle yapılan taramaların agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 4.26-4.28’de bulunmaktadır.

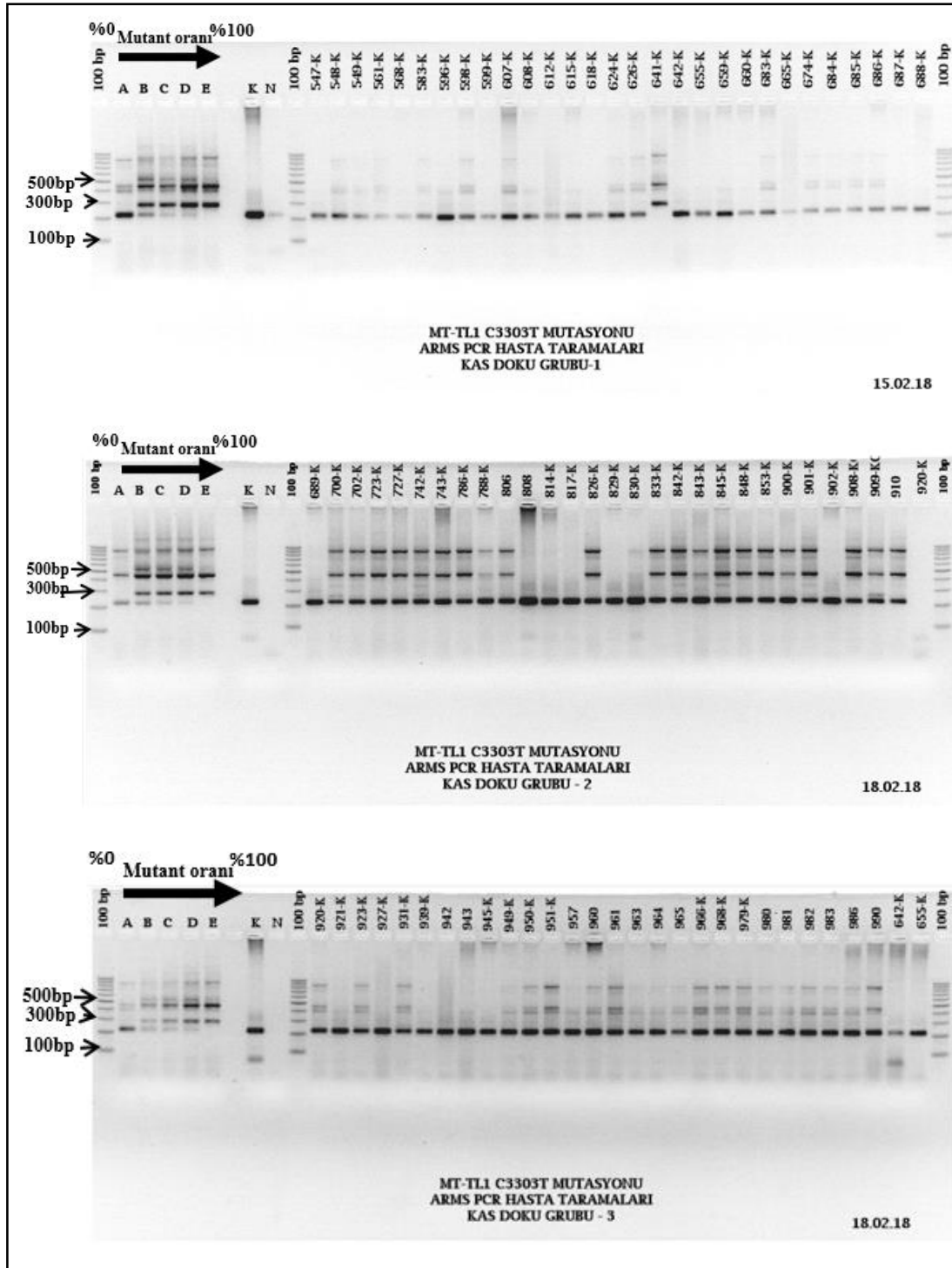
ARMS-PZT taramaları sonucunda bir hastanın homoplazmik olarak m.3303 C>T mutasyonu taşıdığı belirlenmiş, bu mutasyonun HRM ve dizileme yöntemiyle analizi yapılmış, mutasyonun varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.29).



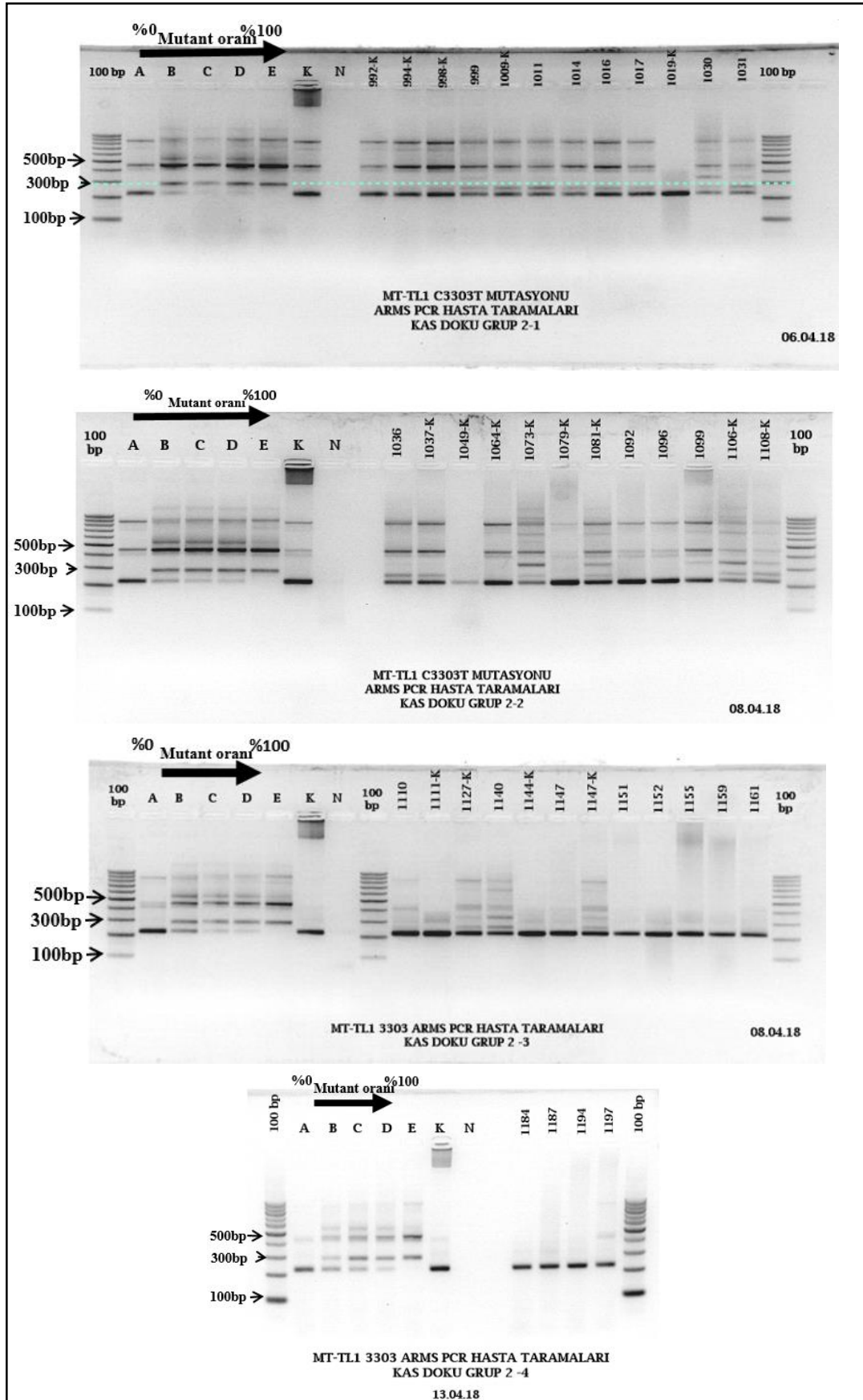


Şekil 4.26 m.3303 T>C mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları -1.

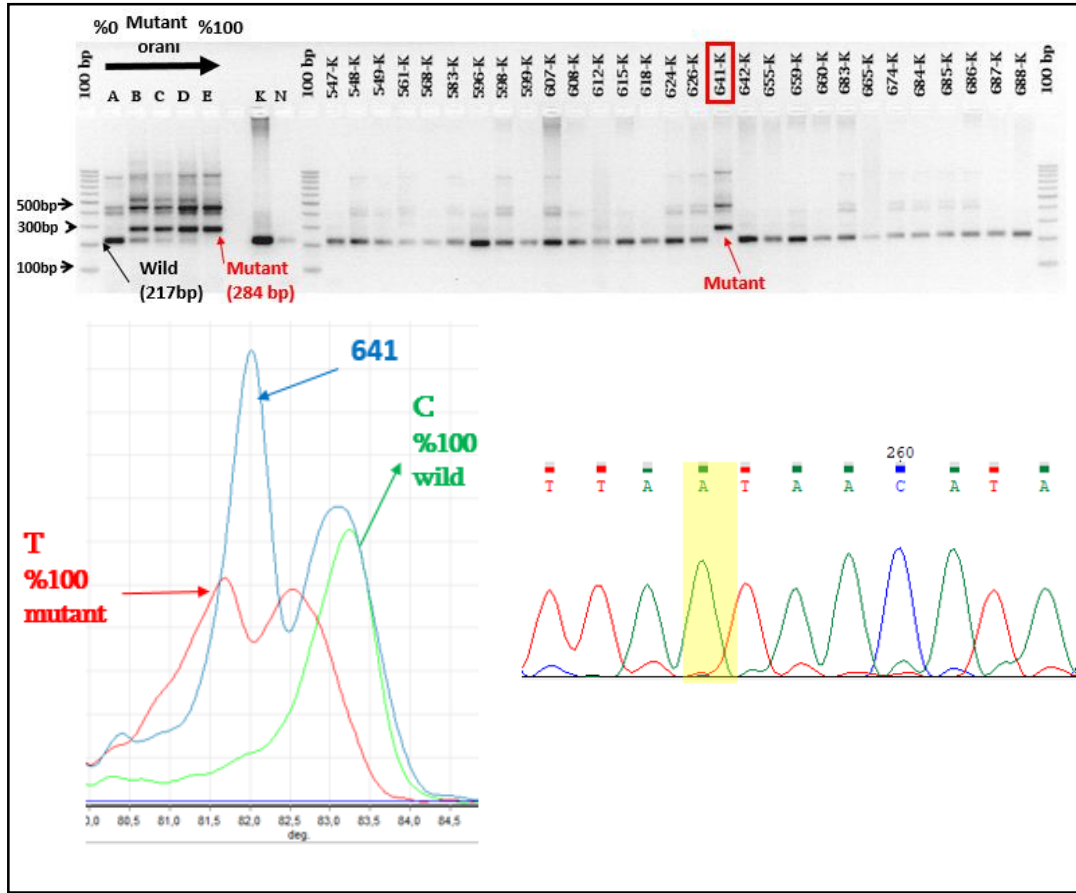




Şekil 4.27 m.3303 T>C mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları -2.



Şekil 4.28 m.3303 T>C mutasyonu ARMS-PCR hasta taramaları -3.



Şekil 4.29 m.3303 T>C mutasyonu taramalarında pozitif çıkan 641 numaralı hasta örneğinin agaroz jel elektroforezi, erime eğrisi ve dizileme sonuçları.

## 5. TARTIŞMA

Mitokondriyal sitopatiler, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon işlev bozukluklarının neden olduğu, klinik ve genetik heterojenitenin görüldüğü, multi-sistemik bir hastalık grubudur. Mitokondriyal sitopati öntanısı, hastanın klinik bulguları, aile geçmişi ve biyokimya testleri göz önünde bulundurularak verilir. Klinik kimya incelemelerinde hasta serumunda, yüksek laktat/piruvat oranı, yüksek alanin düzeyi ve TCA döngüsü ara ürünlerinde bir artış olması durumu mitokondriyal işlev bozukluklarına işaret etmektedir (5). Ancak bu belirteçler mitokondriyal hastalıkların taranmasında ve tanılanmasında tek başına kullanılabilecek hassasiyette ve güvenilirlikte değildir. Moleküler tanı testler bu belirteçlerin yanında açık, güvenilir ve hızlı sonuçlar sağlayabildikleri için mitokondriyal sitopati ön tanılı hastalarda mtDNA nokta mutasyonlarının incelenmesinde ilk adım olarak değerlendirilir (5).

Bu tez çalışması kapsamında mitokondriyal sitopati öntanlı hastalar için *MT-TL1* geninde belirlenen altı nokta mutasyonunun hedeflendiği ARMS-PZT tabanlı bir tarama testi geliştirilmiştir. Taramalarda hastalara ait periferik kan ve kas doku örnekleri kullanılmıştır. Periferik kan örnekleri, kolay ulaşılabilir olmalarıyla genetik tanı ve tarama testlerinde sıklıkla tercih edilse de mitokondriyal sitopati analizlerinde düşük heteroplazmi nedeniyle yalancı negatif sonuç verme olasılığı yüksek olan örneklerdir. Örneğin m.3243 A>G mutasyon yükünün negatif seçimle yaşam süresi boyunca azaldığı ve ilerleyen yaşlarda periferik kan örneklerinde belirlenmesinin güçleştiği bilinmektedir (103,104). Bu nedenle çalışmada, dağılım hacmi göz önünde bulundurularak tutulumun en sık gözlemlendiği doku olan kas doku örneklerinin kullanılmasına öncelik verilmiş; mitokondriyal sitopati öntanısı alan hastalara ait 78 kan örneğine karşı, 140 kas doku örneği ve bir karaciğer doku örneği taranmıştır. Tarama sonucunda iki pediyatrik hastanın periferik kan örneklerinde heteroplazmik m.3243 A>G mutasyonu belirlenirken, pediyatrik bir hastanın kas örneğinde homoplazmik m.3290 T>C varyasyonu ve başka bir pediyatrik hastanın kas örneğinde homoplazmik m.3303 C>T mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

m.3243 A>G mutasyonunun Finlandiya'da yapılan bir çalışmada yetişkin popülasyonundaki prevalansının 16,3/100,000 olduğu belirlenmiştir (71). Bu çalışma

kapsamında 219 hasta arasında m.3243 A>G mutasyonu taşıdığı tespit edilen iki hasta bulunmaktadır. Hastalar 1996 yılında anabilim dalımıza yönlendirilmiş olup, genetik tanı laboratuvarımızda PZT ve ApaI enzim kesimleri sonucunda m.3243 A>G mutasyonu taşıdığı belirlenerek raporlanmış hastalardır. Geliştirilen tarama testi sonucunda bu mutasyonların hastalardaki varlığı doğrulanarak, tarama testinin hassasiyeti ortaya konulmuştur.

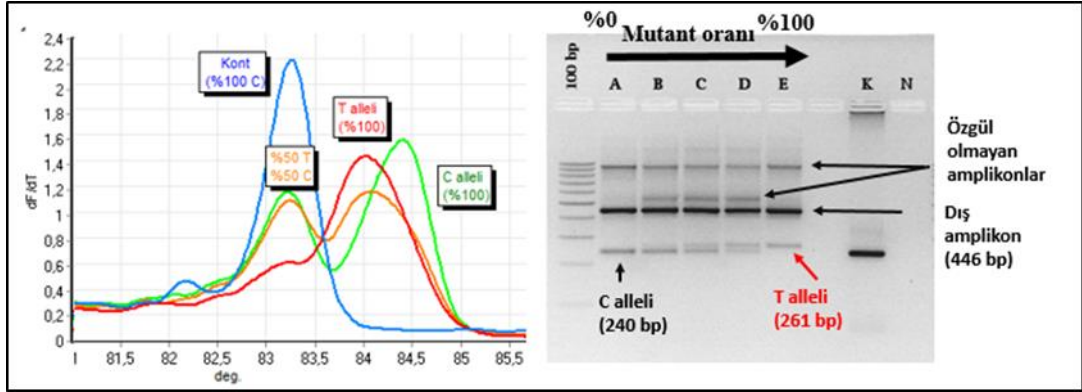
m.3291 T>C mutasyonu için tasarlanan ARMS-PZT taramaları sonucunda bir hastanın kas doku örneğinde homoplazmik m.3290 T>C varyasyonu belirlenmiştir. Hastanın 2005 yılında çocuk nöroloji birimine başvurduğu ve klinik muayenesinde yağlı karaciğer ve hipotoni bulgularının belirgin olduğu raporlanmıştır. Geçmişte genetik tanı laboratuvarında yapılan testlerde hastanın kas doku örneğinde MELAS ile ilişkilendirilen m.3243 A>G mutasyonu, MERRF ile ilişkilendirilen m.8344 A>G mutasyonu ve *common* delesyon negatif olarak raporlanmıştır. MITOMAP veri tabanında patojenik olmayan varyasyon olarak geçen m.3290 T>C, literatürdeki bazı vakalarda yüksek tansiyon (105) ve ani bebek ölümü sendromuyla (106) ilişkilendirilmiştir.

ARMS-PZT taramaları sonucunda bir hastada homoplazmik olarak nadir m.3303 C>T mutasyonu belirlenmiştir. Bu mutasyonun raporlandığı vaka sayısı literatürde oldukça az olmakla birlikte 1994'te Silvestri ve Bruno'nun yaptığı çalışmalar mutasyonun kardiyomiyopati ilişkili olduğunu göstermektedir (Bkz. 2.4 *MT-TL1* Geni bölümü). 2003 yılında Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'na başvuran hastanın klinik muayenesinde retinada tuz-biber manzarası, başını dik tutamama ve azalmış cilt altı yağ dokusu belirlenmiş; geçmişte yapılan genetik tanı testlerinde hastanın kas doku örneğinde m.3243 A>G, m.8344 A>G mutasyonları ve *common* delesyon negatif olarak raporlanmıştır.

**Tablo 5.1** ARMS-PZT taramaları sonucunda *MT-TL1* geninde mutasyon tespit edilen hastalar.

Hasta	Örnek türü	Mutasyon		Cinsiyet
111	Kan	m.3243 A>G	Heteroplazmi	Kız
135	Kan	m.3243 A>G	Heteroplazmi	Erkek
814	Kas	m.3290 T>C	Homoplazmi	Erkek
641	Kas	m.3303 C>T	Homoplazmi	Erkek

Tez çalışması kapsamında geliştirilen ARMS-PZT, m.3243 A>G, m.3256 C>T, m.3291 T>C, m.3303 C>T mutasyonları için agaroz jel elektroforezinde kalitatif ve kantitatif olarak ayırıcı nitelik göstermektedir. Özellikle m.3243 A>G mutasyonu taramalarında yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizlerinde ayırıcı sonuçlar alınmış, ARMS-PZT tanımlayıcı hassasiyetinin HRM analiziyle artırılabilirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Mitokondriyal sitopatilerle ilişkilendirilen diğer beş nokta mutasyonu için gerçekleştirilen tarama tepkimelerinde HRM analizlerinin ayırıcı hassasiyetinin azaldığı, mutant amplikon ile yabancı tipteki amplikonun aynı sıcaklıklarda erime profilleri oluşturabildiği saptanmıştır. Bu tarama tepkimelerinde primerlerin özgül olmayan bağlanmalar yapması ve ikincil yapılar oluşturması nedeniyle ayırıcı bir sonuç alınamamıştır. HRM analizleri oldukça hassas olup 300 bazdan daha uzun amplikonlar için ayırıcı hassasiyetini kaybeden yöntemlerdir (91). Amplikon uzunluğu arttıkça küçük dizi değişikliklerinin meydana gelme ihtimali daha da artar, bu nedenle HRM analizinde birden fazla erime noktası belirlenebilir. Amplikonun uzunluğu arttıkça erime *domainlerinin* de artması beklenen bir etkidir. ARMS-PZT sonucunda allele özgü olmayan dış primerlerin çoğalttığı amplikon boyları 446 bç ve 329 bç uzunluğundayken allele özgü iç primerlerle çoğaltılan amplikonların boyları 300 bç'inden kısadır. Yapılan optimizasyon çalışmalarında allele özgü olmayan uzun aplikonların amplifikasyonu engellenemediği gibi bazı primerlerin özgül olmayan ürünler vermesi de söz konusudur. Tüm bu sonuçlar HRM analizinin nokta mutasyonları üzerindeki ayırıcı gücünü olumsuz etkilemektedir (Şekil 5.1).



**Şekil 5.1** m.3256 C>T mutasyonu için tasarlanan primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanması sonucunda elde edilen erime eğrisi grafiği.

Geliştirilen ARMS-PZT tarama sisteminin HRM analizine uygunluğunun arttırılabilmesi  $MgCl_2$  titrasyonu ile mümkündür. Ancak yapılan çalışmalarda m.3256 C>T, m.3260 A>G ve m.3271 T>C mutasyonları için 3,5 mM'lık  $MgCl_2$  konsantrasyonundan daha az  $MgCl_2$  konsantrasyonu ile çalışıldığında, allele özgü primerlerin bağlanma etkisinin azaldığı belirlenmiştir.

Çalışmada, m.3271 T>C ve m.3260 A>G mutasyonlarına özgü tasarlanan iç primerlerin birbirleriyle yarış içerisine girdiği, mutasyon analiz tepkimesinde kalitatif-kantitatif ayrımın zorlaştığı ve yabancı tipteki alleller için tasarlanan primerlerin mutant allellere de bağlandığı belirlenmiştir (Bkz. 3.4.3 ve 3.4.4). Bu ARMS-PZT taramalarının, mutasyon belirlenmesinde kantitatif ayırıcı özelliği bulunmamakta; ancak kalitatif olarak ayırıcı hassasiyeti bulunmaktadır. İki tepkime de homoplazmik yabancı tipteki allel için belirleyici nitelikteyken, homoplazmik mutant tipteki allel varlığında ayırıcı nitelik göstermemektedir. Nokta mutasyonlarının bulunduğu bölgelerin baz içeriklerinin farklılık göstermesi, mutasyonun olduğu bazın 5' ve 3' de kalan dizilerin farklı oranlarda GC içeriği bulundurması gibi faktörler, tasarlanan primerlerin  $T_m$ 'lerini etkilemektedir. ARMS-PZT'nde iki farklı primer çiftinin birbirleriyle uyum içinde çalışırılığının en önemli kriterlerinden birisi de  $T_m$  değerlerinin birbirine yakın olmasıdır. Çalışmanın başlarında m.3260 A>G mutasyonu taramaları için tasarlanan iç primerlerin  $T_m$ 'leri arasında 10 °C'lik bir fark bulunması ve bu farkın iç primerlerin (59,9 °C – 69,9°C) dış primerlerle (60 °C – 61 °C) uyum içerisinde çalışmasını da etkilemesi söz konusu olmuştur (Bkz. 4.3). Bu nedenle bu mutasyon için yeni primer çifti tasarlanmış ve m.3260 A>G forward primerlerinin 5'

ucundan 7 bazlık bir kesim yapılarak, T<sub>m</sub>'i 61,8 °C'ye getirilmiştir. Benzer yaklaşımla m.3260 A>G reverse primerinin T<sub>m</sub>'i de 55.1 °C'e getirilmiş ve tepkime bu primerlerle optimize edilmiştir.

ARMS-PZT m.3260 A>G mutasyonu taramalarının agaroz jel elektroforezi sonucunda beş hastanın bu mutasyonu heteroplazmik olarak taşıdığı belirlenmiştir. Ancak belirlenen hastaların dizileme sonucunda mutasyon taşımadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Çalışmanın tek yalancı pozitif sonuçları m.3260 A>G mutasyonu taramalarında elde edilmiştir. Bu sonuçlarda, mutasyon noktasına özgül tasarlanan iç primerin özgül olmayan bağlanmalar yaparak, beklenen ampikon uzunluğuna yakın bir başka ampikon çoğaltması söz konusudur. Ayrıca taranılan hastaların DNA miktarının fazla olması da arka planda amplifikasyon alınmasında etkilidir. Shaykholeslam Esfahani ve arkadaşları, geliştirdikleri PAH mutasyonlarını belirlemeye yönelik ARMS-PZT teknolojisinde primer ve kalıp arasında belirli bir oran olması gerektiğini vurgulayarak 25-27 ng civarında DNA kullanılan deneylerde en etkili sonuçları aldıklarını belirtmişlerdir (90). Tarama grubu içerisindeki her hastanın total DNA örneğinin farklı oranlarda mtDNA kopya sayısı içermesi ve bazı örneklerde mtDNA kopyasını yoğun olması da mutant primerin yabancı tipteki alleli çoğaltması neden olabilmektedir.

m.3271 T>C mutasyonu için tasarlanan iç primerlerin arasında ciddi bir T<sub>m</sub> farkı olmamasına rağmen sentetik kontroller arasında 100% yabancı tip içeren örnekten %100 mutant allel içeren örneğe doğru kademeli bir kantitatif ampikon geçişi gözlemlenmemiştir. Optimizasyon sürecinde yabancı tipteki primerin bağlanma eğiliminin mutant primere göre daha az olduğu tespit edilmiş, tepkime karışımındaki konsantrasyonu iki katına çıkartılınca da %100 mutant kontrolden de yabancı tip primer amplifikasyonu alındığı tespit edilmiştir (Bkz. Ek 2). İç primerlerin dış primerlere oranla konsantrasyonlarının iki katına çıkartılması sonucunda ise 100% mutant allel içeren standartın yabancı tipteki allele özgül ampikonun boyuna çok yakın olan özgül olmayan bir ampikon verdiği gözlemlenmiştir. Mutasyonun yer aldığı dizinin baz içeriğinden dolayı tıpkı m.3260 A>G mutasyonu tarama tepkimelerinde olduğu gibi m.3271 T>C mutasyonu taramalarında da kantitatif bir ayırım yapılamayacağı belirlenmiştir. Çalışma kapsamında m.3260 A>G mutasyonu ve m.3271 T>C mutasyonu taramalarında mitokondriyal sitopati öntanısı alan hastaların



yüksek mitokondri içeriğiyle mtDNA mutasyonlarının tespitinde yüksek belirleyici özelliği olan kas doku örnekleri (123 örnek) kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında m.3243 A>G, m 3256 C<T, m.3291 T>C ve m.3303 C>T mutasyonları için tanımlayıcı hassasiyeti yüksek olan bir ARMS-PZT tarama testi geliştirilmiştir. Geliştirilen tarama testi 1,5 saat gibi kısa bir sürede *MT-TL1* gen mutasyonlarının saptanmasını sağlayarak ucuz ve güvenilir bir tarama alternatifi sunmaktadır.

Bu tez kapsamında geliştirilen tarama testi mitokondriyal sitopati hastalarında görülen nadir mtDNA mutasyonlarının taranabilmesi için ileriye yönelik teknolojik bir kavram kanıtı sunmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1 Sonuçlar

- Bu tez çalışması kapsamında 1995 yılından günümüze mitokondriyal sitopati ön tanısı olarak bölümümüze yönlendirilmiş 219 hastanın kan ve/veya kas doku örnekleri taranmıştır.
- *MT-TL1* geninde meydana gelen nadir mutasyonlar m.3260 A>G, m.3256 C>T, m.3291 T>C ve m.3303 C>T için hassas bir tarama alternatifi sunan ARMS-PZT, m.3260 A>G ve m.3271 T>C mutasyonlarında dizi özelliklerinin sınırlayıcı olması nedeniyle yeterince hassas bir analiz yöntemi sunmamaktadır.
- Tarama sonucunda iki hastanın heteroplazmik m.3243 A>G mutasyonu, bir hastanın homoplazmik m.3290 T>C varyasyonu ve bir hastanın da homoplazmik m.3303 C>T mutasyonu taşıdığı tespit edilmiştir.
- Bu çalışma kapsamında m.3290 T>C ve m.3303 C>T gibi oldukça nadir görülen mutasyonların belirlenmesi, bölümümüze yönlendirilen mitokondriyal sitopati ön tanılı hasta örnekleri içerisinde m.3243 A>G mutasyonu dışında diğer *MT-TL1* mutasyonlarının da olduğunu kanıtlar niteliktedir.
- Bu yeni yöntem, *MT-TL1* nokta mutasyonlarının saptanmasında ucuz, güvenilir ve hızlı bir alternatif sunmaktadır. Bu çalışma ve sonuçları, hastalarda nadir gözlenen diğer mtDNA varyasyonlarının da taranabilmesi için ileriye yönelik yeni ve teknolojik “kavram kanıtı” ortaya koymaktadır.

### 6.2 Öneriler

- Taramalar sonucunda mitokondriyal sitopati öntanıli hastalarda belirlenen nadir m.3290 T>C ve m.3303 C>T mutasyonlarının Türk toplumunda insidansının araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılabilir; oluşturdukları özgün klinik tabloların belirlenerek Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı laboratuvarının genetik test yelpazesinin geliştirilmesine katkıda bulunulabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., Woese, C.R. (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (13), 4443-4447.
2. Suzuki, T., Nagao, A., Suzuki, T. (2011) Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet*, 45, 299-329.
3. El-Hattab, A.W., Adesina, A.M., Jones, J., Scaglia, F. (2015) MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab*, 116 (1-2), 4-12.
4. Stenqvist, L., Paetau, A., Valanne, L., Suomalainen, A., Pihko, H. (2005) A juvenile case of MELAS with T3271C mitochondrial DNA mutation. *Pediatr Res*, 58 (2), 258-262.
5. Wong, L.J., Scaglia, F., Graham, B.H., Craigen, W.J. (2010) Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Mol Genet Metab*, 100 (2), 111-117.
6. Suomalainen, A. (2015) Mitochondrial roles in disease: a box full of surprises. *EMBO Mol Med*, 7 (10), 1245-1247.
7. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N. ve diğerleri. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 17 (7), 2503-2516.
8. Andersson, S.G., Kurland, C.G. (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Opin Microbiol*, 2 (5), 535-541.
9. Gray, M.W. (2001). Mitochondria A2 - Brenner, Sydney. J. H. Miller (Ed.). Encyclopedia of Genetics (s. 1215-1217). New York: Academic Press
10. Krebs, H.A., Johnson, W.A. (1937) Acetopyruvic acid (alphagamma-diketovaleric acid) as an intermediate metabolite in animal tissues. *Biochem J*, 31 (5), 772-779.
11. Akram, M. (2014) Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*, 68 (3), 475-478.
12. van den Brom, C.E., Bulte, C.S., Loer, S.A., Bouwman, R.A., Boer, C. (2013) Diabetes, perioperative ischaemia and volatile anaesthetics: consequences of derangements in myocardial substrate metabolism. *Cardiovasc Diabetol*, 12, 42.
13. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287 (4), C817-833.
14. Whelan, S.P., Zuckerbraun, B.S. (2013) Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 351613.

15. Grabacka, M.M., Gawin, M.,Pierzchalska, M. (2014) Phytochemical modulators of mitochondria: the search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)*, 7 (9), 913-942.
16. Jazwinski, S.M. (2005) Rtg2 protein: at the nexus of yeast longevity and aging. *FEMS Yeast Res*, 5 (12), 1253-1259.
17. Cardamone, M.D., Tanasa, B., Cederquist, C.T., Huang, J., Mahdaviani, K., Li, W. ve diğeri. (2018) Mitochondrial Retrograde Signaling in Mammals Is Mediated by the Transcriptional Cofactor GPS2 via Direct Mitochondria-to-Nucleus Translocation. *Mol Cell*, 69 (5), 757-772 e757.
18. Weinberg, S.E.,Chandel, N.S. (2015) Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*, 11 (1), 9-15.
19. Chatterjee, A., Dasgupta, S.,Sidransky, D. (2011) Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4 (5), 638-654.
20. Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39, 359-407.
21. Wallace, D.C. (1992) Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, 61, 1175-1212.
22. Nicholls, T.J.,Minczuk, M. (2014) In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol*, 56, 175-181.
23. Stewart, J.B.,Chinnery, P.F. (2015) The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*, 16 (9), 530-542.
24. Yasukawa, T., Yang, M.Y., Jacobs, H.T.,Holt, I.J. (2005) A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell*, 18 (6), 651-662.
25. Satoh, M.,Kuroiwa, T. (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res*, 196 (1), 137-140.
26. Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B.,Keightley, P.D. (2008) Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 6 (8), e204.
27. Xu, S., Schaack, S., Seyfert, A., Choi, E., Lynch, M.,Cristescu, M.E. (2012) High mutation rates in the mitochondrial genomes of *Daphnia pulex*. *Mol Biol Evol*, 29 (2), 763-769.
28. Bohr, V.A., Stevnsner, T.,de Souza-Pinto, N.C. (2002) Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286 (1), 127-134.
29. Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H.,Copeland, W.C. (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (21), 12244-12248.
30. Schwartz, M.,Vissing, J. (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*, 347 (8), 576-580.

31. Zhao, X., Li, N., Guo, W., Hu, X., Liu, Z., Gong, G. ve diğerleri. (2004) Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity (Edinb)*, 93 (4), 399-403.
32. Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402 (6760), 371-372.
33. Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C. ve diğerleri. (2011) Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 334 (6059), 1144-1147.
34. Rojansky, R., Cha, M.Y., Chan, D.C. (2016) Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife*, 5.
35. Chen, D., Clark, A.T. (2018) Mitochondrial DNA selection in human germ cells. *Nat Cell Biol*, 20 (2), 118-120.
36. Floros, V.I., Pyle, A., Dietmann, S., Wei, W., Tang, W.C.W., Irie, N. ve diğerleri. (2018) Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. *Nat Cell Biol*, 20 (2), 144-151.
37. Miller, F.J., Rosenfeldt, F.L., Zhang, C., Linnane, A.W., Nagley, P. (2003) Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res*, 31 (11), e61.
38. Chen, N., Wen, S., Sun, X., Fang, Q., Huang, L., Liu, S. ve diğerleri. (2016) Elevated Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood and Tissue Predict the Opposite Outcome of Cancer: A Meta-Analysis. *Sci Rep*, 6, 37404.
39. Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.P., Letellier, T. (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*, 370 (Pt 3), 751-762.
40. Taylor, R.W., Turnbull, D.M. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 6 (5), 389-402.
41. Hehman, G.L., Hauswirth, W.W. (1992) DNA helicase from mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (18), 8562-8566.
42. Wong, T.W., Clayton, D.A. (1985) Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *J Biol Chem*, 260 (21), 11530-11535.
43. Bogenhagen, D.F., Pinz, K.G. (1998) The action of DNA ligase at abasic sites in DNA. *J Biol Chem*, 273 (14), 7888-7893.
44. Kocaefe, C. (2011) Mitokondriyal Sitopatiler. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Özel Dergisi*, 4 (2), 87-92.
45. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2015). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book: Elsevier Health Sciences*.
46. McKenzie, M., Ryan, M.T. (2010) Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. *IUBMB Life*, 62 (7), 497-502.

47. Nunnari, J., Suomalainen, A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148 (6), 1145-1159.
48. Wallace, D.C. (1986) Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance. *Somat Cell Mol Genet*, 12 (1), 41-49.
49. Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W., Wallace, D.C. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, 61 (6), 931-937.
50. Shoffner, J.M., Kaufman, A., Koontz, D., Krawiecki, N., Smith, E., Topp, M. ve diğerleri. (1995) Oxidative phosphorylation diseases and cerebellar ataxia. *Clin Neurosci*, 3 (1), 43-53.
51. Suomalainen, A. (2011) Therapy for mitochondrial disorders: little proof, high research activity, some promise. *Semin Fetal Neonatal Med*, 16 (4), 236-240.
52. Rahman, S., Blok, R.B., Dahl, H.H., Danks, D.M., Kirby, D.M., Chow, C.W. ve diğerleri. (1996) Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol*, 39 (3), 343-351.
53. Lake, N.J., Bird, M.J., Isohanni, P., Paetau, A. (2015) Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74 (6), 482-492.
54. Rahman, S., Thorburn, D. (1993). Nuclear Gene-Encoded Leigh Syndrome Overview. M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens & A. Amemiya (Ed.). GeneReviews((R)). Seattle (WA)
55. Shemesh, A., Margolin, E. (2018). Kearns Sayre Syndrome. StatPearls. Treasure Island (FL)
56. Yamashita, S., Nishino, I., Nonaka, I., Goto, Y. (2008) Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *J Hum Genet*, 53 (7), 598-606.
57. Park, J., Ryu, H., Jang, W., Chae, H., Kim, M., Kim, Y. ve diğerleri. (2015) Novel 5.712 kb mitochondrial DNA deletion in a patient with Pearson syndrome: a case report. *Mol Med Rep*, 11 (5), 3741-3745.
58. Fukuhara, N., Tokiguchi, S., Shirakawa, K., Tsubaki, T. (1980) Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities ): disease entity or a syndrome? Light- and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci*, 47 (1), 117-133.
59. DiMauro, S., Hirano, M. (1993). Merrf. M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens & A. Amemiya (Ed.). GeneReviews((R)). Seattle (WA)
60. Shoffner, J.M., Wallace, D.C. (1992) Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am J Hum Genet*, 51 (6), 1179-1186.
61. Gorman, G.S., Schaefer, A.M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E.L., Alston, C.L. ve diğerleri. (2015) Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*, 77 (5), 753-759.

62. Pavlakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., De Vivo, D.C., Rowland, L.P. (1984) Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol*, 16 (4), 481-488.
63. Goto, Y., Nonaka, I., Horai, S. (1990) A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348 (6302), 651-653.
64. Moraes, C.T., Ciacci, F., Bonilla, E., Jansen, C., Hirano, M., Rao, N. ve diğerleri. (1993) Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA(Leu)(UUR) gene an etiologic hot spot? *J Clin Invest*, 92 (6), 2906-2915.
65. Sato, W., Hayasaka, K., Shoji, Y., Takahashi, T., Takada, G., Saito, M. ve diğerleri. (1994) A mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation at 3,256 associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Mol Biol Int*, 33 (6), 1055-1061.
66. Hayashi, J., Ohta, S., Takai, D., Miyabayashi, S., Sakuta, R., Goto, Y. ve diğerleri. (1993) Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA(Leu)(UUR) gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function. *Biochem Biophys Res Commun*, 197 (3), 1049-1055.
67. Sakuta, R., Goto, Y., Horai, S., Nonaka, I. (1993) Mitochondrial DNA mutations at nucleotide positions 3243 and 3271 in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a comparative study. *J Neurol Sci*, 115 (2), 158-160.
68. Goto, Y., Tsugane, K., Tanabe, Y., Nonaka, I., Horai, S. (1994) A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun*, 202 (3), 1624-1630.
69. Goto, Y. (1995) Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve Suppl*, 3, S107-112.
70. Kobayashi, Y., Momoi, M.Y., Tominaga, K., Momoi, T., Nihei, K., Yanagisawa, M. ve diğerleri. (1990) A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun*, 173 (3), 816-822.
71. Majamaa, K., Moilanen, J.S., Uimonen, S., Remes, A.M., Salmela, P.I., Karppa, M. ve diğerleri. (1998) Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet*, 63 (2), 447-454.
72. Uusimaa, J., Moilanen, J.S., Vainionpää, L., Tapanainen, P., Lindholm, P., Nuutinen, M. ve diğerleri. (2007) Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. *Ann Neurol*, 62 (3), 278-287.

73. Nam, S.C., Kang, C. (2005) DNA light-strand preferential recognition of human mitochondria transcription termination factor mTERF. *J Biochem Mol Biol*, 38 (6), 690-694.
74. Yakubovskaya, E., Mejia, E., Byrnes, J., Hambardjjeva, E., Garcia-Diaz, M. (2010) Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription. *Cell*, 141 (6), 982-993.
75. Zeviani, M., Gellera, C., Antozzi, C., Rimoldi, M., Morandi, L., Villani, F. ve diğerleri. (1991) Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA(Leu)(UUR). *Lancet*, 338 (8760), 143-147.
76. Sweeney, M.G., Brockington, M., Weston, M.J., Morgan-Hughes, J.A., Harding, A.E. (1993) Mitochondrial DNA transfer RNA mutation Leu(UUR)A-->G 3260: a second family with myopathy and cardiomyopathy. *Q J Med*, 86 (7), 435-438.
77. Silvestri, G., Santorelli, F.M., Shanske, S., Whitley, C.B., Schimmenti, L.A., Smith, S.A. ve diğerleri. (1994) A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat*, 3 (1), 37-43.
78. Sue, C.M., Bruno, C., Andreu, A.L., Cargan, A., Mendell, J.R., Tsao, C.Y. ve diğerleri. (1999) Infantile encephalopathy associated with the MELAS A3243G mutation. *J Pediatr*, 134 (6), 696-700.
79. Pyle, A., Taylor, R.W., Durham, S.E., Deschauer, M., Schaefer, A.M., Samuels, D.C. ve diğerleri. (2007) Depletion of mitochondrial DNA in leucocytes harbouring the 3243A->G mtDNA mutation. *J Med Genet*, 44 (1), 69-74.
80. Yasukawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S., Watanabe, K. (2000) Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem*, 275 (6), 4251-4257.
81. Hirai, M., Suzuki, S., Onoda, M., Hinokio, Y., Hirai, A., Ohtomo, M. ve diğerleri. (1998) Mitochondrial deoxyribonucleic acid 3256C-T mutation in a Japanese family with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (3), 992-994.
82. Mariotti, C., Tiranti, V., Carrara, F., Dallapiccola, B., DiDonato, S., Zeviani, M. (1994) Defective respiratory capacity and mitochondrial protein synthesis in transformant cybrids harboring the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with maternally inherited myopathy and cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 93 (3), 1102-1107.
83. Liu, K., Zhao, H., Ji, K., Yan, C. (2014) MERRF/MELAS overlap syndrome due to the m.3291T>C mutation. *Metab Brain Dis*, 29 (1), 139-144.
84. Bruno, C., Kirby, D.M., Koga, Y., Garavaglia, B., Duran, G., Santorelli, F.M. ve diğerleri. (1999) The mitochondrial DNA C3303T mutation can cause cardiomyopathy and/or skeletal myopathy. *J Pediatr*, 135 (2 Pt 1), 197-202.



85. Arber, W. (1965) Host-controlled modification of bacteriophage. *Annu Rev Microbiol*, 19, 365-378.
86. Meselson, M., Yuan, R. (1968) DNA restriction enzyme from E. coli. *Nature*, 217 (5134), 1110-1114.
87. Smith, H.O., Wilcox, K.W. (1970) A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. *J Mol Biol*, 51 (2), 379-391.
88. Medrano, R.F., de Oliveira, C.A. (2014) Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*, 56 (7), 599-608.
89. Ryan, S.E., Ryan, F., O'Dwyer, V., Neylan, D. (2016) A real-time ARMS PCR/high-resolution melt curve assay for the detection of the three primary mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Mol Vis*, 22, 1169-1175.
90. Shaykholeslam Esfahani, M., Shaykholeslam Esfahani, E., Vallian, S. (2018) A novel compound-primed multiplex ARMS-PCR (CPMAP) for simultaneous detection of common PAH gene mutations. *Metab Brain Dis*.
91. Druml, B., Cichna-Markl, M. (2014) High resolution melting (HRM) analysis of DNA--its role and potential in food analysis. *Food Chem*, 158, 245-254.
92. Sun, W., Li, J.J., Xiong, C., Zhao, B., Chen, S.L. (2016) The Potential Power of Bar-HRM Technology in Herbal Medicine Identification. *Front Plant Sci*, 7, 367.
93. Meistertzheim, A.-L., Calves, I., Artigaud, S., Friedman, C.S., Paillard, C., Laroche, J. ve diğerleri. (2012) High Resolution Melting Analysis for fast and cheap polymorphism screening of marine populations.
94. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12), 5463-5467.
95. Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (2), 560-564.
96. Gastra, W. (1985) Chemical cleavage (maxam and gilbert) method for DNA sequence determination. *Methods Mol Biol*, 2, 333-341.
97. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N. (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 29 (17), E88-88.
98. Ke, S.H., Madison, E.L. (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res*, 25 (16), 3371-3372.
99. Tyagi, R., Lai, R., Duggleby, R.G. (2004) A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnol*, 4, 2.
100. Kammann, M., Laufs, J., Schell, J., Gronenborn, B. (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res*, 17 (13), 5404.

101. Cai, X., Jiao, C., Sun, H., Wang, X., Xu, C., Fei, Z. ve diğeri. (2017) The complete mitochondrial genome sequence of spinach, *Spinacia oleracea* L. *Mitochondrial DNA Part B*, 2 (1), 339-340.
102. Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., Greilhuber, J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*, 51 (2), 127-128; author reply 129.
103. Rajasimha, H.K., Chinnery, P.F., Samuels, D.C. (2008) Selection against pathogenic mtDNA mutations in a stem cell population leads to the loss of the 3243A->G mutation in blood. *Am J Hum Genet*, 82 (2), 333-343.
104. Rahman, S., Poulton, J., Marchington, D., Suomalainen, A. (2001) Decrease of 3243 A->G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: a longitudinal study. *Am J Hum Genet*, 68 (1), 238-240.
105. Zhu, H.Y., Wang, S.W., Liu, L., Chen, R., Wang, L., Gong, X.L. ve diğeri. (2009) Genetic variants in mitochondrial tRNA genes are associated with essential hypertension in a Chinese Han population. *Clin Chim Acta*, 410 (1-2), 64-69.
106. Opdal, S.H., Rognum, T.O., Torgersen, H., Vege, A. (1999) Mitochondrial DNA point mutations detected in four cases of sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*, 88 (9), 957-960.

## 8. EKLER

**EK-1:** *MT-TL1* Geni.

### *MT-TL1* GENİ

**5' – upstream**

.....atatcatctcaacttagtattataccacacccaccaagaacaggg  
ttt

**3,230-**

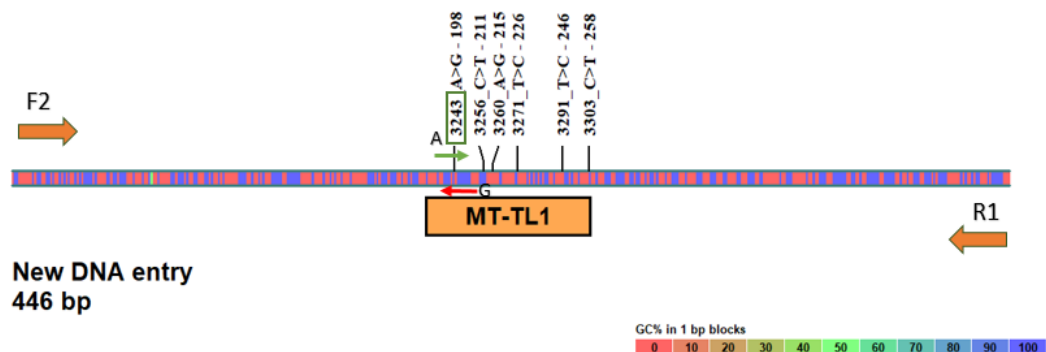
gtaagatggcagagcccggtaatcgcataaaacttaaactttacagtcagaggtt  
caattcctcttcttaaca

**3,304-**

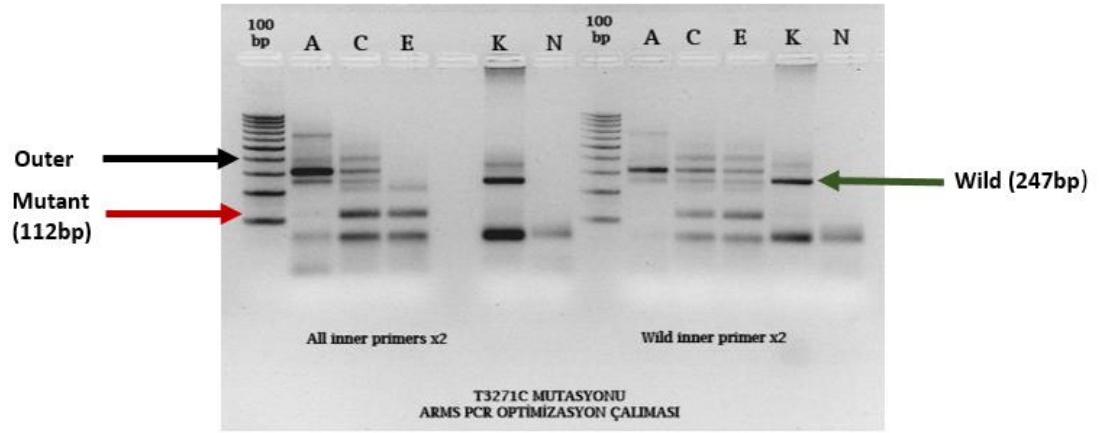
**3' downstream**

acatacccatggccaacctcctactcctcattgtaccattctaategca.....  
...

**EK-2:** ARMS-PZT primerlerinin hedeflediği *MT-TL1* gen bölgesi.



**EK-3:** m.3271 T>C mutasyonu ARMS-PZT optimizasyonu, iç primer konsantrasyon denemeleri.



**EK-4: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni**

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

Sayı : 16969557 - 870

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 13 HAZİRAN 2017 SALI  
**Toplantı No** : 2017/15  
**Proje No** : GO 17/519 (Değerlendirme Tarihi: 13.06.2017)  
**Karar No** : GO 17/519- 08

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Y. Çetin KOCAEFE' nin sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Sevim Erdem ÖZDAMAR, Doç. Dr. Can Ebru KURT, Prof. Dr. Haluk TOPALOĞLU, Prof. Dr. Göknur HALİLOĞLU ile birlikte çalışacakları ve Bengisu Kevser BULDUK' un yüksek lisans tezi olan, GO 17/519 kayıt numaralı, "**Mitokondriyal Sitopati Öntanılı Hastalarda MT-TL1 Gen Mutasyonlarının İncelenmesi**" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

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

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

**Adı-Soyadı:** Bengisu Kevser BULDUK

**Doğum yeri ve tarihi:** Ankara- 01/04/1993

**Uyruğu:** T.C

**İletişim Adresi ve Telefon:** Beştepe Mahallesi Cumhurbaşkanlığı Caddesi Çamlık Sitesi 3B/15 Yenimahalle, Ankara. / +90 506 618 32 28

### II- Eğitim

- 2016 -** Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
- 2011 – 2016** Lisans, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü
- 2007 – 2011** Gazi Üniversitesi Vakfı Özel Fen Lisesi

### III- Deneyimler

- Eylül 2016-** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD Araştırma Laboratuvarı, Kocaeve Lab, Yüksek Lisans Öğrencisi
- Haziran 2016- Eylül 2016** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD Araştırma Laboratuvarı, Kocaeve Lab, Stajyer
- Şubat 2016 - Haziran 2016** Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Bitki Genetiği ve Doku Kültürü Laboratuvarı, Kaya Lab, Proje Öğrencisi
- Temmuz 2015** İNTERGEN Genetik Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi, Stajyer
- Haziran 2015 – Temmuz 2015** Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Genombilim Birimi, Özdağ Lab, Stajyer

### IV- Bilimsel Faaliyetler

#### Bildiriler

Bulduk B.K., Bekircan-Kurt C.E , Erdem-Özdamar S., Kocaeve Y.Ç . “Mitokondriyal Sitopati Nedeni Olan MT-TL1 Mutasyonlarına Yönelik Yeni Bir Tanı Yöntemi: ARMS-PZT+HRM”(Sözlü Bildiri). III. Türkiye *in vitro* Diyagnostik Sempozyumu: Endokrin ve Metabolik Hatalıklar, Tanıdan Tedaviye Biyobelirteçler. İzmir, 28 Şubat-2 Mart 2018.

Bulduk B.K., Bekircan-Kurt C.E , Erdem-Özdamar S., Kocaeve Y.Ç. “Mitokondriyal Sitopati Öntanımlı Hastalarda MT-TL1 Gen Mutasyonlarının ARMS-PZT Yöntemi İle İncelenmesi”(Poster Sunumu). Türk Nöroloji Derneği Nöromusküler Hastalıklar Kongresi. Çeşme, İzmir, Aralık 15-17, 2017.