

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GLİAL TÜMÖRLERDE GÖZLEMLENEN mtDNA'NIN D-LOOP BÖLGESİ VARYASYONLARI

Dr. Ali MUTLUKAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr.Hakan KARABAĞLI

KONYA-2017

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GLİAL TÜMÖRLERDE GÖZLEMLENEN mtDNA'NIN D-LOOP BÖLGESİ VARYASYONLARI

Dr. Ali MUTLUKAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan KARABAĞLI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16102027 proje numarası ile desteklenmiştir.

UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı :

Uzmanlık Dalı :

Tez Danışmanı :

Tezin Adı :

Dr. Ali MUTLUKAN hazırlamış olduğu tezini …/…/2017 tarihinde aşağıda isimleri yazılı olan jüri huzurunda savunmuştur.

SONUÇ: **TEZ BAŞARILI ( )** **TEZ BAŞARISIZ ( )**

Jüri **Jüri** **Jüri**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği geçen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Hakan Karabağlı başta olmak üzere değerli hocam Doç. Dr.Ender Kökterkir e çok teşekkür ederim. Tez hazırlama sürecinde her konuda bilgi ve yardımını aldığım Prof. Dr. Murat Ayaz hocama, Doç. Dr. Aylin Köseler hocama ve Doç. Dr. Pınar Karabağlı hocama şükranlarımı sunarım. Tez sürecinde yardımını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Mert Şahinoğlu abime çok teşekkür ederim.

Birbirimizden her konuda çok şey öğrendiğimiz ve birlikte görev yapmaktan onur duyduğum kıymetli asistan arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Kliniğimizde birlikte çalıştığımız değerli, hemşire, sekreter, teknisyen ve personel arkadaşlarımıza, bu süre zarfındaki emekleri için teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu süreçte de arkamda olan ve desteklerini eksik etmeyen sevgili aileme derin sevgilerimi sunarım.

Dr.Ali MUTLUKAN

2017- Konya

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

KISALTMALAR v

GİRİŞ 1

1.1. Beyin Tümörleri 1

1.2.Beyin Tümörlerinin Oluşum Mekanizması 1

1.3.Beyin Tümörleri ve Mitokondriyal DNA 2

1.4.Mitokondrial yapı 3

1.5.Mitokondrinin Fonksiyonu: OXPHOS sistemi 4

1.6.Mitokondrial genom 6

1.7.Kanser hücrelerinde Warburg Teorisi ve Mitokondriyal Disfonksiyonu 8

1.8.Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS) ve Tümörigenezi 9

1.9. Apoptoz ve tümörigenez 11

1.10.Kanserde mitokondrial DNA mutasyonları 11

1.11.Somatik mDNA Değişiklikleri ve Beyin Tümörleri 12

1.12.Nokta mutasyonları 13

1.13.Delesyon 14

1.14. Mitokondrial Mikrosatellit Düzensizliği 14

1.15. Kopya Sayısı Değişiklikleri 15

1.16. Mitokondrial Gen Ekspresyonundaki Değişiklikler 15

2.YÖNTEM ve GEREÇLER 16

3.BULGULAR 25

4.TARTIŞMA 27

5.KAYNAKLAR 29

ÖZET 39
SUMMARY 40
ÖZGEÇMİŞ 41

KISALTMALAR

ATP : Adenosin Trifosfat

Asetil CoA : Asetil Koenzim A

Akt : Protein Kinaz B

HRM : yüksek çözünürlüklü eriyik

CDK-4 : Cyclin-Dependent Kinase 4

CSF : Beyin Omurilik Sıvısı

CDK-6 :Cyclin-Dependent Kinase 6 ETZ: Elektron Transfer Zinciri

EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Hsp60 : Şaperon Isı Şoku Proteini 60

F : Fenilalanin

OXPHOS : Mitokondri Oksidatif Fosforilasyon

H2O2 : Hidrojen Peroksit

OH : Hidroksil Radikali

MDM2 : Mouse Double Minute 2 Homolog

MtDNA : Mitokondrial Deoksiribonükleik Asit

$O2^{-}$: Süperoksit anyon radikali

mtMSI : Mitokondriyal Mikrosatellit İnstabilitesi

MnSOD : manganez SOD

PTEN : Fosfataz ve Tensin Homologları

RB : Retinoblastoma

ROS : Reaktif oksijen radikalleri

SOD : Süperoksit Dismutazlar

CuZnSOD : Sitozolik Bakır / Çinko SOD

Tfam: Mitokondriyal Transkripsiyon faktörü A

GİRİŞ

1.1. Beyin Tümörleri

Her türü kanser olmayan beyin tümörleri iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malign) olmak üzere iki grupta değerlendirilmektedir. Kanserli hücre barındırmayan iyi huylu (Benign) beyin tümörleri için cerrahi çözüm genellikle başarılı sonuçlar üretmektedir. Beynin hassas bölgelerine baskı yaparak ciddi sağlık problemlerine sebep olabilen bu tümör tipi için sınırlar net ve vücudun diğer yerlerine yayılma yapmadıkları şeklinde genel olarak tariflenebilirler([1-3]).Ancak bu tip tümörler çok nadirende olsa zamanla malign tümöre dönüşebilirler.

Diğer yandan kanser hücreleri bünyesinde barındıran kötü huylu (Malign, habis) beyin tümörleri ciddi ve hayatı tehlike oluşturucu niteliktedir. Sağlıklı hücrelere yayılma eğilimleri bulunan bu tümörler çok hızlı bir şekilde büyürler. Göreceli olarak nadiren de olsa malign beyin tümöründen ayrılan kanser hücreleri omurilik gibi vücudun diğer yerlerine yayılma yapabilirler (metastaz).

Pek çok gelişmiş ülkelerde yapılan araştırmalar beyin tümörü oluşumu ve sonucu olarak da mortalite insidansının arttığını işaret etmektedir ([4]).Merkezi sinir sistemi patolojilerinin en yıkıcı olanlarından birisi olan beyin tümörleri, 15 yaş altındaki çocuklarda solid tümör sebepli ölümlerin en temel sebebini oluşturmaktadır. İlaveten kanser nedeni ile ölen 20 ile 40 yaşlarındaki erkeklerin içerisinde beyin tümörleri ikinci sırada yer almaktadır ([5-10])

1.2.Beyin Tümörlerinin Oluşum Mekanizması

Literatürde şimdiye kadar tümörün oluşumu ve gelişimini konu eden araştırmalar çekirdek genindeki değişiklikler üzerine yoğun biçimde odaklanılmıştır ([11]). Beyin tümörleri gelişen nükleer genetik değişiklikler nedeniyle en çok rapor edilen patoloji tipidir. Beyin tümör hücreleri için, nükleer DNA ile kodlanan tümör süpresörü ve onkogenler gibi bazı iyi bilinen duyarlılık genlerinin de içinde bulunduğu çok sayıda genetik olay tespit edilmiştir. Örnek vermek gerekirse, p53 tümör süpresör geninin beyin tümörlerinde - özellikle astrositik tümörler oluşumunda- sıklıkla mutasyona uğramış ve/veya çoğunlukla erken dönemde değişmiş veya kaybolmuş olduğu saptanmıştır [12-14]. Benzer şekilde, Fosfataz ve tensin homologları (PTEN), p16 geni, retinoblastomanın (RB) mutasyonları veya kaybı, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), MDM2 (mouse double minute 2

homolog), sikline bağlı kinazlar [CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) ve CDK6'nın (cyclin-dependent kinase 6)] amplifikasyonu da beyin tümörleri patogenezinde görülebilir [15,16].

1.3.Beyin Tümörleri ve Mitokondriyal DNA

Her ne kadar nükleer kodlanmış genler için çoklu değişikliklerin tümör gelişimi ile ilişkili olduğu iyi bilinse de, yine de araştırılmak üzere başka bir faktör veya genomun var olduğunu düşünmek ve kabul etmek mantıklı bir seçenektir. Mitokondriyal genomun tümör oluşumu ve kanser ilerlemesiyle ilişkili olması literatürde halen tartışmalı bir durumdur([11]). Mitokondri aslen ökaryotik hücrede Yunanca da mitos (iplik) ve khondrion (tane) sözcüklerinin bir araya gelmesi ile oluşmuş sitoplazmik bir organellerdir. Hücrenin enerji santrali olarak tanımlanan mitokondri oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla hücresel enerji molekülü olan adenosin trifosfat (ATP) üretini sağlamaktır [17].

En genel anlatımı ile OXPHOS oksijen ile elektron transfer zincirinin (ETZ) oksidasyonu ile açığa çıkan bu enerjinin ATP'ye eş zamanlı dönüşümü olarak tanımlanabilir. OXPHOS sistemi beş protein kompleksinin birleşiminden oluşmaktadır. Bunlar ; Kompleks I , NADH-ubiquinone oksidoredüktaz, Kompleks II, sukinat-ubiquinone oksidoredüktaz, Kompleks III, ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz, Kompleks IV, sitokrom c oksidaz ve Kompleks V, ATP sentaz.

Enerji üretimine ek olarak mitokondri, hücre içi kalsiyum sinyalizasyonunda, hücresel metabolizmanın düzenlenmesinde, steroid sentezinde ve belki de en önemlisi apoptozun başlatılmasında ve uygulanmasında temel bileşen olarak karşımıza çıkmaktadır [18,19].

Geçtiğimiz son 25 yılda nöbet, ataksi, oftalmopleji, optik atrofi, kısa boy, sensorinöral işitme kaybı, kardiyomiyopati, diabetes mellitus ve böbrek yetmezliği gibi pek çok hastalıkta mitokondrial DNA (mtDNA) değişiklikleri ile ilişkili anormallikler tespit edilmiştir [20,21]. Yaşlanma ve yaşa bağlı çeşitli dejeneratif hastalıkların gelişiminde, değişmiş mtDNA birikiminin de önemli rol oynadığına inanılmaktadır [22]. Son yıllarda, OXPHOS sisteminin genetik kusurlarına bağlı olarak çeşitli kanser tiplerinde mitokondriyal disfonksiyonun rolü ön plana çıkmaktadır [23-28]. Fizyolojik koşullar altında OXPHOS sisteminin işleyişine katılan proteinler hem nDNA hem de mtDNA tarafından kodlanmaktadır. nDNA' dakine benzer şekilde, mtDNA mutasyonları ve delesyonları da beyin tümörleri de dahil olmak üzere çok çeşitli kanser tiplerinde tespit edilmiştir [29-37],

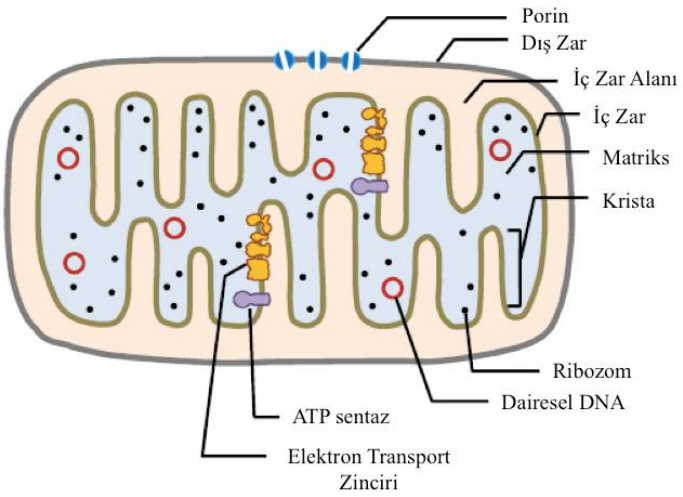
ancak bunların neden mi yoksa neoplastik sürecin bir sonucu mu olduğu halen belirsizliğini korumaktadır.

1.4.Mitokondrial yapı

Mitokondri, elektron mikroskobunda, enine 0,1 – 0,5 μm arasında ve değişken uzunlukta olan hücre içi dikdörtgen veya ovoid şekilli bir organel olarak gözlemlenir [38]. Mitokondrinin yapısı şekil 1' de gösterilmektedir. Çoğu ökaryotik hücre birden çok mitokondri içerir ve takriben bunlar total sitoplazma hacminin % 25' ini kaplar. Hücre içindeki mitokondri sayısı substrat ve oksijen miktarına bağlı olarak artış göstermektedir. Mitokondri ışık mikroskobu ile görünebilecek kadar büyük olmasına rağmen yapının ayrıntıları sadece elektron mikroskopu ile görülebilir niteliktedir.

Palade ve Sjöstrand tarafından yapılan elektron mikroskopi araştırmalarına dayanan ilk çalışmalar, mitokondriyanın biri dış olmak üzere çok katlanmış bir iç zar olmak üzere iki zar sistemi içerdiğini ortaya koymuştur [39,40]. Palade tarafından geliştirilmiş perde modeli genel olarak kabul görmüş ve tüm ders kitaplarında mitokondri yapısı bu modelle resmedilmektedir [39]. Perde modelinde, mitokondri dört bölüme sahip olarak tanımlamaktadır (Şekil 1). İlk bölme dış zar olarak adlandırılır. Bu düz zar, çok kıvrımlı veya katlanmış bir iç zar ile çevrelenir. İç zar kristayı oluşturmak için katlanırken dış ve iç zarlar çok farklı özelliklere sahiptir. Bu birliktelik iki bölüm oluşumunu sağlar bunlar; membranlar arası boşluk (dış ve iç zarlar arasındaki boşluk) ve matris (iç membran ve mitokondriyanın iç kısmı arasındaki bölüm) olarak adlandırılır.

Ancak günümüzde perde modelinin hatalı olduğu gösterilmiştir. Elektron mikroskop tomografisi ile mitokondriyal morfolojinin 3 boyutlu yapısının incelenmesine dayanarak, iç zarın iki ayrı alana ayrıldığına inanılmaktadır: iç sınır membranı ve krista zarları [38-41-43]. İç sınır zar, dış zarın yakınında bulunur ve onunla çeşitli pozisyonlarda sıkı temas eder. Krista membranlar ise matris bölmesine çıkıntı yapar ve krista kavşakları adı verilen dar tubuler yapılarla iç sınır membrana bağlanır (Figure 1).



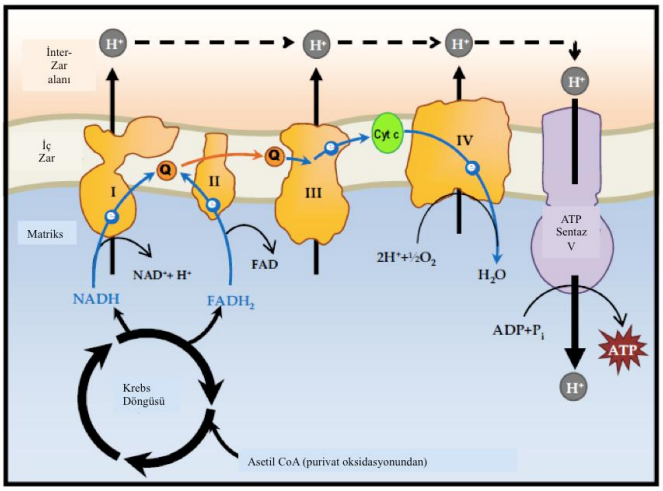
Figür 1: Mitokondrinin yapısı

Dış lipid çift tabaka membran, porinler olarak adlandırılan voltaj bağımlı anyon kanallarından oluşturulan kanalları içerir ve bunlar <10000 Da ölçekli moleküllere geçirgendir. Bu zar yaklaşık % 50 lipid ve % 50 proteinden oluşur. İç lipid çift tabaka membran katlanmış ve birçok molekül ve proton için geçirimsizdir ve % 70 protein içerir. İç membran ayrıca elektron taşıma zincirinin bulunduğu yerdir ve OXPHOS sistemi için taşıma proteinleri içerir. Matris içerisinde, DNA polimeraz, şaperonlar (ısı şoku proteinleri), ribozomlar, mRNA'lar, tRNA'lar ve mtDNA da dahil olmak üzere çok sayıda enzim ve diğer proteinler ve peptidler bulunur.

1.5.Mitokondrinin Fonksiyonu: OXPHOS sistemi

Mitokondri, "oksidatif fosforilasyon" (OXPHOS) olarak adlandırılan karmaşık bir mekanizma yoluyla ATP sentezini enerji dönüşüm süreçlerinde (solunum) merkezi bir rol oynamaktadır (Figür 2). Hücre içindeki OXPHOS bir elektron taşıma sisteminde elektronların transferinden türetilmiş enerjiyi kullanarak ATP' nin üretilmesidir. Mitokondrial elektron taşıma işlemi gerçekleştiğinde açığa çıkan enerjiyi protonu pompalamak ve elektrokimyasal gradienti ile oluşan geri dönüş sırasında ATP’ nin üretilmesinde kullanır. Bu serbest bırakılan enerjinin korunumu ile ilgili ayrıntılar halen tartışılmakta olmasına rağmen, çoğu bilim adamı enerji transferinin genel mekanizması olarak kemiosmotik hipotez kabul görmektedir. Kemiosmotik hipotez 1960'lı yıllarda Peter Mitchell tarafından formüle edilmiştir [44,45]. Bu hipotezde, elektron taşınması bir dizi redüksiyon-oksidasyon tepkimesi ile gerçekleşirken hidrojen iyonlarının (H^+ veya protonlar) mitokondriyal matristen iç membrandan intermembraner aralığa kadar transfer edilir ve böylece elektrokimyasal gradient oluşur. Membran, ATP sentazı ya da kompleks V olarak

adlandırılan büyük bir enzim yoluyla proton gradientine ters akan protonlar için geçirimsizdir, bu gradient daha sonra ATP üretmek için kullanılır.



Figür 2: Mitokondriyal OXPHOS sisteminin şematik gösterimi

Bütün işlemi başarmak için, glikoliz ilk aşamada sitozolde üretilen piruvat, çift mitokondriyal membranlar boyunca taşınır ve matrise girer. Piruvat molekülleri, karbonhidratlardan glikoliz yoluyla glikoz moleküllerinin parçalanmasıyla üretilir. Matrise girildiğinde, piruvat molekülleri iki karbonlu bir bileşik olan asetil koenzim A'ya (asetil CoA) dönüştürülür. Bu oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonu piruvat dehidrojenaz kompleksi tarafından katalize edilir. Asetil CoA daha sonra karbon oksidasyonunu tamamlayan ve döngüyü devam ettirmek için bir elektron alıcıyı yeniden üreten sitrik asit döngüsü olarak bilinen enzimatik olarak katalize edilmiş reaksiyonların bir dizisine sokulur. Sitrik asit döngüsünde (Krebs döngüsü veya trikarboksilik asit döngüsü olarak da adlandırılır) asetil CoA'nın oksidasyonu, mitokondriyal matriste lokalize olmuş bir enzim kümesi tarafından katalize edilir. Bu işlem sırasında, salınan elektronlar indirgenmiş moleküller NADH ve $FADH_2$'yi oluşturmak için NAD^+ ve FAD koenzimlerine aktarılır. Daha sonra NADH ve $FADH_2$ elektronları, elektron taşıma zincirinde, iç mitokondriyal membrandaki alıcı moleküllere transfer eder. Koenzim Q (ubiquinone) ve sitokrom c, mitokondriyal solunumda kompleksler arasında 'elektron servisleri' veya mobil elektron taşıyıcıları olarak görev yapar.

NADH'den Kompleks I'e veya $FADH_2$'den Kompleks II'ye aktarılan elektronlar koenzim Q'ya geçirilir. Elektronlar daha sonra koenzim Q'dan elektronları sitokrom c'ye

aktaran Kompleks III'e aktarılır. Sitokrom c'den elektronlar Kompleks IV'e aktarılır ve nihayet ½ O_2'ye aktarılarak H_2O üretilir [46]. Elektronlar bu kompleksleri bir dizi oksidasyon-indirgeme reaksiyonları yoluyla geçtikçe bu elektron taşıma zinciri tarafından serbest bırakılan enerji, I, III ve IV kompleksleri protonları mitokondriyal matristen zarlar arası boşluğa pompalayarak elektrokimyasal gradient oluşturur. Elektrokimyasal gradient protonların Kompleks V'deki (ATP sentaz) bir gözenek yoluyla matrise geri götürmesine izin verir ve açığa çıkan enerji ADP ve fosfattan ATP sentezini katalizlemek için kullanılır.

1.6.Mitokondrial genom

Mitokondriyum, nükleer sistemden ayrı, kendi ifadesi için gerekli tüm mekanizma ile kendi genetik sistemine sahiptir; yani içerdikleri genetik bilgiyi çoğaltmak, kopyalamak ve çevirmektir. Mitokondriyal deoksiribonükleik asit (mtDNA) 1963 yılında keşfedildi [47] ve insan mtDNA'sının neredeyse tama yakın dizisi 1981'de mevcuttu [48] ve 1999'da minimal revize edildi [49]. İnsan mtDNA'sı çoğunlukla 16569 baz çiftinden oluşan çift sarmallı, kapalı bir dairesel moleküldür.

Şekil 3 insan mitokondriyal genomunu göstermektedir. Çok kompakttır, küçük kodlamayan dizi içerir, esas itibariyle sadece 1,1 kb D-döngüsü (yer değiştirme döngüsü veya kodlamayan bölge) ve bazı üstüste gelen genlere bile sahiptir. D-loop içeren kodlamayan bölge, tRNA fenilalanini (F) ve prolin (P) kodlayan genler arasında bulunur. MtDNA'nın iki ipliği, denatüre edici bir sezyum klorür gradienti aracılığıyla yüzdürme derecelerine göre hafif iplikçik (L-iplikçik, sitozinler açısından zengin) ve ağır iplikçik (H-iplikçik, guanin bakımından zengin) olarak adlandırılmıştır [50].

MtDNA'nın D-loop bölgesi, hem H-iplik hem de mitokondriyal transkripsiyon promotörleri (hafif iplikçikli promotör, LPS ve iki ağır iplikçikli promotörler, HSP1 ve HSP2) sentezi için replikasyonun orijini içerir ve mitokondriyal genomik replikasyon ve transkripsiyon için ana bölge olarak görev yapar [51,52]. Farklı memeli türlerinde, mtDNA yaklaşık olarak aynı boyuttadır ve genlerin organizasyonu ve içeriği benzerdir [53-55]. Mitokondriyal genom, birçok türe ait dizilenmiş ve haritalandırılmıştır, ancak ekspresyonunun düzenlenmesi tam olarak anlaşılamamıştır.

İnsan mtDNA, OXPHOS sisteminde beş çoklu enzimatik kompleksin dördünün parçası olan 13 polipeptit için mRNA kodlayan, 22 tRNA (tüm açık okuma çerçevelerini çözebilmektedir) ve polipeptit sentezi için gerekli 2 rRNA (özel mitokondriyal ribozomların

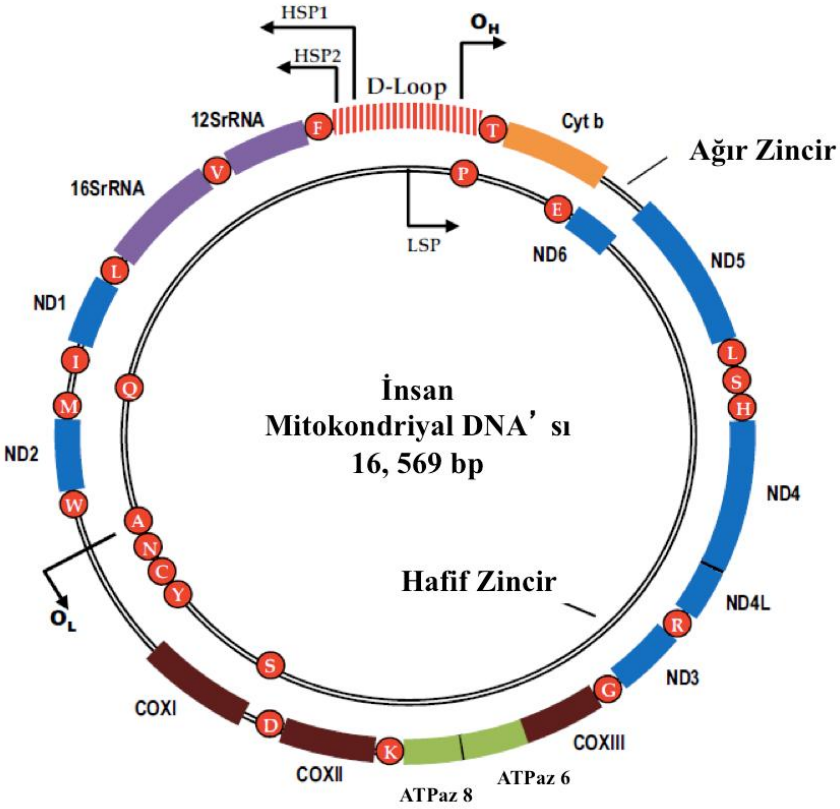
bileşenlerini) olmak üzere 37 gen bulunur. Nükleer DNA'nın aksine, mtDNA kodlama sekanslarının intronları yoktur. Bu polipeptitlerin yedisi, ND1 ila ND6 ve ND4L, Kompleks I'in alt birimleridir; bir tanesi sitokrom b, kompleks III' ün bir parçasıdır; üç tanesi, COX I, COX II ve COX III, Kompleks IV'ün katalitik alt birimleridir ve ATPaz 6 ve 8, Kompleks V'nin (F_0F_1 ATP sentaz) alt birimleridir. Ağır iplik ana kodlama zinciridir ve 2 rRNA, 14 tRNA ve 12 polipeptid kodlar, hafif iplik ise geriye kalan 8 tRNA ve yalnızca bir polipeptid, ND6 alt birimi (NADH-dehidrogenaz) kodlar[17].

Memeli mitokondrisi, hücrede kendini kendine yeten varlıklar değildir. Replikasyonları ve transkripsiyonları, trans-aktif nükleer kodlu faktörlere bağlıdır. Mitokondrial ribozomların tüm proteinleri ve bunlarla ilişkili translasyon faktörleri ve aslında diğer tüm mitokondriyal proteinler örneğin mitokondrial taşıma mekanizmaları gibi, nükleer DNA ile kodlanır. Örneğin, mitokondriyal tRNA'lar nükleer genlerden gelen aminoasil-tRNA sentetazlarla oluşturulur.

Her bir somatik hücrede yaklaşık yüzlerce veya binlerce mitokondrial genom kopyası vardır. Normal olarak, bireyin hücrelerindeki mitokondriyal DNA'ların tümü özdeştir ve bu homoplazi olarak adlandırılır. Bununla birlikte, bir mitokondrial DNA mutasyonu varlığında, etkilenen bireysel hücreler genellikle mutasyona uğramış ve wild tipte bir mitokondriyal DNA karışımı barındıracaktır. Bu iki mitokondrial DNA molekülünün de bulunması durumuna heteroplasmi denir [56]. Hücreler bölünürken, mutant ve wild tipli mitokondriyal DNA, rastgele olarak yavru hücrelerine dağıtılır, bu nedenle mutantın wild tipteki mitokondriyal DNA'ya oranı, hücre hatlarındaki ardıl jenerasyonlarda artadabilir azalabilir. Bu oran belli bir seviyenin üzerine çıkarsa, hücresel enerji kapasitesi düşecek ve klinik bulgular ortaya çıkacaktır. Buna eşik etkisi denir. Eşik değer dokudan dokuya değişebilir, çünkü mutant mitokondriyal DNA'nın hücre disfonksiyonuna neden olması gereken yüzdesi, dokunun oksidatif gereksinimlerine ve mutasyonun şiddetine göre değişir. Kas ve beyin gibi oksidatif enerji metabolizmasına gereksinimlere yüksek dokuların nispeten düşük eşikleri vardır ve özellikle mitokondriyal DNA mutasyonuna karşı savunmasız oldukları iddia edilmektedir.

İnsan mitokondriyal DNA'sı, -13 önemli solunum zinciri alt birimini kodlar- dairesel, çift sarmallı ve 16569 baz çiftinden oluşur. ND1-ND6 ve ND4L, yedi kompleks I alt birimlerini kodlamaktadır (NADH-Ubiquinone oxidoreductase), CYT b kompleks III'ün tek alt birimini kodlar (ubiquinol:Sitokrom c oksidoredüktaz), COX I-COX III kompleks 4 ün

üç büyük katalitik altbirimi kodlar ve ATPase6 ve ATPase8 kompleks V (ATP sintaz) 'ın iki alt birimini kodlar. Ayrıca mitokondriyal protein sentezi için gerekli olan iki ribozomal RNA (12S rRNA ve 16S rRNA) genleri ve 22 transfer RNA geni (tekli amino asit kodu kısaltması ile gösterilen kırmızı küreler) gösterilmektedir. tRNA'lar F, Fenilalanin; V, Falin; L, Lösin; I, İzolösin; Q, Glutamin; M, Metiyonin; W, Triptofan; A, Alanin; N, Asparagin; C, Sistein, Y, Tirosin; S, Serin; D, Aspartik asit; K, Lizin; G, Glisin; R, Arginin; H, Histidin; E, Glutamik asit; T, Treonin; P, Prolin. Genom yüksek derecede organize olup, kodlayıcı diziliminden çok az fazlalık gösterir. Yerdeğiştirme döngüsü (D-döngü) veya kodlanmayan kontrol bölgesi, L (LSP) ve H dizilerinin (HSP1 ve HSP2) transkripsiyonu için promotörleri ve H ipliğinin replikasyon kaynağını (O_H) içerir. Hafif iplikçiklerinin kökeni O_L olarak gösterilir.



Figür 3: İnsan mitokondriyal genomu

1.7.Kanser hücrelerinde Warburg Teorisi ve Mitokondriyal Disfonksiyonu

1930' larda Alman bilim adamı Dr. Otto H. Warburg, özellikle mitokondriyal solunumun kanser açısından değiştirilmesini hedefleyen araştırmalara öncülük etmiştir.

Çalışma kanser hücrelerinin bile bol oksijen varlığında yüksek bir glikoliz oranı sergilediğini göstermiştir. Bu fenomen literatürde "Warburg etkisi" olarak bilinir. Kanser hücreleri, ATP üretmek için solunum yerine anaerobik glikoliz kullanır [57]. Ayrıca, özellikle mitokondriyal işlev bozukluğu nedeniyle enerji metabolizmasındaki defektlerin kanserin başlamasıyla veya ilerlemesiyle ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Warburg'un keşfi birçok bilim adamını kanser hücrelerinde mitokondrianın potansiyel rolünü anlamaya teşvik etmiştir.

O zamandan buyana, çeşitli kanserlerde mitokondrinin sayı, şekil ve fonksiyon değişiklikleri bildirilmiştir [58]. Mitokondriyal OXPHOS' tan ATP üretiminin glikolize dönüşmesinin, kanser hücrelerinin biyoenerjetik karakterizasyonu olduğu öne sürülmüştür [59]. Dahası, mitokondriyal disfonksiyonun hücre proliferasyonunu veya büyümesini modüle eden kritik sinyal yollarını başlatabileceği gösterilmiştir [60,61]. Pelicano ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırma, mitokondriyal solunum defektilerinin redoks modifikasyon mekanizması yoluyla PTEN' yi inaktive edebilen artmış NADH düzeyine yükseldiğini tespit etmiştir [62]. PTEN' in deaktivasyonu, protein kinaz B (Akt) varlığını sürdürme yolunun aktivasyonuna yol açabilir [62]. Akt, glikolizi uyarmak için gösterilmiş ve aynı zamanda kanser hücrelerinin hücre sağkalımında bir artışa neden olmuştur [63,64]. Buna ek olarak, Lopez-Rios ve meslektaşları, oligomisin ile akciğer kanseri hücrelerinin inkubasyonuyla OXPHOS aktivitesinin inhibisyonunun aerobik glikolizde hızlı bir artışa neden olabileceğini göstermiştir [65]. Bu bulgu, mitokondriyal enerji üretiminin baskılanmasının, tümör hücrelerinin glikolitik olmasına neden olabileceğini göstermektedir [65]. Bununla birlikte, glikoliz inhibe edildiğinde, tümör hücreleri, mitokondriyal OXPHOS'un yeterli upregülasyonunu gerçekleştiremez ve bu, kısmi mitokondriyal bozulmadan kaynaklanmaktadır [66].

1.8.Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS) ve Tümörigenezi

Süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) gibi Reaktif oksijen radikalleri (ROS), tüm canlılarda metabolik süreç boyunca sürekli olarak üretilir [67]. Mitokondriyal solunum zinciri, moleküler oksijene geçen elektronların bazılarının zincirin dışına sızması nedeniyle ROS üretimi için önemli bir hücre içi kaynak veya üreticidir. Normal fizyolojik koşullar altında, hücresel ROS üretimi, esas olarak süperoksit dismutazlar (SOD), sitozolik bakır / çinko SOD (CuZnSOD) ve mitokondriyal manganez SOD (MnSOD) gibi antioksidan enzimler içeren endojen sistemin etkisi ile

dengelenir. Düşük ROS seviyeleri, hücresel sinyalleri düzenler ve normal hücrenin çoğalması için gereklidir. Bununla birlikte, ROS'un aşırı üretimi, DNA, proteinler ve lipidler gibi çeşitli hücresel bileşenlerin hasar görmesine neden olacaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, tümör gelişimini hızlandırmada ROS 'un önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Normal hücrelerin ROS'a maruz kalması çoğalma [68] ve büyüme ile ilişkili genlerin ekspresyonunda artışa neden olur [69-71]. Dahası, kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla ROS ürettiği yaygın olarak bilinmektedir [72,73]. Bu gözlemler, ROS'un uyarılmasının kanserin in vivo başlamasında, sürdürülmesinde ve gelişiminde önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

ROS son derece aktiftir ve aynı zamanda mitokondrial genomda hasara neden olabilir [74,75]. MtDNA hasarı doğru bir şekilde tamir edilmediği taktirde tümörigenezi başlatması ve kanser gelişimini desteklediği ileri sürülmüştür [76,77]. MtDNA' daki mutasyonlar, OXPHOS sisteminin etkinliğinin azalmasına ve sızıntı elektronlarının artmasına ve daha çok mitokondriyal ve hücresel ROS üretimine neden olabilir. Bu durum, mtDNA'nın konumu ROS üreten elektron taşıma sistemine çok yakın olduğu için, mtDNA'ya daha fazla toplam hasar daha verecek oksidatif stres yaratmaya neden olabilir. Bu nedenle, hücreler üzerindeki kalıcı oksidatif stres, mutasyona yol açan mtDNA hasarının indüklenmesi yoluyla neoplastik işleme öncülük edebilir [78].

Dahası, nDNA'nın tersine, mtDNA intronik dizileri içermez ve histonlar gibi koruyucu proteinlerle örtülmez. Bu nedenlerden ötürü, mtDNA mutasyonlarının çoğunun kodlama sekanslarında ortaya çıktığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte, daha yakın tarihli veriler, mtDNA'nın DNA bağlayıcı protein Tfam (mitokondriyal transkripsiyon faktörü A) tarafından neredeyse tamamen kaplanabildiğini göstermektedir [79]. Buna ek olarak, mtDNA da sınırlı etkili DNA onarım mekanizmalarına sahiptir. Bütün bu koşulların, mitokondriyal genomun zarar görmeye duyarlılığının artmasına katkıda bulunduğuna ve sonuçta mutasyonlara neden olduğuna inanılmaktadır. MtDNA'daki mutasyonların kanserin bir nedeni veya bir sonucu olup olmadığı hâlâ tartışmalıdır ve üzerinde ileri çalışılmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, oksidatif hasarla indüklenen mtDNA mutasyonlarının, tümörlerde OXPHOS defektlerine ve genetik istikrarsızlığa önemli ölçüde katkıda bulunduğu ve böylece tümör hücresi büyümesi ve progresyonu için daha yüksek bir eğilimi teşvik ettiği kanıtlanmıştır [80]. Bu durum, mtDNA'nın mutasyonunun oksidatif stresi kötüleştirebileceğini ya da bunun tersini gösterebilir.

1.9. Apoptoz ve tümörigenez

Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişimi ve homeostazında mitokondriyanın da dahil olması gereken önemli bir fizyolojik süreçtir. Mitokondri, uzun süredir apoptotik sinyal yolaklarının düzenlenmesindeki temel rolünden dolayı tanınmaktadır [81,82]. Apoptotik hücre ölüm yollarındaki kusurların genomik instabilite neden olduğu ve tümörigeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir [83]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, mitokondrial solunum zincirinin apoptozu modüle edebilme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir [84]. Solunum zinciri disfonksiyonunun, elektron akısının spesifik değiştirilmesine dayanan, apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiği veya bastırdığı gösterilmiştir [84]. ROS üretiminin stimülasyonu mitokondride apoptoz başlatabilir. Mitokondrial defektler normalde düşük ATP üretimi ve yüksek sitosolik kalsiyum ile fosforilasyonun azalmasına neden olabilir ve bu durumlar apoptotik hücre ölümünü tetikleyen bir sinyal haline gelir [85]. Kanser hücrelerindeki mitokondriyal solunum defekti, hücre ölüm direncini artıran Akt sağkalım yolunun aktivasyonuna yol açabilir. Daha önce de belirttiğimiz gibi, Akt'in bu aktivasyonunun artmış NADH seviyesi ve bir redoks modifikasyon mekanizması yoluyla PTEN'in inaktivasyonu sonucu olduğu öne sürülmüştür [62] . Daha da ilginç olarak, başka bir çalışma, mitokondrial şaperonların kanser hücrelerinin hayatta kalması için mitokondriyal fonksiyonu modüle etme rolünü açıklamıştır [86,87]. Moleküler şaperon ısı şoku proteini 60 (Hsp60), mitokondrinin stabilize edilmesine odaklanan ve ayrıca p53 fonksiyonunu sınırlayan geniş bir hücre sağ kalımı programını düzenlediği gösterilmiştir [86]. Başka bir şaperon, Hsp90 ve mitokondriyal ilişkili molekül TRAP-1'in, hücre ölümünü baskılamak için siklofilin D ile etkileşime girdiği önerilmiştir [87].

1.10.Kanserde mitokondrial DNA mutasyonları

MtDNA hasarının neden olduğu ilk hastalıkların 25 yıl önce tanımlanmasından bugüne, 300'den fazla mtDNA mutasyonunun ve daha fazla mtDNA delesyonunun insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [88-89]. Mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğu gösterilen hastalıklar diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, epilepsi, sensorinöral sağırlık ve kaslar ve merkezi sinir sistemini de içeren çeşitli sendromların yanı sıra çeşitli kanser formlarıdır [90-93]. Aynı mtDNA genindeki aynı veya farklı mutasyonlar, çok farklı klinik bulgularla ortaya çıkabilirken, aynı klinik fenotip farklı mutasyonlardan da kaynaklanabilir (DiMauro ve Schon, 2003). Çok sayıda mtDNA mutasyonu, Lebers kalıtsal

optik nöropati (LHON), Leigh sendromu, Kearns-Sayre sendromu, kronik ilerleyici eksternal oftalmopleji (CPEO), nöropati, miyoklonik ensefalomiyopati, laktik asidoz ve felç benzeri sendromu (MELAS), miyoklonik epilepsiyi ve düzensiz kırmızı fiberi hastalığı (MERRF), ataksi, retinitis pigmentosa (NARP) gibi mitokondriyal hastalıkların çok çeşitli klinik bulguları / fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir.

nDNA mutasyonlarının karsinogenezideki rolünün iyi bilinmesine rağmen, kanserlerin gelişimi ve sürdürülmesinde mtDNA değişikliklerinin önemine araştırmacılar ancak şimdi odaklanmaya başlamıştır. mtDNA'daki değişikliklerin OXPHOS sisteminde dengesizleşmeye neden olması kaçınılmazdır çünkü mtDNA ile kodlanan 13 proteinin kompleks I ve III-V solunum zinciri kompleksi için elzemdir ve insan solid tümörlerinde bu enzimatik kompleks kusurları bildirilmiştir [94-95]. Mitokondriyal mekanizmanın hala tartışılabilir olmasına ve tam olarak bilinememesine rağmen, mitokondrianın karsinogeneze potansiyel katkıda bulunabileceğini düşündüren önemli kanıtlar vardır. Bu nedenle mtDNA'nın, çeşitli dokulardaki tümörojenez için biyolojik belirteç olarak potansiyel rolü giderek artan sayıda laboratuarlarda çalışılmaktadır [96,97].

Mitokondriadaki DNA değişikliklerinin kanser araştırmalarının popüler konularından biri haline gelmiştir. İlk somatik mtDNA mutasyonunun, insan kolorektal kanser hücrelerinde Bert Vogelstein'ın grubu tarafından 15 yıl önce saptanmasından bu yana mtDNA'daki sayısız mutasyon, çoklu kanser türlerinde [98-100] gözlemlenmiştir [101]. Bu başlangıç bulguları sonrasında mtDNA mutasyonları veya değişiklikleri mesane kanseri [102], meme kanseri [103-106], özofageal kanser [107-109], baş-boyun kanseri [110], hepatoselüler karsinom [111-113], over kanseri [117, 118], prostat kanseri [119-121], renal kanseri [122], tiroid kanseri [123] ve birtakım kan kanseri [124,125] ile ilişkili olduğu da tespit edilmiştir. Son zamanlarda, mtDNA'daki nokta mutasyonları, polimorfizmler, deplesyon, insersiyonlar, mikrosatellit istikrarsızlığı ve mtDNA kopya sayısındaki değişiklikler gibi çeşitli moleküler anormaliler, insan kanserlerinde mitokondriyal genom boyunca karakterize edilmiştir [99,100,126].

1.11.Somatik mDNA Değişiklikleri ve Beyin Tümörleri

MtDNA mutasyonlarının beyin tümörleri ile ilişkisi hakkında raporlar bulunmasına rağmen, mitokondriyal anormalliklerin beyin tümörojenezinde faktörlere katkısı olup olmadığı hala açık değildir. Beyin tümörlerinde birçok çeşit somatik mtDNA değişikliği

saptanmıştır. Bu mtDNA değişiklikleri nokta mutasyonlar, delesyonlar, eklemeler, mtMSI (mitokondriyal mikrosatellit instabilitesi) ve kopya sayısı değişikliklerini içerir.

1.12.Nokta mutasyonları

Bazı çalışmalar, gliomalar, astrositomlar, gliomatozis cerebri, medulloblastoma, meningiomlar, schwannomalar ve nörofibromalar gibi beynin ve diğer merkezi sinir sisteminin kanserlerinde mtDNA nokta mutasyonlarını tespit etmiştir [30,31,127-130]. Mitokondrial genom somatik nokta mutasyonlar en sık D-loop bölgesinde, özellikle D310 olarak bilinen 303 ve 315 nükleotid arasında bulunan bir polisitozin (poli-C) mononükleotit tekrarlama yolunda bulunmuştur. Bu yer, beyin kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde somatik mtDNA mutasyonları için sorunlu bir bölge olarak tanımlanmıştır. 2005 yılında Montanini ve arkadaşları malign gliomlardan etkilenen 42 hastada mtDNA'nın D-loop bölgesini analiz etmiş ve çoğunlukla D310 bölgesinde 16 somatik mutasyon dahil olmak üzere hastaların %36' sında sekans değişiklikleri bulmuştur. Yazarlar, mtDNA mutasyonlarının cerrahi sonrası tümör boşluklarından kolaylıkla arttığını ve habis gliomların klinik takibi için kullanılabileceğini önermektedir [131].

D-loop bölgesine odaklanmak yerine, mitokondriyal genomun tamamı da beyin kanseri hastalarında çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Medulloblastomalarda tüm mtDNA mutasyon taraması temporal sıcaklık jel elektroforezi (TTGE) ile yapılmış, ve olguların % 40'ında (6/15) en az bir somatik mutasyon olduğu tespit edilmiştir [31]. Yedi eşleşmiş beyin omurilik sıvısı (CSF) örnekleri de mtDNA mutasyonlarını tespit etmek için analiz edilmiş, bazı tümörlerde mtDNA mutasyonu olduğu görülmüştür. Bu çalışma, BOS'ta somatik mtDNA mutasyonlarının, hastalık prognozu için yararlı bir biyolojik belirteç olabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Öte yandan, Lueth'in grubu (2010), 15 medulloblastomalı hastanın 6'sında somatik mtDNA mutasyonlarının varlığını bildirmiştir.Bu sonuçlar, onların medulloblastomadaki somatik mitokondriyal mutasyonların sıklığı üzerine yaptıkları önceki bulgularını desteklemektedir [34]. Medulloblastoma hastalarında yapılan araştırmalara başlamadan önce, Lueth ve çalışma arkadaşları 19 pilositik astrositom hastasından alınan tümör dokusunun ve eşleştirilmiş kan örneklerinin mitokondri genom dizilimini sıralamış ve 16 (% 84) olguda somatik mutasyon saptamışlardır [33].

Kurtz ve ekibi (2004) 37 nörofibromatozis tip 1 hastada nörofibromların durumunu analiz etmiş ve kutanöz nörofibromlar (% 37) olan 7 bireyde ve plexiform nörofibroma

sahip 9 hastada (% 50) somatik mutasyonlar saptamıştır [129]. Bu çalışmada saptanan tüm mtDNA somatik mutasyonları D-döngüsü bölgesindeki gerçekleşmiştir. Genetik mutasyonların çoğunun, mitokondrial genomun kodlamayan bölgelerinde oluşmasının nedeni şu an bilinmemektedir. Bununla birlikte, D-döngüsündeki mutasyonların replikasyon ve promoter bölgenin kökenini etkilediğine inanılmaktadır ve bu nedenle mitokondriyal biyogenezin bozulmasına ve transkripsiyon ve protein ekspresyonunun bozulmasına yol açabilmektedir [132,133].

1.13.Delesyon

Mitokondriyal genomda tanımlanan büyük ölçekli delesyonlar arasında, 4977 bp silme, tiroid tümörleri, özofagus karsinomu, hepatosellüler karsinom, gastrik kanser ve göğüs kanseri gibi çeşitli kanserler türlerinde saptanan en yaygın mtDNA silinmesidir [134-138]. Bu delesyon, "ortak delesyon" olarak algılanır ve normal mitokondriyal OXPHOS fonksiyonunun sürdürülmesi için gerekli olan 4 kompleks I alt birimi, 1 kompleks IV subunit, 2 kompleks V alt birimi kodlayan 7 geni ve 5 tRNA genini ortadan kaldırır. Bu silinmenin sonucu, ATP üretiminde tam bir başarısızlığa ve anormal ROS oluşumunda neden olabilir [139]. 4977 bp'lik delesyon, karsinogenez sürecinde rol oynamış olsa da, beyin tümörlerine bu delesyonun etkisi veya rolü henüz araştırılmamıştır. Beyin tümörlerinde silinme ile ilgili bir çalışma yapılmamş olsa da Wallace'ın grubu, sağlıklı bireylerin beynini kullanılarak yaşlanma sürecinde 4977 bp delesyon varlığını inceledi [140]. Beyindeki korteks, putamen ve serebellum arasındaki farklı bölgelerdeki 4977 bp'lik delesyonunun yaşlı bireylerde gençlere göre daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle, bu mtDNA delesyonunun yaşlanmayla ilişkili nörolojik bozukluğa katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür. 4977 bp delesyonu, bipolar bozukluğu olan hastaların otopsi yapılmış beyinlerinde de tespit edilmiştir [141].

1.14. Mitokondrial Mikrosatellit Düzensizliği

1999'da, Kirches ve arkadaşları, 12 astrositik tümörde yüksek mtDNA sekansı varyantlarını ortaya koydu [127]. İki yıl sonra aynı grup lazer mikrodiseksiyon ve PCR tekniği kullanılarak mitokondriyal D-loop'un poli-C yolundaki mtDNA kararsızlığı için 55 glioma örneğini inceleyerek çalışmayı genişletti [30]. Poli-C yolundaki değişiklikleri ile örneklerin % 9'unda daha düşük bir frekans bulmuşlardır. Buna ek olarak, somatik mutasyonu saptamak için 17 frozen glioblastom numunesinde D-loop ve karşılık gelen kan örnekleri sıralanmıştır. 2003 yılında, mitokondrial genom instabilitesi üzerine yapılan bir

takip çalışması yapılmış ve daha sonra yazar, gliomatozis cerebri hastalarında klonal bir belirteç olarak hiperdeğişken bölgenin poli-C yolunu (HVR2) tespit etmiştir [128].

En son olarak Yeung ve ekibi, glioblastoma multiformelerde (GBM) mitokondriyal genom varyantlarının katkısını araştırdı [142]. Bu çalışmada, mtDNA varyantları, yeni nesil sıralama ve yüksek çözünürlüklü eriyik (HRM) analizinin bir kombinasyonu kullanılarak bir dizi GBM hücre hattında analiz edildi. mtDNA varyantlarının en yüksek frekansının D-döngüsünde ve hafif iplikçik replikasyonunun kaynağını olan kodlamayan bölgelerde olduğunu bildirmişlerdir. Dahası, kodlama bölgesinde ND4 ve ND6 mutasyondan en çok etkilenmiş genlerdir ve ikisi de elektron taşıma zincirinin I kompleksinin alt birimleri kodlamaktadır. Yazar, mitokondriyal genomdaki bu yeni varyantların, GBM tümörigenezini teşvik etmek için hücrelere bir avantaj sağladığı sonucuna varmıştır [142].

1.15. Kopya Sayısı Değişiklikleri

MtDNA mutasyonları ve delesyonlarına ek olarak, mtDNA kopya sayısındaki değişiklikler gliomlarda araştırılmıştır [143,144]. Daha önce ilk defa Liang (1996) tarafından bildirilen 15 düşük gradeli 15 tümör dokusunun cDNA'sı, mtDNA'ya 1.679-1.946 ve 2.017-2.057 pozisyonlarında homolog olarak değerlendirildi ve sonuçlar, bu tümörlerin normal beyin doku kontrolleriyle karşılaştırıldığında mtDNA kopya sayısının arttığını ortaya koydu [143]. Liang ve Hays (1999) tarafından yapılan ayrı iki araştırmada, düşük dereceli ve yüksek dereceli gliomaları incelemiş ve 45'ten 39'unda (% 87) mtDNA kopya sayılarında 25 kat arttığı bulunmuştur [144]. Bu frekansın, bu tümörlerin sadece %18'inde mevcut olan erb-b gen amplifikasyonundan çok daha yüksek olduğunu iddia edilmiştir.

1.16. Mitokondrial Gen Ekspresyonundaki Değişiklikler

2005 yılında Dmitrenko'nun grubu cDNA kütüphanelerini insan fetüs glioblastomu ve normal insan beyin örnekleri üzerinde taradı ve 80 farklı genin eksprese edildiğini buldu [145]. Bunların 30'u, ATP6, COXII, COXIII, ND1, ND4 ve 12S rRNA için mitokondriyal genlere karşılık geldiğini tespit etmişer. Verilerine göre, tüm bu mitokondriyal transkriptler, glioblastomalarda, tümöre komşu histolojik olarak normal beyin ile karşılaştırıldığında daha düşük seviyede eksprese edildiğini bulmuşlardır [145].

2.YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışmamız, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (25.05.2016 tarih ve 206/10) onayı alınarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi ABD kliniğine başvuran Glial Tümör tanısı konulmuş hastalar üzerinde yapılmıştır. Araştırma popülasyonu, grade 2-3 veya 4 derece glial tümör tanısı konulmuş 19 bireylik olgu grubundan oluşturulmuştur. Bireylerden alınan 4-5 ml kan örnekleri %2'lik 1 ml etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere konulduktan sonra DNA'lar izole edilmek için -80ºC'de deneylere kadar bekletilmiştir. Eş zamanlı olarak tümör dokuları da DNA izole edilmek üzere -80ºC'de bekletilmiştir. MtDNA HVR I ve II bölgelerine ait nükleotid varyasyonlarını incelemek için gen bölgesi PCR ile amplifiye edilip elektroforezle görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünü DNA dizi analizi yöntemi ile analiz edilmiş ve varyasyonlar değerlendirilmiştir. Alınan doku ve kan örneklerinin üzerindeki tüm çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı imkanları çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Materyal

Hasta Gruplarının Toplanması

Selçuk Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından grade 2, 3 veya 4 glial tümör tanısı konulmuş 19 birey (30 – 80 yaş aralığındaki, 9 kadın ve 10 adet erkek) olgu grubuna alınmıştır. Benzer epidemiyolojik özeliklere sahip 98 sağlıklı bireyden kontrol grubu oluşturulmuştur. Bireylerden alkol ve sigara kullanımları, mevcut hastalıkları, ailede kanser öyküleri ile ilgili bilgiler detaylı şekilde alınarak bilgi formlarına kaydedilmiştir.

Deneyler için kullanılan Cihazlar:

- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-15R)
- Mikropipet Seti (Finnpipette)
- Etüv (Nüve EN 055)
- Vorteks (Heidolph)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 16)
- Buzdolabı (Beko 5034 NF)
- Derin Dondurucu (Beko 7125)
- Termal Cycler (Peqlab Primus 25)
- Hassas Terazi (Ohaus)

- Mikrodalga Fırın (Beko MD-1610)
- Manyetik Karıştırıcı (Yellow Line MSH Basic)
- Elektroforez Tankı (Cleaver)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Wealtec Elite 300 Plus)
- Jel Görüntüleyici (İntas Science İmaging)

Deneyler için kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:

- 10×PCR Buffer
- 50-1000 bç DNA Ladder
- Agaroz
- Borik Asit
- dNTP Mix
- Doymuş Fenol
- EDTA
- Etanol
- Etidyum Bromid
- İzoamil Alkol
- Kloroform
- $MgCl_2$
- Proteinaz K
- Potasyum Klorür
- Sodyum Dodesil Sülfat
- Sodyum Klorür
- Sodyum Asetat
- Steril Saf Su
- Taq DNA Polimeraz
- Tris Base
- Tris-Hidroklorid
- **Retikülosit Tuz (Salin) Çözeltisi**

  Sodyum Klorür (NaCl) 686 mM

  Potasyum Klorür (KCl) 25 mM

  Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) 35 mM

- **Parçalayıcı Çözelti (Lizat Hazırlama Çözeltisi)**

  Amonyum Klorür 155 mM

  Potasyum Bikarbonat 10 mM

  Disodyum Edta 0.1 mM

- **STE Çözeltisi**

  Sodyum Klorür 100 mM

  Tris. HCl 10 mM (pH:8.0)

  Disodyum Edta 1 mM

Deneyler için Kullanılam Primerler

- MtDNA HVR I bölgesi PCR ve Dizi analizi için primer çifti:

Ön (Forward) 5’- CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT -3'

Ters (Reverse) 5’- TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG- -3

- MtDNA HVR I bölgesi PCR ve Dizi analizi için primer çifti:

Ön (Forward) 5’- GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C -3'

Ters (Reverse) 5’- CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A -3'

Metot

Kan Numunelerinden Genomik DNA’nın İzolasyonu:

PCR tekniklerinin uygulanabilmesi ve sağlıklı sonuçlar alınabilmesi öncelikle hücre DNA’sının yüksek saflıkta elde edilmesini gerektirir. DNA izolasyonu ard arda yürüyen üç basamakla gerçekleşir. Bu basamaklar sırasıyla;

1. Hücre parçalanması sonucu yüksek molekül ağırlıklı DNA’nın açığa çıkması,

2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin birbirinden ayrılması ve DNA’nın çözünebilir duruma getirilmesi,

3. DNA’nın basit kimyasal ve enzimatik yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden temizlenmesi.

Bu aşamaların ardından da farklı kaynaklı ya da farklı özellikteki DNA moleküllerinin ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla kromotografik yöntemlerden yararlanılabilmekle beraber jel elektroforezi yöntemi daha yüksek ayırma gücü nedeniyle nükleik asitleri ayırmada en yaygın kullanılan yöntemdir (107).

Çalışmamızda DNA izolasyonu için kullanılan yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstteki sıvı kısmında bulunan DNA’nın etanol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak izole edilmesine dayanır.

DNA izolasyonu için olgu gruplarından elde edilen 4-5 ml venöz kan örneklerinin her birinden 1 ml alındı. Üzerlerine 5 ml retikülosit tuz çözeltisi konularak hafifçe karıştırıldı. Santrifüjleme (3500 rpm'de 15 dakika) sonrası üstte yer alan süpernatant sıvı atıldı. Elde edilen çökelti, üç kez retikülosit tuz çözeltisi ile yıkandı ve her seferinde 15 dakika 3500 rpm'de santrifüjlendi.

Temiz 15 ml'lik santrifüj tüpleri içerisine aktarılan son çökeltilerin üzerine 3’er ml soğuk parçalayıcı çözelti (lizat hazırlama çözeltisi) eklenerek en az 15 dakika berraklaşma sağlanana kadar derin dondurucuda bekletildi. Daha sonra tüpler 3500 rpm'de 15'er dakika santrifüjlenerek üst sıvılar atıldı. Çökelti üzerine 1 ml STE çözeltisi eklendi. Karıştırılarak bir kez daha 3500 rpm'de santrifüj edilip üst sıvılar atıldı.

Elde edilen nükleer pellet çökeltiden kaybetmeksizin tüpler ters çevrilerek filtre kağıtları üzerinde 15'er dakika bekletildi. Daha sonra nükleer pelletler üzerine 1-2 ml STE çözeltisi eklenerek vortekste karıştırıldı. Üzerine ml'de 100 µg olacak şekilde Proteinaz-K ve hacimce %1 oranında SDS eklenerek karıştırıldı. Tüpler oda ısısında bir gece boyunca ve ardından 37 °C sıcaklıkta 2-4 saat süre ile bekletildi. Tüplerin üzerine içlerindeki madde ile eşit miktarda doymuş fenol eklenerek karıştırıldı. Bu karışımlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Üstteki su fazı, temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Su fazı üzerine eşit miktarda fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklendi, karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek üstteki su fazları bir erlen içerisine alındı. Alınan su fazı üzerine hacminin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (pH:5) eklendi ve saf etanol ile 20 kat hacmine kadar çoğaltıldı. DNA çökünceye kadar karıştırıldı. Normal olarak ipliksi görünümde birkaç

dakika içerisinde çökelen DNA otomatik pipet ucu yardımıyla Eppendorf tüpleri içerisine konuldu.

Eppendorf tüpü içerisinde bulunan DNA üzerine %70'lik etanol eklenerek karıştırıldı ve tekrar santrifüjlenerek etanol atıldı. Bu şekilde yıkanmış olan DNA, steril saf su yardımıyla çözüldü.

Genomik DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

DNA numunelerinin konsantrasyonu ve saflığını belirlemek için 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri Eppendorf® spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. DNA molekülü 260 nm'de azami absorbsiyonu verir. Bu dalga boyunda okunan değer, çift sarmallı DNA molekülünün yaklaşık 50 µg/ml konsantrasyonunda 1.0 optik yoğunluğa (O.Y.) sahip olması temel bilgisine dayanılarak numunedeki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanması esasına dayanır.

$$\text{DNA Derişimi (µg/ml)} = \text{O.Y.}_{260\ nm} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

260 nm ve 280 nm arasındaki O.Y. değerleri arasındaki oran ($\text{O.Y.}_{260\ nm}$ / $\text{O.Y.}_{280\ nm}$ oranı) nükleik asit saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA preparatlarında bu oran 1.8'dir. Daha yüksek veya düşük değerler, genellikle sırasıyla RNA, protein veya fenol kontaminasyonlarını gösterir. Protein veya fenol bulaşısı olmadan saf olarak DNA izolasyonu, çalışmamızın kritik basamaklarından birini teşkil etmektedir. Spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilen numunelerden $\text{O.Y}_{260\ nm}$ / $\text{O.Y}_{280\ nm}$ değeri 1,7'den aşağı ve 1,9'dan yukarı olan numuneler elendi ve yeniden izolasyon sürecine başlandı.

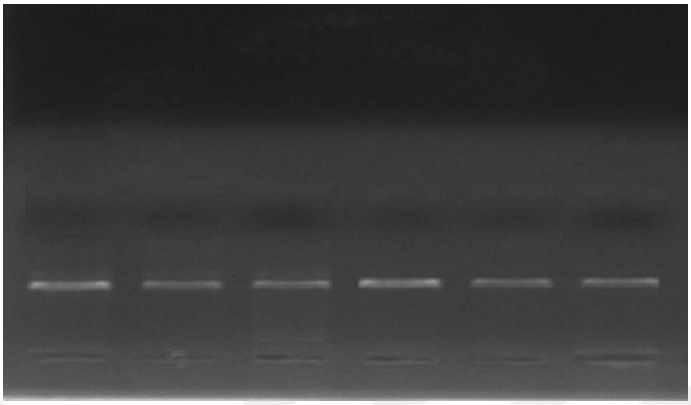
Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elekroforezi İle Saflık Kontrolü

Saflık tayini için DNA numuneleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile de test edildi. Bu amaçla Wealtec® Elite 300 Plus model güç kaynağına bağlı Cleaver® marka yatay jel tepsili elektroforez kabı kullanıldı.

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 0,6 gram toz agaroz hassas terazi ile tartıldı. Temiz bir erlene aktarıldı. Üzerine 30 ml 0,5X TBE (Tris-Borat-EDTA, pH8,3) tamponu eklendi. Erlen'in ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Hafifçe karıştırıp Beko® MD-1610 mikrodalga fırına koyuldu. Ara ara kontrol ederek erlen içerisindeki agaroz kristallerinin eridiğinden emin olana kadar ortalama iki dakika ısıtıldı. Kristaller tamamen eriyip sulu fazın altında jel oluştuğunu görünce soğumaya bırakıldı. Heterojen soğumayı engellemek için doğrudan banko üzerinde soğumaya bırakılmadı. Solüsyon yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuduğunda üzerine UV ışık altında bantların görülmesini sağlayan etidyum bromür'den 3 µl ilave edildi ve karışım yavaşça çalkalandı. Bu işlemler devam ederken, diğer yandan elektroforez kabı, tepsisi ve jel tarakları önce distile su ile ardından %70'lik etanol ile yıkanıp temizlendi. Tepsinin kenarlarına kauçuk bariyerler geçirildi ve üzerinde bulunan bölmelere jel tarakları yerleştirildi. Sıcak jel ve etidyum bromür karışımını içeren erlen, tepsinin 3-4 cm yukarısından tutularak kabın içerisine yavaşça döküldükten sonra jel üzerinde oluşan hava kabarcığı eğer var ise pipet ucu yardımıyla alınarak oda sıcaklığında 30-40 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.

Sürenin sonunda jelin iyice katılaştığını gözlemledikten sonra elektroforez tepsisinin kenarlarındaki kauçuk bariyerler çıkarıldı. Tepsi, yaklaşık 350 ml civarında 0.5X TBE tamponu ile doldurduğumuz yatay elektroforez tankına jelin üzerindeki kuyular negatif kutup olan katot'a bakacak şekilde yerleştirildi. Jelin üzerindeki tarak yavaşça ve dikkatli bir şekilde kaldırıldı. Jelin üzerini 1-1.5 mm kaplayacak şekilde bir miktar daha 0.5X TBE tamponu ilavesi yapıldı. Oluşan bir hava kabarcığı var ise pipet ucu yardımı ile alındı. DNA numunesi [5 µl (0,25-0,5 ng)] ve 1 µl yükleme tamponu (loading buffer), mikropipet ile birkaç defa çekip bırakmak suretiyle iyice karıştırıldı. Karışım (6 µl'lik), mikropipet yardımı ile jelin üzerindeki kuyulardan birine yüklendi. Her bir DNA numunesi için aynı işlem tekrar edilerek jelin üzerindeki kuyulara sıra ile yüklendi. En son sırada bulunan kuyuya elektroforez sonucu oluşan bantların yerinin net olarak gözlemlenmesini sağlayan 50-1000 baz çiftleri arasında belli aralıklarla kuvvetli bantlar veren DNA merdiveni yüklendi. Elektroforez kabının kapağı kapatıldı. Güç kaynağının elektroforez kabına kablo bağlantıları yapıldı. Güç kaynağı 90 volt'a ayarlanarak numuneler elektroforezde 30 dakika boyunca yürütüldü. Sürenin sonunda jel UV ışığı altında bilgisayar destekli İntaş® jel görüntüleme sistemi ile görüntülenip kayıt edildi. Jelin kuyularına yerleştirdiğimiz saf DNA, elektroforezde kuvvetli bir tek band şeklinde gözlenmektedir (Resim 1). Elektroforez

sonucunda jel üzerinde değişik bantlara ait leke ve izler bulunması DNA'nın bozunmaya uğradığını gösterir.



Resim 1. Elekroforezde %2' lik agaroz jel'de 90 volt'ta 30 dakika yürütülen DNA örneklerinin görünümü.

PCR İşlemi

mtDNA HVR I ve II bölgelerine ait tek bir bant elde edebilmek için PCR'de değişik parametreler test edildi. Bu parametreler arasında, $MgCl_2$ 'ün 1,0 ile 3,0 mM arasındaki konsantrasyonları, primer çiftlerinin 20 ile 100 pmol arasındaki konsantrasyonları ve kalıp DNA'nın 100, 200,300 ve 500 ng gibi değişik konsantrasyonları ile çalışmaların yapılması yer almaktadır. İzlenen genel protokol Tablo 2'de, PCR ile çoğaltma programında kullanılan bileşenlerin ideal hacim ve konsantrasyonları tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 2: İzlenen Genel Protokol

Denatürasyon	**94 °C**	**1 dk**	**36 siklus**
Primer eşleşmesi	**55 °C**	**1 dk**	
Zincir Uzaması	**72 °C**	**1 dk**	
Final Uzatması	**72 °C**	**1 dk**	

Tablo 3: mtDNA HVR I ve II bölgelerinde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için ideal hacim ve konsantrasyonları

İçerik	Stok Konsantrasyon	Eklenecek Hacim	50 µl Reaksiyon Karışımındaki Konsantrasyon
Kalıp DNA	**3 µl**	**3 µl**	**~4 ng/ µl**
Tampon	**10x**	**5 µl**	**1x**
$MgCl_2$	**25 mM**	**3 µl**	**1,5 mM**
dNTP Karışımı	**10 mM**	**1 µl**	**200 µM**
Ön Primer	**10 pmol/ µl**	**2 µl**	**20 pmol**
Ters Primer	**10 pmol/ µl**	**2 µl**	**20 pmol**
Taq DNA Polimeraz Enzimi	**5 U/L**	**1 µl**	**5 U**
Steril Su		**50 µl'ye tamamlanır.**	

PCR ürünleri sırasıyla 1'er µl yükleme tamponu ile (loading buffer) 3.2.3'te belirtildiği gibi karıştırılarak jelin kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 30 dakika yürütülmesinin ardından yapılan görüntülemede bç hizasında ilgili bölgeye ait bantlar gözlendi

DNA Dizi Analizi

Mitokondri genomu HVR-I ve HVR-II bölgesi PCR yöntemine dayalı DNA dizi analizi ile ortaya konulmuştur. İçeriği saptanan genom bölgelerinde polimorfik odaklar bu yaklaşım ile belirlenmiştir. PCR ve DNA dizi analizi reaksiyonunda aynı primerler kullanılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. DNA dizi analizi yönteminde kullanılan primerler

Primer Adı	**Primer Dizisi**
L15997 (Forward)	(5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3')
H16401 (Reverse)	(5'-TGATTTCACGGAGGATGGTG-3')
L29 (Forward)	(5'-GGTCTATCACCCTATTAACCAC-3')
H408 (Reverse)	(5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3')

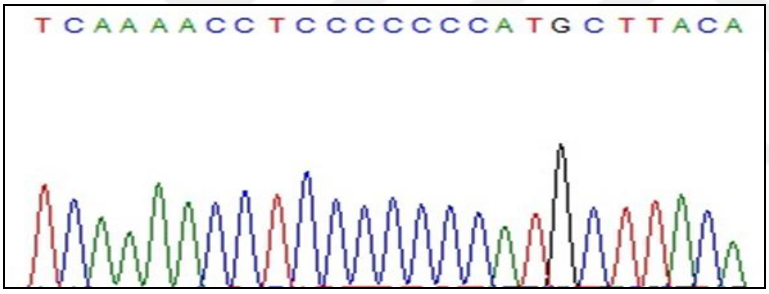
PCR yöntemi ile çoğaltım işlemi, sıcaklık döngü cihazı (*Technegene Thermo Cycler*) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon 94 °C'de 15 sn, 56 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 15 olarak toplam 30 döngüde gerçekleştirildi. Daha sonra, elde edilen PCR ürünü, % 1' lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Dizi analizi yönteminde, Beckman Coulter Genome Lab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Kiti kullanılmıştır. Reaksiyon uygulaması 94 °C'de 20 sn, 50 °C'de 20 sn ve 60 °C'de 4 dak olmak üzere toplam 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

19 bireyde HVR I ve HVR II bölgelerinin dizileri rCRS ile karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 5 ’de gösterilmiştir. Toplamda 47 nükleotid değişimi saptanmıştır. Bu değişimlerin 39 tanesi HVR I bölgesinde iken, 8 tanesinin HVR II bölgesinde olduğu gözlenmiştir. HVR I bölgesinde en sık görülen nükleotid değişimi 16221 pozisyonundaki C® A değişimidir (84.2%). HVR II bölgesinde ise 263 pozisyonundaki A® G değişimidir (100%).

HVR I bölgesindeki çoklu sitozin değişimleri 16184-16193 nükleotidleri arasında incelenmiştir. Nükleotid değişimi DNA dizi analizi görüntüsü Şekil 4’de sunulmuştur. Tablo 5’de çalışmamızda gözlenen varyasyonlar belirtilmiştir. Toplam olarak 5 farklı tipte nükleotid sekansı saptanmıştır.



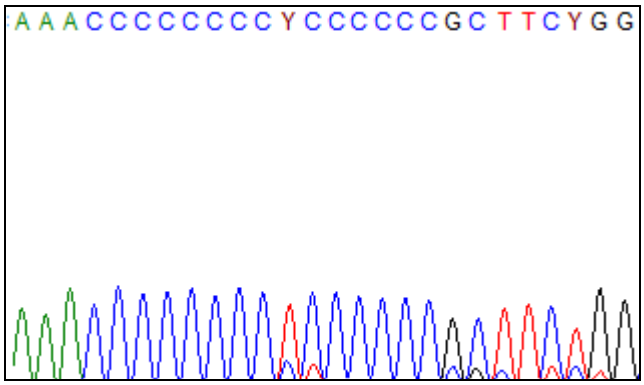
Figür 4: HVR I bölgesi çoklu sitozin değişiminin DNA dizi analizi ile gösterimi

Nükleotid Değişimleri	**Gözlenen Sayı**
A A A A C C C C C T C C C C *	16 Kan Örneği
A A A A C C T C C C C C C C	1 Kan Örneği
A A A A C C C C - T C C C C	1 Kan Örneği
A A C C C C C C C C C C C C	1 Kan Örneği
A A A A C C C C C T C C C C	18 Tümör doku
A A A A C C T C C C C C C C	1 Tümör Doku

Tablo 5: HVR I bölgesi 16180 - 16193 nükleotid farklılıkları

(*) Referans dizi

HVR II bölgesindeki çoklu sitozin değişimleri 303-315 nükleotidleri arasında incelenmiştir. Nükleotid değişimi DNA dizi analizi görüntüsü Şekil 5 de sunulmuştur.



Figür 5: DNA Sequencing of poly-cytosine tract from 303 to 315 in HVR II

Tablo 6'de çalışmamızda gözlenen varyasyonlar belirtilmiştir. Toplam olarak 6 farklı tipte nükleotid sekansı saptanmıştır.

Nükleotid Değişimleri																	**Gözlenen Sayı**
C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	*			5 Kan Örneği
C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C		10 Kan Örneği
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	3 Kan Örneği
C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C			1 Kan Örneği
C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C		11 Tümör Doku
C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C			4 Tümör Doku
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	4 Tümör Doku

Tablo 6: HVR II bölgesi 303 - 315 nükleotid farklılıkları

(*) Referans dizi

4.TARTIŞMA

Mitokondri, nükleer genomdan ayrı olan kendi genomuna sahiptir; dolayısıyla içerdiği genetik bilgi translasyona, replikasyona ve transkripsiyona uğrayabilir. Mitokondriyal deoksiribonükleik asit (mtDNA) 1963 yılında keşfedildi ve insan mtDNA'sı için tam dizi 1981'de ortaya çıkartılmış ve 1999'da revize edilmiştir [146,147]. İnsan mtDNA'sı 16.569 baz çifti içeren çift sarmallı, dairesel, 1.1kb büyüklüğünde D-Loop adı verilen kodlanmayan bir bölge içeren moleküldür. MtDNA'nın D-Loop bölgesi, hem H-strand sentezi hem de hem mitokondriyal transkripsiyon promotörleri için replikasyonun orijini içermekte ve mitokondriyal genomik kopyalama ve kopyalama için ana alan olarak görev yapmaktadır [148,149].

Karsinogenezideki nükleer DNA mutasyonları iyi belirlenmiş olsa da, mtDNA değişikliklerinin kanserlerin gelişimi ve korunmasında önemi araştırılmaya başlanmıştır.

Mitokondrideki DNA değişikliklerinin kanser araştırmalarının odak noktaları haline geldiği düşünülmektedir. Çoklu kanser tiplerinde mtDNA'daki birçok mutasyon gözlemlenmiştir [150-153]. Örneğin, ilk somatik mtDNA mutasyonu, 15 yıl önce insan kolorektal kanser hücrelerinde Bert Vogelstein'ın grubu tarafından tespit edilmiştir[154]. Daha sonra mesane kanseri, meme kanseri, özofagus kanseri, baş-boyun kanseri, hepatoselüler karsinom, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, böbrek kanseri, tiroid kanseri ve farklı kan kanserlerin de mtDNA mutasyonları veya değişimleri saptanmıştır[155-156]. Nokta mutasyonları, polimorfizmler, delesyonlar, insersiyonlar, mikrosatellit kararsızlığı ve mtDNA kopya sayısındaki değişiklikler gibi mtDNA'daki çeşitli moleküler değişiklikler, insan kanserlerinde mitokondriyal genomda karakterize edilmiştir [152,153,156].

Bulgularımızda mtDNA'da hem glioblastomalar hem de kan örnekleri varyasyonları tespit edildi. MtDNA sekansları, tanımlanmış ve revize edilmiş olan Cambridge Referans Dizisi (rCRS; GenBank accession no: NC_012920.1) ile karşılaştırılmıştır. Nükleotid değişikliklerinin yüksek sıklıkta olarak 16221 pozisyonlarında olduğunu gözlemledik. İlginçtir olarak, bu varyasyonu hem tümör hem de kan örnekleri açısından yüksek frekansta gözlenmiştir. Oysaki, Seo ve ark. Japon nüfus araştırmasında bu varyasyonu bildirilmiştir [157].

Kircher ve ark. Glioblastoma mtDNA değişiklikleri üzerinde çalışmıştır, gözlemlenen nükleotid değişiklik sonuçları bizim sonuçlarımızla kıyaslandığında; onların D-loop bölgesinde A185G, T195C, C204T, T295C, C16126T, A16293G, T16356C, ve T16519C varyasyonlarını gözlemlemelerine rağmen, bizim kan ve tümör doku örneklerimizde T195C, C204T, T295C, T16356C, ve T16519C varyasyonları saptanmamıştır. Ayrıca, 17 hasta (% 31), beyin homoplazmik olarak tespit edilmişti ve bu olguların 12'sinde, çoklu sitozin bölgesinde ilgili tümörde değişim bulunmamıştır; fakat çalışmamızda değişimler hem kan hem de tümör dokuda belirlenmiştir.

Birlikte ele alındığında, bu bulgular farklı bölgelerde ve / veya farklı kökenlerde yaşayan Türk nüfusundaki genotip dağılımlarının farklı olabileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu ön çalışma, popülasyonlar arasında mtDNA'nın önemini göstermektedir. Farklı popülasyonlardan elde edilen veri tabanları, mtDNA'nın farklı genetik bilgilerde biyoinformatiğin genişlemesine yardımcı olacaktır. Kanser gelişiminde ve bakımında mtDNA değişikliklerinin önemini belirlemek için daha ileri tetkikler gerekmektedir.

5.KAYNAKLAR

[1] Oğul E. Klinik Nöroloji, Nobel&Güneş Tıp Kitabevleri, Bursa 1996; 466.

[2] Cohen ME. Primary and Secondary Tumors of the Central Nervous System In: Neurology in Clinical Practice Ed. WG Bradley, RB Daroff, GM Fenichel and CD Marsden 2nd edition Butterworth- Heinemann, Boston 1996.

[3] Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology 7th Edit. McGrav Hill 2001;684.

[4] J Neurooncol. 2017 Apr 26. doi: 10.1007/s11060-017-2451-7. [Epub ahead of print]Assessment of PD-1 positive cells on initial and secondary resected tumor specimens of newly diagnosed glioblastoma and its implications on patient outcome.Miyazaki T, Ishikawa E, Matsuda M, Akutsu H, Osuka S, Sakamoto N, Takano S, Yamamoto T, Tsuboi K, Matsumura A.)

[5]. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer, Principles and Practice of Oncology. JB Lippincott Cott Philadelphia, 1989.

[6]. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology, JB Lippincott Cott. Philadelphia, 1989.

[7]. Silverberg E, Lubera JA. Cancer Statistics 1989. Ca-A Cancer Journal for Clinician 39: 3-20, 1989.

[8]. Tannock IF, Hill Rp. The Basic Science of Oncology, Pergamon Press, Los Angeles, 1987.

[9]. Bernard CW, Derfman RF, Kanfman N. Malignant Lymphoma, Williams and Wilkins, Newyork, 1987.

[10]. Casciato DA, Lowitz BB. Manual of Clinical Oncology, Little Brown and Company, Boston, 1988.)

[11] Mol Med Rep. 2017 Apr 12. doi: 10.3892/mmr.2017.6467. [Epub ahead of print]Mitochondrial transcription factor A (TFAM) is upregulated in glioma.Lee H, Park J, Tran Q, Kim D, Hong Y, Cho H, Kwon SH, Brazil D, Kim SH, Park J.).

[12] Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 1994;53(1) 11-21.

[13] Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H, Ishii N, Van Meir EG. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. Neuro-Oncology 1999;1(2) 124-137.

[14] Yusoff AA, Abdullah J, Abdullah MR, Mohd Ariff AR, Isa MN. Association of p53 tumor suppressor gene with paraclinical and clinical modalities of gliomas patients in Malaysia. Acta Neurochirurgica (Wien). 2004;146(6) 595-601.

[15] Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. Annual Review of Pathology. 2006;1 97-117.

[16] Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. American Journal of Pathology 2007;170(5) 1445-1453.

[17] Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. Annual Review of Cell Biology 1988;4 289-333.

[18] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2012;13(12) 780-788.

[19] Wallace DC. Mitochondria and cancer. Nature Reviews Cancer 2012;12(10) 685-698.

[20] Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. Scientific American 1997;277(2) 40-47.

[21] DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. American Journal of Medical Genetics 2001;106(1) 18-26.

[22] Wallace DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. Novartis Foundation Symposia 2001;235 247-263; discussion 263-246

[23] Kaipparettu BA, Ma Y, Wong LJ. Functional effects of cancer mitochondria on energy metabolism and tumorigenesis: utility of transmitochondrial cybrids. Annals of the New York Academy of Sciences 2010;1201:137-146. doi: 10.1111/j. 1749-6632.2010.05621.x.

[24] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park SH, Singh KK, Abdulkadir SA, Spitz DR, Deng CX, Gius D. SIRT3 is a mitochondrialocalized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. Cancer Cell 2010;17(1) 41-52.

[25] Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS, DeBerardinis RJ. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. Nature 2011;481(7381) 385-388.

[26] Owens KM, Kulawiec M, Desouki MM, Vanniarajan A, Singh KK. Impaired OXPHOS complex III in breast cancer. PLoS One 2011;6(8) e23846.

[27] Cook CC, Kim A, Terao S, Gotoh A, Higuchi M. Consumption of oxygen: a mitochondrial-generated progression signal of advanced cancer. Cell Death and Disease 2012; 3:e258. doi: 10.1038/cddis.2011.141.

[28] Chen PL, Chen CF, Chen Y, Guo XE, Huang CK, Shew JY, Reddick RL, Wallace DC, Lee WH. Mitochondrial genome instability resulting from SUV3 haploinsufficiency leads to tumorigenesis and shortened lifespan. Oncogene 2013;32(9) 1193-1201.

[29] Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, vander Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. Science 2000;287(5454) 848-851.

[30] Kirches E, Krause G, Warich-Kirches M, Weis S, Schneider T, Meyer-Puttlitz B, Mawrin C, Dietzmann K. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. International Journal of Cancer 2001;93(4) 534-538.

[31] Wong LJ, Lueth M, Li XN, Lau CC, Vogel H. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. Cancer Research 2003;63(14) 3866-3871.

[32] Dai JG, Xiao YB, Min JX, Zhang GQ, Yao K, Zhou RJ. Mitochondrial DNA 4977 BP deletion mutations in lung carcinoma. Indian Journal of Cancer 2006;43(1) 20-25.

[33] Lueth M, Wronski L, Giese A, Kirschner-Schwabe R, Pietsch T, von Deimling A, Henze G, Kurtz A, Driever PH. Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma. Cancer Genetics and Cytogenetics 2009;192(1) 30-35.

[34] Lueth M, von Deimling A, Pietsch T, Wong LJ, Kurtz A, Henze G, Driever PH. Medulloblastoma harbor somatic mitochondrial DNA mutations in the D-loop region. Journal of Pediatric Hematology/Oncology 2010; 32(2) 156-159.

[35] Li LH, Kang T, Chen L, Zhang W, Liao Y, Chen J, Shi Y. Detection of mitochondrial DNA mutations by high-throughput sequencing in the blood of breast cancer patients. International Journal of Molecular Medicine 2014;33(1) 77-82.

[36] Larman TC, DePalma SR, Hadjipanayis AG; Cancer Genome Atlas Research Network, Protopopov A, Zhang J, Gabriel SB, Chin L, Seidman CE, Kucherlapati R, Seidman JG. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2012;109(35) 14087-14091.

[37] Yin PH, Wu CC, Lin JC, Chi CW, Wei YH, Lee HC. Somatic mutations of itochondrial genome in hepatocellular carcinoma. Mitochondrion 2010;10(2) 174-182.

[38] Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. Trends in Biochemical Sciences 2000;25(7) 319-324.

[39] Palade G. The fine structure of mitochondria. Anatomical Record. 1952;114(3) 427-451.

[40] Sjöstrand FS. The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. International Review of Cytology 1956; 5: 455-533.

[41] Perkins G, Renken C, Martone ME, Y ung SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. Journal of Structural Biology 1997;119(3) 260-272.

[42] Perkins GA, Frey TG. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. Micron 2000;31(1) 97-111.

[43] Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. Biochimica et Biophysica Acta 2002;1555(1-3) 196-203.

[44] Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. Nature 1961;191: 144-148.

[45] Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. Nature 1967;213(5072) 137-139.

[46] Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2002. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley & Sons,Inc., New York

[47] Nass S, Nass MMK. Intramitochondrial fibres with DNA characteristics. Journal of Cell Biology 1963;19: 593-629.

[48] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981;290(5806) 427-465.

[49] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nature Genetics 1999;23(2) 147.

[50] Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. Annual Review of Biochemistry 1974;43(0) 695-719.

[51] Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. Human Genetics 1997;101(3) 384.

[52] Taanman JW. The mitochondrial genome: transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica Acta 1999;1410(2) 103-123.

[53] Monnat RJ, Reay DT. Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. Gene 1986;43(3) 205-211.

[54] Tzagoloff A, Myers AM. Biogenesis of mitochondrial genetics. Annual Review of Biochemistry 1986; 55: 249-285.

[55] Gadaleta G, Pepe G, DeCandia G, Quagliariello C, Sbissá E, Saccone C. The complete nucleotide sequence of the Rattus norvegicus mitochondrial genome: cryptic signals revealed

by comparative analysis between vertebrates. Journal of Molecular Evolution 1989;28(6) 497-516.

[56] Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. Trends in Genetics 1997;13(11) 450-455.

[57] Warburg O. On the origin of cancer cells. Science 1956;123(3191) 309-314.

[58] Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. Progress in Experimental Tumor Research 1978; 22 190-274.

[59] Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaría G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. Cancer Research 2002;62(22) 6674-6681.

[60] Arnould T, Vankoningsloo S, Renard P, Houbion A, Ninane N, Demazy C, Remacle J, Raes M. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. The EMBO Journal 2002;21(1-2) 53-63.

[61] Rustin P. Mitochondria from cell death to proliferation. Nature Genetics 2002;30(4) 352-353.

[62] Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W, Huang P. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. Journal of Cell Biology 2006;175(6) 913-923.

[63] Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Research 2004;64(11) 3892-3899.

[64] Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. Oncogene 2005; 24(50) 7435-7442.

[65] López-Ríos F, Sánchez-Aragó M, García-García E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo Rodríguez F, López-Encuentra A, Ballestín C, Cuezva JM. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. Cancer Research 2007;67(19) 9013-9017.

[66] Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology 2007;292(1) C125-136.

[67] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiological Reviews 1979;59(3) 527-605.

[68] Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radical Biology and Medicine 1995;18(4) 775-794.

[69] Nose K, Shibanuma M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. European Journal of Biochemistry 1991;201(1) 99-106.

[70] Amstad PA, Krupitza G, Cerutti PA. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. Cancer Research 1992;52(14) 3952-3960.

[71] Nose K, Ohba M. Functional activation of the Egr-1 (early growth response-1) gene by hydrogen peroxide. Biochemical Journal 1996;316 (Pt 2) 381-383.

[72] Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt- Clermont PJ, Finkel T. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. Biochemical Journal 1996;318 (Pt 2) 379-382.

[73] Ha HC, Thiagalingam A, Nelkin BD, Casero RA Jr. Reactive oxygen species are critical for the growth and differentiation of medullary thyroid carcinoma cells. Clinical Cancer Research 2000;6(9) 3783-3787.

[74] Harman D. Free radicals in aging. Molecular and Cellular Biochemistry 1988;84(2) 155-161.

[75] Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. Annals of the New York Academy of Sciences 1992;663 85-96.

[76] Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. European Journal of Cancer Prevention 1998;7(1) 9-16.

[77] Zanssen S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in cancer. PLoS Medicine 2005;2(11) e401.

[78] Grzybowska-Szatkowska L, Slaska B. Mitochondrial DNA and carcinogenesis (review). Molecular Medicine Reports 2012;6(5) 923-930.

[79] Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. Annals of the New York Academy of Sciences 2005;1042: 101-108.

[80] Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. Biochimica et Biophysica Acta 2011;1807(6) 620-625.

[81] Richter C. Pro-oxidants and mitochondrial Ca2+: their relationship to apoptosis and oncogenesis. FEBS Letters 1993;325(1-2) 104-107.

[82] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Toxicology Letters 2004;149(1-3) 19-23.

[83] Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White E. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. Genes & Development 2004;18(17) 2095-2107.

[84] Kwong JQ, Henning MS, Starkov AA, Manfredi G. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. Journal of Cell Biology 2007;179(6) 1163-1177.

[85] Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. American Journal of Medical Genetics 2001;106(1) 62-70.

[86] Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. Cell 2007;131(2) 257-270.

[87] Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. Journal of Biological Chemistry 2008;283(8) 5188-5194.

[88] Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 1988;331(6158) 717-719.

[89] Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 1988;242(4884) 1427-1430. [79] Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 1988;38(9) 1339-1346.

[90] Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. Mutation Research 2001;488(2) 119-133.

[91] Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry 2003;74(9) 1188-1199.

[92] DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. Annals of Medicine 2005;37(3) 222-232.

[93] Schapira AH. Mitochondrial diseases. Lancet. 2012;379(9828) 1825-1834. doi: 0.1016/ S0140-6736(11)61305-6.

[94] DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. New England Journal of Medicine 2003;348(26) 2656-2668.

[95] Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D. Mitochondrial subversion in cancer. Cancer Prevention Research 2011;4(5) 638-654.

[96] Salas A, Yao YG, Macaulay V, Vega A, Carracedo A, Bandelt HJ. A critical reassessment of the role of mitochondria in tumorigenesis. PLOS Medicine 2005;2(11) e296.

[97] Nie H, Shu H, Vartak R, Milstein AC, Mo Y, Hu X, Fang H, Shen L, Ding Z, Lu J, Bai Y. Mitochondrial common deletion, a potential biomarker for cancer occurrence, is selected against in cancer background: a meta-analysis of 38 studies. PLoS One 2013;8(7) e67953.

[98] Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. Oncogene 2006;25(34) 4647-4662.

[99] Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. Oncogene 2006;25(34) 4663-4674.

[100] Yu M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. Advances in Clinical Chemistry 2012;57 99-138.

[101] Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nature Genetics 1998;20(3) 291-293.

[102] Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science 2000;287(5460) 2017-2019.

[103] Tan DJ, Bai RK, Wong LJC. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. Cancer Research 2002;62(4) 972-976.

[104] Zhu W, Qin W, Bradley P, Wessel A, Puckett CL, Sauter ER. Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid. Carcinogenesis 2005;26(1) 145-152.

[105] Tseng LM, Yin PH, Yang CW, Tsai YF, Hsu CY, Chi CW, Lee HC. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human breast cancers. Genes Chromosomes Cancer 2011;50(10) 800-811.

[106] Xu C, Tran-Thanh D, Ma C, May K, Jung J, Vecchiarelli J, Done SJ. Mitochondrial D310 mutations in the early development of breast cancer. British Journal of Cancer 2012;106(9) 1506-1511.

[107] Kumimoto H, Yamane Y, Nishimoto Y, Fukami H, Shinoda M, Hatooka S, Ishizaki K. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma. International Journal of Cancer 2004;108(2) 228-231.

[108] Tan DJ, Chang J, Liu LL, Bai RK, Wang YF, Yeh KT, Wong LJ. Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. BMC Cancer 2006;6:93.

[109] Lin CS, Chang SC, Wang LS, Chou TY, Hsu WH, Wu YC, Wei YH. The role of mitochondrial DNA alterations in esophageal squamous cell carcinomas. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2010;139(1) 189-197.

[110] Lievre A, Blons H, Houllier AM, Laccourreye O, Brasnu D, Beaune P, Laurent-Puig P. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. British Journal of Cancer 2006;94(5) 692-697.

[111] Lee HC, Li SH, Lin JC, Wu CC, Yeh DC, Wei YH. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. Mutation Research 2004;547(1-2) 71-78.

[112] Tamori A, Nishiguchi S, Nishikawa M, Kubo S, Koh N, Hirohashi K, Shiomi S, Inoue M. Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. Journal of Gastroenterology 2004;39(11) 1063-1068.

[113] Yin PH, Wu CC, Lin JC, Chi CW, Wei YH, Lee HC. Somatic mutations of mitochondrial genome in hepatocellular carcinoma. Mitochondrion 2010;10(2) 174-182.

[114] Suzuki M, Toyooka S, Miyajima K, Iizasa T, Fujisawa T, Bekele NB, Gazdar AF. Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers. Clinical Cancer Research 2003;9(15) 5636-5641.

[115] Jin X, Zhang J, Gao Y, Ding K, Wang N, Zhou D, Jen J, Cheng S. Relationship between mitochondrial DNA mutations and clinical characteristics in human lung cancer. Mitochondrion 2007;7(5) 347-353.

[116] Choi SJ, Kim SH, Kang HY, Lee J, Bhak JH, Sohn I, Jung SH, Choi YS, Kim HK, Han J, Huh N, Lee G, Kim BC, Kim J. Mutational hotspots in the mitochondrial genome of lung cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications 2011;407(1) 23-27.

[117] Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC, Ngan HY

(2001) High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. Cancer Research 2001; 61(16) 5998-6001.

[118] Van Trappen PO, Cullup T, Troke R, Swann D, Shepherd JH, Jacobs IJ, Gayther SA, Mein CA. Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. Gynecologic Oncology 2007;104(1) 129-133.

[119] Jerónimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss MS, Sidransky D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. Oncogene 2001;20(37) 5195-5198.

[120] Gomez-Zaera M, Abril J, Gonzalez L, Aguilo F, Condom E, Nadal M, Nunes V (2006) Identification of somatic and germline mitochondrial DNA sequence variants in prostate cancer patients. Mutation Research 2006;595(1-2) 42-51.

[121] Kloss-Brandstätter A, Schäfer G, Erhart G, Hüttenhofer A, Coassin S, Seifarth C, Summerer M, Bektic J, Klocker H, Kronenberg F. Somatic mutations throughout the entire mitochondrial genome are associated with elevated PSA levels in prostate cancer patients. American Journal of Human Genetics 2010;87(6) 802-812.

[122] Nagy A, Wilhelm M, Sukosd F, Ljungberg B, Kovacs G. Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. Genes Chromosomes Cancer 2002;35(3) 256-260.

[123] Tong BC, Ha PK, Dhir K, Xing M, Westra WH, Sidransky D, Califano JA. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. Journal Surgical Oncology 2003;82(3) 170-173.

[124] Carew JS, Zhou Y, Albitar M, Carew JD, Keating MJ, Huang P. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. Leukemia 2003;17(8) 1437-1447.

[125] Grist SA, Lu XJ, Morley AA. Mitochondrial mutations in acute leukemia. Leukemia 2004;18(7) 1313-1316.

[126] Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. Nature Review Genetics 2012;13(12) 878-890.

[127] Kirches E, Michael M, Woy C, Schneider T, Warich M-Kirches, Schneider-Stock R, Winkler K, Wittig H, Dietzmann K. Loss of heteroplasmy in the displacement loop of brain mitochondrial DNA in astrocytic tumors. Genes Chromosomes Cancer 1999;26(1) 80-83.

[128] Kirches E, Mawrin C, Schneider-Stock R, Krause G, Scherlach C, Dietzmann K. Mitochondrial DNA as a clonal tumor cell marker: gliomatosis cerebri. Journal of Neuro-Oncology 2003;61(1) 1-5.

[129] Kurtz A, Lueth M, Kluwe L, Zhang T, Foster R, Mautner VF, Hartmann M, Tan DJ, Martuza RL, Friedrich RE, Driever PH, Wong LJ. Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors. Molecular Cancer Research 2004;2(8) 433-441.

[130] Vega A, Salas A, Gamborino E, Sobrido MJ, Macaulay V, Carracedo A. mtDNA mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of mtDNA in populations. Oncogene 2004;23(6) 1314-1320.

[131] Montanini L, Regna-Gladin C, Eoli M, Albarosa R, Carrara F, Zeviani M, Bruzzone MG, Broggi G, Boiardi A, Finocchiaro G. Instability of mitochondrial DNA and MRI and clinical correlations in malignant gliomas. Journal of Neuro-Oncology 2005;74(1) 87-89.

[132] Barthelemy C, de Baulny HO, Lombes A. D-loop mutations in mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion? Human Genetics 2002;110(5) 479-487.

[133] Wong L, Tan D, Bai R, Yeh K, and Chang J. Molecular alterations in mitochondrial DNA of hepatocellular carcinomas: is there a correlation with clinicopathological profile? Journal of Medical Genetics 2004;41(5) e65.

[134] Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: A study with emphasis on Hurthle cell tumors. American Journal of Pathology 2002;160(5) 1857-1865.

[135] Abnet CC, Huppi K, Carrera A, Armistead D, McKenney K, Hu N, Tang ZZ, Taylor PR, Dawsey SM. Control region mutations and the ‘common deletion’ are frequent in the mitochondrial DNA of patients with esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer 2004;4: 30.

[136] Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, Wei YH, Liu TY, Chi CW. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. British Journal of Cancer 2004;90(12) 2390-2396.

[137] Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, Wei YH, Lee HC. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. Genes Chromosomes Cancer 2005;44(1) 19-28.

[138] Ye C, Shu XO, Wen W, Pierce L, Courtney R, Gao YT, Zheng W, Cai Q. Quantitative analysis of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in sporadic breast cancer and benign breast diseases. Breast Cancer Research and Treatment 2008;108(3) 427-434.

[139] Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wu HY, Wei YH, Jou MJ. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta 2006;1762(2) 241-255.

[140] Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. Nature Genetics 1992;2(4) 324-329.

[141] Kato T, Stine OC, McMahon FJ, Crowe RR. Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. Biological Psychiatry 1997;42(10) 871-875.

[142] Yeung KY, Dickinson A, Donoghue JF, Polekhina G, White SJ, Grammatopoulos DK, McKenzie M, Johns TG, John JC. The identification of mitochondrial DNA variants in glioblastoma multiforme. Acta Neuropathologica Communications 2014;2(1): 1. doi: 10.1186/2051-5960-2-1.

[143] Liang BC. Evidence for association of mitochondrial DNA sequence amplification and nuclear localization in human low-grade gliomas. Mutation Research 1996;354(1) 27-33.

[144] Liang BC, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas. Cancer Letters 1996;105(2)167-173.

[145] Dmitrenko V, Shostak K, Boyko O, Khomenko O, Rozumenko V, Malisheva T, Shamayev M, Zozulya Y, Kavsan V. Reduction of the transcription level of the mitochondrial genome in human glioblastoma. Cancer Letters 2005;218(1) 99-107.

[146] Anderson, S., Bankier A. T., Barrell B. G., De Bruijin M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., I.C. Eperon, D.P.Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, I.G. Young., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 290, 457–465.

[147] Nass S, Nass MMK. Intramitochondrial fibres with DNA characteristics. Journal of Cell Biology 1963;19: 593-629.

[148] Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. Human Genetics 1997;101(3) 384.

[149] Taanman JW. The mitochondrial genome: transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica Acta 1999;1410(2) 103-123.

[150] Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. Oncogene 2006;25(34) 4647-4662.

[151] Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. Oncogene 2006;25(34) 4663-4674.

[152] Yu M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. Advances in Clinical Chemistry 2012;57 99-138.

[153] Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nature Genetics 1998;20(3) 291-293.

[154] Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science 2000;287(5460) 2017-2019.

[155] Tan DJ, Bai RK, Wong LJC. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. Cancer Research 2002;62(4) 972-976.

[156] Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. Nature Review Genetics 2012;13(12) 878-890.

[157] Seo Y, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Takahama K, Schneider PM (1998) Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. Forensic Sci Int

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Glial Tümörlerde Gözlemlenen mtDNA'nın D-Loop Bölgesi Varyasyonları

Ali Mutlukan

Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilimdalı

DANIŞMAN

Prof.Dr. Hakan KARABAĞLI

TIPTA UZMANLIK TEZİ/ Konya, 2017

Köken itibarı ile gliomlar, glial hücrelerden gelişen tümörlerdir. Astrositlerden astrositomlar, oligodendrositlerden oligodendrogliomlar ve ependimal hücrelerden ependimomlar gelişir. Glial tümörler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yetişkinlerde en fazla görülen primer beyin tümörü olarak rapor edilmektedir. Ek olarakta, astrositomlar diğer glial tümörlerden üç kat daha yüksek insidans ile görülürler

İnsan mitokondri DNA'sı 16.569 baz çifti (bç) büyüklüğünde, kapalı dairesel çift zincirli bir moleküldür. İnsan mitokondri DNA'sının tüm baz dizisi ve genom organizasyonu 1981 yılında Anderson ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır. mtDNA zincirlerinden guanin içeriği fazla olan zincire ağır zincir (H zincir), sitozin içeriği fazla olana ise hafif zincir (L zincir) denir. Her iki zincirin bir birinden ayrı replikasyon orijini vardır. Ağır zincirin replikasyon orjini D-loop (Displacement loop) denen kontrol bölgede yer alır.

Kanser araştırmalarında mtDNA D-loop bölgesi mutasyon ve polimorfizleri saptanmıştır. Örneğin; gastirik kanserlerde D-Loop bölgesinde geniş delesyonlar ve nokta mutasyonları, kolorektal kanserlerde, baş-boyun kanserlerinde ve akciğer kanserlerinde nokta mutasyonları saptanmıştır.

Diğer DNA tipleri (çekirdek, kloroplast ve bakteri) düşünüldüğünde mitokondrial DNA (mtDNA) sekanslanması özellikle yakın akrabaların belirlenmesi ve hücrenin geçirdiği evrimsel olayların geçmişini içermesi açısından son derece önem arz etmektedir.

Anahtar sözcükler: Glial tümör, mtDNA, varyasyon, D-loop

SUMMARY

The observed mtDNA D-Loop area variations in the Glial tumors

As of origin with gliomas, tumors developed from glial cells. Astrocytes develop from astrocytomas, oligodendrocytes from oligodendrogliomas and ependymomas develop from ependymal cells.Glial tumors has been reported as the most common primeryl tumors in adults by the World Health Organization is reported to be a brain tumor. Astrocytomas are seen three times more often than other glial tumors

Human mitochondrial DNA 16569 base pairs (bp) in size, has a closed circular double-stranded molecule. All of the base sequence of human mitochondrial DNA and genome organization was uncovered in 1981 by Anderson et al. Guanine content of mtDNA chain which chain over the heavy chain (H chain), cytosine content in excess of the light chain (L chain) is called. Both chains have an origin of replication from a separate one. The replication origin of the heavy chain D-loop (Displacement loop) takes place in so-called control zone.

mtDNA D-loop region mutations and polymorphisms have been identified in cancer research. For example; large deletions and point mutations in gastric cancer in the D-loop, colorectal cancer, head and neck cancer and point mutations in lung cancer patients.

Other types of DNA (nucleus, chloroplasts and bacteria) Considering mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing of close relatives and especially the determination of terms to include the history of evolutionary events experienced by the cell is of the utmost importance

Key Words: glial tumors, mtDNA, variation, D-loop

ÖZGEÇMİŞ

Ali Mutlukan, 18.04.1985 tarihinde Konya'da doğdu. İlk okulunu Gazi Mustafa Kemal ilkokulunda, orta okul ve liseyi Konya Meram Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldu. Aralık 2011 tarihinde Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalında uzmanlık eğitimi almaya başlamıştır.