

**TÜRK POPÜLASYONUNDA TİROİT  
NODÜLLERİNDE, MİTOKONDRIYAL DNA D-LOOP  
BÖLGESİ MUTASYONLARININ ANALİZİ**

**Esra ULU**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Cenk ARAL  
2015**

**T.C.**

**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRK POPÜLASYONUNDA TİROİT NODÜLLERİNDE,  
MİTOKONDRIYAL DNA D-LOOP BÖLGESİ MUTASYONLARININ  
ANALİZİ**

**Esra ULU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Cenk ARAL**

**TEKİRDAĞ-2015**

**Her hakkı saklıdır**

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.00.10.YL.14.01 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Cenk ARAL danışmanlığında, Esra ULU tarafından hazırlanan “Türk Popülasyonunda Tiroit Nodüllerinde, Mitokondriyal DNA D-Loop Bölgesi Mutasyonlarının Analizi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Cenk ARAL

*İmza :*

Üye : Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Türk Popülasyonunda Tiroit Nodüllerinde, Mitokondriyal DNA D-Loop Bölgesi Mutasyonlarının Analizi

**Esra ULU**

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cenk ARAL

Mitokondriyal DNA (mtDNA) kusurlarının kanser dâhil birçok hastalıkla ilişkili olduğu literatürde yer almaktadır. Buna ilişkin olarak, serviks, meme, gastrik, kolorektal, akciğer ve renal kanserlerde mitokondriyal DNA D-loop bölgesindeki değişimlerin sıklıkla gözlemlendiği bildirilmiş ve özellikle, D-loop bölgesinde yer alan D310 bölgesi olarak adlandırılan polisitozin dizisinin elektrofilik ve oksidatif hasara daha yatkın olduğu öne sürülmüştür. Yapılan bu çalışmanın amacı, Türk toplumunda, tiroit bezi tümörlerinde mtDNA mutasyon ve polimorfizmlerinin belirlenmesidir. Çalışmaya 87 benign ve 6 malign hiperplazi hastasına ait toplam 268 dokudan fenol-kloroform yöntemiyle elde edilen DNA örneği dahil edilmiştir. MtDNA D-loop bölgesi 15-484 ile 15971-16411 nt arası sırasıyla birinci ve ikinci bölge olarak adlandırılan iki bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra DNA dizi analizi, Beckman Coulter GenomeLab marka otomatik dizi analizi cihazı kullanılarak Sanger metoduyla gerçekleştirilmiştir. Benign olgular için hasta ve sağlıklı dokular kıyaslandığında, birinci bölgede 7 olguda somatik mutasyon belirlenmiş, ancak malign hiperplazilerde bir fark görülmemiştir. Belirlenen polimorfizmler içerisinde sadece aile öyküsü ve A73G polimorfizmi arasında istatistiksel bir ilişki bulunmuştur. Birinci bölgede yer alan D310 dizi değişimleri ayrıca değerlendirilmiş ve örneklerin %90'dan fazlasında bu bölgedeki uzunluk polimorfizminin normal sınırlar içerisinde bulunduğu görülmüştür. Bu bölgede gözlenen heteroplazmilerin de incelenen patolojilerle bir ilişkisi görülmemiştir. İkinci bölge analizlerinde ise polimorfizmlerin birinci bölgeye kıyasla daha fazla olduğu ancak her bir polimorfizmin frekansının nispeten daha

düşük olduğu görülmüştür. Sağlıklı ve hasta dokular kıyaslandığında benign olgulardan 4 tanesinde farklılık görülmüş, malign olgularda ise farklılık gözlenmemiştir. Sonuç olarak elde edilen veriler mtDNA D-loop bölgesindeki değişimlerin benign ve malign tiroit lezyonlarının gelişiminde bir rolü olmadığını göstermektedir. Kodlama yapan bölgelerdeki mutasyon/polimorfizmlerin belirlenmesi, mitokondriyal haplogrupların tanımlanması ve düşük heteroplazmilerin belirlenmesi tiroit nodüllerinde mtDNA değişimlerinin rolünün açığa çıkartılması için önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Mitokondriyal DNA, D-Loop, Tiroit Nodülü, Polimorfizm, Mutasyon

**2015, 74 sayfa**

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

Analysis of Mitochondrial DNA D-loop Region Mutations in Thyroid Nodules in Turkish Population

**Esra ULU**

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cenk ARAL

It is currently present in the literature that mitochondrial DNA (mtDNA) defects are associated with a great number of diseases including cancer. With regard to this, one reports that alterations of mtDNA D-loop region are often observed in cervical, breast, gastric, lung and renal cancers, and suggests that in particular a polycytidine stretch termed D310 within D-loop region is more susceptible to electrophile and oxidant damage. The aim of the present study is to establish mtDNA mutations and polymorphisms in tumors of the thyroid gland in Turkish population. The study covered DNA samples which were extracted from a total of 268 tissues from thyroid patients, 87 individuals with benign hyperplasia and 6 individuals with malignant hyperplasia, using phenol-chloroform method. Two regions between 15-484. and 15971-16411. nt, designated as the first and the second region, respectively, were amplified from mtDNA D-loop region by using polymerase chain reaction (PCR). Following purification of the obtained PCR products, DNA sequencing was performed with Sanger method, by employing a Beckman Coulter GenomeLab automated DNA sequencer. When healthy and diseased tissues were compared in benign cases, somatic mutations were detected in the first region in 7 cases whereas there were no mutations in those with malignant hyperplasia. Among the polymorphisms detected, there was a statistically significant relationship between family history and A73G polymorphism only. D310 sequence variations in the first region were additionally evaluated, and it was seen that length polymorphism in this region was in normal limits in more than 90% of the samples. Heteroplasmy observed in this region was not also associated with pathological examinations. Analyses of the second

region revealed that polymorphisms were a lot more when compared to the first region; however the frequency of each polymorphism was relatively lower. In comparison of healthy and diseased tissues, 4 of benign cases exhibited mutations while any malignant ones did not. In conclusion, the obtained results suggest that alterations in mtDNA D-loop region play no role in the development of benign and malignant thyroid lesions. Determination of mutation/polymorphisms in coding regions, identification of mitochondrial haplogroups, and detection of low heteroplasmy are important to reveal role of alterations in mtDNA in thyroid nodules.

**Key words:** Mitochondrial DNA, D-Loop, Thyroid Nodule, Polymorphism, Mutation

**2015, 74 pages**



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEMEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Mitokondriyal DNA'nın Yapısı ve Özellikleri.....	3
2.2. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyon ve Transkripsiyonu .....	5
2.2.1. Replikasyon .....	5
2.2.2. Transkripsiyon .....	7
2.2.3. Mitokondriyal protein sentezi.....	9
2.3. Mitokondriyal DNA Mutasyonları .....	10
2.3.1. Mitokondriyal DNA yeniden düzenlenmeleri .....	12
2.3.2. Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları.....	13
2.4. Tiroit .....	13
2.4.1 Soğuk nodül .....	15
2.4.2. Sıcak nodül .....	17
2.5. Mitokondriyal DNA Mutasyonları ve Tiroit .....	17
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>20</b>
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	20
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.3. Kullanılan kitler.....	22
3.1.4. Kullanılan ticari çözeltiler ve tamponlar .....	22
3.1.5. Kullanılan çözeltiler .....	23
3.1.6. Primerler .....	24
3.1.7. Kullanılan bilgisayar programları.....	25
3.1.8. Hasta grubu.....	25
3.2. Yöntem .....	25
3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) .....	25
3.2.2. Agaroz jel elektroforezi .....	27
3.2.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	28
3.2.4. DNA dizileme reaksiyonu .....	28
3.2.5. DNA dizi analizi örneklerinin çöktürülmesi (etanol presipitasyonu).....	29
3.2.6. Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi.....	30
3.2.7. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi .....	30
3.2.8. İstatistiksel analizler .....	30
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>31</b>
4.1. Hasta Grubu.....	31
4.2. PZR Sonuçları .....	33
4.3. Saflaştırma Sonuçları.....	34

4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları .....	35
4.4.1. Birinci Bölge (15-484. nükleotidler) analiz sonuçları .....	36
4.4.2. İkinci Bölge (15971-16411. nükleotidler) analiz sonuçları.....	44
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>48</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>58</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 3.1: PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler .....	24
Çizelge 4.1: Tez çalışması kapsamında incelenen tiroit benign hiperplazi hastalarına ait veriler .....	32
Çizelge 4.2: Tez çalışması kapsamında incelenen tiroit malign hiperplazi hastalarına ait veriler .....	32
Çizelge 4.3: Birinci bölge için farklılık görülen benign neoplazm olgular .....	39
Çizelge 4.4: Birinci bölge için malign hiperplazilerde rastlanan nükleotid değişimleri .....	39
Çizelge 4.5: Benign hiperplazi hastalarında D310 bölgesi için belirlenen sitozin sayıları ve yüzdeleri .....	40
Çizelge 4.6: Malign hiperplazi hastalarında D310 bölgesi için belirlenen sitozin sayıları .....	41
Çizelge 4.7: Benign hiperplazi olgularında D310 bölgesi için belirlenen farklılıklar .....	42
Çizelge 4.8: Benign hiperplazi olgularında D310 bölgesi için heteroplazmi, homoplazmi sayıları ve yüzdeleri .....	43
Çizelge 4.9: Malign hiperplazi olgularında D310 bölgesi için heteroplazmi, homoplazmi sayıları .....	44
Çizelge 4.10: İkinci bölge için farklılık görülen benign neoplazm olgular .....	49
Çizelge 4.11: İkinci bölge için malign hiperplazilerde rastlanan .....	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

- Şekil 2.1: İnsan mitokondriyal DNA'sı ve üzerinde yer alan genler. Kompleks I genleri: NADH dehidrogenaz (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 ND6), Kompleks III genleri: Sitokrom c Oksidoredüktaz (cytb), Kompleks IV genleri: Sitokrom oksidaz (COI, COII, COIII), Kompleks V genleri: ATP sentaz (ATP6, ATP8), Ribozomal RNA genleri 16S, 12S, Transfer RNA genleri taşıdıkları aminoasidin harf kodu ile gösterilmiştir. HSP1: Ağır zincir promotör bölge 1, HSP2: Ağır zincir promotör bölge 2, LSP: Hafif zincir promotör bölge, OH: Ağır zincir orijini, OL: Hafif zincir orijini ..... 3
- Şekil 2.2: OL ve OH şeklinde iki farklı orijinde başlayan asimetrik zincir modeli..... 5
- Şekil 2.3: Mitokondriyal DNA ağır zincir replikasyon başlangıcı. TAS: Sonlanma ile ilişkili diziler, CSB: Korunmuş dizi bloğu ..... 6
- Şekil 2.4: Memeli mtDNA transkripsiyon başlama ve sonlanmasının şematik görünümü. I TH1: Ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi 1, ITH2: Ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi 2, ITL: Hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi, MTERF: Mitokondriyal sonlanma faktörü B1, mtTFA: Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A, TFB1M: Transkripsiyon faktörü B1, TFB2M: Transkripsiyon faktörü B2..... 8
- Şekil 2.5: Heteroplazmik mtDNA mutasyonlarının hücre bölünmesi ile dengesiz dağılımını ve hipotetik bir eşik değer çizgisinde fenotipik etkileri ..... 11
- Şekil 2.6: A. Soğuk nodül; sağ tiroit lobu üst kesiminde soğuk nodül izlenmektedir, B. Sıcak nodül; sol tiroit lobu alt kesiminde sıcak nodül izlenmektedir ..... 16
- Şekil 4.1: M: Marker, BL: Negatif kontrol, 1,2,3,4 ve 5: Hasta örnekleri..... 33
- Şekil 4.2: A; %2 'lik agaroz jelin fotodansimetrik olarak görüntülenmesi, B; Marker bantlarının değerlendirilmesi, C; 1. Kuyudaki örneğin değerlendirilmesi ..... 34
- Şekil 4.3: Dizi analizi sonuçlarının referans dizi ile karşılaştırılması ..... 35
- Şekil 4.4: 20 nolu hastaya ait normal doku (A) ve nodül (B) DNA'sından elde edilen dizi analizi örnekleri ..... 36
- Şekil 4.5: Birinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının yeri ve sayısı ile bu bölgede yer alan CSNI, II ve III dizilerinin konumu..... 37
- Şekil 4.6: Birinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının Cambridge dizisi ve gen bankasında belirlenen 3 Türk mtDNA dizisi ile çoklu eşleme sonuçları. Tez kapsamında bulunan polimorfizmler küçük harflerle gösterilmiştir. Cambridge diziden farklı olduğu halde en az bir gen bankası verisi ile uyumlu olan substitüsyonlar ok işaretleri ile gösterilmiştir ..... 38
- Şekil 4.7: İkinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının yeri ve sayısı ile bu bölgede yer alan ETAS1 ve ETAS2 dizilerinin konumu ..... 45
- Şekil 4.8: İkinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının Cambridge dizisi ve genbankasında belirlenen 3 Türk mtDNA dizisi ile çoklu eşleme sonuçları. Tez kapsamında bulunan polimorfizmler küçük harflerle gösterilmiştir. Cambridge

diziden farklı olduğu halde en az bir gen bankası verisi ile uyumlu olan  
substitüsyonlar ok işaretleri ile gösterilmiştir .....46

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATP	: Adenozin-3-fosfat
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
CD	: Mitokondriyal DNA sık delesyon “common deletion”
CSB	: Korunmuş dizi bloğu
CTN	: Soğuk nodül
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleik asit trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
G	: Guanin
HCl	: Hidrojen klorür
HSP	: Ağır zincir promotörü
HTN	: Sıcak nodül
IT <sub>H</sub> , IT <sub>L</sub>	: Ağır ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgeleri
KCl	: Potasyum klorür
LSP	: Hafif zincir promotörü
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
MNG	: Multinodüler guatr
mRNA	: Haberci RNA
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mtEF	: Mitokondriyal translasyon uzama faktörü
mTERF	: Mitokondriyal sonlanma faktörü
mtIF	: Mitokondriyal translasyon başlangıç faktörü
mtRNA pol	: Mitokondriyal RNA polimeraz
mtTFA	: Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A
NaAC	: Sodyum asetat
NaCl	: Sodyum klorür
ND	: NADH dehidrogenaz
nDNA	: Nükleer DNA
nt	: Nükleotid
O <sub>H</sub> , O <sub>L</sub>	: Ağır ve hafif zincir replikasyon orijinleri
PEG	: Polietilenglikol
Pol $\gamma$	: DNA polimeraz $\gamma$
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RPM	: Devir/dak.
rRNA	: Ribozomal RNA
SLS	: Örnek yükleme tamponu

T	: Timin
TAS	: Sonlanma ile ilişkili diziler
TBE	: Tris borik asit EDTA
TFB1M, TFB2M	: Transkripsiyon faktörü B1 ve B2
TMNG	: Toksik multinodüler guatr
TRH	: Tirotropin salan hormon
tRNA	: Taşıyıcı RNA
TSH	: Tiroit stimulan hormon
U	: Ünite
USG	: Ultrasonografi
UV	: Ultraviyole

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimimde tüm imkanları sağlayan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Cenk ARAL'a;

Yardımları ve yönlendirmeleri ile hep yanımda olduğunu hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a;

Yüksek lisans öğrenimimde ve çalışmalarım sırasında yardımlarını bilgi ve görüşlerini eksik etmeyen ve her daim yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e ve çalışma arkadaşlarım Hande AKALAN, Gürkan AKYILDIZ, Dilan Hevra KIZILOCAK, Serdar FINDIK'a ve diğer tüm Biyoloji A.D. mensuplarına;

Tez çalışmamda kullandığım örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Doç. Dr. Hülya ILIKSU GÖZÜ'ne (Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı), laboratuvarını bizimle paylaşan Prof. Dr. Havva İLBAĞI'na;

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında beni neşelendirerek motive eden arkadaşlarım Aysel EREN ve Olcay BELLİ'ye;

Öğrenim hayatım boyunca ve her daim yanımda olarak maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayarak destekleyen hayat arkadaşım Koray AKAR'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından NKUBAP.00.10.YL.14.01 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ocak, 2015

Esra ULU  
Biyolog



## 1. GİRİŞ

Nodüler tiroit hastalıkları tiroit bezi içinde, bir ya da birden fazla nodüllerle karakterize yaygın görülen bir hastalıktır (Gharib 1997). İyot eksikliği olan bölgelerde, ileri yaşlarda, kadınlarda ve radyasyona maruz kalmış toplumlarda daha sık görülür (Gharib 1997, Tan ve ark. 1997). Çevre tiroit parankiminden farklı, radyolojik olarak ayrılabilen, fizik muayene ya da yardımcı görüntüleme yöntemleri ile tespit edilebilen lezyonlara tiroit nodülü denir (Datta ve ark. 2006, Faquin 2008, Hegedus ve ark. 2003, Serra ve ark. 2008).

Tiroit bezi kanserleri nadir olarak görülen kanserler olup Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) görülen tüm kanserlerin %0,74-2,3'ünü oluşturmaktadır. Kansere bağlı ölümlerin %0,17-0,26'sından tiroit kanserleri sorumludur (Schneider ve ark. 2000). Benign hiperplastik (kolloid) nodüller en sık görülen tiroit nodülleridir ve tiroit nodüllerinin %5-20 'si gerçek neoplazmdir (Larsen ve ark. 1998). Palpe edilebilen tiroit nodüllerinde, maligniteye %5'ten az rastlanır (Burguera ve ark. 2000, Meier 2000). Nodüllerin fonksiyonel özellikleri göz önüne alındığında sintigrafik taramalarda iyot alımındaki azalış veya artışa bağlı olarak normal, soğuk ve sıcak nodüller olarak sınıflandırılırlar. İyot alımına bağlı olarak farklı coğrafi bölgelerde değişken insidansına karşın, nodüllerin yaklaşık %85'i soğuk, %10'u ılık ve %5'i sıcak nodüllerden oluşur (Gozu ve ark. 2005).

Mitokondriler nükleer genomdan bağımsız olarak replike ve transkribe olabilen kendi genomlarına sahiptirler. Her hücrede çok sayıda kopyası bulunan bu genomu sitoplazmik genom veya mitokondriyal DNA (mtDNA) adı verilir. Son yıllarda mitokondriyal DNA mutasyonları ve polimorfizmlerinin kanser oluşumunda ve gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bunlar arasında, en çok çalışılan kodlama yapmayan D-loop bölgesinde yer alan D310 uzunluk polimorfizmidir. MtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızının diğer kısımlarına göre %2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Avisé 1991). Bu denli yüksek oranda mutasyon görülmesi, histon proteinlerden yoksun olması ve tamir mekanizmasının nükleer genom kadar etkin olmamasından kaynaklanır. MtDNA'da homolog kromozomlar bulunmadığı için mayoz bölünmede görülen crossing-over gerçekleşmez. Dolayısıyla mitokondriyal genomdaki varyasyonlar nükleotit eksilmesi (delesyon), eklenmesi (insersiyon) veya değişimlerinden (tranzisyon ve transversiyon) kaynaklanmaktadır.

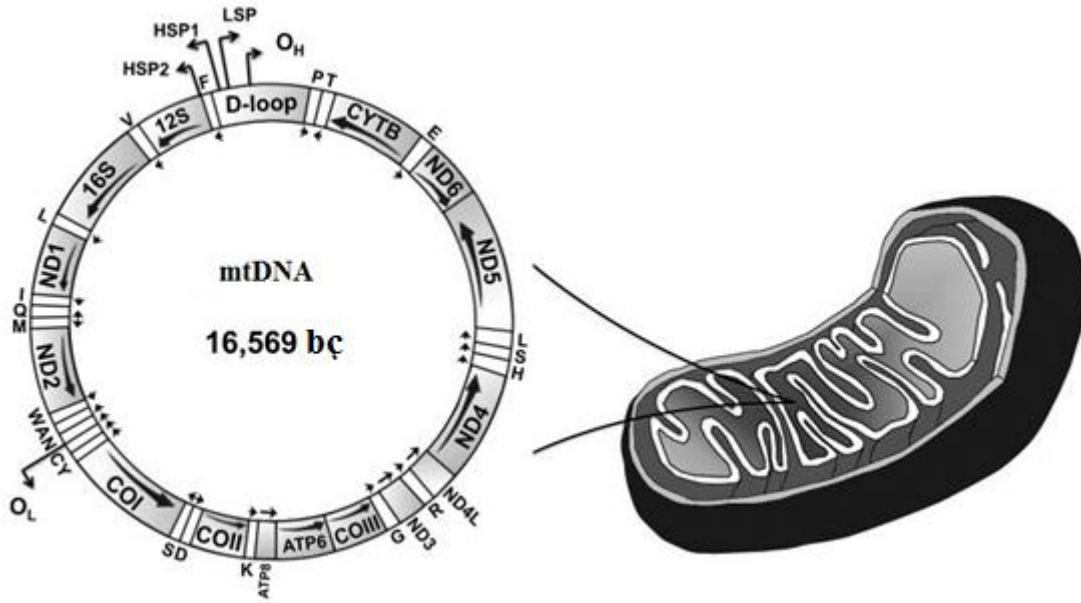
Yapılan çalışmalarda, büyük delesyonların varlığının tiroit tümörlerinin gelişiminde rolü olabileceği bildirilmiştir (Muller-Hocker ve ark. 1998, Maximo ve ark. 2002, Ebner ve ark. 1991). Diğer taraftan mtDNA sık delesyonunun varlığını tiroit hastalıklarında ele alan diğer çalışmalarda böyle bir ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir (Tallini ve ark. 1994, Aral ve ark. 2010). Büyük delesyonların varlığı üzerine yapılan çalışmaların dışında, kodlama yapan veya yapmayan mtDNA dizilerindeki diğer mutasyonları ele alan çalışmalar da mevcuttur. MtDNA mutasyonlarının ağırlıklı olarak kompleks I genlerinde bulunduğu ve bu bölgenin mutasyonlarının tiroit tümörögenezinde rolü olabileceği bildirilmiştir (Yeh ve ark. 2000). Benzer şekilde yapılan çalışmalarda bulunan sonuçlar bu görüşü desteklemektedir (Maximo ve ark. 2002, G. Gasparre 2007). Buna karşılık mtDNA mutasyonlarının tiroit tümörlerinde rolü olmadığını belirten çalışmalarda bulunmaktadır (Witte ve ark. 2007). Mitokondriyal DNA D-loop bölgesi, D310 değişimlerinin incelediği bir çalışmada da meydana gelen değişimlerin tümörögenezde bir rolü olmadığı bildirilmiştir (Lohrer ve ark. 2002). Bir başka yayında ise tiroit kanseri olgusunda D310 değişimlerinin %5,7 düzeyinde görüldüğü ve tiroit kanserleri ile bir ilişkisi bulunmadığı bildirilmiştir (Tong ve ark. 2003).

Sonuç olarak mitokondriyal genom instabilitesine neden olabilen ve oldukça değişken olan D-loop kontrol noktasında meydana gelen mitokondriyal DNA değişimleri (nokta mutasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar) ve kodlama yapan bölgelerdeki mutasyonlar serviks, meme, gastrik, renal, kolorektal, hepatoselüler ve akciğer kanserlerinde sıklıkla görülmekle birlikte tiroit patolojileri ile mtDNA değişimleri arasındaki ilişki kesin değildir ve çok sayıda sağlıklı ve hasta bireyi kapsayan, farklı populasyonlarda yapılacak çalışmalara gereksinim vardır. Bu çalışmanın amacı Türk toplumunda tiroit bezi tümörlerinde mtDNA D-loop bölgesinde mutasyon sıklığının belirlenmesi ve tümörögenezde rolünün bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır.

## 2. TEMEL BİLGİLER

### 2.1. Mitokondriyal DNA'nın Yapısı ve Özellikleri

Mitokondri genel olarak tüm ökaryotlarda bulunan ve hücrel reaksiyonlar için gerekli enerjinin sağlandığı hücrenin en önemli organellerindendir (Cummins 1998). Mitokondri içerisinde, sayıları 2-15 arasında değişen mitokondriyal DNA (mtDNA) kopyaları bulunmaktadır. İnsan mtDNA'sı 16569 baz çifti (bç) uzunluğunda, halkasal, çift zincirli bir DNA molekülü olup tüm dizisi ilk olarak Anderson ve ark., (1981) tarafından tanımlanmıştır. Mitokondriyal DNA'da 13'ü protein, 22'si taşıyıcı RNA (tRNA) ve 2'si ribozomal RNA (rRNA) kodlayan toplam 37 gen bulunmaktadır (Krawczak M ve ark. 1998, Zischler 1999) (Şekil 2.1.).



**Şekil 2.1.** İnsan mitokondriyal DNA'sı ve üzerinde yer alan genler (McKinney ve ark. 2013). Kompleks I genleri: NADH dehidrogenaz (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6), Kompleks III genleri: sitokrom c Oksidoredüktaz (CYTB), Kompleks IV genleri: Sitokrom oksidaz (COI, COII, COIII), Kompleks V genleri: ATP sentaz (ATP6, ATP8), Ribozomal RNA genleri: 16S, 12S, Transfer RNA genleri taşıdıkları aminoasitin harf kodu ile gösterilmiştir. HSP1: Ağır zincir promotör bölge 1, HSP2: Ağır zincir promotör bölge 2, LSP: Hafif zincir promotör bölge, OH: Ağır zincir orijini, OL: Hafif zincir orijini

Mitokondriyal DNA'nın iki komplementer zinciri guanin içeriklerine göre adlandırılmaktadır. Guanince zengin olan ağır zincir üzerinde 28 gen, hafif zincirde ise 9 gen kodlanmaktadır (Anderson ve ark. 1981). Mitokondriyal DNA ileri düzeyde ekonomik bir organizasyon göstermektedir. Bu organizasyon içinde genler intron dizilerine sahip değildir ve kontrol bölgesi dışında genler arası diziler yoktur veya birkaç bazla sınırlıdır. Mitokondriyal DNA üzerinde kodlanan rRNA ve tRNA genleri küçüktür ve polipeptid kodlayan genlerin bir kısmı üst üste çakışmaktadır. Birçok gen için sonlanma kodonları bulunmamaktadır ve translasyonun sonlanması mRNA'nın posttranskripsiyonel poliadenilasyonu aracılığı ile sağlanmaktadır. Mitokondriyal DNA üzerinde kodlama yapmayan kontrol bölgesi 16,024-576. nükleotidler arasında yer almakta ve 3 korunmuş dizi bloğu, 3 zincirli bir yapı gösteren D-loop bölgesi ve mitokondriyal transkripsiyonda rol alan "enhancer" ve promotor dizileri ile ağır zincir replikasyon orijinini içermektedir (Fernandez-Silva ve ark. 2003, Scheffler 1999, Taanman 1999).

Mitokondriyal DNA maternal yolla kalıtılır (Carracedo ve ark. 2000, Wilson AC ve ark. 1985). Çünkü ovumun zona pellusida tabakasını sadece spermin baş kısmı geçer. Oysa mitokondriler spermin kuyruk kısmında yer alırlar. Ancak son zamanlarda az miktarda paternal mtDNA'nın fertilize yumurtaya transfer olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır (Awadalla ve ark. 1999, Eyre-Walker ve ark. 1999, Parsons ve ark. 2000). Diploid canlılar her hücrede nDNA'nın iki kopyasına sahipken, mtDNA'nın, hücre tipine göre değişmek üzere, 1000 – 100000 kopyasına sahiptirler (Fourtounis 1999).

Mitokondriyal DNA'nın başka bir özelliği ise mutasyon hızının yüksek olmasıdır. MtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızı diğer kısımlarına göre %2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha fazladır (Avise 1991). Bu denli yüksek oranda mutasyon görülmesi, histon proteinlerden yoksun olması ve tamir mekanizmasının nükleer genom kadar etkin olmamasından kaynaklanır. MtDNA'da homolog kromozomlar bulunmadığı için mayoz bölünme esnasında crossing-over gerçekleşmez. Dolayısıyla mitokondriyal genomdaki varyasyonlar nükleotit eksilmesi (delesyon), eklenmesi (insersiyon) veya değişimlerinden (tranzisyon ve transversiyon) kaynaklanmaktadır.

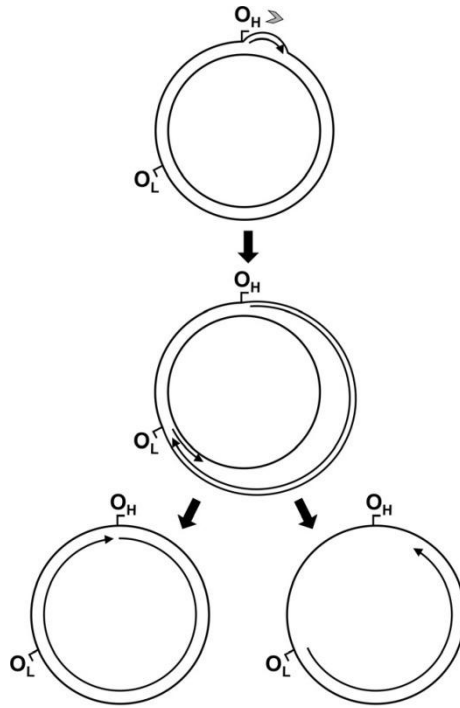
Bunlara ek olarak mtDNA, nükleer DNA'dan daha farklı bir genetik kod kullanmaktadır. Örneğin, evrensel (nükleer) genetik kodlamada UGA sonlandırma (STOP) kodonu iken mitokondriyal genetik kodda aynı kodon triptofan amino asidini kodlamaktadır. Benzer şekilde mitokondriyal genetik kodda AUA kodonu izolösine yerine metionin

kodlamakta, AGA ve AGG kodonları ise arjinin amino asidini kodlamak yerine STOP kodonu olarak görev almaktadırlar (Butler 2005).

## 2.2. Mitokondriyal DNA'nın Replikasyon ve Transkripsiyonu

### 2.2.1. Replikasyon

Mitokondriyal DNA'nın replikasyonu nDNA replikasyonundan farklıdır ve hücre döngüsünden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Mitokondriyal DNA replikasyonu ağır zincir orijini ( $O_H$ ) ve hafif zincir orijini ( $O_L$ ) olmak üzere iki noktadan başlar. Ağır zincir orijini D-loop bölgesinde hafif zincir promotörünün (LSP) aşağısında yer alırken hafif zincir orijini  $O_H$ 'den mtDNA'nın 2/3'si kadar bir uzaklıkta yer almaktadır (Clayton 1982) (Şekil 2.2.).

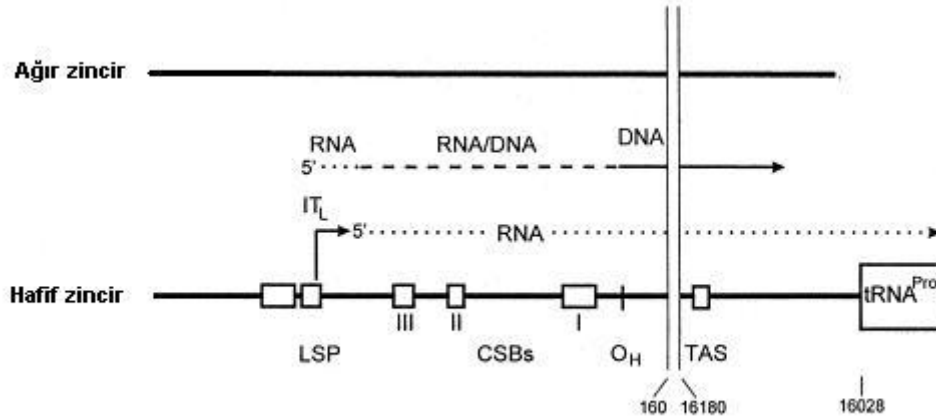


**Şekil 2.2.**  $O_L$  ve  $O_H$  şeklinde iki farklı orijinde başlayan asimetrik zincir modeli (McKinney ve ark. 2013)

Mitokondriyal replikasyonun başlaması mitokondriyal transkripsiyon ile bağlantılı olup halkasal şekilde gerçekleşmektedir.  $O_H$  üzerinden başlayıp sentezlenen ağır zincirin 2/3'ü

sentezlendikten sonra yani hemen hemen hafif zincir orijinini geçtikten sonra hafif zincir sentezi başlar. Ağır zincir sentezinin başlaması için hafif zincir promotöründe (LSP) yer alan hafif zincir transkripsiyon başlangıç (ITL) bölgesinden kısa bir RNA transkript primeri kökenlenir. D-loop bölgesinde bulunan promotör bölgede üç adet değişmez baz dizisi mitokondriyal RNA polimerazın yeni RNA primeri sentezinden sonra  $O_H$  yukarısında kalan üç iyi korunmuş dizi bloğu üzerinde (CSB) stabil bir RNA-DNA hibridi oluşmaktadır. Bu diziler CSBI 210-234, CSBII 299-315, CSBIII 346-363 baz çiftleri arasındadır (Sbisa ve ark. 1997). Bu yapıdan oluşturulan olgun primer ve mitokondriyal DNA polimeraz (DNA polimeraz  $\gamma$ ) yeni zincir sentezini başlatır (Lee ve ark. 1996, Shadel ve ark. 1997). Hafif zincir sentezi, ağır zincir sentezine bağlı olarak  $O_L$  bölgesinde çift zincirin açılması sonrasında gerçekleşmektedir. Açılmayı takiben bir primaz yardımı ile primer dizisi oluşturulur ve ters yönde replikasyon gerçekleştirilir (Holt ve ark. 1990).

DNA replikasyonu sonlanma ile ilgili diziler (TAS) üzerinde durur ve 3 zincirli D-loop yapısı ortaya çıkmaktadır. Sbisa ve ark. (1997) insan mtDNA' sında TAS dizilerinin de kapsayan iki korunmuş bölgeyi uzamış sonlanma ile ilgili diziler (ETAS) olarak tanımlamış ve 60 ile 63 bç uzunluğundaki ETAS 1 ve ETAS 2 dizilerinin 16081 ve 16294. nükleotidlerinden itibaren başladığını belirtmişlerdir . Diğer durumda ise sentez tüm genom boyunca devam etmekte ve yeni bir mtDNA kopyası oluşturulmaktadır (Clayton 1982, Brown ve ark. 2002) (Şekil 2.3.).



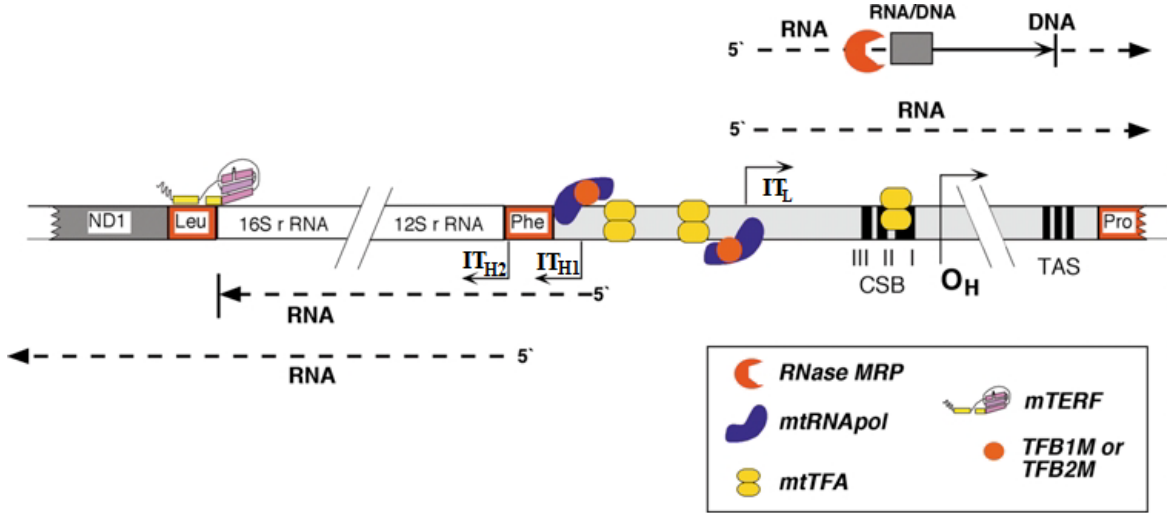
**Şekil 2.3.** Mitokondriyal DNA ağır zincir replikasyon başlangıcı (Taanman 1999). TAS: Sonlanma ile ilişkili diziler, CSB:Korunmuş dizi bloğu

Asimetrik zincir replikasyon modelinin yanı sıra, iki boyutlu agaroz jel elektroforezi tekniği kullanılarak mtDNA replikasyon mekanizması incelenen çalışmalarda tek bir orijinli olan ( $O_H$ ) tek yönlü replikasyon modeli ve ağır zincir replikasyon orijininin daha aşağısında başlayan iki yönlü replikasyon modelinin replikasyonda rol alabileceği bildirilmiştir (Bowmaker ve ark. 2003, Holt ve ark. 2000, Yang ve ark. 2002).

Mitokondriyal DNA replikasyonu DNA polimeraz  $\gamma$  (Pol  $\gamma$ ) tarafından gerçekleştirilir. Pol  $\gamma$  125-140 kD ağırlığında büyük katalitik  $\alpha$ -alt birimi ve 30-54 kD ağırlığında primer tanınmasında rol alan  $\beta$ -alt birimlerinden oluşur. Büyük alt birim aynı zamanda 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve bu sayede replikasyonun doğruluğu sağlanır. Nükleer DNA polimerazlar gibi Pol  $\gamma$ 'da diğer yardımcı proteinlere gereksinim duyar ancak bunların sadece bir kısmı karakterize edilebilmiştir. Replikasyon sırasında çift sarmalın açılmasında rol alan mitokondriyal helikaz, mtDNA süper dönümlerinin açılmasında rol alan DNA topoizomeraz I ve II, mitokondriyal tek zincir bağlayıcı protein (mtSSB), mitokondriyal DNA primaz ve ligaz bunlardan bazılarıdır (Fernandez-Silva ve ark. 2003, Scheffler 1999, Taanman 1999).

### **2.2.2. Transkripsiyon**

Mitokondriyal DNA'nın transkripsiyonu da nükleer DNA'dan farklılık gösterir. Ökaryotlarda; nDNA'da transkripsiyon için her gen kendine ait spesifik bir promotöre sahipken, mtDNA'da ikisi ağır zincirde (HSP1 ve HSP2) biri de hafif zincirde (LSP) olmak üzere 3 promotör bulunmaktadır (Şekil 2.4.).



**Şekil 2.4.** Memeli mtDNA transkripsiyon başlama ve sonlanmasının şematik görünümü (Fernandez-Silva ve ark. 2003).  $IT_{H1}$ : Ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi 1,  $IT_{H2}$ : Ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi 2,  $IT_L$ : hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi, mTERF: Mitokondriyal sonlanma faktörü, mtTFA: mitokondriyal transkripsiyon faktörü A, TFB1M: Transkripsiyon faktörü B1, TFB2M: Transkripsiyon faktörü B2

Ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi  $IT_{H1}$  ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi  $IT_L$  olarak adlandırılan iki ana transkripsiyon başlangıç bölgesi birbirlerine 150 bp uzaklıkta yer alır. Ağır zincir ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgeleri 5'-CANACC(G)CC(A)AAAGAYA-3' şeklinde 15bp uzunluğunda konsensüs diziden oluşan ağır ve hafif zincir promotör bölgeleri içerisinde yer almaktadır (Chang ve ark. 1984, Hixson ve ark. 1985). Bir diğer ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi olan  $IT_{H2}$  ise 638 nükleotid pozisyonunda  $tRNA^{phe}$  geninin içerisinde 12S rRNA geninin hemen yanında yer almaktadır. Bu bölgenin promotör dizisi 15 bp konsensüs dizi ile daha az benzerlik gösterir ve  $IT_{H1}$ 'den daha az aktiftir (Chang ve ark. 1984, Yoza ve ark. 1984). Bu noktada başlayan transkripsiyon tüm mtDNA molekülü boyunca devam ederek polisistronik bir mRNA oluşturmaktadır. Diğer taraftan,  $IT_{H1}$ 'den başlayan transkripsiyon 16S rRNA'nın 3'-ucunda sona ermektedir. Bu sayede iki farklı transkripsiyon başlama bölgesi mRNA ve rRNA transkriptlerinin regülasyonunun birbirinden bağımsız olmasına olanak sağlanmaktadır. Hafif zincirde  $IT_L$  üzerinden başlayan transkripsiyon ise  $IT_{H2}$  gibi polisistronik bir mRNA oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Fernandez-Silva ve ark. 2003).



Mitokondriyal transkripsiyon, mitokondriyal RNA polimeraz (mtRNAPol) tarafından gerçekleştirilir. Mitokondriyal RNAPol tek başına promotora bağlanıp transkripsiyonu başlatamaz ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (mtTFA), mitokondriyal transkripsiyon faktörü B1 ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü B2 (TFB1M ve TFB2M) gereksinimi bulunmaktadır (Fernandez-Silva ve ark. 2003, Taanman 1999, Gaspari ve ark. 2004, Masters ve ark. 1987). Mitokondriyal TFA ile birlikte iki transkripsiyon faktörü daha tanımlanmıştır. RNA metil transferazlarla yüksek homoloji gösteren bu faktörler TFB1M ve TFB2M olarak adlandırılmışlardır.

Hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi ve IT<sub>H2</sub> üzerinden başlayan transkripsiyonun sonlanma mekanizması ise günümüzde açıklık kazanmış değildir. IT<sub>H1</sub> üzerinden başlayan transkripsiyon ise 16S rRNA/tRNA<sup>leu</sup> sınırında tRNA'da bulunan üç tekrar dizisi ve bu dizilere bağlanan mitokondriyal sonlanma faktörü (mTERF) ile sağlanmaktadır (Fernandez-Silva ve ark. 2003, Scheffler 1999). DNA'ya monomer olarak bağlanan ve üç lösin-fermuar motifine sahip bu faktör, gerek mtRNAPol ile bağlanarak gerekse fiziksel bir bariyer oluşturarak transkripsiyonun sonlanmasını sağlamaktadır.

### 2.2.3. Mitokondriyal protein sentezi

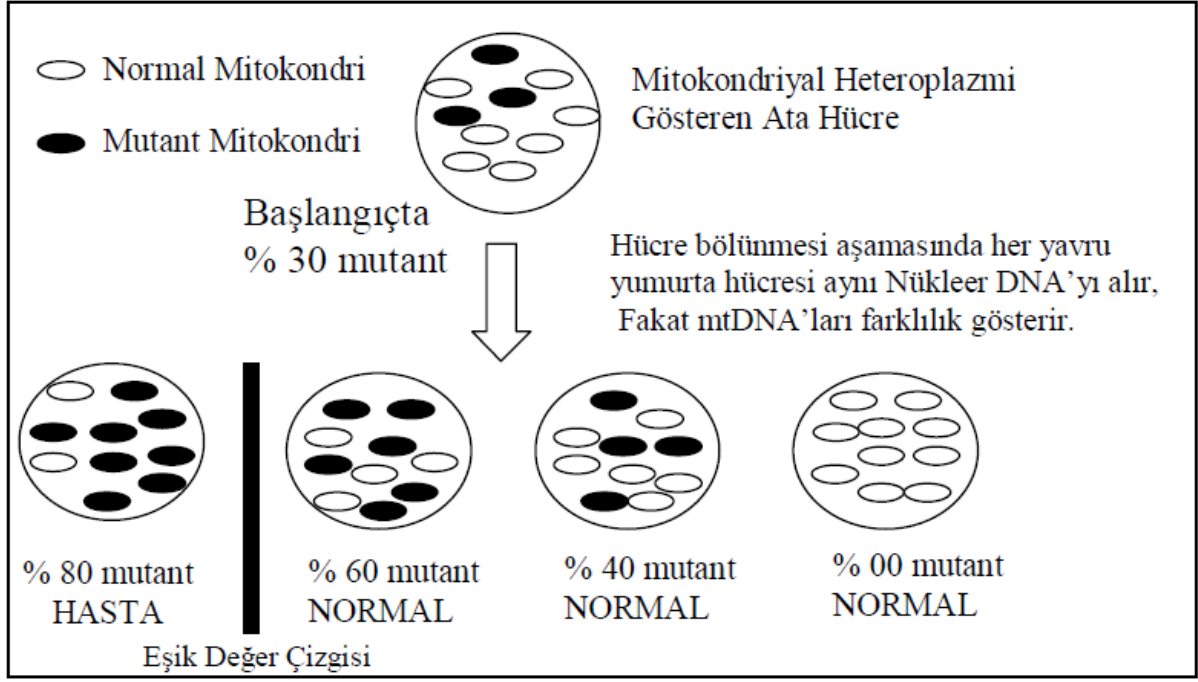
Mitokondriyal protein sentezi sitoplazmik protein sentezinden bağımsız olarak mitokondriyal matrikste gerçekleşmektedir. Mitokondriyal matrikste yer alan ve mitoribozom adı verilen mitokondriyal ribozomlar bulunmaktadır (Scheffler 1999, Taanman 1999). Mitoribozomlar prokaryotik ve ökaryotik ribozomlardan daha küçüktür ve daha az rRNA içeriğine sahiptir. Ribozom küçük ve büyük alt birimleri mtDNA tarafından kodlanan 16S ve 12S rRNA'yı içermektedir. Mitokondriyal protein sentezinde rol alan tRNA'lar mtDNA tarafından kodlanırlar ve sitoplazmik tRNA'lara kıyasla çok daha küçüktürler.

Mitokondriyal mRNA 7-metilguanilat şapka yapısı taşımamaktadır bu nedenle sitoplazmik translasyonda görülen şapka yapısının translasyon ünitelerince tanınması işlemi gerçekleşmemektedir. Araştırmalar bu tanıma sorununun getireceği düşük translasyon düzeyi probleminin yüksek mRNA düzeyi ile tolere edildiğini bildirmişlerdir. mRNA'nın mitoribozom küçük alt birimine bağlanmasını takiben ribozomal alt birim henüz tam olarak belirlenememiş yardımcı faktörler aracılığı ile mRNA 5' ucuna doğru ilerlemektedir. Memelilerde tanımlanmış tek başlangıç faktörü mtIF-2'dir ve *E. coli* translasyon başlangıç faktörü ile %36 homoloji göstermektedir. Mitokondriyal IF-2 GTP hidrolizi ile büyük alt

birimin yapıya dahil olmasını sağlar, ancak yapılan çalışmalar GTP hidrolizi olmaksızın da bu kompleksin oluşturulabildiğini göstermiştir. Memelilerde üç tane uzama faktörü tanımlanmıştır; mtEF-Tu, mtEF-Ts ve mtEF-G. Bu uzama faktörlerinin varlığında mitokondriyal translasyonun *E.coli* translasyon mekanizması ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Scheffler 1999, Taanman 1999).

### 2.3. Mitokondriyal DNA Mutasyonları

Mitokondriyal genomun güvenilirliği çok hücreli organizmalar için hayati öneme sahiptir. Nükleer DNA'dan farklı olarak mtDNA, sinir hücreleri gibi farklılaşmış hücrelerde bile devamlı replike olmaktadır. Bundan dolayı somatik mtDNA hasarları hücresel fonksiyonlar üzerinde nükleer DNA'sının hasarından daha fazla olumsuz etkiler yapabilmektedir. Nükleer DNA hasarı onarılamayacak kadar büyük olduğunda, hücre programlı hücre ölümüne (apoptoza) gidebilmektedir (Scheffler 1999, Lodish H ve ark. 2003). MtDNA'nın birden çok kopyasının bulunması nedeniyle, mutasyonlar sonucu çıkabilecek hasarlı mtDNA, normal kopyaların varlığı ile tolere edilebilir. Bu şekilde gerek normal yabancıl tipte gerekse mutant mtDNA kopyalarının bir arada bulunduğu durum heteroplazmi olarak adlandırılır. Bu durum tüm mtDNA'larda aynı olduğu homoplazmiden farklıdır ve mutasyonun fenotipe etkisi mutasyonun yeri, ait olduğu hücre tipi ve mutant DNA'nın normal DNA'ya kıyasla ne kadar fazla bulunduğu ile ilgilidir. Bu durum eşik etkisi olarak adlandırılır ve bir kez olduğunda, mutasyondaki küçük artış oranlarına karşılık fenotipe giderek artan seviyede daha büyük değişiklikler oluşturabilmektedir (Finnila ve ark. 1999) (Şekil 2.5.).



**Şekil 2.5.** Heteroplazmik mtDNA mutasyonlarının hücre bölünmesi ile dengesiz dağılımını ve hipotetik bir eşik değer çizgisinde fenotipik etkileri

Mitokondriyal DNA nokta mutasyonlarının basit klonal büyüme ile oluşup oluşmadığı tartışmalıdır. Çok sayıda somatik mtDNA delesyonlarının tek hücrede bir klonal büyüme sağladığı gösterilmiş olmasına rağmen, bu mutasyonların klonal büyümeye ya da homoplazmiye yol açtığı gösterilememiştir (Chandra ve ark. 2011). Eğer gerçekleşen mutasyon hücre büyümesi/sağkalım avantajı sağlıyorsa veya mtDNA replikasyonunu kolaylaştırıyorsa, böyle bir mutasyonun seçilim yolu ile kalıcı hale gelmesi muhtemeldir. Sonuçta bu mutasyon dominant hale gelebilir ve klonal büyüme ile homoplazmik hale gelecek şekilde evrimleşebilir. Mutant mitokondriyal genomlu tek hücrenin, tümör gelişiminde seçici büyüme avantajına sahip olduğu kanıtlanmıştır (Chandra ve ark. 2011). Böyle bir hücre tümör hücre popülasyonunda baskın hale gelebilir. Aynı zamanda, bazı mtDNA mutasyonları aslında bireyin prenatal gelişim esnasında oluşan ve homoplazmiye sürüklenmiş somatik mutasyonlardır. Homoplazmik mtDNA mutasyonlarının matematiksel bir yöntemle açıklandığı modele göre tümörlerde mtDNA mutasyon varlığı, tümör gelişimde oluşan çeşitli hücre soylarındaki mutant genomların rastgele ayırımından kaynaklanabilir. Daha sonra gösterilen bir modele göre ise, homoplazmik mitokondriyal varyasyonlar kök hücrelerden köken almaktadır. Bu da mitokondriyal genomdaki mutasyonun dominant hale gelebilmesi için seçici avantaja ihtiyacı olmadığı anlamına gelmektedir. Bu özel modelin geçerli olup olmadığı hala tartışmalıdır. Eğer seçici olmayan, avantaj sağlayan, rastgele mutasyonun bir temeli

varsa, aynı zamanda orada başka mutasyonların varlığını da düşündürür. Bu mutasyonlar mitokondriyal fonksiyonda ve hücre fizyolojisinde değişim yaratırlar. Bu bir anlamda tümör gelişiminde belirgin bir etkidir (Chandra ve ark. 2011).

Hastalıkların klinikte görülen geniş spektrumu nedeniyle mtDNA genetiğinin epidemiyolojisi son derece komplekstir. Mitokondriyal DNA mutasyonları genel olarak duplikasyon ve delesyonları içeren mitokondriyal DNA yeniden düzenlenmeleri ve mtDNA nokta mutasyonları olarak iki başlık altında ele alınabilir.

### **2.3.1. Mitokondriyal DNA yeniden düzenlenmeleri**

Mitokondriyal DNA delesyonları bir hastalıkla ilişkilendirilen ilk mtDNA mutasyonlarıdır. Mitokondriyal DNA delesyonlarının birkaç bazdan birkaç kilo baza kadar olabileceği bildirilmiştir. Mitokondriyal DNA yeniden düzenlenmeleri sonucu oluşan hastalıklardan en iyi tanımlanmış olanı Kearns-Sayre sendromudur (KSS) (Schon ve ark. 2002a, Schon ve ark. 2002b). Bu hastalıkla mtDNA'da ATPaz8 ve ND5 genleri arasında kalan büyük bir bölgenin delesyonu tanımlanmıştır ve bu delesyon mtDNA sık delesyonu "common deletion" (CD) olarak adlandırılmaktadır. Bu delesyon, mtDNA'da 8470-13447. nükleotidler arasında 13 bç uzunluğundaki tekrar dizilerinde bir kırılma ile ortaya çıkar ve 4977 bç uzunluğunda bir bölgenin kaybıyla sonuçlanır (Soong ve ark. 1996). Sporadik KSS'da CD'a ek olarak duplikasyonların da varlığı gösterilmiş ve bu bireyler triplazmik olarak tanımlanmıştır. Triplazmik olgularda yabancı tipte mtDNA'ya ek olarak CD taşıyan mtDNA (11592 bç) ve CD mtDNA ile yabancı tipte mtDNA birleşmesiyle ortaya çıkan duplike mtDNA (16569+11592= 28188 bç) görülmektedir. Bu duplike mtDNA'ların delesyonun ortaya çıkmasında rolü olan rekombinasyon ara ürünleri olabileceği ifade edilmiştir (Schon ve ark. 2002b, Poulton ve ark. 1993). Yapılan bir çalışmada araştırmacılar HeLa hücrelerinde delesyonlu mtDNA oranının %65'in altında olması durumunda mitokondriyal translasyonun etkilenmediğini ve yabancı tipte mtDNA'ların mutant olanları kompanse edebildiğini bildirmişlerdir (Hayashi ve ark. 1991). Bir başka çalışmada ise büyük delesyonların yüksek oranda bulduklarında nokta mutasyonlarından daha ağır fenotipik etkileri olduğunu bildirilmiştir (Vielhaber ve ark. 2002). Diğer taraftan bu durum bir çelişkiye neden olmaktadır, eğer tRNA genlerindeki nokta mutasyonları için mutant mtDNA oranının %95'lere ulaşması gerekiyorsa delesyona bağlı tRNA kayıplarında bu oranın neden daha düşük olduğu açık değildir. Eğer nokta mutasyonu sonrası tRNA kaybını kalan normal mtDNA'lar çok düşük oranlarda bile karşılayabiliyorsa delesyonda da (birden fazla tRNA

kaybı) aynı durumun gözlenmesi beklenmelidir. Bu durumun mutant mtDNA üzerinde halen rRNA sentezine devam ediliyor olmasına bağlamaktadır (Vielhaber ve ark. 2002).

### **2.3.2. Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları**

Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları tRNA, rRNA, protein kodlayan genler veya kodlama yapmayan bölgelerde tanımlanmıştır. Hastalıklarla ilişkilendirilen nokta mutasyonlarının büyük kısmı tRNA genlerindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlar genellikle nöromusküler veya kardiyak fenotiple ilişkilendirilmektedir (Von Kleist-Retzow ve ark. 2003). Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları ve ilişkili oldukları hastalıkların güncel listesi mitokondriyal DNA veritabanı olan MITOMAP'de verilmektedir ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) (Brandon ve ark. 2005).

Mitokondriyal DNA nokta mutasyonlarının çoğunun fenotipik yansıması son derece değişkenlik göstermektedir. Aynı yolakta yer alan genlerde görülen aynı tip mutasyonların bu fenotipik değişkenliğinin nedeni açık değildir. Yapılan çalışmalar bu değişkenlikte nükleer genler ve diğer mtDNA mutasyon ve/veya polimorfizmlerinin rolü olabileceğini ve çevresel faktörlerinde fenotipik ekspresyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Schapira 2006). Diğer taraftan heteroplazmik mutasyonlarda mutant mtDNA oranı, mutasyonun dokulara göre dağılımı veya mutasyondan etkilenen dokunun enerji kullanımı gibi faktörlerinde klinik ekspresyonda rolü olabileceği bildirilmiştir.

### **2.4. Tiroit**

Tiroit bezi boynun alt kısmında, trakeanın ön yüzünde, larinksin hemen aşağısında, tiroit ön grup kaslarının arkasına yerleşmiş, insan bedenindeki en büyük endokrin bezdir. Erişkin tiroit bezi ortalama 15-20 gram ağırlığındadır. Sağ ve sol olmak üzere iki lob ve bunları birleştiren istmüsten oluşmaktadır (Meller ve ark. 2002).

Gelişimini embriyolojik olarak tamamlayan tiroit, farklı büyüklüklerde foliküllerden meydana gelmektedir. Tiroit bezinin fonksiyonel birimini oluşturan her bir folikül, içi kolloid ile dolu bir boşluk etrafında tek sıra dizilmiş kübik epitel hücreler ve bu epiteli çevreleyen bazal membrandan oluşur. Folikül hücresine tiroisit adı da verilir (Henry 1997). Bir tiroit folikülünde, foliküler lümen ve bazal membranla ilişkide olan normal folikül hücresi, oksifilik (Hürthle) hücreler ve lümenle ilişkide olmayan ancak bazal membranla ilişkide olan parafoliküler olmak üzere 3 tip esas hücre vardır ve bu hüclere A, B ve C hücreleri adı da

verilmektedir. A hücresi, normal folikül hücresi olup TSH etkisi altındadır, hormonların yapım ve salınmasından sorumludur (Henry 1997). B hücrelerinin (Askanazy hücresi, onkosit, Hürthle hücresi, oksifilik hücre) en önemli özelliği çok miktarda serotonin depolaması ve TSH reseptörü içerip tiroglobulin sentezi yapabilmesidir. Bu hücrelerin tam olarak fonksiyonu bilinmemektedir (Henry 1997, Rhodin 1995). C hücresi (parafoliküler hücre) ise TSH kontrolünde olmayıp tirokalsitonin (TC) hormonunun yapım ve salınmasından sorumludur (Papotti 1994).

Tiroit bezinin görevi, vücut metabolizmasının düzenlenmesi için gerekli tiroit hormonlarının ve vücut kalsiyum metabolizmasının düzenleyici hormonlarından kalsitoninin sentezi ve salınımıdır (İşgör 2000).

Tiroid bezinin kontrolü normal fizyolojik koşullarda hipotalamus-hipofiz ekseninde sağlanır. Hipotalamustan salgılanan tripeptid TRH (tirotropin salgılayıcı hormon) hipofiz bezini uyararak bir hipofiz glukoprotein hormonu olan tirotropin (TSH) hormonunun üretilmesini ve salgılanmasını sağlar (Kopp 2001). TSH reseptörü luteotropik hormon (LH), foliküler stimüle edici hormon (FSH) ve koryonaganodotropik hormon ( $\beta$ -HCG) reseptörü ile beraber rodopsin/ $\beta$  adrenerjik reseptör alt ailesinin bir üyesi olup tiroid bezinin büyüme ve işlevlerinden sorumludur (Szkudlinski ve ark. 2002). TSH, TSH reseptörüne bağlanır, tiroid foliküler hücrelerinin büyüme ve işlevlerini uyarır, tiroid bezi hormonlarının (tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3)) sentezini ve tiroid bezinden salgılanmalarını düzenler.

Tiroid bezi hormonları ise (T3, T4) farklılaşma, büyüme ve metabolizma üzerinde çoklu etkiye sahiptirler. Genellikle bu hormonların birincil işlevleri nükleer reseptörler vasıtasıyla protein yapımını düzenlemek ve zar yapısında yer alan enzimleri aktive ederek mitokondrilerde oksitlenme hızını arttırmaktır (Kopp 2001, Yiğit G. 2001). Bununla beraber tiroid hormonlarının zar  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz aktivitesini arttırarak  $\text{O}_2$  tüketiminin uyarılması ve hücre içerisinde glikoz/aminoasit taşınmasının hızlanması gibi genomik olmayan işlevleri de tanımlanmıştır (Davis ve ark. 1996).

Tiroit bezinin büyümesine guatr denir ve kadınlarda erkeklerden 4-5 kat daha fazla görülür. Bölgelere göre değişmekle birlikte Türkiye’de guatr sıklığı % 5-56 civarındadır (Özata 2005). Tiroit bezi hastalıkları, dünyada yaygın görülen hastalıklar arasında olup özellikle nodüllerine çok sık rastlanmaktadır. Nodüller tiroit hastalıkları tiroit bezi içinde, bir ya da birden fazla nodüllerle karakterize yaygın görülen bir hastalıktır (Gharib 1997). İyot

eksikliği olan bölgelerde, ileri yaşlarda, kadınlarda ve radyasyona maruz kalmış toplumlarda daha sık görülür (Gharib 1997, Tan ve ark. 1997). Çevre tiroit parankiminden farklı, radyolojik olarak ayrılabilen, fizik muayene ya da yardımcı görüntüleme yöntemleri ile tespit edilebilen lezyonlara tiroit nodülü denir. Palpe edilebilen nodül sıklığı %3-7 iken, klinik olarak saptanamayan ancak ultrasonografide (USG) tespit edilen nodül sıklığı %20-76 arasındadır (Datta ve ark. 2006, Faquin 2008, Hegedus ve ark. 2003, Serra ve ark. 2008). Ayrıca tiroit bezi kanserleri nadir olarak görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) görülen tüm kanserlerin %0,74-2,3'ünü oluşturmaktadır. Kansere bağlı ölümlerinde %0,17-0,26'sından tiroit kanserleri sorumludur (Schneider ve ark. 2000). Bununla beraber tiroit nodüllerinin çoğu benign özellik taşıyabilir (Meier 2000, Pacini ve ark. 2001). Benign hiperplastik (kolloid) nodüller en sık görülen tiroit nodülleridir ve tiroit nodüllerinin %5-20 'si gerçek neoplazmdir (Larsen ve ark. 1998). Palpe edilebilen tiroit nodüllerinde, malignensiye %5'ten az rastlanır (Burguera ve ark. 2000, Meier 2000). Bunun nedeni tiroit bezi hastalıklarının erken tanı ve tedavisidir. Ancak klinikte tiroit kanseri nadir görülmesine karşın gizli tiroit kanserleri önemli oranda görülür. Otopsi çalışmalarından elde edilen bilgilere dayanarak ABD' den yayınlanan serilerde bu oran %0,45-5,7 , Japon serilerinde ise %13-24'lere çıkmaktadır (Sampson ve ark. 1974).

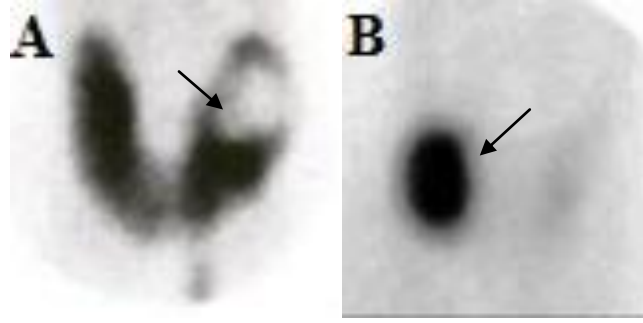
Genelde soliter nodüler ve multinodüler tiroit hastalıkları olarak iki temel gruba bölünebilen benign nodüler tiroit hastalıkları iyotça fakir bölgelerde yaygın olan heterojen tiroit bozukluklarını oluşturmaktadır (Krohn ve ark. 2005). Nodüllerin fonksiyonel özellikleri göz önüne alındığında sintigrafik taramalarda iyot alımındaki azalış veya artışa bağlı olarak normal, soğuk ve sıcak nodüller olarak sınıflandırılırlar (Gozu ve ark. 2005). İyot alımına bağlı olarak nodüllerin değişik coğrafi bölgelerde farklı insidans göstermesine karşın, nodüllerin yaklaşık %85'i soğuk , %10'u ılık ve %5'i sıcak nodüllerden oluşur (Belfiore ve ark. 1992).

Tiroit nodüllerinin klinik-patolojik sınıflandırılması nonneoplastik nodüller, benign neoplastik nodüller, malign neoplastik nodüller ve tiroit dışı lezyonlar olarak yapılabilir (Pacini ve ark. 2001).

#### **2.4.1 Soğuk nodül**

Tiroit sintigrafisinde, geri kalan tiroit dokusundan daha düşük radyoizotop tutulumu gösteren nodüle, hipofonksiyone veya soğuk nodül denilir (Şekil 2.6.). Soliter nodüllerin

%85-90'ı hipofonksiyonudur. Tiroit malign tümörleri normal tiroit dokusunun %1-10'u kadar radyofarmasötik akümüle eder ve sintigrafik olarak hipoaktif görüntü verirler. Soliter soğuk nodüllerin büyük kısmının nedeni kolloid kist veya adenomdur. %15-40'ı ise karsinoma riski taşır. Apse, hemoraji, paratiroit adenomu da soğuk nodül olarak görülür. Karsinoma olasılığı eğer hasta genç kadın veya herhangi bir yaşta erkek ise artar. Birlikte lenfadenopati varsa veya tiroit hormon supresyonundan sonra büyüklüğü azalmıyorsa karsinom şüphesi daha çok artar. Eğer hikayede daha önce baş boyun bölgesine radyasyon tedavisi varsa soğuk nodülün malign olma ihtimali %40'tır (Özata 2005).



**Şekil 2.6.** A. Soğuk nodül; sağ tiroit lobu üst kesiminde soğuk nodül izlenmektedir, B. Sıcak nodül; sol tiroit lobu alt kesiminde sıcak nodül izlenmektedir (Özata 2005)



#### **2.4.2. Sıcak nodül**

Sıcak nodüllerin radyoizotop tutulumu normal tiroit dokusuna oranla daha yüksektir (Şekil 2.6.). Belirgin tiroit nodülü olan hastaların nodüllerinin %7-25'i sıcak karakterdedir. Sıcak nodüllerin büyük bir kısmı benign olmakla birlikte çok küçük bir yüzdesinde tiroit karsinoma tanımlanmıştır. Bu nodüllerin hemen hepsi hiperfonksiyon gösteren adenomlardır ve bunların yarısından fazlası otonomdur. Otonom fonksiyon gösteren nodüller hipofizer-tiroit geri besleme mekanizmasından bağımsız çalışır, böylece dışarıdan verilen tiroit hormonları ile suprese olmaz. 3-4 cm çapından büyük otonom nodüller hipofiz bezini suprese edecek miktarda tiroit hormonu üretebilirler (Özata 2005).

Bir nodülün otonom olup olmadığı tiroit supresyon testi ile belirlenebilir. Otonom hiperfonksiyone nodüller yeterli miktarda tiroit hormonu üreterek TSH'ın hipofizer sekresyonunu inhibe ederler ve sekonder olarak etrafındaki normal dokunun fonksiyonunu suprese ederler. Bu suprese tiroit dokusunun belirlenmesi TSH stimülasyon testi ile yapılabilir.

#### **2.5. Mitokondriyal DNA Mutasyonları ve Tiroit**

Literatürde malign ve benign tiroit nodüllerinde mtDNA mutasyonlarını ele alan çalışmalar mevcuttur. Ancak bu çalışmaların büyük kısmının çok az sayıda örnek üzerinde gerçekleştirilmiş olması, analizde kullanılan yöntemlerin yeterince hassas olmaması gibi nedenlerle elde edilen sonuçlar çelişkilidir.

Ebner ve ark. (1991) onkositik tiroit tümörlerinde mtDNA' da büyük değişimlerin varlığını restriksiyon enzim kesimleri ile incelemişler ve bu hücrelerde büyük değişimler ve heteroplazminin gözlenmediğini ve tümör gelişimde rolü olmadığını belirtmişlerdir. Buna karşılık Muller-Hocker ve ark.,(1998) Hashimoto tiroiditinde 4977 bç sık delesyonun %2-8 oranında bulunduğunu ve bunun sonucu ortaya çıkan mitokondriyal solunum defektlerinin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Maximo ve ark, (2002) mtDNA sık delesyonunun inceledikleri tüm tiroit Hürthle hücre tümörlerinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Diğer taraftan mtDNA sık delesyonunun varlığını tiroit hastalıklarında ele alan diğer çalışmalarda böyle bir ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir (Tallini ve ark. 1994, Aral ve ark. 2010).

Büyük delesyonların varlığı üzerine yapılan çalışmaların dışında, kodlama yapan veya yapmayan mtDNA dizilerindeki diğer mutasyonları ele alan çalışmalar da mevcuttur. Yeh ve ark., (2000) mtDNA mutasyonlarının varlığını iki boyutlu gen tarama tekniği ile incelemişler ve mutasyonların ağırlıklı olarak kompleks I genlerinde bulunduğunu ve bu bölgenin mutasyonlarının tiroit tümörögenezinde rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Benzer bulgular Maximo ve ark., (2002) ve Gasparne ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmalarda da desteklenmektedir. Buna karşılık mtDNA mutasyonlarının tiroit tümörlerinde rolü olmadığını belirten çalışmalarda bulunmaktadır (Witte ve ark. 2007).

Mitokondriyal DNA D-loop bölgesi, D310 değişimlerinin incelediği bir çalışmada Çernobil faciası sonrası radyasyona maruz kalan Belarus kökenli 126 tiroit kanseri olgusu ile Münih, Almanya kökenli sporadik 40 tiroit kanseri olgusu incelenmiş ve bu bölgede görülen değişimlerin radyasyona maruz kalmamış sporadik tümörlerde daha sık gözlemlendiği, ancak her iki grup içinde tümörögenezde bir rolü olmadığı vurgulanmıştır (Lohrer ve ark. 2002). Diğer taraftan bu çalışmaya yönelik yayımlanan editöre mektupda, çalışmanın tiroit kanseri dışındaki sağlıklı dokuları ele almaması nedeniyle elde edilen verilerin güvenilir olamayacağı vurgulanmıştır (Lima ve ark. 2003). Bir başka yayında ise 72 tiroit kanseri olgusunda D310 değişimlerinin %5,7 düzeyinde görüldüğü ve tiroit kanserleri ile bir ilişkisi bulunmadığı bildirilmiştir (Tong ve ark. 2003). Araştırmacılar elde edilen bu değerlerin epitelyal kökenli kanserlere kıyasla çok düşük olduğu bildirmiş ve beklenen D-loop mutasyon frekansının son derece azalmış olduğunu vurgulamışlardır. Elde edilen bu verilerin aksine Maximo ve ark. (2002) 79 benign ve malign tiroit olgusunda D-loop instabilitesinin %68,5 gibi yüksek bir oranda görüldüğünü ancak benign ve malign olgular arasında bir fark bulunmadığını göstermişlerdir. Aynı araştırma grubu daha sonra yaptıkları çalışmada 66 benign ve malign tiroit olgusunda D310 ve D568 mononükleotid tekrar dizileri ile D514 dinükleotid tekrar dizilerinde instabilite varlığını incelemişler ve D310 ve D514 tekrarlarının sayıca fazlalığının mutagenizde bir rolü olabileceğini düşündüğünü belirtmişlerdir (Maximo ve ark. 2005). İlginç olarak 19 nodüler guatr ve 77 malign tiroit karsinomunu ele alan bir diğer çalışmada sadece 8 olguda D310 mikrosatellit instabilitesi belirlenmiş olmasına rağmen yazarlar bu değişimlerin heteroplazmik olması nedeniyle erken tümörögenezde rol oynadığını bildirmişlerdir.

Burada kısaca özetlenmeye çalışılan literatür özetinden de görüleceği gibi tiroit patolojileri ile mtDNA değişimleri arasındaki ilişki kesin değildir ve çok sayıda sağlıklı ve hasta bireyi kapsayan, farklı populasyonlarda yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan cihazlar**

Buzdolabı +4<sup>0</sup>C, Profilo, Türkiye

Derin dondurucu -20<sup>0</sup>C, Vestel, Türkiye

Distile su cihazı, GFL, Almanya

Ultrasaf su cihazı, Millipore, ABD

Elektroforez güç kaynağı, Cleaver, İngiltere

Elektroforez güç kaynağı, Thermo, İngiltere

Fotoğraf makinesi, Canon, Japonya

Hassas terazi, Ohaus, ABD

Isı döngü cihazı, Techne TC Plus, İngiltere

Isıtıcı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

Kar buz makinası, Bluewave BW, Çin

Mikrosantrifüj, Cleaver, İngiltere

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Otoklav, Tek Bal, Türkiye

Otomatik dizi analizi cihazı, Genome lab GeXP genetic analysis system Beckman Coulter, ABD

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

pH metre, Hanna HI221, Romanya

Soğutmalı mikrosantrifüj, VWR, Almanya

Soğutmalı santrifüj, Hettich, Almanya

Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye

Transillüminatör, Vilber Lourmat, Fransa

Vorteks, WiseMix, Kore

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere

### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

33 cm x 75 µm Kapiler dizi, Beckman Coulter, ABD

Agaroz, Sigma, ABD

Borik asit, Sigma, ABD

Dizi analizi seperasyon jeli, Beckman Coulter, ABD

Dizi analizi kapiller elektroforez tamponu, Beckman Coulter, ABD

Deoksiribonükleik asit trifosfat (dNTP) set, MBI Fermentas, Litvanya

DNA belirteç (100 bç'lik), Thermo, Almanya

EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit), Sigma, ABD

Etidyum bromür, Sigma, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Glikojen, Roche, Almanya

Magnezyum klorür, Sigma, ABD

Mineral yağ, Sigma, ABD

PEG (polietilenglikol) 4000, Merck, Almanya

SLS (örnek yükleme tamponu), Beckman Coulter, ABD

Sodyum asetat, Merck, Almanya

*Taq* DNA polimeraz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya

Tris, Sigma, ABD

Yükleme tamponu, MBI Fermentas, Litvanya

### **3.1.3. Kullanılan kitler**

DNA dizi analizinde kullanılan GenomeLab DTCS – Quick Start DNA Sequencing Kit, Beckman Coulter, (ABD) firmasından elde edilmiştir. Kit dizileme için gerekli olan glikojen, dizileme primeri, quick start mix, kontrol kalıp, mineral yağ, SLS içermektedir.

### **3.1.4. Kullanılan ticari çözelti ve tamponlar**

#### **Yükleme tamponu (Fermantas, Litvanya)**

Tris-HCl pH 7,6

% 0,03 bromfenol mavisi

% 0,03 ksilen siyanol FF

% 60 gliserol

60 mM EDTA

#### **10X reaksiyon tamponu (Fermantas, Litvanya)**

*Taq* DNA polimeraz enzim seti içerisinde hazır olarak alındı.

100 mM Tris-HCl (pH 8,8)

500 mM KCl

0,8% Nonidet P40

2 mM MgCl<sub>2</sub>

### **25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermantas, Litvanya)**

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan 25 mM MgCl<sub>2</sub> *Taq* DNA polimeraz enzim kiti içerisinde hazır olarak alındı.

### **10 mM dNTP (Fermantas, Litvanya)**

Her biri 100 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP solüsyonlarından 10'ar µl ve steril dH<sub>2</sub>O'dan 60 µl alınarak 500 µl'lik steril ependorf tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

### **3.1.5. Kullanılan çözeltiler**

#### **Etidyum bromür çözeltisi**

10 mg/ml etidyum bromür distile su içerisinde hazırlandı.

#### **5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu**

54 g Tris baz

27,5 g Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Çözelti 1 litre'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

1X TBE hazırlamak için 5X TBE stoğundan 200 ml alındı ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

#### **%26 PEG solüsyonu**

13 g PEG 4000

67 mg Magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>)

25 ml 1.2 M Sodyum asetat (NaAc) (pH 5.2)

Çözelti 50 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

### DNA dizileme reaksiyonu durdurma solüsyonu

Her bir örnek için 5 µl olacak şekilde 0,1 M EDTA (pH 8,0)'dan 2 µl, 3 M NaAc (pH 5,2)'tan 2 µl, 20 mg/ml Glikojen'den 1 µl alınarak 0.2 ml'lik eppendorf tüpte kullanım öncesi taze olarak hazırlandı.

### 3.1.6.Primerler

Çalışmada PZR ve DNA dizi analizi esnasında kullanılan primerler Iontek Ltd Şti, Türkiye'den temin edilmiştir. Primerlerin dizileri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir (Levin ve ark. 1999).

**Çizelge 3.1.** PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler

Primerler	Bölge	Tm (°C)	Primer dizileri (5'→3')
mtHV2F15	Birinci bölge	57,3	CACCCTATTAACCACTCACG
mtHV2R484		53,2	TGAGATTAGTAGTATGGGAG
mtHV1F15971	İkinci bölge	55,3	TTAACTCCACCATTAGCACC
mtHV1R16411		61,8	GCGAGGAGAGTAGCACTCTTG



Liyofilize olarak temin edilen primerler 100 pmol olacak şekilde sulandırılarak ana stok elde edildi. Ana stoktan 10 µl alınıp üzerine 90 µl distile su ilave edildi ve 10 pmol ara stok elde edildi. Ara stoklar -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

### **3.1.7. Kullanılan bilgisayar programları**

GenomeLab GeXP Genetic Analysis System, DNA sekanslama analiz programı version 10.2, Beckman Coulter, ABD

Infinity jel görüntüleme sistemi, Vilber Lourmat, Fransa

Microsoft word, excel, ABD

SPSS 16.0, ABD

### **3.1.8. Hasta grubu**

Çalışmaya 2001-2003 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Endokrinoloji Polikliniğine başvuran ve guatr tanısı konulan 93 hasta dahil edilmiş olup bu hastaların 87 tanesi benign hiperplazi, 6 tanesi ise malign hiperplazidir. Benign hiperplazili hastaların 72 sıcak nodülü, 102 soğuk nodülü ve 67 sağlıklı çevre dokusu olmak üzere 241 tane dokusu vardır. Malign hiperplazili hastaların ise 6 sağlıklı çevre dokusu ve 21 nodülü olmak üzere 27 tane dokusu vardır. DNA örnekleri daha önce başka çalışmalar için kullanılmış olup 2008 yılından bu yana Namık Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında arşivlenmektedir.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu ilk olarak Kary Mullis ve ark. (Mullis ve ark. 1986) tarafından uygulanan ve hedef DNA veya RNA parçasının 20-30 nt'lik oligonükleotit primerler kullanılarak *in vitro* şartlarda kopyalanmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem basitçe üç aşamadan oluşur:

- Çift iplikli DNA'nın denatürasyonu,
- Primerlerin DNA üzerinde kendilerine özgü bölgelerine bağlanması,
- Yeni DNA zincirlerinin sentezi.

Polimeraz zincir reaksiyonunun ilk aşamasında çift iplikli DNA yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilir. Denatürasyon aşamasından sonra reaksiyon ortamı kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülür ve oligonükleotit primerler komplementer bölgelere bağlanır. Son aşamada *Taq* DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP varlığında primerleri 5'→3' yönünde uzatmaya başlar. Her döngü sonucunda ilgili DNA bölgesi iki katına çıkar (Schochetman ve ark. 1988).

Yapılan bu çalışmada, bölümümüzde arşivlenen tiroit dokularına ait DNA örneklerinden mtDNA D-loop bölgesine ait 15.-484. nükleotidler ve 15971.-16411. nükleotidler arasındaki mitokondriyal genom bölgesinin çoğaltılması amacıyla Barbara C. Levin ve arkadaşlarınca belirlenen kriterlere göre PZR reaksiyonları gerçekleştirildi (Levin ve ark. 1999).

Mitokondriyal DNA D-loop bölgesine ait 15.-484. nt ve 15971.-16411. nt'ler arası DNA dizileri için 50 µl'lik reaksiyon karışımı;

0,1-1 µg kalıp DNA

1X PZR tamponu

10 pmol ileri ve geri primer

200 µM dNTP karışımı

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 U *Taq* polimeraz enzimi,

dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı.

Bu işlem 0,2 ml'lik eppendorf tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek, aşağıda belirtilen program uygulandı.

96°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 30 saniye..... denatürasyon

56°C'de 30 saniye..... bağlanma

72°C'de 30saniye..... sentez

} 35 döngü

72°C'de 7 dakikalık son uzama

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarında kontaminasyonun takibi için ek olarak negatif kontrol de çalışmaya eklendi. Negatif kontrol için PZR bileşenleri, örnekler ile aynı miktarda olup kalıp DNA kullanılmadı, son hacim ise distile su ile tamamlandı.

### 3.2.2. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi ile DNA tayininde, çözülmüş haldeki DNA parçaları elektrik akımı ve jelde oluşan porlar sayesinde büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine göre farklı hızlarda hareket etmektedirler. Bu sayede çeşitli boyutlardaki DNA molekülleri tanımlanabilmektedir. Küçük DNA fragmanları için yüksek agaroz konsantrasyonu, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz konsantrasyonu ile agaroz jeller hazırlanarak DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. Ayrıca agaroz jel hazırlanırken DNA'nın görünür hale gelmesi için EtBr kullanılmaktadır. Agaroz jeldeki EtBr, DNA'ya enterkalasyonu neticesinde 300-360 nm dalga boylu UV ışık altında floresan etki gösterir ve DNA agaroz jelde görünür hale gelir (Sambrook J ve ark. 1989). Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç olan DNA kullanılarak, moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir (Sambrook ve ark. 2001)

Bu çalışmada PZR ile amplifiye edilen ürünlerin doğruluğunun ve kalitesinin kontrolü için jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla 50 ml 1X TBE içerisinde 1 g agaroz ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. Konsantrasyonu 10mg/ml olan EtBr'den 2,5µl ilave edilerek jel düzeneğine uygun taraklar takılarak döküldü. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve düzenek içerisinde 1X TBE bulunan tanka yerleştirildi. Kuyucuklara örnekler ve belirteç DNA yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. Yüklenen DNA örnekleri 30 dakika 120 volt sabit voltajda koşturuldu ve oluşan DNA bantları UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi. Birinci bölge için 469 bç ve ikinci bölge için 440 bç amplifikasyon ürünlerinin varlığı DNA belirteç ile kıyaslanarak kontrol edildi.

### 3.2.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Dizi analizi reaksiyonu öncesi PZR karışımındaki primer, dNTP gibi kimyasal safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması için, PZR ürünleri PEG ile çöktürme yöntemi kullanılarak saflaştırıldı (Rosenthal ve ark. 1993).

Bu amaçla, PZR ürünlerinin üzerine 1:1 oranında %26'lık PEG çözeltisi ilave edilerek kuvvetli şekilde vortekslenildikten sonra oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Bunu takiben oda ısısında 20 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 90 µl %70'lik soğuk etil alkol ilave edildi ve 10 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Pellet 20 µl dH<sub>2</sub>O ile çözündürüldü ve 4 µl alınarak %2'lik agaroz jel elektroforezi ile yukarıda belirtildiği şekilde incelendi. Jel üzerinde her bir örneğin konsantrasyonu belirteç DNA ile kıyaslanarak Bio1D programında fotodansitometrik olarak belirlendi.

### 3.2.4. DNA dizileme reaksiyonu

DNA dizi analizi ya da sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde kullanılan yöntemdir. DNA baz kompozisyonunu 1940'lı yıllarda saptama yöntemleri bulunmasına karşın, ancak 1970'li yıllarda etkin ve doğrudan nükleotid dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmanları elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in (1977) kimyasal yöntemi DNA'nın belirli dizilerden kırılmasına dayanırken, Fred Sanger ve ark. (1951) geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır (her baz için bir tane). Bu dört reaksiyonun ürünleri bir nükleotid uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde, dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir (Eberhard 2000, William ve ark. 2002).

Günümüzde enzimatik ve kimyasal yöntemler olarak bilinen klasik yöntemlerin dışında DNA bölgelerinin dizi analizi için Sanger sekanslama prensibine dayalı otomatik sistemler de kullanılmaktadır. Bu amaçla dizi analizi reaksiyonunda fotokrom işaretli nükleotidler kullanılır. Klasik Sanger yönteminden farklı tüm dedioksi işaretli ddNTP'ler tek bir reaksiyon tüpü içerisine koyulur. Reaksiyon karışımı amplifikasyon sonrası kapiller jelle

yüklenir ve bazlar iki farklı floresans dedektör vasıtasıyla saptanır. Kullanılan bilgisayar programları vasıtasıyla elde edilen veriler renkli kromotogram dosyalarına çevirilir. Bu dosyalarda her bir baz kendisine özgül olan bir renk eğrisi ile gösterilir (Eberhard 2000).

Yapılan bu çalışmada da tiroit nodülleri ve sağlıklı örneklere ait mtDNA D-loop bölgesine ait DNA dizilerinin tespiti için Sanger metoduna dayanan otomatik dizi analizi yöntemi kullanıldı. Bu amaçla dizileme reaksiyon karışımı hazırlandı.

10 µl'lik reaksiyon karışımı:

- 35-50ng saflaştırılmış PZR ürünü
- 1,5 µl dizileme reaksiyon karışımı (Sequencing mix)
- 5 pmol primer (ileri veya geri)
- dH<sub>2</sub>O içermektedir.

Bu işlem 0,2 ml'lik eppendorf tüplerinde ve buz içerisinde gerçekleştirildi ve tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen program uygulandı.

96°C'de 20 saniye..... denatürasyon	} 30 döngü
50 °C'de 20 saniye..... bağlanma	
60°C'de 4 dakika..... sentez	

### **3.2.5. DNA dizi analizi örneklerinin çöktürülmesi (etanol presipitasyonu)**

Dizileme reaksiyonu sonrası presipitasyon üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu tüpleri içerisinde bulunan reaksiyon ürünleri 0,5 ml'lik steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Herbir örneğin üstüne hazırlanan durdurma solüsyonundan 5 µl ve soğuk absolu etanolden 60 µl ilave edilip vortekslendi. +4 °C'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst faz uzaklaştırıldı. Pellet üzerine %70'lik soğuk etanolden 90 µl ilave edilip +4 °C'de 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst faz uzaklaştırıldıktan sonra örnekler karanlıkta 10 dakika kurumaya bırakıldı. Örnekler, otomatik dizi analizi cihazına yüklenene kadar -20°C'de saklandı.

### **3.2.6. Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi**

Presipite dizi analizi ürünleri üre ve formamid içeren 30 µl SLS tamponu içerisinde çözündürülerek üzerine buharlaşmayı önlemek amacıyla bir damla mineral yağ eklendi ve cihaza yüklendi. Kapiller elektroforez üretici firma tarafından belirtilen koşullara göre Backman Coulter GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (ABD) marka otomatik dizi analizi cihazında gerçekleştirildi.

### **3.2.7. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi**

Elde edilen dizi analizi sonuçları GenomeLab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2 DNA dizi analizi programı kullanılarak değerlendirildi. Hastalara ait sağlıklı dokular ve nodüllerden elde edilen diziler değerlendirilip Cambridgereferans dizisi (NC-012920.1) ile karşılaştırıldı.

Ayrıca gen bankasında Türk bireylere ait 3 farklı mitokondriyal genom verisi bulunmuştur (AM263182, AM263185 ve AM263190). Bu veriler Cambridge dizisi olarak adlandırılan referans mtDNA dizisi de dahil edilerek çoklu dizi eşleştirmesi programı kullanılarak Clustal Omega (Goujon ve ark. 2010) tez kapsamında bulunan polimorfizmler için incelenmiştir.

### **3.2.8. İstatistiksel analizler**

Tez çalışması kapsamındaki hastaların dizi analizi sonuçlarındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığı Ki-kare testi ile değerlendirildi ve “p” değerinin 0,05’den küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi. İstatistik hesapları için SPSS 16.0 bilgisayar programı kullanıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Hasta Grubu

Çalışmaya, klinik ve patolojik tanısı konulmuş 93 hasta dahil edilmiş olup bu hastaların 87 tanesi benign hiperplazi, 6 tanesi ise malign hiperplazidir (Çizelge 4.1. ve 4.2.). Benign hiperplazili 87 hastanın 74'ü kadın ve 13'ü erkektir. Bu hastaların 72 sıcak nodülü, 102 soğuk nodülü ve 67 sağlıklı çevre dokusu olmak üzere 241 tane dokusu vardır. Ayrıca 19 tanesinde sigara kullanımı, 38 tanesinde aile öyküsü mevcuttur. Yaş ortalamaları  $47\pm 13$  (kadın  $45\pm 13$ , erkek  $57\pm 10$ ) 'tür. 87 hastanın 37 tanesinde sıcak nodül, 37 tanesinde soğuk nodül, 13 tanesinde ise hem sıcak hem soğuk nodül vardır.

Sıcak nodülü bulunan 28 kadın ve 9 erkek olmak üzere toplam 37 hastanın 59 nodülü ve 27 sağlıklı çevre dokusu mevcut olup toplamda 86 tane dokusu vardır. Ayrıca 9 tanesinde sigara kullanımı, 18 tanesinde aile öyküsü mevcuttur. Yaş ortalamaları ise  $52\pm 10$ 'dur.

Soğuk nodülü bulunan 36 kadın ve 2 erkek olmak üzere toplam 38 hastanın 84 nodülü ve 30 sağlıklı çevre dokusu mevcut olup toplamda 114 tane dokusu vardır. Ayrıca 9 tanesinde sigara kullanımı, 16 tanesinde aile öyküsü mevcuttur. Yaş ortalamaları ise  $43\pm 13$ 'tür.

Hem sıcak hem soğuk nodülü bulunan 10 kadın ve 2 erkek olmak üzere toplam 12 hastanın 13 sıcak, 18 soğuk nodülü ve 10 sağlıklı çevre dokusu mevcut olup toplamda 41 tane dokusu vardır. Ayrıca 1 tanesinde sigara kullanımı, 4 tanesinde aile öyküsü mevcuttur. Yaş ortalamaları ise  $45\pm 13$ 'tür.

Çalışmaya dahil edilen 6 kanser hastasının 4 tanesi kadın, 2 tanesi ise erkektir. Kadınlar papiller karsinom olup erkeklerden biri medüller karsinom diğeri ise foliküler karsinomdur. Ayrıca 1 tanesinde sigara kullanımı, 2 tanesinde aile öyküsü mevcuttur. Yaş ortalamaları ise  $61\pm 10$ 'dur.

**Çizelge 4.1.** Tez çalışması kapsamında incelenen tiroit benign hiperplazi hastalarına ait veriler

Nodül tipi	Kişi sayısı	Toplam doku sayısı	Normal doku sayısı	Nodül sayısı	Cinsiyet	Sigara içen	Aile öyküsü bulunan
H	37	86	27	59H	28K, 9E	9	18
C	38	114	30	84C	36K, 2E	9	16
H+C	12	41	10	13H+18C	10K, 2E	1	4
TOPLAM	87	241	67	174	87	19	38

H; sıcak nodül, C; soğuk nodül, H+C; Hem sıcak hem de soğuk nodülü bulunan hastalar, K; Kadın, E; Erkek

**Çizelge 4.2.** Tez çalışması kapsamında incelenen tiroit malign hiperplazi hastalarına ait veriler

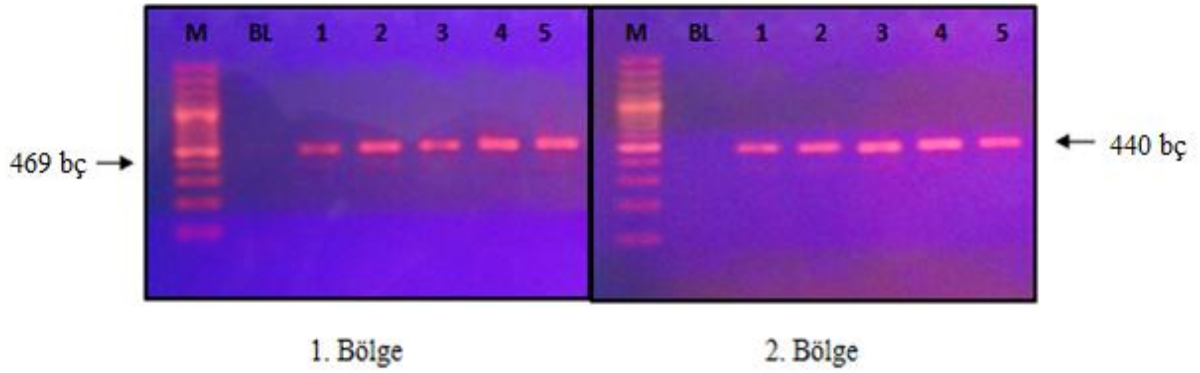
Hasta No	Malignite	Cinsiyet	Yaş	Sigara kullanımı	Aile öyküsü
27	Papiller karsinom	K	50	-	-
29	Papiller karsinom	K	53	-	-
60	Medüller karsinom	E	61	-	-
82	Papiller karsinom	K	78	-	-
EG	Papiller karsinom	K	63	-	+
TCA	Foliküler karsinom	E	62	+	+

K; Kadın, E; Erkek, -; Yok, +; Var



## 4.2. PZR Sonuçları

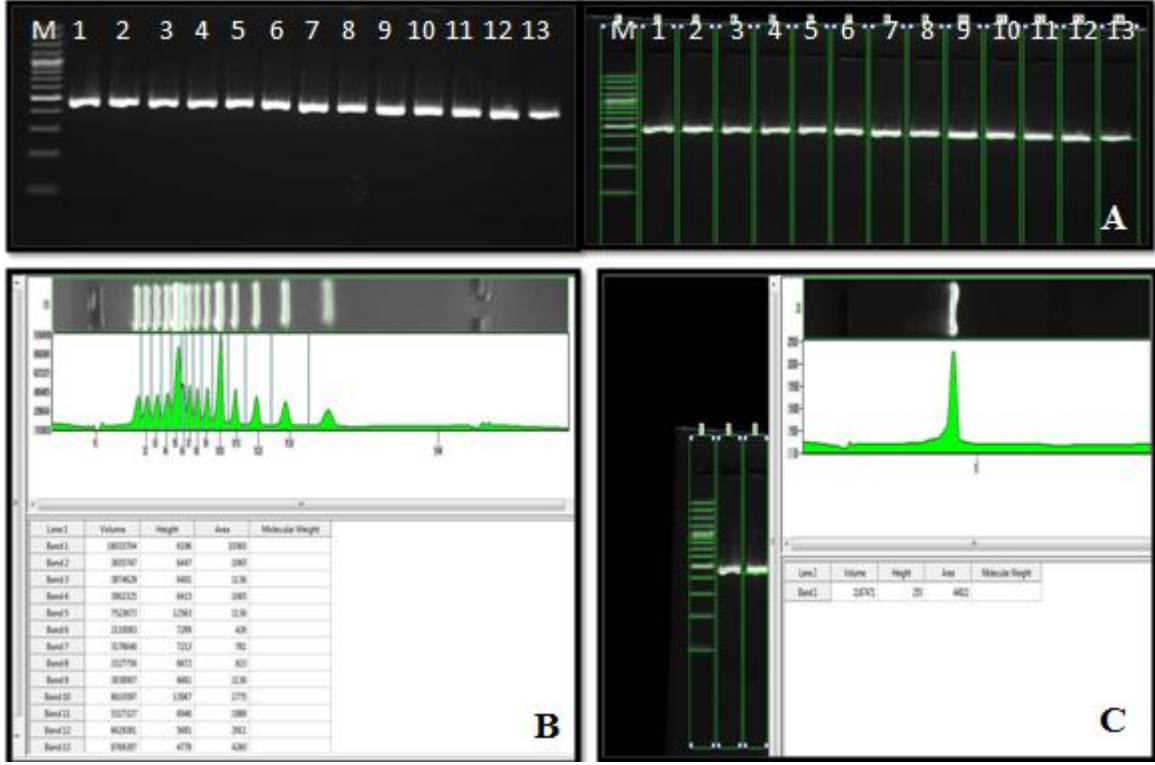
Hasta dokulardan ve sağlıklı dokulardan elde edilen DNA örnekleri Yöntem 3.2.1.'de belirtildiği şekilde 1. ve 2. bölge için ayrı ayrı amplifiye edilmiştir. Tüm örneklerde 1. bölge için 469 bç ve 2. bölge için 440 bç amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde marker DNA'ya karşı kontrol edilmiştir. Ayrıca negatif kontrolde beklediği üzere amplifikasyon görülmemiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. M: Marker, BL: Negatif kontrol, 1,2,3,4 ve 5: hasta örnekleri

### 4.3. Saflaştırma Sonuçları

Yöntem 3.2.3.'te belirtilen şekilde saflaştırılan PZR örnekleri %2'lik jel elektroforezini takiben fotodansimetrik olarak değerlendirildi ve örnek konsantrasyonu 25 ng/μl-65 ng/μl arasında olacak şekilde hesaplandı (Şekil 4.2.).

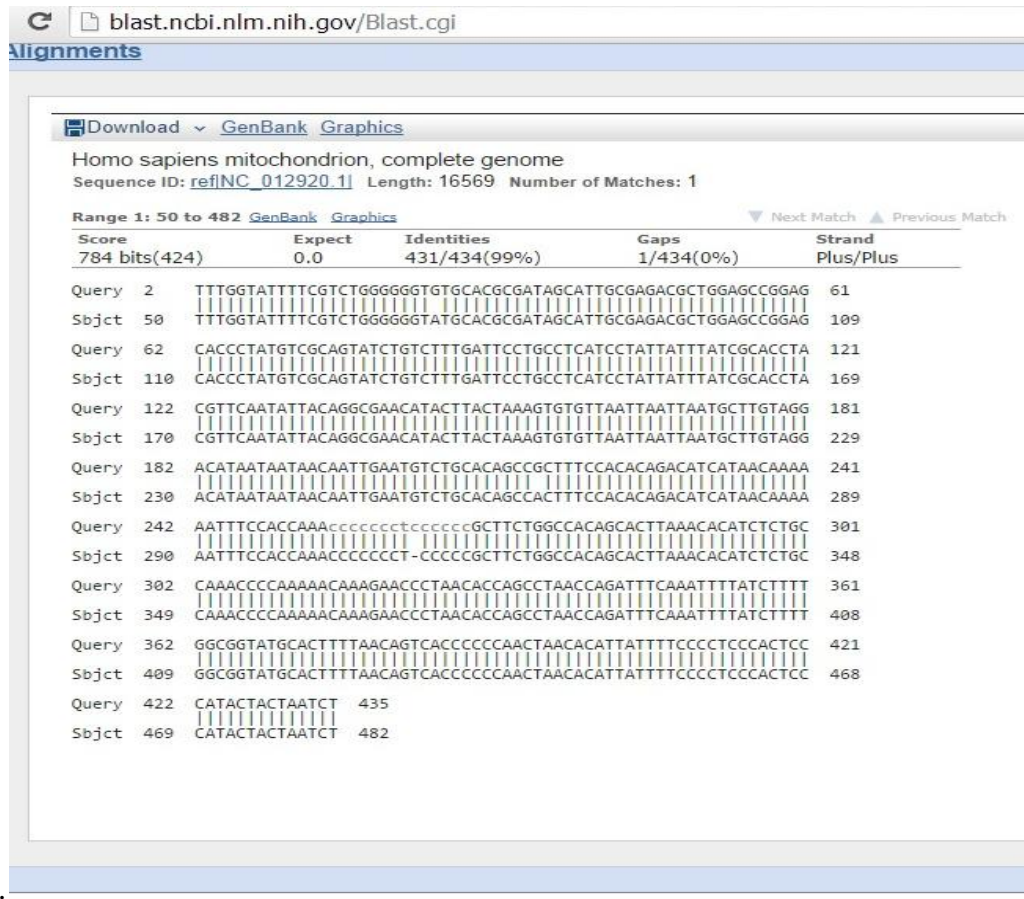


Şekil 4.2. A; % 2'lik agaroz jelin fotodansimetrik olarak görüntülenmesi, B; Marker bantlarının değerlendirilmesi, C; 1. kuyudaki örneğin değerlendirilmesi

#### 4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Saflaştırılan sağlıklı doku ve nodül örnekleri Yöntem3.2.6.'da belirtildiği gibi kapiller elektroforez için cihaza yüklendi. Cihazdan elde edilen dizi analizi sonuçları GenomeLab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2 DNA dizi analizi programı kullanılarak değerlendirildi.

Hastalara ait dizileme sonuçları hem hasta ve sağlıklı dokular arasında hem de Cambridge referans dizisi (NC-012920.1) ile blast programı kullanılarak karşılaştırıldı.(Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).



blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Alignments

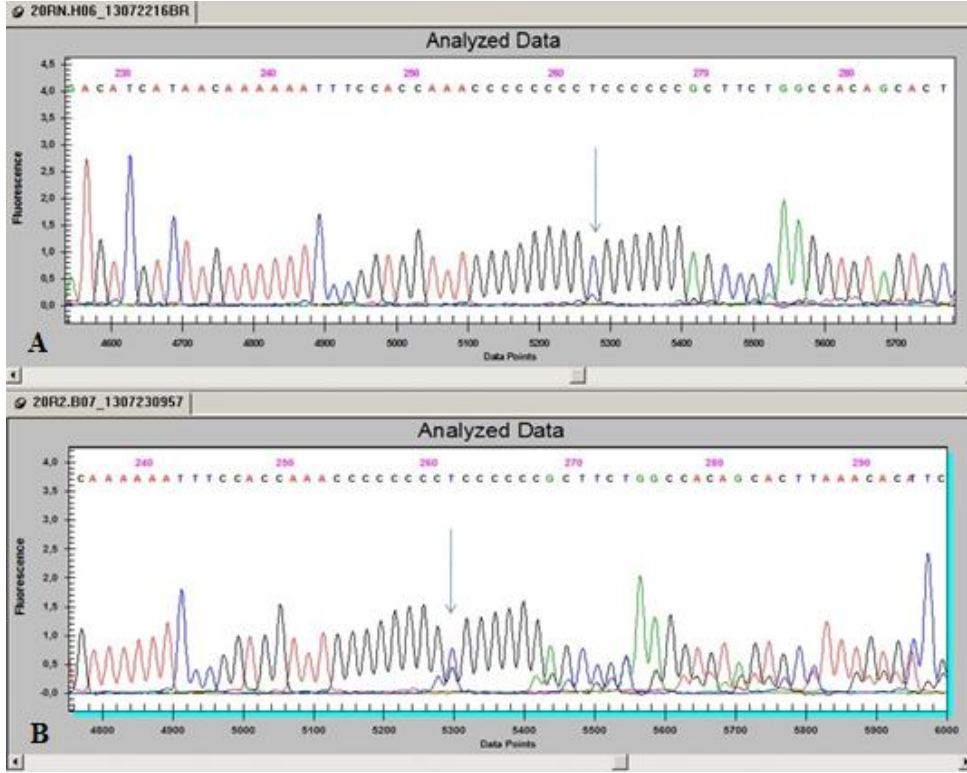
Download v GenBank Graphics

Homo sapiens mitochondrion, complete genome  
Sequence ID: [ref|NC\\_012920.1](#) Length: 16569 Number of Matches: 1

Range 1: 50 to 482 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
784 bits(424)	0.0	431/434(99%)	1/434(0%)	Plus/Plus
Query 2	TTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTGTGCACGCGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAG	61		
Sbjct 50	TTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTATGCACGCGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAG	109		
Query 62	CACCCATATGTCGCGAGTATCTGCTTTTGATTCTGCTCATCCTATTATTTATCGCACCTA	121		
Sbjct 110	CACCCATATGTCGCGAGTATCTGCTTTTGATTCTGCTCATCCTATTATTTATCGCACCTA	169		
Query 122	CGTTCAATATTACAGGCGAACATACTTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGG	181		
Sbjct 170	CGTTCAATATTACAGGCGAACATACTTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGG	229		
Query 182	ACATAATAATAACAATTGAATGTCTGCACAGCCGCTTTCCACACAGACATCATAACAAAA	241		
Sbjct 230	ACATAATAATAACAATTGAATGTCTGCACAGCCACTTTCCACACAGACATCATAACAAAA	289		
Query 242	AATTTCCACCAAAACCCCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGC	301		
Sbjct 290	AATTTCCACCAAAACCCCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGC	348		
Query 302	CAAACCCAAAAAAGAAACCCCTAACACAGCCTAACAGATTCAAATTTTATCTTTT	361		
Sbjct 349	CAAACCCAAAAAAGAAACCCCTAACACAGCCTAACAGATTCAAATTTTATCTTTT	408		
Query 362	GGCGGTATGCACCTTTAACAGTCACCCCAACTAACACATTATTTCCCTCCCACTCC	421		
Sbjct 409	GGCGGTATGCACCTTTAACAGTCACCCCAACTAACACATTATTTCCCTCCCACTCC	468		
Query 422	CATACTACTAATCT	435		
Sbjct 469	CATACTACTAATCT	482		

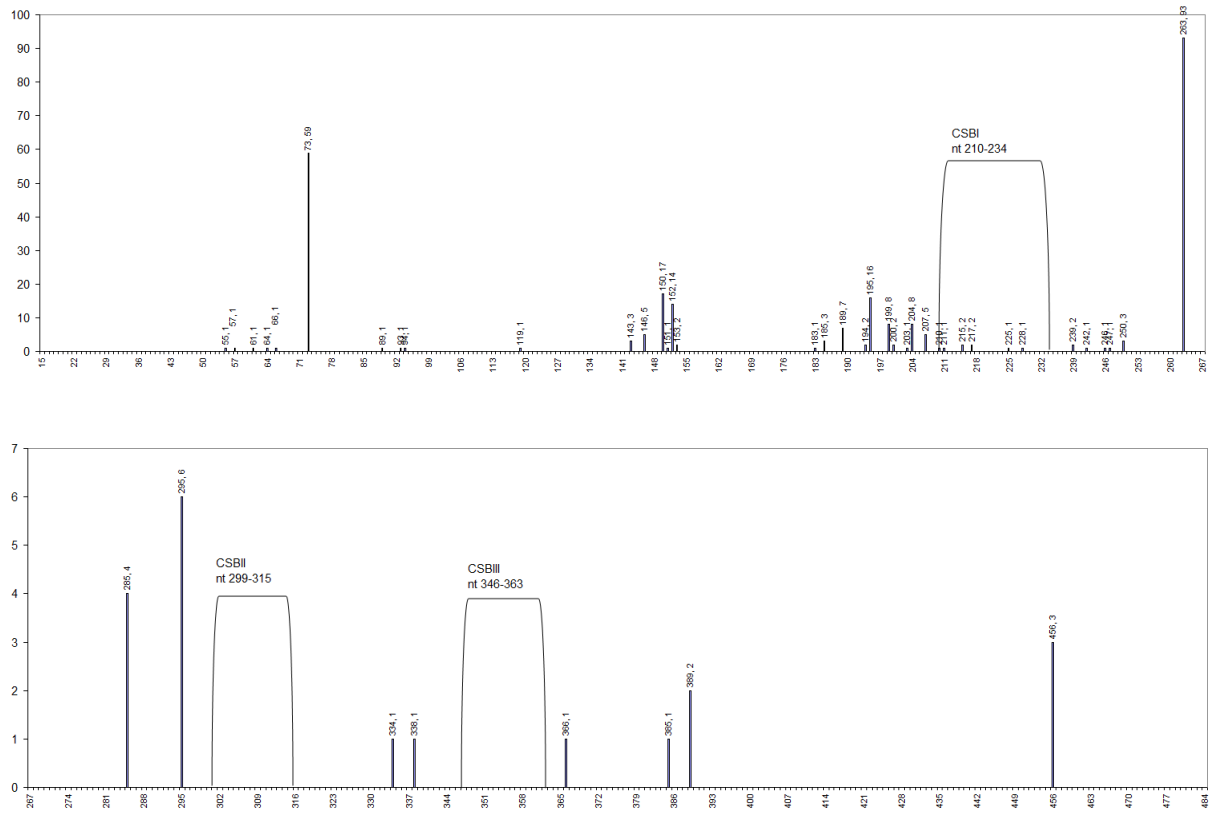
Şekil 4.3. Dizi analizi sonuçlarının referans dizi ile karşılaştırılması



Şekil 4.4. 20 nolu hastaya ait normal doku (A) ve nodül (B) DNA'sından elde edilen dizi analizi örnekleri

#### 4.4.1. Birinci Bölge (15-484. nükleotidler) analiz sonuçları

Tez çalışması kapsamında mtDNA D-loop bölgesi 1. ve 2. bölge olarak iki kısım halinde dizilenmiş ve incelenmiştir. Birinci bölge 15. nükleotid pozisyonundan 484. nükleotid pozisyonuna kadar devam eden ve 3 adet korunmuş dizi bloğunu da (CSBI-III) içeren bölgedir. Tez kapsamında çalışılan tüm örneklerde görülen nükleotid substitüsyonlarının nükleotid pozisyonları, her bir substitüsyonun kaç tane bulunduğu ve bu dizi içerisinde yer alan CSBI, II ve III Şekil 4.5.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi CSB II ve CSB III içerisinde incelenen hiç bir örnek için nükleotid değişimine rastlanmazken CSBI içerisinde az sayıda olmakla beraber polimorfik varyantlar gözlenmiştir. CSBII D310 olarak adlandırılan polisitozin uzunluk polimorfizmleri için sıcak bölgedir ancak verilen şekilde bu bölgede yer alan uzunluk polimorfizmleri verilmemiş bu değişimler ayrı olarak ele alınmıştır.



**Şekil 4.5.** Birinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının yeri ve sayısı ile bu bölgede yer alan CSBI, II ve III dizilerinin konumu

Tüm 1. bölge için belirlenen polimorfizmlerin özellikle 55-93, 143-153, 183-250, nükleotid pozisyonları arasında kümeleştiği görülmektedir. 263. nükleotid pozisyonunda A→G değişimi 93 olguda izlenmiştir. Bu noktadan sonra rastlanan polimorfizmlerin daha seyrek ve az sayıda olduğu görülmektedir. Çalışma kapsamında bulunan nükleotid polimorfizmlerinin sıklığı ile aile öyküsü ve sigara kullanımı arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelenmiş ve A73G polimorfizminin aile öyküsü olan hastalarda daha sık görüldüğü bulunmuştur (p=0,009). Gözlenen diğer polimorfizmler için istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır.

Yöntem 3.2.7'de belirtildiği gibi elde edilen diziler gen bankasında bulunan Türk bireylere ait 3 mtDNA dizisi ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.6.). Çoklu dizi eşleştirme programı kullanılarak yapılan bu analizde, tez çalışmamız kapsamında belirlenen nükleotid değişimlerinin sadece 4 tanesinin diğer dizilerde de görüldüğü geri kalan nükleotid değişimlerine ise incelenen bu 3 dizide rastlanmadığı belirlenmiştir. Ortak olan bu substitüsyonlar A93G, T152C, A189G ve A263G polimorfizmleridir.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

TEZ          15 CACCCTATTAACCACTCACGGGAGCTCTCCATGCATTTGGcATTTTtGTCTtGGGGGTgT 74
NC_012920.1 CACCCTATTAACCACTCACGGGAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTAT
AM263182     CACCCTATTAACCACTCACGGGAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTAT
AM263185     CACCCTATTAACCACTCACGGGAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTAT
AM263190     CACCCTATTAACCACTCACGGGAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTAT
*****
                A93G
                ↓
TEZ          75 GCACGCGATAGCATgGCGgaACGCTGGAGCCGGAGCACCCTATGcCGCAGTATCTGTCTT 134
NC_012920.1 GCACGCGATAGCATTGCGGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCTATGTCGCAGTATCTGTCTT
AM263182     GCACGCGATAGCATTGCGGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCTATGTCGCAGTATCTGTCTT
AM263185     GCACGCGATAGCATTGCGGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCTATGTCGCAGTATCTGTCTT
AM263190     GCACGCGATAGCATTGCGGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCTATGTCGCAGTATCTGTCTT
*****

                T152C                A189G
                ↓                ↓
TEZ          135 TGATTCCTaCCcCATtctcgTTATTTATCGCACCTACGTTCAATATTACgGaCGAgCATAt 194
NC_012920.1 TGATTCCTGCCTCATCCTATTATTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACATAC
AM263182     TGATTCCTGCCTCATCCCATTATTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACATAC
AM263185     TGATTCCTGCCTCATCCCATTATTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACATAC
AM263190     TGATTCCTGCCTCATCCTATTATTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACATAC
*****

TEZ          195 cTACcgAAacGTaTTggTTAgTgAATGCTTaTAaGACATAATAAcAAaATcaAAcGTCT 254
NC_012920.1 TTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCT
AM263182     TTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCT
AM263185     TTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCT
AM263190     TTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCT
*****

                A263G
                ↓
TEZ          255 GCACAGCCgCTTCCACACAGACATCATAAaAAAAATTTtCACCAAACCCCCCTCCCC 314
NC_012920.1 GCACAGCCACTTTCCACACAGACATCATAAaAAAAATTTCCACCAAACCCCCCTCCCC
AM263182     GCACAGCCGCTTCCACACAGACATCATAAaAAAAATTTCCACCAAACCCCCCTCCCC
AM263185     GCACAGCCGCTTCCACACAGACATCATAAaAAAAATTTCCACCAAACCCCCCTCCCC
AM263190     GCACAGCCGCTTCCACACAGACATCATAAaAAAAATTTCCACCAAACCCCCCTCCCC
*****

TEZ          315 CGCTTCTGGCCACAGCACTcAAaTACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACAAaAACCTAA 374
NC_012920.1 CGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACAAAGAACCTAA
AM263182     CGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACAAAGAACCTAA
AM263185     CGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACAAAGAACCTAA
AM263190     CGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACAAAGAACCTAA
*****

TEZ          375 CACCAGCCTAgCCAaATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAACAGTCACC 434
NC_012920.1 CACCAGCCTAACAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAACAGTCACC
AM263182     CACCAGCCTAACAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAACAGTCACC
AM263185     CACCAGCCTAACAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAACAGTCACC
AM263190     CACCAGCCTAACAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAACAGTCACC
*****

TEZ          435 CCCCAACTAACACATTATTTtCCCTCCCACTCCCATACTACTAATCT 482
NC_012920.1 CCCCAACTAACACATTATTTCCCTCCCACTCCCATACTACTAATCT
AM263182     CCCCAACTAACACATTATTTCCCTCCCACTCCCATACTACTAATCT
AM263185     CCCCAACTAACACATTATTTCCCTCCCACTCCCATACTACTAATCT
AM263190     CCCCAACTAACACATTATTTCCCTCCCACTCCCATACTACTAATCT
*****

```

**Şekil 4.6.** Birinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının Cambridge dizisi ve gen bankasında belirlenen 3 Türk mtDNA dizisi ile çoklu eşleme sonuçları. Tez kapsamında bulunan polimorfizmler küçük harflerle gösterilmiştir. Cambridge diziden farklı olduğu halde en az bir gen bankası verisi ile uyumlu olan substitüsyonlar ok işaretleri ile gösterilmiştir

İncelenen benign neoplazm olguları içerisinde sağlıklı ve hasta dokular kıyaslandığında 7 olguda farklılık belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). Belirlenen bu farklılıkların aynı bireylere ait tüm nodüllerde ortak olmadığı görülmüştür.

**Çizelge 4.3.** Birinci bölge için farklılık görülen benign neoplazm olgular

Hasta no	Patoloji	Nükleotid pozisyonu	Normal allel	SD	N1	N2	N3	N4	N5
31	H	73	A	A	A	G			
7	H	146	C	T	T	C			
32	H	152	T	T	T	C			
		195	T	T	T	C			
52	C	338	C	C	T	T			
75	C	64	C	C	C	C	T	C	
79	C	217	T	G	G	G	T	T	G
104	H	89	T	G	T				

H; sıcak nodül, C; soğuk nodül, SD; Sağlıklı doku, N; Nodül

Malign hiperplazilerde rastlanan polimorfizmler ise Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Yapılan bu kıyaslamalarda tanımlanan polimorfizmlerden hiç birinin belirli bir patoloji ile ilişkisi görülmemiştir.

**Çizelge 4.4.** Birinci bölge için malign hiperplazilerde rastlanan nükleotid değişimleri

Hasta no	Polimorfizm
27	A73G, G143A, A263G
29	A73G, T195C, A263G
60	G66T, A73G, A263G
82	A73G, C150T, T199C, A263G
EG	A73G, A200G, A263G
TCA	A73G, C150T, T152C, A263G

Yapılan çalışmalarda sıklıkla izlenen D310 uzunluk polimorfizmleri bu çalışma kapsamında da incelenmiş ve soğuk/sıcak nodüller ile normal tiroit dokuları için belirlenen sitozin sayıları Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.'da benign ve malign olgular için ayrı ayrı verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Benign hiperplazi hastalarında D310 bölgesi için belirlenen sitozin sayıları ve yüzdeleri

Patoloji		C7 (%)	C8 (%)	C9 (%)	C7/C8 (%)	C8/C9 (%)	C7/C8/C9 (%)	C8/C9/C10 (%)	C8/C9/C10/C11 (%)	Toplam
Sıcak (H)	N	11 (40,74)	9 (33,33)	1 (3,7)	1 (3,7)	2 (7,4)	1 (3,7)	1 (3,7)	1 (3,7)	27
	P	22 (37,28)	21 (35,59)	2 (3,38)	1 (1,69)	6 (10,16)	3 (5,08)	3 (5,08)	1 (1,69)	59
	Toplam	33 (38,37)	30 (34,88)	3 (3,48)	2 (2,32)	8 (9,3)	4 (4,65)	4 (4,65)	2 (2,32)	86
Soğuk (C)	N	14 (46,66)	10 (33,33)	-	2 (6,66)	-	1 (3,33)	3 (10)	-	30
	P	38 (45,23)	34 (40,47)	-	1 (1,19)	2 (2,38)	2 (2,38)	6 (7,14)	1 (1,19)	84
	Toplam	52 (45,61)	44 (38,59)	-	3 (2,63)	2 (1,75)	3 (2,63)	9 (7,89)	1 (0,87)	114
C+H	N	4 (40)	6 (60)	-	-	-	-	-	-	10
	PH	5 (38,46)	8 (61,53)	-	-	-	-	-	-	13
	PC	6 (33,33)	12 (66,66)	-	-	-	-	-	-	18
	Toplam	15 (36,58)	26 (63,41)	-	-	-	-	-	-	41

H; sıcak nodül, C; soğuk nodül, H+C; Hem sıcak hem de soğuk nodül, N; normal doku, P; patoloji



**Çizelge 4.6.** Malign hiperplazi hastalarında D310 bölgesi için belirlenen sitozin sayıları

Hasta no	Normal/ Patoloji	C7	C8	C7/C8	Toplam
27	N	-	1	-	1
	P	-	1	-	1
29	N	-	1	-	1
	P	-	1	-	1
60	N	1	-	-	1
	P	2	-	-	2
82	N	1	-	-	1
	P	2	-	-	2
EG	N	-	1	-	1
	P	-	8	-	8
TCA	N	-	1	-	1
	P	-	6	1	7
Toplam		6	20	1	27

Yapılan çalışmada D310 bölgesi için incelenen benign hiperplazi olguları içerisinde sağlıklı ve hasta dokular kıyaslandığında 14 olguda farklılık belirlenmiştir (Çizelge 4.7.). D310 bölgesi için belirlenen farklılıklarında nükleotid polimorfizmlerine benzer şekilde tüm nodüller için ortak olmadığı görülmüştür. İki olguda ise (hasta no 88 ve 97) sağlıklı normal dokular mevcut değildir.

**Çizelge 4.7.** Benign hiperplazi olgularında D310 bölgesi için belirlenen farklılıklar

Hasta no	Patoloji	Normal	Nodül 1	Nodül 2	Nodül 3	Nodül 4
13	H	C8C9	C8C9C10	C8C9C10	C8C9	Yok
28	H	C8	C8C9	Yok	Yok	Yok
31	H	C7	C8	C7	Yok	Yok
4	H	C8C9C10	C8C9	C8C9	C8C9	Yok
7	H	C7C8	C7	C7C8	Yok	Yok
9	H	C8	C8C9	C8	Yok	Yok
20	C	C7C8	C8	C8	C8	C8
32	H	C8	C8	C8	C7C8C9	Yok
34	H+C	C7	C8	C8	C8	Yok
71	H	C8C9	C8C9C10	Yok	Yok	Yok
75	C	C7C8	C7	C7	C7	C7
88	C	Yok	C8C9	C8C9	C7C8C9	Yok
97	C	Yok	C8C9C10	C7C8	Yok	Yok
102	C	C8C9C10	C8C9C10	C8C9C10	C8C9C10C11	C8C9C10

H; sıcak nodül, C; soğuk nodül, H+C; Hem sıcak hem de soğuk nodülü bulunan hastaları ifade etmektedir

Malign hiperplazi olguları arasında foliküler karsinom hastasına ait bir nodülde C7C8 bulunduğu halde diğer nodüller ve sağlıklı dokusunda C8 görülmüştür. Diğer malign hiperplazi hastalarında D310 bölgesi için dokular arası bir farklılığa rastlanmamıştır.

D310 bölgesi için heteroplazmi ve homoplazmi sayıları benign olgular için Çizelge 4.8.'de verilmiştir. Sıcak nodüllerin 20'sinde (%23,72) ve soğuk nodüllerin 18'in de (%15,78) heteroplazmi belirlenmiştir. Sıcak, soğuk ve sağlıklı dokular heteroplazmi açısından istatistiksel olarak incelenmiş ve anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Sıcak ve soğuk nodülü bir arada bulunduran hastalarda ise heteroplazmiye rastlanmamış olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 4.8.** Benign hiperplazi olgularında D310 bölgesi için heteroplazmi, homoplazmi sayıları ve yüzdeleri

		Heteroplazmi (%)	Homoplazmi (%)	Toplam
Sıcak (H)	N	6 (22,22)	21 (77,77)	27
	P	14 (23,72)	45 (76,27)	59
	Toplam	20 (23,25)	66 (76,74)	86
Soğuk (C)	N	6 (20)	24 (80)	30
	P	12 (14,28)	72 (85,71)	84
	Toplam	18 (15,78)	96 (84,21)	114
H+C	N	-	10 (100)	10
	PH	-	13 (100)	13
	PC	-	18 (100)	18
	Toplam	-	41 (100)	42

Malign hiperplazili 6 hastanın 5 tanesinin tüm nodülleri homoplazmiktir. Heteroplazmisi olan 1 kanser hastasının ise 7 nodülünün 6 tanesi homoplazmiktir (Çizelge 4.9.).

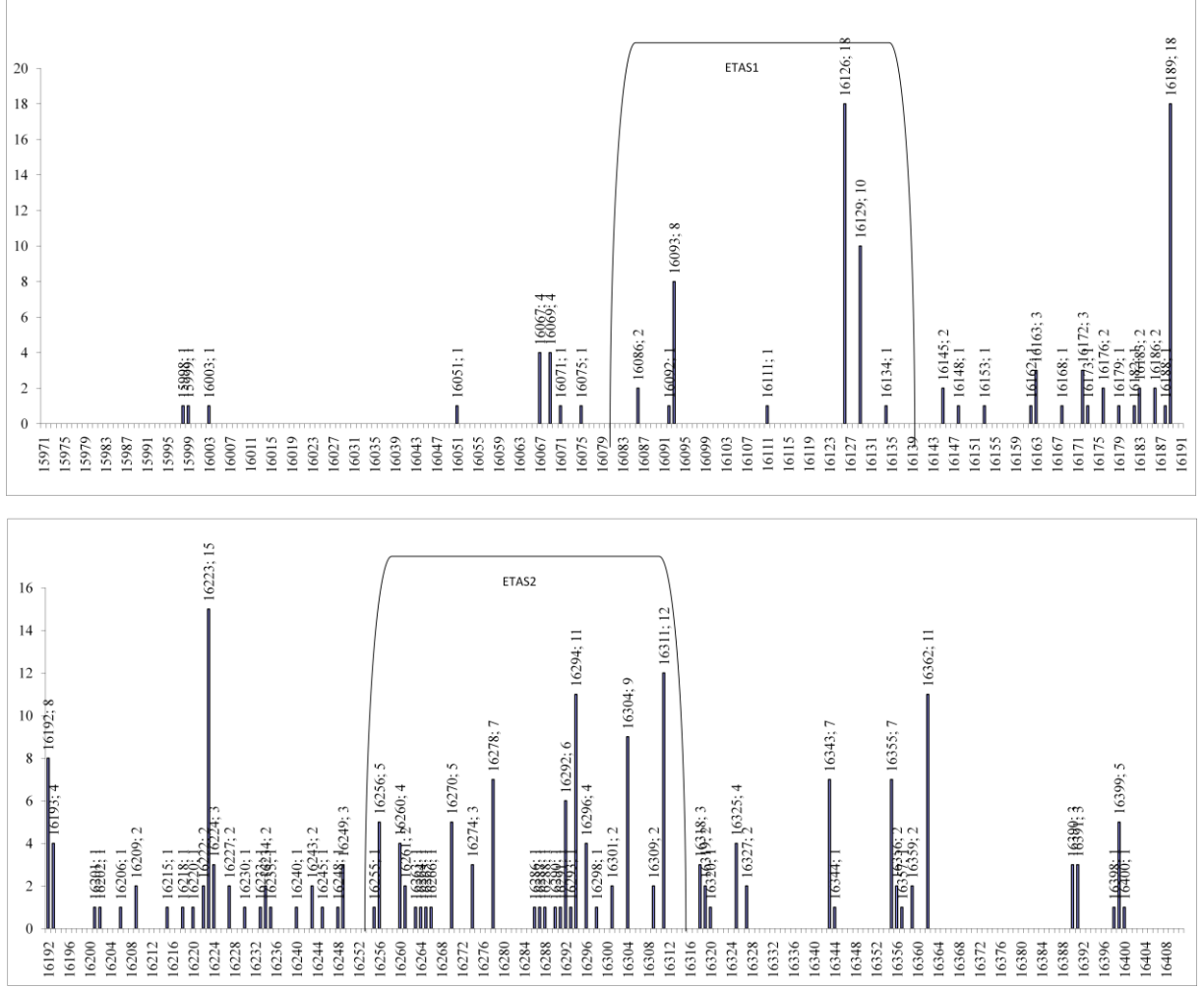
**Çizelge 4.9.** Malign hiperplazi olgularında D310 bölgesi için heteroplazmi, homoplazmi sayıları

Hasta no	Normal (N)/ Patoloji (P)	Heteroplazmi	Homoplazmi	Toplam
27	N	-	1	1
	P	-	1	1
29	N	-	1	1
	P	-	1	1
60	N	-	1	1
	P	-	2	2
82	N	-	1	1
	P	-	2	2
EG	N	-	1	1
	P	-	8	8
TCA	N	-	1	1
	P	1	6	7
Toplam		1	26	27

#### 4.4.2. İkinci Bölge (15971-16411. nükleotidler) analiz sonuçları

İkinci bölge 15971. nükleotid pozisyonundan 16411. nükleotid pozisyonuna kadar devam eden ve replikasyonsonlanma ile ilgili dizileri (ETAS1 ve 2) içeren bölgedir. Tez kapsamında çalışılan tüm örneklerde görülen nükleotid substitüsyonlarının nükleotid pozisyonları, her bir substitüsyonun kaç tane bulunduğu ve bu dizi içerisinde yer alan ETAS1 ve 2 Şekil 4.7.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi ETAS1 içerisinde az sayıda, ETAS 2 içerisinde ise fazla sayıda polimorfik varyantlar gözlenmiştir.

Tüm 2. bölge için belirlenen polimorfizmler belli bir bölgede kümeleşme göstermemekle birlikte belirlenen polimorfizm sayısı fazla olmasına rağmen görülen olgu sayısı azdır.



**Şekil 4.7.** İkinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının yeri ve sayısı ile bu bölgede yer alan ETAS1 ve ETAS2 dizilerinin konumu

Yöntem 3.2.7'de belirtildiği gibi elde edilen diziler gen bankasında bulunan Türk bireylere ait 3 mtDNA dizisi ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.8.). Çoklu dizi eşleştirme programı kullanılarak yapılan bu analizde, tez kapsamında karşılaşılan polimorfizmlerden 6 tanesinin gen bankası verilerinde de görüldüğü belirlenmiştir. Bu polimorfizmlerden 4 tanesi (G16129A, C16148T, C16256T ve G16319A) AM263190 gen bankası verisi ile uyumlu olduğu halde T16092G polimorfizminin AM263185 ve T16172C polimorfizminin AM263182 numaralı veriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Tez kapsamında belirlenen diğer nükleotid substitüsyonları incelenen gen bankası verilerinde görülmemektedir.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

TEZ      15971 TTA↓ACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTttGATcCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTC 16030
AM263190 TTA↓ACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTC
AM263185 TTA↓ACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTC
NC_012920.1 TTA↓ACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTC
AM263182 TTA↓ACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTC
*****

TEZ      16031 ATGGGGAAGCAGATTTGGGTgCCACCCAAGTATTGAtTtAtCCA↓cCAACAACCGC↓cATGT 16090
AM263190 ATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGT
AM263185 ATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGT
NC_012920.1 ATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGT
AM263182 ATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGT
*****

                T16092G                                G16129A                                C16148T
                ↓                                ↓                                ↓
TEZ      16091 AccTCGTACATTACTGCCAGtCACCATGAATATTGcACaGTACtATAAAATACTTaAcTAC 16150
AM263190 ATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACAGTACCATAAAATACTTGACTAC
AM263185 ACTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACCAC
NC_012920.1 ATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACCAC
AM263182 ATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACCAC
* *****

                T16172C
                ↓
TEZ      16151 CTaTAGTACATg↓gAAACtCAActCAtAtTAAccCctCtcCcttATGCTTAtgAGCgAGcA 16210
AM263190 CTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTA
AM263185 CTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTA
NC_012920.1 CTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTA
AM263182 CTGTAGTACATAAAAACCCAACCCACATCAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTA
** *****

                C16256T
                ↓
TEZ      16211 CAGCgATtAcCttcCAgCTgTcgtgCATCgAcGtAAteCCAAAatCACttCcggtCCAt 16270
AM263190 CAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAGTCACCCCTCACCCAC
AM263185 CAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAGGCCACCCCTCACCCAC
NC_012920.1 CAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAGGCCACCCCTCACCCAC
AM263182 CAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAGGCCACCCCTCACCCAC
**** * * * *

                G16319A
                ↓
TEZ      16271 TAGaATAtCAACAAAttcAtttgtCtTcAAtAGcACATgGcACATAA↓catCATTcAtCGT 16330
AM263190 TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAACCATTTACCGT
AM263185 TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAAGCCATTTACCGT
NC_012920.1 TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAAGCCATTTACCGT
AM263182 TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAAGCCATTTACCGT
*** ** * * * *

TEZ      16331 ACATAGCACATTgtAGTCAAATCCtccCcGcCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGG↓a 16390
AM263190 ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGG
AM263185 ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGG
NC_012920.1 ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGG
AM263182 ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGG
*****

TEZ      16391 aTCCCTT↓agtCACCATCCTC 16410
AM263190 GTCCCTTGACCACCATCCTC
AM263185 GTCCCTTGACCACCATCCTC
NC_012920.1 GTCCCTTGACCACCATCCTC
AM263182 GTCCCTTGACCACCATCCTC
*****

```

**Şekil 4.8.** İkinci bölge için belirlenen nükleotid substitüsyonlarının Cambridge dizisi ve gen bankasında belirlenen 3 Türk mtDNA dizisi ile çoklu eşleme sonuçları. Tez kapsamında bulunan polimorfizmler küçük harflerle gösterilmiştir. Cambridge diziden farklı olduğu halde en az bir gen bankası verisi ile uyumlu olan substitüsyonlar ok işaretleri ile gösterilmiştir

İncelenen benign neoplazm olguları içerisinde sağlıklı ve hasta dokular kıyaslandığında 4 olguda farklılık belirlenmiştir (Çizelge 4.10.). Malign hiperplazilerde rastlanan polimorfizmler ise Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Yapılan bu kıyaslamalarda tanımlanan polimorfizmlerden hiç birinin belirli bir patoloji, aile öyküsü ve sigara kullanımı ile ilişkisi görülmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 4.10.** İkinci bölge için farklılık görülen benign neoplazm olgular

Hasta no	Patoloji	Nükleotid pozisyonu	Normal allel	SD	N1	N2	N3
2	H	16355	C	C	T		
III	H	16278	C	C	C	T	C
89	C	16192	C		C	T	
98	C	16189	C	C	T		

H; Sıcak nodül, C; Soğuk nodül, SD; Sağlıklı doku, N; Nodül

**Çizelge 4.11.** İkinci bölge için malign hiperplazilerde rastlanan polimorfizmler

Hasta no	Polimorfizm
27	C16069T, T16093C, T16126C, G16145A, C16222T, C16261T
29	T16126C, C16294T, C16320T
60	T16126C, A16163G, A16183C, T16189C, T16243C, C16294T
82	C16173T, C16260T, A16343G, G16390A
EG	G16129A, T16224C, C16301T, T16311C
TCA	C16168T, A16343G

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma Türk toplumunda mtDNA D-loop mutasyon ve polimorfizmlerinin varlığını ve benign ve malign tiroit lezyonlarıyla ilişkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde mtDNA mutasyonlarının mide, kolon, pankreas, böbrek, meme ve akciğer kanserleri ile olan ilişkisini ele alan çok sayıda çalışma mevcuttur (Copeland ve ark. 2002, Chatterjee ve ark. 2006, Aral ve ark. 2007). Tiroit kanserlerinin normal tiroit dokusuna kıyasla daha fazla mitokondri içerdiği uzun yıllardır bilinmektedir (Stefaneanu ve ark. 1979). Diğer taraftan mtDNA mutasyonlarının tiroit hastalıklarındaki rolü bu tezin genel bilgiler kısmında da kısaca özetlendiği üzere kesin değildir.

Çalışmamız kapsamında 6 tanesi malign hiperplazi olmak üzere 93 tiroit hastasında mtDNA D-loop 15-484 ve 15971-16411. nükleotidler arası iki bölgede mutasyonlarının varlığı dizi analizi yöntemi ile araştırılmış ve elde edilen veriler gen bankası verileriyle kıyaslanmıştır. Ayrıca bulunan polimorfizmlerin sıklığı ve heteroplazmi durumu sigara kullanımı ve aile öyküsü açısından da istatistiksel olarak ele alınmıştır. Ayrıca çalışılan bölgelerde yer alan korunmuş dizi blokları (CSBI-III) ve replikasyon sonlanma ile ilgili dizilerde (ETASI-II) polimorfizmlerin dağılımı incelenmiştir.

Çalışmamız kapsamında elde edilen nükleotid değişimlerinin tamamı literatürle uyumlu olarak hem sağlıklı hem de hasta dokularında görülmesi nedeniyle polimorfizm olarak ele alınmış, sağlıklı ve hasta doku arasındaki farklılıklar ise somatik mutasyon olarak değerlendirilmiştir. Diğer taraftan çalışmaya dahil edilen olguların tamamında sağlıklı doku mevcut olmadığı için bu hastalara ait nükleotid değişimleri de polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Mitokondriyal DNA dizi analizlerinin değerlendirilmesinde bir diğer önemli husus heteroplazmilerin varlığıdır. Çalışmamızda heteroplazmi görülen noktalarda üst üste gelen nükleotid piklerinden daha küçük olanın, kuvvetli sinyalin en az yarısı kadar olduğu hallerde heteroplazmi kabul edilmiş, bunun altında kalan pikler homoplazmik olarak alınmıştır. Bunun sebebi elde ettiğimiz dizileri yüksek çözünürlüklü erime analizleri (high resolution melting, HRM) gibi yöntemlerle konfirme etme imkanımızın olmamasıdır.

Birinci bölge için yapılan analizlerde korunmuş dizi blokları CSBI, II ve III arasında tek nükleotid değişimlerinin sadece CSBI' de olduğu ve bunlarında sayıca az olduğu görülmüştür. Bu bölgeler mtDNA replikasyonunun başlamasında rol oynadıklarından nükleotid



değişimlerinin nadir olması beklenen bir durumdur (Kornienko ve ark. 2010). Birinci bölge için en fazla rastlanan nükleotid değişimi A263G olarak görülmekle beraber bu noktada adenin bulunmasının nadir bir durum olduğu ve insanların çoğunda 263. nükleotid pozisyonunda guanin bulunduğu bildirilmiştir (Andrews ve ark. 1999). Bu nedenle A263G bir polimorfizm olarak ele alınmamalıdır. Hasta ve sağlıklı dokular kıyaslandığında sadece 7 olguda somatik mutasyon belirlenmiş ve sıcak-soğuk nodüller açısından istatistiksel bir ilişki görülmemiştir. Malign hiperplazmilerde ise sağlıklı dokularla lezyonlar arasında bir fark görülmemiştir. İlginç olarak tez çalışmamızda belirlenen polimorfizmlerden A73G ile aile öyküsü arasında istatistiksel bir ilişki bulunmuştur. Ancak bu ilişkinin etkisi açık değildir ve hastalıkla ilişkili olmaktan ziyade belirli bir haplogrubun etkisini yansıtır olması da mümkündür. Bu açıdan mitokondriyal haplogrupların belirlenerek tiroid hastalıklarındaki rolünün çalışılması bu etkinin açıklanabilmesi için gereklidir. Tez kapsamında belirlenen tek nükleotid değişimleri için heteroplazmi görülmemiştir.

Diğer taraftan D310 olarak adlandırılan ve Cambridge referans dizide CCCCCCTCCCCC (C7TC5) olarak yer alan dizide, ilk polisitozin dizisindeki insersiyon ve delesyonlar neredeyse tüm tümör tipleri için gösterilmiştir (Maximo ve ark. 2005, Sanchez-Cespedes ve ark. 2001, Parrella ve ark. 2001, Aral ve ark. 2006). Bu bölgede ilk polisitozin dizisinin 7-9 arasında olması normal polimorfik aralık olarak kabul edildiği halde 10 ve daha fazla sitozin sayısı (10, 11, 12C) nadir polimorfik varyantlar olarak kabul edilmektedir (Maximo ve ark. 2005). Tez kapsamında incelenen benign olgulardan sıcak nodül hastalarına ait dokuların %93'ü, soğuk nodül hastalarına ait dokuların %91,2'si ve sıcak ve soğuk nodülü bir arada bulunan hastalara ait dokuların tamamı (%100) normal polimorfik aralıkta bulunmuştur ve büyük kısmı 7 ve 8 sitozin içermektedir. 10 ve 11 sitozin içeren nadir varyantlar son derece azdır. Malign hiperplazilerde ise çalışılan dokuların tamamı normal sınırlar içerisinde bulunmuştur. Hasta ve sağlıklı dokular kıyaslandığında 14 benign ve 1 malign olguda sağlıklı doku ile hasta doku arasında farklılık olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde bu bölgedeki sitozin sayılarının hastalıkla veya sigara kullanımı ve aile hikayesi ile bir ilişkisi görülmemiştir. Elde edilen bu veriler literatürde aynı bölgeyi ele alan çalışmalardan elde edilen verilerle uyumlu görülmektedir (Maximo ve ark. 2002, Lohrer ve ark. 2002, Tong ve ark. 2003, Maximo ve ark. 2005). D310 bölgesi ikinci polisitozin dizisi ise referans dizide 5 sitozin içerdiği halde burada 6 sitozin bulunduğu ve 5 sitozin sayısının nadir bir varyant olduğu bildirilmiştir (Andrews ve ark.

1999). Çalışmamız kapsamında incelenen tüm olgularda da ikinci polisitozin dizisinin 6 sitozinden oluştuğu görülmüştür.

İkinci bölge analizlerinde polimorfizmlerin birinci bölgeye kıyasla daha fazla olduğu ancak her bir polimorfizmin frekansının nispeten daha düşük olduğu görülmüştür. Mitokondriyal replikasyonun sonlanması ile ilişkili iki dizi bloğu ETAS1 ve ETAS2 incelendiğinde ETAS2' de polimorfik varyantlara daha fazla rastlandığı görülmüştür. Sağlıklı ve hasta dokular kıyaslandığında benign olgulardan 4 tanesinde farklılık görülmüş, malign olgularda ise farklılık gözlenmemiştir. Belirlenen hiçbir polimorfizmin hastalık, sigara kullanımı ve aile öyküsü ile ilişkisi görülmemiştir.

Gerek 1. bölge gerekse 2. bölge analizlerinde sağlıklı dokularla hasta dokular arasında görülen farklılıkların tüm lezyonları kapsamadığı, aynı hastanın 1-2 lezyonunda farklılık olduğu görülmektedir. Bu durum belirlenen mutasyonların hastalığa özgün olmayacağının kanıtı olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak tez çalışmamız kapsamında elde edilen bulgular mtDNA D-loop bölgesindeki değişimlerin benign ve malign tiroit lezyonlarının gelişiminde bir rolü olmadığı göstermektedir. Diğer taraftan tez kapsamında ele alınmayan düşük düzeydeki heteroplazmilerin yüksek çözünürlüklü erime analizleri ile ele alınması ve mitokondriyal haplogrupların hastalıkla olan ilişkisinin araştırılması önemlidir.

## 6. KAYNAKLAR

- 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 ve Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM ve Howell N (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 23: 147.
- Aral C ve Ozer A (2007). Mitochondrial DNA and Cancer, *Marmara Medical Journal*; 20; 127-136
- Aral C, Akkiprik M, Kaya H, Ataizi-Celikel C, Caglayan S, Ozisik G, Baloglu H ve Ozer A (2010). Mitochondrial DNA common deletion is not associated with thyroid, breast and colorectal tumors in Turkish patients. *Genet Mol Biol*, 33: 1-4.
- Aral C, Kaya H, Ataizi-Celikel C, Akkiprik M, Sonmez O, Gulluoglu BM ve Ozer A (2006). A novel approach for rapid screening of mitochondrial D310 polymorphism. *BMC Cancer*, 6: 21.
- Avise JC (1991). Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet*, 25: 45-69.
- Awadalla P, Eyre-Walker A ve Smith JM (1999). Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, 286: 2524-2525.
- Belfiore A, La Rosa GL, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C ve Vigneri R (1992). Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *Am J Med*, 93: 363-369.
- Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA ve Holt IJ (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*, 278: 50961-50969.
- Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P ve Wallace DC (2005). MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res*, 33: D611-613.
- Brown TA ve Clayton DA (2002). Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res*, 30: 2004-2010.
- Burguera B ve Gharib H (2000). Thyroid incidentalomas. Prevalence, diagnosis, significance, and management. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 29: 187-203.
- Butler JM (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STRMarkers*. 2nd edition. Elsevier Academic Press., USA.
- Carracedo A, Bar W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G ve Wilson M (2000). DNA commission of

- the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int*, 110: 79-85.
- Chandra D ve Singh KK (2011). Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1807: 620-625.
- Chang DD ve Clayton DA (1984). Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell*, 36: 635-643.
- Chatterjee A, Mambo E ve Sidransky D (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25: 4663-4674.
- Clayton DA (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28: 693-705.
- Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM ve Penta JS (2002). Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest*, 20: 557-569.
- Cummins J (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod*, 3: 172-182.
- Datta RV, Petrelli NJ ve Ramzy J (2006). Evaluation and management of incidentally discovered thyroid nodules. *Surg Oncol*, 15: 33-42.
- Davis PJ ve Davis FB (1996). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*, 6: 497-504.
- Eberhard P (2000). *Genetik Atlası*. Lüleci G., SM, Alper Ö. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 53-56.
- Ebner D, Rodel G, Pavenstaedt I ve Haferkamp O (1991). Functional and molecular analysis of mitochondria in thyroid oncocyoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 60: 139-144.
- Eyre-Walker A, Smith NH ve Smith JM (1999). How clonal are human mitochondria? *Proc Biol Sci*, 266: 477-483.
- Faquin WC (2008). The thyroid gland: recurring problems in histologic and cytologic evaluation. *Arch Pathol Lab Med*, 132: 622-632.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA ve Montoya J (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, 88: 41-56.
- Finnila S, Hassinen IE ve Majamaa K (1999). Restriction fragment analysis as a source of error in detection of heteroplasmic mtDNA mutations. *Mutat Res*, 406: 109-114.
- Fourtounis D (1999). Mutations in the control region of the mitochondrial genome linked to traits of economic value in white leghorns. Thesis of Master degree. McGill University, Canada.
- G. Gasparre AMP, E. Bonora et al., (2007). Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *PNAS*. 104:9001-9006.
- Gaspari M, Larsson NG ve Gustafsson CM (2004). The transcription machinery in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1659: 148-152.

- Gharib H (1997). Changing concepts in the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 26: 777-800.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J ve Lopez R (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*, 38: W695-699.
- Gozu H, Avsar M, Bircan R, Claus M, Sahin S, Sezgin O, Deyneli O, Paschke R, Cirakoglu B ve Akalin S (2005). Two novel mutations in the sixth transmembrane segment of the thyrotropin receptor gene causing hyperfunctioning thyroid nodules. *Thyroid*, 15: 389-397.
- Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y ve Nonaka I (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10614-10618.
- Hegedus L, Bonnema SJ ve Bennedbaek FN (2003). Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr Rev*, 24: 102-132.
- Henry JF (1997). "Surgical Anatomy and Embryology Of The Thyroid And Parathyroid Glands And Recurrent and External Laryngeal Nerves" of Endocrine Surgery. Clark, OH, Duh, Q.Y., . W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Hixson JE ve Clayton DA (1985). Initiation of transcription from each of the two human mitochondrial promoters requires unique nucleotides at the transcriptional start sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 2660-2664.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK ve Morgan-Hughes JA (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*, 46: 428-433.
- Holt IJ, Lorimer HE ve Jacobs HT (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 100: 515-524.
- İşgör A (2000). "Tiroit Fizyolojisi", Tiroit Hastalıkları Ve Cerrahisi. İşgör, A. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, 69-122.
- Kopp P (2001). Human genome and disease : Review, The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 1301-1322.
- Kornienko IV ve Vodolazhskii DI (2010). [The regularity of occurrence of single nucleotide polymorphisms in the hypervariability sites control region of the human mitochondrial DNA]. *Mol Biol (Mosk)*, 44: 439-446.
- Krawczak M ve J. S (1998). DNA Fingerprinting, 2nd edn. BIOS Scientific Publishers, New York, 128 p.
- Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S ve Paschke R (2005). Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev*, 26: 504-524.
- Larsen PR, Davies TF ve Hay ID (1998). Thyroid Neoplasia. *Williams Textbook of Endocrinology 9th ed.*, Wilson, JD ve ark. WB Saunders, Philedelphia, 482-515.

- Lee DY ve Clayton DA (1996). Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *J Biol Chem*, 271: 24262-24269.
- Levin BC, Cheng H ve Reeder DJ (1999). A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. *Genomics*, 55: 135-146.
- Lima J, Maximo V, Soares P, Williams D, Bogdanova T, Thomas GA ve Sobrinho-Simoes M (2003). Re: Lohrer,H.D., Hieber,L. and Zitzelsberger,H. (2002) Differential mutation frequency in mitochondrial DNA from thyroid tumours. *Carcinogenesis*, 23, 1577-1582. *Carcinogenesis*, 24: 1155.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P ve J D (2003). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman Company, USA.
- Lohrer HD, Hieber L ve Zitzelsberger H (2002). Differential mutation frequency in mitochondrial DNA from thyroid tumours. *Carcinogenesis*, 23: 1577-1582.
- Masters BS, Stohl LL ve Clayton DA (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, 51: 89-99.
- Maxam AM ve Gilbert W (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 560-564.
- Maximo V, Lima J, Soares P, Botelho T, Gomes L ve Sobrinho-Simoes M (2005). Mitochondrial D-Loop instability in thyroid tumours is not a marker of malignancy. *Mitochondrion*, 5: 333-340.
- Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J ve Sobrinho-Simoes M (2002). 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. *Am J Pathol*, 160: 1857-1865.
- McKinney EA ve Oliveira MT (2013). Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet Mol Biol*, 36: 308-315.
- Meier CA (2000). Thyroid nodules: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 14: 559-575.
- Meller J ve Becker W (2002). The continuing importance of thyroid scintigraphy in the era of high-resolution ultrasound. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29 Suppl 2: S425-438.
- Muller-Hocker J, Jacob U ve Seibel P (1998). Hashimoto thyroiditis is associated with defects of cytochrome-c oxidase in oxyphil Askanazy cells and with the common deletion (4,977) of mitochondrial DNA. *Ultrastruct Pathol*, 22: 91-100.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G ve Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-273.
- Özata M ( 2005). “Tiroit Hastalarına Güncel Yaklaşım”. Epsilon Yayınları, Ankara, 241-244.

- Pacini F ve De Grooth LJ (2001). Thyroid Neoplasia. *Endocrinology* 4th ed., De Grooth I.j. ve ark. WB Saunders, Philadelphia, 1541-1566.
- Papotti M, Gugliotta, P., Fote, G., (1994). "Immunocytochemical Identification Of Oxyphilic Mitochondrion-Rich Cells, *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2: 261
- Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM ve Sidransky D (2001). Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res*, 61: 7623-7626.
- Parsons TJ ve Irwin JA (2000). Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, 288: 1931.
- Poulton J, Deadman ME, Bindoff L, Morten K, Land J ve Brown G (1993). Families of mtDNA re-arrangements can be detected in patients with mtDNA deletions: duplications may be a transient intermediate form. *Hum Mol Genet*, 2: 23-30.
- Rhodin JAG (1995). "An Atlas Of Ultrastructure". W. B. Saunders Company, Philadelphia, 80.
- Rosenthal A, Coutelle O ve Craxton M (1993). Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res*, 21: 173-174.
- Sambrook J ve DW. R ( 1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor labrotory. New York.
- Sambrook J, Fritsch EF ve Maniatis T (2001). *Moleculer cloning; a laboratory manual 3 rd*, Sambrook, J ve ark. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New york, 150-172.
- Sampson RJ, Woolner LB, Bahn RC ve Kurland LT (1974). Occult thyroid carcinoma in Olmsted County, Minnesota: prevalence at autopsy compared with that in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Cancer*, 34: 2072-2076.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, Cohen D, Xiao Y, Esteller M, Jeronimo C, Jordan RC, Nicol T, Koch WM, Schoenberg M, Mazzarelli P, Fazio VM ve Sidransky D (2001). Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res*, 61: 7015-7019.
- Sanger F ve Tuppy H (1951). The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J*, 49: 481-490.
- Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G ve Saccone C (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205: 125-140.
- Schapira AH (2006). Mitochondrial disease. *Lancet*, 368: 70-82.
- Scheffler IE (1999). *Metabolic pathways inside mitochondria*. Mitochondria. Wiley-Liss, New York, 246-272.

- Schneider AB ve Ron E (2000). Carcinoma of follicular epithelium. Werner and Ingbar's The Thyroid 8th ed., Braverman, LE ve ark. Lippincott Williams and Wilkins, Philedelphia, 875-886.
- Schochetman G, Ou CY ve Jones WK (1988). Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 158: 1154-1157.
- Schon EA ve Dimauro S (2002b). Primary Disorders of Mitochondrial DNA and the Pathophysiology of mtDNA-Related Disorders. *Mitochondria in Pathogenesis*, Nieminen, JJLL. Kluwer Academic Publishers, New York, 64-80.
- Schon EA, Naini A ve Shanske S (2002a). Identification of mutations in mtDNA from patients suffering mitochondrial diseases. *Methods Mol Biol*, 197: 55-74.
- Serra S ve Asa SL (2008). Controversies in thyroid pathology: the diagnosis of follicular neoplasms. *Endocr Pathol*, 19: 156-165.
- Shadel GS ve Clayton DA (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*, 66: 409-435.
- Soong NW ve Arnheim N (1996). Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions. *Methods Enzymol*, 264: 421-431.
- Stefaneanu L ve Tasca C (1979). An electron-microscopic study of human thyroid cancer. *Endocrinologie*, 17: 233-239.
- Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C ve Weintraub BD (2002). Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*, 82: 473-502.
- Taanman JW (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410: 103-123.
- Tallini G, Ladanyi M, Rosai J ve Jhanwar SC (1994). Analysis of nuclear and mitochondrial DNA alterations in thyroid and renal oncocyctic tumors. *Cytogenet Cell Genet*, 66: 253-259.
- Tan GH ve Gharib H (1997). Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med*, 126: 226-231.
- Tong BC, Ha PK, Dhir K, Xing M, Westra WH, Sidransky D ve Califano JA (2003). Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. *J Surg Oncol*, 82: 170-173.
- Vielhaber S, Varlamov DA, Kudina TA, Schroder R, Kappes-Horn K, Elger CE, Seibel M, Seibel P ve Kunz WS (2002). Expression pattern of mitochondrial respiratory chain enzymes in skeletal muscle of patients harboring the A3243G point mutation or large-scale deletions of mitochondrial DNA. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61: 885-895.
- Von Kleist-Retzow JC, Schauseil-Zipf U, Michalk DV ve Kunz WS (2003). Mitochondrial diseases--an expanding spectrum of disorders and affected genes. *Exp Physiol*, 88: 155-166.



- William SK ve Michael RC (2002). Concepts of Genetics. Öner, C. Palme Yayıncılık, Ankara, 744-745.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M ve KM. G.U.H-B (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics, Higuchi RG, PS, Prager EM, Sage RD, Stoneking M. Biol J Linn Soc, 375-400.
- Witte J, Lehmann S, Wulfert M, Yang Q ve Roher HD (2007). Mitochondrial DNA mutations in differentiated thyroid cancer with respect to the age factor. World J Surg, 31: 51-59.
- Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, Vergani L, Angeli P, Gringeri E, Jacobs HT ve Holt IJ (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. Cell, 111: 495-505.
- Yeh JJ, Lunetta KL, van Orsouw NJ, Moore FD, Jr., Mutter GL, Vijg J, Dahia PL ve Eng C (2000). Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. Oncogene, 19: 2060-2066.
- Yiğit G. Y, R. (2001). Tiroid Fizyolojisi. Ed: Ünal G.:Tiroid Hastalıkları. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 3: 28-64.
- Yoza BK ve Bogenhagen DF (1984). Identification and in vitro capping of a primary transcript of human mitochondrial DNA. J Biol Chem, 259: 3909-3915.
- Zischler H (1999). Mitochondrial DNA:Diversity analysis and possible pitfalls. DNA Profiling and DNA fingerprinting.1 st ed, Eppelen, J ve ark. Birkhäuser Verlag., Basel, 117-131.

## ÖZGEÇMİŞ

Esra ULU; 16.05.1987 tarihinde TEKİRDAĞ'da doğdu. İlköğrenimini ve ortaöğrenimini Öğretmen Mediha Mehmet Tetikol İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Tekirdağ Namık Kemal Lisesi'nde (NKL) tamamladı. Süleyman Demirel Üniversitesi Şarkikarağaç MYO Gıda Teknolojileri Bölümü'nden 2007 yılında Gıda Teknikeri unvanıyla mezun olup, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında Biyolog unvanıyla mezun oldu. 2012-2013 Eğitim Öğretim yılının güz yarıyıl döneminde Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2013 yılında 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresinde "Lösin fermuar-EF- el motifi içeren transmembran protein 1 (LETM1)'in aşırı ekspresyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin araştırılması" ve "Türk populasyonunda tiroit nodüllerinde D-Loop bölgesinde mitokondriyal DNA mutasyonlarının analizi-ilk bulgular" başlıklı poster sunumlarını gerçekleştirdi. 2012 yılından günümüze yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.